



УДК 547.963.32.02

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК ФАГА λ plac 5—1 В РАЙОНЕ *EcoRI*-САЙТА, КОДИРУЮЩАЯ С-КОНЦЕВОЙ УЧАСТОК β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *E. COLI***Микрюков Н. Н., Петров Н. А., Каргинов В. А.,
Василенико С. К.**

Специальное конструкторско-технологическое бюро биологически активных веществ
Главмикробиопрома при Совете Министров СССР;

Институт органической химии Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

Трансдуцирующий фаг λ plac 5—1 содержит единственный сайт рестрикции для эндонуклеазы *EcoRI*, находящийся в С-концевой области гена β -галактозидазы *E. coli* [1]. Этот фаг является удобным вектором для клонирования фрагментов ДНК: гибриды легко тестируются как *lac*⁻любим из известных методов. Полная аминокислотная последовательность β -галактозидазы была определена [2, 3]. О'Фаррел и сотр. [4], исследуя трансляцию *in vivo* гибридных плазмид, несущих ген β -галактозидазы, и исходя из знания аминокислотной последовательности белка, определили наиболее вероятное местоположение *EcoRI*-сайта между глутаминовой кислотой-1004 и фенилаланином-1005. В свете этих данных представлялось интересным определить первичную структуру ДНК λ plac 5—1 в районе *EcoRI*-сайта.

Суммарный гидролизат ДНК λ plac 5—1 рестриктазами *EndoR·EcoRI* и *EndoR·BsuI* дотраивали с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии [α ³²-P]dATP и dTTP. При этом метка вводилась почти исключительно в два *Bsu/EcoRI*-фрагмента, а также в *Bsu*-фрагмент, содержащий левый конец ДНК фага. После гель-фильтрации на сефадексе G-50 фрагменты разделяли в пластинах 4% полиакриламидного геля, радиоавтографировали и из геля извлекали два *Bsu/EcoRI*-фрагмента длиной 70 и 170 нуклеотидных пар. Первичную структуру этих рестриктовок определяли методом Максама—Гилберта [5] с некоторыми модификациями [6, 7].

На схеме приведена последовательность нуклеотидов ДНК фага λ plac 5—1 в области *EcoRI*-сайта относительно с аминокислотной последовательностью С-конца β -галактозидазы. Из полученных данных видно, что они полностью соответствуют друг другу. Участок действия рестриктазы *EcoRI* расположен в районе триплетов САА и ТТС, кодирующих глутаминовую кислоту и фенилаланин, которые занимают 1004-е и 1005-е положения от N-конца белка [3], что полностью подтверждают данные О'Фаррела и сотр. [4]. Необходимо отметить наличие трех последовательно расположенных стоп-кодонов ТАА непосредственно за структурной частью гена β -галактозидазы.

...Gln Leu Met Glu Thr Ser His⁹⁷⁰ Arg His Leu Leu His Ala
 5'-CC...CAA CTG ATG GAA ACC AGG CAT CGC CAT CTG CTG CAC GCG
 3'-GG....GTT GAC TAC CTT TGG TCG GTA GCG GTA GAC GAC GTG CGC
Bsu/EcoRI-170

Glu Glu Gly Thr⁹⁸⁰ Trp Leu Asn Ile Asp Gly Phe His Met Gly⁹⁹⁰ Ile
 GAA GAA GGC ACA TGG CTG AAT ATC GAC GGT TTC CAT ATG GGG ATT
 CTT CTT CCG TGT ACC GAC TTA TAG CTG CCA AAG GTA TAC CCC TAA
 Gly Gly Asp Asp Ser Trp Ser Pro¹⁰⁰⁰ Ser Val Ser Ala Glu Phe
 GGT GGC GAC GAC TCT TGG AGC CCG TCA GTA TCG GCG G/AA TT C
 CCA CCG CTG CTG AGA ACC TCG GGC AGT CAT AGC CGC C TT AA/G
EcoRI

Gln Leu Ser Ala¹⁰¹⁰ Gly Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys
 CAG CTG AGC GCC GGT CGC TAC CAT TAC CAG TTG GTC TGG TGT
 GTC GAC TCG CGG CCA GCG ATG GTA ATG GTC AAC CAG ACC ACA

1024
 Gln Lys
 GAA AAA TAA TAA TAA CCG GGC..GG-3'
 GTT TTT ATT ATT ATT GGC CCG..CC-5'

Bsu/EcoRI-70

Примечание. Первичная структура ДНК фага λ plac 5-1 в районе *EcoRI*-сайта соотносительно с кодируемой ею аминокислотной последовательностью С-концевого участка β -галактозидазы *E.coli*. Подчеркнуты участки ДНК, нуклеотидная последовательность которых определялась экспериментально.

Определенная в данной работе нуклеотидная последовательность может быть полезна в тех случаях, когда для клонирования и экспрессии используется в качестве места встройки *EcoRI*-сайт гена β -галактозидазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Charnay P., Luise A., Fritsch A., Tiollais P. (1979) *Mol. and Gen. Genet.*, **170**, 171-178.
2. Fowler A. V., Zabin I. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1507-1510.
3. Fowler A. V., Zabin I. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 5521-5525.
4. O'Farrel P. H., Polisky B., Gelfand D. H. (1978) *J. Bacteriol.*, **134**, 645-654.
5. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560-564.
6. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1420-1422.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1977) *Биоорган. химия*, **4**, 1281-1283.

Поступило в редакцию
 26.VI.1980

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF A λ plac 5-1 DNA REGION CODING FOR A COOH-TERMINAL PART OF *Escherichia coli* β -GALACTOSIDASE

MIKRYUKOV N. N., PETROV N. A., KARGINOV V. A., VASSILENKO S. K.

Special Technological Bureau for Designing of Biologically Active Compounds, Novosibirsk; Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk

The nucleotide sequence of λ plac 5-1 DNA at the *EcoRI* endonuclease site has been determined. When compared with the amino acid sequence of *E.coli* β -galactosidase, it appears to code for a COOH-terminal part of the protein. The position of the *EcoRI* site corresponds to the GAA and UUC codons for Glu-1004 and Phe-1005, respectively.