



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 14 * № 2 * 1988

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.143.5:577.175

СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ кДНК ПРООПИОМЕЛАНОКОРТИНА ИЗ ГИПОФИЗА НОРКИ (*MUSTELLA VISON*)

Головин С. Я., Бондарь А. А., Каргинов В. А.*,
Морозов И. В., Зеленин С. М., Попова В. С.,
Мертьевцов Н. П.

Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского
отделения Академии наук СССР;

*Институт клинической и экспериментальной медицины Сибирского
отделения Академии медицинских наук СССР, Новосибирск

Проопиомеланокортин (ПОМК) представляет собой белок-предшественник целого ряда пептидных гормонов гипофиза: адренокортикотропина (АКТГ), α, β, γ -мелапотропинов, β -липотропина (β ЛПГ), β -эндорфина [1]. Экспрессия гена ПОМК в организме млекопитающих находится под мультигормональным контролем [2]. Ценную информацию о тканевой специфичности синтеза ПОМК, о тонких механизмах гормональной регуляции экспрессии его гена можно получить, используя методы рекомбинантных ДНК. Клонированные ДНК-копии, синтезированные на матричных РНК ПОМК, служат молекулярными зондами при локализации генов ПОМК на хромосомах с помощью гибридизации *in situ*.

Ранее были клонированы и секвенированы ДНК, комплементарные мРНК ПОМК быка [3], свиньи [4], человека [5], а также фрагменты геномной ДНК, кодирующие ПОМК мыши [6], быка [7], человека [8] и крысы [9]. Существенный интерес представляет клонирование и структурный анализ мРНК ПОМК из других видов млекопитающих, а также последующий сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, выявление консервативных и вариабельных участков молекулы мРНК.

В настоящей работе впервые осуществлено клонирование и определение первичной структуры фрагмента ДНК-копии мРНК проопиомеланокорттина норки (*Mustella vison*). Гипофизы норки получали из Экспериментального хозяйства Института цитологии и генетики СО АН СССР сразу после забоя животных и замораживали в жидком азоте. Суммарную РНК из ткани гипофиза выделяли при помощи фенольной депротеинизации или центрифугированием ткани, обработанной 4 М гуанидинизотиоцианатом, через слой 5,7 М CsCl [10]. Синтез одно- и двухцепочечной комплементарной ДНК проводили при помощи обратной транскриптазы вируса птичьего миелобластоза.

Клонирование кДНК ПОМК норки в составе плазмида pBR327 осуществляли GC-коннекторным методом по стандартной схеме [10], используя для трансформации штамм *E. coli* JC 5183. Поиск клонов, содержащих кДНК ПОМК, проводили путем гибридизации *in situ* бактериальных колоний с синтетическим олигонуклеотидом TTC-ATG-ACC-TCC-GA, кодирующим участок β -эндорфина; выбор структуры зонда определялся тем, что нуклеотидная последовательность этого участка одинакова у всех ранее секвенированных генов ПОМК млекопитающих.

	G	1
N-Концевой пептид SerGluProGlyArgArgGluGlyLysArgSerTyrSerMetGluHisPheArgTrpGly AGCGAGCCCGGCCGCGAGGGCAAGCGCTCCTATTCCATGGAGCACTTCGCTGGGC	20 61	
LysProValGlyLysLysArgArgProValLysValTyrProAsnGlyAlaGluAspGlu AAGCCTGTGGGCAAGAACGGCGCCGGTGAAAGGTGTACCCCAACGGCGCCGAGGACGAG	40 121	
SerAlaGluAlaPheProLeuGluPheLysArgGluLeuAlaGlyGluArgProGluPro TCGGCCGAGGCCTTCCCCTCGAGTTAAGAGAGAGCTGGCCGGGGAGCGGCCCTGAGCCG	60 181	
AlaLeuGlyProGluGlyAlaAlaGluMetAlaAlaLeuAlaAspLeuGluTyrGly GCGCTCGGCCCGAGGGCGCGCCGAGGGCATGGCGCCCTGGCCGACCTGGAGTACGGC	80 241	
LeuValAlaLysAlaGluValAlaGluLysLysAspAspGlyProTyrLysMetGluHis CTGGTGGCGAAGGCCGAGGTGGCGAGAAGAAGGACGACGGCCCTACAAGATGGAGCAC	100 301	
PheArgTrpGlySerProGlyLysAspLysArgTyrGlyGlyPheMetThrSerGluLys TTCCGCTGGGGCAGCCGGCAAGGACAAGCGCTACGGCGCTTCATGACCTCCGAGAAG	120 361	
SerGlnThrProLeuValThrLeuPheLysAsnAlaIleIleLysAsnAlaHisLysLys AGCCAGACCCCCCTGGTGACGCTGTTCAAAACGCATCATCAAGAACGCCACAAGAAG	140 421	
GlyGln*** GGCCAGTGAGGGCACCGCGGGGCCAGAGGCTTCTCTCCCCCAGGAAGTCGACCCTAAGG	143 481	
CCCCCCCCCTCTCCTCGCCTGCCCTCCGCCCTCCGGCTGGGTGTGCTCCTCGCTCAG	541	
GGCGTGACGGCCCGATAGTCAGCCTTTCAAGCTGACTGTAGTT	585	

Первичная структура ДНК-копии мРНК ПОМК из гипофиза норки, и кодируемая ею аминокислотная последовательность. Расположение участков кДНК, кодирующих биологически активные домены ПОМК, указано стрелками над последовательностью. Альтернативные сайты процессинга ПОМК [1] заключены в прямоугольные рамки. Звездочками помечен терминирующий кодон. Стрелками обозначены концы пептидов, образующихся в результате данного варианта процессинга.

Рестрикционный анализ выделенных гибридных плазмид показал наличие вставок размером 400–600 п.о. Для облегчения секвенирования одна из вставок (длиной около 600 п.о.) была переклонирована в плазмиду pUC18 по сайту *Pst*I. Полученная гибридная плазмида pUC-MPOMC1 использовалась для определения первичной структуры кДНК ПОМК методом Максама — Гилберта [11]. На рисунке представлена первичная структура клонированной ДНК-копии мРНК ПОМК норки. Расшифрованная последовательность кодирует фрагмент аминокислотной последовательности N-концевого пептида, полную последовательность АКТГ и βЛПГ и содержит часть 3'-концевой нетранслируемой области мРНК ПОМК. С помощью компьютерного анализа нами установлено, что гомология района мРНК ПОМК норки (с 1-го по 430-е звено), кодирующего биологически активные домены ПОМК, с соответствующим районом мРНК ПОМК человека [5] составляет 84,6 %. Детальный сравнительный анализ первичных структур генов ПОМК из различных организмов осуществляется в настоящее время и будет предметом отдельной публикации.

Полученная в настоящей работе клонированная кДНК ПОМК используется сейчас как молекулярный зонд для локализации гена ПОМК на хромосомах норки гибридизацией *in situ*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Imura H., Kato Y., Nakai Y., Tanaka I., Jingami H., Koh T., Yoshimasa T., Tsudaka T., Suda M., Sakamoto M., Morii M., Takahashi H., Tojo K., Sugawara A. // J. Endocrinol. 1985. V. 107. № 1. P. 147–157.
2. Vale W., Vaughan J., Smith M., Yamamoto G., Rivier J., Rivier C. // Endocrinology. 1983. V. 113. N 3. P. 1121–1131.
3. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Numa S. // Nature. 1979. V. 278. № 5703. P. 423–427.
4. Boileau G., Barbeau C., Jeannotte L., Chrétien M., Drouin J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 11. № 22. P. 8063–8071.
5. Головин С. Я., Каргинов В. А., Бондарь А. А., Беклемишев А. Б., Чехранова М. К., Мергетцов Н. П., Панков Ю. А. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 4. С. 562–564.
6. Notake M., Tobimatsu T., Watanabe Y., Takahashi Y., Mishina M., Numa S. // FEBS Lett. 1983. V. 156. № 1. P. 67–71.
7. Nakanishi S., Teranishi Y., Watanabe Y., Notake M., Noda M., Kakidani H., Jingami H., Numa S. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. № 2. P. 429–438.
8. Takahashi H., Hakamata Y., Watanabe Y., Kikuno R., Miyata T., Numa S. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 19. P. 6847–6858.
9. Drouin J., Chamberland M., Charron J., Jeannotte L., Nemec M. // FEBS Lett. 1985. V. 193. № 1. P. 54–58.
10. Мануарис Т., Фрич Э., Сэмбрюк Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 192.
11. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560–564.

Поступило в редакцию
30.I.1987

После доработки
22.V.1987

SYNTHESIS, CLONING AND SEQUENCING OF THE PROOPIOMELANOCORTIN cDNA FROM THE PITUITARY GLAND OF MINK *MUSTELLA VISON*

GOLOVIN S. Ya., BONDAR A. A., KARGINOV V. A.*,
MOROSOV I. V., ZELENIN S. M., POPOVA V. G.,
MERTVETSOV N. P.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Academy
of Sciences of the USSR;*

**Institute of Clinic and Experimental Medicine, Siberian Division, Academy
of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Total RNA was extracted from *Mustella vison* pituitary gland, and cDNA for proopiomelanocortin mRNA was synthesised and cloned. A 600 b. p. insert encoding for total ACTH, β LPH and 3'-nontranslated end of the mRNA was sequenced using the Maxam – Gilbert technique.