



УДК 577.113.5

## НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ $\alpha$ - И $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦ ЛЮЦИФЕРАЗЫ *PHOTOBACTERIUM* *LEIIGNATHI*

Илларионов Б. А., Протопопова М. В.\*, Каргинов В. А.\* \*,  
Мертецов Н. П.\*\*\*, Гительзон И. И\*.

Красноярский государственный университет;  
\*Институт биофизики Сибирского отделения Академии наук СССР,  
Красноярск;

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

\*\*\*Новосибирский институт биоорганической химии Сибирского отделения  
Академии наук СССР

Бактериальная люцифераза (КФ 1.14.14.3) —  $\alpha, \beta$ -гетеродимерный белок, который катализирует *in vitro* окисление восстановленного флавиномононуклеотида и алифатического альдегида и восстанавливает кислород. При этом в ходе реакции излучается свет. Биохимические исследования этого экзотического белка позволили достаточно полно выяснить субстратную специфичность, кинетические параметры реакции, физико-химические свойства люциферазы, но не дали определенных ответов на вопросы о значении «люциферазного шунта» для метаболизма бактериальной клетки и механизме излучения света [1, 2].

Изучение клонированных генов люциферазы и определение их нуклеотидной последовательности может способствовать решению такого рода задач. С этой целью ранее нами был клонирован фрагмент хромосомной ДНК морской бактерии *Photobacterium leiognathi*, содержащий интактные гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц люциферазы [3]. В настоящей работе мы провели определение первичной структуры клонированного фрагмента ДНК. Мы использовали гибридную плазмиду рPHL 12, несущую фрагмент ДНК *P. leiognathi* размером 2,8 тыс. нуклеотидных пар в составе векторной плазмиды PUC19 [4]. Анализ нуклеотидной последовательности производили методом Максама — Гилберта, используя рестрикты, меченные с помощью ДНК-полимеразы I (фрагмент Кленова) и дезоксирибонуклеозид [ $\alpha$ - $^{32}$ P]трифосфатов [5]. Стратегия секвенирования изображена на рис. 1.

На рис. 2 приведена нуклеотидная последовательность клонированного фрагмента ДНК *P. leiognathi*. В этой последовательности обнаруживаются две достаточно большие открытые рамки считывания, ограниченные сайтами инициации и терминации трансляции. Кодированные пептиды

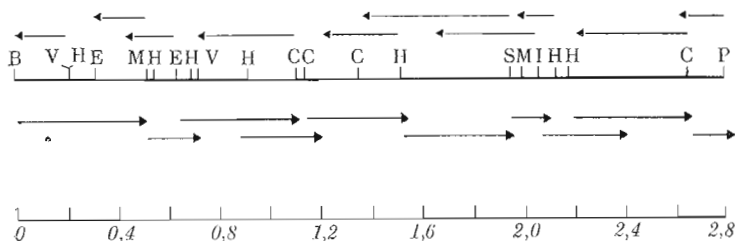


Рис. 1. Стратегия секвенирования фрагмента ДНК *P. leiognathi*. Сайты рестрикции: В — *Bam*HI, С — *Cla*I, Е — *Eco*RI, Н — *Hin*I, I — *Hind*III, М — *Msp*I, Р — *Pst*I, S — *Sal*GI, V — *Mva*I. Линиями со стрелками отмечены секвенированные участки рестрикторов, внизу — шкала в тысячах нуклеотидных пар

TCGAGCAGCCATTGGCTTAGACAGTGAAGTGATTGATTTAGTTGATGATATTAGTGAGCCA 61

AACTTTGAAGATCTCACCATTATTACAGTTAATGAACGTCGTTG^AAAAATAAAATTGAA 121

AACGAAATGTTCCGCTAGCGCTTAAACCAATACCTATTC AAGTCATCAAAGGAAAAGATA 181

MetLysPheGlyAsnIleCysPheSerTyrGlnProProGlyGluSerHisLysGluVal 241  
ATGAAATTTGGCAATATTTGTTTTCTATACCAGCCACCAGGTGAATCTCATAAAGAAGTC

MetAspArgPheValArgLeuGlyValAlaSerGluGluLeuAsnPheAspThrPheTrp 301  
ATGGATCGCTTTGTTCTGCTTGCGGTGCTTCAGAAGAATTAACCTCGACACCTTCTGG

ThrLeuGluHisHisPheThrGluPheGlyLeuThrGlyAsnLeuTyrValAlaCysAla 361  
ACACTTGAGCACCACCTTCACTGAATTCGGCCTAACAGGTAACCTATATGTTGCTTGTGCC

AsnIleLeuGlyArgThrLysLysLeuAsnValGlyThrMetGlyIleValLeuProThr 421  
AATATCTTGGTCGTACCAAAAACTTAACGTCGGCACAAATGGGTATCGTACTACCAACA

AlaHisProAlaArgGlnMetGluAspLeuLeuLeuLeuAspGlnMetSerLysGlyArg 481  
GCTCACCCTGCTCGCAAAATGGAAGATCTACTGCTACTGGATCAAATGTCAAAGGACGT

PheAsnPheGlyValValArgGlyLeuTyrHisLysAspPheArgValPheGlyValThr 541  
TTTAACCTTGGTGTAGTACGTGGTCTATACCATAAAGATTTCCGGGTATTTGGTGTACG

MetGluAspSerArgSerIleThrGluAspPheHisLysMetIleMetAspGlySerLys 601  
ATGGAAGATTCCTGCTCGACTCACTGAAGATTTCCATAAAATGATCATGGACGGCTCAA

SerGlyValLeuHisThrAspGlyLysAsnIleGluPheProAspValAsnValTyrPro 661  
TCAGGCGTTTTACACACTGATGGTAAAAACATGAATTCAGATGTAATGTCTATC.A

GluAlaTyrLeuAspLysIleProThrCysMetThrAlaGluSerAlaAlaThrThrThr 721  
GAGGCTACCTAGACAAGATCCCTACTTGTATGACAGCGGAATCTGCGGCGACAACGACC

TrpLeuAlaGluArgGlyLeuProMetValLeuSerTrpIleIleThrThrSerGluLys 781  
TGGTAGCAGAACGTGGTTTGC AATGCTACTGAGCTGGATCATCACCACCGAGAGAAA

LysAlaGlnMetGluLeuTyrAsnGluIleAlaAlaGluHisGlyHisAspIleHisAsn 841  
AAAGCACAGATGGAATATACAATGAAATTCAGCTGAGCATGGGCACGATATTCACAAT

IleAspHisSerMetThrPheIleCysSerValAsnGluAspProGluLysAlaGluSer 901  
ATCGACCACAGCATGACCTTCACTGTTCCGTAAATGAAGATCCAGAAAAAGCAGAAAGT

ValCysArgAspPheLeuSerAsnTrpTyrGluSerTyrThrAsnAlaThrAsnIlePhe 961  
GTCTGCCGTGACTTCTATCAAACGGTACGAGTCTACACCAATGCGACCAATATCTTT

LysAspSerAsnGlnThrArgGlyTyrAspTyrHisLysGlyGlnTrpArgAspPheVal 1021  
AAAGACAGTAACCAAACTCGTGGTTATGACTATCACAAAGGTCAATGGCGTGACTTTGTA

LeuGlnGlyHisThrAspThrArgArgArgLeuAspTyrSerAsnAsnLeuAsnProVal 1081  
CTACAAGGCCATACCGATACCCGTCGTCGCTTGATTACAGTAATAACCTAAACCTGTT

GlyThrProGluLysCysIleGluIleIleGlnArgAspIleAspAlaThrGlyIleAsn 1141  
GGTACACCTGAAAAATGATTAAGAAATATCCAGCGAGATATCGATGCAACAGGGATCAAC

AsnIleThrLeuGlyPheGluAlaAsnGlySerGluGlnGluIleIleAlaSerMetGlu 1201  
AACATCACCTTGGTTTTGAAGCAACGGTTCTGAGCAAGAAATCATCGCATCGATGGAA

ArgPheMetThrGlnValAlaProTyrLeuLysAspProLys\*\*\* 1261  
CGCTTCATGACACAAGTGGCGCCATACCTAAAAGATCCGAAATAAACTGCCACATTAAG

MetAsnPheGlyLeuPhePheLeuAsn

CCATTGAATTAATTTAAATAAGGAAAAAACATGAATTTTGGATTATCTTTCTGAAC 1321

PheGlnLeuLysGlyMetThrSerGluAlaValLeuAspAsnMetIleAspThrIleAla 1381  
TTTCAGCTCAAAGGTATGACATCTGAAGCAGTACTAGACAACATGATCGATACTATTGCT

LeuValAspLysAspGluTyrHisPheLysThrAlaPheValAsnGluHisHisPheSer 1441  
TTGGTTGATAAAGACGAGTACCCTTCAAACCGCATTTGTGAACGAACACCATTTTCT

LysAsnGlyIleValGlyAlaProMetThrAlaAlaSerPheLeuLeuGlyLeuThrGlu 1501  
AAAACGGTATCGTTGGGGCACCTATGACAGCTGCAAGTTTCTACTAGGTTTAACTGAA

ArgLeuHisIleGlySerLeuAsnGlnValIleThrThrHisHisProValArgIleAla 1561  
CGCCTTCATATTGGTTCATTGAATCAAGTGATCACCCTCACCACCCAGTCCGATTGCA

GluGluAlaSerLeuLeuAspGlnMetSerAspGlyArgPheIleLeuGlyLeuSerAsp 1621  
GAAGAAGCTAGCTTACTTGATCAAATGTCAGATGGGCGTTTTATTCTTGGGTTAAGTGT

CysValSerAspPheGluMetAspPhePheLysArgGlnArgAspSerGlnGlnGlnGln TGTGTAGTATTTCGAGATGGACTTCTTTAAACGCCAACGATAGCCAACAACAACA	168T
PheGluAlaCysTyrGluIleLeuAsnAspGlyIleThrThrAsnTyrCysTyrAlaAsn TTCGAAGCCTGTACGAAATCTAAATGACGGTATCACACCACTACTGTTATGCGAAT	174T
AsnAspPheTyrAsnPheProLysIleSerIleAsnProHisCysIleSerLysGluAsn AATGACTTTTATAACTTCCCAAAAATCTCTATCAACCCACTGTATTAGTAAAGAAAAC	180T
LeuLysGlnTyrIleLeuAlaThrSerMetGlyValValGluTrpAlaAlaLysLysGly CTAAAACAGTATATTTTAGCACCAGCATGGGCGTGGTGAATGGGCTCGAAAAAGGG	186T
LeuProLeuThrTyrArgTrpSerAspThrLeuAlaGluLysGluAsnTyrTyrGlnArg TTACCACTGACTTACCCTGGAGTGATACGCTGGCAGAAAAAGAAAATTACTATCAACGT	192T
TyrLeuThrValAlaAlaGluAsnAsnValAspIleThrHisValAspHisGlnPhePro TATTTAACTGTCCGCTGAAAATAATGTCGACATTACTCATGTTGATCACCAATTCCCA	198T
LeuLeuValAsnIleAsnProAspArgAspIleAlaLysGlnGluMetArgAspTyrIle TTACTTGTAAACATTAATCCGGATCGTGATATTGCTAAACAAGAAATGCGTGACTATATC	204T
ArgGlyTyrIleAlaGluAlaTyrProAsnThrAspGlnGluGluLysIleGluGluLeu CGTGGTATATTGCTGAAGCTTACCCAAATACAGATCAAGAAGAAAAAATGAAGAGCTA	210T
IleLysGlnHisAlaValGlyThrGluAspGluTyrTyrGluSerSerLysTyrAlaLeu ATTAAGCAACATGCGGTTGGTACAGAAGATGAATATTATGAATCATCTAAATATGCTTTA	216T
GluLysThrGlySerLysAsnValLeuLeuSerPheGluSerMetLysAsnLysAlaAla GAAAAACAGGTTCAAAGAATGATTGCTATCTTTGAATCAATGAAAAATAAGCCGCT	222T
ValIleAspLeuIleAsnMetValAsnGluLysIleLysLysAsnLeu*** GTCATCGACCTTATTAATGTTAATGAAAAAATCAAGAAAAATCTATAATAATAACA	228T
GGATAATAAAAAATGACAAAATGGAATTATGGCGTCTTCTTCTTAATTTTTACCATGTAG	234T
GACAGCAAGAGCCATCATTAACCATGAGCAATGCGTTAGAACATACGTATTATAGATG	240T
AAGATACATCTATCTATGATGTTGTTGCATTTAGCGAACCCACATAGATAAAGCTACA	246T
ATGATGAAACGAAATTAGCGCCATTGTTAGCCTTGGCAACAATTCATATTTTAGCCA	252T
CCAGCCCTGAAACGGTGTAAAAGCGGCTAAATATGGGATGCCACTACTGTTAAATGGG	258T
ATGATAGTCAACAAAAGCGTATCGAATTATTAACCATTACCAAGCAGCTGCGGCTAAAT	264T
TTAATGTCGATATTGCAAGGTGTCGTCATCGATTAATGTTATTTGTCATGTTAATGACA	270T
ACCCAACGCAAGCCAAAGCTGAGCTTAGCATTACTTAGAAGATTACCTCTTTACACCC	276T
AAGCAGAAACATCCATTGATGAAATCATCAATAGCAATGCTGCAG	280T

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента ДНК *P. leiognathi* и аминокислотная последовательность  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц люциферазы. Звездочками обозначены нуклеотиды кодонов, терминирующих изображенные рамки считывания. К 5'-концу приведенного фрагмента примыкает полилинкерный участок векторной ДНК, способ клонирования описан в работе [4]

(рис. 2) содержат 354 и 325 аминокислот и имеют молекулярную массу 40 375 и 37 377 Да соответственно, что очень близко к молекулярной массе  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц люциферазы *P. leiognathi*, определенной другими методами [6]. Сравнение аминокислотных последовательностей (рис. 2) с известными аминокислотными последовательностями  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц люциферазы *Vibrio harveyi* [7, 8] обнаруживает существенную гомологию (50—60%). Ранее нами было показано, что клетки с плазмидой рPHL 12 излучают свет при добавлении в среду одного из субстратов люциферазы — додецилового альдегида, однако удаление из состава плазмиды фрагментов 0,693 или 2014—2806 (рис. 1, 2) приводит к исчезновению активной люциферазы [4]. Все это дает основание заключить, что изображенные на рис. 2 две открытые рамки считывания соответствуют субъединицам люциферазы *P. leiognathi*.

Полученный фактический материал после сравнения с аминокислотными последовательностями субъединиц люциферазы *V. harveyi* поможет локализовать консервативные районы люциферазы, важные для функ-

ционирования белка, а также позволит приступить к изучению механизма действия люциферазы путем получения методами локализованного мутагенеза направленных аминокислотных замен.

Авторы благодарят И. В. Морозова за предоставленные программы компьютерной обработки нуклеотидных последовательностей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hastings J. W., Nealson K. H. // Annu. Rev. Microbiol. 1977. V. 31. P. 549—595.
2. Hastings J. W., Potricus C. J., Gupta S. C., Kurfürst M., Makemson J. C. // Adv. Microb. Physiol. 1985. V. 26. P. 235—291.
3. Илларионов Б. А., Протопопова М. В. // Клонирование и экспрессия генов люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* в плазмидном векторе pUC18. Препринт Института биофизики СО АН СССР, Красноярск, 1986.
4. Илларионов Б. А., Протопопова М. В. // Молек. генет. микробиол. и вирусол. 1987. № 8. С. 41—46.
5. Maxam A. M., Gilbert W. / Meth. Enzymol. 1978. V. 65. P. 499—560.
6. Гительсон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е., Примакова Г. А., Барцев С. И., Крамасюк Г. А., Петушков В. Н., Межевикин В. В., Высоцкий Е. С., Заворьев В. В., Красасюк В. А. // Светящиеся бактерии. Новосибирск: Наука, 1984.
7. Cohn D. H., Mileham A. J., Simon M. I., Nealson K. H., Rausch S. K., Bonam D., Baldwin T. O. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 10. P. 6139—6146.
8. Johnston T. C., Thompson R. B., Baldwin T. O. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 11. P. 4805—4811.

Поступило в редакцию  
6.VII.1987

#### NUCLEOTIDE SEQUENCE OF GENES OF THE LUCIFERASE $\alpha$ AND $\beta$ SUBUNITS FROM *PHOTOBACTERIUM LEIOGNATHI*

ILLARIONOV B. A., PROTOPKOVA M. V.\*, KARGINOV V. A.\*\*\*, MERTVETSOV N. P.\*\*\*,  
GITELSON I. I.\*

*Krasnoyarsk State University; \* Institute  
of Biophysics, Krasnoyarsk; \*\* Institute of Clinical  
and Experimental Medicine, Novosibirsk;  
\*\*\* Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry*

Nucleotide sequence of the *Photobacterium leiognathi* DNA containing genes of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of luciferase has been determined. We also deduced amino acid sequence and molecular mass of luciferase and localized luciferase genes in the sequenced DNA fragment.