



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 14 * № 4 * 1988

ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.214.(334.3+622)

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗУ БАКТЕРИИ

I. КЛОНИРОВАНИЕ *groBC*-ОПЕРОНА

PSEUDOMONAS PUTIDA И ЕГО ФИЗИЧЕСКАЯ КАРТА

*Бородин А. М., Данилкович А. В., Алликкеметс Р. Л.,
Монастырская Г. С.*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Данная работа продолжает цикл исследований по структурно-функциональной характеристике ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактерий (нуклеозидтрифосфат : РНК-нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.6). Ранее была установлена первичная структура субъединиц минимального фермента *E. coli* [1–3] и β -субъединицы РНК-полимеразы *Salmonella typhimurium* [4], идентифицированы субъединицы, контактирующие с ДНК-матрицей, РНК-продуктом и субстратами в активном транскрипционном комплексе [5], а также локализованы мутации устойчивости фермента к антибиотикам рифампицину и стрептолидигину [6–9]. Структурно-функциональное изучение РНК-полимеразы бактерий значительно затруднено из-за больших размеров фермента и его субъединичного строения. Одним из возможных методов исследований в этом направлении может быть структурно-эволюционный анализ, основанный на сопоставлении структуры гомологичных белков и соответствующих им генов. Наличие консервативных участков может предполагать их функциональную значимость [10].

Структурно-эволюционный анализ гена *groB* *S. typhimurium* и *E. coli* показал высокую консервативность β -субъединиц РНК-полимеразы этих родственных видов бактерий, в результате чего локализовать функционально важные участки не удалось. Аналогичный анализ генов *groBC*-оперона (кодирующего β - и β' -субъединицы РНК-полимеразы) бактерии *Pseudomonas putida*, эволюционно удаленной от бактерий кишечной группы, должен дать важную информацию о вырожденности структуры генов β - и β' -субъединиц фермента, а также о распределении консервативных и вариабельных участков этих субъединиц.

Для клонирования *EcoRI*-фрагмента *groBC*-оперона *P. putida* (5,5 т.п.о.; размеры были установлены в результате геномной blot-гибридизации с *EcoRI*-C-фрагментом *groBC*-оперона *E. coli*) хромосомная ДНК *P. putida*, штамм PAW 340 (Sm^r), была обработана рестриктазой *EcoRI* и лигирована с дефосфорилированным вектором pTZ19R с последующей трансформацией *E. coli* TG-1. Blot-гибридизационный анализ плазмид из клонов, давших положительный сигнал, позволил выявить плазмиду pAB5, содержащую искомый фрагмент. Следующим этапом было клонирование более протяженных участков оперона в фаговом векторе EMBL3 [11]. Для этого фракция *Sau3A*-гидролизата (15–20 т.п.о.) хромосомной ДНК *P. putida*, полученная обогащением в градиенте плотности сахарозы, была лигирована с вектором EMBL3, предварительно обработанным рестриктазами *EcoRI* и *BamHI*. Полученный банк (25 000 фаговых бляшек) гибридизировали с ник-транслированным фрагментом (5,5 т.п.о.) *groBC*-оперона *P. putida*, выявив 15 положительных клонов. Такое количество искомых

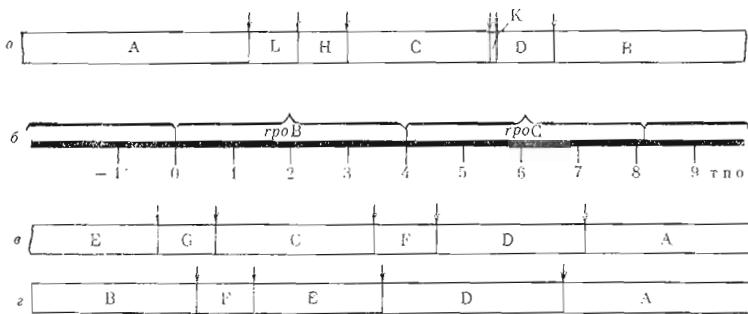


Рис. 1. Физическая карта *groBC*-оперона *P. putida* и *E. coli*: схема строения *groBC*-оперона *P. putida* и *E. coli*, указано расположение генов и их длина в т.п.о. (б), расположение *SalI*-сайтов в *groBC*-опероне *P. putida* (а), расположение *EcoRI*-сайтов (б) и *SalI*-сайтов (а) в *groBC*-опероне *E. coli* [3]

1	V	D	R	R	R	L	L	D	D	F	D	K	N	V	Q
2	D	E	L	K	H	E	F	E	K	K	L	E	A	K	R
3	GACGAACTGAAACACCGAGTTGAGAAAAAAACTTGAAGCGAAGCGCCGTAAAATCACCCAG	*****	*	*	*	*	*	*	*	*	*****	***	***	***	***
4	GTGCGACCGTGCCTGGACGACAAGTTGCAAGACAAGAAGCGAACGTGCAGCG														
	I R														
	G	D	D	L	A	P	G	V	L	K	I	V	K	V	
	GGCGACGATCTGGCGCCGGCGT	G	C	G	C	G	G	C	G	C	G	T	G	A	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
	GGCGATGACCTGGCACCGGGCGT	A	C	C	G	C	G	A	C	G	T	A	G	T	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
	CGCATCCAGCCGGGTGACAAGATGGCCGGTCGTACGGTAACAAGGGTGT	C	G	T	C	G	T	A	C	T	T	G	C	A	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
	M	V		H											
	I	N	P	I	E	D	M	P	Y						
	ATCAACCGATCGAAGACATGCCCTTAC	*****	***	*	*****	*****	**								
	ATCATGCCGGTTGAAGACATGCCGCAC	*****	*****	*****	*****	*****	*****								

Рис. 2. Сравнение нуклеотидных (3, 4) и соответствующих им аминокислотных (1, 2) последовательностей β -субъединицы РНК-полимеразы одного из участков *groBC*-оперона *E. coli* (2, 3) и *P. putida* (1, 4). Участок имеет координаты 3075–3281 п.о. в гене *groB* *E. coli* относительно первого нуклеотида рамки считываания. Звездочками отмечена нуклеотидная гомология. В аминокислотной последовательности участка β -субъединицы РНК-полимеразы *P. putida* (1) указаны только аминокислотные замены, отличающие ее от β -субъединицы РНК-полимеразы *E. coli* (2)

рекомбинантов несколько ниже теоретически ожидаемого [12], однако наши данные согласуются с результатами работы по клонированию *groBC*-оперона *S. typhimurium* [13], где было показано, что «клонируемость» последовательностей данного типа имеет некоторые ограничения. Физическая карта *groBC*-оперона *P. putida* (рис. 1) составлена на основе blot-гибридизации *SalI*-фрагментов рекомбинантных фагов с ник-транслированными плазмидами, содержащими различные участки *groBC*-оперона *E. coli* (*EcoRI*-G, C, F, D), а также на основе частичного секвенирования этих фрагментов, клонированных в фагах M13mp11 и M13mp19 [14–16]. При составлении физической карты оперона учитывалось, что размеры β -и β' -субъединиц *E. coli* и *P. putida*, по данным определения молекулярных масс, совпадают [17]. Следует отметить, что в пределах *groBC*-оперона *E. coli* находятся четыре *SalI*-сайта, а у *P. putida* – шесть, причем их локализация различна. Анализ первичной структуры соответствующих последовательностей на микро-ЭВМ Apple IIe позволил установить, что изменения положений этих участков связаны с неодиночными мутационными

изменениями. На рис. 2 представлены данные структурного анализа характерного участка генов *rpoB* *P. putida* и *E. coli* и соответствующих им последовательностей β -субъединиц РНК-полимеразы.

Фаг EMBL3 был представлен Европейской лабораторией молекулярной биологии (Гейдельберг). Вектор pTZ19R — препарат фирмы Pharmacia PL Biochemicals.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V. // FEBS Lett. 1977. V. 76. № 1. P. 108—111.
2. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Yu., Modyanov N. N., Grinkevich V. A., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 116. № 3. P. 621—629.
3. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Salomatina I. S., Shuvayeva T. M., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 13. P. 4035—4044.
4. Свердлов Е. Д., Лисицын Н. А., Гурьев С. О., Монастырская Г. С. // Докл. АН ССР. 1986. Т. 287. № 1. С. 232—236.
5. Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Levitan T. L., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Grachev M. A., Saychikov E. P., Pletnev A. G., Ovchinnikov Yu. A. // Macromolecules in the functioning cell/Eds Salvatore F., Marino G., Volpe P. N. Y.: Plenum Press, 1978. P. 149—158.
6. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Guryev S. O., Kalinina N. F., Sverdlov E. D., Gragerov A. I., Bass I. A., Kiver I. F., Moiseyeva E. P., Igumnov V. N., Mindlin S. Z., Nikiforov V. G., Khesin R. B. // Mol. Gen. Genet. 1983. V. 190. № 3. P. 344—347.
7. Лисицын Н. А., Гурьев С. О., Свердлов Е. Д., Мусеева Е. П., Никифоров В. Г. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 1. С. 127—128.
8. Lisitsyn N. A., Sverdlov E. D., Moiseyeva E. P., Danilevskaya O. N., Nikiforov V. G. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 196. № 1. P. 173—174.
9. Лисицын Н. А., Свердлов Е. Д., Мусеева Е. П., Никифоров В. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 1. С. 132—134.
10. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Guryev S. O., Kalinina N. F., Sverdlov E. D., Gragerov A. I., Bass I. A., Kiver I. F., Moiseyeva E. P., Igumnov V. N., Mindlin S. Z., Nikiforov V. G., Khesin R. B. // Mol. Gen. Genet. 1983. V. 190. № 3. P. 344—347.
11. Freschauf A. M., Lehrach H., Poustka A., Murray N. J. // Mol. Biol. 1983. V. 170. № 4. P. 827—854.
12. Manuarcis T., Фрич Э., Сэмбрук Дж. // Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
13. Tittawella I. P. B. // FEBS Lett. 1985. V. 185. № 1. P. 33—36.
14. McGraw R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.
15. Beggin M. D., Gibson T. J., Hong G. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 13. P. 3963—3965.
16. Yanish-Perron C., Viera J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
17. Jonson J. C., De Backer M., Boezi J. A. // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 5. P. 1222—1232.

Поступило в редакцию
21.X.1987

GENES CODING FOR BACTERIAL RNA POLYMERASES.

I. CLONING OF THE *PSEUDOMONAS PUTIDA rpoBC* OPERON AND ITS PHYSICAL MAP

BORODIN A. M., DANILKOVICH A. V., ALLIKMETS R. L., MONASTYRSKAYA G. S.

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow

The *P. putida rpoBC* operon, coding for β and β' subunits of RNA polymerase, was cloned and its physical map constructed.