



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.214.(334.3+622)

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ РНК-ПОЛИМЕРАЗУ БАКТЕРИИ
I. КЛОНИРОВАНИЕ *rpoBC*-ОПЕРОНА
PSEUDOMONAS PUTIDA И ЕГО ФИЗИЧЕСКАЯ КАРТАБородин А. М., Данилович А. В., Аликметс 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 *rpoB* *S. typhimurium* и *E. coli* показал высокую консервативность β -субъединицы РНК-полимеразы этих родственных видов бактерий, в результате чего локализовать функционально важные участки не удалось. Аналогичный анализ генов *rpoBC*-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' -субъединицы фермента, а также о распределении консервативных и вариабельных участков этих субъединиц.

Для клонирования *EcoRI*-фрагмента *rpoBC*-оперона *P. putida* (5,5 т.п.о.; размеры были установлены в результате геномной блот-гибридизации с *EcoRI*-С-фрагментом *rpoBC*-оперона *E. coli*) хромосомная ДНК *P. putida*, штамм PAW 340 (*Sm*^r), была обработана рестриктазой *EcoRI* и лигирована с дефосфорилированным вектором рTZ19R с последующей трансформацией *E. coli* TG-1. Блот-гибридизационный анализ плазмид из клонов, давших положительный сигнал, позволил выявить плазмиду рAB5, содержащую искомый фрагмент. Следующим этапом было клонирование более протяженных участков оперона в фаговом векторе ЕМВL3 [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 ЕМВL3, предварительно обработанным рестриктазами *EcoRI* и *VamHI*. Полученный банк (25 000 фаговых бляшек) гибридизовали с ник-транслированным фрагментом (5,5 т.п.о.) *rpoBC*-оперона *P. putida*, выявив 15 положительных клонов. Такое количество искомых

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 рTZ19R — 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., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. // Nucl. Acids Res. 1982. V. 10. № 13. P. 4035—4044.
4. Сverdlov E. D., Луцицын Н. А., Гурьев С. О., Монастырская Г. С. // Докл. АН СССР. 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. Луцицын Н. А., Гурьев С. О., Сverdlov E. D., Моисеева 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. Луцицын Н. А., Сverdlov E. D., Моисеева 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. Мануагис Т., 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.