



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 577.113.4:577.214.622

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА *psbA* ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК ЯЧМЕНЯ, КОДИРУЮЩЕГО ГЕРБИЦИДСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК

Ефимов В. А., Андреева А. В., Дмитрикова Е. В.,
Папкова И. Н., Ревердатто С. В., Юнг Р.,
Чажмахчева О. Г.

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

Одним из продуктов белкового синтеза в хлоропластах растений является тилакоидный мембранный белок Q_b , мол.масса которого оценивается как 32 кДа [1]. Этот белок входит в состав фотосистемы II, где он вовлечен в перенос электронов [2]. Кроме того, он способен связывать некоторые гербициды, в частности диурон и атразин [3]. Было показано, что у высших растений Q_b -белок кодируется единственным геном (*psbA*), локализованным в большом однокопийном районе хлоропластной ДНК. Синтез соответствующей ему мРНК происходит в больших количествах и является светозависимым. В настоящее время известны последовательности *psbA*-генов и Q_b -белков некоторых двудольных растений [1, 4], однако для однодольных злаковых растений структуры этих белков и соответствующих им генов неизвестны в силу ряда объективных причин, среди которых прежде всего следует отметить неустойчивость бактериальных штаммов, несущих плазмидные или фаговые ДНК со встроенными в них *psbA*-генами злаковых растений.

В ходе наших структурно-функциональных исследований белков фотосистемы II и соответствующих им генов был проведен анализ первичной структуры фрагмента хлоропластной ДНК ячменя (*Hordeum vulgare*) длиной около 2000 п.о., включающего последовательность, кодирующую

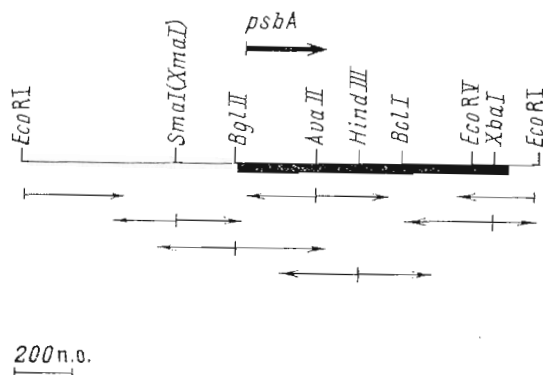


Рис. 1. Рестрикционная карта *EcoRI*-фрагмента хлоропластной ДНК ячменя, содержащего *psbA*-ген (показан в виде зачерпленного прямоугольника). Стрелки указывают направление и протяженность индивидуальных сиквентов, полученных методом Максама — Гилберта, и ориентацию гена

табак (SmaI) CTAGC
 ячмень CCCGGGCAACCCATATAGA
 шпинат TTTT

T TCGAAAT T T C GTAGAGA G CG ATT CTCA C C A A
 AAAGACCCATCAAAGTTTTAACTTTTACTCACTTCATTTACAATACAAAATTATTGGTTTGGTTAATTTATTTATA
 TACTGA ATC TA C T G CTT TT AATCACTTCC..... CACA

.ATT GAAT G ACATACAC CGA AGTC G* A CA
 TGGATAGCCAATCTTTGGGCTGACTTGGTTGACATTGGTATATAGTCTATGTTATACTGTTAAATAACAA.....GC
 AATTCTGAT GATC CACTAGATA CG C AGGC GT

T T C AT T GAT G AA CTA C ATGA A T
 CTTCTATTATCTATATCTAGTTAATACGTGTGCTTGGGAGTCCTTGC AATTTGAA.....TAAACCAAGATCTTACC
 T A T. .T CG TT C ATGA A TTA AA T

I Glu 26
 MetThrAlaIleLeuGluArgArgGluSerThrSerLeuTrpGlyArgPheCysAsnTrpIleThrSerThrGluAsn
 CGA A T C C
 ATGACTGCAATTTTAGAGAGACCGGAAAGTACAAGCCTGTGGGGTGGCTTCTGCAACTGGATAACTAGTACTGAAAAA
 psbA → CGA A T T C C C

ArgLeuTyrIleGlyTrpPheGlyValLeuMetIleProThrLeuLeuThrAlaThrSerValPheIleIleAlaPhe 52
 T T T G T
 CGTCTTTACATCGGATGGTTCCGGTGTGGTGGTATGATCCCTACCTTATTGACCGCAACTTCTGTATTTATTATCGCCTTC
 T T T T A

IleAlaAlaProProValAspIleAspGlyIleArgGluProValSerGlySerLeuLeuTyrGlyAsnAsnIleIle 78
 T T C T A A G C C T
 ATCGCTGCCCTCCAGTAGATATTGATGGTATTCCGCGAGCCTGTTTCTGGTTCTTTACTTTATGAAAACAATATTATC
 T T T A C A C C T T

His 104
 SerGlyAlaIleIleProThrSerAlaAlaIleGlyLeuHisPheTyrProIleTrpGluAlaAlaSerValAspGlu
 C C A T A T A T C G C C A
 TCTGGTGTATTATTCCTACTTCTGCGGGATCGGATTGCACTTTTACCCAATTTGGGAAGCTGCATCTGTTGATGAG
 G C A T A G T T C G G

TrpLeuTyrAsnGlyGlyProTyrGluLeuIleValLeuHisPheLeuLeuGlyValAlaCysTyrMetGlyArgGlu 130
 C A A C C
 TGGTTATACAATGGTGGTCCCTATGAGCTAATTGTTCTACACTTCTTACTTGGTGTAGCTGTTATATGGGTCGTGAG
 A

TrpGluLeuSerPheArgLeuGlyMetArgProTrpIleAlaValAlaTyrSerAlaProValAlaAlaAlaThrAla 156
 G A C A
 TGGGAACTTAGTTTCCGTCTGGGTATGCTCCTTGGATTGCTGTGCATATTCAGCTCCTGTTGCAGCTGCTACTGCT
 A C C A G

ValPheLeuIleTyrProIleGlyGlnGlySerPheSerAspGlyMetProLeuGlyIleSerGlyThrPheAsnPhe 182
 C A T C T C
 GTTTTCTTGATTTACCCTATTGGTCAAGGAAGCTTTTCTGATGGTATGCCTTTAGGAATCTCTGGTACTTTCAACTTT
 C A C C C

MetIleValPheGlnAlaGluHisAsnIleLeuMetHisProPheHisMetLeuGlyValAlaGlyValPheGlyGly 208
 T C T C
 ATGATTGTATTCCAGGCAGAGCACAAACATCCTTATGCATCCATCCACATGTTAGGTGTAGCTGGTGTATTCCGGGGT
 T C T C

SerLeuPheSerAlaMetHisGlySerLeuValThrSerSerLeuIleArgGluThrThrGluAsnGluSerAlaAsn 234
 T C A
 TCCCTATTGAGTGTATGCATGGTTCCTTGGTAACTCTAGTTTGTATCAGGAAACTACTGAAAATGAATCTGCTAAT
 T T C A

260

Arg
 GluGlyTyrLysPheGlyGlnGluGluGluThrTyrAsnIleValAlaAlaHisGlyTyrPheGlyArgLeuIlePhe
 A G C C C A A
 GAGGGTTACAAATTTGGTCAAGAGGAAGACTTATAATATTGTGGCTGCTCATGGTTATTTGGCCGATTAAATCTTC
 A G C A C A A T G

286

GlnTyrAlaSerPheAsnAsnSerArgSerLeuHisPhePheLeuAlaAlaTrpProValValGlyIleTrpPheThr
 G A A T T C
 CAATATGCTAGTTTCAACAACCTCTCGTTCTTTACACTTCTTCTTGGCTGCTTGGCCTGTAGTAGGAATCTGGTTCAC
 A T T T

312

AlaLeuGlyIleSerThrMetAlaPheAsnLeuAsnGlyPheAsnPheAsnGlnSerValValAspSerGlnGlyArg
 C C C C C T
 GCTTTAGGTATTAGTACTATGGCTTTCACCTAAATGGTTTCAATTTCAACCAATCTGTAGTTGATAGTCAAGGTCGC
 T

338

ValIleAsnThrTrpAlaAspIleIleAsnArgAlaAsnLeuGlyMetGluValMetHisGluArgAsnAlaHisAsn
 A T T T T T
 GTTATTAATACTTGGGCTGATATCATCAACCGTGTAACCTTGGTATGGAAGTAATGCACGAACGTAATGCTCACAAC
 A T T T T

Ile Ala SerThe 353

PheProLeuAspLeuAlaAlaValGluValProAlaIleAsnGlyTer
 C A C C T CA A CC GGCCTAGT TATAGGAGG GA
 TTCCTCTAGACTTAGCTGCTGTTGAAGTTCAGCTATTAATGGATAAGGTTTTCTGCTAACATATAAGAATTTTTG
 C A C T CA

AG AGG GC AT TCATTTTCT G TC A CAAGAGGGTGCTA T C CC CTT T C A TA TT
 AAGAAAGAAAAGACAAAATACCCAATATCTTGTCTAGCAAGATATTGGGTATTTTGAATCTTTTTTTCTTAA
ACT T T
 TCTTTCTATTTCAGAATTC
 (EcoRI)

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность *psbA*-гена ячменя и выведенная из нее аминокислотная последовательность Q_B-белка ячменя. Подчеркнуты предполагаемый рибосомсвязывающий сайт, а также -35- и -10-районы промотора. Возможное место инициации транскрипции отмечено звездочкой. Штриховой линией отмечены последовательности, комплементарные синтетическим олигонуклеотидам-праймерам, использованным при подтверждении структуры гена дидезоксиметодом. Показаны нуклеотиды *psbA*-генов табака (сверху) и шпината (снизу), отличающиеся от нуклеотидов в соответствующих позициях гена ячменя. Выше аминокислотной последовательности Q_B-белка ячменя показаны несовпадающие аминокислоты белка табака. Точками показаны места последовательности, не содержащие нуклеотидных остатков в гомологичных участках ДНК у ячменя, табака и шпината

Q_B-белок. В данной работе приводится первичная структура *psbA*-гена ячменя вместе с примыкающими к нему районами ДНК, а также предсказанного продукта его трансляции и сравнение этих структур с известными последовательностями *psbA*-генов и белков Q_B таких двудольных растений, как табак [4] и шпинат [1].

Клонирование *psbA*-гена ячменя проводилось нами в составе *EcoRI*-*EcoRI*-фрагмента соответствующей хлоропластной ДНК в плазмиде pBSM13+ (Stratogene, США). Хлоропластную ДНК ячменя выделяли по методу [5]. Выход составил 70-90 мкг из 100 г зеленой массы. Для отделения ее от РНК использовали хроматографию на колонке с сефакрилом S-1000. Выделенную ДНК исчерпывающе гидролизовали эндонуклеазой *EcoRI* и полученные при этом фрагменты разделяли электрофорезом в 0,6% агарозном геле. Фрагмент, содержащий *psbA*-ген, идентифицировали блоттингом с использованием в качестве гибридационной пробы ³²P-меченого синтетического 31-звенного дезоксирибоолигонуклеотида dCTATGCATCCCTTGGTTCCCTAACTTCTAGTTT, структура которого соответствовала консервативному участку последовательности гена *psbA*, идентичному для шпината и табака [1, 4], а также повторной гибридизацией с 20-звенными олигонуклеотидными зондами dTGGTTTGGCTGTTTTGATGAT и dGGTATGGAAGTTATGGATGA, после-

довательности которых соответствовали 5'- и 3'-концевым участкам структурных генов этих растений.

Фрагмент хлоропластной ДНК (~2 т. п. о.), который давал положительный результат при гибридизации с зондом, элюировали с геля, лигировали с вектором, полученным обработкой плазмиды pBSM13+ эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*, и этой реакционной смесью трансформировали клетки *E. coli* МН1. Из ампициллинустойчивых колоний гибридизацией на нитроцеллюлозных фильтрах [6] с теми же мечеными зондами были отобраны клоны, содержащие искомый фрагмент хлоропластной ДНК. Одна из плазмид, pBSM8A, была использована для определения первичной структуры гена *psbA*. Кроме того, было показано, что *EcoRI*-фрагмент, содержащий *psbA*-ген ячменя, входит в состав следующих, более крупных фрагментов хлоропластной ДНК, полученных при обработке последней эндонуклеазами рестрикции *PstI* (18,4 т. п. о.), *SalI* (20 т. п. о.), *BamHI* (5,5 т. п. о.).

Следует отметить, что попытки использовать с той же целью ряд других реципиентных штаммов *E. coli* (в частности, JM107, TG4, HB101), так же как и попытки клонировать *psbA*-ген в составе *BamHI*, *SmaI* и *SalI*-фрагментов во всех использованных штаммах, не привели к положительным результатам.

На рис. 1 приведена рестрикционная карта клонированного нами *EcoRI*-фрагмента хлоропластной ДНК и стратегия определения его последовательности методом химических модификаций. Полученные этим методом данные подтверждали дидезоксирибонуклеотидным методом Сэнгера. В последнем случае в качестве матрицы брали одноцепочечную ДНК плазмиды pBSM8A. Секвенс проводили с использованием «сдвигающегося праймера» [7]. Синтетические олигонуклеотиды-праймеры, использованные в данной работе, были получены нами на автоматическом синтезаторе Gene assembler (Pharmacia, Швеция) с применением амидитного фосфитного метода и фосфотриэфириного метода на основе О-нуклеофильного внутримолекулярного катализа [8]. Одноцепочечную форму плазмиды pBSM8A получали по методу [9] с использованием в качестве реципиентного штамма *E. coli* MV1193 [*F'*: *trad* 36, *proAB*, *lacI*^qZΔM15].

Из полученных нами данных следует, что *psbA*-ген расположен внутри *SmaI*—*EcoRI* (~1,4 т.п.о) фрагмента хлоропластной ДНК. На рис. 2 приведена нуклеотидная последовательность этого фрагмента ДНК. Отмечены предполагаемые -10- и -35-районы промоторной области, рибосомсвязывающий сайт и возможное место инициации транскрипции.

Сравнение последовательностей *psbA*-генов ячменя и некоторых двудольных растений выявляет значительную гомологию. Так, в гене табака относительно гена ячменя изменено 85 из 1061 п. о., составляющих этот ген (92% гомологии), а в гене шпината — 75 п. о. (93% гомологии), тогда как в аминокислотной последовательности гербицидсвязывающего белка ячменя имеется только 7 аминокислотных замен по сравнению с табаком и 6 замен по сравнению со шпинатом (97% гомологии), причем эти замены расположены в основном в N- и C-концевых участках молекулы белка. В то же время последовательности левее и правее структурного гена ячменя значительно отличаются от соответствующих участков двудольных, за исключением участка, непосредственно перед иницирующим АТГ-кодоном и собственно промотора *psbA*-гена. Последний имеет значительную гомологию с последовательностями, прилегающими к предполагаемой точке инициации транскрипции у двудольных растений, и полностью совпадает с ранее опубликованной частичной структурой промотора гена пшеницы [10].

Авторы глубоко признательны академику Ю. А. Овчинникову за интерес к данной работе, а также д-ру Т. Х. Н. Эллису (Англия), проф. Р. Херманну (ФРГ) и проф. М. Сугиура (Япония) за предоставление фрагментов хлоропластных ДНК ряда растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zurawski G., Bohmert H. J., Whitfeld P. R., Bottomley W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 24. P. 7699-7703.
2. Mattoo A. K., Pick U., Hoffman-Falk H., Edelman M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1572-1576.
3. Pfister B., Steinback K. E., Garder G., Arnstzen C. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 2. P. 981-985.
4. Sugita M., Sugiura M. // Mol. Gen. Genet. 1984. V. 195. № 1-2. P. 308-313.
5. Whitfeld P. R., Herrmann R. G., Bottomley W. // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. № 6. P. 1741-1751.
6. Ефимов В. А., Чахмахчева О. Г. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 8. С. 2084-2093.
7. Strauss E. C., Kobori J. A., Siu G., Hood L. E. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 353-360.
8. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525-6540.
9. Vieira J., Messing J. // Meth. Enzymol. 1988. V. 155.
10. Hanley-Bowdoin L., Chua N.-H. // TIBS. 1987. V. 12. № 2. P. 67-70.

Поступило в редакцию
17.11.1988

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE BARLEY CHLOROPLAST *psbA* GENE CODING FOR A HERBICIDE-BINDING PROTEIN

EFIMOV V. A., ANDREEVA A. V., DMITRAKOVA E. V., PASHKOVA I. N.,
REVERDATTO S. V., JUNG R., CHAKHMAKHCHEVA O. G.

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

The sequence of a stretch of the barley chloroplast DNA containing *psbA* gene with flanking regions and the deduced amino acid sequence of the photosystem II Q_B protein have been determined. Comparison of the *psbA* and Q_B sequences from barley and some dicotyledonous species shows them to be highly conserved. The sequences of the regions which flank the probable transcription initiation site for *psbA* gene of barley are identical to the corresponding sequences of wheat.