



БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 16 * № 9 * 1990

УДК 577.113.5

© 1990 г.

A. A. Бухаров, В. Л. Колосов, А. С. Золотарев

ФОТОСИСТЕМА II РЖИ. НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА *psbC*, КОДИРУЮЩЕГО 43-кДа ХЛОРОФИЛ(а)-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Установлена структура участка хлоропластной ДНК ржи, содержащего ген *psbC*, который кодирует полипептидную цепь 43-кДа хлорофилла(а)-связывающей субъединицы фотосистемы II (белок СРа-2). На расстоянии 140 п. о. за стоп-кодоном гена *psbC* на противоположной цепи ДНК расположена последовательность гена *trnS*(UGA), кодирующая тРНК^{Ser}, а 5'-концевая часть гена *psbC*, как и у других видов растений, на 50 п. о. перекрываетяется с 3'-концевым участком гена *psbD*, который кодирует 32-кДа белок реакционного центра ФС II — D2.

Анализ аминокислотной последовательности продукта гена *psbC* обнаруживает ряд общих черт со структурой продукта гена *psbB* [1] — белка СРа-1, отражающих, очевидно, сходство функций, выполняемых этими белками, а также значительную консервативность этой последовательности в различных группах кислородвыделяющих фотосинтетиков.

Комплекс ядра фотосистемы II состоит из 7 полипептидов гидрофобной природы размером от 4 до 47 кДа [2, 3], с которыми ассоциировано около 50 молекул хлорофилла *a* [4] и ряд других простетических групп. При этом с двумя наиболее крупными субъединицами, называемыми хлорофилл-связывающими белками СРа-1 (размером 47 кДа) и СРа-2 (43 кДа), связано 20—21 и 26 молекул хлорофилла *a* соответственно [5], а также приблизительно по 3 молекулы β-каротина.

Такая насыщенность этих полипептидов молекулами пигментов обусловлена, по-видимому, тем, что их основная функция, выполняемая в ФС II, — участие наряду с Chl_{a/b}-связывающими полипептидами свето-сбирающего комплекса в поглощении квантов света и передаче энергии на пигмент реакционного центра *P*₆₈₀.

В результате ряда работ [6, 7], посвященных определению структуры хлоропластных генов *psbB* и *psbC*, кодирующих белки СРа-1 и СРа-2 соответственно, выяснилось, что оба полипептида обладают сходным аминокислотным составом и имеют общую схему строения. Основной чертой их структуры является наличие 6 участков выраженной гидрофобности, существующих, вероятно, в виде трансмембранных α-спиралей [8]. При этом доминирующим элементом структуры обоих белков является гидрофильный сегмент, разделяющий предполагаемые трансмембранные тяжи V и VI и составляющий около 40 и 30% всей длины полипептидных цепей СРа-1 и СРа-2 соответственно.

В опытах с моноклональными антителами и кросс-сшивающими реагентами [9, 10] показано, что у белка СРа-1 этот сегмент обращен в лumen и взаимодействует с 33-кДа Mn-стабилизирующим белком кислородвыделяющего комплекса. Белок СРа-2 также обнаруживает если не контакт, то по крайней мере пространственную близость к гидрофильным белкам кислородвыделяющего комплекса (их удаление из препарата ФС II резко повышает чувствительность белка СРа-2 к трипсиновому протеолизу [10]). Таким образом, экспонированные в лumen участки двух наиболее

Сокращения: ФС — фотосистема, Chl — хлорофилл, хлДНК — хлоропластная ДНК.

объемных субъединиц ФС II образуют, вероятно, необходимую поверхность для ассоциации полипептидов кислородвыделяющего комплекса с ядром.

Кроме того, предполагается, что Chla-связывающие субъединицы обеспечивают правильную сборку и стабильность всего комплекса ядра ФС II [11]. Так, генетико-инженерными методами показано, что модификация генов *psbB* [12] или *psbC* [11], нарушающая синтез нативных полипептидов СРа-1 и СРа-2, ведет к полной потере активности ФС II в мутантных клетках. Вместе с тем избирательное удаление из уже собранного комплекса ФС II, осуществленное недавно для белка СРа-2 [5], не приводит к утрате или уменьшению способности препарата к светозависимому переносу электронов между центрами Z и Q_A.

Таким образом, принципиальный вопрос о функциональной роли Chla-связывающих белков в ядре ФС II все еще не вполне ясен. Остаются открытыми и вопросы, связанные с деталями структуры этих белков. В частности, неизвестно, с какими аминокислотными остатками полипептидных цепей связываются молекулы хлорофилла.

В настоящей работе, являющейся продолжением наших исследований по установлению структур полипептидов, образующих комплекс ФС II ржи [1, 13–16], мы описываем определение нуклеотидной последовательности гена *psbC* и обсуждаем выведенную из нее первичную структуру белка СРа-2 в сравнении с соответствующими структурами других организмов, а также структуру белка СРа-1.

Как и в случае с геном *psbB* [1], задача получения фрагмента хлДНК ржи, содержащего необходимую последовательность, была решена методом направленного клонирования фрагментов, гибридизующихся с синтетическими олигонуклеотидами, структура которых соответствовала участкам опубликованной последовательности генов *psbC* и *psbD* шпината [17] (ген *psbD* располагается в хлДНК всех изученных видов растений непосредственно перед *psbC*. Два гена при этом имеют общий участок длиной 50 п. о.).

При выработке стратегии клонирования использовали тот факт, что в кодирующей области гена *psbC* шпината находится единичный участок, узнаваемый рестриктазой *Hind*III (нуклеотиды 1931–1936 опубликованной последовательности [17]). Полагая, что в связи со значительной консервативностью структур хлДНК подобная ситуация характерна и для *psbC* гена ржи, его клонировали в виде двух *Eco*RI – *Hind*III-фрагментов, первый из которых — E5H1 (1,8 т. п. о.) — гибридизовался с зондом D, синтезированным на основании структуры участка гена *psbD* шпината (нуклеотиды 436–480 [17]), а второй — E5H2 (1,3 т. п. о.) — с зондом C на участок гена *psbC*, расположенный ниже *Hind*III-сайта (нуклеотиды 2031–2076 [17]).

При этом вначале в смеси рестриктных фрагментов хлДНК, обработанной *Eco*RI, методом blot-гибридизации был идентифицирован фрагмент E5 (3,1 т. п. о.) как гибридизующийся с зондами D и C и содержащий, видимо, генный кластер *psbD* — *psbC*. Вырезанный (в виде участка геля из легкоплавкой агарозы) фрагмент разрезали рестриктазой *Hind*III, предварительно освободившись от агарозы с помощью обработки расплава фенолом, и лигировали с вектором, разрезанным рестриктазами *Eco*RI и *Hind*III.

На стадии секвенирования генов выяснилось, что в гене *psbC* ржи кроме сохранившегося на том же, что и в структуре шпината, месте *Hind*III-сайта появился еще один — на 118 п. о. ближе к 5'-концу. Таким образом, для того чтобы определить структуру всей кодирующей области гена *psbC*, было предпринято клонирование еще и *Bam*HI-фрагмента B15' (3,25 т. п. о.), включающего в себя участок гена между двумя *Hind*III-сайтами.

Его клонирование осуществляли, лигируя вырезанный из геля фрагмент с соответствующим вектором.

Полученные рекомбинантные плазмиды pTSecE5H1, pTSecE5H2, pTSecB15' использовали при определении структуры гена *psbC*. При этом вставки, вырезанные из соответствующей плазмида, элюировали

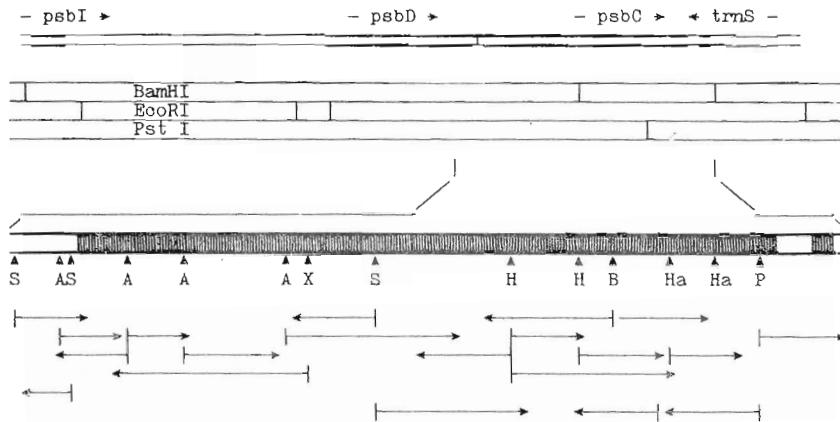


Рис. 1. Схема расщепления фрагмента хлДНК ржи, содержащего ген *psbC* и примыкающие к нему районы, различными рестриктазами и установления нуклеотидной последовательности его участка, включающего в себя гены *psbC* и *trnS*. А — *Alu*I, В — *Bam*HI, *Bg* — *Bgl*II, Е — *Eco*RI, Н — *Hind*III, *Ha* — *Hae*III, S — *Sau*3A, Х — *Xba*I

из геля, разрезали рестриктазами, узнающими четырехнуклеотидные последовательности, и клонировали в фаговые векторы серии M13mp. Страгегия определения нуклеотидной последовательности схематически представлена на рис. 1.

В показанной на рис. 2 области E5-фрагмента хлДНК ржи располагается одна протяженная открытая рамка считывания (OPC473), соответствующая гену *psbC*, причем первые 50 п. о. этой рамки и последовательность перед ее ATG-кодоном представляет собой 3'-концевой участок гена *psbD*, а за ее стоп-кодоном на противоположной цепи ДНК обнаруживается последовательность, гомологичная гену *trnS^{UGA}* других видов растений [18, 19].

Кроме потенциального УСР (участок связывания рибосом), предшествующего ATG-кодону гена *psbC*, за этим кодоном расположена еще одна последовательность, комплементарная 3'-концу 16S рРНК (рис. 2), а через 9 нуклеотидов после нее находится — в той же рамке считывания, что и ATG, — GTG-кодон, который, как показано для некоторых генов *E. coli*, может служить инициатором трансляции [20]. Поскольку показано [21], что выделяемый из тилакоидов продукт гена *psbC* — СРа-2-белок — начинается с Thr¹⁶ (результат процессинга), можно предположить, что первым транслируемым (как Met) кодоном гена *psbC* является GTG и в ходе посттрансляционной модификации удаляется не 14-членный пептид, а дипептид Met-Glu.

Между *psbC*- и *trnS*-генами на расстоянии 40 п. о. от стоп-кодона гена *psbC* располагается пара инвертированных повторов, выполняющая, вероятно, функцию терминатора транскрипции. Гомологичная структура обнаруживается и на хлДНК шпината, однако в этом случае она удалена от гена *psbC* на 140 п. о. Интересно, что при почти полном совпадении последовательностей, образующих 11-членные сегменты повтора в хлДНК двух видов (хлДНК ржи содержит единичную замену в первом сегменте, в результате которой при образовании структуры вида «петля — шилька» пара G·C, имеющая место в случае шпината, заменяется парой G·T), гентануклеотидные последовательности, образующие «петлю», находятся в них в противоположных ориентациях (рис. 3).

Сравнение нуклеотидной последовательности гена *trnS* с соответствующей последовательностью шпината [18] обнаруживает, что все отличия двух структур локализованы в районе, кодирующем так называемую добавочную петлю тРНК, которая у ржи на 5 нуклеотидов короче. Последовательности гена *trnS* ржи и других однодольных растений — кукурузы и ячменя — идентичны [19].

TGAGTGCTATGGCGTAGTGGCTGGCTGTGAACTTACGTGCCTATGA~~CTTTGTTCCC~~ 60
 AGGAAATCCGTGCAGCGGA~~AG~~ATCCTGA~~AT~~TGAGACTTCTACACC~~AAA~~AATATTCTT~~I~~ 120
 TAAACGAGGGTATTCTGC~~G~~TGGATGGCA~~G~~CTCAGGATCAGCCTCAT~~G~~~~AAA~~ATCTTATA~~T~~ 180
 TCCCTGAGGAGGTCTACCACGT~~G~~AAACGCTCTTAAT~~G~~A~~C~~TTCGTTAGCTGGT 240
 CGTGACCAAA~~G~~AAACCOACCGC~~T~~TGCTG~~G~~TGGCTGG~~A~~ATGCCAGACTTATCAATT~~G~~ 300
 TCCGGTAAACTACTGGAGCTCATGACCCATGCCGG~~A~~TTAATCGTATTCTGGCCGG~~A~~ 360
 GCAATGAACCTATTGAAGTGGCCCAT~~T~~TCTG~~T~~ACCAGAA~~A~~GGCCATGTATGAACAAGGG 420
 TTGATT~~T~~TAC~~T~~CCACACT~~T~~AGCTACTCTAGGTTGGGAGTAGGGCCAGGGGGGAAGTT 480
 CTAGATACT~~T~~TCACAT~~T~~TGTATCTGGCGTAC~~T~~CAC~~C~~TAATT~~T~~CCTCGCAGTCTT~~A~~ 540
 GGCTTCGGTGGCATTTATCAGCCCTCTGGGACCCGAGCTCTGAGGA~~A~~TCGTTCC~~A~~ 600
 TTCTTGGT~~A~~TGTGTGGAA~~A~~GTGAA~~A~~AA~~A~~ATGACTACAA~~T~~TTGGTATTCACTT~~A~~ 660
 ATTTGTTAGGTCTAGGTG~~C~~TTCT~~G~~TACTCAAGGCTCTTATT~~T~~TGGGGTGT~~A~~ 720
 TATGATACCTGGGCCCC~~T~~GGGGGGGAGATGTAAGAAAATTACCAATT~~T~~GACCC~~T~~AGT 780
 CCCAGTGT~~A~~TATTGGT~~A~~T~~T~~ACTAA~~A~~ATCCTT~~T~~GGT~~G~~GAGAAGGGT~~G~~ATTGTT~~A~~ 840
 ACTGTAGATGATTAGAAGATATAATTGGTGGACATGTA~~T~~GTTGGTT~~T~~TAT~~T~~G~~T~~ 900
 TTTGGCGGAA~~T~~TTGGCATATTAA~~C~~CCAA~~A~~CCCTCGCA~~T~~GGCTGCCGTG~~C~~ATT~~T~~GT~~A~~ 960
 TGGTCTGGAGAACCTACT~~T~~GTCTTATAGTTAGCTGCTT~~T~~TATCTGCTT~~T~~GGTTTATC 1020
 GCTTGTGTTTGTATGGT~~T~~CAATAATAC~~A~~GCTTATTCGAGTGACTTT~~T~~GGACCCACC 1080
 GGGCCAGAAGCTTCTCAAG~~G~~TCAAGCATT~~T~~ACTTTCTAGTTAGAGACCAGCCTCTGG~~A~~ 1140
 GCTAATGTGGATCCGCTCAAGGACCCACAGGTTAGTAA~~A~~ATATCTAA~~T~~GCGTCC~~C~~ 1200
 ACTGGGAA~~G~~TTATCTTGAGGGAAAC~~T~~ATGCGTT~~T~~GGACCTTCGCTCCATGG 1260
 TTAGAACCT~~C~~TAAGGGGCCAACGGTT~~T~~GGACTTCAGT~~A~~GGT~~G~~AAAAAAGACATACAA 1320
 CCTTGGCAAGAACGACGCT~~C~~AGCAGAATATGACCCAC~~C~~CTCCTT~~T~~AGGCTCTTAA~~A~~ 1380
 TCCGTGGGTGGCGTAGCTACCGAGATCA~~T~~GA~~G~~TTAA~~T~~ATGCTCTC~~C~~TAGAAGTTGG 1440
 TTATCTACT~~T~~CTCATTTGTTCTAGGATT~~T~~GGCTT~~T~~GGGCCATT~~T~~ATGGCATG~~C~~ 1500
 GGAAGAGCCCGAGOTGCTG~~C~~AGCAGGTT~~T~~GA~~A~~AGGGA~~A~~TCGATCGT~~G~~ATTGGAACCT~~T~~ 1560
 GTTCTT~~T~~AC~~A~~TCACCC~~T~~CTTA~~A~~CTAAGAT~~T~~TTCTATT~~T~~TATACCTGTT~~T~~ACTTTTT~~T~~ 1620
 CTGTTCTGG~~T~~CGGTTATT~~C~~ATCTAGCCGAGCCATT~~T~~GA~~T~~CTT~~T~~TTATGAAAGAAAG~~A~~ 1680
 TAAGGGAC~~A~~AAAAAA~~A~~AA~~A~~AA~~A~~AA~~A~~ATGAAAGAAACAA~~A~~AC~~T~~ATT~~C~~ATAAGC~~A~~AA~~A~~ 1740
 GGAGAGAGA~~G~~GGATT~~C~~GA~~A~~CCCTCGATA~~T~~TCCTAGAA~~A~~CTATACCGGTT~~T~~CAACACCG 1800
GAGCTATCA~~A~~CCAC~~T~~CAGC~~C~~ATCTCC~~A~~AGCCTAATC~~C~~TTATT~~T~~TACT~~C~~ 1852

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента хлДНК ржи, содержащего гены *psbC* (166—1584), *trnS* (1828—1740), а также 3'-концевой участок гена *psbD*. Жирным шрифтом выделены иницирующие и стоп-кодоны, а также антикодон гена *trnS*. Подчеркнуты потенциальные участки связывания рибосом и последовательность гена *trnS*. Встречными стрелками отмечены инвертированные повторы

На рис. 4 показана аминокислотная последовательность продукта гена *psbC* ржи в сравнении с соответствующими последовательностями других организмов. Поскольку вопрос о первичном продукте трансляции гена не решен, мы приводим структуру продукта, соответствующего максимально длиной рамке считывания. Однако дальнейшее обсуждение деталей строения белка СРа-2 относится к его зрелой полипептидной цепи длиной 459 а. о.

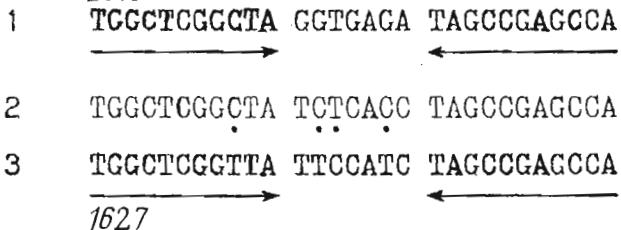


Рис. 3. Структура пары инвертированных повторов (показаны стрелками), расположенных в 3'-фланкирующей области гена *psbC* шпината (1) [7] и ржи (3). Точками обозначены отличия последовательности ржи и инвертированной последовательности шпината (2)

Анализ рис. 4 наряду с очевидной консервативностью полипептидной цепи в целом обнаруживает ряд аминокислотных остатков, наличие которых в определенных позициях полипептидной цепи характерно для всех без исключения организмов. Знаменательно, что эти абсолютно консервативные остатки того же типа, что и в белке CPa-1 [1].

Так же, как и в белке CPa-1, абсолютно консервативны все 7 остатков Met, 17 Trp и 13 His, входящие в процессированную полипептидную цепь CPa-2, причем пары His, находящиеся в предполагаемых трансмембранных участках, образуют характерную и для CPa-1 структуру вида His — (13 а. о.) — His в сегментах II, IV и VI.

Значительную консервативность демонстрируют также позиции полипептидной цепи, занимаемые остатками Pro и Gln. Из 24 остатков Pro белка CPa-2 абсолютно консервативны 21, а из 8 остатков Gln — 7. Сходная ситуация с этими остатками и в белке CPa-1.

Консервативность остатков His обусловлена, очевидно, их участием в связывании молекул хлорофилла. Однако их число (13 в CPa-2 и 14 в CPa-1) недостаточно, чтобы связать обнаруживаемое [5] количество молекул пигмента. Следовательно, функцию связывания Chl выполняют и другие остатки. Структура и выраженная консервативность остатков Gln в рассматриваемых белках делают их вероятными кандидатами на эту роль.

Консервативность остатков Pro, определяющих, по-видимому, компактность и специфический характер укладки экспонированных в строму и люмен перетяжек, указывает на функциональную значимость определенной конформации внемембранных участков рассматриваемых белков, косвенно свидетельствуя в пользу предположения об участии хлорофиллсвязывающих субъединиц ядра ФС II в важных пространственных взаимодействиях с другими компонентами этого комплекса.

Обращает на себя внимание расположение остатков Cys в рассматриваемых белках. Два цистeinовых остатка CPa-2 (Cys-244 и Cys-287) находятся в соседних предполагаемых трансмембранных сегментах (IV и V), располагаясь приблизительно на равном удалении от поверхностей мембраны. Таким образом, эти остатки могли бы образовывать дисульфидную связь, стабилизирующую эту часть молекулы. Идентичная картина наблюдается и в CPa-1, цистeinовые остатки которой располагаются в сегментах II и III. Интересно, что у *Synechocystis* (рис. 4) в отличие от всех прочих видов Cys в сегменте V отсутствует, но обнаруживается в аналогичной позиции трансмембранного сегмента III.

Структура белкового продукта гена *psbC* более консервативна, чем структура CPa-1. Особо следует отметить последовательности первого предполагаемого трансмембранного сегмента с прилегающими участками и гидрофильную перетяжку между трансмембранными сегментами V и VI.

Так же, как и в случае CPa-1 белка [1], характер аминокислотных замен в ряде позиций полипептидной цепи белка CPa-2 различных организмов (позиции 3, 177, 208, 245, 264, 277, 427 (рис. 4)) свидетельствует о том,

1 MKILYSLRRFYHVETLFNGTFLVLAGRDQETTGFAWWAGNARLILNSGKLLGAHVAHAGLIVFWAGAMNL
 2 T. LA.
 3 T. LT.
 4 T. LA. T.
 5 T. S. P. LA. G.
 6 T. S. SP. V. S. SMVG. LPS. S. R. T.
 7 140. EVAHFVPEKPMYEQQLILLPHLATLGWGVGPGEVLDTFPYFVSGVLHLISSAVLGFGGIYHALLGFETL
 8 I.
 9 I. IV. L. R. V.
 10 210. EESFPFFGYVWKDRNEMTTILGIHLILLGLGAFLLVLKALYFPGVYDTWAPGGGDVRKITNLTLSPSVIF
 F.
 11 I. F. V.
 12 I. S. F. I. F. IL.
 13 K. A. F. I. G.
 14 YSS. D. K. Q. N. I. Y. C. L. F. MF. V. P. M. AI.
 15 280. GYLKSPFGGEKGWIVSVDDLEDIIGGHVWLGRICVFEGGIWHILTLPFAWARRAFVWSGEAYLSEVLAALS
 16 S. L. R. L.
 17 S. IL. L. G.
 18 C. I. V. IL. L. G. A
 19 A. N. S. I. L. G. G. IA
 I. NNM. I. I. L. IS. G. LI. G.
 20 350. VFGFIACCFVVFHNNTAYPSEFYGPTGPEASQAGAFTFLVRDQRLGANVGSAQQPTGLGKYLMRSPPTGEV
 R.
 21 I.
 22 F. G. K. DV. SF.
 23 FGGETMRFWDLRAPWLEPLRGPNGLDSRLKKDIQPWQERRSAEYMTHAPLGLSNSVGGVATEINAVNYV
 24 I.
 25 I.
 26 I.
 27 I.
 28 I.
 29 I.
 30 420.
 SPRSWLSTSHTFVLFGLFVGHHLWAGRARAAAAGFEKGIDRDLEPVLYMNPLK
 F.
 F.
 A. F. T.
 A. F. S. T.
 A. F. S. T.
 A. F. S. T.
 FL ET. T. F. PD. D
 470.

Рис. 4. Аминокислотные последовательности продуктов гена *psbC*: 1 — ржи (*Secale cereale*), 2 — пшеницы (*Triticum aestivum*), 3 — ячменя (*Hordeum vulgare*), 4 — кукурузы (*Zea mays*), 5 — табака (*Nicotiana tabacum*), 6 — шпината (*Spinacia oleracea*), 7 — гороха (*Pisum sativum*), 8 — мха (*Marchantia polymorpha*), 9 — цианобактерии (*Synechocystis 6803*). Структуры 2, 4—9 взяты из работы [8], а 3 — из работы [22]. Подчеркнуты предполагаемые трансмембранные сегменты

что хлороплазты двудольных растений находятся несколько ближе в эволюционном отношении к цианобактериям, чем хлороплазты однодольных.

Сравнение аминокислотных последовательностей двух хлорофиллов связывающих белков между собой не выявляет сколько-нибудь значительного сходства, однако два небольших участка обеих цепей, соответствующие предполагаемым трансмембранным сегментам I и VI, обнаруживают заметное структурное подобие (рис. 5). Возможно, это связано с тем, что эти фрагменты принимают участие в пространственном взаимодействии с двумя гомологичными субъединицами реакционного центра — белками D1 и D2.

17
 G R L L A V H I M H T A L V S G W A G S M A L Y E L A CPa-1
 | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : |
 G K L L G A H V A H A G L I V F W A G A M N L F E V A CPa-2
 47

446
 S P R G W F T F G H A T F A L L F F F G H I W H G A R CPa-1
 | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : | : |
 S P R S W L S T S H F V L G F F L F V G H L W H A G R CPa-2
 421

Рис. 5. Сравнение структур двух участков полипептидных цепей CPa-1 и CPa-2 белков ржи, включающих в себя предполагаемые трансмембранные сегменты I и VI (отмечены линиями). Штрихами соединены идентичные остатки, двоеточием — консервативные замены. Цифрами указаны позиции аминокислотных остатков в соответствующих полипептидных цепях

Экспериментальная часть

хлДНК выделяли как описано ранее [1]. Рестрикционный анализ вели согласно работе [23], используя электрофорез в 0,5% агарозном геле. Двунаправленный blot-перенос и гибридизацию нитроцеллюлозных blot-реплик с олигонуклеотидными зондами проводили как описано [24].

Плазмидную ДНК выделяли по методам [25]. Получение компетентных клеток и гибридизационный отбор необходимых рекомбинантных клонов осуществляли по методикам, описанным в работе [26]. Лигирование фрагментов ДНК в расплаве легкоплавкой агарозы проводили согласно сообщению [27].

Векторами для клонирования служили плазмида pTZ19R и репликативная форма ДНК фагов M13mp18, M13mp19, обработанные соответствующими рестриктазами. Дефосфорилирование концов векторов не проводилось.

Переклонирование фрагментов ДНК в фаговые векторы M13mp18, M13mp19 и наработку однонитевой матрицы осуществляли по методикам [28, 29]. Крупные фрагменты клонировали, вырезая их из геля и лигируя с вектором в расплаве, мелкие клонировали в виде соответствующей рестрикционной смеси с последующим гибридизационным анализом полученных рекомбинантных клонов и Т-скринингом [28]. В клонировании и при наработке однонитевой ДНК-матрицы использовали клетки JM109 (Rec⁻) [30].

Секвенирование вели по методу Сэнгера [31] с модификациями [32]. Олигонуклеотидные зонды синтезировали фосфорамидитным методом на синтезаторе Applied Biosystems.

Авторы выражают благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бухаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С., Абдулаев Н. Г. // Биоорган. химия. 1989. В. 15. № 7. Р. 927—939.
- Ikeuchi M., Inoue Y. // FEBS Lett. 1988. V. 241. № 1/2. P. 99—104.
- Webber A. N., Packman L., Chapman D. J., Barber J., Gray J. C. // FEBS Lett. 1989. V. 242. № 2. P. 259—262.
- Zuber H. // Photobiol. Photobiol. 1985. V. 42. № 6. P. 821—844.
- Yamaguchi N., Takahashi Y., Satoh K. // Plant Cell. Physiol. 1988. V. 29. № 1. P. 123—131.
- Morris J., Herrmann R. G. // Nucl. Acid Res. 1984. V. 12. № 6. P. 2837—2850.
- Alt J., Morris J., Westhoff P., Herrmann G. // Curr. Genet. 1984. V. 8. № 8. P. 597—606.

8. Chisholm D., Williams J. G. K. // Plant Mol. Biol. 1988. V. 10. № 4. P. 293—301.
9. Bricker T. M., Frankel L. K. // Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 256. № 1. P. 295—301.
10. Isogai Y., Yamamoto Y., Nishimura M. // FEBS Lett. 1985. V. 187. № 2. P. 240—244.
11. Dzelzkalns V. A., Bogorad L. // EMBO J. 1988. V. 7. № 2. P. 333—338.
12. Vermaas W. F. J., Williams J. G. K., Rutherford A. W., Mathis P., Arntzen C. J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 24. P. 9474—9477.
13. Bukharov A. A., Kolosov V. L., Zolotarev A. S. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 17. P. 8737.
14. Bukharov A. A., Kolosov V. L., Klezovich O. N., Zolotarev A. S. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 2. P. 798.
15. Kolosov V. L., Bukharov A. A., Zolotarev A. S. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 4. P. 1759.
16. Kolosov V. L., Klezovich O. N., Zolotarev A. S. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 4. P. 1760.
17. Alt J., Morris J., Westhoff P., Herrmann G. // Curr. Genet. 1984. V. 8. № 8. P. 597—606.
18. Holschuh K., Bottomley W., Whitfield P. R. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 23. P. 8819—8834.
19. Rasmussen O. F., Bookjans G., Stummann B. M., Henningsen K. W. // Plant Mol. Biol. 1984. V. 3. P. 191—199.
20. Steinmuller K., Ley A. C., Steinmetz A. A., Sayre R. T., Bogorad L. // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 216. № 1. P. 60—69.
21. Michel H., Hunt D. F., Shabanowitz J., Bennet J. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 3. P. 1123—1130.
22. Reverdatto S. V., Andreeva A. V., Buryakova A. A., Chakhmakhcheva O. G., Efimov V. A. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 10. P. 3996.
23. Fuchs R., Blakesley R. // Meth. Enzymol. 1983. V. 100. P. 3—38.
24. Meinkoth J., Wahl G. // Anal. Biochem. 1984. V. 138. № 2. P. 267—284.
25. Monstein H.-J., Geijer T. // Biochem. Inter. 1986. V. 12. № 6. P. 889—896.
26. Маниамис Т., Фрич Э., Сэмбрюк Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
27. Murray J. A. H. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 24. P. 10118.
28. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20—78.
29. Eperon I. C. // Anal. Biochem. 1986. V. 156. № 2. P. 406—412.
30. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. № 1. P. 103—119.
31. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
32. McGraw III R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298—303.

Поступила в редакцию
31.X.1989

A. A. BUKHAROV, V. L. KOLOSOV, A. S. ZOLOTAREV

**RYE PHOTOSYSTEM II: NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE psbC GENE
ENCODING 43-kDa CHLOROPHYLL(a)-BINDING PROTEIN**

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

The structure of the rye chloroplast DNA, which contains psbC gene coding for 43-kDa chlorophyll(a)-binding subunit of photosystem II, is determined. The sequence of trnS (UGA) gene encoding tRNA Ser is located at a distance of 140 bp downstream from the stop codon of psbC gene on the opposite DNA strand. The 5'-terminal part of psbC gene, like in other plants, overlaps by 50 bp the 3'-terminal region of psbD gene coding for D2 protein of photosystem II. The amino acid sequence of the psbC gene product reveals common features with the structure of the psbB gene product (CPa-1 protein). The structural similarity of these two proteins seems to reflect their similar functions.