



УДК 577.113.5

© 1992 г. В. Л. Колосов

**ФОТОСИСТЕМА II РЖИ. НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ГЕНА *psbK* К И ПРИЛЕГАЮЩИХ К НЕМУ ОБЛАСТЕЙ**

Институт фотобиологии АН Республики Беларусь, Минск

До недавнего времени фракция полипептидов ФС II малой молекулярной массы оставалась неохарактеризованной. Прогресс в изучении ряда малых полипептидов ФС II достигнут в значительной степени благодаря применению новых схем электрофореза, а также недавно появившихся методов секвенирования белков, иммобилизованных на PVDF-мембранах [1] (PVDF — поливинилидендифторид). К их числу принадлежит так называемый К-полипептид, мигрирующий при SDS-электрофорезе в районе 2—4 кДа [2, 3].

К-полипептид остается ассоциированным с ФС II после удаления ССК-2 (при солиubilизации октилглюкозидом), но отсутствует в получаемых при дальнейшей очистке кислородвыделяющих препаратах ФС II [2]. На этом основании предполагают, что он не участвует в фотохимической реакции и выделении кислорода [2]. Определена N-концевая последовательность К-полипептида, что позволило установить хлоропластную природу его кодирования, а ген обозначить как *psbK* [2]. У ячменя обнаружены четыре транскрипта гена *psbK*, различающихся по размерам 3'-концевой области [4]. Вероятно, ген *psbK* котранскрибируется с генами *psbI-psbD-psbC*. Известна его нуклеотидная последовательность для ряда фотосинтезирующих организмов. Анализ профиля гидрофобности К-полипептида обнаруживает один трансмембранный сегмент в С-концевой области и положительно заряженный N-конец. Точная локализация и функция К-полипептида неясны.

В настоящей работе, являющейся заключительным этапом наших исследований по установлению структуры полипептидов, образующих комплекс ФС II ржи [5—8], установлена нуклеотидная последовательность гена *psbK* и область между генами *psbI* и *psbD*.

Задача получения фрагмента хлДНК ржи, содержащего необходимую последовательность, была решена методом направленного клонирования фрагмента ДНК, гибридизирующегося с синтетическим олигонуклеотидом д(АААТТГСССГАГГССТАТГСТТТТТГААТССА), структура которого соответствовала началу гена *psbK* табака [2]. ДНК из хлоропластов ржи выделяли как описано в работе [5]. Гидролиз вели эндонуклеазой рестрикции *Bam*HI (НПО «Фермент», Вильнюс) и полученные фрагменты разделяли в 0,6% легкоплавком агарозном геле. Гибридизирующий с зондом фрагмент В10 размером 4,8 т.п.о. выделяли из геля и лигировали в

Сокращения: ФС II — фотосистема II, хлДНК — хлоропластная ДНК.

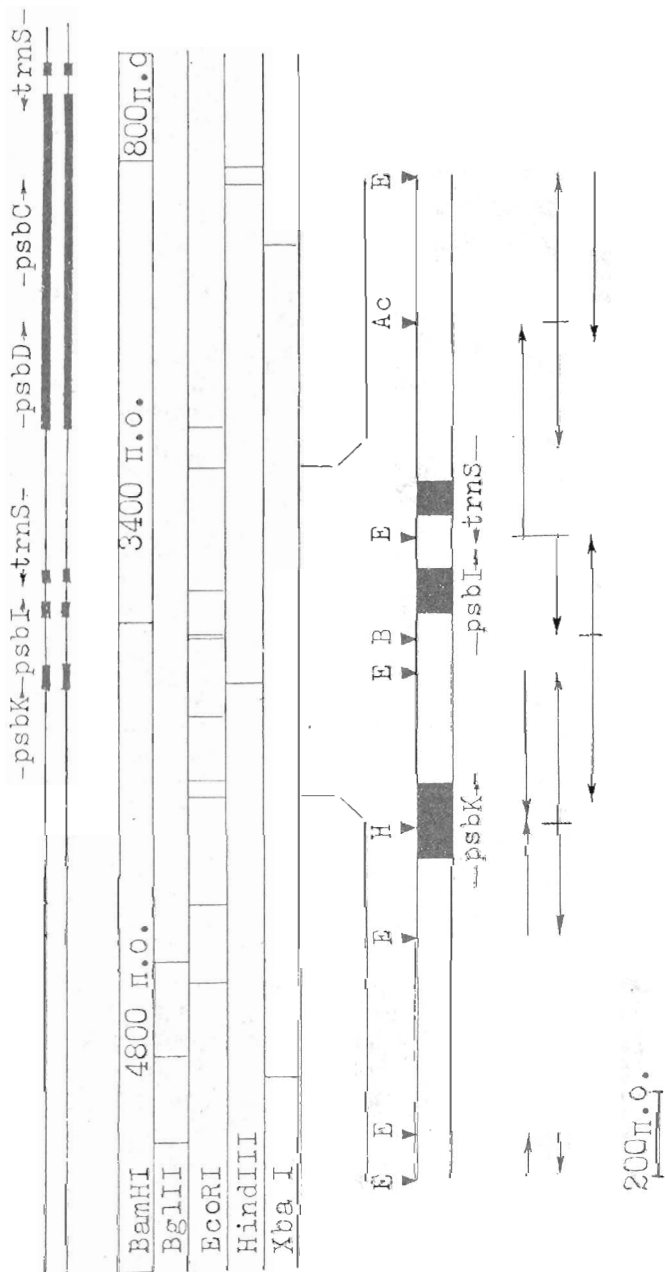


Рис. 1. Рестриктивная карта участка хлДНК ржи, содержащего три *Bam*HI-фрагмента. Гены показаны темными прямоугольниками. Стрелками указано направление и протяженность транскрипции генов. Ac - *Acc*I, B - *Bam*HI, E - *Eco*RI, H - *Hind*III

1 GAATTCCTAGTAGTAATATATTTTTTCAATACCAAAAAACAATTAACATATAAACAATAAACTATTCGAAT
 73 GAAAAGATTGAAAGTTTTTGGTAGTTATAGAAATTC

A

1 GAATTCCTAATTAAGATAATTATATGAAAGTCGAATTTAATTCACACTTCATTGAGAGTGGCAATACAAGGAGGT
 73 ATTTTGTGTTTGGGAAAGTCGGAAGAAAAAGATTTTGAATCTGCCTTTTCCCTTCTTTCCCTTAAAAAATA
 145 ACTCAAGAAAAATCCAATTAATTTACTCTACAAGAATGAAATGCTTGTATTGCCTAATATACTTAGTTTAAACC
 PsbK →
 M P N I L S L T
 217 TGTATCTGTTTTAAATCTGTCTTTATCTCTACTAGTTTTTTCTTTGCCAAATTACCCGAAGCTTATGCCTATT
 C I C F N S V L V P T S F F F A K L P E A V A I
 289 TTCAATCCAATCGTGGATATATATGCCTGTATACCTCTATTCTTTTTCTATTAGCCTTTGTTTGGCAAGCT
 F N P I V D I H P V I P L F F F L L A F V W Q A
 361 GCTGTAAGTTTTTCGATGAAATCTTTAGTACTCTGTATGCCAAATFGAATGATGTGTTCATTCAAAAAAAT
 A V S F R *
 433 TAAAAATGGGTAAAAGCCGAGAAGTTTTATATTTTTATATTATGAACCTTCGATTTCTAAAAATTTAAATCTT
 505 CTACATTTGAATGGGTAGCTACAGCAATAAAAAATAATTTGGATCAGCCTTTCTACTCCCCTGCACCTAGGTTG
 577 AGCAGGTACCTACACAATACCTAACCACTAACCCCTATTTTTCTATTGATAAGAGTGCCTATTATAAAAAAG
 649 ATTCTTGCAATTTTTTTCAAGAAATCTTTTTTTTTTTTTTTCGATTTTTTAGGTATCAAAAAAACCACTCTAG
 psbI →
 721 TGGATCCGTGTGGTAAGGAAAAACTGGTAATCTATTCCCTTAAAAAAATCTTGGAGATTATGTA ATGCTT
 H L
 792 ACTCTCAAACCTTTTTGTTTATACAGTAGTGATATCTTTGTTTCACTCTTTATCTTTGGATTTCTTATCTAAT
 P L K L F V V T V V I F F V S L F I F G F L S N
 864 GACCCAGGACGGAAATCTGGACGCGAGGAGTAAAAATTCATTTTTTTTTTTCTTACAATTTGGATTTGTTTCC
 T P G R N P G R E E *
 936 TACATTTATCTATGAAAAAATCCGGGGGTCAGAAATCTTTCCAATTCGAAAAGTCCCAATGATCCAAGGGAG
 1008 CGGAAAAGAGAGGGATTTCGAACCCCTCGGTACAAAAAATTTGTACAACGGATTAGCAATCCGCCGCTTAGTCC
 1080 ACTCAGCCATCTCTCCACGTTCCAAAGCGAAAGGTTTCCCGTGAATGATATAGGCAAGAAATAAGAAAAAAC
 1152 GGTTCGAAAAAACCCCTTTTTTCTTTTCCAAAGTCTATAAAAAATATAATTGCCAATCCATTTAGTTATA
 1224 TCTTTTTTCTTAAATGTTAATAAAAAAGAAGAAAATCTTGTTTTTTCTTAAAAATCGATTTGGCCG
 1296 AGAGACAATCAAATAGATTTCTCTTTAGCGGGCATTTCATATAGGACTTTGTTATAATATAAATCTGTTAT
 1368 AATTATAATAAAAAAAGCAGATATATATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAAACCGCTTTTTTTTTCGATTTATTTATC
 1440 AAGAAAGCAAAAAGGGTCTTATCAAAATCCACCATAAAAATGGAAAGAAGCATAAAGTAAGTAGACCTGACT
 1512 CCTTTAATGATGCCTCTATCCGCTATTCTGATATATAAAATTCGATGTAGATGAAATTTGATAAGCGAATTTT
 1584 TTGTATTTCTTAGACTTAGACCGCGCAAGACAAGAAATTTTCGCTATTACGATTTCCATATTTCTGTTACT
 1656 AGATGTTCTATAGGAATAAGAAGAAATTCGCAACTCTTTTCGCTACACATAAAAAATTTGATTTGCAAGGTCCA
 1728 TTTTTTTTTTTCAGAAATCTCTATTTTGTCTTCCACCATGCAATAGAGAGGGAAATGGGAAAAAGAGGGT
 1800 TACTTTTATTTTCATTTTCCCTTAAAAAGATAGACTTTGAAATAGGAGTCTTGGAAATAATGCTGAAATTC

B

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность *EcoRI*-фрагмента длиной 117 п. о. (A) и участка хпДНК ржи, содержащего гены *psbK*, *psbI* и *trnS* (B). Ниже нуклеотидных последовательностей их кодирующих цепей показана соответствующая им последовательность аминокислот. Подчеркнуты предполагаемый участок связывания рибосом и ген *trnS*

VamHI-сайт полилинкера плазмиды рTZ19R (Pharmacia, Швеция) [9]. Трансформанты *E. coli* (штамм JM109), несущие плазмиду со вставкой В10, отбирали с помощью вышеупомянутого олигонуклеотидного зонда. Фрагмент В10 подвергали рестриктному анализу с последующим разделением полученных фрагментов электрофорезом в агарозном геле. По результатам гибридизации и с учетом литературных данных [4] была построена рестриктная карта фрагмента В10 ржи (рис. 1). В ходе работы нами были переклонированы *EcoRI*-фрагменты длиной 117 и 652 п. о.

На рис. 1 приведена рестриктная карта фрагментов В10, В15' [8] и стратегия определения нуклеотидной последовательности двух участков дидезоксирибонуклеотидным методом [10] с модификациями [11]. Переклонирование фрагментов ДНК в фаговые векторы М13mp18, М13mp19 и на-

работку однонитевой матрицы осуществляли как описано ранее [5]. Нуклеотидную последовательность фрагмента *EcoRI* длиной 117 п.о. (рис. 2а) определяли на двухцепочечной плазмидной матрице, что способствовало построению рестриктной карты фрагмента В10, содержащего 7 *EcoRI*-сайтов. Сопоставление этого фрагмента с аналогичной последовательностью ячменя выявляет делецию одного нуклеотида и 8 замен, приводящих к появлению добавочного *EcoRI*-сайта у ржи.

Нуклеотидная последовательность фрагмента хлДНК ржи, представленная на рис. 2б, включает гены *psbK*, *psbI*, *trnS* и выявляет 94% гомологии в сравнении с соответствующим участком хлДНК ячменя. Еще большую консервативность проявляют сами гены *psbK* и *psbI* обоих растений (одна и две замены соответственно) [4]. Из полученных нами данных следует, что ген *psbK* расположен внутри *EcoRI*-фрагмента длиной 652 п.о.

В настоящей работе завершено определение нуклеотидной последовательности между генами *trnS* и *psbD*, частично опубликованной ранее [8]. Таким образом, нами установлена нуклеотидная последовательность кластера генов *psbK-psbI-trnS-psbD-psbC-trnS* ржи длиной 4854 п.о. [7, 8]. Такая организация этого района хлДНК ржи полностью соответствует его организации во всех изученных однодольных растениях. По сравнению с двудольными растениями гены *psbK* и *psbI* претерпели инверсию.

Автор выражает благодарность Н. С. Быстрову за синтез олигонуклеотидного зонда и Н. Г. Абдулаеву за помощь в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ikeuchi M., Takio K., Inoue Y. // FEBS Lett. 1989. V. 242. № 2. P. 263–269.
2. Murata N., Miyao V., Hayashida N., Hidaka T., Sugiura M. // FEBS Lett. 1988. V. 235. № 1, 2. P. 283–288.
3. Koike H., Mamada K., Ikeuchi M., Inoue Y. // FEBS Lett. 1989. V. 244. № 2. P. 391–396.
4. Sexton T. B., Jones J. T., Mullet J. E. // Curr. Genet. 1990. V. 17. № 5. P. 445–454.
5. Бухаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С., Абдулаев Н. Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 927–939.
6. Колосов В. Л., Клезович О. Н., Абдулаев Н. Г., Золотарев А. С. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1284–1286.
7. Бухаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С. // Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 9. С. 1210–1217.
8. Колосов В. Л., Бухаров А. А., Золотарев А. С. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 448–455.
9. Манниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
10. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
11. McGraw III R. A. // Anal. Biochem. 1984. V. 143. № 2. P. 298–303.

Поступило в редакцию
25.VI.1992

V. L. KOLOSOV

RYE PHOTOSYSTEM II: NUCLEOTIDE SEQUENCE OF *psbK* GENE AND THE FLANKING REGIONS

Institute of Photobiology, Belarus Academy of Sciences, Minsk

The structure of the rye chloroplast DNA which contains the *psbK* gene coding for a subunit of photosystem II is determined. The gene *psbI* encoding an other protein of photosystem II is located 407 bp downstream from the stop codon of this gene. The determination of structure of the intergenic region between the *psbI* and *psbD* genes is fully elucidated. The rye *BamHI* fragment, comprising the *psbK* gene, is structurally similar to the corresponding fragment of the barley genome.