



УДК 577.112.5

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТА ГЕНА ФОСФОФРУКТОКИНАЗЫ *Cottocomephorus grewinkii*

© 1996 г. И. И. Тулохонов[#], Е. Н. Манакова, Г. Ю. Флегентов, С. И. Беликов, Е. Ф. Зайчиков

Лимнологический институт СО РАН, 664033, Иркутск. ул. Уланбаторская, 3

Поступила в редакцию 22.11.95 г. После доработки 18.03.96 г.

Определена нуклеотидная последовательность (208 п.о.) участка гена *pfk*, кодирующего фосфофруктокиназу из байкальской желтокрылки *Cottocomephorus grewinkii* семейства Cottidae. Секвенированный участок ДНК кодирует аминокислотную последовательность длиной 38 а.о. и содержит интрон длиной 94 п.о. Сравнение структуры фосфофруктокиназы *C. grewinkii* (по гену и белку) с известными структурами других фосфофруктокиназ выявило наибольшее сходство с ферментами из мышц кролика и печени крысы.

Ключевые слова: фосфофруктокиназа, интрон, секвенирование.

В связи с исследованием проблемы происхождения эндемичных организмов озера Байкал изучается филогения нуклеиновых кислот и ферментов этих организмов [1,2]. В качестве одного из объектов нами выбран фрагмент гена фосфофруктокиназы (КФ 2.7.1.11) на участке, кодирующем часть активного центра этого фермента. В данном сообщении публикуется нуклеотидная последовательность такого фрагмента для эндемичного байкальского бычка желтокрылки *Cottocomephorus grewinkii*. До сего времени были известны нуклеотидные последовательности генов фосфофруктокиназы (*pfk*) микроорганизмов [3, 4], крысы [5], кролика [6] и человека [7]. В связи с этим расшифрованная нами первая последовательность фрагмента гена фосфофруктокиназы рыбы представляет, по нашему мнению, большой интерес.

После анализа известных нуклеотидных последовательностей генов *pfk* различных организмов мы выявили консервативные регионы и синтезировали олигонуклеотидные праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР), окаймляющие один из этих регионов. Последовательность одного праймера совпадала с последовательностью гена *pfk* кролика на участке 7545–7568 (*pfk* –7550L, левый праймер, см. рисунок), а другой был комплементарен этому же гену на участке 7958–7980 (*pfk* –7970R, правый праймер).

В ПЦР с этими праймерами на матрице ДНК *C. grewinkii* был получен гомогенный продукт длиной около 260 п.о.

Результаты определения первичной структуры полученного фрагмента приведены на рисунке. Длина секвенированного участка ДНК состав-

ляет 208 п.о., в нем обнаружен интрон длиной 94 п.о. (что гораздо меньше интрона в гене *pfk* кролика (254 п.о.)). Сравнение нуклеотидной последовательности гена *pfk* *C. grewinkii* с известными структурами генов фосфофруктокиназ выявило наибольшее сходство с ферментами из мышц кролика [6] и печени крысы [5]. Во фрагменте экзонной части гена рыбы длиной 114 п.о. имеется 16 отличий от гена *pfk* кролика и 18 от гена *pfk* крысы (как правило, затрагивается третья положение триплета, лишь в одном случае мы обнаружили замену во втором положении).

Экзонная часть секвенированного нами фрагмента ДНК кодирует последовательность из 38 аминокислотных остатков (рисунок). В соответствующей аминокислотной последовательности фермента имеется только 2 отличия от фосфофруктокиназы кролика и 4 от белка крысы. По данным рентгеноструктурного анализа [8, 9], а также результатам сайт-направленного мутагенеза [10], в гомологичных участках последовательностей фосфофруктокиназы из *Escherichia coli* и *Bacillus stearothermophilus* присутствуют аминокислотные остатки, ответственные за связывание фруктозо-6-фосфата, АТФ, АДФ, ионов магния, а также остаток аспарагиновой кислоты (Asp127 для фосфофруктокиназы *B. stearothermophilus* и Asp128 для *E. coli*), катализирующий перенос γ -фосфата с АТФ на фруктозо-6-фосфат (рисунок).

Высокая консервативность первичной структуры (аминокислотные остатки, ответственные за связывание субстрата, полностью инвариантны) свидетельствует в пользу отнесения соответствующего сегмента белковой структуры к области активного центра.

[#] Автор для переписки. Тел.: (3-832) 46-69-07.

Рыба	15	30	45	60	75
	GGC CTG GTC GGG TCC ATT GAC AAT	GAC TTC TGT GGC ACT GAC ATG ACC ATC ACC GAC TCT GCC CTG CAT CGC			
Кролик	7545	GCC CTG CTC GCC TCC ATT GAC AAT	ASP Phe Cys Gly Thr Asp Met Thr Ile Gly Thr Asp Ser Ala Leu His Arg		
Крыса	478	GGT CTG CTG GGC TCC ATC GAC AAC GAC TTC TGC GGC ACC ACC ATC GGC ACC GAC TCT GCC CTG CAC CGG	Gly Leu Val Gly Ser Ile Asp Asn Asp Phe Cys Gly Thr Asp Met Thr Ile Gly Thr Asp Ser Ala Leu His Arg		
<i>E. coli</i>	122	Gly Leu Pro Gly Thr Ile Asp Asn Asp	Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Thr Ala Leu Ser Thr		
<i>B. stear.</i>	121	Gly Val Pro Gly Thr Ile Asp Asn Asp	Ile Pro Gly Thr Asp Phe Thr Ile Gly Phe Asp Thr Ala Leu Asn Thr		
		Fr6P Mg ²⁺			
Рыба	90	105	120	135	150
	ATA ATA GAG ATA GAT GCC ATC ACC ACC ACA GCA	AGgtatgcagtgtgaataattactcgtcttattgaatacaaaacttgccat			
Кролик		Ile Ile Glu Ile Val Asp Ala Ile Thr Thr Thr Thr Ala Gln Ser			
Крыса		ATC ACA GAG ATT GTG GAT GCC ATC ACC ACC ACA GCC CAG AGgtaccac.....	Интрон		
		Ile Thr Glu Ile Val Asp Ala Ile Thr Thr Thr Thr Ala Gln Ser			
		ATC ATG GAG GTC ATC GCC ATC ACC ACC ACT GCC CAG AG.....	Интрон		
		Ile Met Glu Val Ile Asp Ala Ile Thr Thr Thr Thr Ala Gln Ser			
<i>E. coli</i>		Val Val Asp Ala Ile Asp Arg Leu Arg Asp Thr Ser Ser			
<i>B. stear.</i>		Val Ile Asp Ala Ile Asp Lys Ile Arg Asp Thr Ala Thr Ser			
		ADP			
Рыба	180	195	210	225	250
	gctcattttaagagctcttgacatgctatgctgtgtgcttcgctcagT	CAC CAG AGG ACC TTC ATC CTG CAA GTG ATG GCG CAC TGT GG			
Кролик	gtctctctcttcgacG	His Gln Arg Thr Phe Ile Leu		
Крыса	gtctctctcttcgacG	His Gln Arg Thr Phe Val Leu Val Met Arg His Cys		
	C	His Gln Arg Thr Phe Val Leu Val Met Arg His Cys		
<i>E. coli</i>		His Gln Arg Ile Ser Val Val Glu Val Met Gly Arg Tyr Cys 174			
<i>B. stear.</i>		His Glu Arg Thr Tyr Val Ile Glu Val Met Gly Arg His Ala 173			
		Fr6P			

Первичная структура фрагмента гена *pk* и соответствующей аминокислотной последовательности фосфофруктокиназы *S. grewingki* (рыба) и родственных фосфофруктокиназ из мышц кролика и печени крысы. В структуре гена *pk* рыбы двойной чертой подчеркнуты последовательности, соответствующие праймерам для ПЦР. В нуклеотидных последовательностях генов из мышц кролика и печени крысы и в кодируемых ими аминокислотных последовательностях подчеркнуты остатки, отличающиеся от соответствующих остатков последовательностей рыбы. В аминокислотных последовательностях фосфофруктокиназ *E. coli* и *B. stearotherophilus* (*B. stear.*) выделены жирным шрифтом остатки, входящие в активный центр; под ними указаны связывающиеся с ними субстраты и эффекторы (Fr6P – фруктозо-6-фосфат).

Интронная часть расшифрованной нами последовательности гена *pfk* желтокрылки не имеет сколько-нибудь выраженного сходства ни с одной из известных последовательностей нуклеотидов банка EMBL. По предварительным данным, длина интрона существенно варьирует у различных байкальских эндемиков, что открывает интересные перспективы для изучения процессов видообразования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, бисакриламид, трис(гидрокси метиламино)метан (Sigma, США); агарозу (BioRad, США); легкоплавкую агарозу (FMC, США); ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* (BioPol, Россия).

Олигодезоксирибонуклеотидные праймеры были синтезированы Н-фосфонатным методом по методике [11] и мечены по 5'-концам [γ - 32 P]АТФ [12].

ДНК из печени *C. growingki* выделяли согласно работе [12].

Аmplификацию гена фосфофруктокиназы проводили в 25 мкл раствора, содержащего 10 мМ трис-НСI (рН 8.8), 50 мМ КСI, 2.6 мМ MgCl₂, 0.2 мг/мл БСА, 10 мМ дитиотреит, 400 мкМ dNTP, 0.4 мкМ праймеры, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы и 10 нг ДНК *C. growingki*. Амплификацию осуществляли в течение 35 циклов ПЦР на приборе "ЛИНА" (Ангарск). Каждый цикл состоял из денатурации матрицы (94°C, 1 мин), отжига праймеров (50°C, 1 мин) и элонгации цепей ДНК (72°C, 70 с). Продукты реакции анализировали и выделяли электрофорезом в геле легкоплавкой агарозы, как описано в работе [12].

Определение первичной структуры и анализ последовательности амплифицированного фрагмента ДНК. Для секвенирования была использована катализируемая *Taq*-ДНК-полимеразой реакция линейного цепного копирования [13]. Секвенирование осуществляли по обеим цепям ДНК

с использованием меченных по 5'-концам олигонуклеотидов *pfk*-7550L, *pfk*-7970R. Поиск гомологии нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы DNASIS (Hitachi). Известные нуклеотидные последовательности гена *pfk* различных организмов были взяты из EMBL-банка нуклеотидных последовательностей.

Работа частично финансировалась грантом Специального фонда для выплаты персональных стипендий и грантов талантливым молодым ученым (проект Д1.06).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grachev M.A., Slobodyanyuk S.Ja., Kholodilov N.G., Fyodorov S.P., Belikov S.I., Sherbakov D.Yu., Sideleva V.G., Zubin A.A., Kharchenko V.V. // J. Mol. Evol. 1992. V. 34. P. 85–90.
2. Кирильчик С.В., Слободянюк С.Я., Беликов С.И., Павлова М.Е. // Молекуляр. биология. 1995. Т. 29. P. 817–825.
3. Hellinga H.W., Evans P.R. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. P. 363–373.
4. French B.A., Chang S.H. // Gene. 1987. V. 54. P. 65–71.
5. Hotta K., Nakajima H., Yamasaki T., Hamaguchi T., Kuwajima M., Noguchi T., Tanaka T., Kono N., Tarui S. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 202. P. 293–298.
6. Lee C.-P., Kao M.C., French B.A., Putney S.D., Chang S.H. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 4195–4199.
7. Nakajima H., Noguchi T., Yamasaki T., Kono N., Tanaka T., Kono N., Tarui S. // FEBS Lett. 1987. V. 223. P. 113–116.
8. Evans P.R., Hudson P.J. // Nature. 1979. V. 279. P. 500–504.
9. Shirakihara Y., Evans P.R. // J. Mol. Biol. 1988. V. 204. P. 973–994.
10. Hellinga H.W., Evans P.R. // Nature. 1987. V. 327. P. 437–439.
11. Кумарев В.П., Баранова Л.В., Кобзев В.Ф., Кузнецов К.Д., Средин Ю.Г. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. С. 276–278.
12. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
13. Murray V. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 8889.

The Nucleotide Sequence of a Fragment of the Phosphofructokinase Gene from *Cottocomephorus growingki*

I. I. Tulokhonov, E. N. Manakova, G. Yu. Flegentov, S. I. Belikov, and E. F. Zaichikov

Institute of Limnology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, ul. Ulanbatorskaya 3, Irkutsk, 664033 Russia

Abstract—The nucleotide sequence of a 208-bp fragment of the *pfk* gene encoding phosphofructokinase from Baikalian fish *Cottocomephorus growingki* (Cottidae family) was determined. The fragment shows the codes of a sequence of 38 amino acid residues and contains a 94-bp intron. The nucleotide sequence of the *C. growingki* phosphofructokinase gene and the corresponding amino acid sequence display the maximum homology to phosphofructokinases from rabbit muscles and a rat liver.

Key words: phosphofructokinase, intron, sequencing.