



УДК 547.963.32.02

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КОНЦЕВЫХ УЧАСТКОВ  
И ПРОМОТОРНОЙ ОБЛАСТИ А<sub>2</sub> ДНК ФАГА Т7

Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н.,  
Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шмелкина  
Академии наук СССР, Москва;

Новосибирский институт органической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск

Нами исследована первичная структура рестриктных фрагментов ДНК фага Т7 и с помощью описанного ранее [1] модифицированного метода Максама — Гилберта идентифицированы 250 нуклеотидов в концевых участках и в области промотора А<sub>2</sub> ранних генов.

ДНК фага Т7+ (Студьер) дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой, фермент удаляли фенольной экстракцией и ДНК рефосфорилировали Т<sub>4</sub>-полинуклеотидкиназой и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3000 Ки/ммоль). Радиоактивную ДНК гидролизовали нуклеазой *endoR·HaeIII*, после чего электрофорезом в 5% полиакриламидном геле (РАГ) выделили два 5'-<sup>32</sup>P-меченых фрагмента: один — длиной около 150 нуклеотидных пар (*HaeIII*-150; содержит 5'-конец *r*-цепи, т. е. «правый» конец ДНК Т7) и второй — длиной около 1300 н. п. (*HaeIII*-1300; содержит 5'-конец *l*-цепи, т. е. «левый» конец ДНК Т7). По-видимому, второй фрагмент идентифицирован описанному ранее промоторсодержащему фрагменту ДНК Т7, который был получен с помощью нуклеазы *endoR·Bsu I* и длина которого была оценена близкой к 1000 н. п. [2].

Фрагмент *HaeIII*-150 подвергли химическому расщеплению по [1] и разделением продуктов деградации в 20% РАГ (30 × 80 × 0,14 см) определили 5'-концевую последовательность *r*-цепи, приведенную на рис. 1. Фрагмент *HaeIII*-1300 гидролизовали нуклеазой *endoR·HpaII*; образовавшийся 5'-<sup>32</sup>P-меченый субфрагмент, содержащий около 530 н. п. [3] (фрагмент *HpaIII*-530), выделили электрофорезом в 5% РАГ и анализировали тем же методом [1]; найденная 5'-концевая последовательность *l*-цепи также представлена на рис. 1.

Первичная структура 5'-концевых участков обеих цепей ДНК Т7 была ранее исследована Лёвеном, который идентифицировал 15 нуклеотидов в *r*-цепи и 18 в *l*-цепи [4]. Позднее структура восьми 5'-концевых нуклеотидов *l*-цепи была подтверждена Свердловым и Левитан [5]. Найденные нами последовательности отличаются от опубликованных Лёвеном [4] шестью заменами С на А и Т на G. Мы полагаем, что полученные в нашей работе результаты являются достоверными, а отмеченные различия вызваны ошибочной интерпретацией нуклеотидных карт в работе [3] вследствие сдвига —А с —С и —Т с —G (ср. [6]).

(TCTCACAGTGTACGTCCTCC)

(1) 5' TCTCACAGTGTACGGACSTAAAGTTCCSSCCATAGGGGGTACCTAAAGCCGCGCAATCACTAA... AGACSTTTGTAGGGTTCSSCTAA-  
 (r) 3' AGAGTGTACATGGCTGGATTTCAGAGGGGGTATCCSSCATGGATTTCGGGTCCGTTAGTGGATT... TCTGGAACAATCCCAAGGGATT-  
 10 20 30 40 50 60 70  
 60 50 40 30 20 10  
 CCGTTGGGGATGACCCCTTGGGTGTGTCCTTTGGGTGTACCTTTGAGTGTCTCTCTGTGTCCCT 3'  
 GGGAAACCCCTACTGGGAACCCAAACAGAAACCCACAAATGGAACSTCACAGAGGACACAGGGGA 5'  
 (CTCGGACACACAGGGGA)

Рис. 1

Рис. 1. Первичная структура концевых участков ДНК фага T7. В скобках приведены последовательности, опубликованные ранее [4]. Подчеркнуты различия в каждой из двух пар последовательностей. (→) — повторы; (←-----→) — палиндром

(1), 5' CCGATAAGTAAAGACAGCCCTGATAAGTCCGACGGAAACACAGG-  
 (r), 3' CTAATTCATCTGTCCGACATTCAGGGTGCCTTTTGTCC-  
 10 20 30 40  
 50 60 70 80  
 TATTGACAACAATGAAAGTAAACATGCGAGTAAAGATACAAATCG-  
 AATAACTGTGTACTTCATTTGACCTAGGTCATTCATGTTTACG-  
 90 100  
 CTAGGTAACACACTAGCAGCGTCAAC 3'  
 GATCCCAATTTGTGATCGTCCGACGTTGGC 5'

Рис. 2

Рис. 2. Первичная структура фрагмента *Hpa*II-100 ДНК T7, содержащего промотор  $A_2$ . Подчеркнуты последовательности, экспериментально найденные в настоящей работе. Участок связывания РНК-полимеразы, установленный в работе [8], включает нуклеотиды 53—98, положение 80 — точка инициации транскрипции

Для определения нуклеотидной последовательности в области промотора  $A_2$  использовали рестриктный фрагмент, который получали методом [2] из комплекса ДНК Т7 с РНК-полимеразой путем его гидролиза нуклеазой *endoR·Bsu I* (изошизомер *endoR·HaeIII*) с последующей сорбцией связанного с РНК-полимеразой фрагмента на нитроцеллюлозном фильтре. Выделенное вещество при гидролизе нуклеазой *endoR·HpaII* дало три фрагмента: *HpaII-530*, *HpaII-100* и *HpaII/Bsu I-660*. Смесь этих фрагментов дефосфорилировали, вводили 5'-концевую  $^{32}P$ -метку и разделяли электрофорезом в 7% ПАГ. Цепи денатурированного меченого фрагмента *HpaII-100* разделяли электрофорезом по [7], а затем анализировали по [1]. В результате были определены 63 нуклеотида в быстро движущейся (*l*) цепи и 56 нуклеотидов в менее подвижной (*r*) цепи, что дало 13-нуклеотидное перекрывание найденных последовательностей и позволило установить полную структуру этого фрагмента, приведенную на рис. 2.

По данным работы [3], фрагмент *HpaII-100* содержит промотор  $A_2$  ранних генов фага Т7. Выявленная нами последовательность включает в себя установленную ранее Прибновым [8] для участка связывания РНК-полимеразы на этом промоторе (участок 53—98) и полностью согласуется с ней, за исключением одного нуклеотида (98-го в *l*-цепи), который в работе [8] идентифицирован как Т.

Заслуживает внимания то обстоятельство, что в последовательности 48—69 имеется значительный повтор ( $A_{(48)}$ -АСАТГААГТАА и  $A_{(63)}$ -АСАТГСАСГАА, курсивом выделена единственная замена), начало которого соответствует положению —32 от точки инициации транскрипции. Интересно, что аналогичные повторы встречаются в некоторых промоторах фага  $\lambda$  [9].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорган. химия, 3, 1420—1422.
2. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. (1978) Докл. АН СССР, 239, 475—478.
3. Hsieh Tao-shin, Wang J. C. (1976) Biochemistry, 15, 5776—5783.
4. Loewen P. C. (1975) Nucleic Acid Res., 2, 839—852.
5. Свердлов Е. Д., Левитан Т. Л. (1976) Биоорган. химия, 2, 370—375.
6. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acid Res., 1, 331—353.
7. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
8. Pribnow D. (1975) J. Mol. Biol., 99, 419—443.
9. Никифоров В. Г. (1977) в кн. Итоги науки и техники. Молекулярная биология (Хемсин Р. Б., ред.), т. 13, с. 22, ВИНТИ, М.

Поступило в редакцию  
29.IV.1978

#### THE NUCLEOTIDE SEQUENCES AT THE TERMINI AND IN $A_2$ PROMOTER REGION OF T7 PHAGE DNA

KOROBKO V. G., CHUVPILO S. A., KOLOSOV M. N.,  
GRACHEV M. A., ZAYCHIKOV E. F., PLETNYOV A. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;  
Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,  
Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Three sequences have been determined in T7 DNA by a modified Maxam — Gilbert method employing partial depurination in place of A-specific cleavage. These are the 5'-terminal sequences of *r* and *l* strands, and the complete sequence of the *Hpa II* restriction fragment containing the  $A_2$  promoter (84, 65, and 104 nucleotides, respectively). The three sequences agree with the corresponding partial sequences reported by Loewen and Pribnow (15, 18, and 46 nucleotides, respectively) except for seven nucleotides which had probably been identified erroneously.