



УДК 547.963.32.02

**НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ УЧАСТКА
ПРОЧНОГО СВЯЗЫВАНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
ВНУТРИ СТРУКТУРНОГО ГЕНА *rpoB* *E. coli*****Свердлов Е. Д., Липкин В. М., Монастырская Г. С.,
Губанов В. В., Гурьев С. О., Чертов О. Ю.***Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва*

Экспрессия генов, кодирующих субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*, регулируется по сложному и еще не до конца понятому механизму [1]. Недавно было показано [2], что наряду с известными участками регуляции экспрессии *rpoBC*-оперона [4–5] внутри структурного гена β -субъединицы *rpoB* существует участок прочного связывания РНК-полимеразы. Вероятно, он может играть определенную роль в регуляции. В данной работе мы приводим первичную структуру фрагмента гена *rpoB* ES-4,4, расположенного между четвертым сайтом рестрикции эндонуклеазы *SalI* и четвертым сайтом *EcoRI* (рис. 1) и содержащего, по данным работы [2], этот участок.

Приведенная на рис. 2 нуклеотидная последовательность была определена в процессе установления полной структуры фрагмента *EcoRI*-С (рис. 1а). Фрагмент *EcoRI*-С расщепляли одной из рестриктаз, смесь субфрагментов фосфорилировали ^{32}P с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и γ - ^{32}P -АТФ (1000–3000 Ки/моль, Amersham, Англия) и разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле. Комплементарные цепи выделенных субфрагментов разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле и определяли их структуру методом Максама – Гилберта [6] в модифицированном варианте [7].

На рис. 2 дана также аминокислотная последовательность, соответствующая нуклеотидной. Правильность большей части этой последовательности, а следовательно, и точность анализа первичной структуры нуклеотидной цепи, была подтверждена в процессе изучения пептидов, полученных при расщеплении трипсином и протеазой из *Staphylococcus aureus* β -субъединицы РНК-полимеразы, аминокислотную последовательность которой мы определяем параллельно с изучением нуклеотидной последовательности *rpoB*.

Если фрагмент ES-4,4 действительно содержит участок связывания РНК-полимеразы, то в нем должны обнаруживаться специфические последовательности, обуславливающие узнавание и закрепление фермента. Эти последовательности могут, хотя и не обязательно, быть аналогичными соответствующим последовательностям в промоторах [8]. Один из воз-

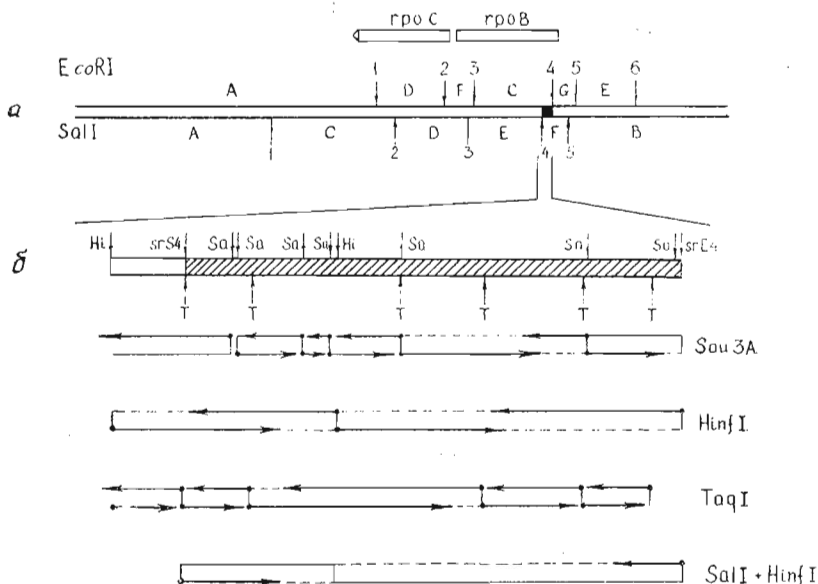


Рис. 1. а) Карта расщепления области ДНК *E. coli*, содержащей структурные гены β - и β' -субъединиц РНК-полимеразы (*rpoB* и *rpoC* соответственно), рестриктонными эндонуклеазами *EcoRI* и *SalI*. Фрагмент ES-4,4 зачернен. Буквенные обозначения фрагментов соответствуют принятым в работе [2]. б) Детализированная карта расщепления фрагмента ES-4,4 и схема установления его последовательности. Места расщепления рестриktionными эндонуклеазами указаны стрелками с обозначениями: T — *TaqI*; Sa — *Sau3A1*; Hi — *HinflI*; srS4 — *SalI*; srE4 — *EcoRI*. Пунктирной стрелкой обозначен участок, содержащий последовательность узнавания *TaqI*, но не расщепляющийся этой рестриктазой. Заштрихован участок, структура которого приводится в настоящем сообщении. Стрелки, направленные справа налево, соответствуют нити данного субфрагмента, последовательность которой адекватна последовательности мРНК. Кружками на концах стрелок обозначено 5'- 32 P-звено. Сплошная часть стрелок обозначает установленную последовательность данной комплементарной нити В одном случае (*SalI*+*HinflI*) фрагменты, меченные только по одной из цепей, получали, используя дополнительное расщепление рестриктазой *HinflI* смеси меченных 32 P фрагментов, полученных при расщеплении *EcoRI*-С эндонуклеазой *SalI*

можных вариантов такой специфической структуры был найден в нижней (рис. 2) цепи фрагмента в интервале 505—470 н.п. Здесь обнаруживается последовательность GGTCGACA (505—498 н.п.), которая имеет тесную гомологию со среднестатистической последовательностью-35 промоторной области TGTTGACA [9] и отличается от нее заменой первого и четвертого тимидиновых звеньев на G и C соответственно. Обе такие замены встречаются в природных промоторах [9]. На расстоянии 16 н.п. от 3'-конца этой последовательности в интервале 481—476 н.п. содержится последовательность TATATG, аналогичная среднестатистической последовательности TATAAT «бокса Прибнова» [9]. Наконец, через две пары оснований находится последовательность CCGT, которая могла бы играть роль инициаторной с G в роли иницирующего нуклеотида [10].

Таким образом, фрагмент ES-4,4 обладает всеми элементами, характерными для промоторной области. Если такое сочетание достаточно для образования функционального промотора, то синтез РНК, иницируемый на таком промоторе, должен быть направлен в сторону, противоположную синтезу мРНК для β - и β' -субъединиц, и может терминироваться в участке, расположенном через 226 нуклеотидов от иницирующего нуклеотида. В этом районе находится последовательность CGGCGCCTTTTCTA, в которой за GC-богатым участком следует тимидиновый кластер, что характерно для многих терминаторов [8]. Ген короткой, так называемой

4. Linn T., Scaife J. (1978) *Nature*, **273**, 33-37.
5. Post L. E., Strycharz G. D., Nomura M., Nomura H., Lewis H., Dennis P. P. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1697-1701.
6. Maxam A., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560-564.
7. Ovchinnikov Yu. A., Guryev S. O., Krayev A. S., Monastyrskaya G. S., Skryabin K. G., Sverdlov E. D., Zakharyev V. M., Bayev A. A. (1979) *Gene*, **6**, 235-249.
8. Gilbert W. (1976) in: *RNA Polymerase* (Chamberlin M., Losick R., eds), pp. 193-205, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor.
9. Siebenlist U. (1979) *Nucl. Acids Res.*, **6**, 1895-1907.
10. Scherer G. E. F., Walkinshak M. D., Arnott S. (1978) *Nucl. Acids Res.*, **5**, 3759-3774.
11. Schwarz E., Scherer G., Hobom G., Kössel H. (1978) *Nature*, **272**, 410-414.

Поступило в редакцию
14.XI.1979

THE NUCLEOTIDE SEQUENCE OF STRONG RNA POLYMERASE BINDING SITE WITHIN THE *E. coli rpoB* STRUCTURAL GENE

SVERDLOV E. D., LIPKIN V. M., MONASTYRSKAYA G. S.,
GUBANOV V. V., GURJEV S. O., CHERTOV O. Yu.

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

The fragment of *E. coli rpoB* structural gene containing the RNA polymerase strong binding site has been sequenced by a modified Maxam-Gilbert method. The fragment is 505 base pair long and shares some similarities with the sequences of the known promoters.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишина*

Сдано в набор 20.11.79 Подписано к печати 2.01.80 Т-21733 Формат бумаги 70×108/16
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0+1 вкл. Уч.-изд. л. 15,7 Бум. л. 5,0 Тираж 873 экз. Зак. 2479

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-12, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука». 121092, Москва, Шубинский пер., 10