



УДК 547.963.32.02

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ПРОМОТОРНОГО УЧАСТКА A_0 ДНК ФАГА Т7

Зайчиков Е. Ф., Шлетнев А. Г.

Новосибирский институт органической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск

РНК-полимераза *E. coli* транскрибирует гены ранней области фага Т7 в основном с главных промоторов A_1 , A_2 и A_3 [1, 2], нуклеотидная последовательность которых опубликована в работах [3, 4]. Вблизи левого конца ДНК найден также промотор A_0 [1, 5], транскрипция с которого левонаправлена. По эффективности связывания с РНК-полимеразой *E. coli* и транскрипции этот промотор не отличается от главных промоторов A_1 , A_2 и A_3 [1, 5, 6].

Настоящая работа посвящена исследованию структуры участка ДНК фага Т7, лежащего между расшифрованными ранее 5'-концевым участком *l*-цепи ДНК и промоторной областью A_1 – A_3 [3, 7]. Для этого описанным ранее методом [8] из *Bsp*I-гидролизата ДНК Т7 был выделен фрагмент длиной около 1400 н.п., несущий промоторы A_0 , A_1 , A_2 и A_3 . Анализ продуктов транскрипции этого фрагмента РНК-полимеразой *E. coli* в 3% полиакриламидном геле (ПААГ) дал четыре основные полосы, соответствующие РНК длиной приблизительно 950, 830, 700 и 200 остатков оснований. Промоторный фрагмент *Bsp*-1400 дефосфорилировали щелочной фосфатазой и после удаления фермента фенольной экстракцией рефосфорилировали с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ - 32 P]АТР. 5'- 32 P-Меченый фрагмент *Bsp*-1400 гидролизали нуклеазой *Msp*I и после разделения в 4% ПААГ выделили два радиоактивных фрагмента: *Msp*-525 (содержащий левый конец ДНК, 525 н.п.) и *Msp*-800 (содержащий правый конец промоторного фрагмента, 800 н.п.). Фрагмент *Msp*-525 подвергли химическому расщеплению по методу Максама – Гилберта [9] с описанными ранее модификациями [10] и продукты деградации разделили в пластинах 6% ПААГ (30×100×0,05 см). Таким образом нами была определена последовательность нуклеотидных остатков с 92-го по 405-й (схема) левого конца фаговой ДНК. Положение остатков с 92-го по 160-й и с 360-го по 405-й полностью совпадает с опубликованными ранее [3, 7]. На основании всех приведенных результатов теперь можно изобразить последовательность 826 нуклеотидных остатков левого конца ДНК Т7.

Чтобы точно локализовать промотор A_0 , мы установили последовательность нуклеотидных остатков на 5'-конце РНК, синтезируемой с этого промотора. Для этого анализировали продукты abortивной инициации, синтезируемые РНК-полимеразой из GTP и [α - 32 P]УТР. При разделении этих продуктов одномерной гомохроматографией [11] или электрофоре-

(1) 5'-pTCTCACAGTG TACGGACCTA AAGTTCCCC ATAGGGGGTA CCTAAAGCCC
 (1') 3'- AGAGTGTAC ATGCTGGAT TTCAAGGGG TATCCCCCAT GGATTTCTGGG

100

AGCCAATCAC CTAAAGTCAA CCTTCGGTTG ACTTGAGGGT TCCCTAAGG^G TTGGGGATGA
 TCGGTTAGTG GATTTTCAGTT GGAAGCCAAC TGAAC TCCCA AGGGATTCCC AACCCCTACT

150

CCCTTGGGTT TGTCTTTGGG TGTACCTTG AGTGTCTCTC TGTGTCCCTA TCTGTTACAG
 GGGAAACCAA ACAGAAACCC ACAATGGAAC TCACAGAGAG ACACAGGGAT AGACAATGTC

200

TCTCCTAAAG TATCCTCCTA AAGTCACCTC CTAACGTCCA TCCTAAAGCC AACACCTAA^AA
 AGAGGATTTT ATAGGAGGAT TTCAGTGGAG GATTGCAGGT AGGATTTCTGG TTGTGGATTT

250

GCCTACACCT AAAGACCCAC TAAGTCACCG CCTATCTTAA AGTTTAAACA TAAAGACCAG
CGGATGTGGA TTTCTGGGTG ATTCAGTTGC GGATAGAATT TCAAATTTGT ATTTCTGGTC

300

ACCTAAAGAC CAGACCTAAA GACACTACAT AAAGACCAGA CCTAAAGATG CTCGGTTGT^T
 TGGATTTCTG GTCTGGATTT CTGTGATGTA TTTCTGGTCT GGATTTCTAC GAGGCAACAA

350

400

AACCATAAG TGATAACCTT TAATCATTGT CTTTATTAAT ACAACTCAC^T ATAAGGAGAG
 TTGGTATTTT ACTATTGGAA ATTAGTAACA GAAATAATTA TGTTGAGTGA TATTCCTCTC

450

ACAACTTAAA GAGACTTAAA AGATTAATTT AAAATTTATC AAAAAGAGT^A TTTGACTTAAA
 TGTTGAATTT CTCTGAATTT TCTAATTTAA TTTTAAATAG TTTTCTCA^T AACTGAATTT

500

GTCTAACCTA TAGGATACCT^T ACAGCCATCG AGAGGGACAC GGCGAACAGC CATCCC..GT
 CAGATTGGAT ATCCTATGAA TGTCTGGTAGC TCTCCCTGTG CCGCTTGTGC GTAGGG..CA
 (Λ_1) pppAUCG...

MspI

550

CAACCGGATA AGTAGACAGC CTGATAAGTC GCACGAAAA CAGGT^ATTTGA CAACATGAAG
 GTTGGCTAT TCATCTGTGC GACTATTCAG CGTGCTTTTT GTCCA^TAACT^GTTGTACTTC

600

MspI

650

TAACATGCA^G TAAGATACAA ATCGCTAGGT AACACTAGCA GCGTCAAC^{CG} GGGCGCACAG^G
 ATTGTACGTC ATTCTATGTT TAGCGATCCA TTGTGATCGT CGCAGTTGG^C CCCGCGTGT^C
 (Λ_2) PPPGUAGGU...

700

TGCCTCTAGG TGACTTAAGC GCACCACGGC ACATAAGGTG AAACAAAAG^G GTTGACAACA
 ACGGAGATCC ACTGAATTCG CGTGGTGCCG TGTATTCCAC TTTGTTTTGC CAACTGTTGT

750

TGAAGTAAAC ACGGTACGAT^T GTACCACATG AAACGACAG^T GAGTCACCAC ACTGAAAGGT
 ACTTCATTTG TGCCATGCTA CATGGTGTAC TTTGCTGTCA CTCAGTGGTG TGACTTTCCA
 (Λ_3) pppAUG AAAC...

800

GATCGGGTCT AACGAAACCT GACCTAAGAC GCTCTTAAAC AATCTGGTAA AGAGCT. .
 CTACGCCAGA TTGCTTTGGA CTGGATTCTG CGAGAAATTG TTAGACCATT TCTCGA...

Нуклеотидная последовательность левого конца ДНК фага Т7. Нуклеотиды 92-405 l-цепи ДНК определены в настоящей работе, нуклеотиды 1-160 и 360-826 - в работах [3, 4, 7]. Горизонтальными скобками отмечены боксы Прибнова, пунктирными скобками - (-35)-последовательности, подчеркнуты повторы, показаны сайты рестрикции нуклеазы *MspI* и 5'-концевые последовательности мРНК

зом в 25% ПААГ в денатурирующих условиях по работе [9] мы обнаружили четыре основных продукта, самый длинный из которых, согласно микроколоночной хроматографии, является пентануклеотидом. Этот дефосфорилированный пентануклеотид подвергли неполному гидролизу фосфодиэстеразой змеиного яда с последующим разделением с помощью двумерной гомохроматографии [11]. Сочетанием этого метода с определением ближайших соседей для этого пентануклеотида была получена последовательность rrrGrUpUpGrG. Этот олигорибонуклеотид действительно синтезируется на промоторе A_0 , поскольку, во-первых, такой же набор абортивно синтезируемых олигонуклеотидов наблюдается и в случае использования фрагмента, содержащего только промоторы A_0 и A_1 , выделенного из ДНК T7 ДИИ [8]; во-вторых, мРНК промотора A_0 имеет 5'-концевую последовательность rrrGrU [12], отличную от 5'-концевых последовательностей мРНК промоторов A_1 , A_2 и A_3 . Учитывая то, что РНК-полимераза связывается с ДНК T7 в районе около 200 н.п. от левого конца [6], и привлекая данные, изложенные выше, мы локализовали точку инициации транскрипции с промотора A_0 (нуклеотид 223), постулировали положение бокса Прибнова (229–235), а также положение так называемой (–35)-последовательности (254–259), которая полностью совпадает с (–35)-последовательностями промоторов A_1 , A_2 и A_3 . Бокс Прибнова для промотора A_0 ближе всего по структуре к A_1 и отличается от A_2 и A_3 .

Изложенные выше данные позволяют определить последовательность РНК, синтез которой направляется промотором A_0 . При анализе этой последовательности оказалось, что эта РНК не может служить матрицей для синтеза белка, так как она не содержит иницирующего кодона, а при считывании ее в каждой из трех рамок не далее чем в 50 нуклеотидах от точки инициации имеются терминаторы белкового синтеза. Заслуживает внимания также то обстоятельство, что последовательность ССТАААГ повторяется многократно на левом и правом концах ДНК. Кроме того, нами обнаружен значительный повтор ТАААГАССАГАССТАААГА (281–299, 294–312, 320–338). По-видимому, такие повторы могут играть существенную роль в процессе созревания фаговой ДНК. Возможно, что промотор A_0 также участвует в этом процессе, действуя совместно с промотором E [5] по механизму, сходному с механизмом, предложенным для сайт-специфической рекомбинации ДНК фага λ при участии промотора p_{att} [13]. Следует также отметить наличие протяженных АТ-богатых участков в области между промоторами A_0 и A_1 .

Авторы выражают благодарность А. И. Закабунину за предоставление нуклеазы *BspI* С. В. Негесову за предоставление нуклеазы *MspI*, М. А. Грачеву, В. Г. Коробко и М. Н. Колосову за интерес к работе и обсуждение результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Minkley E. G., Pribnow D. (1973) *J. Mol. Biol.*, **77**, 255–277.
2. Dunn J. J., Studier F. W. (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1559–1563.
3. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Грачев С. А., Колосов М. Н., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1692–1694.
4. Pribnow D. (1975) *J. Mol. Biol.*, **99**, 419–443.
5. Stahl S. J., Chamberlin M. J. (1977) *J. Mol. Biol.*, **112**, 577–601.
6. Koller T., Kubler O., Portman R., Sogo J. M. (1978) *J. Mol. Biol.*, **120**, 121–131.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1690–1691.
8. Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Кравченко В. В., Плетнев А. Г. (1978) *Докл. АН СССР*, **239**, 475–478.
9. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 560–564.
10. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорг. химия*, **4**, 1281–1283.
11. Ling V. (1972) *J. Mol. Biol.*, **64**, 87–102.
12. McClure W. R., Cech C. L., Johnston D. E. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 8941–8948.
13. Kravchenko V. V., Vassilenko S. K., Grachev M. A. (1979) *Gene*, **7**, 181–195.

Поступило в редакцию
28.III.1980

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE PROMOTER REGION A₀
OF T7 PHAGE DNA

ZAYCHIKOV E. F., PLETNYOV A. G.

*Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,
Siberian Branch of the Academy of Sciences
of the USSR, Novosibirsk*

Nucleotide sequence has been determined by Maxam-Gilbert techniques of the region from nucleotide 92 to nucleotide 405 on the left-hand terminus of T7 DNA. The region contains the A₀ promoter which induces the synthesis of RNA of 5'-terminal sequence pppGUUGG starting at nucleotide 223.