



УДК 547.963.32.02:

НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНА 0.3  
БАКТЕРИОФАГА T7*Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Ген 0.3 является первым среди генов бактериофага T7 и отвечает за синтез белка, при помощи которого фаг на начальной стадии инфекции преодолевает рестрикцию клетки-хозяина [1]. Этот ген расположен между промоторной областью  $A_1-A_3$  и геном 0.4, структура которых опубликована [2, 3]. Мы исследовали фрагмент ДНК T7, который примыкает обоими концами к участкам с известной последовательностью: слева — к *HpaII/AluI*-190 [2], справа — к *HhaI*-169 [3], и в результате установили полную нуклеотидную последовательность гена 0.3.

Исходным веществом в этой работе был левый концевой *HaeIII*-фрагмент ДНК T7 (*HaeIII*-1400 [4]), при гидролизе которого эндонуклеазой *HhaI* образуется пять субфрагментов. Один из них (*HhaI*-492) расщепляется эндонуклеазой *AluI* на два меньших фрагмента: *HhaI/AluI*-153 и *AluI/HhaI*-339, последний из которых содержит интересующую нас область ДНК T7. Для определения нуклеотидной последовательности этот фрагмент был получен двумя разными способами, в результате чего была избирательно введена радиоактивная метка в 5'-конец нижней (*r*) или верхней (*l*) цепи. Первый способ заключался в том, что исходный фрагмент *HaeIII*-1400 обрабатывали нуклеазой *HhaI*, продукты гидролиза дефосфорилировали бактериальной щелочной фосфатазой и разделяли электрофорезом в 5% полиакриламидном геле (ПАГ), детектируя бромистым этидием. Субфрагмент *HhaI*-492 выделяли электроэлюцией, очищали хроматографией на сефадексе G-50, фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой с  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{гАТР}$  (2000–3000 Ки/ммоль) и расщепляли рестриктазой *AluI*. Образовавшиеся фрагменты *HhaI/AluI*-153 и *AluI/HhaI*-339 с одиночными метками на *HhaI*-концах разделяли электрофорезом в 5% ПАГ. По второму способу фрагмент *HaeIII*-1400 гидролизировали нуклеазой *AluI*, продукты гидролиза аналогичным образом дефосфорилировали, а затем рефосфорилировали при помощи  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{гАТР}$ , выделяли меченный обоим концам фрагмент *AluI*-543 и его расщепляли нуклеазой *HhaI*. Структурный анализ проводили по методу Максама — Гилберта с изменениями, описанными нами ранее [5, 6].

Установленная нами нуклеотидная последовательность изображена на схеме. В ней 108 пар оснований (п.о.) точно соответствуют литературным данным о структуре ранних мРНК фага T7 в области сайта РНКазы III перед геном 0.3 [7], участка *a* связывания рибосомы [8] и первых 22 кодонов 0.3 мРНК [9]. Ген 0.3 содержит 351 п.о., и, следовательно, его продукт

AluI

RNaseIII

...CTGTGAGTGCATGACTAGCGGATAACTCAAGGGTATCGCAAGGTGCCCTTATGATATTCACCT  
 ...GACACTCACGTA CTGATCGCCTATTGAGTTC CCA TAGCGTTCCACGGGAAATACTATAAGTGA  
 (CCUUUAUGAUUUCACU)

fMetAlaMetSerAsnMetThrTyrAsnAsnValPheAsp

100

AATAACTGCACGAGGTAAACACAAGATGGCTATGCTAAACATGACTTACAACAACGTTTTTCGAC  
 TTATTGACGTGCTCCATTGTGTTCTACCGATACAGATTGTA CTGAATGTTGTTGCCAAAGCTG  
 AAUAACUGCACGAGGUAACACAAGAUUGGCUAUGUCUAACAUGACUUACAACAACGUUUUCGAC

HisAlaTyrGluMetLeuLysGluAsnIleLeuTyrAspAspIleArgAspThrAspAspLeu

150

CACGCTTACGAAATGCTGAAAGAAAACATCCGTTATGATGACATCCGTGACACTGATGACCTG  
 GTCGAATGCTTTACGACTTTCTTTTGTAGGCAATACTACTGTAGGCACCTGTGACTACTGGAC  
 CACGCUUACGAAUUGCUGAAAGAAAACA)

50

HisAspAlaIleHisMetAlaAlaSerAsnAlaValProHisTyrTyrAlaAspHisLeuSer

200

250

CACGATGCTATTACATGGCTGCCAGTAATGCAGTTCGGCCTACTACGCTGACATCTTTAGC  
 GTGCTACGATAAGTGTACCGACGGTCATTACGTC AAGGGCTGATGATCGCAGCTAGAAATCG

ValMetAlaSerGluGlyIleAspLeuGluPheGluAspSerGlyLeuMetProAspThrLys

300

GTAATGGCAAGTGAGGGCATTGACCTTGAGTTCGAAGACTCTGGTCTGATGCTGACACCAAG  
 CATTACCGTTCACCTCCGTAACCTGGAACCTCAAGCTTCGAGACCAGACTACGGACTGTGGTTC

AspValIleArgIleLeuGlnAlaArgIleTyrGluGlnLeuThrIleAspLeuTrpGluAsp

350

GACGTAATCCGCATCCTGCAAGCGCGTATCTATGAGCAATTAACGATTGACCTCTGGGAAGAC  
 CTGCATTAGCGGTAGGACGCTCGCGCATAGATACTCGTTAATTGCTAACTGGAGACCCCTCTG

HhaI

100

AlaGluAspLeuLeuAsnGluTyrLeuGluGluValGluGluTyrGluGluAspGluGluTER

400

GCAGAACACTTGCTCAATGAATACCTGGAGGAAAGTCGAGGAGTACGAGGAGGATGAAGAGTAA...  
 CGTCTTCTGAACGAGTTACTTATGAACCTCCTTCAGCTCCTCATGCTCCTCTACTTCTCATT...

Нуклеотидная последовательность гена *0.3* бактериофага T7 и аминокислотная последовательность кодируемого им белка. Структура ДНК до сайта *HhaI* (нуклеотиды 1–339) определена в настоящей работе, последовательность 340–443 заимствована из статьи [3]. В скобках приведены литературные данные [7–9] о структуре ранних мРНК фага T7 в области начала гена *0.3*. Подчеркнута последовательность, комплементарная 3'-концу рибосомной 16S РНК.

представляет собой 116-членный полипептид, поскольку N-концевой формилметионин в нем отсутствует [9]. Большая часть этого гена (252 п.о.) находится во фрагменте *AluI/HhaI*-339, который до настоящей работы оставался единственным неизученным участком ДНК T7 между промоторной областью  $A_1$ – $A_3$  и геном *0.4*. Недавно Е. Ф. Зайчиков и А. Г. Плетнев [10] определили 314-нуклеотидную последовательность ДНК T7 в

районе промотора  $A_0$  и при этом идентифицировали последние из оставшихся неизвестными 202 п.о. между левым концевым повтором [11] и промоторной областью  $A_1-A_3$  [2]. Таким образом, в совокупности с их данными результаты этой и предыдущих наших работ [2, 3, 11] составляют непрерывную 1450-нуклеотидную последовательность ДНК фага T7 от ее левого конца до первого сайта эндонуклеазы *Hae*III.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Studier F. W. (1975) *J. Mol. Biol.*, **94**, 283-295.
2. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Грачев С. А., Колосов М. Н., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1692-1694.
3. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 1114-1116.
4. Коробко В. Г., Чувпило С. А., Колосов М. Н., Грачев М. А., Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1132-1134.
5. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) *Биоорган. химия*, **3**, 1420-1422.
6. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1281-1283.
7. Kramer R. A., Rosenberg M., Steitz J. A. (1974) *J. Mol. Biol.*, **89**, 767-776.
8. Steitz J. A., Bryan R. A. (1977) *J. Mol. Biol.*, **114**, 527-543.
9. Dunn J. J., Buzach-Pollert E., Studier F. W. (1978) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 2741-2745.
10. Зайчиков Е. Ф., Плетнев А. Г. (1980) *Биоорган. химия*, **6**, 1268-1271.
11. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н. (1978) *Биоорган. химия*, **4**, 1690-1691.

Поступило в редакцию:  
2.IV.1980

#### NUCLEOTIDE SEQUENCE OF GENE *0.3* OF BACTERIOPHAGE T7

KOROBKO V. G., CHUVPILLO S. A., KOLOSOV M. N.

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

A 339 b.p. long *AluI/HhaI* fragment of T7 DNA obtained on double digestion of the left terminal *Hae*III fragment with the respective endonucleases was analysed by the modified Maxam-Gilbert techniques. The sequence thus determined complemented the published ones to a continuous sequence of 1450 b.p. from the left end of the phage DNA to the first *Hae*III site. Gene *0.3* was found to contain 351 b.p. coding for a protein composed of 117 amino acids.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20. 05. 80 Подписано к печати 26.06.80 Т-11039 Формат бумаги 70×108<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 Уч.-изд. л. 15,3 Бум. л. 5,0 Тираж 880 экз. Зак. 3116.

Издательство «Наука». 103717 ГСП, Москва, К-12, Подосенский пер., 21  
2-я типография издательства «Наука». 121699, Москва, Шубинский, пер., 10