



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 578.113.5:578.816

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ФРАГМЕНТА кДНК ФАГА fr

Берзинь В. М., Авотс А. Я., Янсоне И. В.,
Циманис А. Ю.

Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига

Среди четырех серологически различных групп РНК-содержащих бактериофагов наиболее подробно изучены представители I-й группы (f2, MS2, R17, M12, fr) и III-й группы (Q_β), которые успешно использовались в качестве модельных систем как в установлении регуляторных процессов репликации простейших вирусов, так и в исследованиях молекулярных механизмов биосинтеза белка в прокариотах (см. обзоры [1, 2]). В настоящее время известна полная нуклеотидная последовательность РНК фага MS2 [3], с которой очень сходную структуру имеют геномы фагов f2 и R17 [4]. Сведения о структуре РНК другого представителя I-й серологической группы — фага fr крайне ограничены, однако отличия в аминокислотной последовательности белка оболочки fr [5] и в нуклеотидной последовательности участка инициации трансляции гена репликазы fr [6] указывают на определенные структурные различия не только в кодирующих, но и в регуляторных районах РНК фага fr. Нами было проведено клонирование кДНК фага fr с целью исследования структуры участков инициации трансляции генов на РНК fr; получения индивидуальных генов фага для функциональных исследований; сравнительного изучения первичной структуры геномов фагов fr и MS2.

Для клонирования кДНК была использована стандартная методика [7], включающая синтез кДНК на матрице полиаденилированной РНК фага fr и встраивание продукта в *Pst*I-сайт плазмиды pBR322 с применением oligo(dC)·oligo(dG)-коннекторов. После трансформации клеток *E. coli* RR1 отбор рекомбинантных плазмид проводили гибридизацией колоний с 5'-³²P-меченым 88-членным фрагментом РНК fr, содержащим последовательность участка инициации трансляции гена репликазы [6].

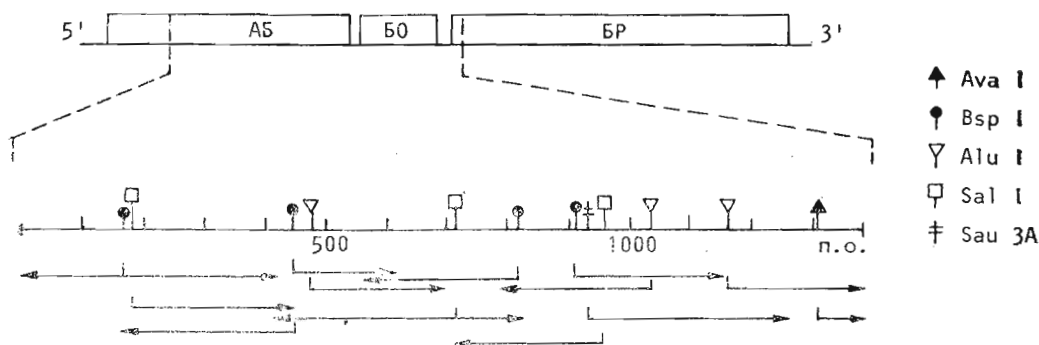


Рис. 1. Схема стратегии секвенирования фрагмента кДНК фага fr. Отмечены только сайты узнавания рестриктазами, использованные при определении структуры. Стрелки показывают направление секвенирования и длину установленной последовательности. AB, BO и BP — гены белка А, белка оболочки и репликазы

1 GGCATGTCTA TCGACGCCAG TAGTTGTAT ACCCTATTCC CCGTTAGTCA
 51 AAACCTAACG TGGATAGACC TACCAACGAA CGTAGCTAAT CCGGCCACCA
 101 CTGAGGCTCTT AGGTAAGGTC ACTCAAGGTA ATTTAACTT TGGCGTGGCC
 151 CTTGCTGAAG CAAGGTCGAC GGCCTCAGAA CTGTGGACCC AAAGCATCCC
 201 CTTGATTAAG GCGTACACCG CCGCTCGCCG GGGGAAGTGG CCGCAGCATC
 251 TCCGCTACTT AGGGCTGAAC GAGAATCGAA AATTCATTC GAAGTCCTC
 301 GCAAGCAGGT GCGTGGAGTT GCAGTTCGGG TCGATGCCCG TTCTCAGGCA
 351 TATCCAAGGT CCGTATGAGA TCGTCACCAA AGTGCATCTT AAGGCATTTA
 401 TGCCTATGCG TGGCGTAGT CAAGTCGGAC AAAACGCTCA GTTGTCTGGC
 451 CCGCTCACTT CTCCGGCTGC AAGCTATAAC TCTACGTGCA ACATATCACC
 501 ACGCATTGTG ATATGGTTTT ACATAAACGA TGCACGCTCG CCTTGGCTCT
 551 CCTCCTTAGG GATTTGAAAC CCGCTAGGAA TAGTGTGGGA AAAGTCCCG
 601 TCTCTTTCC TGGTGGATTG GTTGTGCGCG GTTGGCAACA TGCTTGAAGG
 651 GCTTACGGCC CCGATAGGCT GTTGGTATCA ATCGGGAACA GTAAACGAGC
 701 TAAATACAGG ACAGTCGACA ATAAATCCCG ATGACATCTA TGGTTGGGAT
 751 ACAGTCGGAC CTGCAACCGC TAAGGTGCAA ATCAGTGTG TCCACCGGGG
 801 GGTACAAAAG GTGTGGCCCA CAACGCGCGT ATACGTTAAG TCAGCTTTCT
 851 CGATGCTCCA TACCTTAGAT GCGTGGGAC TTTTCAGGCA ACGGCTCTGG
 901 AAATGACCGC CCTAACCGAA GGGAGAGCCA CTTGTCTTCG AACTTTGAAG
 951 AGTTCGTTCT CGTGCACAAT GCGGCAACGG GAGATGTAAT AGTGGCTCCC
 1001 AGCAACTTGG CTAAGGGGGT TGCAGAATGG ATCAGCTCGA ATCAGCTTC
 1051 TCAGGCTTAC AAAGTCACCT GTAGCGTGGC TCAGAGCTCT GCGAACATC
 1101 GGAATACAC CGTCAAGGTC GAGGTCCCGA AAGTGGCAAC TCAGCTCCAA
 1151 GCGGGCGTTC AGCTTCTCTT TCGGGCGTGG CCGTCTGACA TGAATATGGA
 1201 ATTAACATAT CCGGTATTGG CGACCAACGA CGACTGCGCC TTAATCGTTA
 1251 AGGCATTGCA AGGCACCTTT AAAACTGGTA ACCCAATTGC AACAGCCATC
 1301 GCAGCCAACT CCGGAATCTA CTAAGAAACC CBTGCCAATC CAACATGAGG
 1351 AATACCCCTC TCAAAAACAA CAADGAACTT CAACCTTTA TG

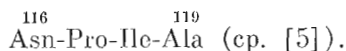
Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента (+)-цепи кДНК фага fr. Подчеркнуты терминирующие кодоны генов А-белка и белка оболочки, обведены инициаторные кодоны АТГ генов белка оболочки и репликазы fr. Волнистой линией подчеркнута нуклеотидная последовательность, отвечающая тетрапептидному фрагменту 116-119

В настоящей работе установлена первичная структура одного из фрагментов (~1400 п. о.) клонированной кДНК fr, содержащего 3'-концевую часть гена А-белка, полный ген белка оболочки и начало гена репликазы.

На рис. 1 приведена схема стратегии секвенирования данного фрагмента кДНК и показана его примерная локализация (по данным нуклеотидной последовательности) в геноме фага fr. Последовательность вставки ДНК была определена дидезокситерминаторным методом Сэнгера [8] после субклонирования фрагментов рестрикции в соответствующих сайтах репликативных форм фагов M13 mp8, mp9 и mp11 [9].

В установленной последовательности (+)-цепи фрагмента кДНК фага fr (рис. 2) локализованы 903 нуклеотида 3'-концевой части гена А-белка fr, в которой по сравнению с аналогичным геном фага MS2 [10] имеется 228 нуклеотидных замен. Из них 94 замены приводят к 52 отличиям в аминокислотной последовательности в С-концевой части А-белка. Далее следует нуклеотидная последовательность участка инициации трансляции и структурной части гена белка оболочки. В последовательности гена белка оболочки fr длиной в 390 нуклеотидов по сравнению

с соответствующим геном фага MS2 [11] локализованы 74 нуклеотидные замены, из которых 29 приводят к 16 аминокислотным заменам. Аминокислотная последовательность белка оболочки fr, рассчитанная по первичной структуре гена, практически полностью совпадает с ранее опубликованными [5] результатами прямого секвенирования белка, за исключением ошибочно определенной последовательности пептида



В отличие от фагов MS2, f2 и R17 с выраженной консервативностью структур нетранслируемых регуляторных районов [4] участок инициации трансляции гена белка оболочки fr содержит много замен. В сравнительно короткой последовательности длиной в 28 нуклеотидов по сравнению с аналогичным участком генома MS2 локализовано 6 замен и 2 вставки нуклеотидов, что приводит к изменениям как последовательности Шайна-Далгарно и ее расстояния от инициаторного ATG, так и вторичной структуры этого регуляторного участка.

Данные о первичной структуре кДНК участка инициации трансляции и 5'-концевой части гена репликазы полностью подтверждают ранее опубликованную нами [6] нуклеотидную последовательность этого района РНК фага fr.

В заключение важно отметить, что во всех фазах считывания последовательности данного фрагмента кДНК fr нам не удалось обнаружить начальную часть четвертого фагового гена — гена лизис-белка, постулированного для фага MS2 [12].

ЛИТЕРАТУРА

1. Грен Э. Я. Регуляторные механизмы репликации РНК-содержащих бактериофагов. Р.: Знание, 1974.
2. Fiers W. In: Comprehensive Virology/Eds Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R. N. Y.: Plenum Press, 1979, v. 13, p. 64–204.
3. Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., Iserentant D., Merregaert J., Min Jou W., Molemans F., Raeymaekers A., Van den Berghe A., Volckaert G., Ysebaert M. Nature, 1976, v. 260, № 5551, p. 500–507.
4. Min Jou W., Fiers W. J. Mol. Biol., 1976, v. 106, № 4, p. 1047–1060.
5. Wittmann-Liebold B., Wittmann H. G. Mol. Gen. Genet., 1967, v. 100, № 2, p. 358–363.
6. Berzin V., Cielens I., Jansone I., Gren E. J. Nucl. Acids Res., 1982, v. 10, № 23, p. 7763–7775.
7. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 212–246.
8. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 12, p. 5463–5467.
9. Messing J. In: Methods Enzymol./Eds Wu R., Grossman L., Moldave K. N. Y.: Acad. Press, 1983, v. 101, part C, p. 20–89.
10. Fiers W., Contreras R., Duerinck F., Haegeman G., Merregaert J., Min Jou W., Raeymaekers A., Volckaert G., Ysebaert M., Vanderkerckhove J., Nolf F., Van Montagu M. Nature, 1975, v. 256, № 5515, p. 273–278.
11. Min Jou W., Haegemann G., Ysebaert M., Fiers W. Nature, 1972, v. 237, № 5350, p. 82–88.
12. Atkins J. F., Steitz J. A., Anderson C. W., Model P. Cell, 1979, v. 18, № 2, p. 247–256.

Поступило в редакцию
2.IX.1985

THE PRIMARY STRUCTURE OF A FRAGMENT OF THE PHAGE fr cDNA

BERZIN V. M., AVOTS A. J., JANSONE I. V., TSIMANIS A. J.

Institute of Organic Synthesis, Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

The nucleotide sequence of a 1392 bp fragment of phage fr cDNA has been determined. The fragment contains 3'-terminal part of the A-protein gene, the complete coat protein gene, and beginning of the replicase gene. A comparison between the sequences of the corresponding genes and regulatory regions from the phage fr and MS2 genomes reveals 320 base changes.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 21.10.85 Подписано к печати 23.12.85 Т-49593 Формат бумаги 70×108^{1/16}
Высокая печать Усл. печ. л. 14,0 Усл. кр.-отт. 13,0 тыс. Уч.-изд. л. 15,9 Бум. л. 5,0
Тираж 910 экз. Зак. 1885

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука»,
103717 ГСП, Москва, К-62, Подсосенский пер., 21
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Шубинский пер., 6