



УДК 577.113.5 : 577.152.277\*6

ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ  $\beta$ -СУБЪЕДИНИЦУ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗ БАКТЕРИЙI. ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА *EcoRI*-С-ФРАГМЕНТА ГЕНА *rpoB*  
*SALMONELLA TYPHIMURIUM*Свердлов Е. Д., Лисицын Н. А., Гурьев С. О.,  
Смирнов Ю. В., Ростанцов В. М., Монастырская Г. С.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва

ДНК-зависимый синтез всех видов РНК в клетках бактерий катализирует единственный фермент — ДНК-зависимая РНК-полимераза (нуклеозидтрифосфат: РНК нуклеотидилтрансфераза, КФ 2.7.7.6) с субъединичной структурой  $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ . Ранее нами была определена первичная структура  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\beta'$ -субъединиц РНК-полимеразы *E. coli*, образующих минимальный фермент [1—3], идентифицированы субъединицы, контактирующие с ДНК-матрицей, РНК-продуктом и субстратами в активном транскрипционном комплексе [4], а также локализованы мутации устойчивости этого фермента к антибиотикам рифампицину и стрептолидигину [5—8].

Проведенные исследования указывают на важную роль  $\beta$ -субъединицы в функционировании РНК-полимеразы [4]. Однако сведения о конкретных аминокислотных последовательностях этого фермента, привимающих участие во взаимодействиях с субстратами и матрицами, сегодня отсутствуют. Один из путей получения информации в этом направлении заключается в сопоставлении гомологичных субъединиц из различных РНК-полимераз с целью идентификации консервативных и вариабельных участков. Консервативность определенных фрагментов последовательности может указывать на их важную роль в функционировании фермента [9, 10]. В данной работе приведены результаты клонирования и определения первичной структуры большей части гена *rpoB*, кодирующего  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы *Salmonella typhimurium* — близко родственного кишечной палочке вида энтеробактерий.

Ранее было показано, что *rpl JL-rpoBC*-опероны этих, а также четырех других видов энтеробактерий имеют высокий процент гомологии [11] и сходное расположение сайтов эндонуклеаз рестрикции, специфичных к редко встречающимся последовательностям. Поэтому при клонировании гена *rpoB* сальмонеллы хромосомную ДНК, выделенную из клеток штамма *S. typhimurium* LT2, гидролизовали эндонуклеазой рестрикции *BglII*, не имеющей сайтов в составе *rpoB*-гена (В. Г. Никифоров, личное сообщение). Набор полученных фрагментов лигировали с расщепленной этой же рестриктазой и дефосфорилированной плазмидой p104 (производное от плазмиды pIFN $\alpha_2$ -0 [12]) с последующей трансформацией клеток *E. coli* MN1 (рис. 1). Полученный банк (12 000 клонов) переносили на нитроцеллюлозные фильтры, амплифицировали на LB-агаре, содержащем хлорамфеникол, и после лизиса клеток и иммобилизации ДНК последнюю гибридизовали с ник-транслированным *EcoRI*-С-фрагментом гена *rpoB* *E. coli*. В качестве отрицательного и положительного контролей использовали клетки *E. coli* MN1 [13], несущие плазмиду pBR322 и плазмиду pRC1 017, содержащую фрагмент *EcoRI*-С *E. coli* [6]. Таким образом удалось выявить 17 гибридизующихся клонов. Рестриктивный анализ и блот-гибридизация плазмидной ДНК этих клонов подтвердили полученные

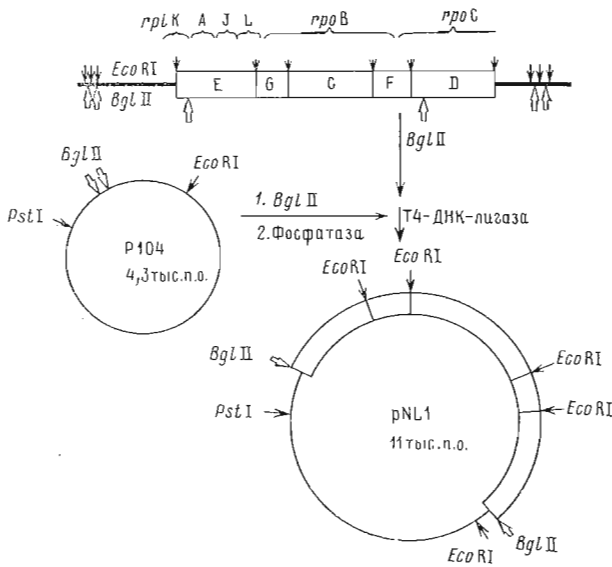


Рис. 1. Схема клонирования *BglII*-фрагмента ДНК *S. typhimurium*, содержащего ген *rpoB*

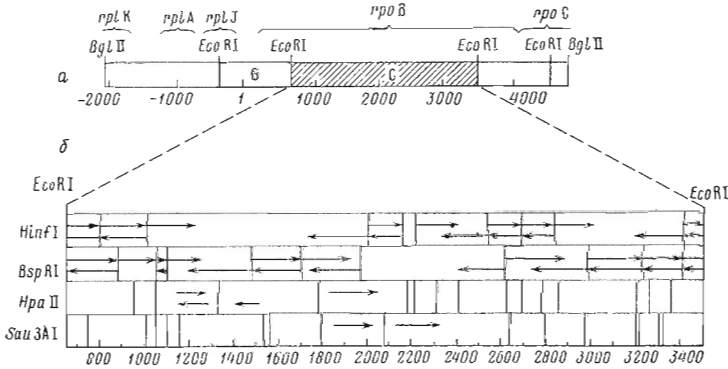


Рис. 2. *a* — расположение участков расщепления рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI* в фрагменте ДНК *S. typhimurium*, содержащем гены рибосомных белков *rplK*, *A*, *J*, ген *rpoB*, кодирующий  $\beta$ -субъединицу РНК-полимеразы и часть гена *rpoC*, кодирующего  $\beta'$ -субъединицу этого фермента; *б* — расположение участков расщепления рестрикционными эндонуклеазами *HinfI*, *BspRI*, *HpaII* и *Sau 3AI* во фрагменте *EcoRI*-*C* гена *rpoB* *S. typhimurium* и схема определения последовательностей субфрагментов, образующихся при расщеплении фрагмента *EcoRI*-*C* этими рестриктазами. Стрелками указаны направление и длина определенной последовательности

ранее данные о сохранении расположения сайтов расщепления рестриктазы *EcoRI* по сравнению с *E. coli* и появлении дополнительного сайта расщепления рестриктазы *HindIII* в дистальной части гена *rpoB* [11].

Следует отметить, что во всех клонах, отобранных для анализа, обнаруживалась не одна, а две плазмиды. Одна из них, названная рNL1, содержала искомый *BglII*-фрагмент, гибридизующийся с зондом, тогда как другая — различные негибридизующиеся фрагменты неидентифицированной природы. Относительное количество плазмиды рNL1 быстро уменьшалось при культивировании клеток, в связи с чем препаративное выделение большого количества плазмиды сильно затруднялось. С целью получения более стабильных штаммов плазмиды рNL1 была расщеплена эндонуклеазой *EcoRI* и выделенные электрофорезом в агарозном геле фрагменты *EcoRI*-*C*, *EcoRI*-*F* и *EcoRI*-*G* (см. рис. 1) были переклонированы в плазмиде рBR322. Нужные клоны идентифицировали рестрикционным анализом, а соответствующие стабильные плазмиды рNL1-*C*, рNL1-*F* и рNL1-*G* выделяли стандартным щелочным методом. Для окончательной

очистки плазмид использовали центрифугирование в градиенте плотности хлористого цезия. Плазмиды расщепляли рестриктазой *EcoRI* и фрагменты выделяли электроэлюцией после препаративного электрофореза гидролизатов в блоках агарозы.

Стратегия определения первичной структуры *EcoRI*-С-фрагмента гена *groV* *S. typhimurium* показана на рис. 2. Анализ последовательностей проводили модифицированным нами [14] методом Максама — Гилберта [15] и методом терминирующих аналогов Сэнгера [16, 17]. В первом случае фрагмент гидролизовали рестриктазой *HinfI*, 5'-концевые звенья субфрагментов метили  $^{32}\text{P}$  с помощью  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  и T4-полинуклеотидкиназы и для анализа использовали выделенные комплементарные цепи индивидуальных субфрагментов. При использовании метода Сэнгера фрагмент расщепляли рестриктазой *BspRI* и полученные субфрагменты клонировали в составе одноцепочечного фага M13mp11 [16]. Для установления оставшейся неопределенной части структуры *EcoRI*-С-фрагмент гидролизовали рестрикционными эндонуклеазами *HpaII* или *Sau3AI*, гидролизаты разделяли в 2% агарозном геле и после элюции зон, содержащих необходимые для «перекрытия» субфрагменты (положение зон выявляли по подвижности маркеров), клонировали последние в составе фага M13mp9 и определяли их первичную структуру методом [17].

Установленная последовательность длиной 2873 п.о. представлена на рис. 3. При сравнении последовательностей *EcoRI*-С-фрагментов генов *groV* *S. typhimurium* и *E. coli* обнаруживается 194 различия, являющихся точечными заменами. Инсерций и делеций не выявлено. Различия составляют 6,8% от общего количества пар оснований. Это расхождение близко к найденному при сравнении последовательностей генов наружного мембранного белка А двух вышеупомянутых энтеробактерий [18], однако оно в 3 раза меньше, чем в случае генов, кодирующих белки триптофанового оперона [19]. 90% различий составляют вариации третьей буквы кодона, не приводящие к различиям в аминокислотной последовательности, так называемые молчащие замены, причем три четверти таких замен являются компенсаторными [9] и не приводят к заметным различиям в частоте использования кодонов этими микроорганизмами. Исключение составляют кодоны аланина, валина, серина и треонина. В этих случаях *S. typhimurium* чаще, чем *E. coli*, использует кодоны, содержащие в третьем положении G или C. Возможно, это в некоторой степени определяется небольшим различием в G + C-составах сальмонеллы и кишечной палочки [19]: 52 и 51% соответственно.

Аминокислотные последовательности центральной части  $\beta$ -субъединиц РНК-полимераз *S. typhimurium* и *E. coli*, выведенные на основании нуклеотидных последовательностей *EcoRI*-С-фрагментов, различаются в 13 позициях (1,5% от общего количества аминокислотных остатков), что значительно меньше числа различий между белками триптофанового оперона и наружными мембранными белками этих микроорганизмов [18, 19]. Это свидетельствует о высокой консервативности  $\beta$ -полипептида. Такая консервативность связана, по-видимому, с жизненной важностью данного белка для микроорганизмов. Детальный анализ распределения более и менее консервативных областей вдоль цепи белка [9, 10] в настоящее время проводится.

### Экспериментальная часть

Штамм *S. typhimurium* LT2(*His*<sup>-</sup>) любезно предоставлен В. П. Кузнецовым (Институт эпидемиологии им. Гамалея, Москва). Плазмида p104 (*Tc*<sup>r</sup>*Ar*<sup>s</sup>), применявшаяся для первичного клонирования, сконструирована в нашей лаборатории и является производной плазмиды pBR322, несущей два близко расположенных сайта узнавания рестрикционной эндонуклеазой *BglII* [12].

Хромосомная ДНК *S. typhimurium* была выделена по методу, описанному Титавеллой [11]. Препаративное и аналитическое выделение плазмидной ДНК осуществляли из клеток ночной культуры, выращенных без амплификации, основываясь на методиках, описанных Маниатисом и

640-648 GAA TTC GAT  
 187-189 -Glu-Phe-Asp-

649-729 CCG AAG GAC AAC CTG TTC GTA CCG ATC GAC CGT CGC ACC CTA CCT CGC ACC ATC ATC CTG CGT CGC CTG AAC TAC ACC  
 190-216 Pro-Lys-Asp-Asn-Leu-Phe-Val-Arg-Ile-Asp-Arg-Arg-Lys-Leu-Pro-Ala-Thr-Ile-Ile-Leu-Arg-Ala-Leu-Asn-Tyr-Thr-  
 G T C C

730-810 ACT GAG CAG ATC CTT GAC CTG TTC TTT GAG AAA GTC GTC TTC GAA ATT CGC GAC AAC AAA CTG CAG ATG GAG CTG ATT CCA  
 217-243 Thr-Glu-Gln-Ile-Leu-Asp-Phe-Phe-Glu-Lys-Val-Val-Phe-Glu-Ile-Arg-Asp-Asn-Lys-Leu-Gln-Met-Glu-Leu-Ile-Pro-  
 A C C A A T A T T G A G G G Val

811-891 GAA CGT CTG CGT GGC GAA ACC CCG TCG TTC GAT ATC GAA GGT AAC GGC AAA GTG TAC GTT GAA AAA GGC CGT CGC ATT ACC  
 244-270 Glu-Arg-Leu-Arg-Gly-Glu-Thr-Ala-Ser-Phe-Asp-Ile-Glu-Ala-Asn-Gly-Lys-Val-Tyr-Val-Glu-Lys-Gly-Arg-Arg-Ile-Thr-  
 C T A T T C T A

892-972 CCG CGT CAC ATC CGT CAG CTG GAA AAA GAC GAT ATC AAC CAT ATC GAA GTT CCG GTT GAG TAC ATC CCA GGT AAA GTC GTC  
 271-297 Ala-Arg-His-Ile-Arg-Gln-Leu-Glu-Lys-Asp-Ile-Lys-His-Ile-Glu-Val-Pro-Val-Glu-Ile-Ile-Ala-Gly-Lys-Val-Val-  
 C T C C G A TG C G T G T

973-1053 TCT AAA GAC TAC GTT GAC GAA TCT ACT GGC GAG CTG ATC TGC GCG GCG AAC ATG GAG CTG AGC CTG GAT CTG CTG GCT AAG  
 298-324 Ser-Lys-Asp-Tyr-Val-Asp-Glu-Ser-Thr-Gly-Glu-Leu-Ile-Cys-Ala-Ala-Asn-Met-Glu-Leu-Ser-Leu-Asp-Leu-Ala-Lys-  
 G A T A T G C A Val Leu

1054-1134 CTG AGC CAG TCC GGC CAC AAG CGT ATC GAA ACG CTG TTT ACC AAC GAT CTG GAC CAC GGC CCG TAC ATT TCT GAA ACG GTA  
 325-351 Leu-Ser-Gln-Ser-Gly-His-Lys-Arg-Ile-Glu-Thr-Leu-Phe-Thr-Asn-Asp-Leu-Asp-His-Gly-Pro-Tyr-Ile-Ser-Glu-Thr-Val-  
 T T C C T A T C

1135-1215 CGC GTC GAC CCA ACT AAC GAT CGT CTG AGC CCG CTG GTA GAA ATC TAC CGC ATG ATG CGC CCT GGT GAG CCG ACA CGC  
 352-378 Arg-Val-Asp-Pro-Thr-Asn-Asp-Arg-Leu-Ser-Ala-Leu-Val-Glu-Ile-Tyr-Arg-Met-Met-Arg-Pro-Gly-Glu-Pro-Pro-Thr-Arg-  
 T C A C

1216-1296 GAA GCG GCT GAA AGC CTG TTT GAG AAC CTG TTC TCC GAA GAC CGC TAT GAC CTG TCT CCG CTG GGT CGT ATG AAG TTC  
 379-405 Glu-Ala-Ala-Glu-Ser-Leu-Phe-Glu-Asn-Leu-Phe-Ile-Ser-Glu-Asp-Arg-Tyr-Asp-Leu-Ser-Ala-Val-Gly-Arg-Met-Lys-Phe-  
 A C T T

1297-1377 AAC CGT TCT CTG CTG CCG GAC GAA ATC GAA GGT TCC GGT ATC CTG AGC AAA GAC ATC ATT GAT GTC ATG AAG AAG CTC  
 406-432 Asn-Arg-Ser-Leu-Leu-Arg-Asp-Glu-Ile-Glu-Gly-Ser-Gly-Ile-Leu-Ser-Lys-Asp-Ile-Ile-Asp-Val-Met-Lys-Lys-Leu-  
 A A T T A

Glu

1378-1458 ATC GAT ATC CGT AAC GGT AAA GGC GAA GTG GAT GAT ATC GAC CAC CTC GGC AAC CGT CGT ATC CGT TCC GTC GGC GAA ATG  
 433-459 Ile-Asp-Ile-Arg-Asn-Gly-Lys-Gly-Glu-Val-Asp-Asp-Ile-Asp-His-Leu-Gly-Asn-Arg-Arg-Ile-Arg-Ser-Val-Gly-Glu-Met-  
 T  
 1459-1539 GCG GAA AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG GTG GCG GTA GAG CGT GCG GTG AAA GAG CGT CTG TCT CTG GGC GAT CTG GAT ACC  
 460-486 Ala-Glu-Asn-Gln-Phe-Arg-Val-Gly-Leu-Val-Arg-Val-Glu-Arg-Ala-Val-Lys-Glu-Arg-Leu-Ser-Leu-Gly-Asp-Leu-Asp-Thr-  
 A  
 1540-1620 CTG ATG CCT CAG GAT ATC AAC GCC AAG CCG AAT TCC GCC GCA GTG AAA GAG TTC TTT GGT TCC AGC CAG CTG TCT CAG  
 487-513 Leu-Met-Pro-Gln-Asp-Met-Ile-Asn-Ala-Lys-Pro-Ile-Ser-Ala-Ala-Val-Lys-Glu-Phe-Phe-Gly-Ser-Ser-Gln-Leu-Ser-Gln-  
 A C  
 1621-1701 TTT ATG GAC CAG AAC AAC CCG CTG TCT GAG ATT ACG CAC AAA CGT CGT ATC TCC GCA CTC GGC CCA GGC GGT CTG ACC CGC  
 514-540 Phe-Met-Asp-Gln-Asn-Pro-Leu-Ser-Glu-Ile-Thr-His-Lys-Arg-Arg-Ile-Ser-Ala-Leu-Gly-Pro-Gly-Gly-Leu-Thr-Arg-  
 T  
 1702-1782 GAA CTG GCA GGC TTC GAA GTT CGA GAC GTA CAC CCG ACG CAC TAC TAC GGT CCG GTA TGT CCT ATC GAA ACG CCG GAA GGT CCG  
 541-567 Glu-Leu-Ala-Gly-Phe-Glu-Val-Arg-Asp-Val-His-Pro-Thr-His-Tyr-Gly-Arg-Val-Cys-Pro-Ile-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Pro-  
 T A C T  
 GT Arg  
 1783-1863 AAC ATC GGT CTG ATC AAC TCC CTG TCC CTG TAC GCA CAG ACT AAC GAA TAT GGC TTC CTT GAG ACG CCG TAC CGT CGT GTG  
 568-594 Asn-Ile-Gly-Leu-Ile-Asn-Ser-Leu-Ser-Val-Tyr-Ala-Gln-Thr-Asn-Glu-Tyr-Gly-Phe-Leu-Glu-Thr-Pro-Tyr-Arg-Arg-Val-  
 T C T AAA Lys  
 1864-1944 GTT GAT GGC GTG GTT ACT GAC GAA ATT CAT TAC CTG TCT GCT ATC GAA GGC AAC TAC GTT ATC GCT CAG GCG AAC TCC  
 595-621 Val-Asp-Gly-Val-Val-Thr-Asp-Glu-Ile-His-Tyr-Leu-Ser-Ala-Ile-Glu-Glu-Gly-Asn-Tyr-Val-Ile-Ala-Gln-Ala-Asn-Ser-  
 ACC C T T A C C  
 Thr  
 1945-2025 AAC CTG GAT GAC GAA GGC CAC TTT GTA GAA GAT TTG GTG ACC TGC CGT AGC AAA GGC GAA TCC ACC TTG TTC ACC CGC GAC  
 622-648 Asn-Leu-Asp-Asp-Glu-Gly-His-Phe-Val-Glu-Asp-Leu-Val-Thr-Cys-Arg-Ser-Lys-Gly-Glu-Ser-Ser-Leu-Phe-Ser-Arg-Asp-  
 T A C C A T  
 Glu  
 2026-2106 CAG GTT GAC TAC ATG GAC GTT TCC ACC CAG CAG CTG GTC TCC GTC GGT GCG TCC CTG ATC CCG TTC CTG GAA CAC GAT GAC  
 649-675 Glu-Val-Asp-Tyr-Met-Asp-Val-Ser-Thr-Gln-Gln-Val-Val-Ser-Val-Gly-Ala-Ser-Leu-Ile-Pro-Phe-Leu-Glu-His-Asp-Asp-  
 A

2107-2187 GCC AAC CGT GCA TTG ATG GGT CCG AAC ATG CAA CGT CAG GCG CTT CCG ACT CTG CCG GCT GAC AAG CCG CTG GTG GGT ACC  
 676-702 Ala-Asn-Arg-Ala-Leu-Met-Gly-Ala-Asn-Met-Gln-Arg-Gln-Ala-Val-Pro-Thr-Leu-Arg-Ala-Asp-Lys-Pro-Leu-Val-Gly-Thr-  
 T T C T T

2189-2268 GGT ATG GAA CGT GCT GTC GCC GTC GAC TCC GGT GTF ACT GCA GTA GGT AAA CGT GGC GGT ACT GTT CAG TAC GTG GAT GCG  
 703-729 Gly-Met-Glu-Arg-Ala-Val-Ala-Val-Asp-Ser-Gly-Val-Thr-Ala-Val-Ala-Lys-Arg-Gly-Gly-Thr-Val-Gln-Tyr-Val-Asp-Ala-  
 T T A G T GTC Val

2269-2349 TCC CGT ATC GTT ATC AAA GTT AAC GAA GAC GAG ATG TAC CCG UGC GAA CCG GGT ATC GAC ATC TAT AAC CTG ACC AAA TAC  
 730-756 Ser-Arg-Ile-Val-Ile-Lys-Val-Asn-Glu-Asp-Glu-Met-Tyr-Pro-Gly-Glu-Ala-Gly-Ile-Asp-Ile-Tyr-Asn-Leu-Thr-Lys-Tyr-  
 T T A C

2350-2430 ACC CGC TCT AAC CAG AAC ACC TGT ATC AAC CAG ATG CCA TGT CTG TCT CTG GCG CAG CCG GTF GAA CCG GGC GAC GTG CTG  
 757-783 Thr-Arg-Ser-Asn-Gln-Asn-Thr-Cys-Ile-Asn-Gln-Met-Pro-Cys-Val-Ser-Leu-Gly-Glu-Pro-Val-Glu-Arg-Gly-Asp-Val-Leu-  
 T G T A T

2431-2511 GCA GAC GGT CCG TCC ACC GAC CTC GGT GAA CTG CCG CTC GGT CAG AAC ATG CCG GTG CCG TTC ATG CCG TGG AAC GGC TAC  
 784-810 Ala-Asp-Gly-Pro-Ser-Thr-Asp-Leu-Gly-Glu-Leu-Ala-Leu-Gly-Gln-Asn-Met-Arg-Val-Ala-Phe-Met-Pro-Trp-Asn-Gly-Tyr-  
 T T A

2512-2592 AAC TTC GAA GAC TCC ATT CTC GTT TCC GAG CGT GTT GTC CAG GAA GAC CGT TTC ACC ACC ATC CAC ATT CAG GAA CTG CCG  
 811-837 Asn-Phe-Glu-Asp-Ser-Ile-Leu-Val-Ser-Glu-Arg-Val-Val-Gln-Glu-Asp-Arg-Phe-Thr-Thr-Ile-His-Ile-Gln-Glu-Leu-Ala-  
 C A T

2593-2673 TGC GTG TCC CGT GAC ACC AAG CTG GGG CCG GAA GAG ATC ACC GGT GAT ATC CCG AAC GTG GGT GAA GCT GCG CTC TCC AAA  
 838-864 Cys-Val-Ser-Arg-Asp-Thr-Lys-Leu-Gly-Pro-Glu-Glu-Ile-Thr-Ala-Asp-Ile-Pro-Asn-Val-Gly-Glu-Ala-Ala-Leu-Ser-Lys-  
 T T C C

2674-2754 CTG GAT GAA TCC GGT ATC GTT TAC ATC GGC CCG GAA GTG ACA GGC GGT GAC ATT CTG GTC GGT AAG GTG ACG CCG AAA GGT  
 865-891 Leu-Asp-Glu-Ser-Gly-Ile-Val-Tyr-Ile-Gly-Ala-Glu-Val-Thr-Gly-Gly-Asp-Ile-Leu-Val-Gly-Lys-Val-Thr-Pro-Lys-Gly-  
 T T T C T A

2755-2835 GAA ACC CAG CTG ACG CCG GAA GAG AAA CTG CTG CGT CCG ATC TTC GGT GAG AAA GCG TCT GAC GTT AAA GAC TCT TCT CTG  
 892-918 Glu-Thr-Gln-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Leu-Leu-Arg-Ile-Ile-Phe-Gly-Glu-Lys-Ala-Ser-Asp-Val-Lys-Asp-Ser-Ser-Leu-  
 T C A A C

2836-2916 CGC GTA CCT AAC GGT GTC TCC GGT ACG GTT ATC GAC GTT CAG GTC TTT ACT CGC GAT GGC GTA GAA AAA GAC AAA CGT GCT  
 919-945 Arg-Val-Pro-Asn-Gly-Val-Ser-Gly-Thr-Val-Ile-Asp-Val-Gln-Val-Phe-Thr-Arg-Asp-Gly-Val-Glu-Lys-Asp-Lys-Arg-Ala-  
 G

2917-2997 CTG GAA ATC GAA GAG ATG CAG CTC AAG CAG CCG AAA AAA GAC CTG TCT GAA GAA GAA CTG CAG ATC CTC GAA GCG GGC CTG TTT  
 946-972 Leu-Glu-Ile-Glu-Glu-Met-Gln-Leu-Lys-Gln-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu-Ser-Glu-Glu-Ile-Leu-Gln-Ala-Gly-Leu-Phe-  
 C

2998-3078 AGC CGT ATC CGT GCG GTG CTG GTT TCC ACC GGC GTT GAA GCT GAG AAG CTC GAC AAA CTG CCG CGC GAC CGC TGG CTG GAA  
 973-999 Ser-Arg-Ile-Arg-Ala-Val-Leu-Val-Ser-Ser-Gly-Val-Glu-Ala-Glu-Lys-Leu-Asp-Lys-Leu-Pro-Arg-Asp-Arg-Trp-Leu-Glu-  
 T

3079-3159 CTC GGT CTG ACC GAC GAA GAG AAA CAA AAT CAG CTG GAA CAA CTG GCT GAG CAG TAT GAC GAA CTG AAA CAC GAG TTC GAG  
 1000-1026 Leu-Gly-Leu-Thr-Asp-Glu-Glu-Glu-Lys-Gln-Asn-Gln-Leu-Glu-Gln-Tyr-Asp-Glu-Lys-His-Glu-Phe-Glu-  
 G C A

3160-3240 AAA AAA CTT GAA CCG AAG CCG CGT AAA ATC ACC CAG GGC GAC GAT CTG CCG GCG CTG AAG ATC GTG AAG GTC TAT  
 1027-1053 Lys-Lys-Leu-Glu-Ala-Lys-Arg-Arg-Lys-Ile-Thr-Gln-Gly-Asp-Leu-Ala-Pro-Gly-Val-Leu-Lys-Ile-Val-Lys-Val-Tyr-  
 G C C A C

3241-3321 CTG GCC GTT AAA CCG CGT ATC CAG CCG GGT GAT AAG ATG GCA GGT CCGT CAC GGT AAC AAG GGT GTT ATC TCT AAG ATC AAC  
 1054-1080 Leu-Ala-Val-Lys-Arg-Arg-Ile-Gln-Pro-Gly-Asp-Lys-Met-Ala-Gly-Arg-His-Gly-Asn-Lys-Gly-Val-Ile-Ser-Lys-Ile-Asn-  
 G T C

3322-3402 CCG ATC GAA GAC ATG CCT TAC GAT GAA AAC GGC ACG CCG GTA GAC ATC GTA CTG AAC CCG CTG GGC GTA CCG TCT CGT ATG  
 1081-1107 Pro-Ile-Glu-Asp-Met-Pro-Tyr-Asp-Glu-Asn-Gly-Thr-Pro-Val-Asp-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Leu-Gly-Val-Pro-Ser-Arg-Met-  
 T

3403-3483 AAC ATC GGC CAG ATT CTG GAA ACC CAC CTG GGT ATG GCT GCG AAA GGT ATT GGC GAC AAG ATT AAC GCC ATG CTG AAA CAG  
 1108-1134 Asn-Ile-Gly-Gln-Ile-Leu-Glu-Thr-His-Leu-Gly-Met-Ala-Ala-Lys-Gly-Ile-Asn-Ala-Met-Leu-Lys-Gln-  
 T C C

3484-3513 CAG CAG GAA GTC GCG AAA CTG CCG GAA TTC  
 1135-1144 Gln-Gln-Glu-Val-Ala-Lys-Leu-Arg-Glu-Phe  
 C

Рис. 3. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности фрагмента  *EcoRI-C*  гена  *groV S. typhimurium*  и  *E. coli* . Представлены полные последовательности  *S. typhimurium* , ниже приведены отличающиеся положения в последовательностях  *E. coli* . Нумерация приведена по [2]

др. [20]. Гидролиз ДНК рестриктазами осуществляли в условиях, предлагаемых поставщиками ферментов. Лигирование фрагментов в состав лиnearизованного и дефосфорилированного векторов проводили как описано ранее [20, 21].

Получение и трансформацию компетентных клеток *E. coli* МН1 (хранившихся замороженными при  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких месяцев), получение реплик, амплификацию колоний и иммобилизацию ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах осуществляли как описано Маниатисом и др. [20]. Гибридизацию фильтров с ник-транслированным фрагментом *EcoRI*-С гена *groB* *E. coli*, выделенным как описано ранее [6], проводили в течение ночи при  $60^{\circ}\text{C}$  и отмывали дважды по 20 мин в буфере  $2 \times \text{SSC} + 0,2\% \text{SDS}$  с легким перемешиванием при комнатной температуре и дважды по 20 мин в том же буфере при  $60^{\circ}\text{C}$ , определяя степень отмывки счетчиком радиоактивности [20].

Определение первичной структуры фрагмента *EcoRI*-С проводили по методу Максама — Гилберта [15], модифицированному нами [14], а также по двум вариантам метода Сэнгера: стандартному [16] или с использованием меченного при помощи Т4-полинуклеотидкиназы 17-членного универсального праймера [17].

В работе в большинстве случаев использовали рестриктазы (КФ 3.1.23.X; Boehringer Mannheim), рестриктазу *BglII* (Amersham), фрагмент Кленова (Pharmacia-P. L. Biochemicals). Полинуклеотидкиназа фага Т4 (КФ 27.1.78) была выделена в нашей лаборатории по методу [22].  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  уд. акт. 5000 Ки/ммоль и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  уд. акт. 3000 Ки/ммоль — препараты фирмы Amersham. dNTP, ddNTP и RFI-форма фагов М13mp9 и М13mp11 — препараты фирмы Pharmacia-P. L. Biochemicals. 17-Членный универсальный праймер был синтезирован в нашей лаборатории по методу [23].

Авторы выражают благодарность С. Г. Арсеняну за ценные советы и помощь в работе.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ovchinnikov Yu. A., Lipkin V. M., Chertov O. Yu., Smirnov Yu. V. FEBS Lett., 1977, v. 76, № 1, p. 108—111.
2. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Guryev S. O., Chertov O. Yu., Modyanov N. N., Grinkevitch V. A., Makarova I. A., Marchenko T. V., Polovnikova I. N., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 3, p. 621—629.
3. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Gubanov V. V., Salomatina I. S., Shuvaeva T. M., Lipkin V. M., Sverdlov E. D. Nucl. Acid. Res., 1982, v. 10, № 13, p. 4035—4044.
4. Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Levitan T. L., Lipkin V. M., Modyanov N. N., Grachev M. A., Saychikov E. P., Pletnev A. G., Ovchinnikov Yu. A. In: Macromolecules in the functioning cell/Eds Salvatore F., Marino G., Volpe P. N. Y.: Plenum Press, 1978, p. 149—158.
5. Ovchinnikov Yu. A., Monastyrskaya G. S., Guryev S. O., Kalinina N. F., Sverdlov E. D., Gragerov A. I., Bass I. A., Kiver I. F., Moiseyeva E. P., Igumnov V. N., Mindlin S. Z., Nikiforov V. G., Khesin R. B. Mol. Gen. Genet., 1983, v. 190, № 3, p. 344—347.
6. Луцицкий Н. А., Гурьев С. О., Сverdlov Е. Д., Моисеева Е. П., Никифоров В. Г. Биоорган. химия, 1984, т. 10, № 1, с. 127—128.
7. Lisitsyn N. A., Sverdlov E. D., Moiseyeva E. P., Danilevskaya O. N., Nikiforov V. G. Mol. Gen. Genet., 1984, v. 193, № 1, p. 173—174.
8. Луцицкий Н. А., Сverdlov Е. Д., Моисеева Е. П., Никифоров В. Г. Биоорган. химия, 1985, т. 11, № 1, с. 132—134.
9. Crawford I. P., Yanofsky C. J. Mol. Biol., 1980, v. 142, № 4, p. 489—502.
10. Kaplan J. B., Merkl W. K., Nichols B. P. J. Mol. Biol., 1985, v. 183, № 3, p. 327—341.
11. Titavella I. P. B. Mol. Gen. Genet., 1984, v. 195, № 2, p. 215—218.
12. Овчинников Ю. А., Сverdlov Е. Д., Монастырская Г. С., Царев С. А., Зайцева Е. М., Арсения С. Г., Чаславская О. Г., Новохатский А. С., Аснетов Р. Д., Кузнецов В. П. Молькулярн. биология, 1984, т. 18, вып. 1, с. 49—59.
13. Goddard M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, p. 4281—4285.
14. Sverdlov E. D., Monastyrskaya G. S., Chestukhin A. V., Budowsky E. I. FEBS Lett., 1973, v. 33, № 1, p. 15—17.
15. Maxam A., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560—564.



16. Manual for the M13 cloning sequencing system, 1984, Pharmacia-P. L. Biochemicals.
17. McGraw R. A. Anal. Biochem., 1984, v. 143, № 2, p. 298—303.
18. Frenzl R., Cole S. T. Eur. J. Biochem., 1983, v. 134, № 3, p. 497—502.
19. Yanojsky C., Van Cleemput M. J. Mol. Biol., 1982, v. 155, № 3, p. 235—246.
20. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. В кн.: Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
21. Legersky R. J., Robberson D. L. J. Mol. Biol., 1985, v. 181, № 2, p. 297—312.
22. Richardson C. C. In: Procedures in nucleic acids research. V.2/Eds Cantoni G. L., Davies D. R. N. Y.: Harper and Row, 1971, p. 815—828.
23. Efimov V. A., Buryackova A. A., Reverdatto S. V., Chakhmakhcheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. Nucl. Acids. Res., 1983, v. 11, № 23, p. 8363—8387.

Поступило в редакцию  
29.XII.1985

**GENES CODING FOR  $\beta$ -SUBUNIT OF BACTERIAL RNA POLYMERASES.  
I. PRIMARY STRUCTURE OF THE *rpoB* GENE *EcoRI*-C FRAGMENT  
FROM *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

SVERDLOV E. D., LISITSYN N. A., GURYEV S. O., SMIRNOV Yu. V.,

ROSTAPSHOV V. M., MONASTYRSKAYA G. S.

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

*Bgl*III fragment of *S. typhimurium* DNA, containing *rpoB* gene coding for the RNA polymerase  $\beta$ -subunit, was cloned. The nucleotide sequence of the *rpoB* gene *EcoRI*-C fragment (2873 b. p.) was determined.