



УДК 577.113.5
© 1991 г.

В. А. Ефимов, А. В. Андреева, С. В. Ревердатто,
О. Г. Чахлахчева

ФОТОСИСТЕМА II ЯЧМЕНЯ.
НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ *psbB*, *psbC*,
psbE, *psbF*, *psbH* ЯЧМЕНЯ И ПРИМЫКАЮЩИХ К НИМ
ОБЛАСТЕЙ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Для определения первичной структуры субъединиц комплекса фотосистемы II ячменя были клонированы гены *psbB* (кодирующий хлорофиллсвязывающую субъединицу 47 кДа) и *psbH* (кодирующий фосфопротеин с молекулярной массой 7,8 кДа), *psbE* и *psbF* (кодирующие субъединицы ~9 и ~4 кДа апопротеина цитохрома b_{559}), а также фрагмент гена *psbC* (кодирующий хлорофиллсвязывающую субъединицу 43 кДа). Нуклеотидные последовательности этих генов и аминокислотные последовательности кодируемых ими полипептидов высокомолекулярны соответствующим последовательностям других видов растений.

Фотосистема II осуществляет перенос электронов от молекул воды на молекулы хинонового производного, при этом создается трансмембранная разность электрохимических потенциалов и образуется кислород. Фотосистема II является белково-пигментным комплексом, состоящим из вне-мембранной части и интегрированного в мембрану так называемого «ядра» (рис. 1). Вне-мембранный кислородвыделяющий комплекс включает в себя не менее трех растворимых полипептидов, а «ядро» — не менее 10 субъединиц гидрофобной природы размером от 4 до 47 кДа [1, 2], с которыми связано около 50 молекул хлорофилла *a* [3], а также ряд других простетических групп, причем с двумя наиболее крупными субъединицами, хлорофиллсвязывающими белками CPa-1 (47 кДа) и CPa-2 (43 кДа), ассоциировано 20—24 и 26 молекул хлорофилла *a* соответственно, а также приблизительно по 3 молекулы β -каротина [4, 5]. Минимальный реакционный центр фотосистемы II состоит из четырех полипептидов: белка D1, связывающего вторичный хинон (32 кДа), D2 (33 кДа) и двух полипептидов цитохрома b_{559} [6]. Вопрос о функциональном значении CPa-1 и CPa-2 остается открытым.

Исследование функциональной роли полипептидных компонентов фотосистемы II непосредственно связано с выяснением деталей их структур. Гидрофобная природа относительно крупных полипептидов затрудняет определение аминокислотной последовательности значительной части этих белков методами белковой химии, поэтому перспективным является выведение структур полипептидов из нуклеотидных последовательностей их генов, тем более что гены, кодирующие полипептиды фотосистемы II, находятся в относительно просто организованной ДНК хлоропластов. Физическая карта хлоропластной ДНК ячменя (рис. 2) отражает основные характерные черты ее организации в хлоропластах [7].

Ранее нами были опубликованы структуры генов *psbA* и *psbD*, кодирующих два белка из минимального реакционного центра — D1 и D2 соответственно [8, 9]. В этой статье мы представляем данные по нуклео-

Сокращения: OРС — открытая рамка считывания; *ExoIII* — экзонуклеаза III из *E. coli*; BSA — бычий сывороточный альбумин; хлДНК — ДНК хлоропластов. Префикс «d» в последовательностях олигонуклеотидов опущен.

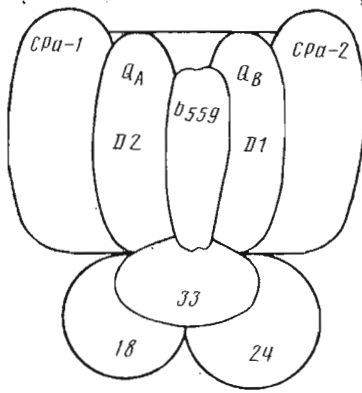


Рис. 1. Модель молекулярной организации фотосистемы II. Белки CPa-1 (47 кДа), CPa-2 (43 кДа), D2 (34 кДа), D1 (32 кДа) и полипептиды цитохрома b_{559} входят в состав «ядра» фотосистемы II. Белки 33, 24 и 18 кДа (отмечены соответствующими цифрами) входят в состав внеклеточного кислородвыделяющего комплекса. Q_A и Q_B — первичный и вторичный акцепторы электронов

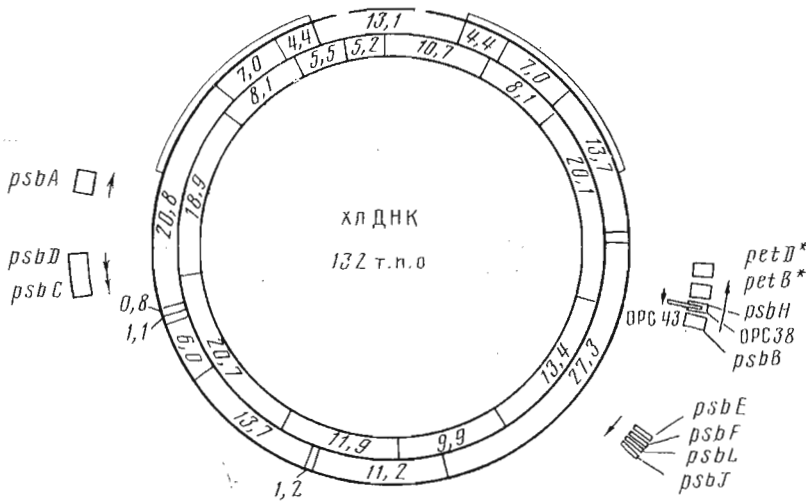


Рис. 2. Рестриктивная карта хлДНК ячменя [7]. Скобкой обозначены инвертированные повторы в хлоропластном геноме ячменя. Показаны фрагменты, полученные при обработке *Pst*I (внутреннее кольцо) и *Sal*GI (внешнее кольцо). Размеры фрагментов даны в т.п.о. [7]. На карте показаны локализация и направление транскрипции генов фотосистемы II: *psbA* [7], *psbB*, *psbC*, *psbE*, *psbF*, *psbJ*, *psbH*, *psbL*, а также ОРС 38, ОРС 43 и гены *petB*, *petD* цитохромного f/b_c -комплекса. Звездочками обозначены гены, имеющие цитроны

тидным последовательностям генов: *psbB* и *psbC*, кодирующих хлорофиллсвязывающие белковые субъединицы (47 и 43 кДа соответственно); *psbE* и *psbF*, кодирующих две субъединицы апопротеина цитохрома b_{559} (~9 и ~4 кДа); *psbH*, кодирующего фосфопротеин с молекулярной массой 7,7 кДа; *psbL* и *psbJ*, кодирующих белки 4 кДа, также, вероятно, принадлежащие фотосистеме II.

В качестве источников генов, кодирующих полипептиды фотосистемы II ячменя, мы использовали плазмиды серии рНvсР, любезно предоставленные д-ром Т. Х. Н. Эллисом (Англия). Плазмиды серии рНvсР были получены на основе вектора рАТ 153 и несли *Pst*I-фрагменты хлоропластного генома ячменя (*Hordeum vulgare*), в дальнейшем обозначенные по убыванию молекулярной массы Р1, Р2 и т. д. [7].

Клонирование и секвенирование генов полипептидов фотосистемы II Гены *psbB* и *psbH*

Фрагмент хлДНК ячменя Р2 (20,4 т.п.о.), предположительно содержащий гены *psbB* и *psbH*, вырезали из плазмиды рНvсР2 и подвергали рестриктному анализу с последующим разделением полученных фрагментов электрофорезом в агарозном геле. Зоны, содержащие искомые гены,

**Структуры синтетических олигонуклеотидов — праймеров и зондов,
использованных для определения нуклеотидной последовательности генов
фотосистемы II**

Гены фотосистемы II	Праймер	Структура олигонуклеотида *	Число звеньев
<i>psbB</i>	UP	CGACGTTGTA [*] AAACGACGGCCAGT	24
	RUP	GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCC	27
<i>psbC</i>	<i>C1</i>	GAGCTCATGTAGCCCATGC	19
	<i>C2</i>	TATCATGC [*] ACTTCTGGGACC	20
	<i>C3</i>	TGGATTGTTAGTGTGGACG ATTT	23
	<i>C0</i>	CATTAGCTCCAAGACGCTGG	20
	<i>C4</i>	CCAAGTATACAAATGGAACC	20
	<i>C5</i>	ATTAAGTGAATACCTAAAAAT	20
<i>psbE</i>	<i>F1</i>	ATGTCTGGAAGCACGGGAGAACGTTCTTTTGC [*] T	33
	<i>F2</i>	ACCGACCGTTTTGATTCTTTAG	22
	<i>F3</i>	TCCTTGTCCGGCTTTCCCGTGA	21
	<i>F4</i>	TTATCGTTGGATGAACTG	18
	<i>F5</i>	AATGAACAAAATGTTGAATT	20
	<i>F6</i>	TCTAGCATGACCAATTGATA	20
	<i>F7</i>	ATCAATTGGTCATGCTAGA	19
	<i>F8</i>	CTATAGAGATGAACCCCAATC	20

* В структуре олигонуклеотида *C1* подчеркнут нуклеотид, не соответствующий аналогичному нуклеотиду в хлДНК ячменя.

деления плазмидной ДНК — рестриктивным анализом. Так были получены плазмиды pB3 и pB2, несущие *Bam*HI-фрагмент в обеих ориентациях, и pB1, несущая *Kpn*I-*Pst*I-фрагмент.

Нуклеотидную последовательность клонированных фрагментов ДНК определяли методом терминирования цепи в присутствии дидезоксирибонуклеотидов (метод Сэнгера) [12]. Для определения нуклеотидной последовательности искомым генов были отобраны плазмиды pB1 и pB3. Выбранный нами метод «делеционных мутантов» Хеникоффа [13] значительно упростил подготовку ДНК к секвенированию, так как отпала необходимость в делении гена на субфрагменты и их последующем клонировании. Получение «делеционных мутантов» проводили по схеме, представленной на рис. 3. Плазмиды pB1 и pB3 расщепляли двумя эндонуклеазами рестрикции (*Xho*I, *Kpn*I в случае pB1 и *Sal*GI, *Sph*I в случае pB3), для каждой из которых имелось по одному участку узнавания. В реакционную смесь, содержащую линейную молекулу с выступающими 5'- и 3'-концами, добавляли фермент *Eco*III и отбирали алиquotы через равные промежутки времени, получая таким образом набор фрагментов с 5'-концевыми делециями различной протяженности. Обработкой S1-нуклеазой удаляли 5'- и 3'-выступающие концы и лигирование проводили по тупым концам. Алиquotами лигазных смесей трансформировали клетки *E. coli* MV4193. Было отобрано по 24 производных от pB1- и pB3-конструкций, содержащих искомый фрагмент хлДНК в обеих ориентациях с делециями различной протяженности как с 5'-, так и с 3'-конца гена *psbE*.

Использование векторов pBSM13+ и pBSM13- позволило получать одноцепочечную матрицу по методике, минуя этап переклонирования в фаговый вектор. В качестве праймеров были взяты так называемые «прямой» (UP) и «обратный» (RUP) универсальные праймеры: синтетические 24- и 27-звенные олигонуклеотиды соответственно (см. таблицу).

Нуклеотидная последовательность *Kpn*I-*Pst*I-фрагмента хлДНК ячменя длиной 5,2 т.п.о. приведена на рис. 4; кроме генов *psbB* и *psbE* данный фрагмент содержит *petB* и частично *petD*, кодирующие белки цитохромного *f/b₆*-комплекса.

1 CTGCAAGTTGCCATGTTTACGGCAGTGAGAGCAGAGATAGCGGTGATGTCCGGCGGTGCT
T T T T C T A A A C A G A T T G C T T T T T T T A G A A T G A A T A A A T T T C A C C G
61 TTTGCCGTTACGCACCACCCCGTCAGTAGCTGAACAGGAGGGACAGCTGATAGAAACAGA
C T G A C A T A A T C T A A A G G T T A G T T A G A A T A G T A G A T A G T C T T T T
121 AGCCACTGGAGCACCTCAAAAAACACCATCATACACTAAATCAGTAAGTTGGCAGCATCAA
C C A A T G C A T T T A T A A G C G C T G G C T A T T T T C T A A G G T A T T C
psb B →
M G L P W Y R V H T V V L N D P G R L L
181 TGGGTTTGCCTTGGTATCGTGTTCATACTGTGCTATTGAATGATCCGGCTCGATTGCTTT
S V H I M H T A L V S G W A G S M A L Y
241 CGGTGCATATAATGCACACAGCTCTAGTTTCTGGTTGGGCTGGCTCAATGGCTTTATACG
T G
E L A V F D P S D P V L D P M W A Q G M
301 AATTAGCAGTTTTTGATGCCCTCTGATCCTGTTCGGATCCAATGTGGAGACAAGGTATGT
G
F V I P F M T R L G I T D S W G G W S I
361 TCGTAATTCCTTCATGACTCGTTTTAGGAATAACGGATTCCGTGGGGTGGTTGGAGTATTT
C C A
S G G T V T N P G I W S Y E G V A A T H
421 CAGGAGGAACCTGTAACAAATCCGGTATTTGGAGTTATGAAGGTGTGGCAGCTACGCATA
G G
I V F S G L C F L A A I W H W V Y W D L
481 TTGTGTTTTCTGGCTTGTGTTTCTTGGCAGCGAICTGGCATTGGGTATATTCGGACCTAG
T
E I F S D E R T G K P S L D L P K I F G
541 AAATATTCCTGTGATGAGCGGACGGGAAAACCCCTCTTTGGATTGCCCCAAGATCTTTGGAA
G T
I H L F L A G V A C F G F G A F H V T G
601 TPCATTTATTTCTTGCAGGGGTGGCTTGCTTTGGCTTTGGGGCATTTCATGTAACGGGTT
T T
L Y G P G I W V S D P Y G L T G K V Q A
661 TGTATGGTCTCGGGATATCGGATCCCTATGGACTAACTGGAAAAGTACAAGCTG
A C G C C
V N P A W G A E G F D P F V P G G I A S
721 TAAATCCAGCGTGGGGTGACAAGGTTTTGATCCTTTTCTCCGGGGGGAATAGCTTCTC
T C A
H H I A A G T L G I L A G G L F H L S V R
781 ATCATATTGCTGCGGTACATTGGGTATATTAGCGGGCTTATCCATCTTAGTGTCCGTC
T C A
P P Q R L Y K G L R M G N I E T V L S S
841 CGCCTCAACGTCTATATAAAGGATTACGTATGGGCAATATGAAACTGTACTTTCCAGTA
C G
S I A A V F F A A F V V A G T M W Y G S
901 GTATCGCTGCTGTTTTTTTTTGCAGCTTTCGTAGTTGCTGGAACATATGTTGATGGGCTCAG
T C A
A T T P I E L F G P T R Y Q W D Q G Y F
961 CAACGACCCCAATCGAATTATTTGGGCCTACTCGTTATCAGTGGGATCAGGATACTTTT
T
Q Q E I Y R R V S N G L A E N L S L S E
1021 AGCAAGAAATATATCGAAGAGTTAGCAATGGTTTAGCCGAAAATCTTAGTTTATCAGAAG
G G
A W S K I P E K L A F Y D Y I G N N P A
1081 CTGGTCTAAAAATCCCGAAAAATAGCCTTTTATCATATATTGGTAATAATCCGGCAA
K G G L F R A G S M D N G D G I A V G W
1141 AAGGGGATTTATCAGAGCGGGCTCAATGGACAATGGGGATGGAATAGCTGTTGCATGGT
G A C
L G H P V F R D K E G R E L F V R R M P
1201 TAGGACATCCCGTCTTTAGAGATAAAGAAGGACCTGAGCTTTTTTGTACGCCCTATGCCTA
C T
T F F E T F P V V L V D E E C I V R A D
1261 CTTTTTTTGAACATTTCCGGTTCTTTTGGTAGATGAGGAGGAAATGTTAGAGCGGACC
C A G

V F F R R A E S K Y S V E Q V G V T V E
1321 TTCCTTTTAGAAGAGCAGAATCCAAATATAGTGTGAACAAGTAGGCCATAACGGTGGAGT
F Y G G E L N G V N Y S D P A T V K K Y
1381 TCTATGCTGGCGAACTTAATGGAGTAAATATTCTGATCCTGCTACTGTAAAAAATATG
G

A R R S Q L G E I F E L D R A T L K S D
1441 CGAGGCGTTCTCAATTAGGGGAAATTTTTGAATTAGACCGGGCTACTTTGAAATCCGATG
C G T A A

G V F R S S P R G W F T F G H A T F A L
1501 GTCTTTTTCCGAGCAGTCCAAGGGTTGGTTCACCTTTGGTTCATGCTACCTTTGCTTTGC
L F F F G H I W H G A R T L F R D V F A
1561 TCTTCTTTTTCCGACACATTTGGCATGGCGCTAGAACATTTGTTCCGAGATGTTTTGCTG
C C

G I D P D L D A Q V E F G T F Q K V G D
1621 GTATTGATCCAGATTTGGATGCTCAAGTGAATTTGGAACATTTCCAAAAAGTGGGAGATC
C T

P T T K K Q A V *
1681 CAACTACAAAGAAACAGGCAGTCTGATACACATTTGTTATGGTATCTTTCACCTCTCTTTT
G G C BI C CA

TTGATTTGACATCTCCCATCTCTTTCTTTGACTCTTTTTCTTTTATATGGGAAATCT
T GAGBI3 TG T GA

CCC[^]AAATGACAAATGAATAGGTGTGGAAGTTATAATTGTA[^]AAAT[^]AAACCAGATCGAATCT
T G G

orf 38 →
M

1861 ATGGAAGCATTGGTTTATACGTTCCCTTTT[^]AGTTTCGACTTTAGGGATAATTTTTTCGCT
1921 ATCTTCTCCGAGAACCACTAAGGTTCCACCAACTCCAATAAAAGAATAAAATAATTT
GA T ACA----- G

CATTTAAGTAAGAAGTCTCCAGATAGGGGGACTTCTTACTTAAAT[^]TAGTCTCGGTGTTCC
A G C G G- A C C A

2041 TTCGAATGGATCTCTAATTTGTTGAGAGGGTTGCCCAAACCGGTATATAAGGCATACCC
+ orf 43
M

3001 AGTAAAGCTTACAAGTAAACCAGATATGGAGATGGCGACTAAAGTTGCTGTTTCCATTTT
2161 TATAGAATTTCAAGATTACAATGGATCTACGAAAAGATCGTGTATTTACAACACTACAACGG
T

AATAGTATACAAAGTCAACCCAATGATTAATATAATTTATGGCTACACAAACCGTTGA
psd H →
M A T Q T V E
G

D S S K P R P K R T G A G S L L K P L N
2281 AGATAGTTCTAAACCTAGGCCAAAACGAACTGGTGCAGGTAGTTTACTGAAACCTTGAA
G A G C T

S E Y G K V A P G W G T T P F M G V A M
2341 TTCGGAATATCGGAAAGTCCGCCCGGGTGGGGGACTACTCCTTTTATGGGGTCCGCAAT
T T

A L F A I F L S I I L E I Y N S S I L L
2401 GGCTTTATTCGCTATATTCCTATCTATCATTTTAGAAATTTATAATTTCTTCCATTTTACT
G A TG

D G I L T N *
2461 GGATGGAATTTTAACCAATTAGGTTTCTACTAACT[^]AAAACTAGGAAGTCAGAGTTTTTCC
C G T C T T

ATCCAAAAAGCCTTTCTAGTTTAAGCTCTACATTTCTAGATATTATGGTAGTTCGACCG
BI C C C C

CGGAATTTTTTGTTCGGTATCTCTGGAATATGAGTGTGTGACTTGTTAGAATTGATCC
pet B →
M S
T - T

TATTGATAATACATAGAAAGGGCCTGTATCTCTATCAAGATGATTCTAATTCGT[^]CAGAT
G

ATTATTTATTTCTAGTATCTGGAACACGAAATAGATAGAGTGGATCAAAAAAATGGA[^]ACT
C A

4141 GTATTTTATACGATACAAATACTTGA³GTTAATTTTACGAAAGAAAAAGCGGGATAT^M
----- G BI

4201 G G V GGCAGTGTGCTGACTTGAATTATTGATTTGGCCATGCAGATAAA^ACAATTGGATCTGCCACA
A G

4261 TTAGAATTACACAAAGGTCTCTCCGCATCCAATCAACATGTAAGTCCCTACCTAGG
G C T

4321 AACGATAGGCTGGTTCACCTGAGGAGAATATTTTCTATGATCATAACCGCAACCATGTCAT
C C_{B3}

4381 CCATGAACAGGCTCCGTAAGATCCCATAGAGTGGAAATGGAATCAGTTCATGTCACATGAT
T AT A T

4441 CCAATTCTCTATTTATTACACTTACTTTTATTATAGTATGGAAATGCATTCATTTCTTT
A A T

4501 TGCATCGATTGTGATCCGCAATACTATCGGAGTAAAAGAAGGGATCTAAGGAAGAATCTA
T C C

4561 GGCTAAACTTTTTGATTTTTATTAGTAACAAGTAAATATTTTGTGGAGGTAAGAAAC
C CA

4621 TTGGGATATTGAGGGGATAAAATCCAACTAATCAAGAGACATGAGACAATCCACAAAGCA
C A

4681 ATTGATCATGATCAAATTTGTAAGCCCACTTGCATATTGAGCATTACCCATAAGAATAG
C A

4741 GATTATTTTCAATGACTACTGGTAGGTGCAACTTTGGAAAAGAGAATCTGATAAAGCTTT
C T A C C T T

4801 TTTTGTCTAGACTCATTGAGTCAATTATATACCTTAATTCTATTAAGGATCTTCCGCGGTC
C A C T C C T G T C A

4861 TTATTTCTTTCACTCTTGCTCGAGCCGGATGATGATAAAATTCTCATCTCCGGTTCCTTTG
T A
q q w i l k s s p i p i T K K P D L N D

4921 GGGGATGGATCCTAAACAGTTCACCTATCCCAATAACAAAGAAACCAGACTTAAATGATC
A T

4981 CTGTATTAAGAGCTAAATTAAGCTAAAGGGATCGGACATAATTATACGGGGAACCCGGCAT
A T G

5041 W P N D L L Y I F P V V I L G T I A C N
G

5101 V G L A V L E P S M I G E P A D P F A T
A G

5161 TAGGTTTAGCGGTTCTCGAGCCATCAATGATTGGTGAACCGGCAGACCCCTTTGCAACTC
A G T
P L E I L P E W Y F F P V F Q I L R T V P

5161 CTTTGGAAATATTACCCGACTCGTACTTCTTCCCGTGTTCAAATACTCCGTACCGGTACC

Рис. 4. Нуклеотидная последовательность фрагмента хлДНК ячменя, содержащего гены *psbB* и *psbH*, а также *petB*, *petD*, ОРС 38, ОРС 43. Над нуклеотидной последовательностью кодирующей цепи показаны соответствующие ей аминокислотные последовательности, снизу — нуклеотидные замены в соответствующем фрагменте хлДНК кукурузы [11]. Подчеркнуты предполагаемые рибосомсвязывающие сайты, а также участки промотора —35 и —10. Стрелками обозначены потенциальные вторичные структуры. Делеции в нуклеотидной последовательности кукурузы обозначены черточкой, вставки — V_N , где N — число встроившихся нуклеотидов. Терминирующие кодоны отмечены звездочкой. Курсивом выделены функционально значимые элементы интронов *petB* и *petD* [16]

Ген *psbC*

Частичная информация о первичной структуре гена *psbC* уже имела в литературе, а именно: нами ранее были определены первые 50 нуклеотидов 5'-концевого участка гена, совпадающие с 3'-концевым участком гена *psbD* [9], также были известны последние 500 нуклеотидов 3'-концевого участка гена *psbC* [14].

Для получения недостающей информации мы использовали плазмиду рНvРЗ с фрагментом хлДНК ячменя длиной 18,4 т.п.о., который содержит полноразмерную копию гена *psbD* и значительную часть гена *psbC* [7]. Для того чтобы выделить искомую часть гена *psbC*, эту плазмиду обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *SacI*, удаляя, таким образом, большую часть фрагмента РЗ, а оставшуюся часть плазмиды с помощью лига-

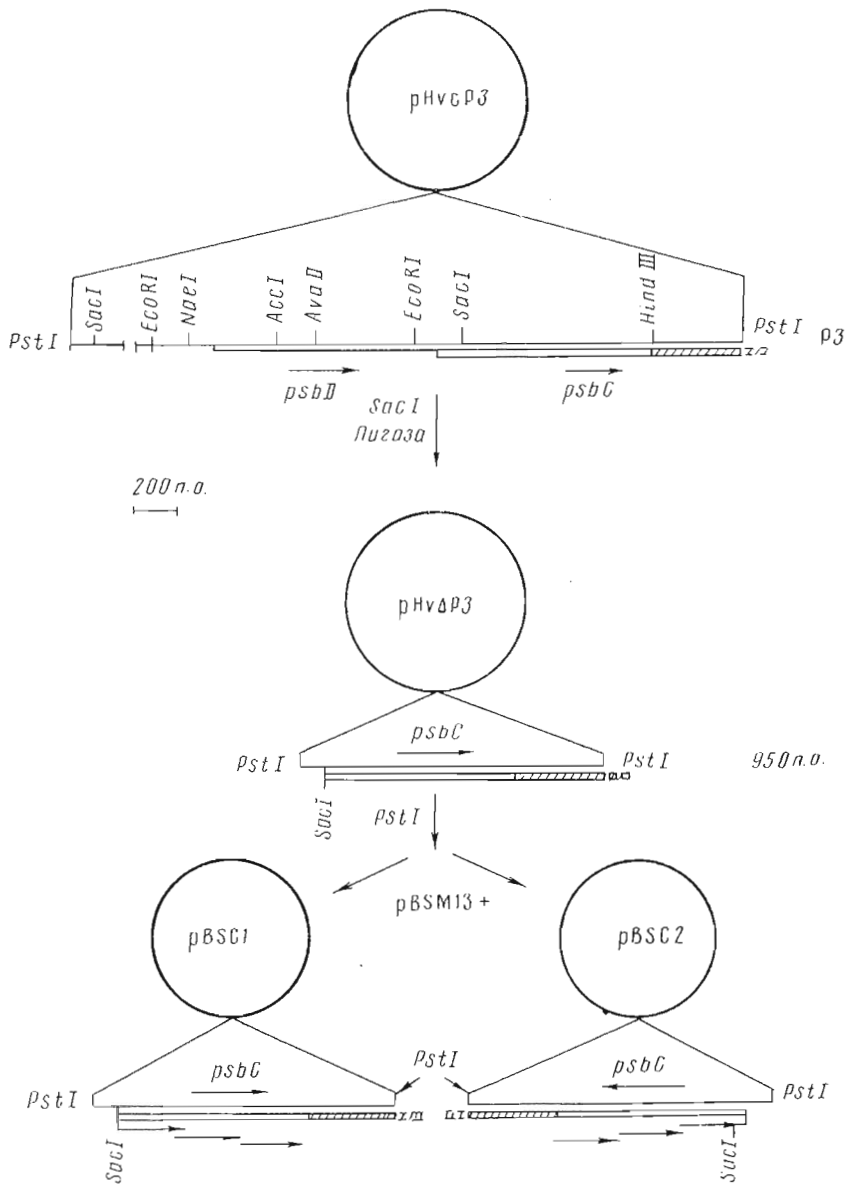


Рис. 5. Стратегия определения нуклеотидной последовательности искомого участка гена *psbC* хлоропластной ДНК ячменя (фрагмент РЗ). Пунктиром обозначен 3'-конец гена *psbC*, который не входит в состав фрагмента РЗ. Заштрихован фрагмент гена *psbC*, структура которого была определена ранее. Стрелками указаны направление и протяженность чтения последовательности с помощью синтетических олигонуклеотидов-праймеров при определении первичной структуры

зы превращали в кольцевую молекулу. Полученную конструкцию подвергали гидролизу *PstI*, что позволило получить *PstI*-фрагмент длиной 950 п.о., который был клонирован в вектор *pBSM13+* (рис. 5). Отбор клонов проводили гибридизацией с тем же меченым *PstI*-фрагментом, а после выделения плазмидной ДНК — рестриктным анализом. В дальнейшем использовались плазмиды *pBSC1* и *pBSC2*, содержавшие этот фрагмент в обеих ориентациях.

Для определения нуклеотидной последовательности этого *PstI*-фрагмента была выбрана одна из разновидностей «дидезокси»-метода: метод «смещающегося праймера» [15]. Наряду с праймерами RUP и UP, структура которых в точности соответствовала структуре участков гена ячменя, нами были использованы олигонуклеотиды С1—С5 (см. таблицу),

1 M K I L Y S L R R F Y H V E T L F N G T
 ATGAAAATCTTATATTCCTCGAGGAGGTTCTACCACGTGGAAACGCTCTTTAATGCAACT
 61 F V L A G R D Q E T T G F A W W A G N A
 TTCGTTTTAGCTGGTCTGACCAAGAAACCACGGCTTTGCTTGGTGGGCTGGGAATGCC
 121 R L I N L S G K L L G A H V A H A G L I
 AGACTTATCAATTTGTCCCGTAAACTACTTGGAGCTCACGTAGCCCATGCCGGATTAATC
 181 V F W A G A M N L F E V A H F V P E K P
 GTATTCTGGGCCGAGCAATGAACCTATTTGAAGTGGCCCATTTCTGTAACCAGAAAAAGCCC
 241 M Y E Q G L I L L P H L A T L G W G V G
 ATGTATGAACAAGGCTGATTTTACTTCCACACTTAGCTACTCTAGGTTGGGGACTAGGG
 301 P G G E V L D T F P Y F V S G V L H L I
 CCAGGGGGGAAGTTCTAGATACTTTTCCATACTTTGTATCTGGCGTACTTCACCTAATT
 361 S S A V L G F G G I Y H A L L G P E T L
 TCCTCCGCACTTAGGCTTCGGTGGCATTATCACGGCTTCTGGGACCCGAGACTCTT
 421 E E S F P F F G Y V W K D R N K M T T I
 GAAGAATCTTTCCATCTTTGGTTATGTCTGAAACATAGAAATAAAATGACTACAATT
 481 L G I H L I L L G L G A F L L V L K A L
 TTGGGTATTCACTTAATTTGTTAGGTCTAGGTGCTTTTCTTCTAGTACTCAAGGCTCTT
 541 Y F G G V Y D T W A P G G G D V R K I T
 TATTTTGGCGGTATATATGATACCTGGGCCCTGGGGGGGAGATGTAAGAAAAATTACC
 601 N L T L S P S V I F G Y L L K S P F G G
 AATTTGACCCTTAGTCCCAGTGTATATTTGGTTATTTACTAAAAATCTCCTTTTGGGGGA
 661 E G W I V S V D D L E D I I G G H V W L
 GAAGGGTGGATTGTTACTGTAGATGATTTAGAAGATATAATTGGTGGACATGTATGGTTG
 721 G F I C V F G G I W H I L T K P F A W A
 GGTTTTATTTGTGTATTTGGGGGAATTTGGCATATTTTAACCAAACCCCTTCGCATGGGCT
 781 R R A F V W S G E A Y L S Y S L A A L S
 CGCCGTCATTTGTATGGTCTGGAGAAGCTTACTTGTCTTATAGTTTAGCTGCTTTATCT
 841 V F G F I A C C F V W F N N T A Y P S E
 GTCTTTGCTTTTATCGCTTGTGTTTTGTATGGTTCAATAATACAGCTTATCCGAGTGGAG
 901 F Y G P T G G P E A S Q A Q A F T F L V R
 TTTTATGACCCACCGGGCCAGAAGCTTCTCAAGCTCAAGCATTTACTTTTCTAGTTAGA
 961 D Q R L G A N V G S A Q G P T G L G K Y
 GACCAGCTCTTGGAGCTAATGTGGGATCCGCTCAAGGACCCACAGCTTTAGGGAAATAT
 1021 L I R S P T G E V I F G C E T M R F W D
 CTAATCCCTTCCCCAACTGGGGAGCTTATCTTTGGAGGGGAAACTATGCCCTTTTGGGGAC
 1081 L R A P W L E P L R G P N G L D L S R L
 CTTCGTGCTCCATGGTTAGAACCCTCTAAGGGCCCCAACGGTTTGGACTTGAGTAGGTTG
 1141 K K D I Q P W Q E R R S A E Y M T H A P
 AAAAAAGACATACAACCTTCCGAAGAACGGCGCTCAGCAGAATATATGACCCACGCTCCT
 1201 L G S L N S V G G V A T E I N A V N Y V
 TTAGGCTCTTTAAATCCCTGGGTGGCGTAGCGACCGAGATCAATGCAGTTAATTATGTC
 1261 S P R S W L S T S H F V L G F F F F V G
 TCTCTAGAAGTTGGTTATCAACTTCTCATTTTGTTCTAGGATCTTCTTTTTTGTGGGC
 1321 H L W H A G R A R A A A A G F E K G I D
 CATTTATGGCATGCAGGAAGAGCCCGAGCTGCTGCAGCAGTTTTGAAAAGGGAATCCAT
 1381 R D L E P V L Y M N P L N *
 CGTGATTTGGAACCTGTTCTTTACATGAACCCCTCTAACTAA

последовательности которых были взяты из аналогичного гена других растений и могли только частично совпадать с искомой структурой. Этот подход позволил нам ускорить процесс секвенирования за счет одновременного синтеза праймеров и определения структуры различных участков интактного фрагмента. На рис. 6 показана нуклеотидная последовательность искомой части гена *psbC* ячменя (см. также [16]).

Гены *psbE*, *psbF*

По предварительным данным, эту группу генов содержал фрагмент Р4 длиной 13,4 т.п.о. Этот фрагмент был подвергнут рестриктному анализу с последующим разделением полученных субфрагментов электрофорезом в агарозном геле. Зоны, содержавшие гены *psbE* и *psbF*, идентифицировали блоттингом с использованием в качестве гибридизационной пробы ³²P-меченого олигонуклеотида F1 (см. таблицу), соответствующего 5'-концевому участку гена *psbE* пшеницы, структура которого была установлена ранее [17]. Были отобраны зоны, соответствующие *VamHI*- и *Eco147I*-фрагментам длиной около 4,2 и 3 т.п.о. соответственно. Элюированный из этих зон материал был клонирован в рBSM13+. Отбор клонов проводили гибридизацией *in situ* с тем же 33-звенным олигонуклеотидом F1, а после выделения плазмидной ДНК — рестриктным анализом. Для дальнейшей работы были отобраны плазмиды рBSE1 и рBSE2, содержавшие *Eco147I*-фрагмент в обеих ориентациях, а также плаزمида рBSE3, имевшая *VamHI*-фрагмент в прямой ориентации относительно *lac*-промотора вектора рBSM13+. Для определения нуклеотидной последовательности этих генов нами был использован тот же подход, что и при секвенировании гена *psbC* (см. рис. 7, 8).

Структура генов и примыкающих к ним областей хлДНК

Нуклеотидная последовательность фрагмента хлоропластной ДНК ячменя, представленная на рис. 4, содержит гены *psbB*, *psbH*, *petB* и частично *petD*. Продукт *psbB*-гена (47-кДа-хлорофиллсвязывающий белок СРa-1) кодируется 508 триплетами. Эта последовательность высококонсервативна у ячменя, кукурузы, шпината и табака (94% идентичных аминокислотных остатков и 3% замен, идентичных по заряду) [11]. Сопоставление этого гена у ячменя и ржи [19] выявляет всего 6 нуклеотидных замен на 1524 п.о.

Район между генами *psbB* и *psbH* составляет 553 п.о. и содержит 34% G·C-пар, тогда как кодирующие районы этого фрагмента содержат 42% G·C-пар. На этом участке выявлен ряд потенциальных вторичных структур (см. рис. 4). Идентифицированы две открытые рамки считывания (ОРС): ОРС 38 и ОРС 43, гомологичные обнаруженным в хлДНК печеночного мха *Marchantia polymorpha* транскрибируемому ОРС 35 и ОРС 43 [20]. ОРС 38 расположена на расстоянии 154 п.о. от терминирующего кодона гена *psbB* на той же цепи, что и *psbB*, тогда как ОРС 43 находится на противоположной цепи между ОРС 38 и геном *psbH*.

Ген *psbH* содержит 73 кодона, и его продукт имеет молекулярную массу 7,8 кДа. Последовательность GAA, расположенная перед иницирующим кодоном на расстоянии 6 п.о., может функционировать в качестве рибосомсвязывающего участка. Район между генами *psbH* и *petB* содержит возможный интрон класса II длиной 754 п.о. При удалении этого интрона рамка считывания *petB* начинается с позиции 2621, считываются два первых триплета, а затем рамка считывания продолжается с позиции 3371. Образуется белок длиной 215 аминокислотных остатков. Аналогична организация этого района у кукурузы и табака [11]. В РНК, не

Рис. 6. Нуклеотидная последовательность гена *psbC*. Подчеркнуты предполагаемые рибосомсвязывающие сайты. Последовательность нуклеотидов с 922-й по 1422-ю п.о. взята из [16]

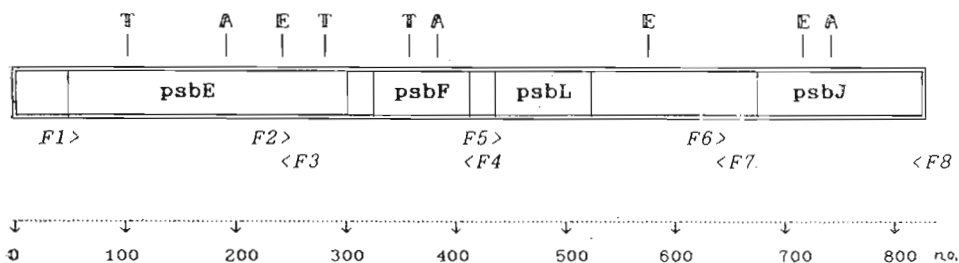


Рис. 7. Рестриктивная карта генов *psbE*, *psbF*, *psbL* (ОПС 38), *psbJ* (ОПС 40) хлДНК ячменя и стратегия определения нуклеотидной последовательности этих генов. Стрелками обозначены синтетические олигонуклеотиды *F1* — *F8*, использованные при определении первичной структуры. Условные обозначения рестриктивных сайтов: А — *AclI*, Т — *TaqI*, Е — *EcoRI*

подвергшейся сплайсингу, открытая рамка считывания начинается с AUG-кодона внутри интрона и кодирует белковый продукт длиной 232 аминокислотных остатка, который удлинен с N-конца на 17 аминокислот аналогично продукту этого гена у шпината [11]. На гидрофильную природу N-конца апопротеина цитохрома b_6 [21] такое удлинение влияет незначительно, так как большинство дополнительных аминокислотных остатков заряжено или полярно. Возможные рибосомсвязывающие последовательности, CGA и GAG, расположены перед участками инициации трансляции апопротеинов цитохрома b_6 на расстоянии 215 и 232 кодона соответственно.

petD-Ген также может кодировать два потенциальных продукта в зависимости от присутствия последовательности интрона II класса в мРНК. Удаление интрона приводит к возникновению рамки считывания, которая начинается на расстоянии 8 нуклеотидов выше интрона, а затем продолжается с позиции 4958 (см. рис. 4). Нуклеотидная последовательность 5'-конца гена *petD* цианобактерии *Nostoc* кодирует полипептид, почти полностью идентичный тому, который кодирует сплайсированная РНК высших растений [11]. Альтернативная форма субъединицы 4 (продукт гена *petD*) может транслироваться с несплайсированной РНК, с AUG, содержащегося внутри интрона [11]. В этом случае N-конец субъединицы 4 удлинен на 35 аминокислотных остатков. Однако N-конец этой субъединицы у ячменя, кукурузы и табака оказывается менее консервативным и не гомологичным N-концу этого белка у *Nostoc* [11]. Предполагаемые рибосомсвязывающие сайты, AAGG и AAA, обнаружены на расстоянии 10 и 8 п. о. от иницирующих кодонов сплайсированной и несплайсированной форм *petD*-кодирующей последовательности соответственно.

Интроны генов *petB* и *petD* могут служить моделью «неклассических» интронов II класса, охарактеризованных в хлоропластной ДНК *Euglena* [16]. Они обладают ярко выраженными особенностями, характерными для этого класса [16]:

1) последовательность GTGTGAC на 5'-конце интрона полностью соответствует предполагаемой последовательности GYGNGC, где Y — пиримидин, N — любой нуклеотид;

2) последовательности СТАТСТСААТ и СТАТССААТ на 3'-концах интронов соответственно *petB* и *petD* идеально согласуются с последовательностью УТАУУУУАУ;

3) имеется характерная потенциальная шпилька длиной 14 п. о. — GAGCNNNRTRNRRNgaaaNTNNYAygYNNNGTTY, где R — пурин, а мелким шрифтом обозначены неспаренные нуклеотиды. У интрона гена *petB* ячменя эта шпилька отличается одной заменой типа транзиции и одной типа трансверсии, у интрона гена *petD* ячменя — одной трансверсионной заменой.

Между генами *psbH* и *petB* ячменя идентифицирован промоторный элемент: TTGAGA-(17 п. о.)-ТАСТАТ, который близок по структуре

psb E →

M S C S T G

1 AATCAATTCCTTTTGAATGTACAAAAATTTGGGAGTTTCAGCATGTCTGGAAGCACGGG
 G -- C C G A GT--- C A

E R S F A D I I T S I R Y W V I H S I T

61 AGAACGTTCTTTTGCTGATATTATTACCAGTATTCGATACTGGGTTATTTCATAGCATTAC
 G C

I P S L F I A G W L F V S T G L A Y D V

121 TATACSTTCCSTATTTCATTCGGGTTGGTATTTCGTCACSTACGGGTTTAGCTTATGACCT
 C C C T

F G S P R P N E Y F T E S R Q G I P L I

181 GTTGGAACTCCTAGGCCAAACGAATATTTACGGAAAGCCGACAAGGAATTCCTTAAT
 C C T A G A

T D R F D S L E Q L D E F S R S F *

241 AACCGACCGTTTGGATTCTTTAGAACAACCTCGATGAATTTACTAGATCSTTTTAGGAGGC
 T G C G G

psb F →

M T I D R T Y P I F T V R W L A I H

301 CCTCAATGACCATAGATCGAAACSTATCSTATTTTTACACTGGCATGGCTGGCTATTTCAG
 - T A A T G

G L A V P T V F F L G S I S A M Q F I Q

361 GACTAGCTGTACCTACTGTTTTTTCTTGGGATCAATATCAGCAATGCAGTTCATCCAAC
 C C C T

psb L (OPC 38) →

R *

421 GATAAACCAAATTCCAACTATAGAACSTATGACACAATCAAACCCGAATGAACAAAAATGT
 TT CG T G C C

E L N R T S L Y W G L L L I F V L A V L

481 GAATTGAATCCTACCAGTTTATACTGGGTTTATTACTCATTTTGTACTTGTCTGTTTA
 C C G

F S N Y F F N *

541 TTTTCCAATTACTTCTTCAATTGAGAGAAAGAAAGAGACTAATAAGAATTCTCTTATCCC
 T A A C A C AT AG C T

601 ATTTGGAAAGATACCATCCTTATAACTACCCATGACTGTTTTTGTCTCTAGCATGACCAA
 C CT AA - T T A C

psb J (OPC 40) →

M A D T T G R I P L

661 TTGATAAAATGTGGAGGAAAGTAGGGAAATGGCCGATACTAGGAGAATTCCTCTTT
 G C G G T G

W L I G T V A G I P V I G L V G V F F Y

721 GGCTGATACGTAAGTCTAGCTGGTATTCCTGTGATTGGTTTACTAGGTCTTTCTTTATG
 A A T A C A A

G S Y S G L G S S L *

781 GTTCATATTCTGGATTGGGTTTCATCTCTATAG
 C C C

Рис. 8. Нуклеотидная последовательность генов *psbE*, *psbF*, *psbL* (OPC 38), *psbJ* (OPC 40) хлДНК ячменя. Над нуклеотидной последовательностью кодирующей цепи показаны соответствующие ей последовательности аминокислотных остатков, снизу — нуклеотидные замены в соответствующем фрагменте хлДНК табака [18]. Подчеркнуты предполагаемые рибосомсвязывающие сайты. Звездочкой отмечены терминирующие кодоны

к функционально определенному промотору оперона *atpBE* кукурузы [22] и отличается единственной нуклеотидной заменой и удлинением на 1 п. о. расстоянием. Второй промоторподобный элемент TTCSTA- (18 п. о.)-GATAAT обнаружен внутри гена *psbH*. Ни между генами *petB* и *petD*, ни внутри них функциональных промоторподобных элементов не выявлено. Эти данные хорошо согласуются с результатами анализа нуклеотидной последовательности этого района у кукурузы [11].

Ген *psbC*

Этот ген кодирует продукт длиной 473 аминокислотных остатка (см. рис. 6) и, возможно, котранскрибируется с геном *psbD* (геном полипептида D2 фотосистемы II), с которым имеет 50 общих п. о. Ранее нами были идентифицированы два возможных набора промоторных последовательностей для гена *psbD*, которые могли бы являться промоторами и для *psbC* [9]. Две другие промоторподобные (—35 и —40) последовательности находятся перед геном *psbC*, внутри гена *psbD*. Нами идентифицирован потенциальный участок связывания рибосом, предшествующий ATG-кодону гена *psbC* (см. рис. 6). За этим кодоном расположена вторая последовательность, комплементарная 3'-концу 16S рРНК, а через 9 нуклеотидов после нее, в той же рамке считывания, что и ATG, находится GTG-кодон, который может служить инициатором трансляции, по крайней мере у *E. coli* [23]. Тот факт, что СРа-2-белок (продукт *psbC*), выделяемый из тилакоидов, начинается с Thr-15 [24], не противоречит предположению, что иницирующим кодоном является не ATG, а GTG, и в этом случае в результате посттрансляционной модификации будет удаляться дипептид Met-Glu.

Структура оперона *psbEF*

Анализ нуклеотидной последовательности, представленной на рис. 8, выявляет 4 открытые рамки считывания, организованные в структуру

ОРС33-(10 п. о.)-ОРС39-(22 п. о.)-ОРС38-(125 п. о.)-ОРС40.

Все ОРС транскрибируются в виде единой матричной РНК размером 1100 оснований [25]. Эти открытые рамки считывания соответствуют генам *psbE*, *psbF*, *psbL*, *psbJ*. В литературе существуют разночтения в обозначении ОРС38 [26, 27]. Сравнение соответствующих нуклеотидных последовательностей ячменя и табака [18] показало, что эти гены имеют следующий процент гомологии: *psbE* — 92,4%, *psbF* — 91,6%, *psbL* — 94%, *psbJ* — 91%. На расстоянии 6—12 нуклеотидов перед иницирующими кодонами генов *psbE*, *psbF*, *psbJ* расположены последовательности, комплементарные 3'-концевому участку 16S рРНК и, вероятно, являющиеся участками связывания рибосом, причем у *psbF* эта последовательность перекрывается со стоп-кодоном гена *psbE*. Такая организация этого района хлДНК у ячменя полностью соответствует его организации во всех изученных видах растений.

Структура полипептидов

Для полипептидных цепей СРа-1 и СРа-2 (продукты генов *psbB* и *psbC*) характерно высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков (41 и 44% соответственно). Эти два белка имеют общую схему строения, а именно наличие 6 участков выраженной гидрофобности, существующих, вероятно, в виде трансмембранных α -спиралей длиной 22—25 аминокислотных остатков [28]. Как в СРа-1, так и в СРа-2 имеется характерный гидрофильный сегмент между предполагаемыми трансмембранными тяжами V и VI. Его длина составляет 37% от общей длины белковой цепи в СРа-1 и 28% — в СРа-2. В ряде работ было показано, что эта гидрофильная перетяжка экспонирована в люмен и участвует во взаимодействии ядра фотосистемы II с 33 кДа полипептидом кислород-выделяющего комплекса [29, 30].

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей продуктов генов фотосистемы II показывает, что все 17 остатков Trp и 14 His СРа-1 абсолютно консервативны. Также консервативны все 17 Trp и 13 His процессированной цепи СРа-2. Значительной консервативностью обладают остатки Tyr, Pro, Gln. И в СРа-1, и в СРа-2 пары остатков His, находящиеся в трансмембранных сегментах, трижды образуют характерную структуру: His-(13 а. о.)-His. Полагают, что остатки His обуслови-

вают координационную связь с центральным атомом Mg порфиринового цикла хлорофилла. Также вероятными участниками этого процесса могут быть остатки Trp и Gln (показано участие остатков Gln в образовании связей с молекулами хлорофилла в светособирающем комплексе *Chloroflexus aurantiacus* [31]). Консервативность остатков Pro определяет жесткий характер укладки перетяжек, выступающих в люмен и строму, что обеспечивает взаимодействие с другими компонентами фотосистемы II.

Аминокислотная последовательность продукта гена *psbH* менее консервативна, наибольшей вариабельностью обладает 36-членный N-концевой участок, содержащий большое количество заряженных групп. Фосфорилируемый остаток Thr-3 абсолютно консервативен [32]. Этот белок содержит, вероятно, один трансмембранный сегмент (с 37-го по 58-й аминокислотный остаток). N-Конец этого белка экспонирован на стромальной поверхности тилакоидной мембраны [32].

Полипептидные продукты ~ 9 и ~ 4 кДа, кодируемые генами *psbE* и *psbF*, связывают гем цитохрома b_{559} . Продукт гена *psbE* содержит единственный гидрофобный тяж длиной 26 аминокислотных остатков (с 19-го по 44-й остаток). Этот трансмембранный тяж, существующий, вероятно, в виде α -спирали, ограничен положительно заряженным Arg-18 и отрицательно заряженным Asp-45. Продукт гена *psbF* также содержит единственный гидрофобный домен длиной 25 аминокислотных остатков, ограниченный положительно заряженными Arg-15 и Arg-41. Оба апопротеина содержат крайне консервативные остатки His (His-22 и His-17), расположенные вблизи стромальной поверхности тилакоидной мембраны и координирующие гемовое железо цитохрома b_{559} [26]. C-концевой сегмент большей субъединицы, экспонированный в строму, частично экранирован гидрофильными белками кислородвыделяющего комплекса.

Продукты генов *psbL* и *psbJ* содержат по одному гидрофобному сегменту и, вероятно, являются интегральными мембранными белками, один раз пересекающими мембрану тилакоидов. Точная локализация и функция продуктов этих генов неясны.

Авторы глубоко признательны сотрудникам группы белковой инженерии Н. Н. Полушину и И. Н. Пашковой за синтез и очистку олигонуклеотидных праймеров и зондов.

Экспериментальная часть

В работе использованы экзонуклеазы рестрикции фирм P-L Biochemicals (США), Boehringer (ФРГ) и НПО «Ферментас» (Вильнюс); Т4-ДНК-лигаза, Т4-полинуклеотидкиназа, ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) и экзонуклеаза III фирмы P-L Biochemicals (США); дезокси- и дидезоксинуклеотидтрифосфаты, нуклеаза S1 фирмы Boehringer (ФРГ), а также нейлоновые мембраны «Gene Screen Plus» (NEN, США). Рестрикционный анализ проводили согласно [33], используя электрофорез в 0,8% агарозе. Блот-перенос на мембрану «Gene Screen Plus» и гибридизацию осуществляли как описано в работе [34]. Плазмидную ДНК выделяли по методике [33]. «Делеционные мутанты» получали по методике, указанной в работе [13], с некоторыми модификациями. Для расщепления брали 12 мкг плазмиды, смесь рестриктов осаждали этанолом. Осадок растворяли в ТЕ-буфере (66 мМ трис-НСl, рН 8,0; 0,66 мМ MgCl₂) до концентрации примерно 100 мкг/мл, добавляли 12 мкл *Eco*III (40 ед. акт./мкл). Содержимое пробирки быстро перемешивали и инкубировали при 37° С. Аликвоты по 5 мкл отбирали через каждые 35 с и перемешивали с 50 мкл буфера, содержащего 0,25 М NaCl и 30 мМ ацетат калия (рН 4,6), 1 мМ ZnSO₄, 5% глицерин и S1-нуклеазу (67 ед. акт./мкл). Далее выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 7 мкл 0,5 М трис-НСl (рН 8,0), 0,125 М EDTA (рН 8,0). Затем образцы быстро обрабатывали 30 мкл смеси фенол — хлороформ (1 : 1), 30 мкл хлороформа, осаждали этанолом и растворяли в 20 мкл 20 мМ трис-НСl (рН 8,0) и 7 мМ MgCl₂. Половину реакционной смеси отбирали и анализировали на агарозном геле, ко второй половине

добавляли ДНК-полимеразу I (фрагмент Кленова) до концентрации 0,025 ед. акт./мкл и выдерживали 5 мин при 37° С. Затем добавляли смесь всех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов до концентрации 0,0125 мМ и выдерживали 5 мин при 37° С. Лигирование вели при комнатной температуре в течение 12 ч в буфере, содержащем 66 мМ трис-НСl (рН 8,0), 6,6 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, 100 мкг/мл BSA, 0,2 мМ АТР и 25 ед. акт./мл T4-ДНК-лигазы. Аликвотами лигазных смесей трансформировали клетки *E. coli* (штамм MV 1193) [33]. Одноцепочечную матрицу получали по методике, описанной нами ранее [8]. Определение нуклеотидной последовательности проводили по методу Сенгера [12] с модификациями [15]. Синтетические олигонуклеотиды — праймеры и зонды были получены на автоматическом синтезаторе «Gene Assembler» фирмы Pharmacia (США) с использованием скоростного фосфоритриэфирного метода на основе О-нуклеофильного катализа [35].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ikeuchi M., Inoue Y. // FEBS Lett. 1988. V. 241. № 1/2. P. 99—104.
2. Webber A. N., Packman L., Chapman D. J., Barber J., Gray J. C. // FEBS Lett. 1989. V. 242. № 2. P. 259—262.
3. Zuber H. // Photochem. Photobiol. 1985. V. 42. № 6. P. 821—824.
4. Yamaguchi N., Takahashi Y., Satoh K. // Plant Cell. Physiol. 1988. V. 29. № 1. P. 121—123.
5. Camm E. L., Green B. R. // BBA Report. 1983. V. 724. № 2. P. 291—293.
6. Nanba O., Satoh K. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 1. P. 109—112.
7. Day A., Ellis T. H. N. // Curr. Genet. 1985. V. 9. № 8. P. 671—678.
8. Ефимов В. А., Андреева А. В., Дмитрикова Е. В., Паикова И. Н., Ревердатто С. В., Юнг Р., Чахмахчева О. Г. // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 8. С. 1117—1121.
9. Ефимов В. А., Андреева А. В., Ревердатто С. В., Чахмахчева О. Г. // Биоорганич. химия. 1988. № 11. С. 1573—1576.
10. Morris J., Herrmann R. G. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 6. P. 2837—2880.
11. Rock C. D., Barkan A., Taylor W. C. // Curr. Genet. 1987. V. 12. № 5. P. 69—77.
12. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
13. Henikoff S. // Gene. 1984. V. 28. № 2—3. P. 351—359.
14. Oliver R. P., Poulsen C. // Carlsberg Res. Commun. 1984. V. 49. № 4. P. 647—673.
15. Strauss E. S., Kobori J. A., Siu G., Hood L. E. // Anal. Biochem. 1986. V. 154. № 1. P. 353—360.
16. Keller M., Michel F. // FEBS Lett. 1985. V. 179. № 1. P. 69—73.
17. Hird S. M., Willey D. L., Dyer T. A., Gray J. C. // Mol. Gen. Genet. 1986. V. 203. № 2. P. 95—100.
18. Shinozaki K., Ohme M., Tanaka M., Wakasugi T., Hayashida N., Matsubayashi T., Zaita N., Chunwongse J., Ohkita J., Yamaguchi-Shinozaki K., Ohto C., Torasawa K., Meng B. Y., Sugita M., Deno H., Kamogashira T., Yamada K., Kusuda J., Takaiwa F., Kato A., Tohdoh N., Shimada H., Sigiura M. // EMBO J. 1986. V. 5. № 9. P. 2043—2049.
19. Бухаров А. А., Колосов В. Л., Золотарев А. С. // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 927—939.
20. Kohchi T., Yoshida T., Komano T., Ohyama K. // EMBO J. 1988. V. 7. № 4. P. 885—891.
21. Heinemeyer W., Alt J., Herrmann R. // Curr. Genet. 1986. V. 8. № 7. P. 543—549.
22. Hanley-Bowdoin L., Orozco E., Chua N.-H. // Molecular Biology of Photosynthetic Apparatus. Cold Spring Harbor, New York. P. 311—318.
23. Steinmuller K., Ley A., Steinmetz A., Sayre R., Bogorad L. // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 216. № 1. P. 60—69.
24. Michel H., Hunt D., Shabanowitz J., Bennet J. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 3. P. 1123—1130.
25. Westhoff P., Alt J., Widger W., Cramer W., Herrmann R. // Plant Mol. Biol. 1985. V. 4. № 2—3. P. 103—110.
26. Cushman J., Christopher D., Little M., Hallic R., Price C. // Curr. Genet. 1988. V. 13. № 2. P. 173—180.
27. Ikeuchi M., Takio K., Inoue Y. // FEBS Lett. 1989. V. 242. № 2. P. 263—269.
28. Chisholm D., Williams J. // Plant Mol. Biol. 1988. V. 10. № 4. P. 293—301.
29. Bricker T. M., Frankel L. K. // Arch. Biochem. and Biophys. 1987. V. 256. № 1. P. 295—301.
30. Isogai Y., Yamamoto Y., Nishimura M. // FEBS Lett. 1985. V. 187. № 2. P. 240—244.
31. Wechler T., Suter F., Fuller C., Zuber H. // FEBS Lett. 1984. V. 181. № 1. P. 173—178.
32. Koike H., Mamada K., Ikeuchi M., Inoue Y. // FEBS Lett. 1989. V. 244. № 2. P. 391—396.

33. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
34. Chomczynski P., Kasba P. K. // NEN product News. 1984. V. 4. № 2. P. 2.
35. Efimov V. A., Buryakova A. A., Dubey I. Y., Polushin N. N., Chakhmakheva O. G., Ovchinnikov Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 16. P. 6525—6540.

Поступила в редакцию
31.X.1990

После доработки
30.V.1991

V. A. EFIMOV, A. V. ANDREEVA, S. V. REVERDATTO, O. G. CHAKHMAKHEVA
**NUCLEOTIDE SEQUENCES OF THE BARLEY CHLOROPLAST *psbB*, *psbC*,
psbE, *psbF*, *psbH* GENES CODING FOR THE
POLYPEPTIDES OF PHOTOSYSTEM II**

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

In order to determine structures of the barley photosystem II subunits, the following genes have been cloned: *psbB*, encoding 47 kDa chlorophyll-binding subunit; *psbH*, encoding 7.7 kDa phosphoprotein; *psbE* and *psbF*, encoding 9.3 and 4.4 kDa subunits of the cytochrome *b₅₅₉* apoprotein, respectively; and a fragment of *psbC* gene, encoding the 43 kDa chlorophyll-binding subunit. The nucleotide sequences of these genes and the deduced amino acid sequences of their products are highly homologous to the corresponding sequences for other plant species.