



УДК 547.963.32.02

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА УЧАСТКА ГЕНА 18S-РНК
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE**Рубцов И. М., Краев А. С., Мусаханов М. М.,
Скрябин К. Г., Баев А. А.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Для понимания молекулярных механизмов биосинтеза белка необходимо детальное знание структуры компонентов рибосом. В настоящее время определены последовательности аминокислот в рибосомных белках *Escherichia coli* [1], а также последовательности нуклеотидов 5S- и 5,8S-РНК ряда организмов [2]. Определение первичной структуры высокомолекулярных РНК, в том числе и рибосомных, является трудной задачей, поэтому пока изучена только одна из таких рРНК — 16S-РНК *E. coli* [3]. Методы генетической инженерии позволили выделить структурные гены рибосомных РНК из различных организмов [4—7]. Анализ рекомбинантных ДНК с помощью метода Максама — Гилберта [8] дает возможность определять первичную структуру генов, а используя принцип комплементарности — и последовательность нуклеотидов самих рибосомных РНК [5—11].

В настоящее время мы применяем такой подход для выяснения первичной структуры 18S-РНК *Saccharomyces cerevisiae*. В данном сообщении представлена последовательность нуклеотидов участка структурного гена 18S-РНК. На рисунке изображена карта расщепления рибосомного оперона *S. cerevisiae* рестрикционной эндонуклеазой *EcoRI*, на которой отмечена локализация генов 18S-, 5,8S- и 25S-РНК [5, 10, 11]. Нами определена последовательность нуклеотидов из прилегающих друг к другу фрагментов R_1C и R_1D .

Материалом для получения рестриктных фрагментов ДНК служила рекомбинантная плазида *E. coli* pY1gA-3, содержащая часть рибосомного оперона *S. cerevisiae* [5]. ДНК плазмиды выделяли по методу Танаки и Вайсблума [12] и гидролизовали эндонуклеазой *EcoRI*. Необходимые для дальнейшего структурного исследования фрагменты R_1C и R_1D в препаративных количествах выделяли из смеси продуктов гидролиза центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы, как описано ранее [11].

Фрагмент R_1C обрабатывали 30 мин при 65° бактериальной щелочной фосфатазой в 10 мМ трис-НСl-буфере, рН 8,0, содержащем 10 мМ $MgCl_2$. Затем проводили фосфорилирование 5'-концов, используя T4-полинуклеотидкиназу и $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$. Меченый фрагмент гидролизовали эндонуклеазой *HindIII*, продукты расщепления разделяли электрофорезом в пластинах 8% полиакриламидного геля. Для определения первичной структуры

использовали фрагмент $H_{III}C_2$ длиной около 1700 пар оснований после его элюции из геля и осаждения этанолом.

Фрагмент R_1D обрабатывали эндонуклеазой *HaeIII*. Полученные 4 фрагмента фосфорилировали по 5'-концам и выделяли, как описано выше. Затем проводили разделение цепей фрагментов по методу Шалаи и др. [13]. В данной работе представлена первичная структура всего фрагмента $Hae_{III}D_1$ и прилегающей к нему части фрагмента $Hae_{III}D_4$ (см. рисунок). Для определения ориентации цепей фрагмента $Hae_{III}D_4$ необходимо было получить фрагмент, перекрывающий области $Hae_{III}D_1$ и $Hae_{III}D_4$, и разделить его структуру в районе разделяющего эти области сайта расщепления эндонуклеазы *HaeIII*. Такой фрагмент был получен в результате расщепления меченого фрагмента R_1D эндонуклеазой *Taq I*.

Определение первичной структуры фрагментов ДНК осуществляли методом Максама — Гилберта [8] с некоторыми модификациями, описанными ранее [11]. Продукты специфического расщепления разделяли электрофорезом в пластинах 10 и 25% полиакриламидного геля с 7 М мочевиной.

В результате проведенной работы нами определена последовательность нуклеотидов ДНК длиной 338 пар оснований из прилегающих друг к другу фрагментов R_1C и R_1D , представленная на рисунке. Данная последовательность нуклеотидов ДНК определяет следующую первичную структуру участка 18S-РНК:

```
5'...p GUUGGCAUACGUCGUGGCCUUGCGUUCUGGGCGCACC GCGCGC-  
-ACACGCGAGCCGCGAGUCUAACCUUGGCCG.G.GGUCUUGGUAA-  
-UCUUGUGAACACCCGUCGUGCUGGGGAUAGAGCAUUGUAAUUA-  
-UUCGUCUUCAACGAGGAUUCCUAGUAAGCGCAAGUCAUCAG-  
-CUUGCGUUGAUUACGUGCCUGCCCUUUGUACACACCGCCCCGUC-  
-GCUAGUACCCAUUGAAUGGCUUAGUGAGGCCUCAGGAUCUGC-  
-UUAGAGAAGGGGGCAACUCCAUCUCAGAGCGGAGAAUUUGGA-  
-CAAACUUGGUCAUUUAGAGGAACUAAAAGUCGUACAAGG...3'
```

По предварительным данным, расстояние от установленной последовательности до 3'-конца 18S-РНК не превышает 30 нуклеотидов. Данная последовательность содержит взаимокomплементарные участки, которые могут, вероятно, взаимодействовать между собой, образуя шпильки.

Авторы выражают благодарность В. М. Захарьеву за ценные методические советы и П. М. Чумакову за любезное предоставление препарата эндонуклеазы *HaeIII*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wittman-Liebold B., Dzionara M. (1976) FEBS Lett., 61, 14—19.
2. Erdmann V. A. (1978) Nucleic Acids Res., 5, r1 — r13.
3. Ehresmann C., Stiegler P., Fellner P., Ebel J. P. (1975) Biochimie, 57, 711—748.
4. Cramer J. H., Farrelly F. W., Barnitz J. T., Rownd R. H. (1977) Molec. Gen. Genet., 151, 229—244.
5. Petes T. D., Hereford L. M., Skryabin K. G. (1978) J. Bacteriol., 134, 295—305.
6. Fedoroff N. V., Brown D. D. (1978) Cell, 13, 701—716.
7. Miller J. R., Cartwright E. M., Brownlee G. G., Fedoroff N. V., Brown D. D. (1978) Cell, 13, 717—725.
8. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
9. Maxam A. M., Tizard R., Skryabin K. G., Gilbert W. (1977) Nature, 267, 643—645.
10. Skryabin K. G., Maxam A. M., Petes T. D., Hereford L. (1978) J. Bacteriol., 134, 306—309.
11. Скрябин К. Г., Захарьев В. М., Баев А. А. (1978) Докл. АН СССР, 241, 488—490.

12. Tanaka T., Weisblum B. (1975) *J. Bacteriol.*, **121**, 354—362.
13. Szalay A. A., Grohman K., Sinsheimer R. L. (1977) *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1569—1578.

Поступило в редакцию
17.IV.1978

После доработки
21.VII.1978

**THE SEQUENCE OF THE 18S-RNA STRUCTURAL GENE FRAGMENT
OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

RUBTSOV P. M., KRAYEV A. S., MUSAKHANOV M. M.,
SKRYABIN K. G., BAYEV A. A.

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

A sequence of the 338 base-pair fragment of the 18S-RNA structural gene from *Saccharomyces cerevisiae* is determined. The sequence presented encodes the region adjacent to the 3'-end of the 18S-RNA.
