



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.07

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ МОДЕЛЬНОГО
ПРОМОТОРА ТРАНСКРИПЦИИ И УЧАСТКА УЗНАВАНИЯ
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Escherichia coli*Добрынин В. Н., Коробко В. Г., Северцова И. В.,
Колосов М. И.Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

В 1978 г. Шерер и др. [1] высказали предположение, что должна существовать такая нуклеотидная последовательность, которая является «идеальным» промотором для РНК-полимеразы *E. coli*, и что все реальные промоторы представляют собой различные степени приближения к этому прототипу. На основании компьютерной обработки данных о структуре известных в то время участков инициации транскрипции в *E. coli* и колифагах они постулировали для этого промотора нуклеотидную последовательность, приведенную на рисунке А. Немного позднее аналогичную среднестатистическую модель промотора *E. coli* (рисунок Б) предложил Зибенлист [2]. При сравнении обеих моделей видно, что они имеют идентичную нуклеотидную последовательность -37-25 (участок узнавания РНК-полимеразы [3, 4]) и лишь незначительно различаются в области -15-6 (участок связывания РНК-полимеразы [3, 4]).

С целью экспериментальной проверки этой гипотезы мы предприняли химико-ферментативный синтез изображенных на рисунке двухцепочечных фрагментов ДНК (В) и (Г), первый из которых содержит предполагаемый участок специфического узнавания промотора РНК-полимеразой (но лишен участка связывания фермента), а второй охватывает всю инициаторную область от положения -50 до -2, т. е. представляет собой полный промотор транскрипции *E. coli*. Для этого нами были получены девять олигонуклеотидов (I) - (VIII) и (VI') длиной от гекса- до тетрадекамера; их синтез был выполнен фосфоритриэфирным способом, как в работе [5], а структура и гомогенность доказаны методом нуклеотидных карт. Синтезированные олигонуклеотиды были сшиты в двухцепочечные ДНК с помощью ДНК-лигазы фага Т4 в описанных ранее [5] условиях. При лигировании шестикомпонентного комплекса (I) · (³³pII) · (³³pIII) · (³³pIV) · (³³pV) · (VI) образовался с выходом 60% 35-членный двухцепочечный нуклеотид (В), который был выделен хроматографией на колонке с сефадексом G-50 и очищен электрофорезом в 15% полиакриламидном геле. Синтез 49-звенного нуклеотида (Г) проводили в три этапа: сначала попарно соединяли четыре олигонуклеотида левой части (I+³³pIII) · (³³pIV+³³pII) и правой части (³³pV+³³pVII) · (VIII+³³pVI), а затем продукты лигирования сшивали между собой. Оба синтезированных дуплекса, (В) и (Г), были

6. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорганич. химия, 3, 1420—1422.
7. Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. И. (1978) Биоорганич. химия, 4, 1281—1283.
8. Pribnow D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 784—788.

Поступило в редакцию
4.II.1980

THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF A MODEL PROMOTER AND A RECOGNITION SITE FOR RNA POLYMERASE OF *ESCHERICHIA COLI*

DOBRYNIN V. N., KOROBKO V. G., SEVERTSOVA I. V., KOLOSOV M. N.

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

Two DNA fragments *B* and *I'* have been synthesized to verify the Schierer et al. 's hypothesis [1] that the nucleotide sequence *A* is an ideal promoter for *E. coli* RNA polymerase. To this end, nine oligodeoxynucleotides (I—VIII, VI') were chemically prepared by the phosphotriester method and enzymatically joined into double-stranded DNAs by T4 DNA ligase. The one-step ligation of (I) and (VI) with 5'-phosphorylated derivatives (pII—pV) of the oligonucleotides (II—V) yielded the 35/35-membered DNA duplex *B*; the analogous joining of (I) and (VIII) with (pII — pIV) and (pV, pVI', pVII), respectively, followed by ligation of the reaction products resulted in the 49/41-membered duplex *I'*. The structures of the synthetic oligonucleotides (I—VIII, VI') were proved by fingerprinting, those of the DNA duplexes *B* and *I'* were determined by the modified Maxam-Gilbert techniques. As compared with the hypothetical sequence *A*, the DNA fragment *B* contains a putative recognition site for RNA polymerase while lacking its binding site, whereas the *I'* fragment comprises all but one (the -1st) nucleotides of the transcription initiation region *A*, thus being a model promoter for RNA polymerase of *E. coli*.