



УДК 577.113.5

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА  $\kappa$ ДНК \* МАКРОПЕПТИДА  $\kappa$ -КАЗЕИНА  
*Bos taurus*

Гордецкий С. И., Кершулите Д. Р.

Институт общей генетики Академии наук СССР, Москва

Коробко В. Г.

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

Каппа-казеин, важнейший функциональный компонент белков молока, стабилизирует природные мицеллы казеинов, предотвращает осаждение  $\alpha_{S1}$ -казеина ионами кальция, является единственной фракцией казеинов, содержащей углеводный компонент. При воздействии протеолитического фермента ренина (химозина КФ 3.4.4.3) в казеине расщепляется связь между остатками фенилаланина в 105-м положении и метионином в 106-м положении с образованием растворимого С-концевого 64-членного  $\kappa$ -гликопептида и нерастворимого параказеина [1].

В настоящей работе представлены данные об идентификации клона, содержащего последовательность гена гликопептида  $\kappa$ -казеина коровы.

Идентификацию клона, содержащего нуклеотидную последовательность  $\kappa$ ДНК  $\kappa$ -казеина, проводили с помощью анализа «библиотеки» клонов, содержащих  $\kappa$ ДНК тотальной мРНК молочной железы *Bos taurus*. Синтезированную двухцепочечную ДНК вводили в *Pst*I-сайт плазмиды pBR322, используя гомополимерные концы poly(dC)—poly(dG), и клонировали в *E. coli* HB 101. После гибридизации «библиотеки» клонов с  $^{32}$ P-меченой  $\kappa$ ДНК тотальной мРНК ДНК отобранных клонов анализировали по размер вставки и специфичность. Идентификацию клона, содержащего нуклеотидную последовательность  $\kappa$ ДНК  $\kappa$ -казеина, проводили с помощью «блот»-гибридизации, анализа продукта трансляции гибрид-селектированной мРНК в бесклеточной системе синтеза белка и определения первичной структуры встроенной  $\kappa$ ДНК. «Блот»-гибридизацию проводили с тотальной мРНК, перенесенной на нитроцеллюлозные фильтры после электрофоретического разделения в денатурирующем агарозном геле. В результате идентифицирован клон, содержащий рекомбинантную ДНК рKcas $\kappa$ B-2, с размером вставки 900 н.п., гибридизующийся с материалом, соответствующим 12S мРНК, что совпадает с размером мРНК  $\kappa$ -казеина (890 нуклеотидов). При определении первичной структуры ДНК плазмиды рKcas $\kappa$ B-2 обрабатывали рестриктазой *Hind*III, выступающие концы достраивали в присутствии  $^{32}$ P-dATP, 3'-немеченых dNTP и ДНК полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова). После дополнительного гидролиза рестриктазой *Pst*I меченые фрагменты величиной 250–280 н.п. элюировали из геля и подвергали анализу по методу Максама — Гилберта [2]. Полученные результаты определения структуры представлены на рисунке.

\*  $\kappa$ ДНК — комплементарная ДНК.

... GCC CAA ATT CTT CAA TGG CAA GTT TTG TCA AAT ACT GTG CCT GCC AAG TCC TGC CAA GCC CAG-  
 Ala Gln Ile Leu Gln Trp Gln Val Pro Ser Asn Thr Val Pro Ala Lys Ser Cys Gln Ala Gln  
  
 CCA ACC ACC ATG GCA CGT CAC CCA CAC CCA CAT TTA TCA TTT ATG GCC ATT CCA CCA AAG AAA  
 Pro Thr Thr Met Ala Arg His Pro His Pro His Leu Ser Phe Met Ala Ile Pro Pro Lys Lys  
  
 AAT CAG GAT AAA ACA GAA ATC CCT ACC ATC AAT ACC ATT GCT AGT GGT GAG CCT ACA AGT ACA  
 Asn Gln Asp Lys Thr Gly Ile Pro Thr Ile Asn Thr Ile Ala Ser Gly Glu Pro Thr Ser Thr  
  
 CCT ACC ATC GAA GCA GTA GAG AGC ACT GTA GCT ACT CT. GAA GCT TC. CCA GAA GTT ACT GAG  
 Pro Thr Ile Glu Ala Val Glu Ser Thr Val Ala Thr Leu Glu Ala Ser Pro Glu Val Thr Glu  
  
 AGC CCA CCT GAG ATC AAC ACA CTC CAA GTT ACT TCA ACC GCG GTC TAA A T A C T C T A A G  
 Ser Pro Pro Glu Ile Asn Thr Val Gln Val Thr Ser Thr Ala Val Term  
  
 C A G A C A T C A A A G A A G A C A A C G C A C A T T T A G C T G G G A C T G A A T  
  
 G A C T A C T T C G A A C T T T C S T T T G G C C G G T G G T T G C S T T C T . . .

Нуклеотидная и аминокислотная последовательности макропептида  $\kappa$ -казеина *Bos taurus*. Стрелкой указано место действия рениппа; сплошной линией подчеркнуты замесы нуклеотидов, обуславливающие возникновение варианта В  $\kappa$ -казеина, штриховой — дополнительная замена в кодирующей части макропептида. Точкой обозначены неидентифицированные нуклеотиды

Ранее проведено определение аминокислотной последовательности макропептида  $\kappa$ -казеинов коровы [1], овцы [3], человека [4]. В настоящей работе установлена полная нуклеотидная последовательность, кодирующая синтез макропептида со 106-й по 169-ю аминокислоту  $\kappa$ -казеина коровы.

В молекуле макропептида имеются три известных активных участка. Первый определяет место действия рениппа между 105-м и 106-м аминокислотным остатком  $\kappa$ -казеина, второй связан со 149-й аминокислотой — фосфорилированным серином, третий — со 131-й аминокислотой — треонином, по которой происходит присоединение углеводного компонента в виде три- и тетрасахарида, обуславливающего микрогетерогенности  $\kappa$ -казеина [4]. Наличие генетических вариантов  $\kappa$ -казеина связано с заменой в аминокислотной последовательности макропептида. Описаны два генетических варианта  $\kappa$ -казеинов [5]. В варианте А  $\kappa$ -казеина 136-е положение занимает треонин, а 148-е — аспарагин. В клонированной ДНК кодон 136-й аминокислоты соответствует изолейцину (ATC), а 148-й кодон — аланину (GCT). Наличие этих замен указывает на то, что выделенный клон соответствует генетическому варианту В  $\kappa$ -казеина [5]. Помимо замен, характерных для варианта В, определена ранее не описанная замена в кодоне 153-й аминокислоты, связанная с перестановкой второго и третьего нуклеотидов — Т и С. Такая перестановка привела к появлению треонинового остатка вместо изолейцина.

Таким образом, определение нуклеотидной последовательности позволило наряду с идентификацией клона установить новый, ранее не описанный генетический вариант  $\kappa$ -казеина, который можно обозначить как  $\kappa$ -казеин В<sub>2</sub>.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mercier J.-C., Uro S., Ribadeau-Dumas B., Grosclaude F. Eur. J. Biochem., 1972, v. 27, № 3, p. 535—547.
2. Maxam A. M., Gilbert W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 2, p. 560—564.
3. Jolles J., Fiat A.-M., Shoentgen F., Alais C., Jolles P. Biochem. et biophys. acta, 1974, v. 365, № 2, p. 335—343.

4. Fiat A.-M., Jolles J., Aubert J.-P., Loucheux-Lefebvre M.-H., Jolles P. Eur. J. Biochem., 1980, v. 111, № 2, p. 333-339.
5. Thompson M. P., Farrelle H. M. In: Lactation/Eds Larson B. L., Smith V. R. New York - London: Acad. Press, 1974, p. 109-134.

Поступило в редакцию  
24.VI.1983

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF cDNA OF  $\gamma$ -CASEIN MACROPEPTIDE OF  
**BOS TAURUS**

GORODETSKII S. I., KERSHULYTE D. R., KOROBKO V. G.

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

By means of nucleotide sequencing in a library of clones, containing cDNA of *Bos taurus* mammary gland, a clone corresponding to  $\alpha$ -casein has been identified. In addition, the region encoding for the complete nucleotide sequence of cDNA of  $\alpha$ -casein B macropeptide has been detected. The nucleotide changes in the DNA sequence have been identified which mean that the isolated clone corresponds to the genetic variant B of  $\alpha$ -casein.