

формы показано для аргинил-тРНК-синтетазы из печени крыс [8] и аспарагил-тРНК-синтетазы из щитовидной железы свиньи [9]. Отсутствие ассоциированной формы лейPC печени может быть связано с меньшей стабильностью APCазного комплекса либо с невозможностью тестировать его в данных экспериментальных условиях. Дальнейшие исследования направлены на выяснение этих вопросов.

#### PURIFICATION AND PROPERTIES OF LEUCYL-tRNA-SYNTHEASE FROM THE MAMMALIAN TISSUES

*L. L. Ivanov, R. R. Stapulionis, L. J. Lukoševičius*

Medical Institute, Kaunas

#### Summary

The method of purification of leucyl-tRNA-synthetase (LeuRS) from rabbit liver and pig myocardium is described. Two forms ( $E_1$  and  $E_2$ ) of LeuRS are distinguished by hydroxylapatite chromatography of partially purified enzyme from pig myocardium. The molecular mass was calculated to be 185000 for LeuRS from rabbit liver and 158000 for  $E_1$  from pig myocardium.  $E_2$  is stated to contain aminoacyl-tRNA synthetase activities of other amino acid specificities and is a complex of enzymes with molecular mass of about 800000.

1. *Joachimiak A., Barciszewski J.* Amino acid: tRNA ligases (EC 6.1.1.).—FEBS Lett., 1980, **119**, N 2, p. 201—211.
2. *Выделение и характеристика лейцил-тРНК-синтетазы из молочной железы коров / О. И. Гудзера, А. В. Ельская, Г. В. Овчаренко и др.*—Молекуляр. биология, 1979, **13**, № 3, с. 550—557.
3. *Hedrick J. L., Smith A. J.* Estimation of molecular weight by polyacrylamide gel electrophoresis.—Arch. Biochem. and Biophys., 1968, **126**, N 1, p. 155—164.
4. *Purification of leucyl transfer ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli / Н. Hayashi, J. R. Knowles, J. R. Katze et al.*—J. Biol. Chem., 1970, **245**, N 6, p. 1401—1406.
5. *Корниш-Бодуэн Э.* Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1979.—280 с.
6. *Legocki A. B., Pawelkiewicz J.* Amino acid activating enzymes in yellow lupin seeds, and purification on leucyl-tRNA synthetase.—Acta biochim. pol., 1967, **14**, N 3, p. 3131—3138.
7. *Dang C. V., Johnson D. L., Vang D. C. H.* High molecular mass amino acyl-tRNA synthetase complexes in eukaryotes.—FEBS Lett., 1982, **142**, N 1, p. 1—6.
8. *Deutcher M. P., Ni R. C.* Purification of a low molecular weight form of rat liver arginyl-tRNA synthetase.—J. Biol. Chem., 1982, **257**, N 11, p. 6003—6006.
9. *Vellekamp G. J., Kull F. J.* Allotropism of aspartyl-tRNA-synthetase from porcine thyroid.—Eur. J. Biochem., 1981, **118**, N 2, p. 261—269.

Каунас. мед. ин-т

Получено 26.10.84

УДК 575.113.576.851.5:576.851.48

#### ИЗУЧЕНИЕ ОРГАНИЗАЦИИ ЛИЗИНОВОГО ОПЕРОНА У *BACILLUS SUBTILIS*

**З. М. Алексиева, Т. Н. Шевченко, С. С. Малюта**

Биосинтез лизина у микроорганизмов осуществляется в девять стадий [1]. Наиболее полно организация оперона биосинтеза лизина и регуляция его экспрессии изучена у *E. coli*. Лизиновые гены у этого вида микроорганизмов расположены в нескольких областях хромосомы [2], не образуя единой группы сцепления. Чрезвычайно мало данных о структуре лизинового оперона *Bacillus subtilis* — вида микроорганизмов, широко используемого в микробиологической промышленности для получения биологически активных метаболитов. Ранее нами были клонированы *Sall*-, *BglII*-фрагменты ДНК *B. subtilis*, содержащие ряд генов биосинтеза лизина [3, 4]. Однако рекомбинантные плазмиды *pLRS33* и *pLRB4*, содержащие эти гены, несли также регуляторную область опе-

рона биосинтеза рибофлавина *B. subtilis*. Поэтому нами была предпринята попытка, используя рестриктазу *Bam*HI, сконструировать плазмиду с лизиновыми генами *B. subtilis*, но не содержащую части рибофлавинового оперона.

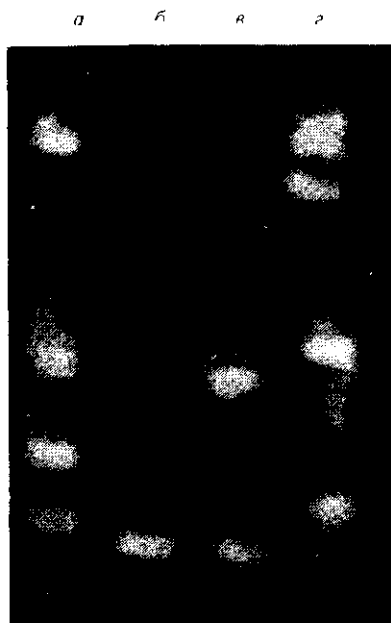
Для создания такой рекомбинантной плазмиды использовали стандартные методики рестрикции и лигирования [5]. ДНК штамма *B. subtilis* *ribO 335* обрабатывали эндонуклеазой *Bam*HI и лигировали с рестрицированной этим же ферментом плазмидой *pBR322*. Затем трансформировали штамм *E. coli* *5491 (lysA)*, аукоотрофный по лизину и несущий мутацию в гене, кодирующем последний фермент биосинтеза лизина — диаминопимелат декарбоксилазу (ДАП).

Селекцию трансформантов, содержащих гибридную плазмиду, проводили на чашках, не содержащих лизина, в присутствии ампициллина (25 мкг/мл).

Нами было получено и проанализировано несколько гибридных клонов. Электрофоретический анализ трансформантов показал, что они содержат плазмидную ДНК. На рисунке приведена электрограмма выделенной рекомбинантной плазмид-

Электрофорграмма плазмиды *pLB1*: ДНК фага  $\lambda$ , рестрицированная *Eco*RI (величина фрагментов сверху вниз: 13,7; 4,7; 3,7; 3;  $2,1 \cdot 10^6$ ) (а); векторная плаزمида *pBR322*, рестрицированная *Bam*HI (б); *pLB1*, рестрицированная *Bam*HI (в); гибридная плазмиды *pLB1* без рестрикции (г).

Fig. 1. Electrophoregram of the *pLB1* plasmid: *Eco*RI-restricted  $\lambda$  phage DNA (the size of fragments from top to bottom: 13.7, 4.7, 3.7, 3 and  $2.1 \cdot 10^6$ ) (a); the *Bam*HI-restricted vector *pBR322* plasmid (b); *Bam*III-restricted *pLB1* (v); unrestricted hybrid *pLB1* plasmid (z).



ной ДНК. Рестриктаза *Bam*HI расщепляет плазмиду, обозначенную нами *pLB1*, на два фрагмента:  $2,6 \cdot 10^6$ , соответствующий исходной плазмиде *pBR322* и  $4,5 \cdot 10^6$  — фрагмент ДНК *B. subtilis*. Плазмиды *pLB1* оказалась способной трансформировать к лизиннезависимости штаммы *B. subtilis*: *lys42*, *lys21*, *lys3* и *lys10* — мутантные по синтезу лизина. Среди *lys*<sup>+</sup>-трансформантов нами не были обнаружены колонии, обладающие флюоресценцией в УФ-свете, т. е. плазмиды не содержала операторную область рибофлавинового оперона *B. subtilis*. Для уточнения числа лизиновых генов, клонированных на гибридной плазмиде, мы трансформировали штаммы *E. coli*, мутантные по разным лизиновым генам. Плазмиды *pLB1* способна комплементировать мутации *dapA*, *dapB*, *dapC*, *dapD*, *dapE*, *lysA*, *lysC* у *E. coli*. Таким образом, рекомбинантная плазмиды *pLB1* содержит семь генов биосинтеза лизина *B. subtilis*, что свидетельствует о сцепленном расположении этих генов на хромосоме. Выявляется четкое различие в организации лизиновых оперонов у *E. coli* и *B. subtilis*.

Введение плазмиды *pLB1* в штамм *E. coli* *5183* сопровождается повышением уровня синтеза лизина и ДАП приблизительно в два раза по сравнению с бесплазмидным штаммом.

Таким образом, сконструированная нами плазмиды *pLB1* по ряду характеристик является более удобной для изучения оперона биосинтеза лизина у *B. subtilis*. Прежде всего, при меньшей величине вставки она несет большее число лизиновых генов, чем плазмиды *pLRS33* [3, 4], а также не содержит области регулятора оперона биосинтеза рибофлавина.

## A STUDY OF LYSINE OPERON ORGANIZATION IN *BACILLUS SUBTILIS*

Z. M. Aleksieva, T. N. Shevchenko, S. S. Malyuta

Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of  
Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

### Summary

The *pBR322* plasmid was used for constructing *pLBI* plasmid carrying genes of *Bacillus subtilis* lysine biosynthesis. *B. subtilis* and *E. coli* strains (lysine-auxotrophs) are transformed. The plasmid is shown to complement both mutations in seven genes of lysine biosynthesis in *E. coli* cells and four mutations in *B. subtilis*. The size of DNA insertion, according to the electrophoresis data, is  $4,5 \cdot 10^6$ .

1. Umbarger H. E. Amino acid biosynthesis and its regulation.—Annu. Rev. Biochem., 1978, 47, p. 533-606.
2. Bachmann B. J., Low K. B. Linkage map of *Escherichia coli* K-12.—Microbiol. Revs., 1980, 44, N 1, p. 1-56.
3. Окунев О. В., Шевченко Т. Н., Малюта С. С. Клонирование фрагмента ДНК *Bacillus subtilis*, содержащего гены биосинтеза лизина и рибофлавина.—Генетика, 1984, 20, № 7, с. 1061—1066.
4. Экспрессия генов биосинтеза лизина *Bacillus subtilis* в клетках *Escherichia coli* / Т. Н. Шевченко, О. В. Окунев, З. М. Алексиева, С. С. Малюта.—Цитология и генетика, 1984, 18, № 1, с. 58—74.
5. Improvement of *Escherichia coli* strains overproducing lysine using recombinant DNA techniques / B. D. Beverend, A. M. Boitel, A. M. Deschamps et al.—Eur. J. Appl. Microbiol., 1982, 15, N 2, p. 227-231.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики  
АН УССР, Киев

Получено 19.10.84

УДК 577.112.5:578.841

## АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТОВ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ ГРАНУЛИНА ВИРУСА ГРАНУЛЕЗА ОЗИМОЙ СОВКИ, *AGROTIS SEGETUM*

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. В. Родниц,  
В. М. Харченко, С. Б. Серебряный

В предыдущем сообщении [1] обсуждались результаты сравнительного исследования физико-химических свойств полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) и гранулина вируса гранулеза (ВГ) *A. segetum*. Первичная структура полиэдрина нескольких ВЯП выяснена нами ранее [2—4]. Полиэдрины представляют собой группу высокомолекулярных по первичной структуре белков, степень гомологии которых лежит в пределах 82—94 % [5]. Настоящее сообщение является первой публикацией по исследованию первичной структуры гранулина бакуловирусов.

Восстановленный и карбоксиметилированный гранулин расщепляли трипсином и химотрипсином. Методами гель-фильтрования, ионообменной хроматографии на AG-50X $\times$ 8, высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге, описанными нами ранее [3, 4], было получено 22 триптических и 34 химотриптических пептида. N-концевую последовательность пептидов определяли методом Эдмана, как описано нами ранее [3, 4].

При сопоставлении триптических и химотриптических пептидов удается выписать 26 фрагментов с уникальной аминокислотной последовательностью, насчитывающих в сумме 212 остатков аминокислот, что составляет 91 % полипептидной цепи белка с молекулярной массой 27500 [1].

1. Ser-Gly-Lys-Glu-Phe-Leu-Arg-Glu-Thr-Trp-Thr-Arg-Phe-Ile-Glx-Asx-Glx-Phe-Val-  
(Asx<sub>2</sub>, Ser, Thr, Glx, Pro, Met, Leu<sub>2</sub>, Tyr)
2. Ser-Glx-Ile-(Glx<sub>2</sub>, Ala, Ile)-Met-(Asx, Glx, Ala, Val<sub>4</sub>, Met, Ile<sub>3</sub>, Phe)