



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 576.316.3

© 1993 Л. Л. Вагнер, Д. А. Бессараб, Е. П. Копанцев,
А. М. Бородин *

ALN1 И ALN5 — НОВЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ Alu-PCR-АНАЛИЗА ДНК ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;

* Медицинская школа Вашингтонского университета, Сент-Луис, США

Развитие новых стратегий картирования и секвенирования генома человека привело к разработке высокоэффективного метода Alu-PCR *, позволяющего осуществлять специфическую амплификацию человеческой ДНК с использованием олигонуклеотидных праймеров, комплементарных определенным областям Alu-повтора человека [1, 2]. К настоящему времени описано около 20 праймеров, соответствующих разным областям консенсусной последовательности Alu-повтора [2]. Как правило, использование различных Alu-праймеров приводит к существенно различающимся результатам амплификации человеческой ДНК, что связано со значительной дивергенцией нуклеотидного состава Alu-повторов относительно консенсусной структуры [3]. Кроме того, от места расположения конкретного Alu-праймера на консенсусной последовательности Alu-повтора и условий PCR в значительной степени зависит человек-специфичность проводимой амплификации. В связи с этим поиск и анализ новых олигонуклеотидных праймеров для Alu-PCR весьма актуальны [4].

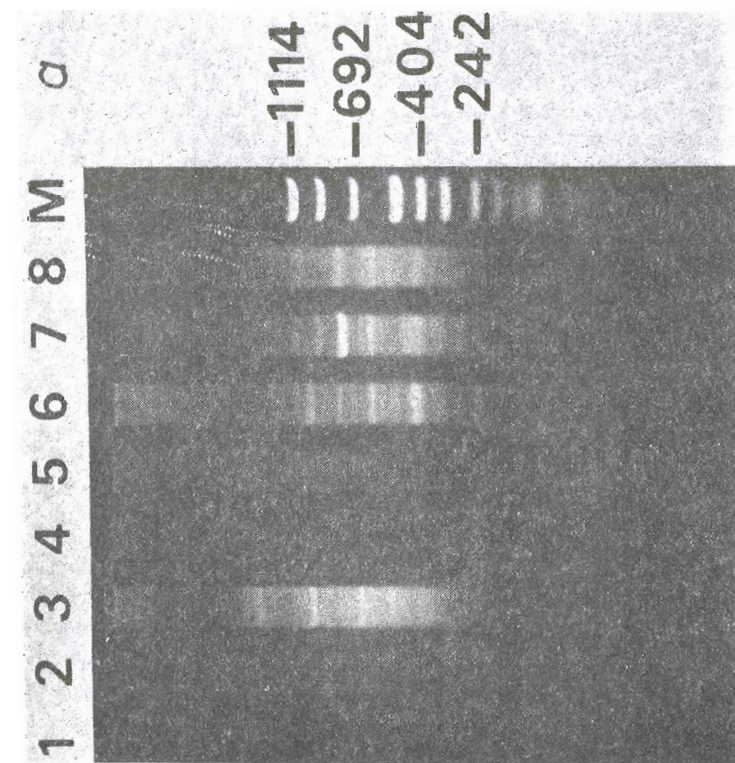
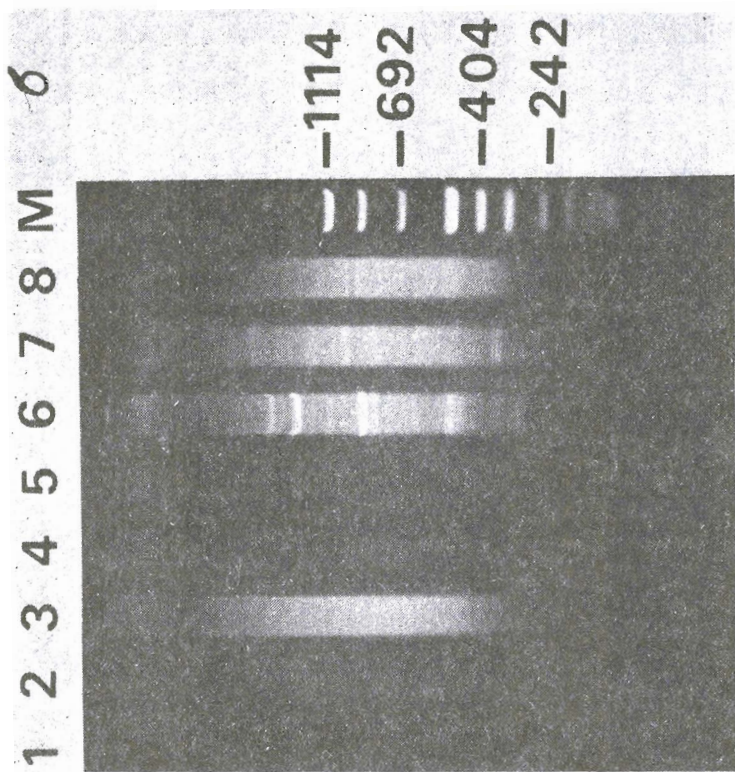
В нашей работе была изучена возможность использования олигонуклеотидных праймеров, комплементарных позициям 206—228 (ALN1) и 222—242 (ALN5) консенсусной последовательности Alu-повтора человека [5], для специфической амплификации ДНК гибридов соматических клеток человек—китайский хомячок. Выбранные праймеры ALN1 и ALN5 частично перекрываются друг с другом и с наиболее широко используемым в Alu-PCR человек-специфическим праймером TC-65:

	200		220		240
Alu cons. (5')	CGCTTGA	ACCCGGG	GAGGTTG	CAGTGAG	CCCGAGATCGCGCCAC
TC-65			(5')	GGTTCAGT	GAGCCGAGAT
ALN1	(5')	cttgaattCC	AGGAGG	AGGTTG	CAGTGA **
ALN5			(5')	GCAGTGAG	CCCGAGATGCCACC

Замены (подчеркнуты) в нуклеотидных последовательностях праймеров ALN1 и ALN5 соответствуют более редким, описанным вариантам Alu-повтора [3, 5], что позволяет надеяться на амплификацию человеческой ДНК, ограниченную Alu-повторами со структурой, отличной от консенсусной последовательности. 5'-Область ALN1-праймера была дополнена EcoRI-сайтом, облегчающим последующее клонирование амплифицируемых фрагментов ДНК.

* PCR — полимеразная цепная реакция.

** Строчным шрифтом выделены нуклеотиды, которые были добавлены к 5'-концу для введения EcoRI-сайта.



Ада-PCR высокомолекулярной ДНК с использованием праймера ALN1 (а) и ALN5 (б). 1 — контроль без ДНК; 2 — амплификация ДНК человека с помощью праймера TC-65; 3 — ДНК человека; 4 — ДНК мыши; 5 — ДНК китайского хомячка; 6 — ДНК клона 8M18, сохранившего 16-, 18- и X-хромосомы человека; 7 — ДНК клона 7SMO2-1, сохранившего 11- и X-хромосомы человека; 8 — ДНК клона 7SMO2-1, сохранившего человеческий хромосомный дериват de(11)(p11) (ret → p24) и X-хромосому человека; M — маркеры молекулярной массы VIII (Boehringer-Mannheim, ФРГ), размеры фрагментов указаны в парах оснований (п. о.)

Аmplification осуществляли на термоблоке GeneAmp PCR System 9600 (Perkin — Elmer, США), используя следующий режим PCR:

1 цикл: 95° С (1 мин); 68° С (1 с); 75° С (2 мин),

29 циклов: 95° С (1 с); 68° С (1 с); 75° С (2 мин).

Реакцию проводили в объеме 20 мкл, используя рабочий буфер 67 мМ трис-НСl (рН 8,8); 16,7 мМ (NH₄)₂SO₄; 1 мМ дитиотреит; 3 мМ MgCl₂; dNTP (500 мкМ каждый); 100 нг высокомолекулярной ДНК; 0,5 мкМ праймер и 2 ед. акт. *AmpliTag*-ДНК-полимеразы (Perkin — Elmer, США). По окончании реакции 10 мкл амплификационной смеси анализировали в 4% NuSieve-агарозном геле (FMC Corp., США).

Результаты Alu-PCR с использованием праймеров ALN1 и ALN5 демонстрируются на рисунке. В приведенных случаях PCR осуществляли на препаратах высокомолекулярной ДНК, выделенной из клеток соматических гибридов человек—китайский хомячок, сохранивших небольшое количество хромосом человека: 7SM02 — 1; 8SM07 и 8M18 [6]. В качестве контроля специфичности амплификации использовали препараты ДНК человеческих фибробластов линии Detroit 551, ДНК мышины линии RAG и ДНК родительской линии китайского хомячка Ag 17. Как видно из рисунка, в использованных условиях PCR праймер ALN1 обеспечивал высокоспецифическую амплификацию человеческой ДНК при стандартной концентрации праймера — 0,5 мкМ. Праймер ALN5 в аналогичных условиях PCR на ДНК грызунов давал амплификационный продукт с молекулярной массой около 1200 п. о., который, однако, в Alu-амплификатах гибридных клеток, по-видимому, составляет лишь незначительную часть от общего выхода PCR-фрагментов. В дополнительных экспериментах нами было показано, что увеличение концентрации тестируемых Alu-праймеров вплоть до 10 мкМ не приводило к существенной амплификации ДНК грызуна. Как и следовало ожидать, электрофоретические спектры ДНК фрагментов ALN1- и ALN5-амплификатов заметно различаются, что позволяет в перспективе использовать эти олигонуклеотиды для избирательного PCR-анализа разных участков генома человека.

Из рисунка видно, что при выбранных режимах PCR использование праймера TC-65 не приводило к существенной амплификации ДНК, хотя при температуре отжига ниже 68° С наблюдалась специфическая амплификация в образцах, содержащих ДНК человека. Этот результат свидетельствует, что праймеры ALN1 и ALN5 являются более специфическими по сравнению с TC-65. Очевидно также, что использованные нами короткое время и высокая температура отжига для праймеров ALN1 и ALN5 предоставляют возможность получить препарат амплифицированной человеческой ДНК лишь с незначительными примесями ДНК грызуна.

Необходимо также отметить, что количество и характер распределения Alu-PCR-фрагментов, полученных из ДНК гибридных клеток с помощью праймеров ALN1 и ALN5, позволяют использовать описанные олигонуклеотиды для «PCR-каротипирования» гибридных клеток человек — грызун [7]. Обнаруживаемые в Alu-амплификатах ДНК различных гибридных клеток PCR-фрагменты одинаковой длины соответствуют, по-видимому, человеческим хромосомам, которые являются общими для этих клеточных линий. Для исследованных клонов это X-хромосома человека. Различающиеся по длине Alu-PCR-фрагменты соответствуют уникальным хромосомам человека, характерным для каждой гибридной линии. Эти результаты делают перспективным использование праймеров ALN1 и ALN5 также для предварительной селекции малохромосомных гибридных клонов человек—грызун и в сегрегационном анализе отбираемых клонов [8].

Таким образом, предлагаемые олигонуклеотидные праймеры ALN1 и ALN5 позволяют осуществлять избирательную амплификацию человеческой ДНК из сложных источников, какими являются препараты ДНК гибридных клеток человек—грызун. Возможным использованием этих праймеров может быть также Alu-PCR-анализ и скрининг хромосомспецифических библиотек человека [9]. В настоящее время нами изучается возможность использования праймеров ALN1 и ALN5 для

синтеза специфических кДНК на непроцессированной гетероядерной РНК из гибридных клеток человек—грызун, содержащих индивидуальные хромосомы человека [10].

Авторы признательны И. П. Чернову и А. В. Данилковичу (ИБХ РАН) за синтез олигонуклеотидов и чл.-кор. РАН Е. Д. Свердлову за помощь и обсуждение в ходе работы. Работа финансировалась в рамках государственной программы «Геном человека».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson D. L., Ledbetter S. A., Corbo L., Victoria M. F., Ramirez-Solis R., Webster T. D., Ledbetter D., Caskey C. T.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 17. P. 6686—6690.
2. Nelson D. L.//Methods: a Companion to Methods in Enzymology. 1991. V. 2. № 2. P. 60—74.
3. Jurka J., Milosavljevic A.//J. Mol. Evol. 1991. V. 32. № 2. P. 105—121.
4. Tagle D. A., Collins F. S.//Hum. Mol. Genet. 1992. V. 1. № 2. P. 121—122.
5. Kariya Y., Kato K., Hayashizaki Y., Himeno S., Tarui S., Matsubara K.//Gene. 1987. V. 53. № 1. P. 1—10.
6. Копанцев Е. П., Нестерова Т. Б., Бородин А. М., Закиян С. М.// Генетика. 1993. Т. 29. № 7. С. 41—51.
7. Ledbetter S. A., Garcia-Heras J., Ledbetter D. H.//Genomics. 1990. V. 8. № 4. P. 614—622.
8. Нестерова Т. Б., Копанцев Е. П., Бородин А. М., Закиян С. М.//Молекулярн. биология. 1993. Т. 27. № 3. С. 1—25.
9. Green E. D., Olson M. V.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 3. P. 1213—1217.
10. Corbo L., Maley J. A., Nelson D. L., Caskey C. T.//Science. 1990. V. 249. № 4969. P. 652—655.

Поступило в редакцию
23.XII.1992

После доработки
13.V.1993

*L. L. Wagner, D. A. Bessarab, E. P. Kopantzev,
A. M. Borodin **

ALN1 AND ALN5 — NEW OLIGONUCLEOTIDE PRIMERS FOR Alu PCR ANALYSIS OF HUMAN DNA

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow;*

** Washington University School of Medicine, St. Louis, USA*

New oligonucleotide primers for the Alu PCR assay of human genome have been developed and experimentally verified in the Alu PCR of DNA isolated from human—Chinese hamster somatic cell hybrids.