



УДК 577.212.3:577.217.343'112

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА КОДИРУЮЩЕЙ ЧАСТИ ГЕНА ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ХРОМОСОМАХ

© 1995 г. А. В. Кочетов[#], В. В. Лукашева, М. Л. Филипенко^{*},
Н. П. Мертвецов^{*}, М. И. Ривкин

Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 10;

^{*} Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 27.10.94 г. После доработки 14.03.95 г.

На основании известной первичной структуры гена панкреатической рибонуклеазы мыши выбраны два дезоксирибоолигонуклеотида в качестве праймеров для амплификации гена панкреатической рибонуклеазы человека. Проведено клонирование полученного в результате полимеразной цепной реакции фрагмента ДНК и определена его нуклеотидная последовательность. Осуществлена локализация гена панкреатической рибонуклеазы на хромосоме 14 человека.

Ключевые слова: панкреатическая рибонуклеаза; полимеразная цепная реакция; гены, картирование.

Панкреатические рибонуклеазы представляют собой группу гомологичных белков, которые в значительных количествах производятся и секретируются экзокринными клетками поджелудочной железы млекопитающих. Рибонуклеазы благодаря небольшой величине, доступности и высокой стабильности представляют собой весьма удобные модели для исследования структуры белка и являются объектом интенсивного изучения. В настоящее время определены аминокислотные последовательности и охарактеризованы свойства около 50 представителей семейства панкреатических рибонуклеаз [1]. Исследованы структуры генов панкреатических рибонуклеаз мыши и быка. Показано, что кодирующие области этих генов не содержат интронов и определяют синтез белков-предшественников размером 150 а. о. [2, 3]. Аминокислотная последовательность рибонуклеазы человека была опубликована в 1984 г. [4], однако структура гена до сих пор не изучена. В данной работе определена структура кодирующей области гена панкреатической рибонуклеазы человека и проведено картирование гена панкреатической рибонуклеазы на хромосомах человека.

На основании данных об отсутствии интронов в белоккодирующих районах генов рибонуклеаз мыши и быка [2, 3] было сделано предположение, что кодирующая область гена панкреатической рибонуклеазы человека также не содержит ин-

тронов. Это позволило применить для клонирования кодирующей последовательности гена метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы геномную ДНК человека.

В результате анализа известной нуклеотидной последовательности гена панкреатической рибонуклеазы мыши [3] мы выбрали и синтезировали два дезоксирибоолигонуклеотида – P1 (отвечающий участкам кодирующей части гена от +865-го до +894-го нуклеотида) и P2 (гомологичный участку кодирующей части гена от +1301-го до +1318-го нуклеотида), которые использовали в качестве праймеров для амплификации:

P1 5' ACCATGGGTCTGGAGAAGTC
и P2 5' CCTACACAGTACCATCAA.

Среди продуктов амплификации на плацентарной геномной ДНК человека был обнаружен фрагмент длиной около 460 п. о., соответствующий величине, предсказанной для искомого гена на основании анализа известных первичных структур генов панкреатических рибонуклеаз мыши и быка [2, 3]. Фрагмент выделяли из геля и лигировали с линейаризованной эндонуклеазой EcoRV плазмидой pBluescript SK. Анализ плазмидной ДНК из клонов, дефектных по lacZ-системе, проводили с помощью рестриктазы PvuII (результаты не показаны). Нуклеотидная последовательность вставок из трех независимых клонов была определена модифицированным методом Сэнгера [5] (рис. 1). Все три структуры оказались полностью идентичными.

[#] Автор для переписки. Факс: (3832) 356558; E-mail: Rivkin@cgi.nsk.su.

ПЦР происходит специфическая амплификация фрагмента гена панкреатической рибонуклеазы человека.

Хромосомный состав гибридных клеток, а также результаты амплификации приведены в таблице. Наличие амплифицируемого фрагмента при анализе продуктов ПЦР строго коррелировало с присутствием в гибридных клетках хромосомы 14 человека. Следует отметить, что ген рибонуклеазы мыши локализован на 14-й хромосоме в сегменте, гомологичном сегменту 14q11 14-й хромосомы человека [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали бактериальный штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, [F, *proAB*, *lacI^q* *lacZ* M15, Tn10(*tet^r*)], а также *Taq*-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4, эндонуклеазы рестрикции *EcoRV* и *PvuII*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, 5-бром-3-индолил-D-галактозид (Biorol, Москва), [α -³²P]АТФ с уд. акт. 40 Пбк/моль ("Радио-препарат", Ташкент). Олигодезоксирибонуклеотидные праймеры были синтезированы В.В. Горном (НИБХ СО РАН).

Картирующая панель была получена из Coriell Cell Repositories, USA (клоны серии NAO), ДНК из клонов 5L27, 8SM22-2, 6LO4, Ag17 была предоставлена Е.В. Копанцевым (ИБХ РАН, Москва).

Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе "БИС" (пос. Кольцово Новосибирской обл.). Реакционная смесь (30 мкл) содержала 67 мМ трис-НСl (рН 8.9), 16 мМ (NH₂)₂SO₄, 1.5 мМ MgCl₂, 0.01% Tween 20, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 100 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы, 100 нг геномной ДНК.

Амплификацию проводили в течение 35 циклов в следующем режиме: денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг праймеров – 55°C, 1 мин (для праймеров P1 и P2) и 62°C, 1 мин (для праймеров P3 и P4); полимеризация – 72°C, 1 мин. Полученные амплификационные смеси анализировали электрофорезом в 6% полиакриламидном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [7].

Клонирование и секвенирование полученных фрагментов ДНК. Фрагмент ДНК размером около 460 п.о., предсказанным на основании анализа структуры генов панкреатических рибонуклеаз мыши и быка [2, 3], элюировали из геля и клонировали по тупым концам в плазмидный вектор pBluescript SK (Stratagene, USA), гидролизованый рестриктазой *EcoRV*. Отбор рекомбинантных клонов проводили фенотипически (колонии, дефективные по *lacZ*-системе) и по анализу ДНК плазмид из этих колоний рестриктазой *PvuII*.

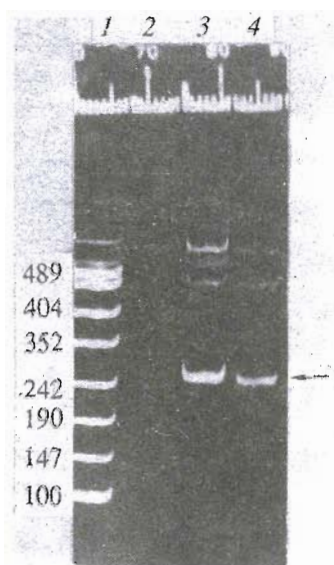


Рис. 2. Электрофорез в 6% ПААГ образцов, полученных в результате амплификации внутреннего фрагмента гена рибонуклеазы человека на геномной ДНК мыши (2), человека (3), на ДНК гибридного клона мышь × человек, несущего 14-ю хромосому человека (4). 1 – маркеры длины (гидролизат плазмиды PUC19 рестриктазой *MspI*; цифры слева – величины фрагментов, п. о.). Стрелкой отмечен фрагмент размером 250 п. о.

Элюцию фрагментов ДНК из геля, выделение плазмидной ДНК, расщепление рестриктазами, сшивку ДНК-лигазой фага T4, трансформацию клеток *E. coli* XL1-Blue и фенотипический отбор

Хромосомный состав гибридных клеток картирующей панели и результаты амплификации фрагмента гена рибонуклеазы на препаратах ДНК из этой панели

Клон	Хромосомный состав	R ⁺ *
NA09927	1 - 4, 6 - 8, 10, 13 - 15, 17 - 20	+
NA09928	2, 3, 5, 6, 8, 14, 15, 17, 19, 21, 22, Y	+
NA09929	3, 4, 6, 8, 11, 12, 14, 17, 20	+
NA09931	5, 7, 10, 12, 14, 17, 20, 21, Y	+
NA09932	4 - 6, 8, 11, 12, 17, 21	-
NA09933	1, 3 - 8, 12 - 15, 17 - 22, Y	+
NA09934	2, 5, 6, 8, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 21	-
NA09936	4, 6 - 8, 10, 11, 14, 17, 19, 20, 22	+
NA09937	2, 4, 6 - 8, 12, 14, 15, 17, 18	+
NA09938	4 - 7, 11, 12, 14, 17, 20, 21, 22	+
NA09940	3, 7, 8, 15, 17	-
5L27	4, 11, 16, 20, 22, X	-
8SM22-2	1, 4, 5, 9, 12, 18, 20, X	-
6LO4	10, 13, 19, X	-
NAIMR91	Человеческая линия IMR 91	+
NA00347a	Мышиная линия В-82	-
Ag17-1	Хомячья линия Ag17-1	-

* "+" – наличие фрагмента ожидаемого размера в амплификационной смеси.

гибридных клонов (lac-дефектных) осуществляли стандартными методами, описанными в работе [7]. Нуклеотидные последовательности вставок определяли модифицированным методом Сэнгера [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beintema J.J., Fitch W.M., Carsana A.* // *Mol. Biol. Evol.* 1986. V. 3. P. 262 - 275.
2. *Carcana A., Confalone E., Libonati M., Furia A.* // *Nucl. Acids Res.* 1988. V. 16. P. 5491 - 5502.
3. *Samuelson L.C., Wiebauer K., Howard G., Schmid R.M., Kooplin D., Meisler M.H.* // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 6935 - 6941.
4. *Beintema J.J., Weickman J.K., Glitz D.G.* // *Anal. Biochem.* 1984. V. 136. P. 8 - 64.
5. *Heon M.L., Pene J.J.* // *Gene Anal. Techn.* 1988. V. 5. P. 32 - 39.
6. *Elliot R.W., Samuelson L.C., Lambert M.S., Meisler M.H.* // *Cytogen. Cell Genetics.* 1986. V. 42. P. 110 - 112.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Primary Structure and Chromosomal Localization of the Coding Region of Human Pancreatic Ribonuclease Gene

A. V. Kochetov*,¹ V. V. Lukasheva*, M. L. Filipenko**,
N. P. Mertvetsov**, and M. I. Rivkin*

* *Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Division, pr. akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia*

** *Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Division, pr. akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – On the basis of the known primary structure of the gene for murine pancreatic ribonuclease, two deoxyoligonucleotides were selected as primers for amplification of human pancreatic ribonuclease gene. The PCR amplified DNA fragment was subsequently cloned, and its nucleotide sequence was determined. Pancreatic ribonuclease gene was localized on human chromosome 14.

Key words: pancreatic ribonuclease; polymerase chain reaction; genes, mapping.

¹ To whom correspondence should be addressed.