



УДК 577.212.3

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОМНОГО ЛОКУСА, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕНЫ
ФАКТОРОВ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ МЫШИ, МЕТОДОМ
ГИБРИДАЦИОННОЙ КОНЦЕВОЙ МЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Недоспасов С. А., Турецкая Р. Л., Метт В. А.,
Шахов А. Н.

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Академии
наук СССР, Москва

Конструирование физических карт протяженных участков геномных локусов — существенный этап изучения структурно-функциональной организации генов [1]. Универсальная стратегия конструирования карт была предложена Смитом и Бирнстилом [2], при этом использовался полный гидролиз анализируемой ДНК одной рестриктазой и частичный гидролиз второй. Техническая сложность метода, в особенности при применении к длинным фрагментам ДНК, кроется в необходимости избирательного мечения одного конца ДНК.

Общим подходом для реализации стратегии Смита — Бирнстила является метод гибридизационной концевой метки, первоначально разработанный для анализа нуклеазных расщеплений в хроматине [3, 4], который позволяет избирательно пометить все фрагменты, располагающиеся по одну сторону от выбранного сайта.

В настоящей работе мы применили указанный подход для составления физической карты локуса, окружающего гены факторов некроза опухолей (ФНО) на 17-й хромосоме мыши, клонированного и частично изученного в предыдущих работах [5, 6]. В качестве гибридизационных проб использовались меченые синтетические олигонуклеотиды, гомологичные к ДНК ФНО- α мыши [7], а также секвенированным участкам гена ФНО- β [5]. Кроме того, для картирования фрагментов ДНК в составе рекомбинантных бактериофагов λ были использованы синтетические олигонуклеотиды, комплементарные ДНК вектора и непосредственно примыкающие с одной из сторон к вставке чужеродной ДНК.

Гены ФНО- α и ФНО- β были клонированы в составе четырех различных рекомбинантных бактериофагов λ EMBL3 [8], при этом три из них содержали оба гена ФНО, а клон 12 содержал только ген ФНО- α [6]. Частичная рестриктная карта 7-тысячного нуклеотидного фрагмента ДНК, содержащего tandem генов ФНО мыши, была построена обычным методом ранее [5]. Исходя из данных по расщеплению вставок всех четырех клонов рестриктазами *Hind*III, *Kpn*I и *Sal*I, их было решено использовать на первом этапе в качестве реперных для геномного локуса ФНО мыши.

На рис. 1 показаны результаты картирования сайтов *Eco*RI относительно концевого сайта *Sal*I в ДНК клона 4. В соответствии со структурой ДНК фага λ EMBL3 (см. нижнюю часть рис. 2) до гидролиза *Eco*RI гибридизация с олигонуклеотидом GGCTGCAGGAACCCCTGCC из 4-го экзона гена ФНО- β , выявляет исходный фрагмент *Sal*I—*Sal*I, который соответствует полной длине вставки клона 4 в 14 тыс. нуклеотидов. В промежуточных точках гидролиза выявляются дополнительные полосы, соответствующие фрагментам длиной 6,2; 5,8; 5,1 и 2,3 тыс. нуклеотидов. Так как последний из этих фрагментов присутствует и при полном гидролизе *Eco*RI + *Sal*I, он, очевидно, соответствует ближайшему сайту *Eco*RI, вслед за которым можно восстановить и всю карту расщеплений

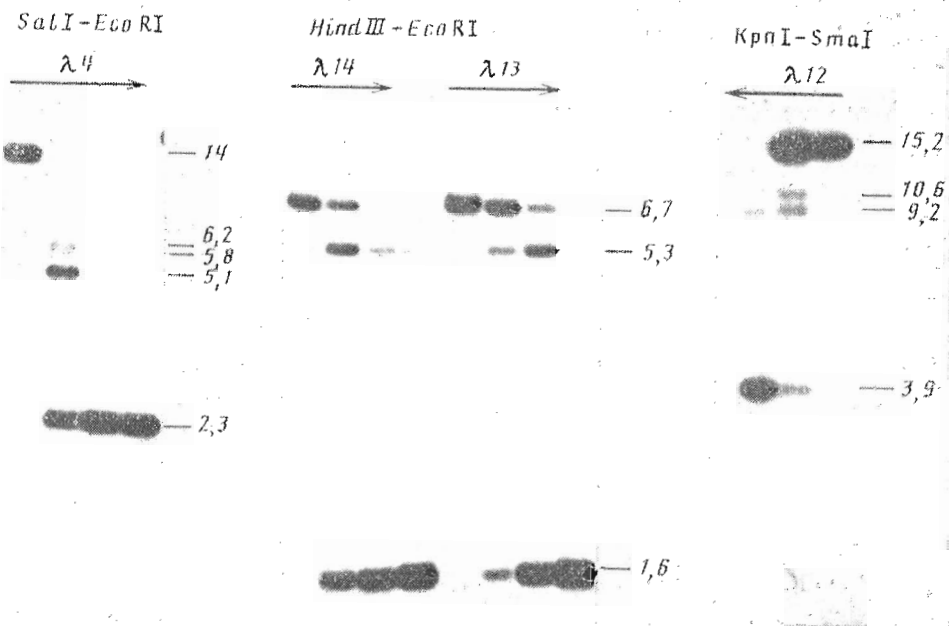


Рис. 1. Примеры картирования локуса ФНО мыши с помощью блот-гибридизаций с синтетическими олигонуклеотидами. Стрелки соответствуют увеличению степени гидролиза второй из указанных рестриктаз. Цифры указывают длины фрагментов ДНК в тысячах нуклеотидов

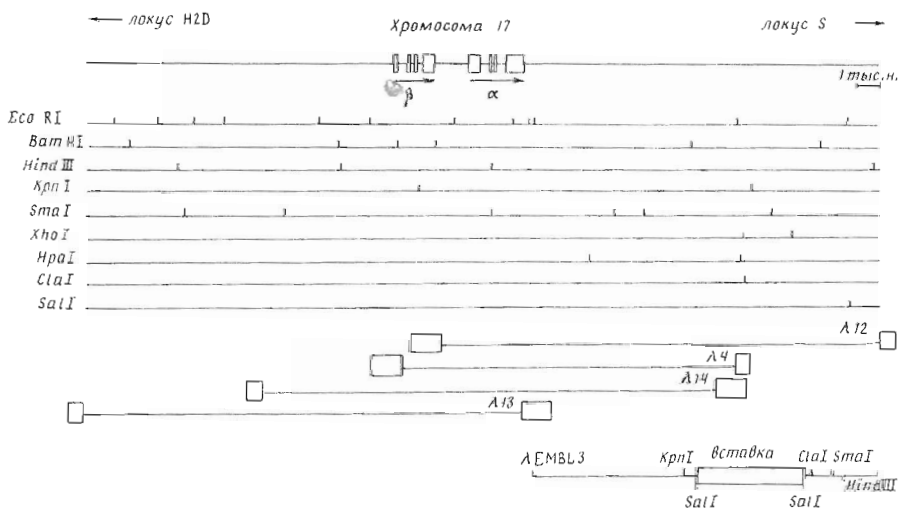


Рис. 2. Физическая карта локуса ФНО мыши и 4 рекомбинантных клонов для 9 рестриктаз. Прямоугольники соответствуют большому и малому «шлям» векторной ДНК. Внизу показана схема расположения сайтов в векторе λ EMBL3, от которых удобно проводить картирование клонированной ДНК

(слева направо на рис. 2). Аналогично выявляется и расположение *EcoRI*-сайтов относительно центрального сайта *HindIII* (во втором интроне гена ФНО- α) справа налево (рис. 2). В этом случае ДНК клонов 13 и 14 полностью гидролизуют *HindIII* и частично *EcoRI* (рис. 1), а гибридизацию проводили с олигонуклеотидом AGGCTGTCACCTCGAATTTTGA из 3-го экзона гена ФНО- α .

Для составления полной карты локуса, определяемого перекрывающимися геномными клонами 4, 12, 13 и 14, потребовалось также дополнительное картирование от концов вставок. Поскольку последовательность нуклеотидов была установлена лишь для центральной части клонирован-

ного локуса, нами были выбраны «универсальные» зонды, которые были комплементарны участкам молекулы фага λ EMBL3, непосредственно примыкающим к вставкам со стороны большого или малого «плеча» вектора. Картирование в этом случае удобно вести от «внутренних» сайтов вектора: *Hind*III, *Sma*I или *Cla*I для малого «плеча» и *Kpn*I для большого «плеча» (нижняя часть рис. 2). В правой части рис. 1 показан пример гибридизационного картирования от *Kpn*I-сайта с использованием олигонуклеотида GTTGATATTGCTTATGAA.

В результате применения описанных подходов нами построена рестриктивная карта локуса длиной около 35 тыс. нуклеотидов для 9 рестриктаз (см. рис. 2). В проведенном параллельно исследовании по точному картированию положения локуса генов ФНО мыши внутри гигантского генетического локуса главного комплекса гистосовместимости [9] был обнаружен космидный клон, находящийся на самом краю клонированной области из локуса H2D, содержащий тандем генов ФНО. Физическая карта этого клона [10] для нескольких рестриктаз соответствует правой части рис. 2, причем вставка клона 12 в правой части рис. 2 на 7 тыс. нуклеотидов заходит в неклонированную ранее область главного комплекса гистосовместимости в направлении локуса S. Интересно, что в составе этого клонированного нами участка, дистально расположенного по отношению к H2D (клон 12), локализован ФНО-ассоциированный ген B144 с неизвестной функцией, который специфически экспрессируется в В-лимфоцитах и макрофагах [11].

В заключение отметим, что примененный подход к картированию носит универсальный характер, а использование синтетических олигонуклеотидов, комплементарных пограничным со вставкой районам векторной молекулы, позволяет эффективно картировать любую клонированную ДНК.

Авторы благодарны Э. Кавашиме, В. Н. Добрынину, С. А. Филиппову и В. М. Росташову, любезно предоставившим синтетические олигонуклеотиды, использованные при картировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Smith C. L., Cantor C. R.* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. 51. P. 115—122.
2. *Smith H. O., Birnstiel M. L.* // Nucl. Acids Res. 1976. V. 3. № 7. P. 2387—2402.
3. *Wu C.* // Nature. 1980. V. 286. № 5776. P. 854—860.
4. *Nedospasov S. A., Georgiev G. P.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. № 2. P. 532—539.
5. *Nedospasov S. A., Hirt B., Shakhov A. N., Dobrynin V. N., Kawashima E., Accolla R., Jongeneel C. V.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 19. P. 7713—7728.
6. *Недоспасов С. А., Йонгенил К. В.* // Докл. АН СССР. 1987. Т. 295. № 3. С. 749—752.
7. *Fransen L., Muller P., Marmenout A., Tavernier J., Van der Heyden J., Kawashima E., Cholett A., Tizard R., Van Heuverswin H., Van Vliet A., Ruyschaert M. R., Fiers W.* // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 17. P. 6361—6373.
8. *Frischauf A. M., Lehrach H., Poustka A., Murray N.* // J. Mol. Biol. 1983. V. 170. № 4. P. 827—842.
9. *Muller U., Jongeneel C. V., Nedospasov S. A., Fisher-Lindahl K., Steinmetz M.* // Nature. 1987. V. 325. № 6101. P. 265—267.
10. *Stephan D., Sun H., Fisher-Lindahl K., Steinmetz M.* // J. Exp. Med. 1986. V. 163. № 3. P. 1226—1244.
11. *Tsuge I., Shen F.-W., Steinmetz M., Boyse E. A.* // Immunogenetics. 1987. V. 26. № 6. P. 378—380.

Поступило в редакцию
30.XII.1988

MAPPING OF THE GENOMIC LOCUS CONTAINING GENES
FOR MOUSE TUMOUR NECROSIS FACTOR BY INDIRECT
END LABELLING WITH SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES

NEDOSPASOV S. A., TURETSKAYA R. L., METT V. A., SHAKHOV A. N.

*V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the USSR, Moscow*

We have developed a technique for restriction nuclease sites mapping in genomic DNA cloned into phage lambda vectors. Synthetic oligonucleotides homologous to the vector sequences and adjacent to the cloning site were used as hybridisation probes for indirect end labelling procedure. In addition, a number of oligonucleotides homologous to the sequences of tumour necrosis factor genes were used for mapping from the internal sites. As a result, a map of 35 kb genomic region on the chromosome 17 inside major histocompatibility complex and surrounding mouse tumour necrosis factor genes was constructed.