



УДК 577.212.3; 577.217.343'112

© 1994 М. Л. Филипенко, С. Н. Владимиров,
А. И. Муравлев, Г. Г. Карпова, Н. П. Мертвецов

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК РИБОСОМНОГО БЕЛКА S26 ЧЕЛОВЕКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН**

Ключевые слова: рибосомные белки; белок S26; кДНК; геном человека.

На основе известной первичной структуры мРНК рибосомного белка S26 крысы были выбраны два дезоксирибоолигонуклеотида в качестве праймеров для амплификации кДНК белка S26 человека. Проведено клонирование полученной в результате полимеразной цепной реакции специфичной кДНК и определена ее первичная структура. Сравнительный анализ показал, что кДНК рибосомного белка S26 человека имеет высокую степень гомологии (87,7%) с кДНК рибосомного белка S26 крысы. Единственная замена аминокислотных остатков обнаружена в позиции 38 кодируемых белков: Ser → Val. На основе результатов блот-гибридизации амплифицированной кДНК с гидролизатами геномной ДНК человека высказано предположение, что геном человека содержит не менее 7 генов рибосомного белка S26.

Биосинтез эукариотических рибосом требует накопления 4 видов молекул РНК и свыше 70 различных рибосомных белков. Молекулярные механизмы, осуществляющие координацию синтеза рибосомных белков в эукариотической клетке, остаются большей частью невыясненными. Полученные к настоящему времени данные позволяют предположить, что регуляция происходит как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне [1—3]. Для изучения механизмов, лежащих в основе такой регуляции, требуется знание нуклеотидных последовательностей генов рибосомных белков, а также элементов структуры, ответственных за координируемую экспрессию этих генов.

Задача определения нуклеотидной последовательности гена может быть решена только при наличии специфического молекулярного зонда для отбора из геномной библиотеки рекомбинантных клонов, содержащих фрагменты соответствующего гена. С целью получения таких молекулярных зондов нами на примере рибосомного белка S26 была использована простая схема клонирования кДНК рибосомных белков человека. Белок S26 представляет интерес с точки зрения функциональной топографии рибосомы, так как входит в состав мРНК-связывающего центра рибосом из печени крысы [4, 5] и плаценты человека [6].

* Новосибирск 630090, проспект Лаврентьева, 8.

Факс: (3832) 35 1665.

E-mail: Mertv@modul. bioch. nsk. su.

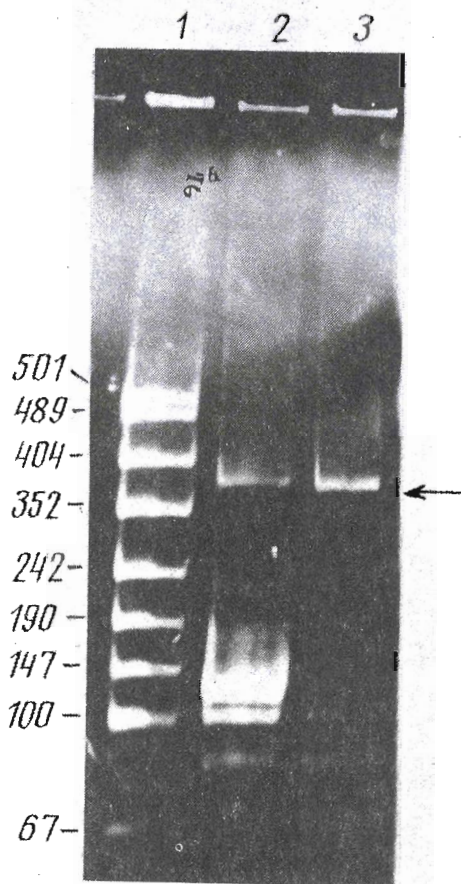


Рис. 1. Анализ в 6% ПААГ продуктов амплификации кДНК при температуре отжига праймеров 45° С (2), 45° С в первых двух циклах и 55°С во всех последующих циклах (3). Стрелкой помечено положение на электрофореграмме фрагмента кДНК ожидаемого размера (380 п. о.). / — *MspI*-фрагменты рестрикции плазмиды pUC19

В качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали одноцепочечную кДНК, синтезированную при помощи AMV-ревертазы на плацентарной poly(A)⁺-мРНК с затравки dT₁₆.

В результате анализа известной первичной структуры мРНК крысиного рибосомного белка S26 [7, 8] мы выбрали и синтезировали два олигодезоксирибонуклеотида, которые использовали в качестве праймеров для амплификации: П1 (5')CGAGTCTTGGCTCCAATATG и П2 (5')TGAAATCACCTCTTTA. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. Мы не наблюдали среди продуктов амплификации фрагмента ожидаемого размера (378 п. о., предсказан на основании первичной структуры крысиной мРНК [7, 8]) при температуре отжига 55 и даже 50° С, что связано, по-видимому, с неполной идентичностью синтезированных нами праймеров соответствующим фрагментам кДНК рибосомного белка S26 человека. При понижении температуры отжига праймеров до 45° С в амплификационной смеси появлялся фрагмент ожидаемого размера, однако при этом сильно возрастало и количество неспецифических фрагментов ДНК. При использовании температуры отжига 45° С в первых двух циклах и 55° С



Рис. 2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей кДНК рибосомного белка S26 человека (H) и крысы (R). Для R указаны только нуклеотидные замены

во всех последующих количество неспецифических фрагментов резко падало без видимого уменьшения количества специфического фрагмента (рис. 1). Такой температурный режим был успешно применен нами и для амплификации кДНК других рибосомных белков человека: S13, L19, L28 и L30 (данные не приведены).

Фрагмент ожидаемого размера выделяли из геля и лигировали с плазмидной ДНК ptz19RJL1, линеаризованной эндонуклеазой *HincII*. После трансформации полученной лигазной смесью клеток *E. coli* XL1-blue отбирали колонии, имеющие *lac*-фенотип, число которых составляло 8% от общего количества. Рестриктионный анализ плазмидных ДНК из 36 отобранных *lac*-клонов *E. coli* показал, что 9 из них содержат вставки ДНК нужного размера. Нуклеотидная последовательность вставок из четырех независимых клонов была определена методом Сэнгера [9]. Все четыре структуры оказались полностью идентичными.

Сравнительный анализ показал, что кДНК рибосомного белка S26 человека имеет высокую степень гомологии (87,7%) с кДНК рибосомного белка S26 крысы (рис. 2). Кодированные белки практически гомологичны: единственная замена аминокислотных остатков обнаружена в позиции 38: Ser → Val.

Далее была проверена возможность использования полученного фрагмента кДНК в качестве молекулярного зонда в блот-гибридизации с гидролизатами плацентарной человеческой геномной ДНК. С этой целью геномная ДНК человека была гидролизована эндонуклеазами *EcoRI* и *PvuII*, фрагменты ДНК разделяли электрофорезом в 0,8% агарозе, переносили на капроновую мембрану и гибридизовали при 65° С с ³²P-меченой кДНК рибосомного белка S26 человека. Последующий радиоавтографический анализ показал, что 7 *EcoRI*- и 6 *PvuII*-фрагментов гидролизованной геномной ДНК гибридизуются с кДНК рибосомного белка S26 человека (рис. 3). Это позволяет предположить наличие не менее 7 генов данного белка в геноме человека, что хорошо согласуется с имеющимися литературными данными о наличии в геноме млекопитающих множества псевдогенов рибосомных белков [10].

Несмотря на то что используемая нами схема не позволяет определить полную первичную структуру мРНК, она значительно упрощает процедуру клонирования кДНК рибосомных белков, поскольку исключается трудоемкий скрининг библи-

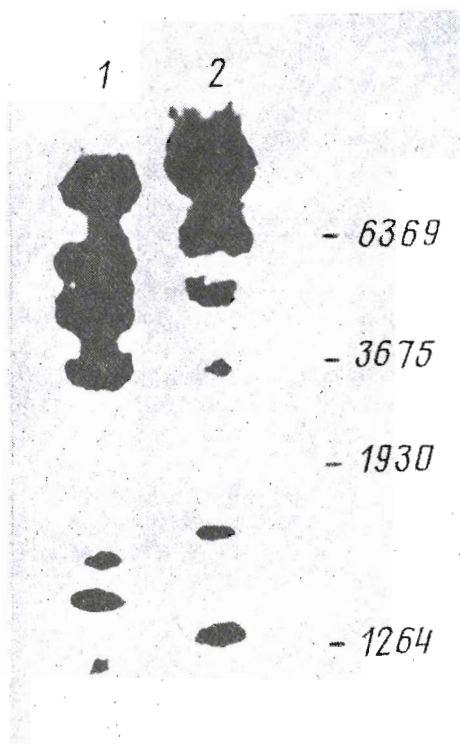


Рис. 3. Блот-гибридизация ^{32}P -меченой кДНК рибосомного белка S26 с *EcoRI*- и *PvuII*-гидролизатами (1, 2 соответственно) плацентарной геномной ДНК человека. Цифры справа — размер фрагментов (п. о.)

отеки кДНК. Полученные по данной схеме кДНК, кодирующие рибосомные белки человека, можно применять в качестве молекулярных зондов при скрининге геномных библиотек человека, для изучения структурной организации генов рибосомных белков и картирования их на хромосомах человека.

Экспериментальная часть

В работе использовали РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса миелобластоза птиц (AMV-ревертазу), Taq-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу фага Т4, эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *PvuII*, *HincII*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, 5-бром-3-индолил- β -D-галактозид (БИГ) (Biopol, Москва), $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ с уд. акт. 40 ПБк/моль («Радиопрепарат», Ташкент), oligo(dT)-целлюлозу (Pharmacia, Швеция), капроновую мембрану Hybond-N (Amersham, Англия). Олигодезоксирибонуклеотидные праймеры были синтезированы В. В. Горном (НИБХ СО РАН).

Выделение poly(A)⁺-мРНК. Суммарную РНК человека выделяли из ткани плаценты гуанидинизотиоцианатным методом [11]; poly(A)⁺-мРНК получали хроматографией суммарной РНК на oligo(dT)-целлюлозе [12].

Обратная транскрипция и амплификация специфической кДНК. Обратную транскрипцию проводили в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-HCl (pH 8,3), 50 мМ KCl, 6 мМ MgCl₂, 50 мкМ dNTP, 3 мкг poly(A)⁺-мРНК, 6 мкг dT₁₆ и 20 ед. акт. AMV-ревертазы (инкубация 1 ч при 42° С). По окончании обратной транскрипции 2 мкл реакционной смеси использовали как источник одноцепочечной кДНК в амплификации специфической кДНК. Амплификацию осуществляли в 50 мкл буфера (67 мМ трис-HCl (pH 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ MgCl₂, 0,01% Tween 20, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 100 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры П1 и П2, 2 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы) в течение 35 циклов в

следующем режиме: денатурация — 94° С, 1 мин; отжиг праймеров — 40—55° С, 1 мин; полимеризация — 72° С, 1 мин. Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе «БИС» (пос. Кольцово, Новосибирская обл.). Полученные амплификационные смеси анализировали электрофорезом в 6% полиакриламидном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [12].

Клонирование и секвенирование полученных фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК ожидаемого размера (378 п. о.) вырезали из геля, элюировали и лигировали по тупым концам в плазмидный вектор pTZ19RJL1, обработанный рестриктазой *HincII*. Элюцию фрагментов ДНК из геля, выделение плазмидных ДНК, расщепление рестриктазами, сшивку ДНК-лигазой T4, трансформацию клеток *E. coli* XL1-blue и фенотипический отбор гибридных клонов (*lac*) проводили стандартными методами как описано в работе [12]. Нуклеотидные последовательности вставок полученных клонов определяли методом Сэнгера [9].

Блот-гибридизацию амплифицированной кДНК рибосомного белка S26 человека с фрагментами рестрикции плацентарной геномной ДНК осуществляли как описано в работе [12].

Обсчет гомологии нуклеотидных последовательностей проводили, используя программу DNASIS (Hitachi).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Meyuhas O.*//Recombinant DNA and Cell Proliferation/Eds G. S. Stein, J. L. Stein. Orlando: Acad. Press, 1984. P. 243—271.
2. *Jacobs-Lorena M., Fried H. M.*//Translational Regulation of Gene Expression/Ed J. Han. N. Y.: Plenum Press, 1987. P. 63—85.
3. *Mager W. H.*//Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 949. № 1. P. 1—15.
4. *Stahl J., Kobetz N. D.*//Mol. Biol. Rep. 1984. V. 9. № 2. P. 212—222.
5. *Stahl J., Karpova G. G.*//Biomed. et biochim. acta. 1985. V. 44. № 6. P. 1057—1064.
6. *Malygin A. A., Graifer D. M., Bulygin A. A., Zenkova M. A., Yamkovy V. I., Stahl J., Karpova G. G.*//EMBO J. 1993. Submitted.
7. *Kuwano Y., Nakonishi O., Nabeshima Y., Tanaka T., Ogata K.*//J. Biochem. 1985. V. 97. № 6. P. 983—992.
8. *Wittman-Liebold B., Kopke A. K. E., Arnd E., Kromer W., Hatakeyama T., Wittman H.-G.*//Structure, Function and Evolution of Ribosomes/Eds W. E. Hill et al. Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1990. P. 203—214.
9. *Heon M. L., Pene J. J.*//Gene Anal. Techn. 1988. V. 5. P. 32—39.
10. *Dudov K. P., Perry R. P.*//Cell. 1984. V. 37. № 3. P. 457—468.
11. *Chomczynski P., Sacchi N.*//Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156—159.
12. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Поступила в редакцию
10.VI.1993

После доработки
27.IX.1993

*M. L. Filipenko, S. N. Vladimirov, A. I. Muravlev,
G. G. Karpova, N. P. Mertvetsov*

**CLONING OF cDNA ENCODING S26 HUMAN RIBOSOMAL
PROTEIN AND ITS SEQUENCE ANALYSIS**

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk*

The polymerase chain reaction technique was employed to isolate cDNA encoding S26 human ribosomal protein. Based on the known sequence of rat S26 ribosomal protein we have designed primers and amplified the corresponding sequence of human cDNA from total placenta cDNA. The fragment of S26 cDNA was cloned in a plasmid vector and sequenced by the Sanger method. Extremely high homology (87,7%) between coding regions of S26 mRNAs in rat liver and human placenta was revealed. The only amino acid substitution (Ser → Val) at position 38 was observed. Results of blot hybridization with partially digested human genomic DNA suggest the presence of more than 6 copies of the S26 gene.