



УДК 577.212.3;577.217.343'112

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S26, L19 И L32 НА ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА

© 1995 г. М. Л. Филипченко, В. П. Мишин, Ю. А. Сутурина, А. И. Муравлев, Е. А. Копанцев*, Г. Г. Карпова, Н. П. Мертвецов[#]

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8;

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

Поступила в редакцию 06.10.94 г. После доработки 05.07.95 г.

Клонированы и секвенированы фрагмент кДНК и интронсодержащий фрагмент гена рибосомного белка L19 (RPL19) человека, интроны генов рибосомных белков человека S26 (RPS26) и L32 (RPL32). С использованием панели ДНК из гибридов человек-грызун, несущих разные наборы хромосом человека, методом ПЦР осуществлена локализация интронсодержащих генов указанных рибосомных белков на хромосомах человека.

Ключевые слова: гены рибосомных белков, гибридные клетки, картирование, ПЦР.

В состав эукариотической рибосомы входят четыре вида молекул РНК и свыше 80 различных рибосомных белков [1]. Молекулярные механизмы, осуществляющие координацию синтеза рибосомных белков в эукариотической клетке, остаются большей частью невыясненными. Для понимания механизмов, участвующих в регуляции экспрессии генов рибосомных белков, важно иметь информацию об их структурной организации и локализации на хромосомах. К настоящему времени достигнуты значительные успехи в клонировании и секвенировании кДНК рибосомных белков крысы [1]. Показано, что в мультигенном семействе каждого рибосомного белка только один ген является транскрибируемым, остальные же представляют собой псевдогены, т.е. ревертированные копии процессированной мРНК данного рибосомного белка [2, 3]. Из-за наличия в геноме млекопитающих множественных псевдогенов использование полученных первичных структур кДНК для непосредственного картирования генов рибосомных белков стандартными гибридизационными методами [4] крайне неэффективно. Поэтому транскрипционно активные интронсодержащие гены рибосомных белков млекопитающих, и в особенности человека, остаются пока малоизученными. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для клонирования интронов генов рибосомных белков с последующим использованием их для картирования и скрининга геномных библиотек позволяет обойти вышеуказанные проблемы [5, 6].

В данной работе описано клонирование и секвенирование фрагмента кДНК и интронсодержаще-

го фрагмента гена рибосомного белка L19 (RPL19) человека, интронов генов рибосомных белков человека S26 (RPS26) и L32 (RPL32), а также осуществлена локализация генов указанных рибосомных белков на хромосомах человека.

Клонирование интронов генов рибосомных белков в присутствии множественных псевдогенов проводили по схеме, представленной на рис. 1, с использованием метода ПЦР. Предварительно проведенный анализ известных первичных структур генов рибосомных белков млекопитающих показал, что нуклеотидное окружение их интронов зачастую имеет следующий вид: AAG-интрон-G либо (A/T)TG-интрон-(G/A). Учитывая эту особенность, пары праймеров для амплификации интронов выбирали по структуре мРНК рибосомных белков так, чтобы между их локализацией на мРНК находились участки со структурой AAGG или (A/U)UG(G/A). В случае удачного подбора праймеров, когда между участками геномной ДНК, соответствующими выбранным праймерам, действительно располагался интрон, в продуктах амплификации выявлялись два фрагмента. Один, меньшего размера, соответствовал фрагменту псевдогена, другой, большего размера, – интронсодержащему фрагменту транскрипционно активного гена. Фрагмент большего размера клонировали по тупым концам в плазмидном векторе pTZ19RJL1 и проводили анализ его первичной структуры методом Сэнгера [7]. Полученные структуры подвергали компьютерному анализу для выявления участков, соответствующих консенсусным последовательностям акцепторного и донорного сайтов сплайсинга. При наличии вышеуказанных последовательностей в нужной

[#] Автор для переписки. Факс: (3832) 351665; E-mail: Mertv@modul.bioch.nsk.su.

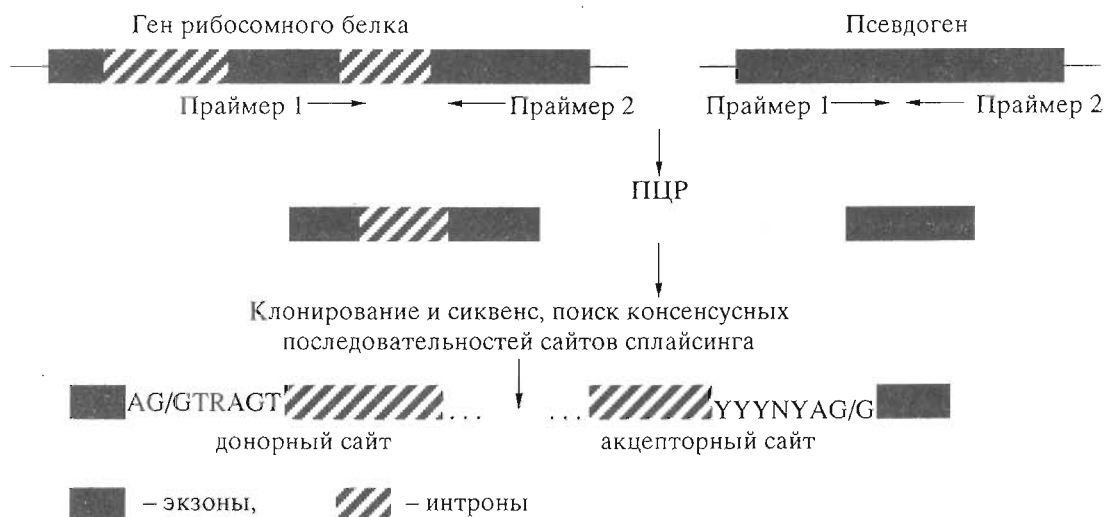


Рис. 1. Схема эксперимента по клонированию интронсодержащих фрагментов генов рибосомных белков в присутствии множественных псевдогенов.



Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагмента кДНК рибосомного белка L19 человека. Указано положение праймеров p19a и p19b, которые использовались для амплификации интронов гена RPL19.

ориентации считали, что амплифицированный фрагмент ДНК содержит интрон гена исследуемого рибосомного белка.

Клонирование и секвенирование кДНК и интронсодержащего фрагмента гена рибосомного белка L19 человека, картирование гена на хромосомах человека

Для амплификации интронов гена RPL19 предварительно была определена нуклеотидная последовательность кДНК RPL19 человека. Для

этого, основываясь на известной первичной структуре мРНК соответствующего крысиного белка [8], мы выбрали олигонуклеотидные праймеры p19a и p19b (рис. 2) и с их помощью амплифицировали фрагмент кДНК RPL19 человека на суммарной плацентарной кДНК. Продукт ПЦР ожидаемого размера клонировали в плазмиде pTZ19RJI. Для трех независимых клонов была определена нуклеотидная последовательность вставок размером 592 п. о. Все три структуры оказались полностью идентичными (рис. 2) и имели 87%-ную гомологию с кДНК RPL19 крысы [8].



Рис. 3. Электрофоретический анализ в 6% ПААГ продуктов амплификации интронсодержащего фрагмента гена RPL19 с праймерами p19-4/p19-6 на ДНК человека (2), мыши (3), китайского хомячка (4), ДНК клеточных линий NA09925 (5), NA09927 (6), NA09928 (7), 1 и 8 – *TaqI*- и *MspI*-фрагменты рестрикции плазмиды pUC19. Приведены длины маркерных фрагментов (п. о.). Стрелкой отмечено положение на электрофореграмме фрагмента ДНК размером около 460 п. о., содержащего интрон гена RPL19 человека.

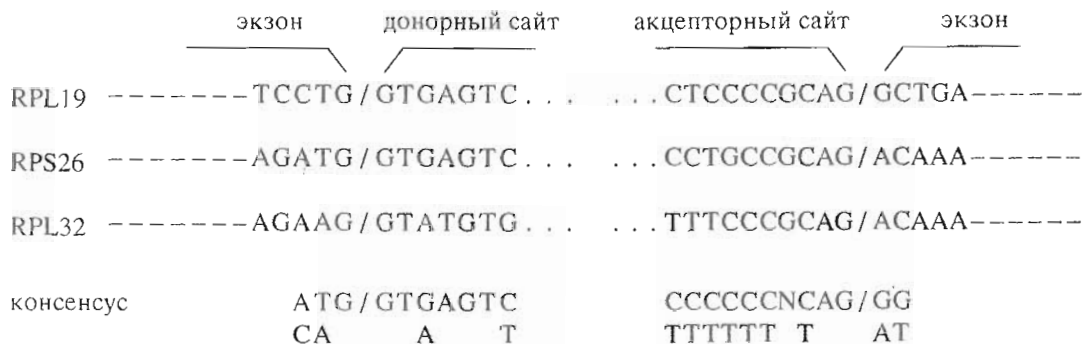


Рис. 4. Сравнительный анализ концевых нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов генов RPL19, RPS26, RPL32 и консенсусных последовательностей акцепторного и донорного сайтов сплайсинга.

На основе полученной структуры были подобраны четыре праймера: p19-1, p19-2, p19-3, p19-4 (см. “Экспер. часть”). При амплификации с праймерами p19-3/p19-4 детектировались три основных амплифицированных фрагмента ДНК (рис. 3). Два фрагмента большего размера были клонированы и секвенированы. Анализ первичной структуры фрагмента с размером около 460 п. о. показал, что на его “концах” содержатся участки последовательности кДНК RPL19, между которыми на-

ходится фрагмент анонимной ДНК размером около 400 п. о., фланкированный последовательностями, подобными консенсусным последовательностям акцепторного и донорного сайтов сплайсинга (рис. 4). На основе этого можно заключить, что клонированный нами фрагмент ДНК содержит интрон гена рибосомного белка L19.

Для проверки возможности использования пары праймеров p19-3/p19-4 для картирования транскрипционно активного гена RPL19 на

Хромосомный состав гибридных клеток картирующей панели и результаты амплификации фрагментов интронов генов RPL19, RPS26 и RPL32 на препаратах ДНК из этой панели

Клон	Хромосомный состав	L19	S26	L32	Клон	Хромосомный состав	L19	S26	L32
NA09925	1, 2, 4 - 8, 12, 14 - 20, 22	+	+	-	NA09938	4 - 7, 11, 12, 14, 17, 20, 21, 22	+	+	-
NA09927	1 - 4, 6 - 8, 10, 13 - 15, 17 - 20	+	-	+	NA09940	3, 7, 8, 15, 17	+	-	+
NA09928	2, 3, 5, 6, 8, 14, 15, 17, 19, 21, 22, Y	+	-	+	7SM01	10, 11, 14, 18, 19, 21, 22, X	-	-	-
NA09929	3, 4, 6, 8, 11, 12, 14, 17, 20	+	+	+	5L27	4, 11, 16, 20, 22, X	-	-	-
NA09931	5, 7, 10, 12, 14, 17, 20, 21, Y	+	+	-	8SM22-2	1, 4, 5, 9, 12, 18, 20, X	-	+	-
NA09932	4, 5, 6, 8, 11, 12, 17, 21	+	+	-	6L05	5, 8, 21, X	-	-	-
NA09933	1, 3 - 8, 12 - 15, 17 - 22, Y	+	+	+	6L04	10, 13, 19, X	-	-	-
NA09934	2, 5, 6, 8, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 21	+	+	-	NAIMR91	Человеческая линия IMR91	+	+	+
NA09936	4, 6 - 8, 10, 11, 14, 17, 19, 20, 22	+	-	-	NA00347a	Мышиная линия В-82	-	-	-
NA09937	2, 4, 6 - 8, 12, 14, 15, 17, 18	+	+	-					

Примечание. (+) – наличие фрагмента ожидаемого размера в амплификационной смеси.

хромосомах человека с применением панели ДНК из гибридных клеток человек–грызун была проведена амплификация на геномных ДНК человека, мыши и китайского хомячка с использованием этих праймеров. Было обнаружено, что соответствующие интроны белка L19 указанных видов имеют разные размеры (рис. 3). Это позволило специфично детектировать амплификацию интронсодержащего фрагмента гена RPL19 человека в ДНК из гибридов человек–грызун, несущих разные наборы хромосом человека. Результаты амплификации интрона гена RPL19 человека представлены в таблице. Видно, что наличие амплифицируемого фрагмента гена белка L19 строго связано с наличием в гибридных клетках хромосомы 17 человека. Это позволяет заключить, что интронсодержащий функциональный ген RPL19 локализован на этой хромосоме.

Клонирование и секвенирование интронсодержащего фрагмента гена рибосомного белка S26 человека, картирование гена на хромосомах человека

На основе ранее опубликованной последовательности кДНК рибосомного белка S26 человека [9, 10] нами были выбраны пять олигонуклеотидных праймеров для амплификации интронов данного гена: p26-1, p26-2, p26-3, p26-4, p26-5 (см. "Экспер. часть"). При анализе продуктов амплификации для двух пар праймеров (p26-1/p26-2 и p26-1/p26-3) детектировалось по два основных амплифицированных фрагмента (рис. 5). Самый по размерам фрагмент ДНК, образующийся в случае пары p26-1/p26-2, был клонирован и секвенирован. Концевой анализ вставки показал, что клонированный фрагмент, как и в случае с фрагментом гена белка L19, содержит участки последовательности кДНК белка S26, между которыми

находится фрагмент анонимной ДНК размером около 320 п. о., фланкированный последовательностями, подобными консенсусным последовательностям сайтов сплайсинга (рис. 4). Таким образом, можно заключить, что клонированный

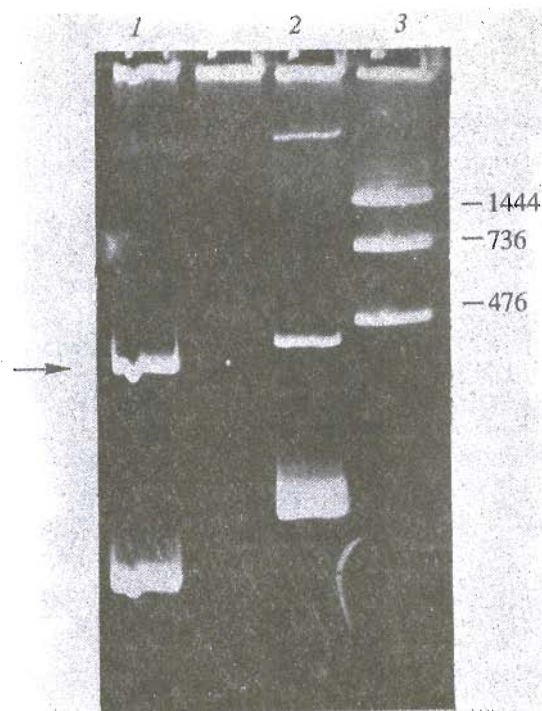


Рис. 5. Электрофоретический анализ в 6% ПААГ продуктов амплификации интронов гена RPS26. Амплификационные смеси: 1 – праймеры p26-1/p26-2; 2 – p26-1/p26-3; 3 – TaqI-фрагменты рестрикции плазмиды pUC19. Приведены длины маркерных фрагментов (п. о.). Стрелкой отмечено положение на электрограмме фрагментов ДНК, содержащих интрон гена RPS26.

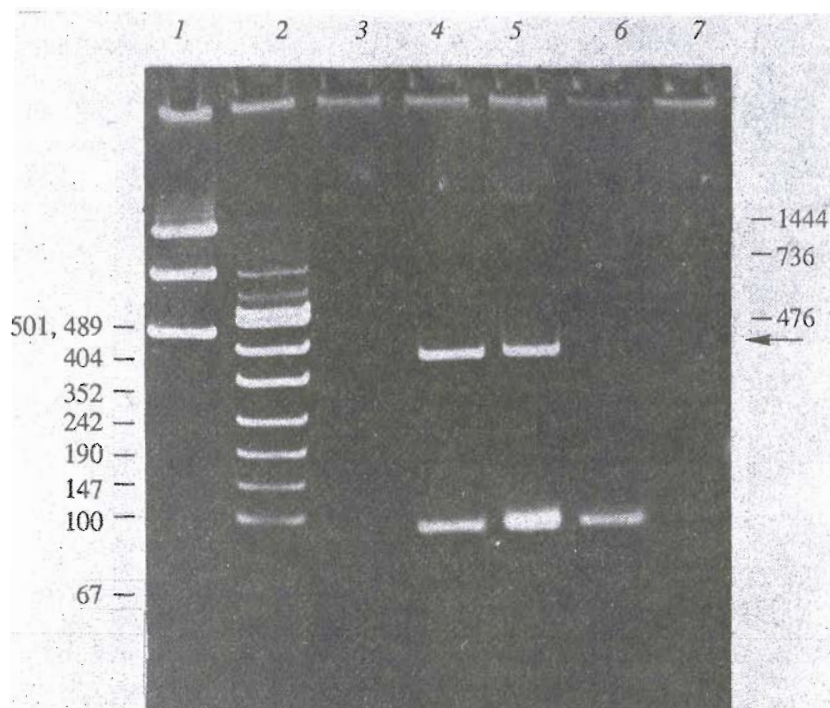


Рис. 6. Электрофоретический анализ в 6% ПААГ продуктов амплификации интронсодержащего фрагмента гена RPS26 с праймерами p26-1/p26-2 на ДНК мыши (3), человека (4), ДНК клеточных линий NA09925 (5), NA09927 (6), NA09940 (7). 1 и 2 – *TaqI*- и *MspI*-фрагменты рестрикции плазмиды pUC19. Приведены длины маркерных фрагментов (п. о.). Стрелкой помечено положение на электрофореграмме фрагмента ДНК размером около 400 п. о., содержащего интрон гена RPS26.

нами фрагмент ДНК содержит интрон гена рибосомного белка S26.

Поскольку структуры праймеров p26-1 и p26-2 не имеют полного соответствия последовательностям кДНК крысы и других грызунов, путем варьирования условий ПЦР нам удалось добиться специфичной амплификации интронсодержащего фрагмента гена S26 на ДНК человека. Это позволило провести картирование транскрипционно активного гена S26 методом амплификации на панели ДНК из гибридов человек–грызун, несущих разные наборы хромосом человека (рис. 6). Результаты амплификации интрона гена белка S26 человека, представленные в таблице, позволяют заключить, что интронсодержащий функциональный ген RPS26 находится на 12-й хромосоме.

Клонирование и секвенирование интронсодержащего фрагмента гена рибосомного белка L32 человека, картирование гена на хромосомах человека

Используя ранее опубликованную нуклеотидную последовательность интронсодержащего гена рибосомного белка L32 мыши [11], мы выбрали олигонуклеотиды p32a и p32b (см. “Экспер. часть”) для амплификации интрона 2 этого гена. Учитывая высокую консервативность структур мРНК

рибосомных белков млекопитающих [12], а также консервативность экзон-интронной структуры их генов, мы предположили, что полученная пара праймеров может быть использована для амплификации соответствующего интрона гена человека. В продуктах амплификации на ДНК человека был обнаружен фрагмент ДНК размером около 700 п. о. Этот фрагмент был клонирован и секвенирован. Анализ показал, что на концах амплифицированного фрагмента находятся нуклеотидные последовательности, комплементарные праймерам p32a и p32b, между которыми находится фрагмент анонимной ДНК размером около 700 п. о., фланкированный последовательностями, подобными последовательностям сайтов сплайсинга гена L32 мыши, а также консенсусным последовательностям акцепторного и донорного сайтов сплайсинга (рис. 4). На основании этого можно заключить, что клонированный фрагмент ДНК является интроном гена рибосомного белка L32 человека. Для картирования функционального гена RPL32 на хромосомах человека на основе полученной структуры мы выбрали еще один олигонуклеотидный праймер – p32c (см. “Экспер. часть”), специфичный для интрона человека, но не мыши. Это позволило специфично амплифицировать интронсодержащий фрагмент ДНК человека в ДНК из гибридов человек–грызун, используя пару праймеров

p32a/p32c. Результаты амплификации интрона гена белка L32 человека на панели ДНК из гибридов человек-грызун, несущих разные наборы хромосом человека, представлены в таблице. На основании этих результатов можно заключить, что интронсодержащий функциональный ген RPL32 находится на хромосоме 3.

Локализация генов рибосомных белков S26, L19 и L32 на хромосомах человека зарегистрирована Genome Data Base под номером G-00-311-036.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса миелобластома птиц. *Taq*-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4, эндонуклеазу рестрикции *HincII*, Y-GAL (Biopol, Москва), oligo(dT)-целлюлозу (Pharmacia, Швеция). Картирующая панель ДНК № 1 была получена из Coriell Cell Depositories, картирующая панель ДНК № 2 была предоставлена Е.Д. Свердловым (ИБХ РАН, Москва). Дезоксирибоолигонуклеотидные праймеры были синтезированы О.А. Батуриной (НИБХ СО РАН) и имели следующие структуры (5' → 3'):

- p19a – ATGAGTATGCTCAGGCTT (12 - 29),
 p19b – TТАТТТСТТGGTCTCTTCCCTT (585 - 603) [8],
 p19-1 – ACAGCCAATGCCCCGAATGC (231 - 250),
 p19-2 – СТТCAGCTTGTGGATGTGTT (401 - 420),
 p19-3 – GCCCGCAAGAAGCTCCTG (430 - 447),
 p19-4 – GAGGCGCTCTTCACGGCG (495 - 513),
 p26-1 – СТТCCTGGTCCGTCCGTGCC (2 - 21),
 p26-2 – GAATAGGCTGCACGTGGC (69 - 86),
 p26-3 – GGCGCAGTTCGTGCAGCGTT (85 - 104),
 p26-4 – СТААСТGTGCCCGATGCGT (94 - 112),
 p26-5 – GACGCTCGCTTCAGAAATG (179 - 197) [9],
 p32a – CGATATGTGAAAATTAAGGT (1275 - 1295),
 p32b – GGGTTTCCGCCAGTTTTCGCT (1938 - 1958) [11],
 p32c – GGGTTAGCGTCTGTGCAGA.

Обратная транскрипция и амплификация специфической кДНК. Для выделения суммарной РНК человека использовали ткань плаценты. РНК выделяли гуанидин-изотиоцианатным методом [13]. Poly(A)⁺-мРНК выделяли на oligo(dT)-целлюлозе [14]. Обратную транскрипцию проводили 1 ч при 42°C в 50 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 8.3), 50 мМ КСl, 6 мМ MgCl₂, 50 мкМ dNTP, 10 мкг РНК, 0.5 мкг oligo(dT)₁₆-праймера и 20 ед. акт. РНК-зависимой ДНК-по-

лимеразы вируса миелобластома птиц. ДНК из реакционной смеси осаждали этанолом, растворяли в 10 мкл воды и 5 мкл использовали в амплификации специфической кДНК.

Амплификацию проводили в 50 мкл буфера, содержащего 67 мМ трис-НСl (рН 8.9), 16 мМ (NH₄)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. Амплификацию осуществляли в течение 32 циклов в следующем режиме [время (мин), t (°C)]: для праймеров p26-1, p26-2 – денатурация – 1, 94, отжиг – 1, 62, элонгация – 1, 72; для праймеров p32a, p32b – денатурация – 1, 94, отжиг – 1, 60, элонгация – 2, 72; для всех остальных пар праймеров денатурация – 1, 94, отжиг – 1, 58, элонгация – 1.5, 72. Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе “БИС” (пос. Кольцово Новосибирской обл.). Полученные амплификационные смеси анализировали электрофорезом в 6% ПААГ с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [14].

Клонирование и анализ амплифицированных фрагментов ДНК. Фрагменты ДНК ожидаемого размера, предсказанного на основе структуры гомологичной крысиной кДНК, вырезали из геля, элюировали и клонировали по тупым концам в плазмидный вектор pTZ19RJL1 (MBI Fermentas, Lithuania), гидролизованый рестриктазой *HincII* [14]. Поиск гомологии нуклеотидных последовательностей проводили, используя программу DNASIS (Hitachi). Известные нуклеотидные последовательности интронсодержащих генов рибосомных белков млекопитающих были взяты из EMBL Data Library.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wool I.G., Endo Y., Gluck A. // Structure, Function and Evolution of Ribosomes // Eds W.E. Hill et al. Washington: Amer. Soc. Microbiol. 1990. P. 183 - 203.
2. Dudov K.P., Perry R.P. // Cell. 1984. V. 37. P. 457 - 468.
3. Wiedemann L.M., Perry R.P. // Mol. Cell. Biol. 1984. V. 4. P. 2518 - 2528.
4. Nakamichi N.N., Fa-Ten-Kao, Wasmuth J., Roufa D.J. // Somat. Cell Mol. Genet. 1986. V. 12. P. 225 - 226.
5. Davies B., Feo S., Heard E., Fried M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6691 - 6695.
6. Feo S., Davies B., Fried M. // Genomics. 1992. V. 13. P. 201 - 207.
7. Chen E.Y., Seeburg P.H. // DNA. 1985. V. 4. P. 165 - 170.
8. Chan Y.L., Lin A., McNally J., Peleg D., Meyuhos O., Wool I.G. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 1111 - 1115.
9. Vincent S., Marty L., Fort P. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. P. 1498.
10. Филипенко М.Л., Владимиров С.Н., Муравлев А.И., Карпова Г.Г., Мертвецов Н.П. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 644 - 649.
11. Dudov K., Perry R. // Cell. 1984. V. 37. P. 457 - 468.

12. 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.
13. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. P. 156 - 159.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Chromosome Localization of Human S26, L19, and L32 Ribosomal Protein Genes

M. L. Filipenko*, V. P. Mishin*, Yu. A. Suturina*, A. I. Muravlev*,
E. A. Kopantsev**, G. G. Karpova*, and N. P. Mervetsov*¹

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

** Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

Abstract – A fragment of cDNA and an intron-containing fragment of the human L19 ribosomal protein (RPL19) gene, and introns of the human ribosomal proteins S26 (RPS26) and L32 (RPL32) genes were cloned and sequenced. The intron-containing genes of these ribosomal proteins were mapped to human chromosomes by means of polymerase chain reaction (PCR) using a human/rodent hybrid DNA panel.

Key words: ribosomal protein genes, hybrid cells, mapping, polymerase chain reaction.

¹ To whom correspondence should be addressed.