



УДК 577.212.3;577.217.343'112

**КЛОНИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДНК, КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ  
мРНК РИБОСОМНОГО БЕЛКА L11 ЧЕЛОВЕКА**© 1995 г. В. П. Мишин, М. Л. Филипенко, А. И. Муравлев,  
Г. Г. Карпова, Н. П. Мертвцов

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН

Поступило в редакцию 25.07.94 г. После доработки 16.09.94 г.

*Ключевые слова:* гены рибосомных белков, кДНК, ПЦР.

Координация синтеза рибосомных белков в эукариотической клетке осуществляется сложными молекулярными механизмами. Для их изучения требуется знание нуклеотидных последовательностей генов рибосомных белков и тех элементов первичной структуры, которые ответственны за координацию экспрессии этих генов [1]. В настоящее время ведется интенсивная работа по секвенированию кДНК рибосомных белков человека, а также по клонированию и секвенированию их генов [2 - 8]. В данной работе было проведено клонирование и секвенирование полноразмерной кДНК рибосомного белка L11 человека (RPL11), для которой ранее, при сиквенсе случайных клонов из библиотеки кДНК человека, была установлена нуклеотидная последовательность ее 5'-конца (Н. Bhat, 1993, регистрационный номер в EMBL-банке нуклеотидных последовательностей L05092).

При клонировании кДНК RPL11 мы использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В качестве матрицы для ПЦР брали одноцепочечную кДНК, синтезированную на суммарной плацентарной poly(A)<sup>+</sup>-мРНК с праймера M245 (TAAAACGACGGCCAGTGCGGCCGC(T)<sub>15</sub>), содержащего на 3'-конце oligo(dT)-тракт, на 5'-конце последовательность универсального праймера M13 (16 нуклеотидов) и последовательность сайта рестрикции *NotI* (8 нуклеотидов) между ними. В результате анализа известной первичной структуры 5'-области мРНК рибосомного белка L11 человека были выбраны два частично перекрывающихся дезоксирибоолигонуклеотида, которые использовали в качестве 5'-концевых праймеров при амплификации кДНК RPL11 (M111 (5')ATGGCGCAGGATCAAGGT и M112 (5')GATCAAGGTGAAAAGGAG). В каче-

стве 3'-концевых праймеров использовали пару частично перекрывающихся олигонуклеотидов, комплементарных oligo(dT)-содержащему праймеру ("гнездовые" праймеры M228 (5')TAAAACGACGGCCAGTG и M345 (5')GCCAGTGCGGCCGCTTTT) (см. рисунок). Для повышения специфичности амплификации кДНК RPL11 ПЦР проводили в две стадии. На первой стадии использовали праймеры M111 и M228 и суммарную кДНК в качестве матрицы. На втором этапе полученные продукты ПЦР повторно амплифицировали с "внутренней" пары праймеров M112 и M345. Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием. Фрагмент ожидаемого размера (около 600 п. о.) выделяли из геля и лигировали с линейаризованной эндонуклеазой *HincII* плазмидой pTZ19RJL1. Нуклеотидная последовательность вставок из четырех независимых клонов была определена методом Максама-Гилберта [9].

В результате была установлена первичная структура кДНК RPL11 начиная с положения 28 до poly(A)-тракта длиной 546 п. о. (рисунок). Сравнительный анализ показал, что кДНК рибосомного белка L11 человека имеет высокую степень гомологии (88%) с кДНК рибосомного белка L11 крысы (регистрационный номер в EMBL-банке нуклеотидных последовательностей X62146). Замены аминокислотных остатков обнаружены в позициях 91 (Asp→Gly), 217 (Thr→Ala), 352 (Lys→Glu).

Полученные клоны кДНК, кодирующие рибосомный белок L11 человека, могут быть использованы в качестве молекулярных зондов при скрининге геномных библиотек человека, для изучения структурной организации генов рибосомных белков и картирования их на хромосомах человека.

Адрес для переписки: Новосибирск 630090, проспект Лаврентьева, 8. Факс (3832) 351665; E-mail: Mervt@modul. bioch. nsk. su.

		M111										M112						
		←										←						
1	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Gly	Glu	Lys	Glu	Asn	Pro	Met	Arg	Glu	Leu	Arg	16	
1	ATG	GCG	CAG	GAT	CAA	GGT	GAA	AAG	GAG	AAC	CCC	ATG	CGG	GAA	CTT	CGC	48	
17	Ile	Arg	Lys	Leu	Cys	Leu	Asn	Ile	Cys	Val	Gly	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	32	
49	ATC	CGC	AAA	CTC	TGT	CTC	AAC	ATC	TGT	GTT	GGG	GAG	AGT	GGA	GGC	AGA	96	
33	Leu	Thr	Arg	Ala	Ala	Lys	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Thr	Gly	Gln	Thr	Pro	48	
97	CTG	ACG	CGA	GCA	GCC	AAG	GTG	TTG	GAG	CAG	CTC	ACA	GGG	CAG	ACC	CCT	144	
49	Val	Phe	Ser	Lys	Ala	Arg	Tyr	Thr	Val	Arg	Ser	Phe	Gly	Ile	Arg	Arg	64	
145	GTG	TTT	TCC	AAA	GCT	AGA	TAC	ACT	GTC	AGA	TCC	TTT	GGC	ATC	CGG	AGA	192	
65	Asn	Glu	Lys	Ile	Ala	Val	His	Cys	Ala	Val	Arg	Gly	Ala	Lys	Ala	Glu	80	
193	AAT	GAA	AAG	ATT	GCT	GTC	CAC	TGC	GCA	GTT	CGA	GGG	GCC	AAG	GCA	GAA	240	
81	Glu	Ile	Leu	Glu	Lys	Gly	Leu	Lys	Val	Arg	Glu	Leu	Glu	Leu	Arg	Lys	96	
241	GAA	ATC	TTG	GAG	AAG	GGT	CTA	AAG	GTG	CGG	GAG	TTG	GAG	TTA	AGA	AAA	288	
97	Asn	Asn	Phe	Ser	Asp	Thr	Gly	Asn	Phe	Gly	Phe	Gly	Ile	Gln	Glu	His	112	
289	AAC	AAC	TTC	TCA	GAT	ACT	GGA	AAC	TTT	GGT	TTT	GGG	ATC	CAG	GAA	CAC	336	
113	Ile	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Tyr	Asp	Pro	Ser	Ile	Gly	Ile	Tyr	Gly	Leu	128	
337	ATT	GAT	CTG	GGT	ATC	GAA	TAT	GAC	CCA	AGC	ATT	GGT	ATC	TAC	GGC	CTG	384	
129	Asp	Phe	Tyr	Val	Val	Leu	Gly	Arg	Pro	Gly	Phe	Ser	Ile	Ala	Asp	Lys	144	
385	GAC	TTC	TAT	GTG	GTG	CTG	GGT	AGG	CCA	GGT	TTC	AGC	ATC	GCA	GAC	AAG	432	
145	Lys	Arg	Arg	Thr	Gly	Cys	Ile	Gly	Ala	Lys	His	Arg	Ile	Ser	Lys	Glu	160	
433	AAG	CGC	AGG	ACA	GGC	TGC	ATT	GGG	GCC	AAA	CAC	AGA	ATC	AGC	AAA	GAG	480	
161	Glu	Ala	Met	Arg	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Tyr	Asp	Gly	Ile	Ile	Leu	Pro	176	
481	GAG	GCC	ATG	CGC	TGG	TTC	CAG	CAG	AAG	TAT	GAT	GGG	ATC	ATC	CTT	CCT	528	
177	Gly	Lys																
529	GGC	AAA	TAA	ATT	CCC	GTT	TCC	ATC	CAA	AAG	AGC	AAT	AAA	AAG	TTT		573	
574	TCA	poly(A)-тракт																
																	M245	
																	M228	
																	M345	

Нуклеотидная последовательность кДНК RPL11. Иницирующий кодон ATG и стоп-кодон TAA выделены рамками. Позиции амплификационных праймеров M111, M112, M345 и M228, а также oligo(dT)-содержащего праймера M245 показаны стрелками.

Первичная структура кДНК RPL11 зарегистрирована в EMBL-банке нуклеотидных последовательностей под номером X79234.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса миелобластома птиц, Таq-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4, эндонуклеазы рестрикции PvuII, HincII, Y-GAL (Biopol, Москва). Олигодезоксирибонуклеотид-

ные праймеры были синтезированы О.А. Батуриной (НИБХ СО РАН).

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 MgCl<sub>2</sub>, 50 мкМ dNTP, 3 мкг poly(A)<sup>+</sup>-мРНК и 20 ед. AMV РНК-зависимой ДНК-полимеразы. По окончании обратной транскрипции 2 мкл реакционной смеси использовали как источник одноцепочечной кДНК в амплификации специфической кДНК. ПЦР осуществляли согласно [10]. Амплификацию проводили в течение 35 циклов в следующем режиме:

денатурация – 94°C, 1 мин; отжиг праймеров – 40 - 55°C, 1 мин; полимеризация – 72°C, 2 мин. Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе БИС (пос. Кольцово, Новосибирская обл.). Лигирование, трансформацию и отбор рекомбинантных клонов осуществляли согласно [11].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wool I. G., Endo Y., Gluck A. // Structure, Function and Evolution of Ribosomes / Eds Hill W.E. et al. Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1990. P. 203 - 214.
2. Zaman G.J.R. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 7. P. 1673.
3. Nobori T., Hexdall L.E., Carson D.A. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 22. P. 7105.
4. Metspalu A., Rebane A., Hoth S., Pooga M., Stahl J., Kruppa J. // Gene. 1992. V. 119. № 2. P. 316 - 319.
5. Johnson K.R. // Gene. 1993. V. 123. № 2. P. 283 - 285.
6. Hemmerich P., von Mikecz A., Neumann F., Soezen O., Wolff-Vorbeck G., Zobelein R., Krawinkel U. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 2. P. 223 - 231.
7. Chu W., Presky D.H., Swerlick R.A., Burns D.K. // Nucl. Acids Res. 1993. V. 21. № 7. P. 1672.
8. Pata I., Hoth S., Kruppa J., Metspalu A. // Gene. 1992. V. 121. № 2. P. 387 - 392.
9. Чувпило С.А., Кравченко В.В. // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 13. С. 1634 - 1637.
10. Филипенко М.Л., Владимиров С.Н., Муравлев А.И., Карпова Г.Г., Мертвецов Н.П. // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20. № 6. С. 644 - 649.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

## Cloning cDNA Encoding L11 Human Ribosomal Protein and Its Sequence Analysis

V. P. Mishin, M. L. Filipenko, A. I. Muravlev, G. G. Karpova, and N. P. Mertvetsov

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division of Russian Academy of Sciences,  
Lavrentjev Prospect 8, Novosibirsk 630090, Russia*

**Abstract** – A polymerase chain reaction strategy was employed to isolate cDNA encoding L11 human ribosomal protein. Based on the known nucleotide sequence of 5'-region of the ribosomal protein L11 mRNA, we have designed primers and used them in amplification of corresponding sequence of human cDNA from total placenta cDNA. The fragment of RPS26 cDNA was cloned in plasmid vector and sequenced. Sequence analysis showed that there is high homology (88%) between coding regions of RPS26 mRNAs in rat liver and human placenta. The amino acid exchanges were observed at positions: 91 (Asp → Glu), 217 (Thr → Ala), 352 (Lys → Glu).

*Key words: ribosomal protein genes, cDNA, PCR.*