



УДК 577.212.3:577.217.343'112

КАРТИРОВАНИЕ ГЕНОВ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ S14 И S17 НА ХРОМОСОМАХ ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ кДНК ИЗ ПАНЕЛИ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК

© 1995 г. М. Л. Филипенко, Е. И. Янцен, А. И. Муравлев, Е. П. Копанцев*, Г. Г. Карпова, Н. П. Мертвецов

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН, Новосибирск;

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

Поступила в редакцию 01.12.93 г. После доработки 25.07.94 г.

Предложен новый способ картирования транскрипционно активных генов рибосомных белков на хромосомах человека. Метод основан на детекции экспрессии мРНК рибосомного белка человека в гибридных клетках грызун × человек, несущих разные хромосомы человека. С помощью этого метода на хромосоме 15 был локализован функциональный ген рибосомного белка S17 человека и подтверждена локализация гена рибосомного белка S14 на хромосоме 5.

Ключевые слова: гены рибосомных белков, гибридные клетки, транскрипция.

Для понимания механизмов координируемой регуляции экспрессии функционально зависимой группы генов, к которым относятся, в частности, гены рибосомных белков [1], важно иметь информацию об их структурной организации на хромосомах. В мультигенном семействе каждого рибосомного белка только один ген является активно транскрибируемым, остальные же представляют собой псевдогены [2]. Псевдогены являются ревертированными копиями процессирующей мРНК соответствующего рибосомного белка [3]. Их наличие в геноме млекопитающих существенно затрудняет картирование транскрипционно активных генов рибосомных белков человека гибридизационными методами. Поэтому мы предприняли попытку разработать метод, позволяющий быстро и надежно картировать функциональные гены рибосомных белков на хромосомах человека. Известно, что гены рибосомных белков принадлежат к группе облигатных генов (house-keeping genes) и являются высококонсервативными [4]. Основываясь на этом факте, логично предположить, что синтез мРНК рибосомного белка, локализованного на хромосоме человека, не подавляется в гибридной клетке (грызун × человек), несущей эту хромосому человека. Таким образом, тестируя суммарную мРНК из моносомных гибридных клеток на наличие мРНК рибосомных белков человека, можно локализовать транскрибируемый ген. Такое тестирование может быть осуществлено методом полнимерной

разной цепной реакции (ПЦР) на панели суммарных кДНК из гибридных клеток грызун × человек, несущих разные хромосомы человека, с использованием пары праймеров к кДНК исследуемого рибосомного белка. В том случае, если используемые праймеры амплифицируют только кДНК человека, экспрессия мРНК рибосомного белка человека может быть обнаружена простым электрофорезом в полиакриламидном геле. Если же амплифицируются кДНК человека и мыши одновременно, тестирование проводится рестрикционным анализом продуктов амплификации.

Для проверки такого способа картирования нами были выбраны рибосомные белки человека S14 и S17 (RPS14 и RPS17 соответственно), гены которых уже картированы на хромосоме 5 [5]. Информация о функциональности гена RPS17 в отличие от RPS14 [5] до настоящего времени не имелась. На основе известных нуклеотидных последовательностей мРНК RPS14 и RPS17 человека [6, 7] нами были синтезированы две пары праймеров: P14a – асacatctgccgtgtgactg, P14b – ttccctgcgagtgctgtcaga (для амплификации фрагмента кДНК RPS14 размером 277 п. о.) и P17a – ttgatctttaccaggacc, P17b – ccgtgtgccagatttatg (для амплификации фрагмента кДНК RPS17 размером 478 п. о.). В качестве матрицы для ПЦР использовали одноцепочечную кДНК, синтезированную при помощи АМV ревертазы на суммарных РНК из гибридных клеток грызун × человек, из плаценты человека и мышинной клеточной линии А9. Для проверки наличия геномной ДНК человека в препаратах кДНК каждого клона проводили ПЦР, используя в качестве матрицы

Адрес для переписки: 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 8, Мертвецову Н. П.
Факс: (3832) 351665; E-mail: Mertv@modul.bioch.nsk.su.

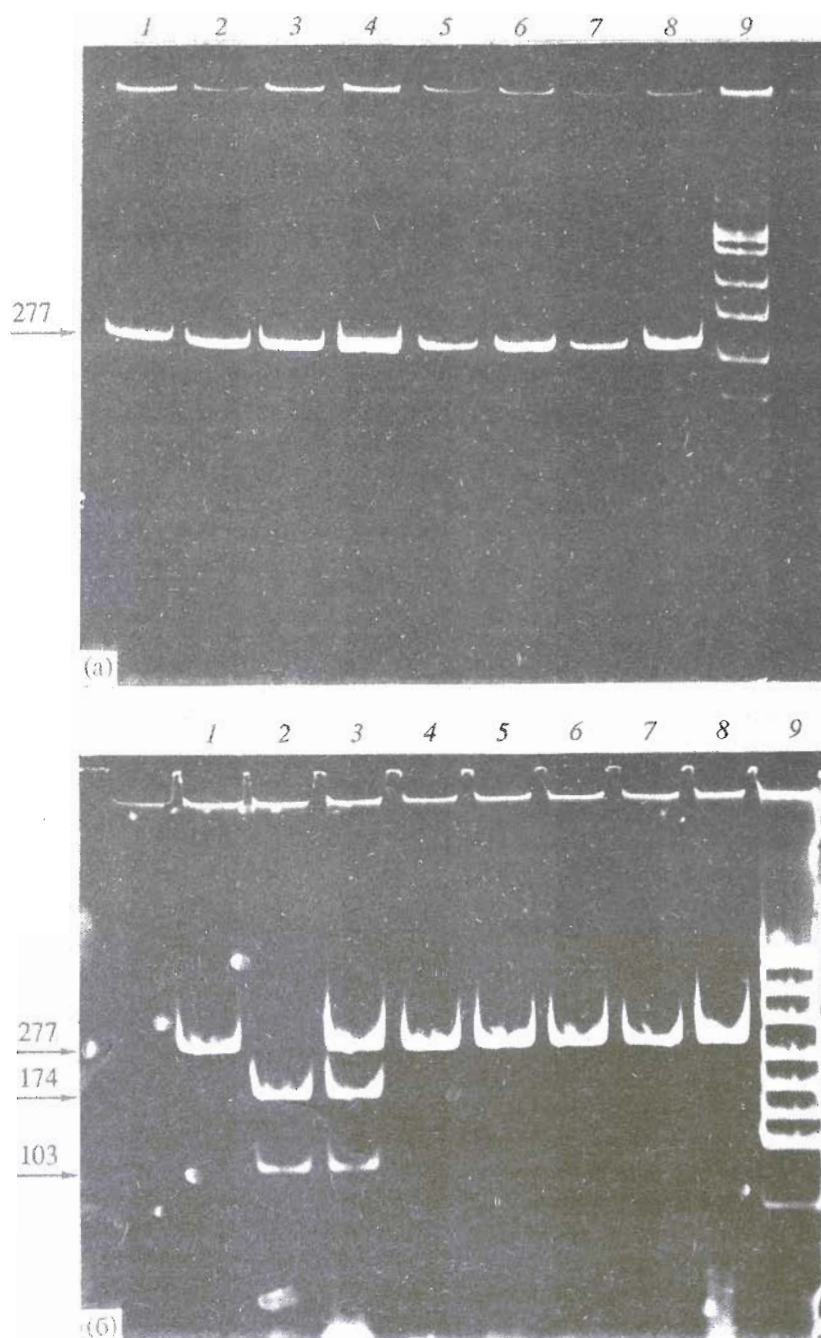


Рис. 1. Анализ электрофорезом в 6% ПААГ продуктов амплификации кДНК RPS 14 (а) и *ApaI*-гидролиза этих амплификационных смесей (б): 1 – суммарная кДНК мыши (линия А9), 2 – кДНК плаценты человека, 3 – 8 – кДНК из гибридных клеток, несущих хромосомы человека 5, 13, 15, 18, 21, X соответственно, 9 – *MspI*-фрагменты рестрикции плазмиды рUC19. Стрелкой помечено положение на электрофореграмме фрагмента кДНК ожидаемого размера (277 п. о.).

суммарные РНК из гибридных клеток. При анализе таких амплификационных смесей гель-электрофорезом не было обнаружено фрагментов ДНК нужного размера, что говорит об отсутствии геномной ДНК в препаратах РНК (данные не приведены).

Вследствие высокой гомологии нуклеотидных последовательностей мРНК рибосомного белка

S14 человека и мыши нам не удалось подобрать условий для специфической амплификации выбранного фрагмента только на кДНК человека. Однако компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей выбранного фрагмента кДНК показал наличие сайта рестрикции *ApaI* в кДНК человека и отсутствие этого сайта во фрагменте кДНК мыши. Поэтому в дальнейшем амплификационные смеси

подвергали гидролизу рестриктазой *ApaI*. Продукты гидролиза анализировали гель-электрофорезом (рис. 1). Наличие рестрикционных фрагментов размером 174 и 103 п. о. (что совпадает с рестрикционной картой фрагмента кДНК человека) в *ApaI*-гидролизате амплификационной смеси с кДНК из гибридных клеток, несущих хромосому 5 человека, свидетельствует о присутствии мРНК и соответственно функционального гена рибосомного белка S14 человека в этих клетках. Таким образом, используя предложенный нами метод, мы подтвердили локализацию функционального гена RPS14 на хромосоме 5 человека.

Далее этот же подход был применен нами для картирования на хромосоме функционального гена RPS17. Для этого были выбраны праймеры к 5'- и 3'-нетранслируемым областям мРНК RPS17, где гомология человеческой и мышшиной мРНК минимальна. В результате нам удалось добиться специфической амплификации с праймеров P17a и P17b только человеческой кДНК. Продукты амплификации фрагмента кДНК RPS17 на панели кДНК из гибридных клеток, а также на суммарных человеческой и мышшиной кДНК подвергали электрофоретическому анализу в ПААГ (рис. 2). Мы не наблюдали среди продуктов амплификации с кДНК из гибридных клеток, несущих хромосому 5 человека, фрагмента размером 478 п. о. Однако этот фрагмент появлялся в амплификационной смеси на кДНК из клеток, несущих хромосому 15 человека, и на суммарной кДНК человека. Следовательно, можно заключить, что функциональный ген RPS17 находится на хромосоме 15 человека.

Ген RPS17 – один из немногих генов рибосомных белков человека, нуклеотидная последовательность которых полностью известна [8]. Это позволило нам провести его картирование, используя подход, в основе которого лежит тот факт, что интронсодержащий ген рибосомного белка транскрипционно активен и единственен в каждом мультигенном семействе [2]. С учетом известной нуклеотидной последовательности гена RPS17 человека были выбраны два дезоксирибоолигонуклеотида в качестве праймеров для амплификации фрагмента интрона этого гена (2310 - 2626) [8] размером 316 п. о.: P17c – gtgcattgagttagtcgcs и P17d – sacccaagtatgcaaaaggac. Выбранные праймеры были использованы для амплификации на панели ДНК из гибридных клеток грызун × человек, несущих разные хромосомы человека. В полученных амплификационных смесях проверяли наличие фрагмента ДНК нужного размера. Хромосомный состав гибридных клеток, а также результаты амплификации приведены в табл. 1 и 2. Видно, что наличие амплифицируемого фрагмента наблюдается только в случае ДНК из гибридных клеток, несущих хромосому 15 человека, что позволяет

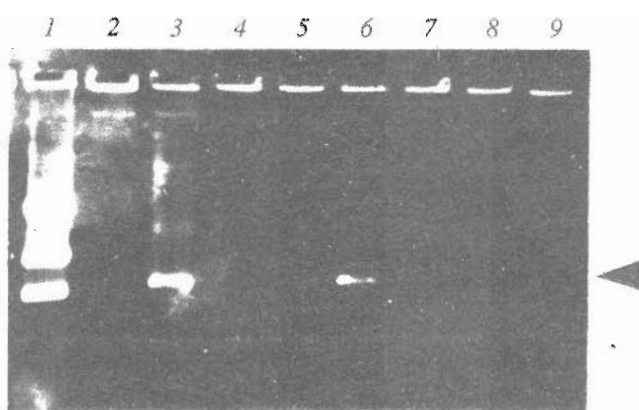


Рис. 2. Анализ электрофорезом в 1.2% агарозном геле продуктов амплификации кДНК RPS17: 2 – суммарная кДНК мыши (линия А9), 3 – кДНК плаценты человека, 4-9 – кДНК из гибридных клеток, несущих хромосомы человека 5, 13, 15, 18, 21, X соответственно, 1 – *TaqI*-фрагменты рестрикции плазмиды pUC19. Стрелкой отмечено положение на электрофореграмме фрагмента кДНК ожидаемого размера (478 п. о.).

отнести интронсодержащий функциональный ген RPS17 к этой хромосоме.

Картирование гена RPS17, описанное в работе [5], осуществляли методом блот-гибридизации кДНК RPS17 с гидролизатами ДНК из панели гибридных клонов, несущих хромосомы человека. Этот метод должен с большей вероятностью выявлять множественные псевдогены рибосомных

Таблица 1. Хромосомный состав гибридных клеток картирующей панели n1 и результаты амплификации фрагмента интрона RPS17 на препаратах ДНК из этой панели (плюс или минус – наличие или отсутствие фрагмента ожидаемого размера в амплификационной смеси)

Клон	Хромосомный состав	R
NA09925	1, 2, 4 - 8, 12, 14 - 20, 22	+
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 - 22	-
NA09940	3, 7, 8, 15, 17	+
NA10324	X	-
NA10611	9	-
NAIMR91	Human line IMR91	+
NA00347a	Mouse line B-82	-

Таблица 2. Хромосомный состав гибридных клеток картирующей панели n2 и результаты амплификации фрагмента интрона RPS17 на препаратах ДНК из этой панели (плюс или минус – наличие или отсутствие фрагмента ожидаемого размера в амплификационной смеси)

Клон	Хромосомный состав	R
7SM01	10, 11, 14, 18, 19, 21, 22, X	-
8M14	1, 3, 5, 6, 8 - 17, 19, 21, 22, X	+
6SL07-TG1	3, 4, 8 - 10, 12 - 14, 16 - 19, 21	-
5L05	3, 6, 9, 10, 12 - 14, 17, 20, X	-
5L27	4, 11, 16, 20, 22, X	-
5L17-2	1, 3, 4, 8, 10, 14, 15, 17 - 22, X	+
6L01	1, 2q, 4 - 6, 8 - 16, 18 - 20, 22, X	+
8SM22-2	1, 4, 5, 9, 12, 18, 20, X	-
6L05	5, 8, 21, X	-
6SL01	1, 2 - 6, 8 - 14, 16 - 21, X	-
6L04	10, 13, 19, X	-

белков, представляющие собой фактически копии мРНК, разбросанные по разным хромосомам. Принимая во внимание отсутствие интронов у гена RPS17, локализованного на хромосоме 5 человека, а также отсутствие транскрипции, можно сделать вывод, что на этой хромосоме ранее был локализован один из псевдогенов RPS17.

Предложенный нами методический подход, по-видимому, может быть применен для картирования других генов человека, экспрессия которых не подавляется в гибридных клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали РНК-зависимую ДНК-полимеразу вируса миелобластома птиц (AMV-ревертаза), *Taq*-ДНК-полимеразу и эндонуклеазу рестрикции *ApaI* (Biozol, Москва). Картирующая панель ДНК n1 была получена из Coriell Cell Repositories, картирующая панель ДНК n2 была предоставлена Е.Д. Свердловым (ИБХ РАН, Москва). Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы В.В. Горном (НИБХ СО РАН). Панель кДНК была сконструирована на основе суммарных РНК из моносомных гибридных клеток мышь × человек, несущих хромосомы 5, 13, 15, 18, 21, X человека, клеток мыши А9, суммарной РНК из плаценты человека. Гибридные клетки были предоставлены А.Г. Шиловым (ИЦиГ, Новосибирск).

Для выделения суммарной РНК человека использовали ткань плаценты. РНК выделяли гуанидин-изотиоцианатным методом [9], суммарные РНК из культур гибридных клеток – по методу, описанному в [10].

Обратную транскрипцию проводили 1 ч при 42°C в 50 мкл буфера, содержащего 5% mM трис-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 50 мкМ dNTP, 10 мкг РНК, 0.5 мкг (dT)₁₆-праймера и 20 ед. РНК-зависимой ДНК-полимеразы AMV. Реакционную смесь осаждали этанолом, растворяли в 10 мкл воды и 5 мкл реакционной смеси использовали как источник одноцепочечной кДНК в амплификации специфической кДНК. Амплификацию проводили в 50 мкл буфера, содержащего 67 mM трис-HCl (pH 8.9), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% твин 20, 10 mM β-меркаптоэтанол, dNTP (100 мкМ каждый), 1 мкМ праймеры, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы. Амплификацию проводили в течение 32 циклов в следующем режиме. Для RPS14 денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг праймеров – 1 мин при 58°C, элонгация – 1 мин при 72°C; для RPS17 в случае праймеров P17a и P17b: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг праймеров – 1 мин при 55°C, полимеризация – 1 мин при 72°C; для RPS14 в случае праймеров P17c и P17d денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг праймеров – 1 мин при 62°C, элонгация – 1 мин при 72°C. ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе "БИС" (пос. Кольцово Новосибирской обл.). Для проведения рестрикционного анализа амплификационные смеси осаждали этанолом, растворяли в 10 мкл воды и 5 мкл использовали для гидролиза рестриктазой *ApaI*. Полученные амплификационные смеси и их гидролизаты анализировали электрофорезом в 6% полиакриламидном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mager W.H. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 949. № 1. P. 1 - 15.
2. Davies B., Feo S., Heard E., Fried M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 7. P. 6691 - 6695.
3. Yacks C., Powaser C., Hackett P. // Gene. 1988. V. 74. P. 565 - 570.
4. Wittman-Liebold B., Kopke A.K.E., Arnd E., Kromer W., Hatakeyama T., Wittman H.-G. // Structure, Function and Evolution of Ribosomes / Eds Hill W.E. et al. Washington: Amer. Soc. Microbiol., 1990. P. 203 - 214.
5. Nakamichi N.N., Fa-Ten-Kao, Wasmuth J., Roufa D.J. // Somatic Cell and Mol. Genet. 1986. V. 12. № 3. P. 225 - 226.
6. Rhoads D.D., Dixit A., Roufa D.J. // Mol. and Cell. Biol. 1986. Aug. P. 2774 - 2783.
7. Chen I.T., Dixit A., Rhoads D., Roufa D.J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 15. P. 6907 - 6911.
8. Chen T., Roufa D.J. // Gene. 1988. V. 70. № 1. P. 107 - 116.
9. Chomczynski P., Sacchi N. // Anal. Biochem. 1987. V. 162. № 1. P. 156 - 159.
10. Kawasaki E. // PCR Technology / Eds Erlich H.A. Stockton Press, 1989. P. 37.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Mapping Genes of Ribosomal Proteins S14 and S17 onto Human Chromosomes Using cDNA from a Panel of Hybrid Cells

M. L. Filipenko, E. I. Yantsen, A. I. Muravlev, E. P. Kopantsev*,
G. G. Karpova, and N. P. Mervetsov

Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

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

Abstract – A new method of mapping transcriptionally active genes of ribosomal proteins onto human chromosomes is proposed. The method is based on the detection of the expression of human ribosomal protein mRNA in rodent–human hybrid cells carrying different human chromosomes. Using this method, the functional gene of the human ribosomal protein S17 was mapped and the location of the S14 ribosomal protein gene on chromosome 5 was confirmed.

Key words: ribosomal protein genes, hybrid cells, transcription.