



УДК 577.212.3:577.217.343'112

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА КОДИРУЮЩЕЙ ЧАСТИ ГЕНА ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ РИБОНУКЛЕАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЛОКАЛИЗАЦИЯ НА ХРОМОСОМАХ

© 1995 г. А. В. Кочетов[#], В. В. Лукашева, М. Л. Филиппенко^{*},
Н. П. Мертвецов*, М. И. Ривкин

Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Лаврентьева, 10;

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

Поступила в редакцию 27.10.94 г. После доработки 14.03.95 г.

На основании известной первичной структуры гена панкреатической рибонуклеазы мыши выбраны два дезоксирибоолигонуклеотида в качестве праймеров для амплификации гена панкреатической рибонуклеазы человека. Проведено клонирование полученного в результате полимеразной цепной реакции фрагмента ДНК и определена его нуклеотидная последовательность. Осуществлена локализация гена панкреатической рибонуклеазы на хромосоме 14 человека.

Ключевые слова: панкреатическая рибонуклеаза; полимеразная цепная реакция; гены, картирование.

Панкреатические рибонуклеазы представляют собой группу гомологичных белков, которые в значительных количествах производятся и секретируются экзокринными клетками поджелудочной железы млекопитающих. Рибонуклеазы благодаря небольшой величине, доступности и высокой стабильности представляют собой весьма удобные модели для исследования структуры белка и являются объектом интенсивного изучения. В настоящее время определены аминокислотные последовательности и охарактеризованы свойства около 50 представителей семейства панкреатических рибонуклеаз [1]. Исследованы структуры генов панкреатических рибонуклеаз мыши и быка. Показано, что кодирующие области этих генов не содержат инtronов и определяют синтез белков-предшественников размером 150 а. о. [2, 3]. Аминокислотная последовательность рибонуклеазы человека была опубликована в 1984 г. [4], однако структура гена до сих пор не изучена. В данной работе определена структура кодирующей области гена панкреатической рибонуклеазы человека и проведено картирование гена панкреатической рибонуклеазы на хромосомах человека.

На основании данных об отсутствии инtronов в белок-кодирующих районах генов рибонуклеаз мыши и быка [2, 3] было сделано предположение, что кодирующая область гена панкреатической рибонуклеазы человека также не содержит ин-

tronов. Это позволило применить для клонирования кодирующей последовательности гена метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы геномную ДНК человека.

В результате анализа известной нуклеотидной последовательности гена панкреатической рибонуклеазы мыши [3] мы выбрали и синтезировали два дезоксирибоолигонуклеотида – Р1 (отвечающий участкам кодирующей части гена от +865-го до +894-го нуклеотида) и Р2 (гомологичный участку кодирующей части гена от +1301-го до +1318-го нуклеотида), которые использовали в качестве праймеров для амплификации:

Р1 5' ACCATGGGTCTGGAGAAGTC
и Р2 5'CCTACACAGTACCATCAA.

Среди продуктов амплификации на плацентарной геномной ДНК человека был обнаружен фрагмент длиной около 460 п. о., соответствующий величине, предсказанной для искомого гена на основании анализа известных первичных структур генов панкреатических рибонуклеаз мыши и быка [2, 3]. Фрагмент выделяли из геля и лигировали с линеаризованной эндонуклеазой EcoRV плазмидой pBluescript SK. Анализ плазмидной ДНК из клонов, дефектных по lacZ-системе, проводили с помощью рестриктазы PvuII (результаты не показаны). Нуклеотидная последовательность вставок из трех независимых клонов была определена модифицированным методом Сэнгера [5] (рис. 1). Все три структуры оказались полностью идентичными.

[#] Автор для переписки. Факс: (3832) 356558; E-mail: Rivkin@cgi.nsk.su.

праймер (P1)												
(5')	accatgggtctggagaagtc	tctt	Leu	Val	Arg	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Leu
Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Gly	Trp	Val	Gln	Pro	Ser	Leu	Gly
ata	ctg	ctg	gtg	ctg	ggc	tgg	gtc	cag	cct	tcc	ctg	ggc
1	Lys	Glu	Ser	Arg	Ala	Lys	Phe	Gln	Arg	Gln	His	Met
aag	gaa	tcc	cgg	gcc	aag	aaa	ttc	cag	cgg	cag	cat	atg
Asp	Ser	Asp	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Cys
gac	tca	gac	agt	tcc	ccc	agc	agc	agc	tcc	acc	tac	tgt
30	Asn	Gln	Met	Met	Arg	Arg	Arg	Asn	Met	Thr	Gln	Gly
aac	caa	atg	atg	agg	cgc	cgg	aat	aat	atg	aca	cag	ggg
40	Cys	Lys	Pro	Val	Asn	Thr	Phe	Val	His	Glu	Pro	Leu
tgc	aaa	cca	gtg	aac	acc	ttt	gtg	cac	gag	ccc	ctg	gta
Asp	Val	Gln	Asn	Val	Cys	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Thr	Cys
gat	gtc	cag	aat	gtc	tgt	ttc	cag	gaa	aag	gtc	acc	tgc
70	Lys	Asn	Gly	Gln	Gly	Asn	Cys	Tyr	Lys	Ser	Asn	Ser
aag	aac	ggg	cag	ggc	aac	tgc	tac	aag	agc	aac	tcc	agc
80	Met	His	Ile	Thr	Asp	Cys	Arg	Leu	Thr	Asn	Gly	Ser
atg	cac	atc	aca	gac	tgc	cgc	ctg	aca	aca	aac	ggc	agg
100	Tyr	Pro	Asn	Cys	Ala	Tyr	Arg	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg
---(5')	tac	ccc	aac	tgt	gca	tac	cgg	acc	agc	ccg	aag	aga
His	Ile	Ile	Val	Ala	Cys	Glu	Gly	Ser	Pro	Tyr	Val	Pro
cac	atc	att	gtg	gcc	tgt	gaa	ggg	agc	cca	tat	gtg	cca
119	Val	His										
gtc	cact											
		aactaccatgacacatcc (5')										
		праймер (P2)										

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность кодирующей части гена панкреатической рибонуклеазы человека и соответствующая ей аминокислотная последовательность. Аминокислотные остатки последовательности зрелого белка пронумерованы. Фрагменты ДНК, соответствующие праймерам P1, P2, P89, P90, подчеркнуты.

Нуклеотидная последовательность гена панкреатической рибонуклеазы человека была зарегистрирована нами в банке данных EMBL (код X79235). Аминокислотная последовательность, полученная на основе данных о нуклеотидной последовательности кодирующей части гена, включает последовательность зрелого белка рибонуклеазы человека (за исключением восьми C-концевых аминокислот) и соответствует опубликованным ранее данным о структуре этого белка (рис. 1) [4]. N-Концевой фрагмент данной аминокислотной последовательности (в силу особенностей клонирования его структура также определена не полностью), возможно, выполняет роль лидерного пептида.

Для картирования гена рибонуклеазы на хромосомах человека в качестве праймеров для амплификации внутреннего фрагмента этого гена размером 250 п. о. были выбраны два дезоксирибоолигонуклеотида:

P89 5'-CATATGGACTCAGACA
и P90 5'-GTACCTCGAGCCGTTT.

Праймеры соответствовали участкам гена рибонуклеазы человека, не имеющим выраженной гомологии с геном рибонуклеазы мыши, и были использованы для амплификации на ДНК гибридных клонов тряпун \times человек, несущих разные хромосомы человека. Из рис. 2 видно, что при использовании выбранных нами параметров

ПЦР происходит специфическая амплификация фрагмента гена панкреатической рибонуклеазы человека.

Хромосомный состав гибридных клеток, а также результаты амплификации приведены в таблице. Наличие амплифицируемого фрагмента при анализе продуктов ПЦР строго коррелировало с присутствием в гибридных клетках хромосомы 14 человека. Следует отметить, что ген рибонуклеазы мыши локализован на 14-й хромосоме в сегменте, гомологичном сегменту 14q11 14-й хромосомы человека [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали бактериальный штамм *E. coli* XL1-Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, [F, *proAB*, *lacI^q* *lacZ* M15, Tn10(*tet*^r)], а также *Taq*-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4, эндонуклеазы рестрикции *EcoRV* и *PvuII*, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, 5-бром-3-индолил-D-галактозид (Biopol, Москва), [α -³²P]ATP с уд. акт. 40 ПБк/моль ("Радиопрепарат", Ташкент). Олигодезоксирибонуклеотидные праймеры были синтезированы В.В. Горном (НИБХ СО РАН).

Картирующая панель была получена из Coriell Cell Repositories, USA (кллоны серии NAO), ДНК из клонов 5L27, 8SM22-2, 6L04, Ag17 была представлена Е.В. Копанцевым (ИБХ РАН, Москва).

Полимеразную цепную реакцию проводили на ДНК-амплификаторе "БИС" (пос. Кольцово Новосибирской обл.). Реакционная смесь (30 мкл) содержала 67 мМ трис-HCl (рН 8.9), 16 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 мМ MgCl₂, 0.01% Tween 20, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 100 мкМ dNTP, 1 мкМ праймеры, 2 ед. акт. *Taq*-ДНК-полимеразы, 100 нг геномной ДНК.

Амплификацию проводили в течение 35 циклов в следующем режиме: денатурация – 94°C, 1 мин; стягивание праймеров – 55°C, 1 мин (для праймеров P1 и P2) и 62°C, 1 мин (для праймеров P3 и P4); полимеризация – 72°C, 1 мин. Полученные амплификационные смеси анализировали электрофорезом в 6% полиакриламидном геле с последующей визуализацией ДНК бромистым этидием [7].

Клонирование и секвенирование полученных фрагментов ДНК. Фрагмент ДНК размером около 460 п.о., предсказанным на основании анализа структуры генов панкреатических рибонуклеаз мыши и быка [2, 3], элюировали из геля и克лонировали по тупым концам в плазмидный вектор pBluescript SK (Stratagene, USA), гидролизованный рестриктазой *EcoRV*. Отбор рекомбинантных клонов проводили фенотипически (колонии, дефектные по *lacZ*-системе) и по анализу ДНК плазмид из этих колоний рестриктазой *PvuII*.

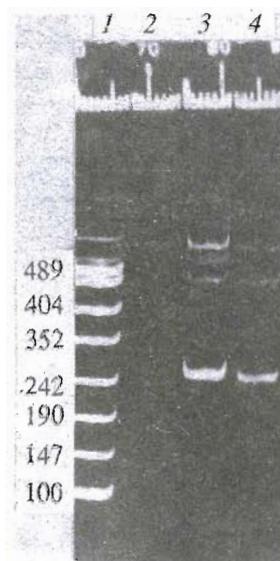


Рис. 2. Электрофорез в 6% ПААГ' образцов, полученных в результате амплификации внутреннего фрагмента гена рибонуклеазы человека на геномной ДНК мыши (2), человека (3), на ДНК гибридного клона мышь × человек, несущего 14-ю хромосому человека (4). 1 – маркеры длины (гидролизат плазмиды PUC19 рестриктазой *MspI*; цифры слева – величины фрагментов, п. о.). Стрелкой отмечен фрагмент размером 250 п. о.

Элюцию фрагментов ДНК из геля, выделение плазмидной ДНК, расщепление рестриктазами, спlicing ДНК-лигазой фага T4, трансформацию клеток *E. coli* XL1-Blue и фенотипический отбор

Хромосомный состав гибридных клеток картирующей панели и результаты амплификации фрагмента гена рибонуклеазы на препаратах ДНК из этой панели

Клон	Хромосомный состав	R*
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, 21, 22	+
NA09940	3, 7, 8, 15, 17	-
5L27	4, 11, 16, 20, 22, X	-
8SM22-2	1, 4, 5, 9, 12, 18, 20, X	-
6L04	10, 13, 19, X	-
NAIMR91	Человеческая линия IMR 91	+
NA00347a	Мышьявая линия B-82	-
Ag17-1	Хомячья линия Ag17-1	-

* "+" – наличие фрагмента ожидаемого размера в амплификационной смеси.

гибридных клонов (*lac*-дефектных) осуществляли стандартными методами, описанными в работе [7]. Нуклеотидные последовательности вставок определяли модифицированным методом Сэнгера [5].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beintema J.J., Fitch W.M., Carsana A. // Mol. Biol. Evol. 1986. V. 3. P. 262 - 275.
2. Carsana A., Confalone E., Libonati M., Furia A. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 5491 - 5502.
3. Samuelson L.C., Wiebauwer K., Howard G., Schmid R.M., Kooplin D., Meisler M.H. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 6935 - 6941.
4. Beintema J.J., Weickman J.K., Glitz D.G. // Anal. Biochem. 1984. V. 136. P. 8 - 64.
5. Heon M.L., Pene J.J. // Gene Anal. Techn. 1988. V. 5. P. 32 - 39.
6. Elliot R.W., Samuelson L.C., Lambert M.S., Meisler M.H. // Cytogen. Cell Genetics. 1986. V. 42. P. 110 - 112.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.

Primary Structure and Chromosomal Localization of the Coding Region of Human Pancreatic Ribonuclease Gene

A. V. Kochetov*,¹ V. V. Lukasheva*, M. L. Filipenko**,
N. P. Mertvetsov**, and M. I. Rivkin*

* Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences,
Siberian Division, pr. akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia

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

Abstract – On the basis of the known primary structure of the gene for murine pancreatic ribonuclease, two deoxyoligonucleotides were selected as primers for amplification of human pancreatic ribonuclease gene. The PCR amplified DNA fragment was subsequently cloned, and its nucleotide sequence was determined. Pancreatic ribonuclease gene was localized on human chromosome 14.

Key words: pancreatic ribonuclease; polymerase chain reaction; genes, mapping.

¹ To whom correspondence should be addressed.