



Doctoral Thesis

## Identification of VNTR-probes in cattle with plasmid-derived iteron repeat sequences

**Author(s):**

Huebscher, Karen Jane

**Publication Date:**

1993

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000904761> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 10115

**IDENTIFICATION OF VNTR-PROBES IN CATTLE WITH  
PLASMID-DERIVED ITERON REPEAT SEQUENCES**

**A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences**

**presented by  
KAREN JANE HUEBSCHER  
Dipl. Ing.-Agr. ETH  
born 4th July 1963  
citizen of Dottikon/AG**

**accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. G. Stranzinger, examiner  
PD Dr. J. Frey, co-examiner  
Dr. G. Dolf, co-examiner**

**ADAG  
Zurich, 1993**

## Zusammenfassung

### IDENTIFIKATION VON VNTR-SONDEN BEIM RIND MIT HILFE VON PLASMID ITERONS.

VNTR-Sonden erzeugen in Southern-Blot-Hybridisierungen mit der fragmentierten DNA der verschiedensten Organismen individualspezifische, polymorphe Bandmuster, die auf repetierte DNA-Sequenzen, das heisst auf Minisatelliten und Mikrosatelliten, zurückzuführen sind. Zur Entwicklung solcher Sonden kann man sich verschiedenster Ansätze bedienen. Die Funktion solcher repetierter Sequenzen in höheren Eukaryoten ist weitgehend unbekannt.

Iterons sind repetierte Sequenzen beim DNA-Replikationsursprung von Plasmiden, welchen eine bedeutende Kontrollfunktion in der Replikation zukommt. Die Länge und die Zusammensetzung ihrer Kernsequenzen ist mit denjenigen der Minisatelliten in Säugetieren vergleichbar. Diese Aehnlichkeiten waren der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit.

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit den drei stringent kontrollierten Plasmiden P1, pSC101 und RSF1010 durchgeführt. In Southern-Blot-Hybridisierungen mit *Pst*I und *Hinf*I verdauter DNA von Rind, Esel und Mensch erzeugten sie unter Einhaltung niedriger Temperaturen polymorphe Muster. Zur Entwicklung einer spezifischen VNTR-Probe, die auch bei höherer Stringenz einsetzbar sein sollte, verwendeten wir das Plasmid P1 weiter. Dazu wurde Rinder DNA mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaut und der Fragmentbereich zwischen 4 bis 10 Kilobasen (kb) mit Hilfe eines Salzgradienten selektiert. Die DNA-Fragmente wurden in den Vektor pBluescript II SK<sup>-</sup> kloniert und zur Vermehrung in den *E.coli* Stamm JM83 überführt. Die so erstellte Rinder-Genbank wurde mit dem PCR-Produkt des Replikationsursprungs von Plasmid P1 auf das Vorhandensein ähnlicher Sequenzen hin untersucht. Acht Klone wurden isoliert, wovon der Klon pKJH7-5.9 und seine Derivate unter hoher Stringenz bei verschiedenen Tierarten als DNA-Fingerprinting-Sonden eingesetzt werden konnten. Die Sequenzanalyse ergab, dass die dafür verantwortliche Sequenz ein unvollkommener Mikrosatellit ist. Neben der Verwendbarkeit als DNA Fingerprinting Sonde wurde die Möglichkeit der PCR-Analyse der Polymorphismen untersucht. Die Amplifikation von DNA verschiedener Rinder mittels - den Mikrosatelliten flankierenden -

Primersequenzen, liess keinen Längenpolymorphismus am entsprechenden Locus erkennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Versuche durchgeführt, die eine Verbindung von repetierten Sequenzen in Säugetieren mit einer Funktion während der DNA-Replikation ableiten liessen. In der Diskussion wird auf publizierte Ergebnisse aus Untersuchungen mit eukaryotischen Replikationsmodellen eingegangen, welche die Möglichkeit, dass Mini- oder Mikrosatelliten eine Rolle bei der Replikation ausüben könnten, zumindest nicht ausschliessen.

## SUMMARY

### IDENTIFICATION OF VNTR-PROBES IN CATTLE WITH PLASMID-DERIVED ITERON REPEAT SEQUENCES

VNTR-probes produce specific bandpatterns in Southern blot hybridisations of DNA from different organisms, which is due to the presence of repetitive sequences, such as minisatellites and microsatellites, in the DNA. A variety of approaches is possible for the development of such VNTR-probes. The function of repetitive DNA in higher eukaryotes is not yet clear.

Iterons are repeated sequences at the origin of DNA replication in plasmids which assert an important part in the control of DNA replication. The length and the composition of the core sequences is similar to their core sequences of minisatellites in mammals. These similarities lead to the investigations presented in this thesis.

The three stringently controlled plasmids P1, pSC101 and RSF1010 were used as probes in Southern blot hybridisations. They generated under lenient conditions patterns in *Pst*I and *Hinf*I digested DNA of cattle, donkey and man, very similar to the ones which are generated by VNTR probes. P1 generated the strongest patterns and thus was used to develop a specific VNTR-probe, which would generate fingerprint patterns under high stringency. Bovine DNA was digested with *Pst*I and the size range between 4 and 10 kilobases (kb) was selected with a salt gradient. The DNA fragments were cloned into the vector pBluescript II SK<sup>-</sup> and introduced into the host strain JM83. This partial, bovine genomic library was screened for similar sequences with the PCR product of the P1 origin of replication. Eight single colonies were isolated. One clone, pKJH7-5.9, and its derivatives have been used successfully as DNA fingerprinting probes under high stringency with several species. The sequence analysis revealed that a compound, imperfect simple sequence, i.e. a microsatellite, must be responsible for the generation of the observed, polymorphic band patterns. Besides its use as a DNA fingerprinting probe, the possibility of PCR-analysis of length polymorphisms at this microsatellite locus has been investigated. Primers flanking the simple sequence were developed and tested

on bovine DNA samples. The amplification revealed no length variations at this locus.

In this thesis, no investigations were performed which could prove a replicational function of tandem repeated sequences in mammals. In the discussion, publications on eukaryotic replication models have been taken into consideration. The possibility that micro- or minisatellites play a part in replication cannot be ruled out.