

## THIẾT LẬP QUI TRÌNH PHÁT HIỆN NHÂN TỐ ALU Ở NGƯỜI BẰNG KỸ THUẬT PCR

Phan Thị Phượng Trang, Trần Thanh Phong, Nguyễn Đức Hoàng, Trần Linh Thuộc  
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. HCM  
(Bài nhận ngày 13 tháng 10 năm 2004, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 20 tháng 12 năm 2004)

**TÓM TẮT:** Chúng tôi đã thiết kế các cặp mồi dùng để khuếch đại đoạn DNA Alu (nhân tố Alu) tại locus PLAT (plasminogen activator) nằm giữa exon 8 và exon 9 trên nhiễm sắc thể số VIII ở người bằng kỹ thuật PCR (Polimerase Chain Reaction). Tính đặc hiệu của các cặp mồi đã được khảo sát để chọn cặp mồi tối ưu cho qui trình phát hiện DNA Alu-TPA. Thực nghiệm đã hình thành một qui trình đơn giản để tách chiết DNA bộ gen từ nước súc miệng dùng làm khuôn để khuếch đại sự hiện diện của đoạn DNA Alu-TPA bằng kỹ thuật PCR. Các sản phẩm PCR đã được dòng hóa thành công vào pBluescript II KS dùng làm đối chứng trong qui trình. Từ các kết quả đạt được, chúng tôi thiết kế bộ hóa chất giúp dễ dàng trong việc dạy thực tập về kỹ thuật PCR cho các cơ sở đào tạo.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Phương pháp PCR được áp dụng phổ biến khá lâu ở các nước phát triển để nhân bản DNA *in vitro*. Tuy nhiên phương pháp này còn khá mới ở nước ta. Nhằm nâng cao trình độ nhận thức và mục đích áp dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, chúng tôi đã thiết lập một quy trình phát hiện nhân tố Alu TPA ở người bằng phương pháp PCR.

Họ Alu bao gồm những nhân tố DNA ngắn nằm rải rác và chiếm khoảng 5% trong toàn bộ bộ gen người. Trong đó có một nhân tố Alu hiện diện bên trong intron thứ 8 của gen nằm trên nhiễm sắc thể (NST) số VIII gọi tắt là Alu-TPA. Gen chứa đoạn Alu-TPA là gen TPA mã hóa cho một protein hoạt hóa plasminogen (Tissue Plasminogen Activator gene). Nhân tố Alu-TPA có kích thước khoảng 300bp và tùy theo mỗi cá nhân mà sự hiện diện của nhân tố này trong intron thứ 8 của NST số VIII có sự khác nhau; trên một số cá thể thì nhân tố này chỉ hiện diện trên một sợi của NST, một số cá thể khác nhân tố này hiện diện trên cả 2 sợi của NST; trong khi đó, một số cá thể khác thì không có sự hiện diện của nhân tố Alu này. Sự hiện diện khác nhau của nhân tố Alu-TPA trên các cá thể có thể được kiểm tra bằng phương pháp PCR [7], [10], [11].

Từ những kết quả thí nghiệm chúng tôi đã tạo ra một bộ hóa chất (bộ kit) đơn giản để phát hiện nhân tố Alu-TPA trên người nhằm phục vụ cho việc giảng dạy ở các trường đại học, cao đẳng và trung học chuyên ban về kỹ thuật PCR.

### VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

**Hóa chất sử dụng.** Dung dịch SNET [Tris-Cl (pH8), EDTA (pH8), NaCl, SDS], dung dịch PCA (phenol, chloroform, isoamyl alcohol), TE [Tris-Cl, EDTA (pH8)], PCR buffer 10X, dNTP, Mg<sup>2+</sup>, Taq DNA polymerase, mồi, ethidium bromide, dung dịch nạp mẫu, agarose.

**Chủng giống vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy.** *E.coli* DH5α [F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80lacZΔM15, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*, λ<sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] được nuôi cấy ở 37°C trong môi trường Luria-Bertani (LB) (1% tryptone (Difco, Mich, USA), 0,5% yeast extract (Difco) và 1% NaCl) có bổ sung 100μg/ml ampicillin khi cần, được dùng làm tế bào chủ để nhân bản plasmid [4]. Plasmid được sử dụng cùng với chủng chủ trên là pBluescript II KS (+) (Amersham Biosciences) có kích thước 2961bp.

**Tách chiết DNA bộ gen.** Qui trình chuẩn sử dụng proteinase K và phenol/chloroform của Blin N. Stafford D. W. (1976) [2] được dùng để thu nhận DNA làm bản mẫu nhằm khảo sát các cặp mồi. Phương pháp tách chiết nhanh DNA eukaryote được thực hiện theo phương pháp của Bowtell D. D. (1987) [3]. Chuẩn bị DNA bộ gen từ một lượng mẫu nhỏ theo phương pháp của Palmiter R. D. và cộng

sự [8]. Bốn qui trình khác nhau để phân lập nhanh DNA động vật hữu nhũ theo protocol của Molecular Cloning (Shambrook J và Russell W. D.) [9].

**Thiết lập chương trình PCR để khuếch đại DNA bản mẫu.** Từ những nhiệt độ bắt cặp khác nhau chúng tôi đã chọn chương trình phản ứng như sau: 5 phút- 95°C: 1 chu kỳ; 1 phút - 30 giây- 94°C, 1 phút - 58°C, 2 phút - 72°C:1 chu kỳ; 30 giây - 94°C, 45 giây - 58°C, 1 phút - 72°C: 30 chu kỳ, 10 phút- 72°C: 1 chu kỳ [5], [12].

**Chọn cặp môi thích hợp, có độ nhạy độ chính xác và mức độ ổn định cao.** Từ nhiều cặp môi khác nhau (Alu2F/PlatB, Alu2F/Alu2R, Alu2F/Alu1R, PlatA/PlatB, PlatA/Alu2R, PlatA/Alu1R) chúng tôi đã chọn được cặp môi PlatA/Alu1R cho kết quả khuếch đại tốt nhất với biên độ nhiệt độ rộng. Tiến hành khuếch đại đoạn gen có và không có chứa đoạn *Alu TPA* với cặp môi vừa chọn bằng chương trình PCR đã chọn trên. Enzyme *Pfu* DNA polymerase được dùng để khuếch đại do có độ tin cậy cao và tạo đầu bằng cho sản phẩm khuếch đại [5], [6].

**Dot-Blot.** Lấy các sản phẩm DNA khuôn và sản phẩm PCR từ các khuôn trên của cặp môi PlatA/Alu1R đem thực hiện Dot Blot với mẫu dò là sản phẩm khuếch đại từ cặp môi PlatA/Alu1R từ khuôn đồng hợp lặn được tinh chế qua gel agarose. Chuyển các sản phẩm DNA trên lên màng lai bằng hệ thống Dot-Blot, cho lai qua đêm trong buffer lai có chứa mẫu dò, cho hiện phim nhờ bộ Kit ECL.

**Thiết kế plasmid pB-Alu-TPA (+) và pB-Alu-TPA (-).** Đoạn gen có sự hiện diện của nhân tố *Alu* hoặc không có nhân tố *Alu* được khuếch đại nhờ *Pfu* DNA polymerase được dòng hóa vào plasmid pBluescript II KS (+) tại vị trí *SmaI* nhờ enzym  $T_4$  DNA ligase, tạo thành plasmid tái tổ hợp có ký hiệu pB-Alu-TPA (+) và pB-Alu-TPA(-).

**Phương pháp điện biến nạp.** Plasmid được điện biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$  với điện dung 25 $\mu$ F, hiệu điện thế 2,5kV, điện trở 200 $\Omega$  trong dung tích 50 $\mu$ l. Tế bào được hoạt hóa trong 1ml môi trường SOC (tryptone 2%, yeast extract 0,5%, glucose 0,36%, NaCl 0,05%, KCl 0,0186%, MgCl<sub>2</sub> 0,095%), nuôi cấy lắc ở 37°C trong 30 phút. Huyền phù tế bào được trải lên môi trường LB có Ampicillin nồng độ 100 $\mu$ g/ml và X-gal, ủ 37°C trong 14 giờ.

**Sàng lọc thể biến nạp.** Thể biến nạp được sàng lọc dựa trên môi trường LB có bổ sung ampicillin 100 $\mu$ g/ml và X-gal, chọn những khuẩn lạc có màu trắng. Tiếp tục kiểm tra lại bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp môi PlatA/2R. Chương trình phản ứng như sau: 5 phút- 95°C: 1 chu kỳ; 1 phút- 94°C, 45 giây- 55°C, 1 phút- 72°C: 30 chu kỳ; 5 phút 72°C. Chọn được dòng mang vector tái tổ hợp được ký hiệu là pB-Alu-TPA (+) và pB-Alu-TPA (-). Hai vector này tiếp tục được kiểm chứng bằng cắt hạn chế bởi 2 enzym *Bam*HI và *Eco*RI.

**Giải trình tự so sánh và phân tích.** Plasmid được kiểm tra ở trên được đem giải trình tự vùng có đoạn chèn theo phương pháp Sanger sử dụng dideoxynucleotide với cặp môi được sử dụng là T3/T7 trên thiết bị giải trình tự ALF Express II (Amersham Biosciences). Trình tự thu nhận được so sánh với trình tự lý thuyết đã được xác định trên genbank bằng chương trình Jellyfish [3], [5], [10].

## KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

**Chọn cặp môi tối ưu.** DNA được chiết tách từ dịch súc miệng theo qui trình chuẩn sử dụng phenol/chloroform để tinh sạch DNA dùng làm khuôn để khảo sát các cặp môi nhằm khuếch đại đoạn *Alu-TPA*. Phương pháp này cho phép thu nhận DNA có độ tinh sạch cao thích hợp cho việc khảo sát các cặp môi khác nhau. Mẫu DNA được chọn để khảo sát trong thí nghiệm này là mẫu *Alu-TPA (+/-)*.

Đoạn gen chứa *Alu-TPA* trong DNA khuôn từ dịch súc miệng được khuếch đại bằng PCR với một số cặp môi khác nhau có khả năng bắt cặp đặc hiệu với gen chứa *Alu-TPA* được nêu ở phần vật liệu- phương pháp. Từ các kết quả khảo sát các điều kiện của phản ứng PCR, chúng tôi đã chọn cặp môi PlatA/Alu1R vì chúng cho kết quả rõ ràng nhất với biên độ nhiệt độ tương đối rộng (khoảng từ 56°C - 59°C) và đã chọn điều kiện phản ứng với nhiệt độ bắt cặp thích hợp để sản phẩm khuếch đại rõ và đặc hiệu nhất là 58°C.

Kết quả phản ứng PCR từ các cặp môi khác nhau đã được chạy trong cùng một điều kiện với nhiệt độ bất cấp 58°C. Cặp môi PlatA/Alu1R đã được chọn vì chúng cho kết quả rõ nhất.

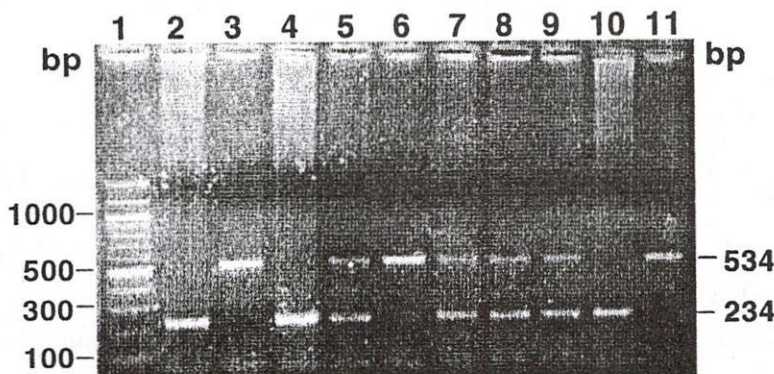
**Khảo sát nồng độ môi.** Cặp môi PlatA/Alu1R được dùng cho phản ứng PCR ở năm nồng độ môi 0,1  $\mu\text{M}$ ; 0,2  $\mu\text{M}$ ; 0,4  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{M}$ ; 0,8  $\mu\text{M}$ . Thấy nồng độ môi từ 0,2 – 0,8  $\mu\text{M}$  đều cho kết quả tốt. Chúng tôi chọn nồng độ môi 0,4  $\mu\text{M}$ .

**Khảo sát nồng độ  $\text{Mg}^{2+}$ .** Chọn bốn nồng độ  $\text{Mg}^{2+}$  lần lượt là 2mM; 4mM; 5mM; 8mM cho cặp môi trên với nồng độ môi 0,4  $\mu\text{M}$  và nhiệt độ 58°C, kết quả cho thấy sản phẩm khuếch đại đều tốt hầu hết ở các nồng độ  $\text{Mg}^{2+}$  được khảo sát.

**Chọn phương pháp tách chiết DNA đơn giản.** DNA đã được chiết tách theo 6 qui trình khác nhau như đã nêu trong phần vật liệu và phương pháp. Từ các kết quả thực nghiệm đó qui trình đơn giản để tách chiết được DNA khuôn cho phản ứng PCR phát hiện nhân tố *Alu-TPA* được hình thành như Sơ đồ 1.

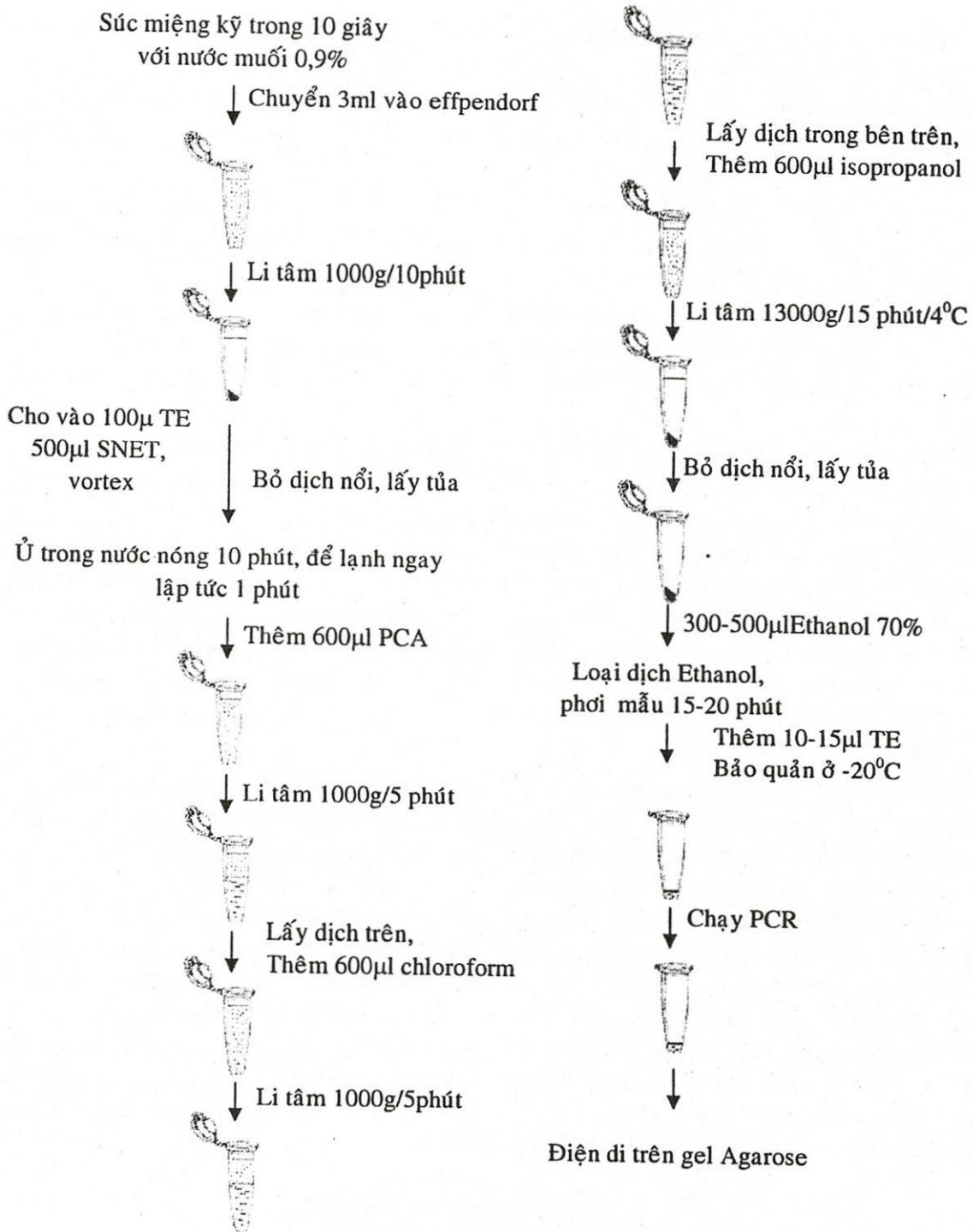
**Các kiểu hình khác nhau của nhân tố *Alu*.** Dùng phương pháp PCR để khuếch đại đoạn gen có chứa hay không có chứa nhân tố *Alu-TPA* với cặp môi PlatA/Alu1R theo chương trình mà chúng tôi đã thiết lập trên 10 mẫu DNA ngẫu nhiên. Kết quả điện di trên gel agarose 2% (Hình 1). Nhân tố *Alu-TPA* trong DNA bộ gen mỗi người sẽ phải là một trong 3 dạng sau: có chứa nhân tố *Alu-TPA* trên hai nhiễm sắc thể (+/+; đồng hợp trội), không chứa nhân tố *Alu-TPA* trên cả 2 nhiễm sắc thể (-/-; đồng hợp lặn), có chứa nhân tố *Alu-TPA* trên 1 nhiễm sắc thể và nhiễm sắc thể còn lại không chứa (+/-; dị hợp). Như vậy sản phẩm khuếch đại bao gồm những dạng sau; sản phẩm khuếch đại có chứa nhân tố *Alu-TPA* có kích thước 534bp (+/+) (Hình 1, Giếng 3, 6, 11), sản phẩm khuếch đại không chứa nhân tố *Alu-TPA* có kích thước 234bp (-/-) (Hình 1, Giếng 2, 4, 10) và sản phẩm có cùng lúc hai dạng trên (+/-) (Hình 1, Giếng 5, 7, 8, 9).

**Kiểm tra đoạn *Alu-TPA* được khuếch đại.** Để kiểm tra sản phẩm khuếch đại có phải là đoạn DNA của gen *TPA* hay không, phương pháp PCR tổ và lai Dot-Blot được sử dụng để kiểm tra sản phẩm khuếch đại. Bằng PCR tổ, do mỗi *Alu2F* nằm trong vùng khuếch đại của cặp môi PlatA/Alu1R, nên mỗi *Alu2F* được chọn để kiểm chứng sản phẩm khuếch đại cùng với *Alu1R*. Lấy sản phẩm PCR của cặp môi PlatA/Alu1R trên các mẫu DNA đồng trội (+/+) và đồng lặn (-/-) làm khuôn để chạy PCR với cặp môi *Alu2F/Alu1R*. Kết quả (Hình 2) cho thấy ở giếng 3 và giếng 4 cho hai vạch kích thước 126bp và 426bp như dự đoán. Kết quả này cho phép kết luận rằng đoạn DNA được khuếch đại từ cặp môi PlatA/Alu1R có nguồn gốc từ gen *TPA*. Bằng Dot Blot, lấy sản phẩm PCR của cặp môi PlatA/Alu1R tiếp tục thực hiện Dot-Blot với mẫu dò là sản phẩm khuếch đại từ cặp môi PlatA/Alu1R (từ khuôn -/-) được tinh chế qua gel agarose. Kết quả cho thấy trong trường hợp đối chứng âm không có vạch lai, trong khi đó ở các giếng 1A, 1B và 1C lại có xuất hiện vạch lai, điều đó chứng tỏ mẫu dò đã lai với DNA bộ gen người trong cả ba trường hợp (Hình 3).



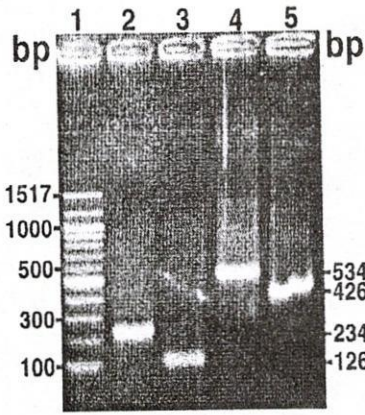
**Hình 1.** Sản phẩm khuếch đại với các dạng kiểu hình khác nhau

1, Thang DNA 100bp; 2, 5, 10, Các mẫu cho kết quả đồng hợp trội; 4, 6, 7, 8, Các mẫu cho kết quả dị hợp; 3, 9, Các mẫu cho kết quả đồng hợp lặn.



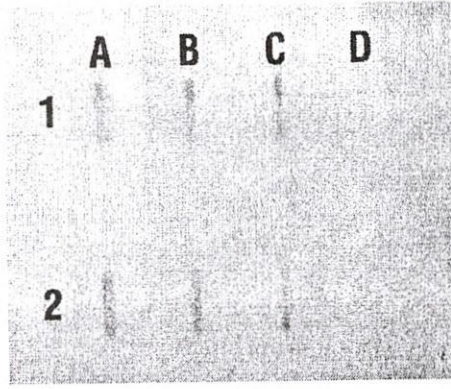
Sơ đồ 1. Quy trình tách chiết DNA bộ gen và phát hiện nhân tố Alu-TPA

**Dòng hóa đoạn gen có mang và không có mang nhân tố Alu-TPA.** Nhằm tạo ra một đối chứng dương ổn định cho quy trình phát hiện nhân tố Alu-TPA, chúng tôi tiến hành dòng hóa các đoạn gen có và không có mang nhân tố Alu-TPA vào plasmid pBluescript II KS (+). Những khuẩn lạc màu trắng trên môi trường LB có chứa ampicillin và X-gal gọi là khuẩn lạc dự tuyển, các khuẩn lạc dự tuyển này được kiểm tra lại bằng PCR khuẩn lạc bởi cặp mồi PlatA/Alu1R, chọn những khuẩn lạc cho kết quả PCR (+) (Hình 4, Giếng 2, 4). Plasmid từ các dòng này được tiếp tục kiểm tra bằng phản ứng cắt, chọn dòng mang plasmid cho kết quả cắt 2 vạch như trên (Hình 4, Giếng 3, 5).



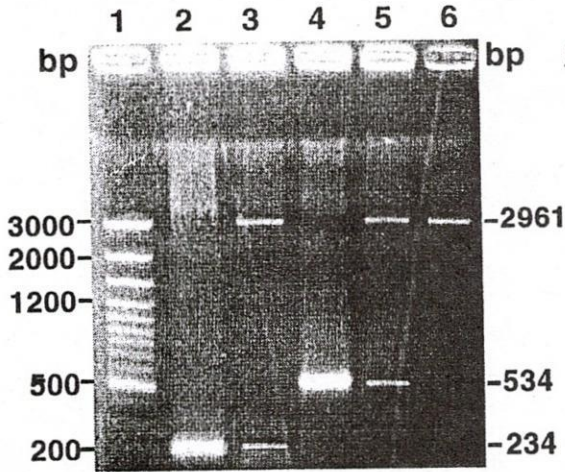
**Hình 2.** Sản phẩm PCR tổ của hai sản phẩm PCR được khuếch đại từ hai khuôn khác nhau.

1, Thang 100bp; 2, Sản phẩm PCR từ DNA khuôn (-/-); 3, Sản phẩm PCR tổ từ khuôn của mẫu ở giếng 2; 4, Sản phẩm PCR từ DNA khuôn (+/+); 5, Sản phẩm PCR tổ từ khuôn của mẫu ở giếng 4.



**Hình 3.** Kết quả lai kiểm tra các sản phẩm khuếch đại bằng cặp mồi *PlatA/Alu1R*

1A, DNA khuôn bộ gen (+/+)  
1B, DNA bộ gen (-/-)  
1C, DNA bộ gen (+/-)  
1D, DNA bộ gen tôm sú  
2A, Sản phẩm PCR từ khuôn DNA (+/+)  
2B, Sản phẩm PCR từ khuôn DNA (-/-)  
2C, Sản phẩm PCR từ khuôn DNA (+/-)  
2D, DNA khuôn tôm sú.



**Hình 4.** Kết quả chọn lọc dòng *E. coli* DH5 $\alpha$  mang plasmid pB-Alu-TPA(+) và pB-Alu-TPA(-) bằng PCR khuẩn lạc và cắt hạn chế.

1, Thang DNA 1Kb  
2, 4, Sản phẩm PCR khuẩn lạc (+) với cặp mồi *PlatA/Alu1R*  
3, 5, Plasmid từ khuẩn lạc dự tuyển cắt bằng *Bam*HI và *Eco*RI  
6, Sản phẩm cắt bằng *Bam*HI và *Eco*RI của plasmid pBluescript II KS (+)

Đối với khuẩn lạc có chứa plasmid pB-Alu-TPA (-) thì sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi *PlatA/Alu1R* có kích thước 234bp (**Hình 4, Giếng 2**). Và sản phẩm cắt cho 2 vạch 234bp (gen *Alu-TPA* (-)) và 2961bp (plasmid pBluescript II KS (+)) (**Hình 4, Giếng 3**). Vậy khuẩn lạc này có chứa plasmid pB-Alu-TPA (-).

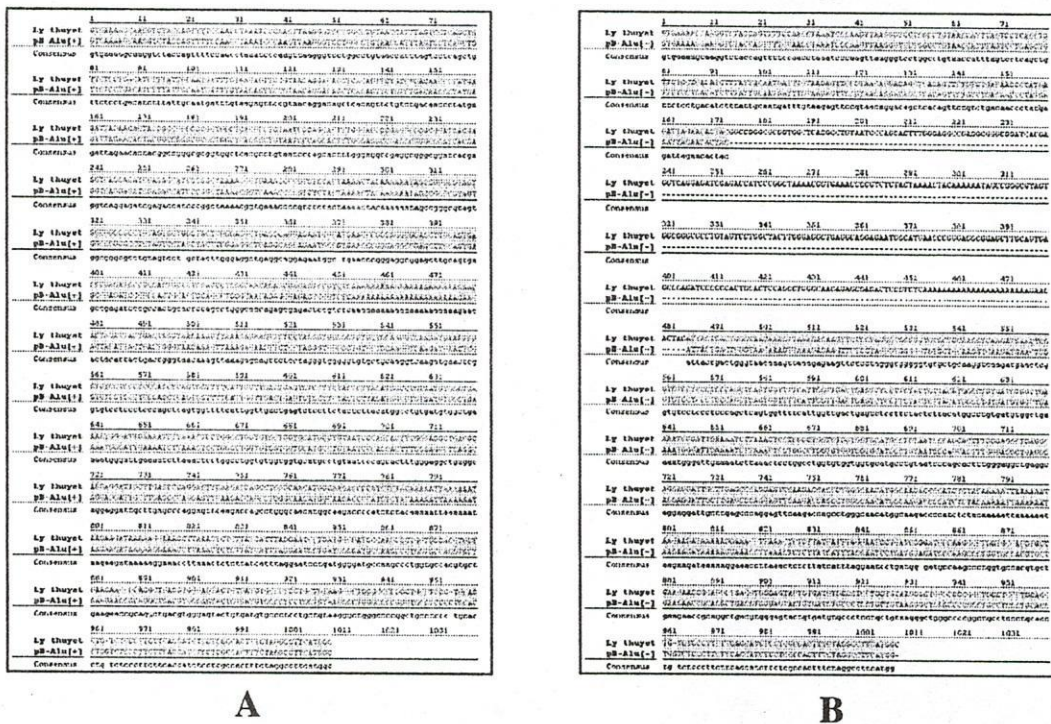
Đối với khuẩn lạc có chứa plasmid pB-Alu-TPA(+) thì sản phẩm PCR khuẩn lạc với cặp mồi *PlatA/Alu1R* cho vạch có kích thước 534bp (**Hình 4, Giếng 4**). Và sản phẩm cắt cho 2 vạch 534bp (gen *Alu-TPA* (+)) và 2961bp (plasmid pBluescript II KS (+)) (**Hình 4, Giếng 5**). Vậy khuẩn lạc này có chứa plasmid pB-Alu-TPA (+).

Kết quả giải trình gen *Alu-TPA* cho thấy trình tự gen *Alu-TPA* có chứa nhân tố *Alu* [*Alu-TPA*(+)] (**Hình 5A**) và không chứa nhân tố *Alu* [*Alu-TPA*(-)] (**Hình 5B**) trên gen người khá tương đồng đối với trình tự lý thuyết trên GenBank ngoại trừ một vài vị trí có sự sai khác không đáng kể.

Chúng tôi đã thiết lập một quy trình tách chiết đơn giản DNA người từ dịch súc miệng, khảo sát các cặp mồi khác nhau dùng để khuếch đại đoạn DNA *Alu-TPA*, chọn cặp mồi thích hợp nhất cho phản ứng PCR. Ngoài ra đoạn gen *Alu-TPA* có hoặc không có đoạn chèn *Alu* cũng được dòng hóa vào plasmid pBluescript II KS (+) tạo thành plasmid tái tổ hợp pB-Alu-TPA(+) và pB-Alu-

TPA(-). Những dòng tế bào có chứa vector tái tổ hợp này được sử dụng làm đối chứng cho quy trình phát hiện nhân tố *Alu* trên người mà chúng tôi đã thiết lập trong phạm vi nghiên cứu này [1], [2], [4], [10].

Như vậy chúng tôi đã hoàn tất qui trình phát hiện nhân tố *Alu-TPA* ở người bao gồm các bước từ lấy mẫu đến quan sát kết quả. Qui trình đã được lặp lại trên 30 lần. Bên cạnh việc chọn lọc các cặp mỗi, chọn lọc qui trình chiết tách DNA bộ gen và khảo sát điều kiện tối ưu cho phản ứng PCR. Đồng thời chúng tôi cũng đã thiết kế các plasmid không chứa nhân tố *Alu* pB-Alu-TPA (-) và plasmid có chứa nhân tố *Alu* pB-Alu-TPA (+) nhằm làm đối chứng trong các qui trình phát hiện nhân tố *Alu*.



Hình 5. So sánh sự tương đồng giữa trình tự gen *Alu-TPA(-)* và *Alu-TPA(-)* với trình tự lý thuyết trên Genbank.

Các kết quả này còn tạo cơ sở cho những mục đích nghiên cứu sâu hơn hoặc áp dụng thực tiễn như chẩn đoán y học, xác định kiểu di truyền trong cùng một quần thể hoặc giữa các quần thể hoặc giữa các vùng địa lý khác nhau, xác định mối quan hệ cha con... [9].

## ESTABLISHMENT OF PROCEDURE FOR DETECTION OF THE *ALU* ELEMENT IN HUMAN BY PCR

Phan Thi Phuong Trang, Tran Thanh Phong, Nguyen Duc Hoang, Tran Linh Thuoc  
University of Natural Sciences, Vietnam National University – HoChiMinh City, Vietnam

**ABSTRACT:** We designed pairs of primers to amplify *Alu* element at *PLAT* (plasminogen activator) locus between the exon 8 and 9 on VIII human chromosome by PCR (Polimerase Chain Reaction). The specificity of the pairs of primers were investigated to select the optimum pair of primers for detecting the *Alu* DNA segment. A simple procedure was established experimentally to extract DNA genome from mouthwash to be used as template for the amplification of *Alu* DNA segment

with designed primers. The PCR products were successfully cloned into pBluescript II KS to be used as control in the established procedure. We designed a Kit to practice PCR technique for training students at educational institutions.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ausubel MF, et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc (1998).
- [2] Blin N. and Stafford DW (1976). A general Method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, **3**: 2303- 2308.
- [3] Bowtell D. D. (1987) Rapid isolation of Eucaryotic DNA. *Analysis Biochemistry*, **162**: 463-465.
- [4] Degen SJ, Rajput B. and Reich E (1986). The human tissue plasminogen activator gene. *The Journal of biological chemistry*, **261** (15): 6972-6985.
- [5] DNA Learning Center (1994). Detection of Alu by PCR A Human DNA Fingerprinting Lab Protocol. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- [6] Hồ Huỳnh Thùy Dương (1998). Sinh học phân tử, *Tái bản lần thứ nhất*, NXB Giáo Dục.
- [7] Ludwig M. et al. (1992) Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event, *Human Genetics*, **88** (4):388-392.
- [8] Palmiter RD, Chen HY, Messing A, and Brinster RL (1985). SV40 enhancer and Large-T antigen are instrumental indevelopment of choroid plexus tumours in transgenic mice. *Nature*, **361**: 457- 460.
- [9] Sambrook J and Russel WD (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
- [10] Tishkoff SA et al (2000). Short tandem-repeat polymorphism/Alu haplotype variation at the PLAT locus: implications for modern human origins. *The American journal of human genetics*, **67** (4): 900-925.
- [11] Tishkoff SA et al (1996). Distribution and frequency of a polymorphic Alu insertion at the plasminogen activator locus in humans. *Human Genetics*, **97** (6):759-64.
- [12] White AB (1993), *Methods in Molecular Biology. PCR protocols*, Humana Press Inc (1993)