

both loci studied in normal individuals and high risk families was found to be quite similar to that in North American population. The proportion of women heterozygous for alleles of both loci was about 40 %. 7 of 9 families subjected to RFLP analysis were found to be informative for subsequent prenatal testing. Deletion in the proximal part of DMD gene has been discovered in 1 of 6 DMD patients.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Molecular analysis of human muscle dystrophy* / K. Davies, S. Forrest, T. Smith et al. // *Muscle and Nerve*.— 1986.— 1.— P. 185—194.
2. *The problems of Duchenne muscle dystrophy* / R. G. Worton, P. N. Ray, S. Bodrug et al. // *Phil. Trans. Roy. Soc. London*.— 1988.— 319, N 1194.— P. 275—284.
3. *Davies K. E., Kenwick S. J., Patterson M.* Molecular analysis of muscular dystrophy // *J. Muscle Res. Cell Motility*.— 1988.— 9, N 1.— P. 1—8.
4. *Complete cloning of DMD cDNA and preliminary genomic organization of DMD gene in normal and affected individuals* / M. Koenig, E. P. Hoffman, C. J. Bertelson et al. // *Cell*.— 1987.— 50, N 3.— P. 505—507.
5. *The screening of Duchenne muscle dystrophy patients for submicroscopic deletions* / E. Hart, C. Cole, A. Walker et al. // *J. Med. Genet.*— 1986.— 23.— P. 516—520.
6. *Duchenne muscle dystrophy deficiency of Dystrophin at the muscle cell surface* / E. Bonilla, C. E. Samit, A. F. Mianda et al. // *Cell*.— 1988.— 54, N 4.— P. 447—452.
7. *Евграфов О. В., Макаров В. Б.* Диагностика мюлдистрофии Дюшенна с помощью зондов ДНК // *Вопр. невропатологии и психиатрии*.— 1987.— 87, № 1.— С. 1732—1736.
8. *Красильников В. В., Лазебник Т. А., Шилов Л. А.* Использование метода дискриминационного анализа уровней сывороточной креатинкиназы в установлении гетерозиготного носительства мышечной дистрофии Дюшенна // *Генетика*.— 1987.— 23, № 11.— С. 176—179.
9. *Анализ частоты рестрикционного полиморфизма локуса ДНК С7 в популяции здоровых людей и в семьях больных кистозным панкреатитом поджелудочной железы с помощью цепной реакции синтеза ДНК* / Е. И. Шварц, Т. Э. Иващенко, А. А. Гольцов и др. // *Докл. АН СССР*.— 1989.— 307, № 2.— С. 397—400.
10. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1986.— 420 с.
11. *Thompson M. W., Ray P. N., Bellfall C. P.* Linkage analysis of polymorphism within the DNA fragment XJ cloned the breakpoint of an X; 21 translocation associated with X-linked muscular dystrophy // *J. Med. Genet.*— 1986.— 23.— P. 548—555.
12. *Kunkel L. M., Hiftmanok G. F., Caskey C. T.* Analysis of deletion in DNA from patients with Becker and Duchenne muscle dystrophy // *Nature*.— 1986.— 322.— P. 73—77.
13. *DNA deletion screening in Duchenne and Becker muscular dystrophy* / K. A. Hart, A. Walker, C. G. Cole et al. // *J. Med. Genet.*— 1987.— 24, N 4.— P. 243—244.
14. *Prenatal diagnosis using deletion studies in Duchenne muscular dystrophy* / M. C. Speer, M. A. Pericak-Vance, L. Yamaoka et al. // *Prenat. Diagn.*— 1988.— 8 — P. 427—437.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР,
Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.213.3

**Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, М. В. Асеев,
В. С. Баранов, С. В. Виноградов, Ю. А. Берлин,
А. А. Гольцов, О. К. Кабоев, Е. И. Шварц**

АНАЛИЗ РЕСТРИКЦИОННОГО ПОЛИМОРФИЗМА ДНК-ЛОКУСА D7S23 ПРИ ПОМОЩИ ЗОНДА КМ-19 МЕТОДОМ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ДНК В ПОПУЛЯЦИИ И В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ

Методом цепной реакции синтеза (ЦРС) ДНК проанализирован аллельный полиморфизм локуса D7S23, выявляемый ДНК-зондом КМ-19 в популяции Ленинграда — в семьях высокого риска и у больных муковисцидозом (МВ). Методом полимеразной

* Работа частично финансируется Всемирной организацией здравоохранения (контракт ВОЗ G 3/181/139).

ЦРС ДНК установлено вырожденное неравновесное распределение аллелей A1 и A2 зонда KM-19 в исследованных группах. Соотношение аллелей A1 и A2 в группе доноров (46 человек) составило соответственно 75 и 25 %, в семьях высокого риска (51 человек) — гетерозиготные носители гена MB — 48 и 52 %, тогда как у больных MB встречалась исключительно аллель A2 (18 человек — все A2/A2). Полученные результаты доказывают высокостоверное неслучайное сцепление аллеля A2 с мутантным геном MB и A1 — с его нормальным аллелем. Эти данные расширяют возможности использования молекулярных подходов для пренатальной диагностики MB на ранних сроках беременности, выявления гетерозиготного носительства данной мутации в семьях высокого риска и уточнения диагноза MB в сомнительных и генетически неясных случаях. Обсуждаются методические модификации, примененные в работе, позволяющие значительно повысить эффективность полимеразной ЦРС ДНК, уменьшить расход олигонуклеотидных праймеров и термостабильной ДНК-полимеразы.

Введение. Одной из актуальных проблем молекулярной генетики человека является разработка и внедрение в клиническую практику сравнительно простых методов анализа физического состояния конкретных генетических детерминант. ЦРС ДНК *in vitro*, разработанная в 1985 г. [1], позволяет в течение 2,5—3 ч амплифицировать любой фрагмент ДНК генома человека, для которого известна первичная нуклеотидная последовательность, и далее проанализировать его состояние либо секвенированием, либо рестрикционным картированием [2, 3]. По простоте технического исполнения и по возможности проведения одномоментного анализа большого количества проб (свыше 20) метод оказался весьма удобным для клинического применения [4, 5].

Принцип метода ЦРС ДНК основан на спаривании двух синтетических олигонуклеотидов-праймеров, комплементарных двум участкам противоположных цепей ДНК, а длина амплифицированного фрагмента равна расстоянию между этими праймерами. Два праймера располагаются таким образом, что после первого цикла синтеза ДНК новая цепь ДНК становится местом спаривания для другого праймера. Последующие циклы денатурации, отжига и синтеза ДНК позволяют амплифицировать определенный фрагмент ДНК, ограниченный двумя праймерами, причем эта величина возрастает в геометрической прогрессии и равна 2^n , где n — число циклов амплификации [1, 2]. После завершения процедуры амплификации синтезированная ДНК может быть идентифицирована с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и последующей визуализацией бромистым этидием.

Особое значение метод может иметь для изучения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов ДНК (ПДРФ). Как известно, исследование ПДРФ-локусов ДНК, сцепленных с мутантными генами человека, является в настоящее время важнейшим подходом для консультирования при моногенных заболеваниях с неизвестной природой биохимического дефекта [5, 6]. Впервые ЦРС ДНК была использована для изучения ПДРФ при гемофилии А [4]. После амплификации ДНК и материал подвергали рестрикции и далее анализировали электрофорезом в ПААГ. Если для анализа ПДРФ с помощью традиционной технологии (блот-гибридизации) требуется около 10 дней, то ЦРС ДНК позволяет получать результат в течение 5—6 ч.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения ПДРФ с помощью ЦРС ДНК для локуса KM-19 в группе доноров и в семьях больных MB. Эта патология встречается с частотой 1 : 2 000 новорожденных в Европейской части СССР (каждый 20-й гетерозиготен) и является самым распространенным моногенным заболеванием у человека [7, 8].

Материалы и методы. В качестве биологического материала использовали лейкоциты периферической крови больных. ДНК выделяли по методу [9]. Два праймера (каждый длиной 20 нуклеотидов) [5] синтезировали ручным твердофазным методом с использованием 3'-цианэтилдизопропилфосфамидитов защищенных дезоксирибонуклеотидов, средний выход на стадии парашивания цепи — 95 %. После деблокирования олигонуклеотиды были очищены электрофорезом в ПААГ и проанализированы в виде 5'-³²P-фосфатов. Амплификацию проводили в инкубационной среде объемом 50 мкл: 67 мМ трис-HCl, pH 8,8, 6,7 мМ MgCl₂, 10 мМ меркаптоэтанол, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄.

6,7 мкМ ЭДТА, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, четыре dNTP (1,0 мМ каждый), пару праймеров (0,03 мкг каждого), 1 мкг ДНК. ДНК денатурировали при 98 °С в течение 10 мин, затем добавляли 2 ед. активности ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* и проводили синтез при 72 °С в течение 3 мин. Последующие циклы денатурация — 1 мин, 94 °С; отжиг праймеров — 1 мин, 55 °С; синтез ДНК — 4 мин, 72 °С. После 30 циклов амплификации пробы выдерживали в течение 10 мин при температуре 72 °С и затем охлаждали. Отбирали аликваты по 20 мкл, добавляли 2 ед. активности рестриктазы *PstI* и в течение 30 мин вели расщепление при температуре 37 °С. После окончания реакции материал фракционировали в 6 %-ном ПААГ. Полосы ДНК выявляли с помощью бромистого этидия.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены результаты амплификации, рестрикции и последующего электрофореза. Использо-

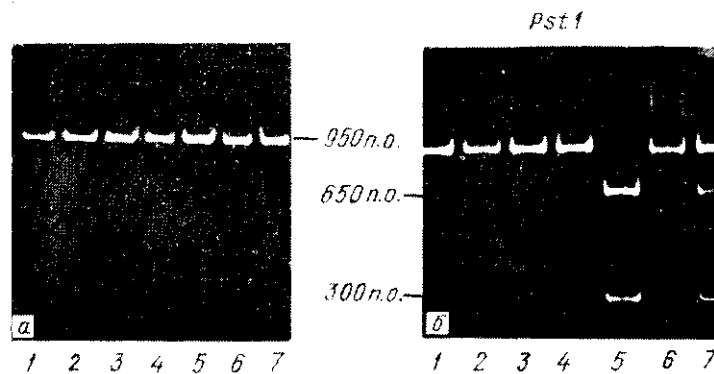


Рис. 1. Амплификация ДНК-доноров при помощи олигонуклеотидных праймеров зонда *KM-19* в полимеразной ПРС ДНК: *a* — до рестрикции; *b* — после рестрикции *PstI* и электрофореза. Окраска бромистым этидием: 1—4, 6 — генотип *A1/A1*; 5 — генотип *A2/A2*; 7 — генотип *A1/A2*

Fig. 1. Amplification of donor DNA with oligonucleotide primers of *KM-19* probe in polymerase chain reaction (PCR): *a* — before restriction *b* — after restriction *PstI* and electrophoresis. Ethidium bromide staining 1—4, 6 — genotype *A1/A1*; 5 — *A2/A2*; 7 — *A1/A2*

ванные нами праймеры амплифицировали фрагмент ДНК длиной 950 нуклеотидов. После расщепления рестриктазой *PstI* при наличии сайта образовывались два фрагмента с подвижностью 300 и 650 нуклеотидов.

Частоты ПДРФ аллелей и соотношение генотипов по локусу *D7S23*, выявленные ДНК-зондом *KM-19* в популяции Ленинграда

RFLP analysis of D7S23 locus with KM-19 DNA probe in Leningrad population, in the families and in patients with cystis fibrosis

Анализируемая группа	Количество	<i>A1/A1</i> , %	<i>A1/A2</i> , %	<i>A2/A2</i> , %	Частота аллелей, %		χ^2
					<i>A1</i>	<i>A2</i>	
Норма	46	54	41	5	75	25	13,64
Гетерозиготные носители МВ	51	11	73	16	48	52	
Больные МВ	19		21	79	11	89	14,99

В случае гетерозиготного состояния по сайту рестрикции (один аллель содержал сайт рестрикции, а другой — нет) образовывались три фрагмента — 950, 650 и 300 нуклеотидов. Таким образом выявлялись три варианта комбинации аллелей: *A1/A1* — гомозиготы по аллелю с отсутствием сайта рестрикции — одна полоса с подвижностью 950 нуклеотидов; *A1/A2* — гетерозиготы (наличие одного аллеля с сайтом рестрикции и одного с отсутствием его) — три полосы 950, 600 и 350

нуклеотидов; $A2/A2$ — гомозигота по наличию сайта рестрикции — две полосы с подвижностью 650 и 300 нуклеотидов.

В таблице представлены результаты анализа встречаемости аллелей среди контрольной группы (доноры) и в семьях больных МВ. Как следует из таблицы, в здоровой популяции частота встречаемости аллелей $A1$ и $A2$ равна 75 и 25 % соответственно, тогда как среди гетерозиготных носителей гена МВ она равна 48 и 52 %. Достоверность различий высокосignификантна $\chi^2=13,64$, $p < 0,001$. Еще более выражены эти различия в группе больных — там встречаемость аллеля $A2$ составляет 100 %. Таким образом, очевидна неравновесность сцепления аллеля $A2$ с мутантным геном. Наши результаты по частоте встречаемости двух аллелей в группе доноров и в семьях больных МВ совпадают с данными, полученными с помощью блот-гибридизации в ряде европейских стран [10], т. е. в популяции Ленинграда обнаруживается полиморфизм локуса $KM-19$ по сайту рестрикции $PstI$, а аллель $A2$, как правило, сцеплен с мутантным геном. Информационная значимость такого анализа может быть проиллюстрирована на примере семьи К

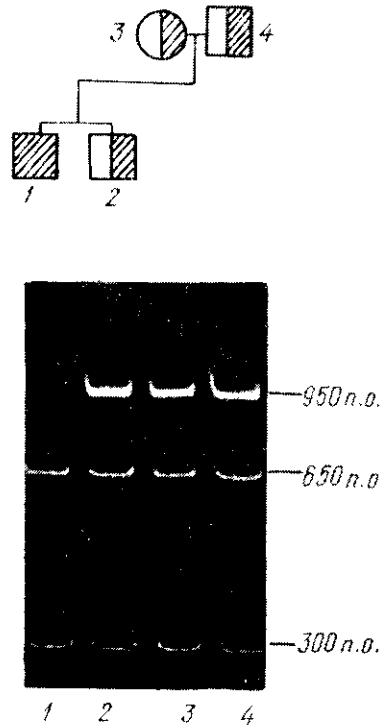


Рис. 2. Родословная семьи К. и результаты ДНК-анализа членов семьи методом полимеразной ЦПС ДНК в системе ПДРФ зонда $pKM-19$: —2—4 генотип родителей и сибса — $A1/A2$; —1— генотип больного $A2/A2$.

Fig. 2. Pedigree and the results of $KM-19/PstI$ RFLP analysis by polymerase chain reaction: —2—4— genotype of both parents and sibling $A1/A2$, —1— genotype of CF patient — $A2/A2$

(рис. 2). Отец и мать — гетерозиготные носители мутантного гена, имеют аллели по сайту рестрикции локуса $KM-19$ $A1/A2$, у больного — гомозиготы — $A2/A2$, а здоровый сибс — гетерозигота $A1/A2$. Он может иметь больное потомство в случае вступления в брак с гетерозиготным носителем мутантного гена.

Семьи, в которых имеется больной ребенок и возможно проведение анализа сцепления мутантного гена с определенным типом полиморфизма по сайту рестрикции, получили название информативных семей. Понятно, что в данных конкретных семьях установление сочетания аллелей $A2/A2$ у будущего ребенка позволяет однозначно утверждать, что он будет болен.

На основании приведенных результатов можно сделать следующие выводы. Исследование рестрикционного полиморфизма локуса $KM-19$ позволяет в случае информативной семьи вести как пренатальную диагностику, так и медико-генетическое прогнозирование у здоровых сибсов. При сопоставлении частоты встречаемости аллелей $A1$ и $A2$ выявлено значительное преобладание аллеля $A2$ в семьях больных МВ и среди пробандов. Эти результаты указывают на неравновесность сцепления аллеля $A2$ с мутантным геном. Однако не во всех случаях аллель $A2$ сцеплен с геном МВ (таблица). Именно с этим обстоятельством связано ограничение использования рестрикционного полиморфизма локуса $KM-19$ лишь в информативных семьях.

Как уже отмечалось, для проведения ЦПС ДНК в настоящей работе использована ДНК-полимераза, выделенная из *Th. thermophilus*. Ранее нами было показано, что ДНК-полимераза из *Th. thermophilus*

выдерживает 30 циклов амплификации и в этой связи отпадает необходимость ее добавления в процессе реакции. Принципиальная возможность применения этой полимеразы для целей амплификации ДНК была показана нами в предыдущей работе [11].

Ранее была продемонстрирована также реальная принципиальная возможность использования ЦРС ДНК при анализе рестрикционного полиморфизма локуса *KM-19* для пренатальной диагностики МВ [5]. В реакции использованы 5 ед. активности ДНК-полимеразы *Th. aquaticus* (2,5 ед. активности на первом цикле и 2,5 ед. активности после 15-го цикла) и 75 пмоль/дм³ каждого праймера. После амплификации наряду с фрагментом 0,95 т. п. о. вследствие неспецифического праймирования возникла полоса с подвижностью 0,8 т. п. о. При попытке использования условий амплификации, описанных в работе [5], мы выявили большое количество участков неспецифического праймирования. Принимая во внимание, что специфичность амплификации определяется как количеством праймеров, так и количеством используемой полимеразы, нами была снижена концентрация праймеров до 15 пмоль/дм³ и использованы лишь 2 ед. активности ДНК-полимеразы. Благодаря этому были достигнуты условия, при которых амплифицировалась только требуемая последовательность. Поскольку типирование аллелей локуса *KM-19*, вероятно, в ближайшее время будет широко внедряться в клиническую практику, 15-кратное снижение количества праймеров и 5-кратное — ДНК-полимеразы имеет существенное значение в плане стоимости таких исследований.

ANALYSIS OF RESTRICTION POLYMORPHISM OF *D7S23* LOCUS BY POLYMERASE CHAIN REACTION WITH *KM-19* PROBE IN POPULATION AND CYSTIC FIBROSIS FAMILIES

T. E. Ivashchenko, V. N. Gorbunova, M. V. Aseev, V. S. Baranov, S. V. Vinogradov, Yu. A. Berlin, A. A. Goltsov, O. K. Kuboev, E. I. Schwartz

Institute of Obstetrics and Gynecology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad
Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

Highly significant disequilibrium of A_1 and A_2 alleles rate in population (group I), CF-heterozygotes (group II) and CF patients (group III) has been found with *KM-19* probe in polymerase chain reaction, that constitutes 75 % and 25 % for 46 individuals in gr. I, 48 % and 52 % for 51 individuals in gr. II, 0 % and 100 % in 18 individuals of gr. III, respectively. These data prove highly nonrandom linkage of A_2 allele of *KM-19* with CF-gene and A_1 allele with normal gene and thus significantly extend the capacity of molecular approaches for prenatal diagnosis of CF during early development as well as for CF heterozygotes detection and CF diagnosis postnatally. Some methodological improvements in polymerase chain reaction are discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* // R. K. Saiki, S. Scharf, F. Fallona et al. // *Science*.— 1985.— 230, N 3279.— P. 1350—1354.
2. *Saiki R. K., Gelfant D. H., Stoffel S.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Ibid.*— 1988.— 239, N 4842.— P. 487—491.
3. *Schure S. J., Horn G. T.* Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences // *Ibid.*— 1986.— 233, N 3321.— P. 1076—1078.
4. *Kogan S. C., Doneity M., Gitschier J.* An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences // *New Engl. J. Med.*— 1987.— 317, N 16.— P. 985—990.

5. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis for detection of *Km-19* polymorphism / G. L. Feldman, R. Williamson, A. L. Beaudet, W. E. O'Brien // *Lancet*.— 1988.— N. 8610.— P. 102.
6. Sommer S. S., Sobell J. L. Application of DNA-based diagnosis of patient care. The example of hemophilia A // *Mayo Clin. Proc.* — 1987.— 62, N 3.— P. 387—404.
7. Капринов Н. Н. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М.: НИИ педиатрии АМН СССР, 1986.— 37 с.
8. Morris A., Super M. Cystic fibrosis. The facts.— Oxford: Univ. press, 1987.— 264 p.
9. Possibilities and problems in genomic diagnosis of Dueschenne muscular dystrophy with molecular probes / A. Speer, K. Davies, S. McGlade, R. Hanke // *Biomed. et biochim. acta*.— 1986.— 45, N 1.— P. 19—27.
10. Esticill X., Farrall M., Williamson R. Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linkage DNA polymorphism in Italian families: a collaborative studies // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1988.— 43, N 5.— P. 623—628.
11. Праймер-зависимая амплификация двух участков β -глобинового гена человека / Е. П. Шварц, О. К. Кобоев, А. А. Гольцов и др. // *Биоорг. химии*. — 1988. — 14, № 11.— С. 1577—1579.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР,
Ленинград
Ин-т ядер. физики АН СССР, Гатчина
Ин-т биоорг. химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва

Получено 06.04.89

УДК 577.213.3

Л. А. Лившиц, В. И. Гришко, С. А. Кравченко,
Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов, Т. И. Бужиевская

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК В УЧАСТКАХ, ТЕСНО СЦЕПЛЕННЫХ С ГЕНОМ МУКОВИСЦИДОЗА, В ПОПУЛЯЦИИ КИЕВА

В работе представлены результаты исследования рестрикционного полиморфизма в локусах, тесно сцепленных с геном муковисцидоза (МВ, кистозного фиброза поджелудочной железы), в популяции здоровых людей-доноров и в семьях с высоким риском МВ (Киев).

Неравновесное сцепление мутации МВ с определенными гаплотипами локуса D7S23 (в системах КМ-19 и CS.7) обнаружено в семьях с МВ. Этот факт позволяет осуществлять выявление гетерозиготного носительства у здоровых sibсов в данных семьях и проводить пренатальную диагностику методом ДНК-анализа плода в сочетании с анализом ферментов амниотической жидкости на 18—19-й неделях беременности в семьях, утративших больного ребенка, но имеющих высокий риск повторного рождения детей, больных МВ.

Введение. МВ относится к числу тяжелых моногенных патологий человека с аутосомно-рецессивным типом наследования. Показано [1], что для европейского населения частота встречаемости МВ составляет 1 : 2 000 новорожденных [2]. Каждый 20-й житель Европы может являться носителем мутантного аллеля гена МВ. Однако до сих пор попытки идентифицировать точное местонахождение и характер мутации, приводящей к этому тяжелому заболеванию, не увенчались успехом. В ходе исследований были обнаружены локусы 7-й хромосомы человека ($-7q31$), фланкирующие ген МВ и имеющие полиморфные сайты рестрикции. ДНК-фрагменты этих локусов были клонированы и в настоящее время широко используются для пренатальной диагностики и выявления гетерозиготного носительства МВ в семьях с высоким риском рождения больного ребенка [2—4]. Особый интерес представляет локус *D7S23*, в состав которого входят участки *КМ-19* и *CS.7*. Было показано, что он находится достаточно близко от гипотетического гена МВ [3]. Наличие полиморфных сайтов рестрикции, а также анализ нуклеотидной последовательности, фланкирующей данные сайты, позволяют проводить изучение полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) методом специфической амплификации с помо-