

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Structure and variation of human alpha₁-antitrypsin / R. Carrell, J. O. Jeppson, C. B. Laurell et al. // Nature.— 1982.— 298, N 5869.— P. 329—334.
2. Complete sequence of the cDNA for human alpha₁-antitrypsin and the gene for the S variant / G. L. Long, T. Chandra, S. L. C. Woo et al. // Biochemistry.— 1984.— 23, N 21.— P. 4828—4837.
3. Cox D. W., Johnson A. M., Fagerhol M. K. A report of nomenclature meeting for alpha₁-antitrypsin // Hum. Genet.— 1980.— 53, N 2.— P. 429—433.
4. Jeppson J.-O., Laurell C. B. The amino acid substitutions of human alpha₁-antitrypsin M₃, X and Z // FEBS Lett.— 1988.— 231, N 2.— P. 327—330.
5. Alpha₁-antitrypsin and serum albumin mRNA accumulation in normal, acute phase and ZZ human liver / J. H. Riley, I. C. Bathurst, M. R. Edbrooke et al. // Ibid.— 1985.— 189, N 2.— P. 361—366.
6. Identification of second mutation in the protein-coding sequence of the Z type alpha₁-antitrypsin gene / T. Nukiwa, K. Satoh, M. L. Brantly et al. // J. Biol. Chem.— 1986.— 261, N 34.— P. 15989—15994.
7. Cox D., Billinostey G. D. Restriction enzyme *MaeIII* for prenatal diagnosis of alpha₁-antitrypsin deficiency // Lancet.— 1986.— N 9.— P. 27.
8. Fagerhol M., Laurell S. The Pi system inherited variants of serum alpha₁-antitrypsin // Progr. Med. Genet.— 1970.— 8.— P. 96—105.
9. Alpha₁-antitrypsin deficiency by direct analysis of mutation site in the gene / W. Kidd, R. B. Wallace, K. Itakura, S. L. C. Woo // Nature.— 1983.— 304, N 5923.— P. 230—234.
10. Boswell P. R., Carrell R. Alpha₁-antitrypsin: molecules and medicine // TIBS.— 1986.— 11, N 3.— P. 102—103.
11. Retroviral mediated transfer and expression of human alpha₁-antitrypsin in cultured cell / F. D. Ledley, H. E. Grennet, D. P. Bartos, S. L. C. Woo // Gene.— 1987.— 61, N 1.— P. 113—118.
12. Perlino E., Cortese R., Ciliberto G. The human alpha₁-antitrypsin gene is transcribed from two different promoters in macrophages and hepatocytes // EMBO J.— 1987.— 6, N 9.— P. 2767—2771.
13. Young R. A., Davis R. W. Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes // Science.— 1983.— 222, N 4625.— P. 778—782.
14. Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
15. Der alpha-1-antitrypsin-mangel-isolation von alpha-1-antitrypsin cDNA gensonnen aus einer cfprimierenden-*gtII*-humanlebergenbank / W. Berger, A. Schwarzman, C. Coutelle, S. Neifakh // Z. Klin. Med.— 1988.— 43, N 3.— S. 583—586.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград
Центр. ин-т молекуляр. биологии АН ГДР, Берлин-Бух

Получено 13.06.89

УДК 616.056.7:616.153.922

М. Ю. Манделъштам, Л. К. Сасина, Л. А. Шварцман

ДНК-ДИАГНОСТИКА СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) — одно из наиболее часто встречающихся генетических заболеваний человека, связанное с мутациями в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП). ДНК-диагностика является не только наиболее достоверным методом определения СГ, но и позволяет выявлять заболевание до возникновения клинических нарушений. В работе описано получение ДНК-зондов, необходимых для диагностики СГ, на основе определения полиморфизмов длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) гена рЛНП. Рассматривается определение ПДРФ для PvuII, BstEII, AvaII, NcoI, TaqI у больных с СГ как полезных маркеров в семейном анализе. Описан новый полиморфный вариант гена рЛНП для фермента EcoRI.

Введение. СГ — наследственное заболевание человека, передающегося по аутосомно-доминантному типу [1]. Гетерозиготная форма СГ в большинстве европейских популяций выявляется у одного индивидуума среди 500 обследованных, гомозиготная форма встречается с частотой 1 случай на миллион новорожденных. Причиной заболевания является нарушение катаболизма атерогенных ЛНП в результате различных мутаций в гене рЛНП [2]. В интронах гена и в экзоне 18 обнаружены повторы *Alu*-семейства, кроме того, в 5'-концевой области гена содер-

жится значительное число повторов другого типа [3]. Это обуславливает высокую частоту рекомбинационных событий, являющихся причиной различных делеций и инсерций в гене рЛНП [2, 4, 5]. Описаны также точечные мутации, приводящие к нарушению функций рЛНП [2, 6]. Однако прямой анализ мутаций гена рЛНП возможен лишь в небольшом числе случаев СГ в связи с ее выраженной генетической

ПДРФ гена рЛНП, обсуждаемые в данной работе
RFLPs of the LDLR gene discussed in this paper

Рестриктаза	Аллельные полиморфные фрагменты, т. п. н.	Частоты аллелей	Источник данных	Экспериментальные частоты	Число изученных аллелей от неродственных пациентов
R _{vu} II	16,5	0,77	[10]	0,92	12
	14+2,6	0,23		0,08	
AvaII	3,6	0,56	[11]	0,58	12
	3,4	0,44		0,42	
B _{st} IEI	33	0,75	[12, 13]	0,68	22
	22+11	0,25		0,32	
NcoI	3,1	0,64	[14]	0,25	4
	13	0,36		0,75	
TaqI	1,7	0,69	[9, 15]	0,92	12
	0,6	0,31		0,08	

гетерогенностью, что сильно ограничивает возможности диагностики. С другой стороны, достоверный диагноз СГ может быть осуществлен только на основе определения концентрации рЛНП в культивируемых фибробластах и его способности связывать и интернализировать липопротеины [7]. Диагностика СГ по уровню холестерина ЛНП крови далеко не всегда дает однозначные результаты [8]. К тому же имеется значительное число случаев первичной гиперхолестеринемии, обусловленной действием ряда генов [9]. Более перспективным методом диагностики СГ представляется метод анализа ПДРФ гена рЛНП. Метод заключается в изучении сцепления какого-либо полиморфного рестрикционного сайта в гене рЛНП и фенотипа гиперхолестеринемии в каждой конкретной родословной. При обнаружении совместной сегрегации в отдельной семье генетического маркера и клинических признаков гиперхолестеринемии можно поставить диагноз СГ без знания природы первичного дефекта (мутации). К настоящему времени описаны уже 14 полиморфных рестрикционных сайтов для 12 рестрикционных эндонуклеаз в гене рЛНП. Некоторые из них приведены в таблице. Необходимый материал для определения ПДРФ (клетки крови как источник ДНК) может быть получен при проведении обычного клинического анализа крови на холестерин. Раннее выявление больных СГ делает возможным своевременное применение как методов терапевтического лечения, так и (в перспективе) после определения характера мутации, генетической коррекции.

Материалы и методы. В работе использованы рестрикционные эндонуклеазы и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* производства НПО «Фермент» (Вильнюс), статистический ДНК-праймер и мембраны Hybond-N, Hybond-C производства фирмы «Amersham» (Великобритания).

Плазмида *pLDLR-3*, содержащая полноразмерную рЛНП кДНК человека, была любезно предоставлена Д. Расселом (Ун-т штата Техас, США) и передана в наше распоряжение А. Н. Климовым.

Кровь от больных с типом IIa гиперлипидемии была предоставлена нам Б. М. Липовецким (клиника ИЭМ АМН СССР). Геномную ДНК получали из 5—10 мл несвернувшейся крови по методу Кюнцеля [16] в модификации Белла [17] для небольших количеств крови. ДНК гидролизовали соответствующими рестрикционными эндонуклеазами с 4—6-кратным избытком фермента по активности и после электрофореза в агарозном геле переносили на фильтры по методу Саузерна [18]. ДНК-зон-

ды для гибридизации метили с помощью множественного праймера и фрагмента Клевова ДНК-полимеразы I [19]. Мембраны предгибридизовали в $6\times\text{SSC}$ ($1\times\text{SSC} = 0,15 \text{ M NaCl}, 0,15 \text{ M Na-цитрат}, \text{pH } 8,0$) с 0,1 % поливинилпирролидона, 0,1 % фикола-400, 0,1 % бычьего сывороточного альбумина, 1 % DS-Na, 100 мкг/мл тРНК, 100 мкг/мл денатурированной ДНК спермы лосося и 10 % декстрансульфата («Pharmacia», Швеция) при 65°C 2 ч. Гибридизацию проводили в растворе того же состава с ^{32}P -ДНК и концентрацией метки $10^6 \text{ имп}\cdot\text{мин}^{-1}\cdot\text{мг}^{-1}$ (10 нг/мл ДНК) при 65°C 16 ч. Авторадиографию вели на пленке ORWO HS11 при -70°C с усиливающими экранами.

Все процедуры клонирования ДНК выполняли по Маннатсу и др. [20].

Результаты и обсуждение. мРНК рЛНП человека содержит в своей 3'-некодирующей области повторы *Alu*-семейства [21]. Поэтому соответствующая клонированная полноразмерная кДНК не может быть непосредственно использована в качестве зонда для гибридизации с ДНК больных. Более того, большой размер гена (45 тысяч пар нуклеотидов, т. п. н.) и высокая степень гомологии отдельных его экзонов целому набору уникальных последовательностей в геноме человека (предшественнику эпидермального фактора роста, компоненту С9-системы complemento, тромбомодулину, факторам IX, X и белку С системы свертывания крови) [3] делают затруднительным интерпретацию гибридизационных экспериментов, полученных со всей кДНК рЛНП даже при элиминации повторов. Для выделения адекватных зондов

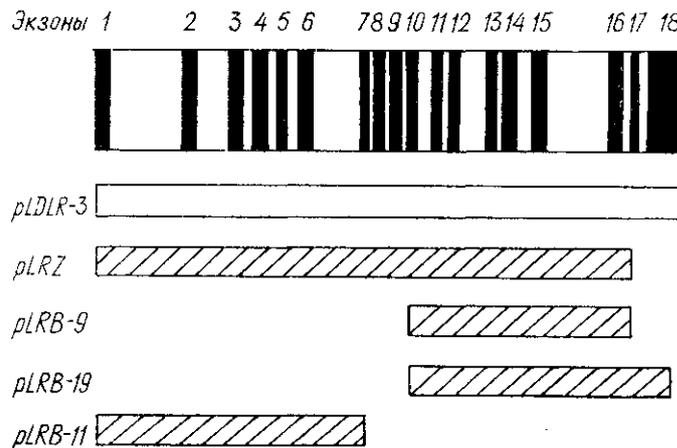


Рис. 1. Молекулярные пробы для анализа ПДРФ, ассоциированных с геном рЛНП *pLDLR-3* содержит кДНК рЛНП, в которой представлены все 18 экзонов гена. Плазмид *pLRZ* получена в результате делетирования *XhoI*-фрагмента размером 2,5 т. п. н., содержащего *Alu*-повторы, из *pLDLR-3*; *pLRB-9*, *pLRB-11*, *pLRB-19* — в результате клонирования *BamHI*-фрагмента размером 0,9 т. п. н. *pLRZ* и *BamHI*-фрагментов размером 1,1 и 1,9 т. п. н. *pLDLR-3* в уникальный *BamHI*-сайт *pBR322* соответственно. Показано соответствие клонированных фрагментов *pLDLR-3* исходной кДНК и экзонной структуре гена

Fig. 1. Molecular probes for the analysis of RFLPs associated with LDLR gene. *pLDLR-3* plasmid contains the full-length *LDLR* cDNA that corresponds to all 18 exons of the *LDLR* gene. *pLRZ* plasmid is a result of the deletion of the *Alu*-repeats containing 2.5 kb *XhoI* fragment from *pLDLR-3*. Plasmids *pLRB-9*, *pLRB-11*, *pLRB-19* were obtained after cloning of the 0.9 kb *BamHI* fragment from *pLRZ* and 1.1 kb and 1.9 kb *BamHI* fragments from *pLDLR-3* into unique *BamHI* site of *pBR322*. The correspondence of the *pLDLR-3* cloned fragments to the original cDNA and exon structure of the *LDLR* gene is shown

изолировали фрагменты плазмиды *pLDLR-3* после ее гидролиза рестриктазой *BamHI* (рис. 1). С целью дополнительной очистки зондов клонировали эти фрагменты по уникальному *BamHI*-сайту в плазмиде *pBR322*, а затем препаративно выделяли их. Использование метода метки специфических фрагментов ДНК с помощью случайного ДНК-

праймера до высокой удельной радиоактивности ($>10^8$ имп·мин $^{-1}$ × мкг $^{-1}$) делает возможным сокращение времени автордиографии после гибридизации до 2—12 ч, что существенно для задач диагностики.

Описанные зонды мы использовали при определении ПДРФ для *PvuII*, *AvaII*, *NcoI*, *BstEII* в 3'-части гена рЛНП. Изошизомеры этих

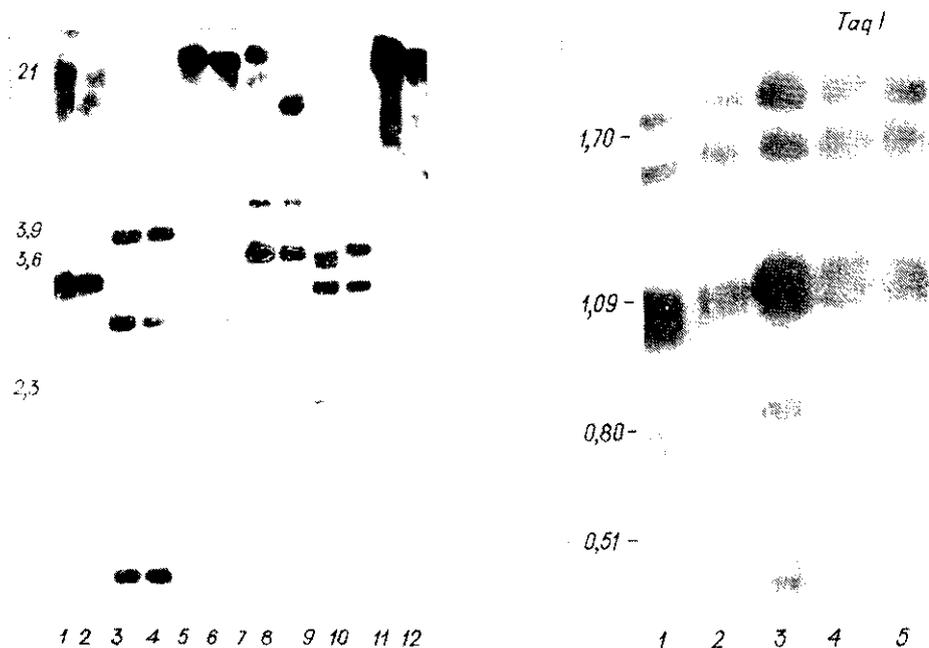


Рис. 2. Гибридизация по Саузерну геномной ДНК с пробой на 3'-конец гена рЛНП. На дорожки наносили по 5 мкг геномной ДНК, расщепленной рестриктазами *PvuII* (1, 2); *Eco130I* (-*StyI*) (3, 4); *EcoRI* (5, 6); *Eco91I* (-*BstEII*) (7, 8); *Eco47I* (-*AvaII*) (9, 10); *BamHI* (11, 12). В скобках указаны наиболее известные изошизомеры использованных необычных рестриктаз НПО «Фермент». На дорожках 2, 4, 9 представлено распределение рестрикционных фрагментов у гетерозигот по соответствующему полиморфизму; на дорожки 1, 2, 10 нанесен материал от гомозигот по часто встречающемуся аллелю соответствующего полиморфизма; на дорожки 7 и 8 — от гомозигот по часто встречающемуся и редкому аллелю *BstEII* полиморфизма. После обработки ДНК рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* образуются только инвариантные фрагменты, гибридизующиеся с пробой. В качестве пробы на ген рЛНП использован *BamHI*-фрагмент размером 1,9 т.п.н. плазмиды *pLDLR-3* (*pLRB-19*). Цифры слева — маркеры молекулярной массы в т.п.н.

Fig. 2. Southern blot analysis of the human genomic DNA using the probe for the 3' end of the *LDLR* gene. 5 μ g of human genomic DNA was digested with the restriction enzyme and then subjected to electrophoresis. The enzymes used: *PvuII* (1, 2); *Eco130I* (-*StyI*) (3, 4); *EcoRI* (5, 6); *Eco91I* (-*BstEII*) (7, 8); *Eco47I* (-*AvaII*) (9, 10); *BamHI* (11, 12). The characteristic pattern of signal distribution in heterozygous individuals is shown on lanes 2, 4, 9. The material from patients homozygous for the frequent allele of the same polymorphism is presented on lanes 1, 3, 10. Lanes 7 and 8 show the distribution of fragments after electrophoresis in patients homozygous for the frequent and for the rare allele of the *BstEII* polymorphism. Only invariant fragments hybridizing with the probe are formed after DNA treatment with *EcoRI* or *BamHI* restrictases. The 1.9 kb *BamHI* fragment of the *pLDLR-3* (*pLRB-19*) was used as a probe for the *LDLR* gene. Figures on the left indicate the DNA fragments length in kb

Рис. 3. Гибридизация по Саузерну геномной ДНК, обработанной рестриктазой *TaqI*, с пробой на 5'-конец гена рЛНП. На дорожке 3 видно присутствие редкого полиморфного низкомолекулярного фрагмента. На других дорожках представлен материал от гомозигот по обычному аллелю полиморфизма. В качестве пробы на ген рЛНП использовали *BamHI*-фрагмент размером 1,1 т.п.н. плазмиды *pLDLR-3* (*pLRB-11*). Цифры слева — маркеры молекулярной массы в т.п.н.

Fig. 3. Southern blot hybridization of *TaqI* digested human genomic DNA with the probe for the 5' end of the *LDLR* gene. The presence of the rare polymorphic low-molecular weight fragments is shown on lane 3. The 1.1 kb *BamHI* fragment of the plasmid *pLDLR-3* (*pLRB-11*) was used as a probe for the *LDLR* gene. Figures on the left indicate the DNA fragments length in kb

рестриктаз дают полностью соответствующее описанному в литературе данному распределению инвариантных и полиморфных фрагментов гена рЛНП при гибридизации (рис. 2). Более того, возможно выявление всех четырех ПДРФ на одном фильтре в результате одной гибридизации при использовании в качестве пробы 1,9 т. п. н. *Bam*HI-фрагмента

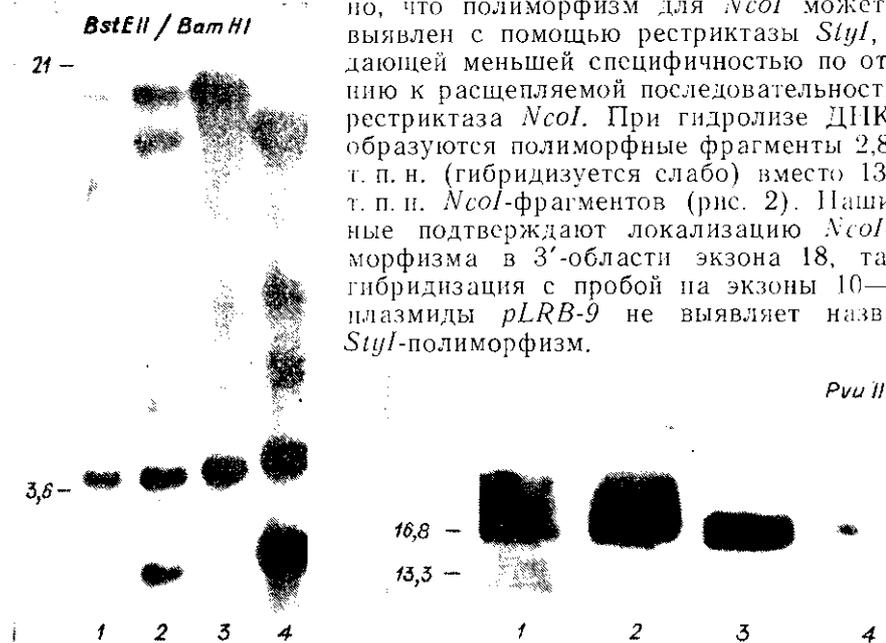


Рис. 4. Гибридизация по Саузерну *BstEII/Bam*HI-фрагментов геномной ДНК с пробой на ген рЛНП. В качестве пробы на ген рЛНП использован клонированный *Bam*III-фрагмент размером 0,9 т. п. н. плазмиды *pLRZ (pLRB-9)*. Цифры слева — маркеры молекулярной массы в т. п. н. Пациент А. Т. (1) от каждого из своих родителей (2, 3) унаследовал часто встречающийся *BstEII/Bam*HI-аллель. На дорожке 4 для сравнения представлен материал от пациента, гомозиготного по редкому аллелю *BstEII/Bam*III-полиморфизма

Fig. 4. Southern blot hybridization of *BstEII/Bam*III genomic DNA fragments with the *LDLR* gene probe. The 0.9 kb *Bam*III fragment of *pLRZ (pLRB-9)* was used as a probe for the *LDLR* gene. Figures on the left indicate the DNA fragments length in kb. Patient A. T. (1) has inherited the more common *BstEII/Bam*III allele from both his parents (2, 3). The distribution of *BstEII/Bam*III fragments of the *LDLR* gene in a patient homozygous for the rare allele of the indicated polymorphism is shown on lane 4 for comparison

Рис. 5. Гибридизация по Саузерну геномной ДНК, обработанной рестриктазой *Pvu*II, с пробой на ген рЛНП. На дорожке 1 видно присутствие редкого полиморфного фрагмента. На других дорожках представлен материал от гомозигот по обычному аллелю полиморфизма. В качестве пробы использовали клонированный *Bam*III-фрагмент размером 0,9 т.п.н. плазмиды *pLRZ (pLRB-9)*. Цифры слева — маркеры молекулярной массы в т.п.н.

Fig. 5. Southern blot hybridization of *Pvu*II digested human genomic DNA with the probe for the *LDLR* gene. The presence of the rare polymorphic fragment is shown on lane 1. The 0.9 kb *Bam*III fragment of *pLRZ* plasmid cloned into *pLRB-9* was used as a probe for the *LDLR* gene. Figures on the left indicate the DNA fragments length in kb

*Taq*I-полиморфизм [9, 15] может быть выявлен при гибридизации ДНК на фильтрах с 5'-концевой пробой на ген рЛНП, а именно: с *Bam*HI-фрагментом плазмиды *pLDLR-3 (pLRB-11)* размером 1,1 т. п. н. (проба на экзоны 1—8 гена) (рис. 3).

Рестриктаза *BstEII* дает полиморфные фрагменты гена рЛНП размером 33 или 22+11 т. п. н. Эти фрагменты трудно разделяются в 0,8 %-ной агарозе и плохо переносятся из геля на фильтры по Саузерну [12]. На рис. 2 представлен материал от гомозигот по рассматриваемому полиморфизму. Совместный перевар геномной ДНК рестрик-

тазами *BstEII* и *EcoRI* [13] дает более удовлетворительно делимые фрагменты размерами 12 или 9+3 т. п. н. Использование двойного расщепления ДНК доноров эндонуклеазами *BstEII* и *BamHI* приводит к образованию близких к ним по молекулярным массам фрагментов.

Кодоминантное наследование *BstEII/BamHI*-полиморфных фрагментов в одной семье представлено на рис. 4.

Рис. 6. *EcoRI*-полиморфный вариант гена рЛНП. С пробой на 5'-конец гена рЛНП у большей части обследованных индивидуумов (3, 4) гибридизуются *EcoRI*-фрагменты геномной ДНК размером 10; 9 и 1,8 т. п. н. (не показан). У пациента М. К. отсутствует гибридизационный сигнал от фрагментов размером 9 и 1,8 т. п. н. (не показан), а у его сына данные сигналы ослаблены по сравнению с нормальными интенсивностями (дорожки 1 и 2 соответственно). Гибридизация с *BamHI*-фрагментом плазмиды *pLDLR-3* (*pLRB-11*) размером 1,1 т. п. н. Цифры слева — маркеры молекулярной массы в т. п. н.

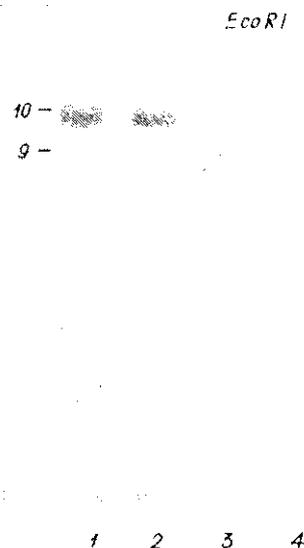


Fig. 6. *EcoRI* polymorphic variant of the *LDLR* gene. Hybridization of the *EcoRI* digested human genomic DNA with the probe for the 5' end of the *LDLR* gene reveals three different fragments (3, 4): 10 kb, 9 kb, 1.8 kb (smaller fragment is not shown). In M. K. patient hybridization signal from fragments 9 kb and 1.8 kb (not shown) is undetectable (1). In his son D. K. these fragments are present but only in half-intensity as compared with control (2). The 1.1 kb *BamHI* fragment of the *pLDLR-3* (*pLRB-11*) plasmid was used as a probe for the *LDLR* gene. Figures on the left indicate the DNA fragments length in kb

Использование в качестве зонда *BamHI*-фрагмента 0,9 т. п. н. из плазмиды *pLRZ* (*pLRB-9*) дает высокое соотношение сигнал/фон при выявлении *AvaII*-, *BstEII*- и особенно *PvuII*-полиморфизмов (рис. 5).

По предварительным данным мы оценили частоты редкого аллеля для разных ПДРФ в исследованной популяции (таблица). Малое количество обследованных доноров (независимых аллелей) не позволяет выявить различия частот для отдельных аллельных вариантов в исследуемой популяции Петроградского района Ленинграда от европейской. Однако приведенные в таблице результаты дают представление о том, что в первую очередь *AvaII*- и *BstEII*-ПДРФ могут быть полезны в семейном анализе для диагностики СГ.

Известно, что в различных популяциях от 5—7% мутаций в гене рЛНП до 30% в некоторых изолированных этнических группах составляют протяженные делеции [4, 5, 22, 23]. Большой частью они локализованы в 5'-концевой области гена. Эти мутации могут быть выявлены непосредственно гибридизационными методами. Нами также была предпринята попытка поиска протяженных делеций у больных типом На гиперлипипротенемии. При этом исследовании выявлен новый редкий полиморфный вариант гена рЛНП, связанный с утратой сайта для рестриктазы *EcoRI* в интроне 6 (рис. 6). У пациента М. К. отсутствуют фрагменты размером 9 и 1,8 т. п. н., а имеется только фрагмент размером 10 т. п. н. при гибридизации с пробой на 5'-конец гена. Его сын является гетерозиготой по этому *EcoRI*-сайту: фрагменты 9 и 1,8 т. п. н. характеризуются меньшей интенсивностью гибридизационного сигнала по сравнению с таковыми у других обследованных пациентов. Видимо, исчезновение сайта для *EcoRI* не связано с протяженной делецией, так как характер распределения *TagI*-фрагментов у больного М. К. не выявляет отличий от обычно наблюдаемого. Причина исчезновения сайта нами исследуется. В данной семье этот сайт может быть полезным маркером для изучения сегрегации СГ.

Следует отметить, что использование ПДРФ для нескольких ферментов при изучении родословных конкретных семей с СГ значительно увеличивает возможности метода [23, 24] и позволяет однозначно осу-

щественлять раннюю диагностику и лечение заболевания. Ранняя ДНК-диагностика больных с СГ позволяет не только выбрать подходы к лечению, но и определить целесообразность применения генной терапии.

DNA-DIAGNOSTICS OF FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA

M. Yu. Mandelsham, L. K. Sasina, A. I. Schwartzman

Institute for Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

Familial hypercholesterolemia (FH) is one of the most common human genetic diseases. This inborn error of metabolism is connected with mutations in the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene. DNA diagnostics is not only a method of the highest validity for FH determination, but also this method permits detecting the disease before the appearance of clinical disorders. The construction of DNA probes necessary for FH diagnostics based on determination of the LDLR gene restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) has been described in the paper. The *PvuII*, *BstEII*, *AvaII*, *NcoI* and *TaqI* RFLPs are regarded to be helpful markers in FH family study. A new polymorphic variant of the LDLR gene for the enzyme *EcoRI* is described.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein J. L., Brown M. S. Familial hypercholesterolemia // The metabolic basis of inherited disease / Eds J. B. Stanbury et al.—New York: McGraw-Hill, 1983.— P. 672—712.
2. Brown M. S., Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis // Science.— 1986.— 232, N 4746.— P. 34—47.
3. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins / T. S. Südhof, J. L. Goldstein, M. S. Brown, D. W. Russell // Ibid.— 1985.— 228, N 4701.— P. 815—822.
4. Horsthemke B., Dunning A., Humphries S. Identification of deletions in the human low density lipoprotein (LDL) receptor gene // J. Med. Genet.— 1987.— 24, N 3.— P. 144—147.
5. Langlois S., Kastelcin J. J. P., Hayden M. R. Characterization of six partial deletions in the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene causing familial hypercholesterolemia (FH) // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 43, N 1.— P. 60—68.
6. The Lebanese allele at the low density lipoprotein receptor locus. Nonsense mutation produces truncated receptor that is retained endoplasmic reticulum / M. A. Lehrman, W. J. Schneider, M. S. Brown et al. // J. Biol. Chem.— 1987.— 262, N 1.— P. 401—410.
7. Goldstein J. L., Basu S. K., Brown M. S. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells // Meth. Enzymol.— 1983.— 98.— P. 241—266.
8. Humphries S., Taylor R., Munroe A. Resolution, by DNA probes, of uncertain diagnosis of inheritance of hypercholesterolemia // Lancet.— 1988, N 8614.— P. 794—795.
9. *TaqI* polymorphism in the LDL receptor gene and a *TaqI* 1.5 kb band associated with familial hypercholesterolemia / K. Yamakawa, T. Okafuji, K. Iwamura et al. // Hum. Genet.— 1988.— 80, N 1.— P. 1—5.
10. A common DNA polymorphism of the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene and its use in diagnosis / S. E. Humphries, B. Horsthemke, M. Seed et al. // Lancet.— 1985.— N 8436.— P. 1003—1005.
11. Hobbs H. H., Esser V., Russell D. W. *AvaII* polymorphism in the human LDL receptor gene // Nucl. Acids Res.— 1987.— 15, N 1.— P. 379.
12. RFLP for the human LDL receptor gene (LDLR): *BstEII* / I. T. Steyn, A. Pretorius, P. A. Brink, A. J. Bester // Ibid.— N 11.— P. 4702.
13. Kotze M. J., Langenhoven E., Retief A. E. Improved visualization of the *BstEII* RFLP of the human LDL receptor gene by co-digestion // Ibid.— N 23.— P. 10067.
14. A RFLP associated with the low density lipoprotein receptor gene / M. J. Kotze, E. Langenhoven, E. Dietzsch, A. E. Retief // Ibid.— N 1.— P. 376.
15. *TaqI* polymorphism in the human LDL receptor gene / K. Yamakawa, T. Okafuji, Y. Iwamura et al. // Ibid.— N 18.— P. 7659.
16. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants / L. M. Kunkel, K. D. Smith, S. H. Boyer et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1977.— 74, N 3.— P. 1245—1249.
17. Bell G. I., Karam J. H., Rutter W. J. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene // Ibid.— 1981.— 78, N 9.— P. 5759—5763.
18. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.— 1975.— 98, N 3.— P. 503—517.

19. *Feinberg A. P., Vogelstein B.* A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // *Anal. Biochem.*—1983.—**132**, N 1.— P. 6—13.
20. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
21. *The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA / Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown et al.* // *Cell.*—1984.—**39**, N 1.— P. 27—38.
22. *Identification of a deletion in the LDL receptor gene. A Finnish type of mutation / K. Aalto-Setälä, H. Gylling, T. Miettinen, K. Kontula* // *FEBS Lett.*—1988.—**230**, N 1, 2.— P. 31—34.
23. *The use of recombinant DNA techniques for the diagnosis of familial hypercholesterolaemia / S. Humphries, R. Taylor, M. Jeenah et al.* // *J. Inher. Metabol. Disease.*—1988.—**11**, suppl. 1.— P. 33—44.
24. *Gene probes in diagnosis of familial hypercholesterolemia / S. Humphries, R. Taylor, M. Jeenah et al.* // *Arteriosclerosis.*—1989.—**9**, N 1, suppl.— P. 59—65.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.212:577.352.27

**С. П. Шнилевая, И. Е. Костецкий, Л. И. Лихачева, Л. Г. Жарова,
Д. М. Иродов, Е. В. Усенко, Т. В. Столяр, В. А. Кордюм**

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ IN VIVO С ПОМОЩЬЮ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

Исследована экспрессия гена бактериальной β -галактозидазы in vivo в гепатоцитах чуждшей линии BALB/c. Использовано несколько векторных молекул, содержащих lacZ-ген. Тестирование продукта экспрессии проводили иммунофлюоресцентным методом с последующей микроцитометрией. Обсуждаются преимущества использованного метода тестирования для выявления отдельных трансформированных клеток в популяции гепатоцитов.

Введение. Функциональная коррекция наследственных патологий методами геной терапии требует детального изучения функционирования введенного генетического материала в клетках различных органов и тканей и включает в себя ряд экспериментальных подходов: тестирование введенной ДНК (ДНК-дот и ДНК-блот анализы) и транскрипта (РНК-блот), тестирование продукта экспрессии (иммуоферментный и др. методы анализа количественного определения белка, Western-блот, использование специфических биохимических субстратов для выявления функциональной активности продукта экспрессии). Все эти методы позволяют оценить эффективность функционирования введенного гена в группе клеток, отдельном органе или ткани по суммарному продукту. В то же время в ряде случаев существует необходимость клеточного изучения уровня экспрессии и для этих целей очень удобным инструментом может оказаться непрямо́й иммунофлюоресцентный (ИФ) метод [1]. Целью настоящей работы явилось изучение функционирования бактериального *lacZ*-гена, кодирующего экспрессию β -галактозидазы в гепатоцитах мышей, и возможности корректного использования ИФ-метода для получения быстрого ответа об экспрессии гена на уровне отдельной клетки.

Материалы и методы. В экспериментах по исследованию экспрессии гена бактериальной β -галактозидазы использованы векторные молекулы, содержащие *lacZ*-ген *Escherichia coli*, плазмиды *pGA293* [2] и *pCII10*. Кроме того, применяли конструкцию *pGA293A*, представляющую собой плазмиду *pGA293* с клонированным по *BamHI*-сайту *Alu*-повтором, и плазмиду *pGA293Z Δ* , лишенную *EcoRI*-фрагмента, содержащего ген бактериальной β -галактозидазы.