

4. Marx J. L. Gene therapy—so near and yet so far away // Science.—1986.—232, N 4752.—P. 824—825.
5. Ланцов В. А. Бактериальный белок Rec A: биохимический, генетический и физико-химический анализ // Генетика.—1985.—21, № 9.—С. 1413—1427.
6. Cox M. M., Lehman I. R. Enzymes of general recombination // Ann. Rev. Biochem.—1987.—56.—P. 229—262.
7. Kmiec E., Holloman W. K. Homologous pairing of DNA molecules promoted by a protein from *Ustilago* // Cell.—1982.—29, N 2.—P. 367—374.
8. Kenne K., Ljungquist S. A. A DNA-recombinogenic activity in human cells // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 7.—P. 3057—3068.
9. General recombination mechanisms in extracts of meiotic cells / Y. Hotta, S. Tabata, R. A. Bouchard et al. // Chromosoma.—1985.—93, N 2.—P. 140—151.
10. Hsieh P., Meyn M. S., Camerini-Otero R. D. Partial purification and characterization of a recombinase from human cells // Cell.—1986.—44, N 3.—P. 885—894.
11. Cassuto E., Lightfoot L.-A., Howard-Flanders P. Partial purification of an activity from human cells that promotes homologous pairing and the formation of heteroduplex DNA in the presence of ATP // Mol. and Gen. Genet.—1987.—208, N 1.—P. 10—14.
12. Characterization of an ATP-dependent DNA strand transferase from human cells / D. Ganea, P. Moore, L. Checuri, R. Kucherlapati // Mol. and Cell Biol.—1987.—7, N 9.—P. 3124—3130.
13. Kolodner R., Evans D. H., Morrison P. T. Purification and characterization of an activity from *Saccharomyces cerevisiae* that catalyses homologous pairing and strand exchange // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 16.—P. 5560—5564.
14. Lopez B., Raussei S., Coppey J. Homologous recombination intermediates between two duplex DNA catalyzed by human cell extracts // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 14.—P. 5643—5655.
15. Eisen A., Camerini-Otero R. D. A recombinase from *Drosophila melanogaster* embryos // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 20.—P. 7481—7485.
16. Fishel R. A., Detmer K., Rich A. Identification of homologous pairing and strand-exchange activity from human tumor cell line based on Z-DNA affinity chromatography // Ibid.—N 1.—P. 36—40.
17. Sensitive homologous recombination strand-transfer assay: Partial purification of a *Drosophila melanogaster* enzyme and detection of sequence effects on the strand-transfer activity of Rec A protein / J. G. McCarthy, M. Sander, K. Lowenhaupt, A. Rich // Ibid.—N 16.—P. 5854—5858.
18. Sugino A., Nitiss J., Resnick M. A. ATP-independent DNA strand transfer catalyzed by protein(s) from meiotic cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Ibid.—N 11.—P. 3683—3687.
19. Митшакис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.—420 с.
20. Клонирование ДНК / Под ред. Д. Гловера.— М.: Мир, 1988.—320 с.
21. Kalb V. F., Bernlohr R. W. A new spectrophotometric assay for protein // Anal. Biochem.—1977.—82, N 2.—P. 362—371.
22. Symington L. S., Fogarty L. M., Kolodner R. Genetic recombination of homologous plasmids catalyzed by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae* // Cell.—1983.—35, N 3.—P. 805—813.
23. Darby V., Blattner F. Homologous recombination catalyzed by mammalian cell extracts *in vitro* // Science.—1984.—226, N 4679.—P. 1213—1215.
24. Kucherlapati R. S., Spencer J., Moore P. D. Homologous recombination catalyzed by human cell extracts // Mol. and Cell Biol.—1985.—5, N 4.—P. 714—720.

Ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова
АН СССР, Ленинград

Получено 23.06.89

УДК 577.213.3

М. В. Асеев, Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, В. С. Баранов

ПДРФ-АНАЛИЗ И ДИАГНОСТИКА ГЕМОФИЛИИ А ПРИ ПОМОЩИ ДНК-ЗОНДОВ

Методом блот-гибридизации изучен полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) ДНК-последовательностей, тесно сцепленных (зонд St-14) или расположенных внутри, т. е. представляющих собой фрагменты гена фактора (F) VIII: С свертывания крови (p51.61 и p1.8), в ленинградской популяции (контроль) — в семьях высокого риска и непосредственно у больных гемофилией А. Частота ПДРФ-аллелей, выявленная этими зондами, во всех исследованных группах в целом хорошо коррелирует с аналогичными показателями для западноевропейских и североамериканских популяций. В исследованиях с зондом St-14 обнаружены два дополнительных, ранее неописанных

ных аллеля 4,35 и 4,2 т. п. о. Подтверждена высокая информативность внесленного зонда *St-14* и сравнительно низкая — внутригенных зондов. Совместное использование трех зондов в семьях высокого риска позволило установить диагноз и подтвердить гетерозиготное носительство гена гемофилии А у 11 и отвергнуть его у двух женщин — близких родственников пробандов, а также с вероятностью более 95 % осуществить пренатальную диагностику гемофилии А у плода 9-й недели развития.

Введение. Использование специфических молекулярных ДНК-зондов для диагностики наследственных заболеваний как моногенной, так и хромосомной этиологии — новое магистральное направление современной медицинской генетики [1—3]. Согласно существующим данным, уже сегодня более 170 различных наследственных нарушений может быть выявлено при помощи ДНК-зондов [1], причем в связи со стремительным прогрессом данных по молекулярной структуре генома человека число доступных для молекулярной диагностики болезней быстро увеличивается [4, 5].

Решающие успехи достигнуты в последние годы и в изучении молекулярной природы гемофилии А — тяжелого наследственного заболевания, обусловленного рецессивной мутацией гена *F VIII : C*, локализованного в длинном плече X-хромосомы (*Xq27.1*) в непосредственной близости от места привычной ломки X-хромосомы — *Fra-X* (*Xq28*) [6, 7]. Сразу в нескольких лабораториях мира практически одновременно выделен и охарактеризован сам ген [8, 9], его кДНК [10], изучена экспрессия этого гена *in vitro* [10] и начат планомерный анализ молекулярной природы мутаций гена *F VIII : C*, лежащих в основе различных клинических форм гемофилии А [11—13]. Важным итогом таких исследований явилось выделение фрагментов ДНК как самого гена, так и тесно сцепленных с ним районов, характеризующихся выраженным ПДРФ при обработке определенными эндонуклеазами [14, 15]. Легко выявляемые методом блот-гибридизации или при помощи реакции специфической амплификации ДНК [16] такие полиморфные сайты оказались удобными молекулярными маркерами мутантного гена *F VIII : C* и позволяют с высокой эффективностью выявить гетерозиготное носительство мутантного гена *F VIII : C* в семьях высокого риска [14], проследить генеалогию заболеваний в ряде поколений [15] и проводить его пренатальную диагностику [17, 18].

В настоящем сообщении приведены первые данные ПДРФ-анализа с помощью ДНК-зондов, применяемых для диагностики гемофилии А, в отечественной (ленинградской) популяции, в том числе в семьях высокого риска с целью выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики гемофилии А.

Материалы и методы. Работа выполнена на 32 здоровых донорах и 100 членах семей высокого риска (всего 30 семей), состоящих на учете Ленинградского гемофилического центра, в том числе на 35 больных гемофилией А, 24 их матерях и 50 ближайших родственниках пробанда. Наследственная передача гемофилии А по женской линии подтверждена генеалогически в 12 семьях. Диагноз гемофилии А у пробандов установлен в лаборатории свертывания крови Ленинград. ин-та гематологии и переливания крови МЗ РСФСР.

ДНК выделяли из 15—20 мл периферической крови в соответствии с модифицированным вариантом бесфенольного метода [18]. С этой целью лейкоциты отделяли от эритроцитов в желатиновом градиенте (3,5 % желатина, 0,8 % NaCl), отмывали физиологическим раствором, лизировали (0,075 М NaCl, 0,025 М ЭДТА, pH 8,0; 0,8 % DS-Na, 0,8 М NaClO₄). После денатурации белков (хлороформ: октанол, 24:1) и отмывки (чистый хлороформ) ДНК осаждали изопропанолом и растворяли в TE-буфере. Рестрикционное расщепление ДНК проводили соответствующими эндонуклеазами (табл. 1 и 2) в течение 6—16 ч. Качество реакции проверяли на мни-форезе. Электрофорез образцов ДНК для блот-анализа осуществляли в 0,8 %-ной агарозе, после чего по методике [21] их переносили на капроновый фильтр «Хийу Калур» (Таллинн).

В работе использованы три ДНК-зонда. Два фрагмента ДНК геномного гена *F VIII : C* — *p51.61* и *p1.8* (любезно предоставлены Р. Лоуном, Сан-Франциско, США) и один внегенный фрагмент — *St-14* (любезно предоставлен Дж.-Л. Манделем, Страсбург, Франция).

Зонд p51.61 (рестриктаза *HindIII*) размером 4,7 т. п. о., последовательность, содержащая с 14-го по 24-й экзоны и часть 26-го экзона гена *F VIII:C* [19]. Зонд *p1.8* (рестриктаза *BglI*) размером 1,8 т. п. о., последовательность, содержащая часть экзона 26 и 3'-нетранслируемую часть гена *F VIII:C* [19]. Зонд *St-14* (рестриктаза *TaqI*), 3,0 т. п. о., фрагмент локуса *DXS52* на расстоянии 3—4,5 сантиморганиды от гена *F VIII:C* [19].

Таблица 1

Частота аллелей локуса *DXS52*, выявляемая ДНК-зондом *St-14*, в X-хромосомах с нормальным и мутантным аллелями гена *F VIII:C*

Allelic frequencies in DXS52 locus revealed by St-14 probe in normal and haemophilia A X-chromosomes

№ Аллели	Размер рестрикционного фрагмента, т. п. о.	Частота встречаемости аллели в популяции, %			
		Ленинград, 123 нормальные X-хромосомы	21 X-хромосома с геном гемофилии А	Страсбург, 145 нормальных X-хромосом [20]	Солт Лэйк Сити, 54 нормальные X-хромосомы [20]
1	6,6	0	0	0,7	0
2	5,3	0,8	0	5,5	3,9
3	4,8	10,7	4	11,7	11,8
4	4,5	39,7	32,0	35,9	37,2
5	4,35	1,7	0	0	0
6*	4,2	0,8	0	0	0
7	4,1	17,4	24,0	21,4	19,6
8	4,0	4,1	0	0,2	0
9	3,9	15,7	8,0	9,0	13,7
10	3,4	9,1	24,0	15,9	13,7

* Новые аллели, обнаруженные в данной работе.

Таблица 2

ПДРФ-анализ аллельного полиморфизма гена *F VIII:C*, выявляемого ДНК-зондами *p51.61* и *p1.8*

RFLP-analysis of allelic polymorphism of F VIII:C gene as revealed by intragenetic probes p51-61 and p1.8

ДНК-зонд	Рестриктаза	Аллель, т. п. о.	Частота аллелей, %	
			Ленинград, 55 нормальных X-хромосом	США [20]
<i>p51.61</i>	<i>HindIII</i>	2,6	27	30
		2,7	73	70
<i>p1.8</i>	<i>BglI</i>	20,0	9,2	10
		5,0	90,8	90

ДНК-зонды выделяли из культур соответствующих плазмид щелочным лизисом с последующим осаждением в градиенте хлористого цезия и бромистым этидином, метили в реакции ник-трансляции ^{32}P (удельная активность $2 \cdot 10^8$ имп·мин $^{-1}$ ·мкг $^{-1}$), гибридизовали на фильтрах ($6 \times \text{SSC}$, $5 \times$ раствор Денхарда, 0,05 % DS-Na , 100 мкг/мл ДНК спермы лосося, 10 % декстрасульфат, 18 ч, 65 °С) с рестрицированной ДНК доноров по методу [21] и после отмывки экспонировали с рентгеновской пленкой в кассетах с усиливающим экраном при -70 °С.

Результаты и обсуждение. Итоги ПДРФ-анализа суммированы в табл. 1 и 2. При этом в случае внегенного зонда *St-14* (табл. 1) данные по X-хромосоме здоровых доноров и «здоровых», т. е. не несущих мутации гемофилии А, X-хромосом объединены. Всего, таким образом, в системе *St-14/TaqI* проанализированы 123 «здоровые» X-хромосомы и 21 X-хромосома с геном гемофилии А. Спектр аллельного полиморфизма в случае зонда *St-14* отличается особенно большим разнообра-

зием. В системе *St-14/TaqI* выявляются до 10 различных аллелей как на нормальной X-хромосоме, так и на X-хромосоме с мутацией гемофилии А. Такая вариабельность сайтов рестрикции дает при блот-анализе весьма характерный паттерн аллелей с молекулярной массой от 3,4 до 6,6 т. п. о., нередко уникальный для каждого индивидуума (рис. 1). Частота различных типов *St-14* аллелей в ленинградской популяции в целом хорошо коррелирует с аналогичными показателями в популяциях Западной Европы и Северной Америки [20]. Вместе с тем

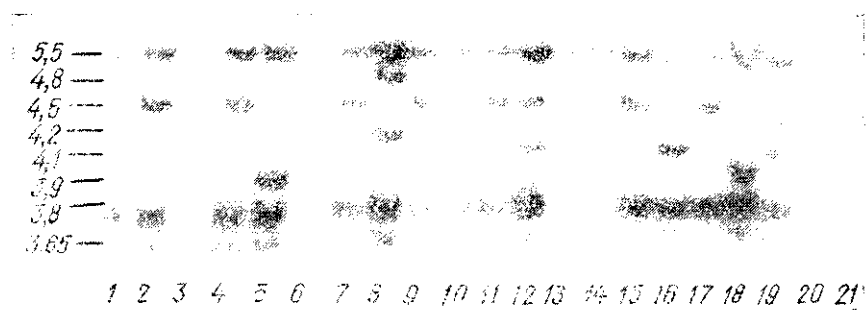


Рис. 1. ПДРФ-анализ 21 индивидуума из популяции Ленинграда. Рестриктаза *TaqI*, зонд *St-14*. Размеры фрагментов даны в т. п. о.

Fig. 1. RFLP-analysis of 21 persons in the Leningrad population *TaqI*, probe *St-14*. Sizes of fragments are given in kb

в наших исследованиях с зондом *St-14* были обнаружены два дополнительных, ранее не описанных аллеля размером 4,35 и 4,2 т. п. о., частота которых, однако, очень низкая (1,7 и 0,8 % соответственно).

В отличие от *St-14* оба внутригенных зонда выявляли полиморфизм лишь по одному сайту рестрикции. В обоих случаях соотношение аллелей в ленинградской популяции не отличалось от известных литературных данных (табл. 2).

Проведенный популяционный анализ ПДРФ позволил предположить высокую информативность (гетерозиготность по X-сцепленным аллелям) внегенного локуса *DXS52*, тестируемого зондом *St-14/TaqI*, и значительно более низкую — соответствующих фрагментов самого гена *F VIII : C* по сайтам *HindIII* и *BglI* соответственно. ПДРФ-анализ семей с гемофилией А подтвердил это предположение. Информативными, т. е. гетерозиготными по соответствующим ПДРФ аллелям, оказались матери детей с гемофилией А в 25 из 30 обследованных семей, причем большинство из них было информативно только по зонду *St-14*. ПДРФ-анализ 21 X-хромосомы с геном гемофилии А в системе *St-14/TaqI* выявил те же сочетания аллелей, что и в X-хромосомах без этой мутации (табл. 1). Наблюдаемые при этом различия частот ряда аллелей «больных» и «здоровых» X-хромосом были статистически недостоверными.

Применение зонда *St-14* позволило подтвердить гетерозиготное носительство гемофилии у 11 и отвергнуть его у двух женщин группы высокого риска с вероятностью более 95 %. При помощи внутригенных зондов наличие гена гемофилии А с вероятностью около 99 % установлено у пяти из шести близких родственниц пробанда. Результаты ПДРФ-анализа диагностических случаев гетерозиготного носительства гемофилии А внегенным и внутригенными ДНК-зондами совпадали. Пример ПДРФ-анализа с целью выяснения гетерозиготного носительства в семье с гемофилией А приведен на рис. 2.

В одной из 12 семей с точно установленной наследуемой формой гемофилии А проведена пренатальная диагностика. С этой целью осуществлен ПДРФ-анализ всех доступных здоровых и больных членов семьи П. и выяснено, что молекулярным маркером мутации гемофилии А в данной семье является аллель 4,5 т. п. о. (рис. 3). На 9-й неделе

беременности у матери — облигатной гетерозиготной носительницы при помощи хорионбиопсии получены ворсинки хориона плода, использованные для цитогенетического и молекулярного анализа. Мужской пол плода установлен по наличию Y-хромосомы в интерфазных клетках и в метафазных пластинках. Наличие аллеля размером 4,5 т. п. о. у плода (рис. 3) однозначно доказывало присутствие у пробанда X-хромосомы с мутацией гемофилии А. По желанию женщины данная беременность была прервана на 11-й неделе. ПДРФ-анализ при помощи внегенного зон-

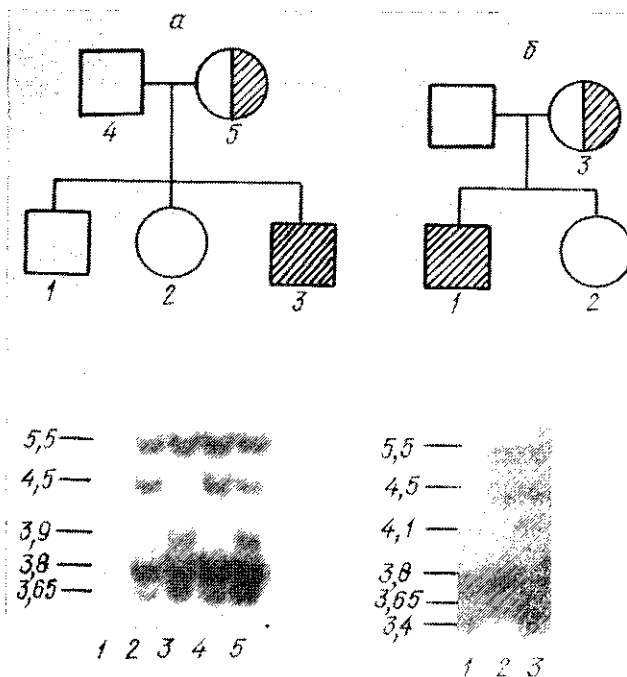


Рис. 2. Родословные и ПДРФ-анализ двух семей с наследственной формой гемофилии А (рестриктаза *TaqI*, зонд *St-14*): а — мутантный ген сцеплен с аллелем 3,9 т. п. о.; б — с аллелями 3,4 и 4,1 т. п. о.

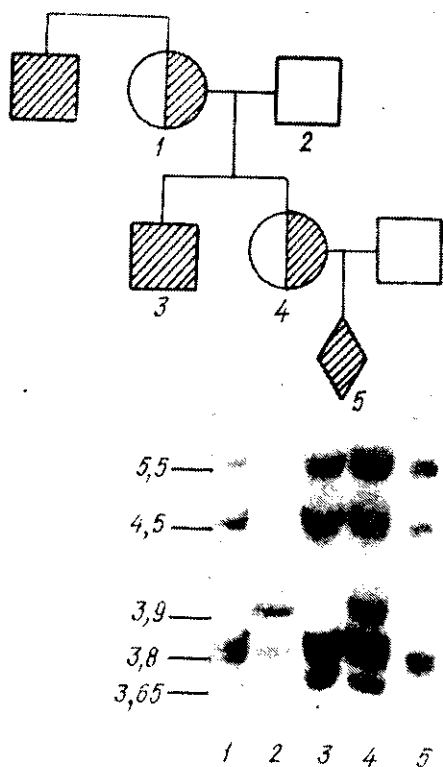
Fig. 2. RFLP-analysis and pedigrees of two families with hereditary hemophilia A. (probe *St-14*): *TaqI*, а — hemophilia A gene linked to 3.9 kb allele; б — hemophilia A gene linked to 3.4 and 4.1 kb alleles

да *St-14* позволил обнаружить, что частота и соотношение аллелей у жителей Ленинграда соответствуют таковым у жителей Западной Европы и Северной Америки [20]. Интересной особенностью, однако, представляется наличие двух ранее неизвестных аллелей (4,2 и 4,35 т. п. о.). Являются ли они редкой случайной находкой либо представляют собой характерную особенность тонкой структуры локуса *DXS52* ленинградской популяции или какой-нибудь этнической группы северо-западного региона страны — ответы на эти вопросы требуют специального изучения на большем материале. Частота аллелей *St-14/TaqI* при анализе нормальных X-хромосом и X-хромосом, несущих мутацию гемофилии А, статистически не отличается, т. е. аллели локуса *DXS52* не обнаруживают неравновесного сцепления с мутантным или нормальным геном гемофилии А. Эти результаты хорошо подтверждают известные литературные данные [14, 15].

В плане пренатальной диагностики и уточнения гетерозиготного носительства гемофилии А особенно информативным оказался зонд *St-14*. Следует, однако, учитывать, что локус *DXS52*, фрагментом которого является зонд *St-14*, находится на расстоянии 3,5—4 сантиморганды от гена *F VIII : C*, т. е. с вероятностью 3,5—4 % между этими генами возможен кроссинговер. Принимая во внимание, что частота кроссинговера в женском мейозе примерно в 1,5—2 раза больше, чем в мужском, вероятность ошибки ДНК-диагностики в случае зонда *St-14* может возрасти до 5—6 % [4, 18]. Более надежные результаты диагностики гемофилии А дают внутргенные зонды. Информативность примененных в работе внутргенных зондов *p51.61* (рестриктаза *HindIII*) и *p1.8* (рестриктаза *BglII*) оказалась невысока. Известно, что более перспективным для целей диагностики является использование системы *p51.61/BclI* [17, 18]. К сожалению, отсутствие такой отечественной рестриктазы либо ее изошизомера служит серьезным препятст-

вием для использования этой очень перспективной аллельной системы. Настоятельная необходимость в рестриктазе *BclI* особенно очевидна в настоящее время, когда именно для этого сайта рестрикции предложена система олигонуклеотидных праймеров, позволяющая проводить специфическую амплификацию соответствующего участка гена *F VIII : C* [16]. Точность диагностики при этом возрастает до 99 % [16].

Поскольку существующие иммуноферментные и другие лабораторные методы диагностики гемофилии *A* проводятся только на образцах крови, провести верификацию диагностированного нами случая гемофилии *A* у внутриутробного плода оказалось невозможным. Между тем разработка надежных методов выявления гемофилии у внутриутробного плода после предшествующей молекулярной диагностики представляется весьма актуальной задачей современной коагулологии и гематологии. В равной мере это относится и к необходимости разработ-



ки более надежных тестов для выявления гетерозиготного носительства гемофилии *A*, так как существующие функциональные и иммуноферментные методы, по крайней мере в 10—15 % случаев, дают ошибочные результаты [14]. В этой связи необходимо подчеркнуть, что эффективная пренатальная диагностика гемофилии *A* возможна лишь при доказанном гетерозиготном носительстве мутантного гена у матери, поскольку значительная часть случаев гемофилии *A* (около 30 %) имеет спонтанное происхождение, т. е. возникает *de novo* [14]. Вероятность повторного мутирования гена *F VIII : C* в гаметах той же женщины невелика, и эти семьи должны быть исключены из пренатальной диагностики. Отбор подобных семей проводится как на основании генеалогического анализа, так и по результатам коагуляционных исследований крови матери на гетерозиготное носительство гемофилии *A*.

Рис. 3. Пренатальная диагностика гемофилии *A* в семье П. Размеры фрагментов даны в т. п. о.

Fig. 3. Prenatal diagnosis of hemophilia *A* in family P. Sizes of fragments are given in kb

Авторы выражают искреннюю признательность проф. Дж.-Л. Манделю (Страсбург, Франция) и проф. Р. Лоуну (Сан-Франциско, США), за предоставление ДНК-зондов на гемофилию *A*, а также благодарность сотруднику Ленинград. ин-та гематологии и переливания крови Л. П. Папаян и сотрудникам Ленинград. гематол. центра Т. А. Андреевой, П. В. Храпову за предоставление семей с гемофилией *A*.

RFLP-ANALYSIS AND HAEMOPHILIA A DIAGNOSTICS WITH DNA PROBES

Aseev M. V., Ivashchenko T. E., Gorbunova V. N., Baranov V. S.

Institute of Obstetrics and Gynecology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

RFLP analysis of DNA sequences close to (probe St-14) or inside Factor VIII:C gene (probes p. 51.61 and probe p. 1.8) was carried out in the Leningrad population (control group), in the families with high risk of haemophilia A as well as in patients with haemophilia A. The frequency of corresponding alleles in normal and haemophilia A X chromosomes were in good concordance with relative allelic frequencies in populations of Western Europe and North America. Two rare and previously unknown alleles (4.2 and 4.35 base pairs) were detected in studies with St-14 probe. High informativity of closely linked St-14 probe and low predictive values of tested intragenetic probes have been confirmed. Using RFLP technique with 3 tested probes haemophilia A heterozygotes carriers have been diagnosed in 11 and rejected in 2 close female relatives of haemophilic patients. Prenatal diagnosis of haemophilia A in a 9-week embryo has been performed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jeanpierre M., Junien Cl. DNA analysis as clinical investigation: When and how? // *Ann. Genet.*—1984.—27, N 3.—P. 135—147.
2. Баранов В. С. Дородовая диагностика наследственных болезней, современное состояние, реальные возможности и перспективы // *Вестн. АМН СССР.*—1987.— № 4.—С. 44—50.
3. Калинин В. П. Генно-инженерная диагностика наследственных болезней // *Диагностика наследст. болезней.*—М., 1986.—С. 103—122.
4. Sommer S. A., Sobell J. L. Application of DNA-based diagnosis to patient care: the example of hemophilia A // *Mayo Clinic Proc.*—1987.—62, N 5.—P. 387—404.
5. Cooper D. N., Schmidtke J. Diagnosis of genetic diseases using recombinant DNA // *Hum. Genet.*—1987.—77, N 2.—P. 66—75.
6. Recombination between the factor VIII gene and the *DXS52* locus gives the most probable genetic order as centromere-Fra(X)-*DXS15-DXS52-F8C*-telomere / L. M. Mulligan, H. J. Grover, V. S. Blanchette et al. // *Amer. J. Med. Genet.*—1987.—26, N 4.—P. 751—760.
7. The human genes for hemophilia B flank the X chromosome fragile site at *Xq27.3* / M. Purrello, B. Alhadefi, D. Esposito et al. // *The EMBO J.*—1985.—4, N 3.—P. 725—729.
8. Characterization of the human factor VIII gene / J. W. Gitscher, W. I. Wood, T. M. Gorkalka et al. // *Nature.*—1984.—312, N 3256.—P. 326—330.
9. Structure of human factor VIII / G. A. Vahar, A. B. Keyt, D. Eaton et al. // *Ibid.*—P. 337—342.
10. Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor / J. J. Toole, J. L. Knopf, J. M. Wozney et al. // *Ibid.*—P. 342—347.
11. Nonsense and missense mutations in hemophilia A: estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides / H. Youssoufian, St. E. Antonarakis, W. Bell et al. // *Amer. J. Hum. Genet.*—1988.—42, N 4.—P. 718—725.
12. Characterization of a partial deletion of the factor VIII gene in a haemophiliac with inhibitor / B. Bardoni, M. Sampierio, M. Romano et al. // *Hum. Genet.*—1988.—79, N 1.—P. 86—88.
13. Gitscher J. Maternal duplication associated with gene deletion in sporadic hemophilia // *Amer. J. Hum. Genet.*—1988.—43, N 3.—P. 274—279.
14. Detection of hemophilia A carriers using intragenic factor VIII:C DNA polymorphism / R. L. Lanco, J. A. Phillips, P. J. Orlando et al. // *Blood.*—1987.—69, N 5.—P. 1539—1541.
15. RFLP analysis in families with sporadic haemophilia A. Estimate of the mutation ratio in male and female gametes / F. Bernardi, G. Marchetti, V. Bertagnolo et al. // *Hum. Genet.*—1987.—76, N 2.—P. 253—256.
16. Kogan S. G., Doherty M., Gitschier J. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A // *New Engl. J. Med.*—1987.—317, N 16.—P. 985—990.
17. Prenatal diagnosis of haemophilia A by factor VIII gene analysis / S. E. Antonarakis, K. L. Copeland, R. J. Carpenter et al. // *Lancet.*—1985.—123, N 8443.—1407—1409.
18. 1/2Erste ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikosippen mit Haemophilie A und B in der DDR / M. Wehnert, F. H. Herrmann, H. Metzke et al. // *Z. gesamte inn. Med.*—1988.—43, H. 16.—S. 441—444.

19. Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a *BclI* polymorphism in the factor VIII gene / J. Gitschier, D. Drayna, E. G. D. Tuddenham et al. // Nature.— 1985.— 314, N 6013.— P. 738—740.
20. Genetic screening for haemophilia A with a polymorphic DNA probes / I. Oberle, G. Camerino, R. Heilig et al. // New Engl. J. Med.— 1985.— 312, N 13.— P. 682—686.
21. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Molecular cloning.— New York: Cold Spring Harbor, 1982.— 420 p.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 06.04.89

УДК 575.116.4

**В. Н. Горбунова, В. В. Красильников, М. В. Асеев,
И. В. Санцевич, В. С. Баранов**

ИДРФ-АНАЛИЗ ГЕНА МИОДИСТРОФИИ ДЮШЕННА В ЛЕНИНГРАДСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ И В СЕМЬЯХ ВЫСОКОГО РИСКА

Методом блот-гибридизации исследован аллельный полиморфизм двух районов проксимальной части гена миодистрофии Дюшенна — DXS164 (зонд pERT87.15) и DXS206 (зонд pX11.1) у жителей Ленинграда и в семьях высокого риска с миодистрофией Дюшенна (МДД). Частота аллельного полиморфизма в популяции Ленинграда для обоих изученных фрагментов гена МДД оказались практически идентичной таковой в популяции Северной Америки. Число женщин, гетерозиготных по аллелям локусов DXS164 и DXS206, было примерно одинаковым и равнялось 40%. Аллельный полиморфизм гена МДД в семьях высокого риска не отличался от популяционного. Семь из девяти семей высокого риска, подвергнутых ИДРФ-анализу, оказались информативными для последующей ДНК-диагностики. У одного из шести обследованных больных с МДД обнаружена делеция проксимальной части гена МДД.

МДД — тяжелое летальное наследственное заболевание, сцепленное с полом и встречающееся в среднем с частотой 1 : 3 000 новорожденных мальчиков [1, 2]. Методами молекулярной генетики мутация картирована в средней части короткого плеча X-хромосомы (*Xp21*), подробно охарактеризован сам ген, оказавшийся одним из наиболее крупных известных генов млекопитающих [3], выделена и частично секвенирована его кДНК [4] и начат планомерный анализ молекулярной природы этого заболевания. Оказалось, в частности, что у 60% больных МДД наблюдается делеция одного или нескольких экзонов гена МДД [5]. На модели МДД реализован принцип «обратной генетики», впервые идентифицирован белковый продукт этого гена — белок дистрофин, содержащийся в норме в саркомере мышечных волокон [6]. В случае мутации МДД концентрация этого белка в скелетных мышцах резко уменьшается. Получены и клонированы многочисленные фрагменты самого гена, его кДНК и многочисленные последовательности ДНК-локусов, тесно сцепленных с геном МДД, позволяющие с высокой эффективностью выявлять гетерозиготное носительство мутации МДД и проводить диагностику (в том числе и пренатальную) этого тяжелого заболевания [7].

Цель работы состояла в популяционном анализе частоты аллельного полиморфизма двух районов гена МДД *DXS164* и *DXS206* при помощи соответствующих ДНК-зондов у жителей Ленинграда, а также в семьях высокого риска с МДД.

Материалы и методы. Работа выполнена на 101 здоровом доноре и 27 членах семей высокого риска с МДД (всего 9 семей), из них 6 пробандов, 9 матерей, 12 сибсов и ближайших родственников пробанда. Все обследованные семьи состоят на учете в медико-генетической поликлинике № 70 Ленинграда. Наследственный характер заболевания установлен генеалогическим анализом родословных и верифицирован методом дискриминационного анализа уровня сывороточной креатинфосфокиназы [8] в семи семьях и не подтвержден — в двух.