

17. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*.— 1970.— 227, N 5289.— P. 680—685.
18. *Granules 25—30 nm in diameter: Basic constituent of the nuclear matrix, chromosome scaffold, and nuclear envelope* / P. Engelhardt, U. Plagens, I. B. Zbarsky, I. S. Filatova // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1982.— 79, N 22.— P. 6937—6940.
19. *Thelander L., Berg P.* Isolation and characterization of expressible cDNA clones encoding the M1 and M2 subunits of mouse ribonucleotide reductase // *Mol. and Cell. Biol.*— 1986.— 6, N 10.— P. 3433—3442.
20. *A yeast protein analogous to E. coli RecA protein whose cellular level is enhanced after UV-irradiation* // J. F. Angulo, J. Schwencke, P. L. Moreau et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1985.— 20, N 1.— P. 120—124.
21. *Elledge S., Davis R.* Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *S. cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability // *Mol. and Cell. Biol.*— 1987.— 7, N 7.— P. 2783—2793.
22. *Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells* / Y. Engstrom, B. Rozzell, H.-A. Hanson et al. // *EMBO J.*— 1984.— 3, N 3.— P. 863—867.
23. *Identification of two major components of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat* / C. Heyling, P. B. Moens, W. van Raamsdonk et al. // *Eur. J. Cell. Biol.*— 1987.— 43, N 1.— P. 148—154.
24. *Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei* / C. Heyling, R. J. Dettmers, A. J. J. Dietrich et al. // *Chromosoma*.— 1988.— 96, N 2.— P. 325—332.
25. *Synaptonemal complex antigen location and conservation* / P. B. Moens, C. Heyling, A. J. J. Dietrich et al. // *J. Cell. Biol.*— 1987.— 105, N 1.— P. 93—103.
26. *Moens P. B., Earnshaw W. C.* Anti-topoisomerase II recognizes meiotic chromosome cores // *Chromosoma*.— 1989.— 98, N 2.— P. 317—322.

Отдел вирусологии Ун-та, Хельсинки
Ленингр. ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова
АН СССР, Гатчина

Получено 05.07.90

УДК 577.152.1

А. Л. Шварцман, А. Ковальская, М. И. Страхова, В. С. Гайцхоки

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ АЛЬФА₁-АНТИТРИПСИНА

Проведено сравнение трех различных методов ДНК-диагностики наследственной недостаточности альфа₁-антитрипсина (АТ), основанных на анализе Z-мутации во фрагменте экзона V гена АТ, амплифицированного в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Показано, что методы гибридизации с аллель-специфическими олигонуклеотидами, альтернативного праймирования и прямого секвенирования выявляют гетеро- и гомозиготное носительство Z-аллеля и могут быть использованы для пренатальной диагностики наследственной недостаточности АТ.

Введение. Наследственная недостаточность АТ встречается с частотой 1/1000—1/2000 в популяциях людей белой расы в Северной Америке и Европе [1, 2]. В подавляющем большинстве случаев заболевание обусловлено единичной аминокислотной заменой в позиции 342^{Glu}→^{Lys} полипептидной цепи АТ [1, 2]. У 15—17 % носителей этой мутации (Z-аллеля) наблюдается развитие в детском возрасте гепатита и прогрессирующего цирроза печени, но в большинстве случаев в более позднем возрасте развивается первичная эмфизема легких [2, 3]. За последнее время накоплен большой опыт пренатальной диагностики АТ [2—6]. Однако не все использованные при этом методы представляются адекватными. Так, исследование полиморфизма длин рестриционных фрагментов, неравновесно сцепленного с Z-аллелем гена АТ, характеризовалось рядом существенных ограничений, связанных, в первую очередь, с необходимостью предварительного скрининга популяции,

© А. Л. ШВАРЦМАН, А. КОВАЛЬСКАЯ, М. И. СТРАХОВА, В. С. ГАЙЦХОКИ, 1991

неполной информативностью при семейном анализе, артефактами вследствие неполного переваривания ДНК рестрикционными эндонуклеазами [5]. Прямая гибридизация аллель-специфических олигонуклеотидов с тотальными препаратами геномной ДНК характеризуется низкой чувствительностью, а также недостаточной репродуцибельностью и специфичностью [4]. В последние годы прогресс пренатальной ДНК-диагностики наследственных болезней обусловлен развитием метода ПЦР, позволяющего анализировать непосредственно фрагмент

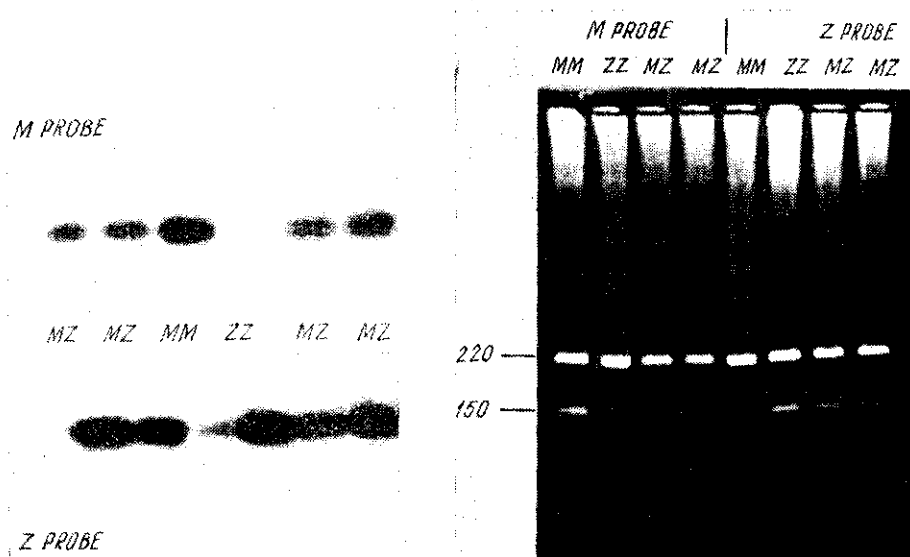


Рис. 1. Блот-гибридизация амплифицированного фрагмента экзона V гена AT с M- и Z-специфичными олигонуклеотидами. Амплифицированную ДНК после электрофореза в 2 %-ной агарозе переносили на две различные мембраны. Мембраны гибридизовали отдельно с M- и Z-пробами

Рис. 2. Анализ амплифицированного фрагмента экзона V гена AT методом альтернативного праймирования. Продукт ПЦР анализировали электрофорезом в 2 %-ной агарозе. Дорожки содержат продукт амплификации 220 н. п., фрагмент 150 н. п., полученный при альтернативном праймировании

гена, несущий мутацию, без его предварительного клонирования [2, 6]. Сравнительный анализ этих методов диагностики недостаточности AT был проведен в настоящей работе.

Материалы и методы. ДНК лейкоцитов здоровых доноров и больных с недостаточностью AT выделяли по методу [5]. ПЦР проводили в объеме 50 мкл, содержащем 1 мкг геномной ДНК, 0,5 мМ dNTP, 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6,7 мМ MgCl_2 , 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 6,7 мкМ ЭДТА и 100 пмоль олигонуклеотида. При альтернативном праймировании концентрация dNTP была снижена до 0,2 мМ. При асимметричном праймировании концентрации олигонуклеотидов соответствовали 0,5 и 50 пмоль. Образцы ДНК денатурировали 5 мин при 100 °С, охлаждали во льду 30 с, после чего добавляли 1 ед. Taq-полимеразы. Реакцию проводили в следующем режиме: а) амплификация ДНК для аллель-специфической гибридизации и секвенирования — денатурация (94 °С, 1,5 мин), отжиг с олигонуклеотидами (58 °С, 2 мин), синтез цепи (68 °С, 2,5 мин); б) амплификация ДНК при альтернативном праймировании (94 °С, 1,1 мин), отжиг и синтез (51 °С, 4 мин). Нуклеотидную последовательность ДНК определяли по методу Сэнджера для фрагментов ДНК, полученных при асимметричном праймировании [7]. Все олигонуклеотиды синтезированы в НПО «Вектор» (Новосибирск), Taq-полимераза любезно предоставлена сотрудником Ленингр. ин-та ядер. физики О. А. Кабовым. Аллель-специфическую гибридизацию с амплифицированным фрагментом ДНК проводили по методу [6].

Результаты и обсуждение. Для амплификации фрагмента ДНК, содержащего мутацию, использовали олигонуклеотиды, ограничивающие площадку ПЦР от позиции 9 890 внутри интрона IV до позиции 10 109 в экзоне V гена АТ

5'd (TGTCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGCCTGGG)
и 5'd (GAGACTTGGTATTTTGTTC AATCATTAAG).

После электрофоретического разделения в 2 %-ной агарозе фрагмент переносили по стандартной процедуре [8] на Z-мембрану («Bio-Rad», США) и гибридизовали с мечеными ³²P-АТФ по 5'-концам олигонуклеотидами 5'd (ACCATCGACGAGAAAGGGACT) — М-проба и 5'd (ACCATCGACAAGAAAGGGACT) — Z-проба. После удаления неспецифически сорбированной метки при 37 °С проводили отмывки при 63 и 61 °С соответственно для М- и Z-проб. Результаты гибридизационных экспериментов представлены на рис. 1. Высокая специфичность метода позволяет достаточно надежно дифференцировать гетеро- и гомозиготное носительство Z-аллеля. Незначительная интенсивность неспецифического гибридизационного сигнала является следствием увеличения времени экспозиции при автордиографии и практически не влияет на трактовку результатов. При использовании данного метода не требуется проведения семейного анализа, а необходимы лишь маркерные ДНК (ММ-, МZ- и ZZ-варианты).

В 1989 г. был предложен метод «альтернативного праймирования» для поиска точечных мутаций с помощью ПЦР [8]. Он основан на обязательном комплементарном спаривании 3'-концевого нуклеотида праймера и соответствующего нуклеотида ДНК для прохождения ПЦР. При единичных нуклеотидных заменах ПЦР на мутантной ДНК может происходить лишь при наличии на 3'-конце праймера основания, комплементарного основанию в мутантной ДНК. Соответственно аналогичное требование предъявляется и для ПЦР с нормальной ДНК. Таким образом, в присутствии мутантного праймера и нормальной ДНК или мутантной ДНК и нормального праймера реакция ПЦР не проходит. В некоторых случаях, зависящих от нуклеотидного состава мутантного кодона, единичная 3'-концевая замена не позволяет провести строгого аллель-специфического праймирования и в этих случаях возникает необходимость введения дополнительной «ошибки» в участке, непосредственно прилегающем к 3'-концу праймера. Эта вторая замена сама по себе не влияет на ПЦР, однако резко увеличивает специфичность альтернативного праймирования. Нами были выбраны два альтернативных праймера

5'd (CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCG)
и 5'd (CCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATCGCCA),

различающихся лишь 3'-концевыми нуклеотидами. Оба праймера соответствуют позициям 9 960—9 989 нуклеотидной цепи гена АТ, причем позиция 9 989 в геномной ДНК различается для нормального аллеля и Z-аллеля АТ (соответственно С и Т для кодирующей цепи гена АТ). В позиции 9 989 оба праймера имеют одну и ту же «ошибку» — замену Т→С.

На рис. 2 представлены результаты определения Z-мутации методом альтернативного праймирования. В качестве общего праймера, определяющего «площадку» ПЦР в 150 нуклеотидов, использовали олигонуклеотид 5'd (GAGACTTGGTATTTTGTTC AATCATTAAG) (позиция 10 081—10 110). В качестве контрольной пробы, доказывающей целостность фрагмента гена АТ, несущего Z-аллель, использовали продукт ПЦР (220 пар нуклеотидов) с теми же праймерами, что и для аллель-специфической гибридизации. Высокая специфичность альтернативного праймирования позволяет однозначно трактовать полученные данные по выявлению Z-аллеля. Метод очень чувствителен к чистоте препаратов геномной ДНК и олигонуклеотидов и может быть рекомендован для пренатальной диагностики при наличии надежных стандартов ДНК.

Абсолютным методом в диагностике недостаточности АТ может являться определение нуклеотидной последовательности экзона V гена АТ. Метод не зависит от семейного анализа, не требует наличия какого-либо стандарта, но достаточно сложен для рутинного анализа. Существует несколько способов прямого секвенирования продукта ПЦР, различающихся по соотношению комплементарных нитей в амплифицированном фрагменте ДНК. Мы использовали метод, предложенный в работе [7] и заключающийся в добавлении асимметричных молярных концентраций праймеров со сдвигом ПЦР в сторону преиму-

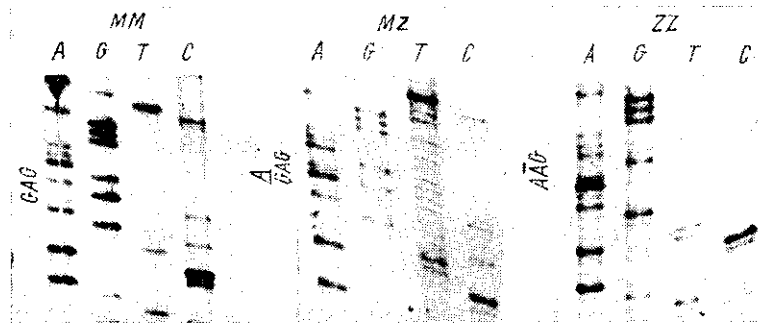


Рис. 3. Прямое секвенирование продукта ПЦР

щественного синтеза одной из нитей. Он не требует использования внутреннего праймера в качестве затравки и высоких концентраций терминаторов в реакции Сэнджера в отличие от секвенирования дуплетчатых фрагментов, полученных при симметричном праймировании ПЦР. На рис. 3 представлены данные определения Z-мутации методом прямого секвенирования фрагмента гена АТ, ограниченного позициями 9 890—10 109 (праймеры те же, что использовали для ПЦР при аллель-специфической гибридизации). В качестве затравки в реакции Сэнджера применяли праймер

5'd (TGTCCACGTGAGCCTTGCTCGAGGCCTGGG).

Среди предложенных способов прямое определение нуклеотидной последовательности, включающей Z-мутацию, является наиболее предпочтительным и может быть рекомендовано, в первую очередь, для пренатального диагноза без какого-либо семейного анализа или использования ДНК-стандартов. Методы альтернативного праймирования и аллель-специфической гибридизации следует сочетать между собой во избежание возможных неточностей в интерпретации результатов.

Резюме

В роботі порівняно три різних методи ДНК-діагностики спадкової недостатності альфа-антітрипсину (АТ), що базуються на аналізі Z-мутації у складі V екзону гену АТ, який ампліфікований у полімеразній ланцюговій реакції. Було показано, що методи аллель-специфічної гібридизації, альтернативного праймування та прямого секвенування виявляють гетеро- та гомозиготних носіїв Z-алелю і можуть, як наслідок, бути використаними для пренатальної діагностики спадкової недостатності АТ.

Summary

Three different methods of DNA diagnosis of inherited alpha-antitrypsin (AT) deficiency were compared. All of these methods are based on the detection of a Z-mutation in PCR-amplified sequence of V-th exon of the AT gene. It was demonstrated that all the methods used (allele-specific hybridization, alternative priming and direct sequencing) are able to detect the Z-allele in both hetero- and homozygous carriers and hence may be applied to prenatal diagnosis of the inherited AT deficiency.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fagerhol M. K., Cox D. W. The P_i polymorphism: genetic, biochemical and clinical aspects of human α_1 -antitrypsin // *Adv. Human Genet.*— 1981.— **11**, N 1.— P. 1—62.
2. *The α_1 -antitrypsin gene and its imitations. Clinical consequences and strategies for therapy* / R. G. Crystal, M. L. Brantly, R. C. Hubbard et al. // *Chest.*— 1989.— **95**, N 1.— P. 196—208.
3. Erickson S., Carlson J., Velez R. Risk of liver cirrhosis and primary liver cancer in α_1 -antitrypsin deficiency // *N. Engl. J. Med.*— 1986.— **314**, N 6.— P. 736—739.
4. Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency by direct analysis of the mutant site in the gene / V. J. Kidd, M. S. Golbus, R. B. Wallace et al. // *Ibid.*— 1984.— **310**, N 5.— P. 5639—5642.
5. Cox D. W., Mansfield T. Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency and estimates of fetal risk for disease // *J. Med. Genet.*— 1987.— **24**, N 1.— P. 52—59.
6. Prenatal diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency using polymerase chain reaction (PCR). Comparison of conventional RFLP methods with PCR used in combination with allele specific oligonucleotides or RFLP analysis / M. Schwartz, K. Bruun-Petersen, N. Gregersen et al. // *Clin. Genet.*— 1989.— **36**, N 3.— P. 419—426.
7. Gyllensten U. B., Erlich H. A. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*— 1988.— **85**, N 20.— P. 7652—7656.
8. Analysis of point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) / C. R. Newton, A. Graham, L. E. Heptinstall et al. // *Nucl. Acids Res.*— 1989.— **17**, N 7.— P. 2503—2516.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград
Ин-т генетики человека Польской Академии Наук, Познань

Получено 05.07.90

УДК 616-0.53.1:577.112:577.122.5

Л. В. Пучкова, И. А. Вербина, В. В. Денежкина,
В. С. Гайцхоки, С. А. Нейфах

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДЕФЕКТ ВЫВЕДЕНИЯ МЕДИ ЧЕРЕЗ ЖЕЛЧЬ У БОЛЬНЫХ ГЕПАТОЛЕНТИКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ

Методами иммуноэлектрофореза проведен скрининг сывороток крови гомо- и гетерозиготных носителей мутации Вильсона. Показано, что наряду с нормальным церулоплазмином (ЦП) в сыворотке носителей вильсоновской мутации присутствует специфический для этой мутации ЦП-подобный белок (вильсоновский). Показано что у здоровых людей ЦП-подобный белок, идентичный вильсоновскому ЦП, участвует в выведении меди из организма через желчь. Обсуждаются механизмы дефекта выведения меди через желчь у больных гепатолентикулярной дегенерацией.

Введение. Гепатолентикулярная дегенерация (ГЛД), или болезнь Вильсона (БВ), представляет собой наследственное аутосомно-рецессивное моногенное заболевание, при котором происходит нарушение обмена меди, выражающееся в задержке выведения меди из организма и отложении ее в токсических количествах в жизненно важных органах [1].

Основными патогномическими признаками БВ являются снижение скорости выведения меди через желчь, увеличение содержания ее в моче и крови, образование в клетках различных органов электронноплотных гранул, содержащих медь. При этом содержание меди в гепатоцитах увеличивается в 30—50 раз до развития клинической картины заболевания.

Главными клиническими признаками ГЛД являются цирроз печени и дегенерация подкорковых ядер мозга, что является следствием токсического действия меди [2].

Специфической биохимической манифестацией заболевания является наследственный дефицит медьсодержащего гликопротеина сыворотки крови — церулоплазмينا (ЦП), что позволило сформулировать предположение о локализации молекулярного дефекта БВ в гене ЦП

© Л. В. ПУЧКОВА, И. А. ВЕРБИНА, В. В. ДЕНЕЖКИНА, В. С. ГАЙЦХОКИ, С. А. НЕЙФАХ, 1991