

статевую диференційність, а також у окремих сперматозоїдах людини. Обговорюються перспективи використання неінвазивних методів для визначення статі внутрішньоутробного плоду за допомогою ПЛР і олігопраймерів, специфічних для X- та Y-хромосом.

#### Summary

The results of fetus sexing by polymerase chain reaction (PCR) with different Y chromosome specific oligoprimers in chorionic villi samples, amniocytes, in chromosome preparation slide scratches as well as in maternal blood samples are summarised. Detection of Y chromosome specific sequences in individual human sperms as well as in persons with phenotypic and genotypic derivations in sex differentiation are carried out. Perspective for noninvasive intrauterine fetus sexing by means of PCR with X and Y chromosome specific oligoprimers are discussed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia* / R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona et al. // *Science*.— 1987.— 230, N 18.— P. 1350—1354.
2. *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.
3. *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.
4. *Y-90, a DNA probe for the sensitive detection of Y-derived marker chromosomes and mosaicism* / U. Müller, T. A. Donlon, S. H. Kunkel et al. // *Hum. Genet.*— 1987.— 75, N 2.— P. 109—113.
5. *Fetal lymphocytes and trophoblast cells in the maternal circulation* / A. E. Covone, D. Mutton, A. D. van Dam et al. // *Proc. of the Int. symp. on early prenatal diagnosis: present and future* (12—13 October 1984).— Naples, 1984.— P. 108.
6. *Selypes A., Lorencz R.* A noninvasive method for determination of the sex and karyotype of the fetus from the maternal blood // *Hum. Genet.*— 1988.— 79, N 6.— P. 357—359.
7. *Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood* / Y.-M. D. Lo, J. S. Wainscoat, M. D. G. Gillmer et al. // *Lancet*.— 1989.— N 8676.— P. 1363—1365.
8. *Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Дж.* Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1986.— 420 с.
9. *Баранов В. С.* Метод стряхивания — отпечатывания — надежный способ приготовления препаратов хорниона // *Цитология*.— 1989.— 31, № 2.— С. 251—254.
10. *Fine structure genetics mapping of human chromosomes using the polymerase chain reaction on single sperm: experimental design considerations* / M. Boehnke, N. Arnheim, H. Li, F. S. Collins // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1989.— 45, N 1.— P. 21—32.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 577.213.3

**Т. Э. Иващенко, Л. А. Лившиц, С. А. Гембовская, Д. С. Амоаший,  
М. Т. Веножинскис, В. Н. Горбунова, В. С. Баранов**

#### **СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ ДЕЛЕЦИИ F508 У БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ \***

*При помощи реакции специфической амплификации изучена частота делеции F508 у 114 больных муковисцидозом (МВ) северо-западной части СССР, 31 — с Украины, 14 — из Молдавии и 8 — из Литвы. Установлено, что среди больных смешанной формой МВ делеция F508 встречается у 65 % пациентов северо-западного региона и у*

\* Работа частично финансируется Всемирной Организацией Здравоохранения (Грант G 3/181/139).

© Т. Э. ИВАЩЕНКО, Л. А. ЛИВШИЦ, С. А. ГЕМБОВСКАЯ, Д. С. АМОАШИИ,  
М. Т. ВЕНОЖИНСКИС, В. Н. ГОРБУНОВА, В. С. БАРАНОВ, 1991

77 % — Украины. Частота делеции в молдавской и литовской популяциях, по предварительным данным, значительно меньше (26 и 25 % соответственно). Около 96 % больных МВ северо-западного региона и 92 % — Украины гомозиготны либо гетерозиготны по делеции F508. Более 90 % хромосом с делецией F508 имеют гаплотип 2. 2. 1 для полиморфных сайтов KM19, CS7, MP6D9, XV2c соответственно. Полученные результаты имеют важное значение для повышения эффективности пренатальной и постнатальной диагностики МВ и выявления гетерозиготного носительства.

**Введение.** Муковисцидоз (МВ) относится к числу моногенных наследственных заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования. Поскольку каждый 20-й представитель белой расы является гетерозиготным носителем мутантного гена МВ и один из 2000 детей рождается с этим заболеванием, МВ представляет собой серьезную медицинскую и социальную проблему во многих странах мира, в том числе и в нашей стране [1, 2]. Ген МВ локализован на 7-й хромосоме в области 7q31. Выделен ряд ДНК-маркеров, тесно сцепленных с геном МВ в локусах IRP, D7S23, D7S399, выявляющих полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Аллели этих локусов обнаруживают выраженное неравновесное сцепление с МВ мутациями. Установлено также, что частоты этих аллелей (гаплотипов) на нормальных и МВ+ хромосомах существенно варьируют в различных популяциях и этнических группах [3]. На этом основании высказана гипотеза о том, что в северо-европейской популяции существует одна доминирующая мутация гена МВ, тогда как в южно-европейской — есть по крайней мере одна или несколько других мутаций [3]. В 1989 году совместными усилиями канадских и американских исследователей удалось не только осуществить точную молекулярную идентификацию гена МВ, но и выделить его кДНК, определить ее первичную структуру, детально охарактеризовать ранее неизвестный мембранный белок класса Р-гликопротеинов, наследственный дефект которого и является непосредственной причиной МВ [4]. Этот гликопротеин получил название трансмембранного регуляторного белка МВ — ТРБМВ [5]. Сам ген МВ имеет размеры 250 тыс. пар оснований (п. о.) и содержит 26 экзонов, его кДНК состоит из 6 129 п. о. [4, 5]. Этими же авторами в 70 % МВ+ хромосом была обнаружена однотипная мутация, которая представляет собой делецию трех нуклеотидов 10-го экзона гена МВ. Мутация получила название  $\Delta F508$ , так как приводит к исчезновению фенилаланина в 508-м положении ТРБМВ [6]. Установлено, что у большинства пациентов с недостаточностью функций поджелудочной железы мутация  $\Delta F508$  присутствует в гомозиготном состоянии [6]. Обнаружено также, что частота  $\Delta F508$  варьирует в различных популяциях [7]. При этом наблюдается ярко выраженный градиент распределения частот этой мутации с северо-запада Европы на юго-восток. В настоящей работе приводятся результаты изучения частоты  $\Delta F508$  у больных МВ в некоторых районах европейской части нашей страны, а также сцепления ее с гаплотипами ДНК локусов IRP, D7S23, D7S399, выявляемых зондами (XV2c, KM19, MP6d9, CS7) при помощи метода полимеразной цепной реакции синтеза ДНК.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 167 пациентах с МВ из северо-западной части СССР (114), Украины (31), Молдавии (14) и Литвы (8). Во всех случаях клинический диагноз МВ подтвержден биохимическим тестом на хлориды пота. В зависимости от клинического проявления различали смешанную форму (более тяжелая, с поражением легких и поджелудочной железы) и легочную (преобладание легочной патологии). В качестве биологического материала использовали лейкоциты периферической крови больных. Часть исследований проведена на материале, полученном для пренатальной диагностики от беременных женщин группы высокого риска после установления и верификации биохимическими методами диагноза МВ у плода.

Реакцию специфической амплификации проводили при помощи автоматического циклера Perkin — Elmer («Cetus», США) с использованием термостойкой ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* (произ-

водство кооператива «Плодородие») в соответствии с ранее описанной схемой [8]. Олигопраймеры (каждый длиной 20 нуклеотидов) для амплификации участков ДНК, несущих полиморфные сайты рестрикции локусов IRP (*XV2c*), D7S23 (*KM19*, *CS7*), D7S399 (*MP6d9*), а также олигопраймеры, фланкирующие участок делеции F508 гена МВ, синтезированы НПҚ «Энзим» (Вильнюс). После амплификации области делеции F508 отбирали аликвоты (10—15 мкл), которые подвергали электрофорезу в 12 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с

Таблица 1

Частота  $\Delta F508$  в различных регионах СССР

The frequency of  $\Delta F508$  in different population's of European part of the USSR

Форма МВ	Северо-западная часть СССР	Украина	Молдавия	Литва	Форма МВ	Северо-западная часть СССР	Украина	Молдавия	Литва
Смешанная, %	65	77	33	25	Легочная, %	5	—	—	—
<i>n</i>	228	62	28	16	<i>n</i>	44			

длиной разгона 30 см и обрабатывали бромистым этидием. У особей, не имеющих делеции F508, на электрофореграмме определялась одна полоса, соответствующая 83 п. о., у гомозигот по делеции была видна также одна полоса — 80 п. о., а у гетерозигот присутствовали обе.

Полиморфные сайты рестрикции для ДНК-зондов *XV2c*, *KM19*, *CS7*, *MP6d9* определяли после обработки амплифицированных фрагментов ДНК рестрикционными эндонуклеазами *TaqI*, *PstI*, *Hin6I*, *MspI* соответственно и электрофореза в 8 %-ном ПААГ с последующей окраской бромистым этидием.

Результаты эксперимента обрабатывали по правилам вариационной статистики.

**Результаты и обсуждение.** Данные по изучению частоты  $\Delta F508$  на мутантных (МВ<sup>+</sup>) хромосомах больных из различных популяций европейской части страны представлены в табл. 1. Наибольшая частота мутации — 77 % — наблюдается в украинской популяции, тогда как в северо-западной части СССР частота достоверно ниже — 65 % ( $\chi^2=3,25$ ). Возможно, в определенной мере это связано с тем, что часть северных славян имеет угро-финское происхождение. В этой этнической группе МВ встречается реже и частота делеции снижена [9].

Частота  $\Delta F508$  в молдавской и литовской популяциях оказалась примерно одинаковой и в среднем в 2—3 раза ниже, чем в славянской. Отчасти, по-видимому, это связано с малой величиной выборки. Вместе с тем в отношении молдавской популяции наши результаты хорошо согласуются с обобщенными европейскими данными, указывающими на прогрессивное снижение частоты делеции F508 в направлении север—юг при одновременном увеличении доли новых мутаций гена МВ, приводящих к заболеванию [7].

Низкая частота мутации  $\Delta F508$  в литовской популяции может реально указывать на уникальные генетические особенности этой этнической группы, что подтверждается результатами ПДРФ-анализа ДНК локусов, связанных с геном МВ литовской популяции. Однако это предположение нуждается в серьезной проверке на большем клиническом материале, с хорошей биохимической верификацией диагноза МВ.

Анализ данных по частоте  $\Delta F508$  при различных клинических формах МВ (см. табл. 1) также показывает, что эта мутация особенно характерна для смешанной формы, тогда как при более легкой легочной форме она встречается лишь в 5 % случаев и только в гетерозиготном состоянии. Вместе с тем уместно подчеркнуть, что наличие неидентифицированных мутаций гена МВ можно предполагать и при смешанных

формах заболевания. Так, анализ генотипов больных смешанной формой МВ, при которой, как правило, поражается и поджелудочная железа, свидетельствует о том, что только 36 % больных в северо-западном регионе и 61 % больных с Украины гомозиготны по делеции F508, т. е. только эта мутация определяет наличие заболевания (табл. 2). В то же время у остальных пациентов делеция представлена в гетерозиготном состоянии, а у некоторых, число которых невелико (4—6 %),

Таблица 2

Распределение  $\Delta F508$  в генотипах больных при смешанной форме МВ в различных популяциях Европейской части СССР  
Distribution of  $\Delta F508$  in genotypes of CF patients (mixed clinical forms) in different populations of European part of the USSR

Генотип	Северо-западная часть СССР (%)	Украина (%)	Молдавия (%)	Литва (%)
$\Delta F/\Delta F$	41 (36)	19 (61,3)	5 (35)	—
$\Delta F/+$	69 (60)	10 (32,3)	—	4 (50)
$+/+$	4 (4)	2 (6,4)	9 (65)	4 (50)
Всего	114	31	14	8

Таблица 3

Корреляция  $\Delta F508$  с различными гаплотипами локусов IRP ( $XV2c/TaqI$ ),  $D7S23$  ( $KM19/PstI$ ,  $CS7/Hin6I$ ) и  $D7S399$  ( $MP6d9/MspI$ )  
Correlation of  $\Delta F508$  deletion with various haplotypes of the loci IRP ( $XV2c/TaqI$ ),  $D7S23$  ( $KM19/PstI$ ,  $CS7/Hin6I$ ) and  $D7S399$  ( $MP6d9/MspI$ )

	$XV2c$ , %		$KM19$ , %		$CS7$ , %		$MP6d9$ , %	
	1	2	1	2	1	2	1	2
$\Delta F508$	91	9	—	100	—	100	—	100
<i>n</i>	41		74		96		62	

Примечание. 1, 2 — отсутствие и наличие сайта рестрикции соответственно.

делеции вообще не обнаружено. Интересно, что в молдавской группе больных смешанной формой МВ 5 оказались гомозиготами и 9 не имели мутации  $\Delta F508$ , тогда как в литовской группе из 8 больных 4 были гетерозиготами, гомозиготных носителей делеции не обнаружено. Таким образом, именно среди больных МВ литовской и молдавской популяции поиски новых мутаций гена МВ, отличных от мутации  $\Delta F508$ , особенно перспективны.

Существенно также отметить, что наличие мутации зарегистрировано в общей сложности у 96 % всех больных, имеющих смешанную форму МВ, в северо-западном регионе СССР и у 94 % больных украинской группы. Следовательно, выявление делеции в генотипе больного с подозрениями на МВ в случае неясной симптоматики и неоднозначных результатов потового теста может служить достаточно надежным диагностическим признаком заболевания для славянской популяции Украины и северо-западного региона страны. В значительно меньшей степени этот критерий применим для этнических групп Молдавии и Литвы. Однако данный вывод требует тщательной проверки на большем клиническом материале. Сопоставляя результаты молекулярного анализа  $\Delta F508$  с данными клинического течения заболевания, нельзя не обратить внимания на то, что при тяжелых формах МВ как минимум одна из мутантных хромосом больного несет  $\Delta F508$ , тогда как при МВ средней тяжести лишь 50 % пациентов имеют эту мутацию в гетерозиготном состоянии, а в гомозиготном — она не встречается.

Анализ сцепления  $\Delta F508$  с аллелями ДНК локусов IRP, D7S23, D7S399, хромосомы 7 при помощи маркеров *XV2c*, *KM19*, *CS7*, *MP6d9* (табл. 3) показывает, что эта мутация всегда сцеплена с гаплотипом, характеризующимся наличием сайта рестрикции для *KM19*, *CS7*, *MP6d9* [2] и в подавляющем большинстве случаев (91 %) с отсутствием сайта рестрикции для *XV2c* [1]. Следовательно, в наших исследованиях, так же как и в многочисленных наблюдениях зарубежных авторов [8], мутация  $\Delta F508$  в большинстве случаев ассоциируется с гаплотипом 1, 2, 2, 2 для *XV2c*, *KM19*, *CS7*, *MP6d9* соответственно. Это подтверждает предположение о том, что именно с хромосомой данного гаплотипа связано возникновение мутации  $\Delta F508$  у представителей белой расы. Случаи ассоциации мутации  $\Delta F508$  с другими гаплотипами этих локусов следует трактовать как результат митотических рекомбинаций [6].

Полученные в работе результаты позволяют уже сейчас существенно увеличить эффективность диагностики МВ и открывают принципиально новые возможности для выявления гетерозиготного носительства мутантного гена в популяциях, что может иметь решающее значение в профилактике этого тяжелого наследственного заболевания.

#### Резюме

За допомогою реакції специфічної ампліфікації вивчена частота делеції F508 у 114 хворих муковісцидозом (МВ) північно-західної частини СРСР, 31 — з України, 14 — з Молдавії та 8 — з Литви. Встановлено, що серед хворих змішаною формою МВ делеція F508 зустрічається у 65 % пацієнтів північно-західного регіону та у 77 % — України. Частота делеції в молдавській та литовській популяціях, за попередніми даними, значно менша (26 і 25 % відповідно). Близько 96 % хворих МВ північно-західного регіону та 92 % — України гомозиготні або гетерозиготні по делеції F508. Більш як 90 % хромосом з делецією F508 мають гаплотип 2, 2, 2, 1 для поліморфних сайтів *KM19*, *CS7*, *MP6d9*, *XV2c* відповідно. Одержані результати мають важливе значення для збільшення ефективності пре- та постнатальної діагностики МВ і виявлення носіїв гетерозиготності.

#### Summary

The frequency of F508 deletion has been studied by polymerase chain reaction in 114 CF patients of North-West part of the USSR, in 31 CF patients from Ukraine, 14 from Moldavia and 8 from Lithuania. 77 % of CF chromosomes from Ukrainian CF patients with severe mixed pancreatic-pulmonary forms of disease and 65 % CF chromosomes of similar CF patients from North-Western part of the USSR carried  $\Delta F508$  while its frequency in Moldavian and Lithuania CF patients was significantly less (26 and 25 % respectively). 96 % Slavonian patients of North-Western part and 92 % Slavonian CF patients from Ukraine were either heterozygous or homozygous for the deletion F508. 90 % of F508 chromosomes possessed haplotype 2, 2, 2, 1 for polymorphic sites *KM19*, *CS7*, *MP6d9*, *XV2c*, respectively. Obvious significance at these data for the most effective pre- and postnatal diagnosis of CF and carrier detection is discussed.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Капринов Н. Н. Течение и исход муковисцидоза у детей после современного лечения и реабилитации: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1986.— 37 с.
2. Morris A., Super M. Cystic fibrosis. The facts.— Oxford: Univ. press, 1987.— 264 p.
3. Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphisms in Italian families: a collaborative study / X. Estivill, M. Farrall, R. Williamson et al. // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 43, N 1.— P. 23—28.
4. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping / J. Rommens, M. Iannuzzi, B. Kerem et al. // Science.— 1989.— 245.— P. 1059—1065.
5. Identification of cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA / J. Riordan, J. Rommens, B. Kerem et al. // Ibid.— P. 1066—1073.
6. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis / B. Kerem, J. Rommens, J. Buchanan et al. // Ibid.— P. 1073—1080.

7. Devoto M. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype // Hum. Genet.— 1990.— 83, N 2.— P. 317—325.
8. Анализ рестрикционного полиморфизма ДНК-локуса D7S23 при помощи зонда KM-19 методом цепной реакции синтеза ДНК в популяции и в семьях больных муковисцидозом / Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, М. В. Асеев и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 55—60.
9. Cystic fibrosis in Finland a molecular and genealogical study / J. Kere, R. Norio, E. Savilahti et al. // Hum. Genet.— 1989.— 83, N 1.— P. 20—25.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград  
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 05.07.90

УДК 577.212:577.352.27

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

### **ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *RecA*-БЕЛКА С ХРОМАТИНОМ ЯДЕР (ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ)**

*Продемонстрирована возможность использования гена recA в качестве модельного гена при изучении экспрессии экзогенной ДНК in vitro и in vivo.*

*Визуализация RecA-белка в цитоплазме и ядрах проведена непрямой иммунофлюоресцентным методом. Бактериальный RecA-белок тестировали в культуре HeLa после ее обработки чистым RecA-белком или белком, заключенным в липосомы, а также после трансфекции культуры сконструированной плазмидой pKCR2. Отмечена визуализация RecA-белком хроматина ядер, которая зависела от прохождения клеткой фаз митотического цикла.*

*В системе in vivo бактериальная β-галактозидаза и RecA-белок обнаруживались через 48 ч после проведения котрансформации печени мышей плазмидами pGA293A и pKCR2, заключенными в липосомы. Высокий уровень экспрессии recA-гена в гепатоцитах экспериментальных животных позволяет использовать его в модельных системах при изучении экспрессии экзогенной ДНК in vivo.*

**Введение.** В клетках эукариот, как и в клетках прокариот, могут существовать некоторые SOS-функции. Уже в ранних работах было показано, что клетки млекопитающих способны отвечать на ингибирование репликации индукцией новых белков (в клетках *Escherichia coli* в этом случае генерируется сигнал, вызывающий индукцию *RecA*-белка) [1]. Могут ли продукты генов *recA* (или их аналогов), имеющих различное происхождение, функционально замещать друг друга? Белок *RecA E. coli* представляет собой небольшой по молекулярной массе белок, принимающий участие в процессах рекомбинации, репликации, репарации, мутагенеза, клеточного деления и др. [2]. В ряде работ показано наличие у эукариот белковых факторов, функционально аналогичных белку *E. coli* [3—6]. В реакциях *in vivo* эти белки могут осуществлять гомологичное спаривание сверхспиральной ДНК однонитчатой ДНК [3, 4], перенос нитей ДНК между соответствующими ДНК-субстратами [5]. Некоторые из них, например RRA1 [6], локализованы в районе внутренней мембраны ядра. Белок *RecA E. coli* может использовать в качестве субстрата эукариотическую ДНК.

Представлялось интересным изучение возможности функционирования этого белка в эукариотических клетках *in vivo*. С этой целью была изучена вероятность проникновения белка *RecA* через цитоплазматическую мембрану в клетку и ядро.

**Материалы и методы.** Для введения в культуру *HeLa* и проведения опытов *in vivo* использованы плазмиды *pKCR2*, *pGA293A* и *RecA*-белок. Конструкция *pKCR2* представляет собой плазмиду *pKCR* [7] с клонированным по *BamHI*-сайту полноразмерным *recA*-геном *E. coli*.

© С. П. ШПИЛЕВА, И. Е. КОСТЕЦКИЙ, Т. В. СТОЛЯР, Л. И. ЛИХАЧЕВА, Л. Г. ЖАРОВА, И. М. СПИВАК, В. Д. ЖЕСТЯНИКОВ, В. А. КОРДЮМ, Д. М. ИРОДОВ, 1991