

from early SV40 promoter and glucocorticoid-responsive enhancer of Molony sarcoma virus. The expression of rLDL c DNA in transformed cells was demonstrated using dot and blot RNA-cDNA hybridization as well as immunofluorescent analysis.

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, 1978.— P. 672—712.
2. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple *Alu* sequences in its mRNA / T. Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown et al. // Cell.— 1984.— 39, N 1.— P. 27—38.
3. Efficient expression of retroviral vector-transduced human low density lipoprotein (LDL) receptor in LDL receptor-deficient rabbit fibroblasts *in vitro* // A. Miyahara, M. F. Sharkey, J. L. Witztum et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1988.— 85, N 17.— P. 6538—6542.
4. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit / J. M. Wilson, D. E. Johnson, D. M. Jeffersen, R. C. Mulligan // Ibid.— N 12.— P. 4421—4425.
5. Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy / R. F. Selden, M. J. Skoskiewicz, K. B. Howie et al. // Science.— 1987.— 236, N 4802.— P. 714—718.
6. Маниатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 420 с.
7. Graham R., Van der Eb A. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // Virology.— 1973.— 52, N 2.— P. 456—467.
8. Gough N. M. Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells // Anal. Biochem.— 1988.— 173, N 1.— P. 93—95.
9. Feinberg A. P., Vogelstein B. A. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // Ibid.— 1983.— 132, N 1.— P. 6—13.
10. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts / J. M. Larkin, M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson // Cell.— 1983.— 33, N 1.— P. 273—285.
11. Anderson R. G. W. Methods for visualisation of the LDL pathway in cultured human fibroblasts // Meth. Enzymol.— 1986.— 129.— P. 201—216.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград
Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.213.3

М. И. Николенко, С. Б. Арбузова

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ДНК ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В 12-м ЭКЗОНЕ ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Описаны условия проведения реакции амплификации ДНК для определения мутаций в 12-м экзоне гена фенилаланингидроксилазы (ФАГид). Указано на необходимость оптимизации условий реакции. Подчеркивается последовательность составления реакционной смеси, при этом праймеры, фермент и трифосфаты следует добавлять после денатурации ДНК. ДНК можно выделять не только из цельной крови больных фенилкетонурией (ФКУ), но и из сухих пятен крови на фильтровальной бумаге. В результате амплификации образуется фрагмент гена ФАГид длиной 245 пар оснований (п. о.), несущий мутации. Последующая дот-гибридизация с мутантными мечеными зондами позволяет определить гетерозиготное носительство у здоровых членов семей.

Введение. В настоящее время в изучении молекулярных основ генетики человека происходят значительные изменения. Во многом это связано с созданием метода специфической амплификации ДНК (полимеразная цепная реакция) [1], позволяющего диагностировать ряд наследственных заболеваний человека за один день. Использование двух синтетических олигонуклеотидных праймеров, комплементарных последовательностям, фланкирующим специфический сайт мутации, дает воз-

возможность амплифицировать интересующий участок гена. Размер амплифицируемого фрагмента определяется расстоянием между праймерами, гибридизованными с ДНК. Мутантные аллели идентифицируются с использованием специфических мутантных олигонуклеотидов (зондов) по методу дот-гибридизации.

Полимеразная цепная реакция, имеющая ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами молекулярной диагностики (например, блот-гибридизацией), успешно применяется для выявления мо-

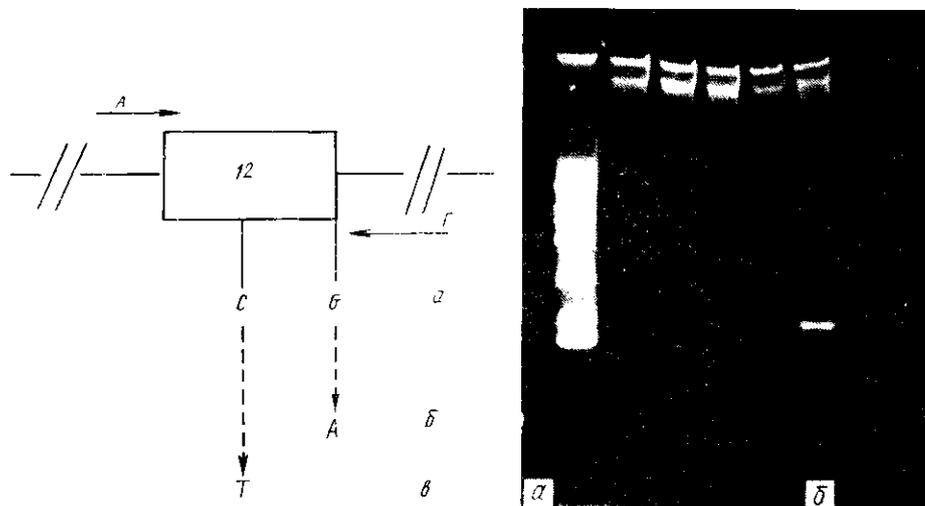


Рис. 1. Схематическое положение амплифицируемого участка ДНК (245 п. о.), содержащего экзон 12 и фланкирующие интронные последовательности гена ФАГид [5]: *a* — нормальная последовательность; *b* — мутация 1; *c* — мутация 2

Fig. 1. Schematic representation of the 245 bp DNA-fragment containing exon 12 and flanking introne sequences of the PAK gene [5]: *a* — normal sequence; *b* — mutation 1; *c* — mutation 2

Рис. 2. Гель-электрофорез амплифицированного образца: *a* — маркер (см. текст); *b* — фрагмент ДНК больного ФКУ длиной 245 п. о.

Fig. 2. Gel-electrophoresis of amplification sample: *a* — marker (see text); *b* — 245 bp fragment of DNA of PKU-patient

ногенных наследственных заболеваний человека — гемофилии, талассемии, муковисцидоза и др. [2, 3]. Нами на базе лаборатории молекулярной генетики Ленинград. ин-та ядер. физики (ЛИЯФ) АН СССР осуществлена работа по подбору оптимальных условий проведения реакции амплификации ДНК для диагностики ФКУ.

Классическая ФКУ — это аутосомно-рецессивное заболевание, вызываемое дефектом гена ФАГид. Ген человеческой ФАГид имеет кодирующую часть размером 2448 п. о., 19 пар поли(А) на 3'-конце [4]. Первый метиониновый кодон находится в 223-м нуклеотидном положении. Ген содержит 13 экзонов, присутствует в одной копии и локализован в *q22-q24*-области 12-й хромосомы. С гена ФАГид считывается белок (451 аминокислота) молекулярной массой 51 900.

В настоящее время исследования проводятся в области 12-го экзона гена ФАГид. Найден ряд мутаций в этой области [5]. Одна из них — специфическая точечная мутация, транзиция С на Т в экзоне 12, ведущая к замене аргинина на триптофан в 408-м положении белка. Другая — единичная замена Г на А на 5'-сплайсинговом сайте интрона 12. Учитывая эти данные, для реакции амплификации выбран фрагмент размером 245 п. о., включающий экзон 12 гена ФАГид и фланкирующие интроны (рис. 1).

Материалы и методы. Геномную ДНК изолировали из цельной крови больных и членов их семей по методу [6]. Для реакции использовали 1 мкг ДНК. Последовательности: праймер А — 5'-ATGCCACTGAGAАСТСТСТ-3'; праймер В — 5'-AGTCTTCGATTACTGAGAAA-3'.

Для проведения реакции использовали ДНК-полимеразу, выделенную из *Thermus thermophilus* в лаборатории молекулярной генетики ЛИЯФ АН СССР. О возможности применения такого фермента вместо традиционной ДНК-полимеразы из *T. aquaticus* указано в работе [7]. Амплификацию проводили в 100 (50) мкл реакционной смеси, содержащей 67 ммоль/л трис-HCl, pH 8,8, 6,7 ммоль/л MgCl₂, 10 ммоль/л β-меркаптоэтанол, 16,6 ммоль/л (NH₄)₂SO₄, 6,4 ммоль/л ЭДТА, 170 мкг/л бычьего сывороточного альбумина, 1,5 ммоль/л АТФ, 1,5 ммоль/л ГТР, 1,5 ммоль/л СТР, 1,5 ммоль/л ТТР, 1 ммоль/л праймера А и 1 ммоль/л праймера Б.

ДНК денатурировали 7 мин при 97 °С, затем образцы инкубировали 2 мин при комнатной температуре. Добавляли 2 ед. активности ДНК-полимеразы и выполняли 30 циклов реакции амплификации. Каждый цикл включал следующие стадии: 1) полимеризация ДНК — 70 °С, 3 мин; 2) денатурация ДНК — 94 °С, 1 мин; 3) отжиг праймеров — 55 °С, 1 мин. Результаты амплификации исследовали в 6 %-ном полиакриламидном геле [8].

Результаты и обсуждение. На рис. 2 представлен результат 30 циклов реакции амплификации ДНК. Четко виден фрагмент, который по подвижности соответствует фрагменту 245 п. о. маркера (фраг λ, расщепленный рестриктазой *Pst*I).

Следует отметить, что сама методика полимеразной цепной реакции имеет ряд особенностей. Прежде всего, на ход реакции оказывает влияние качество геномной ДНК. Так как для реакции достаточно 1 нг ДНК, ее выделяли из минимального объема цельной крови (1 мл) и в среднем получали до 450 мкг ДНК. При этом по методу [6] используется ЭДТА в концентрации 25 ммоль/л. Мы обнаружили, что при последующей экстракции и осаждении ДНК этанолом в чистом препарате остаются следы ЭДТА (в виде белых хлопьев), которые ингибируют реакцию амплификации. Поэтому предпочтительнее пользоваться ЭДТА в концентрации 1 ммоль/л.

Очень часто у больных детей затруднительно получить образцы цельной крови. В таких случаях мы собирали сухие пятна крови на фильтровальной бумаге, диаметр пятна 1 см. ДНК выделяли по методу [9]. Из четырех пятен получали до 10 мкг ДНК, что вполне достаточно для реакции амплификации.

Важным моментом является последовательность составления амплификационной смеси. Так, при добавлении праймеров и ДНК-полимеразы до денатурации ДНК результаты часто оказывались отрицательными. В ряде случаев наблюдали неспецифическую амплификацию, т. е. образование фрагментов ДНК разной длины. Поэтому все компоненты реакции, способные разрушиться при денатурации ДНК, следует вносить в реакционную смесь после денатурации.

Следует подчеркнуть, что важным для проведения реакции является оптимальный температурный режим. В наших опытах при понижении температуры отжига праймеров до 52—53 °С реакция ингибировалась. Праймеры не включались в последующие циклы полимеризации. Саму полимеризацию лучше проводить при 68—69 °С, при таких условиях нарабатывается наибольшее количество нужного фрагмента.

Таким образом, подобрав соответствующие условия для проведения цепной реакции синтеза ДНК, можно получить определенный участок гена ФАГид, несущий мутации. Следующим этапом исследований является дот-гибридизация амплифицированных образцов с мутантными зондами, меченными ³²P, для идентификации мутаций и определения гетерозиготного носительства.

SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR POLYMERASE CHAIN REACTION FOR IDENTIFICATION OF MUTATIONS IN 12TH GENE OF HUMAN PHENYLALANINE HYDROXYLASE

M. I. Nikolenko, S. B. Arbuzova

M. Gorky Medical Institute,
Medical-Genetic Centre, Donetsk

Summary

The conditions of the amplification procedure for region of gene of human phenylalanine hydroxylase with some PKU mutations were elaborated. Genomic DNA of PKU-patients was isolated from whole blood and from dry blood spots on filter paper. The concentration of EDTA must be low to prevent inhibition of the reaction. It is necessary to perform dot-hybridization of amplificational sample with mutant DNA-probes for identification of mutations and rapid carrier testing.

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. Fallona et al. // *Science*.—1985.—230, N 1.—P. 1350—1354.
2. *Some-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification* / C. Williams, R. Williamson, C. Coutelle et al. // *Lancet*.—1988.—N 9.—P. 102—103.
3. *Davies K. E., Robson K. J. H.* Molecular analysis of human monogenic disease // *Bio Essay*.—1987.—6, N 6.—P. 247—262.
4. *Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene* / A. G. DiLella, C. M. Simon, K. F. D. Ledley et al. // *Biochemistry*.—1986.—25, N 4.—P. 4—8.
5. *Woo S. L. C.* Molecular basis and population genetics of phenylketonuria // *Ibid.*—1989.—28, N 1.—P. 1—7.
6. *Davies K. E.* Human genetic disease, a practical approach.—Oxford: Inform. Printing Ltd., 1986.—223 p.
7. *Шварц Е. И.* Праймер-зависимая амплификация 2-х участков β -глобинового гена человека // *Биоорганическая химия*.—1988.—14, № 11.—С. 1577.
8. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Molecular cloning.—New York: Cold Spring Harbor, 1982.—479 p.
9. *Edward R. B., McCabe S-Z. H.* DNA-microextraction from dribe blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening // *Hum. Genet.*—1987.—75, N 4.—P. 213—216.

Донец. мед. ин-т им. М. Горького,
мед.-генет. центр

Получено 13.06.89

УДК 577.21:575

**А. Т. Ахмедов, Е. А. Намсараев, Е. М. Зайцева,
Е. Н. Зайцев, В. А. Ланцов**

ИЗУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ В ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Описана бесклеточная система, в которой используются экстракты ядер миелобластов человека, клеток HeLa и семенников крыс для инициации рекомбинации между гомологичными плазмидами, несущими различные мутантные аллели Tc-гена. Инкубация этих плазмид с ядерными экстрактами увеличивала частоту Tc^r-рекомбинантов с $2,6 \cdot 10^{-5}$ до $2,7 \cdot 10^3$. Реакция требует ионов Mg²⁺ и не зависит от присутствия АТФ и dNTP.

Кроме того, используя чувствительный метод определения реакции переноса нити, мы частично очистили АТФ-независимую рекомбинационную активность из ядерных экстрактов семенников крыс. Реакция требует гомологии между ДНК-субстратами и присутствия ионов Mg²⁺.

Введение. Благодаря внедрению методов генетической инженерии в современную генетику стал возможным новый этап в развитии молекулярной биологии эукариот, включая человека. Клонирование генетического детерминанта, анализ его первичной структуры, нахождение поврежденных, приводящих к тяжелым наследственным заболеваниям, становятся рутинными приемами медицинской генетики [1]. Современная медицина требует комплексных знаний молекулярной биологии в норме и патологии. Эта новая отрасль науки выдвинула в ряд акту-