

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.

ДНК выделяли из ядерных клеток, периферической крови ранее описанным способом [9].

Выделение плазмидной ДНК, их мечение  $^{32}\text{P}$  в реакции ник-трансляции, рестрикцию геномной ДНК, электрофоретическое разделение фрагментов, перенос их на нейлоновые фильтры, гибридизацию и радиоавтографию проводили по стандартным методикам [10].

**Результаты и обсуждение.** Данные блот-анализа образцов донорской ДНК после рестрикции *TaqI*, электрофореза и гибридизации с  $^{32}\text{P}$ -мечеными ДНК-зондами *pX11.1* и *pERT87.15* приведены на рис. 1 (а, б).

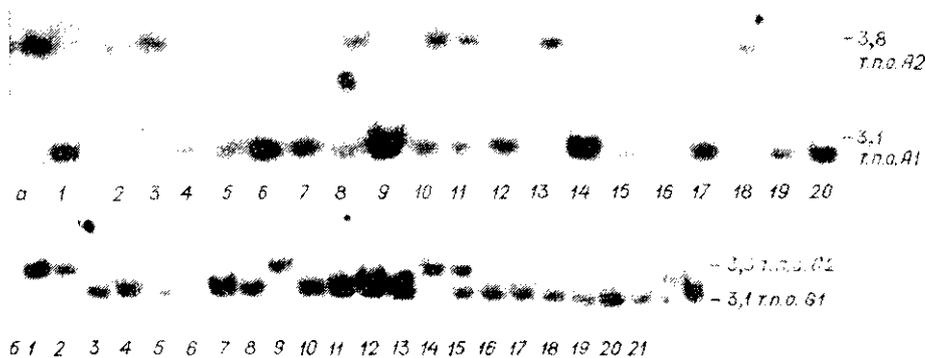


Рис. 1. Популяционный ПДРФ-анализ при помощи ДНК-зондов — фрагментов гена МДД — *pX11.1* (а) и *pERT87.15* (б). Рестрикция образцов ДНК эндогенной нуклеазой *TaqI*

Fig. 1. RFLP analysis of Duchenne muscular dystrophy gene with intragenetic DNA probes *pX11.1* (a) and *pERT87.15* (b). Restriction of DNA samples with *TaqI*

Из данных, суммированных в табл. 1, следует, что частоты аллелей *A1* и *G1*, соответствующих рестриционным фрагментам более низкой молекулярной массы *A1* и *G1* в ленинградской популяции, примерно вдвое больше аналогичных величин для *A2* и *G2*.

Найденные нами частоты аллельного полиморфизма анализируемых районов гена МДД, хорошо соответствуют таковым для жителей

Таблица 1

Частоты аллелей ДНК районов DXS206 (зонд *pX11.1*) и DXS164 (зонд *pERT87.15*) гена МДД в популяции Ленинграда и в семьях высокого риска (рестрикция образцов ДНК эндогенной нуклеазой *TaqI*)  
*Allelic frequencies of DNA loci DXS206 (probe pX11.1) and DXS164 (probe pERT87.15) of Duchenne muscle dystrophy gene in population of Leningrad and in high risk families*

ДНК-зонды	Аллели	Размеры рестриционных фрагментов ДНК, т. п. о.	Частоты аллелей, %	
			В популяции города	В семьях высокого риска
<i>pX11.1</i>	<i>A1</i>	3,1	69	72
	<i>A2</i>	3,8	31	28
<i>pERT87.15</i>	<i>G1</i>	3,1	71	70
	<i>G2</i>	3,3	29	30

США и Канады [11, 12]. Среди особей женского пола в наших опытах частота гетерозигот *A1/A2* и *G1/G2* оказалась примерно одинаковой и составляла около 40 %. Частоты аллельного полиморфизма исследуемых локусов у больных МДД, их матерей и ближайших родственников примерно соответствовали таковым в популяции. Следовательно, в отличие от аллельного полиморфизма некоторых ДНК-локусов, сцепленных с геном муковисцидоза [19], эти аллели не обнаруживают неравновесного сцепления с мутациями гена МДД.

Результаты ПДРФ-анализа семей с МДД приведены в табл. 2. Семь из девяти проанализированных семей были информативными для ДНК-диагностики (четыре по зонду *pXJ1.1* и три по зонду *pERT87.15*), т. е. оказались пригодными для последующей пренатальной ДНК-диагностики (рис. 2, а). Интересно, что в одной семье мать была гетерозиготной (A1/A2), тогда как у больного ребенка образец ДНК после рестрикции *TaqI* с зондом *pXJ1.1* не гибридизовался (рис. 2, б). По-

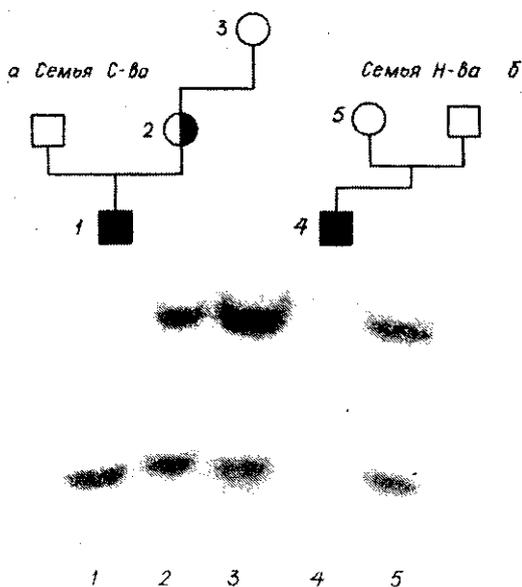


Таблица 2  
Результаты ПДРФ-анализа семей с МДД  
RFLP analysis of high risk families with Duchenne muscular dystrophy

ДНК-зонды	Всего изучено		Число информативных семей
	семей	индивидуумов	
<i>pXJ1.1</i>	9	27	4
<i>pERT87.15</i>	6	17	3

Рис. 2. ПДРФ-анализ семей с высоким риском МДД: а — информативная семья С-ва, родословная и результаты блот-анализа (зонд *pXJ1.1*, рестрикция *TaqI*); б — семья Н-ва с делецией сайта рестрикции по *TaqI* у пробаанда (зонд *pXJ1.1*)

Fig. 2. RFLP analysis of two families with high risk of Duchenne muscular dystrophy: а — informative family with pedigree and blot-analysis. The probe *pXJ1.1*, *TaqI*. б — deletion of *TaqI* restriction site in proband with DMD, *pXJ1.1*, *TaqI*

димому, в данном случае имела место делеция проксимальной части гена МДД. Отсутствие такой делеции в обеих X-хромосомах матери позволяет предположить, что эта мутация возникла *de novo* в процессе оогенеза. Какова протяженность этой делеции и захватывает ли она близлежащий локус *DXS164* (зонд *pERT87.15*), остается пока невыясненным. Следует подчеркнуть в этой связи, что, согласно имеющимся в литературе данным, почти 30% случаев МДД обусловлено мутациями, возникающими *de novo* вследствие мейоза и приводящими к неравному кроссинговеру и, как следствие этого, к многочисленным делециям разной величины в проксимальной и центральной частях гена [12, 14]. Естественно, что установление факта возникновения каждой новой мутации МДД-гена и соответственно отрицания гетерозиготного носительства мутации у матери имеют принципиальное значение для прогноза будущего потомства не только у нее, но и у ее сестер, а также у сибсов женского пола.

#### RFLP ANALYSIS OF DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY GENE IN POPULATION OF LENINGRAD AND IN HIGH RISK FAMILIES

V. N. Gorbunova, V. V. Krasilnikov, M. V. Aseev, N. V. Santzevich, V. S. Baranov

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

#### Summary

Allelic polymorphism of two loci in proximal part of Duchenne muscular dystrophy gene (DMD) *DXS164* (*pERT 87.15* probe) and *DXS206* (probe *XJ1.1*) has been studied by blot-analysis in population of Leningrad and in high risk families. Allelic polymorphism of

both loci studied in normal individuals and high risk families was found to be quite similar to that in North American population. The proportion of women heterozygous for alleles of both loci was about 40 %. 7 of 9 families subjected to RFLP analysis were found to be informative for subsequent prenatal testing. Deletion in the proximal part of DMD gene has been discovered in 1 of 6 DMD patients.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Molecular analysis of human muscle dystrophy* / K. Davies, S. Forrest, T. Smith et al. // *Muscle and Nerve*.— 1986.— 1.— P. 185—194.
2. *The problems of Duchenne muscle dystrophy* / R. G. Worton, P. N. Ray, S. Bodrug et al. // *Phil. Trans. Roy. Soc. London*.— 1988.— 319, N 1194.— P. 275—284.
3. *Davies K. E., Kenwick S. J., Patterson M.* Molecular analysis of muscular dystrophy // *J. Muscle Res. Cell Motility*.— 1988.— 9, N 1.— P. 1—8.
4. *Complete cloning of DMD cDNA and preliminary genomic organization of DMD gene in normal and affected individuals* / M. Koenig, E. P. Hoffman, C. J. Bertelson et al. // *Cell*.— 1987.— 50, N 3.— P. 505—507.
5. *The screening of Duchenne muscle dystrophy patients for submicroscopic deletions* / E. Hart, C. Coic, A. Walker et al. // *J. Med. Genet.*— 1986.— 23.— P. 516—520.
6. *Duchenne muscle dystrophy deficiency of Dystrophin at the muscle cell surface* / E. Bonilla, C. E. Samit, A. F. Mianda et al. // *Cell*.— 1988.— 54, N 4.— P. 447—452.
7. *Евграфов О. В., Макаров В. Б.* Диагностика мюлдистрофии Дюшенна с помощью зондов ДНК // *Вопр. невропатологии и психиатрии*.— 1987.— 87, № 1.— С. 1732—1736.
8. *Красильников В. В., Лазебник Т. А., Шилов Л. А.* Использование метода дискриминационного анализа уровней сывороточной креатинкиназы в установлении гетерозиготного носительства мышечной дистрофии Дюшенна // *Генетика*.— 1987.— 23, № 11.— С. 176—179.
9. *Анализ частоты рестрикционного полиморфизма локуса ДНК С7 в популяции здоровых людей и в семьях больных кистозным панкреатитом поджелудочной железы с помощью цепной реакции синтеза ДНК* / Е. И. Шварц, Т. Э. Иващенко, А. А. Гольцов и др. // *Докл. АН СССР*.— 1989.— 307, № 2.— С. 397—400.
10. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1986.— 420 с.
11. *Thompson M. W., Ray P. N., Bellfall C. P.* Linkage analysis of polymorphism within the DNA fragment XJ cloned the breakpoint of an X; 21 translocation associated with X-linked muscular dystrophy // *J. Med. Genet.*— 1986.— 23.— P. 548—555.
12. *Kunkel L. M., Hiftmanok G. F., Caskey C. T.* Analysis of deletion in DNA from patients with Becker and Duchenne muscle dystrophy // *Nature*.— 1986.— 322.— P. 73—77.
13. *DNA deletion screening in Duchenne and Becker muscular dystrophy* / K. A. Hart, A. Walker, C. G. Cole et al. // *J. Med. Genet.*— 1987.— 24, N 4.— P. 243—244.
14. *Prenatal diagnosis using deletion studies in Duchenne muscular dystrophy* / M. C. Speer, M. A. Pericak-Vance, L. Yamaoka et al. // *Prenat. Diagn.*— 1988.— 8 — P. 427—437.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР,  
Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.213.3

**Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, М. В. Асеев,  
В. С. Баранов, С. В. Виноградов, Ю. А. Берлин,  
А. А. Гольцов, О. К. Кабоев, Е. И. Шварц**

#### **АНАЛИЗ РЕСТРИКЦИОННОГО ПОЛИМОРФИЗМА ДНК-ЛОКУСА D7S23 ПРИ ПОМОЩИ ЗОНДА КМ-19 МЕТОДОМ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ДНК В ПОПУЛЯЦИИ И В СЕМЬЯХ БОЛЬНЫХ МУКОВИСЦИДОЗОМ**

*Методом цепной реакции синтеза (ЦРС) ДНК проанализирован аллельный полиморфизм локуса D7S23, выявляемый ДНК-зондом КМ-19 в популяции Ленинграда — в семьях высокого риска и у больных муковисцидозом (МВ). Методом полимеразной*

\* Работа частично финансируется Всемирной организацией здравоохранения (контракт ВОЗ G 3/181/139).