



УДК 577.213.3

ПРАЙМЕРЗАВИСИМАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДВУХ УЧАСТКОВ β-ГЛОБИНОВОГО ГЕНА ЧЕЛОВЕКА

Шварц Е. И., Кабоев О. К., Гольцов А. А., Виноградов С. В.*,
Лебедеженко Е. Н.*, Берлин Ю. А.*

Ленинградский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Академии наук СССР, Гатчина, Ленинградская обл.;

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

Одной из актуальных проблем молекулярной генетики человека является изучение молекулярных основ патологии и ее распространения в различных регионах. До последнего времени анализ мутационных событий в геноме человека требовал конструирования геномных или кДНК-клонотек, выделения искомых генетических детерминант и их последующего анализа. Методические трудности, возникающие при проведении такого рода исследований, накладывали определенные ограничения на возможности широкого анализа природы генетических дефектов человека. Ситуация принципиально изменилась с созданием метода специфической амплификации ДНК *in vitro* (полимеразная цепная реакция), который сделал возможным прямое выделение фрагментов геномной ДНК [1]. Специфичность амплификации при этом определяется структурой двух синтетических олигонуклеотидов-праймеров, комплементарных двум противоположным цепям ДНК, а длина амплифицируемого фрагмента — расстоянием между этими праймерами, гибридизованными с ДНК.

Первоначально для амплификации ДНК использовали ДНК-полимеразу *E. coli* (фрагмент Кленова) [2], впоследствии замененную на ДНК-полимеразу *Thermus aquaticus* [3]: благодаря термостабильности этого фермента отпадает необходимость его добавления в каждом цикле амплификации. В настоящей работе показана возможность использования для этих целей термостабильной ДНК-полимеразы из *Thermus thermophilus*, выделенной и охарактеризованной в Институте ядерной физики АН СССР.

С помощью амплификации *in vitro* мы выделили два фрагмента β-глобинного гена человека (рис. 1). Выбор фрагментов, подлежащих амплификации, определялся наибольшей частотой мутационных нарушений, свойственных именно этим районам β-глобинного гена. Первый амплифицируемый фрагмент включает область ТАТА-бокса и первый экзон вместе с началом первого интрона; мутации в пределах этого фрагмента в ТАТА-боксе, в 17-м кодоне, а также на границе первого

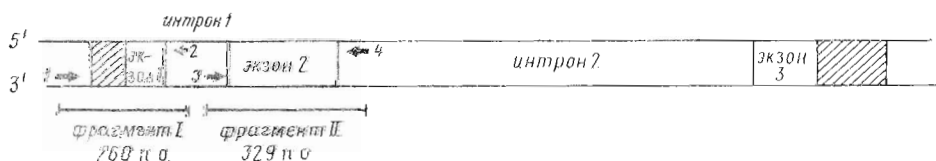


Рис. 1. Схема амплификации двух участков β-глобинного гена человека. Праймеры изображены стрелками, отвечающими 5'→3'-направлению, в котором происходит элонгация, и имеют структуру dCCAATCTACTCCAGGAGCA (1), dCTATTGGTCTCC-TTAAACCT (2), dCACTGACTCTCTGTCCTAT (3), dTATGACATGAACCTAACCAT (4). Заштрихованы 5'- и 3'-нетранслируемые участки гена

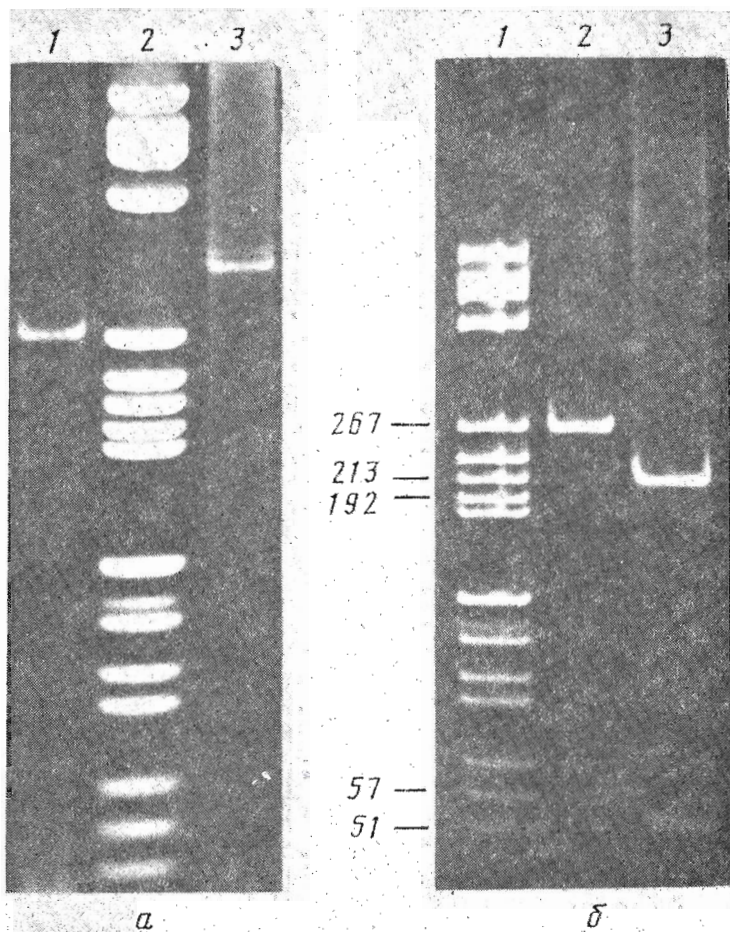


Рис. 2. Анализ продуктов амплификации участков β -глобинового гена человека (6% педенатурирующий ПААГ, прокрашивание бромистым этидием): а — фрагмент I (260 п. о.; карман 1), фрагмент II (329 п. о.; карман 3), смесь *Bsp*R1-фрагментов ДНК рВВ322 в качестве стандартного рестрикта (карман 2); б — рестрикционный анализ амплифицированного фрагмента I: фрагмент I (карман 2), продукты его расщепления эндонуклеазой рестрикции *Bsp*R1 (205 и 55 п. о.; карман 3), стандартный *Bsp*R1-рестрикт ДНК рВВ322 (карман 1; указаны размеры некоторых компонентов смеси, п. о.)

экзона и интрона приводят к тяжелым формам β -талассемии. Второй фрагмент, подлежащий амплификации, частично перекрывает первый интрон и заканчивается вблизи границы второго экзона и второго интрона. Наиболее распространенными патогенными мутациями в этой области являются нонсенс-мутация в 39-м кодоне и транзиция в 110-м звене первого интрона, ведущая к нарушению сплайсинга [4].

Все четыре праймеры (каждый длиной 20 нуклеотидов) были синтезированы ручным твердофазным методом с использованием 3'-цианэтил-N,N-диизопропилфосфамидитов защищенных дезоксирибонуклеозидов [5]; средний выход на стадии наращивания цепи 95%. После деблокирования олигонуклеотиды были очищены электрофорезом в полиакриламидном геле и проанализированы в виде [5'- 32 P]фосфатов. Амплификацию проводили в условиях, близких к описанным ранее [6]: 100 мкл инкубационной среды содержали 67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 6,7 мМ MgCl₂, 10 мМ β -меркаптоэтанол, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 6,7 мкМ EDTA, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, четыре dNTP (1,5 мМ каждый), пару праймеров (0,3 мкг каждого), 10% DMSO и 1 мкг ДНК человека из клеток крови. Денатурацию ДНК проводили при 97° С в течение 7 мин, отжиг праймеров — 2 мин при 20° С, затем добавляли 3 ед. акт. ДНК-полимеразы

T. thermophilus и проводили синтез при 63° С в течение 4 мин. Последующие циклы включали 1 мин при 92° С (денатурация), 1 мин при 20° С (отжиг) и 2 мин при 63° С (синтез). После 30 циклов амплификации ДНК анализировали гель-электрофорезом (рис. 2). В каждой из двух проведенных нами амплификаций видна резко преобладающая полоса, отвечающая полинуклеотиду ожидаемой длины, — соответственно 260 и 329 п. о. О специфичности амплификации, т. е. о выделении определенного участка генома, свидетельствуют также результаты расщепления амплифицированных фрагментов эндонуклеазами рестрикции. Так, действие рестриктазы *BspRI* (*HaeIII*) на первый из двух фрагментов приводит к полинуклеотидам длиной около 205 и 55 звеньев, что точно соответствует первичной структуре этого участка ДНК.

Таким образом, методом амплификации *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы *T. thermophilus* осуществлен синтез двух фрагментов ДНК β -глобинового гена человека, в которых мутации встречаются наиболее часто.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. // Science. 1985. V. 230. № 4732. P. 1350–1354.
2. Scharf S. J., Horn G. T., Erlich H. A. // Science. 1986. V. 233. № 4768. P. 1076–1078.
3. Erlich H. A., Geljand D. H., Saiki R. K. // Nature. 1988. V. 331. № 6155. P. 461–462.
4. Orkin S. H. // Ann. Rev. Genet. 1984. V. 18. P. 131–137.
5. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Köster H. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 11. P. 4539–4557.
6. DiLella A., Huang W. M., Woo S. L. C. // Lancet. 1988. V. i. P. 497–499.

Поступило в редакцию
14.VII.1988

AMPLIFICATION OF TWO SEGMENTS OF THE HUMAN β -GLOBIN GENE BY MEANS OF POLYMERASE CHAIN REACTION

SCHWARZ E. I., KABOEВ O. K., GOL'TSOV A. A., VINOGRADOV S. V.*,
LEBEDENKO E. N.*, BERLIN Yu. A.*

*B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina, Leningrad Region;*

** M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The polymerase chain reaction (PCR) method has been used for amplification of two segments of the human β -globin gene comprising most of pathogenic mutations in the gene.