



УДК 577.243.3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ДЕЛЕЦИИ ПРИ β^0 -ТАЛАССЕМИИ,
УСТАНОВЛЕННАЯ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА АМПЛИФИКАЦИИ
ГЕНОМНОЙ ДНК IN VITRO

*Шварц Е. И., Гольцов А. А., Кабоев О. К.,
Бахланова И. Н., Алексеев А. Н., Соловьев Г. Я.*,
Сурин В. Л.*, Лукьяненко А. В.*, Лебедеенко Е. Н.**,
Виноградов С. В.**, Берлин Ю. А.***

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

** Всесоюзный гематологический научный центр МЗ СССР,
НИИ экспериментальной гематологии и биотехнологии, Москва;*

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

Большинство известных мутаций, приводящих к наследственному синдрому β -талассемии у человека, локализовано в области β -глобинового гена от района ТАТА-бокса до начала второго интрона [1]. В азербайджанской популяции, являющейся главным носителем этого заболевания в СССР, до настоящего времени структурно идентифицирована только одна мутация, которая приводит к β^+ -талассемии [2]. В настоящей работе, используя метод амплификации геномной ДНК in vitro [3], мы установили молекулярную природу мутации в азербайджанской популяции, приводящей к β^0 -талассемии.

ДНК выделяли по методу [4] из лейкоцитов периферической крови больного (по клиническим и гематологическим данным) β^0 -талассемией и трех его ближайших родственников. В четырех полученных образцах амплифицировали два участка β -глобинового гена, как описано ранее [5], используя синтетические 20-звенные праймеры и термофильную ДНК-полимеразу из *Thermus thermophilus* (см. рис. 1). В каждом случае амплификацию проводили в трех вариантах — как с немечеными праймерами, так и с обеими комбинациями немеченого и $5'$ - ^{32}P -меченого праймеров, что позволило получить дуплексы, в которых избирательно мечена одна из цепей. По окончании амплификации реакционную смесь разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле и выделенные из геля полинуклеотиды длиной 260 и 329 п.о. (фрагменты I и II) [5] анализировали.

Сначала был проведен анализ фрагмента II β -глобинового гена, охватывающего экзон 2 и фланкирующие его участки интронов 1 и 2, с помощью рестриктазы *AvaII*; известно, что в этом участке гена находятся два *AvaII*-сайта, из которых лишь один (нуклеотиды 21—25 экзона 2) неизменен, тогда как второй (звенья 12—16 интрона 2) полиморфен [1], что делает возможным анализ вероятности его сцепления с мутантным геном. Как видно из полученных результатов (рис. 2), отец, мать и здоровый ребенок являются гетерозиготными носителями полиморфного *AvaII*-сайта, тогда как у пробанда в обоих аллелях этот сайт отсутствует. Это заключение было затем подтверждено результатами секвенирования по Максаму — Гилберту [6].

Благодаря избирательному терминальному мечению каждой из цепей в составе амплифицированных дуплексов I и II все изученные нами фрагменты β -глобинового гена в четырех различных ДНК были секвенированы по обеим цепям. В структуре ДНК пробанда были обнаружены три особенности. Так, во фрагменте I наблюдалась транзигция

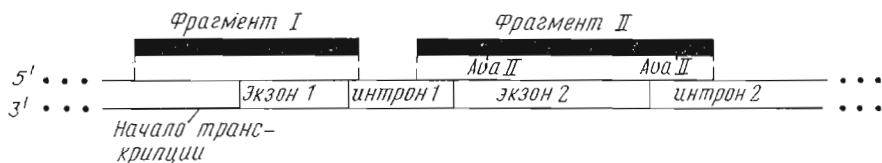


Рис. 1. Схема части β-глобинового гена человека. Указаны границы двух амплифицированных участков гена (I и II), подвергнутых секвенированию (продуктам амплификации отвечают зачерненные прямоугольники)

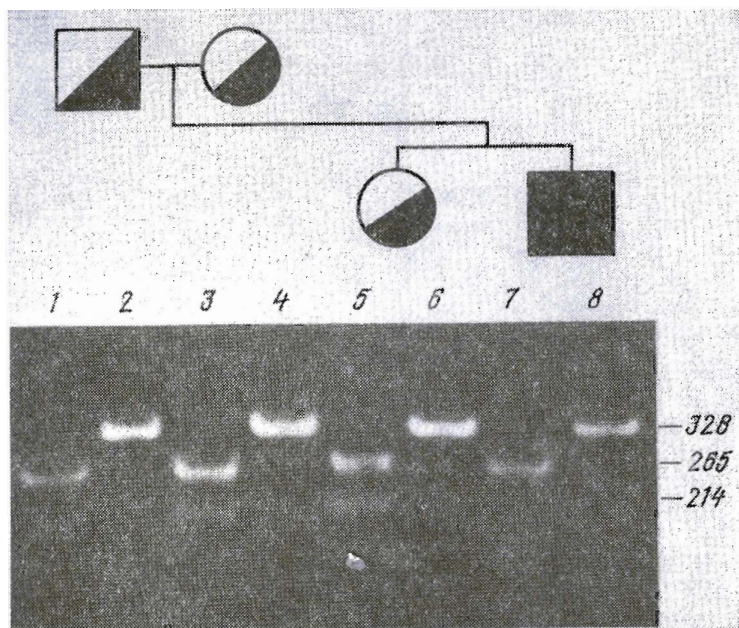


Рис. 2. *AvaII*-рестриктный анализ II участка β-глобинового гена в семье больного β⁰-талассемией (в верхней части рисунка дана родословная этой семьи). Приведены результаты электрофореза в 6% полиакриламидном геле (прокрашивание бромистым этидием) продуктов амплификации II участка ДНК отца, матери, здорового ребенка и больного ребенка (карманы 2, 4, 6, 8) и *AvaII*-рестрикты этих ДНК (1, 3, 5, 7 соответственно). Указаны размеры оставшихся в геле наиболее крупных продуктов рестрикции (п.о.; длины приведены без учета выступающих трехзвенных концов). Фрагмент 214 п.о. отвечает нормальному аллелю (содержит оба упоминаемых в тексте *AvaII*-сайта), а фрагмент 265 п.о. — мутантному аллелю (полиморфный *AvaII*-сайт в начале второго интрона отсутствует)

С → Т в третьем положении второго кодона β-глобинового гена (нейтральная мутация). Далее, в составе фрагмента II оказался модифицированным *AvaII*-сайт (трансверсия С → G в 16-м звене 2-го интрона), что согласуется с приведенными выше (рис. 2) данными об отсутствии этого рестриктового сайта в обоих аллелях генома пробанда и в одном из аллелей каждого из остальных геномов. Наконец, в I фрагменте была обнаружена делеция двух нуклеотидов (AA) в составе восьмого кодона β-глобинового гена (см. рис. 3). Именно эта делеция обуславливает β⁰-талассемию: сдвигая рамку считывания, она вызывает почти немедленное появление терминирующего кодона и таким образом делает невозможным синтез зрелого β-глобина.

Делеция двух нуклеотидов в восьмом кодоне β-глобинового гена была впервые описана в 1981 г. в турецкой семье [7] и недавно обнаружена у больного β⁰-талассемией в Ливане [8]; по нашим предварительным данным, эта мутация сцеплена с IV гаплотипом по Оркину [9]. Полученные нами результаты показывают существование такой же мутации

в Азербайджане. Это делает возможным выявление носителей мутантного аллеля с помощью олигонуклеотидных зондов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Orkin S. H. // Hum. Genet. 1985. V. 69. № 1. P. 1-14.
2. Лимборская С. А., Бухман В. Л., Просняк М. И., Федоров А. Н., Слоимский П. А., Никкина П. И., Рысков А. П. // Генетика. 1987. Т. 23. № 2. С. 228-238.
3. 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.
4. Лукьяненко А. В., Соловьев Г. Я., Рустамов Р. Ш., Гринева Н. И., Постников Ю. В., Гаубов Н. Т., Дадашева Т. С., Токарев Ю. Н. // Гематология и трансфузиология. 1987. № 12. С. 22-24.
5. Шварц Е. И., Кабоев О. К., Гольцов А. А., Виноградов С. В., Лебеденко Е. Н., Берлин Ю. А. // Биоорг. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1577-1579.
6. Maxam A. M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. С. 499-560.
7. Orkin S. H., Goff S. C. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 19. P. 9782-9784.
8. Chehap F. F., Der Kalustian V., Khuri F. P., Deeb S. S., Kan Y. W. // Blood. 1987. V. 69. № 4. P. 1141-1145.
9. Orkin S. H., Kazazian H. H., Antonarakis S. E., Goff S. C., Boehm C. D., Sexton J. P., Waber P. G., Giardina P. J. V. // Nature. 1982. V. 296. № 5858. P. 627-631.

Поступила в редакцию
23.XII.1988

A β^0 -THALASSAEMIA-CAUSING SHORT DELETION STRUCTURALLY ELUCIDATED BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

SCHWARTZ E. I., GOL'TSOV A. A., KABOEV O. K., BAKHLANOVA I. N.,
ALEXEEV A. N., SOLOVYEV G. Ya.*, SURIN V. L.*, LUKYANENKO A. V.*,
LEBEDENKO E. N.**, VINOGRADOV S. V.**, BERLIN Yu. A.**

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

** All-Union Hematological Scientific Centre, Institute
of Experimental Hematology and Biotechnology, Moscow;*

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

A mutation causing β^0 -thalassaemia in Azerbaijani population is shown, by the polymerase chain reaction followed by Maxam - Gilbert sequencing, to be the deletion of dinucleotide AA from the eighth codone of β -globin gene (the mutation is known to exist also in Turkey and Lebanon). Two other mutations have also been found in β -globin gene of the same DNA, one of which (transversion C→G at position 16 of intron 2) eliminates the polymorphic *Ava*II-site and is associated with thalassaemia, and other is transition C→T in the third position of the second β -globin codon.