

5. 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.
6. Sommer S. S., Sobell J. L. Application of DNA-based diagnosis of patient care. The example of hemophilia A // *Mayo Clin. Proc.* — 1987.— 62, N 3.— P. 387—404.
7. Капринов Н. Н. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М.: НИИ педиатрии АМН СССР, 1986.— 37 с.
8. Morris A., Super M. Cystic fibrosis. The facts.— Oxford: Univ. press, 1987.— 264 p.
9. Possibilities and problems in genomic diagnosis of Dueschenne muscular dystrophy with molecular probes / A. Speer, K. Davies, S. McGlade, R. Hanke // *Biomed. et biochim. acta*.— 1986.— 45, N 1.— P. 19—27.
10. Esticill X., Farrall M., Williamson R. Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linkage DNA polymorphism in Italian families: a collaborative studies // *Amer. J. Hum. Genet.*— 1988.— 43, N 5.— P. 623—628.
11. Праймер-зависимая амплификация двух участков β -глобинового гена человека / Е. П. Шварц, О. К. Кобоев, А. А. Гольцов и др. // *Биоорг. химии*. — 1988. — 14, № 11.— С. 1577—1579.

Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР,
Ленинград
Ин-т ядер. физики АН СССР, Гатчина
Ин-т биоорг. химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва

Получено 06.04.89

УДК 577.213.3

Л. А. Лившиц, В. И. Гришко, С. А. Кравченко,
Т. Э. Иващенко, В. С. Баранов, Т. И. Бужиевская

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК В УЧАСТКАХ, ТЕСНО СЦЕПЛЕННЫХ С ГЕНОМ МУКОВИСЦИДОЗА, В ПОПУЛЯЦИИ КИЕВА

В работе представлены результаты исследования рестрикционного полиморфизма в локусах, тесно сцепленных с геном муковисцидоза (МВ, кистозного фиброза поджелудочной железы), в популяции здоровых людей-доноров и в семьях с высоким риском МВ (Киев).

Неравновесное сцепление мутации МВ с определенными гаплотипами локуса D7S23 (в системах КМ-19 и CS.7) обнаружено в семьях с МВ. Этот факт позволяет осуществлять выявление гетерозиготного носительства у здоровых sibсов в данных семьях и проводить пренатальную диагностику методом ДНК-анализа плода в сочетании с анализом ферментов амниотической жидкости на 18—19-й неделях беременности в семьях, утративших больного ребенка, но имеющих высокий риск повторного рождения детей, больных МВ.

Введение. МВ относится к числу тяжелых моногенных патологий человека с аутомно-рецессивным типом наследования. Показано [1], что для европейского населения частота встречаемости МВ составляет 1 : 2 000 новорожденных [2]. Каждый 20-й житель Европы может являться носителем мутантного аллеля гена МВ. Однако до сих пор попытки идентифицировать точное местонахождение и характер мутации, приводящей к этому тяжелому заболеванию, не увенчались успехом. В ходе исследований были обнаружены локусы 7-й хромосомы человека ($-7q31$), фланкирующие ген МВ и имеющие полиморфные сайты рестрикции. ДНК-фрагменты этих локусов были клонированы и в настоящее время широко используются для пренатальной диагностики и выявления гетерозиготного носительства МВ в семьях с высоким риском рождения больного ребенка [2—4]. Особый интерес представляет локус *D7S23*, в состав которого входят участки *КМ-19* и *CS.7*. Было показано, что он находится достаточно близко от гипотетического гена МВ [3]. Наличие полиморфных сайтов рестрикции, а также анализ нуклеотидной последовательности, фланкирующей данные сайты, позволяют проводить изучение полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) методом специфической амплификации с помо-

ищу полимеразной цепной реакции для эффективной пренатальной диагностики МВ [5, 6].

Диагностическая ценность ПДРФ ДНК в данной конкретной популяции определяется частотой встречаемости аллелей и сцепления их с мутацией МВ. В разных популяциях эти характеристики различаются [7—9]. Учитывая это, необходимо проведение анализа ПДРФ ДНК в популяциях отдельных регионов для отбора диагностически информативных систем зонд — рестриктаза.

Целью данной работы был анализ ПДРФ ДНК в локусе *D7S23* (системы *KM-19* и *CS.7*), тесно сцепленном с геном МВ, у здоровых доноров и в семьях с МВ Киева.

Материалы и методы. ДНК из клеток крови получали по методу [10]. Олигонуклеотидные праймеры к участкам *KM-19* [5] и *CS.7* [6] синтезированы сотрудниками Ин-та молекулярной биологии и генетики АН УССР Г. В. Панасенко и С. С. Овчинником фосфитагидным способом в автоматическом варианте на синтезаторе «Geneassembler» производства фирмы «Pharmacia» (Швеция). После деблокирования олигонуклеотиды очищали вначале на колонке для гель-хроматографии и затем — электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Далее олигонуклеотидный материал элюировали из геля и снова наносили на гель-фильтрационную колонку. Препараты анализировали на гомогенность электрофорезом в денатурирующих условиях, предварительно введя в 5'-конец ³²P-метку.

Полимеразную цепную реакцию проводили в инкубационной среде: 50 мкл содержали 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 6,7 мМ MgCl₂, 10 мМ меркаптоэтанол, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 6,7 мМ ЭДТА, 170 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1,0 мМ каждого из четырех NTP, пару праймеров (0,03 мкг каждого), 1 мкг ДНК. ДНК денатурировали при 98 °С в течение 10 мин, затем добавляли 2 ед. активности термостабильной ДНК-полимеразы и проводили синтез при 72 °С в течение 4 мин. Последующие циклы включали денатурацию (1 мин, 94 °С), отжиг праймеров (1 мин, 55 °С), синтез ДНК (3 мин, 72 °С). После 30 циклов амплификации пробы выдерживали в течение 10 мин при температуре 72 °С и затем охлаждали [11]. Отбирали аллели по 20 мкл, добавляли по 5 ед. акт. рестриктаз *PstI*, *HinfI* и в течение 2 ч вели рестрикцию при температуре 37 °С. Затем материал фракционировали в 6 %-ном ПААГ [12]. В качестве маркеров молекулярной массы использовали ДНК бактериофага λ, гидролизованную рестриктазой *HindIII*.

Результаты и обсуждение. Проведенный анализ ПДРФ-гаплотипов в популяции здоровых людей-доноров, в семьях которых не обнаружено больных МВ, свидетельствует о высокой частоте встречаемости (0,623 и 0,377) аллелей ПДРФ (фрагменты 0,95; 0,65 и 0,30 т. п. н.) в системе *KM-19* рестриктаза *PstI*. Аналогичные исследования ПДРФ-гаплотипов в группе гетерозиготных носителей МВ (родители больных детей) выявили достоверные различия по частоте встречаемости соответствующих аллелей (0,426 и 0,574) по сравнению с таковой в группе здоровых доноров в данной системе.

Наиболее интересными представляются результаты, полученные при анализе гаплотипов больных МВ. Приведенные в табл. 1 данные свидетельствуют о существенных различиях по частоте встречаемости гаплотипов у больных МВ по сравнению с таковыми в группе здоровых доноров и в группе облигатных носителей МВ. Так, если хромосомы с отсутствием сайта рестрикции по *PstI* в локусе *KM-19* (размер фрагментов 0,95 т. п. н.) встречаются в группе здоровых доноров с частотой 0,623, то в группе облигатных носителей МВ и в группе детей, больных МВ — с частотой 0,426 и 0,182 соответственно.

В свою очередь, частота встречаемости хромосом 7 с наличием в данном локусе сайта рестрикции для *PstI*, выявляемого по образованию ДНК-фрагментов размером 0,65 и 0,30 т. п. н., составляет в группе здоровых доноров 0,377, тогда как аналогичный показатель в группах гетерозиготных носителей мутантного гена МВ и у детей, больных МВ, имеет существенно отличные величины (0,574 и 0,818 соответственно).

Аналогичные частоты встречаемости ПДРФ-аллелей в системе

CS.7 — рестриктаза *Hin61* в тех же анализируемых группах приведены в табл. 2. Из нее следует, что частота встречаемости хромосом 7 с отсутствием сайта рестрикции (длина фрагмента 0,33 т. п. н.) в группе

Таблица 1

Частота встречаемости гаплотипов по локусу KM-19 (Киев)

Genotype frequencies for the alleles of polymorphic locus KM-19 in healthy donors, obligatory heterozygotes and affected CF-children in Kiev

Анализируемая группа	Число проанализированных хромосом	Число выявленных гаплотипов		Частота выявленных гаплотипов	
		B_1	B_2	B_1	B_2
Гетерозиготные носители (родители детей с МВ)	54	23	31	0,425	0,574
Дети, больные МВ	22	4	18	0,182	0,818
Контрольная группа (доноры)	48	30	18	0,623	0,377

Примечание. Гаплотип B_1 соответствует отсутствию, гаплотип B_2 — наличию сайта рестрикции. Различия между частотами анализируемых групп достоверны при $P < 0,001$.

Таблица 2

Частота встречаемости гаплотипов по локусу CS.7 (Киев)

Genotype frequencies for the alleles for polymorphic locus CS.7 in healthy donors, obligatory heterozygotes and affected CF-children in Kiev

Анализируемая группа	Число проанализированных хромосом	Число выявленных гаплотипов		Частота выявленных гаплотипов	
		A_1	A_2	A_1	A_2
Гетерозиготные носители (родители детей с МВ)	46	20	26	0,435	0,565
Дети, больные МВ	22	3	19	0,136	0,864
Здоровые доноры	18	10	8	0,556	0,444

Примечание. Гаплотип A_1 соответствует отсутствию, гаплотип A_2 — наличию сайта рестрикции. Различия между частотами гаплотипов в анализируемых группах достоверны при $P < 0,001$.

Таблица 3

Частота встречаемости ПДФ-генотипов по локусам KM-19 и CS.7 (Киев)

Genotype frequencies for the alleles of polymorphic locus KM-19 and CS.7 in healthy donors, obligatory heterozygotes and affected CF-children in Kiev

Анализируемая группа	Частота встречаемости генотипов					
	A_1A_1	A_1A_2	A_2A_2	B_1B_1	B_1B_2	B_2B_2
Гетерозиготные носители МВ (родители детей с МВ)	0,143	0,572	0,285	0,103	0,586	0,313
Дети, больные МВ	—	0,25	0,75	—	0,243	0,727
Здоровые доноры	0,33	0,45	0,22	0,375	0,5	0,125

Примечание. Различия между частотами достоверны при $P < 0,001$.

здоровых доноров составляет 0,556 и существенно отличается от таковой в группах гетерозиготных носителей МВ и детей, больных МВ (0,435 и 0,136 соответственно).

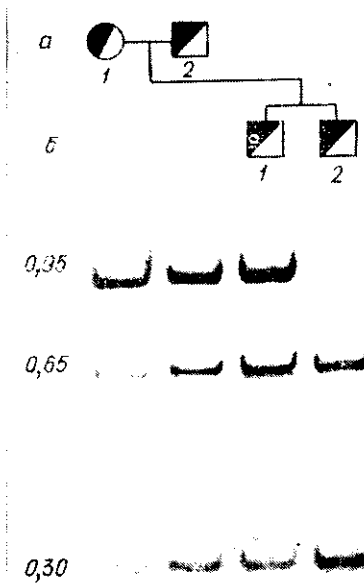
С другой стороны, частота встречаемости хромосом 7 с наличием

сайта рестрикции для фермента рестрикции *Hin6I* (длина фрагментов 0,164 и 0,166 т. п. н., выявляемых с помощью электрофореза как фрагмент размером приблизительно 0,165 т. п. н.) составила в группе здоровых доноров 0,444 и значительно отличалась от таковой в группах гетерозиготных носителей мутации МВ и больших МВ (0,565 и 0,864 соответственно).

Анализ частоты встречаемости генотипов в системе *CS.7* свидетельствует о неравновесном сцеплении аллели A_2 (наличие сайта рестрикции для фермента *Hin6I*) с мутацией МВ. Так, среди здоровых доноров генотип A_1A_1 (гомозиготы по отсутствию сайта рестрикции) встречается с частотой 0,33, тогда как у гетерозиготных носителей МВ этот генотип встречается гораздо реже (0,143), а у больных МВ этот генотип не встречается вовсе. Напротив, генотип A_2A_2 (гомозиготы по наличию сайта рестрикции) встречается с частотой всего лишь 0,12, в то время как среди гетерозиготных носителей

Анализ ПДРФ ДНК, сцепленного с геном МВ, в семье С. с больным ребенком методом специфической амплификации (система *KM-19*): а — ДНК матери (1); ДНК отца (2); б — ДНК здорового брата (1); ДНК пробанда (2). Размер рестриционных фрагментов указан в т. п. н.

RFLP analysis in family C. with cystic fibrosis child by means of polymerase chain reaction (*KM-19*): а — maternal DNA sample (1), paternal DNA sample (2); б — unaffected child DNA sample (1), CF-child's DNA sample (2) DNA fragment size in kb



МВ этот показатель возрастает до 0,285, а у больных МВ составляет 0,75. Доля гетерозигот A_1A_2 для здоровых доноров составляет 0,45, для облигатных носителей мутантного гена МВ и больных МВ — 0,572 и 0,25 соответственно.

Сходные результаты имеют место при анализе ПДРФ-генотипов системы *KM-19* (табл. 3).

Полученные результаты позволяют сделать вывод о статистически достоверном неравновесном сцеплении МВ с аллелью A_2 в системе *CS.7* и аллелью B_2 в системе *KM-19*, что подтверждается соответствующими величинами стандартного коэффициента неравновесия $\Delta st/\Delta st = 0,49$ и $\Delta st = 0,32$ для аллелей A_2 и B_2 соответственно [13]. Эти данные достоверно отличаются ($P < 0,001$) от таковых, полученных при исследовании семей с высоким риском МВ в системах *KM-19/PstI* и *CS.7/Hinf6I* в некоторых городах Италии [8].

На основании вышеперечисленных данных можно сделать вывод о высокой информативности пренатальной диагностики в семьях с высоким риском МВ. На рисунке представлены результаты семейного ДНК-анализа в системе *KM-19* — рестриктаза *PstI*. Данная семья является полностью информативной для последующей пренатальной диагностики МВ.

Неравновесность сцепления A_2 и B_2 аллелей с МВ позволяет использовать вышеописанный ДНК-анализ методом полимеразной цепной реакции для верификации диагноза МВ, выявления гетерозиготного носительства и пренатальной диагностики в семьях, утративших больного ребенка.

ANALYSIS OF DNA POLYMORPHISM IN THE REGIONS CLOSELY LINKED WITH
CYSTIC FIBROSIS GENE IN KIEV POPULATION

L. A. Livshitz, V. I. Gryshko, S. A. Kravchenko, T. E. Ivashchenko,
C. S. Baranov, T. I. Buzhievskaya

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Institute of Obstetrics and Gynecology,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

The allelic polymorphism of human DNA loci linked with cystic fibrosis gene (*D7S23*) was studied using polymerase chain reaction in the population of healthy donors in Kiev. The marked linkage disequilibrium between cystic fibrosis mutation and particular RELP alleles in *D7S23* loci (KM-19-endonuclease Pst I and CS.7-endonuclease *Hin6I* systems) was found in the families with the affected children.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harris A., Super M. Cystic fibrosis. The fact.— Oxford: Univ. press, 1987.— 133 p.
2. Construction of a general human chromosome jumping library with application to cystic fibrosis / F. Collins, M. L. Drumm, C. L. Efery et al. // Science.— 1987.— 235, N 4792.— P. 1046—1049.
3. Linkage disequilibrium and the origins of cystic fibrosis / X. Estivill, P. Frederick, B. Wainwright et al. // Excerpta med. Int. Congr. Ser.— 1988.— 74.— P. 9—10.
4. Schmidtke J., Krawczak M., Schwartz M. Linkage relationships and allelic associations of the cystic fibrosis locus and four marker loci // Hum. Genet.— 1987.— 76, N 4.— P. 337—343.
5. Feldman G. L., Williamson R., Beaudet A. L. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by DNA amplification for detection of KM-19 polymorphism // Lancet.— 1988.— N 9.— P. 102.
6. Same-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification / C. Williams, R. Williamson, C. Coutelle et al. // Ibid.— P. 102—103.
7. Cystic fibrosis DNA markers in Alabama blacks / R. K. Martin, G. C. Kaplan, T. W. Hodge, P. E. Barker // Genomics.— 1988.— N 3.— P. 385—388.
8. Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphism 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.
9. Pattern of polymorphism and linkage disequilibrium for cystic fibrosis / X. Estivill, P. J. Scambler, B. C. Wainwright et al. // Genomics.— 1987.— N 1.— P. 257—263.
10. Erste Ergebnisse bei der genomischen Carrierdiagnostik in Risikosippen mit Haemophilie A und B in der DDR / M. Wehnert, F. H. Herrmann, H. Melzke, H. Thiele // Z. gesamte inn. Med.— 1988.— 43, N 16.— S. 441—444.
11. Использование метода цепной реакции синтеза ДНК для анализа частоты рестрикционного полиморфизма ДНК-локуса CS7 в популяции и в семьях больных муковисцидозом / Е. И. Шварц, Т. Э. Иващенко, А. А. Гольцов и др. // Докл. АН СССР.— 1989.— 307, № 2.— С. 467—469.
12. Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual.— New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.— 420 p.
13. Allelic association of the cystic fibrosis locus and two DNA markers, XV-2c and KM.19 in 55 German Families / M. Krawczak, D. S. Konecki, J. Schmidtke et al. // Hum. Genet.— 1988.— 80.— P. 78—80.

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

Получено 23.06.89