

early) gene of CMV. The second reaction includes from 20 up to 50 cycles consisting of the same steps but with 20-base primers chosen to amplify the internal part of the fragment amplified during the first reaction. The final fragment is detected by the ethidium bromide staining after polyacrylamide gel electrophoresis. Verification of the band includes restriction enzyme analysis. Use of *pCM5018* plasmid bearing the CMV MIE gene shows that the proposed procedure can detect as little as several (from 1 to 5) molecules of DNA.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самохин П. А. Цитомегаловирусная инфекция у детей.— М.: Медицина, 1987.— 161 с.
2. *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*/R. K. Saiki, St. Scharf, F. Faloona et al.// *Science*.— 1985.— 230, N 4732.— P. 1350—1354.
3. *Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification*/G. J. Demmler, G. J. Buffone, C. M. Schimbor, R. A. May// *J. Infect. Diseases*.— 1988.— 158, N 6.— P. 1177—1184.
4. *Polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus* / J. M. Li, M. A. Morgan, D. Rascon et al.// *Abstrs Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*— New Orleans, 1989.— S-10.— P. 372.
5. *Fiss E., York M. K., Brooks G. F.* Detection of cytomegalovirus in bronchial lavage and blood specimens by means of the polymerase chain reaction// *Ibid.*— C-176.— P. 422.
6. *Forman M., Charache P., Arthur R.* The use of polymerase chain reaction for detection of cytomegalovirus in clinical specimens// *Ibid.*— D-238.— P. 122.
7. *Use of the polymerase chain reaction technique to detect cytomegalovirus*/E. Rosenberg, J. Keiser, J. Gross et al.// *Ibid.*— D-239.— P. 122.
8. *Использование цепной реакции полимеризации для выявления вируса цитомегалии в тканях человека*/Г. Р. Виноградская, И. Ю. Горышин, О. В. Плуталов и др.// VII Всесоюз. симпозиум. «Молекуляр. механизмы генет. процессов».— М., 1990.— С. 2037.
9. *Ryger R., Bornkamm G. W., Fleckenstein B.* Human cytomegalovirus sequences with homologies to the cellular genome// *J. Gen. Virol.*— 1984.— 65.— P. 1351—1364.
10. *Goetz S. E., Hamilton S. R., Vogelstein B.* Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue// *BBRC*.— 1985.— 130, N 1.— P. 118—126.
11. *Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж.* Методы генетической инженерии. Генетика бактерий.— М.: Мир, 1984.— 176 с.
12. *Прямозависимая амплификация двух участков β -глобинового гена человека*/Е. И. Шварц, О. К. Кабоев, А. А. Гольцов и др.// *Биоорг. химия*.— 1988.— 14, № 11.— С. 1577—1579.
13. *Stenberg R. M., Thomsen D. R., Stinski M. F.* Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus// *J. Virol.*— 1984.— 49, N 1.— P. 190—199.

Ленинград. ин-т ядер. физики им. Б. П. Константинова
АН СССР

Получено 05.07.90

Ин-т акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта АМН СССР,
Ленинград
Ин-т биоорг. химии им. М. М. Шемякина АН СССР,
Москва
Ленинград. педиатр. мед. ин-т Минздрава РСФСР

УДК 616-056.7:616.153.922

Н. Б. Должанская, М. Т. Тодорова, А. Л. Шварцман

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИСМЫСЛОВОЙ КОНСТРУКЦИИ κ ДНК РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Получена антисмысловая конструкция κ ДНК рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП) человека. Эта конструкция включает 5'-концевой фрагмент (1,1 тыс. п. н.) κ ДНК рЛНП и промотор гена металлотиионина мыши и может быть использована для создания трансгенных животных, дефицитных по рЛНП.

© Н. Б. ДОЛЖАНСКАЯ, М. Т. ТОДОРОВА, А. Л. ШВАРЦМАН, 1991

Введение. Одним из способов моделирования генетических заболеваний являются системы, в которых роль регуляторов генной экспрессии выполняют антисмысловые РНК [1]. При этом существует целый ряд обязательных требований к антисмысловым РНК, необходимых для эффективного блокирования экспрессии генов: а) генетическая конструкция в которую клонирована генетическая копия, должна содержать промотор, обеспечивающий высокий уровень транскрипции в специализированных клетках; б) нуклеотидная последовательность антисмысловой копии должна иметь участки, комплементарные районам инициации транскрипции, включая сигналы сплайсинга; в) при подав-

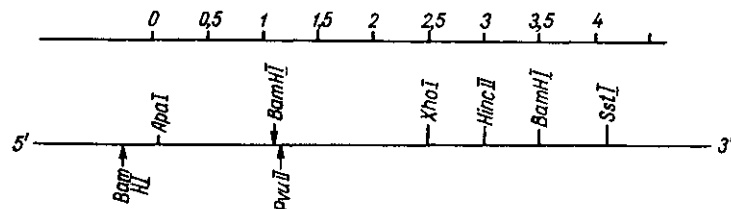


Рис. 1. Схема кДНК рЛНП человека (цифры — размеры фрагментов в тыс. п. н.)

лении трансляции антисмысловая копия должна содержать участки, комплементарные участку связывания мРНК с рибосомами, включая иницирующий кодон. Таким образом, для построения конструкций,

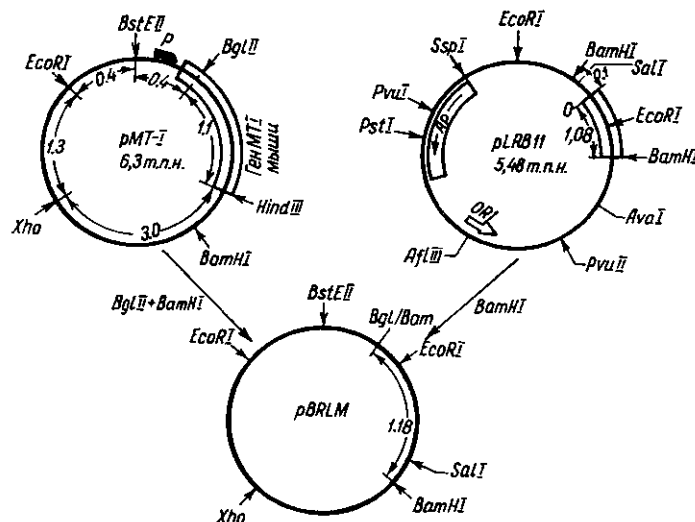


Рис. 2. Схема получения антисмысловой конструкции кДНК рЛНП человека

кодирующих антисмысловую РНК, необходимо, в общем виде, выделение и клонирование последовательностей ДНК, кодирующих 5'-концевую область соответствующего гена или кДНК. При моделировании семейной гиперхолестеринемии — заболевания, связанного с нарушением экспрессии функционально активных молекул рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП) [2], — возникает проблема подавления синтеза рЛНП в клетках печени. В задачу наших исследований входило получение генетической конструкции, кодирующей антисмысловую последовательность РНК рЛНП, под контролем промотора гена металлотioneина (MT) [3].

Материалы и методы. Выделение, клонирование рекомбинантной ДНК и скрининг бактериальных колоний проводили по методам, описанным в монографии [4]. Бактериальные клетки ДН5 трансформировали лигазной смесью методом электропорации. В качестве гибридизационного зонда использовали ^{32}P -фрагмент кДНК-рЛНП (1,1 тыс. п. н.),

меченный в реакции с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I с множественной заправкой. Удельная радиоактивность ДНК превышала 10^8 расп/мин. Авторадиографию осуществляли в течение двух суток при -70°C с усиливающим экраном. Ориентацию фрагмента кДНК рЛНП проверяли с помощью рестрикционного анализа [4].

Результаты и обсуждение. В качестве исходной плазмиды для получения антисмысловых копий РНК рЛНП нами была выбрана плазида *pDLR3*, любезно предоставленная доктором Расселом, включающая полноразмерную кДНК рЛНП (рис. 1). Участок, ограниченный сайтами *BamHI* и обозначенный на рис. 1 стрелками, содержал кодоны 5'-нетранслируемой области и иницирующий кодон ATG. Этот участок мы использовали в качестве последовательности для создания антисмысловой конструк-

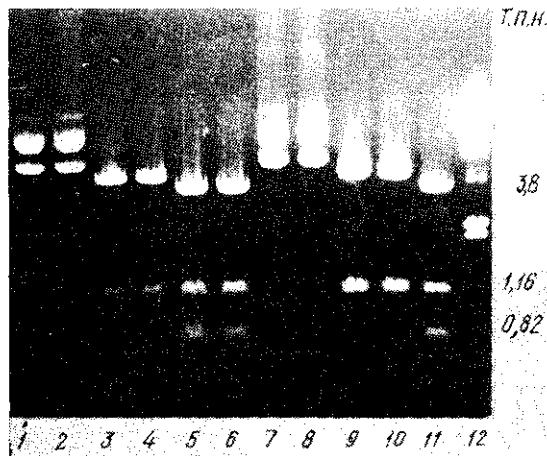


Рис. 3. Электрофореграмма фрагментов плазмиды *pBRLM* после расщепления рестриктазами *EcoRI* (3, 4, 9, 10); *EcoRI+BamHI* (5, 6, 11); нативная *pBRLM* (1, 2, 7, 8); ДНК фага λ после расщепления *HindIII* (12)

ции. Предварительно фрагмент *BamHI-BamHI* (1,18 тыс. п. н.) был клонирован в плазмиде *pBR322*. Полученная рекомбинантная плазида была обозначена как *pLRBII* (рис. 2).

Среди промоторов, активно функционирующих в клетках печени, мы выбрали промотор гена МТ [6]. Генетические конструкции, включающие этот промотор, активно экспрессировались как в культуре клеток печени, так и в печени трансгенных животных даже без специфической регуляции ионами кадмия [3]. С другой стороны, выбор промотора гена МТ продиктован тем обстоятельством, что он содержит акцепторный сайт *BglIII*, позволяющий клонировать в нем *BamHI-BamHI*-фрагмент 5'-концевой области кДНК рЛНП (рис. 2). Образование слитого сайта *BamHI-BglIII* и наличие асимметричного сайта *EcoRI* позволили определить ориентацию вставки фрагмента кДНК рЛНП. В этом случае при использовании в качестве вектора плазмиды *pMT-1* (рис. 2), а также одинарных и двойных расщеплений *EcoRI* и *EcoRI + BamHI* получают фрагменты длиной 4,6+1,16 и 0,82+1,16+3,8 тыс. п. н. соответственно. На рис. 3 представлена электрофореграмма фрагментов плазмиды *pBRLM* после расщепления рестриктазами *EcoRI*, *EcoRI+BamHI*. Таким образом, на основе расчета размеров рестрикционных фрагментов мы можем однозначно трактовать полученную конструкцию *pBRLM* как антисмысловую. Ранее нами показано, что в фибробластах мыши, трансформированных плазмидой *pMSVL*, происходит временная экспрессия кДНК рЛНП [7]. В дальнейших экспериментах мы планируем продемонстрировать функциональную активность полученной антисмысловой копии в экспериментах по одновременной трансформации плазмидами *pMSVL* и *pBRLM*. Созданная антисмысловая конструкция может быть использована для получения трансгенных животных, дефицитных по рЛНП. Исследования таких трансгенных животных позволят не только изучить особенности липидного обмена при генетически детерминированной гиперхолестеринемии, но и разработать подходы к терапевтическому лечению заболевания.

Резюме

Одержана антисмислова конструкція кДНК рецептору ліпопротеїнів низької щільності (рЛНЩ) людини. Ця конструкція містить 5'-кінцевий фрагмент (1,1 тис. п. н.) кДНК рЛНЩ та промотор гену металотіонеїну миші і може бути використана для створення трансгенних тварин, дефіцитних по рЛНЩ.

Summary

The anti-sense cDNA construction of human low-density lipoprotein receptor (rLDL) was obtained. It includes the 5'-terminal fragment of cDNA rLDL and the murine metallothionein gene promoter. The construction may be used to obtain transgenic animals that are deficient of rLDL.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green P. J., Pines O., Inouye M. The role of antisense RNA in gene regulation // Ann. Rev. Biochem.— 1986.— 55.— P. 569—597.
2. Michael S., Brown C., Goldstein J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis // Science.— 1986.— 232, N 4746.— P. 34—40.
3. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice / R. D. Palmiter, G. Norstedt, R. E. Gelinis et al. // Ibid.— 1983.— 222, N 4625.— P. 809—814.
4. Маниатис Т., Фритч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 420 с.
5. Calvin N. M., Hanawalt P. C. High-efficiency transformation of bacterial cells by electrophoration // J. Bacteriol.— 1988.— 170, N 6.— P. 2796—2801.
6. Hammer R. E. Expression of human growth hormone releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth // Nature.— 1985.— 315, N 6008.— P. 413—416.
7. Моделирование генетической коррекции семейной гиперхолестеринемии / Н. Б. Должанская, М. Ю. Мандельштам, Е. Л. Паткин и др. // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 2.— С. 31—35.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 05.07.90

УДК 616-056.7:616.153.922

**М. Ю. Мандельштам, Б. М. Липовецкий, А. Л. Шварцман,
В. С. Гайцхоки**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОВОЙ ДЕЛЕЦИИ В ГЕНЕ РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТА С СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) — аутосомно-доминантное заболевание человека, причиной которого на молекулярном уровне являются различные мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП). В работе мы описываем новую делецию протяженностью 5 тыс. нуклеотидных пар в локусе рЛНП у больного с фенотипом СГ. Делеция элиминирует экзоны 4, 5 и, вероятно, экзон 6 гена рЛНП. Определение природы наследственного дефекта позволяет осуществить раннюю диагностику СГ у детей больной. Обсуждается значение межиндивидуальных различий в развитии СГ.

Введение. СГ — наследственное заболевание человека, обусловленное нарушениями функций рецептора ЛНП вследствие различных мутаций в его гене. Гетерозиготная форма СГ в большинстве изученных

© М. Ю. МАНДЕЛЬШТАМ, Б. М. ЛИПОВЕЦКИЙ, А. Л. ШВАРЦМАН, В. С. ГАЙЦХОКИ, 1991