

Н. М. Гусак, Н. Г. Горovenko, Н. Л. Хоменко, Т. И. Бужиевская

## МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К УПРОЩЕНИЮ И УСКОРЕНИЮ ПРОЦЕДУРЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИИ $\Delta F508$ В ГЕНЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА МУКОВИСЦИДОЗА

*В работе предложено использовать двухэтапную процедуру (прямую амплификацию ДНК из пятен крови в сочетании с идентификацией мутации модифицированным методом диагностических гетеродуплексов) выявления наиболее распространенной среди населения Украины мутации в гене трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза — делеции F508. Обсуждаются преимущества данного подхода молекулярной диагностики муковисцидоза при осуществлении скрининга различных контингентов населения на муковисцидоз.*

*Методология апробирована при обследовании 21 семьи с высоким риском муковисцидоза.*

Муковисцидоз (МВ) — наиболее распространенное моногенное наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, частота которого составляет 1 : (2000—2500) новорожденных белой расы [1]. Ген МВ был картирован на хромосоме 7 [2], и нуклеотидная последовательность его расшифрована в 1989 г. [3]. Причиной заболевания являются мутации гена МВ, приводящие к различным нарушениям в синтезе его продукта — трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза (ТРБМ). В настоящее время известно более 200 мутаций гена ТРБМ [4]. Наиболее распространенная среди них — делеция тринуклеотида в 10-м экзоне гена, названная  $\Delta F508$ . Частота этой мутации варьирует в разных популяциях. По результатам пилотного скрининга [5], частота встречаемости мутации у больных МВ в Украине составляет 55 %.

Другие виды мутаций, выявленные в Украине у больных МВ, в сумме представляют величину не более 1 % [6]. Исходя из этого, первым шагом при скрининге различных контингентов населения (семьи с высоким риском МВ, новорожденные и др.) на наличие мутаций в гене ТРБМ является тестирование мутации  $\Delta F508$ .

Используемая до настоящего времени процедура выявления данной мутации в исследуемой ДНК обычно включает три этапа: 1) экстракция ДНК из лейкоцитов или других ядерных клеток [7]; 2) амплификация участка ДНК, в котором локализована мутация; 3) идентификация мутации в продукте амплификации. Для решения последней задачи наиболее широко применяются два методологических подхода: 1) аллельспецифическая гибридизация с мечеными ДНК-зондами амплификата соответствующего участка ДНК обследуемого [8]; 2) определение размера амплификата соответствующего участка ДНК методом электрофореза в 10—12 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) [9]. Показана высокая информативность обоих методических подходов. Однако широкое внедрение этих методик в практику здравоохранения для лабораторной диагностики МВ сопряжено с рядом трудностей. Так, чувствительный и быстрый метод аллельспецифической гибридизации требует значительных затрат на приобретение меченых ДНК-зондов, мембран и других реагентов. Более же дешевый метод определения размера амплификата участка ДНК, содержащего делецию, по электрофо-

© Н. М. ГУСАК, Н. Г. ГОРОВЕНКО, Н. Л. ХОМЕНКО, Т. И. БУЖИЕВСКАЯ, 1994

ретической подвижности в ПААГ достаточно продолжителен по времени и малорентабелен для массовых анализов. Кроме того, значительно ограничивает возможности широкого использования процедуры идентификации  $\Delta F508$  довольно трудоемкий с существенными затратами энергии этап экстракции ДНК из клеток.

В связи с этим нам представляется более приемлемой для практического использования двухэтапная процедура, включающая: 1) прямую амплификацию (без предварительной микроэкстракции) ДНК из пятен крови и 2) идентификацию мутации в амплификате с помощью модифицированного метода гетеродуплексов.

Метод прямой амплификации ДНК из пятен крови был предложен Шварцем с соавт. [10] для идентификации мутаций в гене фенилаланин-гидроксилазы. Мы использовали эту методику, несколько модифицировав и адаптировав ее для гена ТРБМ. Для этого из пятна крови (высушенного на карточке Гатри или на бумаге Whatman 3M) выбивали диск диаметром 2 мм, помещали в микропробирку для термоциклера и заливали 100 мкл метилового спирта. Микропробирку интенсивно встряхивали и оставляли на 15 мин для фиксации. После этого спирт удаляли и диск тщательно высушивали на воздухе. Затем в пробирку добавляли 100 мкл смеси для амплификации и проводили полимеразную цепную реакцию в автоматическом режиме на термоциклере Perkin-Elmer Thermal Cycler. Амплифицировали 10-й экзон гена ТРБМ, используя в качестве праймеров олигонуклеотиды, гомологичные последовательностям, фланкирующим 10-й экзон: 10i5 и 10i3 [11]. Реакцию проводили в буфере для амплификации (10 мМ трис-HCl, pH 8,3, 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 %-й желатин), содержащем 200 мкмоль каждого дезокси-нуклеотидтрифосфата, 100 пмоль каждого олигонуклеотидного праймера (праймеры любезно предоставлены д-р Карсон из Лаборатории клинической химии Центра здоровья, Виннипег, Канада), 2,5 единицы активности термостабильной ДНК-полимеразы (фирма «Perkin-Elmer Cetus»). Режим амплификации: нагревание при 94 °C — 6 мин, затем 30 циклов: 94 °C — 30 с; 55 °C — 30 с; 72 °C — 1 мин и пролонгированный синтез 72 °C — 7 мин.

Продукты амплификации анализируют для выявления мутации  $\Delta F508$  с помощью модифицированного метода диагностических гетеродуплексов.

Методика основана на использовании открытого ранее [9, 12, 13] явления формирования в ходе полимеразной цепной реакции гетеродуплекса между продуктами амплификации гомологичных, но отличающихся по длине на 1—4 нуклеотида участков ДНК. Такой гетеродуплекс имеет отличную от гомодуплекса (идентичные последовательности) конформацию и благодаря этому заметно менее подвижен при электрофорезе в ПААГ. Причем это различие тем значительнее, чем больше размер амплифицированного участка (этим фактором мы руководствовались при выборе участка амплификации — 10-й экзон). В работе [9] этот феномен использовали для обнаружения гетерозиготных носителей мутации  $\Delta F508$ . Хэндисайд и др. [14] показали возможность индуцирования образования гетеродуплексов при смешивании анализируемого амплификата с ранее амплифицированной ДНК (заведомо известной гомозиготой по нормальному или мутантному аллелю). Мы применили данную методологию для выявления как гетерозиготных носителей ( $\Delta F508/N$ , где N — аллель, не несущий данной делеции), так и обоих типов гомозигот ( $N/N$  и  $\Delta F508/\Delta F508$ ).

С этой целью продукт амплификации каждого исследуемого образца ДНК (15 мкл) смешивали с 5 мкл амплификата (полученного в тех же условиях) контрольной ДНК — гомозиготы по нормальному аллелю ( $N/N$ ) — и с 5 мкл амплификата контрольной ДНК — гомозиготы по делеции ( $\Delta F508/\Delta F508$ ). Смеси прогревали 5 мин при 95 °C и 5 мин при 65 °C, осуществляя таким образом процедуру денатурации — ренатурации смеси молекул ДНК. Анализировали смеси электрофорезом

в 10 %-м ПААГ (использовали пластинки минигеля, ТВЕ буфер, 200 В, 45 мин), окрашивали электрофореграммы 5 %-м раствором бромистого этидия.

Как видно из рис. 1, амплификаты ДНК индивидуумов, которые являются гетерозиготными носителями делеции, формируют гетеродуплекс и с контрольной ДНК N/N, и с контрольной ДНК  $\Delta F508/\Delta F508$  (дорожки 2 и 3 соответственно). Амплификаты ДНК индивидуумов, являющихся гомозиготами по нормальному аллелю, образуют гетеродуплекс только с контрольной ДНК  $\Delta F508/\Delta F508$  (дорожка 5). Ам-

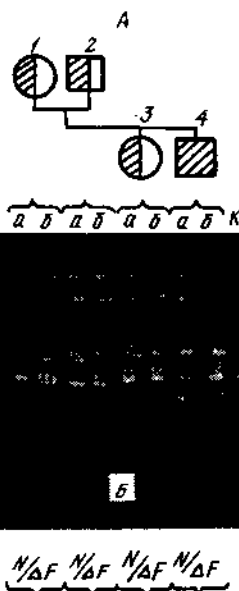
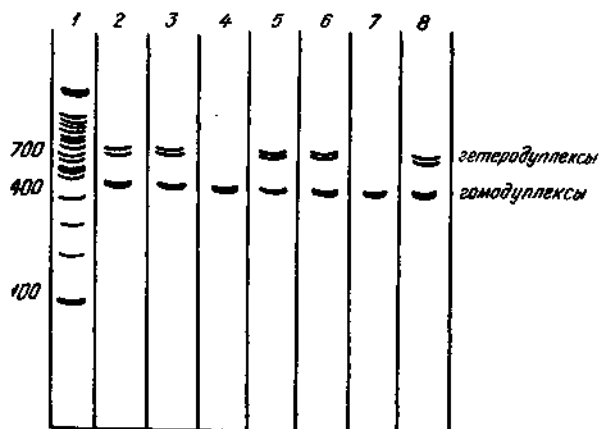


Рис. 1. Схема разделения в ПААГ гетеродуплексов, формирующихся в процессе денатурации—ренатурации смеси амплификатов тестируемой и контрольной ДНК: 1 — маркер молекулярной массы; 2, 3 — смесь амплификата ДНК гетерозиготного носителя мутации  $\Delta F508$  с контрольными ДНК N/N и  $\Delta F508/\Delta F508$  соответственно; 4, 5 — смесь амплификата ДНК нормального индивидуума с контрольными ДНК N/N и  $\Delta F508/\Delta F508$  соответственно; 6, 7 — смесь амплификата ДНК гомозиготного по делеции индивидуума с контрольными ДНК N/N и  $\Delta F508/\Delta F508$  соответственно; 8 — смесь амплификатов контрольной ДНК N/N и контрольной ДНК  $\Delta F508/\Delta F508$ . N/N — гомозигота по нормальному аллелю;  $\Delta F508/\Delta F508$  — гомозигота по мутантному аллелю

Рис. 2. Идентификация распределения мутации  $\Delta F508$  в одной из семей с высоким риском муковисцидоза: А — родословная обследованной семьи; Б — электрофореграммы амплификатов ДНК соответствующих (1, 2, 3, 4) членов семьи (а — исследуемая ДНК+контрольная ДНК N/N; б — исследуемая ДНК+контрольная ДНК  $\Delta F508/\Delta F508$ ; к — контрольная ДНК N/N+контрольная ДНК  $\Delta F508/\Delta F508$ ). N/N — гомозигота по нормальному аллелю; N/ $\Delta F508$  — носитель мутации;  $\Delta F508/\Delta F508$  — гомозигота по мутантному аллелю

плификат ДНК индивидуумов, гомозиготных по аллелю, несущему делецию, формируют гетеродуплекс только с контрольной ДНК N/N (дорожка б). Нормальный и мутантный гомодуплексы плохо разделяются в этих условиях, так как размеры амплификатов равны 491 и 488 п. о. соответственно. Гетеродуплекс же мигрирует в районе полос 700—800 п. о. и четко отделяется от гомодуплексов. Это определяет простую и эффективную идентификацию данной мутации в ДНК пациентов. Единственное затруднение, которое может возникнуть при интерпретации результатов, обусловлено обнаружением в 10-м экзоне гена ТРБМ иных, нежели  $\Delta F508$ , мутаций [15]. Таковыми могут быть, например, мутации  $\Delta 1507$  и  $1677delTA$ . Однако, во-первых, эти типы мутаций встречаются в различных популяциях в единичных случаях и, во-вторых, электрофоретическая подвижность гетеродуплексов типа  $\Delta 1507/\Delta F508$  и  $1677delTA/\Delta F508$  будет отличной от таковой гетеродуплекса  $\Delta F508/N$  [5, 15]. Тем не менее, необходимым условием проведения электрофоретического анализа гетеродуплексов является наличие внутреннего контроля (рис. 1, дорожка 8).

Используя вышеизложенную методологию, мы провели обследование 21 семьи (132 хромосомы) с высоким риском МВ и идентифицировали делецию  $\Delta F508$  в 37 хромосомах. Это позволило дать характеристику генотипа больных МВ, выявить носителей  $\Delta F508$  среди родителей и sibсов (рис. 2), что послужило основой для стратегии дальнейших лечебно-профилактических мероприятий в семьях, включая пренатальную диагностику.

Применение двухэтапной процедуры выявления мутации  $\Delta F508$  в анализируемой ДНК дает возможность исследовать несколько образцов одновременно, значительно сократить время анализа (вся процедура занимает не более 6 ч) и удешевить процесс, исключив этап экстракции ДНК из клеток. Все перечисленное, а также однозначность интерпретации данных, отсутствие ложноположительных и ложноотрицательных результатов делают предлагаемый подход более перспективным для обследования различных контингентов населения и, в первую очередь, для осуществления скрининговых программ.

Выражаем благодарность доктору Ненси Карсон (Лаборатория клинической химии, Центр здоровья, Виннипег, Канада) за любезно предоставленные олигонуклеотидные праймеры, за внимание и помощь в данной работе.

Работа выполнена при поддержке Канадско-Украинского проекта «Чернобыльские дети», финансируется Министерством здравоохранения Украины (ОК.91.276).

*Н. М. Гусак, Н. Г. Горовенко, Н. Л. Хоменко, Т. І. Бужієвська*

#### МЕТОДОЛОГІЧНІ ПІДХОДИ ДО СПРОЩЕННЯ ТА ПРИШВИДШЕННЯ ПРОЦЕДУРИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МУТАЦІЇ $\Delta F508$ У ГЕНІ ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕГУЛЯТОРНОГО БІЛКА МУКОВІСЦИДОЗА

##### Резюме

В роботі запропоновано використання двоетапної процедури (пряму ампліфікацію ДНК з плям крові у сукултності з ідентифікацією мутації за допомогою модифікованого методу діагностичних гетеродуплексів) для виявлення найпоширенішої серед населення України мутації в гені трансмембранного регуляторного білка муковісцидоза — делеції  $F508$ . Обговорюються переваги запропонованого підходу молекулярної діагностики для здійснення скринінгу різних контингентів населення на муковісцидоз.

*N. M. Gusak, N. G. Gorovenko, N. L. Homenko, T. I. Buzhievskaya*

#### A METHODOLOGICAL APPROACH ALLOWING A FASTER AND EASIER PROCEDURE FOR IDENTIFICATION OF $\Delta F508$ IN CFTR GENE

##### Summary

The procedure consisted of two steps (direct amplification of DNA from dried blood spots and identification of mutation with the modified method of diagnostic heteroduplexes) was proposed to test the most common mutation in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene ( $\Delta F508$ ). The advantages of this approach for screening of different population groups are discussed. The procedure was used to examine 21 families with positive history of CF.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Harris A., Cuper M. Cystic fibrosis. The fact.—Oxford: Univ. press, 1987.—133 p.
2. Rommens J. M., Iannuzzi M. C., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping // Science.—1989.—245, N 4922.—P. 1059—1065.
3. Riordan J. P., Rommens J. M., Kerem B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of the complementary DNA // Ibid.—P. 1066—1073.
4. Cystic fibrosis // Eds J. A. Dodge, D. J. H. Brock et al.—Chichester: John Wiley and sons, 1993.—Vol. 2.—358 p.

5. Кравченко С. А., Лившиц Л. А. Анализ мутаций в 7, 10, 11-м экзонах и полиморфизм четырех нуклеотидных tandemных повторов 3'-конца 6-го интрона гена ТРБМ в семьях с высоким риском муковисцидоза из Украины // Цитология и генетика.—1993.—27, № 4.— С. 72—77.
6. Baranov V. S. Molecular diagnosis of some common genetic diseases in Russia and the former USSR present and future // J. Med. Genet.—1993.—30.— P. 141—146.
7. Wenham P. R. DNA-based techniques in clinical biochemistry: a beginners guide to theory and practice // Annu. Clin. Biochem.—1992.—29.— P. 598—629.
8. Kerem B., Zilenski J., Markiewicz D. et al. Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide ATP-binding folds of the cystic fibrosis gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87.— P. 8447—8451.
9. Rommens J., Kerem B., Greer W. et al. Rapid nonradioactive detection of the major cystic fibrosis mutation // Amer. J. Hum. Genet.—1990.—46.— P. 395—396.
10. Schwartz E. I., Khalchitsky S. E., Eisensmith R. C., Woo S. L. Polymerase chain reaction of amplification from dried blood spots on Guthrie cards // Lancet.—1990.— N 1.— P. 15—17.
11. Zelensky J., Rozmahel R., Bozon D., Kerem B. et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene // Genomics.—1991.—10.— P. 214—228.
12. Nagamine C. M., Chan K., Lou Y. A PCR artifact generation of heteroduplexes // Amer. J. Hum. Genet.—1989.—45.— P. 337—339.
13. Triggs-Raine B., Gravel R. Diagnostic heteroduplexes: simple detection of a 4-bp insertion mutation in Tay-Sachs disease // Ibid.—1990.—46.— P. 183—184.
14. Handyside A. H., Lesko J. G., Tarin J. J. et al. Birth of a normal girl after *in vitro* fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis // New Engl. J. Med.—1992.—327, N 13.— P. 905—909.
15. Cuppens H., Loumi O., Marynen P., Cassiman J. Identification of a new frameshift mutation and a duplication polymorphism in CFTR gene in Algerian population // Human Mol. Genet.—1992.—1, N 4.— P. 141—146.

Киев, ин-т усовершенствования врачей МЗ Украины

Получено 14.01.94