

В. Г. Горбулев, Б. К. Чернов, П. М. Рубцов

КЛОНИРОВАНИЕ кДНК, КОДИРУЮЩЕЙ Фолликулостимулирующий Гормон Крупного Рогатого Скота

Получена библиотека кДНК гипофиза крупного рогатого скота в λ gt10, в которой идентифицированы клоны, содержащие кДНК для полноразмерной α -субъединицы гликопротеидных гормонов. Показано, что в двух клонках вслед за 3'-концевым нуклеотидом мРНК расположена длинная (около 300 п. н.) последовательность, которая различна в этих клонках. Из обогащенной библиотеки кДНК гипофиза быка в рUC19 выделены клоны, которые несут кДНК, кодирующую полноразмерную β -субъединицу фолликулостимулирующего гормона.

Введение. Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) принадлежит к семейству гликопротеидных гормонов. Это семейство включает в себя наряду с ФСГ еще два гормона, продуцируемых (как и ФСГ) передней долей гипофиза, — лютеотропный (ЛГ) и тиреотропный (ТСГ) гормоны, а также хорионический гонадотропин (ХГ), синтезируемый в плаценте. Все белки данного семейства представляют собой гетеродимеры, состоящие из нековалентно связанных между собой α - и β -субъединиц, причем α -субъединица у всех гликопротеидных гормонов одного вида одинаковая, а β -субъединицы — разные. Именно β -субъединица и определяет биологическую специфичность того или иного гормона [1].

ФСГ повышает восприимчивость гонад к действию ЛГ, увеличивает продукцию стероидных гормонов в гонадах, стимулирует сперматогенез и активность сертолиевых клеток. ФСГ — основной гормон, отвечающий за репродуктивность [2]. Очищенный ФСГ используется для созревания фолликулов при проведении опытов по оплодотворению *in vitro* и при лечении ряда женских болезней [3]. Однако препараты гормона, полученные из мочи, гетерогенны по своей углеводной части. Поскольку такие структурные изоформы обладают различной биологической активностью, это вызывает нежелательные осложнения при лечении и затрудняет интерпретацию получаемых результатов. Получение генноинженерного ФСГ в эукариотических клетках позволяет преодолеть подобные проблемы и расширяет возможности применения ФСГ в терапевтических целях.

В связи с этим была предпринята настоящая работа, в задачу которой входило клонирование кДНК ФСГ крупного рогатого скота для последующей экспрессии этих кДНК в клетках млекопитающих.

Материалы и методы. Поли(А)-содержащую мРНК выделяли из свежесзамороженного гипофиза по уже описанной нами методике [4]. Синтез кДНК осуществляли с использованием набора «cDNA synthesis system» фирмы «Amersham» (Англия) по прописи, рекомендованной производителем. Библиотеку кДНК в бактериофаге λ gt10 получали при помощи набора «cDNA cloning system λ gt10» фирмы «Amersham» в соответствии с рекомендациями фирмы. Скрининг библиотеки проводили гибридизацией с 32 P-меченными дезоксиолигонуклеотидными зондами: зонд А — СТССААГССАГАТГСТСС, зонд Б — GGTGATGTTGGTCAGCTC. Фильтры Hybond-N («Amersham») гибридизовали в растворе, содержащем $6\times$ SSC, $5\times$ раствора Денхардта, 1% DS-Na и 20 мкг/мл денатурированной ДНК-носителя. Температура гибридизации и отмывки — 53°C для зонда А и 51°C для зонда Б. Отмывку проводили в $6\times$ SSC, содержащем 0,1% DS-Na.

ДНК из рекомбинантных фагов выделяли по методу Забаровского и Туринной [5], обрабатывали рестриктазой *EcoRI* и выплещенный

фрагмент кДНК переклонировали в *pUC19* либо в *EcoRI*-сайт, либо (после соответствующего затупления концов) в *SmaI*-сайт.

Секвенирование кДНК осуществляли по методу Сенгера [6] в модификации Хаттори и Сакаки [7]. В работе использованы рестриктазы и другие ферменты фирмы «Amersham». Все манипуляции с ними проводили согласно Маниатису и др. [8].

Результаты и обсуждение. Полученная в результате клонирования библиотека кДНК гипофиза крупного рогатого скота в λ gt10 содержала около 300 000 БОЕ. Анализ библиотеки на присутствие кДНК, ко-

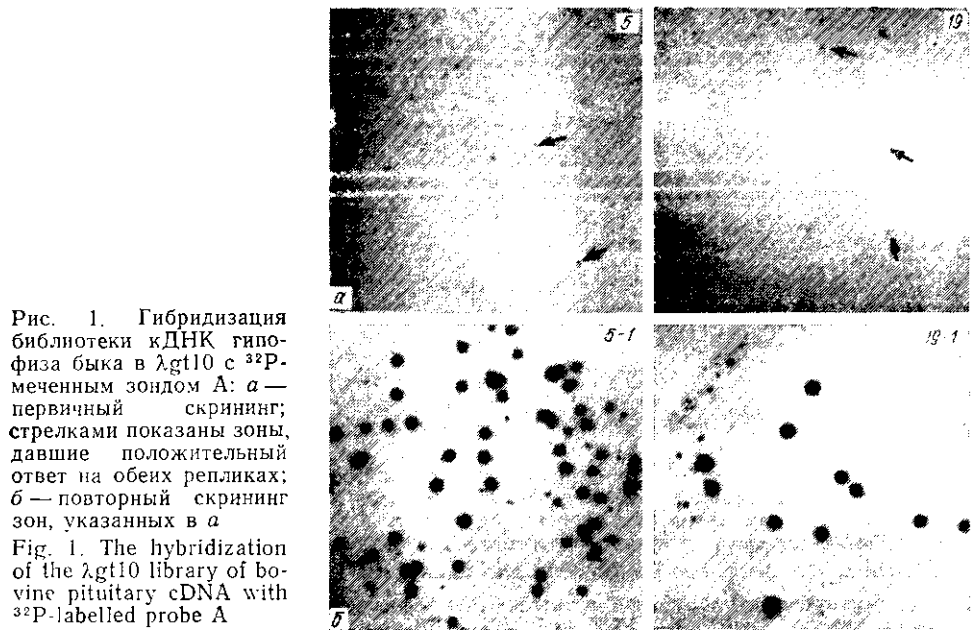


Рис. 1. Гибридизация библиотеки кДНК гипофиза быка в λ gt10 с ^{32}P -меченным зондом А: а — первичный скрининг; стрелками показаны зоны, давшие положительный ответ на обеих репликах; б — повторный скрининг зон, указанных в а
Fig. 1. The hybridization of the λ gt10 library of bovine pituitary cDNA with ^{32}P -labelled probe А

дирующей α -субъединицу гликопротеидных гормонов, проводили с помощью 18-членного олигонуклеотидного зонда А, соответствующего кодам для аминокислот 23—28 зрелого белка. Скрининг 25 000 БОЕ (с использованием двойных реплик) выявил 18 зон, дающих положительный гибридизационный сигнал (рис. 1, а). Эти зоны были изолированы и рассеяны для повторного скрининга. При повторной гибридации все они дали множественные положительные ответы (рис. 1, б), совпадающие с индивидуальными бляшками.

Для дальнейшей работы были выбраны два рекомбинантных фага $\lambda\alpha 03$ и $\lambda\alpha 21$. При совместном расщеплении фага λ gt10 рестриктазами *BglIII* и *HindIII* образуется несколько фрагментов, в том числе и фрагмент размером 1,14 тыс. п. н., содержащий *EcoRI*-сайт, по которому происходит клонирование кДНК. В ДНК рекомбинантных фагов этот фрагмент в зависимости от размера вставки изменяет подвижность в агарозе. В ДНК фагов $\lambda\alpha 03$ и $\lambda\alpha 21$ он имеет длину около 2 200 п. н. (рис. 2), т. е. вставка в этих фагах составляет примерно 1 000 п. н.

Однако при гидролизе рестриктазой *EcoRI* выявляются различия этих двух ДНК: в $\lambda\alpha 21$ действительно выщепляется фрагмент около 1 000 п. н. (рис. 2 и 3), тогда как в $\lambda\alpha 03$ вставка расщепляется на два фрагмента — около 750 и 300 п. н. (рис. 3).

Вставка $\lambda\alpha 21$ и оба *EcoRI*-фрагмента $\lambda\alpha 03$ были переклонированы в *pUC19* и секвенированы. Анализ нуклеотидной последовательности вставки клона $\lambda\alpha 03$ показал, что эта кДНК действительно кодирует α -субъединицу гликопротеидных гормонов (рис. 4). Сравнение полученной первичной структуры с опубликованной ранее [9] свидетельствует о том, что сразу за 3'-концевым нуклеотидом кДНК α -субъеди-

ницы расположен *EcoRI*-сайт и далее следует протяженная последовательность, заканчивающаяся 18 остатками А.

Поскольку в работе по клонированию кДНК α -субъединицы быка [9] авторам не удалось получить клоны, содержащие полную последовательность 3'-нетранслируемой области мРНК, то 3'-конец мРНК был определен Гудвином и соавт. [10] по аналогии с геном α -субъединицы человека [11]. Можно было бы предположить, что на

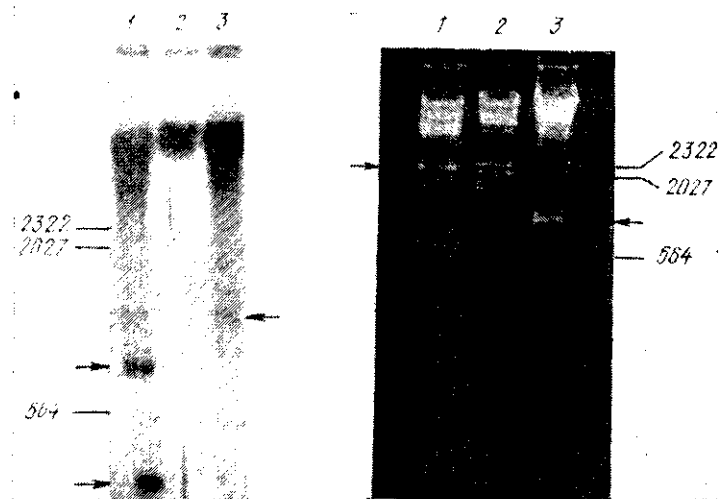


Рис. 2. Электрофорез в 1 %-ной агарозе рестрикционных фрагментов ДНК: 1 — ДНК $\lambda\alpha 21$, расщепленная совместным действием *BglII* и *HindIII*; 2 — ДНК фага λ , расщепленная *HindIII* (справа указаны размеры фрагментов в п. н.), 3 — ДНК $\lambda\alpha 21$, расщепленная *EcoRI*. Стрелками показаны фрагменты, несущие вставку кДНК

Fig. 2. The electrophoresis of DNA restriction fragments on 1 % agarose gel

Рис. 3. Электрофорез в 1 %-ной агарозе ^{32}P -меченных фрагментов ДНК, полученных после рестрикции *EcoRI*: 1 — ДНК $\lambda\alpha 03$; 2 — ДНК $\lambda gt10$; 3 — ДНК $\lambda\alpha 21$. Стрелками показаны фрагменты кДНК. Слева указано положение и размер в п. н. маркеров (ДНК фага λ , расщепленная *HindIII*)

Fig. 3. The agarose electrophoresis of ^{32}P -labelled DNA fragments after the digestion with *EcoRI*

самом деле 3'-нетранслируемая область мРНК α -субъединицы гликопротеидных гормонов у быка существенно длиннее, чем у человека. Однако такому простому объяснению препятствуют два обстоятельства. Во-первых, в нуклеотидной последовательности гена α -субъединицы быка [10] после предполагаемого 3'-конца мРНК секвенированы еще 11 нуклеотидов до ближайшего *EcoRI*-сайта. Эти нуклеотиды в кДНК $\lambda\alpha 03$ отсутствуют. Во-вторых, мы провели частичное секвенирование вставки из клона $\lambda\alpha 21$. Эта кДНК также кодирует α -субъединицу гликопротеидных гормонов, но 5'-конец ее расположен в кодоне для —16 аминокислоты белка-предшественника, а 3'-конец вставки имеет структуру, показанную на рис. 5 и не имеющую ничего общего с 3'-концевой последовательностью кДНК $\lambda\alpha 03$. Самое удивительное состоит в том, что при секвенировании от *Sau3A*-сайта, расположенного в 3'-нетранслируемой области кДНК, внутри вставки обнаружен поли(А)-треск из 11 остатков, следующий в точности за тем нуклеотидом, который был обозначен как 3'-концевой в работе [10].

Таким образом, противоречие между литературными данными о 3'-конце мРНК α -субъединицы и нашими результатами секвенирования кДНК $\lambda\alpha 03$ и $\lambda\alpha 21$ сохраняется. Мы надеемся внести какую-то ясность в этот вопрос, осуществив анализ других рекомбинантных фагов, имеющих в нашем распоряжении.

Как бы то ни было, мы располагаем кДНК, кодирующей полно-размерный предшественник α -субъединицы, что является необходимой

предпосылкой для дальнейших экспериментов по экспрессии этого белка.

Следующей задачей явилось клонирование кДНК β -субъединицы ФСГ (β ФСГ) крупного рогатого скота. Приступая к этой работе, мы

```

1   A AAT CAC AAG ACA AAA CTA AAA TTC TTC TTC ACA TCC ACA CTC AAC
1   Met Asp
47  TCC CCT GAC TAC ATT CTG CAA AAA TCC AGA GGA CGA AGA GCC ATC CAT
3   Tyr Tyr Arg Lys Tyr Ala Ala Val Ile Leu Ala Ile Leu Ser Leu Phe
95  TAC TAC ACA AAA TAT GCA GCT GTC ATT CTG GCC ATT TTG TCT CTG TTT
19  Leu Gln Ile Leu His Ser Phe Pro Asp Gly Glu Phe Thr Met Gln Gly
143 CTG CAA ATT CTC CAT TCC TTT CCT GAT CGA GAG TTT ACA ATG CAG GCC
35  Cys Pro Glu Cys Lys Leu Lys Glu Asn Lys Tyr Phe Ser Lys Pro Asp
191 TGT CCT GAA TCC AAG CTA AAA GAA AAC AAA TAC TTC TCC AAG CCA GAT
51  Ala Pro Ile Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro
239 GCT CCA ATC TAT CAG TGC ATG GGG TGC TGC TTC TCC AGG GCA TAC CCC
67  Thr Pro Ala Arg Ser Lys Lys Thr Met Leu Val Pro Lys Asn Ile Thr
287 ACT CCA GCG ACG TCT AAG AAG ACA ATG TTG GTC CCC AAG AAC ATC ACC
83  Ser Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys Ala Phe Thr Lys Ala Thr Val
335 TCG GAA GCT ACA TCC TGT GTC GCC AAA GCA TTT ACC AAC GCC ACA GTG
99  Met Gly Asn Val Arg Val Glu Asn His Thr Glu Cys His Cys Ser Thr
383 ATG GGA AAT GTC AGA GTC CAG AAC CAC ACC CAG TCC CAC TGC ACC ACT
115 Cys Tyr Tyr His Lys Ser ***
431 TCT TAT TAT CAC AAA TCC TAA TAG TTT GCA GTG GCC CTT GCT CAT GAT
479 GCG TGA CTT GCT CAA AAG GAA AAT TAA TTT GTC CAG TGT CTA TGG CTT
527 TGT GAG ATA AAA CCC TCC TTT TCC TTG CCA TAC CAT TTT TAA CCT GCT
575 TTG ACA ATA TAC TGC AGC TTT ATT GCT TTT CTC CTT ATC CTA CAA TAT
623 AAT CAG TAG TCT TCA TCT TTT CAT TTG GAA TCA AAT ATG GCA TTT AGC
671 ATG ACC ATA AAA AGC TGA TTC CAC TGG AAA TAA AGT CTT TTA AAT CAT
719 CCG AAT TCC GGT ACT CTA TAA GAG GTC TGG GTG TTT ATT TGG TCG CGC
767 TGC AAG CAA GTC CTA ACG CAG CAT CAT CAG TAT ACA CGG AAG GTT TTT
815 AGG AAG TAT CGG AAA AAA AAT GTT GTA TTG GCT ATG ATG GTG GCA TGC
863 TAT AGT CAA GCT GCC TTT TCT GAC GTC CTA TCT TTC AGT CTT AAG TGA
911 TTT TTA AAA ATA ATA ACC TGT TTT TCT CAC TAG CTT AAA GAT GGA TTT
959 GAA AAT GGT TTT GCA TGC AAT TAG ATT ATG CTA TTT GGA CAA TAA ACT
1007 CAC CTT GAC CTA AAA AAA AAA AAA AAA AA

```

Рис. 4. Первичная структура кДНК α -субъединицы гликопротеидных гормонов крупного рогатого скота из клона $\lambda\alpha 03$. Над нуклеотидной последовательностью приведена последовательность аминокислот. Стрелкой отмечен 3'-концевой нуклеотид мРНК согласно работе [10]. Внутренний *EcoRI*-сайт подчеркнут

Fig. 4. The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA for α -subunit of bovine glycoprotein hormones from the clone $\lambda\alpha 03$

```

5'..TGCGAAGCCC CGGGCCCCCG CGATCAGGCC GAGACGGGTC CGCGCGAGGA CAAGCGTTCT
TACTCCATGG AACACTTCCG CTGGCCAAGC CGGTGGGCAA GAACGGCGCC CGGTCAAGTG
TACCCCAACG CGCGCGAGGA CGAGNNNNNN..3'

```

Рис. 5. Нуклеотидная последовательность 3'-концевой части вставки $\lambda\alpha 21$. Несколько самых крайних нуклеотидов с 3'-конца не определены (обозначены N)

Fig. 5. The nucleotide sequence of 3'-part of the $\lambda\alpha 21$ insert. A few extreme 3' terminal nucleotides were not identified (marked as N)

учитывали, что содержание мРНК для β -субъединиц значительно меньше, чем для α -субъединицы [12], и, кроме того, мРНК ФСГ быка обладает исключительно длинной 3'-нетранслируемой областью (почти 1300 п. н.) [13]. Поэтому мы предпочли не проводить скрининга большого числа рекомбинантных фагов в полной библиотеке кДНК, а получить библиотеку, обогащенную последовательностями кДНК β ФСГ. С этой целью тотальная кДНК была гидролизована рестрик-

```

1
1   TC ACC ATC TAC AGT TAT CAA GTG CCC AGG ATG AAG TCT GTC CAG TTC
      Met Lys Ser Val Gln Phe

7   Cys Phe Leu Phe Cys Cys Trp Arg Ala Ile Cys Cys Arg Ser Cys Glu
48  TGT TTC CTT TTC TGT TCC TGG AGA GCA ATC TGC TGC AGA ACC TGC CAG

23  Leu Thr Asn Ile Thr Ile Thr Val Glu Lys Glu Glu Cys Gly Phe Cys
96  CTG ACC AAC ATC ACC ATC ACG GTG CAG AAA CAG GAA TGT GGC TTC TGC

39  Ile Ser Ile Asn Thr Thr Trp Cys Ala Gly Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp
144 ATA ACC ATC AAC ACC ACG TCG TGT GCA GGC TAC TGC TAC ACC GGC GAC

55  Leu Val Tyr Arg Asp Pro Ala Arg Pro Asn Ile Gln Lys Thr Cys Thr
192 TTC GTG TAC AGG GAC CCA GCA AGG CCC AAT ATC CAG AAA ACG TGT ACC

71  Phe Lys Glu Leu Val Tyr Glu Thr Val Lys Val Pro Gly Cys Ala His
240 TTC AAG GAG CTG GTC TAC CAG ACG GTG AAA GTG CCT GGC TGT CCT CAC

87  His Ala Asp Ser Leu Tyr Thr Tyr Pro Val Ala Thr Glu Cys His Cys
288 CAT GCA CAC TCC CTG TAC ACC TAC CGA GTA GCC ACT GAA TGT CAC TGC

103 Ser Lys Cys Asp Ser Asp Ser Thr Asp Cys Thr Val Arg Gly Leu Gly
336 AGC AAG TCC GAC ACC GAC ACC ACT GAC TGC ACC CTG CGA GCC CTG GGG

119 Pro Ser Tyr Cys Ser Phe Arg Glu Ile Lys Glu ***
384 CCC ACC TAC TCC TCC TTC ACC GAA ATC AAA CAA TAA AGA GCA GCC GAT

432 GCT TTG ACC TGC CTA CCC TTA TCC TAA AGC ACG AAA ACA TCC AAG ATG

450 TCT CTC TGT ACA TGT GCC TAG GCT GCA GAC CAC CAC GGG AGA CCC TAC

528 TGA TCT CTG CTC TCC TGA

```

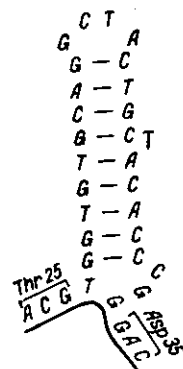


Рис. 6. Нуклеотидная последовательность кДНК β -субъединицы ФСГ крупного рогатого скота из клона рF221. Над нуклеотидной последовательностью приведена последовательность аминокислот

Fig. 6. The nucleotide and deduced amino acid sequences of cDNA for β -subunit of bovine FSH

Рис. 7. Самокомплементарный участок в мРНК, кодирующей β -субъединицу ФСГ крупного рогатого скота

Fig. 7. The self-complementary region of mRNA for β -subunit of bovine FSH

тазой *DdeI*: сайты для этой рестриктазы находятся в 5'- и 3'-нетранслируемых зонах и отсутствуют внутри кодирующей области кДНК β ФСГ. После электрофореза в полиакриламидном геле зона, соответствующая 500—600 п. н., была вырезана и кДНК элюирована. После частичной достройки (в присутствии ТТР) *DdeI*-концов кДНК была встроена в *pUC19*, расщепленную *BamHI* и также частично достроенную (в присутствии dGTP и dATP). Полученная в результате трансформации штамма DH1 *Escherichia coli* клонотека кДНК была скринирована при помощи олигонуклеотида Б, соответствующего противоположной цепи мРНК в области кодонов для аминокислот 3—3 зрелой β -субъединицы ФСГ быка. Были выявлены три зоны положительных сигналов, которые подтвердились и при повторном (после пересева) скрининге.

Вставка одного из клонов — рF221 — была секвенирована полностью (рис. 6). Она, как и ожидалось, представляет собой кДНК β ФСГ крупного рогатого скота и содержит область, кодирующую

предшественник β -субъединицы вместе с прилегающими 5'- и 3'-нетранслируемыми последовательностями. Единственным обнаруженным отличием от уже опубликованной первичной структуры β ФСГ быка [13] оказалась замена А на С в первом положении кодона для Arg96, не меняющая смыслового значения кодона.

Наряду с полноразмерной кДНК β ФСГ в одном из клонов найдена кДНК, несущая делецию 25 п. н., затрагивающую кодоны для аминокислот 26—34. Анализ этой области мРНК показал, что здесь возможно образование очень прочной шпильки (рис. 7), которая, видимо, и позволяет обратной транскриптазе «проскакивать» этот участок мРНК при синтезе первой цепи кДНК. Интересно отметить, что шпилька располагается на границе экзон—интрон гена β ФСГ [14].

Делеция затрагивает универсальный для β -субъединиц всех гликопротеидных гормонов пентапептид Cys-Ala-Gly-Tyr-Cys, очевидно, необходимый для выполнения ими какой-то общей функции (может быть, для взаимодействия с α -субъединицей). К сожалению, делеция сдвигает рамку считывания матрицы; однако с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза в кДНК можно ввести недостающий нуклеотид и использовать полученную кДНК для изучения вопроса о функциональной роли универсального пентапептида.

Таким образом, в результате проведенной работы получена кДНК, кодирующая обе субъединицы ФСГ крупного рогатого скота, и в настоящее время мы приступили к созданию конструкций, позволяющих экспрессировать кДНК ФСГ в эукариотических системах.

Резюме

Одержана бібліотека кДНК гіпофізу великої рогатої худоби в бактеріофазі *λgt10*, в якій ідентифіковані клони, що містять кДНК для повнорозмірної α -субодиниці глікопротеїдних гормонів. Показано, що у двох клонах за 3'-кінцевим нуклеотидом мРНК розміщена довга (біля 300 п. н.) послідовність, яка різниться у цих клонах. Із бібліотеки кДНК гіпофізу бика в плазміді *pUC19* виділені клони, що несуть кДНК, яка кодує повнорозмірну β -субодиницю фолікулоstimулюючого гормону.

Summary

The *λgt10* library of bovine pituitary cDNA was screened and the clones with cDNA encoding α subunit of glycoprotein hormones were isolated. The sequencing of the inserts from two clones revealed that they contain 3'-terminal nucleotide of mRNA followed by the prolonged (about 300 bp) but different stretch. The clones carrying the cDNA for β subunit of follicle-stimulating hormone (FSH) were isolated from the enriched plasmid library of bovine pituitary cDNA. The sequence of cDNA for β subunit of FSH was established. The sequence results proved that we have cDNAs encoding the full-length both α and β subunits of bovine FSH.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pierce J. G., Parsons T. F. Glycoprotein hormones: structure and function // Ann. Rev. Biochem.—1981.—50.—P. 465—495.
2. Chin W. W. Glycoprotein hormone genes // Molecular cloning of hormone genes / Ed. J. F. Habener.—Clifton; New Jersey: Humana press, 1987.—P. 137—172.
3. Expression of biologically active human follitropin in chinese hamster ovary cells / J. L. Keene, M. M. Matzuk, T. Otani et al. // J. Biol. Chem.—1989.—264, N 9.—P. 4769—4775.
4. Генетическая инженерия пептидных гормонов. 1. Клонирование и первичная структура кДНК гормона роста курицы / Г. С. Жвирблис, В. Г. Горбулев, П. М. Рубцов и др. // Молекуляр. биология.—1987.—21, № 6.—С. 1620—1624.
5. Zbarovskiy E. R., Turina O. V. Rapid isolation of λ phage DNA in micro- and macrovariants // Nucl. Acids Res.—1988.—16, N 22.—P. 10925.
6. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 9.—P. 5463—5467.
7. Hattory M., Sakaki Y. Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates // Anal. Biochem.—1986.—152, N 2.—P. 232—238.

8. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.
9. *Nucleotide sequence of a cDNA for the common α subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones / J. H. Nilson, A. R. Thomason, M. T. Cserbak et al. // J. Biol. Chem.— 1983.— 258, N 8.— P. 4679—4682.*
10. *Characterization and nucleotide sequence of the gene for the common α subunit of the bovine pituitary glycoprotein hormones / R. G. Goodwin, C. L. Moncman, F. M. Rottman, J. H. Nilson // Nucl. Acids Res.— 1983.— 11, N 19.— P. 6873—6882.*
11. *Fiddes J. C., Goodman H. M.* The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones // *J. Mol. and Appl. Genet.*— 1981.— 1, N 1.— P. 3—18.
12. *Characterization of the precursors of α - and β -subunits of follitropin following cell-free translation of rat and ovine pituitary mRNAs / R. Counis, M. Corbani, M. Poissonnier, M. Jutisz // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1982.— 107, N 3.— P. 998—1005.*
13. *Maurer R. A., Beck A.* Isolation and nucleotide sequence analysis of a cloned cDNA encoding the β -subunit of bovine follicle-stimulating hormone // *DNA.*— 1986.— 5, N 5.— P. 363—369.
14. *Kim K., Gordon D., Maurer R. A.* Nucleotide sequence of the bovine gene for follicle-stimulating hormone β -subunit // *Ibid.*— 1988.— 7, N 4.— P. 227—233.

Ин-т молекуляр. биологии им. В. А. Энгельгардта
АН СССР, Москва

Получено 05.07.90

УДК 577.213.3

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

НЕРАВНОВЕСНОЕ СЦЕПЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ ХРОМОСОМЫ 7 ЧЕЛОВЕКА С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ МУКОВИСЦИДОЗА В УКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ

В 37 украинских семьях с риском муковисцидоза (МВ) 1:25 и среди 100 здоровых доноров проводили ДНК-анализ делеции ΔF_{508} с использованием полимеразной цепной реакции. Данную трехнуклеотидную делецию имели 65% хромосом, мутантных по гену МВ. Осуществлен анализ сцепления между тремя полиморфными маркерами (КМ-19, СS. 7, D7S8) и мутациями в гене МВ. Сильное неравновесное сцепление было обнаружено между ПДРФ-гаплотипами в системах КМ-19/PstI и СS.7/Hin6I и делецией ΔF_{508} . Более слабое, но достоверное сцепление было между теми же гаплотипами и другими мутациями в гене МВ.

Сцепление между этими маркерами и МВ-мутациями позволяет проводить точную пре- и постнатальную диагностику МВ в большинстве семей, имеющих больного ребенка, а также дает возможность выявлять носителей мутации в гене МВ в популяции.

МВ — одно из наиболее распространенных среди европейского населения моногенное наследственное заболевание с аутосомно-рецессивным характером наследования. По данным ряда зарубежных и отечественных авторов, каждый 20-й представитель белой расы может являться гетерозиготным носителем мутантного гена, ответственного за развитие данной патологии, в среднем один из 2000 новорожденных болел МВ и умирает преимущественно в раннем возрасте [1].

После локализации гена МВ на хромосоме 7 человека в районе 31q были выделены и клонированы маркерные последовательности, фланкирующие предполагаемый ген МВ и имеющие полиморфные сайты узнавания некоторыми рестрикционными эндонуклеазами [2]. Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) в локусах D7S23 (системы КМ-19/PstI, СS. 7/Hin6I) и D7S8 (D7S8/PstI) успешно используется для пренатальной диагностики МВ в семьях высокого риска [3, 4]. Однако диагностическая ценность ПДРФ ДНК в каждой конкретной популяции определяется частотой полиморфных

© Л. А. ЛИВШИЦ, С. А. КРАВЧЕНКО, В. И. ГРИШКО, Т. И. БУЖИЕВСКАЯ,
В. С. БАРАНОВ, 1991