



УДК 577.113.6

БЫСТРАЯ ДЕТЕКЦИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ПРИ ПОМОЩИ БИОТИНИЛИРОВАННЫХ СЕЛЕКТИВНО РАСЩЕПЛЯЕМЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

© 1995 г. М. С. Щепинов, В. Г. Коробко, **В. Н. Добрынин**,
Ф. А. Амосенко*, В. Н. Калинин*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;

* Институт генетики человека РАН, Москва

Поступило в редакцию 25.08.94 г.

Ключевые слова: точечные мутации, полиморфизм, цистозный фиброз, аллель-специфические праймеры, биотин, селективно расщепляемые праймеры.

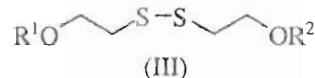
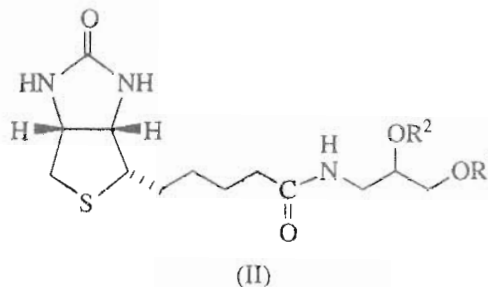
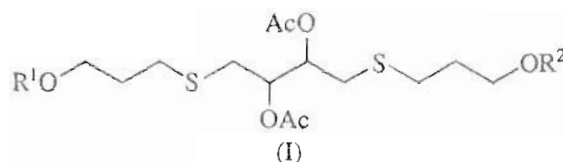
Ряд генетических заболеваний человека обусловлен заменой одного основания в ДНК. Полиморфизм М470V был идентифицирован в 10-м экзоне гена трансмембранного регуляторного белка муковисцидоза – белка, часть которого образует в мембране канал для ионов хлора. Описано несколько мутаций, приводящих к утрате этим белком своих свойств. По данным работы [1], в положении 1540 может быть либо аденозин (аллель 1), либо гуанозин (аллель 2). Замена А на G приводит к замещению Met на Val в 470-м кодоне, в результате чего возникает сайт узнавания для рестриктазы *HphI*. Показано неравновесное сцепление аллеля 1 с муковисцидозной мутацией [2], что предполагает использование полиморфного маркера М470V при молекулярно-генетических исследованиях муковисцидоза. Мы описываем здесь аллель-специфическую амплификацию с использованием стрептавидинилированного носителя (СН) и 5'-биотинилированных аллель-специфических праймеров, содержащих специальные химически расщепляемые вставки, для идентификации аллелей маркера М470V.

5'-Биотинилированные гомологичные олигонуклеотиды (IV) и (V), различающиеся 3'-нуклеотидным звеном и содержащие на 5'-концах, между остатком биотина и нуклеотидной частью, соответственно дисульфидный (для (IV)) и диольный (для (V)) размыкаемые элементы, были синтезированы с использованием биотин- (II) [3], диол- (I) [3] и дисульфидсодержащего (III) [4] фосфитамидных реагентов (схема 1) на синтезаторе ABI 380B по стандартным протоколам. Стрептавидинили-

рованный носитель получали с использованием реагента (II) как описано в работе [3]. Геномную ДНК выделяли из образцов крови гомозиготных (по аллелю 1 или 2) и гетерозиготных индивидуумов и определяли (предварительно, при помощи рестриктоного анализа) генотип как описано в сообщении [2].

Идентификация включала четыре этапа (схема 2).

1. Аллель-специфическая амплификация в присутствии [³²P]ТТР. Мы впервые применили аллель-специфическую амплификацию для идентификации аллелей маркера М470V, подобрав



R¹ = DMTr,

R² = (N,N-диизопропиламино)цианэтоксифосфинил

Схема 1.

Использованные сокращения: DMTr – 4,4'-диметокситри-тил, ДТТ – дитиотреит, М470V – замена Met на Val в 470-м кодоне.

Адрес для переписки: 117871, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Лаборатория химии генов.

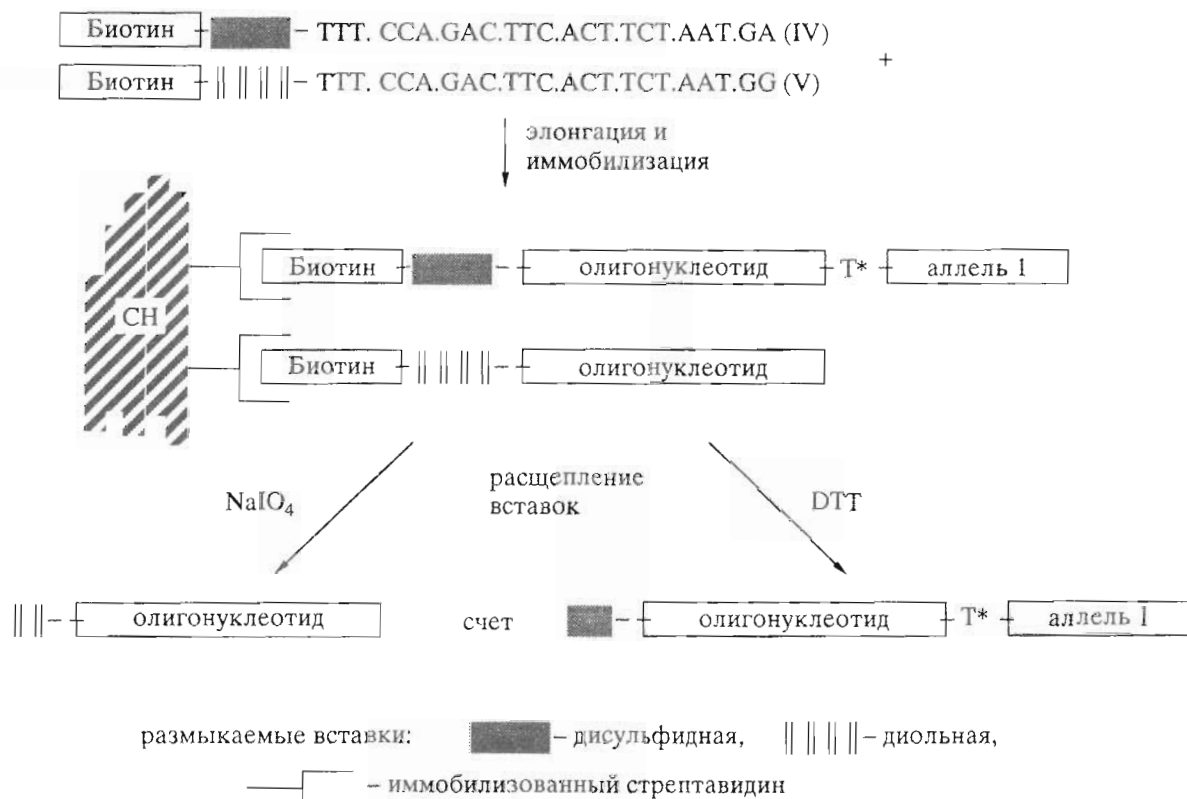


Схема 2.

для этого оптимальные условия. Критическими параметрами, определяющими специфичность олигонуклеотидных праймеров в этой реакции, являются температура отжига ($t_{от}$) праймеров и концентрация Mg^{2+} [5]. Мы установили, что при концентрации Mg^{2+} 6.7 мМ и $t_{от}$ 55 - 59°C (остальные условия стандартные) амплификация с аллель-специфическими праймерами была неспецифической, а при 72°C она отсутствовала вообще. При проведении отжига праймеров при 62°C была получена 100%-ная специфичность для праймера (IV) и 50%-ная для праймера (V). Снизив концентрацию Mg^{2+} вдвое ($t_{от}$ 62°C), мы получили аллель-специфическую амплификацию для обоих 5'-модифицированных праймеров (при исследовании индивидуумов, гомозиготных по разным аллелям, аллель-специфические праймеры (IV) и (V) правильно определили их генотипы). Для увеличения эффективности полимеразной цепной реакции были увеличены, по сравнению с контрольной амплификацией, концентрации dNTP ([dATP] = [dGTP] = [dCTP] = 360 мкМ, [α -³²P]TTP] 50 мкКи), количество геномной ДНК, количество *Taq*-полимеразы и количество циклов амплификации.

2. Иммобилизация биотинилированных праймеров (один из которых, не имевший концевого мисмэтча, после амплификации содержал на

3'-конце несколько ³²P-меченых остатков) на стрептавидинилированный носитель путем инкубации 1 ч при 20°C [3].

3. Специфическое последовательное расщепление "размычек" химическими реагентами. Нуклеотидные вставки (I) и (III) расщепляются соответственно NaIO₄ [3] и DTT [4].

4. Определение количества радиоактивной метки, перешедшей в раствор (по Черенкову, используя канал для ³²P жидкостного сцинтилляционного счетчика). Для гомозиготных по аллелю I (A/A) индивидуумов 100%-ный переход радиоактивности в раствор наблюдался при обработке носителя с "заякоренными" продуктами полимеразной цепной реакции 0.4 М водным раствором дитиотреита (схема 2), а для индивидуумов, гомозиготных по аллелю 2 (G/G), 100%-ное отщепление меченого продукта достигалось обработкой носителя 0.05 М водным раствором NaIO₄.

Описываемый метод является быстрым и легковоспроизводимым. Он позволяет идентифицировать замену одного основания в ДНК и удобен для молекулярной диагностики генетических заболеваний человека (дородовой диагностики, а также скрининга большого числа потенциальных переносчиков).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kerem B., Zielenski J., Markiewicz D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 8447 - 8451.
2. Амосенко Ф.А., Сазонова М.А., Капранов М.И., Трубникова И.С., Калинин В.Н. // Генетика. 1994 (в печати).
3. Щепинов М.С., Есинов Д.С., Коробко В.Г., Добрынин В.Н. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. № 8 - 9. С. 955 - 966.
4. Щепинов М.С., Коробко В.Г., Добрынин В.Н. // Биоорган. химия. 1995 (в печати).
5. Fugger L., Morling L., Ryder L.P. // J. Immunol. Meth. 1990. V. 129. P. 175 - 185.

Rapid Detection of Point Mutations with Biotinylated Selectively Cleavable Synthetic Oligonucleotides

M. S. Shchepinov, V. G. Korobko, **V. N. Dobrynin**,
F. A. Amosenko*, and V. N. Kalinin*

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow;

**Institute of Human Genetics, Russian Academy of Medicinal Sciences, Moscow*

Abstract – The method is described for fast detection of point mutations using originally prepared 5'-biotinylated specifically chemically cleavable oligonucleotides by means of allele-specific amplification in the presence of [³³P]TTP, immobilization of the products to streptavidinylated support and subsequent successive splintering of cleavable inserts.

Key words: point mutations, polymorphism, cystotic fibrosis, allele-specific primers, biotin, selectively cleavable primers.

Post address: Laboratory of gene chemistry, Institute of bioorganic chemistry, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow V-437, 117871 Russia.