

УДК 577.113.5:517.152.231

© Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ ЭНДОНУКЛЕАЗ РЕСТРИКЦИИ *Bst*2U I И *Acc*65 I ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *Kpn* I - ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *NAT2*

*М.В. Никишина, А.Г. Акишев, С.И. Макарова, В.А. Вавилин,
С.Х. Дегтярев, В.В. Ляхович*

НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, 630117,
Новосибирск, ул. Тимакова, 2; факс: (3832)336853, эл. почта: degt@lae.ru

На 30-и образцах ДНК человека был проведен ПДРФ-анализ. Впервые показана возможность применения эндонуклеаз рестрикции *Acc*65 I и *Bst*2U I для обнаружения точковой мутации С481Т гена *NAT2*. Обсуждены варианты использования данных ферментов.

Ключевые слова: N-ацетилтрансфераза, генетический полиморфизм, точковые мутации, эндонуклеазы рестрикции, ПДРФ-анализ.

ВВЕДЕНИЕ. Использование биомаркеров для оценки степени риска предрасположенности к различным полифакторным заболеваниям, в патогенезе которых важное значение имеют экзогенные факторы, становится все более распространенным. Существуют индивидуальные различия в чувствительности к поражению неблагоприятными факторами окружающей среды, обусловленные генетическим полиморфизмом. Полиморфизм генов, кодирующих ферменты биотрансформации ксенобиотиков, вносит существенный вклад в индивидуальные различия чувствительности к поражению неблагоприятными факторами окружающей среды а, следовательно, и в риск предрасположенности к заболеваниям.

Ариламин-N-ацетилтрансфераза (КФ 2.3.1.5), субстратами которой служат ароматические и гетероциклические амины и гидразины, является одним из ферментов второй фазы биотрансформации ксенобиотиков.

У человека ген *NAT2*, кодирующий N-ацетилтрансферазу, содержит один экзон длиной 870 пар нуклеотидов (п.н.), в котором к 2000 г. обнаружено 13 точковых мутаций (9 ведущих и 4 не ведущих к аминокислотной замене); различные комбинации этих мутаций дают 29 известных к настоящему времени аллелей [1].

Фенотип ацетилирования (быстрый или медленный) определяют по скорости превращения исходного тестового препарата, чаще всего сульфадимезина. Около 50% представителей европеоидной расы являются медленными ацетиляторами [2], причем самой распространенной мутацией является замена цитозина на тимин в положении 481, что не ведет к аминокислотной замене [3]. Исследования механизмов медленного ацетилирования позволили показать гетерогенность группы медленных ацетиляторов: так, была показана разная субстратная специфичность аллозимов [4] и различие молекулярных механизмов возникновения фенотипов медленных ацетиляторов [5].

Лица с разными фенотипами ацетилирования имеют разную предрасположенность к таким заболеваниям, как бронхиальная астма [6], болезнь

Крп I - ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА NAT2

Паркинсона [7], к различным онкологическим заболеваниям, из которых наиболее освещены связи с раком мочевого пузыря и раком толстой кишки [8,9].

В практике медико-генетического консультирования широкое распространение получил быстрый и информативный метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ), позволяющий обнаружить мутационную изменчивость в сайтах узнавания различных эндонуклеаз рестрикции. Метод основан на оценке исчезновения или появления сайта узнавания для специфической эндонуклеазы рестрикции при изменениях последовательности ДНК вследствие мутации. В настоящей работе мы исследовали возможность использования новых эндонуклеаз рестрикции для определения мутации в положении 481 гена NAT2.

МЕТОДИКА. Геномная ДНК была выделена из лейкоцитов периферической крови 30 неродственных индивидов европеоидной расы по методу Kunkel [10]. Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции, которую проводили на амплификаторе "АМП-105" ("Бис", Россия) с использованием олигонуклеотидных праймеров Nat-Hu 14 и Nat-Hu 16 [11] для получения амплификата размером 1000 п.н. Реакцию проводили в 100 мкл. Состав реакционной смеси в буфере для ПЦР: 50 мкМ каждый из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,2 мкМ каждый из двух праймеров, 2 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы и 4 мкл ДНК. После исходной денатурации ДНК при 94°C в течение 3 мин проводили 30 циклов амплификации: 1 мин при 94°C, 2 мин при 56°C и 2 мин при 72°C с последующей финальной достройкой ДНК в течение 4 мин при 72°C.

В настоящей работе использовали следующие эндонуклеазы рестрикции ("СибЭнзим", Россия):

1. Эндонуклеаза рестрикции *Bst2U* I, выделенная из *Bacillus stearothermophilus* 2U. Сайт узнавания CCG(A/T)GG. Условия реакции: 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6 при 25°C); 10 мМ MgCl₂; 50 мМ NaCl; 1 мМ ДТТ. Температура инкубации 60°C.

2. Эндонуклеаза рестрикции *Kpn* I выделенная из *Klebsiella pneumoniae*. Сайт узнавания GGTAC↓C. Условия реакции: 10 мМ трис-HCl (pH 7,6 при 25°C); 10 мМ MgCl₂; 1 мМ ДТТ. Температура инкубации 37°C.

3. Эндонуклеаза рестрикции *Acc65* I, выделенная из *Acinetobacter calcoaceticus* 65. Прототипом является *Kpn* I. Сайт узнавания G↓GTACC. Условия реакции: 10 мМ Трис-HCl (pH 8,5 при 25°C); 10 мМ MgCl₂; 100 мМ NaCl; 1 мМ ДТТ. Температура инкубации 37°C.

Гидролиз ПЦР-продукта эндонуклеазами рестрикции проводили в течение 3 часов. ДНК-фрагменты разделяли в 2 % агарозном геле. В работе использовали агарозу и реагенты для электрофореза фирмы "Sigma" (США). Размеры фрагментов оценивали сравнивая их с маркерными фрагментами ("СибЭнзим", Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В нашей работе мы исследовали возможность использования новой эндонуклеазы рестрикции *Bst2U* I и эндонуклеазы рестрикции *Acc65* I, являющейся ложным изошизомером *Kpn* I [12], которую используют в этих целях [11].

В аллеле гена NAT2 "дикого" типа для эндонуклеазы рестрикции *Acc65* I (*Kpn* I) существует только один сайт узнавания и занимает шесть нуклеотидов в положении 476-481; при наличии мутации в одном из этих нуклеотидов сайт узнавания нарушается. Для эндонуклеазы рестрикции *Bst2U* I в аллеле "дикого" типа существуют три сайта узнавания размером пять нуклеотидов. Сайт узнавания эндонуклеазой рестрикции *Bst2U* I в интересующем нас положении занимает нуклеотиды в положении 480-484 (рис. 1). Сайты узнавания перекрываются в положении 480 и 481.

В работе параллельное использование эндонуклеаз рестрикции *Acc65* I (*Kpn* I) и *Bst2U* I было проведено на 30-и образцах амплифицированных фрагментов гена NAT2, типичные образцы электрофореграмм приведены на рисунках 2 и 3. В этой группе выявлено 27 носителей этого полиморфизма (таблица). Результаты ПДРФ-анализа при рестрикции амплифицированных фрагментов эндонуклеазой

Сайт узнавания <i>Kpn</i> I (<i>Acc</i> 65 I)	5'- ⁴ GGTACC
Участок последовательности гена <i>NAT2</i> "дикого" типа	5'- ⁴⁷³ TCTGGTACCTGGACC
Сайт узнавания <i>Bst</i> 2U I	5'- ¹⁸⁰ CCTGG

Рисунок 1.

Перекрытие сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции *Kpn* I (*Acc*65 I) и *Bst*2U I для гена *NAT2*.

Таблица. Результаты ПДРФ-анализа для обнаружения мутации С481Т гена *NAT2*.

Эндонуклеазы рестрикции	<i>Kpn</i> I	<i>Acc</i> 65 I	<i>Bst</i> 2U I
Число "диких" гомозигот	3	3	3
Число гетерозигот	23	23	23
Число мутантных гомозигот	4	4	4

рестрикции *Bst*2U I полностью совпадают с таковыми при рестрикции *Acc*65 I (*Kpn* I). Вероятность нахождения мутации в 480 положении не исключается. Так, известно, что наряду с мутацией G191A, была обнаружена мутация в положении 190 ведущая к замене цитозина на тимин [13], при наличии этих мутаций происходит замена аргинина в положении 64 на глутамин или триптофан соответственно.

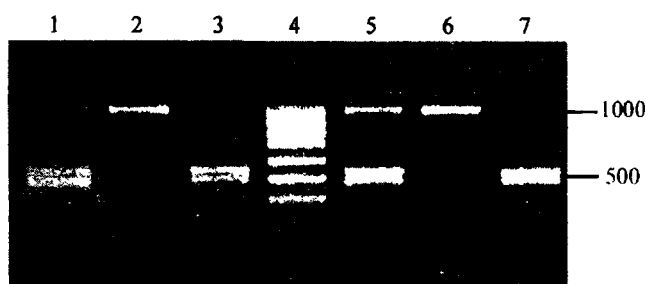


Рисунок 2.

Электрофореграмма гидролиза эндонуклеазами рестрикции *Acc*65 I и *Kpn* I амплификатов гена *NAT2*. 1, 2, 3 - гидролиз *Acc*65 I; 4 - маркер; 5, 6, 7 - гидролиз *Kpn* I. 1, 5 - гетерозигота; 2, 6 - мутантная гомозигота; 3, 7 - "дикая" гомозигота. Справа указаны длины (пар нуклеотидов) маркерных фрагментов.

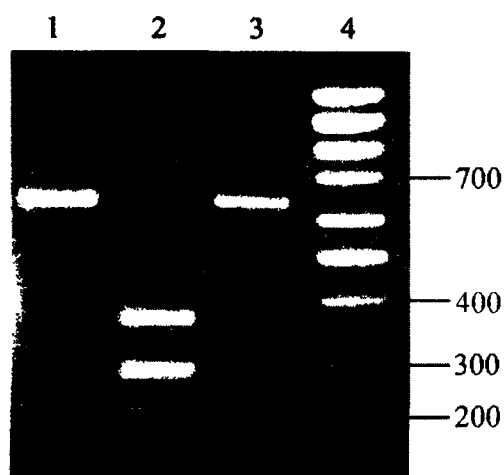


Рисунок 3.

Электрофореграмма гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Bst*2U I амплификатов гена *NAT2*. 1 - мутантная гомозигота; 2 - "дикая" гомозигота; 3 - гетерозигота; 4 - маркер. Справа указаны длины (пар нуклеотидов) маркерных фрагментов.

Kpn I - ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *NAT2*

Таким образом, показана возможность использования эндонуклеаз рестрикции *Bst2U I* и *Acc65 I* для определения точковой мутации гена *NAT2* в положении 481.

Параллельное использование двух эндонуклеаз рестрикции *Bst2U I* и *Acc65 I* (*Kpn I*) для определения точковой мутации C481T дает возможность более точно локализовать возможное место мутации.

Дополнительным преимуществом использования эндонуклеазы рестрикции *Bst2U I*, которое облегчает интерпретацию результатов ПДРФ-анализа для определения точковой мутации гена *NAT2* в положении 481, является наличие в этом гене трех сайтов узнавания для *Bst2U I*, что обеспечивает проведение дискриминации между отсутствием гидролиза и обнаружением мутантных гомозигот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hein D.V., Grant D.M., Sim E. (2000) Pharmacogenetics, **10**, 291-292.
2. Крынецкий Е.Ю. (1996) Мол. биология, **30**, 33-42.
3. Woolhouse N.M., Quershi M.M., Bastaki S.M.A., Patel M., Abdulrazzad Y., Bayoumi R.A.I. (1997) Pharmacogenetics, **7**, 73-82.
4. Hickman D., Palamanda J.R., Unadkat J.D., Sim E. (1995) Biochem. Pharmacol., **50**, 697-703.
5. Leff M.A., Fretland A.J., Doll M.A., Hein D.W. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 34519-34522.
6. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Макарова С.И., Гавалов С.М., Рябова О.А., Часовникова О.Б., Гуткина Н.И. (2000) Вестник РАМН, №12, 36-41.
7. Bandmann O., Vaughan J.R., Holmans P., Marsden C.D., Wood N.W. (2000) Mov. Disord., **15**, 30-35.
8. Hein D.W., Doll M.A., Fretland A.J., Leff M.A., Webb S.J., Xiao G.H., Devanaboyin U.S., Nangju N.A., Fend Y. (2000) Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., **9**, 29-42.
9. Lee E.J., Zhao B., Seow-Choen F. (1998) Pharmacogenetics., **8**, 513-517.
10. Kunkel L.M., Smith K.D., Boyer S.H., Bordgaonkar D.S., Wachtel S.S., Miller O.J., Bred W.R., Jones H.W., Rary J.M. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1245-1249.
11. Hickman D., Sim E. (1991) Biochem. Pharmacol., **42**, 1007-1014.
12. Приходько Е.А., Речкунова Н.И., Репин В.Е., Дегтярев С.Х. (1991) Сибирский биологический журнал, **1**, 59-60.
13. Shishikura K., Hohjoh H., Tokunaga K. (2000) Hum. Mutat., **15**, 581.

Поступила 14.01.2002

APPLICATION RESTRICTION ENDONUCLEASES *Bst2U I* AND *Acc65 I* TO FIND *Kpn I* - POLYMORPHISM IN *NAT2* GENE

M.V. Nikishina, A.G. Akishev, S.I. Makarova, V.A. Vavilin, S.Kh. Degtyarev, V.V. Lyakhovich

Scientific Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Siberian Division of Russian Academy of Medical Sciences, ul. Timakova, 2, Novosibirsk, 630117;
fax: (3832)336853, e-mail: degt@lae.ru

RFLP-analysis was made for 30 human DNA samples. The ability of application of restriction endonucleases *Acc65I* and *Bst2UI* to find point mutation C481T in *NAT2* gene has been demonstrated for the first time. Variants of these enzymes application are discussed.

Key words: N-acetyltransferase, genetic polymorphism, point mutations, restriction endonucleases, RFLP-analysis.