

Summary

The conditions of the amplification procedure for region of gene of human phenylalanine hydroxylase with some PKU mutations were elaborated. Genomic DNA of PKU-patients was isolated from whole blood and from dry blood spots on filter paper. The concentration of EDTA must be low to prevent inhibition of the reaction. It is necessary to perform dot-hybridization of amplificational sample with mutant DNA-probes for identification of mutations and rapid carrier testing.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*/R. Saiki, S. Scharf, F. Fallona et al. // *Science*.—1985.—230, N 1.—P. 1350—1354.
2. *Some-day, first-trimester antenatal diagnosis for cystic fibrosis by gene amplification*/C. Williams, R. Williamson, C. Coutelle et al. // *Lancet*.—1988.—N 9.—P. 102—103.
3. *Davies K. E., Robson K. J. H.* Molecular analysis of human monogenic disease // *Bio Essay*.—1987.—6, N 6.—P. 247—262.
4. *Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene*/A. G. DiLella, C. M. Simon, K. F. D. Ledley et al. // *Biochemistry*.—1986.—25, N 4.—P. 4—8.
5. *Woo S. L. C.* Molecular basis and population genetics of phenylketonuria // *Ibid.*—1989.—28, N 1.—P. 1—7.
6. *Davies K. E.* Human genetic disease, a practical approach.—Oxford: Inform. Printing Ltd., 1986.—223 p.
7. *Шварц Е. И.* Праймер-зависимая амплификация 2-х участков β -глобинового гена человека // *Биоорганическая химия*.—1988.—14, № 11.—С. 1577.
8. *Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.* Molecular cloning.—New York: Cold Spring Harbor, 1982.—479 p.
9. *Edward R. B., McCabe S-Z. H.* DNA-microextraction from dribe blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening // *Hum. Genet.*—1987.—75, N 4.—P. 213—216.

Донец. мед. ин-т им. М. Горького,
мед.-генет. центр

Получено 13.06.89

УДК 577.21:575

**А. Т. Ахмедов, Е. А. Намсараев, Е. М. Зайцева,
Е. Н. Зайцев, В. А. Ланцов**

ИЗУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ В ЭКСТРАКТАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Описана бесклеточная система, в которой используются экстракты ядер миелобластов человека, клеток HeLa и семенников крыс для инициации рекомбинации между гомологичными плазмидами, несущими различные мутантные аллели Tc-гена. Инкубация этих плазмид с ядерными экстрактами увеличивала частоту Tc^r-рекомбинантов с $2,6 \cdot 10^{-5}$ до $2,7 \cdot 10^3$. Реакция требует ионов Mg²⁺ и не зависит от присутствия АТФ и dNTP.

Кроме того, используя чувствительный метод определения реакции переноса нити, мы частично очистили АТФ-независимую рекомбинационную активность из ядерных экстрактов семенников крыс. Реакция требует гомологии между ДНК-субстратами и присутствия ионов Mg²⁺.

Введение. Благодаря внедрению методов генетической инженерии в современную генетику стал возможным новый этап в развитии молекулярной биологии эукариот, включая человека. Клонирование генетического детерминанта, анализ его первичной структуры, нахождение поврежденных, приводящих к тяжелым наследственным заболеваниям, становятся рутинными приемами медицинской генетики [1]. Современная медицина требует комплексных знаний молекулярной биологии в норме и патологии. Эта новая отрасль науки выдвинула в ряд акту-

альных задачу генотерапии, т. е. лечения заболевания путем ликвидации первичного дефекта на уровне гена [2—4]. Оставляя в стороне обсуждение различных вариантов генотерапии, укажем идеальный — замену повреждения путем гомологической рекомбинации. Так, практическая задача стимулирует фундаментальные исследования механизмов гомологической рекомбинации в клетках высших, включая человека.

Опыт изучения гомологической рекомбинации у прокариот и грибов показывает, что центральную роль в этом процессе играет рекомбиназа (гомологическая синаптаза), катализирующая спаривание го-

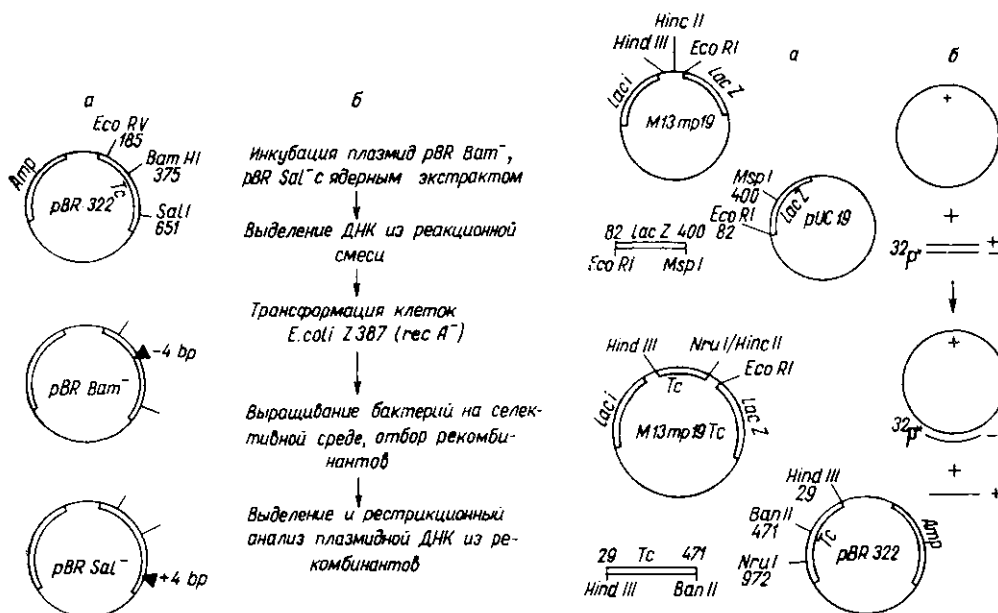


Рис. 1. Субстраты для бесклеточной рекомбинационной системы (а) и схема эксперимента (б)

Fig. 1. Substrates for cell-free recombination system (a) and scheme of experiment (b)

Рис. 2. Субстраты для определения рекомбиназной активности (а) и схема образования joint-молекул в результате переноса нити (б)

Fig. 2. Substrates for recombinase assay (a) and scheme of the formation of joint-molecules as a result of strand-transfer reaction (b)

мологических молекул ДНК, сопровождающееся гидролизом АТФ ([см. обзоры 5, 6]). Это хорошо изученные белки *RecA Escherichia coli* и *RecI Ustilago maydis* [5—7]. В клетках эукариот, в том числе и млекопитающих, к настоящему времени обнаружены как АТФ-зависимые, так и АТФ-независимые рекомбиназы [7—18].

В настоящей работе описан первый этап выделения рекомбиназ высших, выбор рекомбинационных тест-систем и обнаружение активного рекомбинационного начала в ядерных экстрактах клеток миелобластов крови человека, *HeLa* и семенников крыс. Выбор объектов исследования основывался на представлении, что активно пролиферирующие раковые клетки, а также половые клетки могут обладать повышенным уровнем рекомбиназной активности.

Материалы и методы. Источники экстрактов. Миелобласты выделены из крови больных, страдающих хроническим миелолейкозом. Препараты крови получены из Ленинград. ин-та гематологии и переливания крови; семенники — от 20—25 2—3-месячных белых беспородных крыс. Клетки промывали физиологическим раствором на фосфатном буфере, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Приготовление ядерных экстрактов. Все дальнейшие операции проводили при 4°C . Клетки лизировали в присутствии 0,5%-ного неионда Р40, ядра

отмывали и ядерные белки экстрагировали 20 мМ трис-НСl, рН 7,5, 10 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотрептолом (ДТТ), 0,5 М NaCl, 1 мМ фенилметилсульфонилфторидом (ФМСФ). Экстракты центрифугировали при 100 000 *g* 1 ч. Нуклеиновые кислоты осаждали 5 %-ным стрептомицисульфатом, белки осаждали сульфатом аммония (60 %) насыщения). Осадки ресуспендировали в 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 10 %-ном глицерине, 1 мМ ФМСФ, 0,1 М NaCl (буфер А) и диализировали против этого же буфера. Ядерные экстракты использовали либо сразу, либо замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С.

Манипуляции с ДНК. Выделение, очистку и манипуляции с ДНК проводили стандартными методами [19].

Бесклеточная рекомбинационная тест-система. В качестве субстратов использовали две плазмиды *pBR322* с поврежденным в разных участках геном *Tet*, контролирующим устойчивость к тетрациклину (рис. 1). Реакционная смесь (50 мкл) содержала по 0,5 мкг каждой плазмиды, 35 мМ буфер HEPES, рН 7,8, 2 мМ спермидин, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 5 мМ АТР, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), четыре дNTP, концентрация каждого 20 мМ, и от 0 до 32 мкг белка ядерных экстрактов. После инкубации при 37 °С в течение указанного времени ДНК осаждали, очищали и использовали для трансформации клеток *E. coli* Z387 (*recA*⁻) по методу [20]. Частоту рекомбинации определяли как отношение числа трансформантов *Tet* к числу трансформантов *Amp*^r.

Определение рекомбинационной активности. В качестве субстратов использовали однонитчатую (он) ДНК фага *M13mp19* и двухнитчатый (дн) гомологичный фрагмент ДНК плазмиды *pUC19*, меченный ³²P (рис. 2) [17]. Реакционная смесь (15 мкл) содержала 25 мМ трис-НСl, рН 7,6, 12 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 6 мМ креатинфосфат, 20 ед/мл креатинфосфокиназы, 1 мМ АТР, 10 %-ный глицерин, 25 мкг/мл БСА, а также 20 нг онДНК *M13mp19* и 0,5 нг днДНК фрагмента. Реакцию инициировали добавлением белков *RecA* и *SSB* или ядерных экстрактов семенных крыс. После инкубации при 32 °С (для *RecA* — 37 °С) реакцию останавливали добавлением 1,5 мкл смеси, содержащей 30 % глицерина, 5 % DS-Na, 50 мМ ЭДТА, 0,7 % бромфенолового синего. Белок гидролизовали протеиназой К (1 мг/мл) при 45 °С в течение 20 мин, а продукты реакции рекомбинации анализировали электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле. Гель высушивали и автораднографировали при -70 °С, используя рентгеновскую пленку РМ 1.

Содержание белка определяли спектрофотометрически [21].

Результаты и обсуждение. В основе применяемой нами бесклеточной рекомбинационной системы лежит восстановление функциональной активности гена *Tet* в результате гомологической рекомбинации между двумя плазмидами, одна из которых содержит делецию в *Bam*HI-сайте, а другая — вставку в *Sal*I-сайте этого гена. Впервые подобная система была использована Саймингтоном и др. [22]. Структура субстратов представлена на рис. 1, а. Один из них получен разрезанием плазмиды *pBR322* рестриктазой *Bam*HI с последующей деградацией он-концов нуклеазой *S1* и лигированием, результатом чего явилось образование делеции в 4 н. п. и исчезновение сайта рестрикции *Bam*HI.

Основные характеристики рекомбинационной реакции, катализируемой ядерными экстрактами миелобластов человека

General characteristics of recombination activity catalyzed by nuclear extracts of human myeloblasts

Субстрат	Инкубация с экстрактами, 37 °С	Частота рекомбинации, <i>Tet</i> ^r / <i>Amp</i> ^r
Линейная <i>pBRSal</i> ⁻	—	3,5 · 10 ⁻⁶
Кольцевая <i>pBRBam</i> ⁻	—	1,2 · 10 ⁻⁵
Линейная <i>pBRSal</i> ⁻ +кольцевая <i>pBRBam</i> ⁻	—	2,6 · 10 ⁻⁵
Линейная <i>pBRSal</i> ⁻ +кольцевая <i>pBRBam</i> ⁻	Раздельная инкубация, 1 ч	3,2 · 10 ⁻⁴
То же	Совместная инкубация, 1 ч	2,7 · 10 ⁻³
То же, но без Mg ²⁺	То же	0,85 · 10 ⁻⁴
То же, но без АТР и дNTP	«—»	3,7 · 10 ⁻³

Второй получен разрезанием той же исходной плазмиды рестриктазой *Sall* с последующей застройкой выступающего конца фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I и лигированием, что привело к вставке в 4 н. п. и исчезновению сайта рестрикции *Sall*. Плазмиду *pBRSal*-переводили в линейную форму обработкой рестриктазой *EcoRV*.

Были проведены две серии экспериментов по три опыта в каждой из них. В первой — к эквимольной смеси описанных плазмид добавляли ядерный экстракт и после инкубации при 37 °С данной смесью трансформировали клетки *E. coli* (*recA*⁻) с последующим высевом на селективные среды с ампициллином и тетрациклином (см. «Материалы и методы»; рис. 1, б). В другой — каждую из плазмид инкубировали с ядерным экстрактом по отдельности, затем выделяли из реакционных смесей

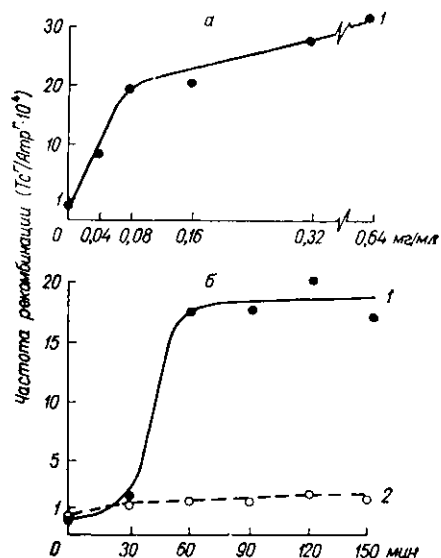


Рис. 3. Зависимость частоты рекомбинации от концентрации белка (а, время инкубации 60 мин) и времени инкубации (б, концентрация белка 0,08 мг/мл): 1 — совместная и 2 — раздельная инкубация плазмид с ядерным экстрактом

Fig. 3. Extent of recombination as a function of either protein concentration, time of incubation was 60 min (a) or time of incubation, protein concentration was 0.08 mg/ml (b): 1 — coincubation and 2 — separate incubation of plasmids with nuclear extract

ДНК, смешивали их и трансформировали клетки *E. coli* (*recA*⁻). Результаты этих опытов представлены в таблице и на рис. 3. Видно, что при совместной инкубации плазмид с ядерным экстрактом частота рекомбинации возрастает в 100 раз, тогда как при раздельной — лишь в 10. Раздельная инкубация позволяет оценить число трансформантов *Tc*^r, образовавшихся не в результате гомологической рекомбинации, а, например, деградации онДНК нуклеазами с последующей спонтанной реассоциацией комплементарных онДНК. Разница между относительными выходами трансформантов *Tc*^r/*Amp*^r при совместной и раздельной инкубации плазмид с экстрактами и составляет чистый эффект гомологической рекомбинации.

Из данных таблицы видно, что описываемая рекомбинационная реакция полностью зависит от ионов Mg^{2+} и не зависит от добавления экзогенной АТР или трифосфатов. По этим свойствам наша бесклеточная система сходна с той, которая описана для экстрактов ядер клеток *HeLa*, карциномы легкого и фибробластов кожи человека [14]. В экстрактах дрожжей и клеток млекопитающих обнаружена, кроме того, АТР-зависимая рекомбинационная реакция [9, 22—24]. Что же касается потребностей в экзогенных трифосфатах, то здесь в литературе данные более противоречивы.

Для анализа конечного продукта рекомбинации из трансформантов *Tc*^r выделяли плазмидную ДНК и проводили рестрикционный анализ. В этих экспериментах установлено, что происходит восстановление обоих сайтов рестрикции в *Tet*-гене.

Предварительные результаты, подобные описанным выше, получены нами в опытах с экстрактами из ядер клеток *HeLa* и семенишек крыс (данные не приведены).

Как уже отмечалось, ключевым ферментом гомологической рекомбинации является рекомбиназа — фермент, катализирующий реакцию комплементарного спаривания и обмена нитей между гомологичными молекулами ДНК. В этой части сообщения описаны результаты опытов

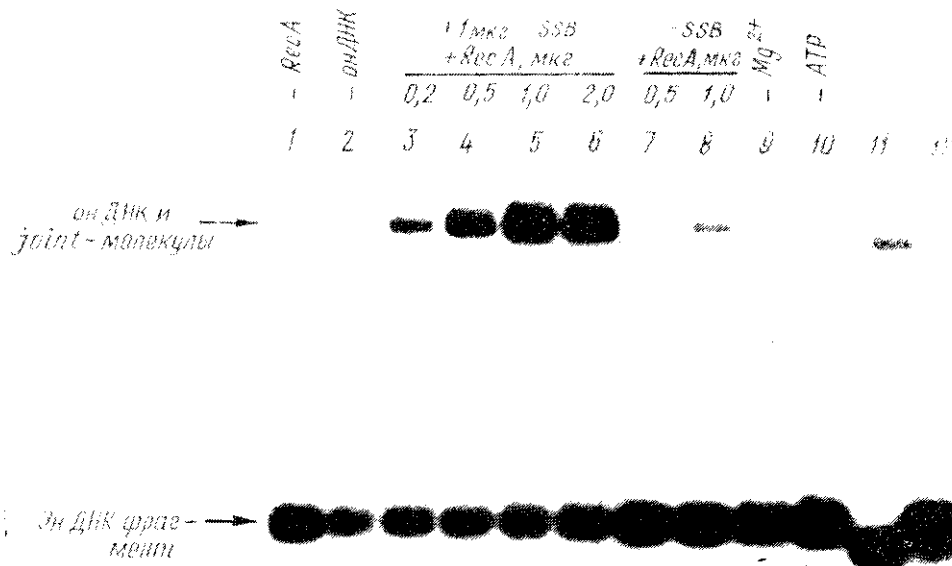


Рис. 4. Образование *joint*-молекул, катализируемое белком *RecA* *E. coli*. В качестве субстратов использовали: 1—10—онДНК *M13mp19Tc* и гомологичный днДНК *Tc*-фрагмент (442 п. н.); 11—онДНК *M13mp19* и гомологичный днДНК фрагмент (318 п. н.); 12—онДНК *M13mp19* и негомологичный днДНК *Tc*-фрагмент (442 п. н.); в пробах 2, 9—12 содержалось по 1 мкг белков *RecA* и *SSB* *E. coli*

Fig. 4. Formation of *joint*-molecules catalyzed by *E. coli RecA* protein DNA substrates used were: 1-10—*M13mp19Tc* ssDNA and homologous dsDNA *Tc*-fragment (442 bp); 11—*M13mp19* ssDNA and homologous dsDNA fragment (318 bp); 12—*M13mp19* ssDNA and nonhomologous dsDNA *Tc*-fragment (442 bp). Samples 2, 9-12 contained 1 μg of *RecA* and *SSB* protein

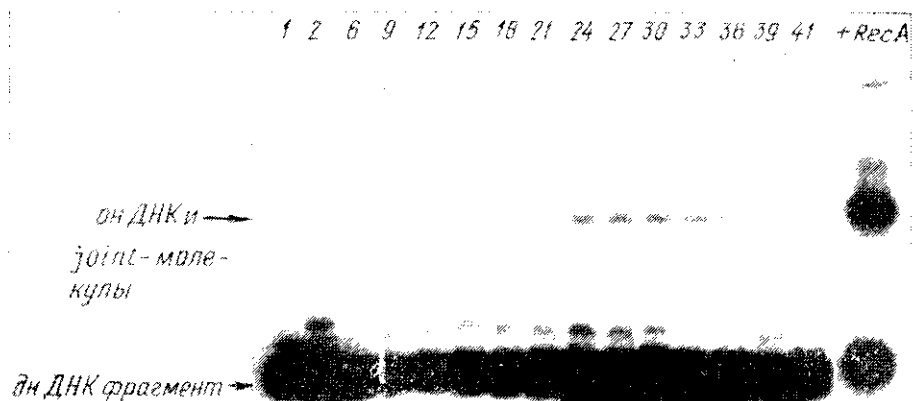


Рис. 5. Определение рекомбиназной активности после хроматографии на онДНК-целлюлозе. Элюцию проводили линейным градиентом 0,2—0,7 М NaCl (30 мл). Собранные фракции (1 мл) анализировали, как описано в «Материалах и методах»: 1—исходные субстраты; 2—фракция I; 6—41—номера фракций, элюированных с онДНК-целлюлозы

Fig. 5. Detection of recombinase activity after chromatography on ssDNA cellulose. Elution was performed by linear 0.2-0.7 M NaCl gradient (30 ml). Collected fractions (1 ml) were analyzed as described in «Materials and Methods»: 1—unreacted substrates; 2—fraction I; 6—41—numbered fractions eluted from the ssDNA-cellulose

по выделению, частичной очистке и определению некоторых свойств рекомбиназы из ядерных экстрактов семенников крыс.

Для тестирования рекомбиназной активности мы применили высокочувствительный метод, позволяющий выявлять реакцию образования «сцепленных» (*joint*)-молекул ДНК в неочищенных экстрактах с примесями нуклеазных, лигазных и геликазных активностей [17]. Этот

метод является модификацией одной из методик по рекомбинационному переносу нити ДНК (strand transfer reaction). В качестве субстратов использовали следующие пары ДНК (см. рис. 2, а): 1) кольцевая онДНК («+»нить) фага *M13mp19* и линейный дн-фрагмент ДНК (318 н. п.), вырезанный из полилинкера плазмиды *pUC19* по сайтам *EcoRI* и *MspI*, что соответствует 82 и 400 нуклеотидам стандартной карты плазмиды *pUC19*; 2) та же нить ДНК фага *M13*, но со вставкой фраг-

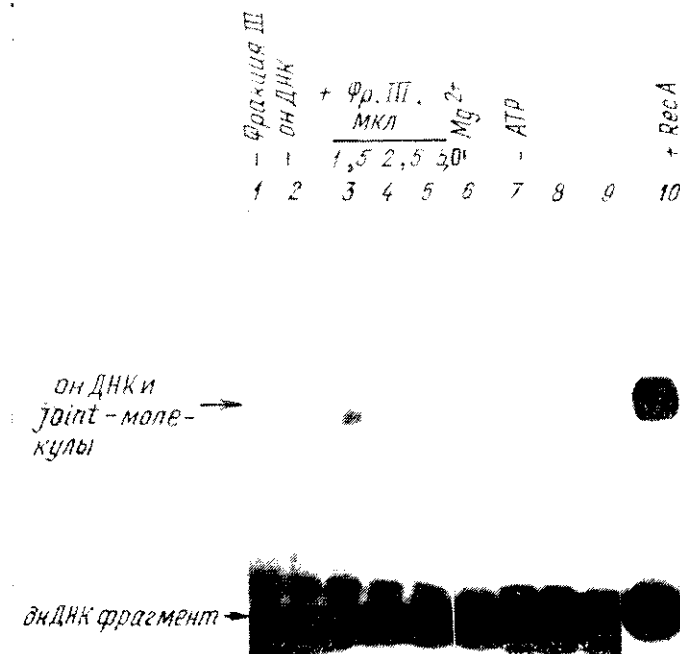


Рис. 6. Образование *joint*-молекул, катализируемое рекомбиназной активностью из ядер семенников крыс (фракция III). В качестве субстратов использовали: 1—7, 10 — онДНК *M13mp19Tc* и гомологичный днДНК *Tc*-фрагмент (442 н. п.); 8 — онДНК *M13mp19* и гомологичный днДНК фрагмент (318 н. п.); 9 — онДНК *M13mp19* и не-гомологичный днДНК *Tc*-фрагмент (442 н. п.); в пробах 2, 6—9 содержалось по 5 мкл фракции III

Fig. 6. Formation of *joint*-molecules catalyzed by recombinase activity from nuclear of rat testis (fraction III). DNA substrates used were: 1-7, 10 — *M13mp19Tc* ssDNA and homologous dsDNA *Tc*-fragment (442 bp); 8 — *M13mp19* ssDNA and homologous dsDNA fragment (318 bp); 9 — *M13mp19* ssDNA and nonhomologous dsDNA *Tc*-fragment (442 bp). Samples 2, 6-9 contained 5 μ l of fraction III

мента гена *Tet* размером 943 н. п., вырезанного из плазмиды *pBR322* по сайтам *HindIII* и *NruI*, что соответствует 29 и 972 нуклеотидам стандартной карты плазмиды *pBR322 (M13mp19Tet)*, и линейный днДНК *Tet*-фрагмент (442 н. п.), вырезанный из плазмиды *pBR322* по сайтам *HindIII* и *BamHI* (29 и 471 нуклеотиды стандартной карты плазмиды *pBR322*).

Фрагменты днДНК метили ³²P с 3'-конца. При инкубации каждой из этих пар субстратов с белком *RecA E. coli* (состав реакционной смеси см. в «Материалах и методах») происходит образование стабильных гетеродуплексов, о чем свидетельствует появление на радиоавтографах меченой полосы в зоне миграции онДНК (рис. 2, б, и 4). Кроме того, приведенные на рис. 4 данные демонстрируют основные характеристики реакции переноса нити, катализируемой белком *RecA*, строгую зависимость от гомологии субстратов, присутствия АТФ, ионов Mg²⁺ и стимуляцию белком SSB из *E. coli*, что полностью соответствует свойствам этого белка, описанным в литературе [5, 6].

В наших опытах ядерные экстракты, приготовленные из семенников крыс (см. «Материалы и методы»; фракция I), хроматографировали на колонке (6 мл) с онДНК-целлюлозой. Сорбированные белки

элюировали градиентом концентрации 0,2—0,7 М NaCl. Рекombинационная активность обнаруживалась во фракциях, элюируемых при 0,5—0,7 М NaCl после выхода основного белкового пика, в котором выявлялась, в частности, ДНК-зависимая АТФ-зависимая активность (рис. 5). Суммарные активные фракции диализировали против буфера А (фракция II) и наносили на колонку объемом 5 мл с фосфоцеллюлозой. Белки элюировали 0,2—1,0 М NaCl. Рекombинационная активность выходила при 0,8—1,0 М NaCl после основного пика белка. Активные фракции диализировали против буфера А и хранили при 4 °С (фракция III). Все эксперименты по изучению свойств рекombиназы проводили с этим препаратом.

Основными примесями во фракции III были ДНК-лигаза и, по-видимому, следовые количества онДНК-нуклеазы.

Реакция образования «сцепленных» молекул ДНК строго зависит от гомологии субстратов, требует ионов Mg^{2+} , подавляется ЭДТА, не зависит от экзогенного АТФ и подавляется 0,2 М NaCl (рис. 6). Структура гетеродуплекса, образовавшегося в результате реакции переноса нити, исследуется нами в настоящее время.

Интересен в том, что рекombинационная активность локализована именно в ядрах клеток семенников крыс. При фракционировании цитоплазматического экстракта искомая активность не обнаружена.

Изученная нами рекombинационная активность отличается от АТФ-зависимой рекombиназы, обнаруженной в семенниках мышей ранее [9]. Она напоминает АТФ-независимые рекombиназы, описанные другими авторами в клетках дрожжей [13, 18], дрозофилы [15, 17] и млекопитающих [10, 14]. Столь широкое распространение АТФ-независимых рекombиназ у эукариот может свидетельствовать о качественно ином характере иницирования процесса рекombинации у них по сравнению с прокариотами.

Авторы благодарят В. М. Чернаско за предоставление препаратов белков *RecA* и *SSB E. coli*; М. Н. Блинова и Л. Б. Салтыкову — препаратов миелобластов; А. Л. Качурина — за помощь в препаративной работе; Е. И. Шварца и М. Л. Беккера — за плодотворное обсуждение результатов.

STUDY OF RECOMBINATION ACTIVITY IN MAMMALIAN CELL EXTRACTS

A. T. Akhmedov, E. A. Namsaraev, E. M. Zaitseva, E. N. Zaitsev, V. A. Lantsov

B. P. Konstantinov Leningrad Institute of Nuclear Physics,
Academy of Sciences of the USSR, Gatchina

Summary

The cell-free system utilizing nuclear extracts from human micloblasts, HeLa cells and rat testes to initiate recombination events between homologous plasmids containing different mutant alleles of the Tc gene has been described. The incubation of the plasmids with nuclear extracts increased the frequency of Tc^R recombinants from 2.6×10^{-6} to 2.7×10^{-3} . The reaction required Mg^{2+} and was ATP- and dNTP-independent.

In addition while using a sensitive homologous recombination strand-transfer assay ATP-independent strand-transfer activity from nuclear extracts of rat testis have been partially purified. It was homology-dependent and required the presence of Mg^{2+} . Similarities between recombinase activity and other known eukaryotic recombinases are under discussion.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davies K. E., Robson K. J. H. Molecular analysis of human monogenic diseases // Bioassays.— 1987.— 6, N 6.— P. 247—253.
2. Anderson W. F. Prospects for human gene therapy // Science.— 1984.— 226, N 4673.— P. 401—409.
3. Maniatis T. Targeting in mammalian cells // Nature.— 1985.— 317, N 6034.— P. 205—206.

4. Marx J. L. Gene therapy—so near and yet so far away // Science.—1986.—232, N 4752.—P. 824—825.
5. Ланцов В. А. Бактериальный белок Rec A: биохимический, генетический и физико-химический анализ // Генетика.—1985.—21, № 9.—С. 1413—1427.
6. Cox M. M., Lehman I. R. Enzymes of general recombination // Ann. Rev. Biochem.—1987.—56.—P. 229—262.
7. Kmiec E., Holloman W. K. Homologous pairing of DNA molecules promoted by a protein from *Ustilago* // Cell.—1982.—29, N 2.—P. 367—374.
8. Kenne K., Ljungquist S. A. A DNA-recombinogenic activity in human cells // Nucl. Acids Res.—1984.—12, N 7.—P. 3057—3068.
9. General recombination mechanisms in extracts of meiotic cells / Y. Hotta, S. Tabata, R. A. Bouchard et al. // Chromosoma.—1985.—93, N 2.—P. 140—151.
10. Hsieh P., Meyn M. S., Camerini-Otero R. D. Partial purification and characterization of a recombinase from human cells // Cell.—1986.—44, N 3.—P. 885—894.
11. Cassuto E., Lightfoot L.-A., Howard-Flanders P. Partial purification of an activity from human cells that promotes homologous pairing and the formation of heteroduplex DNA in the presence of ATP // Mol. and Gen. Genet.—1987.—208, N 1.—P. 10—14.
12. Characterization of an ATP-dependent DNA strand transferase from human cells / D. Ganea, P. Moore, L. Checuri, R. Kucherlapati // Mol. and Cell Biol.—1987.—7, N 9.—P. 3124—3130.
13. Kolodner R., Evans D. H., Morrison P. T. Purification and characterization of an activity from *Saccharomyces cerevisiae* that catalyses homologous pairing and strand exchange // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1987.—84, N 16.—P. 5560—5564.
14. Lopez B., Raussei S., Coppey J. Homologous recombination intermediates between two duplex DNA catalyzed by human cell extracts // Nucl. Acids Res.—1987.—15, N 14.—P. 5643—5655.
15. Eisen A., Camerini-Otero R. D. A recombinase from *Drosophila melanogaster* embryos // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 20.—P. 7481—7485.
16. Fishel R. A., Detmer K., Rich A. Identification of homologous pairing and strand-exchange activity from human tumor cell line based on Z-DNA affinity chromatography // Ibid.—N 1.—P. 36—40.
17. Sensitive homologous recombination strand-transfer assay: Partial purification of a *Drosophila melanogaster* enzyme and detection of sequence effects on the strand-transfer activity of Rec A protein / J. G. McCarthy, M. Sander, K. Lowenhiaupt, A. Rich // Ibid.—N 16.—P. 5854—5858.
18. Sugino A., Nitiss J., Resnick M. A. ATP-independent DNA strand transfer catalyzed by protein(s) from meiotic cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Ibid.—N 11.—P. 3683—3687.
19. Митшакис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—420 с.
20. Клонирование ДНК / Под ред. Д. Гловера.—М.: Мир, 1988.—320 с.
21. Kalb V. F., Bernlohr R. W. A new spectrophotometric assay for protein // Anal. Biochem.—1977.—82, N 2.—P. 362—371.
22. Symington L. S., Fogarty L. M., Kolodner R. Genetic recombination of homologous plasmids catalyzed by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae* // Cell.—1983.—35, N 3.—P. 805—813.
23. Darby V., Blattner F. Homologous recombination catalyzed by mammalian cell extracts *in vitro* // Science.—1984.—226, N 4679.—P. 1213—1215.
24. Kucherlapati R. S., Spencer J., Moore P. D. Homologous recombination catalyzed by human cell extracts // Mol. and Cell Biol.—1985.—5, N 4.—P. 714—720.

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

Получено 23.06.89

УДК 577.213.3

М. В. Асеев, Т. Э. Иващенко, В. Н. Горбунова, В. С. Баранов

ПДРФ-АНАЛИЗ И ДИАГНОСТИКА ГЕМОФИЛИИ А ПРИ ПОМОЩИ ДНК-ЗОНДОВ

Методом блот-гибридизации изучен полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) ДНК-последовательностей, тесно сцепленных (зонд St-14) или расположенных внутри, т. е. представляющих собой фрагменты гена фактора (F) VIII: С свертывания крови (p51.61 и p1.8), в ленинградской популяции (контроль) — в семьях высокого риска и непосредственно у больных гемофилией А. Частота ПДРФ-аллелей, выявленная этими зондами, во всех исследованных группах в целом хорошо коррелирует с аналогичными показателями для западноевропейских и североамериканских популяций. В исследованиях с зондом St-14 обнаружены два дополнительных, ранее неописанных