

УДК 616-056.7:616.153.922

Егоров В.В. (4 курс, БФ), Ф.М. Захарова (НИИЭМ РАМН)

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ PCR ДЛЯ ЭКЗОНОВ 1, 7 И 9 ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ ЧЕЛОВЕКА

Семейная гиперхолестеринемия (СГ) - аутосомно-доминантное заболевание человека, приводящее к развитию атеросклероза и, как следствие, к инфаркту миокарда в раннем возрасте. Гетерозиготная форма СГ встречается с частотой 1:500. СГ обусловлена снижением скорости удаления из кровотока липопротеинов низкой плотности (ЛНП) человека вследствие мутаций в гене рецептора ЛНП. К настоящему моменту в мире известно более 700 мутаций в гене рецептора ЛНП, спектр которых специфичен для каждой популяции. Исследования, частью которых являются данная работа, направлены на определение спектра мутаций в гене рецептора ЛНП у больных СГ в популяции Санкт-Петербурга.

Для поиска мутаций, например методом анализа конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК (SSCP-анализ) в ПААГ, необходимо наличие достаточного количества копий изучаемого фрагмента ДНК. Одним из наиболее распространенных методов получения большого числа копий определенного участка ДНК сегодня является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Целью исследований являлось определение оптимальных условий ПЦР для трех различных экзонов гена рецептора ЛНП. ПЦР в стандартных условиях (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Трис-НСl рН8.4, по 200 мкМ dATP, dTTP, dGTP, dCTP, 0.33 мкМ каждого праймера, 2.5 единицы на 100 мкл Таq-полимеразы) показало, что эти условия не являются оптимальными - анализ полученных амплификатов в 8% ПААГ показал наличие неспецифических продуктов ПЦР. Постепенное увеличение температуры отжига (с 60 до 62°C) привело к исчезновению всех, кроме одной распложенной выше зоны основного амплификата, дополнительной зоны. Проведение электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях показало, что данная зона является следствием асимметричной ПЦР. Изменение концентраций праймеров привело к исчезновению зоны, соответствующей однонитевой структуре и показало, что оптимальным для ПЦР является количество праймеров в 20 раз меньшее, чем предполагалось ранее, так как их фактическая концентрация оказалась больше, чем расчетная.

*Работа поддержана федеральной целевой программой "Интеграция" № 783/89 (Развитие и поддержка учебно-научного центра "Молекулярно-биологические проблемы современной медицины")*