



УДК 577.212.3

© 1992 А.Д. Мирзабеков

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДНК И ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСПОЛОЖЕНИЯ БЕЛКОВ НА ГЕНОМНОЙ ДНК

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Москва*

Представлен новый метод секвенирования ДНК путем ее гибридизации с олигонуклеотидной матрицей. В работе описаны также новые подходы для идентификации, картирования и установления линейного расположения белков на любых представляющих интерес участках геномной ДНК.

Секвенирование белков было одной из тех научных проблем, которые неизменно вызывали интерес Ю.А. Овчинникова. В нашей стране Юрий Анатольевич был пионером в области крупномасштабного секвенирования белков, начиная с работы по определению первичной структуры тирозинаминотрансферазы, которая завершилась полным секвенированием самого большого по тем временам белка. Когда развитие геной инженерии обеспечило возможности для быстрого и эффективного клонирования и секвенирования ДНК, Ю.А. Овчинников начал широко применять технологию секвенирования ДНК для исследования структуры белков. По этой причине мне кажется уместным представить здесь результаты нашей работы по созданию нового подхода к секвенированию ДНК и новой методики определения последовательности расположения белков на геномной ДНК. В некотором отношении эти исследования продолжили работы по секвенированию тРНК, которые проводились в лаборатории В.А. Энгельгардта, а затем А.А. Басва (Институт молекулярной биологии) в одно и то же время и на том же этаже, где работал Юрий Анатольевич.

От секвенирования белков к секвенированию геномной ДНК

В настоящее время в ряде стран существуют программы картирования и секвенирования геномов человека, ряда других животных, растений, а также геномов дрожжей, *E. coli*, микоплазмы и т.п. Эти программы стали реальностью вследствие двух основных факторов: во-первых, осознаны связанные с реализацией программ огромные возможности для развития биологии и биотехнологии, а во-вторых, созрели условия для их практического воплощения.

Каждый день в мире открывают и секвенируют все новые гены различных организмов. Возможно, что большинство вопросов биологии, и в частности медицины, могут быть разрешены на уровне определенных

Скорость секвенирования,
число оснований/сут

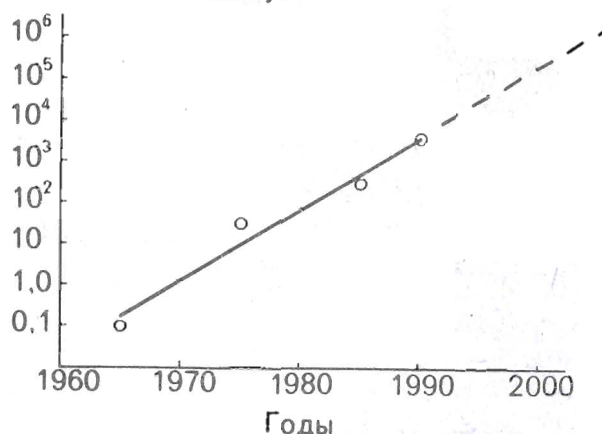


Рис. 1. Увеличение скорости секвенирования нуклеиновых кислот с 1965 по 1991 г.

генов и их структуры. По этой причине профессия "охотника за генами" становится весьма популярной и хорошо финансируемой. Многие лаборатории специализируются на поисках определенного гена или генов и их секвенировании. Однако в долговременном аспекте лозунг "одна лаборатория — один ген" или даже "одна лаборатория — несколько генов" бесперспективен. Действительно, геном человека содержит десятки или сотни тысяч генов, и существуют сотни, даже тысячи других организмов, гены которых интересны для исследования. Было бы непоправимой роскошью в отношении как затрат времени, так и материальных средств исследовать и секвенировать в отдельности тысячи и миллионы генов. Впервые это стало очевидным для онкогенов [1]. Уже открыто много онкогенов благодаря огромным затратам и усилиям прекрасных научных коллективов. Однако пока совершенно неясно, сколько их еще предстоит найти и во сколько это обойдется. Все это привело к созданию новой парадигмы, которую можно назвать "обратная биология". В классической биологии исследование продвигается в направлении от функции к гену. В "обратной биологии" процесс как раз противоположный: от изучения структуры всех генов в организме к пониманию того, как функционирует организм, начиная от молекулярного и кончая экологическим и эволюционным уровнями. Горячим проповедником второго подхода является У. Гилберт [2].

Вторым аргументом в поддержку геномных программ является сама возможность картирования и секвенирования. На рис. 1 показано, как возросла скорость секвенирования нуклеиновых кислот за последние примерно 25 лет. Первым секвенированным биополимером был небольшой белок инсулин. Ф. Сэнгер определил его первичную структуру, разработав так называемый "блочный подход". Сначала молекула инсулина была разрезана с помощью специфических протеиназ на несколько перекрывающихся пептидных блоков. Определялась аминокислотная последовательность каждого блока, а перекрывание блоков позволило Сэнгеру воссоздать полную последовательность аминокислот в инсулине. Применение

такого же "блочного подхода" к нуклеиновым кислотам привело к секвенированию первых молекул тРНК в коротком временном интервале от 1975 до 1977 г. последовательно тремя ведущими лабораториями: группой Р. Холли в США, группой Х. Цахау в ФРГ и группой, возглавлявшейся А.А. Баевым в СССР. Для расшифровки 75–90 нуклеотидов в первых аланиновой, сериновой и валиновой тРНК потребовалось несколько лет при скорости дешифровки не более одного нуклеотида за 10 дней.

Совершенно иной подход к секвенированию ДНК, основанный на последовательном считывании нуклеотидов одного за другим, начиная с 5'-конца молекулы, с помощью разделения фрагментов, оканчивающихся на определенный нуклеотид, по их длине, был предложен в классических работах Ф. Сэнгера [3] и Максама – Гилберта [4]. Различие методов состояло в использовании либо ферментативного синтеза ДНК [3], либо специфического расщепления ДНК химическими методами [4]. Здесь следует упомянуть, что подход Максама – Гилберта был создан в результате совместного применения (для комплекса λ с-репрессор – оператор) метода метилирования ДНК диметилсульфатом [5], разработанного в нашей лаборатории для тестирования бороздок двойной спирали ДНК и измерения количества в ней одноцепочечных участков [6]. Важно подчеркнуть, что именно русские ученые, Васильенко с соавт. [7] в 1965 г. и Свердлов с соавт. [8, 9] в 1972 г., одними из первых высказали идею о возможности секвенирования нуклеиновых кислот путем измерения длины от одного конца фрагмента до определенного нуклеотида и использования с этой целью химического расщепления ДНК [8, 9].

При появлении методов Сэнгера и Максама – Гилберта скорость секвенирования возросла до сотен нуклеотидов в день, а использование роботов и автоматизированных секвенаторов увеличило ее до 10 тыс. нуклеотидов в день. График на рис. 1 показывает, что скорость секвенирования все время росла экспоненциально. Экспоненциальный рост, возможно, сохранится и в ближайшем будущем, поскольку большие усилия направлены на дальнейшее совершенствование существующих методов, их автоматизацию и роботизацию, а также разработку новых подходов [10]. В идеальном случае новые методы секвенирования должны быть быстрыми, простыми, относительно дешевыми и доступными для автоматизации. Одним из таких методов может стать секвенирование посредством гибридизации с олигонуклеотидной матрицей.

Секвенирование путем гибридизации с олигонуклеотидной матрицей [11, 12]

Метод основан на самом фундаментальном свойстве ДНК – способности двух комплементарных цепочек ДНК строго определенным образом взаимодействовать друг с другом с образованием специфических пар оснований Уотсона – Крика: А-Т и G-C. Реализация этого метода становится возможной благодаря появлению новых автоматизированных технологий синтеза большого числа олигонуклеотидов.

Схематически метод [11–12] проиллюстрирован рис. 2. Моделью ДНК, последовательность которой необходимо определить, служит синтетический гептадекануклеотид (рис. 2а), содержащий радиоактивную (^{32}P) или флуоресцентную метку. Набор синтетических олигонуклеотидов определенной структуры (октамеров, рис. 2а) иммобилизуют в тонком слое (10–30 мкм) полиакриламидного геля, в результате чего получают октануклеотидную матрицу, или "чип", для секвенирования (рис. 2б).

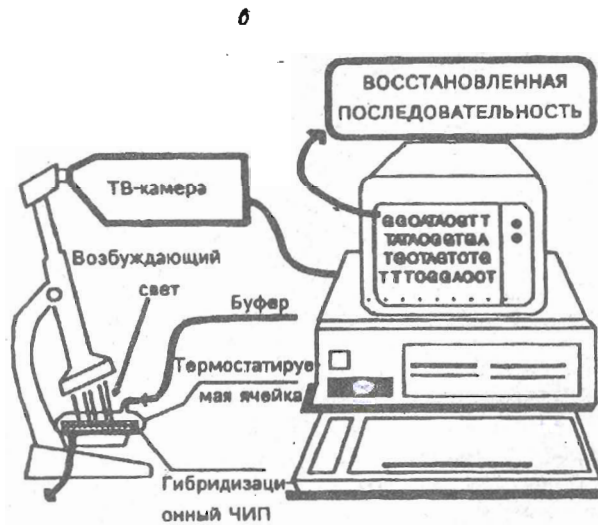
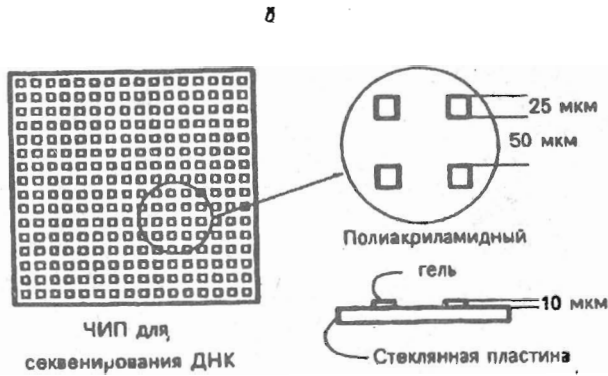
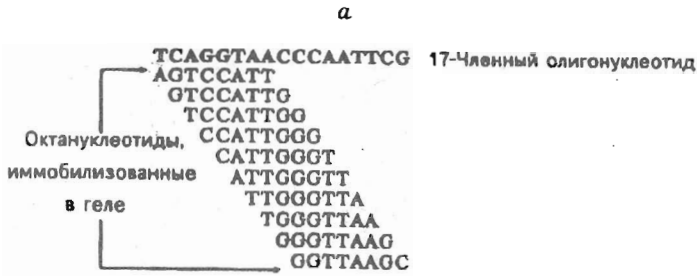


Рис. 2. Секвенирование ДНК с помощью гибридизации с олигонуклеотидной микроматрицей (секвенирующим чипом): *a* - схема модельного эксперимента; *b* - строение матрицы (чипа) для секвенирования ДНК; *в* - модель автоматического секвенсатора

Анализируемый фрагмент ДНК гибридизуют при 0°C с этой матрицей, содержащей в данном случае 10 иммобилизованных октануклеотидов, комплементарных участкам ДНК (рис. 2а). Гибридованную ДНК на матрице иммобилизованных октануклеотидов отмывают в гибридизационном буфере при постепенном повышении температуры. Во всем температурном интервале измеряют количество меченой ДНК, гибридизующейся к каждому иммобилизованному октануклеотиду, и строят кривые плавления для каждого дуплекса. Полученные в этом эксперименте данные [12] показывают, что образовавшиеся совершенные дуплексы более стабильны, чем дефектные дуплексы, содержащие хотя бы одну-единственную замену, и, таким образом, в большинстве случаев удается по изменению термостабильности отличить совершенные дуплексы от несовершенных. Соседствующие октануклеотидные фрагменты ДНК, образующие совершенные дуплексы при гибридизации с иммобилизованными октануклеотидами, перекрываются на 7 нуклеотидов. Такое перекрывание позволяет достоверно восстановить последовательность ДНК исходя из структуры октануклеотидов, образующих совершенные дуплексы (рис. 2а), а также идентифицировать положение замен оснований [12].

Для секвенирования коротких случайных последовательностей ДНК длиной до 200 нуклеотидов эффективной будет матрица всех возможных ($4^8 = 65356$) октануклеотидов. Использование матрицы более длинных олигонуклеотидов позволит секвенировать более длинные фрагменты ДНК, однако размеры матрицы будут увеличиваться в геометрической прогрессии. Можно существенно увеличить эффективность матрицы с помощью нескольких дополнительных циклов гибридизации ДНК с октамерной матрицей в присутствии специально подобранной компьютером смеси пентануклеотидов; в этом случае возможно секвенировать ДНК длиной несколько тысяч нуклеотидов [12]. В своем нынешнем виде данный подход неэффективен для секвенирования ДНК с простой последовательностью или с высоким содержанием повторов — для таких случаев следует использовать традиционные методы.

В настоящее время мы отрабатываем технологию изготовления микрочипов, в которых каждый октамер будет занимать пространство 30x30 мкм и менее. Чип, содержащий полный набор октануклеотидов, будет иметь размер порядка 2x2 см. Кроме того, в нашем институте разрабатывается прототипная модель автоматического секвенатора (рис. 2б). Он включает в себя микрочип, термостатированную камеру для гибридизации, флуоресцентный микроскоп, дополненный CCD-камерой*, и компьютер с программой распознавания образов, которая обеспечит измерение интенсивности гибридизации с флуоресцентно меченой ДНК и реконструирование последовательности ДНК на основе "библиотеки" октамеров, которые образуют с ДНК совершенные дуплексы.

Есть основания полагать, что когда метод будет полностью отработан, он позволит секвенировать более 1 млн. нуклеотидов в день при использовании сравнительно недорогого автоматического устройства. В условиях промышленного производства стоимость одного микрочипа, возможно, не превысит нескольких долларов.

Данный подход (в его весьма различных модификациях) был предложен практически одновременно в 1988 г. четырьмя группами исследователей: двумя группами в Англии [13, 14], одной в Югославии [15] и одной в Москве [11, 12]. В ноябре 1991 г. в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта (Москва) было проведено первое международное совещание по секвенированию путем гибридизации [16].

*Камера с ПЗС-матрицей (ПЗС — прибор зарядовой связи).

Участники совещания пришли к выводу, что уже в недалеком будущем метод можно будет использовать для диагностирования наследственных заболеваний и сравнения некоторых известных последовательностей ДНК. "Доводка" метода для его применения с целью полной расшифровки ДНК потребует большего времени и будет в конечном счете определяться наличием материальных ресурсов для развития этой технологии.

Определение последовательности расположения белков на геномной ДНК

В вирусах, клетках бактерий и ядрах эукариот ДНК всегда ассоциирована с различными белками, ответственными за осуществление и регулирование таких важных функций ДНК, как транскрипция, репликация и другие, а также за компактизацию ДНК в структуры нескольких уровней, как это имеет место, например, в вирусных дезоксирибонуклеопротеидах, бактериальном нуклеоиде, интерфазном хроматине ядер и метафазных хромосомах. При секвенировании определенных участков геномной ДНК или целого генома весьма желательно идентифицировать и картировать белки, связанные с данными участками, что необходимо для установления детального механизма функционирования и структурной организации ДНК.

Химическая модификация [5], ферментативный футпринтинг [17] и аналогичные им методы в комбинации с непрямым концевым мечением [18, 19] позволяют картировать, но не идентифицировать белки на геномной ДНК. Те же недостатки ограничивают использование такого эффективного метода, как замедление электрофоретической подвижности ДНК белками в геле [20].

За последние годы в нашей лаборатории был разработан ряд методов для картирования и локализации белков на ДНК, а также для идентификации остатков в белках и ДНК, непосредственно контактирующих друг с другом в их комплексах [21]. Эти подходы основаны на пришивке белков к ДНК в целых клетках, изолированных ядрах или их реконструированных комплексах с последующей идентификацией сшитых компонентов и контактирующих аминокислотных и нуклеотидных остатков. В последнее время эти подходы были усовершенствованы нами, что позволяет использовать их для изучения белков на геномной ДНК.

Картирование белков на геномной ДНК

Для картирования белков на геномной ДНК нами был ранее разработан метод гибридизации с "белковыми тенями" [22, 23] (см. схему на рис. 3). После сшивки в составе целых клеток или выделенных ядер ДНК-белковые комплексы подвергают диагональному двумерному электрофорезу. Наличие пришитых белков понижает электрофоретическую подвижность ДНК в комплексе в первом направлении пропорционально величине пришитого белка. Далее белки расщепляют прямо в геле проназой, а высвобожденные фрагменты ДНК подвергают электрофорезу во втором направлении. Несшитая статистически фрагментированная ДНК располагается в этой системе двумерного электрофореза на отдельной диагонали. Эффект замедления подвижности ДНК белками в первом направлении приводит к тому, что фрагменты ДНК, сшитые с разными белками, оказываются на разных диагоналях, причем сдвиг их относительно диагонали несшитой ДНК пропорционален размеру связанного белка. "Отклонение"

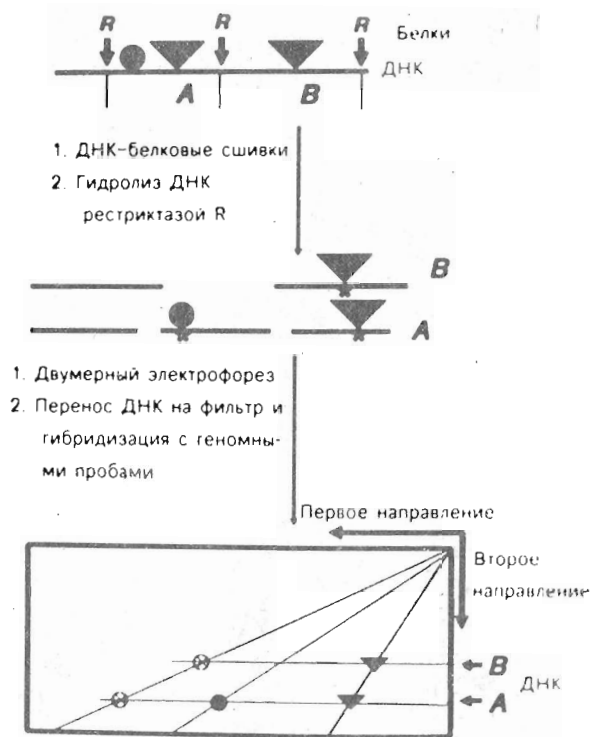


Рис. 3. Схема метода гибридизации с "белковыми тенями" для картирования белков на геномной ДНК. R - участки расщепления ДНК рестриктазами, приводящего к образованию фрагментов А и В. Кружком и треугольником обозначены два взаимодействующих с ДНК белка (второй больше первого по молекулярной массе). На схеме электрофореграммы такие же значки отвечают положению фрагментов А и В ДНК после отщепления соответствующих белков. Светлые кружки соответствуют положению фрагментов А и В ДНК, изначально с белками не связанных

диагонали можно оценить с помощью калибровочных пришитых белков и тем самым довольно точно определить кажущуюся молекулярную массу пришитого белка. Если до проведения двумерного электрофореза ДНК комплекса была случайным образом фрагментирована, то на геле будут присутствовать диагонали ДНК. С другой стороны, если ДНК подвергалась направленной рестрикции, то на соответствующих диагоналях будут наблюдаться отдельные пятна рестрикционных фрагментов. ДНК в диагоналях не содержит белков, однако положение каждой такой диагонали, являющейся как бы тенью пришитого белка, отражает размер белка. Далее ДНК переносят на фильтр и последовательно гибридизуют с мечеными ^{32}P пробами на различные участки геномной ДНК. Это позволяет определить белки, пришитые к участкам в целом геноме, соответствующим пробам.

Мы использовали четыре различных метода пришивки белков к ДНК. Первый из них (А) — это известный метод ДНК-белковой сшивки облучением целых клеток ультрафиолетом. Три других метода были разработаны в нашей лаборатории [21]. Они основаны на пришивке белков к частично апуризированной ДНК в мягких условиях в составе

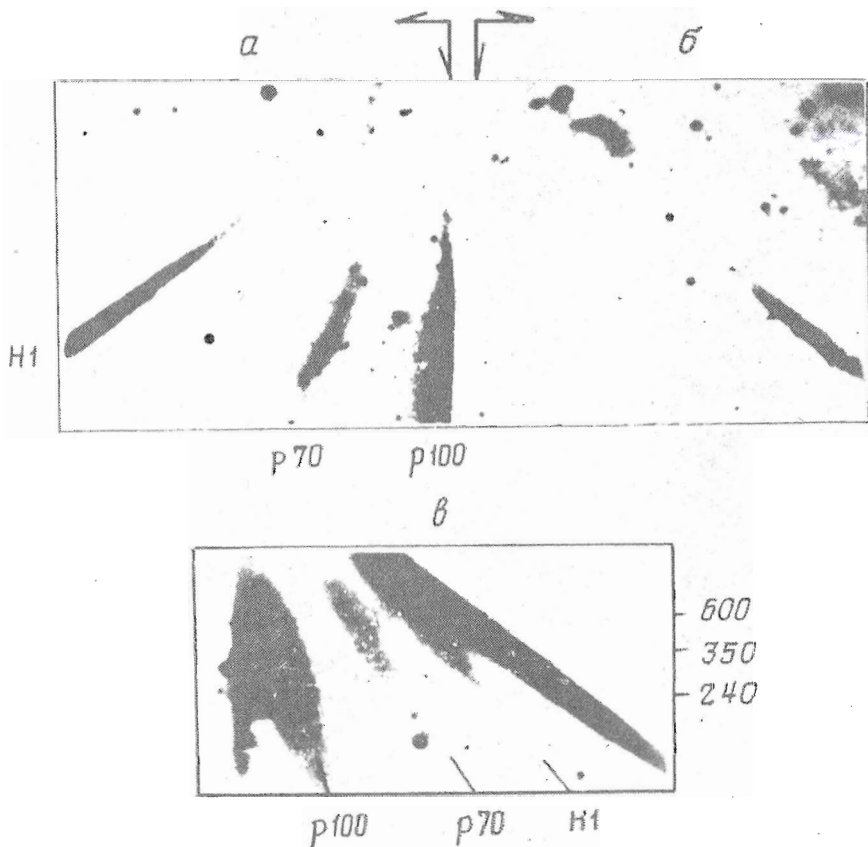


Рис. 4. Идентификация белков, связанных с промоторным участком гена теплового шока *hsp-70* дрозофилы до (б) и после активации гена (а, в). Электрофорез шитых ДНК-белковых комплексов в первом (горизонтальном) направлении и свободной ДНК во втором (вертикальном) направлении. Видны диагонали негистоновых белков p70 и p100 с молекулярной массой 70000 и 10000, а также диагональ гистона H1. в - гель высокого разрешения, где видна также диагональ гистона H1

выделенных ядер, хроматина или в реконструированных ДНК-белковых комплексах. При этом происходит ковалентное связывание белков с ДНК преимущественно по N-концевым α- и лизиновым ε-аминогруппам (Б) или по гистидиновым остаткам (В). Можно также использовать методы Б и В после предварительной и обратимой фиксации формальдегидом нуклеопротеидной структуры в составе целых клеток (Г).

Структура хроматина в различных участках генома *Drosophila melanogaster* исследовалась методом гибридизации с "белковыми тенями" [22, 23]. За неимением места мы здесь не будем останавливаться на функциональных аспектах полученных результатов.

Методы Б и В использовались нами для изучения структурных изменений в хроматине, происходящих при активации генов теплового шока *hsp-70* повышением температуры при инкубации культуры клеток [23]. Как в активном, так и в "репрессированном" хроматине все пять фракций гистонов, H2A, H2B, H3, H4 и H1, оставались связанными с ДНК

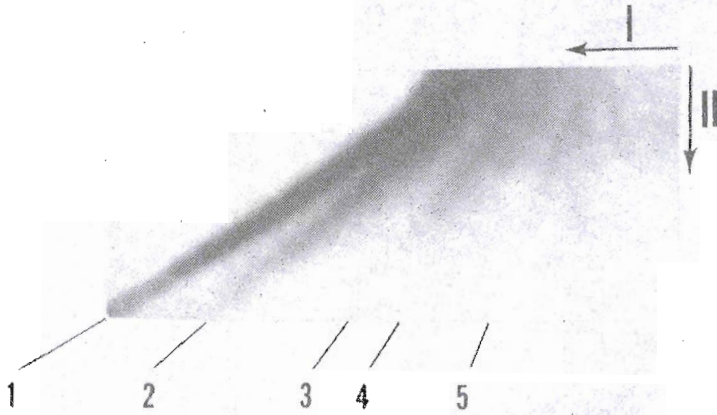


Рис. 5. Идентификация белков р11 (2), р33 (3), р60 (4) и р70 (5), связанных с ДНК вируса оспы в нативном вирионе. Диагональ I содержит непришитую, статистически фрагментированную ДНК вируса. I, II - электрофорез в 1-м и 2-м направлениях

через неструктурированные N- и C-концевые участки, в то время как взаимодействие гистонов через гистидиновые остатки, локализованные в пределах глобулярной части гистонов, в транскрипционно-активном хроматине заметно ослаблялось. Это указывает на то, что при активации генов происходит "развертывание" нуклеосом и потеря других высших структур хроматина вследствие ослабления контактов глобулярных участков гистонов с ДНК [23]. Известно, что эти контакты определяют формирование нуклеосом и структур высших порядков хроматина. Вместе с тем гистоны остаются связанными с транскрибируемой ДНК благодаря взаимодействию их неструктурированных положительно заряженных и лизинбогатых N- и C-концевых участков.

С использованием метода шивки А (УФ-облучением) установлено, что белки р70 и р100 (M 70 000 и 100 000 Да) пришиваются только к промоторному (рис. 4а, в), но не к кодирующему участку транскрибируемого гена *hsp-70* (не показано), что, возможно, связано с регуляторной функцией этих белков. Для неактивного гена *hsp* пришивка этих белков не наблюдается (рис. 4б) [24]. Два других белка, гАВР70 и гАВР50, были обнаружены на ДНК *Alu*-повтора, который предшествует транскрибируемому участку в рибосомальных генах РНК. Эти два белка связаны с промоторными элементами *Alu*-повтора и также, видимо, играют регуляторную роль. Неизвестный ранее белок р10 был обнаружен связанным в геноме с 1.688-сателлитной ДНК *D. melanogaster* [24].

С помощью метода Б были пришиты к геномной ДНК *Vaccinia virus* и таким образом идентифицированы следующие четыре белка: р11, р33, р60 и р70 [25] (см. рис. 5).

Другой подход, основанный на иммуноаффинной хроматографии, был разработан для картирования специфических белков на геномной ДНК [26]. После пришивки белков к ДНК в эристобластах цыплят или в изолированных ядрах методом А, Б или Г сшитая с этими белками ДНК была изолирована с использованием специфических антител к негистоновым

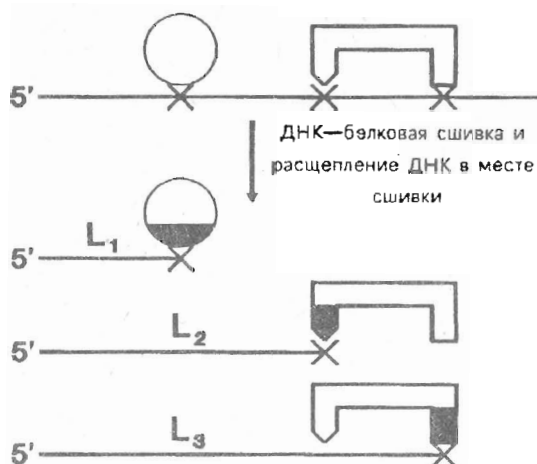


Рис. 6. Схема определения последовательности расположения белков на ДНК с помощью ДНК-белковой сшивки. Обозначены два белка, взаимодействующих с одноцепочечным фрагментом ДНК определенной длины. Один из белков имеет два ДНК-связывающих домена, после пришивки белков к одной нити ДНК и расщепления ДНК в месте пришивки, длина 5'-концевых пришитых фрагментов L₁, L₂ и L₃ определяет положение белков на ДНК

белкам HMG 14/17 и HMG 1/2 и к гистонам H1 и H5. Полученную ДНК наносили на фильтр в виде точек и последовательно гибридизовали ее прямо на фильтре с рядом проб на транскрибируемые и регуляторные участки бета-глобинового гена и неактивные в транскрипции участки хроматина. В результате этих экспериментов было показано, что транскрибируемый ген в сравнении с неактивными участками наполовину обеднен гистонами H1 и H5 и вдвое обогащен HMG 14/17. В отношении HMG 1/2 никаких различий не обнаружено. Промоторный участок бета-глобинового гена оказался обедненным всеми указанными белками [26].

Следует отметить, что вышеупомянутые фильтры для гибридизации с "белковыми тенями" и фильтры с нанесенными в точках ДНК после иммуноаффинной хроматографии могут быть многократно гибридизованы с различными пробами с получением информации о пришивке белков ко многим участкам геномной ДНК.

Картирование белков вдоль геномной ДНК можно сочетать с секвенированием соответствующих участков ДНК. После секвенирования интересующего участка клонированная ДНК или ее амплифицированная копия может гибридизоваться с фильтрами для идентификации пришитых белков. Фильтры, предназначенные для гибридизации с "белковыми тенями", можно изготавливать централизованно и распределять между занимающимися секвенированием исследователями. Таким образом программа картирования белков на геномной ДНК может быть тесно связана с программами секвенирования геномных ДНК.

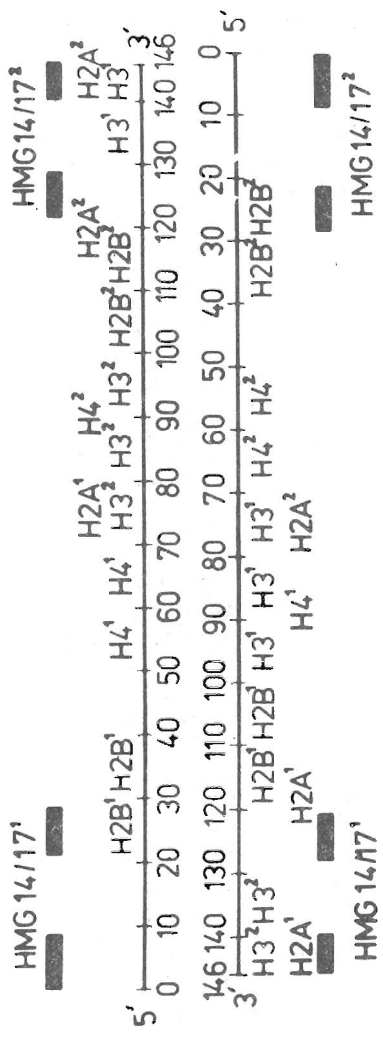


Рис. 7. Первичная организация минимальной нуклессомы, содержащей на ДНК длиной в 145 п.о. по 2 молекулы каждого из гистонов: H2A, H2B, H3, H4 и негистоновых белков HMG 14/17. Надстрочные индексы 1 и 2 обозначают каждую из двух молекул белков

Локализация белков на специфических участках геномной ДНК

Если установлено, что некий белок или белки связаны с определенным участком геномной ДНК, то часто представляет интерес их точная локализация на ДНК. Рисунок 6 иллюстрирует разработанные нами подходы для достижения этой цели. Место пришивки белка локализуется путем измерения расстояния от точки пришивки до 5'-конца ДНК в данном фрагменте. В основном это тот же подход, что используется в методе Максама — Гилберта для секвенирования ДНК, в котором измеряется расстояние от 5'-конца отрезка ДНК до места расщепления ДНК по определенным основаниям. Химия этих методов очень близка, и оба метода были разработаны примерно в одно время [4, 27, 28].

Существенным моментом нашего метода является расщепление ДНК по месту пришивки, осуществляемое таким образом, что только 5'-концевой фрагмент ДНК оказывается пришитым к молекуле белка. Это достигается применением ДНК-белковой сшивки по методу Б [28] или перевариванием пришитой ДНК с помощью нуклеазы *Eco*III от 3'-конца и до места пришивки [24].

Двумерный гель-электрофорез, описанный в предыдущем разделе, использовался для измерения длины 5'-концевых отрезков ДНК, пришитых к различным белкам. Именно таким способом было установлено представленное на рис. 7 расположение на ДНК нуклеосом всех пяти фракций гистонов, H1, H2B, H2A, H3 и H4, а также негистоновых белков HMG-14/17 [29]. Сочетание данной методики с методом гибридизации с "белковыми тенями" позволило определить последовательность расположения гистонов вдоль ДНК на специфических участках геномной ДНК и продемонстрировать отсутствие существенных различий в структуре нуклеосом в транскрибируемых и неактивных областях генома [30]. При использовании методики с *Eco*III мы определили расположение белков γ ABP 50/70, гистона H1 и белка p10 вдоль каждой из комплементарных нитей ДНК в рибосомальном *Ali*-повторе и сателлитной ДНК [24].

Нами были идентифицированы этими методами аминокислоты и гистидиновые остатки гистонов H1, H3 и H4, контактирующие со специфическими участками ДНК в нуклеосоме и хроматине [31, 32]. Для этого сшитые ДНК-белковые комплексы были наработаны в препаративных количествах. Необходимость работы с препаративными количествами сшитых комплексов ограничивает пока использование этих подходов для изучения белков, связанных с геномной ДНК в относительно малых количествах.

Разработки метода секвенирования ДНК и картирования белков на геномной ДНК были финансированы грантами gg 558 и gg 562 Государственной научно-технической программы "Геном человека".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dulbecco R.// Science. 1986. V. 231. P. 1055—1056.
2. Gilbert W.// Nature. 1991. V. 349. P. 9.
3. Sanger F., Nilken S., Coellson A.R.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463—5468.

4. Maxam A., Gilbert W.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 560—564.
5. Gilbert W., Maxam A., Mirzabekov A.// Alfred Benson Symp. IX. 1976. P. 139—148.
6. Mirzabekov A.D., Kolchinsky A.M.// Mol. Biol. Rep. 1974. V. 1. P. 379—385.
7. Василенко С.К., Демушкин В.П., Будовский Е.И.// Докл. АН СССР. 1965. Т. 162. С. 694—697.
8. Sverdlov E.D., Monastyrskaya G.S., Budowsky E.I.// FEBS Lett. 1972. V. 28. P. 231—235.
9. Sverdlov E.D., Monastyrskaya G.S., Chestukhin A.V., Budowsky E.I.// FEBS Lett. 1973. V. 33. P. 15—17.
10. Hunkapiller T., Kaiser R.J., Koop B.F., Hood L.// Science. 1991. V. 254. P. 59—67.
11. Лысов Ю.П., Флорентьев В.Л., Хорлин Л.А., Храпко К.Р., Шук В.В., Мирзабеков А.Д.// Докл. АН СССР. 1988. Т. 303. С. 1508—1511.
12. Khrapko K., Lysov Yu., Khorlin A., Ivanov I., Yershov G., Vasilenko S., Florentiev V., Mirzabekov A.// DNA Sequence. 1991. V. 1. P. 375—388.
13. Southern E.// PCT/GB89/00460. 1989.
14. Bains W., Smith G.C.// J. Theor. Biol. 1988. V. 135. P. 303—307.
15. Drmanac R., Labat I., Brukner I., Crkvenjakov R.//Genomics. 1989. V. 4. P. 114—128.
16. Moscow Workshop on Sequencing by Hybridization //Human Genome News. March 1992. P. 12—16.
17. Galas D.J., Schmitz A.// Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. P. 3157—3170.
18. Nedospasov S.A., Georgiev G.P.// Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1980. V. 92. P. 532—539.
19. Wu C.// Nature. 1980. V. 286. P. 854—860.
20. Freid M., Crothers D.// Nucl. Acids Res. 1981. V. 9. P. 1605—1625.
21. Mirzabekov A., Bavykin S., Belyavsky A., Karpov V., Preobrazhenskaya O., Shick V., Ebralidse K.// Meth. Enzymol. 1989. V. 170. P. 386—408.
22. Karpov V., Preobrazhenskaya O., Mirzabekov A.// Cell. 1984. V. 36. P. 423—431.
23. Nacheva G., Guschin D., Preobrazhenskaya O., Karpov V., Ebralidse K., Mirzabekov A.// Cell. 1989. V. 58. P. 27—36.
24. Belikov S.V., Belgovsky A.I., Preobrazhenskaya O.V., Karpov V.L., Mirzabekov A.D. 1992 (submitted).
25. Приходько Г.Г., Чхеидзе А.И., Урманов И.Х., Карпов В.Л., Петрушина С.И., Василенко С.К., Мирзабеков А.Д.// Докл. АН СССР. 1992. Т. 323.
26. Postnikov Yu., Shick V., Belyavsky A., Khrapko K., Brodolin K., Nikolskaya T., Mirzabekov A.// Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 717—725.
27. Мирзабеков А.Д., Белявский А.В., Бавыкин С.Г., Шук В.В.// Докл. АН СССР. 1978. Т. 242. С. 715—718.
28. Mirzabekov A., Shick V., Belyavsky A., Bavykin S.// Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. P. 4184—4188.
29. Shick V., Belyavsky A., Mirzabekov A. // J. Mol. Biol. 1985. V. 185. P. 329—339.
30. Studitsky V., Belyavsky A., Melnikova A., Mirzabekov A.// Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 11187—11205.
31. Ebralidse K., Grachev S., Mirzabekov A.// Nature. 1988. V. 331. P. 365—367.
32. Mirzabekov A., Pruss D., Ebralidse K.// J. Mol. Biol. 1989. V. 211. P. 479—491.

A.D. MIRZABEKOV

NEW STRATEGIES OF DNA SEQUENCING AND PROTEIN
MAPPING ON GENOMIC DNA

*V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A new technique of DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix (SHOM) has been tested in model experiments. The paper also describes a number of new approaches to protein identification and their mapping on any particular region of genomic DNA.