



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ  
В ДНК МОДИФИЦИРОВАННЫМ ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

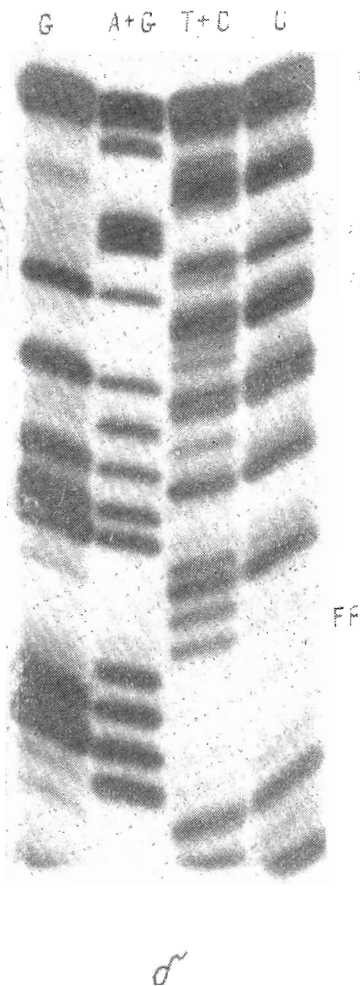
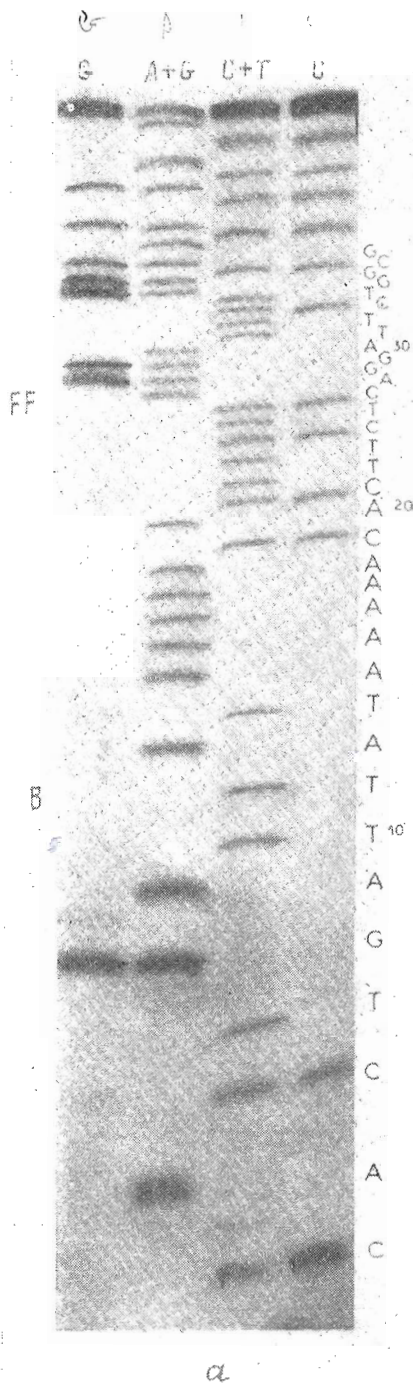
Коробко В. Г., Грачев С. А.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Для определения нуклеотидной последовательности в терминально меченных фрагментах ДНК недавно был предложен эффективный химический метод, основанный на статистическом расщеплении полинуклеотидной цепи после частичной специфической модификации по остаткам G, A, C и C + T [1]. Исследуя этим методом различные фрагменты ДНК, мы встретились с трудностями при осуществлении A-специфической дегградации и нашли, что она может быть с успехом заменена более удобной частичной апуринизацией (по реакции Бёртона [2]), которая ранее уже была использована для структурного анализа ДНК [3]. Применение этого модифицированного химического метода иллюстрируется ниже на примере определения нуклеотидной последовательности одного из рестриктивных фрагментов ДНК бактериофага f1.

Одноцепочечную ДНК f1 [(+)-цепь] гидролизовали по методу [4] нуклеазой *endoR·HaeIII* в буфере, содержащем 67 мМ Трис-HCl, pH 7,4, и 6,7 мМ MgCl<sub>2</sub> (37°, 16 ч). Образовавшиеся полинуклеотиды дефосфорилировали щелочной фосфатазой *E. coli*, 5'-рефосфорилировали Т4-полипуклеотидкиназой и [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТР, разделяли электрофорезом в пластинах полиакриламидного геля (40 × 18 × 0,15 см, градиент концентрации от 2,5 до 7,5%) в буфере, содержащем 0,05 М Трис-борат, pH 8,3, 1 мМ EDTA, извлекали из геля по методу [5] и обессоливали на сефадексе G-50. Наименьший полинуклеотид («фрагмент H» Хориучи и Зиндера [4]) представлял собой одноцепочечный 72-мер, соответствующий рестрикту *HaeIII-I* репликативной формы ДНК фага f1, картированному в С-концевой части гена IV [6, 7]; этот полинуклеотид был нами обозначен *HaeIII-I<sub>ss</sub>*.

Структуру *HaeIII-I<sub>ss</sub>* анализировали путем четырех параллельных дегградаций: положение G определяли по методу [1], C<sup>x</sup> — как в работе [1], но с гидразип-гидратом вместо безводного гидразина, C + T — аналогично C, но в отсутствие NaCl, а A + G — действием 2% дифениламина в 66% муравьиной кислоте (20°, 35—40 мин). Продукты дегградации разделяли электрофорезом в пластинах (40 × 18 × 0,15 см) 20% полиакриламидного геля в Трис-боратном буфере, содержащем 8 М мочевины. Полученный радиоавтограф и его интерпретация показаны на рисунке. Как видно из этого рисунка, частичная апуринизация достаточно дополняет информацию, получаемую при G-, C- и C + T-специфичных расщеплениях, позволяя сразу «прочитать» последовательность более 50 мононуклеотидов. При использовании гелей длиной 100 см и многократном разделении

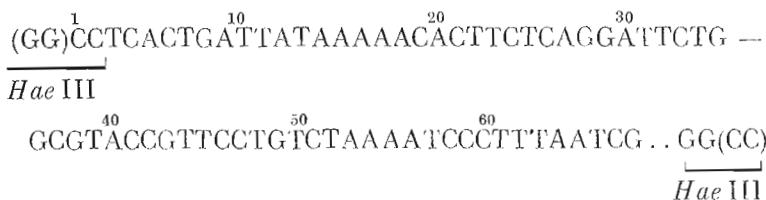


Электрофорез в полиакриламидном геле продуктов расщепления фрагмента *HaeIII-I<sub>SS</sub>* ДНК фага П. В каждом опыте 5–10 пмоль ( $1-2 \cdot 10^5$  имп/мин) анализируемого полинуклеотида. Электрофорез проводили 6 ч при 25 В/см, гель подвергли радиоавтографии (a), затем дальнейшему электрофорезу в течение 12 ч при 25 В/см и повторной радиоавтографии (b). В и FF — положения красителей-маркеров, бромфенолового синего и ксиленианола соответственно

(электрофорез, затем радиоавтография при  $-70^\circ$ , повторный электрофорез того же геля и т. д.) удастся определить в одной серии опытов 100 и более мононуклеотидов.

Для идентификации близких к 5'-концу звеньев, обычно не определяемых этим способом, *HaeIII-I<sub>SS</sub>* был гидролизован фосфодиэстеразой змеиного яда в присутствии панкреатической ДНКазы [8] и гидролизат проанализирован методом нуклеотидных карт [9]. Выясненная в результате

нуклеотидная последовательность имеет следующий вид:



Нуклеотиды 1—22 определены методом нуклеотидных карт, нуклеотиды 5—68 — модифицированным химическим методом.

Авторы выражают благодарность чл.-корр. АН СССР Г. П. Георгиеву (Институт молекулярной биологии АН СССР) за любезно предоставленный препарат нуклеазы endoR·HaeIII.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 560—564.
2. Burton K. (1967) in Methods in Enzymology, vol. XII, part A, pp. 222—224 (Grossman Z., Moldave K., eds.), Acad. Press, N. Y.—London.
3. Свердлов Е. Д., Левитан Т. Л. (1977) Биоорг. химия, **3**, 206—209.
4. Horiuchi K., Zinder N. D. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 2555—2558.
5. Maniatis T., Jeffrey A., Van de Sande H. (1975) Biochemistry, **14**, 3787—3794.
6. Van den Hondel C. A., Shoenmakers J. G. G. (1976) J. Virology, **18**, 1024—1039.
7. Van den Hondel C. A., Pennings L., Shoenmakers J. G. G. (1976) Eur. J. Biochem., **68**, 55—70.
8. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **72**, 1184—1188.
9. Sanger F. (1973) in Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—598, Acad. Press, N. Y.—London.

Поступило в редакцию  
13.VI.1977

#### SEQUENCE DETERMINATION IN DNA BY A MODIFIED CHEMICAL METHOD

KOROBKO V. G., GRACHEV S. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A modification of the Maxam and Gilbert method for sequence determination in DNA is described which employs partial depurination by Burton's reagent in place of the A-specific degradation. By this procedure combined with fingerprinting techniques, the 68-nucleotide 5'-terminal sequence in the shortest endo R·HaeIII fragment of phage  $\phi$ 1 single-stranded DNA is determined to be CCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAAATCCCTTTAATCG.