



УДК 547.963.32

НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ КАРТ

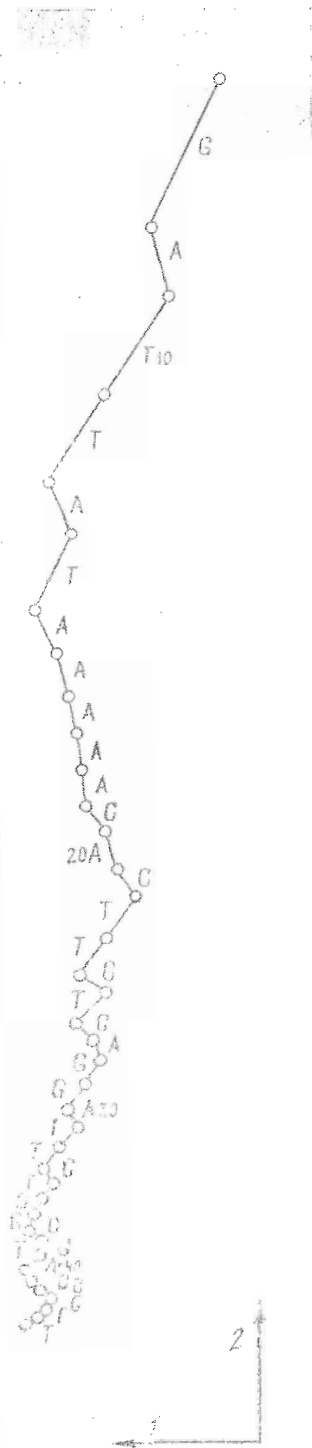
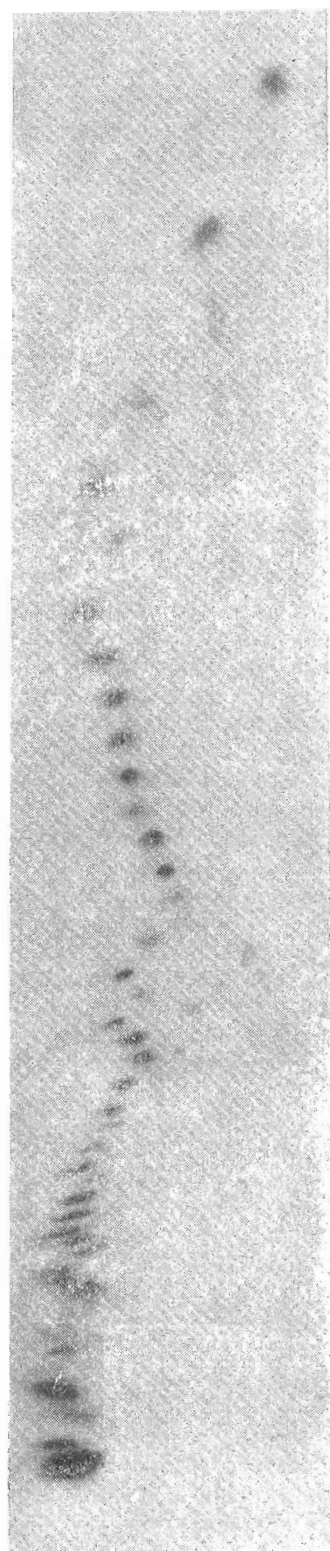
Коробко В. Г., Грачев С. А., Петров Н. А.

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

Один из важных методов структурного анализа фрагментов ДНК заключается в том, что исследуемое $5'$ - $[^{32}\text{P}]$ меченое вещество частично гидролизуют $3'$ - или $5'$ -экзонуклеазой [обычно фосфодиэстеразой змеиного яда (VPDE) или селезенки (SPDE)], продукты гидролиза подвергают электрофорезу на ацетилцеллюлозе с последующей гомохроматографией и полученную карту двухмерного разделения интерпретируют на основании эмпирических правил об изменении подвижности олигонуклеотида при отщеплении концевых звена, А, С, G или Т [1]. Этот метод нуклеотидных карт широко используется при исследовании строения коротких олигонуклеотидов (см., например, [2, 3]), но не пригоден для двухцепочечных и одноцепочечных полинуклеотидов, так как они при низких концентрациях VPDE или SPDE гидролизуются очень медленно, а при высоких концентрациях фосфодиэстеразы подвергаются полному расщеплению до мононуклеотидов. Частичный гидролиз таких фрагментов ДНК иногда удается провести с помощью панкреатической ДНКазы [3, 4] или при совместном действии ДНКазы и VPDE [5], но при этом для получения полного набора продуктов гидролиза необходимо в каждом случае специально подбирать условия реакции.

Мы разработали новый способ получения нуклеотидных карт, который отличается от существующего тем, что вместо ферментативного гидролиза расщепление полинуклеотидной цепи проводят путем гидразинолиза и апуринизации, а для разделения продуктов расщепления используют гель-электрофорез вместо гомохроматографии.

Например, для определения нуклеотидной последовательности в приготовленном из ДНК бактериофага $\phi 1$ одноцепочечном $5'$ - $[^{32}\text{P}]$ меченом 72-членном фрагменте *HaeIII*-I₅ [6] одну половину анализируемого вещества (10 пмоль, $2 \cdot 10^5$ имп/мин) обрабатывают гидразин-гидратом (С + Т-специфическая деградация по методу [7]), а вторую половину — 2% раствором дифениламина в 66% муравьиной кислоте (А + G-специфическая деградация по методу [8]). Через 30 мин при 20° продукты расщепления ДНК осаждают из реакционных растворов спиртом, объединяют, обрабатывают 30 мин 1 М пиперидином при 90°, лиофилизируют и подвергают электрофорезу на ацетилцеллюлозе (5000 В/см, 35—40 мин) при pH 3,5 по методу [1]. Разделение во втором направлении осуществляют электрофорезом (20—25 В/см, 12—16 ч) в пластинах 20% полиакриламидного геля (70 × 25 × 0,15 см) в Трис-боратном буфере, pH 8,3, содержащем 8 М мочевины. Анализируемое вещество переводят с ацетилцеллюлозы на гель



Двухмерное разделение продуктов частичного расщепления фрагмента *HaeIII-I*_{ss}. Направление 1 — электрофорез на ацетилцеллюлозе при pH 3, 5; 2 — гель-электрофорез в 20% полиакриламидном геле при pH 8,3 в присутствии 8М мочевины

электрофоретически. При таком способе переноса не происходит потери радиоактивного материала. Полученная нуклеотидная карта и ее интерпретация на основании известных правил [1—3] представлены на рисунке.

По сравнению с прежним новый способ получения нуклеотидных карт имеет ряд преимуществ, среди которых наиболее важными являются следующие:

универсальность — метод пригоден для анализа как 5'-, так и 3'-[³²P]-меченых фрагментов ДНК, он применим также к двухцепочечным ДНК, поскольку расщепление полинуклеотидной цепи проводится в условиях полной денатурации вторичной структуры;

простота и легкая воспроизводимость — практически легче контролировать чистоту химических реактивов, чем ферментных препаратов, а присутствие в анализируемом образце примесей, ингибирующих ферментативную активность, не оказывает существенного влияния на его химическое расщепление;

однозначность результатов — при химической деградации все продукты частичного расщепления полинуклеотидной цепи образуются в каждой из двух серий (A + G и C + T) с приблизительно одинаковым выходом, тогда как при ферментативной реакции некоторые продукты частичного гидролиза сильно преобладают, а другие получаются в следовых количествах. В целом апуринизация по указанной методике протекает полнее, чем гидразинолиз, вследствие чего на радиоавтографе гель-электрофореграммы пятна продуктов расщепления по A и G интенсивнее, чем продуктов расщепления по C и T; благодаря этому всегда можно однозначно отличить Pu от Py, что ранее представляло трудности в случае «нехарактерных» изменений подвижности (когда сдвиг -A сходен с -C, а -G с -T);

эффективность — благодаря высокой разрешающей способности гель-электрофореза удается определить значительно большую нуклеотидную последовательность (на рисунке — более 40 мононуклеотидов), чем с помощью гомохроматографии (до 20—25 мононуклеотидов), а при использовании более длинных гелей и многократном электрофорезе, как упомянуто в работе [6], анализируемую последовательность, очевидно, удастся еще более увеличить.

Описанный способ химического расщепления оказался также пригодным для структурного анализа коротких дезоксиолигонуклеотидов (например, синтетических 12—24-мерных олигонуклеотидов) при соответствующем увеличении продолжительности реакции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanger F. (1973) in Virus Research (Fox C. F., Robinson W. S., eds.), pp. 573—598, Acad. Press, N. Y.— London.
2. Galibert F., Sedat J., Ziff E. (1974) J. Mol. Biol., 87, 377—407.
3. Jay E., Bambara R., Radmanabhan R., Wu R. (1974) Nucleic Acids Res., 1, 331—353.
4. Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M. (1975) Nucleic Acids Res., 2, 1851—1865.
5. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D. G. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1184—1188.
6. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биооргани. химия, 3, 1420—1422.
7. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
8. Свердлов Е. Д., Левитан Т. Л. (1977) Биооргани. химия, 3, 206—209.

Поступило в редакцию
13.VI.1977

A NOVEL METHOD FOR DEOXYNUCLEOTIDE FINGERPRINTING

KOROBKO V. G., GRACHEV S. A., PETROV N. A.

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

A method for DNA sequence determination is devised. It consists in random degradation of terminally labeled polynucleotides through partial depurination and, alternatively, partial hydrazinolysis followed by two-dimensional ionophoretic separation of the total of degradation products, first on cellulose acetate at pH 3.5 and then on polyacrylamide gel in the presence of 8 M urea. By this method either single-stranded or double-stranded DNA fragments can be fingerprinted, the sequences of about 50-nucleotide length having been determined in a single experiment.
