



## ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 547.963.32.02

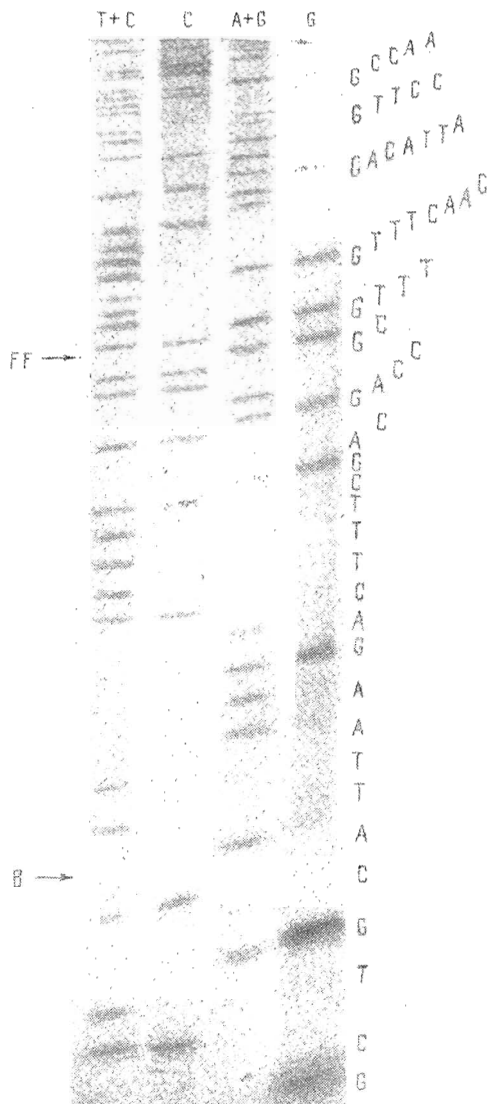
ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК  
С РАДИОАКТИВНОЙ МЕТКОЙ ВБЛИЗИ 3'-КОНЦА ЦЕПИ

Гуревич А. И., Аваков А. Э.

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

При определении нуклеотидной последовательности ДНК по Максому — Гилберту [1] до последнего времени представлялось необходимым введение терминальной радиоактивной  $^{32}\text{P}$ -метки на 5'-концы с помощью полинуклеотидкиназы и  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$  или на 3'-концы с помощью терминальной трансферазы и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rATP}$ . Недавно с той же целью было использовано введение 3'-концевого  $^{32}\text{P}$ -меченого нуклеотида с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli* и  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$  \* [2]. Последний метод требует использования избытка меченого NTP для достижения высокой удельной радиоактивности исследуемого фрагмента ДНК. В случае двуничатой ДНК использованные ранее способы введения метки делали необходимым последующее разделение нитей либо эндонуклеазное расщепление меченой с двух сторон молекулы. При дальнейшей химической модификации в применяемых обычно условиях реагирует один нуклеотид в цепи длиной 100—300 пар нуклеотидов. Это обстоятельство при статистическом характере модификации делает весьма маловероятной возможность дважды модифицировать одинаковые остатки нуклеотидов в одной молекуле. Мы считали, что в таком случае для модификации и определения нуклеотидной последовательности ДНК можно использовать не только терминальную, но и расположенную вблизи одного из концов радиоактивную метку. Метку с таким расположением можно вводить в двуничатую ДНК путем достройки с помощью ДНК-полимеразы I выступающих «лишних» концов, образующихся при фрагментации ДНК различными рестриктазами (например, *EcoRI*, *HpaII* и др.). Наличие у ДНК-полимеразы I 3'-экзонуклеазной активности делает необходимым применение избытка NTP (немеченого), который служит источником концевых остатков нуклеотида, а для введения метки при этом можно использовать стехиометрические количества  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{NTP}$ , являющегося источником отстоящего от конца остатка нуклеотида. Это позволяет избирательно вводить метку лишь в один из двух концов фрагмента, если выступающие 5'-концы имеют различную последовательность или если выступает 5'-конец только одной нити. Такое введение радиоактивной метки с помощью ДНК-полимеразы I мы уже проводили ранее [3]. Образующиеся в резуль-

\* Поскольку статья посвящена структуре ДНК, префикс d всюду опущен.

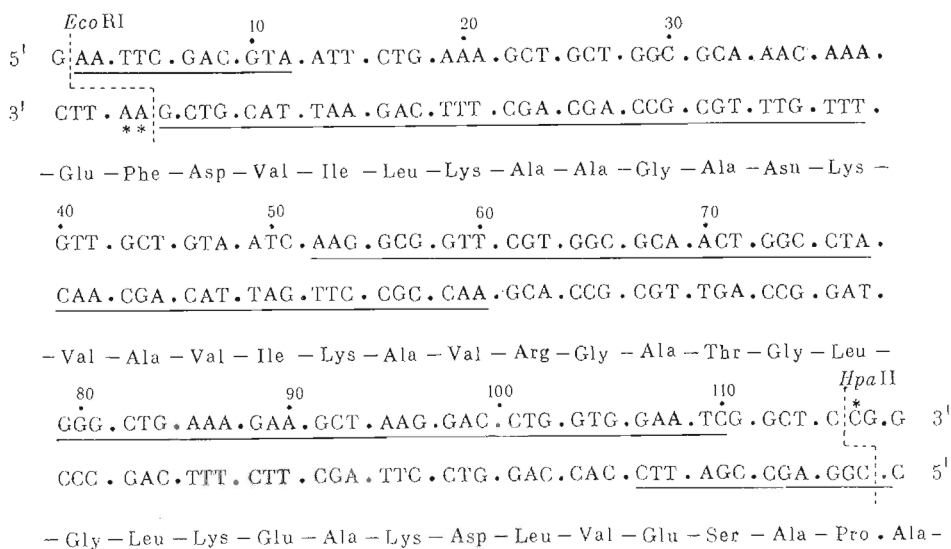


Электрофорез в полиакриламидном геле (2 ч, 40 В/см) продуктов расщепления *EcoRI/HpaII*-фрагмента структурного гена белка L7(L12) *E. coli*, меченого  $^{32}\text{P}$ . В каждый опыт брали 2—4 пмоль ( $1\text{--}2 \cdot 10^5$  имп/мл) анализируемого полинуклеотида. Приведена радиоавтография гелей; B и FF — бромфеноловый синий и ксиленианол FF

тате меченые фрагменты можно непосредственно, без разделения нитей или расщепления другими рестриктазами, использовать для определения нуклеотидной последовательности по Максому — Гилберту. Следует отметить, что нетерминальное расположение метки допускает образование (после химической модификации) полинуклеотидов одинаковой длины, но различающихся между собой, поскольку возможна модификация по обе стороны от метки. Однако это касается лишь немногих (2—4) наиболее длинных составляющих в наборе продуктов модификации, строение которых обычно можно вывести на основании известных сайтов действия использованных рестриктаз.

В качестве примера использования предлагаемого способа мы определили нуклеотидную последовательность фрагмента, выделенного из ДНК трансдуцирующего фага  $\lambda$ rif<sup>d</sup> 47 после ее расщепления рестриктазами *EcoRI* и *HpaII*. Этот фрагмент представляет собой часть структурного гена рибосомного белка L7(L12) *E. coli*, аминокислотная последовательность которого была определена ранее [4]. Согласно этой последовательности, в структурном гене имеется единственный возможный сайт узнавания рестриктазой *EcoRI*, G<sup>↓</sup>AATTC (аминокислотные остатки...Glu-Phe...), что позволяет легко расположить в изучаемом фрагменте ДНК рамку считывания генетической информации.

Избирательное введение метки в выступающий *EcoRI*-конец фрагмента мы проводили достройкой с [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]АТФ и немечеными GTP, CTP и TTP, а введение метки в выступающий *HpaII*-конец — достройкой с [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP и немечеными АТФ, ТТФ и GTP. Последовательность нуклеотидов в меченных таким способом цепях фрагмента была определена по модифицированному методу Максама — Гилберта [5] (см., например, рисунок), а концевые участки секвенированы с помощью фингерприствирования. В результате проведенного нами структурного анализа установлена последовательность двунитчатого фрагмента длиной 118 пар нуклеотидов:



Подчеркнуты экспериментально найденные последовательности нуклеотидов; звездочкой отмечены остатки [<sup>32</sup>P]нуклеотидов, введенные достройкой с ДНК-полимеразой I. Указаны сайты рестриктаз *EcoRI* и *HpaII*, а также аминокислотная последовательность соответствующего участка белка L7 (L12) согласно работе [4].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **74**, 560—564.
2. Schwarz E., Scherer G., Hobom G., Kössel H. (1978) Nature, **272**, 410—414.
3. Гуревич А. И., Аваков А. Э., Киселева О. А., Колосов М. Н. (1978) Биоорганич. химия, **4**, 628—638.
4. Terhorst C., Möller W., Laursen R., Wittmann-Liebold B. (1973) Eur. J. Biochem., **34**, 138—152.
5. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорганич. химия, **3**, 1420—1422.

Поступило в редакцию  
21.IX.1978

# SEQUENCE DETERMINATION IN 3'-END PROXIMATELY LABELLED DNA

GUREVICH A. I., AVAKOV A. E.

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

Double stranded DNA restriction fragments with structurally different 5-protruding ends can be selectively labelled at the 3'-end proximal position by means of the corresponding  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ] triphosphate(s) (the latter not being the source of the 3'-terminal nucleotide) and *E. coli* DNA polymerase I. The radioactive DNA thus prepared can be sequenced directly by the Maxam-Gilbert techniques without strand separation or additional restriction ends nuclease fragmentation. The method is exemplified by the sequence determination of a 118 nucleotide long fragment generated by restriction nucleases *Eco* RI and *Hpa*II from a gene for *E. coli* ribosomal protein L7 (L12).

---