



УДК 547.963.32.02

G-СПЕЦИФИЧЕСКОЕ РАСЩЕПЛЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
РЕСТРИКТНЫХ ФРАГМЕНТОВ ДНК ФАГА M13

Коробко В. Г., Грачев С. А., Колосов М. Н.

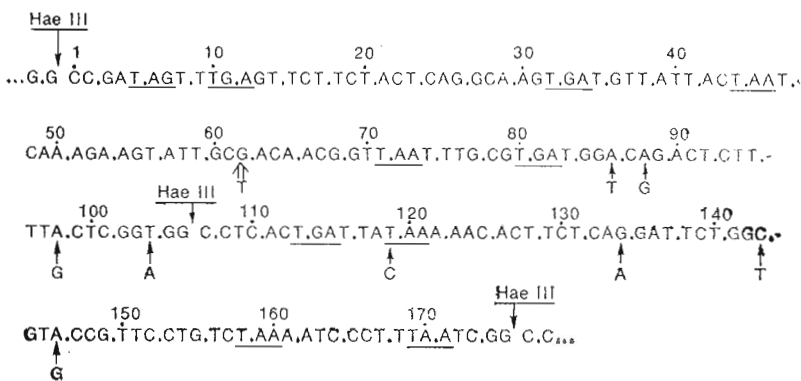
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР, Москва

При определении нуклеотидной последовательности одноцепочечных ДНК с помощью известного метода Максама — Гилберта [1] мы обнаружили, что так называемая G-специфическая деградация сопровождается в заметной степени расщеплением полинуклеотидной цепи по дезоксиаденозиновым и в особенности по дезоксицитидиновым звеньям. Мы нашли, что G-специфичность расщепления ДНК можно существенно повысить, если на стадии метилирования реакцию проводить не в какодилатном буфере, рН 8 (как рекомендовано авторами метода [1]), а в кислом растворе — при рН, промежуточном между pK_a дезоксигуанозинфосфата, с одной стороны, и дезоксицитидин- и дезоксиаденозинфосфата — с другой (соответственно pK_a 2,9; 4,6 и 4,4 [2]). Используя эту и описанную нами ранее [3] модификации, мы определили нуклеотидную последовательность рестриктных фрагментов *HaeIII*-H и *HaeIII*-I ДНК фага M13 [4].

В качестве источника ДНК мы использовали гибридный фаг M13 mp1, несущий часть лактозного оперона *E. coli* [5]. Одноцепочечную ДНК M13 mp1 [(+)-цепь] гидролизовали нуклеазой *endoR*·*HaeIII*, как описано в работе [3] для ДНК *f1*. Образовавшиеся полинуклеотиды дефосфорилировали щелочной фосфатазой, затем рефосфорилировали при помощи [γ - 32 P] АТФ (2000—3000 Ки/ммоль) и T4-полинуклеотидкиназы и разделяли электрофорезом в пластинах (40 × 18 × 0,04 см) 3% полиакриламидного геля.

Нуклеотидную последовательность одноцепочечных фрагментов *HaeIII*-H и *HaeIII*-I определяли путем четырех расщеплений в параллельных опытах. Расщепления по C, C + T и A + G проводили, как описано в работе [3]. Для G-специфического расщепления образец вещества (2—5 · 10⁵ имп/мин) в 50 мкл 0,1 М форматного буфера, рН 3,5, смешивали с 2 мкл диметилсульфата при 20° (фрагменты *HaeIII*-H и *HaeIII*-I метилировали соответственно 15 и 12 мин), а затем обрабатывали по методике [1]. Продукты деградации разделяли электрофорезом в пластинах (40 × 18 × 0,04 см) 15% полиакриламидного геля.

Установленная таким образом нуклеотидная последовательность фрагментов *HaeIII*-H и *HaeIII*-I представлена на рисунке. Она содержит 10 терминирующих триплетов и, за исключением единственной замены в положении 62, полностью совпадает с выясненной недавно [6] нуклеотидной последовательностью соответствующих фрагментов ДНК родственного фага *f1*. Интересно также, что эта последовательность очень близка



Нуклеотидная последовательность фрагментов *HaeIII*-II (1—106) и *HaeIII*-I (107—175) ДНК бактериофага М13. Подчеркнуты терминирующие триплеты. Нуклеотидные замены в ДНК фага *fd* (см. список) показаны стрелкой (↑), в ДНК фага *f1* [6] — двойной стрелкой (↑↑)

к последовательности, найденной для другого нитчатого фага — *fd**, и отличается от нее лишь 8 заменами, 7 из которых приходится на последнюю букву триплетта и не изменяют его смысла, т. е. не вызывают замен в аминокислотной последовательности, кодируемой этой частью фагового генома.

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН СССР Г. П. Георгиеву (Институт молекулярной биологии АН СССР) за препарат нуклеазы *endo*·*HaeIII*, проф. Б. Мюллер-Хияллу (Институт генетики Кёльнского университета, ФРГ) за штамм фага М13 *mp1* и д-ру Х. Шаллеру (Гейдельбергский университет, ФРГ) за неопубликованные данные о первичной структуре ДНК фага *fd*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maxam A. M., Gilbert W. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560—564.
2. Dunn D. B., Hall R. H. (1975) in Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. Nucleic Acids — vol. 1. (Fasman G. D., ed.), 3rd ed., CRC Press, Cleveland, pp. 196—201.
3. Коробко В. Г., Грачев С. А. (1977) Биоорг. химия, 3, 1420—1422.
4. Van den Hondel C. A., Shoemaker J. G. G. (1976) J. Virology, 18, 1024—1039.
5. Messing J., Gronenborn B., Müller-Hill B., Hofscheider P. H. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 3642—3646.
6. Грачев С. А., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Петров Н. А. (1978) Биоорг. химия, 4, 569—570.

Поступило в редакцию
6.VI.1978

G-SPECIFIC DEGRADATION OF SINGLE STRANDED DNA. SEQUENCE DETERMINATION IN *HAEIII* RESTRICTION FRAGMENTS OF PHAGE M13 DNA

KOROBKO V. G., GRACHEV S. A., KOLOSOV M. N.
*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

For sequencing single stranded DNA, the Maxam — Gilbert procedure of DNA methylation was modified since, after piperidine treatment, it resulted in a marked DNA cleavage not only at G, but also C and, to a lesser extent, A residues. The G-specificity of the

* Частное сообщение Х. Шаллера (Гейдельбергский университет, ФРГ).

degradation was greatly improved by reacting DNA with dimethyl sulphate in an acid formate buffer (pH 3,5) where A and C should largely be protonated. Another modification used was substitution of partial depurination (with Burton's formic acid — diphenylamine reagent) for the conventional A-specific degradation. The primary structure of phage M13 single stranded DNA was analysed by the Maxam — Gilbert method thus modified, and a 175 nucleotide long sequence of *Hae*III restriction fragments H and I was determined. The sequence turned out to be almost identical with and very similar to the corresponding sequences found in related phages *f1* and *fd*, respectively.
