

Наталья Броуде

## История одной Нобелевской премии, или Как были разработаны химические методы секвенирования



Статья в Википедии, посвящённая Уолтеру Гилберту (W. Gilbert), до недавнего времени сообщала, что Гилберт вместе со своим аспирантом Максамом (A. Maxam) разработали новый метод секвенирования ДНК[1] (1977), используя методы химической модификации[2], разработанные А.Д. Мирзабековым. Метод получил название метод Максама-Гилберта. В 1980 году У. Гилберт (вместе с Ф. Сенгером) получил Нобелевскую премию за разработку новых методов секвенирования ДНК. Последний раз, что я заглянула в Википедию, фамилии Мирзабекова в статье о Гилберте уже не было. Какова же была история разработки химических методов секвенирования? И почему в этой истории остаются вопросы?

В декабре 1964 года я защитила диплом на химическом факультете МГУ и с января 1965 начала работать в должности лаборанта в Институте химии природных соединений АН СССР (сокращённо ИХПС, сейчас это Институт Биоорганической химии, ИБХ). На самом деле я уже работала в этом институте последние два с половиной года (начиная с 1963 г), сначала будучи там на годовой студенческой практике, а потом работая над дипломным проектом. Работала я в лаборатории химии углеводов и нуклеиновых кислот, которой заведовал Николай Константинович Кочетков. Группой, занимавшейся нуклеиновыми кислотами (НК), руководил Эдуард Израилевич Будовский. Основной тематикой нуклеотидной группы была химическая модификация нуклеиновых оснований[3]. Первоначальной целью этих работ была чисто практическая задача — использовать химическую модификацию нуклеиновых оснований, чтобы разрезать нуклеиновую кислоту в определенных, заранее известных положениях, например только по адениновым основаниям[4], или только по пиримидиновым основаниям[5]. Причина этого заключалась в том, что в то время (начало 60-х) речь шла только о секвенировании РНК и секвенировании так называемым блочным методом, который был использован ранее для определения структуры белков. Суть блочного метода заключается в расщеплении полимерной молекулы на короткие фрагменты несколькими принципиально разными методами. Если при каждом расщеплении получают различные перекрывающиеся наборы фрагментов, то сравнивая эти фрагменты между собой можно восстановить исходную последовательность. Суть блочного метода очень хорошо можно объяснить на примере с работой с текстом. Возьмем, например, фразу «Танядоилакорову», в которой мы хотим установить неизвестный нам порядок букв. Применяя блочный метод, разрежем эту последовательность по букве «а», получим фрагменты «Та», «нядоила» и «корову». Теперь разрежем эту же последовательность по букве «о». Получим фрагменты «Танядо» «илако», «ро» и «ву». Если теперь разрезать эту

же последовательность по букве «и», то мы получим еще два фрагмента «Танядои» и «лакорову», которые позволят нам восстановить исходную фразу «Танядоилакорову».

Понятно, что расщепление на фрагменты является лишь первым шагом в блочном методе. Далее следует очень важный этап, которым является анализ всех расщепленных фрагментов. На бумаге легко сказать, что мы получили такие то фрагменты, а на практике каждый фрагмент должен быть выделен, дополнительно расщеплен, изучен и идентифицирован. Здесь еще очень важно подчеркнуть разницу между белками и нуклеиновыми кислотами. Белки состоят из 20 различных компонентов (аминокислот) и этим больше напоминают текст с различными буквами. Нуклеиновые кислоты гораздо более монотонны, так как состоят только из 4 различных компонентов (А, Т/У, G, С). В этом заключается дополнительная трудность в секвенировании НК и встает вопрос о применимости блочного метода для секвенирования ДНК.

Из описания принципа блочного метода ясно, что для его использования для секвенирования необходимо как минимум два важнейших условия: наличие чистого гомогенного препарата НК и наличие методов специфического расщепления НК по нуклеиновым основаниям А, Т, С и G. Вот этой задачей и занималась группа Будовского в ИХПС начиная с середины 60-х годов.

В 1965 г в лаборатории появился новый сотрудник, Евгений Давидович Свердлов. Он только что защитил кандидатскую диссертацию на химическом факультете МГУ и был принят на работу в ИХПС. С его приходом тут же стало ясно, что в лаборатории появился новый лидер. Тот, кто работал в коллективе, понимает, что настоящих лидеров не назначают, они ими становятся сами. Вот таким лидером стал Женя Свердлов, как его все тогда называли. Его появление в лаборатории практически совпало с разделением лаборатории на две неравные части. Очень вскоре (1966) Н.К. Кочетков был назначен на пост директора Института органической химии АН СССР, куда перешла вся группа сотрудников, занимавшихся углеводами, а группа сотрудников, занимавшихся нуклеиновыми кислотами, осталась в ИХПС, и заведующим новой лабораторией стал Э.И. Будовский.

Еще при Кочеткове и под его руководством все кандидаты химических наук нашей группы участвовали в написании книги «Органическая химия нуклеиновых кислот» (1). Эта книжка стала настольным справочником для всех тех, кто занимался тогда нуклеиновыми кислотами (она была переведена на английский). Ее называли «белая книга», и она до сих пор остается всеобъемлющим справочником по химии НК. Вклад Свердлова в эту книгу был самым существенным.

В 1965–1966 годах были расшифрованы первые структуры нескольких транспортных тРНК, самых коротких известных тогда молекул НК (тРНК). тРНК были тогда единственными возможными объектами секвенирования благодаря трем обстоятельствам: во-первых, они были тогда самыми короткими известными НК — 70–80 нуклеотидов; во-вторых, они были доступны в достаточно чистом виде в достаточных количествах; и, в-третьих, они содержали так называемые «минорные компоненты», которые служили дополнительными маркерами при блочном методе секвенирования, что облегчало реконструкцию первичной структуры. Важно заметить, что ни в одной из трех первых работ по секвенированию тРНК не была использована химическая модификация для специфического расщепления молекулы; во всех работах использовались ферменты. Два обстоятельства объясняют этот факт: во-первых, химические методы были недостаточно разработаны для практического использования в секвенировании. Во-вторых, были

обнаружены и выделены новые специфические РНКазы, которые и были успешно использованы при секвенировании тРНК.

Тем не менее, работы по химической модификации НК усиленно продолжались в нашей лаборатории. Здесь важно вспомнить, что в июне 1970 г во время огромного международного симпозиума по химии природных соединений в Риге, умер директор нашего института академик М.М. Шемякин. Вместо него директором стал молодой доктор химических наук Ю.А. Овчинников. С его приходом многое в институте изменилось. Овчинников, который работал подолгу в лучших европейских и американских лабораториях, хорошо понимал, что будущее всей химии природных соединений, белков в первую очередь, находится в зависимости от определения их структуры. А это означало, что нужна работа с генами, а, следовательно, с ДНК. Поэтому, став директором института, он усиленно пытался убедить заведующих лабораториями перейти на тематики, связанные с ДНК. Так, например, лаборатория М.Н. Колосова, занимавшаяся до того тетрациклиновыми антибиотиками, была переведена на работы по синтезу ДНК. В дальнейшем все олигонуклеотиды, праймеры и зонды синтезировались в его лаборатории. Лишь наша лаборатория химии нуклеиновых кислот, руководимая Будовским, упрямо оставалась на прежних тематиках, (а следовательно, все продолжали работать с РНК). В результате наша лаборатория стала предметом критики директора на всех ученых советах. Ирония ситуации, однако, заключалась в том, что работы с ДНК уже несколько лет велись в лаборатории в группе Свердлова. Однако, эти работы не приветствовались и не афишировались Э.И. Будовским; более того, он им активно мешал, не давая Свердлову сотрудников и критикуя его на лабораторных семинарах. Отношения Будовского и Свердлова стремительно ухудшались, так же как и здоровье Свердлова. Он несколько раз попадал в больницу АН СССР с подозрением на сердечные проблемы, пока очередной приступ не произошёл в Германии, где врач предположил, что проблема не в сердце, а в нервах.

Наконец, на одном из ученых советов, во время очередной критической речи Овчинникова в адрес лаборатории Будовского, Свердлов попросил слова и в 5-минутном выступлении коротко изложил суть своих работ. «Я это слышу в первый раз, никогда не слышал этого от вашего заведующего» — сказал Овчинников, выслушав Свердлова. С этого момента судьба Свердлова переменилась, его группа была выделена из лаборатории Будовского, и он начал успешную работу, приведшую позднее к секвенированию генов РНК полимеразы[6], клонированию и производству интерферона в СССР, секвенированию обеих субъединиц Na, K-АТФазы и другим успешным проектам.

В чем же заключались работы Свердлова, которые он вел еще в конце 60-х в лаборатории Будовского? В декабре 1972 года группа Свердлова опубликовала в журнале FEBS Lett. работу под названием «Новый подход к структурному анализу олигонуклеотидов[7]» с авторами Свердлов, Монастырская, Будовский и Грачев (2). В июне 1973 в этом же журнале была опубликована вторая статья под названием «Первичная структура олигонуклеотидов. Частичная апуринизация[8] как метод определения положения пуринов и пиримидинов» с авторами Свердлов, Монастырская, Честухин и Будовский (3). В этих двух статьях был описан принципиально новый подход к секвенированию олигонуклеотидов.

Новая идея, которая сейчас кажется абсолютно очевидной и тривиальной, состояла в том, что структура полинуклеотида известна, если известно положение каждого нуклеотида (А, G, T, C) в цепи, а определить это положение можно, если знать расстояние каждого нуклеотида до конца фрагмента. Действительно, если мы имеем гексануклеотид[9] ATGGCA и знаем, что А находится на 1 ом и 6 ом месте от левого

конца, Т находится на втором, G — на 3-ем и 4-ом, а С на 5-ом, то мы знаем первичную структуру всего олигонуклеотида. Для такого подхода к секвенированию нужно знать координаты двух точек: конца олигонуклеотида и положения данного звена: А,Т G, и С. Эта идея была абсолютно революционной в 1972/73 годах, так как она представляла собой принципиально новую альтернативу блочному методу и могла быть использована для секвенирования ДНК. Нужно подчеркнуть, что не многие поняли и оценили эту идею. Как мы теперь знаем, в это же время Ф. Сенгер руководствовался такой же идеей при разработке своего метода ферментативного секвенирования.

Свердлов подошел к проблеме секвенирования ДНК, используя методы химической модификации и работая с короткими синтетическими олигонуклеотидами. Для определения количества фрагментов использовалась радиоактивная метка, а разделение фрагментов проводилось ионообменной хроматографией на колонках, что позволяло определить заряд и тем самым длину нуклеотида..

В первой статье Свердлова описана работа с пентануклеотидом[10] С-С-А-С-G, который был химически модифицирован смесью О-метилгидроксиламина и бисульфита, что превратило цитозины в отрицательно заряженные производные цитозина. О-метилгидроксиламин[11] был радиоактивно мечен, таким образом метился не конец, а модифицированный цитозин. Далее, авторы выделили фракцию моно-модифицированных олигонуклеотидов, т.е. те олигонуклеотиды, в которых лишь один из трех цитозинов был модифицирован. На следующей стадии модифицированный и немодифицированный олигонуклеотиды были расщеплены двумя разными фосфодиэстеразами[12], которые не расщепляли фосфодиэфирную[13] связь после модификации цитозина. Сравнивая профили ионно-обменной хроматографии модифицированного и немодифицированного олигонуклеотидов и профили радиоактивности, авторы смогли уверенно заключить, что цитозины находятся в положении 1, 2 и 4 считая от 5' конца. В конце статьи авторы заключают, что аналогичный подход может быть применен к трем другим нуклеиновыми основаниям, что позволит определить структуру любого нуклеотида.

Во второй статье авторы сообщили о методе, позволяющем определить положения пуриновых оснований в олигонуклеотидах. На этот раз тетрануклеотид[14] TGTG был радиоактивно помечен с 5'-конца и частично (partially, incomplete, randomly) апуринизован, т.е. в среднем один гуанин<sup>4</sup> был отщеплен от каждой молекулы тетрануклеотида. Затем олигонуклеотид был химически расщеплен по местам апуринизации<sup>8</sup>, а исходный тетрануклеотид удален ферментативным гидролизом. Ионообменная хроматография показала наличие метки во фракции моно- и три-нуклеотидов. Таким образом, можно было определенно заключить, что гуанины находились в положениях 2 и 4 с 5' конца.

Подводя итог этому длинному описанию следует подчеркнуть несколько важных фактов. Во-первых, в этих двух статьях впервые был предложен альтернативный метод определения структуры ДНК, принципиально отличающийся от блочного метода — предложено определять структуру олигонуклеотида по положению отдельных звеньев (А, Т, G, С) в цепи, считая от 5'-конца. Во — вторых, был введен принцип равномерной или статистической химической модификации. В третьих, впервые химическая модификация была успешно использована для ограничения действия ферментов с целью секвенирования олигонуклеотида.

Теперь нам нужно немного отвлечься от науки и вспомнить некоторые факты, которые сыграли очень существенную роль в истории развития секвенирования, как она сейчас представляется.

Два института АН СССР, ИХПС и ИРФХБ (как они тогда назывались), находились тогда в одном здании бывшего Горного института по адресу: Москва, ул. Вавилова 32. Институты различались между собой очень существенно: если ИРФХБ всегда считался очень либеральным с директором В.А. Энгельгардтом, то наш ИХПС всегда был очень авторитарным. Тематики лабораторий могли измениться в течение месяца, если начальство считало это нужным. Несмотря на различия, эти институты имели много общего: прежде всего, это были одни из самых сильных научных центров в Советском Союзе. Расположение институтов в одном здании приводило к активному общению между сотрудниками обоих институтов. Наша лаборатория химии нуклеиновых кислот выделялась среди других лабораторий ИБХ по близости общения с ИМБ. Прежде всего это было обусловлено близостью научных интересов нашей лаборатории и большей части Института молекулярной биологии. Мы участвовали в школах по молекулярной биологии, на которых сотрудники ИМБ обычно бывали организаторами, посещали семинары, проходившие в нашем общем конференц-зале, ходили на защиты кандидатских и докторских диссертаций или вечерами пили вместе чай в какой-нибудь из лабораторий. Поскольку снабжение реагентами и особенно ферментами было проблемой, мы часто обменивались ими, если кто-то выделял большое количество белка и мог им поделиться. В результате таких общений и научного обмена все хорошо знали, кто чем занимается.

У нашей лаборатории были особенно тесные связи с лабораторией А.А. Баева в ИМБ. Эти связи основывались в первую очередь на общих научных интересах. В частности, Будовский и Кочетков в начале 60-х годов пытались участвовать в работах по секвенированию тРНК, предлагая химические методы расщепления для получения перекрывающихся фрагментов. Однако эти совместные работы не состоялись, так как химические методы были не достаточно разработаны. Во-вторых, в обеих лабораториях были очень сильные энзимологи[15]. В нашей лаборатории Арсений Честухин выделял ферменты в таком количестве и такого высокого качества, что ими пользовались оба института, и многие за пределами наших институтов. В лаборатории Баева была группа Рашель Ильиничны Татарской, в которой не только выделяли ферменты по описанным методикам, но и выделяли и характеризовали новые. Например, благодаря выделению РНазы T2[16] в группе Татарской, лаборатория Баева смогла закончить работу по секвенированию валиновой тРНК[17] в 1966 г., что было большим достижением в то время. Наконец, наши лаборатории связывали дружеские и даже некоторые родственные связи (например, моя мама, Т.В. Венкстерн, была ведущим научным сотрудником в лаборатории Баева). Короче говоря, наши лаборатории были очень хорошо информированы о работах друг друга и обменивались и препаратами, и идеями.

Андрей Мирзабеков был одним из ведущих сотрудников в лаборатории Баева в ИМБ; его карьера развивалась успешно и очень стремительно. В отличие от большинства других молодых сотрудников, он несколько раз (в 1971 и дважды в 1975 гг.) работал за границей по несколько месяцев. В 1975 году он дважды был в лаборатории Гилберта в Гарварде. Перед отъездом из Москвы он разговаривал со Свердловым, который зашел к нему за препаратом диметилсульфата, и рассказал ему о своей новой идее и оставил отпечаток одной из статей в FEBS Lett.

Нужно сказать, что в августе 1973 г. Максам и Гилберт отправили в печать статью по определению последовательности Лас оперона, олигонуклеотида длиной 27 оснований взаимодействующего с репрессором[18]. Интересно, что в работе был использован все тот же блочный метод. Для этого фрагмент ДНК был сначала транскрибирован[19] в РНК, а затем расщеплен несколькими РНказами; после этого короткие фрагменты идентифицировали по всем правилам блочного метода, разработанным еще в 60-е годы.

Таким образом ясно, что в конце 1973 года Гилберт еще не имел в виду альтернативных методов секвенирования ДНК.

В 1975 г Мирзабеков приезжает в лабораторию Гилберта, и в 1976 году появляется статья Гилберта, Максама и Мирзабекова «Контакты *Lac* репрессора с ДНК, выявленные с помощью метилирования[20]» (4). Цель этой работы лежала полностью в русле интересов и экспертизы Мирзабекова и заключалась в изучении взаимодействия *Lac* репрессора с ДНК. В этой работе присутствовали практически все элементы будущего метода секвенирования ДНК: мечение ДНК по концам, неполная химическая модификация пуринов диметилсульфатом, апуринизация и разделение фрагментов гель-электрофорезом[21]. Однако, удивительным образом авторы ни разу не упоминают возможностей такого использования метода для секвенирования. Таким образом кажется, что и в начале 1976 года ни Гилберт, ни Мирзабеков еще не осознают потенциальных возможностей химической модификации в сочетании с расщеплением и анализом фрагментов гель-электрофорезом для секвенирования ДНК.

В том же 1975 году в Киеве состоялся первый и единственный советско-американский симпозиум по молекулярной биологии. На этом симпозиуме Гилберт докладывал работу по взаимодействию диметилсульфата с ДНК (4). После его лекции Свердлов разговаривал с ним и дал ему оттиск своей статьи из *FEBS Letts*. Гилберт позднее был и у нас в лаборатории в Москве, где Будовский дал ему оттиски тех же статей. Таким образом, идея нового метода секвенирования ДНК внедрялась в Гилберта многими и со всех сторон. Ему оставалось внимательно прочесть статьи и вникнуть в суть.

И вот в 1977 году появляется статья Максама и Гилберта «Новый метод секвенирования ДНК», в которой соединены статистическая химическая модификация, мечение олигонуклеотида по концам, расщепление по модифицированным звеньям и разделение радиоактивных фрагментов гель-электрофорезом в полиакриламидном геле (5).

А вот цитаты из Нобелевской лекции Уолтера Гилберта в декабре 1980 г.(6) (английский текст приведен в приложении, чтобы можно было сверить перевод с оригиналом) ...

*“Я случайно пришел к идее химического секвенирования ДНК.... В этот момент была предложена идея новых экспериментов. Андрей Мирзабеков посетил меня в начале 1975 г. Цель его визита была двойной, во-первых, он рассказал мне о своих опытах по метилированию аденинов и гуанинов ДНК (имеются в виду работы по метилированию комплексов ДНК с гистонами), и во-вторых, он хотел убедить меня провести такие же опыты с *Lac* репрессором. Однако идея (секвенирования) появилась только после второго визита Мирзабекова. Мы обедали вместе с ним, Аланом Максамом и Джеем Гралла. Во время нашей беседы мне пришла идея эксперимента, которая в конечном итоге воплотилась в метод секвенирования ДНК”. Конец цитаты.*

Таким образом, сам Гилберт говорит о том, что новая идея секвенирования была привнесена Мирзабековым. Но Мирзабеков секвенированием не занимался, а его интерес к химической модификации ограничивался целями исследования комплексов ДНК с белками; для него химическая модификация ДНК была средством тестирования прочности контактов пуриновых оснований с белками. В то время как в статьях Свердлова было предложено и описано использование химической модификации для секвенирования ДНК.

В лаборатории Гилберта все было готово для быстрой экспериментальной проверки новой идеи. Во-первых, в лаборатории был в работе *Lac* оперон[22], достаточно длинный

фрагмент ДНК, последовательность которого была уже известна. Во-вторых, в лаборатории был разработан метод разделения двух цепей ДНК, радиоактивно меченных по 5' концам [23]. И наконец, в лаборатории уже работали с тонкими полиакриламидными гелями для разделения фрагментов ДНК электрофорезом. Не хватало арсенала различных методов химической модификации. Но с этой проблемой справился Алан Максам, используя известную реакцию цитозина и тимина с гидразином, а для пуринов метилирование диметилсульфатом, ранее предложенное Мирзабековым и использованное в работе 1976 года.

Такова история. Возникает вопрос, насколько этичными были действия участников в описываемых событиях? Статьи Свердлова были опубликованы в 1972 и 1973 гг., поэтому нет ничего предосудительного в использовании Гилбертом идей, опубликованных кем-то другим раньше. Это нормальное развитие науки. Следует также подчеркнуть, что работа Максама и Гилберта экспериментально на порядок выше работ Свердлова. Соотношение уровней приблизительно соответствует соотношению технических возможностей биохимических лабораторий в СССР и в США в конце 60-х — начале 70-х гг. Если Свердлов работал с короткими олигонуклеотидами (тетра- и гекса-мер), то Максам и Гилберт продемонстрировали возможности метода на достаточно длинном фрагменте ДНК (57-нуклеотидов). Для разделения фрагментов Свердлов использовал ионообменную хроматографию, в то время как Гилберт гель-электрофорез в полиакриламидном геле. Вместо безликих пиков на профилях элюции с колонок в статьях Свердлова читатели статьи Максама и Гилберта видели полосы на гелях и читали последовательность сами. Все вместе поставило метод секвенирования на новый технический уровень.

Принципиальной разницы однако нет: все главные идеи в двух статьях Свердлова и в статье Максама-Гилберта совпадают. Вопросы об этике возникают, когда обращаешь внимание на список библиографии, то есть на то, как цитируются работы предшественников. Гилберт знал о новом подходе по крайней мере из трех источников: сам Свердлов, объяснивший ему принцип, отиски статей из FEBS Lett., обсуждения с Мирзабековым. В статье Максама и Гилберта 1977 года в PNAS есть ссылка на статью Максама, Гилберта и Мирзабекова 1976 года и есть ссылка на «белую книгу», на расщепление метилированной ДНК пиперидином по остаткам гуанина. В этой ссылке присутствуют фамилии двух редакторов книги, Кочеткова и Будовского, но фамилии Свердлова нет. И ни в одной статье Гилберта нет ссылок на статьи Свердлова в FEBS Lett. Справедливости ради надо сказать, что правильная ссылка на Свердлова все же есть в диссертации Максама (7), но во всех публикациях Гилберта имя Свердлова старательно избегается.

Надо сказать, что эта история и действительная роль Свердлова в химическом секвенировании ДНК уже была описана Бенно Мюллер-Хиллом в книге "Las operon" (8). Он заканчивает главу о химическом секвенировании сравнением судеб двух еврейских ученых, Свердлова и Гилберта. Он приводит примеры трагических эпизодов в биографии Свердлова во время войны и благополучной судьбы Гилберта в течение всей его жизни. Он также пишет и о неблагоприятных условиях работы Свердлова в ИХПС, где его идеи не были поняты и не получили ни должной поддержки, ни развития. Статья Мюллера-Хилла очень правильно передает суть событий, однако многие детали этой истории и конкретную роль отдельных советских ученых в ней он знать не мог.

Таким образом, получилось, что имя ученого, который первым предложил альтернативу блочному методу, осталось в тени. Некоторые ученые считали, что роль Мирзабекова в развитии химического метода секвенирования недооценена. Как мы видели, его роль была

существенной, она заключалась во-первых, во внедрении методов химической модификации в лаборатории Гилберта, который был физиком-ядерщиком, а не химиком. Во-вторых, Мирзабеков благоприятствовал распространению идеи Сведлова и тем самым ускорил развитие метода. Однако, к созданию новой идеи секвенирования он отношения не имел. Недаром Гилберт включил его как соавтора только в публикацию 1976 года, где нет ни слова о секвенировании (4); (это был сборник статей симпозиума, изданный в Дании) и не включил его в главную статью в PNAS, где описывается метод. Таким образом, в действительности оказывается недооценена роль Сведлова, который не только первым предложил идею альтернативного метода секвенирования, но и показал его потенциальные возможности на коротких олигонуклеотидах. Сейчас метод химического секвенирования — метод Максама-Гилберта — используется только в редких работах; в подавляющем большинстве секвенирование проводится автоматическим методом, основанном на методе Сэнгера. Осталось не так много людей, которые знают и помнят эту историю, и еще меньше людей, которые хотят об этом писать. Поскольку все статьи опубликованы, верность изложенных научных фактов каждый может проверить сам. Однако для понимания истинной последовательности событий и правильной оценки вклада каждого участника необходимы свидетельства людей, на глазах которых развертывалась история этого важного научного достижения.

## Литература

1. Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Сведлов Е.Д. и др. Органическая химия нуклеиновых кислот, Москва 1970.
2. Sverdlov D, Monastyrskaya G.S, Budowsky E.I, Grachev M.A. (1972) A novel approach to structural analysis of oligonucleotides. FEBS Lett. 28, 231-235.
3. Sverdlov D, Monastyrskaya G.S, Chestukhin A.V, Budowsky E.I. (1973) The primary structure of oligonucleotides. Partial apurination as a method to determine the positions of purine and pyrimidine residues. FEBS Lett, 33, pp15-17.
4. Gilbert W, Maxam A, Mirzabekov A. (1976) Contacts between the lac repressor and DNA revealed by methylation in Control of Ribosome Synthesis”, 139-148, Alfred Benzon Symposium IX, Munksgaard 1976.
5. Maxam A. M, Gilbert W (February 1977). A new method for sequencing DNA. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(2): 560—564.
6. [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.pdf](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1980/gilbert-lecture.pdf)

«I came to the chemical DNA sequencing by accident”...» At this point, another line of experiments was opened up by a new suggestion. Andrei Mirzabekov came to visit me in early 1975. The purpose of his visit was twofold: to describe experiments that he had been doing using dimethyl sulfate to methylate the guanines and the adenines in DNA and to urge me to do a similar experiment with the lac repressor. It was not until after a second visit by Mirzabekov that an idea finally emerged. He and I, and Allan Maxam and Jay Gralla had lunch together. During our conversation I had an idea for an experiment, which ultimately underlies our sequencing method»

7. Maxam A. M. Thesis: Nucleotide sequence of DNA, Harvard University, 1980.
8. Muller-Hill B. In: The Lac Operon: A Short History of a Genetic Paradigm, pp.61-64.

## Примечания

[1] Секвенирование ДНК– процесс определения последовательности четырёх компонентов (А, Т, G, С) в нуклеиновых кислотах



- [2] Химическая модификация – обработка нуклеиновых кислот в лабораторных условиях разными химическими агентами. В результате химической модификации НК меняют свои свойства. В ряде случаев эти изменения можно использовать для изучения НК.
- [3] нуклеиновые основания, компоненты нуклеиновых кислот: аденин, тимин, гуанин и цитозин (А, Т, G, С)
- [4] Пурины – компоненты нуклеиновых кислот, аденин и гуанин
- [5] Пиримидины – компоненты нуклеиновых кислот, в ДНК – тимин и цитозин, в РНК – урацил и цитозин
- [6] РНК полимераза – фермент, синтезирующий РНК по матрице ДНК
- [7] Олигонуклеотид – фрагмент ДНК или РНК, может быть синтезирован в лаборатории или выделен из клетки
- [8] Апуринизация – процесс отщепления пуринов в нуклеиновых кислотах. После апуринизации ДНК становится нестабильной и может быть расщеплена по местам, в которых находились пурины.
- [9] Гексануклеотид – фрагмент ДНК, содержащий шесть звеньев
- [10] Пентануклеотид – фрагмент ДНК, содержащий пять звеньев
- [11] О-метилгидроксиламин – химический агент модифицирующий пиримидиновые основания
- [12] Фосфодиэстераза – фермент, расщепляющий ДНК на фрагменты
- [13] Фосфодиэфирная связь – вид химической связи в НК, которой связаны между собой отдельные нуклеотиды
- [14] Тетрануклеотид – фрагмент ДНК, содержащий четыре звена
- [15] Энзимологи – биохимики, занимающиеся ферментами (энзимами)
- [16] РНКаза – фермент, энзим, который расщепляет РНК
- [17] Валиновая тРНК – тРНК, переносящая аминокислоту валин к месту синтеза белка
- [18] Лас репрессор – белок, который регулирует метаболизм лактозы
- [19] Транскрипция – процесс синтеза РНК по матрице ДНК, осуществляется специальным ферментом
- [20] Метилирование — введение химических метильных групп (СН<sub>3</sub>) в ДНК, осуществляется в клетке специальными ферментами, а в лабораторных условиях может быть достигнуто обработкой ДНК химическим реагентом, диметилсульфатом.
- [21] Гель-электрофорез – метод разделения нуклеиновых кислот разной длины в гелях под воздействием электрического поля. Нуклеиновые кислоты имеют отрицательный заряд благодаря наличию фосфодиэфирной связи; чем длиннее олигонуклеотид, тем больше его отрицательный заряд
- [22] Лас оперон – лактозный оперон, фрагмент ДНК, к которому присоединяется белок-репрессор и регулирует гены, ответственные за метаболизм лактозы
- [23] 5'- конец ДНК – в полимерной цепи ДНК различаются два конца, 5'- конец обычно имеет фосфатную группу, 3'- конец обычно несет гидроксильную группу, ОН

## Комментарии

В. Шейнкер

17.08.2018

В 1980 г. Овчинников позволил Свердлову защитить докторскую диссертацию. Защита проходила в конференц-зале, который был общим для Института биорганической химии Овчинникова и молекулярной биологии Энгельгардта, где я в то время работал. Зал был набит битком, интерес к защите подогревался, помимо научной важности работ Свердлова, еще и политическими мотивами: было известно, что академик Колосов, заведующий большой лабораторией в институте Овчинникова, выступает против защиты и особенно против одного из главных выводов диссертации, заключавшегося в том, что

Свердлов предложил один из принципов, легших затем в основу метода Максама-Гилберта. Неприязнь эта по слухам объяснялась тем, что Свердлов с несколькими сотрудниками выполнял работы, которые Колосов со своей большой лабораторией провести не сумел. После короткого вступительного доклада Свердлова, огласившего основные выводы работы, было предложено задавать диссертанту вопросы. Колосов немедленно встал и спросил: «Евгений Давидович, что такое, по-вашему, «принцип»? Свердлов сказал в микрофон ассистенту, показывавшему слайды: «Слайд номер пять из дополнительных, пожалуйста», и на экране появилась фотография страницы из энциклопедического словаря, на которой было сказано: «Принцип – основное начало, на котором построено что-нибудь...». Зал взорвался от хохота. Дальновидный Свердлов предугадал вопрос Колосова и заранее приготовил ему ответ.