



УДК 577.213.3:577.113.4

СУБСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА ФОСФАМИДНЫХ АНАЛОГОВ
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ В СИСТЕМЕ
ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ I *E. COLI*Загребельный С. П., Закабушин А. И., Меламед Н. В.,
Ореикова С. Ф., Хрипин Ю. Л.Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт
биологически активных веществ (НИКТИ БАВ), г. Бердск
Новосибирской области

Осуществлен синтез четырех 5'-амино-2',5'-дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. Показано, что фосфамидные производные дезоксирибонуклеозидтрифосфатов включаются в комплементарную цепь ДНК в системе ДНК-полимеразы I *E. coli* наряду с природными дезокситрифосфатами. Определена скорость синтеза полимеров с фосфамидными связями при различных концентрациях 5'-амино-2',5'-дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. Подобраны условия кислотного гидролиза фосфамидных связей в ДНК. Показана возможность применения фосфамидных аналогов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов для секвенирования ДНК.

Одним из наиболее простых и удобных методов определения нуклеотидной последовательности ДНК является метод Сэнджера с использованием терминаторов — 2',3'-дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (ddNTP) [1]. Обычно в этом методе в качестве матрицы используют одонитивую ДНК, что в некоторой степени ограничивает возможности его применения. К настоящему времени показано, что этим методом с использованием одонитивой затравки можно анализировать также первичную структуру двунитовых ДНК [2, 3]. По сравнению с простотой самого метода секвенирования известные способы синтеза ddNTP, терминирующих аналогов субстратов ДНК-полимеразы I, сложны и трудоемки. В то же время известно, что аминотрифосфаты дезоксирибонуклеозидов (ndNTP) способны включаться в ДНК с помощью ДНК-полимеразы I наряду с природными дезоксирибонуклеозидтрифосфатами (dNTP) [4, 5]. Образовавшиеся полидезоксинуклеотиды, содержащие фосфамидные связи, стабильны в нейтральных и щелочных растворах и легко гидролизуются в кислой среде по местам включения фосфамидных аналогов дезоксинуклеотидов. Методы синтеза ndNTP значительно проще, чем для ddNTP. Эти данные явились предпосылкой для изучения возможности использования фосфамидных аналогов дезокситрифосфатов в секвенировании ДНК.

Фосфамидные аналоги дезоксинуклеозидтрифосфатов синтезировали из 5'-аминодезоксинуклеозидов, которые в свою очередь получали восстановлением 5'-азидонуклеозидов. Синтез 5'-азидопроизводных дезоксинуклеозидов по известным методикам [6, 7] проходил с хорошим выходом — 50–90%. Восстановление 5'-азидонуклеозидов трифенилфосфином [8] протекало во всех случаях без осложнений. После экстракции эфиром или толуолом в водной фазе оставались практически чистые продукты — 5'-аминодезоксинуклеозиды. Хроматографические свойства 5'-аминодезоксинуклеозидов, а также промежуточных и побочных продуктов их синтеза представлены в табл. 1.

Синтез N-трифосфатов аминоклеозидов по методу Летсингера [4] не вызывал затруднений. В данном случае можно избежать поэтапного

Сокращения: ddNTP — 2',3'-дидезоксинуклеозидтрифосфаты; ndN — 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозиды; azdN — 5'-азидо-2',5'-дидезоксинуклеозиды.

Хроматографические свойства целевых, промежуточных и побочных продуктов синтеза 5'-аминодезоксирибонуклеозидов

Соединение	Относительная подвижность (R_f) в системе			
	I	II	III	IV
(Tos) dA	0,25	0,38	—	0,30
(Tos) dA (Tos)	0,36	0,80	—	0,50
azdA	0,10	0,34	0,75	—
ndA	0,05	—	0,48	0,05
azdT	0,37	0,66	0,82	—
ndT	—	—	0,50	—
(Tos) dC ^{bz}	0,43	—	—	—
(Tos) dC	0,35	—	—	—
azdC	0,17	—	—	—
ndC	0,05	—	0,37	—
(Tos) dG ^{1b}	0,55	—	—	0,63
azdG ^{1b}	0,10	—	—	—
ndG	0,05	—	0,40	—

Таблица 2

Относительные подвижности (R_f) аминодезоксирибонуклеозидов и аминодезоксирибонуклеотрифосфатов в системе V

Соединение	R_f	Соединение	R_f
ndA	0,75	ndC	0,60
ndATP	0,07	ndCTP	0,05
ndT	0,72	ndG	0,80
ndTTP	0,13	ndGTP	0,08

фосфорилирования, применяемого для получения трифосфатов дезокси- и дидезоксирибонуклеозидов. В табл. 2 приведены значения R_f полученных аналогов трифосфатов, а также R_f исходных аминоклеозидов в системе V. 5'-Амино-2',5'-дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты — лабильные соединения, они устойчивы в щелочной среде (так, в растворе 0,05 М $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ они могут храниться в течение месяца при -20°C) и быстро гидролизуются в кислом растворе. Спектры поглощения ndNTP при 220–290 нм в щелочной среде полностью совпадали со спектрами соответствующих природных dNTP.

Для исследования реакций включения аналогов в растущую цепь ДНК в системе ДНК-полимеразы I использовали «активированную» тимусную ДНК, имеющую в двухцепочечной структуре однонитчатые участки с концевыми 3'-ОН-группами. Синтез полимеров с фосфамидными связями проводили при различных концентрациях ndNTP, концентрация же dNTP во всех опытах была 0,2 мМ. На рис. 1 представлены кинетические кривые реакций включения [^{14}C]ТМР в «активированную» ДНК при различных концентрациях фосфамидного аналога — ndATP. Видно, что увеличение концентрации аналога в 4 раза не приводит к значительному увеличению скорости синтеза. Выход полимера с фосфамидными связями примерно в 2 раза ниже, чем полимера с фосфодиэфирными связями, полученного в идентичных условиях (рис. 1, 4). Аналогичные данные были получены для остальных трех аминодезоксирибонуклеотрифосфатов — ndTTP, ndCTP, ndGTP.

При увеличении времени реакции в присутствии ndNTP реакция синтеза полимера выходила на плато и достигала уровня синтеза ДНК с природными связями. Так, для ndGTP реакция выходила на плато через 35 ч (рис. 2). Это указывает на стабильность фосфамидных связей в ДНК в условиях проведения реакции (температура 12°C , рН 9).

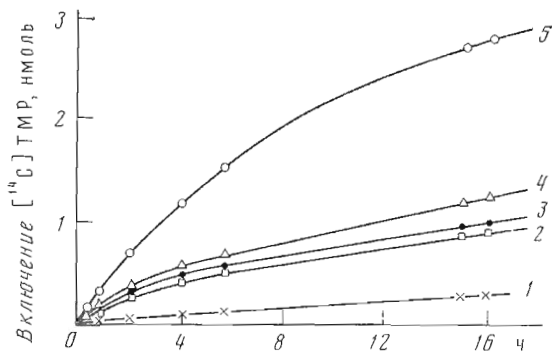


Рис. 1. Синтез фосфамидных полинуклеотидов на «активированной» ДНК с заменой аденинового компонента: 1 — без dATP, 2 — 1 мМ ndATP, 3 — 2 мМ ndATP, 4 — мМ ndATP, 5 — 0,2 мМ dATP

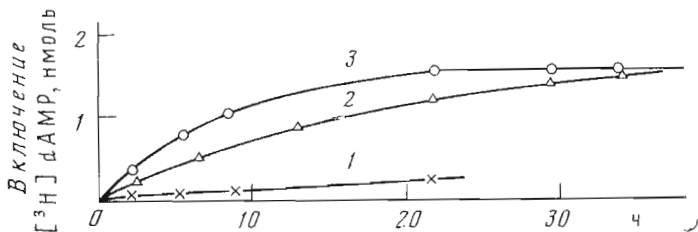


Рис. 2. Синтез фосфамидных полинуклеотидов на «активированной» ДНК с заменой тимидинового компонента: 1 — без dTTP, 2 — 2 мМ ndTTP, 3 — 0,2 мМ dTTP

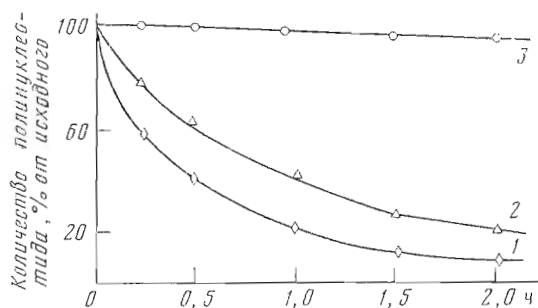


Рис. 3. Кислотный гидролиз фосфамидных связей в полинуклеотидах: 1 — полинуклеотид, полученный с включением ndGMP; 2 — полинуклеотид, полученный с включением ndCMP; 3 — полинуклеотид с фосфодиэфирными связями

Опыты по определению стабильности фосфамидных связей в продуктах ДНК-полимеразной реакции в присутствии 15% уксусной кислоты подтвердили данные Летсингера [5] о быстром гидролизе этих связей в кислой среде. На рис. 3 представлены кривые гидролиза ДНК, полученной с включением аминоксидотрифосфатов ndCTP и ndGTP, а также природной ДНК в присутствии 15% уксусной кислоты. Реакция практически завершается за 1,5–2 ч, при этом гидролизуется 75–90% исходного полимера с фосфамидными связями. ДНК, содержащая только фосфодиэфирные связи, в этих условиях стабильна. Высокая лабильность фосфамидных связей по сравнению с фосфодиэфирными свидетельствовала о том, что можно проводить специфическое расщепление по всем четырем аминоксидонуклеотидам в продуктах синтеза с ДНК-полимеразой для определения первичной структуры ДНК.

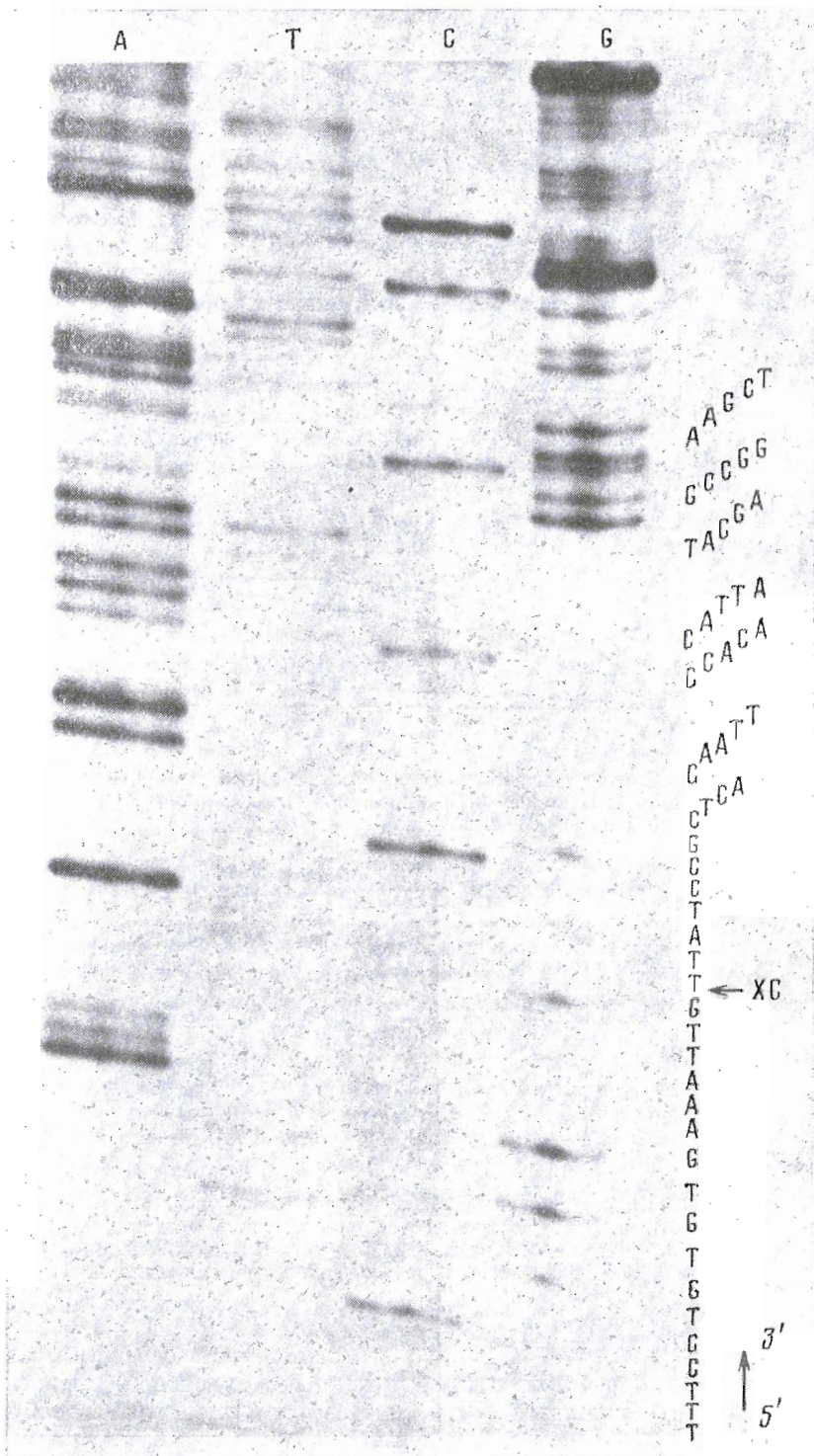


Рис. 4. Определение нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК с *lacUV5*-промотором [9, 10] с использованием ndNTP. Электрофорез в 12% полиакриламидном геле

Опыты по отработке метода секвенирования ДНК с использованием фосфамидных аналогов дезоксирибонуклеотидов проводили на двуцепочечной ДНК рBR 322, содержащей встроенный по *EcoRI*-сайту фрагмент с *lacUV5*-промотором [9, 10]. Затравкой в реакциях служил синтетический олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, комплементарный *EcoRI*-линкер-

ному участку ДНК. Были подобраны соотношения аналогов и природных dNTP в реакционных смесях, обеспечивающие необходимые для секвенирования скорости включения модифицированных звеньев. Для всех четырех фосфамидных аналогов наилучшие результаты были получены при соотношениях ndNTP : dNTP, равном 100 : 1.

Результаты анализа первичной структуры с использованием фосфамидных аналогов дезоксирибонуклеотидов показали полное совпадение определенной этим методом нуклеотидной последовательности и установленной ранее (рис. 4).

Таким образом, 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты могут успешно применяться для секвенирования ДНК вместо дидезоксинуклеозидтрифосфатов, методы синтеза которых сложны и трудоемки.

Экспериментальная часть

В работе были использованы трифенилфосфин и триметилхлорсилан (Fluka, Швейцария), тимусная ДНК (Koch-Light, Англия) дезоксирибоаденозин, тимидин, N⁴-бензоил-дезоксирибоцитидин, N²-изобутирил-дезоксирибогуанозин, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, ДНК-полимераза I *E. coli* (КФ 2.7.7.7) и эндонуклеаза рестрикции *Pst*I отечественного производства.

Четырехбромистый углерод [11], азид лития [12] и моногидрат тринатриевой соли триметафосфата [13] получали по опубликованным методикам.

Синтез 5'-азидо- и 5'-амино-2',5'-дидезоксирибонуклеозидов. Все 5'-амино-2',5'-дидезоксирибонуклеозиды получали восстановлением соответствующих 5'-азидо-2',5'-дидезоксирибонуклеозидов трифенилфосфином [8].

5'-Азидо-2',5'-дидезоксиаденозин был синтезирован через 5'-тозилат, как описано ранее [7]. Этот же метод был применен для получения 5'-азидо-N⁴-бензоил-2',5'-дидезоксцитидина и 5'-азидо-N²-изобутирил-2',5'-дидезоксигуанозина из соответствующих защищенных по ядру дезоксинуклеозидов. В случае производного дезоксцитидина перед обработкой азидом лития бензоильная защита была удалена действием аммиака в спирте. Изобутирильная группа удалялась на стадии восстановления трифенилфосфином одновременно с аммонолизом иминофосфора на [8]. 5'-Азидо-5'-дезокситимидин был получен по описанному методу [6].

Синтез 5'-амино-2',5'-дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов осуществляли по методике, описанной для ndGTP [4]. Синтезированные аминокдезоксифосфаты отделяли от исходных компонентов реакции гель-фильтрацией на биогеле Р-2 (Bio-Rad, США) в элюирующем буфере — 0,005 М NaClO₄, 0,1% триэтаполамин, рН 9, затем осаждали в виде тетранатриевых солей добавлением трехкратного объема 5% NaClO₄ в метаноле.

Анализ 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов, 5'-амино-2',5'-дидезоксинуклеозидов и промежуточных продуктов их синтеза проводили методом ТСХ на пластинках DC-Alufohlen (Merck, ФРГ) в системах: хлороформ — метанол 9 : 1 (I), хлороформ — метанол, 4 : 1 (II), 2-пропанол — вода — концентрированный аммиак, 7 : 5 : 1 (III), хлороформ — ацетон — вода, 20 : 75 : 5 (IV), диоксан — вода — концентрированный аммиак, 6 : 4 : 1 (V).

Включение фосфамидных аналогов в «активированную» ДНК. В качестве матрицы использовали тимусную ДНК, «активированную» обработкой ДНК-азой I по описанному методу [14]. Реакции включения аналогов проводили при 12°С в реакционных смесях, содержащих 60 мМ Na₂B₄O₇, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 1 ОЕ₂₆₀/мл «активированной» ДНК, 2 ед. акт./мл ДНК-полимеразы I, один из ndNTP в различной концентрации и остальные dNTP, один из которых был меченым, в концентрации 0,2 мМ. Реакцию проводили в течение нескольких часов,

периодически отбирая пробы по 0,1 мл. Количество синтезированного продукта определяли по радиоактивности кислотонерастворимого осадка.

Гидролиз фосфамидных связей в ДНК. К 0,1 мл реакционной смеси после полимеризации добавляли 16 мкл ледяной уксусной кислоты и выдерживали смесь при 37°С. Степень гидролиза ДНК определяли по радиоактивности вещества, остающегося на старте после хроматографии реакционной смеси на ионообменной бумаге DE-81 в 0,5 М HCO_2NH_4 в присутствии 7 М мочевины.

Секвенирование ДНК. ДНК pBR 322, содержащую встроенный по EcoRI-сайту фрагмент с *lacUV5*-промотором, выделяли по описанному методу [15]. Олигонуклеотид-затравку синтезировали по методу Наранга [16]. Секвенирование плазмидной ДНК проводили аналогично методу Уэллеса и др. [2], но вместо ddNTP для составления четырех специфических реакционных смесей использовали ndNTP.

Смесь А: 0,02 мМ dATP, 2 мМ ndATP, 0,1 мМ TTP, 0,1 мМ dCTP, 0,1 мМ dGTP;

смесь Т: 0,02 мМ TTP, 2 мМ ndTTP, 0,1 мМ dATP, 0,1 мМ dCTP, 0,1 мМ dGTP;

смесь С: 0,02 мМ dCTP, 2 мМ ndCTP, 0,1 мМ dGTP, 0,1 мМ dATP, 0,1 мМ TTP;

смесь G: 0,02 мМ dGTP, 2 мМ ndGTP, 0,1 мМ dATP, 0,1 мМ TTP, 0,1 мМ dCTP.

Реакционные смеси содержали 30 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 10 мМ MgCl_2 и 10 мМ дитиотреит. Плазмидную ДНК для секвенирования (1,5 пмоль) в 7 мкл 60 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 7 мМ MgCl_2 , 7 мМ дитиотреит гидролизovali 30 мин при 37°С рестриктазой *Pst*I (60 ед.), затем добавляли олигонуклеотид-затравку (30 пмоль), смесь запаивали в капилляре, нагревали 3 мин при 100°С и сразу охлаждали в ледяной бане. Содержимое капилляра переносили в пробирку, в которой упарено 15 пмоль (5 мкКи) $[\alpha^{32}\text{P}]$ dATP (Amersham, Англия, 3000 Ки/ммоль), и добавляли 2 мкл ДНК-полимеразы Кленова (3,6 ед.). Смесь инкубировали 20 мин при 20°С, затем разливали в четыре пробирки, добавляли по 5 мкл специфических реакционных смесей с ndNTP и еще по 1 мкл ДНК-полимеразы Кленова (1,8 ед.). Реакции полимеризации проводили при 12°С в течение 16–18 ч. Синтезированные полимеры подвергали кислотному гидролизу: к пробам добавляли по 3 мкл 50% уксусной кислоты и инкубировали 1,5 ч при 37°С. Затем пробы нейтрализовали 5 М NaOH (2 мкл), добавляли по 1 мкл РНК-носителя (8 мг/мл), 75 мкл охлажденного спирта и выдерживали 45 мин при -20°С. Образовавшиеся осадки отделяли центрифугированием, растворяли в 5–8 мкл формамида, содержащего по 0,05% ксиленианола FF (ХС) и бромфенолового синего, и наносили на 12% полиакриламидный (40×20×0,05 см) гель с 7 М мочевиной. После электрофореза при 20 МА гели авторадииографировали.

Авторы выражают благодарность В. В. Хомову (НИКТИ БАВ) за предоставление ДНК-полимеразы Кленова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1974, v. 77, № 12, p. 5463–5467.
2. Wallace R. B., Johnson M. J., Suggs S. V., Miyoshi K., Bhatt R., Itakura K. Gene, 1981, v. 16, № 1, p. 21–26.
3. Hong G. F. Biosci. Repts., 1982, v. 2, № 1, p. 907–912.
4. Letsinger R. L., Wilkes J. S., Dumas L. B. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, № 1, p. 292–293.
5. Letsinger R. L., Wilkes J. S., Dumas L. B. Biochemistry, 1976, v. 15, № 13, p. 2810–2816.
6. Yamamoto I., Sekine M., Hata T. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 1980, p. 306–310.
7. Gibbs D. E., Orgel L. E. J. Carbohydr., Nucleosides and Nucleotides, 1976, v. 3, № 5–6, p. 315–334.
8. Mungall W. S., Greene G. L., Heavner G. A., Letsinger R. L. J. Org. Chem., 1975, v. 40, № 11, p. 1659–1662.
9. Dickson R. C., Abelson J., Johnson P. J. Mol. Biol., 1977, v. 111, № 1, p. 65–75.

10. Slebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W. Cell, 1980, v. 20, № 2, p. 269-291.
11. Hunter W. H., Edgar D. E. J. Amer. Chem. Soc., 1932, v. 54, № 5, p. 2025-2028.
12. Hofman-Bang N. Acta chem. scand., 1957, v. 11, № 3, p. 581-582.
13. Ondic H. M., Gryder J. W. J. Inorg. Nucl. Chem., 1960, v. 14, № 3/4, p. 240-246.
14. Aposhian H. V., Kornberg A. J. Biol. Chem., 1962, v. 237, № 2, p. 519-525.
15. Clewell D. B., Helinski D. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1969, v. 62, № 4, p. 1159-1166.
16. Stawinski J., Hozumi T., Narang S. A., Bahl C. P., Wu R. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 2, p. 353-371.

Поступила в редакцию
26.I.1984

**SUBSTRATE PROPERTIES OF PHOSPHOAMIDE ANALOGUES
OF DEOXYRIBONUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES IN *E. COLI* DNA
POLYMERASE I SYSTEM**

ZAGREBELNY S. N., ZAKABUNIN A. I., MELAMED N. V.,
ORESHKOVA S. F., KHRIPIN Yu. L.

*Research Institute for Design and Technology of Biologically
Active Compounds, Berdsk (Novosibirsk Region)*

Four 5'-amino-2',5'-dideoxyribonucleoside 5'-triphosphates were synthesized. The phosphoamide derivatives of deoxyribonucleoside triphosphates were shown to incorporate into the DNA complementary chain in the *E. coli* DNA polymerase I system together with naturally occurring deoxytriphosphates. The rate of synthesis of polymers with phosphoamide bonds was determined at different concentrations of 5'-amino-2',5'-dideoxyribonucleoside 5'-triphosphate. The conditions for acidic hydrolysis of phosphoamide bonds in DNA were found. The applicability of phosphoamide analogues of deoxyribonucleoside triphosphates for DNA sequencing was demonstrated.