



УДК 577.152.277*7.042

ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ ДНК-РЕПЛИКАЗЫ
(КОМПЛЕКС ДНК-ПОЛИМЕРАЗА α -ДНК-ПРАЙМАЗА)
И ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА
ИЗ КЛЕТОК ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Михайлов В. С., Марлыев Б. А.*, Атаева Д. О.*,
Буллыев П. Б.*, Атражес А. М.***, Краевский А. А.**

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова Академии наук СССР, Москва;

*Институт зоологии Академии наук ТуркмССР, Ашхабад;

**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Проведен сравнительный ингибиторный анализ синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой (комплекс ДНК-полимераза α -ДНК-праймаза) и ДНК-полимеразой вируса ядерного полиэдрома из клеток тутового шелкопряда *Bombyx mori*. N-Этилмалеимид и афидиолин ингибировали синтез ДНК, катализируемый обоими ферментами. Вирусная ДНК-полимераза оказалась менее эффективной, чем ДНК-репликаза, в синтезе ДНК в присутствии [E]-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфата и 1-(β -D-арабинофуранозил)цитозин-5'-трифосфата. Аналоги субстратов: 5'-трифосфаты 2',3'-дидезокситимидина, 3'-фтор-2',3'-дидезоксиаденозина и 3'-амино-2',3'-дидезокситимидина — оказывали селективный ингибирующий эффект на синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой вируса. Аналоги нуклеотидов ингибируют синтез ДНК по конкурентному к природным субстратам механизму.

Специфические ингибиторы ДНК-полимераз служат эффективным инструментом исследования энзиматических механизмов синтеза ДНК, а также функций различных ДНК-полимераз в репликации и репарации клеточной ДНК. До настоящего времени систематический ингибиторный анализ не был применен для исследования хозяйских и вирусспецифичных ДНК-полимераз из клеток тутового шелкопряда. Инфекция куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* вирусом ядерного полиэдрома (*BmNPV*) приводит к увеличению активности хозяйской ДНК-полимеразы α и индукции вирусспецифичной ДНК-полимеразы (*BmNPV*-ДНК-полимеразы) [1]. В ходе инфекционного цикла в ядрах клеток сосуществуют две энзиматические системы репликации ДНК: система репликации ядерной ДНК, которая обеспечивается активностью клеточной α -полимеразы, и система репликации вирусной ДНК, в которой, вероятно, участвуют вирусспецифичная ДНК-полимераза и некоторые ферменты клетки-хозяина. Недавно из клеток шелкопряда были выделены ДНК-репликаза (комплекс ДНК-полимераза α -ДНК-праймаза) и *BmNPV*-ДНК-полимераза [2, 3]. Использование селективных ингибиторов ферментов позволило бы дифференцировать активность хозяйской и вирусной ДНК-полимераз в инфицированных клетках и субклеточных препаратах, решить вопрос о функциях ДНК-полимераз в синтезе клеточной и вирусной ДНК. Возможно, что специфические ингибиторы *BmNPV*-ДНК-полимераз послужат средством для подавления репродукции вируса ядерного полиэдрома в клетках шелкопряда.

В настоящей работе проведен сравнительный ингибиторный анализ биосинтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой и *BmNPV*-ДНК-по-

Сокращения: *BmNPV* — вирус ядерного полиэдрома тутового шелкопряда; dbvUTP — [E]-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; aCTP — 1-(β -D-арабинофуранозил)цитозин-5'-трифосфат; dTTP — 2',3'-дидезокситимидин-5'-трифосфат; dATP(3'F) и dTTP(3'F) — соответственно 5'-трифосфаты 3'-фтор-2',3'-дидезоксиаденозина и тимидина; dTTP(3'NH₂) — 3'-амино-2',3'-дидезокситимидин-5'-трифосфат; aATP(3'NH₂) и aCTP(3'NH₂) — соответственно 5'-трифосфаты 3'-амино-2',3'-дидезоксиарабинозиладенина и цитозина.

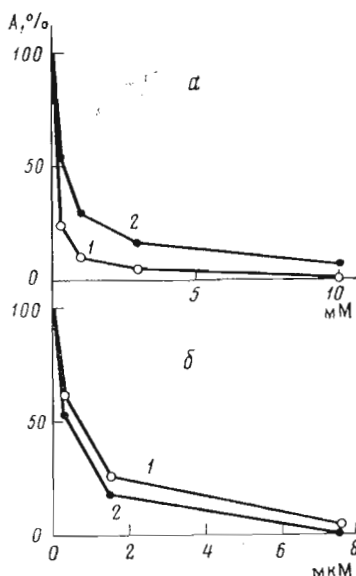


Рис. 1

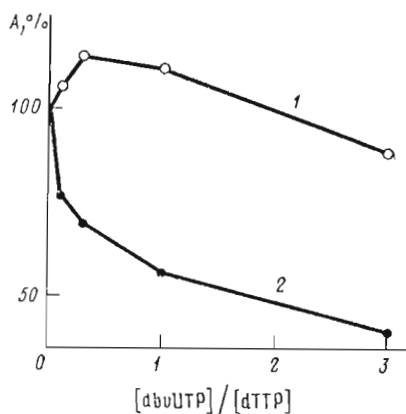


Рис. 2

Рис. 1. Ингибирование N-этилмалеимидом (а) и афидиколином (б) синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой (1) и *BmNPV*-ДНК-полимеразой (2). Включения метки из $[^3H]dTTP$ в ДНК в отсутствие ингибитора: 5700 (а, 1), 14 800 (а, 2), 6100 (б, 1) и 1800 (б, 2) имп/мин — принято за 100%

Рис. 2. Ингибирование dbvUTP синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой (1) и *BmNPV*-ДНК-полимеразой (2). Включение метки из $[^3H]dATP$ в ДНК в отсутствие ингибитора: 8600 (1) и 5400 (2) имп/мин — принято за 100%. Реакция в присутствии 50 мкМ dTTP

лимеразой из клеток тутового шелкопряда с использованием ряда соединений, среди которых были вещества, нашедшие широкое применение в биохимической практике: N-этилмалеимид, афидиколин, аСТР, d_2TTP , а также аналоги нуклеотидов: $dNTP(3'F)$, $dNTP(3'NH_2)$, $aNTP(3'NH_2)$. Некоторые из испытанных соединений оказывали селективный ингибирующий эффект на синтез ДНК, катализируемый вирусной *BmNPV*-ДНК-полимеразой.

BmNPV-ДНК-полимераза и ДНК-репликаза из клеток шелкопряда используют в качестве матрицы затравки ДНК тимуса теленка, активированную ДНКазой I. Оптимальные концентрации соли для проявления активности ферментов различны. *BmNPV*-ДНК-полимераза имеет наибольшую активность при концентрации калий-фосфатного буфера, равной 150 мМ, тогда как ДНК-репликаза — при 50—75 мМ. Чтобы исключить влияние условий инкубации на чувствительность ферментов к ингибиторам, активность *BmNPV*-ДНК-полимеразы и ДНК-репликазы определяли в идентичных по составу реакционных смесях при субоптимальной концентрации калий-фосфатного буфера 100 мМ.

Реагент на сульфгидрильные группы N-этилмалеимид широко используется для дифференциации активностей α -, β - и γ -ДНК-полимераз многоклеточных животных; он ингибирует α - и γ -полимеразы, тогда как β -полимераза относительно устойчива к этому ингибитору [4, 5]. В согласии с литературными данными о высокой чувствительности α -полимераз к сульфгидрильным реагентам N-этилмалеимид ингибировал как ДНК-репликазу шелкопряда (рис. 1а), так и *BmNPV*-ДНК-полимеразу.

Дитерпеновый антибиотик афидиколин, являющийся специфическим ингибитором α -полимераз эукариот [4, 5], примерно в одинаковой степени подавлял синтез ДНК, катализируемый *BmNPV*-ДНК-полимеразой и ДНК-репликазой (рис. 1б). Ранее одинаковая чувствительность к афидиколину была показана для частично очищенных препаратов ДНК-полимераз α и NPV *Autographa californica* [6].

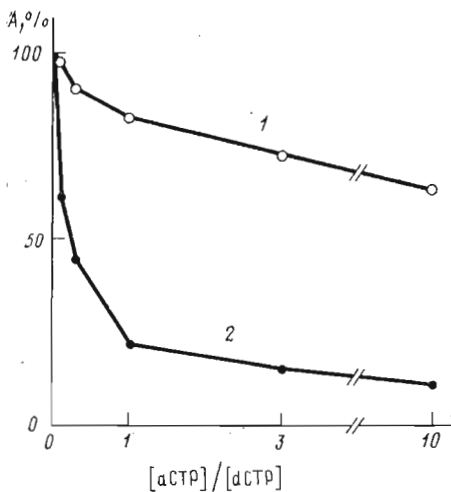


Рис. 3

Рис. 3. Ингибирование аСТР синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой (1) и *BmNPV*-ДНК-полимеразой (2). Включение метки из $[^3\text{H}]$ dTTP в ДНК в отсутствие ингибитора: 5600 (1) и 2400 (2) имп/мин — принято за 100%. Реакция в присутствии 50 мкМ dCTP

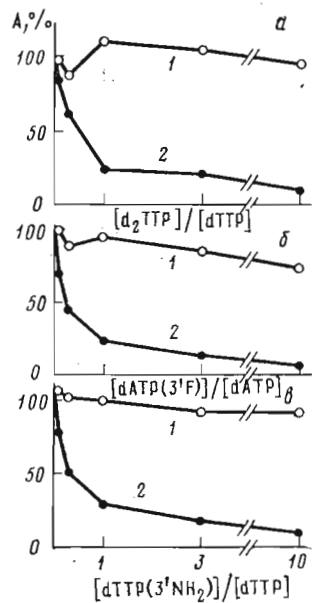


Рис. 4

Рис. 4. Ингибирование d_2 TTP (а), dATP(3'F) (б) и dTTP(3'NH₂) (в) синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой (1) и *BmNPV*-ДНК-полимеразой (2). Включение метки из $[^3\text{H}]$ dATP (а, в) и $[^3\text{H}]$ dTTP (б) в ДНК в отсутствие ингибитора: 11 700 (а, 1), 8600 (а, 2), 4300 (б, 1), 3300 (б, 2), 6900 (в, 1), 4500 (в, 2) имп/мин — принято за 100%. Реакция в присутствии 50 мкМ dTTP (а, в) и 50 мкМ dATP (б)

dbvUTP известен как эффективный ингибитор синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами ряда вирусов, в частности вирусов группы герпеса, а соответствующий нуклеозид оказывает антивирусный эффект на клеточном уровне [7, 8]. В опытах с частично очищенными препаратами ДНК-полимеразы NPV и хозяйской ДНК-полимеразы из клеток *Sprodoptera frugiperda* dbvUTP оказывал более сильное ингибирование синтеза NPV-ДНК-полимеразой [9]. Подобные результаты получены и нами в опытах с *BmNPV*-ДНК-полимеразой и ДНК-репликазой из клеток тутового шелкопряда (рис. 2). dbvUTP действительно в большей степени ингибировал синтез ДНК *BmNPV*-ДНК-полимеразой по сравнению с опытами с ДНК-репликазой. Однако общий эффект dbvUTP был сравнительно низким: 50% ингибирование синтеза достигалось при концентрации dbvUTP 75 мкМ (в присутствии 50 мкМ dTTP в реакционной среде). При высоких концентрациях dbvUTP имело место частичное подавление синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой.

Известный ингибитор синтеза ДНК — аСТР широко используется для изучения репликации ДНК. Встраиваясь в форму монофосфатного остатка в растущую полинуклеотидную цепь, это соединение замедляет дальнейшую элонгацию синтеза ДНК [4, 10]. аСТР подавляет синтез ДНК, катализируемый рядом ДНК-полимераз, в том числе ДНК-полимеразами α из клеток животных [4, 5]. В наших экспериментах аСТР оказывал существенно более выраженный ингибирующий эффект на синтез ДНК *BmNPV*-ДНК-полимеразой по сравнению с хозяйской ДНК-репликазой (рис. 3): 50% подавление синтеза ДНК с *BmNPV*-ДНК-полимеразой наблюдалось при концентрации аСТР 9,3 мкМ (в присутствии 50 мкМ dCTP).

Еще более выраженный селективный эффект на синтез *BmNPV*-ДНК-полимеразой оказывали аналоги нуклеотидов с замещениями по 3'-положению дезоксирибозного остатка, а именно d_2 NTP, dNTP(3'F) и

dNTP(3'NH₂),¹ относящиеся к группе терминаторных субстратов биосинтеза ДНК.

¹ d₂TTP известен как эффективный ингибитор биосинтеза ДНК, катализируемого рядом прокариотических ДНК-полимераз, а также ДНК-полимеразами β и γ из клеток животных [4, 5]. В наших исследованиях d₂TTP вызывал практически полное подавление синтеза, катализируемого *BmNPV*-ДНК-полимеразой, не оказывая заметного эффекта на процесс с хозяйской ДНК-репликазой (рис. 4а): 50% подавление синтеза с *BmNPV*-ферментом наблюдалось при концентрации 26 мкМ (в присутствии 50 мкМ dTTP).

dATP(3'F) также оказался селективным ингибитором синтеза ДНК вирусным ферментом (рис. 4б): $[I]_{0,5}$ для dATP(3'F) в этом случае равнялась 12 мкМ в присутствии 50 мкМ dATP. Процесс с ДНК-репликазой в этих условиях подавлялся незначительно. Активность dNTP(3'F) зависела от природы нуклеинового основания в них: так, dATP(3'F) был более эффективен в опытах с вирусным ферментом, чем dTTP(3'F), для которого $[I]_{0,5}$ составляла 78 мкМ.

Аналоги нуклеотидов dNTP(3'NH₂) также относятся к группе терминаторных субстратов биосинтеза ДНК [11, 12]. Одно из этих соединений, а именно dTTP(3'NH₂), оказывало четко выраженный селективный ингибирующий эффект на катализ синтеза ДНК *BmNPV*-ДНК-полимеразой (рис. 4в): для dTTP(3'NH₂) $[I]_{0,5}$ составляла 19 мкМ (в присутствии 50 мкМ dTTP). Полная нечувствительность ДНК-репликазы тутового шелкопряда к dTTP(3'NH₂) была для нас неожиданной, поскольку ранее был показан ингибирующий эффект этого соединения на ДНК-полимеразы α из клеток вьюна [13] и тимуса теленка [11, 12]. Отношение включений радиоактивного субстрата в ДНК в присутствии dNTP(3'NH₂) и без него не изменялось в течение 1 ч реакции (рис. 5). Это говорит о том, что dTTP(3'NH₂) снижает скорость синтеза цепи ДНК, но не инактивирует фермент. Аналогичным образом, вероятно, реализуется ингибирующее действие d₂NTP и dNTP(3'F) на *BmNPV*-ДНК-полимеразу.

Введение в сахарный остаток нуклеотидов двойной модификации — aCTP(3'NH₂) или aATP(3'NH₂) — приводит к практически полной потере их ингибирующего эффекта на синтез ДНК, катализируемый ДНК-репликазой и *BmNPV*-ДНК-полимеразой (рис. 6). Можно полагать, что потеря ингибирующего эффекта вызвана достаточно сильным искажением конформации указанных соединений по сравнению с природными dNTP. В то же время aCTP(3'NH₂) и aATP(3'NH₂) подавляли синтез ДНК, катализируемый рядом ДНК-полимераз, в том числе α-полимеразой из тимуса теленка. Эти соединения, включаясь в 3'-конец растущей цепи ДНК, блокировали дальнейшую элонгацию [12, 14].

Полимеразная активность ДНК-репликазы шелкопряда обусловлена присутствием в репликационном комплексе ДНК-полимеразы α [2]. Наличие в репликационном комплексе помимо α-полимеразы других компонентов, в частности ДНК-праймазы, может сказываться на сродстве фермента к ингибиторам синтеза ДНК. Синтез ДНК, катализируемый ДНК-репликазой, не ингибировался d₂TTP и dATP(3'F) (рис. 4), что согласуется с нечувствительностью α-полимераз животных к этим ингибиторам [5, 12]. В то же время синтез ДНК в присутствии ДНК-репликазы шелкопряда оказался более устойчив к aCTP и dTTP(3'NH₂), чем в случае исследованных ранее в наших лабораториях ДНК-полимераз α из клеток вьюна [13] и тимуса теленка [11, 12].

Пониженная чувствительность ДНК-репликазы к различным аналогам дезоксирибонуклеотидов свидетельствует о большей избирательности этого ферментативного комплекса в отношении предшественников ДНК по сравнению с *BmNPV*-ДНК-полимеразой. В ряде случаев различия в специфичности ДНК-полимераз удастся интерпретировать с помощью таких упрощенных параметров взаимодействия фермента и субстрата, как константа Михаэлиса (K_m) и обратная ей величина, характеризующая сродство фермента к субстрату. Для некоторых вирусных ДНК-полимераз показано, что мутации, приводящие к появлению «антимутаторного» ти-

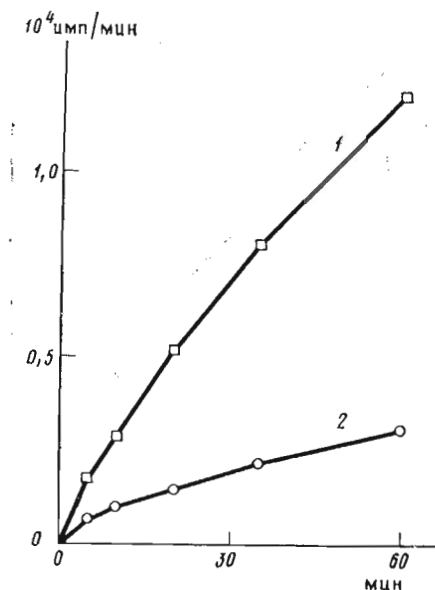


Рис. 5

Рис. 5. Кинетика включения метки из $[^3\text{H}]\text{dATP}$ в ДНК *BmNPV*-ДНК-полимеразой в отсутствие (1) и в присутствии 50 мкМ dTTP ($3'\text{NH}_2$) (2). Концентрация dTTP в реакции равна 50 мкМ

Рис. 6. Ингибирование $\text{aATP}(3'\text{NH}_2)$ (1, 2) и $\text{aСТP}(3'\text{NH}_2)$ (3, 4) синтеза ДНК, катализируемого ДНК-репликазой (1, 3) и *BmNPV*-ДНК-полимеразой (2, 4). Включение метки из $[^3\text{H}]\text{dTTP}$ в ДНК в отсутствие ингибитора: 2900 (1), 6000 (3), 5900 (2) и 4300 (4) имп/мин — принято за 100%. Реакция в присутствии 50 мкМ dATP и dСТP

Рис. 7. Определение константы Михаэлиса по dTTP для ДНК-репликазы (1) и *BmNPV*-ДНК-полимеразы (2). Данные представлены в обратных координатах Лайнуивера—Берка. Значения K_m после компьютерной обработки: 2,1 мкМ для ДНК-репликазы и 0,84 мкМ для *BmNPV*-ДНК-полимеразы

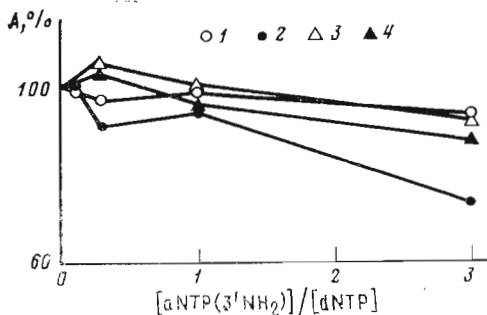


Рис. 6

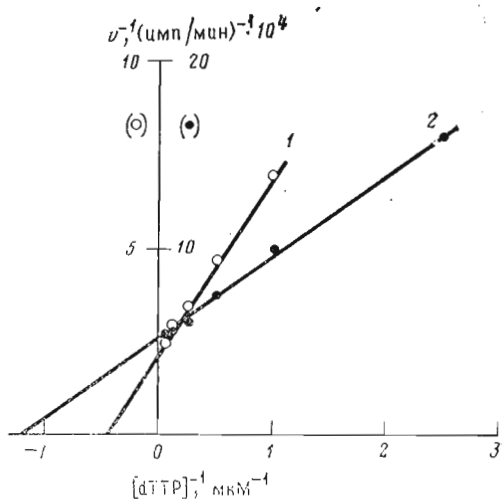


Рис. 7

па ДНК-полимераз с большей точностью копирования ДНК, сопровождаются снижением видимого сродства фермента к предшественникам и увеличением значения K_m для дезоксирибонуклеозидтрифосфатов [15]. Снижение видимого сродства к нуклеотидам, вероятно, позволяет ферменту лучше различать структурные особенности предшественников, строже отбирать в реакцию «правильные» структурные и исключать из реакции «неправильные» аналоги. Интересно, что более избирательная ДНК-репликаза действительно имеет меньшее сродство к дезоксирибонуклеозидтрифосфатам, чем менее избирательная *BmNPV*-ДНК-полимераза (рис. 7). Значения константы Михаэлиса для dTTP составили для ДНК-репликазы и *BmNPV*-ДНК-полимеразы соответственно 2,1 и 0,84 мкМ.

Состав реакционной смеси и условия проведения реакции влияют на чувствительность ДНК-полимераз к ингибиторам синтеза ДНК. Так, добавление в реакционную смесь полиаминов приводило к снижению ингибирующего эффекта aСТP и $\text{dTTP}(3'\text{NH}_2)$ на активность ДНК-полимеразы α из клеток вьюна [13]. В наших экспериментах замена активированной ДНК на однонитевую ДНК фага М13 вызывала увеличение ингибирующего эффекта aСТP , d_2TTP и $\text{dTTP}(3'\text{NH}_2)$ на синтез ДНК, катализируемый *BmNPV*-ДНК-полимеразой (данные не приведены).

В целом проведенный анализ позволил обнаружить ряд специфических ингибиторов *BmNPV*-ДНК-полимеразы, прежде всего аналогов dNTP типа d_2NTP , dNTP(3'F) и dNTP(3'NH₂), которые могут быть использованы для дифференциации активностей вирусной и хозяйской репликативных систем в клетках тутового шелкопряда.

Экспериментальная часть

В работе использовали N-этилмалеимид (Serva, ФРГ), афидиколин и аСТР (Sigma, США), d_2TTP (Boehringer, ФРГ); dATP(3'F) и dTTP(3'F) были синтезированы по методике [16], dbvUTP — по [17], dTTP(3'NH₂) — по [18], аСТР(3'NH₂) и аАТР(3'NH₂) — по [14].

BmNPV-ДНК-полимеразу и ДНК-репликазу (комплекс ДНК-полимеразы α -ДНК-праймазы) выделяли из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* через 72 ч после инфекции вирусом ядерного полиэдроза, когда активность ферментов является наибольшей [1]. Выделение *BmNPV*-ДНК-полимеразы проводили как описано ранее [3]. Фермент был очищен в 3000—4000 раз по удельной активности. Метод выделения ДНК-репликазы включал стадии получения гомогената куколок, супернатанта, фракционирование сульфатом аммония, хроматографию на фосфоцеллюлозе и оксианатите, ультрацентрифугирование в градиенте концентрации глицерина. Детали выделения ДНК-репликазы будут описаны в отдельном сообщении. Общая очистка ДНК-репликазы составила 1400 раз (по удельной активности ДНК-полимеразы α). ДНК-репликаза из куколок не отличалась по своим свойствам от ДНК-репликазы, выделенной нами ранее из грены шелкопряда [2].

ДНК-полимеразную активность определяли в 50 мкл реакционной смеси следующего состава: 100 мМ фосфат калия (рН 7,5); 125 мкг/мл ДНК тимуса телят, активированной ДНКазой I; 10 мМ MgCl₂; 200 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина; 2 мМ дитиотреит; dATP, dCTP, dGTP, dTTP — 50 мкМ; в качестве меченого предшественника использовали 20 мкКи/мл [³H]dTTP или [³H]dATP. В инкубационную смесь вносили ингибиторы. Препараты ферментов в буфере: 50% глицерин, 10 мМ фосфат калия (рН 7,5), 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ EDTA — добавляли в объеме 10 мкл. Пробы инкубировали 30 мин при 37° С. В опытах с N-этилмалеимидом в реакционную среду не добавляли дитиотреит и 2-меркаптоэтанол. Реакцию останавливали быстрым охлаждением до 0° С и количество кислотонерастворимого радиоактивного материала определяли по [19]. Концентрацию ингибитора, вызывающую 50% подавление синтеза, [I]_{0,5}, определяли с помощью машинной программы после представления данных в координатах Хилла.

Авторы выражают признательность проф. И. Б. Збарскому за интерес к настоящей работе, И. А. Михайлопуло (ИБХ АН БССР) за синтез dATP(3'F) и dTTT(3'F), Н. Б. Дяткиной (ИМБ АН СССР) за dbvUTP и А. В. Папчихину (КГУ) за аСТР(3'NH₂) и аАТР(3'NH₂).

ЛИТЕРАТУРА

1. Mikhailov V. S., Ataeva J. O., Marlyev K. A., Kullyev P. K. J. Gen. Virol., 1986, v. 67, № 1, с. 175—179.
2. Михайлов В. С., Атаева Д. О., Марлыев К. А., Кулыев П. К. Докл. АН СССР, 1984, т. 275, № 2, с. 502—505.
3. Атаева Д. О., Марлыев К. А., Кулыев П. К., Михайлов В. С. Биополимеры и клетка, 1985, т. 1, № 5, с. 234—241.
4. Cozzarelli N. R. Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 641—648.
5. Hübscher U. Experientia, 1983, v. 39, № 1, p. 1—25.
6. Miller L. K., Jewell J. E., Browne D. J. Virol., 1981, v. 40, № 1, p. 305—308.
7. Allauden H. S., Kozarich J. W., Bertino J. R., DeClercq E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 78, № 5, p. 2698—2702.
8. DeClercq E., Descamps J., Maudgal P. C., Missotten L., Leyten R., Verhelst G., Jones A. A., Walker R. T., Busson R., Vanderhaeghe H., DeSomer P. In: Developments in antiviral therapy/Eds Collier L. H., Oxford J. L.: Acad. Press, 1980, p. 21—42.
9. Wang X., Kelly D. C. J. Gen. Virol., 1983, v. 64, № 10, p. 2229—2236.

10. Lee M. T., Byrnes J. J., Downey K. M., So A. G. *Biochemistry*, 1980, v. 19, № 1, p. 215—219.
11. Chidgeavadze Z. G., Beabealashvilli R. Sh., Atrazhev A. M., Kukhanova M. K., Azhayev A. V., Kravetsky A. A. *Nucl. Acids Res.*, 1984, v. 12, № 3, p. 1671—1686.
12. Бибилашвили Р. Ш., Чиджавадзе З. Г., Краевский А. А., Куханова М. К., Атражев А. М., Ажаев А. В., Кутателадзе Т. В. *Биополимеры и клетка*, 1985, т. 1, № 6, с. 293—306.
13. Mikhailov V. S., Androsova I. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 783, № 1, p. 6—14.
14. Папчихин А. В., Пурьгин П. П., Ажаев А. В., Краевский А. А., Кутателадзе Т. В., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш. *Биоорган. химия*, 1985, т. 11, № 10, с. 1367—1379.
15. Hall J. D., Furman P. A., Clair M. H. St., Knopf C. W. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1985, v. 82, № 11, p. 3889—3893.
16. Chidgeavadze Z. G., Scamrov A. V., Beabealashvilli R. Sh., Kvasnyuk E. I., Zaitseva G. V., Mikhailopulo I. A., Kowollik G., Langen P. *FEBS Lett.*, 1985, v. 183, № 2, p. 275—278.
17. Дяткина Н. Б., Краевский А. А., фон Янта-Липински М., Герман Г., Ланген П., Ярцева И. В. *Биоорган. химия*, 1986, т. 12, № 3, с. 408—415.
18. Зайцева В. Е., Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Скапцова Н. В., Турина О. В., Гнучев Н. В., Готтхиз Б. П., Ажаев А. В. *Биоорган. химия*, 1984, т. 10, № 5, с. 670—680.
19. Мизгайлов В. С., Гулямов Д. Б. *Биохимия*, 1981, т. 46, № 8, с. 1539—1547.

Поступила в редакцию
25.X.1985

INHIBITION ANALYSIS OF DNA REPLICASE (DNA POLYMERASE α -DNA PRIMASE COMPLEX) AND DNA POLYMERASE OF NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS FROM SILKWORM CELLS

MIKHAILOV V. S., MARLYEV K. A*, ATAIEVA D. O*,
KULLYEV P. K*, ATRAZHEV A. M**, KRAYEVSKY A. A.**

*N. K. Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; *Institute of Zoology, Academy of Sciences of the Turkmenian SSR, Ashkhabad; **Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of USSR, Moscow*

Comparative inhibition analysis of DNA synthesis catalyzed by DNA replicase (DNA polymerase α -DNA primase complex) and DNA polymerase of nuclear polyhedrosis virus (*Bm*NPV-polymerase) from silkworm *Bombyx mori* cells was performed. N-Ethylmaleimide and aphidicolin suppressed the DNA synthesis catalyzed by both enzymes. Viral DNA polymerase could synthesize DNA less efficiently than did DNA replicase in the presence of [E]-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate and 1-(β -D-arabinofuranosyl)cytosine 5'-triphosphate. 5'-Triphosphates of 2', 3'-dideoxythymidine, 3'-fluoro-2', 3'-dideoxyadenosine and 3'-amino-2', 3'-dideoxythymidine appeared to be specific inhibitors of *Bm*NPV-polymerase and had no effect on the DNA replicase activity. The modified nucleotide analogues inhibited DNA synthesis in a competitive manner in relation to natural substrates.