



УДК 577.152.277'135

АНАЛОГИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ,
МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПО ОСНОВАНИЮ
И САХАРНОМУ ОСТАТКУ: СУЕСТРАТНЫЕ СВОЙСТВА
ПРИ БИОСИНТЕЗЕ ДНК В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

Атражес А. М., Дяткина Н. Б., Розовская Т. А.,
Александрова Л. А., Чиджавадзе З. Г.*,
фон Янта-Дипински М.**

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

* Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ
Академии медицинских наук СССР, Москва;

** Центральный институт молекулярной биологии Академии наук ГДР, Берлин

Исследовано включение в ДНК различными ДНК-полимеразами производных дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов, модифицированных как по основанию, так и по 3'-положению углеводного остатка. Показано, что 3'-азидо- и 3'-амино-2',3'-дидезокси-(E)-5-(2-бромвинил)уридин-5'-трифосфаты эффективно терминируют синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) из *E. coli*, ДНК-полимеразой β из печени крысы и обратной транскриптазой из вируса птичьего миеобластома. ДНК-полимераза α из тимуса телянка включает в ДНК только 3'-аминопроизводное. ДНК-полимеразы I и β ведут синтез ДНК в присутствии 5'-трифосфата 1-(β -D-2-дезоксирибофуранозил)бензимидазола, включая соответствующий монофосфат преимущественно вместо дезоксигуанплата, тогда как 3'-фтор-, азидо- и аминопроизводные этого соединения не встраиваются в ДНК. Таким образом, двойная модификация субстратов ДНК-полимераз может привести к существенному изменению их терминаторных свойств.

Физико-химические механизмы мутагенеза, возникающего вследствие ошибочного включения субстрата при биосинтезе ДНК, изучены далеко не достаточно. В последнее время появились убедительные данные в пользу того, что частота ошибочных включений сильно зависит от первичной структуры матрицы, причем различие в частоте таких включений достигает 5–10-кратного [1, 2]. Такие наблюдения стали возможны лишь с использованием в качестве матриц индивидуальных вирусных или плазмидных ДНК в бесклеточных системах синтеза ДНК; радиоактивно меченные продукты этого синтеза анализируют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. На радиоавтографах гелей можно локализовать места ошибочных включений с точностью до одного нуклеотидного остатка. В настоящее время опубликованы три варианта изучения мутагенеза в бесклеточных системах этим методом.

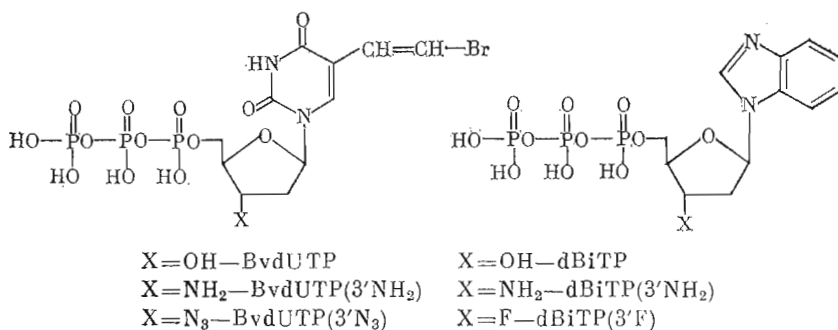
В первом варианте [1] в каждом опыте берутся три субстрата в различных сочетаниях. Если бы ошибочного включения не происходило, синтез в каждом опыте доходил бы до отсутствующего в среде dNTP и останавливался. Однако в реальных опытах синтез продолжается дальше из-за ошибочного включения присутствующих в среде dNTP (неизвестно какого) в определенных положениях матрицы.

Сокращения: dNTP – 2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты; BvdUTP, BvdUTP·(3'N₃), BvdUTP(3'NH₂) – 5'-трифосфаты 2'-дезоксид-5-бромвинилуридина, его 3'-азидо- и 3'-амино-3'-дезоксиналогов соответственно (см. также схему 1); aNTP(3'NH₂) – 3'-амино-3'-дезоксипарабинонуклеозид-5'-трифосфаты; dTTP(3'NH₂) и dTTP(3'N₃) – 3'-амино- и 3'-азидо-2',3'-дидезокситимидин-5'-трифосфаты соответственно. BSA – бычий сывороточный альбумин. dBiTP, dBiTP(3'N₃), dBiTP(3'NH₂) и dBiTP(3'F) – 5'-трифосфаты 1-(2-дезоксид- β -D-рибофуранозил)бензимидазола, его 3'-дезоксид-3'-азидо-, 3'-дезоксид-3'-амино- и 3'-дезоксид-3'-фтораналоги соответственно.

Во втором варианте используются аналоги dNTP, модифицированные по основанию, но способные включаться в растущую цепь ДНК [2]. Использование бесклеточной системы, сочетающей три природных dNTP с модифицированным, позволяет выявить, вместо какого из нуклеотидов включается модифицированный остаток. Однако иногда полученная электрофореграмма трактуется не столь однозначно из-за присутствия в ДНК-полимеразах сорбированных природных dNTP, искажающих общий вид распределения полос на геле.

Третий вариант состоит в использовании аналогов dNTP, модифицированных по основанию и сахарному остатку одновременно, например 5-бром-2',3'-дидезоксиуридин-5'-трифосфата [3]. Встраиваясь в 3'-конец цепи ДНК в виде остатка нуклеотида, это соединение прекращает рост цепи ДНК, и на геле легко увидеть, против какого нуклеотида матрицы оно было включено. Этот подход наиболее иллюстративен, но его сложность состоит в необходимости химического синтеза модифицированных по основанию терминирующих субстратов.

Ранее нами были синтезированы 3'-замещенные 2'-дезоксинуклеозиды, несущие в качестве гетероциклического основания остатки бензимидазола [4, 5] и (E)-5-(2-бромвинил)урацила [6]. Кроме того, был описан синтез и приведены характеристики 5'-трифосфатов производных бромвинил-2'-дезоксинуридина BvdUTP(3'N₃) и BvdUTP(3'NH₂) [6]. В настоящей работе описан синтез и даны характеристики 5'-трифосфатов бензимидазольных нуклеозидов (см. схему и таблицу).



Терминация синтеза ДНК с участием BvdUTP(3'N₃) и BvdUTP(3'NH₂) показана на рис. 1-3.

Изучение BvdUTP, BvdUTP(3'N₂) и BvdUTP(3'NH₂) показало, что введение бромвинильной группы в положение 5 остатка урацила практически не отражается на субстратных свойствах полученных аналогов по сравнению с соответствующими аналогами dTTP. BvdUTP включается в цепь ДНК вместо dTTP всеми изученными здесь ДНК-полимеразами (см., например, трек 10 на рис. 3) аналогично тому, как это описано [7] для ДНК-полимеразы из вируса простого герпеса и ДНК-полимеразы.

Физико-химические характеристики синтезированных 5'-трифосфатов модифицированных нуклеозидов

Соединения	Выход, %	R_f^*	ВЭЖХ, время удерживания, * мин	УФ-спектр (вода) λ_{max} , нм (ε)
dBvTP	25	0,12	24,2	241 (6100), 263 (2900), 279 (3400)
dBvTP(3'N ₃)	58	0,18	36,3	240 (5900), 266 (3000), 276 (3500)
dBvTP(3'NH ₂)	75	0,03	25,2	241 (6100), 266 (2850), 278 (3400)
dBvTP(3'F)	60	0,18	35,2	242 (6000), 270 (2900), 278 (3200)

* См. «Эксп. часть».

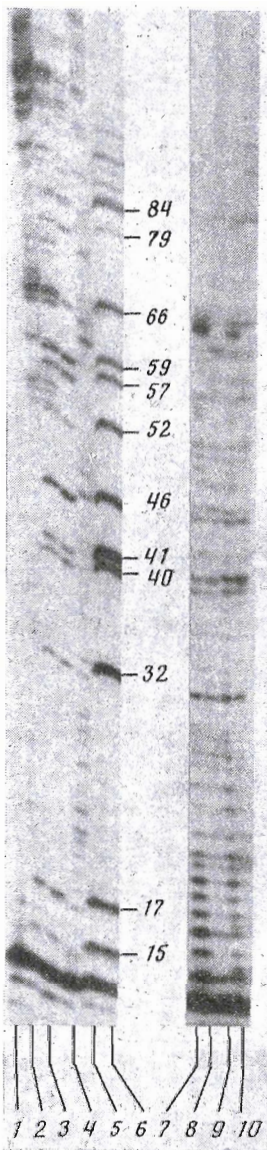


Рис. 1

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой I (1-3) и β (4-10), на матрице фага M13mp10. 1, 4 - синтез без терминаторов; 2, 3 и 5, 6 - BvdUTP(3'NH₂), 200 и 50 мкМ; 7, 8 - dTTP(3'NH₂), 200 мкМ; 9, 10 - BvdUTP(3'NH₂), 500 мкМ. 3, 6, 8, 10 - дополнительный синтез в присутствии 400 мкМ dNTP. Здесь и на остальных рисунках цифры (справа), маркирующие полосы на гелях, соответствуют номерам нуклеотидных остатков в новосинтезированной цепи ДНК

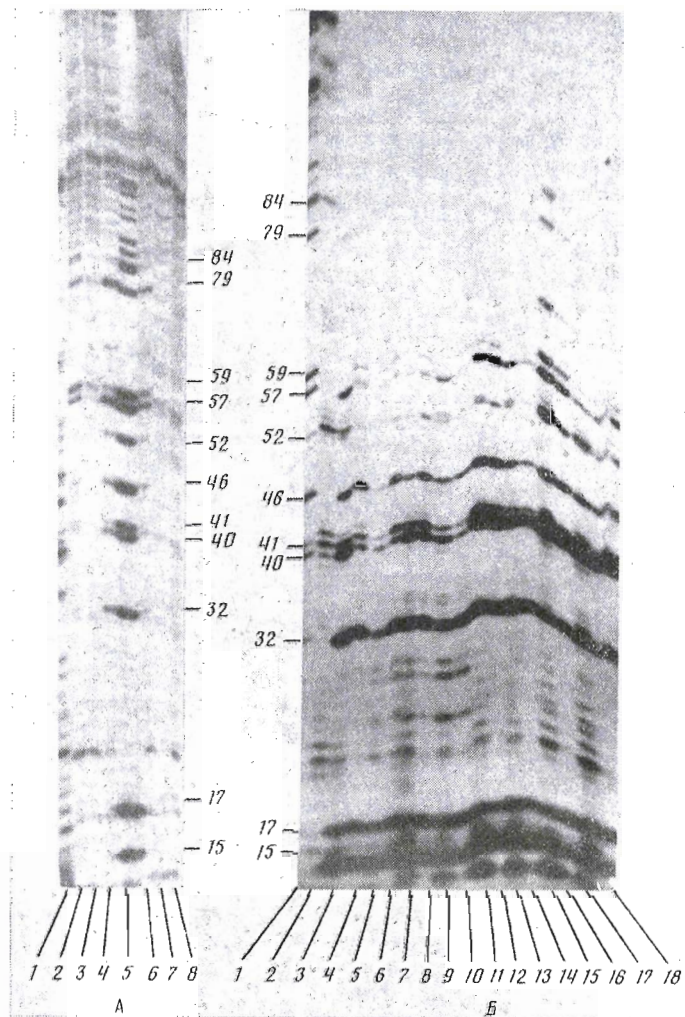


Рис. 2

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов синтеза ДНК на матрице M13mp10. а - удлинение праймера ДНК-полимеразой α : 1 - синтез без терминаторов; 2, 3 - BvdUTP(3'NH₂), 100 мкМ; 4, 6 - dTTP(3'NH₂), 100 мкМ; 7, 8 - BvdUTP(3'NH₂), 500 мкМ. В треке 5 синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразой I, терминирован 500 мкМ dTTP(3'NH₂) (контроль). В реакционных массах проведен дополнительный синтез с добавлением 400 мкМ dNTP (2, 4, 7). б - I - контрольный трек (синтез в присутствии ДНК-полимеразы I и 200 мкМ dTTP(3'NH₂)); 2-18 - синтез ДНК обратной транскриптазой: 2 - без терминатора; 3, 4 и 5, 6 - BvdUTP(3'NH₂), 20 и 100 мкМ; 7, 8 и 9, 10 - dTTP(3'NH₂), 20 и 100 мкМ; 11, 12 и 13, 14 - BvdUTP(3'NH₂), 20 и 100 мкМ; 15, 16 и 17, 18 - dTTP(3'NH₂), 20 и 100 мкМ. Концентрация dNTP 2 мкМ. 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 - дополнительный синтез после терминации в присутствии 400 мкМ dNTP

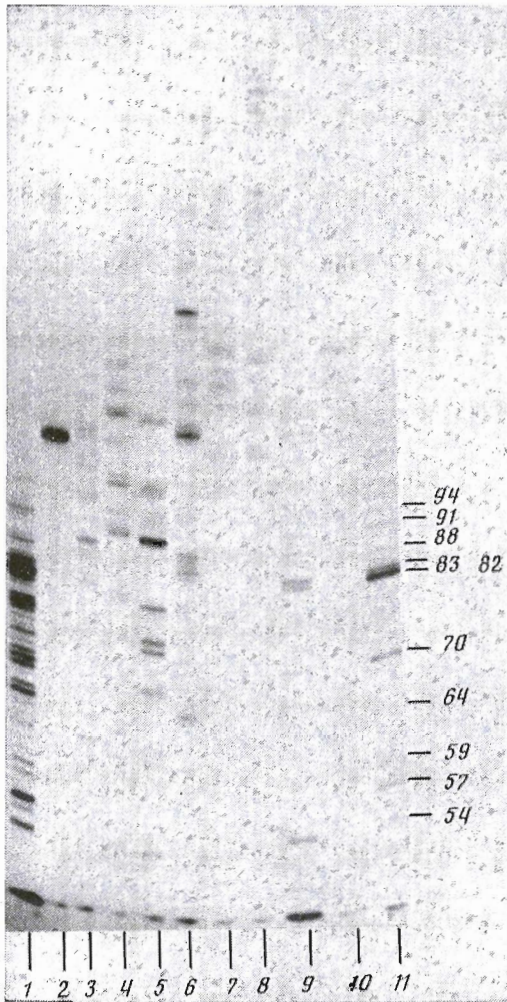


Рис. 3

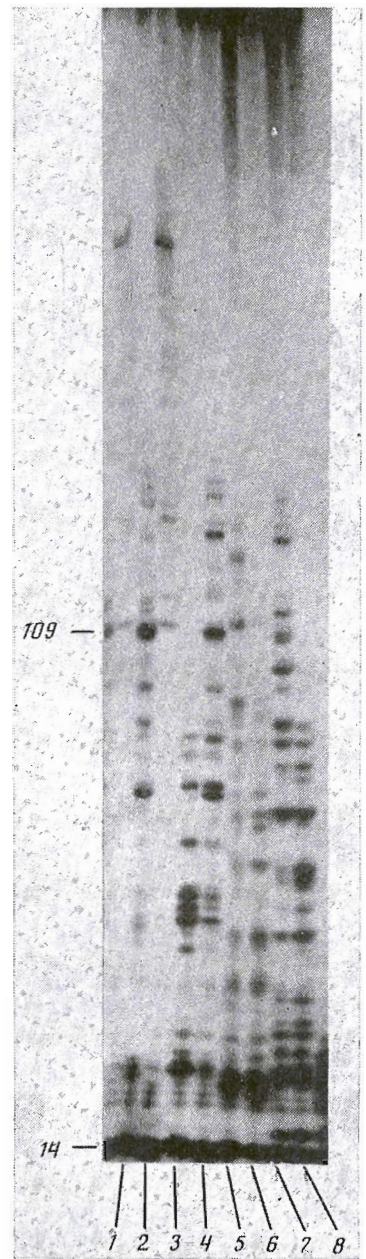


Рис. 4

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов праймерзависимого синтеза ДНК, осуществляемого ДНК-полимеразой α на матрице M13mp11: 1 — исходный праймер-матричный комплекс; 2 — дополнительное доэстраивание в течение 60 мин в присутствии 10 мкМ dNTP; 3, 4, 7-9 и 11 — аналогичный синтез с добавлением 1 мМ терминатора: 3 — aGTP(3'NH₂), 4 — aATP(3'NH₂), 7 — dBiTP(3'NH₂), 8 — dBiTP(3'F), 9 — aTTP(3'NH₂), 11 — BvdUTP(3'NH₂); 5-10 мкМ dCTP, dGTP, dTTP и 1 мМ dBiTP; 6 — 10 мкМ dCTP, dATP, dTTP и 1 мМ dBiTP; 10 — 10 мкМ dATP, dCTP, dGTP и 1 мМ BvdUTP

Рис. 4. Электрофореграмма продуктов синтеза ДНК на матрице M13mp11 в присутствии ДНК-полимераз I (1-4) и β (5-8). 1, 8 — синтез в присутствии 20 мкМ dATP, dCTP, dTTP и 1 мкМ dGTP; 2, 7 — то же с добавлением 0,5 мМ dBiTP; 3, 6 — синтез в присутствии 20 мкМ dGTP, dCTP, dTTP и 1 мкМ dATP; 4, 5 — то же с добавлением 0,5 мМ dBiTP

Как видно из рис. 1, BvdUTP(3'NH₂) терминирует синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами I (треки 2, 3) и β (треки 5, 6). Молярное соотношение концентраций терминатора и субстрата, необходимое для получения полной картины терминации в геле после электрофоретического

разделения продуктов реакции, составляет 50—100 для ДНК-полимеразы I и 5 — для ДНК-полимеразы β . В то же время VvdUTP ($3'N_3$) (треки 9, 10) подобно dTTP ($3'N_3$) (треки 7, 8) слабо терминирует синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразой β (треки 9, 10), а ДНК-полимераза I не включает это соединение в $3'$ -конец ДНК (данные не приводятся).

Синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразой α (рис. 2а), слабо терминируется VvdUTP ($3'NH_2$) (треки 2, 3); терминационные полосы появляются начиная с 60-звенных фрагментов ДНК. Это видно из сравнения с контрольным треком 5, а также с треком 1, где терминатора нет. В опыте (рис. 2а) соотношение концентраций VvdUTP ($3'NH_2$) и dTTP составило 50. Большой избыток терминатора приводит к сокращению синтеза из-за неспецифического ингибирования фермента. Эффективная терминация VvdUTP ($3'NH_2$) синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой α , была продемонстрирована в другом эксперименте (рис. 3, 11), в котором элонгация праймера проводилась в присутствии всех четырех субстратов (2 мкМ dNTP), после чего в реакционную смесь был добавлен терминатор (1 мМ VvdUTP ($3'NH_2$)), в результате чего все праймеры были достроены ферментом до терминаторных звеньев.

Значительно хуже ДНК-полимераза α использует VvdUTP ($3'N_3$) (рис. 3, 7, 8, 250-кратный избыток относительно субстрата). Слабая терминация синтеза в области 60—120-звенных фрагментов ДНК сочетается с неспецифическими паузами. Можно считать, что это соединение практически не включается ДНК-полимеразой α в $3'$ -конец ДНК.

Иначе ведет себя по отношению к обоим аналогам dTTP обратная транскриптаза (рис. 2б): VvdUTP ($3'N_3$) (3—6) и VvdUTP ($3'NH_2$) (11—14) подобно dTTP ($3'N_3$) (7—10) и dTTP ($3'NH_2$) (15—18) проявляют ярко выраженные терминирующие свойства, причем как азидо- так и амниопроизводные включаются этим ферментом в ДНК одинаково хорошо. Это еще раз подтверждает гипотезу о наименьшей субстратной специфичности обратной транскриптазы по сравнению с другими ДНК-полимеразами.

Бензимидазольный аналог dBiTP включается в цепь ДНК при катализе процесса ДНК-полимеразой I и β как вместо остатка dGMP, так и вместо остатка dAMP (рис. 4). Это показано следующими опытами. Контрольный синтез проводился в смесях, содержащих по 20 мкМ dCTP, dTTP и dATP (dGTP), а недостающий четвертый трифосфат — dGTP (или dATP) брали в концентрации 1 мкМ. В опытах помимо контрольной смеси использовался 500 мкМ dBiTP. Если сравнить попарно треки 1, 2; 3, 4; 8, 7 и 5, 6, видно, что при добавлении dBiTP синтез проходит значительно дальше. Это возможно лишь в случае, если dBiTP включается в ДНК вместо взятого в недостатке dNTP. То же самое наблюдается и для синтеза, катализируемого ДНК-полимеразой α (рис. 3, 5, 6). Во всех исследованных случаях замена dGTP на dBiTP приводит к более протяженному синтезу ДНК, чем аналогичная замена dATP. Это свидетельствует о том, что dBiTP лучше заменяет dGTP, чем dATP.

Терминаторные аналоги dBiTP ($3'NH_2$) и dBiTP ($3'F$) исследовались в опытах со всеми четырьмя ДНК-полимеразами. Ни один из ферментов не включает их в цепь ДНК, т. е. оба этих аналога не проявляют терминаторных свойств. Данные по ДНК-полимеразе α приведены на рис. 3 (7, 8). Контролями в этом случае были соответственно aGTP ($3'NH_2$), aATP ($3'NH_2$) и aTTP ($3'NH_2$) (рис. 3, 3, 4 и 9 соответственно).

Из полученных результатов можно сделать два вывода. Во-первых, замещение метильной группы в положении 5 dTTP на 2-бромвинильную не ухудшает его субстратных свойств при синтезе ДНК всеми четырьмя ДНК-полимеразами. Во всех положениях синтезируемой цепи ДНК $3'$ -замещенные производные VvdUTP, а именно VvdUTP ($3'N_3$) и VvdUTP ($3'NH_2$), ведут себя так же, как dTTP ($3'N_3$) и dTTP ($3'NH_2$). Во-вторых, dBiTP способен включаться в цепь ДНК вместо dGTP и, менее эффективно, вместо dATP. Известно [8—10], что остатки $2'$ -дезоксинуклеотида, содержащего бензимидазол в качестве основания, включаются в цепь ДНК, но вопрос этот изучен недостаточно. В бесклеточных системах с очищенными ферментами такие исследования не проводились. Введение дополни-

тельного заместителя в 3'-положение dBiTP полностью лишает полученные соединения свойств субстратных терминаторов. Из этого следует, что введение сразу двух модификаций в молекулу субстрата в одних случаях может вызвать незначительное изменение их субстратных свойств, тогда как для других соединений — полную их потерю. Таким образом, в настоящее время трудно однозначно предсказать свойства вновь синтезируемых модельных субстратных терминаторов с замещенными гетероциклическими основаниями [11, 12].

Экспериментальная часть

ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) (КФ 2.7.7.7) из штамма-продуцента CJ155 очищена по методу [13]; ДНК-полимераза β из печени крысы (КФ 2.7.7.7) выделена по методу [14]; ДНК-полимераза α из тимуса теленка (КФ 2.7.7.7) очищена по методу [15], обратная транскриптаза из вируса птичьего миеобластома (КФ 2.7.7.49) любезно предоставлена В. М. Кавсаном (ИМВиГ АП УССР, Киев). ДНК фагов M13mp10 и M13mp11 очищены по методу [16]; праймер d(CCCAGTCACGACGT) синтезирован А. В. Ажаевым. Праймер-матричный комплекс, радиоактивно меченный по 5'-концу (удельная радиоактивность 300–500 имп/мин на 1 пг ДНК), готовили по методу [17]. В работе использованы полинуклеотидкиназа фага T4 (P-L Laboratories, США), [γ - 32 P]АТР (5000 Ки/ммоль, «Изотоп»), dАТР, dGTP, dCTP и dTTP (НИКТИ БВВ, Бердск). dNTP(3'NH₂) и dTTP(3'N₃) синтезированы по методу [18], dCTP(3'F) и dTTP(3'F) любезно предоставлены И. А. Михайлопуло (ИБХ АН БССР, Минск). Чистоту синтезованных аналогов dNTP проверяли методом ВЭЖХ на колонке «Alltech NH₂» (10 мкм, Alltech Associates, США, 0,46×25 см). Для элюции использовали линейный градиент концентрации КН₂РO₄ (рН 4,5; 0,05–1 М в течение 30 мин и 1 М в течение 10 мин, скорость потока 1,5 мл/мин). Значения R_f (таблица) определяли на пластинках силуфол UV₂₅₄ в системе дioxан — вода — 25% водн. NH₃ (6 : 4 : 1).

5'-Трифосфат 1-(3-азидо- и 3-фтор-2,3-дидезокси- β -D-рибофуранозил)бензимидазола (dBiTP(3'N₃) и dBiTP(3'F)). В 2 мл СН₃CN растворяли 218,6 мкл (1,6 ммоль) триэтиламина, 107,6 мг (1,6 ммоль) триазола и 47,5 мкл (0,5 ммоль) POCl₃. Через 40 мин смесь центрифугировали и супернатант прибавляли к соответствующему нуклеозиду (0,2 ммоль), предварительно высушенному упариванием с пиридином. Протекание реакции контролировали ТСХ на силуфоле UV₂₅₄ в системе хлороформ — метанол (9 : 1). Через 10 мин к реакционной смеси добавляли 4 мл 0,2 М раствора три-*n*-бутиламмониевой соли пиродифосфорной кислоты в DMF и выдерживали 1,5 ч. Затем к реакционной массе, охлажденной до 0° С, прибавляли 10 мл воды и оставляли на ночь при 20° С. Реакционную массу упаривали, разбавляли водой до 200 мл и хроматографировали на колонке с Toyopearl-DEAE (3×25 см, Toyosoda, Япония) в градиенте концентрации NH₄HCO₃ (рН 7,5, 2 л, 0–0,4 М). Из объединенных фракций NH₄HCO₃ удаляли упариванием с водой.

5'-Трифосфат 1-(3-амино-2,3-дидезокси- β -D-рибофуранозил)бензимидазола (dBiTP(3'NH₂)). Растворяли 26 мг (0,05 ммоль) dBiTP(3'N₃) в 5 мл смеси пиридин — 25% водн. аммиак (1 : 1 по объему) и прибавляли 40 мг (0,15 ммоль) трифенилфосфина. Реакционную массу перемешивали 40 ч и упаривали досуха. Остаток распределяли между 20 мл воды и 20 мл эфира. Водный слой отделяли, разбавляли водой до 100 мл и наносили на колонку (2×15 см) DEAE-Toyopearl. Вещество элюировали линейным градиентом NH₄HCO₃ (0–0,5 М, общий объем 800 мл). Соответствующие фракции объединяли и упаривали, соли удаляли многократным перепариванием с водой.

Выходы и характеристики полученных соединений представлены в таблице; 5'-трифосфорилирование BvdUTP и dBiTP осуществляли по методу [18].

Реакционные смеси для матричного синтеза ДНК содержали 1 мкл раствора праймер-матричного комплекса (6000–8000 имп/мин), 1 мкл белкового буфера (20 мМ MgCl₂, 50 мкг/мл BSA, 0,1 М трис-HCl, рН 8,0), 1 мкл смеси всех четырех dNTP (по 10 мкМ). 1 мкл раствора терминатора там, где он используется, в противном случае — воды и 1 мкл препарата фермента (4 ед. акт. ДНК-полимеразы I, 2 ед. акт. ДНК-полимеразы β и обратной транскриптазы и 0,5 ед. акт. ДНК-полимеразы α). Синтез ДНК в присутствии ДНК-полимеразы I вели 2–5 мин, с остальными ферментами — 20–60 мин там, где это не оговорено специально. Реакцию останавливали добавлением 3 мкл 90% формамида, содержащего 20 мМ Na₂EDTA и по 0,02% бромфенолового синего и ксиленцианола. Для разделения лентей ДНК смеси прогревали 1 мин при 100° С и сразу же наносили на электрофорезный гель. Для опыта, результаты которого показаны на рис. 3, был приготовлен комплекс ДНК фага M13mp11 с синтетическим праймером, удлиненным в присутствии 2 мкМ dNTP в течение 30 с с помощью ДНК-полимеразы I. Этот комплекс очищали от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией на сефадексе G-100 и использовали в синтезе ДНК в качестве праймер-матрицы.

Для разделения синтезированных фрагментов ДНК использовали методику [17] со следующими изменениями. Электрофорез проводили в тонком (40×20×0,03 см) геле с градиентом концентрации полиакриламида от 10 до 20% при 40 В/см в 50 мМ трис-барбитурате, рН 8,6 (Reanal, ВНР), содержащем 2 мМ EDTA. Электро-

форез (рис. 3) проводили по методике [19]. Для радиоавтографии гель покрывали пленкой Alcoa Film и экспонировали с усиливающим экраном на рентгеновскую пленку РМ/В при -70°C в течение 12–60 ч, после чего проявляли в стандартном проявителе Р-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hillebrand G. G., McClusky A. H., Abbott K. A., Revich G. G., Beattie K. L. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 7. P. 3155–3171.
2. Reeves S. T., Beattie K. L. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 2. P. 2262–2268.
3. Lasken R. S., Goodman M. F. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 3. P. 1301–1305.
4. Dyatkina N. B., Kravetsky A. A., Azhayev A. V., Jartseva I. V. // Synthesis. 1985. № 4. P. 410–411.
5. Dyatkina N. B., Alexandrova L. A., von Janta-Lipinski M., Langen P. // Z. Chem. 1985. V. 25. № 5. P. 108.
6. Дяткина Н. В., Краевский А. А., Герман Г., фон Янта-Липински М., Ланген П., Ярцева И. В. // Биоорг. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 408–411.
7. Allandein H. S., Chen M. S., Lee J. J., DeClercq E., Prusoff W. H. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 2. P. 603–606.
8. Seiler J. P. // Mutat. Res. 1972. V. 15. № 3. P. 273–276.
9. Seiler J. P. // Mutat. Res. 1973. V. 17. № 1. P. 21–15.
10. Singer B., Kusmierk J. J. // Ann. Rev. Biochem. 1982. V. 51. P. 655–693.
11. Краевский А. А., Куханова М. К. Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. 1986. Т. 22. С. 2–164.
12. Бибилашвили Р. Ш., Чиджавадзе З. Г., Краевский А. А., Куханова М. К., Атражеев А. М., Ажиев А. В., Кутагеладзе Т. В. // Биополимеры и клетка. 1985. Т. 1. № 6. С. 293–306.
13. Bambara R. A., Uyemurs D., Lehman I. R. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 13. P. 4090–4094.
14. Атражеев А. М., Куханова М. К. // Биоорг. химия. 1986. Т. 11. № 12. С. 1627–1635.
15. Grosse F., Krauss G. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 19. P. 5470–5475.
16. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20–78.
17. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560–564.
18. Зайцева В. Е., Дяткина Н. В., Краевский А. А., Скапцова Н. В., Турина О. В., Гнучев Н. В., Готрих Б. П., Ажиев А. В. // Биоорг. химия. 1985. Т. 10. № 5. С. 670–680.
19. Sanger F., Coulson A. R., Nicklen S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.

Поступила в редакцию
12.1.1987

2'-DEOXYRIBONUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES CHEMICALLY MODIFIED IN THE BASE AND SUGAR MOIETIES AS SUBSTRATES FOR DNA BIOSYNTHESIS IN VITRO

ATRAZHEV A. M., DYATKINA N. B., ROZOVSKAYA T. A.,
ALEXANDROVA L. A., CHIDGEAVADZE Z. G.*, von JANTA-LIPINSKI M.**

Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

**Institute of Experimental Cardiology, National Cardiology Research Center,*

Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow;

***Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences
of the GDR, Berlin-Buch*

Incorporation of 2'-deoxyribonucleoside 5'-triphosphate derivatives, chemically modified both in the base and at 3'-position, into DNA by four different DNA polymerases was investigated. It is shown that 3'-azido- and 3'-amino-2',3'-dideoxy-(*E*)-5-(2-bromovinyl)-uridine 5'-triphosphates effectively terminate DNA synthesis catalysed by *E. coli* DNA polymerase I, rat liver DNA polymerase β , and AMV reverse transcriptase. Calf thymus DNA polymerase α incorporates only the 3'-amino derivative. DNA polymerases I and β catalyse DNA synthesis in the presence of β -*D*-(2'-deoxyribofuranosyl)-1-benzimidazol 5'-triphosphate, inserting the corresponding monophosphate in place of dGTP, whereas 3'-substituted analogues of this compound were inactive in the reactions.