



УДК 577.213.47

СПОСОБНОСТЬ 3'-ЗАМЕЩЕННЫХ ФОСФОТИОАТОВ
НУКЛЕОТИДОВ ТЕРМИНИРОВАТЬ СИНТЕЗ ДНК,
КАТАЛИЗИРУЕМЫЙ РАЗНЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

*Атражесв А. М., Дяткина Н. Б., Краевский А. А.,
Еуханова М. К., Чиджавадзе З. Г.*, Виблашвили Р. Ш.**

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

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

Изучена способность новых терминаторных субстратов, содержащих α -тиотрифосфатный остаток, терминировать синтез ДНК, катализируемый несколькими ДНК-полимеразами. Бесклеточная система испытаний содержала (+)-цепь ДНК фага M13mp10 и синтетический олигонуклеотидный праймер. Обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц катализовала терминацию синтеза ДНК 3'-азидо-, 3'-фтор- и 3'-амино-2',3'-дидезокситимидин-5'-(α -тио)трифосфатами. ДНК-полимераза β из печени крыс и ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) из *E. coli* утилизировали только второе и третье соединения, а ДНК-полимераза α из тимуса теленка не утилизировала ни одного соединения. Обсуждается низкая специфичность обратной транскриптазы к различным элементам молекул субстратов.

В последние годы нами разработаны ориентировочные правила, в соответствии с которыми можно направленно синтезировать терминаторные субстраты биосинтеза ДНК, катализируемого различными ДНК-полимеразами [1, 2]. Терминаторными субстратами называют аналоги dNTP, включающиеся в 3'-конец синтезируемой цепи ДНК и после этого обрывающие ее дальнейшую элонгацию. Различные ДНК-полимеразы, катализирующие синтез ДНК, проявляют разную субстратную специфичность к терминаторам. С одной стороны, это дает возможность проводить сравнительный анализ способности ДНК-полимераз отбирать субстраты, что имеет значение для исследования биосинтеза ДНК в клетке, с другой — поиск селективных ингибиторов вирусных ДНК-полимераз имеет важное значение для медицины и ветеринарии. Особенно остро стоит вопрос поиска селективных ингибиторов обратных транскриптаз, продуцируемых ретровирусами. Только в последние два года появились сообщения о селективных терминаторных субстратах обратных транскриптаз в системе с очищенными ферментами [1, 2] и в культуре клеток [3, 4].

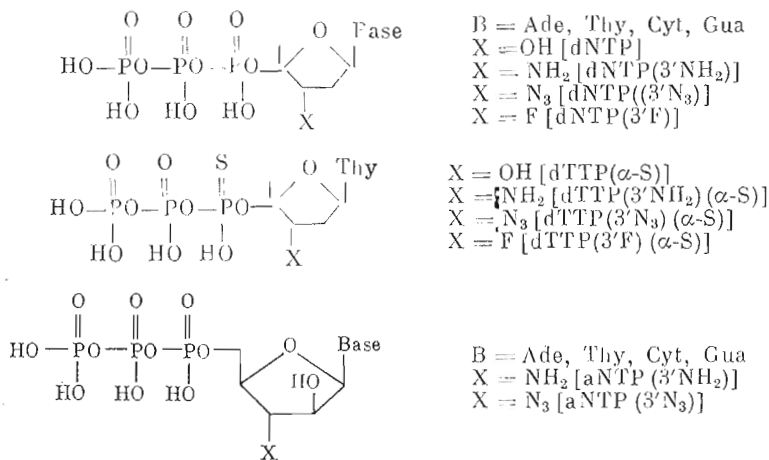
В настоящее время показано, что обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц, наиболее изученная сред ферментов этого типа, менее специфична, чем ДНК-полимеразы млекопитающих α , β и γ при выборе комплементарного к матрице субстрата, причем это различие в точности достигает величины двух порядков [5]. По отношению к матрице обратная транскриптаза также менее специфична, чем ДНК-полимеразы α и β . Это проявляется в способности обратных транскриптаз утилизировать как рибо-, так и 2'-дезоксирибоматрицы, а также матрицы, содержащие в своем составе остатки 2'-фтор-2'-дезоксинуклеотидов или 2'-О-метилнуклеотидов [6].

Исследован также ряд аналогов dNTP, несущих в 3'-положении вместо гидроксила остатки NH_2 , F, OCH_3 , N_3 и другие функциональные группы. Сравнение терминаторных свойств этих соединений в синтезе ДНК, катализируемом шестью различными ДНК-полимеразами, показало, что обратная транскриптаза вируса птичьего миелобластома менее специфична к типу заместителя и катализируемый ею синтез терминируется даже в тех случаях, когда действие других ДНК-полимераз практически не зависит от присутствия таких аналогов [1, 2]. Таким образом, и по отношению к

сахарному остатку dNTP обратная транскриптаза менее специфична, чем ДНК-полимеразы млекопитающих. Поэтому интересно было выяснить, влияют ли замещения в последнем, ранее не исследованном звене субстрата — трифосфатном остатке на утилизацию терминирующих субстратов обратной транскриптазой, а также другими ДНК-полимеразами.

Для решения этой задачи в нашей лаборатории были синтезированы 3'-замещенные аналоги dTTP (α -S): dTTP(3'N₃)(α -S), dTTP(3'NH₂)(α -S) и dTTP(3'F)(α -S) (сокращения см. в схеме 1). Сообщенные ранее

Схема 1



испытания dNTP(3'NH₂) и dNTP(3'F) показали их терминирующую активность в системах с ДНК-полимеразами I (*E. coli*) и β (печень крысы). dNTP(3'NH₂) узнает также ДНК-полимераза α из тимуса теленка [4, 7]. Синтез ДНК, катализируемый обратной транскриптазой, терминировали также dNTP(3'N₃) [4]. Поэтому испытания dTTP(3'N₃)(α -S), dTTP(3'NH₂)(α -S) и dTTP(3'F)(α -S) в бесклеточной системе биосинтеза ДНК с использованием перечисленных ДНК-полимераз позволяют выяснить влияние α -трифосфатной группы на включение терминаторов в ДНК.

Для того чтобы проверить терминирующие свойства синтезированных соединений, были поставлены опыты праймированного синтеза на ДНК фага M13mp10; первичная структура продукта, включая праймер, приведена на схеме 2.

Схема 2

CCCAGTCSG¹⁰ ACGTTGTA¹⁴AAA²⁰ ACGACGGCCA³⁰ CTGCCAAGCT⁴⁰ TGGGCTGCAG⁵⁰
⁶⁰ GTCCAGTCTA ⁷⁰ GAGGATCCCC ⁸⁰ GGGCGAGCTC ⁹⁰ GAATTCGTA¹⁰⁰ TCAATGGTCA¹⁰⁰

Опыты по изучению воздействия α -тиотерминаторов на синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразами I и β (рис. 1), ставились в двух вариантах: в одном реакции оставляли после инкубации с терминатором и субстратами, а в другом проводили дополнительный синтез в присутствии избытка dNTP и добавочной порции фермента. При этом неспецифические полосы, отвечающие не включившим терминаторы фрагментам ДНК, смещались в верхнюю область геля, проявляя картину терминирования. Как видно из треков 4–7 рис. 1 б, dTTP(3'NH₂)(α -S) хорошо терминирует синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой β , что проявляется в картине полос фрагментов, оканчивающихся на тимидин (15-T, 17-T, 32-T, 40-T, 44-T и т. д.). Контролем к этим данным также можно считать треки 2 и 3, в которых терминация проведена dTTP(3'NH₂). Подобная же картина показана для dTTP(3'F)(α -S) (см. треки 8, 9), причем терминация наблюдается даже тогда, когда концентрация терминатора меньше концентрации субстрата. В то же время dTTP(3'N₃)(α -S) даже при концентрации 1 мМ (500-кратный избыток над субстратом) заметной

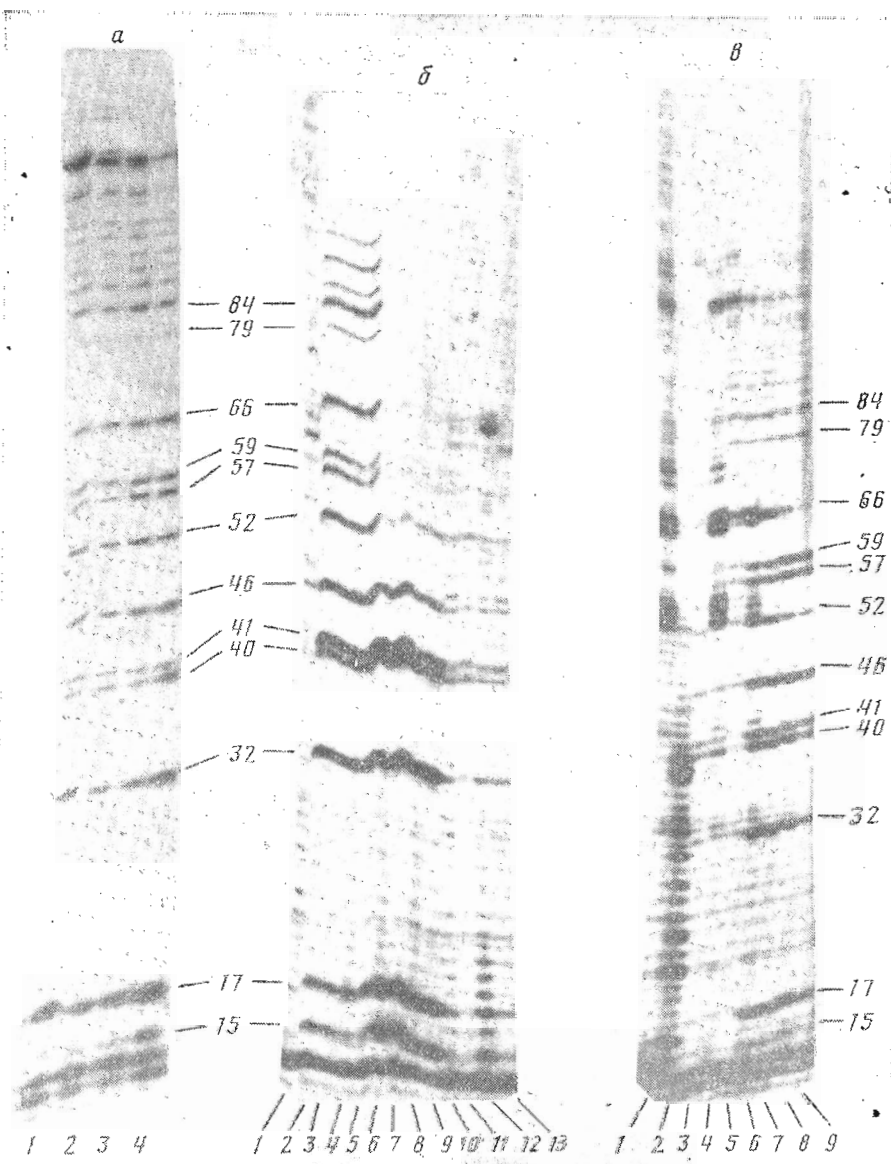


Рис. 1. Электрофореграмма разделения продуктов праймированного синтеза ДНК на матрице M13mp10 ДНК-полимеразами I (а, в) и β (б) в присутствии α-тиотерминаторов. а: концентрация dNTP 1,3 мкМ. 1, 2 и 3, 4 – синтез в присутствии dTTP(3'NH₂)·(α-S), 200 и 500 мкМ. 2 и 4 – дополнительный синтез в присутствии 400 мкМ dNTP. б: 1 – синтез без терминатора; 2, 3 – dTTP(3'NH₂), 10 мкМ; 4, 5 и 6, 7 – dTTP(3'NH₂)·(α-S), 15 и 100 мкМ; 8, 9 – dTTP(3'F)(α-S), 5 мкМ; 10, 11 – dTTP(3'N₃)(α-S), 1 мМ; 12, 13 – dTTP(3'N₃), 200 мкМ. 3, 5, 7, 9, 11, 13 – дополнительная инкубация с 400 мкМ dNTP после терминации. в: 1 – без терминатора; 2, 3 – dTTP(3'N₃)(α-S); 1 мМ; 4, 5 – dTTP(3'NH₂)(α-S), 50 мкМ; 6, 7 – dTTP(3'F)(α-S), 50 мкМ, 8, 9 – dTTP(3'NH₂), 100 мкМ. 3, 5, 7, 9 – дополнительная инкубация с 400 мкМ dNTP после терминации. Сбоку здесь и на рис. 2, 3 указаны номера остатков тимидина синтезированной цепи ДНК и положение фрагментов, оканчивающихся на эти остатки

терминации не вызвал, что видно по распределению полос на треках 10, 11 рис. 1, б, напоминающих трек 1 (синтез без терминатора).

dTTP(3'N₃)(α-S) не терминирует синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой I (треки 2, 3; рис. 1в), хотя при этом наблюдается неспецифическое ингибирование синтеза. В то же время dTTP(3'NH₂)(α-S) (рис. 1а) и dTTP(3'F)(α-S) (треки 6, 7; рис. 1в) проявляют хорошо выраженные терминаторные свойства, что видно из набора полос, оканчивающихся на тимидин, и из сравнения с контрольным треком (терминация

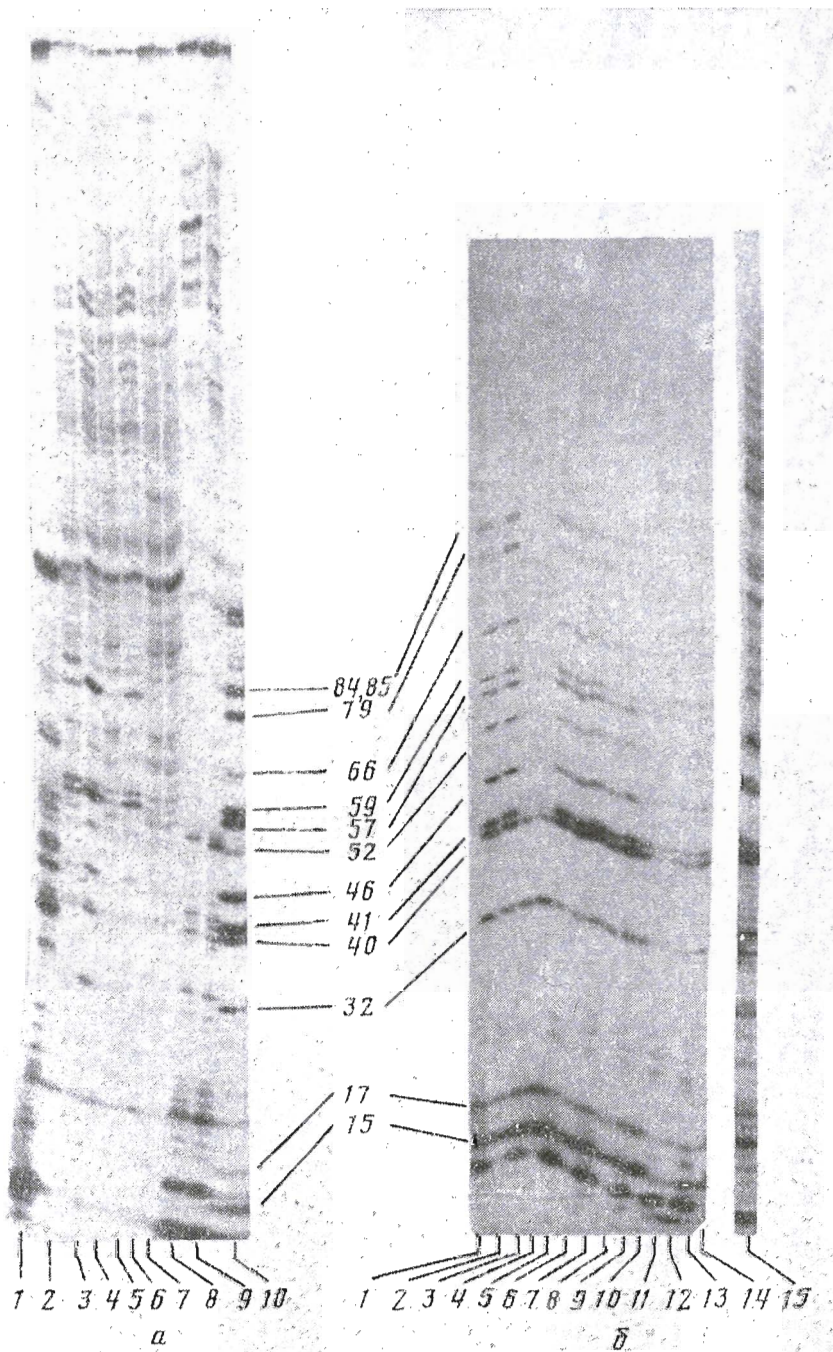


Рис. 2. Электрофореграмма разделения продуктов праймированного синтеза ДНК на матрице M13mp10 ДНК-полимеразой α (а) и обратной транскриптазой (б) в присутствии α -тиотерминаторов. а: 1 — синтез без терминатора; 2, 3 — dTTP(3'NH₂), 100 мкМ; 4, 5 — dTTP(3'NH₂)(α -S), 100 мкМ; 6, 7 — dTTP(3'F)(α -S), 100 мкМ; 8, 9 — dTTP(3'NH₃)(α -S), 250 мкМ. 3, 5, 7, 9 — дополнительная инкубация с 400 мкМ dNTP после терминации. 10 — терминация ДНК-полимеразы 1 dTTP(3'NH₂), 200 мкМ (контроль). б: 1, 2 и 3, 4 — dTTP(3'N₃)(α -S), 50 и 200 мкМ; 5, 6; 7, 8 и 9, 10 — dTTP(3'NH₂)(α -S), 20, 50 и 200 мкМ; 11, 12 и 13, 14 — dTTP(3'F)(α -S), 10 и 50 мкМ. 15 — синтез без терминатора. В четных треках проведена дополнительная инкубация с 400 мкМ dNTP

Количество терминаторного субстрата (моль/моль dNTP), необходимое для эффективного терминирования синтеза ДНК, катализируемого разными ДНК-полимеразами

ДНК-полимераза	dTTP(3'NH ₂) (α-S)	dTTP(3'NH ₂)	dTTP(3'NH ₂) (α-S)	dTTP(3'N ₃)	dTTP(3'F) (α-S)	dTTP(3'F)
1	200-400	30-50	- *	-	25	10
α	-	50	-	-	-	-
β	5	1	-	200-500	0,5-1	0,5
Обратная транскриптаза	10	10	25	20-50	20	20

* Проверк означает, что терминация не наблюдалась.

dTTP(3'NH₂); треки 8, 9; рис. 1*б*). Однако терминация dTTP(3'NH₂) (α-S) наблюдается лишь при превышении молярной концентрации этого соединения над субстратом в 170-400 раз. Если же это соотношение снизить до 25 раз, терминационной картины на геле не получается (треки 4, 5; рис. 1*б*).

На рис. 2*а* приведены данные для ДНК-полимеразы α: dTTP(3'NH₂) (α-S) (треки 4, 5), dTTP(3'F) (α-S) (треки 6, 7) и dTTP(3'N₃) (α-S) (треки 8, 9) не терминируют синтез ДНК, так как на соответствующих треках нет набора полос фрагментов ДНК, оканчивающихся на тимидин (эти полосы имеются на треках 3, 10, контроль в присутствии dTTP(3'NH₂)).

В случае обратной транскриптазы (рис. 2*б*) ситуация другая. Эффективными терминаторами оказались все испытанные соединения, причем соотношение концентраций терминатора и субстрата, обеспечивающее терминацию α-тиопроизводными, такое же, как и для аналогов, содержащих фосфатную группу (таблица). Можно сказать, что α-тиофосфатная группа не затрудняет узнавания терминирующих аналогов dNTP обратной транскриптазой, тогда как для остальных ферментов такие затруднения имеются.

На рис. 3 показана картина терминации синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой α и обратной транскриптазой, с участием dTTP(3'F) (α-S) в сравнении с действием других хорошо изученных терминаторных субстратов, а именно dTTP(3'F) [8], dTTP(3'N₃) [2], aTTP(3'N₃) и aNTP(3'NH₂) [9]. Как видно из рис. 3, dTTP(3'F) (α-S) (трек 7) подобно dTTP(3'F), dTTP(3'N₃), aTTP(3'N₃) и aTTP(3'NH₂) (треки 8, 5, 4, 3) эффективно терминирует синтез, катализируемый обратной транскриптазой, и подобно dTTP(3'F), dTTP(3'N₃) и aTTP(3'N₃) (треки 8, 5, 4 для ДНК-полимеразы α) не влияет на синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой α.

Примерные количественные оценки соотношения терминатор-субстрат для проявления эффективной картины терминации (дающей возможность читать первичную структуру) даны в таблице. Можно видеть, что наименьшей избирательностью обладает обратная транскриптаза. К ней близка ДНК-полимераза β, тогда как ДНК-полимераза α проявляет наибольшую субстратную специфичность.

Все три типа соединений, исследованные в данной работе, синтезированы и изучены впервые. Они представляют интерес с нескольких точек зрения.

Известно, что 3'→5'-экзонуклеазное расщепление ДНК, содержащей тиофосфатные межнуклеотидные группы, ДНК-полимеразой I сильно замедлено [10]. Поэтому, с одной стороны, можно было ожидать, что использование терминаторных субстратов с (α-S)-группами для определения первичной структуры ДНК будет более выгодным, так как соотно-

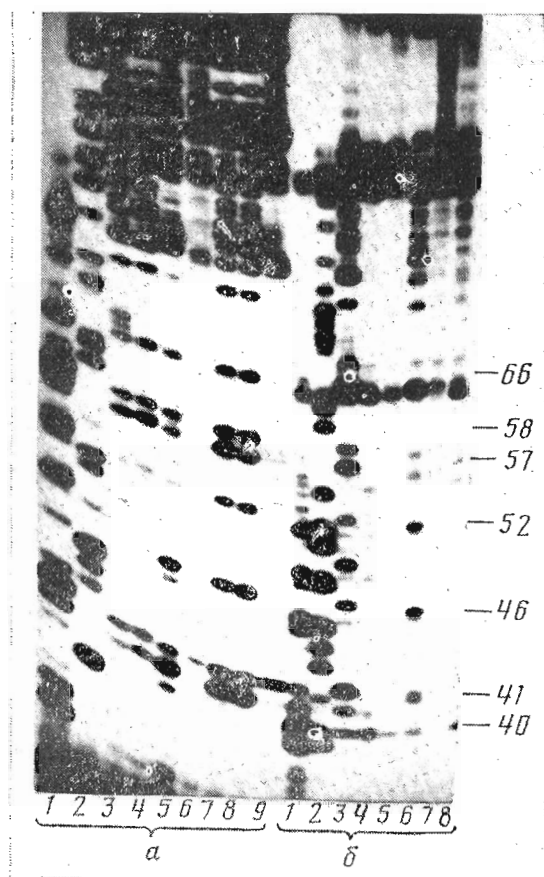


Рис. 3. Электрофореграмма разделения продуктов праймированного синтеза ДНК на матрице M13mp10 ДНК-полимеразой α (a) и обратной транскриптазой (б) в присутствии набора аналогов dNTP. 1 — синтез ДНК в смеси 10 мкМ всех четырех dNTP без терминатора, время инкубации 2 мин; 2–9 — то же, что и 1, но с добавлением после 2 мин прерывкубации 1 мМ аналогов dNTP с последующей инкубацией в течение 60 мин: 2 — aGTP(3'NH₂), 3 — aTTP(3'NH₂), 4 — aTTP(3'N₃), 5 — dTTP(3'N₃), 6 — dTTP(α -S), 7 — dTTP(3'F)(α -S), 8 — dTTP(3'F), 9 — dATP(α -S)

шение скоростей их включения в 3'-конец цепи ДНК, приводящего к терминации синтеза, и экзонуклеазного выщепления с последующим продолжением цепи могло бы быть более значительным, чем для известных терминаторов. Это в свою очередь позволило бы значительно понизить концентрацию субстратов в инкубационной среде и, возможно, оптимизировать процесс.

Однако, с другой стороны, замещение 3'-гидроксила в dNTP(α -S) на другой заместитель в сочетании с α -тиоэфирным остатком могло значительно ухудшить субстратные свойства этих аналогов и свести на нет ожидаемый эффект. Все это ранее не было исследовано.

Полученные результаты показывают (см. таблица), что dTTP(3'F)(α -S) и dTTP(3'NH₂)(α -S) являются хорошими терминаторными субстратами биосинтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразами I и β . Однако в обоих случаях они проявляли терминаторные свойства в концентрациях, в 5–10 раз более высоких, чем dTTP(3'F) и dTTP(3'NH₂) соответственно. Другими словами, введение в α -положение аналогов субстрата тиофосфатного остатка вместо фосфатного понижает сродство модифицирующихся нуклеотидов к комплексу праймер-матрица+фермент. Примерно такое же правило найдено для ДНК-полимеразы α , для которой активным терминатором был dTTP(3'NH₂), тогда как dTTP(3'NH₂)(α -S) синтез ДНК не терминировал. Для обратной транскриптазы картина менее ясна. В то же время следует дополнительно подчерк-

нать, что все три типа α -тиоаналогов субстратов — dTTP (3'F) (α -S), dTTP (3'NH₂) (α -S) и dTTP (3'N₃) (α -S) — являются терминаторными субстратами обратной транскриптазы, тем самым подтверждая найденное нами ранее правило, что обратная транскриптаза представляет собой наименее специфичный фермент по сравнению с ДНК-полимеразами α , β , I и концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой [1, 2]. Таким образом, пониженное сродство обратной транскриптазы к элементам молекул субстратов относится не только к матрице, основанию и сахарному остатку в аналогах dNTP, но и к трифосфатному остатку.

Экспериментальная часть

ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова) выделена из штамма-продукта *E. coli* CJ155 и очищена по методу [11]; ДНК-полимераза β из печени крысы выделена по [12]; ДНК-полимераза α из тимуса телят очищена по методу [13], обратная транскриптаза из вируса птичьего миелобластома любезно предоставлена В. М. Кавсаном (Институт молекулярной биологии и генетики АН УССР, Киев) и А. М. Шевелевым (ВКНИЦ АМН СССР). ДНК фага M13mp10 очищена по методу [14]; использованный в качестве праймера олигонуклеотид d(CCCAGTCAAGACGT) синтезирован А. В. Ажаевым. В работе также использованы полинуклеотидкиназа фага T4 (P-L Laboratories, США), [γ -³²P]АТР (5000 Ки/ммоль, «Изотоп»), dNTP (НИКТИ БАН, Бердск).

Для приготовления радиоактивно помеченного праймер-матричного комплекса упаривали 100 мкКи [γ -³²P]АТР, к остатку добавляли 1 мкл буфера (0,5 М трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ MgCl₂, 20 мМ β -меркаптоэтанол), 2 мкл раствора олигонуклеотида (45 мкг/мл), 6 мкл воды и 1 мкл препарата полинуклеотидкиназы (1 ед. акт.). Реакцию вели 1 ч при 37°С, останавливали 1 мкл 0,2 М Na₂EDTA, инактивировали фермент прогреванием при 55°С в течение 5 мин, добавляли 10 мкл раствора ДНК фага M13mp10 (1 мг/мл), 2 мкл ТРНК (6 мг/мл), 4 мкл 5 М NaCl и оставляли на 2 ч в водяной бане, остывающей от 68 до 30°С. Образовавшийся комплекс отделяли гель-фильтрацией на колонке (0,3×10 см) с носителем Toyopearl HW-65, уравновешенным 20 мМ трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ NaCl, 0,5 мМ Na₂EDTA. Удельная радиоактивность комплекса составила 300–800 имп/мин на 1 нг ДНК.

Реакционные смеси объемом 5 мкл содержали по 10 нг праймер-матрицы (6000–8000 имп/мин), 50 нг бычьего сывороточного альбумина, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ трис-НСl (рН 8,0), смесь четырех dNTP (10 мМ для опытов с ДНК-полимеразой β и 2 мМ для остальных ДНК-полимераз). В одном опыте использовались следующие количества ферментов: 4 ед. акт. ДНК-полимеразы I, 2 ед. акт. ДНК-полимеразы β , 6 ед. акт. обратной транскриптазы и 0,5 ед. акт. ДНК-полимеразы α . Концентрации терминаторов указаны в подписях к рисункам. Синтез ДНК в присутствии ДНК-полимеразы I вели 2–5 мин, с остальными ферментами — 20–60 мин. Реакцию останавливали добавлением 3 мкл 90% формамида, содержащего 20 мМ Na₂EDTA и по 0,02% красителей бромфенолового синего и ксилолцианола. Для денатурации ДНК смеси прогревали 1 мин на кипящей водяной бане и сразу же наносили на электрофорезный гель.

Для разделения синтезированных фрагментов ДНК использовали методику [15] со следующими изменениями. Электрофорез проводили в тонких (40×20×0,03 см) пластинках полиакриламидного геля с градиентом концентрации акриламида от 7 до 20% при напряженности электрического поля 40 В/см; в качестве электрофорезного буфера был выбран 20 мМ трис-барбитурат, рН 8,6, содержащий 1 мМ Na₂EDTA. В этой системе бромфеноловый синий движется вместе с 8-звеньевыми, а ксилолцианол — с 30-звеньевыми олигонуклеотидами. После электрофореза гель покрывали пленкой Alcoa-Film и экспонировали с экраном ЭУИ-1 на рентгеновскую пленку РМ-В («Тасма», Казань) при -70°С в течение 12–60 ч, после чего проявляли радиоавтограф в стандартном проявителе Р-2. Электрофорез, представленный на рис. 3, проводили в условиях работы [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Библиашвили Р. Ш., Чиджавадзе З. Г., Краевский А. А., Куханова М. К., Аражев А. М., Ажаев А. В., Кутателадзе Т. В. // Биополимеры и клетка. 1986. Т. 1. № 6. С. 293–306.
2. Краевский А. А., Куханова М. К. Репликация ДНК эукариот. Изд. ВИНТИ. Сер. «Молекулярная биология». 1986. Т. 22. С. 2–164.
3. Mitsuya H., Weinhold K. J., Furman P. A., Clair M. H. St., Lehrman S. N., Gallo R. C., Logonesi D., Barry D. W., Broder S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 2. P. 7096–7100.
4. Mitsuya H., Broder S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 6. P. 1911–1915.
5. Battula N., Loeb L. A. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 4. P. 982–986.
6. Aoyama H., Sarih-Cottin L., Tarrago-Litvak L., Kakiuchi N., Litvak S., Guschlbauer W. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 824. V. 12. № 2. P. 225–232.
7. Chidgevadze Z. G., Beabealashvilli R. Sh., Atrazhev A. M., Kukhanova M. K., Azhayev A. V., Krayevsky A. A. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 3. P. 1674–1686.
8. Chidgevadze Z., Scamrov A., Beabealashvilli R., Kvasnyuk E., Zaytseva G., Mikhailopulo I., Kowollik G., Langen P. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 2. P. 275–278.

9. Панчихин А. В., Пурьгин П. П., Ажаев А. В., Краевский А. А., Кугачеладзе Т. В., Чиджавадзе З. Г., Бибилашвили Р. Ш. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1367-1379.
10. Cirpa A. P., Benkovic P. A., Benkovic S. J. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 8. P. 5897-5911.
11. Vambara R. A., Ueyama D., Lehman I. R. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 13. P. 4090-4094.
12. Атражес А. М., Куханова М. К. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 12. С. 1627-1635.
13. Grosse F., Krauss C. // Biochemistry. 1981. V. 20. № 19. P. 5470-5475.
14. Messing J. // Meth. Enzymol. 1983. V. 101. P. 20-78.
15. Maxam A. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 560-564.
16. Sanger F., Coulson A. R., Nicklen S. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463-5467.

Поступила в редакцию
11.XII.1986

3'-SUBSTITUTED NUCLEOSIDE PHOSPHOROTHIOATES TERMINATE DNA SYNTHESIS CATALYZED BY VARIOUS DNA POLYMERASES

АТРАЗЕВ А. М., ДЯТКИНА Н. В., КРАЕВСКИЙ А. А.,
КУХАНОВА М. К., ЧИДЖАВАДЗЕ З. Г.*, БЕАБЕЛАШВИЛИ Р. Ш.*

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

** Institute of Experimental Cardiology, of the USSR National Cardiology
Research Centre Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Ability of some new substrates containing the 5'- α -thiotriphosphate residue to terminate the DNA synthesis catalyzed by several DNA polymerases has been investigated. The cell-free test system contained the M13mp10 phage single-stranded DNA and a synthetic oligonucleotide primer. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus catalyzed termination of DNA synthesis by 3'-azido-3'-fluoro- and 3'-amino-2',3'-dideoxythymidine-5'-(α -thio)triphosphates, whereas rat liver DNA polymerase β and *E. coli* DNA polymerase I (Klenow's fragment) utilized only the second and the third compounds, and calf thymus DNA polymerase α failed to utilize any of the substrates. Low specificity of reverse transcriptase to different moieties of the substrate molecules is discussed.