



УДК 577.113.3.057

## СИНТЕЗ НОВЫХ ТЕРМИНАТОРНЫХ СУБСТРАТОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ — НУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ С МОДИФИЦИРОВАННЫМ УГЛЕВОДНЫМ ОСТАТКОМ

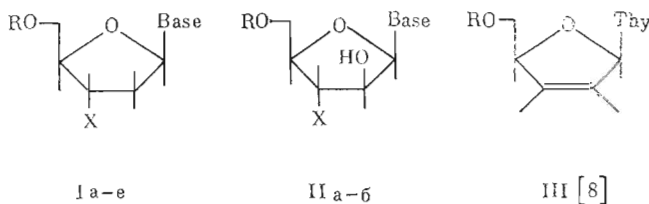
Дяткина Н. Б., Атражева Е. Д., Александрова Л. А.,  
Краевский А. А., фон Янта-Дипински М.\*

Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва;

\* Центральный институт молекулярной биологии  
Академии наук ГДР, Берлин-Бух, ГДР

Описан синтез 3'-хлор- и 3'-тиоциано-2',3'-дидезокситимидина реакцией 2,3'-ангидро-2'-дезокситимидина с хлористым аммонием или тиоцианатом лития соответственно, а также 3'-метансульфониламидо- и 3'-сульфамидо-2',3'-дидезокситимидина из 3'-амино-2',3'-дидезокситимидина. Эти соединения, а также 2',3'-ангидрорибоаденозин, 2',3'-ангидроликсоаденозин, 2',3'-O-изопронилиденцитидин и 2,3'-ангидро-2'-дезокситимидин превращены в 5'-трифосфаты реакцией с трис-1,2,4-триазолидом окиси фосфора и далее бис(трибутиламмоний)пирофосфатом. Полученные 5'-трифосфаты аналогов нуклеозидов изучены как терминаторные субстраты ДНК-полимераз из различных источников в бесклеточных системах биосинтеза ДНК.

Для изучения механизма функционирования ДНК-полимераз в настоящее время широко применяются нуклеозид-5'-трифосфаты, замещенные по 3'-положению. Некоторые из этих соединений являются терминаторными субстратами ДНК-полимераз, поскольку, включаясь в 3'-конец растущей цепи ДНК, они прерывают ее дальнейшую элонгацию из-за отсутствия гидроксила в 3'-положении. К настоящему времени синтезированы и изучены в биологических системах следующие нуклеозид-5'-трифосфаты:



I a : X = H [1, 2],

б : X = OCH<sub>3</sub> [3],

в : X = F [4],

г : X = N<sub>3</sub> [5]

д : X = NH<sub>2</sub> [5],

е : X = NHCOCH<sub>3</sub> [6],

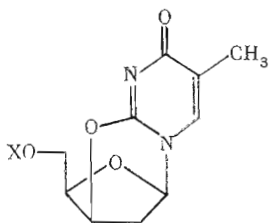
II a : X = N<sub>3</sub> [7],

б : X = NH<sub>2</sub> [7],

где Base = Ade, Gua, Cyt, Thy;

R = (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>P<sub>3</sub>O<sub>6</sub>.

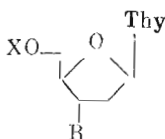
В настоящей работе описан синтез некоторых новых аналогов нуклеозид-5'-трифосфатов с целью сравнительного изучения ДНК-полимераз, а также поиска соединений, селективно ингибирующих ДНК-полимеразу из того или иного источника. Первая группа синтезированных нами нуклеозид-5'-трифосфатов — это 3'-замещенные 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты, содержащие в 3'-положении атом хлора или тиоциано-, метансульфониламидо- или сульфамидогруппу. Для получения таких трифосфатов прежде всего необходимо синтезировать соответствующие нуклеозиды:



(IV) X = Tr;

(V) X = H;

(Va) X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;



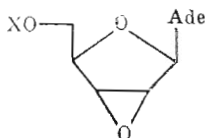
(VI) R = Cl, X = H; (VIa) R = Cl, X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;

(VII) R = SCN, X = H; (VIIa) R = SCN, X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;

(VIII) R = NH<sub>2</sub>, X = H; (IX) R = NHSO<sub>3</sub>H, X = H;

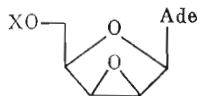
(IXa) R = NHSO<sub>3</sub>H, X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>; (X) R = NHSO<sub>2</sub>Me;

X = H; (Xa) R = NHSO<sub>2</sub>Me, X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;



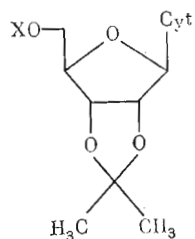
(XI) X = H;

(XIa) X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;



(XII) X = H;

(XIIa) X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;



(XIII) X = H;

(XIIIa) X = P<sub>3</sub>O<sub>9</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>;

Синтез 3'-хлор- (VI) и 3'-тиоцианопроизводного (VII) осуществляли путем раскрытия ангидроцикла 2,3'-ангидро-2'-дезоксинуклеозида (IV) под действием соответствующих нуклеофильных агентов — хлористого аммония или тиоцианата лития с последующим детритилированием. Обе реакции проводили в среде абс. диметилформаида при нагревании.

Нуклеозид (VI) был получен ранее из ангидропроизводного (IV) действием солянокислого пиридиния [9]. Синтез тиоцианопроизводного (VII) из ксилотимидина описан в работе [10]. Температура плавления и хроматографическая подвижность полученных нами нуклеозидов (VI) и (VII) совпадают с литературными данными [9, 10], их структура подтверждена также ЯМР- и масс-спектрами.

Для получения 3'-метансульфониламидо- (X) и 3'-сульфамидо-2',3'-дидезокситимидина (IX) в качестве исходного соединения использован 3'-амино-2',3'-дидезокситимидин (VIII). Обработка аминонуклеозида (VIII) эквимольным количеством метансульфонилхлорида на холоду в пиридине в присутствии триэтиламина позволяет добиться селективного ацилирования по аминогруппе. При обработке аминонуклеозида (VIII) метоксисульфохлоридом мы ожидали получить 3'-метоксисульфамидопроизводное. Однако вследствие высокой реакционной способности эфирной группы на стадии хроматографического выделения происходил гидролиз, приводящий к образованию сульфамидного производного (IX). Структура нуклеозида (IX) доказана ПМР-спектром, в котором отсутствовал сигнал протонов SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-группы, а также электрофорезом на бумаге: при pH 7,5 молекула (IX) содержит отрицательный заряд.

Второй группой синтезированных нами трифосфатов являются нуклеотиды с ограниченной конформационной подвижностью рибозного остатка. Ранее было установлено, что 5'-трифосфат 2',3'-дидезокси-2',3'-дегидротимидина (III) является в 10—100 раз более эффективным терминаторным субстратом ДНК-полимераз, чем другие известные терминаторные субстраты [8]. Видимо, это объясняется тем, что углеводная часть этого нуклеозида имеет такую же фиксированную конформацию, как и углеводная часть субстрата в ДНК-синтезирующем комплексе [11, 12]. Поэтому можно было надеяться, что и другие нуклеозид-5'-трифосфаты, углеродные атомы сахарной части которых имеют пониженную конфор-

**Физико-химические и хроматографические свойства синтезированных трифосфатов нуклеозидов**

| Нуклеозидтрифосфат | УФ (вода), $\lambda_{\text{max}}$ нм (e) | $R_f$ (A) | Время удерживания, мин * |
|--------------------|--|-----------|--------------------------|
| (VIa)              | 268 (9900)                               | 0,18      | 11,1                     |
| (VIIa)             | 267 (10 000)                             | 0,15      | 16,7                     |
| (Xa)               | 266 (9800)                               | 0,31      | 10,9                     |
| (IXa)              | 267 (9800)                               | 0,13      | 11,7                     |
| (XIa)              | 260 (15 100)                             | 0,11      | 17,4                     |
| (XIIa)             | 259 (15 000)                             | 0,12      | 16,6                     |
| (XIIIa)            | 280 (12 800) (0,01 HCl)                  | 0,14      | 12,2                     |
| (Va)               | 254 (8500)                               | 0,29      | 18,1                     |

\* ВЭЖХ, условия — см. «Экспер. часть».

мационную подвижность, также будут активными терминаторными субстратами ДНК-полимераз.

В качестве таких нуклеозидов мы выбрали ангидроликсо- (XII) и ангидрорибоаденозин (XI), а также 2',3'-О-изопропилиденцитидин (XIII) и ангидронуклеозид (V).

Поскольку все синтезированные нами нуклеозиды содержали только один гидроксил в 5'-положении, для фосфорилирования был использован такой активный, но не селективный реагент, как трис-1,2,4-триазолид окиси фосфора PO(Tris)<sub>3</sub> [13].

Первая стадия — получение фосфобистриазолида соответствующего нуклеозида — длилась 5—10 мин. Дальнейшая обработка продукта реакции бис-три-*n*-бутиламмониевой солью пиродифосфорной кислоты в течение 1—2 ч при комнатной температуре с последующим гидролизом водой приводила к получению нуклеозид-5'-трифосфатов (Va—VIIa, IXa—XIIIa). Трифосфаты выделяли ионообменной хроматографией. Чистота всех полученных нуклеозидов доказана элементным анализом, ТСХ и ВЭЖХ, а структура — ПМР-, УФ-, а в отдельных случаях ИК- и масс-спектрами. Все вещества охарактеризованы ТСХ и ВЭЖХ (таблица), а наличие в них трифосфатной группировки подтверждается также тем, что все они, за исключением (Va), являются терминаторными субстратами ДНК-полимераз.

В бесклеточной системе биосинтеза ДНК осуществлялось удлинение ДНК-полимеразой олигонуклеотида, комплементарного (+)-цепи ДНК фага M13mp10, подробно описанное в работах [5, 6]. Было показано, что трифосфаты (VIa) и (XIa) терминируют синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой I *E. coli*, концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазой тимуса телят и обратной транскриптазой вируса миелобластома птиц. Трифосфаты (Xa), (XIIa), (XIIIa) являлись селективными терминаторными субстратами только обратной транскриптазы вируса миелобластома птиц и не ингибировали другие вышеупомянутые ферменты. Ни одно из соединений не влияло на синтез ДНК, катализируемый ДНК-полимеразой  $\alpha$  тимуса телят, а трифосфат (Va) не показал субстратных свойств ни в одном случае.

### Экспериментальная часть

В работе использован 2',3'-О-изопропилиденцитидин фирмы Pharma Waldhof (ФРГ), соединения (XI) и (XII) синтезированы А. В. Папчихиным [7]; 2,3'-ангидро-2'-дезокситимидин (V) получен детритилированием 5'-О-третил-2,3'-ангидротимидина (IV), приготовленного по методике [5], 3'-амино-2',3'-дидезокситимидин (VIII) получен как в работе [5]. Метоксисульфохлорид получен из хлористого сульфурила и метанола (т. кип. 135—137° С,  $n_D^{20} = 1,41$ ;  $d_4^{20} 1,54$ ).

Абсолютирование растворителей проводили по стандартным методикам. УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре Specord UV VIS (ГДР), ЯМР-спектры — на спектрометре Varian XL-100 (США) или Bruker Spectrospin с рабочей частотой 360 МГц (США) с использованием тетраметилсилана в качестве внутреннего стандарта. Масс-спектры регистрировали на приборе MS902, АЕИ, Manchester (США). ТСХ проводили в системах диоксан — аммиак — вода, 6 : 1 : 4 (A), и изопропанол — 25%

водн. аммиак — вода, 7 : 1 : 2 (Б), на пластинках Kieselgel F 254 (Merck, ФРГ), колоночную хроматографию — на силикагеле 40/100 (Chemapol, СССР), DEAE-Toyopearl 650 M (Япония); ВЭЖХ — на колонке (250 × 4,6 мм) Nucleosil 120-7 NH<sub>2</sub> в линейном градиенте KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (0,05 — 1 М) в течение 30 мин со скоростью 1 мл/мин. Время удерживания dTTP 11,8 мин, АТР 14,3 мин.

*3'-Тиоциано-2',3'-дидезокситимидин (VII)*. 5'-О-Тритил-2,3'-ангидро-2'-дезокситимидин (IV) (150 мг, 0,3 ммоль) растворяли в 10 мл абс. диметилформамида, добавляли 250 мг (3 ммоль) LiSCN и 52 мг (0,3 ммоль) *n*-толуолсульфонилсоединения. Реакционную массу нагревали 8 ч при 150° С, охлаждали, упаривали досуха. Остаток распределяли между 10 мл хлороформа и 10 мл воды. Водный слой промывали хлороформом (2 × 5 мл), объединенные органические экстракты сушили и упаривали. К остатку добавляли 10 мл 80% уксусной кислоты и нагревали 3 ч при 50° С. Реакционную массу упаривали досуха. Остаток хроматографировали на колонке (3 × 10 см) с силикагелем в градиенте метанола в хлороформе от 0 до 10% общим объемом 500 мл. Фракции, содержащие нуклеозид (VII), объединяли и упаривали. Выход 57 мг (67%), т. пл. 114—116° С, УФ (вода): λ<sub>max</sub> 267 нм (ε 9900). ИК (KBr): ν = 2150 см<sup>-1</sup> (SCN). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 9,16шс (1H, NH), 7,40д (1H, H-6, J<sub>6,CH<sub>3</sub></sub> = 1,25 Гц), 6,03—5,99дд (1H, H-1', J<sub>1',2'a</sub> = 4,16 Гц, J<sub>1',2'b</sub> = 7,49 Гц), 4,22—4,08 м (3H, H-3', H-4', H-5'a'), 3,91—3,89дд (1H, H-5'b, J<sub>5'b,4'</sub> = 2,08, J<sub>5'a',5'b</sub> = 11,65 Гц), 2,88—2,78м (1H, H-2'a, J<sub>2'a,3'</sub> = 7,90 Гц, J<sub>2'a,2'b</sub> = 14,59 Гц), 2,68—2,58 дд (1H, H-2'b, J<sub>2'b,3'</sub> = 7,49 Гц), 1,91 м (3H, CH<sub>3</sub>). Масс-спектр (m/z): 283 (M<sup>+</sup>), 158 (M<sup>+</sup> - C<sub>5</sub>N<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 125 (M<sup>+</sup> - C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>SN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 99 (158 - HSCN).

*3'-Хлор-2',3'-дидезокситимидин (VI)*. 5'-О-Тритил-2,3'-ангидро-2'-дезокситимидин (IV) (150 мг, 0,3 ммоль) растворяли в 10 мл абс. диметилформамида, добавляли 53 мг (3 ммоль) NH<sub>4</sub>Cl и нагревали 3 ч при 100° С. Реакционную массу охлаждали и упаривали досуха. Остаток распределяли между 10 мл хлороформа и 10 мл воды. Водный слой отделяли и промывали хлороформом (2 × 5 мл). Объединенные органические экстракты сушили и упаривали. К остатку добавляли 10 мл 80% уксусной кислоты и нагревали 3 ч при 50° С. После упаривания остаток хроматографировали на колонке (3 × 10 см) с силикагелем в линейном градиенте метанола в хлороформе от 0 до 10% общим объемом 500 мл. Фракции, содержащие нуклеозид (VI), объединяли и упаривали. Выход 56 мг (72%), т. пл. 177—179° С. УФ (метанол): λ<sub>max</sub> 267 нм (ε 9800). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, δ, м.д.): 8,96 шс (1H, NH), 7,90с (1H, H-6), 6,50—6,46дд (1H, H-1', J<sub>1',2'a</sub> = 5,6 Гц, J<sub>1',2'b</sub> = 8,3 Гц), 5,40—5,28м (1H, H-3), 4,48—4,46м (1H, H-4'), 3,50—3,39м (2H, H-5'a, b), 2,83—2,63м (2H, H-2'a, b), 2,08с (3H, CH<sub>3</sub>). Масс-спектр (m/z): 404 (M<sup>+</sup> + 2(Me<sub>3</sub>Si)), 369 (404 - Cl), 209 (404 - C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OCl), 199 (404 - C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*3'-Метансульфониламидо-2',3'-дидезокситимидин (X)*. К раствору 100 мг (0,41 ммоль) 3'-амино-2',3'-дидезокситимидина (VIII) в 3 мл абс. пиридина добавляли 170 мг (1,7 ммоль) триэтиламина, а затем, охладив до 0° С, 50 мг (0,41 ммоль) метансульфонилхлорида. Реакционную массу перемешивали 6 ч при 20° С, упаривали досуха, остаток хроматографировали на колонке (2 × 25 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол (9 : 1). Получили 170 мг (62%) нуклеозида в виде бесцветных кристаллов. Т. пл. 174—176° С. УФ-спектр (метанол): λ<sub>max</sub> 265 нм (ε 9700), R<sub>f</sub> 0,68 (Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>, δ, м.д.): 7,43д (1H, H-6, J<sub>5,6</sub> = 2 Гц), 6,11 т (1H, H-1', J<sub>1',2'a</sub> = J<sub>1',2'b</sub> = 1 Гц), 4,37—4,22 м (2H, H-3', H-4'), 4,03—3,94 м (2H, H-5'a, b), 2,48—2,41 м (2H, H-2'a, b), 2,02 с (3H, CH<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>), 1,72м (3H, CH<sub>3</sub>).

*3'-Сульфамидо-2',3'-дидезокситимидин (IX)*. Растворили 150 мг (0,62 ммоль) 3'-амино-2',3'-дидезокситимидина (VIII) в 4,5 мл абс. пиридина, добавляли 250 мг (2,5 ммоль) триэтиламина и, охладив до 0° С, 53 мкл (81 мг, 0,62 ммоль) метоксисульфохлорида. Реакционную массу выдерживали 2 ч при 20° С и упаривали досуха. Остаток очищали хроматографией на колонке (3 × 45 см) с силикагелем в системе хлороформ — метанол (1 : 1). Соответствующие фракции объединяли и упаривали. После кристаллизации из этанола нуклеозид (IX) был получен в виде бесцветных кристаллов, R<sub>f</sub> 0,5 (Б). Выход 150 мг (75%). Т. пл. 183—185° С (разл.). УФ (вода): λ<sub>max</sub> 267 нм (ε 9700). <sup>1</sup>H-ЯМР (CD<sub>3</sub>OD, δ, м.д.): 7,71 д (1H, H-6, J<sub>5,6</sub> = 2 Гц), 6,02 т (1H, H-1', J<sub>1',2'a</sub> = J<sub>1',2'b</sub> = 6 Гц), 3,84—3,72м (4H, H-3', H-4', H-5'a, b), 2,20—2,16м (2H, H-2'a, b), 1,78м (3H, CH<sub>3</sub>).

*5'-Трифосфаты модифицированных нуклеозидов (Va — VIIa, IXa — XIIIa)*. К раствору 108 мг (1,56 ммоль) триазола в 1,5 мл абс. ацетонитрила и 219 мкл (1,56 ммоль) триэтиламина, охлажденному до 0° С, прибавили 48 мкл (0,5 ммоль) POCl<sub>3</sub>. Через 30 мин смесь центрифугировали и супернатант добавляли к тщательно высушенному упариванием с пиридином нуклеозиду (V—VII, IX—XIII) (0,2 ммоль). Через 10 мин к реакционной массе добавляли 1,5 мл 0,5 М раствора бис-три-*n*-бутиламмониевой соли пиррофосфорной кислоты в диметилформамиде. Смесь выдерживали 1 ч, охлаждали, добавляли 10 мл воды, ставляли на ночь при 20° С, разбавляли водой до объема 200 мл и паносили на колонку (3 × 15 см) с DEAE-Toyopearl в HCO<sub>3</sub>-форме. Элюцию проводили линейным градиентом NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> от 0 до 0,5 М (рН 7,5), общий объем элюента 1 л. Фракции, содержащие трифосфат нуклеозида, упаривали, соль удаляли многократным упариванием с водой. Средний выход составил 35—50%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sanger F., Neicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463—5467.
2. Atkinson M. R., Deutcher M. P., Kornberg A., Russell A. F., Moffatt J. G. // Biochemistry. 1969. V. 8. № 12. P. 4897—4904.
3. Вознюк Л. А., Крицын А. М., Флорентьев В. Л. // Биоорган. химия. 1980. Т. 6. № 2. С. 205—208.
4. Chidgevadze Z. G., Beabealashvili R. Sh., Kvasuk E. I., Zaytzeva G. V., Mikhailopulo I. A., Kowollik G., Langen P. // FEBS Lett. 1985. V. 183. № 2. P. 275—278.
5. Kravetsky A., Kukhanova M., Azhayev A., Chidgevadze Z. G., Beabealashvili R. Sh. // Nucl. Acids. Res., Symposium Series. 1984. № 14. P. 283—284.
6. Зайцева В. Е., Дяткина Н. Б., Краевский А. А., Скапцова И. В., Турина О. В., Гнучев Н. В., Готтлик Б. П., Ажаев А. В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 10. № 5. С. 670—680.
7. Панчишин А. В., Пурьгин П. П., Ажаев А. В., Краевский А. А., Кутателадзе Т. В., Чиджавадзе З. Г., Библашвили Р. Ш. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1367—1379.
8. Dyatkina N., Minassian Sh., Kukhanova M., Kravetsky A., von Janta-Lipinski M., Chidgevadze Z., Beabealashvili R. // FEBS Lett. 1987. V. 219. № 1. P. 151—155.
9. Verheyden J. P. H., Moffatt J. G. // J. Org. Chem. 1972. V. 37. № 12. P. 1876—1878.
10. Herderwijn P., Balzarini J., de Clerq E., Pauwels R., Baba M., Broder S., Vanderhaeghe H. // J. Med. Chem. 1987. V. 30. № 8. P. 1270—1278.
11. Ferrin L. J., Mildvan A. S. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 24. P. 6904—6913.
12. Ferrin L. J., Mildvan A. S. // Biochemistry. 1986. V. 25. № 18. P. 5131—5145.
13. Дяткина Н. Б., фон Янта-Липински М., Минасян Ш. Х., Куханова М. К., Краевский А. А., Чиджавадзе З. Г., Библашвили Р. Ш. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 10. С. 1366—1374.

Поступила в редакцию  
7.XII.1987  
После доработки  
1.11.1988

SYNTHESIS 3'-MODIFIED NUCLEOSIDE 5'-TRIPHOSPHATES, NEW  
TERMINATION SUBSTRATES OF DNA POLYMERASES

DYATKINA N. B., ATRAZHEVA E. D., ALEXandroVA L. A.,  
KRAYEVSKY A. A., VON JANTA-LIPINSKI M.\*

*Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;*  
*\*Central Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences*  
*of the GDR, Berlin-Buch*

Synthesis of 3'-chloro- and 3'-cyanothio-2',3'-dideoxythymidine by the reaction of 2,3'-anhydro-2'-deoxythymidine with ammonium chloride and lithium thiocyanate, respectively, has been developed. In addition, 3'-methanesulphonylamido- and 3'-sulphonylamido-2',3'-dideoxythymidines were synthesized starting from 3'-amino-2',3'-dideoxythymidine. All these compounds along with 2',3'-anhydroriboadenosine, 2',3'-anhydrolyxoadenosine, 2',3'-O-isopropylidencytidine, and 2,3'-anhydro-2'-deoxythymidine were transformed into 5'-triphosphates by treatment with phosphoryl tris-1,2,4-triazolide and then with bis(tri-*n*-butylammonium)pyrophosphate. All 5'-triphosphates of nucleoside analogues were tested as termination substrates in cell-free systems with various DNA polymerases.