



УДК 547.963.057:577.325

РЕАГЕНТЫ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ. II. САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ФОТОМОДИФИКАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ β ПРАЙМЕРАМИ, ЭЛОНГИРОВАННЫМИ *экзо-N*-ЗАМЕЩЕННЫМИ АРИЛАЗИДНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ dCTP

© 2001 г. И. А. Драчкова*, И. О. Петрусева, И. В. Сафронов#, А. Л. Захаренко, Г. В. Шишкин, О. И. Лаврик, С. Н. Ходырева

Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

*Новосибирский государственный университет, Новосибирск

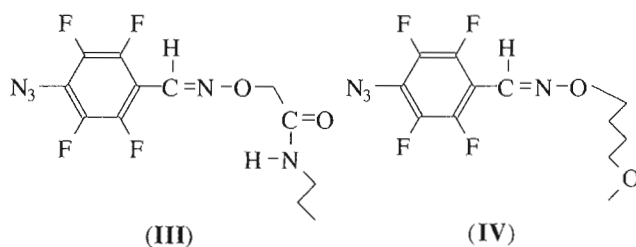
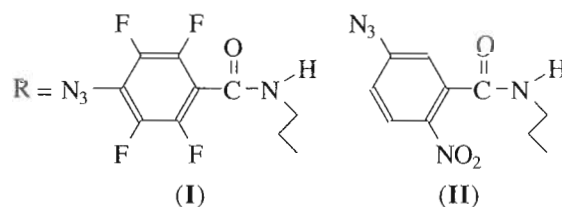
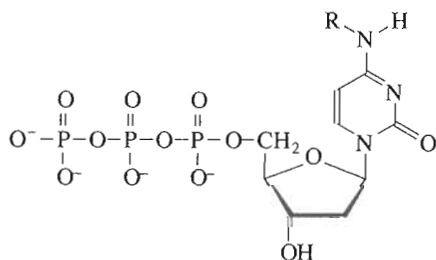
Поступила в редакцию 08.09.2000 г. Принята к печати 30.10.2000 г.

Исследованы субстратные свойства в реакции элонгации праймеров, катализируемой ДНК-полимеразой β крысы, ранее синтезированных и охарактеризованных производных dCTP (I)–(V), несущих в *экзо-N*-положении цитозина 2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензоиламино)этильную (соединение (I)), 2-(2-нитро-5-азидобензоиламино)этильную (II), 2-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминооксиметилкарбониламино)этильную (III), 4-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминоокси)бутилокси- (IV) или 4-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденгидразинокарбонил)бутилкарбониламино группу (V). В отличие от результатов, полученных ранее в системе с обратной транскриптазой вируса иммунодефицита человека (ОТ ВИЧ), производные dCTP (I)–(III) не воспринимались ДНК-полимеразой β в качестве аналога dTTP, а в качестве аналога dCTP использовались все пять нуклеотидов. По сравнению со значениями, полученными для dCTP, K_m для производных dCTP в 4–20 раз выше, V_{max} в 1–2.3 раза выше для аналогов (I)–(III), (V) и в ~20 раз ниже для производного (IV). Проведены сайт-специфические фотомодификации праймер-матричных комплексов ДНК-полимеразы β фотоаффинными реагентами (ФР), полученными *in situ* элонгацией $5'$ - ^{32}P -меченых праймеров аналогами dCTP (I)–(V) (ΦP_I – ΦP_V соответственно), при облучении УФ-светом с длиной волны 303–313 нм. ΦP_I позволил получить наибольшую степень фотопришивок $5'$ - ^{32}P -меченого праймера к ДНК-матрице (56%), а ΦP_{IV} – к ферменту (20%). Наименьшая эффективность фотопришивок (~1%) наблюдалась для ΦP_{II} .

Ключевые слова: производные dCTP; перфторарилазиды; ДНК-полимераза β ; фотоаффинная модификация.

ВВЕДЕНИЕ

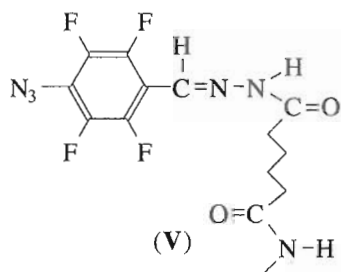
В предыдущих работах [1, 2] были описаны синтез, спектральные и фотохимические свойства производных dCTP (I)–(V).



Сообщение I см. [1].

Сокращения: ОТ ВИЧ – обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека; ФР – фотоаффинный реагент; п/м – праймер-матричная система.

#Автор для переписки (тел.: (383-2) 333-762; e-mail: safron@niboch.nsc.ru).



Были также протестированы субстратные свойства этих соединений в реакциях ДНК- и РНК-зависимого синтеза ДНК в системе с обратной транскриптазой ВИЧ и синтетическими праймер-матричными дуплексами [1]. Было обнаружено, что увеличение размера заместителя значительно снижает эффективность элонгации синтетических праймеров аналогами dCTP (I)–(V). Кроме того, изменение природы *экзо-N*-модифицирующей группы цитозинового основания dCTP от алкильной (аналоги (I)–(III)) до оксиалкильной (IV) и аминокарбонильной (V), обуславливающее сдвиг таутомерного равновесия гетероциклического основания от amino- к иминоформе [3] (рис. 1), приводило к изменению субстратных свойств от

характерных для dCTP к соответствующим dTTP. Причем, если производное (V) воспринималось ОТ ВИЧ с высокой эффективностью в качестве как dTTP-, так и dCTP-аналога, то соединение (IV) распознавалось только как dTTP. Двойственный характер субстратных свойств *экзо-N*-аминокарбонильного производного dCTP (V) позволяет предположить, что amino- и иминоформы его гетероциклического основания представлены примерно одинаково, но не исключено, что основание в иминоформе может образовывать достаточно стабильные комплементарные пары как с Ade-, так и с Gua-звеньями матрицы (рис. 1). Ни одно из *экзо-N*-замещенных производных dCTP не проявило себя строгим терминатором, и элонгированные ими праймеры достраивались ОТ ВИЧ до полномерных комплементарных копий матрицы с помощью обычных dNTP.

Производные (I)–(V) существенно различаются по своим фотохимическим свойствам. Аналог (II) содержит 2-нитро-5-азидобензоильную группу, при фотолизе которой образуются преимущественно продукты, характерные для реакций триплетного нитрена [4]. Соединение (I) содержит

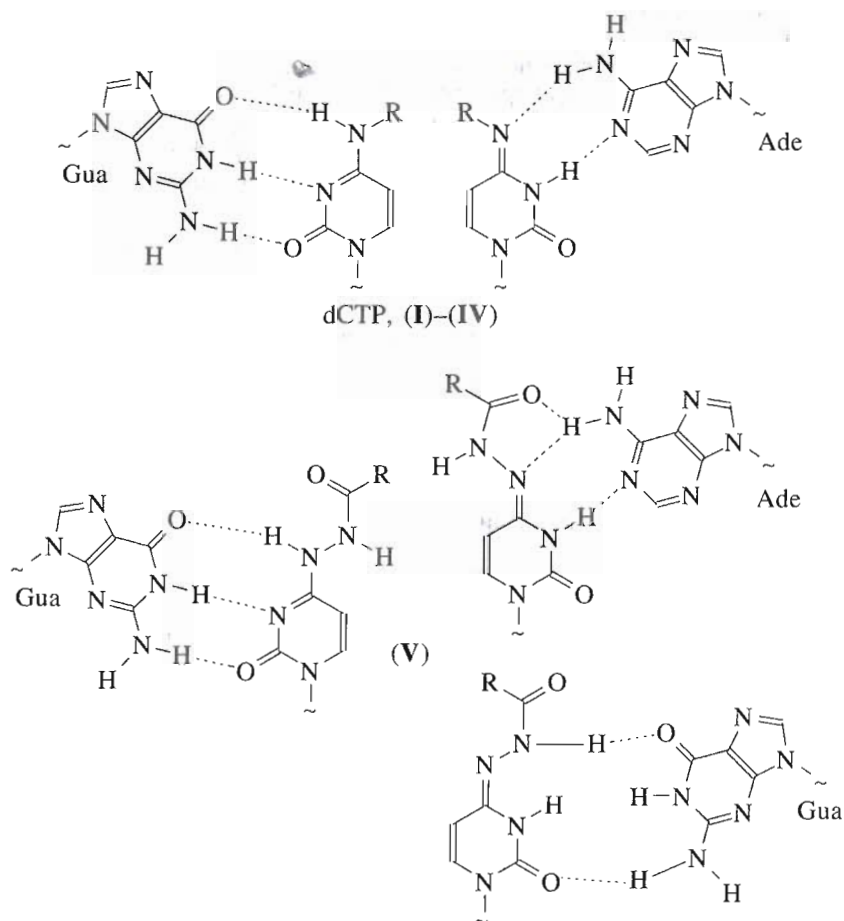


Рис. 1. Схемы предполагаемых комплементарных взаимодействий уотсон-криковского типа для amino- и имино-таутомерных форм гетероциклических оснований производных dCTP (I)–(V).

4-азидотетрафторбензоильную группу, при облучении которой в апротонной среде с высоким выходом образуются продукты реакций синглетного нитрена [5]. Аналоги (III)–(V) содержат 4-азидотетрафторбензилиденные группы. Их применение вместо 4-азидотетрафторбензоильных групп является одним из способов резко увеличить чувствительность к ближнему УФ-свету без существенной потери реакционной способности образующихся при фотолизе синглетных нитренов [5].

Цель данной работы состояла в том, чтобы провести сайт-специфическую фотомодификацию праймер-матричного комплекса ДНК-полимеразы с помощью фотоаффинных реагентов, полученных *in situ* элонгацией 5'-³²P-меченых праймеров с помощью производных dСТР (I)–(V). Для этого планировалось сначала протестировать субстратные свойства этих производных при элонгации праймеров ДНК-полимеразой β млекопитающих в условиях, аналогичных использованному в работе [1] для ОТ ВИЧ. По результатам

тестирований в этих двух ферментных системах и с учетом фотохимических свойств аналогов dСТР (I)–(V) предполагалось выбрать фермент и праймер-матричную систему для получения фотоаффинных реагентов *in situ*, а также условия проведения сайт-специфической фотомодификации сформированных белково-нуклеиновых комплексов. На основании полученных результатов предполагалось оценить влияние свойств экзо-N-замещенных производных dСТР, использованных для получения ФР, на эффективность фотопришивок к ферменту и матрице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Субстратные свойства

Субстратные свойства фотоактивируемых производных dСТР в реакции синтеза ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой β, при замене ими природного dСТР проверяли с использованием праймер-матричной (п/м) системы п/м-1:

(5') d(GGTAGGGGCTATACAG)

(3') d(CCATCCCCGATATGTCGTCCTTGTGCTATAGCTTGG)

и при замене природного dТТР – с п/м-2:

(5') d(GGTAGGGGCTATACAG)

(3') d(CCATCCCCGATATGTCACCTTGTGCTATAGCTTGG).

На рис. 2 представлены данные электрофоретического разделения реакционных смесей после проведения элонгации с п/м-1 и аналогами dСТР (I)–(V) (рис. 2, дорожки 1–5) в условиях, обеспечивающих практически полное завершение этой реакции в присутствии природного dСТР (рис. 2, 6).

Видно, что все аналоги однократно встраивались в праймер, после чего дальнейшая элонгация прекращалась. При тестировании производных (I)–(V) в праймер-матричной системе 2 в качестве аналогов dТТР наблюдалась элонгация праймеров на одну позицию, но только в присутствии аналогов (IV) и (V) (данные не представлены). Таким образом, проявилось существенное различие в идентификации экзо-N-замещенных производных dСТР двумя ДНК-полимеразами. В отличие от ОТ ВИЧ ДНК-полимераза β не воспринимала производные dСТР (I)–(III) как аналоги dТТР и идентифицировала все пять трифосфатов в качестве аналогов dСТР. Кроме того, в отличие от результатов, полученных при использовании ОТ ВИЧ, когда в аналогичных условиях наблюдалось существенное удлинение праймеров на одну или несколько дополнительных некомплементарных матрице позиций [1], ДНК-полимераза β элонгировала праймеры экзо-N-замещенными dСТР строго на одну позицию.

Как видно из результатов этой и предыдущей [1] работы по тестированию субстратных свойств экзо-N-производных dСТР (I)–(V), только использование ДНК-полимеразы β и п/м-1-системы поз-

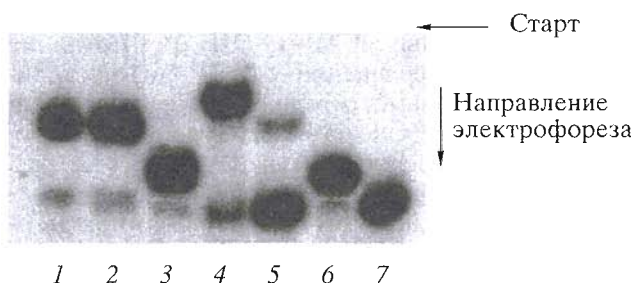


Рис. 2. Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов элонгации 5'-³²P-праймеров, элонгированных ДНК-полимеразой β аналогами dСТР с использованием матрично-праймерной системы 1: 3'CCATCCCCGATATGTCGTCCTTGTGCTATAGCTTGG 5'GGTAGGGGCTATACAG.

Производное (I) – дорожка 1; (II) – 2; (III) – 3; (IV) – 4; (V) – 5; dСТР – 6; контроль (без dNTP) – 7. Реакционная смесь, помимо стандартных компонентов (см. “Эксперимент. часть”), содержала 0.5 мкМ ДНК-полимеразу β, 0.75 мкМ матрицу, 0.5 мкМ 5'-³²P-праймер, один из аналогов dСТР или dСТР в концентрации 10 мкМ.

Таблица 1. Кинетические параметры реакций, катализируемых ДНК-полимеразой β крысы с использованием п/м-1-системы и аналогов dCTP (I)–(V)

Аналог dCTP	$K_m \times 10^5, M$	$V_{max} \times 10^8, M c^{-1}$
dCTP	2.0 ± 0.2	6.5 ± 0.2
(I)	9.0 ± 1.0	7.1 ± 0.3
(II)	36 ± 4	8.3 ± 0.6
(III)	21 ± 2	15 ± 1
(IV)	19 ± 4	0.31 ± 0.04
(V)	9.0 ± 0.2	6.0 ± 0.7

воляет получить *in situ* ФР со всеми пятью аналогами. Кроме того, при элонгации праймеров ДНК-полимеразой β наблюдается включение одного фотоактивного dNMP в праймер и накопление одного ФР, в то время как в системе с ОТ ВИЧ образуются с близкой эффективностью два-три ФР, имеющие разную длину и содержащие разное число арилизидных групп [1]. Очевидно, при фотомодификации в такой системе будет накапливаться два-три набора продуктов, что сильно затруднит их анализ и усложнит сравнение свойств разных производных dCTP.

Важную дополнительную количественную информацию о субстратных свойствах аналогов dCTP при использовании системы п/м-1 и ДНК-полимеразы β дало определение кинетических констант в условиях односубстратного приближения. Для каждого из аналогов были найдены диапазоны концентраций, в которых зависимости начальных скоростей реакции нуклеотидильного переноса хорошо описывались уравнением Михаэлиса–Ментен [6]. Полученные величины представлены в табл. 1.

Для производных dCTP (I)–(III) и (V) отличие значений V_{max} по сравнению с dCTP было невелико. Присутствие заместителей в экзациклической аминогруппе dCTP сказывалось, в основном, на величине K_m : повышение этого параметра в 4–20 раз, вероятнее всего, объясняется снижением эффективности связывания dNTP матрично-праймерным комплексом ДНК-полимеразы β . Сильное уменьшение значения V_{max} резко отличало производное dCTP (IV). Именно этот трифосфат не воспринимался ОТ ВИЧ в качестве аналога dCTP. Возможно, что ДНК-полимераза β эффективнее ОТ ВИЧ использует в элонгации аминокислотную форму этого субстрата, которая может составлять небольшую долю в его таутомерной смеси. Однако нельзя исключить и тот вариант, что ДНК-полимераза β существенно больше, чем ОТ ВИЧ, ошибается при распознавании именно иминоформы *N*-аминоокси-производных dCTP в качестве его аналогов. Механизм отбора аналога dNTP по его способности к комплементарному вза-

имодействию с основанием соответствующего нуклеотида матрицы может с некоторой вероятностью не срабатывать, так как известно, например, что в составе двунитиевой ДНК изоэлектронный аналог соединения (IV) – *экзо-N*-метокси-dCMP – не дестабилизирует существенно В-структуру ДНК, образуя достаточно стабильные комплементарные пары как с dAMP, так и с dGMP [7].

Сайт-специфическая фотомодификация праймер-матричного комплекса ДНК-полимеразы β

Сайт-специфическую фотомодификацию праймер-матричного комплекса ДНК-полимеразы β проводили *in situ* после включения одного из производных dCMP в большую часть 5'-³²P-меченого праймера, осуществляемого при избытке фермента (4-кратного) и матрицы (1.5-кратного) над праймером. При этом использовались концентрации трифосфатов (I)–(V) в 10–100 раз ниже значений K_m . В этих условиях фотосшивки должны происходить, в основном, в составе комплекса ФР с ферментом и матрицей при свободном dNTP-связывающем участке. Облучение реакционных смесей проводили УФ-светом с λ 303–313 нм в течение одного и трех времен полуфотолитиза ($\tau_{1/2}$), которые были определены для производных dCTP (I)–(V) в предыдущей работе [1].

Выбор этих двух кинетических точек обусловлен тем, что ранее было обнаружено появление дополнительных продуктов при длительном облучении соединения (I) [8]. В частности, были детектированы долгоживущие химически активные частицы, способные реагировать с первичными аминогруппами. Аналогичных фотореакций можно ожидать и для других перфтораризидных производных.

Состав смесей до и после облучения анализировали с помощью двух денатурирующих электрофорезов: ПААГ с 7 М мочевиной по методике работы [9] (для разделения олигонуклеотидов) и SDS-ПААГ-электрофорез по Леммли [10] (для разделения ДНК-полимеразы β и продуктов ее модификации). Продукты фотопришивки 5'-³²P-праймеров к ДНК-полимеразе β (рис. 3) и матрице (данные не представлены) имели меньшую по сравнению с исходным ферментом и матрицей электрофоретическую подвижность.

Наблюдаемое снижение электрофоретических подвижностей у наиболее интенсивных полос примерно соответствует ожидаемому при ковалентной пришивке 16–17-мерных олигонуклеотидов. Во всех случаях, кроме основной, наблюдается несколько более слабых полос с меньшей электрофоретической подвижностью. Они, вероятнее всего, соответствуют минорным продуктам фотопришивки праймеров к молекулам фермента и

Таблица 2. Эффективность (%) образования фотопришивок к ДНК-полимеразе $\beta^*(\alpha_e)$ и матрице (α_t) 5^{32}P -меченых праймеров, элонгированных *in situ* экзо-*N*-замещенными производными dСТР (I)–(V) (ФР_I – ФР_V), при облучении УФ-светом с λ 303–313 нм в течение одного и трех времен полуфотолитиза (метод расчета см. в “Эксперимент. части”)

Фотоаффинный реагент	$1 \times \tau_{1/2}$ (50%-ный фотолитиз)			$3 \times \tau_{1/2}$ (85%-ный фотолитиз)		
	τ_{α_e} (F_{α_e})	τ_{α_t} (F_{α_t})	$\tau_{\alpha_e} + \tau_{\alpha_t}$ ($F_{\alpha_e} + F_{\alpha_t}$)	τ_{α_e} (F_{α_e})	τ_{α_t} (F_{α_t})	$\tau_{\alpha_e} + \tau_{\alpha_t}$ ($F_{\alpha_e} + F_{\alpha_t}$)
ФР_I	1 (2)	42 (84)	43 (86)	1.5 (1.5)	56 (65)	57.5 (66.5)
ФР_{II}	<0.5 (<0.5)	1 (2)	1 (2)	<0.5 (<0.5)	2 (2.5)	2 (2.5)
ФР_{III}	1.5 (3)	4 (8)	5.5 (11)	2.5 (3)	6.5 (7.5)	9 (10.5)
ФР_{IV}	12.5 (25)	3.5 (7)	16 (32)	20 (23.5)	5.5 (6.5)	25.5 (30)
ФР_V	1 (2)	0.5 (1)	1.5 (3)	2.5 (3)	1.5 (1.5)	4 (4.5)

* τ_{α_e} и τ_{α_t} – доли фотореагента (%), образовавшего пришивки к ферменту и матрице; F_{α_e} и F_{α_t} – значения τ_{α_e} и τ_{α_t} , нормированные на количество генерированных арилнитренов.

матрицы, которые могут отличаться по молекулярной массе и по конфигурации.

Результаты количественного определения эффективности фотопришивок праймеров к ДНК-полимеразе β и матрице в зависимости от времени облучения (τ_{α_e}) и глубины фотолитиза арилазидных групп (F_{α_e}) представлены в табл. 2 (метод расчета подробно описан в “Эксперимент. части”).

Максимальная суммарная эффективность фотопришивок была получена при использовании ФР_I , несущего 4-азидотетрафторбензоильную группу после облучения в течение одного времени полуфотолитиза ($\tau_{\alpha_e} + \tau_{\alpha_t} = 86\%$). Минимальная эффективность была получена при использовании ФР_{II} , несущего 2-нитро-5-азидобензоильную группу. Зависимость эффективности фотопришивок 5^{32}P -меченых праймеров к матрице для аналогов dСТР, использованных при получении ФР, укладывается в ряд (I) \gg (III) \sim (IV) $>$ (V) $>$ (II). Эта последовательность коррелирует с реакционной способностью синглетных нитренов, образующихся при фотолитизе присутствующих в этих производных dСТР арилазидных групп [6, 11]. Эффективность фотопришивок к ДНК-полимеразе β (F_{α_e}) при использовании перфторарилазидных производных праймеров ФР_I и ФР_{III} – ФР_V также гораздо выше, чем 2-нитро-5-азидобензоильного ФР_{II} (рис. 3, 2). Среди производных оксимов 4-азидотетрафторбензальдегида эффективность фотопришивок к ДНК-полимеразе β для ФР_{IV} была \sim в 8 раз выше, чем для ФР_{III} ($F_{\alpha_e} \sim 25$ и 3% соответственно). При этом эффективность фотопришивок к матрице у ФР_{IV} и ФР_{III} различалась не существенно ($F_{\alpha_t} \sim 7$ и 8% соответственно). Используемые для получения этих ФР производные dСТР (III) и (IV) мало различаются длиной линкеров, но резко – по своим субстратным свойствам. Если значения K_m у них близки, то ве-

личина V_{\max} для трифосфата (IV) в 20 раз меньше, чем для производного (III). Косвенно эти данные могут свидетельствовать об образовании плотного контакта между ферментом и экзоциклической группой производного (IV), препятствующего быстрому протеканию одной из стадий элонгации (нуклеотидилтрансферной реакции, транслокации или диссоциации праймер-матричного комплекса). В этом случае генерируемый при фотолитизе арилнитрен может оказаться в более благоприятном для образования белково-нуклеиновых пришивок окружении, чем в составе ФР_{III} .

Наблюдается хорошее соответствие величин F_{α_e} и F_{α_t} , полученных после облучения в течение одного и трех времен полуфотолитиза, за исключением параметра F_{α_t} для аналога (I). Двадцатипро-

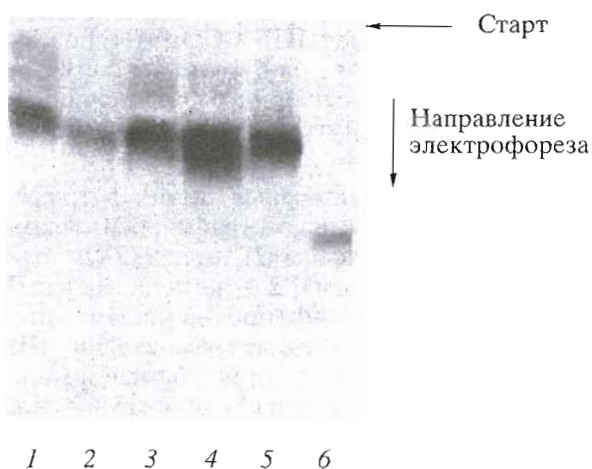


Рис. 3. Радиоавтограф электрофоретического разделения продуктов фотопришивки к ДНК-полимеразе β праймеров, элонгированных *in situ* аналогами dСТР (I) – дорожка 1; (II) – 2; (III) – 3; (IV) – 4; (V) – 5. Дорожка 6 – ДНК-полимераза β (окрашивание кумасси голубым R-250).

центное снижение средней эффективности не может быть объяснено погрешностью эксперимента и, вероятнее всего, отражает влияние одного или нескольких факторов, выявить которые не представляется возможным на основании представленных данных.

В целом, можно сделать предварительный вывод о том, что на эффективность фотопришивок к ДНК-полимеразе β ФР, несущих арилизидные группы, присоединенные через *экзо-N*-аминогруппу 3'-концевого dCMP, влияют, по крайней мере, два независимых фактора: реакционная способность образующихся при фотолизе арилнитренов и характер белково-нуклеиновых контактов в районе локализации арилизидных групп.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы: dNTP, глицин, EDTA, Трис, TEMED, кумасси G-250 (Sigma, США), $MgCl_2$, формамид (Fluka, Швейцария), β -меркаптоэтанол (Serva, ФРГ), акриламид (Schwarz/Mann Biotech, ФРГ; ICN, США), *N,N'*-метиленбисакриламид (Bio-Rad, США), Т4-полинуклеотидкиназный буфер (New England Biolabs Laboratory, США), DEAE-бумага DE-81 (Whatman, Великобритания), [γ - ^{32}P]АТФ (>110 ТБк/ммоль, Биосан, Россия). Остальные реактивы российских фирм: ацетон, NaCl, KCl, HCl квалификации "ос.ч."; H_3BO_3 , $HClO_4$, мочевины квалификации не ниже "ч.д.а."

Препаративные хроматографии проводили с помощью хроматографического комплекта: Uvicord SD/Ultragas II (ЛКВ, Швеция). Количество радиоактивности (изотоп ^{32}P) определяли по Черенкову с помощью счетчика "Minibetta" (ЛКВ, Швеция).

Все использованные синтетические гетероолигонуклеотиды синтезированы в группе олигонуклеотидного синтеза (НИИХ СО РАН, Россия). Праймеры были помечены [^{32}P] по 5'-концу с помощью Т4-полинуклеотидкиназы [12] и очищены электрофорезом в денатурирующем ПААГ с 7 М мочевиной [9].

Фотоактивные производные dСТР: 5'-трифосфаты *экзо-N*-[2-(4-азидотетрафторбензоиламино)этил]-2'-дезокситидина (I), *экзо-N*-[2-(2-нитро-5-азидобензоиламино)этил]-2'-дезокситидина (II), *экзо-N*-[2-(4-азидотетрафторбензилиденамино-оксиметилкарбамил)этил]-2'-дезокситидина (III), *экзо-N*-[4-(4-азидотетрафторбензилиденаминоокси)бутилокси]-2'-дезокситидина (IV) и *экзо-N*-[4-(4-азидотетрафторбензилиденгидразинокарбонил)бутилкарбамил]-2'-дезокситидина (V) синтезированы как описано в работах [1, 2].

Рекомбинантная ДНК-полимераза β крысы (КФ 2.7.7.7) была экспрессирована в системе *E. coli* (штамм BL21DE3 (pLys E)). Плазмида pRSET, содержащая ген ДНК-полимеразы β крысы, была любезно предоставлена проф. С. Вилсо-

ном (Национальный институт наук о здоровой окружающей среде, США). Для разрушения клеток использовали метод, приведенный в [13] с дополнительной обработкой ультразвуком для деградации ДНК. Схема очистки фермента, в основном, соответствовала описанной в работе [13]. Отличиями являются: дополнительная обработка суспензии клеток для деградации ДНК после воздействия лизоцимом; кроме того, для очистки белка использовали хроматографию на гепаринсепфарозе (элюция в линейном градиенте концентрации KCl (0.15–0.6 М) в 50 мМ Трис-HCl-буфере (pH 7.7), содержащем 0.1 мМ EDTA, 0.5 % Nonident NP-40 (буфер А)) и оцДНК*-целлюлозе (элюция в линейном градиенте концентрации KCl (0.15–1.0 М) в буфере А вместо фосфоцеллюлозы и целлюлозы с иммобилизованной тимусной ДНК, соответственно (ср. [13]) Чистоту полученных препаратов ДНК-полимеразы β контролировали на всех стадиях с помощью электрофореза в ПААГ по Лэммли [10].

Для приготовления ДНК-дуплекса праймер и матрицу смешивали в мольном соотношении 1 : 1.5, помещали в водяную баню при 90°C и медленно охлаждали до комнатной температуры.

Субстратные свойства фотоактивируемых производных dСТР

Реакцию синтеза ДНК, катализируемую ДНК-полимеразой β , проводили в буфере следующего состава: 50 мМ Трис-HCl (pH 8.8), 50 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 0.25 мМ β -меркаптоэтанол (буфер Б). Кроме этого, реакционная смесь содержала 0.75 мкМ матрицу, 0.5 мкМ 5'- ^{32}P -праймер, 0.5 мкМ ДНК-полимеразу β , одно из производных dСТР (I)–(V) или dСТР в концентрации 10 мкМ. Реакцию запускали добавлением фермента и проводили при 37°C в течение 30 мин. Продукты синтеза анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях [9] с последующей радиоавтографией.

Кинетические параметры для dСТР и его производных (I)–(V) в ферментативной реакции определяли в буфере А в реакционной смеси, содержащей 1.5 мкМ матрицу, 1 мкМ 5'- ^{32}P -праймер (п/м-1-система), dСТР или одно из его производных в следующих диапазонах концентраций (М): dСТР 5×10^{-7} – 1.5×10^{-4} , (I) 5×10^{-7} – 2.8×10^{-4} ; (II) 10^{-6} – 1.4×10^{-4} ; (III) 5×10^{-6} – 1.2×10^{-4} ; (IV) 2×10^{-5} – 1.8×10^{-4} ; (V) 2.5×10^{-6} – 1.3×10^{-4} . Реакцию запускали добавлением фермента до конечной концентрации 6×10^{-8} М и проводили при 37°C. Из реакционной смеси объемом 10 мкл отбирали аликвоты объемом 2 мкл через 10, 20, 30 с и останавливали реакцию добавлением буфера для нанесения на ПААГ [9]. Продукты синтеза анализировали эле-

* оцДНК – одноцепочечная ДНК.

ктрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях [9] с последующей радиоавтографией. Затем участки геля, содержащие радиоактивность, вырезали и просчитывали по Черенкову. Для каждой из дорожек определяли эффективность элонгации праймера аналогом dСТР. Полученные величины использовали для определения величин K_m и V_{max} с помощью программы Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., США).

Сайт-специфическая фотомодификация праймер-матричных комплексов ДНК-полимеразы β . В реакционную смесь, содержащую 0.5 мкМ $5'$ - ^{32}P -праймер, 0.75 мкМ матрицу (п/м-I-система) и 2 мкМ ДНК-полимеразу β в буфере Б, добавляли одно из производных dСТР (I)–(III), (V) в концентрации 2 мкМ или производное (IV) в концентрации 10 мкМ. Реакцию запускали добавлением аналога, проводили при 37°C в течение 30 мин для производных (I)–(III), (V) или в течение 60 мин в случае производного (IV). После этого реакционную смесь помещали в лед. Затем проводили облучение светом ртутной лампы низкого давления ДРК-120 осветителем ОИ-18А (ЛОМО, Санкт-Петербург) на расстоянии 25 см через фильтры ЖС-3 и УФС-2 (полоса пропускания 303–313 нм, $W = 2 \times 10^{-5}$ Вт/см²). Мощность излучения лампы (W) определяли с помощью ферриоксалатного актинометра [14]. Времена облучения соответствовали временам полужитолиза, определенным как описано в работе [1] и составляли: 10 мин в случае аналога (I), 30 сек – (II) и (III), 1 мин – (IV), 10 сек – (V). Для анализа продуктов фотопришивки $5'$ - ^{32}P -меченых праймеров к матрице отбирали 5 мкл смеси и анализировали с помощью электрофореза в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины [9] с последующей радиоавтографией. Для анализа продуктов аффинного фотомечения ДНК-полимеразы β отбирали 15 мкл смеси и анализировали электрофорезом в 12.5% ПААГ по Лэммли [10] с последующей радиоавтографией. Затем проводили количественную обработку данных.

Расчет эффективности фотопришивки $5'$ - ^{32}P -меченых праймеров к матрице и ДНК-полимеразе β . Полоски геля, содержащие радиоактивность, вырезали и просчитывали по Черенкову. Для каждого из ФР определяли:

1) по данным, полученным с помощью ПААГ-электрофореза в 7 М мочевины, суммарные радиоактивности участков гелей, содержащих неэлонгированный $5'$ - ^{32}P -меченый праймер (p_0), ФР и продукты фотореакций, имеющие подвижность, совпадающую или близкую к ФР (p), продукты фотопришивки $5'$ - ^{32}P -меченых праймеров к матрице (t).

2) по данным, полученным с помощью SDS-электрофореза по Лэммли [10], радиоактивности участков геля, содержащих не связанные с ферментом меченые олигонуклеотиды (N), суммар-

ные радиоактивности полос, относящихся к продуктам фотопришивки $5'$ - ^{32}P -меченых праймеров к ДНК-полимеразе β (E).

3) для каждого из опытов оценивали коэффициент (k), позволяющий соотнести количества реакционных смесей, использованных при электрофоретическом анализе методами [9] и [10], исходя из уравнения: $p_0 + p + t = kN$, и затем рассчитывали значение $e = kE$, которое принимали в качестве величины суммарной радиоактивности продуктов фотопришивки к ферменту, не детектируемой при использовании метода [10]. Далее рассчитывали эффективности (в процентах) фотопришивки $5'$ - ^{32}P -меченых праймеров к матрице (${}^r\alpha_i$) и ДНК-полимеразе β (${}^r\alpha_e$) в зависимости от времени фотолитолиза с помощью формул: ${}^r\alpha_i = t/(p + t + e) \times 100$ и ${}^r\alpha_e = e/(p + t + e) \times 100$, и затем в расчете на количество прореагировавших арилизидных групп с помощью формул $F\alpha_i = \alpha_i/\Delta$ и $F\alpha_e = \alpha_e/\Delta$, где параметр Δ равен доле прореагировавших арилизидных групп и составляет 0.5 для одного времени полужитолиза и 0.85 для трех времен полужитолиза. Полученные величины округляли до 0.5%, что соответствует средним значениям фонового счета фрагментов гелей, не содержащих детектируемые на электрофореграммах полосы.

Настоящая работа была поддержана грантами РФФИ № 98-03-32958, № 99-04-49277, № 99-04-04016, № 00-04-22002, INTAS-96-1778 и программой “Университеты России” грант № 3Н-346-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафронов И.В., Шербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И. // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. С. 576–585.
2. Wlasoff W.A., Dobrikov M.I., Safronov I.V., Dudko R.Y., Bogachev V.S., Kandaurova V.V., Shishkin G.V., Dymshits G.M., Lavrik O.I. // Bioconjug. Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.
3. Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Симуква Е.А., Турчинский М.Ф., Шибяев В.Н. Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970. С. 310–400.
4. Liang T.-Y., Schuster G.B. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. P. 7803–7810.
5. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Шишкин Г.В. // Биоорганическая химия. 1996. Т. 22. С. 191–199.
6. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты 1: Пер. с англ. М.: Мир, 1982. С. 92–94.
7. Anand N.N., Brown D.M., Salisbury S.A. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. P. 8167–8176.
8. Сафронов И.В. Конструирование фотоаффинных реагентов для исследования комплексов матрично-зависимого синтеза нуклеиновых кислот. Производные (d)NTP, несущие перфторарильные группы. Дис. ... канд. хим. наук. НИБХ СО РАН, 1999. С. 60–70.

9. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 277. P. 680–685.
11. Добриков М.И., Дудко Р.Ю., Левина А.С., Халимская Л.М., Шишкин Г.В. // Биоорганич. химия. 1996. Т. 22. С. 200–207.
12. Protocols and Applications Guide Promega. 1991. P. 150–152.
13. Date T., Yamaguchi M., Hirose F., Nishimoto Y., Tanigawa K., Matsukage A. // Biochemistry. 1988. V. 27. P. 2983–2990.
14. Калверт Дж., Питтс Дж. Фотохимия: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. С. 625–627.

Reagents for Modification of Protein–Nucleic Acid Complexes. II. Site-Specific Photomodification of Mammalian DNA Polymerase β Complexes with Primers Extended by the dCTP *exo-N*-Substituted Arylazido Derivatives

I. A. Drachkova**, I. O. Petrusheva*, I. V. Safronov*, A. L. Zakharenko*,
G. V. Shishkin*, O. I. Lavrik*, and S. N. Khodyreva*

e-mail: safron@niboch.nsc.ru.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
prosp. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

**Novosibirsk State University, ul. Pirogova 2, Novosibirsk, 630090 Russia

Substrate properties of the earlier synthesized and characterized dCTP derivatives bearing in the *exo-N*-position of cytosine 2-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzoylamino)ethyl (**I**), 2-(2-nitro-5-azidobenzoylamino)ethyl (**II**), 2-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzylideneaminooxymethylcarbonylamino)ethyl (**III**), 4-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzylideneaminooxy)butyloxy (**IV**), or 4-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzylidenehydrazinocarbonyl)butylcarbonylamino (**V**) groups were studied in the primer extension reaction catalyzed by rat DNA polymerase β . Unlike the earlier results obtained with HIV reverse transcriptase, dCTP derivatives (**I**)–(**III**) were not recognized by rat DNA polymerase β as dTTP analogues, and all the five nucleotides were utilized as dCTP analogues. When compared with dCTP, K_m values for the synthesized dCTP derivatives were higher by a factor of 4–20; V_{max} were 1–2.3 times higher for (**I**)–(**III**) and (**V**) but 20-fold lower for derivative (**IV**). Site-specific photomodifications of the primer–template–DNA polymerase β complexes were carried out using photoreactive reagents PR_I–PR_V, obtained *in situ* by extension of 5'-³²P-labeled primers with dCTP analogues (**I**)–(**V**), respectively, when exposed to UV irradiation at 303–313 nm. Reagents PR_I and PR_V provided the maximum photocrosslinking of the 5'-³²P-labeled primer to the DNA template (56%) and to the enzyme (20%), respectively. The lowest efficiency of photocrosslinking was observed for PR_{II} (about 1%). The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: dCTP derivatives, DNA polymerase β , perfluoroarylazides, photoaffinity modification