



УДК 547.963.057:577.325

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ МОДИФИКАЦИИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ И ДНК-МАТРИЦЫ РАЗЛИЧНЫМИ ФОТОАКТИВНЫМИ ГРУППАМИ НА 3'-КОНЦЕ ДНК-ПРАЙМЕРА

© 2003 г. С. В. Дежуров^{*,***}, С. Н. Ходырева^{*,**},
Н. И. Речкунова^{*}, Д. М. Колпащиков^{*}, О. И. Лаврик^{*,**}

^{*}Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8;

^{**}Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Поступила в редакцию 22.10.2001 г. Принята к печати 25.01.2002 г.

Исследовано влияние природы фотоактивируемой группы и длины линкера, соединяющего ее с гетероциклическим основанием 3'-концевого нуклеотида ДНК-праймера, на эффективность модификации ДНК-полимераз и ДНК-матрицы. Праймеры, содержащие фотоактивную группу на 3'-конце, получали с помощью ДНК-полимеразы β крысы или ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* в присутствии одного из аналогов dTTP с фотоактивной группой в положении 5 остатка тимидина. После облучения реакционной смеси УФ-светом и разделения продуктов модификации определяли уровень ковалентного присоединения [⁵-³²P]праймера к ДНК-полимеразам и к матрице. Показано, что праймеры, содержащие 4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиримидильную группу (FAP), являются наиболее эффективными в реакции модификации ДНК-полимераз.

Ключевые слова: фотоаффинная модификация; ДНК-полимераза.

ВВЕДЕНИЕ

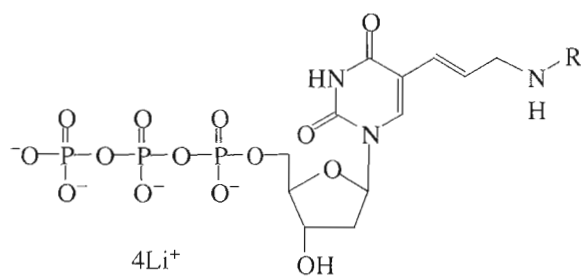
Метод фотоаффинной модификации с помощью замещенных по гетероциклическому основанию аналогов dNTP широко применяется для исследования структуры и функций ДНК-полимераз и других белков, взаимодействующих с ДНК [1]. Ранее были получены аналоги dNTP с фотоактивируемыми группами, присоединенными по экзоциклической аминогруппе цитозина и по 5-му положению урацила [2–5]. Эти аналоги оказались эффективными субстратами всех исследованных ДНК-полимераз – обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека [6, 7], ДНК-полимеразы *Thermus thermophilus* (Tte) [3], ДНК-полимеразы α -праймазы [8, 9], ДНК-полимеразы β крысы [8], и взаимодействовали с

ДНК с кинетическими характеристиками, близкими к природным dNTP. На основе этих аналогов были получены фотореакционноспособные ДНК-праймеры с целью их последующего применения в аффинной модификации ДНК-полимераз, ДНК-матриц в комплексе с ДНК-полимеразами, а также факторов репликации [6–9].

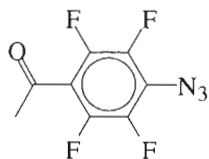
Одна из важных характеристик аффинных реагентов – эффективность модификации, т.е. выход ковалентных аддуктов “реагент–биополимер”. Ранее было отмечено, что тип фотоактивной группы в составе реагента влияет на эффективность фотоаффинной модификации ДНК-мишени [10, 11]. В связи с разработкой и использованием ряда аналогов dTTP, содержащих различные фотоактивируемые группировки, было интересно сравнить эффективность модификации ДНК-полимераз фотореакционноспособными ДНК-праймерами, полученными на основе этих аналогов, а также выявить реакционноспособные группы, наиболее эффективно образующие ковалентные сшивки с мишенями белковой природы и с ДНК. Такое сравнение необходимо для определения путей повышения эффективности модификации биополимеров путем варьирования природы фотоактивной группы. Эффективность модификации важна для накопления достаточных количеств меченых белков с целью их последующего секвенирования, а также для увеличения чувствитель-

Сокращения: FAP-4-dUTP – (E)-5-[N-(2,3,5,6-тетрафтор-4-азидобензоил)-3-аминопропенил-1]-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; FAP-8-dUTP – (E)-5-[N-(N-(4-азидо-2,5-дифтор-3-хлорпиримидин-6-ил)-3-аминопропенил)-3-аминопропенил-1]-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; NAV-4-dUTP – (E)-5-[N-(2-нитро-5-азидобензоил)-3-аминопропенил-1]-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; NAV-12-dUTP – (E)-5-[N-(N-(2-нитро-5-азидобензоил)-6-аминогексаноил)-3-аминопропенил-1]-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; TDB-4-dUTP – (E)-5-[N-(4-(3-фторметилдизазирино)бензоил)-3-аминопропенил-1]-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат; ⁴S-dUTP – 4-тио-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат.

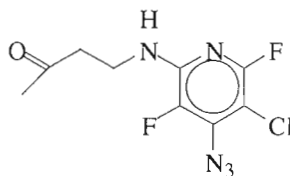
[#] Автор для переписки (тел.: (383-2) 34-42-96; факс: (383-2) 33-36-77; эл. почта: dmk@niboch.nsc.ru).



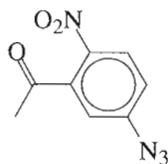
R =



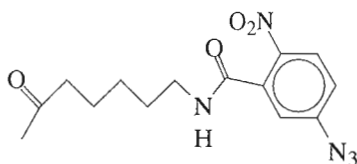
FAB-4-dUTP



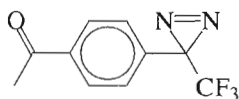
FAP-8-dUTP



NAB-4-dUTP



NAB-12-dUTP



TDB-4-dUTP

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения влияния заместителей в ароматическом кольце на эффективность модификации биополимеров в работе использовали аналоги dTTP, содержащие азидогруппу (FAB, FAP и NAB) или 4-(3-трифторметилдиазирино)бензоильную группу (TDB), а также широко используемый в практике фотоаффинной модификации 4-тио-2'-дезоксинуридин. В отличие от азидогруппы, образующей при активации УФ-светом высокоактивный нитрен, диазириногруппы генерируют при облучении реакционноспособный карбен [12]. Производное, содержащее диазириногруппу, было применено ранее для модификации обратной транскриптазы ВИЧ [13]. Аналоги NAB-4-dUTP и NAB-12-dUTP содержат одинаковую реакционноспособную группу, но отличаются длиной линкера, соединяющего фотоактивную группу с аффинной частью реагента.

Мы показали, что все исследуемые аналоги являются субстратами в реакции удлинения 16-звенного олигонуклеотида-праймера в комплексе с 36-звенной матрицей: в присутствии каждого из аналогов исходный 16-звенный праймер удлиняется на один нуклеотид (рис. 1). Подвижности удлиненных праймеров различаются в зависимости от размера реакционноспособной группы. В таблице указано количество образующегося продукта удлинения относительно общего количества праймера. Самый низкий выход фотореакционноспособного праймера наблюдался при использовании NAB-12-dUTP (50%), а максимальный (91%) – в случае FAP-8-dUTP. При использовании ДНК-полимеразы *Tte* самый низкий выход удлиненного праймера наблюдался в реакции с ⁴S-dUTP (58%), а самый высокий – опять-таки, в реакции с FAP-8-dUTP (85%). Таким образом, из исследованных в настоящей работе аналогов dTTP наиболее предпочтительным субстратом для ДНК-полимераз β и *Tte* является FAP-8-dUTP.

Ранее для сравнения скоростей фоторазложения азидов использовались “времена полуфотоллиза”, измеренные по изменению спектров электронного поглощения азидов при фотоллизе в отсутствие биополимера-мишени [7, 14]. Такой подход можно адекватно использовать только в том случае, если исходное фотоактивное соединение превращается в один конечный продукт фотоллиза. В действительности, фотохимия арилазидов гораздо сложнее. Это выражается в заметном изменении электронного спектра при фотоллизе фотореагента на временах, превышающих времена образования ковалентных аддуктов в тех же условиях облучения, но в присутствии мишени. Кроме того, в присутствии биополимера-мишени может меняться скорость фоторазложения. Поэтому, на наш взгляд, для сравнения эффективности модификации мишени различными реагентами кор-

ности метода при применении его в многокомпонентных системах.

В данной работе проведено сравнение реакционной способности разных фотоактивных групп, локализованных на 3'-конце праймера, в реакции модификации ДНК-полимераз β и *Tte* и ДНК-матрицы. Исследована также зависимость эффективности модификации ДНК-полимераз от длины волны возбуждающего света и от длины линкера, соединяющего реакционноспособную группу с аффинной частью реагента.

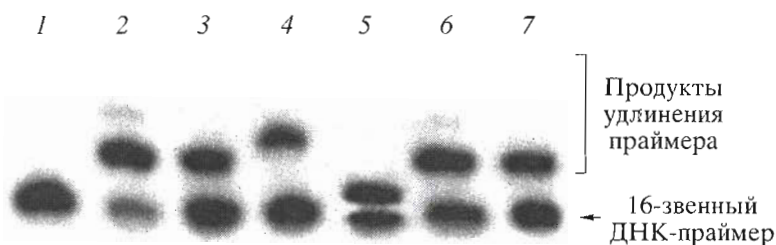


Рис. 1. Радиоавтограф продуктов реакции удлинения 16-звенного праймера в комплексе с 36-звенной матрицей без аналога (1) и в присутствии следующих аналогов dTTP: FAB-8-dUTP (2), NAB-4-dUTP (3), NAB-12-dUTP (4), ^4S -dUTP (5), TDB-4-dUTP (6), FAB-4-dUTP (7). Условия проведения реакции см. “Эксперимент. часть”.

ректнее использовать другой параметр – время полумодификации. С этой целью нами были определены константы скорости модификации ДНК-полимеразы β для каждого реагента. В качестве примера на рис. 2а изображен график зависимости эффективности модификации ДНК-полимеразы β [$5'$ - ^{32}P]ДНК-праймером, содержащим FAB-группу. Зависимость эффективности модификации от времени облучения аппроксимировали уравнением $W_R = A_0(1 - \exp(-kt))$, что позволило определить для разных реагентов константы скорости модификации k и рассчитать соответствующие времена полумодификации $\tau_{1/2}$ (см. “Эксперимент. часть”).

Аналогичная зависимость получена для всех аналогов, за исключением ^4S -dUTP. В этом случае вид кинетической кривой оказался более сложным, что говорит о протекании реакции по другой кинетической схеме (рис. 2б). Наличие, как минимум, двух линейных участков свидетельствует в пользу того, что модификация белка протекает с помощью продуктов вторичного фотолиза данного реагента. Расчет константы k для ^4S -dUTP был произведен по первому линейному участку кинетической кривой. Рассчитанные времена полумодификации приведены в таблице. Таким образом, нами были получены кинетические

параметры (k и $\tau_{1/2}$) образования ковалентных аддуктов реакционноспособных праймеров и ДНК-полимеразы β .

Поскольку лимитирующей стадией процесса модификации считается стадия фотолиза реагента, мы предположили, что константы скорости модификации разных мишеней одним и тем же реагентом приблизительно равны между собой. В рамках такого предположения представляется возможным проводить сравнение величин эффективности модификации мишеней при временах облучения, равных соответствующим временам полумодификации одной из мишеней. Поэтому в дальнейшем значения $\tau_{1/2}$, измеренные для модификации ДНК-полимеразы β , были использованы для сравнения эффективностей модификации различными реагентами как ДНК-полимеразы β , так и ДНК-полимеразы *Tte* и ДНК-матрицы.

Мечение ДНК-полимераз проводили в условиях более чем четырехкратного избытка ДНК-полимераз по отношению к исходному меченому праймеру. Каждый из фотореакционноспособных праймеров при облучении в течение одного времени полумодификации ковалентно присоединяется к ДНК-полимеразе β (рис. 3а) и ДНК-полимеразе *Tte* (рис. 3б) с разной эффективностью. Эффективность модификации определяли как

Кинетические характеристики аналогов dUTP (длина волны облучения 313–365 нм)

Аналог	Выход удлиненного праймера, %		k^* , мин $^{-1}$	$\tau_{1/2}^*$, с
	для ДНК-полимеразы <i>Tte</i>	для ДНК-полимеразы β		
FAB-4-dUTP	87	70	$0.64 \pm 0.07^{**}$ 0.097 ± 0.005	$65 \pm 6^{**}$ 429 ± 21
NAB-4-dUTP	80	70	0.96 ± 0.11	43 ± 5
NAB-12-dUTP	74	70	0.92 ± 0.15	45 ± 6
FAP-8-dUTP	91	85	0.7 ± 0.09	59 ± 7
TDB-4-dUTP	85	67	$0.17 \pm 0.02^{***}$	245 ± 3
^4S -dUTP	76	58	0.031 ± 0.006	1340 ± 240

* Данные трех независимых экспериментов; ** данные для длины волны облучения 280 нм; *** наблюдаются отклонения от кинетического закона первого порядка.

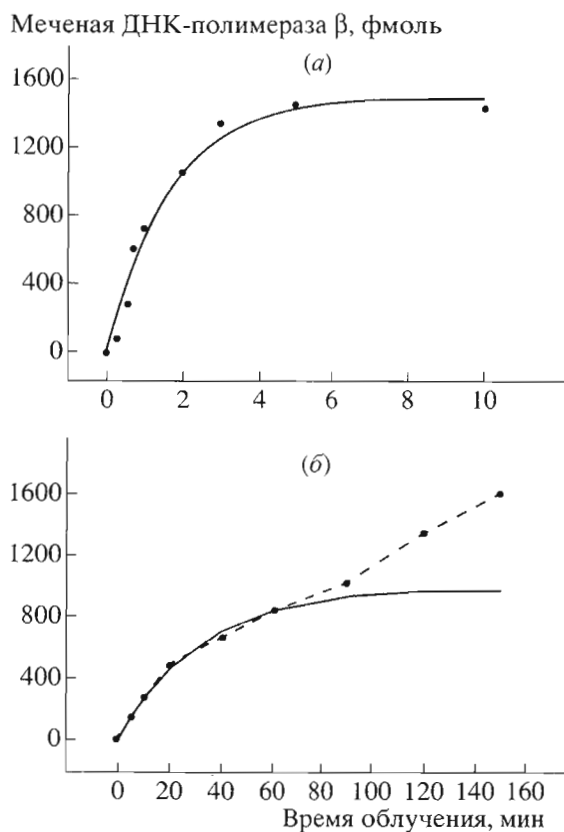


Рис. 2. Зависимость количества продуктов ковалентного присоединения $[5'-^{32}\text{P}]$ ДНК-праймеров, полученных в присутствии FAP-8-dUTP (а) либо ^4S -dUTP (б, пунктирная линия). Сплошная линия – экспоненциальная кривая, аппроксимирующая экспериментальные точки согласно кинетическому уравнению первого порядка.

долю фотоактивного олигонуклеотида (прайма), присоединенного к ДНК-мишени или ДНК-полимеразе. Для ДНК-полимеразы β наблюдается уменьшение суммарной степени модификации в следующем ряду: FAP-8-dUTP > FAB-4-dUTP (313 нм < λ < 365 нм) > TDB-4-dUTP > ^4S -dUTP \approx NAV-12-dUTP > FAB-4-dUTP (λ > 280 нм) > NAV-4-dUTP (рис. 4а). Для ДНК-полимеразы *Tte* эффективность модификации убывает в следующем ряду: FAP-8-dUTP > FAB-4-dUTP (313 нм < λ < 365 нм) > FAB-4-dUTP (λ > 280 нм) > NAV-12-dUTP \approx NAV-4-dUTP > ^4S -dUTP > TDB-4-dUTP (рис. 4б). Таким образом, наиболее эффективным оказался реагент, полученный в присутствии FAP-8-dUTP. Для фотоаффинного реагента, полученного на основе такого аналога, эффективность модификации составляет 11.7%, т.е. максимальное значение данной величины может достигать ~23%.

Нами были обнаружены некоторые общие закономерности для мечения ДНК-полимераз β и *Tte*. Сохранилось положение первых двух реагентов в обоих рядах убывания эффективностей модификации белков. Это свидетельствует о зна-

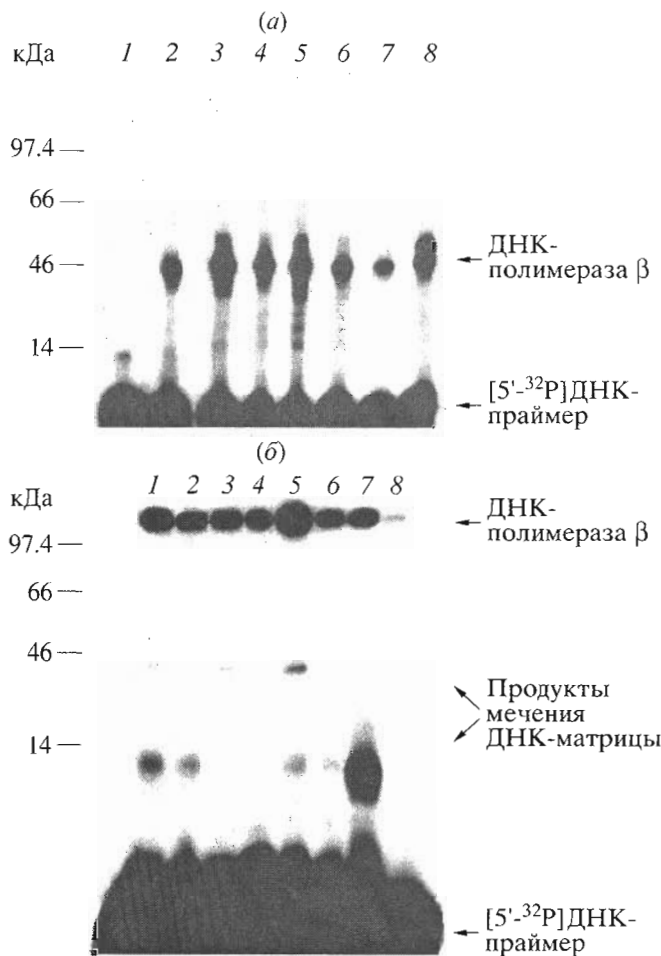


Рис. 3. Радиоавтографы продуктов мечения ДНК-праймерами ДНК-полимеразы β (а) и ДНК-полимеразы *Tte* (б). Реакционноспособные праймеры содержали следующие аналоги dTTP: (а) без аналога (1), ^4S -dUTP (2), FAB-4-dUTP (3, светофильтр УФС-6), TDB-4-dUTP (4), FAP-8-dUTP (5), FAB-4-dUTP (6, светофильтр WG-280), NAV-4-dUTP (7), NAV-12-dUTP (8); (б) FAB-4-dUTP (1, светофильтр WG-280), FAB-4-dUTP (2, светофильтр УФС-6), NAV-4-dUTP (3), NAV-12-dUTP (4), FAP-8-dUTP (5), TDB-4-dUTP (6), ^4S -dUTP (7), без аналога (8). Условия проведения реакции см. "Эксперимент. часть".

чительном влиянии химической структуры реакционноспособной группы на эффективность фотосшивок. Как и предполагалось, усиление электроноакцепторного характера ароматического кольца за счет наличия эндоциклического атома азота в случае FAP повысило степень ковалентного присоединения реагента к ДНК-полимеразам.

Для всех реагентов уровень модификации ДНК-полимеразы β выше, чем ДНК-полимеразы *Tte*. Эти различия можно объяснить несколькими причинами. По-видимому, на эффективность модификации влияет легкость образования ковалентной связи между активной частицей, образующейся из реагента, и аминокислотным остатком

белка. На это в свою очередь влияет химическая природа аминокислотных остатков, способных образовать ковалентную связь, их конформационная доступность, степень связывания реагента белком и другие факторы.

Интересно отметить, что для праймера, содержащего остаток NAB-12-dUTP, на электрофореграмме обнаружено образование дополнительного продукта модификации, обладающего меньшей подвижностью в ПААГ по сравнению с результатами для NAB-4-dUTP (рис. 3). Очевидно, что эффективность модификации ДНК-полимеразы β в случае NAB-12-dUTP увеличивается исключительно за счет образования этого продукта, поскольку эффективность модификации с учетом только продуктов, обладающих одинаковой подвижностью в геле, практически идентична для обоих реагентов (рис. 3а). По всей видимости, образование дополнительного продукта обусловлено возможностью реагента NAB-12-dUTP с более протяженным спейсером атаковать ДНК-полимеразу по удаленным от активного центра аминокислотным остаткам. Вероятно, продукт модификации ДНК-полимеразы β с меньшей подвижностью содержит ДНК-праймер, ковалентно присоединенный к удаленному от активного центра белка аминокислотному остатку. Ранее аналогичная разница в подвижности была отмечена для продуктов модификации белка по разным аминокислотным остаткам олигонуклеотидными фотореагентами [15]. При модификации ДНК-полимеразы *Tte* реагентом, полученным в присутствии NAB-12-dUTP, не происходит образования дополнительного продукта. Эффективность модификации в этом случае практически такая же, как и для NAB-4-dUTP.

Наряду с мечением ДНК-полимеразы *Tte* определялась эффективность модификации ДНК-матрицы. Как видно из рис. 4б, степень модификации ДНК-матрицы убывает в ряду $^3\text{S-dUTP} \gg \text{FAB-4-dUTP} > \text{FAP-8-dUTP} > \text{TDB-4-dUTP} > \text{NAB-12-dUTP} > \text{NAB-4-dUTP}$. Наибольший выход ковалентных аддуктов ДНК-матрицы, который в данных условиях (при облучении в течение одного времени полумодификации) составляет 46%, соответствует реагенту, содержащему остаток 4-тио-2'-дезоксисуридина. Если принять во внимание предположение о приближенном равенстве констант скорости модификации различных мишеней одним реагентом, максимальный выход ковалентных аддуктов с ДНК должен составлять 92%. Такой высокий выход, по всей видимости, определяется локализацией фотоактивного центра (связи C=S) такого реагента вблизи нуклеинового основания, с которым и происходит сшивка. Полученная величина степени модификации выше таковой для лучшего среди ранее изученных арилизидных реагентов, содержащих FAB-группу, которые дают максимальный выход

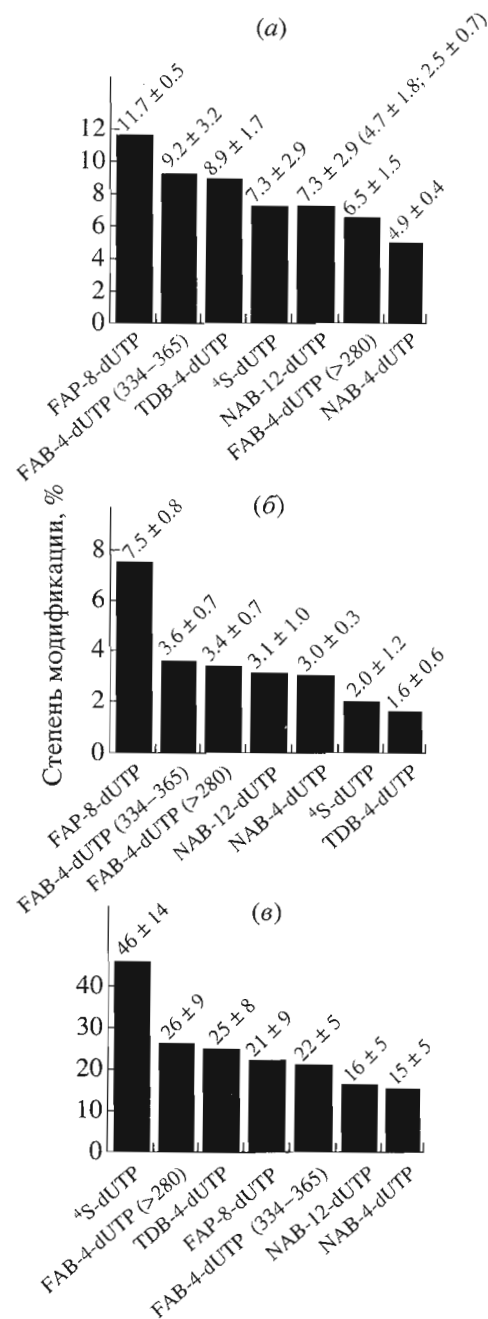


Рис. 4. Эффективность модификации разными реагентами ДНК-полимеразы β (а), ДНК-полимеразы *Tte* (б) и ДНК-матрицы (в). Для NAB-12-dUTP (а) в скобках рядом с величиной суммарной эффективности представлены данные для двух продуктов модификации с разными подвижностями в ПААГ.

ковалентных аддуктов с ДНК-мишенью 65% при десятикратном избытке реагента [10], либо, по данным другой работы, 65–84% при 1.5-кратном избытке [14]. В нашей работе самый высокий выход ковалентных аддуктов в случае использования той же реакционноспособной группы (аналог FAB-4-dUTP) составлял ~50% и, с учетом ошибки эксперимента, вполне согласуется с литературными

ми данными. Кроме того, в предыдущих работах приводились значения эффективности модификации для реагентов, несущих остаток NAB, присоединенный по положению 5 урацила. Для различных мишеней данная величина варьировала от 10 до 20% [10]. По результатам наших измерений, для реагента, содержащего остаток NAB-4-dUTP, среднее значение составляет $30 \pm 10\%$. Небольшое отличие полученных нами величин эффективностей модификации в сравнении с опубликованными ранее может быть объяснено различиями в природе линкера, соединяющего реакционную группу с олигонуклеотидной частью реагента, а также различиями в нуклеотидной последовательности ДНК-мишеней.

Нами было замечено, что эффективность модификации белков реагентами, содержащими FAV-группу, зависит от длины волны возбуждающего света. Чтобы количественно оценить эту разницу, мы использовали разные условия облучения реагента. Как видно из таблицы, при облучении светом с длиной волны >280 нм фотолиз FAV-группы происходит гораздо быстрее, чем при облучении светом в диапазоне 313–365 нм. Однако при использовании FAV-4-dUTP в качестве фотоактивного аналога сказано, что при облучении длинноволновым светом ($313 \text{ нм} < \lambda < 365 \text{ нм}$), эффективность модификации ДНК-полимераз выше, чем при облучении светом с длиной волны >280 нм (рис. 4а, б). Это может быть объяснено фотоинактивацией белка при поглощении света с длиной волны ниже 300 нм. Кроме того, при этих длинах волн возможна фотоактивация продуктов ковалентного присоединения реагента к белку, приводящая к разрушению ковалентной связи между олигонуклеотидом и белком. Таким образом, кроме факторов, связанных с химическим строением реагентов, на эффективность модификации влияет и длина волны УФ-света, которым он активируется. При мечении ДНК-мишени наблюдается обратная ситуация (рис. 4в). Эффективность модификации матрицы несколько ниже при облучении светом с длиной волны 313–365 нм. Это может быть объяснено вкладом прямой ДНК-ДНК фотосшивки между праймером и матрицей при возбуждении оснований ДНК коротковолновым УФ-светом.

Ранее было проведено сравнение эффективностей модификации ДНК-полимеразы β крысы и ДНК-матрицы праймерами, содержащими разные фотореакционноспособные группы на 3'-конце. Такие праймеры были получены с помощью ДНК-полимеразы β в присутствии экзо-*N*-замещенных арилизидных производных dCTP [14]. Модификация проводилась при 4-кратном избытке фермента по отношению к реакционноспособному праймеру. Было обнаружено, что эффективность фотоприсшивки к ДНК-полимеразе β была максимальной (23.5–25%) в случае праймера, содержащего

4-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминоокси)бутилоксигруппу. Для остальных реагентов эффективность модификации фермента составляла 0.5–3%.

В результате проведенных нами исследований установлено, что FAP-группа наиболее эффективно по сравнению с другими изученными в данной работе группами модифицирует ДНК-полимеразы. Кроме того, была отмечена высокая эффективность этой группы в реакции модификации репликативного белка А человека реакционноспособными олигонуклеотидами [16]. Приблизительно такая же, как и в случае реагентов с FAP-группой, эффективность модификации ДНК-полимеразы β была достигнута нами ранее [14] при использовании 4-(4-азидо-2,3,5,6-тетрафторбензилиденаминоокси)бутилоксигруппы. По-видимому, эти две азидогруппы можно использовать при конструировании аффинных реагентов для модификации мишеней белковой природы. Для модификации ДНК-мишеней могут быть рекомендованы реагенты, содержащие остаток 4-тиоурацила.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы следующие реактивы: $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Биосан), MgCl_2 , NaCl (отечественного производства квалификации "ос.ч."), β -меркаптоэтанол (Fluka), маркеры молекулярной массы Rainbow (Amersham), 1,1,1-трис(гидроксиметил)аминометан (Sigma), олигонуклеотиды: (5')GGT TAA ATA AAA TAG TAA GAA TGT ATA GCC CCT ACC (36-звенная матрица), (5')GGT AGG GGC TAT ACA T (16-звенный праймер) (Сибэнзим, Россия). $^4\text{S-dUTP}$ синтезирован и любезно предоставлен В.С. Богачевым (НИБХ СО РАН). Рекомбинантная ДНК-полимераза β крысы выделена в соответствии с работой [17]. Рекомбинантная ДНК-полимераза *Tte* выделена согласно методике, опубликованной в работе [18]. Реакционноспособные аналоги dTTP – литиевые соли FAV-4-dUTP, FAP-8-dUTP, NAB-4-dUTP, NAB-12-dUTP – были получены как описано ранее (соответственно [5, 3, 2, 4]). Литиевая соль TDB-4-dUTP была синтезирована в соответствии с ранее описанными методиками для синтеза аналогов dTTP, замещенных по положению 5 [19].

Введение ^{32}P -метки по 5'-концу праймера проводили по методике, описанной ранее в работе [20]. Очистку меченых олигонуклеотидов осуществляли как описано в [21].

Определение субстратных свойств аналогов dTTP. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 10 мкМ раствор одного из аналогов dTTP, 0.7 мкМ $5'\text{-}^{32}\text{P}$ -меченый праймер в комплексе с матрицей и 3 мкМ ДНК-полимеразу β либо *Tte*, 50 мМ Трис-НСl, рН 8.6 (25°C), 5 мМ MgCl_2 ,

50 mM NaCl. Реакцию проводили в течение 30 мин при 25°C для ДНК-полимеразы β и при 65°C для ДНК-полимеразы *Tte*. Из реакционных смесей отбирали аликвоты объемом 1 мкл. Продукты реакции разделяли электрофорезом в денатурирующем 20% ПААГ [21]. Участки геля, соответствующие исходному праймеру и продуктам его удлинения, вырезали, просчитывали по Черенкову для определения доли удлиненного праймера (x), равную отношению количества удлиненного праймера к общему количеству олигонуклеотида.

Определение констант скоростей модификации (k) и времен полумодификации ($\tau_{1/2}$) ДНК-полимеразы β различными фотореакционноспособными праймерами. После завершения реакции удлинения праймера реакционные смеси (9 мкл) помещали на водяную баню (t 25°C) и облучали светом лампы ДРШ-120 при длинах волн падающего света >280 нм или 313–365 нм с использованием светофильтров WG-280 либо УФС-6 соответственно. В ходе облучения отбирали аликвоты по 1 мкл через определенные интервалы времени. Продукты ковалентного присоединения [$5'$ - 32 P]ДНК-праймера к ДНК-полимеразе β отделяли от свободного [32 P]ДНК-праймера и продуктов модификации матрицы с помощью 12% ПААГ-электрофореза согласно работе [22], вырезали из геля и просчитывали по Черенкову. Константы скорости модификации (k) определяли из зависимости количества продуктов модификации от времени, исходя из предположения о том, что реакция модификации имеет первый порядок. Время полумодификации рассчитывали по формуле $\tau_{1/2} = \lg(2)/k$, что соответствует образованию половины от максимально достижимого количества аддуктов в данных условиях.

Определение эффективности модификации ДНК-полимераз. Модификацию ДНК-полимераз β и *Tte* проводили как описано в предыдущих разделах, при облучении в течение одного времени полумодификации ДНК-полимеразы β (таблица) для каждого из реагентов. Продукты ковалентного присоединения [$5'$ - 32 P]ДНК-праймера к ДНК-полимеразам отделяли от остальных компонентов реакционной смеси с помощью электрофореза в 12% ПААГ. Области геля, соответствующие меченому ферменту и свободному ДНК-праймеру, вырезали из геля и просчитывали по Черенкову. Эффективность модификации рассчитывали по уравнению $W = 100\%[A_1/(A_1 + A_2)]/x$, где A_1 – количество праймера, ковалентно присоединенного к ДНК-полимеразе, A_2 – количество несвязанного к белком реакционноспособного ДНК-праймера, x – доля удлиненного праймера. Величины A_1 и A_2 измеряли, просчитывая по Черенкову соответствующие участки геля. Все эксперименты были воспроизведены 3 раза, проведена статистичес-

кая обработка результатов с использованием критерия Стьюдента, доверительный интервал 90%.

Оценка эффективности модификации ДНК-матрицы. Модификацию ДНК-матрицы, происходящую наряду с модификацией ДНК-полимеразы *Tte*, определяли количественно после разделения смеси продуктов электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях. Участки геля, соответствующие продуктам модификации матрицы и исходному праймеру, вырезали и просчитывали по Черенкову. Значения эффективностей модификации рассчитывали как отношение количества продуктов модификации матрицы к суммарному количеству реакционноспособного [$5'$ - 32 P]ДНК-праймера. Все эксперименты были воспроизведены 3 раза, проведена статистическая обработка результатов с использованием критерия Стьюдента, доверительный интервал 90%.

Авторы выражают благодарность В.С. Богачеву за синтез 4-тио-2'-дезоксинуридин-5'-трифосфата.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 99-04-49277, 00-04-49309, 00-04-22002, 01-04-48861, 01-04-48895, 01-04-06248, 01-03-32439), грантом “Конкурс проектов молодых ученых СО РАН” и Программой Минобразования РФ “Фундаментальные исследования высшей школы в области естественных и гуманитарных наук. Университеты России” (грант № ЗН-346-00).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кнорре Д.Г., Кудряшова И.В., Лаврик О.И. // Успехи химии. 1998. Т. 67. С. 486–502.
2. Wlassoff 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. // Bioconjugate Chem. 1995. V. 6. P. 352–360.
3. Колпащиков Д.М., Захаренко А.Л., Дежуров С.В., Речкунова Н.И., Ходырева С.Н., Дегтярев С.Х., Литвак В.В., Лаврик О.И. // Биооргани. химия. 1999. Т. 25. С. 129–136.
4. Kolpashchikov D.M., Ivanova T.M., Bogachev V.S., Nasheuer H.-P., Weissbart K., Favre A., Lavrik O.I. // Bioconjugate Chem. 2000. V. 11. P. 445–451.
5. Godovikova T.S., Kolpashchikov D.M., Orlova T.N., Richter V.A., Ivanova T.M., Grochovsky S.L., Nasedkina T.V., Victorova L.S., Poletaev A.I. // Bioconjugate Chem. 1999. V. 10. P. 529–537.
6. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Buckle M., Roux P., Buc H., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1994. V. 354. P. 200–202.
7. Сафронов И.В., Щербик Н.В., Ходырева С.Н., Власов В.А., Добриков М.И., Шишкин Г.В., Лаврик О.И. // Биооргани. химия. 1997. Т. 23. С. 576–585.
8. Doronin S.V., Dobrikov M.I., Lavrik O.I. // FEBS Lett. 1992. V. 313. P. 31–33.

9. Lavrik O.I., Nasheuer H.P., Weisshart K., Wold M.S., Prasad R., Beard W.A., Wilson S.H., Favre A. // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. P. 602–607.
10. Добриков М.И., Горн В.В., Зарытова В.Ф., Левина А.С., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 1190–1198.
11. Добриков М.И., Зарытова В.Ф., Комарова Н.И., Левина А.С., Лохов С.А., Приходько Т.А., Шишкин Г.В., Табатадзе Д.Р., Заалишвили М.М. // Биоорганич. химия. 1992. Т. 18. С. 540–549.
12. Liu M.T. // Chem. Soc. Rev. 1981. V. 11. P. 127.
13. Yamaguchi T., Saneyoshi M. // Nucl. Acids Res. 1996. V. 17. P. 3364–3369.
14. Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. // Биоорганич. химия. 2001. V. 27. P. 197–204.
15. Yakubov L., Khald Z., Zhang L.-M., Truneh A., Vlassov V., Stein C.A. // J. Biol. Chem. 1993. V. 398. P. 18818–18823.
16. Хлиманков Д.Ю., Петрусева И.О., Речкунова Н.И., Белоусова Е.А., Колпашников Д.М., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // Биоорганич. химия. 2001. Т. 27. С. 205–209.
17. Beard W.A., Wilson S.H. // Methods Enzymol. 1995. V. 262. P. 98–107.
18. Речкунова Н.И., Акишев А.Г., Лебедева Н.А., Ходырева С.Н., Дегтярев С.Х., Лаврик О.И. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 1490–1495.
19. Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 6633–6637.
20. Ямщиков В.Ф. // Методы молекулярной генетики и геной инженерии / Ред. Р.И. Салганик. М.: Наука, 1990. С. 112–114.
21. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
22. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 277. P. 680–685.

A Comparative Study of the Modification Efficiency of DNA Polymerases and DNA Template by the DNA Primers with Various Photoreactive Groups at Their 3'-Termini

S. V. Dezhurov^{1,2,#}, S. N. Khodyreva^{1,2}, N. I. Rechkunova¹,
D. M. Kolpashchikov¹, and O. I. Lavrik^{1,2}

[#] Phone: +7 (383-2) 34-4296, fax: +7 (383-2) 33-3677, e-mail: dmk@niboch.nsc.ru

¹ Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia

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

The dependence of the modification efficiency of DNA polymerases and DNA template on the nature of photoactivatable group and the length of the linker that joins the group with the heterocyclic base of the primer 3'-terminal nucleotide was studied. The primers that contained the photoreactive groups at their 3'-termini were obtained using the rat DNA polymerase β or the DNA polymerase from *Thermus thermophilus* in the presence of one of the dTTP analogues carrying the photoreactive group in position 5 of thymidine residue. After irradiating the reaction mixture with UV light and separating the modification products, the level of covalent binding of the [5'-³²P]primer to DNA polymerases and template was determined. The primers containing 4-azido-2,5-difluoro-3-chloropyridyl group were shown to be the most effective in the modification of DNA polymerases. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: DNA polymerase, photoaffinity modification