



УДК 577.213.3

РЕПАРИРУЮЩАЯ РЕПЛИКАЦИЯ 5'-S-ТИОФOSFATНОГО АНАЛОГА ГЕКСАДЕКАДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА, КАТАЛИЗИРУЕМАЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗой I *E. COLI*

Шотанов В. А., Рыбаков В. Н., Богачев В. С., Ривкин М. И., Кумарев В. П.

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Академии наук СССР, Новосибирск

Исследована репарирующая репликация 5'-S-тиофосфатного аналога — гексадекадезоксирибонуклеотида $C-sC-sA-sT-(sC)_2-(sT)_3-(sC)_2-sA-(sT)_3-sG^*$ — в присутствии затравки, декадезоксирибонуклеотида $^{32}pC-A-A-A-T-G-G-A-A-A$, ДНК-полимеразами I *E. coli* и фага T4. Показано, что исследуемый аналог является матрицей для первого фермента, но не для второго. Скорость репликации аналога ДНК-полимеразой I *E. coli* была значительно меньше, чем скорость репликации гексадекадезоксирибонуклеотида с идентичной последовательностью нуклеотидов и природными межнуклеотидными связями. В применявшихся условиях репликация матрицы-аналога проходила не до конца, но правильно.

Аналоги полинуклеотидов широко применяются для изучения механизма действия матричных ферментов и для их идентификации [1, 2]. Для различных ферментов одни и те же аналоги могут быть либо матрицами, либо конкурентными ингибиторами [3]. Недавно были описаны некоторые субстратные свойства 5'-S-тиофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих не природные P-S-C(5')-связи, в системах ряда ферментов [4, 5]. Настоящая работа посвящена исследованию матричных свойств таких аналогов в системах ДНК-полимераз *E. coli* и фага T4.

Способность ДНК-полимераз осуществлять синтез ДНК на матрицах, 5'-S-тиофосфатных аналогах олигодезоксирибонуклеотидов, изучали на примере репарирующей репликации такого аналога — $C-sC-sA-sT-(sC)_2-(sT)_3-(sC)_2-sA-(sT)_3-sG$ (I) в присутствии затравки — декадезоксирибонуклеотида $^{32}pC-A-A-A-T-G-G-A-A-A$ (II). В контрольном эксперименте в качестве матрицы использовали гексадекадезоксирибонуклеотид (III) с природными межнуклеотидными связями и последовательностью нуклеотидов, идентичной тиопроизводному (I).

Электрофоретический анализ продуктов реакции, катализируемой ДНК-полимеразой I *E. coli* на матрицах (I) и (III), показал (рис. 1), что в присутствии матрицы-аналога (I) за 2 ч реакции при 0° С затравка удлиняется лишь на два нуклеотидных звена. Дальнейшего удлинения не происходит даже через 30 ч, в то время как в контрольном эксперименте репликация практически завершается через 1 ч. Чтобы установить, правильно ли протекала репликация аналога, модифицированным методом Сангера [6] была определена нуклеотидная последовательность 3'-концевого участка декадезоксирибонуклеотида (IV) — продукта удлинения затравки ферментом (рис. 2). Последовательность нуклеотидов в продукте (IV) оказалась (C-A-A-A-T)-G-G-A-A-A-G-G. Таким образом, репарирующая репликация матрицы-аналога проходила правильно, из чего следует, что 5'-S-тиофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов нерегулярного состава могут служить матрицами для ДНК-полимеразы I, хотя и значительно менее эффективными, чем природные матрицы. Пока неясно, какие стадии матричного синтеза ДНК (связывание матрицы, отбор комп-

* Префикс d в сокращенном написании 2'-дезоксинуклеозидов для краткости всюду опущен. Использовано следующее сокращение: sN — 2',5'-дидезокси-5'-меркапто-нуклеозиды.

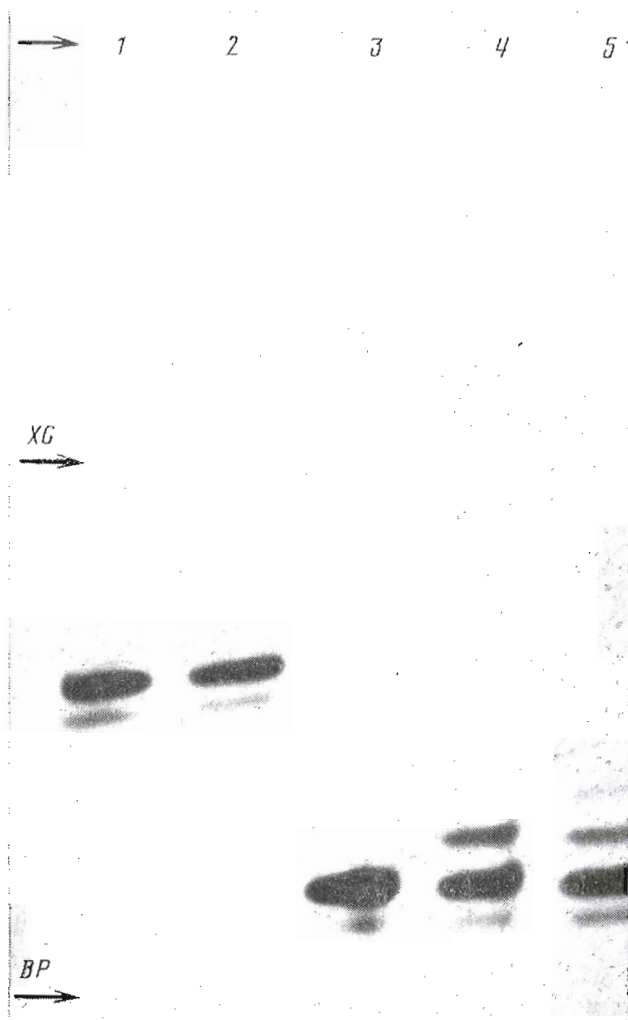


Рис. 1. Результаты гель-электрофоретического анализа продуктов репарирующей репликации 5'-S-тиофосфатного аналога (I) в присутствии затравки (II) в системе ДНК-полимеразы I *E. coli*: 1, 2 — достройка затравки (II) на гексадекадезоксинуклеотиде (III), 4, 5 — достройка затравки на матрице-аналоге (I), 3 — исходная затравка (II). Инкубацию проводили 1 ч (1, 4) и 2 ч (2, 5) при 0° С. XG — положение красителя ксиленцианола FF, BP — бромфенолового синего

лементарного дезоксирибонуклеозидтрифосфата, образование фосфодиэфирной связи, транслокация) определяют низкую скорость репликации аналога. Причиной синтеза неполного продукта может быть либо предпочтение ферментом только определенных участков матрицы-аналога, либо неоптимальные условия реакции для считывания относительно коротких аналогов (известно, что в некоторых случаях копирование концевых нуклеотидов коротких природных матриц ДНК-полимеразой I *E. coli* затруднено [7]). В отличие от ДНК-полимеразы I *E. coli* ДНК-полимераза фага T4 не катализировала присоединение нуклеотидов к 3'-концу затравки (II). Удлинения затравки не наблюдалось даже через 2 сут реакции (данные не приведены), что, по-видимому, обусловлено различиями в строении активных центров этих двух ферментов.

Таким образом, можно заключить, что 5'-S-тиофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов обладают свойствами, делающими весьма перспективным использование таких производных для изучения специфичности и механизма действия матричных ферментов. Они могут оказаться полезными при изучении ДНК-полимеразы I *E. coli*, в частности для исследования отдельных стадий репликации ввиду ее низкой скорости на таких

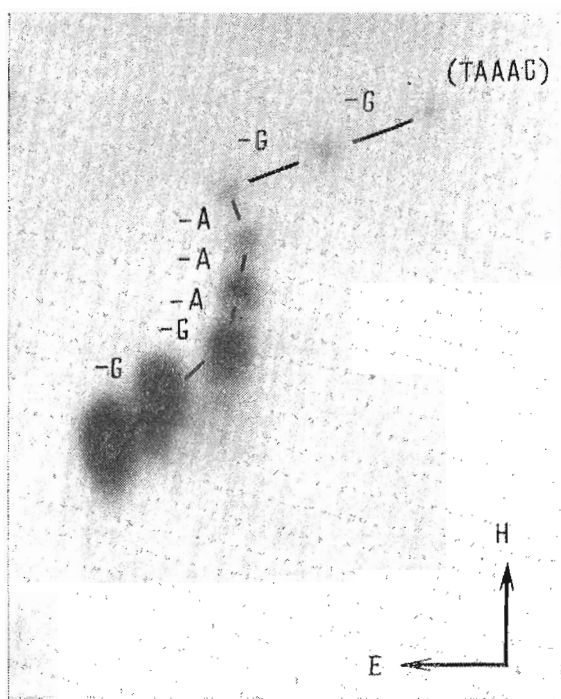


Рис. 2. Двумерное разделение продуктов частичного гидролиза $5'$ - ^{32}P -фосфорилированного додекадезоксинуклеотида (IV) — продукта репарирующей репликации матрицы-аналога ДНК-полимеразой I *E. coli*. Направление E — электрофорез на ацетицеллюлозе; направление H — гомохроматография в гомосмеси IV [8]

аналогах. Отсутствие репарирующей репликации в системе ДНК-полимеразы фага T4 можно объяснить или неспособностью фермента связываться с такой матрицей или тем, что связывание происходит, но фермент не способен осуществить ее репликацию. В последнем случае такие аналоги могли бы быть использованы для решения поставленной Корнбергом задачи: исследовать, как происходит связывание дезоксирибонуклеозидтрифосфатов с ДНК-полимеразой в присутствии матрицы и затравки, влияние которых на этот процесс остается неисследованным [9], так как природные матрицы и затравки либо гидролизуются ферментом, либо в их присутствии идет репликация.

Экспериментальная часть

$5'$ -S-тиофосфатный аналог (I) синтезировали методом, описанным в работе [10], дека- и гексадекадезоксинуклеотиды (II) и (III) — по методу [11]. Первичную структуру аналога (I) определяли как описано в работе [12], а соединений (II) и (III) — методом Сангера [6]. Ферменты, индуцируемые фагом T4, получали как описано в работе [4]. ДНК-полимеразу I (КФ 2.7.7.7) (большой фрагмент) выделяли из биомассы *E. coli*, штамм НАТ 99 (отечественное производство) по методу [13]. Ионообменную хроматографию выполняли на аминокроме отечественного производства (Союзреактив). Фосфорилирование декадезоксинуклеотида (II) и его очистку от избытка $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ проводили как описано в работе [4]. Репарирующую репликацию в системе ДНК-полимеразы фага T4 исследовали по методу [4]. Концентрации матриц (I) и (III) и затравки (II) составляли $5 \cdot 10^{-6}$ М. В случае ДНК-полимеразы I *E. coli* реакционная смесь объемом 0,01 мл содержала 0,05 М трис-НСl (рН 7,4), 0,005 М MgCl_2 , 0,001 М каждый из дезоксинуклеозидтрифосфатов; $1 \cdot 10^{-6}$ М $5'$ - ^{32}P -меченый декадезоксинуклеотид (II); $8 \cdot 10^{-6}$ М гексадекадезоксинуклеотид (III) и 3 ед. акт. ДНК-полимеразы I. Из реакционных смесей через определенные интервалы времени отбирали аликвоты, прогревали их 5 мин при 100°C .

и подвергали электрофорезу в 20% полиакриламидном геле, содержащем 7 М мочевины. Контролем служила исходная затравка (II). Основную часть реакционной смеси с ДНК-полимеразой I *E. coli* через 30 ч инкубации при 0° С хроматографировали на микроколонке с аминохромом в градиенте концентрации KH_2PO_4 (рН 7,0) в 7 М мочевины, как указано в работе [4]. Фракцию с ^{32}P -олигодезоксирибонуклеотидом максимальной длины собирали и обессоливали гель-фильтрацией. Полученный таким образом продукт репарирующей репликации использовали для определения первичной структуры.

Авторы выражают благодарность А. Г. Ромащенко и Д. К. Беляеву за полезные замечания и интерес к данной работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Erikson R., Grosch J. C. *Biochemistry*, 1974, v. 13, № 1, p. 1987–1993.
2. De Clercq E., Billiau A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, v. 72, № 1, p. 284–288.
3. Tuominen F. W., Kenney F. T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, v. 68, № 9, p. 2198–2202.
4. Rybakov V. N., Riukin M. I., Kumarev V. P. *Nucl. Acids Res.*, 1981, v. 9, № 1, p. 189–201.
5. Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П. *Биоорг. химия*, 1981, т. 7, № 9, с. 1423–1425.
6. Tu Chen Pei D., Jay E., Bahl C. P., Wu R. *Anal. Biochem.*, 1976, v. 74, № 1, p. 73–93.
7. Gupta N. K., Khorana H. G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1968, v. 61, № 1, p. 214–221.
8. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. *Nucl. Acids Res.*, 1974, v. 1, № 3, p. 331–354.
9. Корнберг А. Синтез ДНК. М.: Мир, 1977, с. 78–79.
10. А. С. 979361 (СССР). Способ получения олигодезокситионуклеотидов / Кумарев В. П., Богачев В. С., Рыбаков В. Н. Заявл. 30.04.81, № 3285636. Оpubл. в: Б. И., 1982, № 45.
11. А. с. 925964 (СССР). Способ получения полидезоксинуклеотидов / Кумарев В. П., Богачев В. С., Баранова Л. В., Ривкин М. И. Заявл. 01.11.79, № 2835418. Оpubл. в Б. И., 1982, № 17.
12. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. П. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 11, с. 1525–1534.
13. Jovin T. M., Englund P. T., Bertch L. L. *J. Biol. Chem.*, 1969, v. 244, № 11, p. 2996–3008.

Поступила в редакцию
29.VII.1982
После доработки
28.II.1983

REPAIR REPLICATION OF A 5'-S-THIOPHOSPHATE ANALOG OF HEXADECADEXOXYRIBONUCLEOTIDE BY *E. COLI* DNA POLYMERASE I

POTAPOV V. A., RYBAKOV V. N., BOGACHEV V. S.,
RIVKIN M. I., KUMAREV V. P.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Academy
of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The replication of a 5'-S-thiophosphate analog of hexadecadeoxyribonucleotide — d{C-sC-sA-sT-(sC)₂-(sT)₃-(sC)₂-sA-(sT)₃-sG} by *E. coli* DNA polymerase I and T4 DNA polymerase was investigated. This analog was found to serve as template for the former, but not for the latter enzyme. The replication rate for this analog was significantly lower than the that for corresponding hexadecadeoxyribonucleotide with natural internucleotide bonds. Under experimental conditions the replication of the analog was found to be incomplete but correct.