



УДК 577.113.4

**ВКЛЮЧЕНИЕ В ЦЕПЬ ДНК ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО  
ПРОИЗВОДНОГО 2'-ДЕЗОКСИУРИДИЛОВОЙ КИСЛОТЫ  
ПРИ КАТАЛИЗЕ СИНТЕЗА ДНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ А***Александрова Л. А., Атражев А. М., Куханова М. Е.,  
Краевский А. А.**Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Осуществлен синтез аналога 2'-дезоксириндидин-5'-трифосфата, несущего в положении 5 заместитель, содержащий дансилльный остаток на конце протяженного линкера. Это соединение успешно заменяет dTTP в синтезе ДНК, катализируемом ДНК-полимеразой А на матрице ДНК фага M13mp10 с синтетическим 14-членным праймером. Если синтез проводить в присутствии четырех терминаторных субстратов, удастся определить структуру синтезированной ДНК. Это показывает принципиальную возможность установления первичной структуры ДНК с помощью флуоресцентной метки.

Одна из актуальных проблем установления первичной структуры ДНК состоит в замене радиоактивных соединений на какие-либо другие, которые позволяли бы анализировать структуру ДНК. Недавно появилось сообщение о разработке нового автоматизированного способа определения первичной структуры по методу Сенгера (терминацией процесса полимеризации) с использованием флуоресцентно-меченых праймеров [1].

В соответствии с этим методом в четыре порции праймера по 5'-концу вводятся четыре различные флуоресцентные метки. После гибридизации с матрицей и ферментативного удлинения каждого праймера в присутствии одного из четырех ddNTP реакционные смеси объединяют и помещают в трубку с полиакриламидным гелем, в которой проводится электрофорез. По мере разделения олигонуклеотидов ведут сканирование флуоресцентных полос. В этом методе в каждую молекулу ДНК вводится один флуоресцентный остаток, что ограничивает чувствительность метода.

С целью повышения чувствительности мы проверили возможность синтеза ДНК с множественной флуоресцентной меткой и нашли, что при матричном синтезе ДНК с помощью ДНК-полимеразы А в случае, когда вместо одного из субстратов — dTTP — использован его флуоресцентный аналог (VI), происходит образование комплементарной нити ДНК, несущей вместо остатков тимидиловой кислоты соответствующие производные 2'-дезоксириндидиловой кислоты.

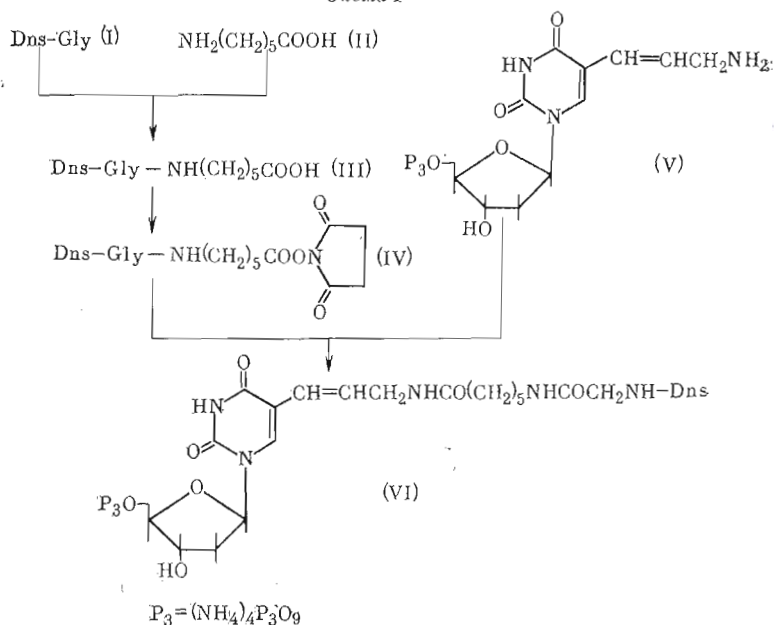
Аналог dTTP, 5-(дансилглицил-6-аминогексаноиламинопропенил-1)-2'-дезоксириндидин-5'-трифосфат (VI) был синтезирован по схеме 1.

Исходный 5-(аминопропенил-1)-2'-дезоксириндидин-5'-трифосфат (V) был синтезирован по методу [2]; далее его конденсировали с N-оксисукцинимидным эфиром дансилглицил-6-аминогексановой кислоты (IV), полученным из дансилглицина (I) и этилового эфира 6-аминогексановой кислоты (II) через промежуточную дансилглицил-6-аминогексановую кислоту (III). Обоснованием метода явились работы, показавшие, что N-оксисукцинимидные эфиры карбоновых кислот в водной среде не реагируют с нуклеотидами [3], но эффективно взаимодействуют с первичными алифатическими аминами [4]. Конечное соединение очищали ВЭЖХ (см. «Экспериментальную часть»).

Ферментативный синтез модифицированной ДНК с помощью ДНК-полимеразы А проводили на ДНК фага M13mp10 в качестве матрицы,

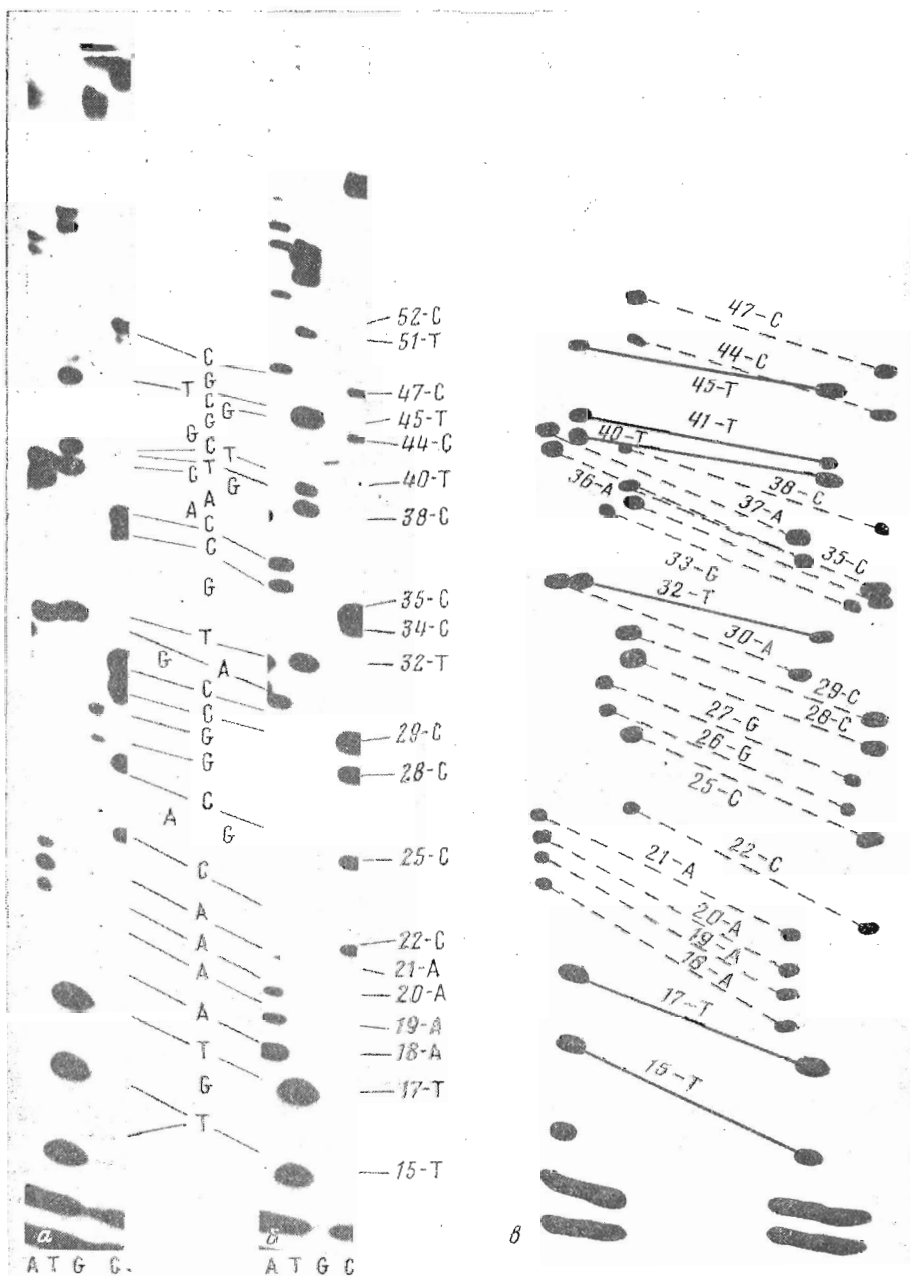
Сокращения: дансил, Dns — 5-диметиламинонафталин-1-сульфонил, ДНК-полимераза А — фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I из *E coli* (RF 2.7.7.7), DCC — N,N'-дипциклогексилкарбодимид.

Схема 1



с добавлением dATP, dGTP, dCTP и аналога (VI) и с частичной терминацией синтеза 3'-амино-2',3'-дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатами [dNTP(3'-NH<sub>2</sub>)] по методу [6].

Как видно из рисунка *a*, можно прочитать последовательность вновь синтезированной ДНК (она приведена сбоку). Для сравнения показаны дорожки, в которых приведены результаты аналогичного синтеза с применением четырех природных dNTP по методу [5] (рисунок *б*). Как легко заметить из сравнения полос дорожек с аналогом (VI) и dTTP, фрагменты ДНК, несущие флуоресцентную метку, мигрируют несколько медленнее, что вызвано, вероятно, введением гидрофобного остатка в аналог (VI) по сравнению с dTTP. Более наглядно это показано на рисунке *в*. Дополнительно следует отметить, что различие в подвижности фрагментов, оканчивающихся на Т (рисунок *a, б*), несколько меньше, чем фрагментов, оканчивающихся на другие нуклеотиды; это хорошо видно по наклону линий, соединяющих одноименные нуклеотиды в схеме. Замеченное явление легко объяснимо, так как при терминации синтеза dTTP(3'-NH<sub>2</sub>) каждый концевой тимидин в молекулах ДНК не содержит дансила и поэтому подвижность фрагмента искажена менее, чем во всех остальных случаях, в которых каждый тимидин замещен на остаток (VI), содержащий дансил. В свою очередь это вносит некоторую трудность в прочтение геля с флуоресцентной меткой, в частности отмеченную при расшифровке фрагмента <sup>38</sup>AAGCTT<sup>44</sup> (ср. рисунок *a* и *б*). Поэтому при расшифровке структуры по гелю следует использовать показанный в схеме алгоритм, учитывающий различие в подвижностях фрагментов ДНК в разных треках. Альтернативным способом снятия этого несоответствия треков может послужить введение метки, аналогичной дансильной, в dCTP и использование этого производного вместо dCTP в реакционной смеси, терминируемой dTTP(3'-NH<sub>2</sub>). Следует также отметить наличие на рисунке *a* в треке Т (когда реакция была терминирована dTTP(3'-NH<sub>2</sub>)) дополнительной полосы, расположенной ниже 15-Т. Мы объясняем ее присутствие следующим образом: в реакционной среде проходит частичный гидролиз 3'-концевого остатка тимидиловой кислоты (14-Т) в праймере, на что указывает двойная полоса праймера на геле, отвечающая 14- и 13-членному праймерам (на рисунке *a* и *б*). Поэтому удлинение 13-членного праймера с участием аналога (VI) дает на геле верхнюю из двух полос (15-Т), а терминация 14-членного праймера, проходящая без участия аналога (VI), выражается нижней полосой того же 15-Т.



Радиоавтограмма электрофореза в геле продуктов синтеза ДНК в присутствии аналога (VI) (а) и с dTTP (б) в условиях определения первичной структуры. (см. «Экспер. часть»). Треки А, Т, С и G соответствуют реакциям, терминированным соответственно dATP(3'-NH<sub>2</sub>), dTTP(3'-NH<sub>2</sub>), dCTP(3'-NH<sub>2</sub>) и dGTP(3'-NH<sub>2</sub>). Положение нуклеотидов новосинтезированной цепи ДНК указано на рисунке справа. в — схематическое изображение данного рисунка а, б, на котором соединены полосами соответствующие нуклеотиды треков а и б. Некоторые очень слабые полосы (главным образом С), показанные на схеме, были видны на радиоавтограмме геля, но не проявились на его фотографиях

Таким образом, показана применимость замены одного из субстратов при копировании цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы А на флуоресцентное производное. Как упоминалось выше, в работе [1] флуоресцентные остатки находились лишь в 5'-положении каждой молекулы ДНК и, несмотря на это, определение структуры ДНК по флуоресцентной метке было возможно. Следовательно, в нашем случае, если в каждую пробу вводить производное dNTP, несущее различную флуоресцентную метку,

можно предложить альтернативный сообщенному [1] способ определения первичной структуры ДНК, но с существенно более высокой чувствительностью.

### Экспериментальная часть

Дансилглицин — фирмы Reanal (Венгрия). Этиловый эфир 6-аминогексановой кислоты получен из 6-аминогексановой кислоты и этанола в присутствии  $\text{SOCl}_2$ . 5-(Аминопропенил-1)-dUTP синтезировал по [2].

Электрофоретический анализ синтезированных соединений проводили на бумаге FN-16 (ГДР) в буферах с pH 7,5 и 2,5 (800 В, 22 В/см) с использованием пикриновой кислоты в качестве маркера. ТСХ проводили на пластинках силуфол UV 254 (ЧССР) в системах этилацетат — гексан, 4:1 (1), изопропанол —  $\text{NH}_4\text{OH}$  — вода, 7:1:2 (2); диоксан — вода —  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 6:4:1 (3); изопропанол — диоксан — вода —  $\text{NH}_4\text{OH}$ , 2:4:4:1 (4); ВЭЖХ выполняли на хроматографе «Милихром» (СССР) в колонке объемом 180 мкл, заполненной силасорбом-амин (10 мкм, ЧССР). Элюцию проводили 0,25 М  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  со скоростью 100 мкл/мин. Время удерживания соединений (IV), (V) и (VI) составило соответственно 4, 5 и 11 мин. Буфер удаляли многократным упариванием с водой.

Меченый праймер-матричный комплекс олигонуклеотида d( $^{32}\text{P}$ CCCA-CTCAGGACGT) и (+)-цепи ДНК фага M13mp10 был приготовлен по [7]. Реакционные смеси для определения первичной структуры ДНК (5 мкл) содержали 1 мкл смеси раствора праймер-матричного комплекса (6000—8000 имп/мл); 1 мкл 20 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 50 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, 0,1 М трис- $\text{HCl}$  (pH 8,0); 1 мкл смеси dNTP (10 мМ одноименного по основанию с терминатором и по 100 мМ трех остальных), вместо dTTP использован аналог (VI); 1 мкл 50 мМ раствора терминатора и 1 мкл препарата ДНК-полимеразы А (4 ед. акт). Синтез ДНК вели 5 мин, затем добавляли 1 мкл 1 мМ dATP, dCTP, dGTP и аналога (VI), выдерживали 5 мин, останавливали реакцию добавлением 3 мкл 90% формамида, содержащего 20 мМ  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  и по 0,02% бромфенолового синего и ксиленцианола. Для разделения цепей ДНК смесь прогревали 1 мин на кипящей водяной бане и сразу же наносили на электрофорезный гель. Электрофорез и радиоавтографию вели по методу, описанному в работе [7].

Дансилглицил-6-аминогексановая кислота (III). К суспензии 388 мг (2 ммоль) хлоргидрата этилового эфира 6-аминогексановой кислоты в 3 мл абс. тетрагидрофурана при 0° С приливали 253 мг (0,35 мл, 2,5 ммоль) абс.  $\text{Et}_3\text{N}$  и перемешивали 20 мин при 20° С. Осадок отделяли, промывали 2×1 мл абс. тетрагидрофурана, к раствору добавляли 308 мг (1 ммоль) дансилглицина и 227 мг (1,1 ммоль) DCC и перемешивали 20 ч при 20° С. Контроль осуществляли по ТСХ в системах 1 и 2; образуется новое вещество с  $R_f$  0,83(1) и 0,81(2); для исходного соединения (1)  $R_f$  0,52(1) и 0,61(2). Смесь фильтровали, раствор упаривали досуха, к остатку добавляли воду и этилацетат (по 10 мл), органический слой промывали порциями по 5 мл последовательно насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$ , водой, 0,1 М ацетатом натрия (pH 4,5), водой и высушивали  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали, остаток растворяли в 5 мл этанола, добавляли 1,1 мл 1 М  $\text{NaOH}$  и перемешивали 1 ч при 20° С. Контроль осуществляли ТСХ в системе 1. Реакционную смесь упаривали до небольшого объема к остатку добавляли воду и хлороформ (по 5 мл), водный слой отделяли, подкисляли 10% лимонной кислотой до pH 4,5. Вещество (III) экстрагировали хлороформом и смесью хлороформ — тетрагидрофуран (4:1). Органический слой высушивали над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упаривали. После кристаллизации из изопропанола т. пл. 177—178° С. Выход 367 мг (87%). УФ-спектр в воде (pH 7,5):  $\lambda_{\text{max}}$  245 (ε 8670) и 327 нм (ε 2500),  $\lambda_{\text{min}}$  280 нм (ε 460). Найдено, %: С 56,77; Н 6,58; N 10,09. Для  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$  вычислено, %: С 56,99; Н 6,46; N 9,97. ТСХ:  $R_f$  0,62(1) и 0,65(2). Электрофоретическая подвижность относительно пикриновой кислоты: -0,62 (pH 2,5), 0,54 (pH 7,5).

*N*-Оксисукцинимидный эфир *N*-дансилглицил-6-аминогексановой кислоты (IV). К раствору 110 мг (0,25 ммоль) соединения (III) и 34,5 мг (0,3 ммоль) *N*-оксисукцинимиды в 1 мл абс. диоксана добавляли 61,8 мг (0,3 ммоль) ДСС и перемешивали 20 ч при 20° С. Контроль осуществляли по ТСХ в системе 1. Реакционную смесь фильтровали, фильтрат упаривали, остаток промывали петролейным эфиром и эфиром и кристаллизовали из изопропанола. Выход 110 мг (84%), т. пл. 139–141° С. УФ-спектр (этанол):  $\lambda_{\text{макс}}$  250 ( $\epsilon$  9170), 329 нм ( $\epsilon$  2900),  $\lambda_{\text{мин}}$  282 нм ( $\epsilon$  430). Найдено, %: С 55,71; Н 5,60; N 10,62. Для  $C_{24}H_{30}N_4O_5S$  вычислено, %: С 55,59; Н 5,83; N 10,80. ТСХ:  $R_f$  0,79 (1) и 0,83 (2). Электрофоретическая подвижность относительно пикриновой кислоты: -0,67 (рН 2,5), 0,12 (рН 7,5).

5-[3-(5-Диметиламинонафталин-1-сульфонилглицил-6-аминогексаноил)-аминопропенил-1]-2'-дезоксисуридин - 5'-трифосфат, триэтиламмонийная соль (VI). К раствору 10,5 ОЕ<sub>289</sub> (1,46 мкмоль) тетранатриевой соли 5-(3-аминопропенил-1)-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфата (V) в 0,5 мл воды добавляли раствор 5,2 мг (10 мкмоль) соединения (IV) в 50 мкл диоксана и 10 мкл *N*-метилмидазола и перемешивали 20 ч при 4° С. Контроль осуществляли по ТСХ в системах 3 и 4. Реакционную смесь разбавляли водой до 10 мл, наносили на колонку (1,5×10 см) с DEAE-сефадексом А-25 (НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>), промывали 50 мл воды. Элюцию проводили при 4° С линейным градиентом NH<sub>4</sub>НСО<sub>3</sub> (рН 7,5; 0–0,5 М, 0,5 л). Вещество (VI) элюируется при 0,41–0,43 М. Элюат упаривали, остаток упаривали несколько раз с водой и этанолом и высушивали. Выход 7,8 ОЕ<sub>293</sub> (72%). УФ-спектр при рН 7,5;  $\lambda_{\text{макс}}$  245 ( $\epsilon$  1700) и 293 нм ( $\epsilon$  7400),  $\lambda_{\text{мин}}$  230 ( $\epsilon$  1360) и 275 нм ( $\epsilon$  6740). Электрофоретическая подвижность относительно dTTP 0,29 (рН 2,5) и 0,52 (рН 7,5); для исходного соединения (V) - 0,68 (рН 2,5) и 0,72 (рН 7,5). ТСХ:  $R_f$  0,3(3) и 0,37(4); для исходного (V)  $R_f$  0,1(3) и 0,12(4).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Dodd C., Connell C. R., Heiner C., Kent S. B. H., Hood L. E. Nature, 1986, v. 321, № 6071, p. 674–679.
2. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1981, v. 78, № 21, p. 6633–6636.
3. Краевский А. А., Пурьгин П. П., Тарусова Н. Б., Готтук Б. П. Изв. АН СССР. Сер. хим., 1970, № 12, с. 2769–2774.
4. De Groot N., Lapidot J., Panet A., Wolman J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1966, v. 25, № 1, p. 17–23.
5. Sanger F., Neiclen S., Coulson A. R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, v. 74, № 12, p. 5463–5467.
6. Chidgeavadze Z. G., Vcabealashvilli R. Sh., Atrazhev A. M., Kukhanova M. K., Azharyev A. V., Krayevsky A. A. Nucl. Acids Res., 1984, v. 12, № 3, p. 1671–1686.
7. Maxam A. M., Gilbert W. Methods Enzymol., 1980, v. 65, p. 499–560.

Поступила в редакцию  
1.IX.1986

### INCORPORATION OF FLUORESCENT DERIVATIVES OF 2'-DEOXYURIDINE 5'-TRIPHOSPHATE INTO DNA CHAIN WITH *E. COLI* DNA POLYMERASE CATALYSIS

ALEXANDROVA L. A., ATRAZHEV A. M., KUKHANOVA M. K., KRAYEVSKY A. A.

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

A 2'-deoxyuridine 5'-triphosphate analogue with a dansyl (5-dimethylaminonaphthalene 1-sulphonyl) residue in the 5-position of uracyl has been synthesised. This compound substitutes dTTP in the DNA synthesis catalyzed by Klenow's fragment of *E. coli* DNA polymerase I on the M13mp10 phage DNA as template with a synthetic 14-member primer. When the synthesis is terminated by four termination substrates, structure of the synthesised DNA chain can be read. It demonstrates in principle possibility of determination of DNA sequence by means of fluorescence.