



УДК 547.963.32.02

ВКЛЮЧЕНИЕ В ДНК БИОТИНИЛИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ dUTP И dCTP ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ.

КЛОНИРОВАНИЕ В *E. COLI* ФРАГМЕНТА ДНК, СОДЕРЖАЩЕГО БИОТИНИЛИРОВАННЫЙ ДЕЗОКСИРИБОУРИДИН

Ошевский С. И., Кумарев В. П., Грачев С. А.*

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск;* Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Академии наук СССР, Москва

Синтезирован новый биотинилированный аналог dCTP — Bio-6-dCTP. Изучалась способность Bio-6-dCTP и ранее описанного аналога dUTP — Bio-4-dUTP включаться в ДНК вместо тимидина ДНК-полимеразами. Оказалось, что скорость включения Bio-6-dCTP в ДНК ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова) составляет 30% от скорости включения Bio-4-dUTP. Bio-4-dUTP в отличие от Bio-6-dCTP является субстратом высокоочищенной ДНК-полимеразы α из плаценты человека. В системе ДНК-полимеразы α с синтетической матрицей в присутствии Bio-4-dUTP синтезирован двухцепочечный полинуклеотид с остатками биотина в одной цепи. Полученный после его расщепления рестриктазой *BspRI*-фрагмент был проклопирован в плазмидном векторе pBR322. Анализ ДНК гибридных клонов показал, что такие биотинилированные фрагменты ДНК могут непосредственно клонироваться в *E. coli* с сохранением нуклеотидной последовательности.

Синтез Bio-4-dUTP, его субстратные свойства в ДНК-полимеразных системах, получение биотинилированных производных ДНК и их свойства впервые были описаны в работе [1]. Впоследствии синтезирован ряд биотинилированных по С-5-положению пиримидинового кольца аналогов dUTP, различающихся длиной соединительной ножки [2]. Существенным недостатком предложенного метода синтеза [1, 2] является низкий (менее 20%) выход продуктов [3]. Предпринимаются попытки заменить труднодоступные биотинилированные аналоги dUTP [1, 2]. Так, в работе [4] предлагается эффективный, но достаточно сложный метод синтеза биотинилированного по С-5-положению пиримидинового кольца аналога dUTP, отличающегося структурой соединительной ножки от ранее описанных аналогов [1, 2]. В то же время синтезируются биотинилированные аналоги dCTP: по С-5-положению пиримидинового кольца — 5-[N-(N-биотинил- ϵ -аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат [5], по экзоциклической аминогруппе — N⁴-(6-биотиниламиногексил)-2'-дезокситидин-5'-трифосфат [6] и др. [7]. Аналоги dCTP по экзоциклической аминогруппе используются для встраивания в ДНК ДНК-полимеразами вместо цитидина и синтезируются более простыми, чем биотинилированные аналоги dUTP, методами, что делает их весьма перспективными.

Цель данной работы — разработка метода синтеза нового биотинилированного аналога — Bio-6-dCTP, сравнение субстратных свойств Bio-6-dCTP и ранее описанного Bio-4-dUTP в ДНК-полимеразных системах — в частности, выяснение возможности для встраивания в ДНК вместо тимидина с перспективой использования вместо аналогов dUTP*. Изучение свойств

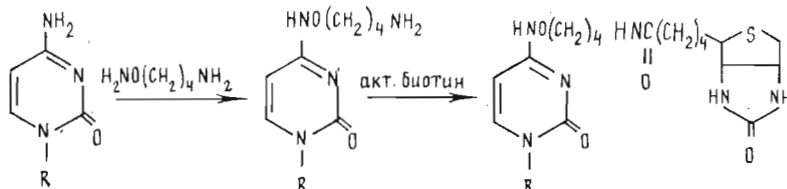
Сокращения: Bio-6-dCTP — N⁴-[(N-биотинил)-4-аминобутоксил]-2'-дезокситидин-5'-трифосфат, Bio-4-dUTP — 5-[(N-биотинил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксисуридин-5'-трифосфат.

* Основанием для предположения послужили данные работы [8] о субстратной специфичности N⁴-метоксипроизводного CTP в РНК-полимеразной системе. Производное поддерживает синтез РНК при использовании как вместо CTP, так и вместо UTP.

продуктов ДНК-полимеразной реакции — биотинилированных ДНК, в том числе исследовали возможность клонирования в *E. coli* с помощью стандартной генно-инженерной техники фрагмента ДНК, несущего остатки биотипа в одной цепи.

Последняя задача представляется актуальной, так как в настоящее время разрабатываются специальные эффективные методы выделения биотинилированных ДНК [9—11], и исследование первичной структуры выделяемой с их помощью ДНК потребует, очевидно, предварительного клонирования.

Аналог Bio-4-dUTP получали методом [1]. Bio-6-dCTP синтезировали в две стадии согласно схеме



R = 2'-дезоксирибозил-5'-трифосфат.

Реакцию dCTP с O-(4-аминобутил)гидроксиламином проводили в условиях, аналогичных предложенным в работе [12] для избирательного замещения экзоциклической аминогруппы цитидина в ДНК. N⁴-(4-Аминобутоксидеокси)-2'-дезоксидитидин-5'-трифосфат выделяли ионообменной хроматографией. Ацилирование алифатической аминогруппы N⁴-(4-аминобутоксидеокси)-2'-дезоксидитидин-5'-трифосфата N-оксисукцинимидным эфиром биотина в использованных условиях проходило быстро и с высоким выходом. Целевой продукт выделяли также ионообменной хроматографией. Существенно, что метод получения Bio-6-dCTP очень прост. Кроме того, исходя из N⁴-(4-аминобутоксидеокси)-2'-дезоксидитидин-5'-трифосфата действием N-оксисукцинимидных эфиров производных биотина [2, 7] легко могут быть получены биотинилированные аналоги dCTP с более длинной соединительной ножкой.

Сравнение субстратной активности Bio-6-dCTP и Bio-4-dUTP в системе ДНК-полимеразы α из плаценты человека проводили в условиях, аналогичных [13]. В качестве затравки на матрице poly(dA) использовали меченый олигонуклеотид [5'-³²P]d(pT)₁₅. Продукты полимеризации после разделения методом электрофореза в ПААГ выявляли с помощью радиоавтографии. В процессе реакции с аналогом Bio-4-dUTP наблюдали образование высокополимерных продуктов в количестве, не меньшем, чем в контрольном эксперименте с dTTP. С аналогом Bio-6-dCTP полимерные продукты не образовывались. Однако в системе ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) с матрицей poly(dA) и той же затравкой Bio-6-dCTP эффективно включался в ДНК. Полученные данные учитывались при тестировании субстратных свойств аналогов с использованием гетерогенной матрицы.

Гетерогенная матрица длиной 48 нуклеотидных остатков была собрана из трех 16-звездных синтетических [5'-³²P] олигонуклеотидов и содержала 3'-концевой фосфат с S-метильной защитной группой (олигонуклеотид с S-метильной группой на 3'-фосфате является промежуточным продуктом в использованном нами методе олигонуклеотидного синтеза [14]). Структура матрицы приведена на рис. 1 (нижняя цепь большого фрагмента). Затравка — [5'-³²P] олигонуклеотид (1), в 20 раз более высокой удельной радиоактивности. В выбранной модели ДНК-полимеразы могут застраивать только верхнюю цепь, что облегчает анализ продуктов (рис. 2). Аналог Bio-4-dUTP — дорожки 1—6. Видно, что и ДНК-полимераза α , и ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) синтезируют одинаковый продукт — полностью застроенный биотинилированный полинуклеотид, что следует из его электрофоретической подвижности, которая соответствует

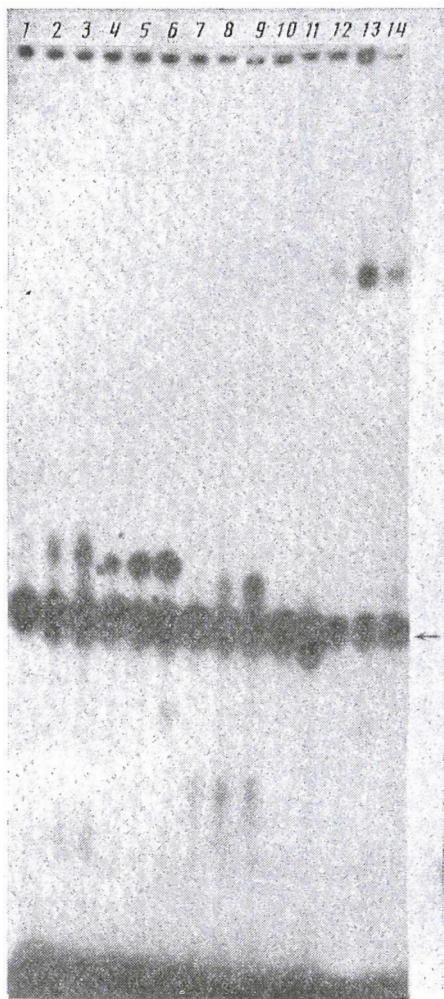


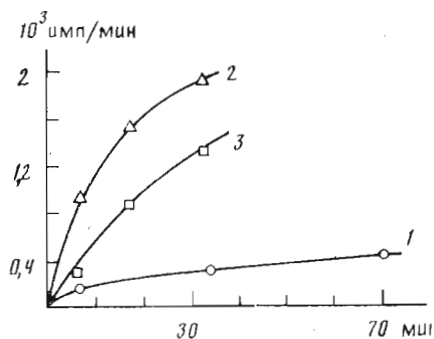
Рис. 2. Электрофоретический анализ биотинилированных полинуклеотидов, синтезируемых ДНК-полимеразами. Матрица (указана стрелкой) — синтетический полинуклеотид длиной 48 нуклеотидных остатков, затравка — $[5'-^{32}P]d(AATTCGCTCAGT)$. 1–6 — продукты, синтезируемые ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова) (1–3) и ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова) (4–6) с аналогом Bio-4-dUTP; 7–9 — продукты, синтезируемые ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова) с аналогом Bio-6-dСТР; 10, 11 — продукты, синтезируемые ДНК-полимеразой α с dTTP; алквоты реакционных смесей отбирали через 6, 33, 70 мин (1–3 соответственно), 6, 16, 33 мин (4–6 и 7–9), 6, 33 мин (10, 11); 12–14 — анализ продуктов ДНК-полимеразных реакций, результат разделения которых представлен на дорожках 3, 6, 9, после выдерживания с авидином

ожидаемой (наличие остатков биотина во фрагменте ДНК приводит к снижению его электрофоретической подвижности [15]), и из его способности образовывать комплекс с авидином. Этот комплекс настолько устойчив, что выдерживает нагревание в растворе 50% формамида в течение 30 с при 100°С (см. дорожки 12, 13). На дорожках 7–9 (рис. 2) показано накопление продукта в реакционной смеси ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова) с аналогом Bio-6-dСТР. Его электрофоретическая подвижность несколько меньше, чем у продукта на дорожках 4–6. По-видимому, это следствие различий в структуре биотинилированных оснований фрагментов ДНК. Продукт включения аналога Bio-6-dСТР хорошо связывает авидин (см. дорожку 14). Эксперименты по застройке синтетической матрицы ДНК-полимеразой α и фрагментом Кленова проводились в присутствии ионов Mn^{2+} (рис. 2). В тех же условиях с Mg^{2+} были получены аналогичные результаты. После разделения продуктов реакционных смесей электрофорезом в ПААГ фрагменты геля, содержащие основные полимерные продукты, вырезали и просчитывали их радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика. Данные, представленные на рис. 3 в виде кинетики накопления полноразмерных биотинилированных полинуклеотидов, отражают соотношение скоростей включения аналогов Bio-4-dUTP и Bio-6-dСТР в ДНК ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова).

Полученные результаты показывают, что синтезируемый нами аналог Bio-6-dСТР эффективно включается в ДНК вместо тимидина ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагмент Кленова) как на гомогенной, так и на гетерогенной матрице, когда используется вместо dTTP. И хотя скорость включения Bio-6-dСТР составляет 30% от скорости включения Bio-4-dUTP (см. рис. 3), с ним может быть получена полноразмерная ДНК-ко-

пия фрагмента ДНК, которая образует прочный комплекс с авидином. Обнаруженные свойства Bio-6-dСТР свидетельствуют, что в принципе аналоги этого типа могут использоваться вместо биотинилированных аналогов dUTP для получения ДНК-зондов. А более простой способ синтеза

Рис. 3. Кинетика накопления полноразмерных биотинилированных полинуклеотидов при включении ДНК-полимеразой α Bio-4-dUTP (1) и ДНК-полимеразой I *E. coli* Bio-4-dUTP (2) и Bio-6-dCTP (3). Матрица — синтетический полинуклеотид длиной 48 нуклеотидных остатков, заправка — $[5' \text{-}^{32}\text{P}]\text{d}(\text{AATTCCGCTCAGT})$



цитидиновых аналогов делает предложенный подход целесообразным.

На основании данных работы [6] об эффективности включения в ДНК вместо цитидина биотинилированного по С-4-положению аналога dCTP — N^4 -(6-биотиниламиногексил)-2'-дезоксцитидин-5'-трифосфата можно предположить, что Bio-6-dCTP также может встраиваться в ДНК вместо цитидина, если будет использоваться вместо dCTP.

Интересно, что в системе ДНК-полимеразы α из плаценты человека Bio-6-dCTP не проявляет субстратных свойств. В отличие от Bio-6-dCTP Bio-4-dUTP включается в ДНК вместо тимидина высокоочищенной ДНК-полимеразой α из плаценты человека на гомогенной и гетерогенной матрицах, что указывает на возможность включения его в ДНК в системе *in situ* [16] ДНК-полимеразой α .

Чтобы проверить, можно ли клонировать в *E. coli* биотинилированные по одной цепи фрагменты ДНК, использовался продукт застройки синтетической матрицы ДНК-полимеразой α из плаценты человека с аналогом Bio-4-dUTP. Реакционную смесь ДНК-полимеразной реакции (рис. 2, 3) подвергали гель-фильтрации. Полимерную фракцию, которая представляет собой смесь меченого двухцепочечного биотинилированного фрагмента (см. структуру на рис. 1) и меченой исходной матрицы, собирали и обрабатывали рестриктазой *BspRI*, так как в результате полимеризации во фрагменте ДНК должен был образоваться узнаваемый ею сайт рестрикции (рис. 4). Образовался более короткий, чем исходный, биотинилированный фрагмент ДНК (рис. 4, 2). Следовательно, наличие вблизи сайта рестрикции биотинилированных оснований (см. рис. 1) не препятствует гидролизу фрагмента ДНК рестриктазой *BspRI*. Укороченный биотинилированный фрагмент (*EcoRI*—*BspRI* на рис. 1) с помощью обычной генно-инженерной техники клонировали в плазмидном векторе pBR322 согласно схеме, изображенной на рис. 1. Для этого из плазмидного вектора pID-1, несущего фрагмент *EcoRI*—*HindIII* ID-последовательности [17] по схеме представленной на рис. 1, был выделен фрагмент *BspRI*—*HindIII*. Полученный фрагмент *BspRI*—*HindIII* и биотинилированный фрагмент *EcoRI*—*RspRI* лигировали совместно с выделенным электрофорезом большим фрагментом *EcoRI*—*HindIII* плазмиды pBR322. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*, штамм JC 5183, и высевали на чашки с ампицилином. Из полученных колоний 135 переносили на чашку и на питроцеллюлозный фильтр, ДНК на фильтре гибридизовали с высоко мечеными олигонуклеотидами, комплементарными началу и концу нижней цепи клонированного фрагмента ДНК (рис. 1). Структура зондов — AATTCCGCTCAGT(I) и TGGGTTCCGGTCCCA(III). Оказалось, что ДНК 14 клонов гибридизуется с зондом (III), из них с зондом (I) гибридизуется ДНК 1 клон. Анализ 2000 клонов показал, что с двумя зондами гибридизуется ДНК 8 клонов. Низкий выход трансформантов, видимо, связан со сложностью и несбалансированностью лигазной смеси. Кроме того, на конце встраиваемого биотинилированного фрагмента ДНК в сайте рестрикции *EcoRI* присутствует защищенный 3'-фосфат, что так-

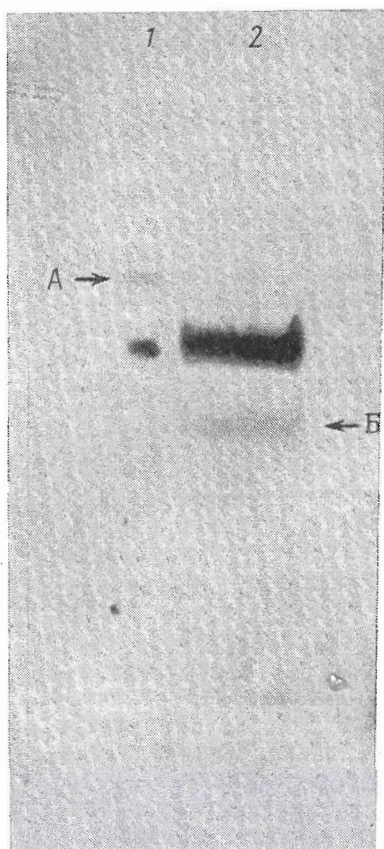


Рис. 4

Рис. 4. Электрофоретический анализ смеси меченого биотинилированного дуплекса, структура которого приведена на рис. 1, и меченой матрицы (1) и этой же смеси после обработки рестриктазой *BspRI* (2). Стрелками обозначены синтезированный биотинилированный полинуклеотид (А) и выделяемый для клонирования биотинилированный полинуклеотид (Б)

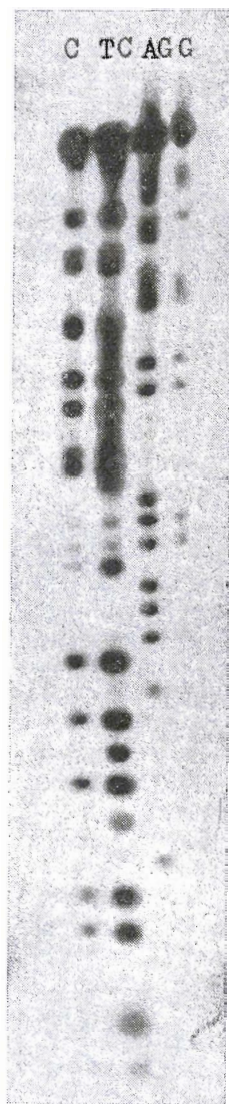


Рис. 5

Рис. 5. Анализ первичной структуры фрагмента *EcoRI-HindIII* ДНК гибридного клона по методу Максама - Гилберта

же снижает выход трансформантов, выявляемых гибридизацией с зондом (1). ДНК одной из гибридных колоний, гибридизовавшейся с двумя зондами, подвергли рестрикционному анализу, который показал наличие вставки *EcoRI-HindIII*, соответствующей по размеру мономерной единице клонированного фрагмента ДНК. Результат анализа первичной структуры этой вставки приведен на рис. 5. Она полностью соответствует первичной структуре встроенного фрагмента ДНК без остатков биотина. Полученные результаты показывают, что клонирование в плазмидном векторе pBR322 в *E. coli*, штамм JC 5183, биотинилированного по одной из цепей фрагмента ДНК возможно с сохранением первичной структуры вставки.

В работе использовали: трис(оксиметил)аминометан (Merck, ФРГ); агарозу (Bio-Rad, США); *d*-биотин (Serva, ФРГ); сефадекс G-50, сверхтонкий; щелочную фосфатазу *E. coli* (Pharmacia, Швеция); poly(dA), полинуклеотидкиназу фага T4, ДНК-лигазу фага T4 (НИКТИ БАН, Бердск); [α - 32 P]dATP и [γ - 32 P]ATP удельной радиоактивности ≥ 3000 Ки/ммоль (отечественное производство); рестриктазы *Bsp*RI, *Eco*RI (ИЦиГ СО АН СССР), *Hind*III (НПО «Фермент», СССР). ДНК-полимераза I *E. coli* (фрагмент Кленова) получена от А. М. Наякина (ИЦиГ СО АН СССР); dATP, dCTP, dGTP, dTTP (НИКТИ БАН, Бердск); ДНК плазмиды pID-1 предоставлена Л. В. Обуховой; олигонуклеотиды синтезированы В. Ф. Кобзевым (ИЦиГ СО АН СССР). Высокоочищенная ДНК-полимераза α из плаценты человека (уд. акт. $5 \cdot 10^3$ ед. акт./мг [13]) получена от Г. А. Невинского (НИБХ СО АН СССР). Солянокислый O-(4-аминобутил)гидроксиламин любезно предоставлен П. И. Поздняковым (ВНИИ МБ, Новосибирск). N-Оксиsuccинимидный эфир биотина получали по методике [18]. Авидин выделяли как описано в работе [19]. Квалификация остальных реактивов была не ниже х. ч.

N^4 -[(*N*-Биотинил)-4-аминобутоксид]-2'-дезоксидитидин-5'-трифосфат. 10 мМ раствор dCTP в 0,5 М солянокислом O-(4-аминобутил)гидроксиламин, рН 5,5, инкубировали 6 ч при 60°С. Затем реакционную смесь разбавляли в 20 раз водой и хроматографировали на колонке с DEAE-целлюлозой в градиенте концентрации бикарбоната триэтиламония от 0 до 0,5 М, рН 8,0. Модифицированный нуклеозид-5'-трифосфат собирали и упаривали, а затем осаждали из водного раствора 20 объемами 2% перхлората лития в ацетоне. Осадок промывали этанолом и высушивали в вакууме. К 10 мМ N^4 -(4-аминобутоксид)-2'-дезоксидитидин-5'-трифосфату в 0,1 М карбонате аммония добавляли 1/10 объема насыщенного раствора N-оксисукцинимидного эфира биотина в сухом диметилсульфоксиде, выдерживали 2 ч при 20°С и вновь выделяли целевой продукт ионообменной хроматографией на колонке с DEAE-целлюлозой, упаривали и пересаждали. Выход около 70%.

Субстратные свойства Bio-6-dCTP и Bio-4-dUTP в системах ДНК-полимераз определяли в условиях, аналогичных [13]. Реакции проводили в 10 мМ буфере трис-НСl, рН 7,5, содержащем 0,04 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 2 мМ EDTA, 0,1 мМ MnCl₂ (или 40 мМ MgCl₂). Реакционная смесь для синтеза на гомополимерной матрице содержала: 0,15 мМ poly(dA) (концентрация оснований), 0,03 мМ [5'- 32 P]d(pT)₁₅ удельной радиоактивности 1000 Ки/ммоль, 20 мкМ dTTP или биотинилированный аналог дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата, 0,025 ед. акт./мкл ДНК-полимеразы α или 0,15 ед. акт./мкл ДНК-полимеразы I *E. coli* (фрагмент Кленова). В реакционной смеси для синтеза на гетерогенной матрице концентрация матрицы и праймера составляла 0,1 и 0,13 мкМ (удельная радиоактивность 30 и 600 Ки/ммоль соответственно). Реакционная смесь содержала также 20 мкМ dCTP, dATP, dGTP и один из биотинилированных аналогов в концентрации 20 мкМ (опыт) или 20 мкМ dTTP (контроль); ДНК-полимеразу α в концентрации 0,05 ед. акт./мкл [13] или ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) — 0,07 ед. акт./мкл [20]. Реакцию проводили при 30°С. Аликвоты объемом 3 мкл после добавления 3 мкл формамида с красителями и прогревания в течение 30 с при 100°С наносили на 10% ПААГ с 7 М мочевиной.

Комплексообразование биотинилированных фрагментов ДНК с авидином. Реакционные смеси, содержащие биотинилированные продукты, синтезируемые на гетерогенной матрице ДНК-полимеразами, хроматографировали на колонке с сефадексом G-50, сверхтонкий, для удаления биотинилированных дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. Собирали полимерную фракцию и упаривали, концентрируя раствор в 20 раз. К 3 мкл полученного раствора фрагментов ДНК (0,1 мкМ по исходной матрице) в 0,12 М трис-НСl-буфере, рН 7,5, содержащем 12 мкМ АТР, добавляли 1/6 объема раствора авидина в 0,1 М бикарбонате натрия, рН 8,0, до кон-

центрации 1 мкМ и выдерживали 10 мин при 20° С. После добавления равного объема формамида с красителями образцы инкубировали 30 с в кипящей водяной бане и аликвоты объемом 3,5 мкл наносили на 10% ПААГ с 7 М мочевиной.

Рестрикция биотинилированного фрагмента ДНК, синтезируемого ДНК-полимеразой α в присутствии Bio-4-dUTP и гетерогенной матрицы. К 20 мкл раствора биотинилированного фрагмента ДНК в смеси с исходной матрицей в 0,12 М трис-НСl-буфере, рН 7,5, содержащем 12 мкМ АТР (после гель-филтрации и упаривания, см. выше), добавляли раствор 1 М MgCl₂ до концентрации 25 мМ и 20 ед. акт. рестриктазы *BspRI*. Через 1,5 ч инкубации при 37° С реакционную смесь разделяли электрофорезом в 10% ПААГ в денатурирующих условиях, гель радиоавтографировали. Биотинилированный фрагмент ДНК (Б, рис. 4) выделяли из геля электроэлюцией на DEAE-бумагу, с которой его элюировали раствором 1 М NaCl.

Выделение фрагментов ДНК. 4 мкг ДНК плазмиды pBR322 гидролизовали рестриктазой *HindIII* в условиях [21]. Аликвоту анализировали методом электрофореза в агарозном геле. К оставшейся части гидролизата добавляли рестриктазу *EcoRI* и инкубировали 2 ч. Большой фрагмент *EcoRI-HindIII* выделяли электрофорезом в 1% агарозном геле с последующей электроэлюцией. Полученный фрагмент осаждали ацетоном из 2 М LiClO₄ [22] и растворяли в 10 мкл TE-буфера*.

3 мкг ДНК плазмиды pID-1 гидролизовали в условиях [21] рестриктазами *HindIII* и *EcoRI*. Полученные фрагменты дефосфорилировали 10–15 мин щелочной фосфатазой *E. coli* (0,004 ед. акт.) и трижды экстрагировали фенолом. Остатки фенола убрали хлороформом. ДНК осаждали ацетоном с перхлоратом лития и промывали осадок этанолом. После растворения в 15 мкл киназного буфера фрагменты ДНК кинировали [γ -³²P] АТР удельной радиоактивности 1000 Ки/ммоль с помощью полинуклеотидкиназы фага Т4 и выделяли фрагмент *EcoRI-HindIII* методом электрофореза в 10% ПААГ. Полученный фрагмент после растворения в 10 мкл *BspRI*-буфера гидролизовали 2 ч *BspRI* (2 ед. акт.). *BspRI-HindIII*-фрагмент выделяли электрофорезом в 10% ПААГ, используя электроэлюцию на DEAE-бумагу. После элюции фрагмента *BspRI-HindIII* с DEAE-бумаги 1 М NaCl к полученному раствору добавляли фрагмент *EcoRI-HindIII* плазмиды pBR322 (выделение см. выше) и биотинилированный фрагмент *EcoRI-BspRI*. Фрагменты соосаждали этанолом, промывали, сушили и растворяли в 4 мкл ДНК-лигазного буфера, содержащего 0,5 мМ АТР.

Лигирование, трансформация и отбор клонов. К раствору ДНК-фрагментов добавляли ДНК-лигазу фага Т4 (ед. акт.) и инкубировали смесь 20 ч при 4–6° С. Половину ДНК-лигазной смеси использовали для трансформации кальций-рубидиевых клеток *E. coli*, штамм JC 5183, по методу [21]. Полученные клетки высевали на чашки с ампициллином. Из 2000 трансформантов для 135 колоний проводили гибридизацию с олигонуклеотидными зондами по методике [21].

Выделение фрагмента ДНК и анализ его первичной структуры. Плазмидную ДНК гибридного клона выделяли по методике [21]. ДНК (4 мкг) гидролизовали *EcoRI* как описано выше. К реакционной смеси добавляли 40 мкКи упаренного [α -³²P] dATP, dTTP до концентрации 50 мкМ и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) в количестве 210 ед. акт. Через 30 мин инкубации при 37° С ферменты инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 65° С. После добавления рестриктазы *HindIII* (60 ед. акт.) и инкубации (4ч, 37° С) продукты разделяли электрофорезом в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. Выделяли одну из цепей фрагмента ДНК – имеющую большую электрофоретическую подвижность. Первичную структуру определяли методом Максама – Гилберта в варианте [23] (рис. 5).

* 10 мМ трис(рН 7,5), 1 мМ EDTA.

1. Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 77. № 11. P. 6633-6637.
2. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 13. P. 4045-4049.
3. Shimkus M., Levy J., Herman T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 9. P. 2593-2597.
4. Nelson P. S., Bahl C., Gibbons I. // Nucleosides and Nucleotides. 1986. V. 5. № 3. P. 233-241.
5. Проспект фирмы Enzo Biochem. Inc., 1985.
6. Gillam I. C., Tener G. M. // Anal. Biochem. 1986. V. 157. № 2. P. 199-207.
7. Gebeyehu G., Rao P. Y., Soochan P., Simms D. A., Klevan L. // Nucl. Acids Res. 1987. V. 15. № 11. P. 4513-4534.
8. Budowsky E. I., Sverdlov E. D., Spasokukotskaya T. N. // Biochim. et biophys. acta. 1972. V. 287. № 2. P. 195-210.
9. Herman T. M., Lefever E., Shimkus M. // Anal. Biochem. 1986. V. 156. № 1. P. 48-55.
10. Welcher A. A., Torres A. R., Ward D. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 24. P. 10027-10044.
11. Roseman B., Lough J., Houkott E., Herman T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 137. № 1. P. 474-479.
12. Адаричев В. А., Дымыщ Г. М., Калачиков С. М., Поздняков П. И., Салганик Р. И. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 8. С. 1066-1069.
13. Невинский Г. А., Подуст В. Н., Левина А. С., Халабуда О. В., Лаврик О. И. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 3. С. 357-368.
14. Кумарев В. П., Баранова Л. В., Богачев В. С., Лебедев А. В., Обухова Л. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 10. С. 1348-1358.
15. Kemp T., Sundquist W. I., Chow F., Hu S.-L. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 1. P. 45-57.
16. Hunting D. J., Dresler S. L., Murcia G. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 21. P. 5729-5734.
17. Боровков А. Ю., Обухова Л. В., Кобзев В. Ф., Кумарев В. П. // Молекулярн. биология. 1986. Т. 20. Вып. 6. С. 1625-1630.
18. Heitzmann H., Richards F. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. № 9. P. 3537-3541.
19. Бросалина Е. Б., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 2. С. 248-256.
20. Jacobsen H., Klenow H., Ovargaard-Hansen K. // Eur. J. Biochem. 1974. V. 45. № 2. P. 623-627.
21. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
22. Барам Г. И., Грачев С. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1420-1422.
23. Чупило С. А., Кравченко В. В. // Биоорган. химия. 1984. Т. 8. № 12. С. 1634-1637.

Поступила в редакцию
14.III.1988

После доработки
18.I.1989

THE INCORPORATION OF dUTP AND dCTP BIOTINYLATED
DERIVATIVES INTO DNA BY DNA-POLYMERASES.
THE CLONING IN *E. COLI* DNA FRAGMENT CONTAINING
BIOTINYLATED DEOXYRIBOURIDINE

OSHEVSKI S. I., KUMAREV V. P., GRACHEV S. A.*

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

**V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The synthesis of a biotinylated derivative of dCTP, viz. N⁴-[(N-biotinyl)-4-amino-butoxy]-2'-deoxycytidine 5'-triphosphate (I), is described. DNA polymerase I (Klenow fragment) incorporates (I) in DNA chains instead of thymidine, although with a lower efficiency than previously described biotinylated dUTP derivative (II), whereas highly purified DNA polymerase α from human placenta uses as substrate derivative (II) but not (I). A DNA fragment bearing biotin residues in one of strands was synthesized with the use of DNA polymerase α and dUTP derivative (II); its cloning in the plasmid vector pBR322 revealed that the DNA nucleotide sequence remained intact.