

6. Mikhailov V. S., Gulyamov D. B. Changes in DNA polymerase α , β , γ activities during early development of the teleost fish *Misgurnus fossilis* (loach).— Eur. J. Biochem., 1983, 135, N 2, p. 303—306.
7. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.— Nature, 1970, 227, N 5259, p. 680—685.
8. Oakley B. R., Kirsch D. R., Morris N. R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.— Anal. Biochem., 1980, 105, N 2, p. 361—363.
9. Михайлов В. С., Гулямов Д. Б. Выделение двух форм ДНК-полимеразы α из икры вьюна. Физико-химическая характеристика изоферментов.— Биохимия, 1983, 48, № 9, с. 1530—1537.
10. ДНК-полимеразная активность вируса ядерного полиэдроза большой вошинной моли / А. В. Рындич, Л. П. Сутугина, В. М. Кавсан и др.— Докл. АН УССР. Сер. Б, 1975, № 4, с. 347—349.
11. Выделение репликативного комплекса, содержащего ДНК-полимеразу α и ДНК-праймазу, из гены тутового шелкопряда *Bombyx mori* / В. С. Михайлов, Д. О. Атаева, К. А. Марлыев, П. К. Куллыев.— Докл. АН СССР, 1984, 275, № 2, с. 502—505.

Ин-т зоологии ТССР, Ашхабад
Ин-т биологии развития
им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

Получено 22.01.85

УДК 577.213.32

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ α И β ИЗ ЭМБРИОНОВ МОРСКОГО ЕЖА

Л. Л. Терентьев, Н. А. Терентьева, В. А. Рассказов

Исследование биосинтеза ДНК в клетках эукариот является одной из центральных проблем молекулярной биологии. Согласно современным представлениям синтез ДНК осуществляется мультиферментным комплексом, ключевую роль в котором играют ДНК-полимеразы. В клетках эукариот обнаружены три типа ДНК-полимераз, которые в соответствии со своими физико-химическими свойствами классифицированы как α , β и γ [1]. В яйцеклетках и эмбрионах морского ежа, как и в других эукариотических клетках, присутствует несколько отличающихся по свойствам ДНК-полимераз [2, 3]. Впервые из клеток эмбрионов морского ежа была выделена Лебом [4] высокомолекулярная ДНК-полимераза, впоследствии классифицированная как ДНК-полимераза α . Сузуки-Хори и др. [5], а также Хобарт и Инфант [6] выделили ДНК-полимеразу, напоминающую по своим свойствам ДНК-полимеразу β эукариот. Однако сравнительный анализ свойств этих ферментов затруднен тем, что эти ферменты выделяли из эмбрионов морских ежей разных видов и на разных стадиях развития. К тому же основное внимание исследователи уделяли характеристике лишь основных физико-химических свойств ферментов, необходимых для отнесения ферментов к соответствующему классу ДНК-полимераз. В то же время для выяснения функций этих ферментов необходимо исследовать молекулярный механизм синтеза ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразами, в частности, взаимодействие ДНК-полимераз с различными участками матрицы-затравки, характер копирования матрицы и эффективность утилизации одноцепочечного пробела.

В настоящей работе обобщены результаты исследования двух ДНК-полимераз — α и β , выделенных из клеток эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* [7—10].

Для исследования спектра ДНК-полимераз суммарный белковый препарат из эмбрионов морского ежа был подвергнут хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Как видно из рис. 1, в результате хроматографии обнаруживают три белковые фракции, обладающие ДНК-полимеразной активностью. Анализ молекулярной массы ДНК-полимераз, входящих в активные фракции, и исследование чувствительно-

сти ферментов к действию сульфгидрильных реагентов дали основание предположить, что ДНК-полимеразы, входящие в пики I и II, относятся к классу ДНК-полимераз β , а ДНК-полимераза из пика III — к классу ДНК-полимераз α .

Для того чтобы более полно исследовать свойства ДНК-полимераз морского ежа, были разработаны методы очистки ферментов. Для выделения ДНК-полимеразы α белковый препарат из клеток эмбрионов морского ежа фракционировали сернокислым аммонием, диализовали и

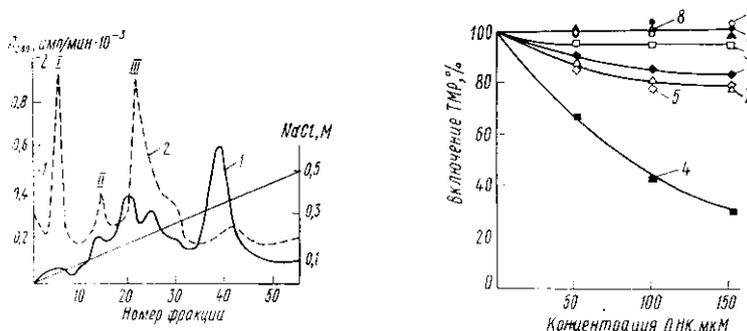


Рис. 1. Распределение ДНК-полимеразной активности при хроматографии суммарного белкового препарата из эмбрионов морского ежа на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой: 1 — белок, измеренный при A_{280} ; 2 — ДНК-полимеразная активность.

Fig. 1. Distribution of the DNA polymerase activity after DEAE-cellulose chromatography of unfractionated homogenate of sea urchin embryos: 1 — protein (A_{280}); 2 — DNA polymerase activity.

Рис. 2. Действие различных форм ДНК на реакцию полимеризации, осуществляемую ДНК-полимеразой α (закрашенные символы) и ДНК-полимеразой β (незакрашенные символы) с активированной ДНК (100 мкМ) в качестве затравки-матрицы: 1, 2 — двухцепочечная кольцевая ДНК фага $\phi X174$; 3, 4 — одноцепочечная кольцевая ДНК $\phi X174$; 5, 6 — линейная двухцепочечная ДНК без одноцепочечных пробелов с 3'-ОН-концевыми группами; 7, 8 — линейная двухцепочечная ДНК без одноцепочечных пробелов с 3'-фосфатными группами.

Fig. 2. Effect of various DNA forms on the polymerization reaction of DNA polymerase α (filled symbols) and DNA polymerase β (open symbols) on activated DNA (100 μM). 1, 2 — supercoiled duplex circular $\phi X174$ DNA, 3, 4 — single-stranded circular $\phi X174$ DNA, (5, 6) — linear duplex fragments of DNA terminated with 3'-hydroxyl, (7, 8) — linear duplex fragments of DNA terminated with 3'-phosphate.

подвергали хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, гидроксил-апатитом и ДНК-целлюлозой. В результате такой очистки была получена ДНК-полимераза α с удельной активностью 46 875 ед. на 1 мг белка и выходом 39 %. Очистка в 2 757 раз.

Выделение ДНК-полимеразы β проводили по следующей схеме. Экстракт белка из клеток эмбрионов морского ежа фракционировали сульфатом аммония. Дальнейшая очистка включала хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, фосфоцеллюлозе, гидроксил-апатите. Представленная схема выделения дала возможность очистить ДНК-полимеразу β в 1 040 раз. Удельная активность фермента 2 600 ед./мг, выход 25 %.

Выделенные ДНК-полимеразы катализируют линейное включение dNTP в течение 1 ч и более. Для проявления максимальной активности ферменты требуют наличия в инкубационной смеси всех четырех dNTP, ионов Mg^{2+} или Mn^{2+} . В случае ДНК-полимеразы α оптимальная концентрация Mg^{2+} составляет 20—30 мМ, Mn^{2+} — 1 мМ; для ДНК-полимеразы β — 2 и 1 мМ соответственно. Оптимум величины pH для выделенных ферментов: 8 — для ДНК-полимеразы α и 9,5 — для ДНК-полимеразы β .

В табл. 1 представлены результаты исследования основных физико-химических свойств выделенных ДНК-полимераз. Молекулярная масса ДНК-полимеразы α , определенная относительно белков-маркеров с помощью хроматографии на колонке с биогелем А-1,5 т, составляет 150 000. Молекулярная масса ДНК-полимеразы β , определенная на колонке с сефадексом G-100, равна 40 000. Коэффициент седимен-

Таблица 1

Свойства ДНК-полимераз морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*
 Properties of DNA polymerases from sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*

Свойства	ДНК-полимераза α	ДНК-полимераза β
Молекулярная масса	150 000	40 000
Полипептидный состав	2 субъединицы (65 000— и 70 000)	1 субъединица (40 000)
Коэффициент седиментации	7,3 S	3,2 S
Изоэлектрическая точка, pH	5,6	8,5
Влияние SH-реагентов	Ингибируют	Слабо ингибируют
Экзонуклеазная активность	Нет	Нет
Эндонуклеазная активность	Нет	Нет
Оптimum pH	8,0	9,5
Оптimum Mg^{2+} , mM	20—30	2
Оптimum Mn^{2+} , mM	1	1
Оптimum KCl (NaCl), mM	50	150
Влияние пирофосфата натрия	Ингибирует	Ингибирует

Таблица 2

Матричная специфичность ДНК-полимераз морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*
 Template specificity of DNA polymerases from sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*

Матрица-затравка	Активность ДНК-полимеразы α , %		Активность ДНК-полимеразы β , %	
	10 mM Mg^{2+}	1 mM Mn^{2+}	1 mM Mg^{2+}	1 mM Mn^{2+}
Активированная ДНК	100	21	100	30
Нативная ДНК	20	1	—	—
Денатурированная ДНК	19	19	—	—
ДНК, обработанная <i>S1</i> нуклеазой	1	1	—	—
ДНК, обработанная микрококковой нуклеазой	1	1	1	1
ДНК фага T7	1	1	—	—
Кольцевая одноцепочечная ДНК фага ϕ X174	1	1	1	1
Кольцевая двухцепочечная ДНК фага ϕ X174	1	1	1	1
Поли(dA) · (dT) ₁₀	31	144	320	220
Поли(dAT) · поли(dAT)	14	15	—	—
Поли(dA, dT)	1	6	—	—
Поли(dA) · поли(dT)	1	10	—	—
Поли(rA) · (dT) ₁₀	1	7	150	200

тации равен 7,3 S для ДНК-полимеразы α и 3,2 S — для ДНК-полимеразы β .

Выделенная из клеток эмбрионов морского ежа ДНК-полимераза α имеет изоэлектрическую точку в кислой области pH. Изоэлектрическая точка ДНК-полимеразы β находится в щелочной области pH и несколько ниже, чем у ДНК-полимеразы β из клеток млекопитающих [11, 12].

Как и в случае других известных эукариотических ДНК-полимераз α и β , сульфгидрильные реагенты действовали на активность выделенных ДНК-полимераз по-разному. Полностью подавляя активность ДНК-полимеразы α , они в значительно меньшей степени влияли на активность ДНК-полимеразы β .

Результаты изучения физико-химических свойств выделенных ферментов соответствуют данным, полученным для ДНК-полимераз из других эукариотических клеток [1].

Важную роль в классификации эукариотических ДНК-полимераз играет способность ферментов использовать в качестве матрицы-затравки различные синтетические полинуклеотиды. Из табл. 2 видно, что ДНК-полимераза α , подобно аналогичным ферментам эукариот [1], проявляет максимальную активность с ДНК, активированной панкреатической ДНКазой. Фермент с низкой эффективностью использует син-

тетические полинуклеотиды в качестве матрицы-затравки в присутствии ионов Mg^{2+} . Замена ионов Mg^{2+} на Mn^{2+} изменяет специфичность ДНК-полимеразы в отношении матрицы-затравки.

Максимальная активность ДНК-полимеразы β проявляется с поли(dA)·олиго(dT) в качестве матрицы-затравки. Кроме того, ДНК-полимераза β морского ежа *S. intermedius*, подобно ДНК-полимеразе γ эукариот, способна копировать поли(гА)·олиго(dT) — матрицу-затрав-

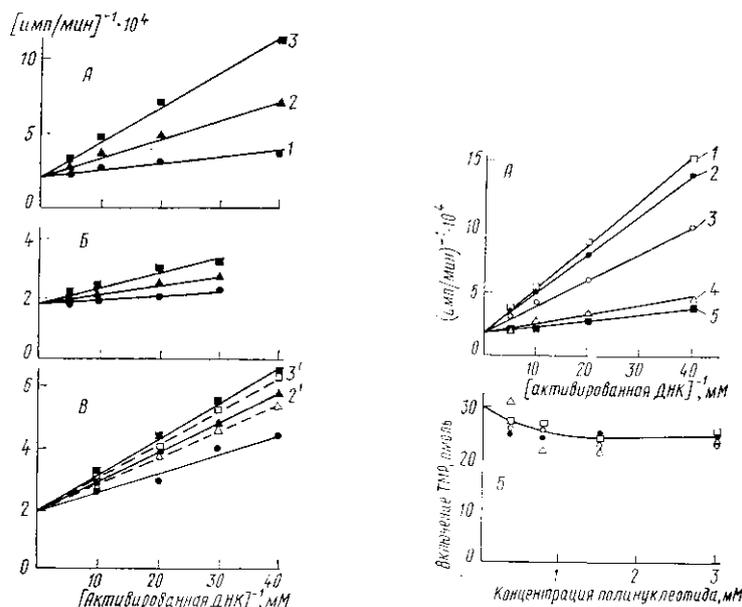


Рис. 3. Влияние одноцепочечной кольцевой ДНК фага $\phi X174$ (А), двухцепочечной линейной ДНК без одноцепочечных пробелов с 3'-ОН-концевыми группами (Б) на активность ДНК-полимеразы α и действие двухцепочечной линейной ДНК без одноцепочечных пробелов с 3'-ОН-концами (3, 2) или с 3'-фосфатными группами (3', 2') на активность ДНК-полимеразы β (В): 1—0; 2—75; 3—150 мкМ ингибиторной ДНК.

Fig. 3. Effect of single-stranded circular $\phi X174$ DNA (A), linear duplex DNA terminated with 3'-OH groups (B) on the DNA polymerase α activity. Effect of linear duplex DNA terminated with 3'-OH (3, 2) or 3'-phosphate (3', 2') groups of the DNA polymerase β activity (B): 1—0; 2—75; 3—150 μM of the inhibitor DNA.

Рис. 4. Влияние синтетических одноцепочечных полинуклеотидов (75 мкМ) на активность ДНК-полимераз α (А) и β (Б), определяемую с активированной ДНК (75 мкМ): 1 — поли(dG); 2 — поли(dT); 3 — поли(dC); 4 — поли(dA); 5 — активированная ДНК.

Fig. 4. Effect of synthetic homopolymers (75 μM) on the reaction of DNA polymerase α (A) and β (B) on activated DNA (75 μM): 1 — poly(dG); 2 — poly(dT); 3 — poly(dC); 4 — poly(dA); 5 — activated DNA.

ку. Эффективное использование ДНК-полимеразой β из эмбрионов морского ежа *Hemicentrotus pulcherrimus* в качестве матрицы-затравки поли(гА)·олиго(dT) отмечено в работе [5].

Результаты исследования физико-химических свойств и матричной специфичности ДНК-полимераз морского ежа *S. intermedius* подтвердили выдвинутое ранее предположение о принадлежности этих ферментов к классу ДНК-полимераз α и β в соответствии с общепринятой классификацией.

Поскольку оптимальной матрицей-затравкой в случае обоих ферментов является ДНК с одноцепочечными пробелами, ограниченными с одной стороны 3'-гидроксилем, а с другой — 5'-фосфатом, то можно предположить, что взаимодействие ДНК-полимераз с матрицей может включать узнавание некоторых комбинаций из одноцепочечного, двухцепочечного участков ДНК и затравочной 3'-гидроксильной группы. Для того чтобы выяснить, с какими участками матрицы-затравки взаимодействуют ДНК-полимеразы, было исследовано влияние различных форм ДНК, не поддерживающих синтез, на полимеризацию активированной ДНК.

Отсутствие заметного ингибирования активности ДНК-полимераз морского ежа двухцепочечными кольцевыми молекулами ДНК фага $\phi X174$ свидетельствует о том, что двухцепочечные участки матрицы не вовлечены в процесс взаимодействия ДНК-полимераз с матрицей-затравкой (рис. 2). Подобное отношение к двухцепочечным участкам матрицы-затравки характерно для ДНК-полимеразы I *E. coli* [13] и ДНК-полимераз α и β из клеток карциномы человека [14].

Добавление в инкубационную среду одноцепочечной кольцевой ДНК фага $\phi X174$ сопровождается конкурентным ингибированием активности ДНК-полимеразы α (рис. 3, А) и не влияет на активность ДНК-полимеразы β (рис. 2). Можно предположить, что существенным моментом в реакции полимеризации, катализируемой ДНК-полимеразой α , является связывание фермента с одноцепочечным участком ДНК-матрицы.

Линейная двухцепочечная ДНК без одноцепочечных пробелов, содержащая 3'-ОН-концевые группы, ингибирует активность ДНК-полимераз α и β (рис. 2, 3). Аналогичная матрица, содержащая 3'-фосфатные концы, ингибирует активность только ДНК-полимеразы β (рис. 2, 3, В). Не исключено, что способность ДНК-полимеразы β взаимодействовать только с 3'-концевой группой (гидроксильной или фосфатной) одной из цепей ДНК является природным свойством фермента и обусловлена функциональной ролью ДНК-полимеразы. Это предположение в определенной степени подтверждается экспериментами по влиянию одноцепочечных синтетических полинуклеотидов на активность ДНК-полимеразы β морского ежа. Как видно из рис. 4, Б, добавление в инкубационную смесь с ДНК-полимеразой β одноцепочечных синтетических дезоксирибополимеров практически не влияет на активность выделенного фермента.

Показано [14], что ДНК-полимераза α клеток *KB* предпочитательно взаимодействует с полинуклеотидными матрицами определенного состава. Причем эффективность взаимодействия фермента с одноцепочечным участком матрицы изменяется в ряду: поли(dT) \geq поли(dG) $>$ поли(dC) $>$ поли(dA). Добавление в инкубационную систему с ДНК-полимеразой α морского ежа синтетических одноцепочечных гомополимеров ингибировало активность фермента в следующем порядке: поли(dG) $>$ поли(dT) $>$ поли(dC) $>$ поли(dA) (рис. 4, А).

Информации о характере копирования ДНК ДНК-полимеразами в настоящее время явно недостаточно. Дас и Фуджимура [15] показали, что большинство ДНК-полимераз прокариот и эукариот включают в период между связыванием с матрицей и диссоциацией из нее более одного нуклеотида, т. е. являются процессивными ферментами. Для того, чтобы определить значение процессивности ДНК-полимераз из эмбрионов морского ежа, мы использовали кинетический метод, предложенный Бамбара и соавт. [16]. Величину процессивности определяли на активированной ДНК, сравнивая скорости реакций полимеризации в присутствии полного и ограниченного наборов дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. ДНК-полимераза α морского ежа является умеренно процессивным ферментом и катализирует включение ~ 10 нуклеотидов за цикл полимеризации. ДНК-полимераза β — дистрибутивный фермент, диссоциирующий из матрицы после каждого включенного нуклеотида. Аналогичные результаты были получены для ДНК-полимераз α [17] и β [16] клеток *KB*.

Несмотря на то, что обе ДНК-полимеразы из эмбрионов морского ежа осуществляют процесс полимеризации с активированной ДНК в качестве матрицы-затравки, эффективность использования одноцепочечных пробелов в ДНК у них различна. Так, ДНК-полимераза α не копирует бреши размером менее 15 нуклеотидов. С увеличением длины одноцепочечного пробела проявляется ограниченная способность заполнять брешь в цепи ДНК. При этом величина застраиваемого пробела составляет 70—80 % общей длины матрицы, определенной с помощью ДНК-полимеразы фага *T4*. Неспособность фермента заполнять одноце-

почечный пробел до конца обусловлена, вероятно, очень высокой чувствительностью ДНК-полимеразы α к особенностям вторичной структуры матрицы-затравки. Ограниченный характер заполнения одноцепочечного пробела в ДНК ДНК-полимеразой α из клеток *KB* отмечали в работе [17]. ДНК-полимераза β морского ежа полностью застраивает брешь в цепи ДНК.

Сравнительный анализ свойств ДНК-полимераз α и β из клеток эмбрионов морского ежа дает основание предположить, что существование различий в механизме полимеризации, осуществляемой этими ферментами, вероятно, связано с различной функциональной ролью выделенных ДНК-полимераз.

COMPARATIVE STUDY OF DNA POLYMERASES α AND β FROM SEA URCHIN EMBRYOS

L. L. Terentiev, N. A. Terentieva, V. A. Rasskazov

Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Research Centre,
Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok

Summary

Two DNA polymerases were isolated from embryonic cells of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. In terms of physicochemical properties and primer-template specificity these enzymes are classified as DNA polymerases α and β . DNA polymerase α can interact both with single strand and 3'-hydroxyl termini in gapped DNA. The interaction of DNA polymerase α with single-stranded sites depends on the template base composition. DNA polymerase β recognizes only 3' primer termini (hydroxyl or phosphoryl). DNA polymerase α realizes DNA synthesis via a moderately processive mechanism and is unable to fill gaps in the DNA chain to completion. In contrast, DNA polymerase β is a distributive enzyme and fills gaps in the DNA chain completely.

1. Weissbach A. Eukaryotic DNA polymerases.—Ann. Rev. Biochem., 1977, 46, p. 25—47.
2. Separation and partial characterization of DNA polymerases in sea urchin *Paracentrotus lividus* eggs / B. De Petrocellis, E. Parisi, S. Filosa, A. Capasso.—Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1976, 68, N 4, p. 954—960.
3. Racine F. M., Morris P. W. DNA polymerase α and β in the *California* urchin.—Nucl. Acids Res., 1978, 5, N 10, p. 3945—3957.
4. Loeb L. A. Purification and properties of deoxyribonucleic acid polymerase from nuclei of sea urchin embryos.—J. Biol. Chem., 1969, 244, N 7, p. 1672—1681.
5. Suzuki-Hori C., Nagano H., Mano Y. DNA polymerase β from the nuclear fraction of sea urchin embryos: characterization of the purified enzyme.—J. Biochem., 1977, 82, N 6, p. 1613—1621.
6. Hobart P. M., Infante A. A. A low molecular weight DNA polymerase in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. Partial purification properties, and changing in development.—J. Biol. Chem., 1978, 253, N 17, p. 8229—8238.
7. Терентьев Л. Л., Терентьева Н. А., Рассказов В. А. ДНК-полимераза из эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Очистка и некоторые свойства.—Биохимия, 1980, 45, № 9, с. 1603—1608.
8. Терентьев Л. Л., Терентьева Н. А., Рассказов В. А. Процессивность и некоторые свойства ДНК-полимеразы α из эмбрионов морского ежа.—Там же, 1983, 48, № 2, с. 224—229.
9. Терентьев Л. Л., Терентьева Н. А., Рассказов В. А. Выделение и некоторые свойства ДНК-полимеразы β из эмбрионов морского ежа *S. intermedius*.—Там же, 1984, 49, № 7, с. 1103—1109.
10. Терентьев Л. Л., Терентьева Н. А., Рассказов В. А. Сравнительные исследования ДНК-полимераз α и β из эмбрионов морского ежа.—В кн.: Структура и функции клеточного ядра: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. Пушино, 1984, с. 278—279.
11. Wang T. S.-F., Sedwick W. D., Korn D. Nuclear deoxyribonucleic acid polymerase.—J. Biol. Chem., 1975, 250, N 14, p. 7040—7044.
12. Boitum F. J. Mammalian DNA polymerases.—Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol., 1975, 15, p. 109—144.
13. Kornberg A. DNA replication / Ed. W. H. Freeman.—San Francisco: Stanford Univ., 1980.—380 p.
14. Korn D., Fisher P. A., Wang T. S.-F. Mechanisms of catalysis of human DNA polymerases α and β .—Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol., 1981, 26, p. 63—81.
15. Das S. K., Fujimura R. K. Processiveness of DNA polymerases. A comparative study using a simple procedure.—J. Biol. Chem., 1979, 254, N 4, p. 1227—1232.

16. Bambara R. A., Uyemura D., Choi T. On the processive mechanism of *E. coli* DNA polymerase I. Quantitative assessment of processivity. — *Ibid.*, 1978, 253, N 1, p. 413—423.
17. Fisher P. A., Wang T. S.-F., Korn D. Enzymological characterization of DNA polymerase α : Basic catalytic properties, processivity, and gap utilization of the homogeneous enzyme from human KB cells. — *Ibid.*, 1979, 254, N 12, p. 6128—6137.

Тихоокеан. ин-т биоорг. химии
ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Получено 22.01.85

УДК 547.963.32.057:577.152.277.145

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА I *E. COLI*: ЗАВИСИМАЯ ОТ ПРАЙМЕР-МАТРИЧНОГО КОМПЛЕКСА ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТА ИМИДАЗОЛИДАМИ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИД-5'-ТРИФОСФАТОВ

Г. А. Невинский, С. В. Доронин, О. И. Лаврик

Метод аффинной модификации, как отмечается в монографии [1], лишь начинают применять к ДНК-полимеразам (КФ 2.7.7.7). Можно перечислить несколько работ, в которых достигнуто ковалентное присоединение к полимеразам dNTP прямой фотосшивкой нуклеотидов с ферментами [2, 3] или при использовании аналогов dNTP, содержащих дополнительные алкилирующие группы, присоединенные по γ -фосфату нуклеотидов [4—6]. Эпоксипроизводное АТФ [7] и окисленный по рибозе периодатом натрия 6-метил-тиопуририбозид [8] также инактивируют ДНК-полимеразу I.

Материалы и методы. В работе использовали препараты ДНК-полимеразы I из *E. coli* MRE-600 производства НИС НГУ и ИЦиГ СО АН СССР (Новосибирск) с удельной активностью $3 \cdot 10^3$ ед. акт./мг [2]. Препараты фермента были свободными от примесных экзо- и эндонуклеаз и содержали по данным электрофореза в полиакриламидном геле не более 3—5 % примесных белков [2].

В работе использовали HEPES («Ferah», ФРГ), бычий сывороточный альбумин (БСА) («Koch-Light Laboratories», Англия), поли(dA)-, поли(dT)-, поли(dC)-, поли(dG)-, поли(rA)-натриевые соли, dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP-натриевые соли (НИКТИ БАВ, г. Бердск), [^3H]dTTP с удельной активностью 836 ТБк/моль и [^3H]dATP — 900 ТБк/моль («Изотоп», СССР), остальные реактивы квалификации х. ч. и ос. ч.

ТСХ в препаративном варианте проводили на пластинках Kieselgel F₆₀ 254 («Merck», ФРГ) в системе диоксан — вода — концентрированный аммиак (6:3:1), в аналитическом — на пластинках Silufol UV-254 («Kavalier», ЧССР) в системе диоксан — вода — аммиак (6:4:1).

Синтез им-dNTP проводили, согласно [10], с некоторыми модификациями. Очистку продуктов проводили с помощью ТСХ в указанных системах. Концентрацию им-dNTP определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярного поглощения для нуклеотидов, приведенные в работе [12]. Для доказательства структуры продуктов проводили их кислый гидролиз в 0,1 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 4,0. Продукты гидролиза идентифицировали с помощью ТСХ и микроколоночной хроматографии на ионообменной смоле АС11300 производства НИС НГУ в градиенте концентраций KH_2PO_4 (pH 7,0), 7 М мочевины. Поглощение элюата регистрировали с помощью микроспектрофотометра «Миллихром» отечественного производства. Величины R_f для им-dATP, dCTP, dGTP и dTTP были равными 0,5; 0,41; 0,43; 0,45 соответственно. Препараты им-dNTP использовали сразу после очистки с помощью ТСХ. В этом случае они содержали не более 1—3 % примеси dNTP.

Принятые сокращения: им-dNTP — γ -имидазOLID dNTP; HEPES — 2-N-гидрокси-этилпиперазин-N'-2-этансульфокислота.