

12. *Shwarz* bioreserch radiochemical catalog.— New York, 1971.—120 p.
13. *Enzymatic* synthesis of deoxyribonucleic acid. Binding of triphosphates to deoxyribonucleic acid polymerase / P. T. England, J. L. Huberman, T. M. Jovin, A. Kornberg.— J. Biol. Chem., 1969, **244**, N 11, p. 3038—3044.
14. *Bryant F. R., Johnson K. A., Benkovic S. J.* Elementary steps in the DNA polymerase I reaction pathway.— Biochemistry, 1983, **22**, N 15, p. 3537—3546.
15. *Kitz R., Wilson I. B.* Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase.— J. Biol. Chem., 1962, **237**, N 10, p. 3245—3249.
16. *Abbots J., Loeb L. A.* On the fidelity of DNA replication.— *Ibid.*, 1984, **259**, N 11, p. 6712—6714.

Ин-т биоорганической химии СО АН СССР,
Новосибирск

Получено 22.01.85

УДК 591.150:575.24+577.155.2

КОРРЕКЦИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗНЫХ ОШИБОК И 3'→5'-ЭКЗОНУКЛЕАЗЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

**Н. В. Белякова, Н. Е. Клейнер, Т. П. Кравецкая,
О. К. Легина, Н. А. Тимченко, В. М. Крутяков**

Введение. Очищенные ДНК-полимеразы эукариот ошибаются (т. е. присоединяют некомплементарные нуклеотиды) с вероятностью приблизительно 10^{-4} [1]. Высокая ошибочность (10^{-3}) ДНК-полимеразы β в составе хроматина [2] не позволяет рассчитывать на резкое повышение надежности синтеза ДНК *in situ*, хотя известны случаи существенного снижения ошибочности ДНК-полимераз в комплексах со вспомогательными белками [1]. Вероятность спонтанного мутагенеза в пересчете на реплицированный нуклеотид составляет 10^{-9} — 10^{-11} [3]. Учет вырожденности генетического кода, устойчивости ферментативной функции к аминокислотным заменам и большей вероятности температурочувствительных мутаций позволяет уменьшить это огромное расхождение лишь в 40 раз [4]. Следовательно, клетки исправляют подавляющую часть ДНК-полимеразных ошибок. Одним из механизмов коррекции является наличие в молекуле ДНК-полимеразы «редакторской» 3'→5'-экзонуклеазной активности, преимущественно удаляющей неспаренные нуклеотиды из ДНК-затравки. Эта активность, присущая ДНК-полимеразам прокариот, отсутствует у ДНК-полимераз α , β , γ млекопитающих [1]. Кроме обычной ДНК-полимеразы α , из костного мозга кролика и тимуса теленка была выделена ДНК-полимераза δ , проявляющая 3'→5'-экзонуклеазную активность [5, 6], и аналогичный фермент был обнаружен в миеломе мыши [7]. Лишь в одном из перечисленных случаев [5] проделаны эксперименты, позволяющие оценить роль экзонуклеазной активности в коррекции превращения дНТФ в дНМФ в присутствии синтетической матрицы, к которой ДНК-полимераза присоединяет комплементарный или некомплементарный нуклеотиды. Оказалось, что ДНК-полимераза δ выщепляет из ДНК-затравки правильный нуклеотид с той же скоростью или даже в несколько раз быстрее, чем неправильный [5]. Наоборот, классические корректазы — ДНК-полимераза I и полимеразы фага T4 — в аналогичном тесте выщепляют некомплементарные нуклеотиды в 10—100 раз быстрее, чем комплементарные [8, 9]. Таким образом, ДНК-полимераза δ не проявляет коррекционной специфичности, т. е. не способна осуществлять эффективную коррекцию ошибок репликации. Это становится особенно ясным, если учесть, что ДНК-полимеразы эукариот довольно эффективно используют затравку с некомплементарным нуклеотидом на 3'-конце: ДНК-полимераза α при этом работает лишь в 20 раз медленнее [10], а ревертаза даже не снижает скорости катализа [11].

Высказывалось предположение, что экзонуклеазная коррекция у млекопитающих может осуществляться нуклеазой, не связанной кова-

лентно с ДНК-полимеразой, но входящей в состав репликативного комплекса [12].

В настоящей работе описаны выделение, основные свойства и кор-рекция специфичность 3'→5'-эксонуклеаз покоящейся и регенерирующей печени крысы. Ранее были опубликованы предварительные сообщения [13, 14].

Материалы и методы. Для получения регенерирующей печени у самцов белых крыс удаляли 2/3 печени по [15], через 40 ч после операции животных забивали эфирным наркозом. Субклеточные препараты получали по [16]. ДНК-полимеразу бактериофага T4 выделяли по [17]; ДНК-полимеразу I выделяли из *Escherichia coli* B по [18]; ДНК-полимеразы α и β — из печени крысы по [19]; концевую дезоксирибонуклеотидилтрансферазу — из тимуса теленка по [20]. Использовали ДНКазу I («Worthington», США); полинуклеотидкиназу фага T4 (НИКТИ БАВ, Новосибирск) и щелочную фосфатазу из *E. coli*, предоставленную Ю. В. Ивановым; ДНК из молок лосося (НИКТИ БАВ); ^3H -дНТФ и АТФ- γ - ^{32}P (ВО «Изотоп», Ленингр. отд.). Использовали ионообменные целлюлозы («Serva», ФРГ); сефадексы и сефакрил («Pharmacia», Швеция); поли[д(А-Т)] («P1 Biochemicals», США).

ДНК-субстраты для 3'→5'-эксонуклеаз готовили следующим образом. ДНК, активированную ДНКазой I, метили по 3'-ОН-концам в присутствии ^3H -дНТФ и ДНК-полимеразы I. Затем ДНК дважды экстрагировали хлороформом, очищали от ^3H -дНТФ на колонке с сефадексом G-50 в 0,05 М буферном растворе трис-НСI, рН 8,0, 0,1 М NaCl. На 1 мкг ДНК приходилось 50 000 расп./мин. Поли[д(А-Т)] метили по 3'-ОН-концам в присутствии ^3H -ТТФ или ^3H -дАТФ (односубстратный синтез), Mg^{2+} и ДНК-полимеразы β , выделенной из хроматина печени крысы. Некомплементарный нуклеотид (^3H -дГТФ или ^3H -дЦТФ) присоединяли тем же ферментом в присутствии Mn^{2+} или концевой трансферазой в присутствии Co^{2+} . Синтетическую матрицу очищали от ферментов и не включившихся ^3H -дНТФ так же, как и природную ДНК. На 1 мкг матрицы приходилось от 1000 до 30 000 расп./мин, т. е. радиоактивный 3'-концевой нуклеотид имел от 0,1 до 3 % молекул поли[д(А-Т)].

Для измерения активности 5'→3'-эксонуклеаз удаляли фосфат с 5'-концов, обрабатывая активированную ДНК щелочной фосфатазой, которую затем удаляли хлороформной экстракцией. 5'-ОН-концы ДНК фосфорилировали полинуклеотидкиназой в присутствии АТФ- γ - ^{32}P и Mg^{2+} . От фермента и избытка АТФ очищали ДНК, как указано выше.

Активность 3'→5'-эксонуклеаз. В качестве субстрата использовали активированную ДНК или поли[д(А-Т)], меченные по 3'-ОН-концам. Скорость выщепления 3'-концевых нуклеотидов измеряли двумя способами.

1. После остановки реакции к 0,2 мл пробы добавляли 4 мл 5 %-ной холодной ТХУ и БСА до концентрации 0,5 мг/мл. После центрифугирования (30 мин, 6000 *g*) радиоактивность супернатанта измеряли в диоксановом сцинтилляторе.

2. Материал пробы анализировали с помощью хроматографии [21], измеряя радиоактивность пятна, содержащего дНМФ.

За 1 ед. активности принимали количество фермента, выщепляющего 1 пмоль ^3H -дНМФ с 3'-концов ДНК за 1 ч инкубации в среде: 50 мМ буфер трис-НСI, рН 7,0, 10 мМ MgCl_2 , 5 мМ 2-меркаптоэтанол (МЭ), 10 мкг/мл ДНК; или переводящего 10 % ^3H -ДНК в кислоторастворимую фракцию при тех же условиях (эта ед. в 2,5 раза меньше предыдущей).

Активность 5'→3'-эксонуклеаз. В качестве субстрата использовали активированную ДНК, меченную по 5'- ^{32}P О₄-концам. Скорость выщепления 5'-концевых нуклеотидов и единицу ферментативной активности определяли по способу 1, указанному выше, ставя контроль на отсутствие нуклеотид-фосфатазной активности. С целью сопоставления обеих эксонуклеазных активностей использовали ДНК, меченную двойной меткой: по 3'-концам ^3H -дНМФ и по 5'-концам ^{32}P О₄.

Результаты и обсуждение. Очистка 3'→5'-эксонуклеазы I из клеточных ядер и хроматина покоящейся печени крысы. Стадии очистки эксонуклеазы представлены в таблице. Удельная активность негистоновых белков хроматина (НГБ) выше в 4 раза, чем удельная активность гомогената. Однако в НГБ обнаружи-

ваются лишь 6 % общей клеточной активности 3'→5'-экзонуклеазы, в очищенных от наружной ядерной мембраны ядрах — 15 %. Правда, это минимальная оценка, поскольку эндонуклеазы цитозоля также выщепляют нуклеотиды, расположенные на 3'-конце ДНК.

Основные свойства 3'→5'-экзонуклеазы I. В качестве субстрата использовали ДНК, к 3'-ОН-концам которой присоединен ³H-ТМФ в процессе односубстратного ДНК-полимеразного синтеза. 3'→5'-экзонуклеазный характер действия фермента доказывается тем, что переход ³H-ТМФ с 3'-конца ДНК-субстрата в кислоторастворимую

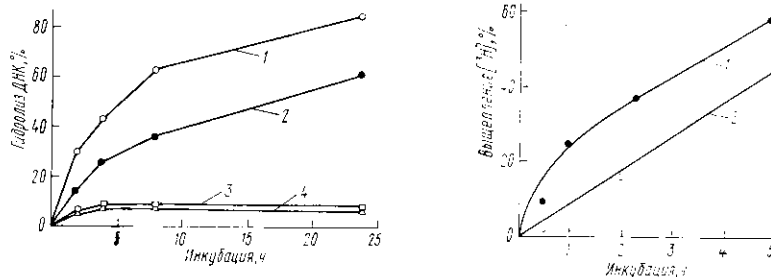


Рис. 1. Кинетика действия экзонуклеазы I на немеченую ДНК и ДНК, меченную с 3'-ОН-конца: 1, 2 — отщепление радиоактивного нуклеотида с 3'-ОН-конца денатурированной и нативной ДНК соответственно; 3, 4 — расщепление немеченой ДНК до кислоторастворимых продуктов (денатурированной и нативной ДНК соответственно).
Fig. 1. Kinetics of exonuclease I action on non-labelled DNA and on DNA labelled from 3'-OH-end: 1, 2 — splitting of a radioactive nucleotide from 3'-OH-end of denatured and native DNA, respectively; 3, 4 — destruction of non-labelled DNA down to acid-insoluble products (denatured and native DNA, respectively).

Рис. 2. Кинетика выщепления комплементарного и некомплементарного 3'-концевого ³H-нуклеотида из поли[д(А-Т)] под действием 3'→5'-экзонуклеазы I: 1 — гидролиз поли[д(А-Т)]-3'-³H-дГМФ; 2 — гидролиз поли[д(А-Т)]-3'-³H-дТМФ.
Fig. 2. Kinetics of splitting of matched and mismatched 3'-end ³H-nucleotide from poly[d(A-T)] as a result of the 3'→5'-exonuclease I action. 1 — hydrolysis of poly[d(A-T)]-3'-³H-dGMP; 2 — hydrolysis of poly[d(A-T)]-3'-³H-dTMP.

фракцию происходит в несколько раз быстрее по сравнению с возрастанием оптической плотности при A₂₆₀ в этой фракции (рис. 1). Единственным продуктом гидролиза является дНМФ, что доказывается хроматографией ферментативного гидролизата на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Оптимальная активность наблюдается в буфере трис-НСl при рН 7,0 в присутствии 100 мМ КCl, 10 мМ Mg²⁺; Mn²⁺ в 10 раз менее эффективен как активатор, чем Mg²⁺; Ca²⁺ и Co²⁺ почти не эффективны; Zn²⁺ подавляет активность. Очищенный фермент полностью неактивен в присутствии 1 мМ N-этилмаленимида, 5 мМ ТМФ или 5 мМ АТФ, активность снижается вдвое в присутствии 25 мМ кофеина. Прогрев экзонуклеазы в течение 10 мин при 45 °С снижает активность в 2 раза, при 55 °С — в 5 раз.

Коррекционные свойства 3'→5'-экзонуклеазы I. В качестве эталонной корректазы и инструмента контроля за получением поли[д(А-Т)] с правильным и неправильным 3'-концевым нуклеотидом использовали ДНК-полимеразу фага T4. Экзонуклеаза I катализи-

*Выделение 3'→5'-экзонуклеазы I из ядер клеток покоящейся печени крысы
Isolation of 3'→5'-exonuclease I from cell nuclei of quiescent rat liver*

Стадия очистки	Объем фракции, мл	Белок, мг/мл	Общий белок, мг	Удельная активность, ед./мг	Общая активность, ед.	Выход, %
I. Гомогенат	1 500	65	97 500	4,8	468 000	100
II. НГБ	500	3	1 500	48	72 000	15
III. ДЭАЭ-целлюлоза	450	0,6	270	233	63 000	13
IV. Сефадекс G-150	195	0,2	39	170	6 630	1,4
V. Фосфоцеллюлоза	50	0,01	0,5	2500	1 250	0,3

рует гидролиз денатурированной ДНК в среднем лишь в 1,5 раза эффективнее, чем нативной ДНК. Эксонуклеаза I приблизительно вдвое быстрее выщепляет некомплемментарный нуклеотид по сравнению с правильно спаренным (рис. 2), т. е. не проявляет отчетливой способности к коррекции ошибок репликации. Добавление к эксонуклеазе I ДНК-полимераз α и β из печени крысы не увеличило коррекционной специфичности 3'→5'-эксонуклеазы I.

3'→5'-эксонуклеаза II, преимущественно удаляющая неспаренные нуклеотиды из ДНК-затравки. Стадии выделения фермента из 40 г регенерирующей печени крысы описаны ранее [13]. Судя по данным гель-фильтрации, эксонуклеаза II имеет

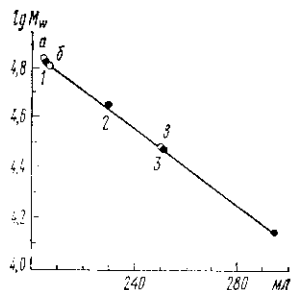


Рис. 3. Гель-фильтрация на колонке с сефакилом S-200. Объем колонки 400 мл. 50 мМ буфер трис-НСl, рН 8,0, 0,3 М NaCl, 10 %-ный глицерин. 1 — БСА; 2 — овальбумин; 3 — ДНКазы I; 4 — РНКазы; а — эксонуклеаза II; б — эксонуклеаза I; в — эксонуклеаза III.

Fig. 3. Gel-filtration on the column with Sephacryl S-200. Bed volume is 400 ml. 50 mM tris-HCl buffer, pH 8,0, 0,3 M NaCl, 10 % glycerol. 1 — BSA; 2 — ovalbumin; 3 — DNAase I, 4 — RNAase; a — exonuclease II, б — exonuclease I, в — exonuclease III.

молекулярную массу 70 000 (рис. 3). Активность максимальна при рН 7,0, требуется присутствие Mg^{2+} , оптимальной является концентрация $MgCl_2$ 2 мМ. NaCl и KCl ингибируют активность. Хроматография ферментативного гидролизата на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой показывает, что единственным фосфорилированным продуктом гидролиза является дНМФ. При 50 %-ном выщеплении 3H -дНМФ с 3'-ОН-конца ДНК еще не наблюдается выщепления дНМФ- ^{32}P с 5'-конца ДНК-субстрата. Фермент также не проявляет ДНК-полимеразной активности.

Фермент в 10 раз быстрее выщепляет некомплемментарные нуклеотиды по сравнению с правильно спаренными (рис. 4) и в 5—7 раз быстрее расщепляет однонитевую ДНК, чем биспиральную (рис. 5), т. е. проявляет явно выраженную коррекционную специфичность. По нашим измерениям в тех же условиях рекордная корректаза — ДНК-полимераза фага T4 — в 30 раз быстрее выщепляет некомплемментарные нуклеотиды, чем правильно спаренные, и в 20 раз активнее расщепляет однонитевую ДНК, чем двунитевую, что хорошо согласуется с литературными данными.

Аналогичное выделение фермента из покоящейся печени обнаруживает в 5—10 раз меньшую энзиматическую активность, лишенную коррекционной специфичности. Этот факт, по-видимому, указывает на участие эксонуклеазы II в репликации.

Выделение и основные свойства 3'→5'-эксонуклеазы III. 200 мл фракции V ([13], таблица) собрали и нанесли на колонку с КМ-сефадексом G-25 (объем колонки 100 мл), уравновешенную 30 мМ калий-фосфатным буфером, рН 6,0, 6 мМ 2-МЭ, 10 %-ный глицерин. Затем колонку промыли 200 мл этого же раствора: на выходе из колонки обнаружили эксонуклеазу III, не собирающуюся на КМ-сефадексе в указанных условиях. 17 мл препарата (0,4 мг/мл по белку), не сорбирующегося на КМ-сефадексе G-25 при рН 6,0 наносили на колонку с сефакилом S-200 (объем колонки 400 мл), уравновешенную и элюируемую 50 мМ буфером трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ 2-МЭ, 10 %-ный глицерин. Ферментативно активная фракция (231—312 мл элюата) была собрана и диализована в течение ночи против 30 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7, 3, 6 мМ 2-МЭ. Затем препарат наносили на колонку с ДЭАЭ-сефадексом А-25, уравновешенную этим же раствором. Фермент элюировали линейным градиентом концентраций 0—0,5 М KCl (100×100 мл). Эксонуклеаза II обнаружена в зоне 0,1 М KCl. Очистка

фермента по удельной активности приблизительно в 200 раз выше по сравнению с активностью гомогената.

Фермент в 2,5 раза быстрее расщепляет нативную ДНК, чем денатурированную. Таким образом, экзонуклеаза III нельзя считать потенциальной корректазой. Фермент не проявляет $5' \rightarrow 3'$ -экзонуклеазной и эндонуклеазной активностей. Активность максимальна при 7,0—8,0 и 6 мМ $MgCl_2$. Молекулярная масса экзонуклеазы III равна 30 000 (рис. 3).

По преимущественному гидролизу одно- или двунитевой ДНК мы относим $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазу II к К. Ф. 3.1.4.26 и $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазы I и III — к 3.1.4.27.

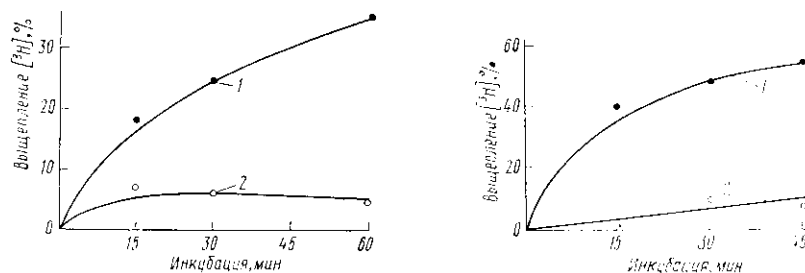


Рис. 4. Катализируемый экзонуклеазой II гидролиз поли[д(А-Т)], меченной с $3'$ -ОН-конца некомплементарным (1) или комплементарным (2) нуклеотидом: 1 — выщепление 3H -дГМФ; 2 — выщепление 3H -дТМФ.

Fig. 4. Exonuclease II hydrolysis of poly[d(A-T)] labelled from $3'$ -OH-end by mismatched (1) or matched (2) nucleotide. 1 — splitting of 3H -dGMP, 2 — splitting of 3H -dTMP.

Рис. 5. Катализируемый экзонуклеазой II гидролиз денатурированной (1) и нативной (2) ДНК.

Fig. 5. Exonuclease II hydrolysis of denatured (1) and native (2) DNA.

Выделение экзонуклеаз из цитозоля, хроматина, наружной ядерной мембраны или нуклеоплазмы указывает на преимущественную локализацию экзонуклеаз II и III в двух последних субклеточных фракциях, тогда как экзонуклеаза I присутствует во всех перечисленных фракциях.

Итак, из трех выделенных $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеаз только экзонуклеаза II обладает явно выраженной способностью к коррекции ошибок репликации. Эффективность коррекции зависит от соотношения $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной и ДНК-полимеразной активностей репликативного комплекса. По нашим предварительным данным, комплекс ДНК-полимеразы α со вспомогательными белками (молекулярная масса 500 000) из регенерирующей печени крысы обладает $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью, приблизительно равной ДНК-полимеразной активности. Недавно высокая $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазная активность обнаружена и в репликативном комплексе из тимуса теленка [24].

CORRECTION OF DNA POLYMERASE MISTAKES AND $3' \rightarrow 5'$ -EXONUCLEASES OF THE RAT LIVER

N. V. Belyakova, N. E. Kleiner, T. P. Kravetskaya,
O. K. Legina, N. A. Timchenko, V. M. Krutyakov

B. P. Konstantinov Institute of Nuclear Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Leningrad, Gatchina

Summary

One of the levels of correcting the DNA polymerase mistakes is the $3' \rightarrow 5'$ -exonuclease «proofreading» activity being absent or non-effective for mammalian DNA polymerases. Cells are supposed to contain correcting $3' \rightarrow 5'$ -exonuclease non-bound covalently with DNA polymerases. Three $3' \rightarrow 5'$ -exonucleases are isolated from the rat liver. To study

their correcting ability both correct and incorrect [³H] dNMPs are attached to 3'-ends of poly[d(A-T)] by means of DNA polymerase β or terminal transferase. The quality of templates obtained is checked by the measurement of correction specificity of the phage T4 DNA polymerase. 3'→5'-exonuclease, mainly able of removing non-complementary nucleotides from the DNA primer is established to arise under the liver regeneration.

1. Loeb L. A., Kunkel T. A. Fidelity of DNA synthesis.— *Ann. Rev. Biochem.*, 1982, 52, p. 429—457.
2. On the fidelity of DNA synthesis directed by chromatin-associated DNA polymerase β / M. Fry, C. W. Sherman, G. M. Martin, L. A. Loeb.— *Biochemistry*, 1980, 19, N 25, p. 5939—5946.
3. Drake J. W. Comparative rates of spontaneous mutation.— *Nature*, 1969, 221, N 5186, p. 1132—1133.
4. Крутяков В. М. Надежность синтеза ДНК в связи с проблемами мутагенеза, канцерогенеза и клеточного старения.— В кн.: Повреждение и репарация ДНК. Пушкино, 1980, с. 95—107.
5. A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity, DNA polymerase δ / J. J. Byrne, K. M. Downey, V. L. Black, A. G. So.— *Biochemistry*, 1976, 15, N 13, p. 2817—2832.
6. Purification of DNA polymerase δ from calf thymus. Partial characterization and physical properties / M. Y. W. Lee, C.-K. Tan, A. G. So, K. M. Downey.— *Ibid.*, 1980, 19, N 10, p. 2096—2101.
7. Mouse DNA polymerase α. Subunit structure and identification of a species with associated exonuclease / Y.-C. Chen, E. W. Bohn, S. R. Planck, S. H. Wilson.— *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, N 22, p. 11678—11687.
8. On the fidelity of DNA replication: NMP generation during polymerization / L. A. Loeb, D. K. Dube, R. A. Beckman et al.— *Ibid.*, 1981, 256, N 8, p. 3978—3987.
9. Replicational fidelity: mechanisms of mutation avoidance and mutation fixation / M. Radman, G. Villani, S. Boiteux et al.— *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1979, 43, p. 937—946.
10. Reckman B., Grosse F., Krauss G. The elongation of mismatched primers by DNA polymerase α from calf thymus.— *Nucl. Acids Res.*, 1983, 11, N 20, p. 7251—7260.
11. Weiss G. B., Carr B. K. Utilization of mismatched initiator termini by avian myeloblastosis virus DNA polymerase.— *Biochim. et biophys. acta*, 1979, 565, N 2, p. 225—230.
12. Making and correcting errors in DNA synthesis: *in vitro* studies of mutagenesis / S. Boiteux, G. Villani, S. Spadari et al.— In: DNA repair mechanisms. New York: Acad. press, 1978, p. 73—84.
13. Эукариотическая 3'→5'-экзонуклеаза, исправляющая ДНК-полимеразные ошибки / В. М. Крутяков, Н. В. Белякова, Н. Е. Клейнер и др.— *Докл. АН СССР*, 1983, 272, № 6, с. 1491—1494.
14. Mammalian 3'→5'-exonuclease preferentially removing mismatched nucleotides from DNA-primer / V. M. Krutyakov, N. V. Belyakova, N. E. Kleiner et al.— In: Abstracts of 16th FEBS meeting. Moscow, 1984, p. 414.
15. Higgins G. M., Anderson R. M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the white rat following partial surgical removal.— *Arch. Pathol.*, 1931, 12, N 2, p. 186—191.
16. Крутяков В. М., Кравецкая Т. П. Эндогенный синтез ДНК в выделенном хроматине.— *Молекуляр. биология*, 1978, 12, № 3, с. 654—662.
17. Goulian M., Lucas Z. J., Kornberg A. Enzymatic synthesis of DNA. XXV. Purification and properties of DNA polymerase induced by infection with phage T4.— *J. Biol. Chem.*, 1968, 243, N 3, p. 627—638.
18. Jovin T. M., Englund P. T., Bertsch L. L. Enzymatic synthesis of DNA. XXVI. Physical and chemical studies of a homogenous DNA polymerase.— *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, N 11, p. 2996—3008.
19. Нарыжный С. Н., Шевелев И. В., Крутяков В. М. Действие противоопухолевого антибиотика блеомицина на ДНК-полимеразную активность.— *Биохимия*, 1982, 47, № 7, с. 1212—1215.
20. Chang L. M. S., Bollum F. J. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. V. Homogenous deoxynucleotidyl transferase.— *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, N 4, p. 909—916.
21. Белякова Н. В., Нарыжный С. Н., Крутяков В. М. Механизм активирующего действия АТФ на репаративный синтез ДНК в хроматине.— *Молекуляр. биология*, 1980, 14, № 3, с. 586—594.
22. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.— *Nature*, 1970, 227, N 5259, p. 680—685.
23. Adsorption phenomena on Sephacryl S-200 superfine / M. Below, I. Porath, J. Fohlmann, I.-C. Janson.— *J. Chromatogr.*, 1978, 147, N 2, p. 205—212.
24. Ottiger H.-P., Hübscher U. Mammalian DNA polymerase α holoenzyme with possible functions at the leading and lagging strand of the replicative fork.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, N 13, p. 3993—3997.

Ленинград. ин-т ядерной физики им. Б. П. Константинова
АН СССР, Гатчина

Получено 22.01.85