



УДК 577.113.6 : 577.152.274*12'14

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОЗИДМОНОФOSFATКИНАЗЫ БАКТЕРИОФАГА T5 И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ СИНТЕЗА [α - 32 P]d/rNTP

© 2009 г. А. Ю. Скоблов*, Г. В. Микулинская**, С. А. Таран**, А. И. Мирошников*,
С. А. Феофанов**, Ю. С. Скоблов**

*Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

**Филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, Московская обл.

Поступила в редакцию 21.04.2009 г. Принята к печати 05.05.2009 г.

Показано, что дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназа бактериофага T5 (dNMP-киназа T5) способна фосфорилировать как d_2 CMP, так и нуклеотиды рибо-ряда: AMP, GMP, CMP, но не может фосфорилировать UMP. Определены K_m и k_{cat} фермента для природных акцепторов фосфорильной группы. Показана возможность использования dNMP-киназы T5 для синтеза [α - 32 P]rNTP и [α - 32 P]dNTP в качестве универсального фермента, фосфорилирующего меченые r/dNMP.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеозидмонофосфаткиназа бактериофага T5; [α - 32 P]rNTP и [α - 32 P]dNTP, синтез.

ВВЕДЕНИЕ

Во внутриклеточном метаболизме предшественников биосинтеза нуклеиновых кислот ключевую роль играет процесс фосфорилирования 5'-нуклеотидов до соответствующих нуклеозид-5'-дифосфатов, который катализируется специфическими ферментами, получившими название нуклеозидмонофосфаткиназы (АТР: нуклеозид-5'-монофосфатфосфотрансферазы) (NMP-киназы). За 50 лет интенсивного изучения накоплена информация о свойствах этих ферментов, механизме их действия и возможностях применения в различных областях. Эта информация систематизирована в нескольких обзорах [1, 2].

Как правило, NMP-киназы бактерий и эукариот проявляют высокую специфичность к гетероциклическому основанию субстрата, в гораздо меньшей степени – к сахару.

В клетках *E. coli* имеется пять нуклеозидмонофосфаткиназ – аденилаткиназа (КФ 2.7.4.11), тимидилаткиназа (КФ 2.7.4.9), гуанилаткиназа (КФ 2.7.4.8), цитидилаткиназа и уридилаткиназа (КФ 2.7.4.14) [3, 4]. В тканях человека содержится тимидилаткиназа, уридилат-цитидилаткиназа, пять

изоформ аденилаткиназы, несколько гуанилаткиназ [5].

Особое место среди NMP-киназ занимают ферменты, кодируемые геномом бактериофагов. Для обеспечения возрастающей в условиях инфекции фагом потребности в нуклеотидах, прежде всего тимидиловых, многие бактериофаги индуцируют синтез своих монофосфаткиназ. При этом, в силу небольшого размера генома, фаг “не может себе позволить” кодировать четыре фермента, и монофосфаткиназы фага зачастую обладают более широкой специфичностью к субстрату, которая, как правило, коррелирует с нуклеотидным составом фаговой ДНК. Так, бактериофаги T2, T4 и T6, в ДНК которых цитозин гидроксиметилирован, кодируют dNMP-киназы (КФ 2.7.4.12), фосфорилирующие, наряду с dGMP и dTMP, гидроксиметилированный (но не обычный) dCMP [6, 7].

Бактериофаг T5 также индуцирует синтез dNMP-киназы (КФ 2.7.4.13). Этот фермент активен на всех четырех “канонических” субстратах – dAMP, dCMP, dGMP и dTMP. Такую широкую субстратную специфичность можно объяснить возрастающей при инфекции потребностью в dNMP, которая у бактериофага T5 тем более велика, что он не использует пул клеточных нуклеотидов для синтеза своей ДНК [8].

Группа Бессмана впервые сумела выделить и охарактеризовать dNMP-киназу из T5-инфицированной биомассы *E. coli* [9]. К сожалению, содержание фермента в биомассе было очень мало, что не

Сокращения: d_2 CMP – 2',3'-дидезоксицитидин-5'-фосфат; PEI – полиэтиленмин; PEP – фосфоенолпируват.

* Автор для связи (тел.: (495) 336-26-41; эл. почта: sur@ibch.ru).

Кинетические характеристики dNMP-киназы бактериофага T5 в реакциях с различными акцепторами фосфорила и АТФ в качестве донора фосфорила, определенные спектрофотометрическим методом

| Субстрат | K_m , мМ | k_{cat} , с ⁻¹ |
|---------------|------------|-----------------------------|
| dAMP | 0.275 | 58 |
| rAMP | 0.367 | 31 |
| dGMP | 0.267 | 43.2 |
| rGMP | 0.81 | 0.29 |
| dCMP | 0.037 | 24.7 |
| rCMP | 0.39 | 5.6 |
| dTMP | 0.190 | 38.7 |
| dUMP | 4.2 | 10 |
| rATP (с dAMP) | 0.042 | 58 |

позволило авторам очистить фермент до гомогенного состояния, однако были определены его основные характеристики: оптимум pH, спектр возможных субстратов и сродство к ним, зависимость активности от ионов двухвалентных металлов.

Развитие технологий генной инженерии позволило нам идентифицировать и клонировать ген *dnk*, кодирующий dNMP-киназу T5, осуществить его экспрессию в *E. coli* и наработать значительное количество высокоочищенного фермента [10]. В настоящей работе представлены результаты исследований субстратной специфичности dNMP-киназы T5, а также результаты использования этого фермента для синтеза $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dNTP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{rNTP}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Необычно широкая субстратная специфичность dNMP-киназы T5 в отношении акцепторов фосфорильной группы делает этот фермент очень привлекательным для использования его в ферментативном синтезе нуклеозид-5'-трифосфатов. Очевидно, что с помощью dNMP-киназы T5 можно фосфорилировать все природные dNMP, что и было сделано ранее [11]. Однако возможности фермента относительно фосфорилирования рибонуклеотидов детально не изучались.

Мы исследовали кинетические свойства dNMP-киназы T5 при фосфорилировании различных субстратов, определяя константы Михаэлиса (K_m) и каталитические константы (k_{cat}) спектрофотометрическим методом [12]. Как видно из таблицы, фермент имеет наибольшее сродство к dCMP в качестве акцептора фосфорильной группы (K_m 0.037). Интересно, что для процесса фосфорилирования всех природных dNMP значения как K_m , так и k_{cat} близки, различаясь всего в несколько раз. В то же время кинетические параметры реакций фосфорилирования рибонуклеотидов совершенно различны: K_m для реакций с AMP, GMP и CMP различаются в 3 раза, а k_{cat} различаются почти в 100 раз. Следует отметить, что оптимум pH для пар dAMP и AMP, dCMP и CMP совпадает и находится в области 7.0 (график не приведен).

В таблице не приведены данные по фосфорилированию UMP, поскольку активность фермента с UMP в качестве акцептора фосфорильной группы не поддается измерению оптическими методами. Для определения возможности фосфорилирования UMP с помощью dNMP-киназы T5 ис-

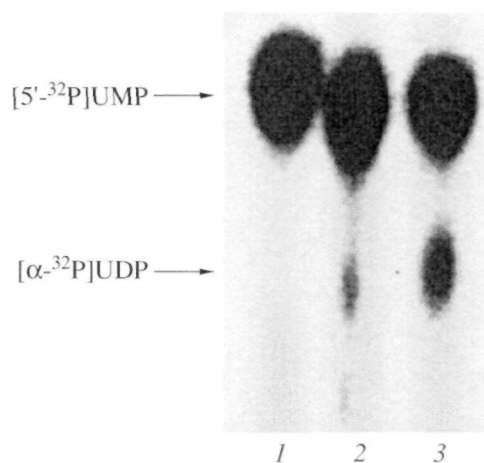


Рис. 1. Радиоавтограф хроматограммы на PEI-целлюлозе аликвот продуктов реакции фосфорилирования $[\text{5}'\text{-}^{32}\text{P}]\text{UMP}$ с помощью dNMP-киназы T5 после инкубации в течение 0 (1, контроль), 15 (2), 60 мин инкубации (3). Доля $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UDP}$ в аликвоте 3, определенная с помощью фосфоимиджера, составила 10% общей активности в реакционной смеси.

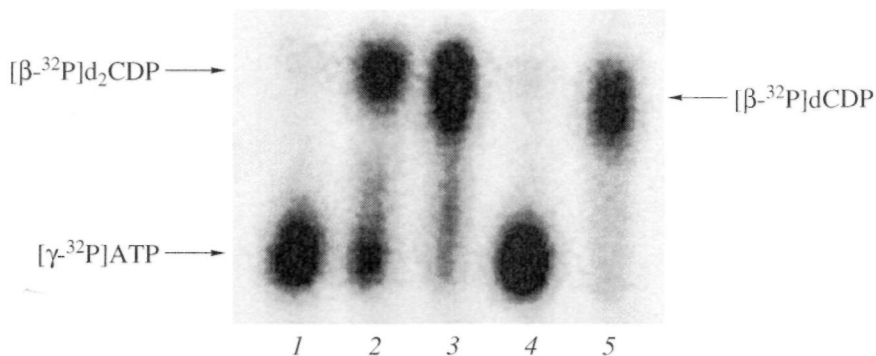


Рис. 2. Радиоавтограф ТСХ на PEI-целлюлозе аликвот продуктов реакции фосфорилирования d_2CMP и dCMP и dNMP -киназой бактериофага T5 (2 и 3, соответственно) и CMP -киназой *E. coli* (4 и 5, соответственно); 1 – $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (контроль).

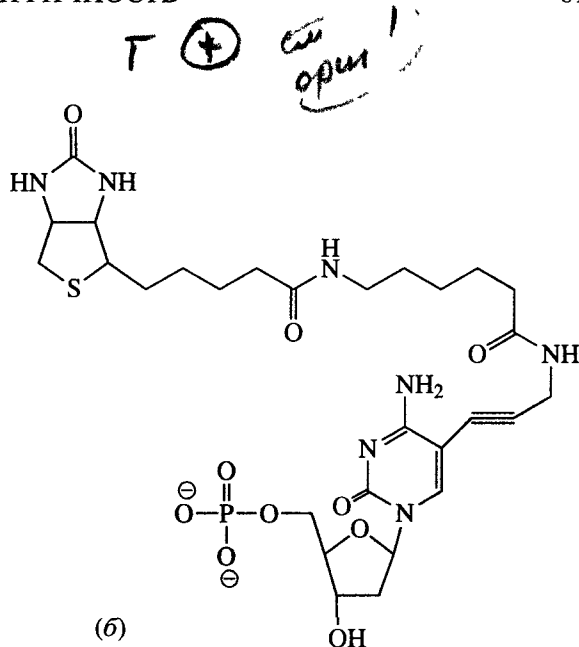
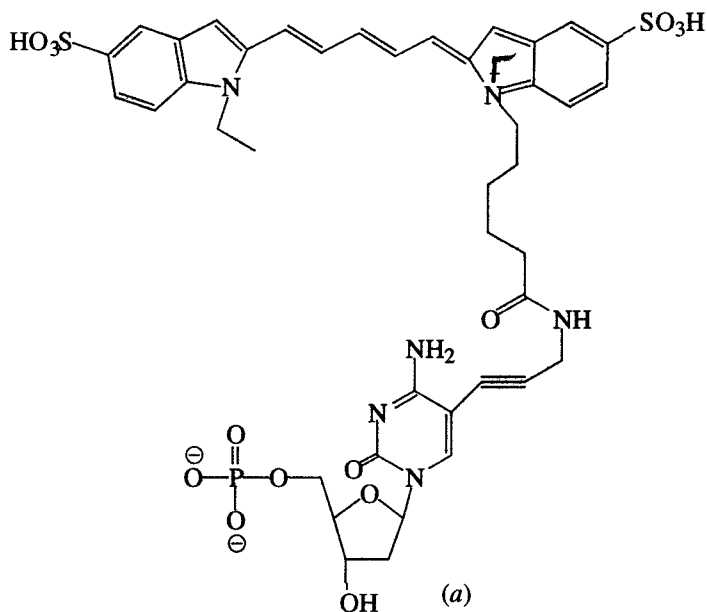
пользовали субстраты, меченные фосфором-32 с высокой молярной активностью (см. “Эксперимент. часть”). Применение субстратов, меченных фосфором-32, существенно повышает чувствительность метода и возможно в двух вариантах: использование $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в качестве донора фосфорила и $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{UMP}$ в качестве его акцептора. Оказалось, что фосфорилирование UMP проходит очень неэффективно, поэтому способ тестирования активности с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в качестве донора не смог дать однозначного результата. В связи с этим, активность dNMP -киназы T5 тестировали с использованием $[5'\text{-}^{32}\text{P}]\text{UMP}$ с молярной активностью 3000 Ки/ммоль (рис. 1). Скорость фосфорилирования UMP при этом составляет около 1 пмоль/мин. Реакционная смесь содержала 0.4 ед. акт. dNMP -киназы T5 (см. “Эксперимент. часть”). Учитывая, что 0.4 ед. акт. фермента катализирует превращение 0.4 мкмоль dCMP в минуту, можно сделать вывод о чрезвычайно низкой эффективности реакции фосфорилирования UMP . Прямое сопоставление скоростей реакций фосфорилирования UMP и dCMP не совсем корректно, так как концентрации субстратов-акцепторов фосфорильной группы не сопоставимы (4 мкМ и 1 мМ соответственно, см. “Эксперимент. часть”), однако, следует признать, что различия в скоростях реакции в $10^4\text{--}10^5$ раз являются очень значительными.

В целом, феномен специфичности dNMP -киназы T5 к природным NMP является уникальным: кинетические параметры фосфорилирования пар $\text{dCMP}\text{--}\text{CMP}$ или $\text{dAMP}\text{--}\text{AMP}$ близки, k_{cat} для пары $\text{dGMP}\text{--}\text{GMP}$ различается почти в 200 раз, а для пары $\text{dUMP}\text{--}\text{UMP}$ – более чем в 10^4 раз.

Понять причину столь радикальных различий в эффективности фосфорилирования dUMP и UMP ,

учитывая способность к фосфорилированию других природных нуклеотидов, непросто. Можно предположить, что эти существенные различия вызваны тем, что регуляция синтеза пула рибонуклеозидтрифосфатов в клетке, инфицированной фагом, происходит через фосфорилирование UMP . Однако невозможно представить себе молекулярный механизм реализации такой специфичности без глубокого знания о структуре активного центра фермента и о его взаимодействии с субстратами. Подобной специфичности не обнаружено ни для одной из описанных NMP -киназ, выделенных из бактериальных, растительных или животных клеток, так как специфичность этих ферментов к акцепторам фосфорильных групп определяется гетероциклическим основанием нуклеотида и, в меньшей степени, углеводной частью молекулы [1].

К сожалению, наши попытки фосфорилирования 5-замещенных производных цитидиловых 5'-нуклеотидов не увенчались успехом. Даже при очень больших избытках фермента достоверного фосфорилирования 5-замещенных (биотинилированного и флуоресцентного) производных dCMP (см. структуры) с использованием $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ в качестве донора фосфорила не было зафиксировано. В то же время dNMP -киназа T5, в отличие от CMP -киназы *E. coli*, успешно фосфорилирует 2',3'-дидезоксицитидин-5'-фосфат (d_2CMP) (см. рис. 2). Это свойство dNMP -киназы T5 является особенно интересным с точки зрения возможного технологического использования фермента в синтезах ddNTP . В дальнейшем эти возможности будут нами исследованы.



Структуры 5-замещенных производных 2'-дезокситидин-5-монофосфата: а) флуоресцентное производное с красителем СУ-5, б) биотинильное производное

Учитывая способность dNMP-киназы T5 фосфорилировать не только dNMP, но и rNMP, мы использовали фермент для препаративного синтеза некоторых $[5'-^{32}\text{P}]d\text{NTP}$ и $[5'-^{32}\text{P}]r\text{NTP}$. Условия синтеза $[5'-^{32}\text{P}]d\text{NTP}$ и $[5'-^{32}\text{P}]r\text{NTP}$ из соответствующих $[5'-^{32}\text{P}]$ монофосфатов подробно описаны в “Эксперимент. части”. Двухстадийное фосфорилирование осуществлялось одновременно в одной реакционной смеси: первая стадия – фосфорилирование dNMP-киназой T5, вторая стадия – фосфорилирование с помощью пируваткиназы и PEP. Были синтезированы $[5'-^{32}\text{P}]d\text{ATP}$, $[5'-^{32}\text{P}]d\text{CTP}$, $[5'-^{32}\text{P}]d\text{GTP}$, $[5'-^{32}\text{P}]d\text{TTP}$, а также $[\alpha-^{32}\text{P}]d\text{ATP}$, $[\alpha-^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ и $[\alpha-^{32}\text{P}]d\text{GTP}$ с выходом 80–90% и молярной активностью 3–4 кКи/ммоль. К сожалению, попытка использовать dNMP-киназу T5 для препаративного фосфорилирования $[5'-^{32}\text{P}]d\text{UMP}$ не увенчалась успехом. Даже значительный избыток фермента не позволяет достичь приемлемого выхода за несколько часов инкубации.

Следует отметить, что синтез, катализируемый dNMP-киназой T5 и пируваткиназой, проводили в условиях незначительного избытка АТФ при значительном избытке ферментов и фосфоенолпирувата. Такое соотношение компонентов реакционной смеси, характерное для ферментативного синтеза меченных фосфором соединений, позволяет проводить последовательное фосфорилирование NMP простым смешиванием всех реагентов в одном реакционном сосуде, сокращает время синтеза и упрощает последующую хроматографическую очистку продукта. Целевой продукт из реакционной смеси выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном режиме. Для фосфорилирования $[5'-^{32}\text{P}]d\text{AMP}$ в качестве донора фосфорильной груп-

пы использовали dATP, что позволяет не снижать молярную активность $[\alpha-^{32}\text{P}]d\text{ATP}$.

Таким образом, используя dNMP-киназу T5 для синтеза нуклеозид-5'-трифосфатов, меченных фосфором-32 в α -положении, мы упростили синтез, сохраняя высокий выход целевых продуктов. Полученные нами результаты, несомненно, могут быть использованы для синтеза аналогичных соединений, меченных фосфором-33. В целом, технологический подход замены узкоспецифичных NMP-киназ *E. coli* на “универсальный” фермент, способный эффективно фосфорилировать нуклеозид-5'-монофосфаты, является весьма перспективным и может при должной доработке быть распространен на другие технологические процессы, в которых проводится фосфорилирование d/rNMP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали: Трис, фосфоенолпируват (PEP), NADH (восстановленный), пируваткиназу, лактатдегидрогеназу, содержащую пируваткиназу фирмы “Sigma”, пластины с PEI-целлюлозой фирмы “Merck”, $[\gamma-^{32}\text{P}]d\text{ATP}$ (объемная активность 10 мКи/мл, молярная активность 4000 Ки/ммоль) был получен от ЦКП “Фосфор” РАН. $d_2\text{CMP}$ был синтезирован из 2',3'-дидезоксицитидина и хлороксида фосфора как описано [13]. Все $[5'-^{32}\text{P}]r\text{NMP}$ и $[5'-^{32}\text{P}]d\text{NMP}$ были синтезированы как описано в работе [14] с молярной активностью около 3000 Ки/ммоль. CMP-киназа *E. coli* была выделена по методике [4] с удельной активностью 4 ед. акт./мг. dNMP-киназу фага T5 получали как описано в работе [10].

Определение активности нуклеозидмонофосфаткиназ

Ферментативную активность *dNMP*-киназы T5 определяли двумя методами:

1. Спектрофотометрически по окислению NADH для определения K_m и k_{cat} , расчеты констант проводили как описано в работе [9]. Полная реакционная смесь содержала в конечном объеме 1 мл: 50 мМ Трис-НСI (рН 7.5), 80 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 2 мМ EDTA, 0.8 мМ PEP, 0.2 мМ АТР, 0.1 мМ NADH, 2 мМ NMP или *dNMP*, 20 ед. акт. лактатдегидрогеназы, содержащей пируваткиназу, и исследуемый фермент (0.02–0.2 ед. акт.). Реакцию вели в акриловой кювете при 25°C в течение 3–5 мин. Скорость окисления NADH измеряли на спектрофотометре по уменьшению оптического поглощения при 340 нм. За 1 ед. акт. фермента принимали количество фермента, катализирующее превращение 1 мкмоль *dCMP* в минуту при температуре 25°C.

2. По фосфорилированию нуклеотидов с [γ -³²P]АТР в качестве донора фосфорильной группы. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 50 мМ Трис-НСI-буфер (рН 7.6); 5 мМ MgCl₂, 1 мМ нуклеозид-5'-монофосфат; 0.1 М KCl; 0.1 мМ АТР; 1 мкКи [γ -³²P]АТР и 0.05 ед. акт. исследуемого фермента. Смесь инкубировали при 37°C, аликвоты по 0.5 мкл отбирали через разные промежутки времени и наносили их на пластинку с PEI-целлюлозой. ТСХ проводили в 0.5 М КН₂Р₄. После хроматографии пластинку высушивали. Визуализацию продуктов реакции на пластинках с PEI-целлюлозой проводили с помощью фосфоимиджера Packard Cyclone Storage Phosphor System.

Тестирование активности *dNMP*-киназы T5 с UMP. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 50 мМ Трис-НСI-буфер (рН 7.6); 5 мМ MgCl₂, 0.1 М KCl, 0.1 мМ АТР, 300 мкКи [5'-³²P]UMP и 0.4 ед. акт. *dNMP*-киназы T5. Смесь инкубировали при 37°C, отбирали аликвоты по 0.5 мкл через 20 и 60 мин на пластинку с PEI-целлюлозой. ТСХ проводили в 0.5 М KCl. Визуализацию продуктов реакции на пластинках с PEI-целлюлозой проводили с помощью фосфоимиджера Packard Cyclone Storage Phosphor System.

Синтез [α -³²P]dCTP. В реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 50 мМ Трис-НСI-буфер (рН 8.0), 5 мМ MgCl₂, 0.2 М KCl, 5 мМ дитиотреит, 0.05 мМ АТР, 5 мМ PEP, добавляли 10 мКи [5'-³²P]dCMP (примерно 2.5–3 нмоль вещества), 5 ед. акт. *dNMP*-киназы T5 и 5 ед. акт. пируваткиназы. Смесь инкубировали при 37°C 30 мин. Затем аликвоту (объемом 0.2–0.3 мкл) анализировали методом ТСХ на пластинке PEI-целлюлозы в 0.5 М калий-фосфатном буфере рН 4.0 для определения выхода. После хроматографии пластинку высушивали и визуализировали с помощью фосфоимиджера или автордиографически. Выход продукта реакции составлял 90% по радиоактивности. Целевой про-

дукт из реакционной смеси выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном режиме на колонке С-18 в градиенте этанола в 50 мМ бикарбонате триэтиламмония. Конечный выход продукта [α -³²P]dCTP составлял 7.5 мКи (75% от исходного соединения).

Синтез [α -³²P]АТР. В реакционную смесь объемом 100 мкл, содержащую 50 мМ Трис-НСI-буфер (рН 8.0), 5 мМ хлорид магния, 0.2 М хлорид калия, 5 мМ ДТТ, 0.1 мМ dАТР, 5 мМ PEP, добавляли 5 мКи [5'-³²P]АМР (примерно 1.5–2 нмоль вещества), 5 ед. акт. *dNMP*-киназы T5 и 5 ед. акт. пируваткиназы. Смесь инкубировали при 37°C 30 мин. Затем аликвоту (объемом 0.2–0.3 мкл) анализировали методом ТСХ на пластинке PEI-целлюлозы в 0.5 М калий-фосфатном буфере рН 4.0 для определения количества продукта в реакции. После хроматографии пластинку высушивали и визуализировали с помощью фосфоимиджера или автордиографически. Выход продукта в реакции составлял 90% по радиоактивности. Целевой продукт из реакционной смеси выделяли с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ в ион-парном режиме на колонке С-18 в градиенте этанола в 50 мМ бикарбонате триэтиламмония. Конечный выход продукта [α -³²P]АТР составлял 4.5 мКи (90% от исходного соединения).

ВЫВОДЫ

Фермент способен эффективно фосфорилировать АМР, dАМР, GMP, dGMP, CMP, dCMP, d₂CMP, TMP, dUMP, но не UMP и может быть использован для препаративного синтеза соответствующих нуклеозид-5'-трифосфатов, меченных радиоактивными изотопами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена благодаря поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ № 08-04-00653-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan H., Tsai M.D. // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1999. V. 73. P. 103–134.
2. Lavie A., Konrad M. // Mini Rev. Med. Chem. 2004. V. 4. P. 351–359.
3. Hiraga S., Sugino Y. // Biochim. Biophys. Acta. 1966. V. 114. P. 416–418.
4. Рухтер В.А., Рабинов И.В., Кузнецов С.А., Павлюк Т.Б., Скоблов Ю.С. // Приклад. биохим. микробиол. 1988. Т. XXIV. С. 310–318.
5. van Rompay A.R., Johansson M., Karlsson A. // Pharmacol. Ther. 2000. V. 87. P. 189–198.
6. Bello L.J., Bessman M.J. // J. Biol. Chem. 1963. V. 238. P. 1777–1787.
7. Duckworth D.H., Bessman M.J. // J. Biol. Chem. 1967. V. 242. P. 2877–2885.

8. Warner H.R., Drong R.F., Berget S.M. // J. Virol. 1975. V. 15. P. 273–280.
9. Bessman M.J., Herriott S.T., Orr M.J. // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. P. 439–445.
10. Mikoulnskaia G.V., Zimin A.A., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I. // Protein Express. Purif. 2004. V. 33. P. 166–175.
11. Микулинская Г.В., Зимин А.А., Феофанов С.А. // Тез. докл. международной школы-конф. молодых ученых “Биотехнология будущего”. М.: Авииздат, 2006. С. 58–59.
12. Bessman M.J. // Methods Enzymol. 1963. V. VI. P. 166–177.
13. Turcotte J.G., Pivarnik P.E., Shirali S.S. // J. Chromatography. 1990. V. 499. P. 55–61.
14. Walseth T.F., Yuen P.S., Moos M.C. // Methods Enzymol. 1991. V. 195. P. 29–44.

Substrate Specificity of T5 Bacteriophage Deoxyribonucleoside Monophosphate Kinase and Its Application for the Synthesis of $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{d/rNTP}$

A. Yu. Skoblov^a, G. V. Mikoulnskaia^b, S. A. Taran^b, A. I. Miroshnikov^a,
S. A. Feofanov^b, and Yu. S. Skoblov^{a, #}

[#]Phone: +7 (495) 336-2641; e-mail: sur@ibch.ru

^a Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

^b Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino Division, Russian Academy of Sciences,
pr. Nauki 6, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

Bacteriophage T5 deoxynucleoside monophosphate kinase (dNMP kinase, EC 2.7.4.13) is shown to catalyze the phosphorylation of both d_2CMP and ribonucleotides AMP, GMP, and CMP, but does not phosphorylate UMP. For natural acceptors of the phosphoryl group, k_m and k_{cat} were found. The applicability of T5 dNMP kinase as a universal enzyme capable of the phosphorylation of labelled r/dNMP was shown for the synthesis of $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{rNTP}$ and $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{dNTP}$.

Key words: T5 bacteriophage deoxyribonucleoside monophosphate kinase $\{\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{rNTP}$ and $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\}\text{dNTP}$, synthesis