



УДК 577.112.4 : 577.152.314.042

МНОЖЕСТВЕННОСТЬ АФФИННОЙ МОДИФИКАЦИИ РНКазы  
ПРИ АЛКИЛИРОВАНИИ ЕЕ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫМ  
АНАЛОГОМ 5'-ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДА

Барам Г. И., Булева В. Н., Добрикова Е. Ю.,  
Петров В. Н.

Новосибирский институт биоорганической химии  
Сибирского отделения Академии наук СССР

Исследовано взаимодействие панкреатической РНКазы с алкилирующим аналогом 5'-дезоксирибонуклеотида — 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламидом  $d(pTrA) d[(ClRCH_2NH)pTrA]$ . Показано, что нерекционноспособный оксианалог  $d[(HORCH_2NH)pTrA]$  является конкурентным ингибитором гидролиза cCMP, катализируемого РНКазой. Взаимодействие РНКазы с  $d[(ClRCH_2NH)pTrA]$  приводит к инактивации фермента, которая значительно уменьшается в присутствии  $d(pTrA)$  и  $d[(HORCH_2NH)pTrA]$ . Несмотря на аффинный характер модификации, процесс не сопровождается полной инактивацией фермента. Высказано предположение о том, что это может быть следствием смещения фрагмента динуклеотида из активного центра после образования ковалентной связи реагента с ферментом. Показано, что при модификации образуются четыре модифицированные формы РНКазы, в значительной мере сохраняющие активность в реакциях гидролиза как cCMP, так и poly(U).

Аффинная модификация биополимеров обычно рассматривается как взаимодействие, проходящее в достаточно жестком комплексе биополимера с реагентом [1]. Однако в силу многоточечного взаимодействия биополимера с аффинным реагентом возможно существование множества различных конформаций комплекса биополимер-реагент [2]. Это разнообразие состояний может быть еще шире из-за конформационной лабильности, свойственной биополимерам. В таком случае направление аффинной модификации биополимера, по всей вероятности, должно определяться в первую очередь тем, в какой мере та или иная химически активная группа (центр) биополимера, находящегося в данном конформационном состоянии, может быть атакована реакционноспособной группой реагента. При этом, если такая реакция будет проходить преимущественно в конформационно сильно искаженном комплексе, вполне вероятно, что после ковалентного присоединения реагента к биополимеру и при переходе биополимера в энергетически более выгодное конформационное состояние этот реагент может быть частично или даже полностью удален из области биополимера, ответственной за узнавание аффинной части реагента.

Такая возможность, в частности, рассмотрена в работе [3], в которой получены серьезные указания на то, что после ковалентного присоединения  $\epsilon$ АТР к креатинкиназе из мышц кролика происходит его частичный вывод из области взаимодействия креатинкиназы с АТР. Подобный сдвиг лиганда после образования им ковалентной связи с биополимером (ферментом) означает, что аффинная модификация может и не приводить к полной инактивации модифицируемого биополимера (фермента). Кроме того, модификация в таком случае может проходить по множеству различных точек биополимера. Так, например, аффинная модификация фенилаланил-тРНК-синтазы из *E. coli*  $\gamma$ -п-азидоанилидом АТР, имеющим сродство к АТР-связывающему центру, приводит к присоединению нескольких остатков реагента без заметной потери активности фермента [4].

Сокращения:  $d[(ClRCH_2NH)pTrA]$  и  $d[(HORCH_2NH)pTrA]$  — амиды дезоксирибонуклеотида  $d(pTrA)$ , несущие на 5'-концевом фосфате остаток соответственно 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина и 4-(N-2-гидроксиэтил-N-метиламино)бензиламина; MES — 2-морфолиноэтилсульфокислота.

Таблица 1

Величина констант ингибирования для 5'-дезоксирибодинуклеотидов —  
d(pN<sub>1</sub>pN<sub>2</sub>) [6] и их оксамидов d[(HORCH<sub>2</sub>NH)pN<sub>1</sub>pN<sub>2</sub>]

Динуклеотид	K <sub>i</sub> , M	
	для исходного динуклеотида	для амида
d(pTpA)	7,0·10 <sup>-4</sup>	2,9·10 <sup>-4</sup>
d(pApT)	3,9·10 <sup>-5</sup>	6,0·10 <sup>-4</sup>
d(pTpC)	5,2·10 <sup>-5</sup>	1,65·10 <sup>-3</sup>

Множественная модификация с резкими изменениями направления модификации при сравнительно небольших изменениях структуры аффинной части реагента наблюдалась при исследовании аффинной модификации рибосом реакционноспособными аналогами олигоуридилатов, помещенными в участок связывания мРНК [5]. Число таких примеров можно было бы существенно увеличить.

Естественно, что вопрос о вкладе динамических факторов в процесс аффинной модификации имеет существенное значение для самых различных аспектов ее применения. Поэтому представлялось целесообразным исследовать этот вопрос на достаточно простом биополимере с известной пространственной структурой. В качестве такой модели авторы выбрали панкреатическую РНКазу, а в качестве аффинного реагента — производное дезоксирибодинуклеотида d(pTpA), несущее на 5'-концевом фосфате алкилирующую группу — остаток 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)-бензиламина (далее сокращенно ClRCH<sub>2</sub>NH-). Ранее было установлено, что все 16 мыслимых природных дезоксирибодинуклеотидов обладают средством к ферменту [6].

Поскольку значительный по размеру остаток ClRCH<sub>2</sub>NH- мог сильно повлиять на средство динуклеотида к биополимеру, первоначально было изучено средство производных динуклеотидов, несущих остаток HORCH<sub>2</sub>NH-. Этот остаток близок по размеру ClRCH<sub>2</sub>NH-, но в отличие от последнего не содержит реакционноспособной группы, которая могла бы исказить данные по измерению активности фермента. С целью выбора реагента с лучшим средством к РНКазе было изучено взаимодействие ее с несколькими такими аналогами — производными динуклеотидов: d(pTpA), d(pApT) и d(pTpC) (например, см. рис. 1). Все исследованные производные оказались конкурентными ингибиторами РНКазы (табл. 1). Для сравнения в табл. 1 приведены также значения, полученные в работе [6] для соответствующих немодифицированных динуклеотидов. Для аффинной модификации РНКазы был использован d[(ClRCH<sub>2</sub>NH)pTpA]. Производное динуклеотида d(pTpA) было выбрано как обладающее наибольшим средством к ферменту, и, кроме того, «адрес» pTpA (pVpR) наиболее соответствует последовательности участков связывания гетероциклических оснований в активном центре РНКазы [7, 8].

Оказалось, что даже при высоких концентрациях реагента не происходит полной инактивации фермента. В то же время процесс имеет ряд черт, характерных для аффинной модификации: реагенты являются конкурентными ингибиторами фермента, динуклеотид и его нереакционноспособный оксианалог защищает фермент от инактивации алкилирующим производным этого олигонуклеотида (рис. 2).

Кинетические кривые инактивации такого вида могут быть следствием по крайней мере двух альтернативных причин. Во-первых, реакция может остановиться, не дойдя до 100% превращения в результате израсходования реагента или сильного тормозящего действия продукта побочного превращения реагента, например d[(HORCH<sub>2</sub>NH)pTpA]. Во-вторых, остановка может быть связана с тем, что количественно модифицированная к моменту достижения плато РНКазы сохраняет активность в используемом тесте — гидролизе сСМР.

Первая причина представляется маловероятной. Остановка реакции (прекращение инактивации) происходит через 15 мин после ее начала.

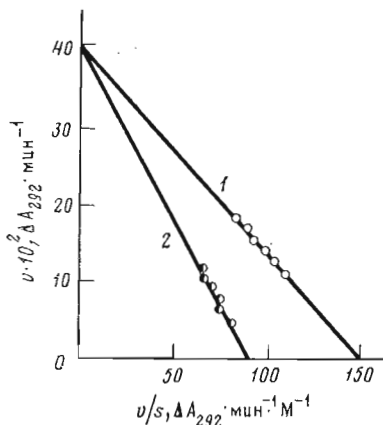


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость начальной скорости гидролиза сСМР от его концентрации в координатах  $v, v/s$  в отсутствие (1) и в присутствии  $2,0 \cdot 10^{-4}$  М  $d[(HORCH_2NH)pTrA]$  (2)

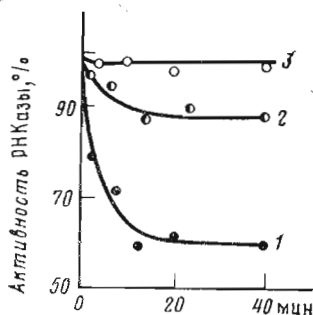


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость остаточной активности РНКазы от времени выдерживания ее при  $25^\circ \text{C}$  с  $5 \cdot 10^{-4}$  М  $d[(ClRCH_2NH)pTrA]$  в отсутствие (1) и в присутствии  $2,1 \cdot 10^{-3}$  М  $d(pTrA)$  (2) и  $3,5 \cdot 10^{-4}$  М  $d[(HORCH_2NH)pTrA]$  (3). Концентрация фермента  $2 \cdot 10^{-5}$  М

Поскольку преобладающая побочная реакция — гидролиз связи С—Cl в реагенте — проходит через лимитирующую стадию образования этилениммониевого катиона, причем при  $25^\circ \text{C}$  этот процесс характеризуется временем полупревращения порядка 360 мин [9], очевидно, что к моменту прекращения реакции сохраняется значительное количество неизрасходованного реагента. Накапливающийся в ходе реакции нереакционноспособный оксианалог не обладает повышенным сродством к РНКазе и едва ли может полностью затормозить превращение. Поэтому более вероятным является образование в результате модификации производного фермента с частично сохранившейся ферментативной активностью.

В связи с этим нами была проведена работа по фракционированию РНКазы, модифицированной реагентом  $d[(ClRCH_2NH)pTrA]$ , с целью установить, образуются ли при этом продукты модификации, сохранившие частично ферментативную активность, а также оценить число этих продуктов.

Для того чтобы получить достаточное для анализа количество модифицированной РНКазы, модификацию проводили при концентрации фермента  $3,7 \cdot 10^{-3}$  М, существенно более высокой, чем при кинетических исследованиях инактивации ( $2 \cdot 10^{-5}$  М). Концентрация реагента была  $6,4 \cdot 10^{-3}$  М.

Продукты модификации РНКазы выделяли хроматографическим методом, описанным в работе [10], используя двухволновую детекцию при 260 и 280 нм (рис. 3). Так как молекула аналога имеет заряд  $(-2)$  при рН 7,0, пики, соответствующие продуктам модификации, должны быть сдвинуты относительно исходной РНКазы к началу координат. Из рис. 3 видно, что до пика немодифицированной РНКазы (пик V) элюируются по крайней мере четыре продукта модификации.

При стехиометрии присоединения реагента к ферменту 1 : 1 рассчитанное соотношение  $A_{280}/A_{260}$  должно равняться 0,51. Из данных рис. 3 можно рассчитать, что для продуктов (пики I—IV) это соотношение изменяется в пределах 0,46—0,51, что позволяет предположить, что модифицированный фермент в пиках I—IV содержит по 1 моль ковалентно связанного аффинного реагента на 1 моль фермента.

Степень модификации РНКазы составляла 70%. Все мономодифицированные формы РНКазы (пики I—IV) обладали ферментативной активностью, определенной как по степени гидролиза  $poly(U)$ , так и по гидро-

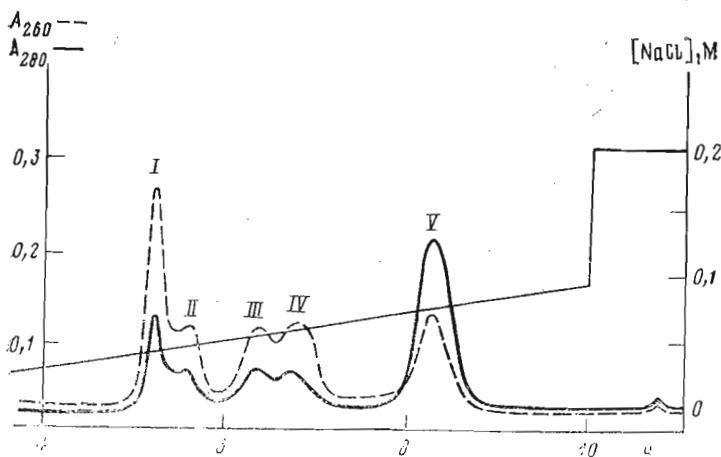


Рис. 3. Хроматографическое разделение модифицированной  $d[(CIRCH_2NH)pTrAl]$  РНКазы на колонке ( $9,5 \times 190$  мм) с СМ-целлюлозой в линейном градиенте  $0-0,1$  М NaCl в  $0,005$  М трис-HCl-буфере, pH 8,0. Скорость элюции  $0,4$  мл/мин

лизу сСМР (табл. 2). Пик V, соответствующий немодифицированной РНКазе, сохранял практически 100% исходной активности фермента.

Чтобы убедиться в гомогенности форм модификации РНКазы, один из продуктов реакции (пик I) подвергали триптическому гидролизу после восстановления S—S-связей и карбоксиметилирования SH-групп остатков цистеина.

Продукты гидролиза разделяли хроматографией на обращенной фазе с использованием двухволновой детекции при 210 и 260 нм (рис. 4). Поглощение при 260 нм обусловлено только наличием в пептиде хромофоров (Tyr и  $d[(CIRCH_2NH)pTrAl]$ ).

Сравнение хроматографических профилей разделения триптических гидролизатов модифицированной и немодифицированной РНКазы (рис. 4а, б) позволяет сказать, что в основном модификация затрагивает пептид, пик которого отмечен звездочкой, что следует из наблюдаемого для него прироста поглощения  $A_{260}$ , вызванного появлением дополнительного хромофора. Этот пептид обладает максимальной гидрофобностью и, как следует из расчета по Мику [11], является С-концевым пептидом РНКазы (остатки 105—124). Аминокислотный анализ пептида подтвердил именно такой его состав. Анализ проводили методом кислотного гидролиза пептида до аминокислот с последующим разделением их дансильных производных методом ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 5). [12]. Дансильный метод по ряду причин используется в основном лишь для качественного анализа аминокислот. Однако в нашем случае знание качественного аминокислотного состава является вполне достаточным, так как из всех триптических пептидов РНКазы только С-концевой пептид ( $His^{105} \dots Val^{124}$ ) удовлетворяет результатам анализа, приведенного на рис. 5.

Таблица 2

Ферментативная активность мономодифицированных форм РНКазы

Номер пика ионообменной хроматографии (рис. 3)	Остаточная активность, %	
	по сСМР	по poly(U)
I	23	94
II	46	88
III	64	100
IV	60	100
V	100	100

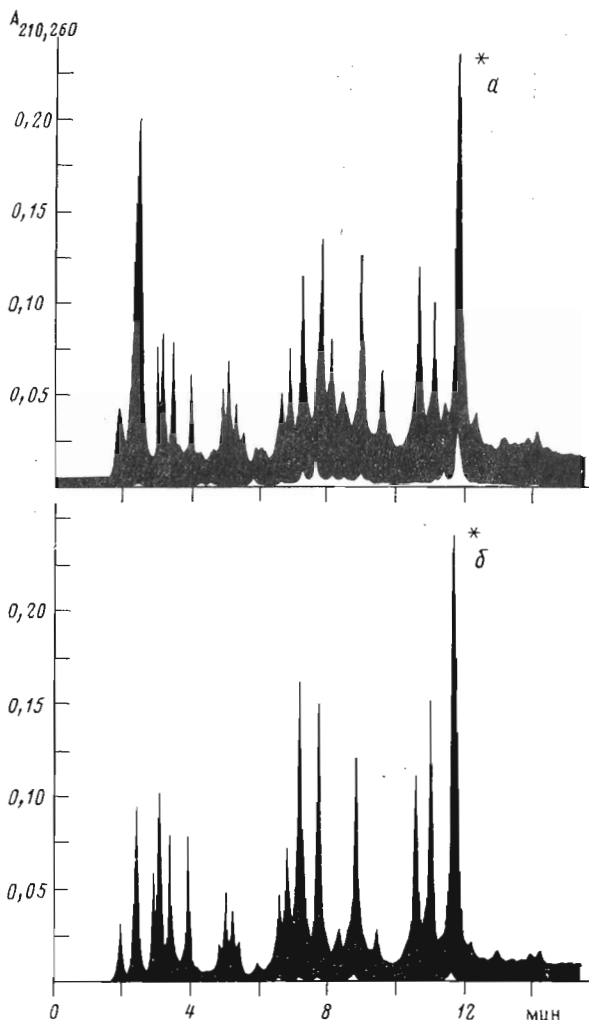


Рис. 4. Хроматографическое разделение триптических гидролизатов модифицированной РНКазы (пик 1, рис. 3) (а) и немодифицированной РНКазы (б) на колонке ( $2 \times 62$  мм) со смолой Nucleosil 5- $C_{18}$ . Элюент — градиент концентрации ацетонитрила (0—50%) в 0,1% трифторуксусной кислоте, рН 2,0. Скорость элюции 100 мкл/мин. Черным цветом указано поглощение при 210 нм, белым — при 260 нм

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о множественном характере модификации РНКазы с помощью аффинного реагента и частичном сохранении ферментативной активности модифицированных форм фермента.

#### Экспериментальная часть

Использовались: сефадекс G-25 (20—80 мкм) (Pharmacia, Швеция); СМ-целлюлоза (СМ-52, Whatman, Англия), сСМР, MES, 2,2'-дипиридилдисульфид (Fluka, Франция); трипсин, трис (Sigma, США); меркаптоэтанол (Serva, Merck, ФРГ); сорбент Nucleosil 5- $C_{18}$  (Macherey Nagel, ФРГ); трифенилфосфин (Chemapol, СССР); диметилформамид, эфир, метанол, ацетон с содержанием влаги не более 0,2%; трифторуксусная кислота, перегнанная;  $ICH_2COOH$  (Reanal, ВНР); мочевины, NaCl, ос. ч. Poly(U) была любезно предоставлена В. К. Райтом (НГУ).

Микроколоночную хроматографию осуществляли на хроматографе «Милихром» (СССР), спектрофотометрические измерения проводили на спектрометрах Specord UV VIS и Specord M-40 (ГДР).

Получение 5'-дезоксирибонуклеотидов и определение их гомогенности осуществляли согласно [6].

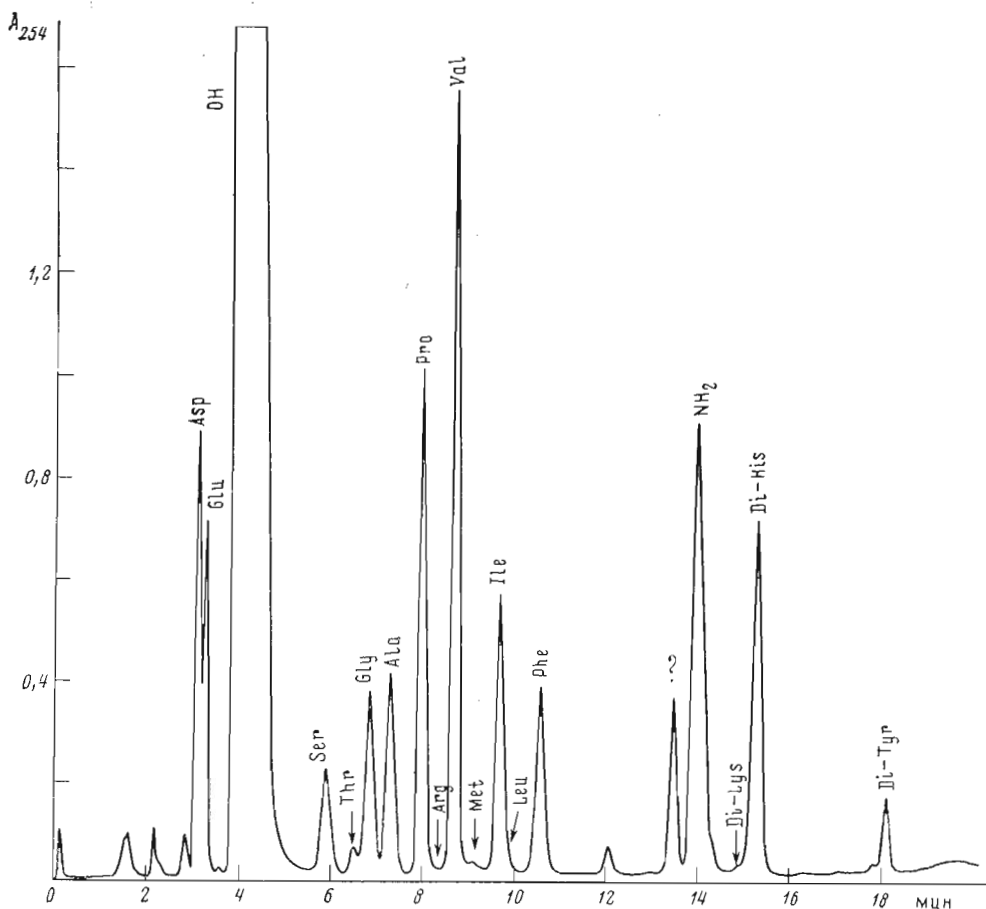


Рис. 5. Хроматографическое разделение дансильрованных продуктов кислотного гидролиза пептида (\*) (см. рис. 4) на колонке (2 × 62 мм) со смолой Nucleosil 5-C<sub>18</sub>. Элюент — градиент концентрации ацетонитрила (0—50%) в 0,01 М трис-трифторацетатном буфере, рН 7,2. Скорость элюции 100 мкл/мин. Трехбуквенным кодом обозначены Dns-производные соответствующих аминокислот; OH—Dns-OH; NH<sub>2</sub> — Dns-NH<sub>2</sub>; Di-Lys, Di-His и Di-Tyr — Dns-Lys(Dns), Dns-His(Dns) и Dns-Tyr (Dns) соответственно

Препарат панкреатической РНКазы А (КФ 3.1.27.5) был получен очисткой рибонуклеазы отечественного производства по методу Таборского [13] с предварительной гель-фильтрацией на сефадексе G-25.

Активность фермента определяли спектрофотометрически при 25° С, измеряя увеличение оптического поглощения раствора 0,1 мг/мл (3,6 · 10<sup>-3</sup> М) сСМР в 0,1 М NaCl в 0,1 М трис-НСl-буфере, рН 7,2, при 292 нм, согласно методу Крука и соавт. [14]. Удельная активность препарата составляла 300 ед. акт./мг. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое вызывает увеличение поглощения при 284 нм на 0,1 ОЕ за 15 мин при 25° С.

4-(N-2-Хлорэтил-N-метиламино)бензиламиды *d(pTpA)*, *d(pApT)* и *d(pTpC)* синтезировали по методу [15]. К раствору 0,2 ммоль дихлоргидрата 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензиламина в метаноле (0,6 мл) добавляли 400 мкл метанола, насыщенного аммиаком (12,5 М). Раствор по каплям добавляли к 50 мл эфира, осадок неорганической соли отделяли, раствор упаривали в вакууме на холоде. Выход основания не менее 90%.

К раствору 0,02 ммоль триэтиламмониевой соли динуклеотида и 0,2 ммоль основания амина в 0,4 мл диметилформамида добавляли по 0,2 ммоль трифенилфосфина и дипиридилдисульфида. Смесь выдерживали 3—4 ч при 5—7° С. Затем реакционную смесь по каплям добавляли к 20 мл 2% раствора LiClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок отделяли, промывали ацетоном (3 × 10 мл) и эфиром (1 × 10 мл) и высушивали в вакууме. Выход

литневой соли амида динуклеотида составлял 85—90%. Структура полученных соединений была подтверждена кислотным гидролизом, как описано в [7]. Анализ продуктов гидролиза методом микроколоночной хроматографии (МКХ) с многоволновой фотометрической детекцией [16] показал, что соотношение динуклеотид — амин для всех соединений 1 : 1. Гомогенность амидов анализировали также методом МКХ, содержание основного продукта было не менее 95%, при этом амид элюировался как соединение, имеющее при pH 7,0 заряд  $-2$  (заряд динуклеотида —  $(-3)$ ), что соответствует структуре 5'-фосфамида динуклеотида. Содержание ковалентно связанного хлора, определенное потенциометрическим титрованием, как описано в работе [15], было не менее 90%.

*4-(N-2-Оксиэтил-N-метиламино)бензиламины динуклеотидов* получали гидролизом соответствующих реакционноспособных аналогов, как описано в работе [17] для получения оксианалогов АМР и АТР.

*Инактивацию фермента и кинетические исследования* ферментативной реакции проводили при 25° С в реакционной смеси (2 мл) состава:  $2 \cdot 10^{-5}$  М РНКазы,  $10^{-4}$  —  $10^{-3}$  М  $d[(ClRCH_2NH)pN_1pN_2]$ , 0,1 М NaCl в 0,1 М трис-НСl-буфере (pH 7,2). Активность РНКазы определяли добавлением аликвот (0,2 мл), отбираемых по ходу реакции, к 1,8 мл раствора  $10^{-3}$  М cСМР в указанном выше буфере. Остаточную ферментативную активность фермента определяли по отношению активности РНКазы в данный момент времени к активности фермента в нулевой момент времени.

*Модификацию фермента* проводили в реакционной смеси (2,5 мл) состава:  $3,7 \cdot 10^{-3}$  М РНКазы,  $6,4 \cdot 10^{-3}$  М  $d[(ClRCH_2NH)pTrA]$  в 0,2 М NaCl, pH 7,0, при 40° С в течение 7 ч.

*Гель-фильтрацию* реакционной смеси модифицированной РНКазы осуществляли по методике [10] на колонке ( $16 \times 290$  мм) с сефадексом G-25; элюент — 0,05 М трис-НСl, pH 8,0; скорость элюции 0,4 мл/мин. Пик, элюированный в свободном объеме колонки, разбавляли водой до 30 мл.

*Ионообменную хроматографию* модифицированных форм РНКазы — пика, собранного после гель-фильтрации, проводили на СМ-целлюлозе (условия в подписи к рис. 3). Фракции модифицированной РНКазы собирали и хранили при 5—7° С.

*Измерение активности РНКазы по гидролизу poly(U)* проводили по методике Ири и соавт. [18], измеряя увеличение поглощения раствора  $2 \cdot 10^{-4}$  М poly(U) в 0,1 М MES, pH 7,0, в присутствии  $2 \cdot 10^{-6}$  М РНКазы при 280 нм за 90 мин.

*Концентрацию мономодифицированных форм РНКазы* рассчитывали из значения молярного коэффициента поглощения, равного  $21\,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при 280 нм, который был найден как сумма молярных коэффициентов поглощения РНКазы ( $9400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) и  $d[(ClRCH_2NH)pTrA]$  (рассчитанная величина, равная  $12\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

*Восстановление S—S-связей* в РНКазе или продукте ее модификации проводили в растворе 20 мг белка в 2 мл 7 М мочевины, pH которого 10 М KOH довели до 8,5. После добавления 10 мкл меркаптоэтанола смесь оставили при 20° С на 12 ч.

*Карбоксиметилирование SH-групп* в восстановленной РНКазе или в продукте ее модификации проводили добавлением к реакционной смеси восстановленной РНКазы раствора  $ICH_2COOH$  (140 мг  $ICH_2COOH$  в 7 М мочевины, pH 7), нейтрализуя по ходу реакции выделяющуюся HI раствором 1 М KOH. Карбоксиметилированные (СМ) продукты очищали гель-фильтрацией на колонке ( $16 \times 110$  мм) с сефадексом G-25 с элюцией 0,05 М  $NH_4HCO_3$ , pH 8,2 (скорость 0,4 мл/мин).

*Гидролиз СМ-РНКазы (или продукта ее модификации) трипсином.* К 200 мкл раствора СМ-РНКазы в 0,05 М  $NH_4HCO_3$  (3 мг/мл) добавляли 10 мкл раствора трипсина в 0,1% трифторуксусной кислоте (1 мг/мл) и выдерживали 12—15 ч при 37° С. Саморасщепление трипсина контролировали в аналогичных условиях.

*Гидролиз пептида* (отмеченного звездочкой на рис. 4) осуществляли 6 М HCl при 105° С в стеклянной запаянной ампуле в течение 24 ч.

Аминокислоты дансильировали как описано в работе [12] и Dns-производные разделяли на микроспектрофотометре «Милихром» на колонке (2 × 62 мм) с Nucleosil 5-C<sub>18</sub> (условия см. в подписи к рис. 5).

Авторы выражают благодарность Н. И. Комаровой за проведение микроколоночной хроматографии, Д. Г. Кнорре за помощь в постановке задачи и ценные замечания при подготовке статьи.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горшкова И. И., Чимитова Т. А. В кн.: Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983, с. 56—86.
2. Кнорре Д. Г., Власов В. В. Успехи химии, 1985, т. 54, вып. 9, с. 1420—1447.
3. Невинский Г. А., Подуст В. Н., Ходырева С. Н., Горшкова И. И., Лаврик О. И. Молекуляр. биология, 1984, т. 18, вып. 5, с. 1311—1315.
4. Budker V. G., Knorre D. G., Kravchenko V. V., Lavrik O. I., Nevinsky G. A., Terlova N. M. FEBS Lett., 1974, v. 49, № 2, p. 159—162.
5. Gimauldinova O. I., Karpova G. G., Knorre D. G., Kobetz N. D. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 14, p. 3465—3481.
6. Бунева В. Н., Мустафина О. В. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук, 1984, № 11, вып. 4, с. 99—101.
7. Richards F. M., Wysocky H. W. In: The Enzymes. V. 4/Ed. Boyer P. D. N. Y.—L.: Acad. Press, 1971, p. 647—806.
8. Irie M., Watanabe H., Ohgi K., Tobe M., Matsumura G., Arata Y., Hirose T., Inayama S. J. Biochem., 1984, v. 95, № 3, p. 751—759.
9. Гринева Н. И., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Т., Чимитова Т. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 210—213.
10. Pares X., Llorens R., Arus C., Cuchillo C. M. Eur. J. Biochem., 1980, v. 105, № 3, p. 571—579.
11. Meek J. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1980, v. 77, № 3, p. 1632—1636.
12. Levina N. B., Nazimov I. V. J. Chromatogr., 1984, v. 286, № 1, p. 207—216.
13. Taborisky G. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 10, p. 2652—2656.
14. Crook E. M., Mathias A. P., Rabin B. R. Biochem. J., 1960, v. 74, № 2, p. 234—238.
15. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. Н. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886—894.
16. Baram G. J., Grachev M. A., Komarova N. I., Perelroyzen M. P., Bolvanov Yu. A., Kuzmin S. V., Kargaltser V. V., Kuper E. A. J. Chromatogr., 1983, v. 264, p. 69—90.
17. Бунева В. Н., Кнорре Д. Г., Пача И. О. Биохимия, 1980, т. 45, вып. 6, с. 1004—1009.
18. Irie M., Mikami F., Momma K., Ohgi K., Watanabe H., Yamaguchi R., Nagase H. J. Biochem., 1984, v. 96, № 1, p. 89—96.

Поступила в редакцию  
7.VIII.1985  
После доработки  
28.X.1986

#### PLURALITY OF RNase AFFINITY MODIFICATION ON ITS ALKYLATION WITH 5'-DEOXYRIBODINUCLEOTIDE REACTIVE DERIVATIVE

BARAM G. I., BUNEVA V. N., DOBRIKOVA E. Yu., PETROV V. N.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Branch  
of the Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

The interaction of pancreatic RNase with 5'-deoxyribodinucleotide alkylating derivative, 4-(N-2-chloroethyl-N-methylamino)benzylamide of d(pTpA) d[(ClRCH<sub>2</sub>NH)pTpA], was studied. The unreactive oxyanalogue d[(HORCH<sub>2</sub>NH)pTpA] was shown to act as competitive inhibitor of cCMP hydrolysis by RNase. d[(ClRCH<sub>2</sub>NH)pTpA] irreversibly inactivated RNase. A protective effect was exerted by d(pTpA) and d[(HORCH<sub>2</sub>NH)pTpA]. The modification, although having an affinity character, was not accompanied by total inactivation of the enzyme. It was supposed that covalent bonding between the reagent and enzyme induced the dinucleotide displacement from the recognition site. The formation of four RNase monolabeled forms retaining the activity in the hydrolysis of cCMP and poly(U) was demonstrated.