



УДК 577.113.4/6

КОМПЛЕМЕНТАРНО-АДРЕСОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ И РАСЩЕПЛЕНИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА ДНК С ПОМОЩЬЮ АЛКИЛИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

*Бросалина Е. Б., Власов В. В., Кутявин И. В.,
Мамаев С. В., Плетнев А. Г., Подыминов М. А.*

*Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР*

Исследована химическая модификация 303-нуклеотидного одноцепочечного фрагмента ДНК алкилирующими производными олигонуклеотидов, несущими 4-[N-метил, N-(2-хлорэтил)]аминобензильную группу на 5'-концевом фосфате или 3'-концевом остатке рибозы. Показано, что в условиях образования комплекса с фрагментом ДНК оба вида производных специфично алкилируют нуклеотиды фрагмента ДНК, расположенные непосредственно вблизи участков, комплементарных олигонуклеотиду — носителю реакционноспособных групп. Алкилирование протекает с высокой эффективностью, фрагмент ДНК может быть специфично расщеплен по положениям алкилированных нуклеотидов.

Модификация нуклеиновых кислот реакционноспособными производными олигонуклеотидов, образующих комплементарные комплексы с определенными нуклеотидными последовательностями (комплементарно-адресованная модификация), была предложена как подход к направленному химическому воздействию на определенные участки структуры нуклеиновых кислот и на определенные нуклеиновые кислоты [1–4]. Потенциальные приложения этого подхода описаны в обзорах [5, 6]. В экспериментах по модификации рибосомных РНК и денатурированных ДНК производными олигонуклеотидов, несущими 4-[N-метил, N-(2-хлорэтил)]-аминобензильные группы, была показана высокая эффективность в реакциях алкилирующих олигонуклеотидных производных с комплементарными им последовательностями нуклеиновых кислот [3, 4]. Исследование модификации дрожжевой тРНК производным олигонуклеотида pdCpGprACHrCl , несущим на 3'-конце алкилирующую группировку, позволило установить, что такие олигонуклеотидные реагенты направленно алкилируют нуклеотиды матрицы в положении 3, считая от 3'-конца алкилирующего олигонуклеотида [7]. Дезоксирибополинуклеотиды могут быть расщеплены по положениям алкилированных пуринов [8] и цитидина [9], поэтому комплементарно-адресованная модификация алкилирующими производными олигонуклеотидов может рассматриваться как подход к направленной фрагментации ДНК [10].

Наиболее удобными моделями для детального изучения процессов комплементарно-адресованной модификации являются меченные ^{32}P по концам фрагменты одноцепочечных ДНК [11, 12]. В случае алкилирующих комплементарно-адресованных реагентов положение точек модификации и эффективность модификации в таких моделях могут быть легко определены путем расщепления полинуклеотидов по этим точкам и анализа полученных фрагментов электрофорезом. Целью настоящей работы было исследование комплементарно-адресованной модификации производными олигонуклеотидов, несущими алкилирующие группы CHrCl или ClrCH_2NH , одноцепочечного 303-нуклеотидного фрагмента ДНК, со-

Сокращения: $\text{CHrCl} = -\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$; $\text{ClrCH}_2\text{NH} = \text{ClCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2\text{NH}-$.

1
 GATCC GTCGA GCTGC AGGGG GGGGG GGGGG GGGGT TGCTC AGGGT GAGGC 50
 GGAAA AGAGT CGACC CAACC TTCCG CCGGC CGTCA CTGGC ACAGG CTGGA 100
 CAGCA AAAGG GCAGA TCACA GTGCT GGACA TGCAC CCAGG CTCTG GGAAG 150
 ACCCA CAGAG TCCTC CCGGA GCTCA TTCGC CAATG CATTG ACAGA CGCCT 200
 AAGGA CATTG GTGTT GGCCC CAACC CGTGT GGTGC TTAAG GAAAT GGAGC 250
 GTGCC TTGAA TGGGA AGAGG GTCAG GTTCC ATTCT CCTGC AGGCT CGACG GAT 300

Рис. 1. Структура фрагмента ДНК, использовавшегося в качестве модели для изучения комплементарно-адресованной модификации алкилирующими производными олигонуклеотидов. Подчеркнута последовательность, к участкам которой были комплементарны использовавшиеся олигонуклеотидные реагенты



Рис. 2. Алкилирующие олигонуклеотидные производные (I)–(VI) и комплементарная последовательность фрагмента ДНК. Стрелками указаны обнаруженные места преимущественного алкилирования фрагмента этими производными

ответствующего по своей первичной структуре участку РНК вируса клещевого энцефалита (рис. 1).

Алкилирующие олигонуклеотидные производные, с помощью которых осуществлялась модификация (I–VI, рис. 2), были комплементарны последовательности, которая не вовлекается в спирализованные участки вероятных вторичных структур фрагмента, по оценкам, проведенным по методу, описанному в работе [13].

Алкилирование ³²P-меченого фрагмента ДНК олигонуклеотидными производными проводили в буфере 0,01 М трис-HCl (рН 7,6), 0,1 М NaCl, 0,001 М EDTA (А). Модифицированный фрагмент обрабатывали пиперидином для расщепления по положениям алкилированных пуринов [8] и получающиеся фрагменты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле (рис. 3, 4). При 37°С олигонуклеотидные производные (I)–(III) и (VI) эффективно модифицировали фрагмент ДНК. Производное октануклеотида (IV) модифицировало фрагмент при 10 и 25°С, тогда как при 37°С реакции не наблюдалось. Производное гексануклеотида (V) не вступало в реакцию с фрагментом в интервале температур 10–37°С. Очевидно, описанные эффекты связаны с различиями в стабильности комплексов, образуемых олигонуклеотидными производными различной длины с матричным фрагментом ДНК. Введение в реакционную смесь олигонуклеотидов, соответствующих по структуре адресующей нуклеотидной последовательности реагентов, подавляет реакцию матричного фрагмента ДНК с олигонуклеотидными производными (рис. 5), очевидно, вследствие конкуренции за участок связывания.

Представленные на рис. 3 и 4 и в таблице данные демонстрируют высокую степень направленности комплементарно-адресованной модификации. Алкилирование фрагмента-мишени производными, несущими группы CIRCH₂NH, протекает непосредственно вблизи 5'-концевого нуклеотида алкилирующих производных. Если в этом положении находятся высоко-реакционноспособные пуриновые нуклеотиды, как в случае реагентов (I), (III), (IV), реакция протекает практически только по ним и фрагмент ДНК расщепляется в этих положениях при обработке пиперидином. В случае реагента (II) реакция направлена на остаток цитидина и образовавшиеся

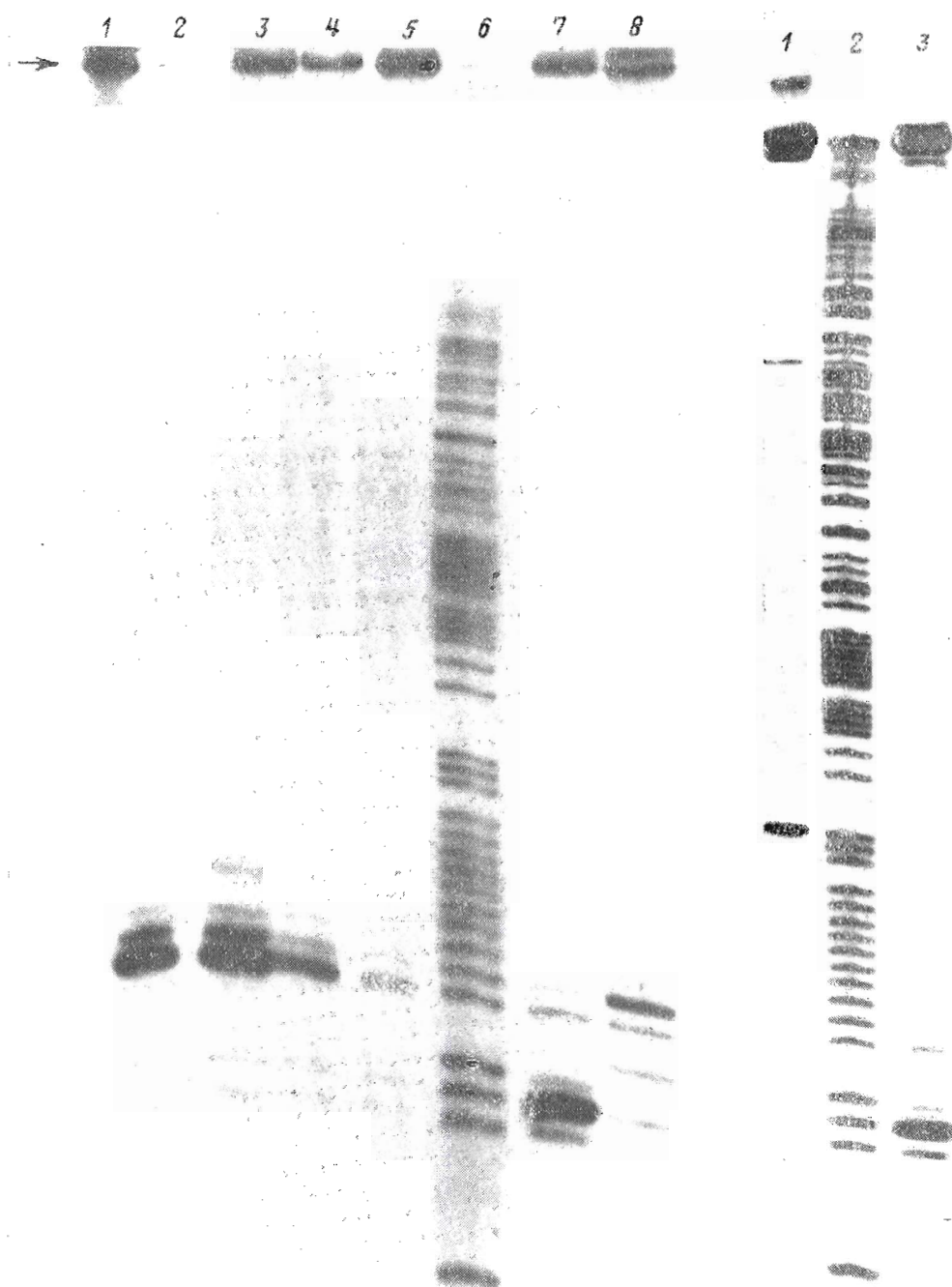


Рис. 3

Рис. 4

Рис. 3. Результаты электрофоретического анализа продуктов расщепления фрагмента ДНК после алкилирования олигонуклеотидными производными (I)–(III) (37°C , 1 ч) и обработки пиперидином: 1 – контрольная инкубация фрагмента в отсутствие реагентов; 2–5 – реагент (III) при концентрации 10^{-5} , $1,5 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-7}$ и $6 \cdot 10^{-8}$ М соответственно; 6 – частичное расщепление фрагмента по пуриновым основаниям; 7 – реагент (I) при концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М; 8 – реагент (II) при концентрации $4,5 \cdot 10^{-7}$ М. Стрелкой показано положение исходного фрагмента ДНК

Рис. 4. Результаты электрофоретического анализа продуктов расщепления фрагмента ДНК после алкилирования производными (I) и (VI) (37°C , 1 ч) и обработки пиперидином: 1 – реагент (VI) при концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М; 2 – частичное расщепление фрагмента по пуриновым основаниям; 3 – реагент (I) при концентрации $4 \cdot 10^{-7}$ М

Относительные реакционные способности отдельных нуклеотидов фрагмента ДНК при модификации различными алкилирующими производными олигонуклеотидов, по данным анализа продуктов расщепления фрагмента (рис. 3, 4) *

Реагент для модификации	G ¹⁷⁹	G ²⁵⁸	G ²⁶⁷	A ²⁶⁸	G ²⁶⁹	G ²⁷⁰	G ²⁷¹	T ²⁷²	G ²⁷³	A ²⁷⁴	G ²⁷⁵	G ²⁷⁶
(I)	0,001	0,003					0,05	0,006	0,012	0,1	1	0,2
(II)					0,03	0,22	0,11	0,001	1 **	0,005	0,07	0,03
(III)			0,02	0,008	0,13	0,3	1	0,001				
(VI)	0,3	1	0,004	0,005								

* За единицу принимали интенсивность расщепления по наиболее эффективно модифицированному нуклеотиду. Реакционная способность остальных (не приведенных в таблице) нуклеотидов фрагмента составила менее 0,001.

** По сумме количеств продукта алкилирования фрагмента ДНК по нуклеотиду G²⁷³ и фрагмента, образующегося при расщеплении алкилированной ДНК по этому звену.

алкилированное производное было стабильно в условиях обработки пиперидином. Расщепление в этом случае удалось провести путем обработки гидразином и пиперидином [9]. Модификация производным (VI), несущим группу CH₂Cl на 3'-конце, протекает в основном по третьему нуклеотиду матрицы, считая от 3'-конца алкилирующего реагента, что находится в соответствии с данными работы [7].

При модификации олигонуклеотидными производными (I) — (IV) реакция с фрагментом протекает исключительно вблизи целевой нуклеотидной последовательности. Неспецифической модификации фрагмента не наблюдалось даже при использовании высоких (до $3 \cdot 10^{-5}$ М) концентраций олигонуклеотидных производных. В случае реагента (VI) помимо реакции в целевом участке фрагмента ДНК наблюдалась намного менее интенсивная, но специфическая и воспроизводимая модификация остатка гуанозина (G¹⁷⁹), значительно удаленного от целевой последовательности. Выяснение природы этого эффекта, очевидно обусловленного пространственной структурой фрагмента, требует дополнительных исследований. Аналогичный эффект отмечен в работе [11], в которой не удалось осуществить комплементарно-адресованную модификацию фрагмента ДНК бактериофага M13 алкилирующим производным комплементарного олигонуклеотида в выбранной авторами области, но наблюдалось алкилирование нуклеотидов фрагмента в определенной его последовательности, удаленной от предполагаемого участка связывания олигонуклеотидного производного.

Данные о кинетике модификации фрагмента ДНК олигонуклеотидными производными и зависимость степени модификации фрагмента от концентрации олигонуклеотидных реагентов (рис. 6, 7) свидетельствуют о том, что при использовании достаточно высоких концентраций алкилирующих олигонуклеотидных производных высокие степени модификации могут быть достигнуты за время порядка времен полупревращения алкилирующих групп в активные промежуточные частицы [14, 15]. Так, при концентрации реагента (III) $5 \cdot 10^{-5}$ М за 1 ч при 37° С степень модификации фрагмента составляет $>70\%$. В этих условиях в соответствии с константой скорости ионизации реагента $k = 3,0 \pm 0,15 \cdot 10^{-4}$ с⁻¹ [15] в активную частицу могло превратиться не более 50—60% реагента. Очевидно, в данных условиях происходит обмен между связанным в комплексе производным (III) и свободным производным (III), находящимся в растворе. Вследствие этого реакция протекает не только с ионизовавшимися в комплексе молекулами реагента, но и с молекулами, которые связываются в комплекс после ионизации в растворе.

В экспериментах по модификации фрагмента ДНК алкилирующими производными олигонуклеотидов мы не наблюдали резкого ускорения реакции алкилирования, которое было обнаружено в реакциях олигонуклеотидов с комплементарно-адресованными реагентами, несущими группы CH₂Cl [16]. Вероятно, описанный эффект характерен лишь для некоторых особых состояний олигонуклеотидных комплексов.

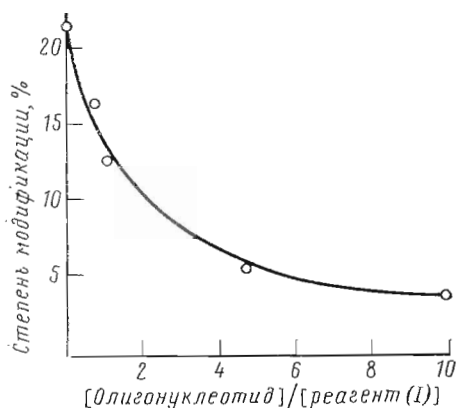


Рис. 5

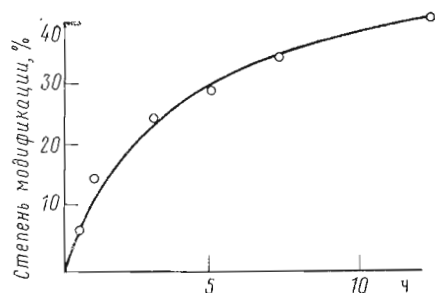


Рис. 6

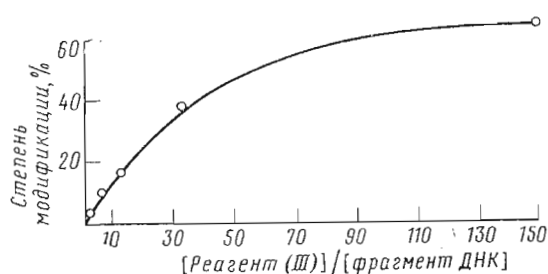


Рис. 7

Рис. 5. Ингибирование реакции алкилирования фрагмента ДНК реагентом (I) ($2 \cdot 10^{-7}$ М, 37°C , 1 ч) при различных соотношениях олигонуклеотид $\text{dpTGACCCTCTT} \cdot \text{CCCGA}$ /реагент (I)

Рис. 6. Кинетическая кривая алкилирования фрагмента ДНК реагентом (III) при 37°C . Концентрации фрагмента ДНК и реагента составляли $1,5 \cdot 10^{-8}$ и $1,5 \cdot 10^{-7}$ М соответственно

Рис. 7. Зависимость степени алкилирования фрагмента ДНК ($1,5 \cdot 10^{-8}$ М) реагентом (III) от его концентрации. Реакция проводилась 1 ч при 37°C

Согласно рис. 3, 6, 7, за счет комплементарно-адресованного алкилирования при использовании достаточно высоких концентраций реагентов можно получить определенные фрагменты ДНК с выходами 60–70%. При таких выходах в реакциях расщепления можно реально рассматривать комплементарно-адресованную модификацию алкилирующими производными как подход к направленной фрагментации ДНК, как это предлагалось в работе [10]. Полученные в настоящей работе результаты, а также данные работы, в которой была осуществлена комплементарно-адресованная модификация другого одноцепочечного фрагмента ДНК алкилирующим производным олигонуклеотида, несущим группу ClRCH_2NH [12], показывают, что с помощью алкилирующих производных олигонуклеотидов можно провести модификацию одноцепочечных полинуклеотидов по положениям отдельных оснований и с высоким выходом.

Экспериментальная часть

В работе использовали акриламид, N,N-метиленбисакриламид, трис, dNTP (Serva, ФРГ), рестриктазу *Bam*HI (Научно-производственное объединение «Фермент», Вильнюс). Обращенно-фазовую хроматографию проводили на колонках с сорбентом Lichrosorb 5-C18 (Merck, ФРГ). Остальные реактивы были квалификации ос.ч. или х.ч.

Фрагмент ДНК, соответствующий по структуре участку РНК вируса клещевого энцефалита, был клонирован в *E. coli* JM103 в составе ДНК бактериофага M13mp7 следующим образом. Ранее с помощью обратной транскриптазы были получены ДНК-копии участков генома вируса кле-

щего энцефалита, которые были клонированы в клетках *E. coli* K802 с помощью плазмиды pBR 322*. Из ДНК одной из рекомбинантных плазмид была выделена ДНК-вставка путем гидролиза эндонуклеазой рестрикции *Pst*I. Этот фрагмент, структура которого была установлена методом Максама — Гилберта [8] (рис. 1), лигировали с помощью ДНК-лигазы фага T4 с репликативной формой ДНК M13mp7, полученной обработкой исходной ДНК рестриктазой *Pst*I. Смесь после лигирования трансформировали клетки JM 103. Рекомбинанты были отобраны по гибридизации с исходной ³²P-меченой ДНК-копией вирусной РНК. Одноцепочечные ДНК гибридных бактериофагов M13mp7 содержат комплементарные последовательности, обрамляющие фрагменты-вставки, и в них образуются двухцепочечные участки с сайтом гидролиза эндонуклеазой *Bam*HI [17]. Обработка этим ферментом позволила выщеплять фрагмент-вставку, который далее метилили с 3'-концу с помощью ДНК полимеразы I (фрагмент Кленова) и [α -³²P] дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Меченый фрагмент выделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, электроосаждения и осаждения 2% раствором LiClO₄ в ацетоне.

Олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы триэфирным методом, описанным ранее [18]. Алкилирующие производные олигонуклеотидов, несущие группы CH₂Cl на 3'-конце, были синтезированы согласно [19], а производные, несущие группы CH₂CH₂NH на 5'-конце, — согласно [20]. Олигонуклеотидные производные очищали обращенно-фазовой хроматографией на колонках с сорбентом Lichrosorb 5-C18 в градиенте концентрации ацетонитрила.

Рекомбинантный бактериофаг выращивали 12 ч в 1 л среды 2YT при 37° С при сильной аэрации. Клетки отделяли центрифугированием (4000g, 30 мин) при 5° С. К супернатанту добавляли полиэтиленгликоль 6000 до концентрации 5% и NaCl до 0,5 М и смесь выдерживали 30 мин при 4° С. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (10 000g, 30 мин, 5° С). Бактериофаг растворяли в 50 мл 0,01 М трис-HCl (pH 7,8), 0,01 М NaCl, 0,01 М EDTA, добавляли тритон X-100 до концентрации 0,1% и инкубировали 30 мин при 37° С. После окончания инкубации проводили центрифугирование (20 000g, 30 мин, 25° С) и супернатант обрабатывали фенолом. ДНК осаждали этанолом, осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали 70% этанолом, сушили, растворяли в 10 мл 0,01 М трис-HCl (pH 8,0), 0,001 М EDTA.

Для получения меченого фрагмента 50 мкл раствора рекомбинантной ДНК (40 мкг) обрабатывали 2 ч при 37° С 100 ед. акт. рестриктазы *Bam*HI в буфере 0,01 М трис-HCl (pH 7,5), 0,01 М MgCl₂, 0,05 М NaCl, 0,1 мМ меркаптоэтанол. После гидролиза в смесь добавляли [α -³²P]dATP (50 мкКи), dGTP и TTP до концентрации 0,1 мМ и 5 ед. акт. ДНК полимеразы I (фрагмент Кленова). Смесь инкубировали 20 мин при 20° С. После окончания инкубации добавляли 5 мкл 50% глицерина, содержащего 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленцианола голубого, наносили на 4% полиакриламидный гель и проводили электрофорез 2 ч при напряжении 20 В/см. Положение меченого фрагмента определяли радиоавтографией. Соответствующий участок геля вырезали и выделяли фрагмент электроосаждением на диализную мембрану.

Для частичной фрагментации ДНК по положениям пуриновых нуклеотидов к 20 мкл раствора ³²P-меченого фрагмента в воде добавляли 40 мкл 3% дифениламина в 99,8% муравьиной кислоте и инкубировали смесь 20 мин при 20° С [21]. После этого к смеси добавляли 40 мкл воды и экстрагировали дифениламин диэтиловым эфиром (2×1 мл). ДНК осаждали добавлением к раствору 10-кратного объема 2% LiClO₄ в ацетоне. Осадок ДНК дважды промывали спиртом, высушивали в вакууме, растворяли в 5 мкл формамида, содержащего 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленцианола голубого, и наносили на полиакриламидный гель.

Алкилирование фрагмента ДНК проводили при 37° С в 20 мкл буфера А. Концентрация ДНК в реакционных смесях составляла 1,5·10⁻⁸ М; концент-

* Данные будут опубликованы отдельно.

рации олигонуклеотидных производных $1 \cdot 10^{-8}$ – $5 \cdot 10^{-5}$ М. Алкилирование фрагмента ДНК производными гекса- и октануклеотидов проводили 12 ч при 25° С или 72 ч при 10° С. Реакцию останавливали добавлением 20-кратного по отношению к реакционной смеси объема 2% раствора LiClO_4 в ацетоне. Осадок ДНК отделяли центрифугированием, промывали спиртом и высушивали в вакууме. Для определения положений точек модификации осадок растворяли в 30 мкл 1 М пиперидина и инкубировали 15 мин при 100° С. После обработки пиперидином ДНК осаждали 20-кратным объемом 2% LiClO_4 в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали этанолом, сушили в вакууме, растворяли в 5 мкл формамида с красителями. Продукты расщепления фрагмента ДНК анализировали электрофорезом в 10% полиакриламидном геле ($30 \times 40 \times 0,04$ см) при напряжении 50 В/см в течение 3 ч. Гель радиоавтографировали на пленку РМ-1. Для определения количества полученных после расщепления отдельных фрагментов вырезали соответствующие участки геля и измеряли их радиоактивность по Черенкову. Отношение количества радиоактивности, содержащейся в участках геля, соответствующих расщеплению по отдельным основаниям, к общему количеству радиоактивности в дорожке геля, умноженное на 100, принимали за степень модификации по данному основанию. На основании этих данных была рассчитана степень модификации фрагмента ДНК в опытах по ингибированию реакции алкилирования (рис. 5), измерению кинетики алкилирования (рис. 6) и зависимости степени алкилирования от концентрации реагента (рис. 7).

Авторы выражают благодарность С. Х. Дегтяреву за предоставленный препарат ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова).

ЛИТЕРАТУРА

1. Belikova A. M., Zarytova V. F., Grineva N. I. Tetrahedron Lett., 1967, p. 3557–3562.
2. Grineva N. I. В кн.: Аффинная модификация биополимеров/Ред. Кнорре Д. Г. Новосибирск: Наука, 1983, с. 187–211.
3. Grineva N. I. Биохимия, 1977, т. 42, № 2, с. 370–374.
4. Кнорре Д. Г. Молекулярн. биология, 1977, т. 11, № 7, с. 1304–1310.
5. Summerton J. J. Theor. Biol., 1979, v. 78, № 1, p. 77–99.
6. Кнорре Д. Г., Власов В. В. Вестн. АН СССР, 1983, № 12, с. 74–81.
7. Grineva N. I., Karpova G. G., Kuznetsova L. M., Venkstern T. V., Bayev A. A. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 5, p. 1609–1631.
8. Maxam A. M., Gilbert M. In: Meth. in Enzymol./Eds Grossman L., Moldave K. N. Y.—L.: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499–560.
9. Kirkegaard K., Bue H., Spassky A., Wand J. G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983, v. 80, № 9, p. 2544–2548.
10. Grineva N. I. Вестн. АН СССР, 1981, № 1, с. 83–93.
11. Грачев М. А., Ошевский С. И. Докл. АН СССР, 1983, т. 272, № 5, с. 1259–1262.
12. Vlassov V. V., Gorn V. V., Grachev S. A., Gaydamakov S. A. FEBS Lett., 1985, v. 182, № 2, p. 415–418.
13. Колчанов Н. А., Соловьев В. В., Жарких А. А. Докл. АН СССР, 1963, т. 273, № 3, с. 741–745.
14. Власов В. В., Grineva N. I., Кнорре Д. Г. Изв. СО АН СССР. Сер. хим. н., 1969, № 2, вып. 1, с. 104–109.
15. Grineva N. I., Ломакина Т. С., Тигеева Н. Г., Чимитова Т. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 2, с. 210–214.
16. Гори В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, № 3, с. 613–615.
17. Ratton J. R., Chae C. B. Analyt. Biochem., 1982, v. 126, № 1, p. 231–234.
18. Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 2, с. 224–230.
19. Гори В. В., Карпова Г. Г., Кнорре Д. Г., Кутявин И. В., Пичко Н. П. Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 9, с. 1225–1232.
20. Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. И. Биоорг. химия, 1979, т. 5, № 6, с. 886–894.
21. Коробко В. Г., Грачев С. А. Биоорг. химия, 1977, т. 3, № 10, с. 1420–1422.

Поступила в редакцию
5.VII.1985

COMPLEMENTARY ADDRESSED MODIFICATION AND SCISSION
OF A SINGLE-STRANDED DNA FRAGMENT WITH ALKYLATING
OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES

BROSALINA E. B., VIASSOV V. V., KUTIAVIN I. V., MAMAEV S. V., PLETNEV A. G.,
PODYMINOGIN M. A.

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

Chemical modification of a 303-nucleotides long DNA fragment with alkylating oligonucleotide derivatives carrying 4-[N-methyl, N-(2-chloroethyl)]aminobenzyl groups at their 5'-terminal phosphates or at 3'-terminal deoxy ribose residues has been investigated. It was found that both types of oligonucleotide derivatives, under conditions providing their complementary interactions with the fragment, specifically alkylate nucleotides of the fragment in vicinity of sequences complementary to the derivatives. The alkylation proceeds efficiently, and the modified fragment can be splitted selectively at the alkylated nucleotide residues.