



УДК 577.113(4 + 7)

© 1990 г.

*В. Ф. Зарытова, И. В. Кутявин, С. В. Мамаев,  
М. А. Подыминогин*

**ЭФФЕКТИВНАЯ И СЕЛЕКТИВНАЯ МОДИФИКАЦИЯ  
ОДНОЦЕПЧЕЧНОГО ФРАГМЕНТА ДНК АЛКИЛИРУЮЩИМИ  
ПРОИЗВОДНЫМИ КОРОТКИХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ  
В ПРИСУТСТВИИ ЭФФЕКТОРОВ РЕАКЦИИ  
N-(2-ГИДРОКСИЭТИЛ)ФЕНАЗИНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ  
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ**

*Новосибирский институт биоорганической химии СО АН СССР*

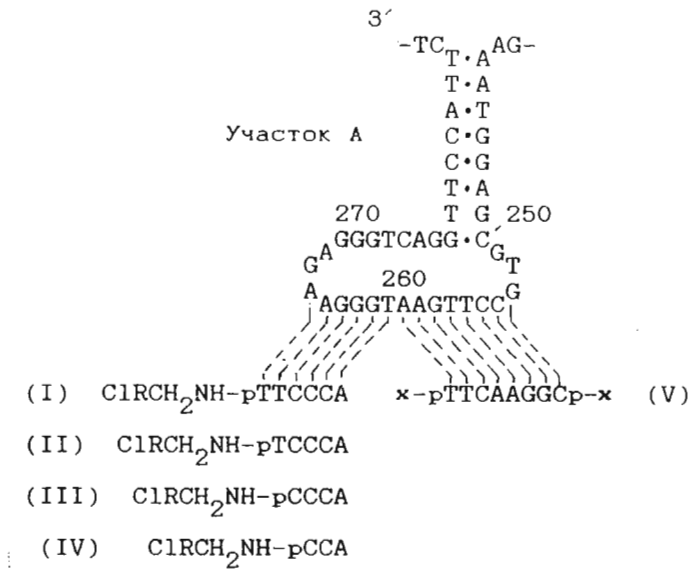
Исследована эффективность и селективность алкилирования одноцепочечного 302-членного фрагмента ДНК 5'-О-фосфорил-[4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензил]амидными производными коротких олигодезоксирибонуклеотидов в присутствии эффекторов реакции — N-(2-гидроксиэтил)феназиевых производных тетра- и октадезоксирибонуклеотидов, образующих комплементарные комплексы с участком мишени, непосредственно примыкающим к одному из нескольких сайтов узнавания реагента. Показано, что все исследованные реагенты в присутствии эффектора способны избирательно модифицировать как одноцепочечный, так и вовлеченный в образование вторичной структуры участки ДНК-мишени. Установлено, что степень модификации полинуклеотида зависит от длины адреса как реагента, так и эффектора. Наличие хотя бы одного неспаренного основания между сайтами узнавания реагента и эффектора устраняет влияние последнего на модификацию мишени. Показано, что замена одного октануклеотидного эффектора на два тетра- или пентануклеотидных лишь незначительно (с 38 до 35%) снижает эффективность модификации мишени гексануклеотидным реагентом. Для повышения эффективности модификации предложено использовать два эффектора, фланкирующих реагент на мишени с 3'- и 5'-конца цепи. Такой подход позволяет в случае гексануклеотидного реагента достигать почти количественной (89%) сайт-специфической модификации фрагмента ДНК.

Широкое внедрение метода комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот в научно-исследовательскую практику для решения таких важных задач, как направленный мутагенез, химическая рестрикция НК и избирательное подавление функциональной активности полинуклеотидов в живых клетках, возможно лишь при использовании высокоэффективных и селективных реагентов. Эффективность действия реакционноспособного производного олигонуклеотида в первую очередь определяется его комплексообразующими свойствами и может быть повышена, например, путем увеличения длины адресующей части реагента. Другим подходом к увеличению стабильности комплементарных комплексов является введение в структуру олигонуклеотида остатков интеркалирующих красителей [1—3]. В случае алкилирующих производных олигонуклеотидов наличие на 5'- или 3'-конце цепи полиароматической группировки красителя обеспечивает повышенную эффективность адресованной модификации ДНК-мишени без изменения позиционной направленности действия реагентов [4, 5].

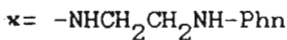
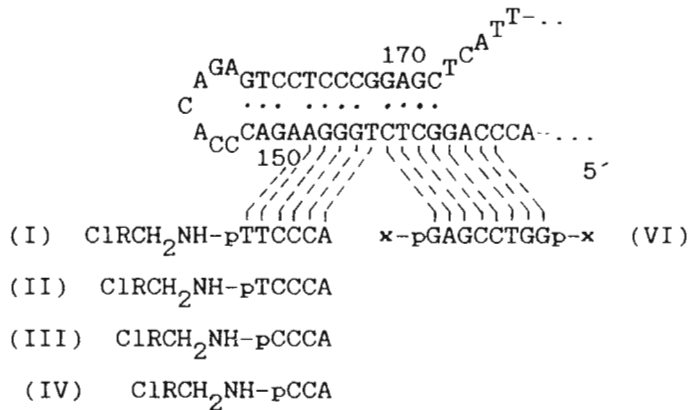
Недавно нами был предложен новый вариант комплементарно адресованной модификации НК, основывающийся на использовании в реакции в качестве эффекторов Phn-производных олигодезоксирибонуклеотидов, образующих прочные комплементарные комплексы с мишенью непосредст-

Сокращения: префикс «d» в аббревиатуре олигонуклеотидов опущен, НК — нуклеиновые кислоты; ClCH<sub>2</sub>NH— — остаток 4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)бензиламина; Phn — остаток N-(2-гидроксиэтил)феназина.

Схема 1



Участок Б



Здесь и на схемах 2, 3 пунктиром показаны комплементарные пары

венно рядом с сайтом узнавания реагента. На примере алкилирования 302-членного одноцепочечного фрагмента ДНК гексануклеотидным реагентом было показано, что этот подход позволяет значительно повысить не только эффективность, но и селективность воздействия на полинуклеотидную мишень [6, 7]. Применением соответствующего эффектора реагент был направлен в строго определенный район ДНК даже при наличии двух участков его полного комплементарного связывания. При этом оказалось возможным модифицировать последовательность мишени, вовлеченную в образование прочной шпильчатой структуры.

В настоящей работе продолжено исследование возможностей эффекторного варианта комплементарно адресованной модификации одноцепочечных ДНК. Исследована эффективность и селективность модификации

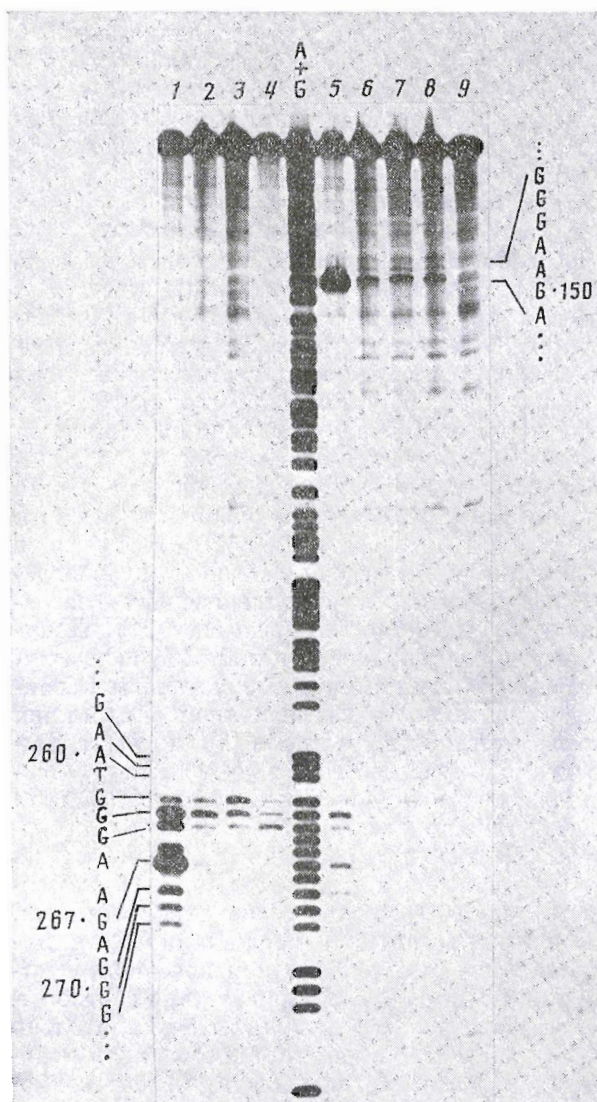


Рис. 1

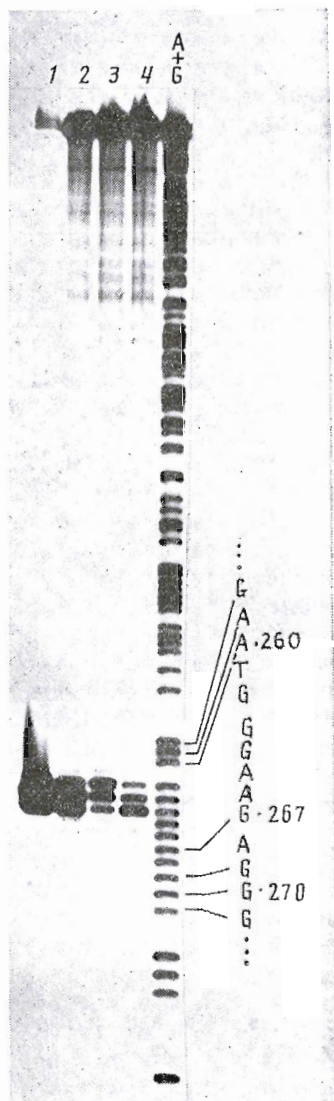


Рис. 2

Рис. 1. Электрофорез в 8% денатурирующем полиакриламидном геле продуктов пиримидинолиза фрагмента ДНК после модификации алкилирующими производными олигонуклеотидов (I)—(IV) (дорожки 1—4 и 5—8 соответственно) в присутствии олигонуклеотидных эффекторов (V) (дорожки 1—4) и (VI) (дорожки 5—8). На дорожке 9 приведены продукты модификации ДНК реагентом (I) в отсутствие эффекторов; на дорожке A + G (здесь и на рис. 2) приведены результаты статистического расщепления ДНК по остаткам пуринов (см. «Экспер. часть»). Реакционные смеси исходно содержали фрагмент ДНК в концентрации  $10^{-8}$  M, реагенты (I)—(IV) — в концентрации  $10^{-5}$  M, олигонуклеотидные эффекторы (V) и (VI) — в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Реакцию модификации проводили 24 ч при  $25^\circ\text{C}$

Рис. 2. Электрофорез в 8% денатурирующем ПААГ  $^{32}\text{P}$ -меченых продуктов модификации фрагмента ДНК алкилирующими реагентами (I)—(IV) (дорожки 1—4 соответственно). Реакционные смеси содержали дополнительно октануклеотидные эффекторы (V) и (X) в концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Концентрации реагентов и ДНК-мишени, а также условия проведения реакции модификации те же, что и в подписи к рис. 1

ДНК-мишени в зависимости от длины олигонуклеотидной части реагента и эффектора и от их комбинаций.

В качестве НК-мишени, как и ранее [6, 7], был использован 302-членный одноцепочечный фрагмент ДНК, являющийся копией фрагмента РНК вируса клещевого энцефалита. Эта нуклеотидная последовательность, как

следует из оценки по методу [8], может образовывать несколько шпилечных структур, две из которых приведены на схеме 1. Модификацию ДНК-мишени осуществляли  $\text{ClRCH}_2\text{NH}$ -производными гекса-, пента-, тетра- и тринуклеотидов (I)—(IV) (схема 1). Результаты алкилирования фрагмента ДНК указанными реагентами в присутствии октануклеотидных эффекторов (V) и (VI) приведены на рис. 1.

Как и ожидалось, из четырех исследованных реакционноспособных производных олигонуклеотидов наиболее эффективно алкилирует ДНК-фрагмент гексануклеотидный реагент (I). Для этого соединения уровень адресованной химической рестрикции\* мишени по основаниям участка А (схема 1) достигает 38%, тогда как для реагентов (II), (III) и (IV) аналогичная величина составляет 23, 6 и 8% соответственно. Второй сайт комплементарного связывания (участок Б, схема 1), общий для всех четырех реагентов, вовлечен в образование прочной шпилечной структуры. Как уже отмечалось ранее [6, 7], это может быть основной причиной снижения эффективности действия реагентов на фрагмент ДНК в этом районе. Например, уровень адресованной рестрикции по основаниям участка Б для гексануклеотидного реагента почти в 2 раза ниже аналогичной величины, полученной при модификации участка А, и составляет 20%. Отчетливо регистрируются продукты адресованной деструкции мишени по основаниям  $\text{G}^{145}$  —  $\text{G}^{150}$  и в случае более коротких олигонуклеотидных реагентов (II)—(IV), однако эффективность их действия не превышает 5%. Полученные значения эффективности адресованной рестрикции в участках А и Б в основном коррелируют с ожидаемыми комплексообразующими свойствами реагентов. Сопоставляя эффективность направленной рестрикции мишени реагентами (I)—(IV) в присутствии эффекторов (V) и (VI) и учитывая определенную труднодоступность участка Б для модификации, можно отметить лишь непропорционально низкую эффективность действия реакционноспособного соединения (II) в присутствии эффектора (VI). Важно отметить также, что фрагмент ДНК подвергается хотя и очень низкоэффективной, но тем не менее отчетливо регистрируемой (рис. 1) адресованной модификации в случае самого короткого из исследованных, тринуклеотидного реагента (IV), причем направленное алкилирование мишени этим соединением обнаруживается не только в одноцепочечном участке А (8%), но и в двуцепочечном участке Б (5%) в присутствии соответствующего октануклеотидного эффектора. Эти результаты убедительно демонстрируют возможность предложенного варианта адресованной модификации НК [6, 7] для повышения эффективности действия реагентов с коротким олигонуклеотидным адресом, так как в отсутствие октануклеотидных эффекторов (V) и (VI) в выбранных условиях реакции направленное алкилирование фрагмента ДНК невозможно не только тринуклеотидным, но даже более длинным, гексануклеотидным реагентом.

По мере уменьшения длины олигонуклеотидного адреса в реагентах (I)—(IV) в связи с удалением реакционноспособной 2-хлорэтиламиногруппы в комплементарном комплексе мишень  $\dagger$  реагент от одних нуклеофильных центров ДНК и приближения к другим (схема 1) закономерно меняется позиционная направленность алкилирования полинуклеотида. Наиболее отчетливо это видно при модификации оснований мишени в участке А (рис. 1). Так, например, если гексануклеотидный реагент (I) преимущественно алкилирует основание  $\text{G}^{267}$  в присутствии эффектора (V), то в случае реагентов (II), (III) и (IV) в аналогичных условиях максимум модификации приходится на основания  $\text{G}^{263}$ ,  $\text{G}^{262}$  и  $\text{G}^{264}$  соответственно.

Важным следствием использования эффекторного варианта при комплементарно адресованной модификации одноцепочечных НК является возможность повышения не только эффективности, но и селективности действия реагентов с коротким олигонуклеотидным адресом [6, 7]. Из представленных на рис. 1 данных видно, что применение соответствующего эффектора позволяет направлять реагенты (I)—(IV) в определенный район полинуклеотидной мишени даже при наличии нескольких участков их

\* Адресованной рестрикцией (или модификацией) в работе считали расщепление по основаниям  $\text{G}^{262}$  —  $\text{G}^{267}$  (участок А) или  $\text{G}^{145}$  —  $\text{G}^{150}$  (участок Б).

полного комплементарного связывания. Если для гекса-, пента- и тетра-нуклеотидных реагентов контекстный анализ структуры ДНК обнаруживает лишь два сайта их полного комплементарного связывания (участки А и Б, схема 1), то в случае тринуклеотидного реагента таких участков уже девять. Тем не менее присутствующий в реакционной смеси олигонуклеотидный эффектор позволяет устранить поливариантность модификации тринуклеотидного реагента с ДНК-мишенью. Следует отметить, однако, что в выбранных условиях модификации несколько нарушена селективность действия гексануклеотидного реагента (I) в присутствии эффектора (VI). В этом случае наряду с интенсивной адресованной модификацией оснований мишени в участке Б обнаруживается низкоэффективная, но тем не менее отчетливо регистрируемая (рис. 1) неадресованная модификация в участке А. Однако, согласно данным предыдущих исследований [6, 7], снижение в реакционной смеси концентрации эффектора (VI) на порядок восстанавливает абсолютную селективность действия реагента (I).

Стабильность комплекса с одноцепочечным разрывом, образуемого реагентом и олигонуклеотидным эффектором с соответствующим участком полинуклеотида, а следовательно, и эффективность воздействия на мишень во многом определяется комплексообразующими свойствами эффектора. В предыдущих работах [6, 7] было показано, что эффективные свойства олигонуклеотидов зависят от наличия в их структуре ковалентно связанных остатков Phn, стабилизирующих комплексы НК [3—5]. Комплексообразующие свойства эффекторов определяются также длиной олигонуклеотидной части молекулы. Например, замена октануклеотидного эффектора (V) на тетрануклеотидный эффектор (VII) (схема 2) при сохранении всех других условий реакции модификации мишени гексануклеотидным реагентом (I) приводит к снижению эффективности адресованной рестрикции в участке А с 38 до 8%. Однако, если один октануклеотидный эффектор (V) заменить в реакции на два тетрануклеотидных эффектора (VIII) и (IX), образующих на мишени непрерывный дуплексный блок (схема 2), примыкающий к 3'-концевой части реагента (I), то эффективность адресованной рестрикции в участке А практически не уменьшается и составляет 35%. Этот результат представляется важным, поскольку использование очень коротких Phn-производных олигонуклеотидов может во многом облегчить процедуру направленной химической модификации НК, например посредством создания банка всех возможных тетрануклеотидных эффекторов.

Во всех приведенных выше примерах адресованной модификации ДНК олигонуклеотидные эффекторы располагаются со стороны 3'-концевой части реагента при образовании комплекса с мишенью (схемы 1 и 2). Можно было ожидать проявления эффекторных свойств и от Phn-производных олигонуклеотидов, имеющих сайт комплементарного связывания с мишенью, расположенный со стороны 5'-конца реагента. Действительно, введение в реакционную смесь ДНК-фрагмент + реагент (I) + эффектор (V) еще одного октануклеотидного эффектора (X) (см. схему 3) приводит к практически количественной адресованной модификации полинуклеотидной мишени (рис. 2), и уровень химической рестрикции фрагмента ДНК по основаниям G<sup>262</sup>—G<sup>267</sup> достигает 89%. В сравнении с ситуацией, когда в аналогичной реакции используется только один эффектор (V), эффективность адресованного алкилирования увеличивается более чем на 50%.

Наблюдаемый феномен можно объяснить значительной стабилизацией комплекса реагента (I), зажатого на мишени между двумя олигонуклеотидными эффекторами. То, что дуплекс 3',5'-ди-Phn-производного октануклеотида (X) на мишени в совокупности с дуплексом гексануклеотидного реагента (I) могут образовывать непрерывную стопку оснований, весьма существенно для реализации эффекторных свойств соединения (X). Наличие хотя бы одного неспаренного основания ДНК-мишени между дуплексными структурами реагента и эффектора устраняет влияние последнего на адресованную модификацию НК. Например, при замене гексануклеотидного реагента (I) (схема 3) на пента-, тетра- и тринуклеотидный реагенты (II)—(IV) уровень адресованной рестрикции составляет 25,9

Схема 2

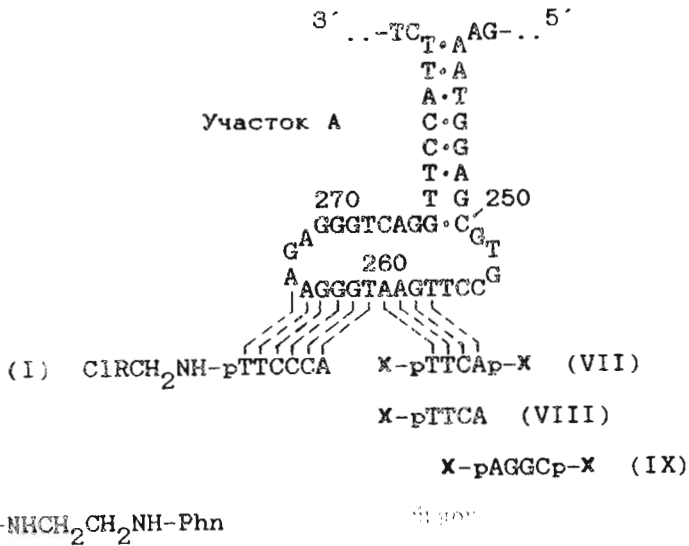
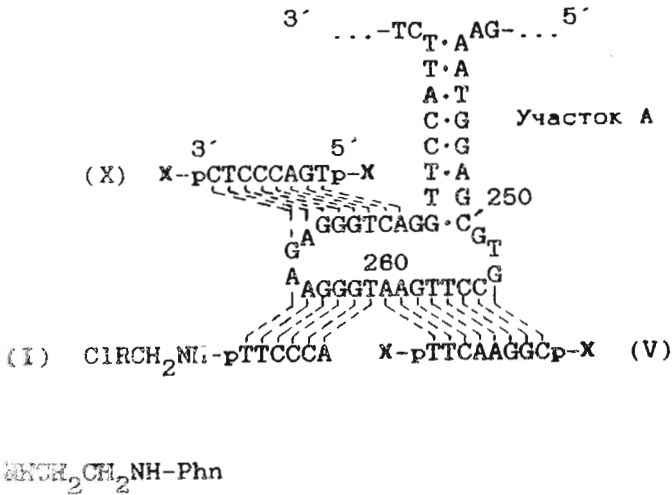


Схема 3



и 7% соответственно (рис. 2) и практически не отличается от соответствующих величин (23, 6 и 8%), полученных для этих реакционноспособных соединений в присутствии одного эффектора (V).

Влияние октануклеотидного эффектора (X) на реакцию модификации ДНК-фрагмента сказывается не только на эффективности действия реагента (I), но и на его позиционной направленности алкилирования. Проявляется это в том, что эффектор (X) полностью блокирует модификацию оснований фрагмента ДНК в участке А, которые входят в структуру сайта его комплементарного связывания (ср. рис. 1 и 2). В результате интенсивному алкилированию подвергаются остатки G<sup>262</sup>-G<sup>264</sup> мишени, участвующие в образовании комплекса с реагентом (I).

Совокупность полученных данных свидетельствует о возможности использования эффекторного варианта комплементарно адресованной модификации для направленного воздействия не только на одноцепочечные, но и на такие труднодоступные участки нуклеиновых кислот, как шпильчатые структуры. Особенно эффективным может оказаться предложенный в данной работе подход, основывающийся на использовании двух эффек-

торов, фланкирующих реагент на мишени с 5'- и 3'-конца цепи. Тот факт, что обсуждаемый вариант модификации НК позволяет достаточно успешно оперировать с реагентами и эффекторами, имеющими очень короткий олигонуклеотидный адрес, делает принципиально возможным решение проблемы унификации процесса направленной химической рестрикции полинуклеотидов. Очевидно также, что Phn-производные олигонуклеотидов могут применяться в качестве эффекторов реакции адресованной модификации НК в сочетании с различными реакционноспособными производными олигонуклеотидов независимо от природы модифицирующего радикала в их структуре.

### Экспериментальная часть

Все использованные в работе олигонуклеотиды были получены модифицированным триэфирным методом синтеза [9] исходя из полностью блокированных моно- и динуклеотидов опытного химического производства НИОХ СО АН СССР. Введение фосфатной группировки по 3'-концу цепи олигонуклеотидов проводили по методу [10]. При деблокировании [11], выделении из реакционной смеси [3] и получении характеристик [12] целевых олигонуклеотидов использовали экспериментальные подходы, подробно описанные в указанных сообщениях.

Реакционноспособные 5'-фосфорил-[4-(N-метиламино-N-2-хлорэтил)-бензиламиные производные олигонуклеотидов (I)–(IV) получали по методу [13] и выделяли обращенно-фазовой хроматографией [3] с выходом 60–80%. Содержание активного хлора в реагентах, определенное по методике [3], превышало 90%. Синтез и изучение свойств 5'-моно-Phn-производного тетрануклеотида (VIII) проводили как описано в сообщении [3].

*Синтез 3',5'-ди-Phn-производных олигонуклеотидов (общая методика).* Олигонуклеотид (0,2–0,5 мкмоль), содержащий фосфомоноэфирные группы на 3'- и 5'-концах цепи, превращали в цетавлоновую соль [13], сушили в вакууме над  $P_2O_5$  и растворяли вместе с 3,5 мг (13,5 мкмоль) трифенилфосфина, 3 мг (13 мкмоль) 2,2'-дипиридилдисульфида и 1,8 мг (13 мкмоль) N-окиси 4-диметиламинопиридина в 30 мкл диметилсульфоксида. Смесь выдерживали 10 мин при 20° С, нуклеотидный материал осаждали 1,5 мл 2% раствора  $LiClO_4$  в ацетоне, после отделения растворяли в 100 мкл 10% водного этилендиамина, выдерживали 45 мин при 20° С и осаждали 1,5 мл 2%  $LiClO_4$  в ацетоне. Осаждение нуклеотидного материала из 3 М водного  $LiClO_4$  (~60 мкл) ацетоном повторяли дважды. Последующее введение остатков Phn, выделение целевых соединений и получение их спектральных и хроматографических характеристик проводили как описано в работах [3, 14]. Соединения (V)–(VII), (IX) и (X) были получены с выходом 60–90%.

Концентрацию производных олигонуклеотидов в водных растворах определяли спектрофотометрически, используя суммарные величины  $\epsilon_{260}$ ; вклад  $ClRCH_2NH$ -группировки принимали равным  $1,47 \cdot 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  [15], Phn-остатка —  $10^4 M^{-1} cm^{-1}$ , для немодифицированных олигонуклеотидов — величины  $\epsilon_{260}$  моно- и динуклеотидов [16] (см. также [17]).

Модификацию полинуклеотидной мишени алкилирующими производными олигонуклеотидов (I)–(IV) проводили в 0,16 М NaCl, 0,02 М  $Na_2HPO_4$ , 0,1 мМ EDTA (рН 7,4), выдерживая реакционную смесь в течение пяти периодов полуионизации связи С—Cl в реагентах (рассчитано по данным работы [18]). В качестве мишени использовали 302-членный одноцепочечный ДНК-фрагмент, первичная структура которого и методика 3'- $^{32}P$ -мечения описаны ранее [19]. Модификацию мишени обнаруживали гель-электрофорезом в ПААГ (рис. 1 и 2) по появлению продуктов деструкции полинуклеотидной цепи в местах алкилированных пуринов после обработки препаратов модифицированной ДНК 10% водным пиперидином в течение 30 мин при 90° С [12]. За степень модификации принимали содержание  $^{32}P$ -метки в продуктах модификации ДНК-мишени. Адресованной модификацией считали модификацию фрагмента ДНК по основаниям  $G^{262}—G^{267}$  (участок А) или  $G^{145}—G^{150}$  (участок Б) в зависимости от

используемых олигонуклеотидных эффекторов. Статистическое расщепление полинуклеотидной цепи по остаткам пуринов (дорожки А + G, рис. 1 и 2) получали обработкой препарата ДНК 2% дифениламино в 66% муравьиной кислоте при 25° С в течение 5 мин [20].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Letsinger R., Schott M. E.* // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 24. P. 7394—7396.
2. *Asseline V., Toulme F., Thuong N. T., Delarue M., Montenay-Garestier T., Helene C.* // EMBO J. 1984. V. 3. № 4. P. 795—800.
3. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 7. С. 911—920.
4. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Подыминогин М. А., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1212—1220.
5. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Рук. деп. в ВИНИТИ, № 4276—В89 от 29 июня 1989 г. 11 с.
6. *Зарытова В. Ф., Кутявин И. В., Левина А. С., Мамаев С. В., Подыминогин М. А.* // Докл. АН СССР. 1988. Т. 302. № 1. С. 102—104.
7. *Kutiavin I. V., Podymingogin M. A., Vashina Yu. N., Fedorova O. S., Knorre D. G., Levina A. S., Mamayev S. V., Zarytova V. F.* // FEBS Lett. 1988. V. 238. № 1. P. 35—38.
8. *Колчанов И. А., Соловьев В. В., Жарких А. А.* // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. № 3. С. 741—745.
9. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Романенко В. П.* // Биоорганическая химия. 1983. Т. 9. № 4. С. 516—521.
10. *Бенимецкая Л. З., Бульчев И. В., Горн В. В., Козионов А. Л., Кутявин И. В., Лебедев А. В., Новожолов С. Ю., Подыминогин М. А., Штокман М. И.* // Препринт ИАНЭ СО АН СССР. 1984. № 252. 40 с.
11. *Бауск Е. В., Горн В. В., Лебедев А. В.* // Биоорганическая химия. 1985. Т. 11. № 6. С. 815—820.
12. *Махат А. М., Gilbert W.* // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
13. *Мишенина Г. Ф., Самуков В. В., Шубина Т. П.* // Биоорганическая химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 886—894.
14. *Зарытова В. Ф., Иванова Е. М., Кутявин И. В., Сергеев Д. С., Сильников В. Н., Шишкин Г. В.* // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1989. Вып. 6. С. 3—9.
15. *Барам Г. И., Бунева В. Н., Добрикова Е. Ю., Петров В. Н.* // Биоорганическая химия. 1986. Т. 12. № 5. С. 613—620.
16. *Santor C. R., Tinoco I.* // J. Mol. Biol. 1965. V. 13. № 1. P. 65—72.
17. *Fasman T. E.* (Ed.) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids. V. 1. Cleveland: CRC Press, 1975.
18. *Власов В. В., Гринева Н. И., Кнорре Д. Г.* // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. наук. 1969. Вып. 1. № 2. С. 104—109.
19. *Vlassov V. V., Zarytova V. F., Kutiavin I. V., Mamayev S. V., Podymingogin M. A.* // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. № 10. P. 4065—4076.
20. *Коробко Д. Г., Грачев С. А.* // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. № 40. С. 1420—1422.

Поступила в редакцию  
12.II.1990

V. F. ZARYTOVA, I. V. KUTYAVIN, S. V. MAMAYEV, M. A. PODYMINOGIN

#### EFFECTIVE AND SELECTIVE MODIFICATION OF A SINGLE-STRANDED DNA FRAGMENT WITH ALKYLATING OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES IN THE PRESENCE OF N-(2-HYDROXYETHYL)PHENAZINIUM OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES AS EFFECTORS

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

Tri-, tetra-, penta- and hexanucleotides bearing a reactive 4-(N-methylamino-N-2-chloroethyl)benzylamide group can effectively and selectively modify a single-stranded DNA fragment (302 nucleotides) in the presence of effectors, N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives of oligonucleotides complementary to DNA sequences adjacent to the binding site of the reagent. The reagents investigated modify not only single-stranded but also secondary-structured DNA regions. The modification extent depends on the length of oligonucleotide parts of the reagent and effector. A gap between the two stretches associated with the target DNA prevents the effector from functioning. The substitution of an octanucleotide effector by two tetranucleotide ones only slightly reduces the modification extent with a hexanucleotide reagent. A very efficient and specific modification can be achieved by using two effectors flanking the reactive oligonucleotide derivative. The approach leads to the modification extent of up to 89% with a hexanucleotide reagent.