



УДК 577.113.4

НОВЫЙ ТИП МОДИФИКАЦИИ ДНК. НАПРАВЛЕННОЕ ВВЕДЕНИЕ 3'-5'-ПИРОФОСФАТНЫХ МЕЖНУКЛЕОТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Пурмаль А. А., Друза В. Л., Шабарова З. А.

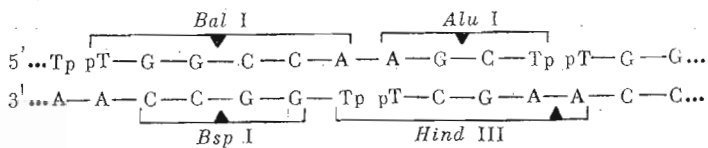
*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Химический факультет. Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Осуществлен химический синтез соединений нового типа — модифицированных ДНК-дуплексов, содержащих 3'-5'-пирофосфатные межнуклеотидные связи в заданном положении. Синтез проведен путем химической матричной поликонденсации 3',5'-дифосфата декануклеотида рТGGCCAAGCTр, образующего при самоассоциации ДНК-подобный дуплекс. В качестве конденсирующего агента использован 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид (CDI). Найдено, что за 3 сут достигается практически количественный выход полимерных продуктов. Пирофосфатный тип образующейся межнуклеотидной связи подтвержден расщеплением продуктов поликонденсации трифторуксусным ангидридом. Исследовано взаимодействие ДНК-дуплексов, содержащих 3'-5'-пирофосфатные связи с эндонуклеазой рестрикции *Bsp I*, *Hind III* и *Alu I*. Обнаружено, что рестриктазы *Bsp I* и *Hind III* гидролизуют модифицированный дуплекс до соответствующих декануклеотидов, а рестриктазой *Alu I* дуплекс не расщепляется.

Однотяжевые и двутяжевые ДНК, содержащие неприродные межнуклеотидные связи, являются перспективными аналогами субстратов эндонуклеаз рестрикции, ферментов процессинга и других ДНК-связывающих и узнающих белков [1—3]. Число известных в настоящее время типов модификации межнуклеотидных связей невелико. В разных лабораториях разработаны химические и ферментативные методы получения олиго- и полинуклеотидов с фосфамидными [4] тиофосфатными [5—7] межнуклеотидными связями.

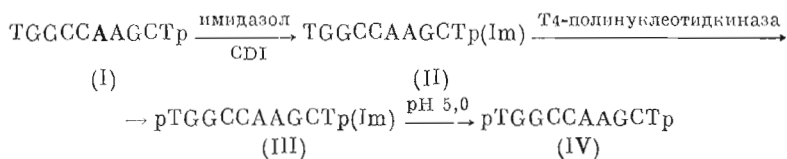
Мы предлагаем новый тип модифицированных ДНК-дуплексов, содержащих 3'-5'-пирофосфатные межнуклеотидные связи в заданном положении. Межнуклеотидная пирофосфатная связь вносит дополнительную конформационную подвижность в структуру полинуклеотида. Кроме того, появляется возможность избирательного расщепления этой связи (без расщепления 3'-5'-фосфодиэфирной). В основу получения соединений нового типа легли разработанные ранее методы химической матричной конденсации олигонуклеотидов с помощью водорастворимого карбодимида [8—11].

В настоящей работе описан химический матричный синтез ДНК-дуплексов, содержащих через каждые 10 мономерных звеньев 3'-5'-пирофосфатные межнуклеотидные связи. В качестве исходной системы для получения модифицированного дуплекса использовали ДНК-подобный комплекс, образующийся при самоассоциации 3',5'-дифосфата декануклеотида рТGGCCAAGCTр. Первичная структура олигонуклеотида выбрана таким образом, что образующийся при самоассоциации дуплекс содержит сайты узнавания ряда рестриктаз:



Префикс «d» (дезоксип) для краткости всюду опущен. Сокращения: Им — имидазолил; CDI — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид; МЖХ — микроколоночная хроматография; ПААГ — полиакриламидный гель; MES — 2-морфолиноэтансульфонат.

Дифосфат рТGGCCAAGCTр получен фосфорилированием 3'-фосфоимидазолида декануклеотида TGGCCAAGCTр(Im) с помощью Т4-полинуклеотидкиназы с последующим удалением имидазолидного остатка.



Выбор такой схемы синтеза связан с тем, что коммерческий препарат Т4-полинуклеотидкиназы помимо основной 5'-фосфорилирующей обладал 3'-фосфатазной активностью [12]. 3'-Имидазолидная группировка использована в качестве защитной группы, препятствующей 3'-дефосфорилированию декануклеотида (I). Она устойчива в условиях ферментативного фосфорилирования (рН 9,0) и количественно удаляется в слабокислой среде (рН 5,0). 3'-Фосфоимидазолид декануклеотида (II) синтезировали методом, описанным в работе [13]. За ходом реакций следили методом ионообменной МХХ. По данным МХХ, на стадиях получения соединений (II)—(IV) процент превращения составлял 90—98%. Реакционную смесь после получения соединения (II) обессоливали на биогеле Р-2 и вводили в реакцию ферментативного фосфорилирования без дополнительного фракционирования. Соединение (III) отделяли от фермента и низкомолекулярных компонентов реакционной смеси обессоливанием на DEAE-целлюлозе и обрабатывали 0,1 М MES-буфером (рН 5,0).

На рис. 1а приведена кривая хроматографического разделения реакционной смеси, содержащей соединения (IV). По данным МХХ, смесь содержит 80% соединения (IV) и 20% смеси декануклеотида (I) и соответствующего 5'-фосфорилированного соединения. Выделение соединения (IV) проводили колоночной ионообменной хроматографией на лихросорбе-NH₂ в линейном градиенте концентрации фосфата натрия в 7 М мочевины (рН 7,0) с последующим обессоливанием на DEAE-целлюлозе. Выход соединения (IV) 60—70% относительно исходного соединения (I). При попытке ферментативного фосфорилирования декануклеотида (I) без применения 3'-фосфоимидазолидной защиты выход соединения (IV) не превышал 10% (рис. 1б).

Подтверждением структуры полученного соединения является его неспособность гидролизываться фосфодиэстеразой змеиного яда и фосфодиэстеразой селезенки. При обработке соединения (IV) фосфомоноэстеразой образуется декануклеотид TGGCCAAGCT, идентичный описанному в работе [11] (по данным МХХ).

Изучение методом УФ-спектрофотометрии зависимости оптического поглощения дифосфата (IV) от температуры, как это описано в работах [10, 11], показало, что в 0,004 М фосфатном буфере, содержащем 0,2 М NaCl и 0,075 М MgCl₂ (рН 7,3), соединение (IV) образует комплекс с температурой плавления 16 и 30° С при нуклеотидной концентрации на мономер 10⁻⁴ и 10⁻³ М соответственно. Вид кривой плавления комплекса аналогичен описанному для комплексов (ДНК-подобного дуплекса), образованного декануклеотидом (I) [10, 11]. На основании этого можно полагать, что соединение (IV) также образует ДНК-подобный комплекс.

Наличие такого ДНК-подобного комплекса позволило нам провести поликонденсацию 3',5'-дифосфата декануклеотида (IV) в условиях комплексообразования. Как конденсирующий агент использовали CDI. Поликонденсацию проводили в условиях, подобранных ранее для декануклеотида (I) [11]. В качестве контрольного эксперимента в идентичных условиях проводили поликонденсацию ³²рTGGCCAAGCT (V), изученную нами ранее [11]. Продукты поликонденсации анализировали электрофорезом в 20% ПЛАГ.

Оказалось, что скорость реакции и выход полимерных продуктов в случае поликонденсации 3',5'-дифосфата декануклеотида (IV) гораздо выше, чем в случае поликонденсации декануклеотида (V) (рис. 2). Через 3 сут

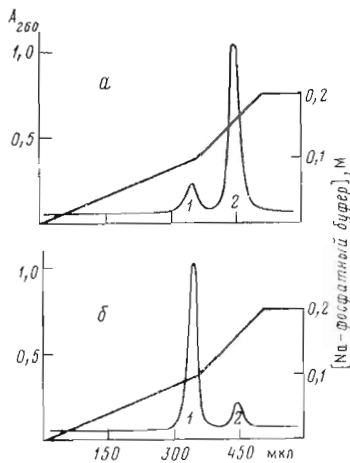


Рис. 1. Разделение реакционных смесей после фосфорилирования с помощью Т4-полинуклеотидкиназы TGGCCAAGCTp(Im) с последующим удалением 3'-Im-группировки (а) и TGGCCAAGCTp (б) МКХ на колонке (0,1×6 см) с лихросорбom-NH₂ в линейном градиенте концентрации фосфата натрия (рН 7,0) в 7 М мочевины при скорости элюции 600 мкл/ч. Пик 1 — смесь 3'- и 5'-фосфатов TGGCCAAGCT, пик 2 — его 3',5'-дифосфат

в реакционной смеси практически не остается исходного соединения (IV), тогда как в контрольной реакционной смеси еще присутствует значительное количество декануклеотида (V).

Поликонденсация соединения (IV) в условиях комплексообразования приводит к образованию высокополимерных продуктов, максимальная длина которых не поддается оценке на основании данных электрофореза в 20% ПААГ. В то же время максимальная длина продуктов поликонденсации декануклеотида (V) за 6 сут достигала лишь 130 нуклеотидных звеньев. Оценку среднестатистической длины продуктов поликонденсации 3',5'-дифосфата декануклеотида (IV) проводили методом седиментационного анализа, как описано в работе [11]. Найденные коэффициенты седиментации в условиях комплексообразования ($(5,2 \pm 0,2)S$) и в условиях полной дестабилизации комплексов ($(4,6 \pm 0,2)S$) характерны для фрагментов ДНК с 200–220 мономерными звеньями.

Сравнение скоростей поликонденсации соединений (IV) и (V) позволяет сделать приблизительную оценку реакционной способности фосфомоноэфирного остатка и 3'-концевой оксигруппы по отношению к активированной СДИ пространственно сближенной фосфатной группировке. Легко заметить, что степень полимеризации соединения (IV) за 6 ч примерно такая же, как соединения (V) за 6 сут (рис. 1, 4 и 11). Следовательно, в этих условиях реакционная способность фосфомоноэфирного остатка более чем на порядок превышает реакционную способность 3'-концевой оксигруппы. Это хорошо согласуется с аналогичной оценкой, сделанной ранее в работе [14].

Для выяснения природы образующейся межнуклеотидной связи суммарную полимерную фракцию, выделенную после поликонденсации соединения (IV) из реакционной смеси электрофорезом в ПААГ, обрабатывали трифторуксусным ангидридом. Для этого полимерные продукты переводили в цетавлоновую соль, растворяли в 90% водном пиридине и добавляли избыток трифторуксусного ангидрида. Обнаружено, что продукты поликонденсации 3',5'-дифосфата (IV) практически количественно расщепляются трифторуксусным ангидридом до исходного (IV). В тех же условиях продукты поликонденсации декануклеотида (V) трифторуксусным ангидридом не расщепляются (рис. 3, 2 и 3). Эти данные доказывают наличие в продуктах поликонденсации соединения (IV) межнуклеотидных пирофосфатных связей.

Для дополнительного доказательства 3'→5'-ориентации декануклеотидных блоков в составе полимера нами было исследовано взаимодействие полученных ДНК-дуплексов, содержащих межмономерные пирофосфатные связи с эндонуклеазами рестрикции *AluI*, *BspI* и *HindIII*. Ранее нами было показано [11], что аналогичный дуплекс, не содержащий пирофосфатных связей, количественно расщепляется всеми перечисленными рестриктазами до соответствующих декануклеотидов. Результаты гидролиза дуплекса, содержащего пирофосфатные межмономерные связи (рис. 3,

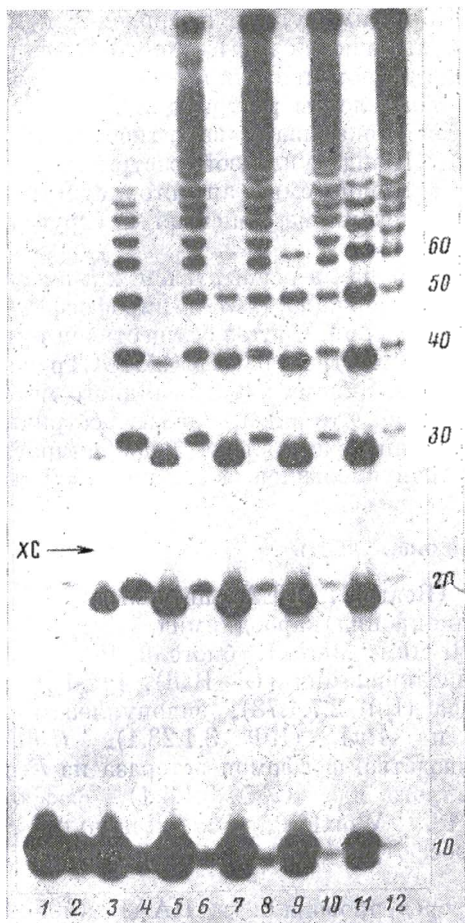


Рис. 2

Рис. 2. Анализ электрофорезом в 20% ПААГ продуктов поликонденсации $^{32}\text{P-TGGCCAAGCTp}$ (2, 4, 6, 8, 10 и 12) и $^{32}\text{P-TGGCCAAGCT}$ (1, 3, 5, 7, 9 и 11) через 5 мин (1 и 2), 6 ч (3 и 4), 1 сут (5 и 6), 2 (7 и 8), 3 (9 и 10) и 6 сут (11 и 12) после начала реакции. Приведена автордиограмма геля. Цифры справа — число мономерных звеньев, ХС — ксиленианол

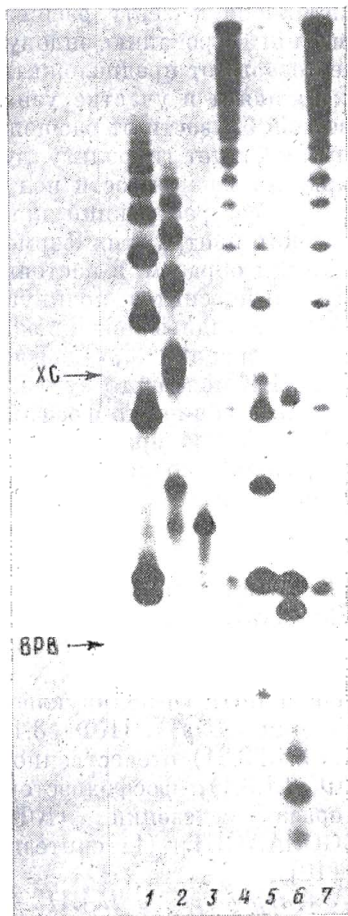


Рис. 3

Рис. 3. Анализ электрофорезом в 20% ПААГ продуктов расщепления трифторуксусным ангидридом полинуклеотидов, полученных поликонденсацией $^{32}\text{P-TGGCCAAGCT}$ (2), и продуктов расщепления трифторуксусным ангидридом (3), *AluI* (4), *HindIII* (5) и *BspI* (6) полинуклеотидов, полученных поликонденсацией $^{32}\text{P-TGGCCAAGCTp}$. Дорожки (1) и (7) — соответственно исходные немодифицированные и модифицированные полинуклеотиды, ХС и ВРВ — ксиленианол и бромфеноловый синий

4–6), свидетельствуют, что модифицированный дуплекс количественно расщепляется рестриктазой *BspI*, практически полностью рестриктазой *HindIII* и не расщепляется рестриктазой *AluI*. Первичная структура рестриктоов — декануклеотидов, выделенных из гидролизатов *BspI* и *HindIII*, подтверждена методом Максама — Гилберта [15]. Интересно, что межнуклеотидная пирофосфатная связь устойчива в условиях проведения реакций селективной химической деградации олигонуклеотидов. Это позволяет анализировать такие модифицированные олигонуклеотиды стандартным методом.

Расщепление модифицированного дуплекса рестриктазами *BspI* и *HindIII* подтверждает $3' \rightarrow 5'$ -ориентацию олигомерных блоков в составе полимера и указывает на то, что межполимерная связь в синтезированных полинуклеотидах $3'-5'$ -пирофосфатная. Кроме того, это свидетельствует о незначительности структурных изменений, вносимых дополнительными межнуклеотидными фосфатными группами. В случае рестриктазы *AluI* пирофосфатная связь примыкает к участку узнавания и наиболее

приближена к месту расщепления. По-видимому, это и приводит к полному ингибированию эндонуклеазной активности *AluI*. Полученные данные позволяют предположить, что межнуклеотидная пирофосфатная связь, находящаяся в участке узнавания эндонуклеазы рестрикции в непосредственной близости от расщепляемой связи, оказывает «защитное» действие и препятствует гидролизу дуплекса ДНК эндонуклеазой рестрикции. Это открывает возможности получения негидролизующихся аналогов субстратов эндонуклеаз рестрикции для изучения механизма действия и структуры активного центра этих ферментов.

Таким образом, в настоящей работе впервые осуществлен химический матричный синтез полинуклеотидов, содержащих 3'-5'-пирофосфатные межнуклеотидные связи в заданном положении. Синтез осуществлен путем поликонденсации 3',5'-дифосфата декануклеотида *pTGGCCAAGCTp* в составе ДНК-подобного дуплекса с использованием карбодимидного метода активации концевых фосфатов. Обнаружено, что эндонуклеазы рестрикции *BspI* и *HindIII* практически количественно расщепляют модифицированный дуплекс до соответствующих декануклеотидов, а рестриктазой *AluI* дуплекс не расщепляется.

Экспериментальная часть

В работе использованы трис (Reanal), DEAE-целлюлоза DE-23 (Whatman), 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодимид, 2-морфолиноэтансульфонат, лихросорб-NH₂ (10 мкм; Merck), биогель P-2 (200—400 меш), акриламид, N,N-метиленбисакриламид (Bio-Rad), [γ^{32} -P]rATP (Amersham), T4-полинуклеотидкиназа (КФ 2.7.1.78), эндонуклеазы рестрикции *BspI* (КФ 3.1.23.17) и *AluI* (КФ 3.1.23.1), *HindIII* (КФ 3.1.23.21) отечественного производства, фосфомоноэстераза из *E. coli* (КФ 3.1.3.1), фосфодиэстераза змеиного яда (КФ 3.1.4.1), фосфодиэстераза селезенки (КФ 3.1.4.18, Worthington). Декануклеотид *TGGCCAAGCTp* (I) синтезирован фосфотриэфирным методом в растворе [10].

Электрофорез в ПААГ. Электрофорез проводили в ПААГ (40×20××0,04 см, 20% акриламид, 0,66% N,N-метиленбисакриламид, 7 М мочевины) в 0,05 М трис-боратном буфере (pH 8,3), содержащем 10⁻⁴ М EDTA, при напряжении 50 В/см. Пробы наносили в 1 мкл 80% формамида, содержащего красители-маркеры — ксиленицианол и бромфеноловый синий.

Хроматографический анализ олигонуклеотидов осуществляли на микрохроматографе с непрерывной регистрацией оптического поглощения элюата с помощью микроспектрофотометрической приставки МСФП-1 (Новосибирский институт органической химии СО АН СССР).

Оптические измерения. Для определения оптического поглощения растворов использовали прибор Рхе Упiсам SP 8-100 (Англия). Зависимость УФ-поглощения от температуры изучали в термостатированных кюветках Hellma (ФРГ) с длиной оптического пути 1 мм.

pTGGCCAAGCTp (IV). К 1 ОЕ₂₆₀ (0,01 мкмоль) NH₄-соли декануклеотида (I) добавляли 70 мкл 3 М водного раствора имидазола с pH 6,0 и 10 мг (50 мкмоль) CDI. После 1,5 ч инкубации при 20° С реакционную смесь наносили на колонку (0,5×20 см) с биогелем P-2 (200—400 меш). Олигонуклеотидную фракцию элюировали 0,01 М водным триэтиламинол, упаривали досуха и анализировали с помощью МКХ (условия как на рис. 1). Полученная смесь содержала 90% имидазолида (II) и 10% исходного декануклеотида (I). Фосфорилирование этой смеси T4-полинуклеотидкиназой (10 ед. акт.) проводили 15 мин при 37° С в 0,05 М трис-HCl-буфере (pH 9,0), содержащем 0,01 М MgCl₂, 0,005 М 2-меркаптоэтанол, 0,002 М спермин и 0,001 М rATP (объем реакционной смеси 100 мкл). Реакционную смесь наносили на колонку (0,2×1 см) с DEAE-целлюлозой (CH₃COO⁻), промывали 0,2 М водным триэтиламонийацетатом с pH 8,5. Олигонуклеотидную фракцию элюировали 1 М водным триэтиламонийацетатом. Элюат многократно упаривали с водным этанолом при 50° С для удаления триэтиламонийацетата. К сухому остатку

добавляли 50 мкл 0,1 М MES-буфера с рН 5,0 и инкубировали 1 ч при 50° С. Соединение (IV) выделяли хроматографией на колонке (0,2×10 см) с лихросорбом-NH₂ в линейном градиенте концентрации (0,005–0,2 М) фосфата натрия в 7 М растворе мочевины, рН 7,0. Профиль элюции аналогичен представленному на рис. 1а. Обессоливание вели на колонке (0,2×1 см) с DEAE-целлюлозой (НСО₃⁻). Нуклеотидный материал элюировали 1 М NH₄НСО₃. Бикарбонат аммония удаляли многократным упариванием с водным этанолом при 50° С. Выход соединения (IV) 60–70% относительно исходного соединения (I). Гидролиз соединения (IV) фосфомоноэстеразой и фосфодиэстеразами змеиного яда и селезенки проводили согласно [11]. 5'-³²P-Меченый 3',5'-дифосфат (IV) получали фосфорилированием 0,01 ОЕ₂₆₀ 3'-фосфоимидазолида декануклеотида (II) [γ -³²P]гАТР с помощью Т4-полинуклеотидкиназы с последующим выделением дифосфорилированного продукта электрофорезом в 20% ПААГ. Элюцию из геля вели 1 М водным ацетатом калия с рН 5,0.

pTGGCCAAGCT (V). Соединение (V) получали последовательным 3'-дефосфорилированием соединения (I) с помощью фосфомоноэстеразы и 5'-фосфорилированием с помощью Т4-полинуклеотидкиназы, как описано в работе [11]. ³²P-Меченый декануклеотид (V) получали фосфорилированием 0,01 ОЕ₂₆₀ TGGCCAAGCT [γ -³²P]гАТР с помощью Т4-полинуклеотидкиназы с последующим выделением фосфорилированного продукта электрофорезом в 20% ПААГ.

Химическая матричная поликонденсация. 0,3 ОЕ₂₆₀ 3',5'-дифосфата (IV) инкубировали в темноте при 4° С в 30 мкл 0,05 М MES-буфера (рН 6,1), содержащего 0,02 М MgCl₂ и 0,02 М CDI. Аналогично проводили поликонденсацию декануклеотида (V). Аликвоты реакционных смесей (2 мкл) отбирали через 5 мин, 6 ч, 1, 2, 3 и 6 сут. Анализ аликуот и выделение продуктов поликонденсации проводили электрофорезом в ПААГ (см. рис. 2).

Расщепление межнуклеотидных пирофосфатных связей трифторуксусным ангидридом. 0,02 ОЕ₂₆₀ ³²P-меченых полинуклеотидов в виде цетавановой соли растворяли в 10 мкл смеси пиридин — вода (9 : 1) и обрабатывали 4 мкл (42,5 мкмоль) трифторуксусного ангидрида в течение 2 мин, после чего добавляли 5 мкл 25% аммиака. Продукты реакции анализировали электрофорезом в ПААГ (см. рис. 3).

Гидролиз полинуклеотидов эндонуклеазами рестрикции. Гидролиз ³²P-меченых полинуклеотидов рестриктазами *AluI*, *BspI* и *HindIII* проводили согласно [11]. Продукты гидролиза фракционировали в 20% ПААГ (рис. 3). Анализ первичной структуры декапуклеотидов — продуктов гидролиза дуплексов эндонуклеазами рестрикции осуществляли методом Максама — Гилберта [15]. Для этого использовали немеченую полимерную фракцию. Декануклеотиды выделяли из гидролизатов *BspI* и *HindIII* МКХ на лихросорбе-NH₂, обрабатывали фосфомоноэстеразой и фосфорилировали с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]гАТР.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vosberg H. P., Eckstein F. J. Biol. Chem., 1982, v. 257, p. 6595–6599.
2. Rybakov V. N., Rivkin M. I., Kumarev V. P. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 1, p. 189–201.
3. Рыбаков В. Н., Ривкин М. И., Богачев В. С., Кумарев В. П. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1423–1425.
4. Letsinger R. L., Mungal W. S. J. Org. Chem., 1970, v. 35, № 11, p. 3800–3803.
5. Кумарев В. П., Богачев В. С., Кобзев В. Ф., Баранова Л. В., Ривкин М. И., Рыбаков В. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, № 11, с. 1525–1534.
6. Kress J., Nagpal K. L., Nagyvary J., Uchic J. T. Nucl. Acids Res., 1975, v. 2, № 1, p. 1–9.
7. Vosberg H. P., Eckstein F. Biochemistry, 1977, v. 16, p. 3633–3640.
8. Naylor R., Gilham P. T. Biochemistry, 1966, v. 5, p. 2722–2728.
9. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Turkin S. I., Gromova E. S. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, p. 2413–2429.
10. Шабарова З. А., Волков Е. М., Орещкая Т. С., Туркин С. И., Долинная Н. Г., Каграманова В. К., Прокофьев М. А. Докл. АН СССР, 1981, т. 258, с. 914–917.
11. Shabarova Z. A., Dolinnaya N. G., Druza V. L., Melnikova N. P., Purnal A. A. Nucl. Acids Res., 1981, v. 9, № 21, p. 5747–5761.

12. Cameron V., Uhlenbeck O. C. *Biochemistry*, 1977, v. 16, p. 5120-5126.
13. Ивановская М. Г., Горрух М. Б., Шабарова З. А. *Биоорг. химия*, 1982, т. 8, № 7, с. 940-944.
14. Меламед Н. В., Понов С. Г., Шамоцкий Г. Г. *Изв. СО АН СССР*, 1974, № 12, вып. 5, с. 90-98.
15. Maxam A. M., Gilbert W. In: *Methods in Enzymology* / Eds Crossman L., Moldave K. New York - London: Acad. Press, 1980, v. 65, p. 499-560.

Поступила в редакцию
19.IV.1983
После доработки
13.IX.1983

A NOVEL TYPE OF DNA MODIFICATION. SITE SPECIFIC INTRODUCTION OF 3'-5'-PYROPHOSPHATE INTERNUCLEOTIDE BONDS

PURMAL A. A., DRUTSA V. L., SHABAROVA Z. A.

*Department of Chemistry and A. N. Belozersky Laboratory of Molecular
Biology and Bioorganic Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State
University, Moscow*

Novel compounds -- modified DNA-duplexes containing 3'-5'-pyrophosphate internucleotide bonds -- have been synthesized. The synthesis was carried out by means of chemical template-guided polycondensation of 3'-5'-diphosphate of decanucleotide pTGCCCAAGCTp, which forms DNA-like duplexes as a result of self-association. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide was used as a condensing agent. Almost quantitative yield of polymer products was achieved by incubation of the reaction mixture for 72 hours. The pyrophosphate type of the internucleotide bonds was confirmed by complete cleavage of these polymers by trifluoroacetic anhydride. The interaction of DNA-duplexes, containing the 3'-5'-pyrophosphate bonds, with restriction endonucleases *BspI*, *HindIII* and *AluI* was studied. *BspI* and *HindIII* were able to hydrolyze modified duplexes giving corresponding decanucleotides, whereas *AluI* failed to split the duplexes.