

**БИОГАНІЧНАЯ ХІМІЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 577.11  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-457-464>

Поступила в редакцию 22.09.2020  
Received 22.09.2020

**В. В. Щур, А. И. Жолнерович, Ю. П. Буренкова, А. В. Янцевич, С. А. Усанов**

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

**СТАБИЛЬНОСТЬ 5'-ДИМЕТОКСИТРИТИЛЬНОЙ ЗАЩИТНОЙ ГРУППЫ  
СИНТЕТИЧЕСКОГО ОЛИГОНУКЛЕОТИДА В УСЛОВИЯХ  
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

**Аннотация.** Модификация 5'-ОН группы нуклеиновых кислот заместителями с различными физико-химическими свойствами имеет принципиальное значение для молекулярной биологии. Интересным представляется исследование симметричного и асимметричного замещения 5'-гидроксила двуцепочечной ДНК (дцДНК) 4,4'-диметокситритильной (ДМТ) группой. Симметричное замещение может позволить осуществлять селективное лигирование дцДНК в плазмидный вектор после ее сборки из олигонуклеотидов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по сравнению с побочными укороченными продуктами сборки. Синтез асимметрично меченной 5'-ДМТ дцДНК при условии наличия специфичной к модификациям 5'-конца экзонуклеазы позволит получать протяженную синтетическую оцДНК, применяемую для сайт-специфичного включения гена в геном с использованием технологии CRISPR/Cas9. Чтобы провести подобные исследования необходимо выяснить, стабилен ли синтетический 5'-ДМТ олигонуклеотид в условиях ПЦР. В данной работе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ (260 нм) и масс-спектрометрической детекцией мы показали, что 5'-ДМТ-группа стабильна в составе синтетического олигонуклеотида в условиях ПЦР, однако присутствие тиольных соединений может снижать выход 5'-ДМТ-дцДНК. Мы планируем дальнейшее изучение влияния 5'-ДМТ-группы в составе синтетических ДНК на функционирование различных ферментов.

**Ключевые слова:** олигонуклеотиды, 4,4'-диметокситритильная группа, ДМТ, полимеразная цепная реакция, ПЦР, синтетический ген

**Для цитирования.** Стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы синтетического олигонуклеотида в условиях полимеразной цепной реакции / В. В. Щур [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 457–464. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-457-464>

**V. V. Shchur, A. I. Zholnerovich, Y. P. Burankova, A. V. Yantsevich, S. A. Usanov**

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

**5'-DIMETHOXYTRITYL PROTECTION GROUP OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDE STABILITY  
IN POLYMERASE CHAIN REACTION**

**Abstract.** Modification of 5'-OH group of nucleic acids by substituents with various physicochemical properties is important for molecular biology. Investigation of symmetric and asymmetric substitution of 5'-hydroxyl of dsDNA by 4,4'-dimethoxytrityl (DMT) group seems interesting. Symmetric substitution can allow performing a selective ligation of dsDNA assembled from oligonucleotides by polymerase chain reaction as compared to shortened assembly by-products into a plasmid vector. Synthesis of asymmetrically labeled 5'-DMT dsDNA in case of presence of exonuclease specific to 5'-end modifications will allow obtaining a long synthetic ssDNA used for site-specific gene insertion into a genome by CRISPR/Cas9 technique. To conduct such investigations, it is necessary to know whether synthetic 5'-DMT oligonucleotide is stable under PCR conditions. Here we demonstrated by high performance liquid chromatography with UV (260 nm) and mass-spectrometric detection that 5'-DMT group of synthetic oligonucleotide is stable under PCR conditions but the presence of thiol compounds can decrease a yield of 5'-DMT dsDNA. We plan a further research on influence of 5'-DMT group of synthetic DNA on functionality of various enzymes.

**Keywords:** oligonucleotides, 4,4'-dimethoxytrityl group, DMT, polymerase chain reaction, PCR, synthetic gene

**For citation.** Shchur V. V., Zholnerovich A. I., Burankova Y. P., Yantsevich A. V., Usanov S. A. 5'-Dimethoxytrityl protection group of synthetic oligonucleotide stability in polymerase chain reaction. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 457–464 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-457-464>

**Введение.** В молекулярной биологии важной модификацией нуклеиновых кислот является замещение 5'-ОН группы различными заместителями [1]. Так, например, стабильность и иммуногенность терапевтических малых интерферирующих РНК (миРНК) и мРНК можно повысить путем модификации их 5'-конца [2–5].

Ассиметричная модификация 5'-ОН группы дцДНК применяется для получения протяженной оцДНК, длина которой соответствует длине гена [6]. Такие оцДНК используют в экспериментах по сайт-специфичной интеграции генов в геном с использованием технологии CRISPR/Cas9 [7–10]. Один из способов получения протяженной оцДНК основан на селективной ферментативной деградации одной из цепей дцДНК, которую предварительно подвергли фосфорилированию. Фермент, осуществляющий процесс деградации фосфорилированной цепи (страндаза), а также метод получения оцДНК коммерциализированы компанией Takara Biosciences. Существует также и иной подход – ассиметричная полимеразная цепная реакция (ПЦР), при которой используют молярное соотношение праймеров, значительно смещенное в сторону одного из них (forward праймера) [6].

Перед использованием олигонуклеотидов для проведения ПЦР, секвенирования или сборки из них дцДНК, которую собираются лигировать в дефосфорилированный вектор, их подвергают фосфорилированию при помощи полинуклеотид-киназы фага Т4 [11, 12]. Лигирование можно превратить в селективный процесс, при котором правильно собравшаяся из олигонуклеотидов конструкция дцДНК преимущественно будет встраиваться в плазмиду. Для этого достаточно подвергнуть фосфорилированию только 5'-концы фланкирующих олигонуклеотидов, а остальные праймеры оставить без модификации. Если для лигирования используют фосфорилированный вектор, то вместо фосфатной группы для модификации фланкирующих олигонуклеотидов стоит использовать иной заместитель.

5'-Гидроксил олигонуклеотида является одним из нуклеофильных центров молекулы, наряду с экзоциклическими аминогруппами гетероциклических азотистых оснований [13]. Осуществить селективную модификацию 5'-ОН, не затронув при этом другие нуклеофильные центры, невозможно [13]. Однако это вполне осуществимо, если аминогруппы азотистых оснований будут заблокированы защитными группами, как в автоматизированном фосфоамидитном синтезе олигонуклеотидов [13]. Таким образом, модификацию 5'-ОН олигонуклеотида целесообразно проводить в ходе его синтеза. В процессе синтеза для блокирования 5'-ОН растущей цепи олигонуклеотида на всех стадиях, кроме присоединения следующего нуклеотидного звена, используют 4,4'-диметокситритильную (ДМТ) группу [13]. Для ее удаления перед стадией конденсации используют раствор трихлоруксусной кислоты в толуоле или дихлорметане. После присоединения последнего нуклеотида ДМТ-группу можно как сохранить на конце олигонуклеотида, так и удалить, оставив на 5'-конце гидроксильную группу. Если дальнейшую очистку олигонуклеотида от побочных продуктов синтеза планируют осуществлять с использованием ВЭЖХ или твердофазной экстракции (ТФЭ) с использованием обращенно-фазовых сорбентов, то ДМТ-группу на конце олигонуклеотида сохраняют [14]. Именно эта гидрофобная функциональная группа, а также наличие в составе подвижной фазы триэтиламинацетата, ион-парного агента, с одной стороны экранирующего полярные фосфатные группы сахарофосфатного остова ДНК, а с другой – взаимодействующего с неполярным октадецилсиликагелем, и позволяет полнодлинному олигонуклеотиду эффективно по сравнению с укороченными примесями задерживаться на сорбенте [14]. Можно так изменить описанный метод очистки, чтобы получить модифицированные ДМТ-группой олигонуклеотиды, избавившись при этом от примесей синтеза. Для этого достаточно опустить стадию снятия ДМТ-группы (стадию детритилирования трифторуксусной кислотой).

Таким образом, ДМТ-группа может быть введена в синтетический олигонуклеотид достаточно просто на этапе его синтеза, также возможно сохранение этой функциональной группы в составе олигонуклеотида после его очистки. Однако в литературе нет данных о том, сохраняется ли ДМТ-группа на конце праймера в ходе ПЦР. Именно выяснению этого обстоятельства и посвящена статья.

Этот вопрос важен, так как позволяет понять, можно ли рассматривать подобный вариант 5'-модификации ДНК как перспективный для молекулярной и синтетической биологии. На сегодня

няшый день не известно, возможно ли провести ПЦР-сборку дцДНК из 5'-ДМТ олигонуклеотидов. Если это осуществимо, то можно получать симметрично и асимметрично модифицированные ДМТ-группой дцДНК. Асимметричную 5'-ДМТ дцДНК теоретически можно применить для получения протяженной оцДНК. Одна из цепей дцДНК, имеющая 5'-ДМТ-группу, может быть устойчива к действию экзонуклеаз, по аналогии с ферментативной деградацией с помощью страндазы. Однако необходимы исследования влияния такой модификации ДНК на функционирование различных экзонуклеаз, а также и на ДНК лигазу, ведь теоретически есть перспективы использования 5'-ДМТ олигонуклеотидов для селективного по сравнению с укороченными примесями лигирования целевого продукта ПЦР-сборки дцДНК в плазмидный вектор. Примеси в данном случае будут симметрично модифицированными 5'-ДМТ дцДНК, неспособными замкнуть векторную молекулу при лигировании.

Цель работы – исследовать стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях ПЦР.

**Материалы и методы.** В качестве модельного использовали 5'-ДМТ дТ<sub>15</sub> олигонуклеотид (рис. 1). В эксперименте в простейшем случае ПЦР-цикл моделировали как нагревание при 98 °С, так как это максимальная температура, используемая в ПЦР. В более сложном случае использовали ПЦР-цикл, рекомендованный производителем DreamTaq ДНК полимеразы.

В работе использовали 5'-ДМТ-дТ-CPG<sup>1</sup> с диаметром пор 1000 Å и емкостью 44 мкмоль/г (BioAutomation); ДМТ-дТ фосфоамидит; дихлорметан; уксусный ангидрид; лутидин; 1-метил-имидазол; трифторуксусную кислоту и метанол (Sigma-Aldrich); 5-(этилтио)-1Н-тетразол (Emp Biotech); ацетонитрил для ВЭЖХ с низким содержанием воды (0,002 %) (Fisher Chemical); 32 %-ный раствор аммиака (Roth); триэтиламин (ТЭА) (Alpha Aesar); картридж для ТФЭ Supelclean<sup>TM</sup> ENVI<sup>TM</sup>-18 SPE (Supelco); 10×DreamTaq буфер DreamTaq ДНК полимеразы (Thermo Scientific). 10×буфер Q5 ДНК полимеразы (New England Biolabs).

A<sub>260</sub> и спектры поглощения олигонуклеотида регистрировали на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Термостатирование растворов олигонуклеотида и ПЦР-цикл осуществляли на термоциклере DNA Engine (Bio Rad Laboratories).

Олигонуклеотид синтезировали, подвергали депротекции и очищали на картридже для ТФЭ в соответствии с методом, описанным в [15]. Для сохранения ДМТ-группы на 5'-конце олигонуклеотида из процедуры очистки исключена стадия детритилирования (обработка 2 %-ной трифторуксусной кислотой). После процедуры очистки раствор олигонуклеотида лиофилизировали на

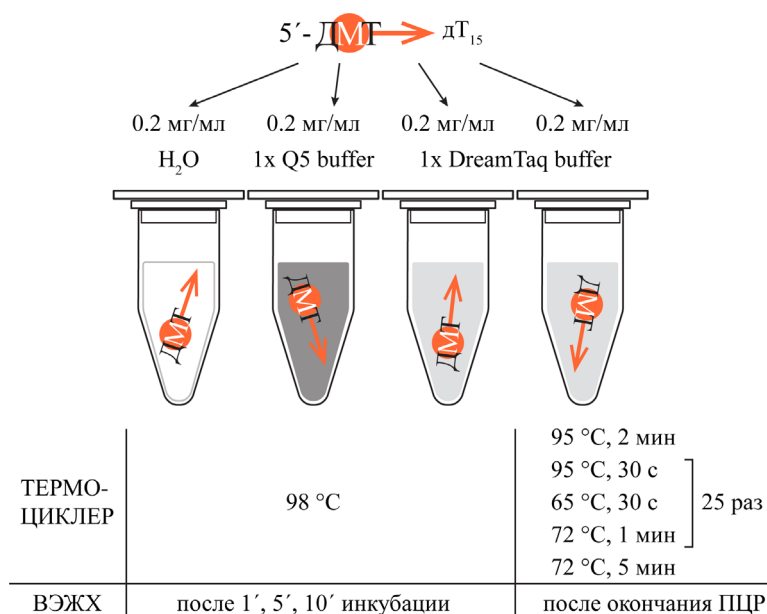


Рис. 1. Схема эксперимента по изучению стабильности 5'-ДМТ группы олигонуклеотида дТ<sub>15</sub> в условиях ПЦР  
 Fig. 1. Scheme of an experiment to study the stability of the 5'-DMT group of the oligonucleotide dT<sub>15</sub> under PCR conditions

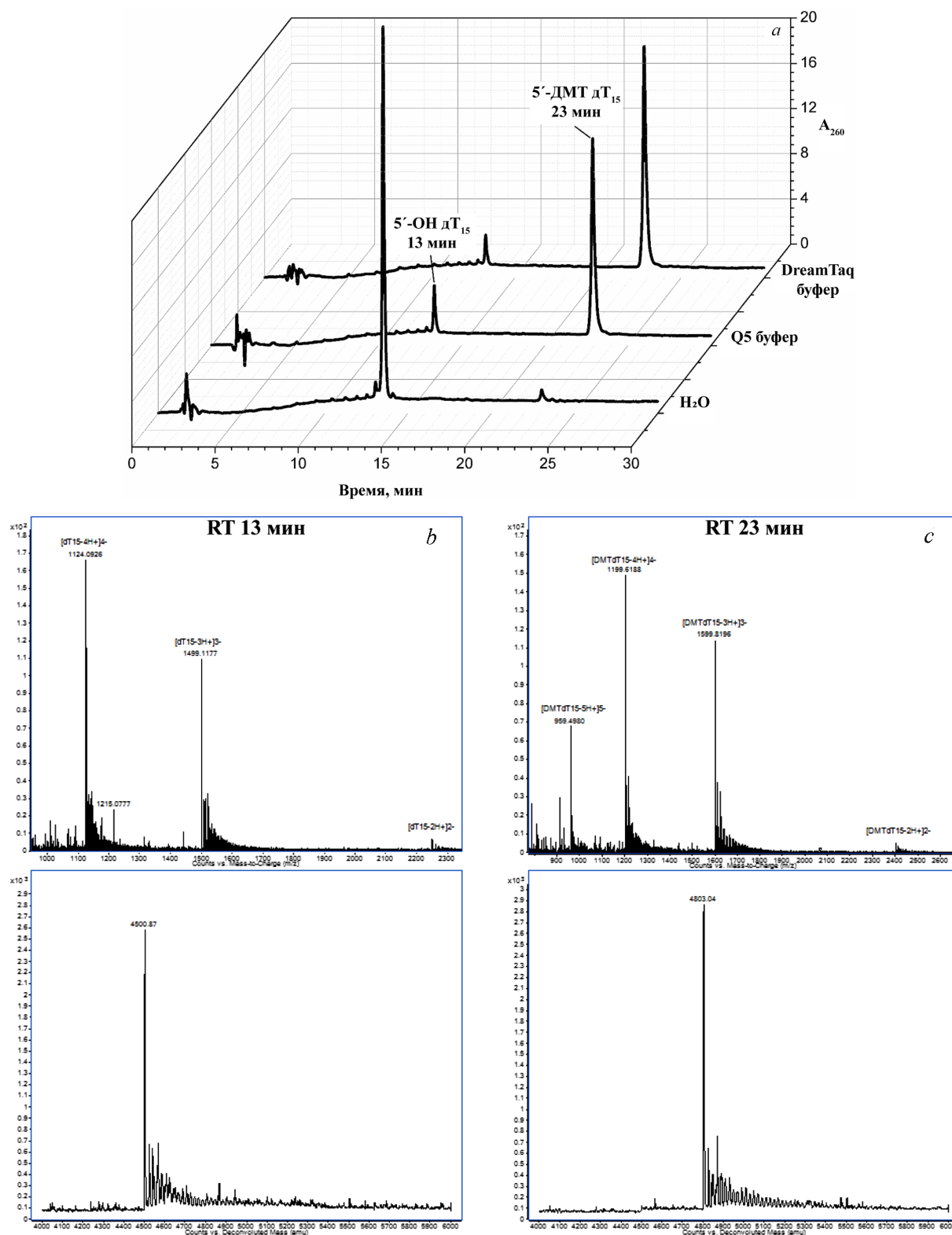


Рис. 2. Детритилирование 5'-DMT-дТ<sub>15</sub> олигонуклеотида в воде и буферных растворах для Q5 и DreamTaq ДНК полимераз после нагревания при 98 °С в течение 5 мин. *a* – хроматограммы (ВЭЖХ-УФ); *b* – масс-спектры хроматографических пиков, имеющих времена удерживания 13 и 23 мин, а также масс-спектры после деконволюции (в нижней части рисунка)

Fig. 2. Detritylation of 5'-DMT-dT<sub>15</sub> oligonucleotide in water and buffer solutions for Q5 and DreamTaq DNA polymerases after heating at 98 °C for 5 min. *a* – chromatograms (HPLC-UV); *b* – mass spectra of chromatographic peaks with retention times of 13 and 23 min, as well as mass spectra after deconvolution (in the lower part of the figure)

вакуумном центрифужном испарителе ScanVac (Labogene), причем в раствор предварительно добавляли 50 мкл концентрированного водного аммиака с целью предотвращения детритилирования.

Аналитическую ВЭЖХ с УФ (260 нм) и масс-спектрометрической (МС) детекцией осуществляли с помощью ВЭЖХ-системы Agilent 1290 в соответствии с [16] (см. раздел LC/MS Parameters for Agilent 6520 Accurate Mass QTOF Platform). Отличие использованного нами метода от описанного в приведенном выше источнике состоит в следующем: хроматографическая колонка – Poroshell 120 EC-C18 (2,1×100 мм, диаметр частиц сорбента – 2,7 мкм), подвижная фаза А – 200 мМ гексафторизопропанола и 8,6 мМ ТЭА (рН 7,7), концентрация раствора олигонуклеотида – 0,2 мг/мл. Для УФ-детекции на длине волны 260 нм использовали диодно-матричный детектор 1260 DAD VL (Agilent). Масс-спектры высокого разрешения записаны на масс-спектрометре Q-TOF 6550 (Agilent) в отрицательном режиме электроспрей-ионизации (упомянутый выше раздел [16]). Деконволюцию масс-спектров осуществляли с использованием модуля BioConfirm программного обеспечения MassHunter.

**Результаты и их обсуждение.** На рис. 2, а приведены хроматограммы для растворов модельного олигонуклеотида в разных растворителях, записанные после нагревания растворов в течение 5 мин при 98 °С. Элюция 5'-ДМТ дТ<sub>15</sub> олигонуклеотида происходит на 23 мин, а менее гидрофобный детритилированный олигонуклеотид 5'-ОН дТ<sub>15</sub> имеет время удерживания около 13 мин. На рис. 2, б отображены масс-спектры хроматографических пиков рис. 2, а с указанными временами удерживания для того же образца, что подтверждает интерпретацию пиков.

Данные для остальных времен инкубации при 98 °С, а также для ПЦР-цикла объединены в табл. 1. Приведенные в ней содержания 5'-ДМТ-дТ<sub>15</sub> определены методом ВЭЖХ (детекция при 260 нм) по площадям хроматографических пиков, соответствующих 5'-ДМТ-дТ<sub>15</sub> и 5'-ОН-дТ<sub>15</sub>. В деионизированной воде более 90 % олигонуклеотида теряет защитную группу уже в течение 5 мин нагревания при 98 °С. Коммерчески доступные буферы для ДНК полимераз намного более эффективно стабилизируют ДМТ-группу олигонуклеотида. Так, около 84 % олигонуклеотида с ДМТ-группой стабильно сохраняется в 1× буфер DreamTaq ДНК полимеразы даже при нагревании при 98 °С в течение 15 мин. Буфер для Q5 ДНК полимеразы показал менее хороший результат – около 72 % стабильного олигонуклеотида с защитой в том же температурно-временном режиме.

Таблица 1. Содержание 5'-ДМТ-дТ<sub>15</sub> в буферных растворах при нагревании до 98 °С

Table 1. 5'-DMT-dT<sub>15</sub> content in buffer solutions by heating to 98 °С

Растворитель	Содержание 5'-ДМТ-дТ <sub>15</sub> , %		
	1 мин	5 мин	15 мин
Вода	44,5	7,43	0 %
1×буфер Q5 ДНК полимеразы	–	88,4	71,5
1×буфер DreamTaq ДНК полимеразы	–	93,5	83,69
25 ПЦР-циклов в 1× буфере DreamTaq ДНК полимеразы		79,5	

В табл. 2 приведен состав различных коммерчески доступных ПЦР-буферов (информация – с сайтов производителей). Буферы, использованные нами, отличаются по составу и рН: буфер для Q5 ДНК полимеразы имеет рН 9,3, а для DreamTaq ДНК полимеразы – рН 8,3.

Исходя из химических свойств ДМТ-защиты, более высокое значение рН буфера должно стабилизировать модифицированный ею олигонуклеотид. Однако экспериментальные данные говорят об обратном. Это противоречие можно объяснить присутствием β-меркаптоэтанола в буфере для Q5 ДНК полимеразы.

В литературе описано нежелательное ретритилирование при деблокировании олигонуклеотидов в безводной среде, происходящее в результате смещения равновесия от ДМТ-катиона и олигонуклеотида без защитной группы к ДМТ-олигонуклеотиду [17]. Сильный нуклеофил (атом серы в составе тиола) может быть эффективным акцептором ДМТ-катиона, что будет приводить к смещению равновесия в сторону реакции детритилирования, таким образом снижая стабильность олигонуклеотида с ДМТ-группой.



Т а б л и ц а 2. Состав коммерческих ПЦР-буферов

T a b l e 2. Composition of commercial PCR buffers

ДНК полимеразы	pH 1×буфера	Состав 1×буфера	Производитель
<i>Taq</i>	pH 8,3(25 °C)	10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,01 % желатин	Sigma-Aldrich
<i>Pfu</i>	pH 8,8(25 °C)	20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 1,0 % ТритонX-100, 1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА) без нуклеаз	Promega
<i>Pwo</i>	pH 8,85(20 °C)	10 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 5 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 mM MgSO <sub>4</sub>	Roch
<i>Tth</i>	pH 8,9(25 °C)	10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 M KCl, 500 мкг/мл БСА, 0,5 % Твин 20	Sigma-Aldrich
<i>Q5</i>	pH 9,3(25 °C)	25 mM ТАПС-HCl, 50 mM KCl, 2 м M MgCl <sub>2</sub> , 1 mM β-меркаптоэтанол	NEB
<i>Phusion</i>	pH 9,3(25 °C)	25 mM ТАПС-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM β-меркаптоэтанол	NEB

П р и м е ч а н и е. ТАПС – N-трис(гидроксиметил)метил-3-аминопропансульфоновая кислота.

**Закключение.** Мы продемонстрировали стабильность 5'-ДМТ-группы в составе синтетических олигонуклеотидов в условиях ПЦР. pH и состав буфера для ПЦР определяют стабильность данной защитной группы. Присутствие тиольных соединений (β-меркаптоэтанол и дитиотреитол) в буфере повышает скорость детритилирования модельных олигонуклеотидов и, следовательно, может снижать выход 5'-ДМТ-дцДНК. Вместе с тем требуются дальнейшие исследования для более глубокого понимания возможности применения 5'-ДМТ-олигонуклеотидов в молекулярной и синтетической биологии. В частности, важны исследования влияния объемной и гидрофобной 5'-ДМТ-группы в составе синтетических олигонуклеотидов на функционирование ДНК полимераз, лигазы, экзонуклеаз. Получение дцДНК, 5'-концы которой имеют ДМТ-защиту, в перспективе позволит осуществлять селективное лигирование корректного продукта синтеза дцДНК и разработать новый способ получения протяженных оцДНК.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках задания 2.20 подпрограммы 2 государственной программы научных исследований «Химические технологии и материалы» на 2016–2020 гг., а также отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси «Разработка и автоматизация эффективных методов получения синтетических генов» на 2018–2019 гг.

**Acknowledgment.** This work has been performed as a part of project 2.20 of the subprogram 2 of the state program “Chemical technologies and materials” for 2016–2020, and also as a part of separate project of fundamental and applied scientific research of the National Academy of Sciences of Belarus “Development and automation of effective methods of synthetic gene obtaining” for 2018–2019.

### Список использованных источников

1. Versatile 5'-functionalization of oligonucleotides on solid support: amines, azides, thiols, and thioethers via phosphorus chemistry / G. P. Miller [et al.] // *J. Org. Chem.* – 2004. – Vol. 69, N 7. – P. 2404–2410. <https://doi.org/10.1021/jo035765e>
2. Enzymatic synthesis of RNAs capped with nucleotide analogues reveals the molecular basis for substrate selectivity of RNA capping enzyme: impacts on RNA metabolism / M. Issur [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 9. – P. e75310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075310>
3. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs / M. Manoharan // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2004. – Vol. 8, N 6. – P. 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.10.007>
4. The synthesis of isopropylidene mRNA cap analogs modified with phosphorothioate moiety and their evaluation as promoters of mRNA translation / M. Warminski [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23, N 13. – P. 3753–3758. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.001>
5. Potential therapeutic applications of RNA cap analogs / M. Ziemniak [et al.] // *Future Med Chem.* – 2013. – Vol. 5, N 10. – P. 1141–1172. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.96>
6. In vitro synthesis of gene-length single-stranded DNA / R. Veneziano [et al.] // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 6548. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24677-5>
7. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases / F. Chen [et al.] // *Nat. Methods.* – 2011. – Vol. 8, N 9. – P. 753–755. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1653>
8. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems / L. Cong [et al.] // *Science.* – 2013. – Vol. 339, N 6121. – P. 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
9. Homology-directed repair of DNA nicks via pathways distinct from canonical double-strand break repair / L. Davis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2014. – Vol. 111, N 10. – P. E924–932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400236111>
10. Homologous recombination between single-stranded DNA and chromosomal genes in *Saccharomyces cerevisiae* / J. R. Simon [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1987. – Vol. 7, N 7. – P. 2329–2334. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.7.2329>

11. Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: an RNA repair enzyme / L. K. Wang [et al.] // *EMBO J.* – 2002. – Vol. 21, N 14. – P. 3873–3880. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf397>
12. Heat-labile phosphatase simplifies the preparation of dephosphorylated vector DNA / L. M. Hoffman [et al.] // *Gene.* – 1990. – Vol. 88, N 1. – P. 97–99. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90064-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90064-x)
13. Синтетические нуклеиновые кислоты. Получение и перспективы терапевтического применения / Т. С. Орещкая [и др.]. – М.: МГУ, 2015. – 102 с.
14. Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography / M. Gilar [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – Vol. 890, N 1. – P. 167–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00521-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00521-5)
15. Programmed assembly of long DNA synthons: design, mechanism, and online monitoring / V. V. Shchur [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2019. – Vol. 103, N 21–22. – P. 9103–9117. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10099-4>
16. Characterization of Synthetic Oligonucleotides Using Agilent LC/MS Systems [Electronic Resource] // *Agilent Technologies.* – Mode of access: <https://www.gimitec.com/file/5990-3539EN.pdf>. – Date of access: 18.09.2020.
17. Solid-Phase Oligodeoxynucleotide Synthesis: A Two-Step Cycle Using Peroxy Anion Deprotection / A. B. Sierzchala [et al.] // *Journal of the American Chemical Society.* – 1998. – Vol. 125, N. 44. – P. 13427–13441. <https://doi.org/10.1021/ja030376n>

## References

1. Miller G. P., Kool E. T. Versatile 5'-functionalization of oligonucleotides on solid support: amines, azides, thiols, and thioethers via phosphorus chemistry. *Journal of Organic Chemistry*, 2004, vol. 69, no. 7, pp. 2404–2410. <https://doi.org/10.1021/jo035765e>
2. Issur M., Bougie I., Despains S., Bisaillon M. Enzymatic synthesis of RNAs capped with nucleotide analogues reveals the molecular basis for substrate selectivity of RNA capping enzyme: impacts on RNA metabolism. *PLoS One*, 2013, vol. 8, iss. 9, pp. e75310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075310>
3. Manoharan M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2004, vol. 8, iss. 6, pp. 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.10.007>
4. Warminski M., Kowalska J., Buck J., Zuberek J., Lukaszewicz M., Nicola C., Kuhn A. N., Sahin U., Darzynkiewicz E., Jemielity J. The synthesis of isopropylidene mRNA cap analogs modified with phosphorothioate moiety and their evaluation as promoters of mRNA translation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, vol. 23, iss. 13, pp. 3753–3758. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.001>
5. Ziemniak M., Strenkowska M., Kowalska J., Jemielity J. Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 5, iss. 10, pp. 1141–1172. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.96>
6. Veneziano R., Shepherd T. R., Ratanalert S., Bellou L., Tao C., Bathe M. In vitro synthesis of gene-length single-stranded DNA. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, iss. 1, pp. 6548. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24677-5>
7. Chen F., Pruet-Miller S. M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton J., Collingwood T. N., Frodin M., Davis G. D. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature Methods*, 2011, vol. 8, iss. 9, pp. 753–755. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1653>
8. Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science*, 2013, vol. 339, iss. 6121, pp. 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
9. Davis L., Maizels N. Homology-directed repair of DNA nicks via pathways distinct from canonical double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2014, vol. 111, iss. 10, pp. E924–932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400236111>
10. Simon J. R., Moore P. D. Homologous recombination between single-stranded DNA and chromosomal genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1987, vol. 7, iss. 7, pp. 2329–2334. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.7.2329>
11. Wang L. K., Lima C. D., Shuman S. Structure and mechanism of T4 polynucleotide kinase: an RNA repair enzyme. *EMBO Journal*, 2002, vol. 21, iss. 14, pp. 3873–3880. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf397>
12. Hoffman L. M., Jendrisak J. Heat-labile phosphatase simplifies the preparation of dephosphorylated vector DNA. *Gene*, 1990, vol. 88, iss. 1, pp. 97–99. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90064-x](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90064-x)
13. Oretskaya T. S., Metelev V. G., Romanova E. A., Gottikh M. B. *Synthetic nucleic acids. Obtaining and perspectives of therapeutic application.* Moscow, MSU Publ., 2015. 102 p. (in Russian).
14. Gilar M., Bouvier E. S. P. Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2000, vol. 890, iss. 1, pp. 167–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00521-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00521-5)
15. Shchur V. V., Burankova Y. P., Shapira M. A., Klevzhits D. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. Programmed assembly of long DNA synthons: design, mechanism, and online monitoring. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, vol. 103, iss. 21–22, pp. 9103–9117. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10099-4>
16. Kreutzian T., Waldheim M., Jackson A., Hoppe M., Mokler V., Eidenmueller D., Hill K. Characterization of Synthetic Oligonucleotides Using Agilent LC/MS Systems. *Agilent Technologies*. 2009. Available at: <https://www.gimitec.com/file/5990-3539EN.pdf>. (accessed 18 September 2020).
17. Sierzchala A. B., Dellinger D. J., Betley J. R., Wyrzykiewicz T. K., Yamada C. M., Caruthers M. H. Solid-Phase Oligodeoxynucleotide Synthesis: A Two-Step Cycle Using Peroxy Anion Deprotection. *Journal of the American Chemical Society*, 1998, vol. 125, iss. 44, pp. 13427–13441. <https://doi.org/10.1021/ja030376n>

### Информация об авторах

*Щур Вероника Владимировна* – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shchur931@gmail.com

*Жолнерович Андрей Иванович* – студент. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.zhauniarovich@gmail.com

*Буренкова Юлия Павловна* – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ms.yuliyab@mail.ru

*Янцевич Алексей Викторович* – канд. хим. наук, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.lyantsevich@gmail.com

*Усанов Сергей Александрович* – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Акад. В. Ф. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: us-anov@iboch.by

### Information about the authors

*Veronika Vladimirovna Shchur* – Junior Researcher; Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shchur931@gmail.com

*Andrei Z. Ivanovich* – Student. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.zhauniarovich@gmail.com

*Yuliya P. Burankova* – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ms.yuliyab@mail.ru

*Aleksei V. Yantsevich* – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.lyantsevich@gmail.com

*Sergei A. Usanov* – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. S. (Chemistry), Professor, Principal Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. Kuprevich Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by