

**БІААРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**УДК 577.11  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-398-406>Поступила в редакцию 08.08.2022  
Received 08.08.2022**Е. А. Улащик, Т. П. Ахламёнок, П. Ю. Борищук, О. Л. Шарко, В. В. Шманай***Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь***ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК  
НА ПЛАНШЕТНОМ АВТОМАТИЧЕСКОМ СИНТЕЗАТОРЕ**

**Аннотация.** Разработан протокол синтеза и подобраны подходящие реагенты для получения направляющих РНК-олигонуклеотидов для системы CRISPR/Cas на автоматическом синтезаторе ASM-2000 в масштабе 500 нмоль. Отработаны методики выделения, очистки и аналитического контроля синтетических РНК-олигонуклеотидов. С использованием улучшенной технологии получены олигонуклеотиды, являющиеся направляющими РНК для системы CRISPR Cas12a.

**Ключевые слова:** направляющие РНК, CRISPR Cas12a, ASM-2000, олигонуклеотиды, олигонуклеотидный синтез, ВЭЖХ

**Для цитирования.** Оптимизация технологии получения направляющих РНК на планшетном автоматическом синтезаторе / Е. А. Улащик [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 398–406. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-398-406>

**E. A. Ulashchik, T. P. Akhlamionok, P. Y. Baryshchuk, O. L. Sharko, V. V. Shmanai***Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***OPTIMIZATION OF THE TECHNOLOGY FOR OBTAINING GUIDE RNA USING  
PLATE AUTOMATIC SYNTHESIZER**

**Abstract.** A synthetic protocol was developed and optimal reagents have been selected for obtaining guide RNA oligonucleotides for the CRISPR/Cas system using ASM-2000 automatic synthesizer in 500 nmol scale. Methods for the isolation, purification and analytical control of synthetic RNA oligonucleotides have been developed. The improved technology has been used for preparation of guide RNAs for the CRISPR Cas12a system.

**Keywords:** guide RNA, CRISPR CAS12a, ASM-2000, oligonucleotides, oligonucleotide synthesis, HPLC

**For citation.** Ulashchik E. A., Akhlamionok T. P., Baryshchuk P. Y., Sharko O. L., Shmanai V. V. Optimization of the technology for obtaining guide RNA using plate automatic synthesizer. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2022, vol. 58, no. 4, pp. 398–406 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-398-406>

**Введение.** Синтетические РНК-олигонуклеотиды находят широкое применение в биотехнологии и медицине [1, 2]. Активно ведутся исследования таких объектов, как миРНК, аптамеры, антисмысловые олигонуклеотиды, антагомиры и направляющие РНК в системе CRISPR/Cas [3–5]. Последняя технология, используемая для редактирования генома, сейчас переживает настоящий бум [6–8]. Ключевым компонентом системы CRISPR/Cas являются синтетические направляющие РНК, которые указывают нуклеазе место разреза в двухцепочечной ДНК-мишени (рис. 1). Длина таких РНК варьируется в зависимости от типа системы CRISPR/Cas [9]. Так, с нуклеазами Cas9 используются РНК-олигонуклеотиды длиной около 100 нуклеотидов, а с нуклеазами Cas12a – порядка 40 нуклеотидов [10]. Недавно для нуклеаз Cas12a был продемонстрирован сплит-эффект, позволяющий использовать усеченные фрагменты направляющих РНК [11]. В силу активного изучения технологии CRISPR/Cas возникает потребность в достаточно большом количестве синтетических направляющих РНК.

РНК-олигонуклеотидный синтез – сложный автоматизированный процесс [12]. Циклическое повторение стадий позволяет выращивать на поверхности твердофазного носителя достаточно

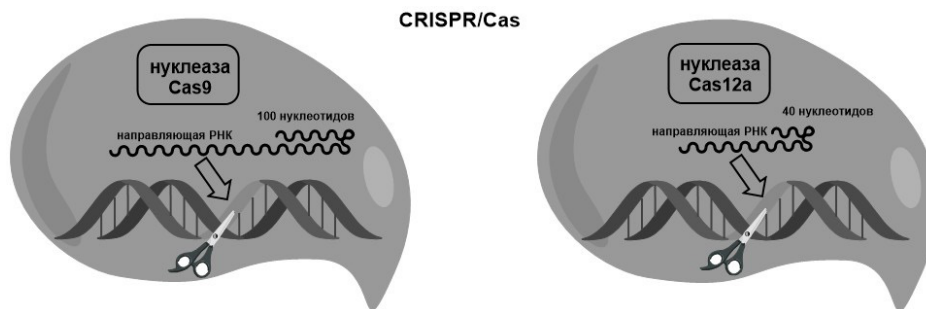


Рис. 1. Системы CRISPR/Cas и направляющие РНК

Fig. 1. CRISPR/Cas systems and guide RNAs

длинные цепи олигонуклеотидов, однако с увеличением длины цепи синтез становится более чувствительным к эффективности каждой стадии. При конденсации одного звена цепи происходят три химических реакции. Если выход каждой реакции составляет 99 %, то суммарный выход олигонуклеотида длиной 10 оснований без учета выделения и очистки составит  $0,99^{30} = 74$  %, длиной 20 оснований –  $0,99^{60} = 55$  %, длиной 40 оснований –  $0,99^{120} = 30$  %, длиной 100 оснований –  $0,99^{300} = 5$  %. Повышение выхода от 99 до 99,5 % увеличивает суммарный выход соответственно до 86 % (10), 74 % (20), 55 % (40) и 22 % (100). Чем длиннее синтезируемый олигонуклеотид, тем больше внимания необходимо уделить оптимизации протокола синтеза и состава используемых реагентов [13]. На рис. 2 изображены ключевые стадии РНК-олигонуклеотидного синтеза: стадия удаления диметокситритильных групп (деблокирование), стадия конденсации, стадия блокирования свободных ОН-групп (экспирование, результат побочной реакции, которая не учитывалась в расчетах), стадия окисления. Так, неполное деблокирование ведет к снижению выхода и накоплению более короткого олигонуклеотида, плохо отработанная стадия конденсации способствует низкому выходу и накоплению продуктов обрыва роста цепи, плохо протекающая стадия экспирования является причиной роста цепей с пропусками, а недо-

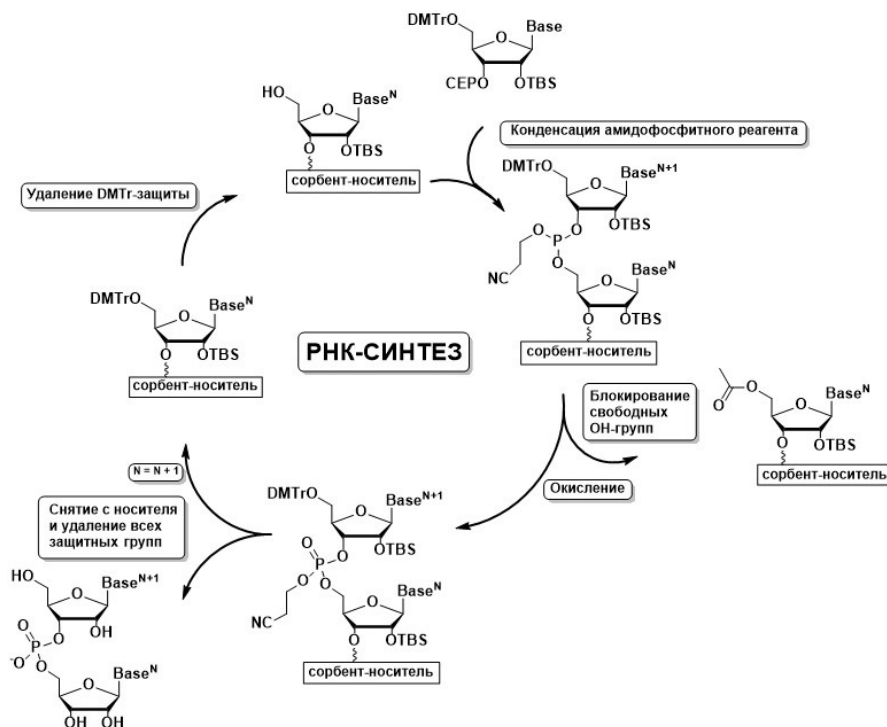


Рис. 2. Цикл автоматического РНК-синтеза

Fig. 2. Automatic RNA-synthesis cycle

окисленный фосфор является нестабильным и не выдерживает последующие стадии синтеза [14]. При синтезе длинных РНК-олигонуклеотидов необходимо не только тщательно подбирать состав реагентов, но и детально оптимизировать сам процесс синтеза для конкретного олигонуклеотидного синтезатора. Особое внимание следует уделять пост-синтетическим операциям, а именно: снятию РНК с носителя и удалению всех защитных групп, процедурам очистки и анализа синтетических олигонуклеотидов.

В данной работе улучшен подход к получению направляющих РНК-олигонуклеотидов с использованием автоматического синтезатора ASM-2000. В результате подобраны оптимальные по составу растворы реагентов, модифицированы программные протоколы производителя, отработаны условия удаления всех защитных групп с олигонуклеотидов, найдены оптимальные способы очистки и анализа синтезированных РНК.

### Экспериментальная часть

**Материалы, оборудование и методы.** Для осуществления синтеза направляющих РНК использовали оптимизированные по составу рабочие растворы. При приготовлении растворов применяли абсолютизированные растворители. Для удаления диметокситритильной защиты использовали 3 %-ный раствор дихлоруксусной кислоты в хлористом метиле (деблокирующий раствор – Dbl); для осуществления реакции конденсации – 0,10 М и 0,075 М растворы защищенных нуклеозидных фосфорамидитов в ацетонитриле; в качестве активатора – 0,45 М раствор 5-(этилтио)-1Н-тетразола и 0,25 М раствор 5-(бензилтио)-1Н-тетразола в ацетонитриле (активатор – Act); для окисления фосфора до пентавалентного – 0,02 М раствор йода в смеси ТГФ/пиридин/вода («оксидайзер» – Oxd); в качестве эспирующих растворов – 10 %-ный раствор уксусного ангидрида в смеси ТГФ/пиридин («кэпирующая смесь А» – Cap A) и 16 %-ный раствор N-метилимидазола в ТГФ с добавлением 3,7 % ДМАП («кэпирующая смесь В» – Cap B). В качестве носителя для олигонуклеотидного синтеза применяли стекло с контролируемым размером пор (500 Å), модифицированное 40 мкмоль/г универсального линкера. Для деблокирования РНК-олигонуклеотидов применяли 40 %-ный раствор метиламина в смеси с насыщенным раствором аммиака 1:1 (АМА), для удаления TBS-групп – Et<sub>3</sub>N·3HF. Все реагенты и растворители использовались квалификации «х. ч.» или аналогичной в случае зарубежных аналогов.

Синтез РНК осуществляли на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК Биоссет ASM-2000. Аналитическую и препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе Thermo Scientific UltiMate 3000, масс-спектры записывали с помощью ВЭЖХ-МС системы (Thermo Scientific UltiMate 3000 с масс-детектором Thermo Scientific LTQ XL), тип ионизации – нагреваемый электроспрей. УФ-спектры поглощения записывали на фотометре Thermo Scientific NanoDrop One. Растворы упаривали с помощью роторного вакуумного концентратора (CentriVac Labconco).

**Синтез направляющих РНК-олигонуклеотидов.** Синтез осуществляли на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК Биоссет ASM-2000 как под управлением стандартного протокола, так и с помощью модифицированной программы в масштабе 500 нмоль. Модификация программы включала в себя использование модифицированных блоков на определенных стадиях олигонуклеотидного синтеза.

*Стадию удаления диметокситритильных групп (деблокирование)* осуществляли путем 7-кратной подачи в реакционную колонку, загруженную твердофазным носителем, раствора деблокирующего реагента. Время контакта реагента с носителем за одну подачу – 15 с. В стандартном протоколе такая операция проводится путем 5-кратной подачи, время контакта – 10 с. Следует отметить, что удаление диметокситритильной защиты при использовании стандартного протокола неполное (можно оценить визуально по розовому окрашиванию носителя, если на данном этапе извлечь колонку с носителем).

*Стадия отмывки сопел дозатора* состояла из процедуры отмывки дозирующего устройства с помощью автоматической моющей системы, встроенной в ASM-2000. Процедура проводилась на каждом шаге олигонуклеотидного синтеза. В стандартном протоколе такая операция проводится лишь один раз в начале синтеза.

*Стадия конденсации* состояла из 2-кратного дозирования смеси растворов амидофосфитного реагента и активатора в объемном соотношении 1 : 1 в реакционную колонку, содержащую де-

блокированный нуклеотид на твердофазном носителе. Время контакта за одну подачу смеси – 3 мин, в стандартном протоколе время контакта – 35 с. При синтезе длинных РНК и использовании стандартного активатора такое время контакта неприемлемо из-за низкой эффективности стадии конденсации.

*Стадия кэпирования* состояла из 2-кратного дозирования смеси растворов для кэпирования Саp А и Саp В в объемном соотношении 1 : 1 в реакционную колонку. Время взаимодействия за одну подачу смеси – 30 с. В стандартном протоколе использовалось однократное дозирование с временем контакта 28 с.

*Стадию окисления* осуществляли путем 5-кратной подачи в реакционную колонку раствора окислителя. Время окисления за одну подачу составляло 23 с. В стандартном протоколе использовалась 2-кратная подача окислителя с временем контакта 20 с.

*Вакуумный импульс* был добавлен на каждой стадии олигонуклеотидного синтеза для лучшего смачивания носителя раствором соответствующего реагента. Вакуумирование колонки с твердофазным носителем в реакционной камере синтезатора осуществляли в течение 33 мс. В стандартном протоколе такая процедура отсутствует.

**Деблокирование РНК.** Удаление цианоэтильных защитных групп проводили после окончания синтеза в автоматическом режиме путем 3-кратной подачи 20 %-ного раствора диэтиламина в ацетонитриле в реакционную колонку. Время контакта за одну подачу составляло 5 мин.

*Процедуры снятия с твердофазного носителя и одновременного удаления защитных групп с гетероциклических оснований* осуществляли посредством воздействия смеси АМА на твердофазный носитель с олигонуклеотидом. Носитель извлекали из реакционной колонки, помещали в герметичную пробирку объемом 1,5 мл. В пробирку добавляли раствор АМА – 750 мкл, смесь выдерживали при 65 °С в течение часа. Затем раствор отделяли от носителя, помещали в пробирку объемом 1,5 мл и упаривали досуха с использованием вакуумного концентратора.

*Процедуру удаления TBS-защитных групп* осуществляли посредством воздействия  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ . Остаток TBS-защитной РНК растворяли в 63 мкл ДМСО, к этому раствору добавляли 79 мкл  $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$  и выдерживали при 65 °С в течение 2,5 ч. По завершении стадии снятия TBS-защитных групп в полученную смесь добавляли 33 мкл 3 М раствора ацетата натрия и 1 мл н-бутилового спирта. Полученную смесь перемешивали и оставляли при 0 °С на час. Затем полученный осадок центрифугировали, супернатант сливали, осадок промывали 1 мл этилового спирта и сушили в вакуумном концентраторе. Высушенный осадок растворяли в 1 мл свободной от РНКаз воды. Раствор хранили в замороженном виде при –20 °С.

**Измерение количества РНК (методика А).** Измерение количества проводили путем записи УФ-спектра поглощения. Для измерения 2 мкл водного раствора помещали на рабочую поверхность фотометра Thermo Scientific NanoDrop One и запускали программу записи УФ-спектра. Величина поглощения при 260 нм представляет собой количественную характеристику концентрации раствора олигонуклеотида, выраженную в оптических единицах на 1 мл (о.е./мл).

**Анализ методом ВЭЖХ-ИО (методика Б).** Анализ полученных РНК проводили методом ионообменной ВЭЖХ (ВЭЖХ-ИО) с использованием колонки TSKgel SuperQ-5PW (7,5 м × 7,5 см, 10 мкм) в градиенте буфера Б 0 – 47 % за 31,3 мин, 47 – 100 % за 6 мин с потоком 1 мл/мин. Буфер А: 50 мМ водный раствор Tris-HCl (pH 7,6) с добавлением 10 % ацетонитрила. Буфер Б: 600 мМ раствор  $\text{NaClO}_4$  в буфере А. Для анализа отбирали аликвоту 10 мкл и разбавляли до 1 мл свободной от РНКаз водой. Образец помещали в накопитель автосамплера и вводили в автоматическом режиме.

**МС анализ (методика В).** Анализ методом МС проводили в автоматическом режиме с пробоподготовкой образца в процессе нанесения и анализа. Для анализа отбирали аликвоту (10 мкл) раствора РНК-олигонуклеотида и разбавляли до 100 мкл свободной от РНКаз водой. Образец помещали в накопитель автосамплера и в автоматическом режиме наносили на сорбционную колонку (DNA Pac RP 2,1 × 10 мм, 4 мкм) в потоке 0,4 мл/мин буфера Б. Сорбционную колонку промывали буфером Б 1 мин, при этом поток элюента направлялся в обход МС детектора. После удаления солей на колонку подавали 20 % буфер А в буфере Б в течение 1,5 мин, при этом поток элюента направлялся в МС-детектор на 1,3 мин анализа. Буфер А: ацетонитрил, буфер Б: 50 мМ водный раствор гексафторизопропанола (HFIP) с концентрацией диизопропилэтиламина (DIPEA) 5 мМ и содержанием ацетонитрила 5 % (pH 8,55). Запись вели в отрицательном режиме электро-спрей-ионизации. Параметры МС: температура источника 350 °С, напряжение источника 2,5 кВ,



температура капилляра 380 °С, напряжение на капилляре – 42 В. Диапазон сканирования – 200–2000 а.е.м. Масс-спектр обрабатывали с использованием программ BioPharma Finder (Thermo Scientific) или ProMass (Novatia).

**Очистка методом ВЭЖХ-ИО (методика Г).** Очистку РНК проводили методом ионообменной ВЭЖХ (ВЭЖХ-ИО) с использованием колонки TSKgel SuperQ-5PW (7,5 мм × 7,5 см, 10 мкм) в градиенте буфера Б 0 – 47 % за 31,3 мин, 47 – 100 % за 6 мин с потоком 1 мл/мин. Буфер А: 50 мМ водный раствор Tris-HCl (pH 7,6) с добавлением 10 % ацетонитрила. Буфер Б: 600 мМ раствор NaClO<sub>4</sub> в буфере А. Для очистки образец разбавляли до 2 мл свободной от РНКаз водой, помещали в накопитель автосамплера и вводили в автоматическом режиме. Ориентируясь на хроматограмму, собирали фракции, соответствующие основному пику. Каждую фракцию анализировали по методике В. Целевые фракции объединяли и упаривали на вакуумном концентраторе Labconco. Упаренный РНК-олигонуклеотид растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз, и высаживали ацетоном при –5 °С. Затем полученный осадок центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали 2 мл ацетона и сушили в вакуумном концентраторе. Высушенный осадок растворяли в 1 мл свободной от РНКаз воды, после чего измеряли его оптическую плотность по методике А. Полученные образцы охарактеризовали по методикам Б и В. Растворы РНК-олигонуклеотидов хранили в замороженном виде при –20 °С.

### Результаты и их обсуждение

**Оптимизация РНК-синтеза.** Для оценки эффективности протоколов олигосинтеза была выбрана последовательность **ON1**, являющаяся направляющей РНК для нуклеазы семейства Cas12a длиной 40 нуклеотидов [1].

**ON1:** rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrCrUrCrUrArUrUrGrArUrCrCrCrCrArCrC

Синтез длинных РНК-олигонуклеотидов на автоматическом синтезаторе ASM-2000 с использованием стандартных заводских протоколов и реагентов не приводил к удовлетворительному результату. Так, использование стандартной программы для масштаба синтеза 500 нмоль и рекомендуемых растворов позволили получить лишь смесь олигонуклеотидов с очень низким содержанием РНК нужной длины (рис. 3, а). Замена активатора на 5-(бензилтио)-1Н-тетразол и добавление в протокол синтеза стадии отмывки сопел дозатора позволило незначительно увеличить содержание целевого РНК-олигонуклеотида (рис. 3, б), однако количество коротких цепей в отно-

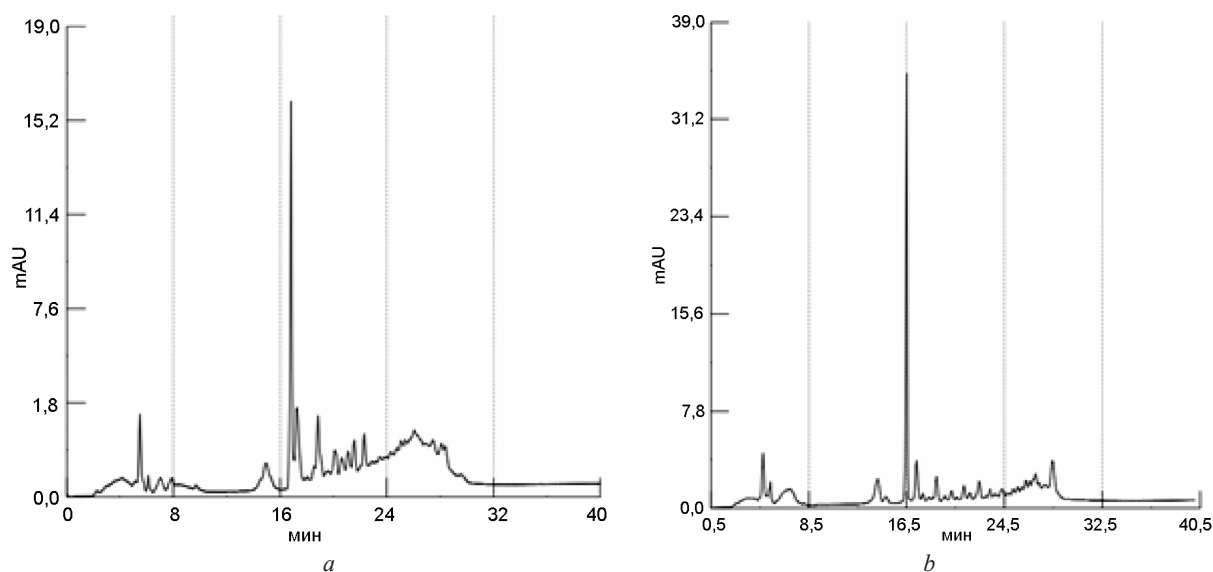


Рис. 3. Аналитическая ВЭЖХ синтетической РНК (ON1) после удаления защитных групп (стандартный протокол синтеза): а – активатор 5-(этилтио)-1Н-тетразол, б – активатор 5-(бензилтио)-1Н-тетразол

Fig. 3. Analytical HPLC of synthetic RNA (ON1) after deprotection, standard synthetic protocol: а – activator 5-(ethylthio)-1H-tetrazole, б – activator 5-(benzylthio)-1H-tetrazole

шении к полноразмерному олигонуклеотиду оставалось неприемлемо большим.

Для повышения эффективности РНК-синтеза предпринят комплекс дополнительных мер по оптимизации протокола синтеза и подбору состава реагентов. Так, для повышения эффективности стадии удаления диметокситригидрокси-защитной группы было увеличено время контакта носителя с деблокирующим раствором. Оценка удаления диметокситригидрокси-групп проводилась визуально по остаточному окрашиванию носителя. При эффективной процедуре окрашивания не наблюдалось. Время конденсации было увеличено до 3 мин, процедура проводилась двукратно. Для увеличения эффективности блокирования незащищенных гидроксильных групп было увеличено время контакта с кэпирующей смесью до 2 мин (процедура проводилась 2 раза), а также использовали модифицированный по составу раствор Сар В с добавлением 3,7 % ДМАП. Добавка ДМАП существенно ускоряет реакцию ацилирования ОН-групп в олигосинтезе [15, 16]. Стадия окисления осуществлялась с использованием стандартного раствора, но с увеличенным временем контакта, что уменьшало содержание недоокисленных фосфитных групп. Для удаления защитных групп после синтеза использовали стандартные реагенты, время деблокирования раствором АМА увеличено до 60 мин для полного удаления защитных групп и линкера, остающегося после снятия цепи с универсального носителя. После оптимизации процесса РНК-синтеза на синтезаторе ASM-2000 удалось получить приемлемое соотношение основного и побочных продуктов (рис. 4). Кроме того, использование оптимизированного протокола позволило снизить рабочие концентрации амидофосфитных реагентов до 0,075 М.

**Очистка направляющих РНК.** После отработки условий синтеза РНК необходимо было подобрать подходящую методику очистки синтезированных олигонуклеотидов. Одним из распространенных подходов к очистке РНК-олигонуклеотидов является ионообменная хроматография в градиенте перхлората натрия. Для создания градиента использовался 600 мМ раствор перхлората натрия в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7,6). Для подбора оптимальной скорости роста градиента выполняли аналитический контроль по ВЭЖХ и оценивали эффективность разделения смеси олигонуклеотидов после синтеза. На рис. 5, а представлена хроматограмма, полученная при использовании градиента 0–47 % буфера Б за 15 мин. Видно, что при таком градиенте примеси плохо отделяются от основного вещества, и использование такой программы для очистки будет неэффективным. Увеличение скорости роста градиента в два раза приводило к приемлемой картине (рис. 5, б). На основании полученных аналитических данных была отработана препаративная методика (методика Г), которая использовалась для очистки направляющих РНК (рис. 5, с).

**Анализ синтезированных РНК.** Анализ синтезированных направляющих РНК проводили по методикам Б и В. Ионообменная ВЭЖХ с использованием перхлората натрия способствовала разрушению вторичных структур, что позволяло точнее оценить чистоту полученных объектов (рис. 6, а). Подтверждение правильности и целостности последовательности проводилось масс-спектрометрически (рис. 6, б). Особенностью масс-спектрометрического анализа являлось то, что пробоподготовка проводилась в процессе анализа. Так, сорбированный материал на колонке с обращенной фазой отмывался буфером, совместимым с масс-спектрометром, что позволяло удалить излишки солей. Дальнейший быстрый рост содержания ацетонитрила способствовал попаданию материала в МС-детектор. Полученный спектр обрабатывался программами BioPharma Finder (Thermo Scientific) и ProMass (Novatia) с использованием алгоритма деконволюции, что позволяло получить значение массы молекулярного иона (методика В).

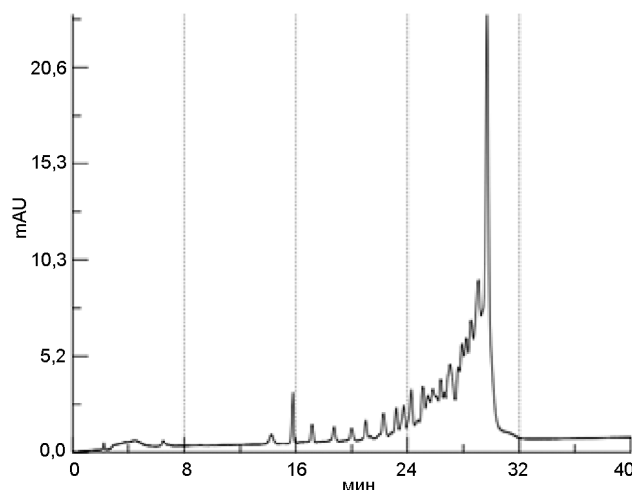


Рис. 4. Аналитическая ВЭЖХ синтетической РНК (ON1) после удаления защитных групп (модифицированный протокол синтеза)

Fig. 4. Analytical HPLC of synthetic RNA (ON1) after deprotection, modified synthetic protocol

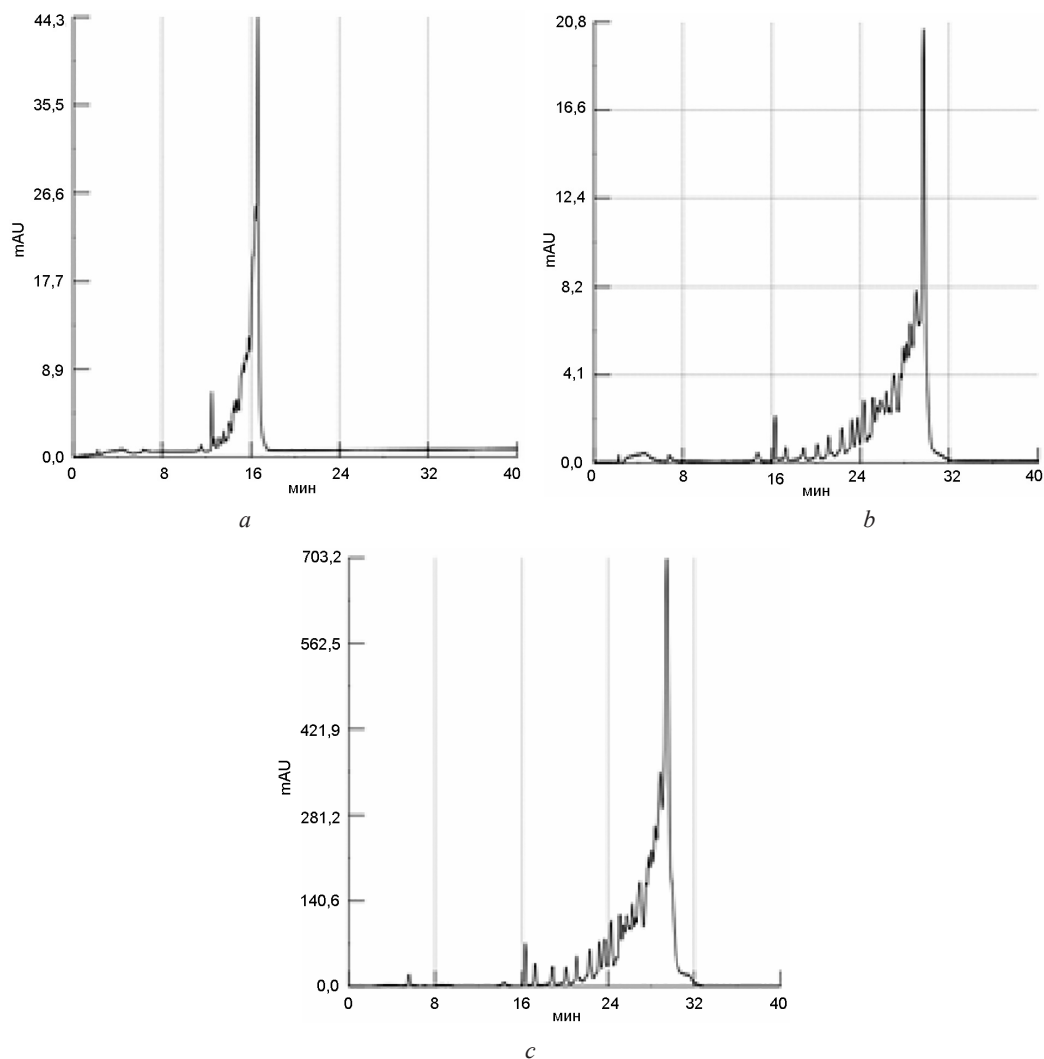


Рис. 5. Отработка условий очистки РНК (ON1):

*a* – быстрый рост градиента, *b* – медленный рост градиента, *c* – препаративная ВЭЖХ

Fig. 5. Development of RNA (ON1) purification conditions: *a* – fast gradient, *b* – slow gradient, *c* – preparative HPLC

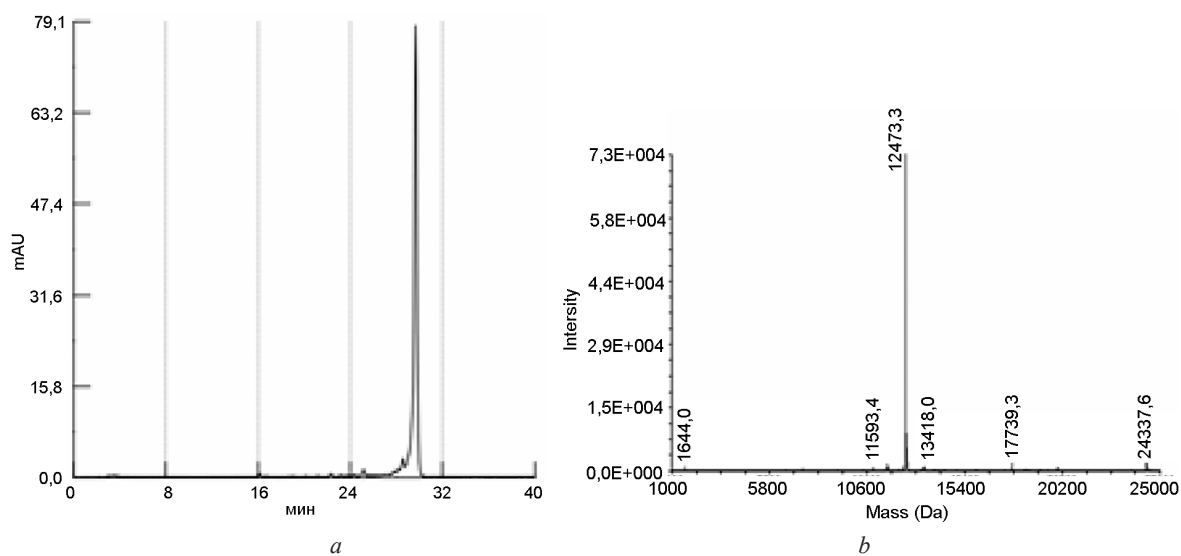


Рис. 6. Аналитическая хроматограмма и масс-спектр (после процедуры деконволюции) очищенной РНК (ON1)

Fig. 6. Analytical chromatogram and mass-spectrum (after deconvolution) of purified RNA (ON1)

Количества полученных направляющих РНК (таблица) определяли посредством измерения оптической плотности растворов с использованием фотометра Thermo Scientific NanoDrop по методике А.

#### Аналитические характеристики синтезированных РНК

##### Analytical characteristics of synthesized RNAs

| Название | Последовательность, 5'-3'  | Оптическая плотность (260 нм), о.е. | Рассчитанная масса, Да | Найденная масса, Да |
|----------|--|-------------------------------------|------------------------|---------------------|
| ON1      | rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrUrUrGrUrArGrArUrCrCrCrUrCrUrArUrUrGrArUrCrCrCrArCrC     | 7.95                                | 12 472.42              | 12 473.30           |
| ON2      | rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrUrUrGrUrArGrArUrGrArGrArArGrUrCrArUrArUrArUrArArGrGrUrA | 8.96                                | 13 105.87              | 13 106.04           |

**Заклучение.** Таким образом, в данной работе выполнена оптимизация технологии синтеза направляющих РНК-олигонуклеотидов с использованием автоматического синтезатора ASM-2000. Предложены оптимальные по составу реагенты и протоколы синтеза, подходящие для эффективного РНК-синтеза. С использованием отработанных методик получены и охарактеризованы олигонуклеотиды (**ON1** и **ON2**), являющиеся направляющими РНК для системы CRISPR Cas12a. Полученные результаты могут быть полезны для оптимизации протоколов получения синтетических РНК на других автоматических ДНК/РНК-синтезаторах.

#### Список использованных источников

1. Bajan, S. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs / S. Bajan, G. Hutvagner // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 1. – P. 1–26. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>
2. Khvorova, A. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility / A. Khvorova, J. K. Watts // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35, N 3. – P. 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>
3. Kang, K. N. RNA aptamers: a review of recent trends and applications. / K. N. Kang, Y. S. Lee // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 131 – P. 153–169. [https://doi.org/10.1007/10\\_2012\\_136](https://doi.org/10.1007/10_2012_136)
4. The Limitless Future of RNA Therapeutics / T. R. Damase [et al.] // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2021. – Vol. 9, March. – P. 1–24. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628137>
5. Kole, R. RNA therapeutics: Beyond RNA interference and antisense oligonucleotides / R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11, N 2. – P. 125–140. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>
6. The CRISPR revolution and its potential impact on global health security / K. E. Watters [et al.] // *Pathog. Glob. Health.* – 2021. – Vol. 115, N 2. – P. 80–92. <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1880202>
7. Novel crisper-cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives / S. Nidhi [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 7. – P. 1–42. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
8. Khalil, A. M. The genome editing revolution: review / A. M. Khalil // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 18, N 1. – Art. N 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>
9. Allen, D. Using Synthetically Engineered Guide RNAs to Enhance CRISPR Genome Editing Systems in Mammalian Cells / D. Allen, M. Rosenberg, A. Hendel // *Front. Genome Ed.* – 2021. – Vol. 2. – P. 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.617910>
10. Swarts, D. C. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure–function comparisons and implications for genome editing / D. C. Swarts, M. Jinek // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. – 2018. – Vol. 9, N 5. – P. 1–19. <https://doi.org/10.1002/wrna.1481>
11. Efficient target cleavage by Type V Cas12a effectors programmed with split CRISPR RNA / R. Shebanova [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50, N 2. – P. 1162–1173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1227>
12. Caruthers, M. H. A brief review of DNA and RNA chemical synthesis / M. H. Caruthers // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – Vol. 39, N 2. – P. 575–580.
13. Pradère, U. Chemical synthesis of long RNAs with terminal 5'-phosphate groups / U. Pradère, F. Halloy, J. Hall // *Chem. – A Eur. J.* – 2017. – Vol. 23, № 22. – P. 5210–5213. <https://doi.org/10.1002/chem.201700514>
14. Roy, S. Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries / S. Roy, M. Caruthers // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18, N 11. – P. 14268–14284. <https://doi.org/10.3390/molecules181114268>
15. The allylic protection method in solid-phase oligonucleotide synthesis. An efficient preparation of solid-anchored DNA oligomers / Y. Hayakawa [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1990. – Vol. 112, N 5. – P. 1691–1696. <https://doi.org/10.1021/ja00161a006>
16. Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: Structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate / Y. Shiba [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35, N 10. – P. 3287–3296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm202>

#### References

1. Bajan S., Hutvagner G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, 2020, vol. 9, no. 1, pp. 1–26. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>



2. Khvorova A., Watts J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, 2017, vol. 35, no 3, pp. 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>
3. Kang K. N., Lee Y. S. RNA aptamers: a review of recent trends and applications. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2013, vol. 131, pp. 153–169. [https://doi.org/10.1007/10\\_2012\\_136](https://doi.org/10.1007/10_2012_136)
4. Damase T. R., Sukhovshin R., Boada C., Taraballi F., Pettigrew R. I., Cooke J. P. The Limitless Future of RNA Therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, vol. 9, pp. 1–24. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.628137>
5. Kole R., Krainer A. R., Altman S. RNA therapeutics: Beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2012, vol. 11, no. 2, pp. 125–140. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>
6. Watters K. E., Kirkpatrick J., Palmer M. J., Koblenz G. D. The CRISPR revolution and its potential impact on global health security. *Pathogens and Global Health*, 2021, vol. 115, no. 2, pp. 80–92. <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.1880202>
7. Nidhi S., Anand U., Oleksak P., Tripathi P., Lal J. A., Thomas G., Kuca K., Tripathi V. Novel crispr–cas systems: An updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 7, pp. 1–42. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>
8. Khalil A. M. The genome editing revolution: review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2020, vol. 18, no. 1. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>
9. Allen D., Rosenberg M., Hendel A. Using Synthetically Engineered Guide RNAs to Enhance CRISPR Genome Editing Systems in Mammalian Cells. *Frontiers in Genome Editing*, 2021, vol. 2, pp. 1–16. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.617910>
10. Swarts D. C., Jinek M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure–function comparisons and implications for genome editing. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2018, vol. 9, no. 5, pp. 1–19. <https://doi.org/10.1002/wrna.1481>
11. Shebanova R., Nikitchina N., Shebanov N., Mekler V., Kuznedelov K., Ulashchik E., Vasilev R., Sharko O., Shmanai V., Tarassov I., Severinov K., Entelis N., Mazunin I. Efficient target cleavage by Type V Cas12a effectors programmed with split CRISPR RNA. *Nucleic acids research*, 2022, vol. 50, no. 2, pp. 1162–1173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1227>
12. Caruthers M. H. A brief review of DNA and RNA chemical synthesis. *Biochemical Society Transactions*, 2011, vol. 39, no. 2, pp. 575–580.
13. Pradère U., Halloy F., Hall J. Chemical synthesis of long RNAs with terminal 5'-phosphate groups. *Chemistry—A European Journal*, 2017, vol. 23, no. 22, pp. 5210–5213. <https://doi.org/10.1002/chem.201700514>
14. Roy S., Caruthers M. Synthesis of DNA/RNA and their analogs via phosphoramidite and H-phosphonate chemistries. *Molecules*, 2013, vol. 18, no. 11, pp. 14268–14284. <https://doi.org/10.3390/molecules181114268>
15. Hayakawa Y., Wakabayashi S., Kato H., Noyori R. The allylic protection method in solid-phase oligonucleotide synthesis. An efficient preparation of solid-anchored DNA oligomers. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, vol. 112, no. 5, pp. 1691–1696. <https://doi.org/10.1021/ja00161a006>
16. Shiba Y., Masuda H., Watanabe N., Ego T., Takagaki K., Ishiyama K., Ohgi T., Yano, J. Chemical synthesis of a very long oligoribonucleotide with 2-cyanoethoxymethyl (CEM) as the 2'-O-protecting group: Structural identification and biological activity of a synthetic 110mer precursor-microRNA candidate. *Nucleic Acids Research*, 2007, vol. 35, no. 10, pp. 3287–3296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm202>

## Информация об авторах

Улащик Егор Александрович – науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.ulashchik@gmail.com

Ахлэмёнок Татьяна Петровна – мл. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: t.akhlamionak@gmail.com

Борищук Полина Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: contact.polina@yandex.by

Шарко Ольга Леонидовна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by

Шманай Вадим Владимирович – канд. хим. наук, зав. лаб. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by

## Information about the authors

Ulashchik Egor A. – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.ulashchik@gmail.com

Akhlamionok Tatsiana P. – Junior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: t.akhlamionak@gmail.com

Baryshchuk Palina Y. – Junior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: contact.polina@yandex.by

Sharko Olga L. – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sharko@ifoch.bas-net.by

Shmanai Vadim V. – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shmanai@ifoch.bas-net.by