



## Синтезу олигонуклеотидов – 70 лет (редакторская статья)

А.В. Чемерис

Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН  
Российская Федерация, 450054, Уфа, пр. Октября, 71  
E-mail: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

### Резюме

На 2025 г. приходится сразу несколько юбилейных дат, прямо или косвенно связанных с синтезом олигонуклеотидов. Так, 70 лет назад, в 1955 г. вышла статья, в которой описан синтез динуклеотидов d(TrT) и d(pTrT). В том же году была опубликована работа, в которой сообщалось о выделении из бактерии *Azotobacter vinelandii* фермента полинуклеотидфосфорилазы, полимеризующей РНК в системе *in vitro*. В 1970-х гг. с помощью этого фермента некоторое время велся синтез коротких олигонуклеотидов с заданной последовательностью. Химический синтез олигонуклеотидов за прошедшие годы претерпел серьезную эволюцию от фосфотриэфирного, через фосфонатный, фосфодиэфирный, фосфиттриэфирный, преобразованный затем в фосфитамидный. Последний является в настоящее время основным методом получения олигонуклеотидов с помощью автоматических ДНК-синтезаторов. Фактически, амидофосфитный способ синтеза олигонуклеотидов пока обеспечивает решение соответствующих задач науки и практики, однако потребность в долговременном хранении небологической информации в молекулах ДНК (в олигонуклеотидах) приводит к необходимости их получения в значительном количестве и другого качества (более длинных), с чем существующий подход уже не справится. Ему на помощь может прийти способ ферментативного получения олигонуклеотидов с использованием терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы - фермента, выделенного из тимуса теленка в 1960 г. и обеспечивающего нематричный синтез ДНК.

**Ключевые слова:** олигонуклеотид, химический синтез, ДНК-синтезатор, амидофосфитный способ, ферментативный синтез, полинуклеотидфосфорилаза, терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, ТдТ

**Цитирование:** Чемерис А.В. Синтезу олигонуклеотидов – 70 лет. (Редакторская статья). *Biomics*. 2025. 17(4). *Biomics*. 2025. 17(4). 328-336. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-29

© Автор, А.В.Чемерис, 2025

## The synthesis of oligonucleotides is 70 years old (Editorial)

A.V. Chemeris

Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences  
71 Prospekt Oktyabrya, Ufa, 450054, Russian Federation  
E-mail: [chemeris@anrb.ru](mailto:chemeris@anrb.ru)

### Resume

The year 2025 marks several anniversaries directly or indirectly related to oligonucleotide synthesis. Seventy years ago, in 1955, a paper was published describing the synthesis of the dinucleotides d(TpT) and d(pTpT). In that year, a paper was published reporting the isolation of the enzyme polynucleotide phosphorylase, which polymerizes RNA *in vitro*, from the bacterium *Azotobacter vinelandii*. In the 1970s, this enzyme was used for some time to synthesize short oligonucleotides with a given sequence. The chemical synthesis of oligonucleotides has undergone significant evolution over the years, from phosphotriester, through phosphonate, phosphodiester, phosphitetriester, and then converted to phosphoramidite. The latter is currently the primary method for producing oligonucleotides using automated DNA synthesizers. In fact, the phosphoramidite method of oligonucleotide synthesis currently provides a solution to the relevant scientific and practical problems. However, the need for long-term storage of non-biological information in DNA molecules (oligonucleotides) necessitates their production in significant quantities and of a different quality (longer), which the existing approach is no longer able to handle. A solution could be provided by the enzymatic production of oligonucleotides using terminal deoxynucleotidyl transferase, an enzyme isolated from calf thymus in 1960 that enables non-template DNA synthesis.

**Keywords:** oligonucleotide, chemical synthesis, DNA synthesizer, amidophosphite method, enzymatic synthesis, polynucleotide phosphorylase, terminal deoxynucleotidyltransferase, TdT

**Citation:** Chtmtris A.V. The synthesis of oligonucleotides is 70 years old. (Editorial). *Biomcs.* 2025. 17(4). 328-336. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-29 (In Russian)

© The Author, A.V. Chemeris, 2025

Возможно, стоит начать с пояснения того, что сейчас под олигонуклеотидами подразумеваются относительно короткие участки одноцепочечной ДНК длиной обычно от 6 до 150 звеньев, но чаще укладываемые в диапазон от 20 до 50 звеньев. Данные звенья представляют собой нуклеотидмонофосфаты, при этом чтобы отделить подобные участки ДНК от аналогичных молекул РНК для последних используют уточнение – «рибоолигонуклеотид», тогда как просто олигонуклеотид по умолчанию считается, что это дезоксирибоолигонуклеотид, что главным образом объясняется несравнимо большим масштабом применения последних и необходимой поэтому краткостью обозначения таких молекул. В обиходе (и не только) еще короче олигонуклеотид(ы) называют олиг(и) (oligo(s)). Помимо олигонуклеотидов с природными компонентами из азотистых оснований, углеводной части и остатка фосфорной кислоты химическим путем синтезировано огромное разнообразие их неприродных аналогов для всех этих компонентов, части которых ниже коротко коснемся.

На 2025 год приходится сразу два 70-летних юбилея. В августе 1955 г. была опубликована статья, в которой сообщалось о химическом синтезе динуклеотидов d(TpT) и d(pTpT) с природной фосфодиэфирной связью [Michelson, Todd, 1955], а в июне и ноябре вышли публикации [Grunberg-Manago, Ochoa, 1955; Grunberg-Manago et al., 1955], впервые описавшие фермент полинуклеотидфосфорилазу из бактерии *Azotobacter vinelandii*, полимеризующей

РНК в системе *in vitro*, которая затем была использована в 1970-х гг. при ферментативном синтезе олигонуклеотидов с определенной последовательностью [Hsieh, 1971; Gillam et al., 1974; Gillam, Smith, 1980]. Главным авторам тех работ 1955 года чуть позже были присуждены Нобелевские премии, в том числе за данные исследования. Так, А.Тодд стал Нобелевским лауреатом по химии 1957 г. за исследования нуклеотидов и нуклеотидных коферментов, а С.Очоа получил Нобелевскую премию по физиологии и медицине в 1959 г. вместе с А.Корнбергом за открытие ими механизмов биосинтеза РНК и ДНК.

Стоит отметить, что весной 2026 года исполнится 70 лет с момента открытия фермента ДНК-полимеразы из *Escherichia coli*<sup>1</sup> [Kornberg et al., 1956]. Этот фермент и ему подобные строят новую цепь ДНК по существующей матрице по принципу комплементарности азотистых оснований и почти не обладают нематричной активностью, поэтому они не подходят для независимого синтеза одноцепочечных олигонуклеотидов с задаваемой последовательностью. Но чуть позже, 65 лет назад, из тимуса теленка была выделена другая ДНК-полимераза – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (ТдТ), способная к нематричному синтезу ДНК [Bollum, 1960]. Именно этот фермент спустя почти шесть десятилетий стал

<sup>1</sup> данному юбилею в 2026 г. будет посвящена отдельная статья

составлять конкуренцию (пока очень слабую) химическому синтезу олигонуклеотидов.

Поскольку в данном номере журнала содержится статья, описывающая ферментативный синтез олигонуклеотидов [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2025], и готовится к печати статья (Алексеев и др.), посвященная химическому синтезу олигонуклеотидов, то здесь этих вопросов подробно касаться не будем, а остановимся лишь на кратком описании постоянно возрастающих масштабов применения олигонуклеотидов, включая их модифицированные формы. Некоторые из них нельзя даже относить к ДНК (или РНК), поскольку они не содержат остатков фосфорной кислоты, однако главный компонент - пуриновые и пиримидиновые азотистые основания, пусть даже отличающиеся от природных аденина, гуанина, цитозина и тимина (урацила), обязательно присутствуют, обеспечивая гибридизацию антипараллельных цепей по принципу комплементарности.

Согласно базе данных PubMed, на начало декабря 2025 г. в ней содержится свыше 311 тысяч статей со словом 'oligonucleotide', но если воспользоваться булевым оператором 'AND', и добавить слово 'medicine' или 'biology', то этот ресурс выдаст информацию о 67 и 60 тысячах статей, соответственно. Несмотря на то, что далеко не во всех статьях или в ключевых словах к ним содержатся упоминания этих научных дисциплин, тем не менее можно допустить, что в целом такое соотношение характерно для использования олигонуклеотидов в проводимых исследованиях и применениях нуклеиновых кислот для решения практических задач в этих областях. Однако если ограничить нахождение слова 'oligonucleotide' только в заголовке, то таковых статей окажется всего чуть более 9300, и по крайней мере часть из них в некоторой степени можно считать методологическими. При применении к ним временного фильтра с периодом 1955-1977 (1977 - год появления метода секвенирования ДНК по Сэнгеру, в котором требуется использование олигонуклеотидных праймеров), таких статей будет всего 151. Задав диапазон 1978–1988 (1988 - год появления метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с термостабильной ДНК-полимеразой, в котором без подобных праймеров не обойтись), сервер выдаст информацию о 432 статьях. За период с 1989 г. до конца прошлого столетия статей, в заголовке которых фигурирует слово 'oligonucleotide', становится уже 2388. За такое же количество лет в наступившем тысячелетии подобных статей оказывается еще больше - 3471. Наконец, за последний отрезок времени, с 2012 г. по настоящее время (декабрь 2025 г.), вышло несколько меньше статей – 2968, но напомним, что это только с упоминанием

'oligonucleotide' в заголовке, что может косвенно свидетельствовать о некотором снижении выполнения исследований методического плана, поскольку многие технологии, где задействованы олигонуклеотиды, необходимые для использования в биологии и медицине (в их в широком понимании), уже разработаны. При этом часть чисто химических статей останется здесь без внимания. Что касается отечественной базы данных <https://elibrary.ru/>, то в ней в заголовках журнальных статей со словом «олигонуклеотид» таковых оказывается 474, начиная с 1977 г. по настоящее время.

Безусловно, резкий рост интереса к олигонуклеотидам произошел после появления метода ПЦР, в котором они используются в качестве праймеров. Но этим их применением востребованность олигонуклеотидов не ограничивается. В частности, развитие синтетической биологии, когда ведется синтез не только отдельных полноразмерных генов, но и геномов целых организмов, требует большого количества олигонуклеотидов. Подход к лечению различных заболеваний разной этиологической природы, называемый 'oligonucleotide therapy', также сильно нуждается в олигонуклеотидах в виде аптамеров или антисенс-вариантов [Thakur et al., 2022]. Причем для этого о во многих случаях необходимо применение модифицированных олигонуклеотидов, в меньшей степени подверженных разрушению ферментами.

Появление модифицированных олигонуклеотидов обусловило появление новых аббревиатур для таких ксенонуклеиновых кислот, или XNA, где X обозначает хено, или чужеродный. Здесь ограничимся лишь перечислением XNA с краткой расшифровкой их состава. Итак, аббревиатура XNA объединяет такие модификации как LNA (Locked), UNA (Unlocked), BNA (Bridged), TNA (Treose), XyloNA<sup>2</sup> (Xylose), HNA (Hexitol), GNA (Glycol), CeNA (Cyclohexenyl), ANA (Arabinose), L-DNA (L-стереоизомер), PNA (Peptide) и некоторые другие. Что касается PNA, то в отличие от присущего истинным молекулам ДНК, а также другим модификациям сахарофосфатного остова, как в виде вариаций его углеводного компонента, так и несколько видоизмененной фосфорной кислоты (фосфотиоат, метилфосфонат, боранофосфат), соединяющих соседние азотистые основания фосфодиэфирной связью, в остове пептидно-нуклеиновой кислоты нет ни того, ни другого компонента или их аналогов, а состоит он из N-(2-аминоэтил)глициновых остатков, связанных пептидной связью. Но для некоторых задач в

<sup>2</sup> такое сокращение потребовалось ввиду того, что 'X' уже занята под хено

молекулярной биологии не столь важно, каким образом соединены соседние азотистые основания, поскольку главное, чтобы они находились друг от друга на расстоянии, обеспечивающем образование между ними водородных связей.

Создан также восьмibuквенный генетический алфавит с четырьмя дополнительными искусственными азотистыми основаниями dP, dZ, dS и dB [Hoshika et al., 2019], а недавно сообщено об улучшенной репликации ДНК с шестibuквенным алфавитом с «экстрабуками» dZ и dP [Kim et al., 2025]. Целый ряд других XNA или способны непосредственно участвовать в ферментативных реакциях *in vitro*, или под них специально с помощью направленного мутагенеза создаются ферменты нуклеинового обмена [Taylor et al., 2019], получившие название XNAzymes [Taylor, Holliger, 2015].

Кроме линейных олигонуклеотидов описан синтез их разветвленных форм в виде дендримеров за счет использования специальных синтонов, что позволяет применять их как в качестве праймеров, так и гибридизационных проб с увеличенным числом меток на 5'-концах [Shcherpinov et al., 1997], а также для создания различных объемных наноконструкций [Shcherpinov et al., 1999].

С учетом того, что аминокислоты кодируются тремя нуклеотидами, отдельный интерес представляет синтез неких генов или их фрагментов с использованием триплетных фосфорамидитов, что на протяжении ряда лет предлагалось несколькими группами ученых, включая россиян [Sondek, Shortle, 1992; Virnekäs et al., 1994; Ono et al., 1995; Kayushin et al., 1996]. Однако широкого развития данный подход не получил ввиду необходимости предварительного синтеза 64 или, по крайней мере, 40 различных синтонов с тем, чтобы сохранить хотя бы некоторую избыточность генетического кода. При этом недавно предложен другой тип синтонов – из динуклеотидов, которых нужно иметь всего 16 [Shi et al., 2024]. Как ни странно, но в будущем, возможно, это будет востребовано в большей степени.

Все разнообразие олигонуклеотидов, как описанное выше, так и оставленное здесь без внимания, достижимо (за небольшими исключениями) только с помощью химического синтеза, но современный ферментативный синтез олигонуклеотидов с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы набирает обороты, в том числе по причине относительно ограниченной длины олигонуклеотидов, синтезируемых химическим путем, обычно не превышающей 250 звеньев. Хотя следует заметить, что недавно сообщалось о химическом синтезе олигонуклеотида длиной в 1728 звеньев [Yin et al., 2024], но его выход был мизерным.

Прежде чем перейти к ферментативному синтезу олигонуклеотидов, необходимо уделить внимание химическому, коротко продемонстрировав его эволюцию. Так, начавшись в 1955 г. с фосфотриэфирного метода, продолжившись уже Н-фосфонатным синтезом, а затем фосфодиэфирным, вернувшись опять на некоторое время к фосфотриэфирному, в том числе в твердофазном варианте, перейдя потом к фосфиттриэфирному, преобразованному впоследствии в амидофосфитный, который благодаря твердофазному синтезу и созданию на его основе автоматических ДНК-синтезаторов стал с начала 1980-х гг. главенствующим методом изготовления олигонуклеотидов. Нынешний фосфитамидный метод характеризуется высокой эффективностью присоединения нуклеотидов, составляя иногда 99,5% и обеспечивая тем самым выход целевого продукта, например, 25-звенного олигонуклеотида, равный ~90%. Но проблема синтеза более протяженных олигонуклеотидов в последние годы встает особенно остро, поскольку ведется разработка способов долговременного хранения небиологической информации в молекулах ДНК, и это для некоторых технологий требует использования олигонуклеотидов большей протяженности.

И на этом вопросе хранения различной информации в ДНК следует остановиться отдельно, поскольку именно это (если состоится) потребует не просто огромного, а гигантского количества синтетических олигонуклеотидов<sup>3</sup>, многократно превышающего все остальные в них потребности. Причина обращения внимания на молекулы ДНК как на носитель несвойственной ей небиологической информации заключается в том, что ДНК обладает огромной емкостью для хранения данных. Так, всего 1 грамм одноцепочечной ДНК может теоретически хранить 500 эксабайт ( $5 \times 10^{20}$  байт) информации, что эквивалентно приблизительно 100 млрд. стандартных DVD дисков. При этом человечество уже накопило более 20 зеттабайт ( $2 \times 10^{22}$  байт) цифровой информации, и это количество увеличивается с каждым годом приблизительно наполовину. Считается, что к 2040 г. накопленные данные составят более 3 йоттабайт ( $3 \times 10^{24}$  байт), для хранения которых потребуется более  $10^9$  кг компьютерного кремния особой чистоты, которого может просто не хватить [Zhirmov et al., 2016]. К тому же считается, что ДНК способна хранить в себе информацию (ссылаясь на найденные артефакты большой давности) столетия и даже тысячелетия. На самом деле, все обстоит не совсем так, и самой старой сохранившейся в музее в

<sup>3</sup> желательнее для некоторых подходов иметь их максимально большой длины

Тюбингене ДНК (плохо очищенному нуклеину, выделенному Ф.Мишером из спермы лосося) всего-то полтора года [Вурне, Дахм, 2019], а найденные артефакты с многотысячелетней историей лишь содержали внутри себя данный биополимер, что далеко не одно и то же. Но как бы то ни было, молекулы ДНК (точнее олигонуклеотиды) действительно представляют определенный интерес и как носитель информации, и даже как некий биологический процессор при молекулярных вычислениях [Adleman, 1994; Михайленко и др. (Mikhailenko et al.), 2024].

К молекулам ДНК как носителям разнообразной информации подступались уже давно. При этом приоритет в таком хранении всевозможных данных принадлежит нашей стране благодаря серии статей М.С.Неймана в журнале «Радиотехника» в 1964 и 1965 гг. [Нейман, 1964; 1965; 1965а]. Однако это стало более реальным только после появления высокопроизводительных методов секвенирования ДНК новых поколений (NGS – Next Generation Sequencing), с помощью которых происходит извлечение хранимой информации, а закладываться она на хранение должна путем синтеза соответствующих олигонуклеотидов с определенными последовательностями [Church et al., 2012]. Для этого цифровая информация должна преобразовываться соответствующим образом в последовательности нуклеотидов, и уже предложено немало вариантов кодирования ими компьютерных «0» и «1». Мы тоже не остались в стороне и предложили весьма удобный способ оцифровки, назвав его Рупи-кодированием [Garafutdinov et al., 2022]. Поскольку в состав ДНК входят два типа азотистых оснований – пиримидины (Пу или У - С и Т) и пурины (Пи или Р - А и Г), то именно они и должны использоваться для отражения в однокбитном формате цифровых данных, представленных в виде бинарных чисел «0» и «1», соответственно. Такой подход дает важное преимущество выбора итоговой последовательности нуклеотидов, лишенной нежелательных вторичных структур благодаря так называемой вырожденности в данном случае уже нуклеино-компьютерного кода. Так, на месте одного «0» можно использовать нуклеотид С, а для другого - Т, равно как и для «1» можно в зависимости от общей последовательности нуклеотидов использовать либо А, либо Г, что дает определенную свободу.

Еще в 2019 г. на Всемирном экономическом форуме в Давосе были определены 10 прорывных технологий, которые окажут самое серьезное воздействие на будущее человечества, и среди них под номером 9 оказалась технология хранения информации в ДНК – DNA Data Storage. В отчете “Global DNA Data Storage Markets and Technologies

Report 2025” (<https://www.researchandmarkets.com/reports/6071579/dna-data-storage-global-strategic-business#tag-pos-1>) приведены оценки, согласно которым глобальный рынок DNA Data Storage с 82 млн.долл. в 2024 г. к 2030 г. достигнет 3,1 млрд.долл. с показателем средне-годового роста CAGR - 83.7%. Впечатляет перечень крупных, хорошо известных фирм, работающих в этом направлении, на основе данных которых и составляются подобные отчеты и прогнозы: Agilent Technologies, Inc., Ansa Biotechnologies, ATUM, Beckman Coulter Inc., Bio basic Inc., Biomatrix, Inc., Biomemory, Bio S&T Inc., Cache DNA, Catalog Technologies, Centillion Technologies, Cergentis B.V., Codex DNA INC., Cegat GMBH, DevX, DNA Script, DNALI Data Technologies, Eurofins Genomics, Evonetix Ltd., Fujifilm Recording Media, GATC Biotech AG, GenScript Biotech Corporation, Helixworks Technologies Ltd, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Illumina, Inc., Imagen, Imec International, Integrated DNA Technologies, Iridia, Inc., Kern Systems, Kioxia Corporation, Macrogen, Microsoft Corporation, Molecular Assemblies Inc., Quantum Corporation, SOSV LLC, Thermo Fisher Scientific Inc., Twist Bioscience Corporation, Western Digital Corporation. Причем среди них есть признанные лидеры и даже столпы в своих сферах деятельности, в том числе казалось бы далеких от обращения с молекулами ДНК. Но чтобы эти прогнозы состоялись (или были превзойдены) - необходим более производительный и при этом более дешевый синтез олигонуклеотидов.

В настоящее время при разработке способов долговременного хранения информации в ДНК через олигонуклеотиды эксплуатируются два основных подхода к их синтезу. Один из них заключается в колоночном синтезе относительно коротких олигонуклеотидов и составления из них своеобразной олиготеки<sup>4</sup>, используемой при формировании файлов для хранения данных. Другой подход основан на микроэрейном синтезе олигонуклеотидов, составляющих конкретный файл для его последующего хранения после одновременного снятия с подложки всех синтезированных олигов. Каждый из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки. Для второго важное значение имеет длина синтезируемых олигонуклеотидов, которая с приемлемым выходом обычно не превышает 250 звеньев. Теоретически, ферментативный синтез олигонуклеотидов может обеспечить большую их длину, что и явилось одной из причин обращения внимания на уникальную ДНК-полимеразу ТдТ,

<sup>4</sup> «олиготека» (<https://oligotheca.ru>) - предложенный нами термин по аналогии с библиотекой, винотекой или клонотекой в молекулярной биологии

способную вести нематричный синтез, в том числе используя особые конъюгаты [Jensen, Davis, 2018; Palluk et al., 2018; Barthel et al., 2020]. Показано также, что TdT способна включать в синтезируемую цепь ДНК модифицированные азотистые основания [Tauraitė et al., 2017] и даже из расширенного генетического алфавита [Wang et al., 2022]. При этом ферментативный синтез олигов более экологичен и может даже оказаться дешевле. И это весьма важно для организации долговременного хранения в ДНК архивных данных, поскольку сейчас главным сдерживающим моментом для внедрения в практику такой технологии хранения служит именно этап синтеза олигонуклеотидов химическим путем.

Стоимость секвенирования ДНК с начала нынешнего столетия снизилась приблизительно в миллион раз, тогда как стоимость химического синтеза олигонуклеотидов колоночным способом уменьшилась приблизительно на два порядка, а микроэрейным способом – в лучшем случае еще на два порядка, что крайне недостаточно. Однако обе эти технологии настолько хорошо отработаны, что дальнейшего ощутимого снижения стоимости и резкого масштабирования процесса (как это имело место в NGS секвенировании) ожидать не стоит. Нужен новый прорыв, каковым теоретически может стать ферментативный синтез олигонуклеотидов. При этом с производством олигонуклеотидов в необходимых количествах для стандартных задач (использование в качестве праймеров, гибридизационных зондов, для мутагенеза, генной терапии и ряда других) вполне справляется обычный химический синтез. К тому же он позволяет внедрять в олигонуклеотиды такие разнообразные модификации, на которые никогда не будет способен синтез ферментативный.

#### Литература

1. Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Сахабутдинова А.Р., Зубов В.В., Алексеев Я.И., Чемерис А.В. Ферментативный синтез олигонуклеотидов. *Biomcs.* 2025. 17(4). С. С.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30
2. Михайленко К.И., Гарафутдинов Р.Р., Привалов Л.Ю. и др. Три десятилетия ДНК-вычислений. *Biomcs.* 2024. 16(2). 149-187. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-9
3. Нейман М.С. Некоторые принципиальные вопросы микроминиатюризации. *Радиотехника.* 1964. 9(1). 3-12.
4. Нейман М.С. О связях между надежностью, быстродействием и степенью микроминиатюризации на молекулярно-атомном уровне. *Радиотехника.* 1965. 20(1). 1-9.
5. Нейман М.С. О молекулярных системах памяти и о направленных мутациях. *Радиотехника.* 1965а. 20(6). 1-8.
6. Adleman LM. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science.* 1994. 266(5187). 1021-1024. DOI: 10.1126/science.7973651
7. Barthel S, Palluk S, Hillson NJ et al. Enhancing Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity on Substrates with 3' Terminal Structures for Enzymatic De Novo DNA Synthesis. *Genes (Basel).* 2020. 11(1). 102. doi: 10.3390/genes11010102
8. Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1960. 235. PC18-20.
9. Byrne J, Dahm R. Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA. *Biomcs.* 2019. 11(3). 249-258. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-23
10. Church GM, Gao Y, Kosuri S. Next-generation digital information storage in DNA. *Science.* 2012. 337(6102). 1628. doi: 10.1126/science.1226355
11. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems.* 2022. 215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
12. Gillam S, Smith M. Use of *E. coli* polynucleotide phosphorylase for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides of defined sequence. *Methods Enzymol.* 1980. 65(1). 687-701. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65067-8
13. Gillam S, Waterman K, Doel M et al. Enzymatic synthesis of deoxyribo-oligonucleotides of defined sequence. Deoxyribo-oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 1974. 1(12). 1649-1664. doi: 10.1093/nar/1.12.1649
14. Grunberg-Manago M, Ochoa S. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc.* 1955. 77(11). 3165-3166. doi: 10.1021/ja01616a093
15. Grunberg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science.* 1955. 122(3176). 907-910. doi: 10.1126/science.122.3176.907
16. Gunberg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. Enzymic synthesis of polynucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of azotobacter vinelandii. *Biochim Biophys Acta.* 1956 Apr;20(1):269-85. doi: 10.1016/0006-3002(56)90286-4
17. Hoshika S, Leal NA, Kim MJ et al. Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science.* 2019. 363(6429). 884-887. doi: 10.1126/science.aat0971
18. Hsieh WT. Polymerization of deoxyribonucleoside diphosphates with an enzyme from

- an *Escherichia coli* mutant lacking deoxyribonucleic acid polymerase activity. *J Biol Chem.* 1971. 246(6). 1780-1784.
19. Jensen MA, Davis RW. Template-Independent Enzymatic Oligonucleotide Synthesis (TiEOS): Its History, Prospects, and Challenges. *Biochemistry.* 2018. 57(12). 1821-1832. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00937
  20. Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res.* 1996. 24(19). 3748-3755. doi: 10.1093/nar/24.19.3748
  21. Kim HJ, Wenta AJ, Dobrzycki LM et al. Improving the Fidelity of Replication of a Six-Letter DNA Alphabet. *ACS Chem Biol.* 2025. 20(11). 2787-2797. doi: 10.1021/acscchembio.5c00724
  22. Kornberg A, Lehman IR, Simms ES. Polydesoxyribonucleotide synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Federation Proc.* 1956. 15(1). 291-292.
  23. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* 1955. 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
  24. Ono A, Matsuda A, Zhao J et al. The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1995. 23(22). 4677-4682. doi: 10.1093/nar/23.22.4677
  25. Palluk S, Arlow DH, de Rond T et al. *De novo* DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. *Nat Biotechnol.* 2018. 36(7). 645-650. doi: 10.1038/nbt.4173
  26. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK et al. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res.* 1999. 27(15). 3035-3041. doi: 10.1093/nar/27.15.3035
  27. Shchepinov MS, UdaloVA IA, Bridgman AJ et al. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(22). 4447-4454. doi: 10.1093/nar/25.22.4447
  28. Shi A, Liu L, Wang F et al. A practical dinucleotide phosphoramidite chemistry for de novo DNA synthesis via block coupling. *Tetrahedron Letters.* 2024. 142. 155106. doi: 10.1016/j.tetlet.2024.155106
  29. Sondek J, Shortle D. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992. 89(8). 3581-3585. doi: 10.1073/pnas.89.8.3581
  30. Tauraitė D, Jakubovska J, Dabužinskaitė J et al. Modified Nucleotides as Substrates of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *Molecules.* 2017. 22(4). 672. doi: 10.3390/molecules22040672
  31. Taylor AI, Holliger P. Directed evolution of artificial enzymes (XNAzymes) from diverse repertoires of synthetic genetic polymers. *Nat Protoc.* 2015. 10(10). 1625-1642. doi: 10.1038/nprot.2015.104
  32. Taylor AI, Houlihan G, Holliger P. Beyond DNA and RNA: The Expanding Toolbox of Synthetic Genetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019. 11(6). a032490. doi: 10.1101/cshperspect.a032490
  33. Thakur S, Sinhari A, Jain P et al. A perspective on oligonucleotide therapy: Approaches to patient customization. *Front Pharmacol.* 2022. 13. 1006304. doi: 10.3389/fphar.2022.1006304
  34. Virnekäs B, Ge L, Plückthun A et al. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22(25). 5600-5607. doi: 10.1093/nar/22.25.5600
  35. Wang G, He C, Zou J et al. Enzymatic Synthesis of DNA with an Expanded Genetic Alphabet Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Synth Biol.* 2022. 11(12). 4142-4155. doi: 10.1021/acssynbio.2c00456
  36. Yin Y, Arneson R, Yuan Y et al. Long oligos: direct chemical synthesis of genes with up to 1728 nucleotides. *Chem Sci.* 2024. 16(4). 1966-1973. doi: 10.1039/d4sc06958g
  37. Zhirnov V, Zadegan RM, Sandhu GS et al. Nucleic acid memory. *Nat Mater.* 2016. 15(4). 366-370. doi: 10.1038/nmat4594

#### References

1. Adleman LM. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science.* 1994. 266(5187). 1021-1024. DOI: 10.1126/science.7973651
2. Barthel S, Palluk S, Hillson NJ et al. Enhancing Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity on Substrates with 3' Terminal Structures for Enzymatic De Novo DNA Synthesis. *Genes (Basel).* 2020. 11(1). 102. doi: 10.3390/genes11010102
3. Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1960. 235. PC18-20.
4. Byrne J, Dahm R. Friedrich Miescher and the 150th anniversary of the discovery of DNA. *Biomics.* 2019. 11(3). 249-258. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-23
5. Church GM, Gao Y, Kosuri S. Next-generation digital information storage in DNA. *Science.* 2012. 337(6102). 1628. doi: 10.1126/science.1226355
6. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR et al. Encoding of non-biological information for its long-term storage in DNA. *Biosystems.* 2022. 215-216. 104664. doi: 10.1016/j.biosystems.2022.104664
7. Garafutdinov R.R., Nikonorov Yu.M., Sakhabutdinova A.R., Zubov V.V., Alekseev Ya.I., Chemeris A.V. Enzymatic synthesis of oligonucleotides.

- Biomics*. 2025. 17(4). doi: P.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30
8. Gillam S, Smith M. Use of *E. coli* polynucleotide phosphorylase for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides of defined sequence. *Methods Enzymol*. 1980. 65(1). 687-701. doi: 10.1016/s0076-6879(80)65067-8
  9. Gillam S, Waterman K, Doel M et al. Enzymatic synthesis of deoxyribo-oligonucleotides of defined sequence. Deoxyribo-oligonucleotide synthesis. *Nucleic Acids Res*. 1974. 1(12). 1649-1664. doi: 10.1093/nar/1.12.1649
  10. Grunberg-Manago M, Ochoa S. Enzymatic synthesis and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. *J. Am. Chem. Soc*. 1955. 77(11). 3165-3166. doi: 10.1021/ja01616a093
  11. Grunberg-Manago M, Oritz PJ, Ochoa S. Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science*. 1955. 122(3176). 907-910. doi: 10.1126/science.122.3176.907
  12. Grunberg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. Enzymic synthesis of polynucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of azotobacter vinelandii. *Biochim Biophys Acta*. 1956 Apr;20(1):269-85. doi: 10.1016/0006-3002(56)90286-4
  13. Hoshika S, Leal NA, Kim MJ et al. Hachimoji DNA and RNA: A genetic system with eight building blocks. *Science*. 2019. 363(6429). 884-887. doi: 10.1126/science.aat0971
  14. Hsieh WT. Polymerization of deoxyribonucleoside diphosphates with an enzyme from an *Escherichia coli* mutant lacking deoxyribonucleic acid polymerase activity. *J Biol Chem*. 1971. 246(6). 1780-1784.
  15. Jensen MA, Davis RW. Template-Independent Enzymatic Oligonucleotide Synthesis (TiEOS): Its History, Prospects, and Challenges. *Biochemistry*. 2018. 57(12). 1821-1832. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00937
  16. Kayushin AL, Korosteleva MD, Miroshnikov AI et al. A convenient approach to the synthesis of trinucleotide phosphoramidites--synthons for the generation of oligonucleotide/peptide libraries. *Nucleic Acids Res*. 1996. 24(19). 3748-3755. doi: 10.1093/nar/24.19.3748
  17. Kim HJ, Wenta AJ, Dobrzycki LM et al. Improving the Fidelity of Replication of a Six-Letter DNA Alphabet. *ACS Chem Biol*. 2025. 20(11). 2787-2797. doi: 10.1021/acscchembio.5c00724
  18. Kornberg A, Lehman IR, Simms ES. Polydesoxyribonucleotide synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Federation Proc*. 1956. 15(1). 291-292.
  19. Michelson AM, Todd AR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc*. 1955. 2632-2638. doi: 10.1039/JR9550002632
  20. Mikhailenko K.I., Garafutdinov R.R., Privalov L.Yu., Matniyazov R.T., Chemeris D.A., Sakhabutdinova A.R., Giniyatov Yu.R., Chemeris A.V. Three decades of DNA computing. *Biomics*. 2024. V.16(2). P.149-187. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-9 (In Russian)
  21. Neiman M.S. Some fundamental issues of microminiaturisation. *Radiotekhnika*. 1964. V.19(1). P. 3-12. (In Russian)
  22. Neiman M.S. On the relationships between the reliability, performance and degree of microminiaturisation at the molecular-atomic level. *Radiotekhnika*. 1965. V.20(1). P. 1-9. (In Russian)
  23. Neiman M.S. On the molecular memory systems and the directed mutations. *Radiotekhnika*. 1965a. V.20(6). P. 1-8. (In Russian)
  24. Ono A, Matsuda A, Zhao J et al. The synthesis of blocked triplet-phosphoramidites and their use in mutagenesis. *Nucleic Acids Res*. 1995. 23(22). 4677-4682. doi: 10.1093/nar/23.22.4677
  25. Palluk S, Arlow DH, de Rond T et al. *De novo* DNA synthesis using polymerase-nucleotide conjugates. *Nat Biotechnol*. 2018. 36(7). 645-650. doi: 10.1038/nbt.4173
  26. Shchepinov MS, Mir KU, Elder JK et al. Oligonucleotide dendrimers: stable nano-structures. *Nucleic Acids Res*. 1999. 27(15). 3035-3041. doi: 10.1093/nar/27.15.3035
  27. Shchepinov MS, Udalova IA, Bridgman AJ et al. Oligonucleotide dendrimers: synthesis and use as polylabelled DNA probes. *Nucleic Acids Res*. 1997. 25(22). 4447-4454. doi: 10.1093/nar/25.22.4447
  28. Shi A, Liu L, Wang F et al. A practical dinucleotide phosphoramidite chemistry for de novo DNA synthesis via block coupling. *Tetrahedron Letters*. 2024. 142. 155106. doi: 10.1016/j.tetlet.2024.155106
  29. Sondek J, Shortle D. A general strategy for random insertion and substitution mutagenesis: substoichiometric coupling of trinucleotide phosphoramidites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89(8). 3581-3585. doi: 10.1073/pnas.89.8.3581
  30. Tauraitė D, Jakubovska J, Dabužinskaitė J et al. Modified Nucleotides as Substrates of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *Molecules*. 2017. 22(4). 672. doi: 10.3390/molecules22040672
  31. Taylor AI, Holliger P. Directed evolution of artificial enzymes (XNAzymes) from diverse repertoires of synthetic genetic polymers. *Nat Protoc*. 2015. 10(10). 1625-1642. doi: 10.1038/nprot.2015.104
  32. Taylor AI, Houlihan G, Holliger P. Beyond DNA and RNA: The Expanding Toolbox of Synthetic Genetics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019. 11(6). a032490. doi: 10.1101/cshperspect.a032490
  33. Thakur S, Sinhari A, Jain P et al. A perspective on oligonucleotide therapy: Approaches to patient

- customization. *Front Pharmacol.* 2022. 13. 1006304. doi: 10.3389/fphar.2022.1006304
34. Virnekäs B, Ge L, Plückthun A et al. Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1994. 22(25). 5600-5607. doi: 10.1093/nar/22.25.5600
35. Wang G, He C, Zou J et al. Enzymatic Synthesis of DNA with an Expanded Genetic Alphabet Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Synth Biol.* 2022. 11(12). 4142-4155. doi: 10.1021/acssynbio.2c00456
36. Yin Y, Arneson R, Yuan Y et al. Long oligos: direct chemical synthesis of genes with up to 1728 nucleotides. *Chem Sci.* 2024. 16(4). 1966-1973. doi: 10.1039/d4sc06958g
37. Zhirnov V, Zadegan RM, Sandhu GS et al. Nucleic acid memory. *Nat Mater.* 2016. 15(4). 366-370. doi: 10.1038/nmat4594