



Ферментативный синтез олигонуклеотидов

¹Р.Р. Гарафутдинов*, ¹Ю.М. Никоноров, ¹А.Р. Сахабутдинова, ²В.В. Зубов, ^{3,4}Я.И. Алексеев, ¹А.В. Чемерис

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Российская Федерация

²ООО «ИзоГель», Пущино, Московская область, Россия,

³Институт аналитического приборостроения Российской академии наук, Российская Федерация, Санкт-Петербург

⁴ООО «НПФ Синтол», Российская Федерация, Москва

*E-mail: garafutdinovr@mail.ru

Резюме

В 1955 г. у бактерии *Azotobacter vinelandii* был обнаружен фермент полинуклеотидфосфорилаза, и таким образом ферментативному синтезу олигонуклеотидов в 2025 г. формально исполняется 70 лет, а открытию выделенной из тимуса телят терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТдТ), также иногда называемой по фамилии автора ферментом Боллума – 65 лет. Однако лишь в последнее десятилетие наметился серьезный прогресс в ферментативном синтезе с помощью данного фермента протяженных олигонуклеотидов с задаваемой последовательностью. Справедливости ради следует заметить, что сам F.J. Bollum еще в 1986 г. в обзорной статье, намного опередив свое время, описал способ подобного ферментативного синтеза олигонуклеотидов. В настоящее время синтез олигонуклеотидов с помощью ТдТ с желаемой последовательностью может производиться разными путями, обеспечивающими временную остановку полимеризации после вставки одного модифицированного дНМФ, несущего на 3'-конце блокирующую группу, и затем его возобновления после удаления блокиратора, которых предложено уже немало. Другой подход заключается в формировании комплекса из обычного дНТФ с ТдТ, что приводит к встраиванию в растущую цепь ДНК дНМФ, связанного с ТдТ, и чтобы продолжить синтез с новым подобным комплексом, фермент из предыдущего конъюгата нужно из цепи ДНК удалить. Еще один подход основан на конкуренции ТдТ с другими ферментами, например, с апиразой, разрушающей неиспользованные на предыдущей стадии дНТФ. Для эффективного ферментативного синтеза олигонуклеотидов необходимо улучшение свойств ТдТ, в том числе увеличение ее термостабильности, чему во многих работах уделяется повышенное внимание. Если на протяжении многих лет ТдТ, помимо тимуса телят, выделялась также из мыши, то в последние годы описаны подобные ферменты из птиц, которые, к слову сказать, являются более теплокровными по сравнению с млекопитающими и, следовательно, их ферменты априори более устойчивы к повышенной температуре. При этом уже создано множество генно-инженерных ТдТ, обладающих улучшенными свойствами по сравнению с нативными ферментами. Имеются примеры коммерческого заказного синтеза олигонуклеотидов увеличенной протяженности, производимого разными фирмами (в том числе до 600 звеньев), а также выпускается специализированный «ТдТ синтезатор».

Ключевые слова: олигонуклеотид, полинуклеотидфосфорилаза, терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза, ТдТ, фермент Боллума

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Никоноров Ю.М., Сахабутдинова А.Р., Зубов В.В., Алексеев Я.И., Чемерис А.В. Ферментативный синтез олигонуклеотидов. *Biomics*. 2025. 17(4). С.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30

© **Авторы,** Р.Р. Гарафутдинов, Ю.М. Никоноров, А.Р. Сахабутдинова, В.В. Зубов, Я.И. Алексеев, А.В. Чемерис, 2025

Enzymatic synthesis of oligonucleotides

¹R.R. Garafutdinov*, ¹Yu.M. Nikonorov, ¹A.R. Sakhabutdinova, ²V.V. Zubov, ^{3,4}Ya.I. Alekseev, ¹A.V. Chemeris

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center,
Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

²IsoGel LLC, Pushchino, Moscow District, Russia,

³Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russian Federation

⁴Syntol LLC, Moscow, Russian Federation

*E-mail: garafutdinovr@mail.ru

Resume

In 1955, the enzyme polynucleotide phosphorylase was discovered in the bacterium *Azotobacter vinelandii*, and thus the enzymatic synthesis of oligonucleotides in 2025 formally marks the 70th anniversary, and the discovery of terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT) isolated from the calf thymus, sometimes also called the Bollum's enzyme (by the author's surname), is 65 years old. However, it is only in the last decade that serious progress has been made in the enzymatic synthesis of extended oligonucleotides with a given sequence using this enzyme. In fairness, it should be noted that F.J.Bollum himself, back in 1986 in a review article, well ahead of his time, he described a method for such enzymatic synthesis of oligonucleotides with defined sequence. Currently, the synthesis of oligonucleotides using TdT with the desired sequence can be carried out in various ways, providing a temporary stop of polymerization after the insertion of one modified dNMP carrying a blocking group at the 3'-end, and then its resumption after the removal of the blocker, which has already been proposed a lot. Another approach is to form a complex of conventional dNTP with TdT, which leads to the incorporation of dNMP bound to TdT into the growing DNA chain, but in order to continue synthesis with a new similar complex, the enzyme from the previous conjugate must be removed from the DNA chain. Another approach is based on the competition of TdT with other enzymes, for example, with apyrase, which destroys dNTPs unused at a last stage. For effective enzymatic synthesis of oligonucleotides, it is necessary to improve the properties of TdT, including increasing its thermal stability, which is given increased attention in many studies. If for many years TdT, in addition to the calf's thymus, has also been isolated from mice, then in recent years similar enzymes have been described from birds, which, by the way, are warmer-blooded than mammals and, therefore, their enzymes are a priori more resistant to elevated temperatures. At the same time, many genetically engineered TdTs have already been created that have improved properties compared to native enzymes. There are examples of commercial custom synthesis of extended-range oligonucleotides produced by various companies (including up to 600 nucleotides), as well as a specialized "TdT synthesizer".

Keywords: oligonucleotide, polynucleotide phosphorylase, terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT, Bollum's enzyme

Citation: Garafutdinov R.R., Nikonorov Yu.M., Sakhabutdinova A.R., Zubov V.V., Alekseev Ya.I., Chemeris A.V. Enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Biomcs.* 2025. 17(4). P.337-351. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2025-30

© **The Authors**, R.R. Garafutdinov, Yu.M. Nikonorov, A.R. Sakhabutdinova, V.V. Zubov, Ya.I. Alekseev, A.V. Chemeris, 2025

Введение

История олигонуклеотидного синтеза берет начало в далеком 1955 г., когда было сообщено о химическом синтезе двух динуклеотидов с природной фосфодиэфирной связью [Michelson, Todd, 1955]. С тех пор в области химического синтеза олигонуклеотидов проделан большой путь, приведший к современному автоматическому амидофосфитному способу с эффективностью

присоединения нуклеотидов, достигающей 99,5%, но его касаться здесь не будем.

Несмотря на то, что история ферментативного синтеза олигонуклеотидов начинается также в 1955 г., когда был выделен фермент полинуклеотидфосфорилаза из бактерии *Azotobacter vinelandii* [Grunberg-Manago, Ochoa, 1955; Grunberg-Manago et al., 1955], долгое время никаких серьезных подвижек в методологии такого синтеза не происходило, если не считать нескольких работ

1970-х гг., в которых сообщалось о синтезе с помощью этого фермента коротких олигонуклеотидов с заданными последовательностями. Однако за последние несколько лет на ферментативный синтез олигонуклеотидов обратили более пристальное внимание, но уже с использованием другого фермента – терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (ТдТ), выделенной из тимуса телят 65 лет назад [Bollum, 1960; 1960a]. Перспективы подобного синтеза олигонуклеотидов выглядят вполне обнадеживающе, но чтобы к нему подойти, изложим развитие исследований в этом направлении по возможности в хронологическом порядке.

Полинуклеотидфосфорилаза и синтез нуклеиновых кислот (олигонуклеотидов)

В июне и ноябре 1955 г. вышли две статьи [Grunberg-Manago, Ochoa, 1955; Grunberg-Manago et al., 1955], описывающие синтез и разрушение полинуклеотидов ферментом, выделенным из бактерии *Azotobacter vinelandii* и названным полинуклеотидфосфорилазой. Это название предложила уроженка тогдашнего Петрограда М. Grunberg-Manago, хотя С. Очоа, получивший в 1957 г. Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие биосинтеза РНК, предлагал назвать данный фермент как РНК-синтетазу. Было обнаружено, что этот фермент обладает обратимым действием, приводя к фосфорилизу, а полимеризация молекул РНК происходит путем использования в качестве субстратов различных нуклеозиддифосфатов, сопровождаемых высвобождением фосфата. Ни монофосфаты, ни трифосфаты нуклеозидов в полимеризацию не вовлекались. В итоговом биополимере присутствовали нуклеозидмонофосфаты, а молекулярная масса по данным светорассеяния достигала 800000 Да. В своей следующей статье эти авторы провели более подробное исследование выделенной и очищенной полинуклеотидфосфорилазы, изучив в том числе кинетику работы фермента, оптимальный состав буфера, требования к катионам, заново определив молекулярный вес образующихся продуктов с помощью ультрацентрифугирования, согласно которому молекулярная масса синтезированных полинуклеотидов стала чуть иной и варьировала от 70 до 350 тысяч [Grunberg-Manago et al., 1956]. Также сообщалось, что подобные ферменты имеются и у других организмов, среди которых были отмечены грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, дрожжи, шпинат, но у животных организмов на тот момент он выявлен не был.

Спустя полтора десятилетия было показано, что полинуклеотидфосфорилаза *E. coli*, используя в качестве субстрата дезоксирибонуклеозиддифосфаты, удлиняет короткую затравочную молекулу из

рибонуклеотидов [Kaufmann, Littauer, 1969]. В дальнейшем эта способность данного фермента была использована другими авторами при синтезе олигонуклеотидов с заданными последовательностями [Gilham¹, Smith, 1972]. При этом чуть ранее было обнаружено, что в присутствии ионов марганца полинуклеотидфосфорилаза способна строить дезоксирибонуклеотидную цепь без затравки [Hsieh, 1971]. Стоит упомянуть еще одну работу, в которой речь шла о синтезе с помощью полинуклеотидфосфорилазы рибоолигонуклеотидов с заданной последовательностью [Mackey, Gilham², 1971].

Большой цикл работ по синтезу олигонуклеотидов с определенными последовательностями был проведен под руководством М. Smith, и если в их первой работе они использовали в качестве праймера³ рибополинуклеотид [Gilham, Smith, 1972], то в последующих публикациях, где ими также производился синтез олигонуклеотидов с заданными последовательностями, праймерами служили участки дезоксирибонуклеотидов с минимально достаточной для протекания этого процесса длиной цепи из трех звеньев [Gillam, Smith, 1974; 1980; Gillam et al., 1974; 1975; 1977; 1978]. Однако максимально достигнутая в их работах длина олигонуклеотидов составила всего 13 звеньев, стартуя с тетра-нуклеотидного праймера. При этом реакция полимеризации дезоксирибонуклеозиддифосфатов оказывалась

¹ Верное написание фамилии данного автора – Gillam, однако в оригинальной статье и в базе данных PubMed она указана с ошибкой и не подверглась исправлению даже после недавнего присвоения doi, в связи с чем вынуждены приводить ее также неправильно, иначе связь с этой статьей будет неоднозначной.

² Данная работа представляет интерес еще и потому, что одним из авторов в ней является Р. Т. Gilham, чья фамилия случайно была использована в выше цитированной работе [Gilham, Smith, 1972] и, скорее всего, допущенная редакцией ошибка в этой работе 1972 г. объясняется некоторой схожестью фамилий и близких тематик исследований этих авторов.

³ В этой статье (равно как и в других работах тех лет) упоминается, что праймерами для нематричного синтеза служили короткие олигонуклеотиды, хотя сейчас правильнее считать их инициаторами полимеризации, поскольку в настоящее время принимается, что праймер должен отжигаться на матричной последовательности и формировать удлиняемый под действием подходящей полимеразы комплекс из одно/двухцепочечного участка со свободным 3'-концом с гидроксильной группой на нем.

необратимой, поскольку полинуклеотидфосфорилаза к фосфорилизу цепей ДНК была неспособна. На этом ферментативный синтез олигонуклеотидов с задаваемыми последовательностями с помощью полинуклеотидфосфорилазы закончился, тем более что к тому времени уже довольно успешно развивался химический метод синтеза олигонуклеотидов. Но спустя еще три с лишним десятка лет ферментативный синтез олигонуклеотидов уже с другим ферментом заставил о себе говорить вновь.

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза (ТдТ)

Теперь самое время вспомнить фермент терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу, или ДНК нуклеотидилэкзотрансферазу, сокращенно обозначаемую как ТдТ. Данный фермент был открыт в 1960 г.; в статьях, вышедших в мае и августе того года, сообщалось, что выделенная из тимуса телят терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза, используя в качестве субстрата дезоксинуклеозидтрифосфаты, обозначаемые тогда как dGP*PP (аналогично и для трех других нуклеотидов), способна синтезировать новую цепь ДНК, присоединяя очередные дезоксинуклеозидмонофосфаты к гидроксильной группе на 3'-конце некоего «праймера», которыми в тех работах служили тимидилатные олигомеры рТрТрТ или (Т₃), а также аналогичные Т₄, Т₅, Т₆ и Т₇ [Bollum, 1960; 1960a]. В одной из последующих статей этого автора была определена минимальная длина праймера, способного инициировать полимеризацию цепи ДНК с помощью ТдТ, и для затравочных молекул выведена формула (рХ)_{n-2}, где Х – любой дезоксинуклеозидмонофосфат, р – остаток фосфорной кислоты, а n – число звеньев [Bollum, 1962]. Позже было обнаружено, что пиримидиновые нуклеозиды лучше встраиваются в строящуюся цепь в присутствии 1 мМ ионов Со²⁺ в буфере с высокой ионной силой (200 мМ), тогда как пуриновые нуклеозиды «обходятся» более привычным «коктейлем» реакционной смеси в виде 8 мМ Mg²⁺ и ионной силой буфера, равной 40 мМ [Kato et al., 1967]. Позже влияние этих двухвалентных катионов, а также Mn²⁺ и Zn²⁺ на эффективность работы ТдТ было исследовано более детально [Chang, Bollum, 1990]. При этом о способе выделения высокоочищенного фермента ТдТ было доложено в 1971 г. [Chang, Bollum, 1971].

* * *

В целом, F.J. Bollum в одиночку или в соавторстве за четыре десятилетия изучения терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы опубликовал более сотни экспериментальных и обзорных работ, в которых уделялось внимание кинетике работы данного фермента, оптимальным

составам реакционной смеси и прочим параметрам. Иногда эту необычную ДНК-полимеразу называют даже ферментом Боллума (Bollum's enzyme), отдавая должное его вкладу в исследование ТдТ, а также принимая во внимание непосредственно открытие им этого уникального фермента.

* * *

Довольно долгое время ТдТ полимеразы оставалась загадочным ферментом благодаря ее способности, в отличие от всех других ДНК-полимераз, строить новую цепь ДНК без участия матрицы, просто удлиняя подходящий 3'-конец молекулы-затравки. Также не было понятно ее предназначение в живой клетке. Впервые о том, что ТдТ может выполнять важную роль в формировании иммунного ответа у млекопитающих, было предположено в 1974 г., поскольку выяснилось, что фермент содержится в лимфоцитной фракции тимуса и, возможно, отвечает неким образом за диверсификацию Т-лимфоцитов [Baltimore, 1974]. Позже было обнаружено, что ТдТ обеспечивает случайное присоединение нуклеотидов к одноцепочечным N-участкам ДНК при рекомбинации V(D)J элементов тяжелых цепей иммуноглобулинов, приводя к рандомизации данного генетического материала, и выполняет важную роль в эволюции и адаптации иммунной системы позвоночных [Desiderio et al., 1984]. Довольно детально эти вопросы, включая механизм работы фермента и его эволюцию, рассмотрены в обзорной статье [Motea, Berdis, 2010]. ТдТ полимеразы, наряду с Pol β, Pol α и Pol μ, относятся к X-семейству ДНК полимераз, при этом данный фермент свойственен только животным организмам [Uchiyama et al., 2009].

ТдТ полимеразы применялись в молекулярной биологии не так активно, как ряд прочих ферментов: иных ДНК-полимераз, ДНК-лигаз, эндонуклеаз рестрикции и некоторых других ферментов нуклеинового обмена, но определенные роли она (ТдТ) выполняла. Нужно заметить, что первая работа по молекулярному клонированию была выполнена с использованием именно ТдТ, где этот фермент сыграл фактически ключевую роль в объединении вектора и вставки. Так, для встраивания галактозного оперона *E.coli* в вектор SV40 линейаризованная форма последнего удлинялась по 3'-концам с помощью ТдТ в присутствии дАТФ, а вставка аналогично удлинялась в присутствии дТТФ, в результате чего их 3'-концы несли комплементарные олигонуклеотидные участки отличающейся протяженности из остатков дТ и дА, соответственно, а после этапа отжига образующиеся с высокой вероятностью бреши в кольцевых последовательностях заполнялись ДНК-полимеразой I *E.coli* и затем перед трансформацией компетентных клеток *E.coli* проводилось лигирование

5'- и 3'-концов Т4 ДНК-лигазой, ликвидируя «ники» [Jackson et al., 1972]. Впоследствии этот подход стал использоваться довольно широко, но только с олигонуклеотидными последовательностями для вектора и вставки в виде нескольких дезоксигуанинов и дезоксицитозинов, поскольку эффективность их полимеризации с помощью ТдТ заметно ниже, благодаря чему размеры итоговых олигонуклеотидов было легче контролировать и они оказывались короче [Bolivar et al., 1977]. Этот метод получил название GC-tailing, причем с использованием для линеаризации подходящего вектора (например, плазмид семейства pBR) эндонуклеазой рестрикции *Pst*I после клонирования вставки ее можно было вырезать той же рестриктазой. Однако вскоре данный подход практически канул в лету, уступив место использованию эндонуклеаз рестрикции, полилинкерным последовательностям в векторах, бесшовному лигированию и прочим вариантам молекулярного клонирования.

Некоторые другие применения ТдТ в молекулярно-биологических исследованиях заключались в оценках с ее помощью фрагментации ДНК *in situ* при апоптозе путем мечения с помощью этого фермента образующихся 3'-концов ДНК [Gavrieli et al., 1992], а также в амплификации в ходе ПЦР 5'-концов мРНК, благодаря построению на 3'-конце первичного ампликона гомополимерного участка для отжига на нем второго праймера [Chen, Patton, 2001; Adamopoulos et al., 2022].

Однако сейчас наблюдается фактически ренессанс ТдТ полимеразы, и области ее применения заметно расширились, свидетельством чему могут служить в том числе обзорные публикации последних лет, посвященные ТдТ [Gao et al., 2025; Zhang et al., 2025]. В более ранней обзорной статье, вышедшей с пометкой 'VIP' (Very Important Paper) [Ashley et al., 2023], уделено внимание разным сторонам применения ТдТ в виде Poly(A)-tailing при проведении некоторых вариантов ПЦР; для создания из ДНК различных наноструктур; для генерации аптамеров; в качестве биосенсоров, а также для полинуклеотидного синтеза, включая организацию долговременного хранения небиологической информации в виде архивных данных в молекулах ДНК, о чем выше уже упоминалось.

При этом нельзя не вспомнить весьма примечательную обзорную статью [Chang, Bollum, 1986], идейно значительно опередившую свое время, в которой все тот же Bollum с одним из постоянных своих соавторов обратили внимание, что с помощью ТдТ можно относительно просто синтезировать молекулы ДНК шаг за шагом с заданной последовательностью, если применять специальные дНТФ с блокирующей группой на их 3'-конце

(которую необходимо после каждого этапа удалять), указав, что данный фермент способен встраивать разные модифицированные дНМФ. Был в том обзоре упомянут и такой тип модифицированных нуклеотидов как их ацетильные производные (3'-OAcдНТФ), но отмечено со ссылкой на неопубликованную работу, что такая реакция у них не прошла. И это был уже относительно далекий 1986 г., однако потребовалось еще три десятилетия, пока на такую возможность вновь обратили серьезное внимание. Но прежде нужно коснуться одной теоретической статьи⁴, в которой поднимался вопрос о настоятельной необходимости для современной биологии ферментативного синтеза протяженных участков ДНК [Minhaz Ud-Dean, 2008]. В ней была предложена схема процесса, согласно которому ТдТ должна была встраивать единственный нуклеотид 3'-AcдНМФ с блокируемой группой из остатка уксусной кислоты, но чтобы реакция могла идти дальше, требовалось добавление двух ферментов: кислой фосфатазы и дезацетилазы, которые должны были соответственно гидролизовать остающиеся в реакционной смеси неиспользованные 3'-AcдНТФ и снимать ацетильную защиту, высвобождая 3'-конец молекул ДНК для дальнейшего удлинения олигонуклеотида аналогичным образом. Поскольку речь в той статье не шла о твердофазном синтезе, то после деблокирования предполагался весьма трудоемкий и непроизводительный этап диализа для удаления ненужных ингредиентов. И даже после той статьи прошло около десятилетия, прежде чем к подобному синтезу подошли вплотную, хотя еще в 1999 г. был выдан патент США, описывающий модифицированные дНТФ, защищенные по 3'-концу, для проведения нематричного синтеза ДНК [Hiatt, Rose, 2001].

Терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза и синтез олигонуклеотидов с заданными последовательностями

Из изложенного выше однозначно следует, что лучше фермента для синтеза олигонуклеотидов с заданными последовательностями, чем терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза с учетом ее уникальной особенности обходиться без какой-либо матрицы и требующей для полимеризации лишь короткую затравку не найти. Однако и природную ТдТ можно и нужно улучшать с целью достижения

⁴ Нужно заметить, что вышеупомянутый обзор [Chang, Bollum, 1986] в ней процитирован не был, хотя два других, более ранних [Bollum, 1974; 1978] упомянуты, но в них подобных мыслей о синтезе олигов с заданными последовательностями высказано не было.

наилучших характеристик данного фермента для выполнения стоящих задач по ферментативному синтезу олиго- и полинуклеотидов, что уже и осуществляется. Все же главным толчком к этому послужило выкристаллизовавшееся за десятилетия предложение для долговременного хранения в ДНК любой информации, к чему смогли подступиться лишь после разработки высокопроизводительных методов секвенирования ДНК новых поколений.

Так, G.M. Church с соавт. опубликовали в 2012 г. эпохальную статью [Church et al., 2012], посвященную разработке подхода для хранения в ДНК (в олигонуклеотидах) небиологической информации, при этом ими было синтезировано почти 55 тысяч олигов, подавляющее количество которых имело длину 159 звеньев. После этого последовали подобные работы, где олигонуклеотидов приходилось синтезировать еще больше. Всё вместе это послужило для Church и его коллег сигналом о необходимости в будущем ферментативного синтеза подобных олигонуклеотидов, что спустя несколько лет нашло отражение в другой статье этих авторов [Lee et al., 2019]. Так, ими было решено для синтеза использовать природную ТдТ и обычные дНТФ, но для исключения их множественного встраивания в растущую цепь ДНК в реакционную смесь добавлялся фермент апираза, разрушающий дНТФ до неиспользуемых уже ТдТ дНДФ и дНМФ, с таким расчетом, что успевал встроиться только один дНМФ, что достигалось определенным соотношением этих ферментов с учетом типа нуклеотида, как встраиваемого, так и находящегося на 3'-конце существующей цепи ДНК. При этом учитывались возможные более чем одинарные встраивания, но специально написанная ими компьютерная программа для хранения информации в ДНК такие ошибки могла игнорировать.

Спустя год группа авторов под руководством все того же Church опубликовала другую, но до некоторой степени схожую статью [Lee et al., 2020], где был описан способ синтеза олигонуклеотидов с помощью также нативной ТдТ, которая становилась работоспособной только после того, как ее кофактор в виде двухвалентного Co^{2+} высвобождался из некой условной «клетки», представленной в виде диметоксинитрофена с ЭДТА (DMNP-EDTA), что происходило в результате фотолитографической активации под действием УФ-света с длиной волны 365 нм. Поскольку комплекс DMNP-EDTA в реакционной смеси присутствовал в избытке, то после отключения через заданное время источника света он связывал все катиона кобальта, лишая ТдТ ферментативной активности, которая все же успевала встроить единичный дНМФ. Синтез шел на специальной подложке, помещенной в проточную

ячейку, и после ее промывки мог начинаться новый цикл присоединения очередного нуклеотида. Как и в предыдущей работе этих авторов, интервалы времени, отпускаемые на освещение, учитывали как тип присоединяемого нуклеотида, так и нуклеотид на 3'-конце цепи ДНК.

При этом ранее другими авторами был предложен иной метод синтеза олигонуклеотидов с помощью ТдТ, прерываемый блокирующей группой и возобновляемый после ее удаления [Mathews et al., 2016; 2017]. Так, были синтезированы восемь нуклеотидов (dA, dC, dG, T), несущие в 5'-положении дезоксирибозы нитробензильные или диметоксинитробензильные группы, отщепляемые под действием УФ-света с длиной волны 365 нм в течение 15 мин. В этой работе в ходе модельных экспериментов синтез олигонуклеотидов велся в растворе при 37°C в течение 60 мин, и после присоединения дНМФ проводился анализ продуктов с помощью гель-электрофореза.

В 2018 г. американской фирме Molecular Assemblies, Inc. был выдан патент США за номером US 10,059,929 B2, в котором защищались модифицированные ферменты ТдТ, несущие замены единичных аминокислот в двух мотивах, и модифицированные дНТФ, несущие 3'-О-блокирующую группу из азидометила [Efcavitch, Sylvester, 2018]. Согласно патенту, синтез олигонуклеотидов с заданной последовательностью велся на твердой фазе в циклическом режиме и каждый цикл состоял из четырех стадий: а) присоединения одного нуклеотида с блокирующей дальнейший синтез азидометильной модификацией; б) удаления непрореагировавших реагентов в специальную емкость для их дальнейшего использования; в) деблокирования под действием трис(2-карбокситил)фосфина; г) завершающего цикла промывки.

Интересный подход к пошаговому синтезу цепи ДНК с помощью ТдТ заключается в образовании с ней конъюгата с дНТФ путем его пришивки по сайт-специфичному месту (специально введенного вблизи каталитического центра остатку цистеина при том, что пять имевшихся в нативном ферменте цистеинов были превращены в аланины или серины при сохранении ферментативной активности). Это приводит к тому, что при присоединении к 3'-концу дНМФ с ним остается связанной ТдТ, блокируя дальнейший синтез другими подобными конъюгатами [Palluk et al., 2018]. Для возобновления синтеза и присоединения очередного дНМФ, конъюгированного с другой молекулой фермента, нужно удалить предыдущую путем разрушения связывающего линкера. Этот двухстадийный цикл (без учета промывок) в виде присоединения конъюгата дНМФ с

ТдТ, а затем удаления фермента можно повторять многократно и в той работе сообщается о синтезе олигонуклеотидов длиной до 20 звеньев. В зависимости от типа используемого линкера его можно разрывать дитиотрептолом или β-меркаптоэтанолом (дисульфидную группу), УФ-светом 365 нм либо лазером 405 нм (нитробензильную группу), а также пептидазой (амидную связь), однако на растущей цепи ДНК при этом остаются разного размера фрагменты линкера, которые авторы назвали «шрамами», в целом не сильно мешающими проведению дальнейших операций с синтезированным таким образом олигонуклеотидом. На присоединение дГМФ, дТМФ и дЦМФ давалось 1,5 мин, а для дАМФ – 3 мин, время деблокирования составляло 1 мин лазером или 10 сек УФ-светом. Для удаления некоторых «шрамов» в отдельных случаях вводился этап ацетилирования.

В своей следующей статье этим авторам удалось создать измененный фермент ТдТ с увеличенной термостабильностью, в том числе присоединив к N-концу мальтозо-связывающий белок, а также варьируя состав реакционного буфера, используя Co^{2+} вместо Mg^{2+} , что позволило вести реакцию при 47°C, добившись при этом 10-ти кратного ускорения присоединения дНМФ к 3'-концам GC-богатых участков, формирующих иначе (при 37°C) нежелательные шпилечные структуры, мешающие полимеризации [Barthel et al., 2020]. Позже эта же группа авторов задумалась о распараллеливании подобного ферментативного синтеза олигонуклеотидов с использованием конъюгатов ТдТ с дНТФ, для чего был применен подход с расщеплением линкера электрохимическим окислением на подложке из массива микроэлектродов [Smith et al., 2023].

В одной из работ было показано, что ТдТ способна использовать LNA (Locked Nucleic Acid) в виде производных ТТФ с блокирующими группами из 3'-бензоила и 3'-пivaloила для удлинения инициаторной молекулы на одно звено, после чего производилось деблокирование под действием 1 М K_2CO_3 при комнатной температуре в течение 3 час [Flamme et al., 2022].

Представляет определенный интерес способность ТдТ использовать различные модифицированные НТФ, и таковая была продемонстрирована, а среди модификаций нуклеотидов и их аналогов были N⁴-аминоцитозин, 4-тиоурацил, 2-пиридон, 4-хлоро- и 4-бromo-2-пиридон [Tauraité et al., 2017], α-тио-ТТФ, α-тио-LNA-ТТФ [Flamme et al., 2021], неприродные азотистые основания dPRT3 и dNaM, составляющие расширенный генетический алфавит [Wang et al., 2022]. В другой работе с помощью ТдТ производился синтез протяженных олигонуклеотидов и при этом

испытывалась большая группа модифицированных нуклеотидов с целью выяснения устойчивости синтезированной одноцепочечной ДНК к действию различных нуклеаз [Gu et al., 2018]. Одни авторы исследовали пригодность разных молекул служить инициаторами синтеза олигонуклеотидов с помощью ТдТ и обнаружили, что даже гексаэтиленгликоль позволяет начать синтез, но лучшим инициатором, как и следовало ожидать, был 3'-конец ДНК со свободной гидроксильной группой [Schaudy et al., 2021].

Генно-инженерные ТдТ

Выше уже упоминалось, что природные ферменты ТдТ нужно совершенствовать, и таких попыток сделано уже немало. В частности, фирма Molecular Assemblies, Inc. создала модифицированные варианты бычьего фермента ТдТ, имеющего размер в 520 аминокислотных остатков, которые несли замены единичных аминокислот в двух мотивах GGFR и TGSR, приходящихся на каталитически активную последнюю треть белка [Efcavitch, Sylvester, 2018]. В другой работе для того, чтобы изготовить конъюгаты ТдТ с дНТФ в ферменте пять остатков цистеина были заменены на аланины и серины и вместо них появился новый цистеин вблизи каталитического центра при сохранении ферментативной активности модифицированной таким образом ТдТ [Palluk et al., 2018]. Повышение термостабильности ТдТ было достигнуто, присоединив к N-концу фермента мальтозо-связывающий белок [Barthel et al., 2020], о чем уже говорилось выше.

Известно, что присутствие в реакционной смеси ДНК-связывающих белков, а также их слияние с ДНК полимеразы повышает эффективность полимеризации цепей ДНК и ТдТ не является исключением. Так, целый цикл работ провели белорусские авторы, исследовав при синтезе гомополимерных цепей из одних тиминов (несклонных к образованию нежелательных вторичных структур) влияние на эффективность работы бычьей ТдТ белков EcSSB из *E.coli* и Sso7d из *Sulfolobus solfataricus*, стабилизирующих одно- и двуцепочную ДНК, но при этом выявили небольшое снижение активности данного фермента [Саченко и др. (Sachanka et al.), 2024]. При создании слитых рекомбинантных белков ТдТ с Sso7d с расположением последнего в N- или C-концах ТдТ обнаруживалась некоторая разница в их ферментативных способностях, при этом оказалась повышена термостабильность фермента [Sachanka et al., 2025]. Аналогичное слияние ТдТ с EcSSB привело к увеличению термостабильности ТдТ, но с одновременным снижением полимеразной активности [Sachanka et al., 2025a]. В другой своей работе [Sachanka et al., 2026] авторы произвели укорочение

N-конца ТдТ на 148 аминокислот (148_TrTdT) и достигли при этом двухкратного увеличения активности фермента, сопровождающегося повышением его термостабильности на 5°C. Добавление в реакционную смесь белков EcSSB и Sso7d для цепей ДНК, склонных к образованию вторичных структур, повысило эффективность включения дНМФ для нативного фермента в 10 раз, а для 148_TrTdT в два раза.

Отечественными авторами произведен сайт-насыщающий мутагенез, совмещенный с рациональным дизайном ТдТ мышцы *Mus musculus*, что позволило выявить несколько вариантов фермента, один из которых (мутант 275) характеризовался высокой термостабильностью и выдерживал 180 мин при 45°C притом, что при такой температуре обычный нативный фермент через 2 минуты полностью теряет активность, а при 37°C данный мутант показывал 4 – 6-ти кратное увеличение каталитической активности [Nikiteev et al., 2025].

Практически все используемые в исследованиях ТдТ происходили или из тимуса теленка или мышцы. Но не так давно было предложено использовать терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу иного происхождения, получившую название ZaTdT – из белогорлого воробья *Zonotrichia albicollis* [Lu et al., 2022]. При этом была несколько изменена форма каталитической полости данного фермента для лучшего размещения в ней нуклеотидов, модифицированных блокирующей группой 3'-ONH₂, что в результате проведенного мутагенеза и замены ряда аминокислот на три порядка повысило эффективность этого фермента по сравнению с широко используемыми ТдТ млекопитающих. Так, модифицированная ZaTdT обеспечивает высокоэффективное пошаговое удлинение олигонуклеотидов после деблокирования 3'-ОН-группы нитритом натрия со средним выходом 98,7%, делая данный модифицированный фермент весьма практичным для синтеза одноцепочечной ДНК. Этот же фермент, но уже названный как E-ZaTdT (engineered) был использован при закладке данных на долговременное хранение с помощью технологии DNA-DISK [Li et al., 2024].

Недавно в *E. coli* были клонированы гены ТдТ шести видов позвоночных, для которых затем были созданы укороченные (на 140 аминокислот) по N-концу ферменты, сохранившие полимеризующую активность [Li et al., 2024]. Так, среди мутантов наибольшее увеличение продукции таких белков было отмечено для N-140-ZaTdT (воробья) и N-140-CpTdT (крокодила гребнистого *Crocodylus porosus*). При этом N-140-ZaTdT приобрел несколько увеличенную термостабильность.

Ранее задачу повышения термостабильности ТдТ поставили перед собой другие авторы [Chua et al.,

2020]. Так, разработав специальный тест для идентификации термостабильных вариантов ТдТ, ими был произведен скрининг около 10000 мутантов фермента, полученных с помощью склонной к ошибкам ПЦР. В итоге был идентифицирован вариант ТдТ3-2, который на 10°C более термостабилен, чем нативная ТдТ.

В результате направленной эволюции, заменившей 80 аминокислот в ходе 32 итераций, шедших в течение 14 месяцев, был создан ряд мутантных ферментов ТдТ ивовой белоглазой мухоловки⁵ *Empidonax traillii*, наилучший из которых приобрел способность встраивать дНМФ с 3'-фосфатом в качестве блокирующей группы с эффективностью свыше 99%, временем присоединения нуклеотидов равным 90 сек и увеличенной на 20°C термостабильностью [Forget et al., 2025]. Все это в целом позволило этим авторам из калифорнийской компании Codexis Inc. говорить о данном ферменте как готовом для коммерческого синтеза олигонуклеотидов.

Коммерциализация ферментативного синтеза олигонуклеотидов с помощью ТдТ

Как можно видеть из изложенного выше материала, всплеск интереса к ферментативному синтезу олигонуклеотидов с помощью ТдТ стал проявляться с середины 2010-х гг., свидетельством чему могут служить публикации разных авторов, в том числе работающих в коммерческих фирмах. Поэтому неудивительным было появление в 2019 и 2020 гг. двух заметок в журналах Nature [Perkel, 2019] и Nature Biotechnology [Eisenstein, 2020], в которых авторы оценили перспективы коммерциализации ведущихся разработок и уделили внимание стартапам разных фирм, отметив, что ряд компаний осуществляют подобный синтез олигонуклеотидов, в том числе предоставляя такой материал для тестирования. Однако по прошествии 5 – 6 лет сказать, что «воз и ныне там» будет неправильно, тем более, что уже есть отдельные прорывы и при этом продолжается процесс улучшения данной технологии. Так, в частности, французской фирмой DNA Script некоторое время назад был создан (тогда) прототип «ТдТ синтезатора» в виде некоего аналога струйного принтера [Verardo et al., 2023].

⁵ Интерес к ТдТ птиц вполне объясним тем, что пернатые характеризуются наиболее высокой среди всех позвоночных температурой тела и соответственно их терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза будет изначально иметь чуть более высокую термостабильность по сравнению с таковой млекопитающих.

В статье 2020 г. [Eisenstein, 2020] приведен перечень фирм с указанием годов их основания (2013-2019), а также с упоминанием их основателей (часть которых явились авторами цитируемых выше статей и патентов), ставящих целью доведения ферментативного синтеза олигонуклеотидов с помощью ТдТ до коммерческого уровня. Представляет интерес нынешнее отношение некоторых из них к данному вопросу, что можно увидеть из их web-сайтов.

Начнем с только что упомянутой фирмы DNA Script (<https://www.dnascript.com/>), основателями которой являются Т.Уbert, S.Gariel и X.Godron. На их сайте представлен синтезатор SYNTAX, обеспечивающий синтез одноцепочечной ДНК высокого качества длиной до 120 звеньев, который может завершиться в течение ночи (overnight). Это первый прибор такого рода. Три ключевых компонента их технологии заключаются в использовании высокотехнологичной терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы; модифицированных дНТФ, обратимо прерывающих синтез цепи ДНК после добавления одного нуклеотида с легко снимаемой защитой в условиях слабой кислотности, при этом не оставляющие следов («шрамов» на ДНК), что позволяет получить полностью естественную ДНК, готовую для использования в молекулярной биологии; твердофазного синтеза, позволяющего контролировать наномолярный масштаб синтеза, который начинается с иницилирующей ДНК (iDNA). При этом на их сайте содержится приглашение испытать эту технологию.

Американская фирма Molecular Assemblies (основатели – J.W.Efcavitch и С.Becker), ставшая сейчас частью компании TriLink Biotechnologies (<https://go.trilinkbiotech.com/molecular-assemblies>) гарантирует ферментативный синтез олигонуклеотидов длиной до 400 звеньев с использованием генно-инженерного уникального фермента ТдТ, созданного компанией Codexis Inc., предоставившей ей на него лицензию.

Другая американская фирма Ansa Biotechnologies, основанная D.Arlow и S.Palluk, (www.ansabio.com), используя свою (описанную выше) технологию конъюгированной ТдТ с дНТФ, берет на выполнение заказы на ферментативный синтез олигонуклеотидов протяженностью до 600 звеньев со временем выполнения за четыре рабочих дня, предоставляя в качестве подтверждения точности синтеза секвенированную нуклеотидную последовательность. Также на их сайте упоминается, что ими синтезирован фрагмент ДНК длиной в 1005 звеньев.

Английская фирма Camena Bioscience (<https://www.camenabio.com/>), основанная S.Harvey,

D.Stemple S.Fraser, сообщает о подобном синтезе олигов длиной до 300 нуклеотидов с точностью 99,9%.

Есть еще ряд «игроков» на этом поприще – это фирмы Evonetix, Kern Systems, уже упоминаемая Codexis, Inc. Можно не сомневаться, что этот список, и сейчас не претендующий на исчерпывающую полноту, будет расти.

* * *

Завершая рассмотрение способов ферментативного синтеза олигонуклеотидов с заданными последовательностями, нельзя обойти вниманием еще одну довольно старую работу [Schmitz, Reetz, 1999], в которой производилось с помощью фермента Т4 РНК лигазы присоединение к закрепленной на твердой фазе трехнуклеотидной затравке новых нуклеотидов, которыми служили дезоксимононуклеозид 3',5'-дифосфаты, при этом фосфат в пятом положении являлся блокирующей дальнейший синтез группой, которая после встраивания дНМФ удалялась щелочной фосфатазой, после чего синтез мог продолжаться. Главным недостатком метода следует считать его крайне малую скорость, поскольку на такое лигирование уходило многие часы.

Заключение

Некоторые исследователи высказывают точку зрения, что ферментативный синтез олигонуклеотидов с помощью ТдТ можно считать преемником химического амидофосфитного метода синтеза. Позволим с ними в этом вопросе не согласиться, по крайней мере, частично. Действительно, синтез протяженных олигонуклеотидов, приближающихся по длине к полинуклеотидам, вне всякого сомнения, рано или поздно будет массово осуществляться ферментативно с помощью ТдТ в виде ее конъюгатов с дНТФ, либо в комплексе с модифицированными тем или иным способом дНТФ с временно блокирующими дальнейший синтез свойствами.

Однако огромное разнообразие модификаций олигонуклеотидов, которое уже на протяжении многих лет успешно реализуется за счет химического синтеза, для ТдТ в любом случае окажется «не под силу» и этот фермент не сможет (уверенно) включать таковые в синтезируемую цепь ДНК, даже после всевозможных модификаций ТдТ, которых уже произведено немало, причем спектр видов позвоночных, из которых ТдТ стала использоваться, заметно расширился.

Но для синтеза с использованием ТдТ требуются инициаторные молекулы, которые как раз будут синтезироваться химическим путем, хотя уже применялись и альтернативные молекулы. Короткие олигонуклеотиды, составляющие для фирм,

делающим на этом свой бизнес, наибольшую массу заказов и покрывающие основные потребности исследователей в олигонуклеотидах, еще долгое время (а может и навсегда) останутся за амидофосфитным синтезом, который при этом непременно станет еще более производительным в плане увеличения числа параллельно ведущихся химических реакций причем как в колоночном, так и в массовом параллельном (микрочиповом) вариантах синтеза с одновременным снижением в пересчете на отдельный образец расходных материалов и в первую очередь растворителей.

Стоит также заметить, что к ныне используемому амидофосфитному методу химический синтез олигонуклеотидов «добирался» около четверти века. Что касается ферментативного синтеза олигонуклеотидов с помощью ТдТ, то будет справедливо считать, что ему пока всего около десяти лет (когда за него взялись по-серьезному⁶), но так как молекулярно-биологическая наука вместе с биоорганической развиваются сейчас с заметным ускорением (а именно от них в первую очередь зависит прорыв в ферментативном синтезе олигов), то можно прогнозировать, что хватит еще нескольких лет для того, чтобы синтез протяженных олигонуклеотидов с помощью модифицированной ТдТ прочно занял свое место в методическом арсенале и из разряда научных исследований перешел в сферу заказного коммерческого синтеза в широком масштабе.

При этом нельзя сбрасывать со счетов и неэкологичность химического синтеза, идущего в безводной среде с использованием дорогих реагентов очень высокой степени чистоты, при этом часть которых довольно токсична, в частности ацетонитрил, тетрагидрофуран, трихлоруксусная кислота, пиридин и др. в отличие от ферментативного синтеза олигонуклеотидов, протекающего в водных растворах, за исключением синтеза модифицированных дНТФ. И это также может ускорить разработку ферментативного метода синтеза олигонуклеотидов.

⁶ Упомянутый выше патент США 2001 г., описывающий синтез дНТФ с блокирующей 3'- группой, все же не вызвал тогда большого интереса и нужно было осознание того, что олигонуклеотидов, причем весьма протяженных скоро потребуются очень много, но оно пришло только после появления и развития во втором десятилетии нынешнего века синтетической биологии, NGS секвенирования и после возникших намерений массово хранить в молекулах ДНК (в олигонуклеотидах) архивную небологическую информацию.

Литература

1. Саченко А.Б., Щур В.В., Усанов С.А. и др. Влияние ДНК-связывающих белков на ферментативную активность терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы в системах с гомополимерными субстратами. Прикл. биохим. микробиол. 2024. 60(6). 589-601. doi: 10.31857/S0555109924060038
2. Adamopoulos PG, Tsiakanikas P, Stolidi I et al. A versatile 5' RACE-Seq methodology for the accurate identification of the 5' termini of mRNAs. *BMC Genomics*. 2022. 23(1). 163. doi: 10.1186/s12864-022-08386-y
3. Ashley J, Potts IG, Olorunniji FJ. Applications of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Enzyme in Biotechnology. *Chembiochem*. 2023. 24(5). e202200510. doi: 10.1002/cbic.202200510
4. Baltimore D. Is terminal deoxynucleotidyl transferase a somatic mutagen in lymphocytes? *Nature*. 1974. 248(447). 409-411. doi: 10.1038/248409a0
5. 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
6. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*. 1977. 2(2). 95-113. doi: 10.1016/0378-1119(77)90000-2
7. Bollum FJ. Calf thymus polymerase. *J Biol Chem*. 1960. 235. 2399-2403.
8. Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem*. 1960. 235. PC18-20.
9. Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide-primed reactions catalyzed by calf thymus polymerase. *J Biol Chem*. 1962. 237. 1945-1949.
10. Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase. In: Boyer PD (ed.) *The enzymes*. 1974. V. 10. Academic Press. 145-171.
11. Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase: biological studies. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1978. 47. P.347-374. doi: 10.1002/9780470122921.ch6
12. Chang LM, Bollum FJ. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. V. Homogeneous terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Biol Chem*. 1971. 246(4). 909-916.
13. Chang LM, Bollum FJ. Molecular biology of terminal transferase. *CRC Crit Rev Biochem*. 1986. 21(1). 27-52. doi: 10.3109/10409238609113608
14. Chang LM, Bollum FJ. Multiple roles of divalent cation in the terminal deoxynucleotidyltransferase reaction. *J Biol Chem*. 1990. 265(29). 17436-17440.

15. Chen D, Patton JT. Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension. *Biotechniques*. 2001. 30(3). 574-580, 582. doi: 10.2144/01303rr02
16. Chua JPS, Go MK, Osothprarop T et al. Evolving a Thermostable Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Synth Biol*. 2020. 9(7). 1725-1735. doi: 10.1021/acssynbio.0c00078
17. Church GM, Gao Y, Kosuri S. Next-generation digital information storage in DNA. *Science*. 2012. 337(6102). 1628. doi: 10.1126/science.1226355
18. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M et al. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature*. 1984. 311(5988). 752-755. doi: 10.1038/311752a0
19. Efcavitch JW, Sylvester JE. Modified template-independent enzymes for polydeoxynucleotide synthesis. US Patent US20160108382A1. (2015).
20. Eisenstein M. Enzymatic DNA synthesis enters new phase. *Nat Biotechnol*. 2020. 38(10). 1113-1115. doi: 10.1038/s41587-020-0695-9
21. Flamme M, Hanlon S, Iding H et al. Towards the enzymatic synthesis of phosphorothioate containing LNA oligonucleotides. *Bioorg Med Chem Lett*. 2021. 48. 128242. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.128242
22. Flamme M, Hanlon S, Marzuoli I. et al. Evaluation of 3'-phosphate as a transient protecting group for controlled enzymatic synthesis of DNA and XNA oligonucleotides. *Commun Chem*. 2022. 5. 68. doi: 10.1038/s42004-022-00685-5
23. Flamme M, Katkevica D, Pajuste K et al. Benzoyl and Pivaloyl as Efficient Protecting Groups for Controlled Enzymatic Synthesis of DNA and XNA Oligonucleotides. 2022. *Asian J. Organ. Chem*. 2022. 11(10). e202200384. doi: 10.1002/ajoc.202200384
24. Forget SM, Krawczyk MJ, Knight AM et al. Evolving a terminal deoxynucleotidyl transferase for commercial enzymatic DNA synthesis. *Nucleic Acids Res*. 2025. 53(4). gkaf115. doi: 10.1093/nar/gkaf115
25. Gao N, Yu A, Yang W et al. Enzymatic de novo oligonucleotide synthesis: Emerging techniques and advancements. *Biotechnol Adv*. 2025. 82. 108604. doi: 10.1016/j.biotechadv.2025.108604
26. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992. 119(3). 493-501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493
27. Gillam S, Smith M. Enzymatic synthesis of deoxyribo-oligonucleotides of defined sequence. *Nat New Biol*. 1972. 238(86). 233-234. doi: 10.1038/newbio238233a0
28. Gillam S, Jahnke P, Smith M. Enzymatic synthesis of oligodeoxyribonucleotides of defined sequence. *J Biol Chem*. 1978. 253(8). 2532-2539.
29. Gillam S, Rottman F, Jahnke P et al. Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence: synthesis of a segment of yeast iso-1-cytochrome c gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977. 74(1). 96-100. doi: 10.1073/pnas.74.1.96
30. 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
31. Gillam S, Waterman K, Smith M. Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence. Addition of short blocks of nucleotide residues to oligonucleotide primers. *Nucleic Acids Res*. 1975. 2(5). 613-624. doi: 10.1093/nar/2.5.613
32. 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
33. 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
34. Grunbeerg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. Enzymic synthesis of polynucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim Biophys Acta*. 1956. 20(1). 269-285. doi: 10.1016/0006-3002(56)90286-4
35. Gu R, Oweida T, Yingling YG et al. Enzymatic Synthesis of Nucleobase-Modified Single-Stranded DNA Offers Tunable Resistance to Nuclease Degradation. *Biomacromolecules*. 2018. 19(8). 3525-3535. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00816
36. Hiatt AC, Rose F. Compositions for enzyme catalyzed template-independent formation of phosphodiester bonds using protected nucleotides. US Patent 6,214,987 B1. (2001)
37. 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.
38. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972. 69(10). 2904-2909. doi: 10.1073/pnas.69.10.2904
39. Kato KI, Gonçalves JM, Houts GE et al. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal

- deoxynucleotidyltransferase. *J Biol Chem.* 1967. 242(11). 2780-2789.
40. Kaufmann G, Littauer UZ. Deoxyadenosine diphosphate as substrate for polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1969. 4(2). 79-83. doi: 10.1016/0014-5793(69)80201-2
41. Lee H, Wiegand DJ, Griswold K et al. Photon-directed multiplexed enzymatic DNA synthesis for molecular digital data storage. *Nat Commun.* 2020. 11(1). 5246. doi: 10.1038/s41467-020-18681-5
42. Lee HH, Kalhor R, Goela N et al. Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage. *Nat Commun.* 2019. 10(1). 2383. doi: 10.1038/s41467-019-10258-1
43. Li AN, Shi K, Zeng BB et al. Enhancing the expression of terminal deoxynucleotidyl transferases by N-terminal truncation. *Biotechnol J.* 2024. 19(9). e2400226. doi: 10.1002/biot.202400226
44. Li K, Lu X, Liao J et al. DNA-DISK: Automated end-to-end data storage via enzymatic single-nucleotide DNA synthesis and sequencing on digital microfluidics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2024. 121(34). e2410164121. doi: 10.1073/pnas.2410164121
45. Lu X, Li J, Li C et al. Enzymatic DNA Synthesis by Engineering Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Catalysis.* 2022. 12. 2988-2997. doi: 10.1021/acscatal.1c04879
46. Mackey JK, Gilham PT. New approach to the synthesis of polyribonucleotides of defined sequence. *Nature.* 1971. 233(5321). 551-553. doi: 10.1038/233551a0
47. Mathews AS, Yang H, Montemagno C. Photocleavable nucleotides for primer free enzyme mediated DNA synthesis. *Org Biomol Chem.* 2016. 14(35). 8278-8288. doi: 10.1039/c6ob01371f
48. Mathews AS, Yang H, Montemagno C. 3'-O-Caged 2'-Deoxynucleoside Triphosphates for Light-Mediated, Enzyme-Catalyzed, Template-Independent DNA Synthesis. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2017. 71. 13.17.1-13.17.38. doi: 10.1002/cpnc.41
49. Minhaz Ud-Dean SM. A theoretical model for template-free synthesis of long DNA sequence. *Syst Synth Biol.* 2008. 2(3-4). 67-73. doi: 10.1007/s11693-009-9023-x
50. 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
51. Motea EA, Berdis AJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta.* 2010. 1804(5). 1151-1166. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.06.030
52. Nikiteev I, Kuzmina J, Rog I et al. Optimization of Expression and Thermostability of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase through Iterative Mutagenesis and Computational Design. Preprint. 2025. DOI: 10.21203/rs.3.rs-7436431/v1
53. 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
54. Perkel JM. The race for enzymatic DNA synthesis heats up. *Nature.* 2019. 566(7745). 565. doi: 10.1038/d41586-019-00682-0
55. Sachanka AB, Douhaya SS, Shchur VV et al. Enhancement of the nucleotide incorporation activity of the terminal deoxynucleotidyl transferase by N-terminal truncation and DNA-binding protein modulation. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2026. 1874(1). 141114. doi: 10.1016/j.bbapap.2025.141114
56. Sachanka AB, Dzichenka YU, Shchur VV et al. Design and Characterization of the Fusion Enzyme of Bovine Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and DNA Binding Protein Sso7d from *Sulfolobus solfataricus*. *Chembiochem.* 2025. 26(19). e202500405. doi: 10.1002/cbic.202500405
57. Sachanka A, Shchur V, Dzichenka Y et al. Design, Expression, and Purification of a Fusion Enzyme Containing Terminal Deoxynucleotidyl Transferase from *B. bovis* and DNA-Binding Proteins from *E. coli*. *Protein Pept Lett.* 2025. 32(5). 353-367. doi: 10.2174/0109298665372636250504084653
58. Schaudy E, Lietard J, Somoza MM. Sequence Preference and Initiator Promiscuity for *De Novo* DNA Synthesis by Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Synth Biol.* 2021. 10(7). 1750-1760. doi: 10.1021/acssynbio.1c00142
59. Schmitz C, Reetz MT. Solid-phase enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Org Lett.* 1999. 1(11). 1729-1731. doi: 10.1021/ol990240n
60. Smith JA, Nguyen BH, Carlson R et al. Spatially Selective Electrochemical Cleavage of a Polymerase-Nucleotide Conjugate. *ACS Synth Biol.* 2023. 12(6). 1716-1726. doi: 10.1021/acssynbio.3c00044
61. 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
62. Uchiyama Y, Takeuchi R, Kodera H et al. Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie.* 2009. 91(2). 165-170. doi: 10.1016/j.biochi.2008.07.005
63. Verardo D, Adelizzi B, Rodriguez-Pinzon DA et al. Multiplex enzymatic synthesis of DNA with single-base resolution. *Sci Adv.* 2023. 9(27). eadi0263. doi: 10.1126/sciadv.adi0263
64. 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

65. Zhang C, Subthain H, Guo F et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase: Properties and applications. *Eng Microbiol.* 2025. 5(1). 100179. doi: 10.1016/j.engmic.2024.100179

References

1. Adamopoulos PG, Tsiakanikas P, Stolidi I et al. A versatile 5' RACE-Seq methodology for the accurate identification of the 5' termini of mRNAs. *BMC Genomics.* 2022. 23(1). 163. doi: 10.1186/s12864-022-08386-y
2. Ashley J, Potts IG, Olorunniyi FJ. Applications of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Enzyme in Biotechnology. *Chembiochem.* 2023. 24(5). e202200510. doi: 10.1002/cbic.202200510
3. Baltimore D. Is terminal deoxynucleotidyl transferase a somatic mutagen in lymphocytes? *Nature.* 1974. 248(447). 409-411. doi: 10.1038/248409a0
4. 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
5. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ et al. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene.* 1977. 2(2). 95-113. doi: 10.1016/0378-1119(77)90000-2
6. Bollum FJ. Calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1960. 235. 2399-2403.
7. Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide primers for calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1960. 235. PC18-20.
8. Bollum FJ. Oligodeoxyribonucleotide-primed reactions catalyzed by calf thymus polymerase. *J Biol Chem.* 1962. 237. 1945-1949.
9. Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase. In: Boyer PD (ed.) *The enzymes.* 1974. V. 10. Academic Press. 145-171.
10. Bollum FJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase: biological studies. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1978. 47. P.347-374. doi: 10.1002/9780470122921.ch6
11. Chang LM, Bollum FJ. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. V. Homogeneous terminal deoxynucleotidyl transferase. *J Biol Chem.* 1971. 246(4). 909-916.
12. Chang LM, Bollum FJ. Molecular biology of terminal transferase. *CRC Crit Rev Biochem.* 1986. 21(1). 27-52. doi: 10.3109/10409238609113608
13. Chang LM, Bollum FJ. Multiple roles of divalent cation in the terminal deoxynucleotidyltransferase reaction. *J Biol Chem.* 1990. 265(29). 17436-17440.
14. Chen D, Patton JT. Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension. *Biotechniques.* 2001. 30(3). 574-580, 582. doi: 10.2144/01303rr02
15. Chua JPS, Go MK, Osothprarop T et al. Evolving a Thermostable Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Synth Biol.* 2020. 9(7). 1725-1735. doi: 10.1021/acssynbio.0c00078
16. Church GM, Gao Y, Kosuri S. Next-generation digital information storage in DNA. *Science.* 2012. 337(6102). 1628. doi: 10.1126/science.1226355
17. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M et al. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature.* 1984. 311(5988). 752-755. doi: 10.1038/311752a0
18. Efcavitch JW, Sylvester JE. Modified template-independent enzymes for polydeoxynucleotide synthesis. US Patent US20160108382A1. (2015).
19. Eisenstein M. Enzymatic DNA synthesis enters new phase. *Nat Biotechnol.* 2020. 38(10). 1113-1115. doi: 10.1038/s41587-020-0695-9
20. Flamme M, Hanlon S, Iding H et al. Towards the enzymatic synthesis of phosphorothioate containing LNA oligonucleotides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2021. 48. 128242. doi: 10.1016/j.bmcl.2021.128242
21. Flamme M, Hanlon S, Marzuoli I. et al. Evaluation of 3'-phosphate as a transient protecting group for controlled enzymatic synthesis of DNA and XNA oligonucleotides. *Commun Chem.* 2022. 5. 68. doi: 10.1038/s42004-022-00685-5
22. Flamme M, Katkevica D, Pajuste K et al. Benzoyl and Pivaloyl as Efficient Protecting Groups for Controlled Enzymatic Synthesis of DNA and XNA Oligonucleotides. 2022. *Asian J. Organ. Chem.* 2022. 11(10). e202200384. doi: 10.1002/ajoc.202200384
23. Forget SM, Krawczyk MJ, Knight AM et al. Evolving a terminal deoxynucleotidyl transferase for commercial enzymatic DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.* 2025. 53(4). gkaf115. doi: 10.1093/nar/gkaf115
24. Gao N, Yu A, Yang W et al. Enzymatic de novo oligonucleotide synthesis: Emerging techniques and advancements. *Biotechnol Adv.* 2025. 82. 108604. doi: 10.1016/j.biotechadv.2025.108604
25. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992. 119(3). 493-501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493
26. Gilham S, Smith M. Enzymatic synthesis of deoxyribo-oligonucleotides of defined sequence. *Nat New Biol.* 1972. 238(86). 233-234. doi: 10.1038/newbio238233a0

27. Gillam S, Jahnke P, Smith M. Enzymatic synthesis of oligodeoxyribonucleotides of defined sequence. *J Biol Chem.* 1978. 253(8). 2532-2539.
28. Gillam S, Rottman F, Jahnke P et al. Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence: synthesis of a segment of yeast iso-1-cytochrome c gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977. 74(1). 96-100. doi: 10.1073/pnas.74.1.96
29. 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
30. Gillam S, Waterman K, Smith M. Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence. Addition of short blocks of nucleotide residues to oligonucleotide primers. *Nucleic Acids Res.* 1975. 2(5). 613-624. doi: 10.1093/nar/2.5.613
31. 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
32. 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
33. Grunbeerg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. Enzymic synthesis of polynucleotides. I. Polynucleotide phosphorylase of *Azotobacter vinelandii*. *Biochim Biophys Acta.* 1956. 20(1). 269-285. doi: 10.1016/0006-3002(56)90286-4
34. Gu R, Oweida T, Yingling YG et al. Enzymatic Synthesis of Nucleobase-Modified Single-Stranded DNA Offers Tunable Resistance to Nuclease Degradation. *Biomacromolecules.* 2018. 19(8). 3525-3535. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00816
35. Hiatt AC, Rose F. Compositions for enzyme catalyzed template-independent formation of phosphodiester bonds using protected nucleotides. US Patent 6,214,987 B1. (2001)
36. 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.
37. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1972. 69(10). 2904-2909. doi: 10.1073/pnas.69.10.2904
38. Kato KI, Gonçalves JM, Houts GE et al. Deoxynucleotide-polymerizing enzymes of calf thymus gland. II. Properties of the terminal deoxynucleotidyltransferase. *J Biol Chem.* 1967. 242(11). 2780-2789.
39. Kaufmann G, Littauer UZ. Deoxyadenosine diphosphate as substrate for polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1969. 4(2). 79-83. doi: 10.1016/0014-5793(69)80201-2
40. Lee H, Wiegand DJ, Griswold K et al. Photon-directed multiplexed enzymatic DNA synthesis for molecular digital data storage. *Nat Commun.* 2020. 11(1). 5246. doi: 10.1038/s41467-020-18681-5
41. Lee HH, Kalhor R, Goela N et al. Terminator-free template-independent enzymatic DNA synthesis for digital information storage. *Nat Commun.* 2019. 10(1). 2383. doi: 10.1038/s41467-019-10258-1
42. Li AN, Shi K, Zeng BB et al. Enhancing the expression of terminal deoxynucleotidyl transferases by N-terminal truncation. *Biotechnol J.* 2024. 19(9). e2400226. doi: 10.1002/biot.202400226
43. Li K, Lu X, Liao J et al. DNA-DISK: Automated end-to-end data storage via enzymatic single-nucleotide DNA synthesis and sequencing on digital microfluidics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2024. 121(34). e2410164121. doi: 10.1073/pnas.2410164121
44. Lu X, Li J, Li C et al. Enzymatic DNA Synthesis by Engineering Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Catalysis.* 2022. 12. 2988-2997. doi: 10.1021/acscatal.1c04879
45. Mackey JK, Gilham PT. New approach to the synthesis of polyribonucleotides of defined sequence. *Nature.* 1971. 233(5321). 551-553. doi: 10.1038/233551a0
46. Mathews AS, Yang H, Montemagno C. 3'-O-Caged 2'-Deoxynucleoside Triphosphates for Light-Mediated, Enzyme-Catalyzed, Template-Independent DNA Synthesis. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2017. 71. 13.17.1-13.17.38. doi: 10.1002/cpnc.41
47. Mathews AS, Yang H, Montemagno C. Photocleavable nucleotides for primer free enzyme mediated DNA synthesis. *Org Biomol Chem.* 2016. 14(35). 8278-8288. doi: 10.1039/c6ob01371f
48. Minhaz Ud-Dean SM. A theoretical model for template-free synthesis of long DNA sequence. *Syst Synth Biol.* 2008. 2(3-4). 67-73. doi: 10.1007/s11693-009-9023-x
49. 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
50. Motea EA, Berdis AJ. Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim Biophys Acta.* 2010. 1804(5). 1151-1166. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.06.030
51. Nikiteev I, Kuzmina J, Rog I et al. Optimization of Expression and Thermostability of Terminal

- Deoxynucleotidyl Transferase through Iterative Mutagenesis and Computational Design. Preprint. 2025. DOI: 10.21203/rs.3.rs-7436431/v1
52. 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
53. Perkel JM. The race for enzymatic DNA synthesis heats up. *Nature.* 2019. 566(7745). 565. doi: 10.1038/d41586-019-00682-0
54. Sachanka AB, Douhaya SS, Shchur VV et al. Enhancement of the nucleotide incorporation activity of the terminal deoxynucleotidyl transferase by N-terminal truncation and DNA-binding protein modulation. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2026. 1874(1). 141114. doi: 10.1016/j.bbapap.2025.141114
55. Sachanka AB, Dzichenka YU, Shchur VV et al. Design and Characterization of the Fusion Enzyme of Bovine Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and DNA Binding Protein Sso7d from *Sulfolobus solfataricus*. *Chembiochem.* 2025. 26(19). e202500405. doi: 10.1002/cbic.202500405
56. Sachanka A, Shchur V, Dzichenka Y et al. Design, Expression, and Purification of a Fusion Enzyme Containing Terminal Deoxynucleotidyl Transferase from *B. bovis* and DNA-Binding Proteins from *E. coli*. *Protein Pept Lett.* 2025. 32(5). 353-367. doi: 10.2174/0109298665372636250504084653
57. Sachanka AB, Shchur VV, Usanov SA et al. Effect of DNA-binding Proteins on Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity in Systems with Homopolymer Substrates. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2024. 60(6). 1104–1117. DOI: 10.1134/S0003683824605237
58. Schaudy E, Lietard J, Somoza MM. Sequence Preference and Initiator Promiscuity for *De Novo* DNA Synthesis by Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *ACS Synth Biol.* 2021. 10(7). 1750-1760. doi: 10.1021/acssynbio.1c00142
59. Schmitz C, Reetz MT. Solid-phase enzymatic synthesis of oligonucleotides. *Org Lett.* 1999. 1(11). 1729-1731. doi: 10.1021/ol990240n
60. Smith JA, Nguyen BH, Carlson R et al. Spatially Selective Electrochemical Cleavage of a Polymerase-Nucleotide Conjugate. *ACS Synth Biol.* 2023. 12(6). 1716-1726. doi: 10.1021/acssynbio.3c00044
61. 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
62. Uchiyama Y, Takeuchi R, Kodera H et al. Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie.* 2009. 91(2). 165-170. doi: 10.1016/j.biochi.2008.07.005
63. Verardo D, Adelizzi B, Rodriguez-Pinzon DA et al. Multiplex enzymatic synthesis of DNA with single-base resolution. *Sci Adv.* 2023. 9(27). eadi0263. doi: 10.1126/sciadv.adi0263
64. 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
65. Zhang C, Subthain H, Guo F et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase: Properties and applications. *Eng Microbiol.* 2025. 5(1). 100179. doi: 10.1016/j.engmic.2024.100179