



УДК 547.963.32:542.95

**СИНТЕЗ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
НА ПОЛИСТИРОЛЬНОМ НОСИТЕЛЕ
ФОСФОТРИЭФИРНЫМ МЕТОДОМ****Смялков А. Н., Ломакин А. И., Ямщиков В. Ф.,
Попов С. Г.***Всесоюзный научно-исследовательский институт
молекулярной биологии, Новосибирск*

С целью автоматизации процесса синтеза олигодезоксирибонуклеотидов разработана схема с использованием полистирольного носителя, позволяющая быстро получать олигодезоксирибонуклеотиды длиной 9–12 звеньев с хорошими выходами (в среднем 53–75% на стадию). Нарастивание олигонуклеотидной цепи осуществлялось защищенными моно- и динуклеотидами фосфотриэфирным методом как от 3'-к 5'-концу, так и от 5'-к 3'-концу с помощью мезитиленсульфонилтетразола.

Последние достижения в синтезе олигонуклеотидов на полимерных носителях [1–4] связаны с успешным применением фосфотриэфирной схемы нарастивания олигонуклеотидной цепи. По сравнению с используемой ранее фосфодиэфирной схемой [5, 6] увеличился выход продукта и скорость синтеза [1], а также значительно расширилась возможность использования различных носителей. Удовлетворительные результаты были получены на полиамидных гелях [1, 7], силикагеле [2], целлюлозе [4], а также полистирольном геле [3, 8].

На основе имеющихся литературных данных нами предпринята попытка разработки простого и эффективного метода синтеза с целью его дальнейшего использования в автоматическом синтезаторе для быстрого получения олигодезоксирибонуклеотидов.

В качестве носителя выбран полистирольный гель, представляющий собой сополимер стирола с 2% дивинилбензола. Полимеры такого типа хорошо изучены, легко доступны и использовались ранее в ряде работ по твердофазному синтезу олигонуклеотидов [9].

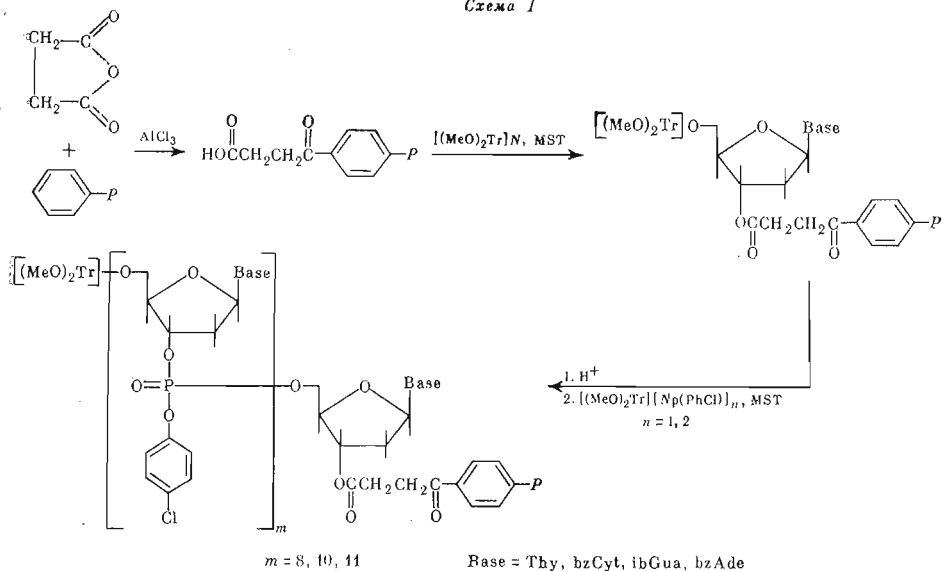
В первом из исследованных нами вариантов нарастивания цепи от 3'-к 5'-концу олигомера использовалась якорная карбоксильная группа. Для ее введения в состав носителя применена простая одностадийная процедура, заключающаяся в обработке носителя янтарным ангидридом в присутствии хлористого алюминия [10] (схема 1). Полученный носитель, содержащий карбоксильную группу, служил далее для непосредственного введения первого нуклеозидного звена с помощью смеси α, α' -дипиридилдисульфида и трифенилфосфина [11] в присутствии 4-диметиламинопиридина* [12].

Преимуществом данного способа введения якорной группы и первого нуклеозидного звена по сравнению с многостадийными способами, использовавшимися ранее [1, 2, 4], является его простота и достаточно высокая эффективность. Кроме того, этот способ не требует синтеза специальных нуклеозидных производных для присоединения к носителю, как, например, в работах [1, 4].

Вместо смеси дипиридилдисульфида с трифенилфосфином мы успешно использовали также мезитиленсульфонилтетразол. Удобством последней

Принятые сокращения: PhCl — *n*-хлорфенил, MST — мезитиленсульфонилтетразол. Остальные сокращения даны в соответствии с рекомендациями IUPAC-IUB. Префикс «d» (дезоксид) в формулах нуклеотидов для краткости опущен.

* Использование 4-диметиламинопиридина в качестве катализатора в этой реакции предложено В. В. Самуковым (персональное сообщение).



модификации является меньшее число используемых в синтезе реагентов, что упрощает автоматизацию метода.

Количество введенного нуклеозида составляло в обоих описанных случаях 80—160 мкмоль на 1 г носителя. Для сборки олигонуклеотидной цепи на полимере был применен метод, аналогичный использованному ранее для синтеза в растворе [13] и хорошо зарекомендовавший себя в предыдущих работах по твердофазному методу синтеза олигонуклеотидов [3, 7] (схема 1). Такой подход удобен, поскольку синтез блоков в растворе и их конденсация на носителе проводятся по одной и той же схеме.

В качестве блоков использовались защищенные динуклеотиды, полученные конденсацией бариевых солей мононуклеотидов [14] в присутствии мезитилсульфонилтетразола. Для удаления концевых цианэтильных групп в ходе синтеза динуклеотидных блоков применялась смесь триэтиламин — пиридин (1:1) [15]. Концевые диметокситритильные группы удаляли с помощью трихлоруксусной кислоты, действие которой характеризуется низким уровнем протекания побочной реакции апуринизации [7].

В цикле наращивания олигонуклеотидной цепи (табл. 1) помимо полимера и фосфатного компонента используются лишь два реагента и два растворителя. Продолжительность цикла составляет ~7 ч. Основная часть времени в случае использования мезитилсульфонилтетразола затрачивается на проведение стадии конденсации и может быть в дальнейшем существенно сокращена за счет применения более эффективных конденсирующих агентов.

После завершения стадий конденсации носитель обрабатывали 0,5 М раствором *n*-нитробензальдоксимата лития* для отщепления олигонуклеотидной цепи и удаления межнуклеотидных защитных групп. Полное снятие защитных групп достигалось последующей стандартной обработкой концентрированным аммиаком и 80% уксусной кислотой. Деблокированный продукт реакции подвергали обессоливаннию на колонке с биогеом Р-2. Фракции, содержащие вещества нуклеотидной природы, объединяли, наносили на колонку с QAE-сефадексом А-25 и выделяли из реакционной смеси последующей хроматографией в системе Томлинсона-Тенера (рис. 1).

Видно, что во всех случаях конечный продукт является основным веществом реакционной смеси. Продукт подвергался дополнительной очистке методом обращенно-фазовой хроматографии на колонке с силианизированным силикагелем в градиенте ацетонитрила [16]. Для быстрого получения небольших количеств продукта для молекулярно-биологических

* Использование *n*-нитробензальдоксимата лития предложено Ю. А. Горбуновым (персональное сообщение).

Цикл наращивания цепи на носителе

Реагент или растворитель	Число × продолжительность операций, мин	Реагент или растворитель	Число × продолжительность операций, мин
Хлороформ	4×2	Абс. пиридин	4×2
CCl ₃ COOH (2,5% раствор в хлороформе)	2×3	Фосфатный компонент, MST	1×360 *
Хлороформ	4×2	Абс. пиридин	3×2

* Время конденсации выбрано равным 6 ч на основании предварительного эксперимента по синтезу тетра-нуклеозидтрифосфата TAGC, в котором на последней стадии присоединения мономера выход продукта, определенный по профилю ионообменной хроматографии реакционной смеси после полного удаления всех защитных групп, составил ~80% за 4 ч и 90% за 24 ч.

Таблица 2

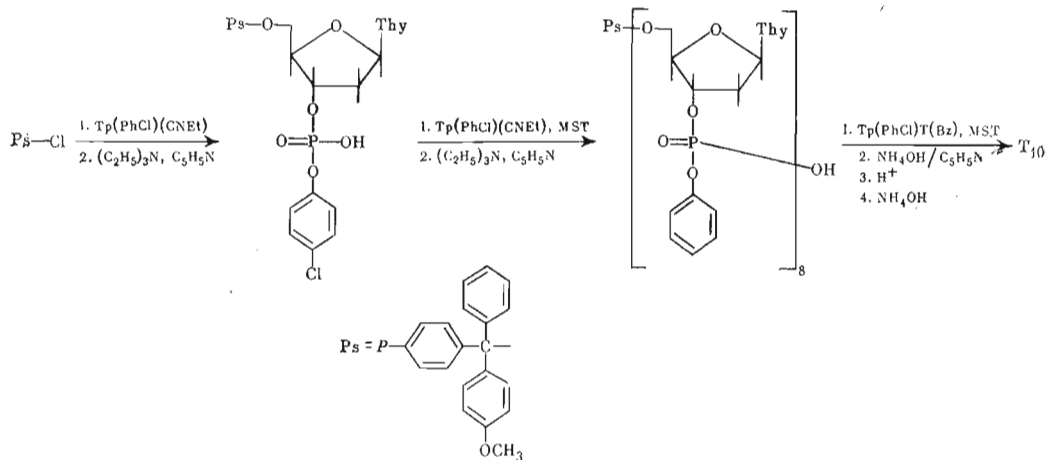
Схемы синтеза и выходы продуктов при наращивании цепи от 3'- к 5'-концу

Олигонуклеотид	Схема синтеза	Исходное количество нуклеозида на носителе, ммоль	Выход после обессоливания, ОЕ ₂₆₀	Взято для хроматографической очистки, ОЕ ₂₆₀	Выход продукта		
					ОЕ ₂₆₀	% (на исходный нуклеозид)	% (средний в расчете на стадию конденсации)
GGAAAAGAA	1+2+2+2+2	15	870	116	40	15,7	63
GCGTTCCTTC	1+2+2+1+2+2	15	520	104	59	24,5	75
AATTGGATCAT	1+2+2+2+2+2	20	1110	148	48	13,9	67
TCCCTGTCTAC	To a'e	15	675	135	60	19,7	72
AGGTTAGTAGA	»	12	270	88	28,5	5,3	56
AGAGTGATACGC	1+1+2+2+2+2+2	15	920	116	22	8,0	66
AACGCATGATCC	1+2+2+2+1+2+2	15	620	124	24	6,1	63
GTATAGCCCGTG	1+2+1+2+2+2+2	15	430	114	11	2,2	53

исследований (~3–5 ОЕ₂₆₀) отдельно очищалось вещество узкой части пика (рис. 2). Гомогенность продукта анализировали далее методом микроколоночной хроматографии на аминоксилочроме. Во всех случаях чистота продукта составляла не менее 95%. Выходы олигомеров приведены в табл. 2 в расчете на исходный нуклеозид. Средний выход на стадию конденсации (53–75%) практически вполне приемлем и не уступает опубликованным в литературе [1, 3, 7, 8]. Это позволяет успешно использовать метод для получения олигонуклеотидов любого состава, в том числе содержащих только пуриновые основания.

Мы попытались оценить применимость другой схемы наращивания олигонуклеотидной цепи — от 5'- к 3'-концу (схема 2). Используемый нами носитель содержал якорную монометокситригильную группу [17],

Схема 2



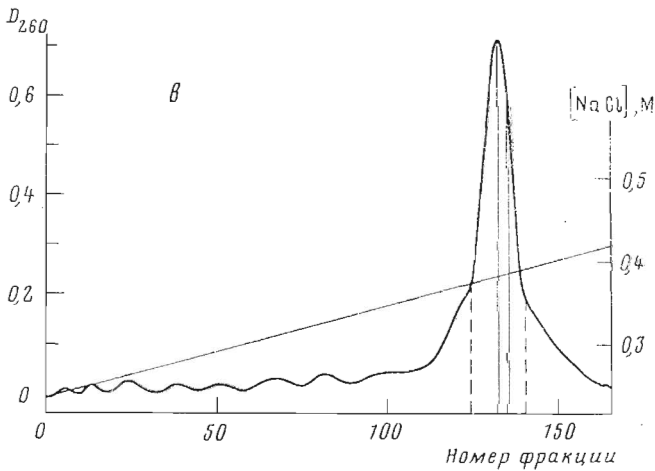
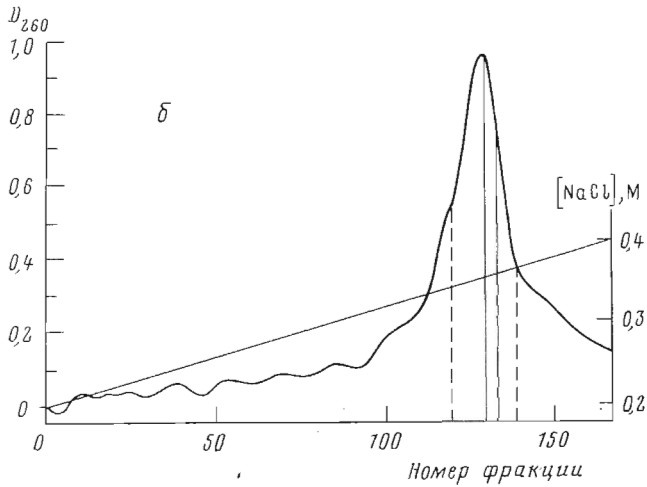
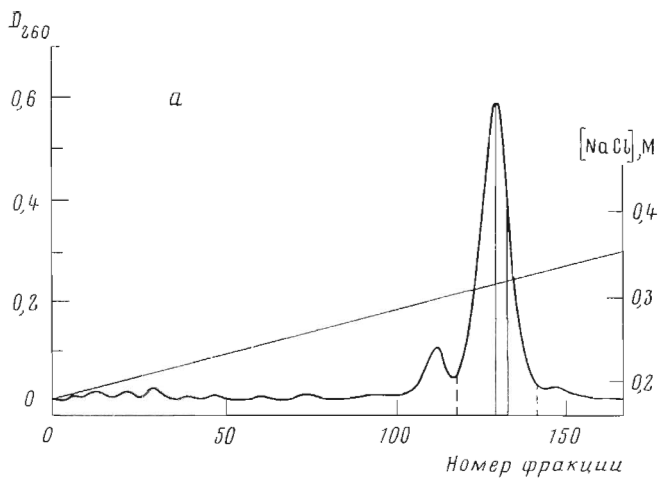


Рис. 1. Типичные профили ионообменной хроматографии реакционных смесей (после удаления всех защитных групп) на QAE-сефадексе А-25 (колонка 200×28 мм). Элюцию проводили в градиенте концентрации NaCl в 7 М мочевины и 0,01 М трис-HCl (pH 7,5). а — нонануклеотид GGAAAAGAA, фракции по 12 мл за 9 мин; б — ундекануклеотид ACGTTAGTAGA, фракции по 12 мл за 8 мин; в — додекануклеотид AGAGTGATACGC, фракции по 12 мл за 9 мин. Пунктирными линиями показана часть пика продукта, выделяемая для дальнейшей очистки; сплошными линиями — фракция, выделяемая для молекулярно-биологических экспериментов

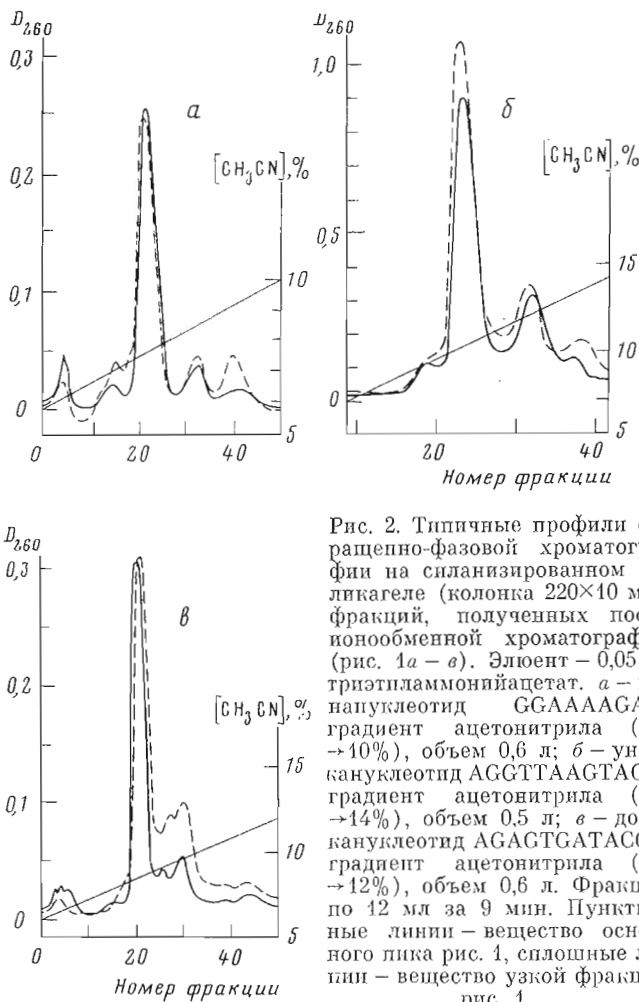


Рис. 2. Типичные профили обращенно-фазовой хроматографии на силианизированном силикагеле (колонка 220×10 мм) фракций, полученных после ионообменной хроматографии (рис. 1а – в). Элюент – 0,05 М триэтиламмонийацетат. а – нонануклеотид GAAAAGAA, градиент ацетонитрила (6 → 10%), объем 0,6 л; б – undека нуклеотид AGGTTAAGTAGA, градиент ацетонитрила (7 → 14%), объем 0,5 л; в – додекануклеотид AGAGTGATACGC, градиент ацетонитрила (6 → 12%), объем 0,6 л. Фракции по 12 мл за 9 мин. Пунктирные линии – вещество основного пика рис. 1, сплошные линии – вещество узкой фракции рис. 1.

связанную с 5'-ОН-группой первого нуклеотидного звена. В качестве первого и семи последующих мононуклеотидных звеньев в синтезе дека нуклеотида использовался тимидин-3'-фосфат, защищенный по фосфатному остатку *n*-хлорфенильной и β-цианэтильной группами. Нагрузка носителя составляла 120 мкмоль нуклеотида на 1 г полимер-нуклеотида. Цикл наращивания олигонуклеотидной цепи на одно нуклеотидное звено включал две стадии: децианэтилирование концевое фосфатного остатка на носителе и последующую конденсацию с защищенным нуклеотидом по схеме 2. Полимер-олигонуклеотид после децианэтилирования отмывали пиридином. Конденсацию вели с трехкратным избытком гидроксильного компонента $\text{Tr}(\text{PhCl})(\text{CNEt})$ с помощью мезитиленсульфонилтетразола. Для обеспечения возможности отделения целевого олигонуклеотида от побочных продуктов методом ионообменной хроматографии на последней стадии вместо мононуклеотида был использован динуклеозидфосфат $\text{Tr}(\text{PhCl})\text{T}(\text{Bz})$. Удаление *O*- и *P*-защитных групп проводили обработкой полимер-олигонуклеотида смесью пиридин – конц. аммиак (1:1). Целевой продукт отщепляли от полимера 1% раствором трифторуксусной кислоты в хлористом метиле, олигонуклеотид смывали пиридином. Общий выход продукта после ионообменной хроматографии (рис. 3) составил 12% в пересчете на исходный нуклеозид-3'-фосфат, закрепленный на носителе, что составляет в среднем 77% на стадию конденсации.

Таким образом, результаты настоящей работы подтверждают вывод, что в случае использования фосфотриэфирной схемы синтеза полистироль-

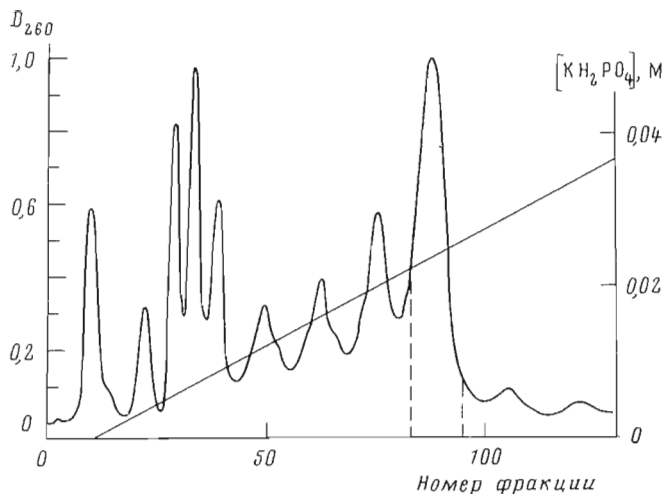


Рис. 3. Профиль ионообменной хроматографии на аминоксилохроме (колонка 200×15 мм) реакционной смеси после удаления всех защитных групп в синтезе декатимидилата по схеме 2. Элюцию проводили в градиенте концентрации $\text{K}_2\text{H}_9\text{PO}_4$ в 7 М мочевины (рН 7,5). Фракции по 10 мл за 6 мин. Пунктирной линией показан выделяемый продукт

ные гели обладают необходимым комплексом свойств, предъявляемых к носителям для твердофазного синтеза олигонуклеотидов [3], и не уступают специально синтезированным для этой цели полиамидным смолам [1, 18].

Высокий выход, достигнутый в синтезе декатимидилата, позволяет заключить, что схема наращивания цепи от 5'-к 3'-концу является весьма перспективной, однако вследствие большего времени, затрачиваемого на удаление цианэтильных групп, по сравнению с диметокситриэтильным этот вариант синтеза пока значительно уступает по скорости альтернативному варианту синтеза от 3'-к 5'-концу. Последний представляется в настоящее время достаточно хорошо разработанным для создания на его основе автоматического метода синтеза.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозиды производства СКТБ БАН (Новосибирск), биогель Р-2 (Bio-Rad Laboratories, США), QAE-сефадекс (LKB, Швеция). Тетразол получали по методу [19]. Аминосилохром — анионообменник на основе силикагеля производства НИС НГУ (Новосибирск). Силанизированный силикагель любезно предоставлен В. В. Самуковым, методика проведения хроматографии дана в работе [16]. Нитробензальдоксимат лития получен по методике, предложенной Ю. А. Горбуновым, смешиванием эквимольных количеств *n*-нитробензальдоксима и 2 М раствора гидроксида лития в пиридине.

Профили хроматографии регистрировали с помощью проточных денситометров «Uvicord II» (LKB, Швеция) и «UV Monitor 1300» (Bio-Rad Laboratories, США). Для спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр «Perkin-Elmer 550» (США). Другие методы и техника проведения эксперимента аналогичны использованным в работах [3, 6, 7].

Защищенные нуклеозид-3'-фосфаты и динуклеотиды получены как описано в работе [14], но концевые цианэтильные группы удаляли в течение 4 ч при 20° С смесью триэтиламин — пиридин (1:1) [15], а диметокситриэтильные — в течение 5 мин при 0–4° С с помощью 2,5% раствора CCl_3COOH в хлороформе [7].

Введение якорной карбоксильной группы. К суспензии 1 г полимера S-X2 (Bio-Rad Laboratories, США) в смеси 2 мл нитробензола и 8 мл 1,1,2,2-тетрахлорэтана добавляли 334 мг (2,5 ммоль) AlCl_3 и 100 мг (1 ммоль)

янтарного ангидрида, перемешивали 20 ч при 20° С, отфильтровывали полимер, промывали этанолом (2×10 мл), смесью конц. HCl — этанол (1:3, 4×10 мл), этанолом до нейтральной реакции фильтрата, ацетоном (2×10 мл) и сушили в вакууме.

Введение первого нуклеозидного звена. Смесь 1 г карбоксил-полимера и 1 ммоль защищенного нуклеозида высушивали упариванием с абс. пиридином (3×20 мл), добавляли 5 мл абс. пиридина и 756 мг (3 ммоль) мезитилсульфонилтетразола или 462 мг (2 ммоль) трифенилфосфина, 376 мг (2 ммоль) α, α' -дипиридилдисульфида и 25 мг (0,2 ммоль) 4-диметиламинопиридина, перемешивали 20 ч при 20° С, прибавляли 0,5 мл метанола и перемешивали еще 20 ч. Полимер отфильтровывали, промывали пиридином до исчезновения следов нуклеозида в фильтрате, затем сухим метанолом (2×20 мл) и сушили в вакууме.

Нагрузку носителя по нуклеозиду определяли спектрофотометрически путем количественного детритилирования навески полимер-нуклеозида 1% раствором CF₃COOH в хлороформе. Содержание нуклеозида на полимере составляло на 1 г полимера: для [(MeO)₂Tr]bzA — 80 мкмоль, для [(MeO)₂Tr]bzC — 100 мкмоль, для [(MeO)₂Tr]ibG — 150 мкмоль и для [(MeO)₂Tr]T — 160 мкмоль.

Удаление диметокситригильной защитной группы и проведение стадии конденсации. Навеску полимера, содержащего 15 мкмоль тритилнуклеозида (или олигонуклеотида), по аналогии с методикой, описанной в работе [7], перемешивали 3 мин в 4 мл 2,5% CCl₃COOH в хлороформе, отфильтровывали, добавляли новую порцию кислоты, перемешивали еще 3 мин. Полимер отфильтровывали, промывали хлороформом (3×5 мл) и пиридином (4×5 мл).

Детритилированный полимер-нуклеозид (олигонуклеотид) и 45 мкмоль фосфатного компонента [(MeO)₂Tr]Np(PhCl) или [(MeO)₂Tr]Np(PhCl)××Np(PhCl) высушивали упариванием с абс. пиридином (3×3 мл), добавляли 3 мл абс. пиридина и 34 мг (135 мкмоль) мезитилсульфонилтетразола. Реакционную смесь упаривали до объема 1,5 мл, перемешивали 6 ч при 20° С, отфильтровывали полимер, промывали пиридином (3×5 мл) и хлороформом (4×5 мл).

Полное удаление защитных групп. Полимер-олигонуклеотид (100 мг) обрабатывали 20 ч при 20° С 2 мл 0,5 М раствора *n*-нитробензальдоксимата лития в смеси пиридин — вода (7:3). Полимер отфильтровывали и тщательно промывали пиридином (3×5 мл) и 50% водным пиридином (3×5 мл). Фильтрат объединяли и подкисляли уксусной кислотой для перевода оксимата лития в оксим, упаривали досуха. К остатку добавляли 20 мл воды и экстрагировали 3 мл хлороформа. Водный слой упаривали и обрабатывали 30 мин при 20° С 10 мл 80% уксусной кислоты. Остаток после упаривания раствора уксусной кислоты выдерживали 20 ч в 10 мл конц. аммиака при 20° С.

Введение якорной монометокситригильной группы проводили как описано в работе [17].

Введение первого нуклеотидного звена. К раствору 875 мг (1,7 ммоль) Tr(PhCl) (CNEt), высушенному упариванием с абс. пиридином (3×10 мл), в 5 мл абс. пиридина прибавляли 1 г полимер-третилхлорида, перемешивали 20 ч при 20° С, добавляли 20 мл метанола. Через 1 ч полимер отфильтровывали, промывали хлороформом (3×10 мл) и пентаном (2×10 мл), сушили в вакууме водоструйного насоса при 50° С.

Определение нагрузки полимера проводили следующим методом. После обработки 13 мг полимер-нуклеотида 1% раствором CF₃COOH в CH₂Cl₂ (3×2 мл, 2 мин) полимер промывали хлороформом (3×5 мл), объединенный фильтрат упаривали, остаток растворяли в метаноле. Количество Tr(PhCl) (CNEt) определяли спектрофотометрически (ϵ_{267} принят равным 9600 M⁻¹ см⁻¹). Содержание нуклеотида на полимере составило 120 мкмоль/г.

Удаление цианэтильной группы и проведение стадии конденсации. Суспензию 200 мг полимер-олигонуклеотида, содержащего 25 мкмоль нуклеотида или олигонуклеотида в 5 мл смеси пиридин — триэтиламин (1:1) пе-

ременивали 2 ч при 50° С. Полимер отфильтровывали, промывали абс. пиридином (3×5 мл).

Децпанэтилированный полимер-нуклеотид (или олигонуклеотид) и 75 мкмоль гидроксильного компонента $\text{Tr}(\text{PhCl})(\text{CNEt})$ или $\text{Tr}(\text{PhCl}) \cdot \text{T}(\text{Bz})$ высушивали упариванием с абс. пиридином (3×5 мл). К реакционной смеси объемом 1 мл добавляли 19 мг (75 мкмоль) мезитилсульфонилтетразола, перемешивали 18 ч при 20° С, полимер отфильтровывали и промывали абс. пиридином (3×5 мл).

Полное удаление защитных групп в синтезе декагимидилата. Полимер-олигонуклеотид (200 мг) перемешивали 20 ч при 50° С в 40 мл смеси пиридин — конц. аммиак (1:1), отфильтровывали и промывали пиридином (5 мл), диоксаном (5 мл), хлороформом (3×5 мл). Затем полимер обрабатывали 1% раствором CF_3COOH в CH_2Cl_2 (2×5 мл, 2 мин), отмывали кислоту толуолом (3×5 мл). Нуклеотидный материал смывали 90% водным пиридином (3×5 мл). Фильтрат упаривали и обрабатывали конц. аммиаком 3 ч при 50° С.

После удаления защитных групп реакционные смеси (кроме T_{10}) обес-соливали на колонке с биогеом Р-2, а затем наносили на колонку с QAE-сефадексом А-25. После ионообменной хроматографии вещество целевого пика собирали, добавляли 1 М триэтиламонийацетатный буфер до концентрации 0,05 М и хроматографировали на колонке с силанизированным спликагелем.

Последовательности нуклеотидов в синтезируемых олигомерах подтверждены стандартным анализом по методу нуклеотидных карт [20].

Авторы выражают благодарность З. Д. Подковыровой и В. А. Каргинову за проведение анализов последовательностей олигонуклеотидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gait M. G., Singh M., Sheppard R. C., Edge M. D., Greene A. R., Heathcliff G. R., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 5, p. 1081–1096.
2. Matteucci M. D., Caruthers M. H. Tetrahedron Lett., 1980, v. 21, № 8, p. 719–722.
3. Miyoshi K., Arentzen R., Huang T., Itakura K. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 22, p. 5507–5517.
4. Crea R., Horn T. Nucl. Acids Res., 1980, v. 8, № 10, p. 2331–2348.
5. Gait M. G., Sheppard R. C. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 4, p. 1135–1158.
6. Potapov V. K., Veiko V. P., Koroleva O. N., Shabarova Z. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 6, p. 2041–2056.
7. Gait M. G., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., Symposium Ser., 1980, № 7, p. 225–232.
8. Добрынин В. Н., Чернов В. К., Колосов М. Н. Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 1, с. 138–140.
9. Kössel H., Seliger H. In: Progress in chemistry of organic natural products / Eds Herz W., Grizebach H., Kirby G. W. Wien — New York: Springer Verlag, 1975, v. 32, p. 297–508.
10. Yip K. F., Tsou K. C. J. Amer. Chem. Soc., 1971, v. 93, № 13, p. 3272–3276.
11. Mukayama T. Phosphorus and sulphur, 1976, v. 1, p. 371–387.
12. Neises B., Steglich W. Angew. Chem. Int. Ed., 1978, v. 17, № 7, p. 522–524.
13. Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura T. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1978, v. 75, № 12, p. 5765–5769.
14. Gough G. R., Collier K. G., Weith H. L., Gilham P. T. Nucl. Acids Res., 1979, v. 7, № 7, p. 1955–1964.
15. Sood A. K., Narang S. A. Nucl. Acids Res., 1977, v. 4, № 8, p. 2757–2765.
16. Gait M. J., Popov S. G., Singh M., Titmas R. C. Nucl. Acids Res., Symp. Ser., 1980, № 7, p. 243–257.
17. Köster H., Cramer F. Liebigs Ann. Chem., 1974, № 6, p. 946–958.
18. Gait M. G., Sheppard R. C. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 26, p. 8514–8516.
19. Finnegan W. G., Herry R. A. J. Org. Chem. 1959, v. 24, № 10, p. 1565–1567.
20. Jay E., Bambara R., Padmanabhan R., Wu R. Nucl. Acids Res., 1974, v. 1, № 1, p. 331–353.

Поступила в редакцию
11.VIII.1981
После доработки
19.X.1981

OLIGODEOXYNUCLEOTIDE SYNTHESIS ON A POLYSTYRENE SUPPORT
BY THE PHOSPHOTRIESTER METHOD

SINYAKOV A. N., LOMAKIN A. I., YAMSHCHIKOV V. F., POPOV S. G.

*All-Union Research Institute of Molecular Biology,
Glavmicrobioprom, Novosibirsk*

A scheme of oligodeoxyribonucleotide synthesis on a polystyrene support has been developed which makes possible automation of the process. The procedure allows to prepare oligodeoxyribonucleotides of 9–12 units rapidly and in good yields (53–75% per coupling step). The elongation of oligonucleotide chain was carried out both in 3'-5'- and 5'-3'-directions with mono- and dinucleotides by the phosphotriester approach using mesitylenesulphonyltetrazole as a coupling reagent.