



УДК 577.143.6:577.152.31*27'17

СТУПЕНЧАТЫЙ СИНТЕЗ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

XXXIII. ИММОБИЛИЗАЦИЯ РИБОНУКЛЕАЗ T_1 И T_2
И ИХ СИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Соболева Н. А., Хабарова М. И., Женодарова С. М.

Институт биологической физики Академии наук СССР,
г. Пущино Московской обл.

Получены препараты малоспецифичной рибонуклеазы T_2 и гуанилспецифичной рибонуклеазы T_1 , ковалентно связанных с СМ-целлюлозой. Имобилизация практически не изменяет синтетической активности рибонуклеаз: рибонуклеаза СМ- T_2 так же мало активна в синтезе, как и нативный фермент, а СМ- T_1 , как и исходная рибонуклеаза T_1 , — весьма эффективный катализатор в синтезе олигорибонуклеотидов, пригодный для многократного использования в препаративных масштабах.

Ранее мы описали получение иммобилизованных препаратов малоспецифичной рибонуклеазы *Penicillium brevicompactum* [1] и гуанилспецифичной рибонуклеазы *Bacillus intermedius* [2] и их применение в олигорибонуклеотидном синтезе. Для расширения возможностей препаративного синтеза олигорибонуклеотидов и изучения влияния ковалентного связывания рибонуклеаз с полимерным носителем на их свойства в настоящей работе мы провели иммобилизацию двух других ферментов — малоспецифичной рибонуклеазы T_2 (КФ 3.1.27.1) и гуанилспецифичной рибонуклеазы T_1 (КФ 3.1.27.3) — и изучили свойства иммобилизованных препаратов. Полимерной матрицей при иммобилизации обоих ферментов служила СМ-целлюлоза, хорошо зарекомендовавшая себя в предыдущих работах [1, 2]. Присоединение ферментов к носителю проводили также уже применявшимся нами азидным методом [1, 2], т. е. в связывании фермента с полимером должны были участвовать N-концевая α -аминогруппа и/или ϵ -аминогруппы остатков лизина.

В табл. 1 приведены сведения о количестве лизиновых остатков в иммобилизованных нами рибонуклеазах: большое число остатков лизина характерно для малоспецифичных рибонуклеаз и существенно меньшее — для гуанилспецифичных ферментов. Тем не менее в работах [1, 2] более эффективно связывалась с полимерной матрицей рибонуклеаза *B. intermedius* (в составе которой лизиновых остатков приблизительно в 4 раза меньше), чем рибонуклеаза *P. brevicompactum* (47 и 27% соответственно).

В настоящей работе нами установлено, что рибонуклеаза T_2 , близкая по молекулярной массе рибонуклеазе *P. brevicompactum* и имеющая еще большее число лизиновых остатков, существенно менее эффективно взаимодействует с азидом СМ-целлюлозы: менее 1% исходной активности прочно связывается с носителем (табл. 2).

Исходная рибонуклеаза T_2 имеет низкую синтетическую активность, которая практически не зависит ни от условий проведения синтеза нуклеотидов (рН и температуры), ни от структуры субстратов (табл. 3). Попытка «расшевелить» фермент связыванием его с полимерным носителем не привела к желаемому результату: синтетическая активность рибонуклеазы СМ- T_2 оказалась такой же низкой, как и нативной рибонуклеазы T_2 (табл. 3). Недоступность многочисленных лизиновых остатков рибонуклеазы T_2 для контакта с азидными группами СМ-целлюлозы, проявившаяся

Сокращения: СМ-рибонуклеаза — рибонуклеаза, ковалентно связанная с СМ-целлюлозой; СМ- T_1 , СМ- T_2 — иммобилизованные на СМ-целлюлозе рибонуклеазы T_1 и T_2 .

Содержание лизина в рибонуклеазах, использованных для иммобилизации

Рибонуклеаза	Число остатков лизина на 1 моль белка	Литература
<i>Penicillium brevicompactum</i>	19	[3]
<i>Bacillus intermedius</i> *	5	[4]
<i>Aspergillus oryzae</i> T ₂	23	[5]
<i>Aspergillus oryzae</i> T ₁	1	[6]

* Иммобилизацию проводили совместно с кафедрой микробиологии Казанского государственного университета [2].

Таблица 2

Связывание рибонуклеазы T₂ с СМ-целлюлозой

Фермент, ед. акт.*	Гидразид СМ-целлюлозы, мг	Объем реакционной смеси, мл	t, °C	Время, ч	Связанный фермент, % по активности	Уд. акт., ед. акт./мг сорбента	Фермент, оставшийся в растворе после связывания, ед. акт.*
2000	300	3	20	2	0,19	0,013	1200
1875 **	200	0,6	20 0	2 18	0,64	0,06	1752

* Единица активности — количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль А>р за 1 мин при рН 6,3 и 37° С.

** Иммобилизацию проводили в 0,1 М фосфатном буфере, рН 8,5. В первом случае в качестве буферной системы использовали 0,1 М раствор солянокислого триэтаноламина в 0,01 М CaCl₂, рН 8,5.

Таблица 3

Синтез динуклеозидофосфатов, катализируемый рибонуклеазой T₂

Исходный состав: [N>р] = 0,25 М; [N'] : [N>р] = 3; РНКазы T₂ = 13,5 ед. акт/мл

Донор фосфата N>р	Акцептор фосфата N'	рН	Температура, °C	Время, ч	Выход, %
A>р	С	4,6	0	72	3
A>р	С	6,3	0	72	5
A>р	С	8,0	0	72	5
A>р	С	6,3	37	2	5
С>р	С	6,3	37	2	3
U>р	С	6,3	37	1,5	2
G>р	С	6,3	37	5	6
G>р	U	6,3	37	1	6
A>р*	С	6,3	37	5	5

* Синтез проведен с рибонуклеазой СМ-T₂ (20 мг/мл).

ся в чрезвычайно низкой степени связывания ее с полимерной матрицей, по-видимому, свидетельствует о том, что молекула фермента имеет довольно компактную и жесткую третичную структуру, не изменяющуюся, по крайней мере в районе активного центра, в процессе иммобилизации.

Молекула рибонуклеазы T₁ может взаимодействовать с азидными группами СМ-целлюлозы α-аминогруппой N-концевого остатка аланина и ε-аминогруппой единственного остатка лизина-41, расположенного рядом с гистидином-40, который входит в активный центр фермента. Так как при модификации этих групп в большинстве случаев активность фермента сохраняется [7], нерастворимые в воде производные рибонуклеазы T₁ получали, используя азидный метод [8] или активировав полисахаридную матрицу (сефадекс, сефарозу) бромцианом [9]. Связывание рибонуклеазы T₁ с СМ-целлюлозой азидным методом впервые было проведено примерно 20 лет назад [10], но свойства рибонуклеазы T₁, ковалентно связанной с СМ-целлюлозой, и ее применение описаны не были.

Связывание рибонуклеазы T₁ с СМ-целлюлозой

Номер опыта	Фермент, ед. акт. *	Гидразид СМ-целлюлозы, мг	Объем реакционной смеси, мл	t, °C	Время, ч	Связанный фермент, % по активности	Уд. акт. СМ-T ₁ , 10 ⁻³ . ед. акт./мг сорбента	Фермент, оставшийся в растворе, ед. акт.
1	69	200	5	18	2	2	6	54
2	39	200	6	0	3,5	2,5	5	32
3	32	200	12	18	3	2,5	4	28
4	28	1000	18	18	3	12,5	3,5	22,5
5	22,5 **	200	2,5	0	15	5	5,5	21

* Единица активности — количество фермента, расщепляющее 1 мкмоль G>p за 1 мин при pH 7,0 и 37° С.

** Иммунизацию проводили в 0,1 М фосфатном буфере, pH 8,5; в остальных случаях использовали в качестве буферной системы 0,1 М раствор солянокислого триэтанолamina в 0,01 М CaCl₂, pH 8,5.

В табл. 4 приведены результаты связывания рибонуклеазы T₁ с СМ-целлюлозой, полученные в нашей работе. Разбавление исходного раствора рибонуклеазы T₁ и снижение содержания азида СМ-целлюлозы в суспензии при проведении иммобилизации (см. опыты 1—3) не уменьшают количество фермента, связанного с матрицей, при небольшом изменении удельной активности получающегося препарата. Дальнейшее разбавление раствора фермента при увеличившемся содержании азида (опыт 4) заметно увеличило связывание фермента, но удельная активность иммобилизованного препарата снизилась. Уменьшение концентрации исходного раствора в случае рибонуклеазы T₂ (см. табл. 2) сопровождалось снижением как связывания, так и удельной активности.

Сравнивая синтетическую активность полученных препаратов СМ-T₁ (рис. 1), мы нашли, что для препаратов 1, 2 и 5 она примерно одинакова, несколько меньше для препарата 3 и еще ниже для препарата 4. Поэтому все дальнейшие исследования были проведены на препаратах 1 и 5.

Мы изучили стабильность рибонуклеазы СМ-T₁, проверяя прочность связывания фермента с матрицей (табл. 5) и возможность его многократ-

Таблица 5

Состав реакционной смеси при синтезе GrC в присутствии СМ-T₁

Исходный состав: [G>p] = 0,02 М; [C]/[G>p] = 25; [СМ-T₁] = 20 мг/мл, pH 7,0

Время инкубации, ч	Содержание в смеси, %		
	GrC	G>p	Gr
2	40,5	48,9	10,9
20 *	42,1	49,1	8,8

* Дополнительная инкубация после отделения рибонуклеазы СМ-T₁.

Таблица 6

Состав реакционной смеси (%) при синтезе GrC в присутствии рибонуклеазы СМ-T₁ в разных концентрациях [G>p]₀ = 0,02 М, [C]₀/[G>p]₀ = 25; 0° С, 1 ч, pH 7,0

СМ-T ₁ , мг/мл	GrC	Gr	G>p
10	13	16	71
30	18	16	66
60	31	11	58
90	31	14	55
120	30	17	53

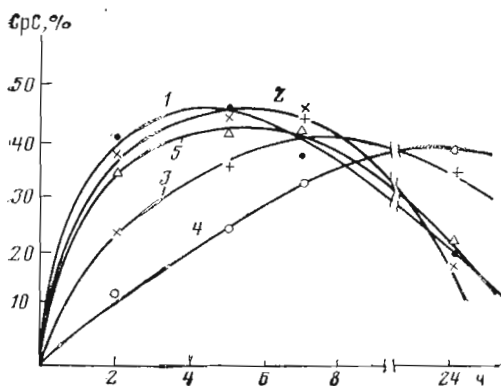


Рис. 1

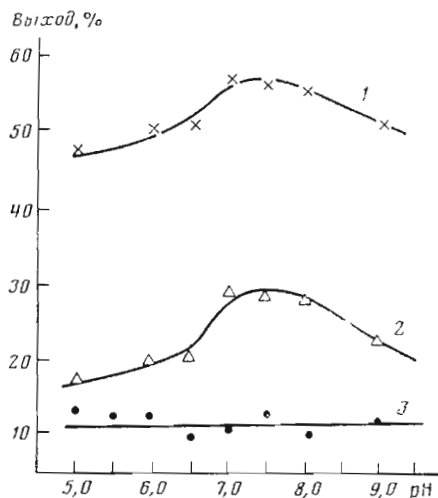


Рис. 3

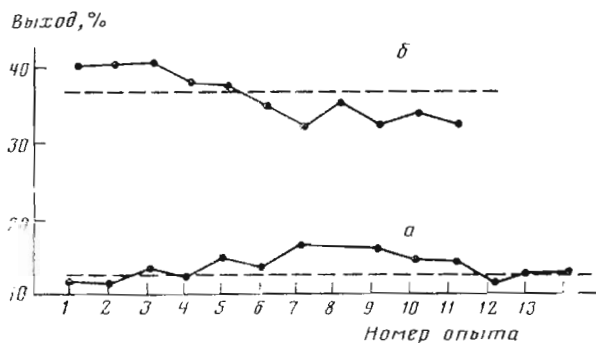


Рис. 2

Рис. 1. Синтетическая активность препаратов 1-5 рибонуклеазы $SM-T_1$ (см. табл. 4). $[G>p]=0,02$ М; $[C]/[G>p]=25$; $SM-T_1 - 30$ мг/мл

Рис. 2. Изменение выхода продукта при многократном использовании препарата $SM-T_1$ в гидролизе $G>p$ (а) и синтезе GrC (б)

Рис. 3. pH-Зависимость синтетической и гидролитической активности $SM-T_1$: содержание GrC (1) и Gr (2) в реакционной смеси при синтезе GrC ($[G>p]=0,02$ М; $[C]/[G>p]=25$; $SM-T_1 - 14$ мг/мл; $\sim 0^\circ C$; 17 ч); содержание Gr (3) в реакционной смеси при гидролизе $G>p$ ($[G>p]=0,02$ М; $SM-T_1 - 10$ мг/мл; $37^\circ C$; 6 ч)

ного использования (рис. 2). Как видно из приведенных данных, рибонуклеаза T_1 в описанных условиях прочно связывается с SM -целлюлозой, не переходя в раствор при достаточно продолжительном инкубировании с субстратами и не теряя активности при многократном (более 10 раз) использовании одного и того же образца. Некоторое снижение выхода GrC после 5-кратного применения препарата связано с механическими потерями фермента.

Изучая зависимость синтеза GrC в присутствии рибонуклеазы $SM-T_1$ от pH (рис. 3), мы установили, что изменение pH в пределах 5,0-9,0 мало сказывается на максимальном выходе динуклеозидмонофосфата, который за 17 ч составляет 50-55% в указанных пределах pH, хотя область pH 7,0-8,0 несколько более предпочтительна. Гидролиз $G>p$ рибонуклеазой $SM-T_1$ также наиболее интенсивен при pH 7,0-8,0 (рис. 3, 3), что совпадает с оптимумом pH гидролитической активности нативного фермента (7,5), определенным по расщеплению РНК [7]. Присутствие цитидина в качестве акцептора фосфата при синтезе GrC снижает степень гидролиза $G>p$ (рис. 3, 2), как и в случае нативных рибонуклеаз [11].

Таблица 7

Состав реакционной смеси (%) при синтезе ГрС
в зависимости от времени

Условия как в табл. 6; [СМ-Т₁] = 60 мг/мл

Компоненты реакционной смеси	Время, ч					
	0,5	1	2	6	7	72
ГрС	17	29	42	48	41	24
Гр	17	19	17	17	19	37
G>p	66	52	40	34	40	39

Таблица 8

Гидролиз G>p и синтез ГрС на колонке с СМ-Т₁ (2×20 мм)
при скорости 7,8 мл/ч

Начальная концентрация G>p, М *	Превращение G>p, %		
	при гидролизе Гр	в синтезе *	
		ГрС	Гр
0,2	—	16	9
0,02	21	11–14	9–11
0,02	—	15 **	9 **
0,02	—	11 ***	19 ***
0,01	21	—	—
0,005	16	—	—
0,004	—	8	9
0,002	—	6	13

* В синтезе [С]/[G>p] = 2%.

** Синтез проводили при 0°С, в остальных случаях при 20°С.

*** Высота столба 105 мм, скорость 1 мл/ч.

Таблица 9

Синтез ГрУрС в присутствии рибонуклеазы СМ-Т₁

[G>p], М	[УрС]/[G>p]	СМ-Т ₁ , мг/мл	Время, ч	Выход, %	Возврат, %	
					УрС	G>p
0,02	10	10	22	25	75	50
0,0095	8	Слой *	2	9	75	80

* См. «Экспериментальную часть».

Для использования образцов СМ-Т₁ в препаративном олигонуклеотидном синтезе необходимо было найти оптимальную «концентрацию» * фермента. В табл. 6 приведены результаты, полученные с различными количествами СМ-Т₁; начиная с «концентрации» 60 мг/мл выход ГрС, достигнутый за 1 ч, остается постоянным; изучение зависимости выхода ГрС от времени для этого случая (табл. 7) показало, что максимальный выход ГрС может быть получен за 6 ч при довольно интенсивном расщеплении G>p.

При значительно более высоком отношении количества фермента в инкубационной смеси и начальной концентрации субстратов, которое устанавливается, если раствор субстрата пропускать через колонку, наполненную ферментным препаратом, результаты, как и при проведении реакции в растворе, зависят от начальной концентрации субстратов, времени контакта с ферментом и т. п. (табл. 8). За время, меньшее 1 мин, можно в описанных условиях получить выход ГрС ~ 15%. При уменьшении ско-

* В этом случае речь идет по существу об оптимальной навеске или, точнее, об оптимальном соотношении навески фермента и начальной концентрации субстратов, так как реакционная смесь представляет собой периодически перемешиваемую гетерогенную систему (суспензию).

рости пропускания (увеличении времени контакта смеси субстратов с ферментом) заметно увеличивается содержание Gr. Если задержать смесь субстратов на колонке, то через 15 мин элюат содержит 18 и 22%, а через 30 мин — 12 и 38% GrC и Gr соответственно.

Полимер, содержащий фермент, в некоторых случаях удобнее помещать в воронку со стеклянным фильтром и пропускать через этот слой смесь субстратов. Этот способ мы применили для получения тринуклеозиддифосфата GrUpC, одного из ключевых блоков, необходимых нам при синтезе аналогов фрагментов D-ветви дрожжевой валиновой tРНК, [12]. При добавлении к смеси субстратов (G>r и UpC), растворенных в 0,01 М фосфатном буфере, рибонуклеазы SM-T₁ через сутки можно получить GrUpC с выходом 25% (табл. 9). Медленно пропуская раствор тех же субстратов через слой рибонуклеазы SM-T₁ толщиной 0,5 см, помещенный на фильтр диаметром ~10 мм, за 2 ч получили GrUpC с выходом ~9%, при этом >80% G>r и ~75% UpC могут быть повторно использованы в реакции.

Таким образом, для препаративных целей иммобилизованный фермент можно упаковывать в колонку или помещать его в виде слоя различной толщины в воронку со стеклянным фильтром и использовать его многократно.

Продукты синтеза (GrC и GrUpC), а также исходные соединения G>r, C и UpC, регенерируемые из реакционных смесей, идентифицировали стандартными способами, комбинируя электрофорез и хроматографию на бумаге, УФ-спектрофотометрию, а также определяя нуклеотидный состав для олигонуклеотидов [13].

Экспериментальная часть

В работе использовали натриевые соли 2', 3'-циклофосфатов адепозина, цитидина, уридина (Reanal, Венгрия), циклогексилгуанидиниевую соль гуанозин-2', 3'-циклофосфата (Calbiochem, США) и аммониевую соль 2', 3'-циклофосфата гуанозина, которую получали из циклогексилгуанидиниевой соли обработкой дауксом 50 W (NH₄⁺-форма), а также рибонуклеазы T₁ и T₂ (Sankyo, Япония). UpC был синтезирован как описано в работе [14].

Хроматографию в системе этанол — изопропанол — аммиак — вода (60 : 5 : 10 : 25) и электрофорез в 0,05 М ТЕАВ (рН 7,6) проводили на бумаге FN-1 и FN-2 (Filtrak, ГДР).

Связывание рибонуклеаз T₁ и T₂ с SM-целлюлозой. Гидразид SM-целлюлозы (получение см. [1]) суспендировали в 0,5 н. HCl, охлажденной до 0° С, и при перемешивании по калям в течение 20 мин добавляли 5% раствор NaNO₂. Перемешивание при 0° С продолжали еще 20 мин. Осадок отфильтровывали, промывали ледяной водой и добавляли к раствору рибонуклеазы в 0,1 М триэтанолламин-HCl-буфере, содержащем 0,01 М CaCl₂ (рН 8,5), или в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,5). Смесь перемешивали при ~20° С и/или при 0° С (продолжительность перемешивания указана в табл. 2 и 4), после чего осадок отфильтровывали, промывали небольшим количеством того же буфера, объединяя промывные воды с первым фильтратом, затем промывали 100 мл этого же буфера, 100 мл 0,1 М фосфатного буфера (рН 8,0), 100 мл 0,1 М NaCl и, наконец, водой до отрицательной реакции на Cl⁻-ионы. Осадок лиофилизovali. Результаты приведены в табл. 2 и 4.

Гидролиз G>r рибонуклеазой SM-T₁. 1,1 мг (2 мкмоль) G>r (циклогексилгуанидиниевая соль) и 2 мг SM-T₁ (5,5·10⁻³ ед. акт./мл) в 0,1 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0) инкубировали 30 мин при 37° С, затем центрифугировали (4000—5000 об/мин), супернатант отбирали шприцем и анализировали электрофорезом. Оставшийся в пробирке фермент промывали водой (5×0,7 мл), центрифугировали. К промытому ферменту вновь добавляли 1,1 мг G>r в 0,1 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0) и т. д. Результаты представлены на рис. 2. При исследовании рН-зависимости применяли следующие буферные растворы: 0,01 М ацетатный бу-

фер — рН 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 0,01 М фосфатный буфер — рН 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0.

Синтез динуклеозидмонофосфатов, катализируемый рибонуклеазами. Раствор нуклеозид-2', 3'-циклофосфата и нуклеозида в буфере инкубировали при 0 или 37° С. В синтезах с рибонуклеазой Т₁ использовали буферные растворы, перечисленные выше, а в опытах с рибонуклеазой Т₂ (табл. 3) — 0,1 М ацетатный (рН 4,6), 0,1 М фосфатный (рН 6,3 и 8,0). Начальные концентрации субстратов и фермента, а также продолжительность инкубирования приведены в табл. 3, 5, 7. Пробы из реакционной смеси наносили на бумагу и анализировали электрофорезом на бумаге и УФ-спектрофотометрией.

Гидролиз G>p и синтез GrC на колонке с рибонуклеазой CM-T₁. Колонку из стекла диаметром ~2 мм заполняли суспензией рибонуклеазы CM-T₁ в воде, после чего фермент в колонке промывали водой и 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,0. Раствор субстратов определенной концентрации (см. табл. 8) засасывали шприцем в шланг-«контейнер», присоединяли к колонке и резервуару с водой и пропускали через слой фермента. Скорость пропускания регулировалась высотой слоя и высотой, на которой устанавливали резервуар. Результаты приведены в табл. 8.

Синтез GrUpC.* Раствор G>p (циклогексилгуанидиниевая соль) и UpC в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,0) инкубировали с рибонуклеазой CM-T₁ при 0° С. Начальные концентрации субстратов и фермента и продолжительность инкубирования приведены в табл. 9. Реакционную смесь после отделения фермента разделяли, комбинируя хроматографию и электрофорез на бумаге. В препаративном опыте раствор 300 мкмоль UpC и 38 мкмоль G>p в 4 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,0) в течение 2 ч пропускали через слой CM-T₁ высотой ~0,5 см, помещенный на стеклянный фильтр № 2 (диаметр 1 см) при ~20° С. После промывания слоя CM-T₁, 4 мл того же буфера и 5 мл воды суммарный фильтрат упаривали в вакууме, остаток наносили на хроматографическую бумагу и выделяли GrUpC, G>p и UpC, комбинируя хроматографию и электрофорез. Результаты см. в табл. 9.

ЛИТЕРАТУРА

1. Женодарова С. М., Соболева И. А., Хабарова М. И., Ежов В. А., Приходько А. Г. Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 5, с. 736–742.
2. Шарипова Ф. Р., Балабан Н. П., Рязанов С. М., Лецинская И. Б., Хабарова М. И., Женодарова С. М. Биоорган. химия, 1983, т. 9, № 4, с. 505–510.
3. Грищенко В. М., Крупяко В. И., Ильина Т. В., Безбородова С. И. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1973, № 1, с. 123–125.
4. Афанасенко Г. А., Дудкин С. М., Каминир Л. Б., Северин Е. С., Голубенко И. А. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 2, с. 182–202.
5. Uchida T. J. Biochem., 1966, v. 60, № 2, p. 115–132.
6. Takahashi K. J. Biochem., 1962, v. 51, № 2, p. 95–108.
7. Takahashi K., Moore St. In: Enzymes/Ed. Boyer P. D. N. Y.—L.: Acad. Press, 1982, v. XVb, p. 435–468.
8. Ito H., Nagivara M., Takahashi K., Ishikizaki I. J. Biochem., 1977, v. 82, № 3, p. 877–883.
9. Lee J. C. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 235, № 3, p. 435–441.
10. Kuriyama Y., Egami F. Seikagaku, 1966, v. 39, p. 735–740.
11. Седелникова Э. А. Модифицированные субстраты в ферментативном синтезе динуклеозидмонофосфатов. Канд. дис. ... хим. наук. М.: МГУ, 1974.
12. Женодарова С. М., Клягина В. П., Седелникова Э. А., Хабарова М. И. Молекулярн. биология, 1984, т. 18, № 5, с. 1181–1193.
13. Jenodarova S. M., Habarova M. J. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 195, p. 1–3.
14. Кавуценко А. И., Калачева Т. Н., Тихомирова-Сидорова И. С. Биохимия, 1974, т. 39, № 4, с. 839–844.

Поступила в редакцию
27.VII.1984
После доработки
23.XI.1984

* Синтез выполнен О. А. Смоляниновой.

STEP-WISE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS. XXXIII. IMMOBILIZATION
OF RIBONUCLEASES T₁ AND T₂ AND THEIR SYNTHETIC ACTIVITIES

SOBOLEVA I. A., KHABAROVA M. I., ZHENODAROVA S. M.

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow region*

Preparations of ribonucleases T₁ and T₂ covalently bound to CM-cellulose (CM-T₁ and CM-T₂) have been prepared for studying the influence of the enzymes immobilization on their synthetic activities. RNase T₂ containing 23 lysine residues reacts with azide groups of CM-cellulose very poorly, whereas RNase T₁ containing only one lysine residue binds much more effectively. The enzyme immobilization does not practically change their synthetic activities CM-T₂ has as low synthetic activity as native RNase T₂, while CM-T₁ is as highly effective in oligonucleotide synthesis as the native enzyme. CM-T₁ can be used repeatedly for preparative synthesis of oligoribonucleotides if packed in the column or placed in the form of varying thickness as a layer of various thickness in a sintered glass filter.