

化学工業とバイオテクノロジー（上）

R&Dレポート No.26

化学工業とバイオテクノロジー(上)

昭和57年4月19日発行 定価 70,000円(上・下巻 2冊組)

編集人兼
発行人—— 檜 垣 寅 雄

発行所—— 株式会社 シーエムシー
東京都千代田区内神田1-11-13(楠本ビル)
☎ (03)293-2061(代)

発売元—— 株式会社 ジ ス ク
東京都千代田区内神田1-17-1(橋本ビル)
☎ (03)293-7051(代)
大阪市北区西天満4-7-10(昭和ビル)
☎ (06)364-7571

印刷所—— 桂 印 刷 製本所—— 前 田 紙 工

〈禁無断転載〉

落丁・乱丁本はお取替えいたします。

内 部 交 流

F196/99 (H2-8/245-上)

化学工業与生物工程 (上)

B000240

はじめに

“21世紀最大の技術革新”——バイオテクノロジーはあらゆる産業にかつてない衝撃を与え、これを制するものが産業界の頂点に立つといわれるほど、今後の方向性が注目されている。

バイオテクノロジーは今、始動をはじめたばかりである。しかし、その技術進歩のスピードは目をみはるものがあり、楽観的な夢として考えられていた予測をはるかに越え、ここ数年間が21世紀の命運を決するといっても過言ではないだろう。

バイオテクノロジーはインターフェロン、インシュリンなどの生産を中心とするメディカルな分野の展開から、今後は無肥料農産物など、農業への応用も着実に研究されてきている。

本書は“化学工業がいかにバイオテクノロジーを利用してゆくべきか”に焦点を当て、産業界を代表する第一線の研究者が執筆し、編集したものである。

本書は上、下巻で構成されており、上巻では特に遺伝子操作をとりあげ、実際の手法と応用技術を詳細に解説し、その周辺特許についても触れた。

下巻では微生物の改良、細胞融合、動・植物の組織培養ならびにタンパク質のマイクロ分析を網羅し、最後に化学工業が期待する遺伝子工学についてまとめたものである。

3兆円とも5兆円ともいわれるバイオテクノロジーによる市場規模に全産業が期待を寄せている現在、その技術と応用についてこれほど詳細にまとめた類書は皆無であると自負している。本書が関連業界の座右の書となれば幸甚である。

1982年4月

シーエムシー編集部



執筆者一覧（執筆順）・上巻

京都大学工学部石油化学科	清水 剛夫
大阪大学薬学部薬学科	岡崎 光雄
理化学研究所微生物学研究室	穴戸 和夫
筑波大学生物科学系	大島 靖美
大阪市立大学理学部生物学科	古沢 満
東レ㈱基礎研究所	小林 茂保
湧永薬品㈱中央研究所	三好 健一
京都大学食糧科学研究所	村田 幸作
〃	木村 光
国立遺伝学研究所分子遺伝部	篠崎 一雄
名古屋大学理学部生物学教室	吉田 和夫
九州大学医学部生化学教室	高木 康敬
〃	木村 彰方
東京大学農学部農芸化学科	丸山 芳治
京都大学化学研究所	左右田 健次
㈱住化技術情報センター	寺田 裕

目 次

第 1 章 遺伝子操作と遺伝子工学

清水 剛夫

1

第 2 章 遺伝子化学と遺伝子工学

清水 剛夫

1. はじめに.....	7	2.5 その他の方法.....	15
2. オリゴヌクレオチドの化学合成.....	8	3. オリゴヌクレオチドの酵素による結合.....	17
2.1 オリゴヌクレオチドの構造と化学合成法.....	8	3.1 DNAの合成.....	17
2.2 縮合剤.....	10	3.2 RNAの合成.....	19
2.3 保護基.....	12	4. おわりに.....	21
2.4 固相合成法.....	14		

第 3 章 遺伝子操作実際の手法

1. 有用微生物の選定 岡崎 光雄...	23	ングリコール二層分配法.....	42
1.1 はじめに.....	23	2.4.2 Greene らの方法.....	43
1.2 大腸菌系.....	24	2.4.3 Bickle らの方法.....	45
1.3 枯草菌系.....	27	3. DNAの取り出し 大島 靖美...	49
1.4 酵母菌系.....	28	3.1 はじめに.....	49
1.5 <i>Pseudomonas</i> 菌系.....	29	3.2 動物からのDNAの分離・精製...	49
1.6 放線菌系.....	32	3.2.1 実験法 1 ; ラット肝臓から	
1.7 おわりに.....	33	の高分子DNA分離・精製...	49
2. 制限酵素の分離 矢野 和夫...	38	3.3 大腸菌の組み換えファージおよびプラスミドDNAの分離・精製...	51
2.1 はじめに.....	38	3.3.1 実験法 2 ; Charon 4 A または λ gtWES をベクターとする組み換えファージ DNA の分離・精製.....	51
2.2 制限酵素の分類.....	38	3.3.2 実験法 3 ; pBR322 をベ	
2.3 制限酵素活性測定法 (ゲル電気泳動法).....	40		
2.4 制限酵素の分離精製方法.....	42		
2.4.1 デキストラン-ポリエチレ			

I

39208

クターとする組み換えプラ スミドDNAの分離・精製…	53	4.4 ジフテリア毒素を使って細胞に 注射される溶液の量を測定する…	58
4. クローン化遺伝子の真核細胞への導入 古沢 清…	56	4.5 インジェクトスコープの構造…	60
4.1 はじめに…	56	4.5.1 I型…	60
4.2 遺伝子の核内注射によってどの ようなことが明らかにされるか…	56	4.5.2 II型…	61
4.2.1 基礎研究…	56	4.6 注射の手順…	62
4.2.2 応用研究…	56	4.6.1 マイクロピペットの作製と 注射液の充填…	62
4.3 DNA(遺伝子)を真核生物の 核内に導入する方法…	57	4.6.2 注射の手順…	62
4.3.1 ウイルスをベクターに用い る方法…	57	4.7 ブリッキング(Pricking)法 …	63
4.3.2 精製DNAの添加による動 物細胞の形質転換…	57	4.8 ブリッキング法の定量性とその メカニズム…	64
4.3.3 小胞にDNAを封じ込み細 胞と融合させる方法…	57	4.8.1 定量性の検討…	64
4.3.4 細い注射針を使って直接D NAを核内に注射する方法…	58	4.8.2 ブリッキングのメカニズム…	66
		4.9 ブリッキングによる組み換えプ ラスミドpBR322の培養細胞 の核への注入…	66
		4.10 おわりに…	68

第4章 遺伝子操作応用技術

1. インターフェロン 小林 茂保…	71	1.2.7 ヒト・インターフェロンの 臨床応用化…	75
1.1 はじめに…	71	1.2.8 ヒト・インターフェロンの 量産問題…	76
1.2 インターフェロンについての基礎…	71	1.3 遺伝子操作技術の導入…	76
1.2.1 インターフェロンとは…	71	1.3.1 ヒト・インターフェロンc DNAのクローン化…	76
1.2.2 インターフェロン活性の力価…	72	1.3.2 ヒト・インターフェロンの 遺伝子の大腸菌内での発現…	79
1.2.3 インターフェロンの抗ウィ ルス作用…	72	1.3.3 遺伝子操作技術の有用性…	79
1.2.4 インターフェロンの多面的 作用…	72	1.4 遺伝子操作技術の問題点と今後 の展望…	83
1.2.5 インターフェロンの産生と 種類…	73	1.5 おわりに…	85
1.2.6 インターフェロン産生の仕 組み…	74		

2. 固相法によるセクレチン人工遺伝子の合成	三好 健一	88
2.1 セクレチン人工遺伝子の設計		88
2.2 固相合成のための樹脂の調製		89
2.3 オリゴヌクレオチドの合成		89
2.4 脱保護および精製		92
2.5 セクレチン遺伝子の合成		93
3. 遺伝子組み換えによるグルタチオン生産菌株の育種	村田幸作, 木村 光	97
3.1 はじめに		97
3.2 遺伝子組み換えによるグルタチオン生産菌株の育種		99
3.2.1 Hybrid plasmid の調製		99
3.2.2 Hybrid plasmid pBR322 -gsh I ⁺ の性質		101
3.2.3 pBR322-gsh I ⁺ の RC 912 での self-cloning と GSH-I 活性の強化		102
3.3 おわりに		103
4. フラクシオン I タンパク 篠崎 一雄		106
4.1 はじめに		106
4.2 フラクシオン I タンパクの構造		106
4.3 フラクシオン I タンパクの酵素反応		107
4.4 フラクシオン I タンパクの遺伝子		109
4.5 フラクシオン I タンパクの生合成		110
4.6 フラクシオン I タンパク大サブユニット遺伝子の構造		112
4.7 フラクシオン I タンパク小サブ		

ユニットの構造		120
4.8 分子育種による植物の品種改良の可能性		121
5. 植物生長ホルモンとプラスミド	吉田 和夫	125
5.1 はじめに		125
5.2 オーキシシン		125
5.3 サイトカイニン		128
5.4 ジベレリン, アブサイシン酸, エチレン		129
5.5 おわりに		132
6. インスリン 高木康敬, 木村彰方		134
6.1 はじめに		134
6.2 インスリンの生合成		134
6.2.1 インスリン遺伝子の構造		134
6.2.2 インスリンタンパクの生合成		135
6.2.3 インスリンタンパクの構造		135
6.3 遺伝子操作によるインスリンの合成		137
6.3.1 原核細胞系		137
6.3.2 真核細胞系		140
6.4 おわりに		141
7. 窒素固定 丸山 芳治		143
7.1 窒素固定と農業生産		143
7.2 窒素固定生物		144
7.3 ニトロゲナーゼ		145
7.4 窒素固定遺伝子		145
7.5 窒素固定遺伝子のクローニング		149
7.6 真核生物(酵母)における nif 遺伝子のクローニング		149

第5章 酵素による有機化合物の合成

左右田健次

1. はじめに.....153	3. ビリドキサルリン酸酵素.....165
2. 加水分解酵素を利用した合成.....155	3.1 アスパラギン酸 β -デカルボキ シラーゼ.....167
2.1 プロテアーゼ.....156	3.2 トリプトファナーゼ.....167
2.1.1 生成物難溶系.....157	3.3 トリプトファンシンターゼ.....167
2.1.2 生成物可溶系.....157	3.4 β -チロシナーゼ.....169
2.2 ペニシリンアシラーゼ.....157	3.5 システインデスルフヒドラーゼ...170
2.3 グリコシダーゼ.....158	3.6 メチオニナー-リアーゼ.....170
2.4 リパーゼ.....159	3.7 その他のビリドキサルリン酵素...175
2.5 ホスファターゼ.....159	4. NAD(P)-酵素.....177
2.6 ヒダントイナーゼ.....161	5. その他のアミノ酸合成酵素.....178
2.7 α -アミノ- ϵ -カプロラクタ マーゼ163	6. ATPを用いる酵素的合成.....179
2.8 L-2-アミノチアゾリン-4 -カルボン酸ヒドローゼ.....163	7. おわりに.....181

第6章 遺伝子工学・周辺特許

寺田 裕

1. わが国内外の情勢.....185	3. わが国の企業活動の現状.....189
2. わが国における公開特許の現状.....187	4. おわりに.....191

第1章 遺伝子操作と遺伝子工学

〔清水 剛夫〕

遺伝子操作とその利用による遺伝子工学との結びつきは、微生物レベルでの遺伝学が登場しはじめた1940年代にさかのぼる。これには、かびによるペニシリンの生産が工業的に行われはじめたことが契機となっている。しかし、遺伝子操作が遺伝子工学と積極的に結びついたのは、遺伝子操作がDNAの分子レベルで、その一次構造を任意に変換すること、とくに一次構造における核酸塩基配列を任意にしうる技術が開発されてからである。

遺伝子の本体であるDNAの一次構造は図1.1に示したように、側鎖にデオキシリボースを介して、アデニン(A, adenine)、グアニン(G, guanine)、シトシン(C, cytosine)、チミン(T, thymine)の4種類の核酸塩基がリン酸ジエステル結合により、生物種によって定まった配列をした単純な基本骨格をもつ高分子で、A-T、G-Cの相補的といわれる塩基対を形成して、基本的には図1.2に示すような複合体(ハイブリッド)として存在している。

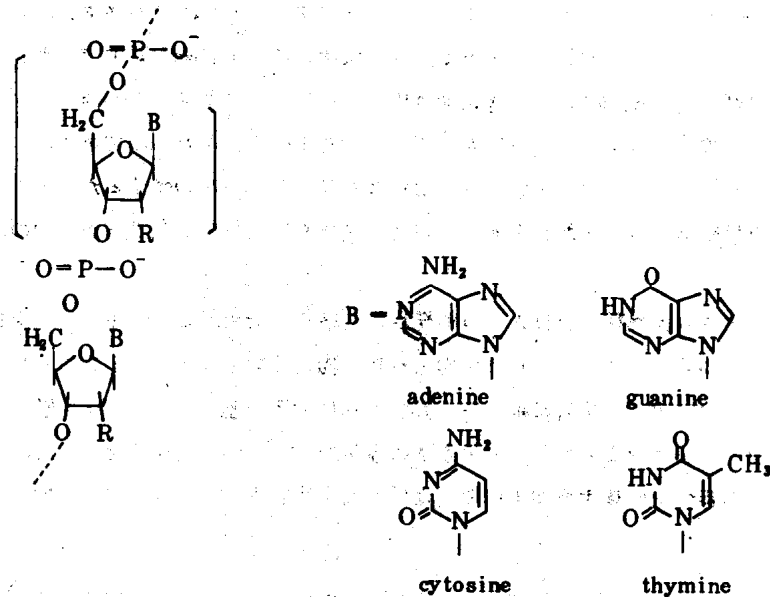
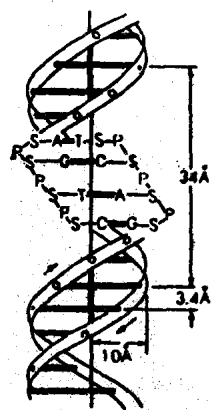


図1.1 DNAの一次構造



S:デオキシリボース
P:リン酸
回っているリボンは糖—
リン酸のバックボーンを
示し、横棒が塩基間の水
素結合、縦棒が二重のら
せんの縦軸を示す。

図 1.2 DNA ハイブリッド
(この図はWatson Crick
によって提示された構造
(B型)を示す)*

遺伝子操作とは、このDNAをとり出して、それを他の生物の遺伝子と試験管の中でつなぎ合わせて、適当な生体へ移すという化学操作をいう。化学操作という言葉を使ったのはこれら一連の操作は、すべて分子のレベルで記述できるからである。したがって、遺伝子操作は、原理的には、天然ではかけ合わすことのできない生物同士の遺伝子の雑種を作ることができ、生物生産を考える場合、革命的な技術といえるのである。

具体的にこれを示してみると次のようになる(詳しいことについては各章で述べられるので、ここでは大筋を述べるにとどめる)。

通常、増殖生物としての宿主には、いくつかの理由から、大腸菌、枯草菌などのバクテリアやサッカロミセス酵母などが用いられている。これらは、サッカロミセス酵母以外はいずれも原核生物である。これらの宿主の中のDNA(これをベクターという)に、異種のDNAをつないで増殖させ、必要な生産物を得ようとするのが遺伝子工業の原点である。

遺伝子操作の一例を原理的に示すと、図 1.3 のようになる。

この図では、挿入しようとする遺伝子を、GAATTCのGとAの間を切断するEco RIという制限酵素で切断して調製する方法を示している。一方、ベクターとしてウイルスやプラスミド(細胞質の中にある小さい環状DNAで、細胞質中で複製し得る)か

らもEco RIで同様の切り出しを行い、さきに切り出したDNAフラグメントを挿入し、異種のDNAフラグメントの挿入された新しいDNAを得る。これを宿主に入れるのである。

宿主に入れられたプラスミドは、主染色体とは別個に存在しながら増殖するが、宿主選択があり、不和合性、自然脱落、コピー数など多くの点で、適当な宿主を定めることが1つの研究課題となっている。

プラスミドに挿入された異種のDNAの情報発現は、宿主の機能による。生物は、染色体が核膜につつまれているか否かによって、真核生物と原核生物に分類される。ヒトをはじめ多くの生物は前者であり、バクテリアは後者に属する。われわれに直接関連するポリアミノ酸であるインシュリンやインターフェロンなどを、大腸菌などの原核生物を用いて生産させるためには、真核生物のもつDNAの特性を原核生物向きに変えなければ、目的とするポリ(アミノ酸)**を得ることができない。

* この他に最近、塩基対が外部に位置した左巻きらせん(Z型)も見出されている。

** ポリペプチドと同義語であるが、タンパクはアミノ酸からできているので、ここではポリ(アミノ酸)とした。

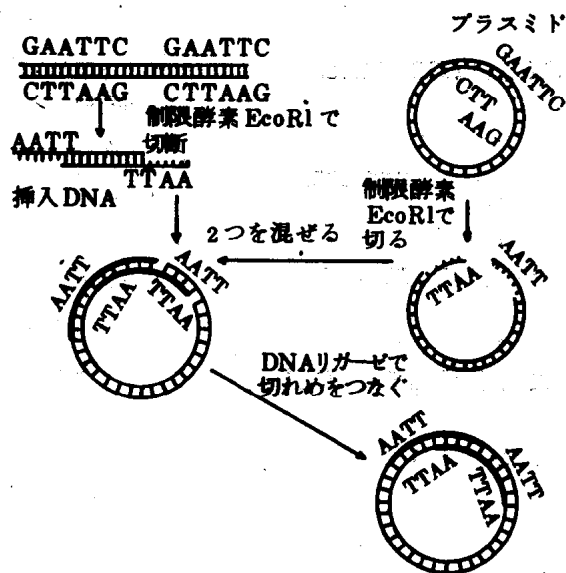


図 1.3 遺伝子操作の模式図

DNA からポリアミノ酸合成には、 $\text{DNA} \rightarrow \text{pre-m-RNA} \rightarrow \text{m-RNA} \rightarrow \text{ポリ(アミノ酸)}^*$ の情報伝達経路をとる。最近の研究^{1), 2)}によると、高等生物の DNA は、大腸菌の 10^3 倍の長さを持ち 10^{12} ダルトンの大きさであるが、ポリ(アミノ酸)をコードしていない部分(イントロン)がコードしている部分(エキソン)と混在していることが示された。したがって、pre-m-RNA には、ポリ(アミノ酸)に対応していない塩基配列をもつ部分があり、これが核膜を通過するとき、はじめて、イントロン部分が切りとられて、ポリ(アミノ酸)に対応する m-RNA ができることになる。この pre-m-RNA から m-RNA のできるときイントロンの切りとりをスプライシングというが、大腸菌や枯草菌のようなバクテリアではこの能力がなく、単細胞ではあるが、真核生物である前述のサッカロミセス酵母では、その能力をもつため注目されつつある。

したがって、原核生物に高等生物の DNA による有用生産を行わせるためには、高等生物のもつ不連続情報 DNA を、原核生物にとっては連続情報となる DNA に変換しなければならないことになる。これには、2つの方法がある。

1つは、目的とするポリ(アミノ酸)のアミノ酸配列が既知の場合、それに対応した塩基配列をもった DNA フラグメントを化学的または酵素的に合成する方法である。たとえば、ヒト・イ

* DNA の塩基の 3 つの配列が、20 種のアミノ酸に対応して、それぞれ pre-m-RNA, m-RNA, ポリ(アミノ酸)のシーケンスを決定している。

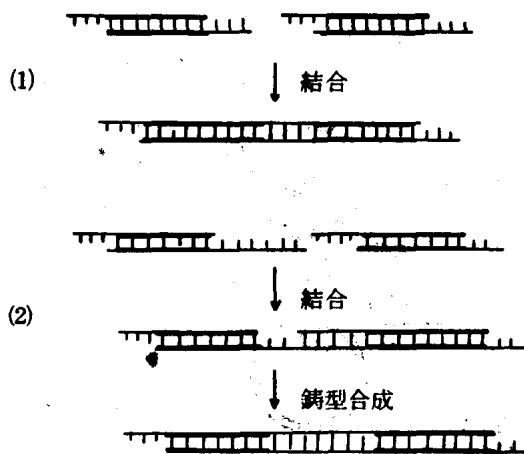


図 1.4 挿入 DNA の合成

インシュリンは、合計 51 のアミノ酸が縮合したものであるが、そのアミノ酸配列は既知であるため、これに対応した 153 の塩基配列の定まった DNA をフラグメントを作ることになる。これには、ノリシロのある短い DNA ハイブリッドを作り、これを後で結合して 153 の塩基配列にする方法がとられる。この場合、ノリシロになる部分は DNA ハイブリッドがつながってゆく場合のガイドの役割 (図 1.4 (1)) と、場合によっては、鋳型の役割 (図 1.4 (2)) を果たす。この原理にもとづき、化学的に合成された DNA によってはじめて

ヒト・インシュリンが生産された³⁾。

もう 1 つの方法は、連続情報をもつサブライズされた m-RNA から、逆転写酵素によって m-RNA と相補的な塩基配列をもつ c-DNA を合成するものである。m-RNA を無傷で取り出す技術が問題となる一方、ポリ (アミノ酸) のアミノ酸配列が明らかである必要は必ずしもない利点もある。

このように、ベクターに対して異種である DNA を取得し、それをベクターに挿入し、これを宿主に入れ、その増殖をはかることにはじまった遺伝子操作の生産技術への利用は、単に、ポリ (アミノ酸) の取得にとどまらず、生物個体の全体を利用しての生産に対してまで展開しつつある。メタノール酸化菌の遺伝子操作によるアミノ酸合成⁴⁾、さらに、空中窒素固定能を有する植物への改良なども検討され、また、化学合成法の転換が遺伝子操作を含んだ生物的方法で予測されている。Genex Corp. と M.I.T. で予測された結果を表 1.1⁵⁾ に抄録する。

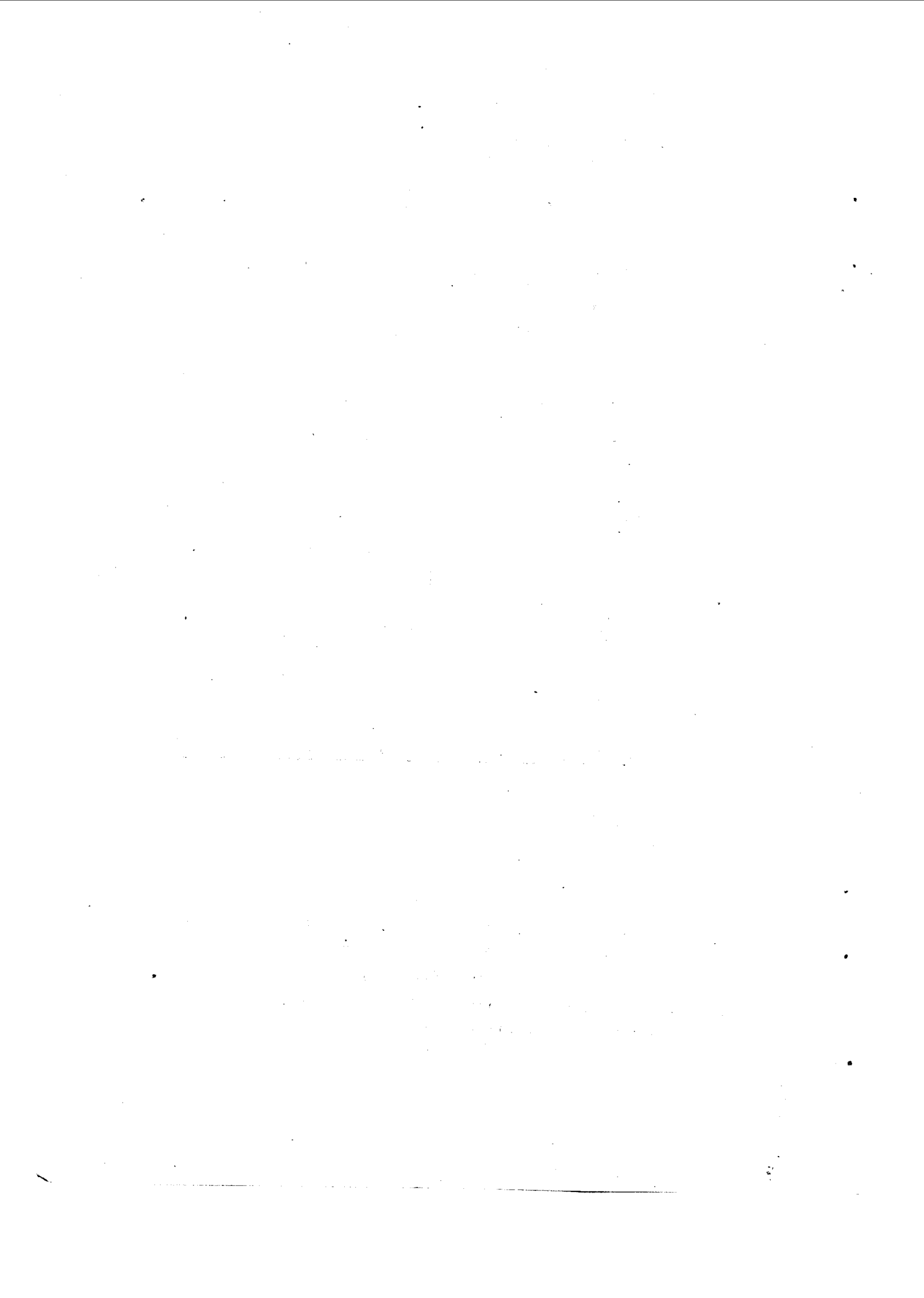
種の本質を決定する遺伝子の人工的変換の可能性を一部実現し利用しつつある遺伝子操作は、複製増殖をする生物を物質生産の手段として利用してきた分野から、生物の物質生産機能の向上と拡大によって、一挙にその範囲を広げてしまった。しかし、多少の修正はあるにしても、表 1.1 に示されるように、すべての化成品がそれにおきかわるものではない。生物には生物のもつ合成条件がある。遺伝子操作という化学原理の確立した今日、その技術的發展と、それを遺伝子工学に結びつけるための、生命現象の多様性の認識を基礎にした合目的な研究ならびに技術展開が望まれる。遺伝子工学とは、生物体のもつ能力を最大に利用する技術といえる。

表 1.1 20 年以内に生物的生産される化成品 (予測)

	Genex Corp.	M.I.T.		Genex Corp.	M.I.T.
アセトアルデヒド		○	酸化エチレン	○	○
酢 酸	○	○	ホルムアルデヒド		○
アセトイン		○	グリニオール		○
アセトン		○	グリセリン	○	○
アセチレン		○	イソブチレン	○	
アクリル酸	○	○	イソブレン		○
アジピン酸	○	○	イソプロパノール		○
アニリン	○		イタコン酸	○	
アスピリン	○		リナロール	○	
安息香酸	○		酢酸リナリル	○	
アジピン酸ビス(2-エ チルヘキシル)	○		メタン	○	
ブタジエン		○	メタノール		○
ブタノール		○	メチルエチルケトン		○
酢酸ブチル		○	アクリル酸メチル		○
ブチルアルデヒド		○	ネロール	○	
桂皮アルデヒド	○		p-アセトアミノフェノール	○	
シトロネラール	○		ペンタエリスリトール	○	
シトロネロール	○		フェノール	○	
クレゾール	○		無水フタル酸	○	
ジヒドロキシアセトン		○	プロピオン酸	○	
フタル酸ジイソデシル	○		プロピレン		○
フタル酸ジオクチル	○		プロピレングリコール	○	○
エタノール	○	○	酸化プロピレン		○
エタノールアミン	○		ソルビン酸	○	
酢酸エチル		○	ソルビトール	○	
アクリル酸エチル		○	ステレン		○
エチレン		○	α-テルピネオール	○	
エチレングリコール	○	○	酢酸 α-テルピニル	○	
			酢酸ビニル		○

文 献

- 1) R. Breathnach, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 4853 (1978).
- 2) A. Dugaiczuk, et al., *ibid.*, 76, 2253 (1979).
- 3) R. Crea, et al., *ibid.*, 75, 5765 (1978).
- 4) J. D. Windass, et al., *Nature*, 287, 396 (1980).
- 5) *Chemical Week*, (March 4), 41 (1980).



第2章 遺伝子化学と遺伝子工学

〔清水 剛夫〕

1. はじめに

遺伝子操作によって、最初に、ヒトのペプチドホルモンであるソマトスタチンが生産されたのは、化学的に合成した DNA を用いてのことである。

今日、核酸の化学合成は長足の進歩をとげ、自動合成装置も汎用の機器として一般に市販されるようになり、鎖長10程度のオリゴマーの合成は1日余りで合成できるようになった。また、一方において、これらを結合する酵素が発見取得され試験管の中で使用されるようになったために、比較的容易に鎖長の長いDNAが得られるようになった*。このようにして化学的手法、酵素的手法を駆使して、任意のシーケンスをもつDNAが合成されるが、さらに、核酸の自己複製を利用して、それを増幅することも可能となる。

DNAのシーケンスは、生産されるペプチドのシーケンスを決定する。この原理は、逆に既知の構造のペプチドを生産する場合において、そのシーケンスを決定するシーケンスをもつDNAフラグメントを取得することが根本であることを示す。この取得方法として2つが考えられる。1つは、生体のもつDNAから、そのシーケンスをもつ部分を特定して選択的に酵素によって切り出すことであり、他の1つは、そのシーケンスのあるDNAを化学的に合成することである。前者の方法では、シーケンスの特定と、選択的に切り出す酵素（制限酵素）の選出とその取得の問題が、切り出しの成否の鍵となっている。これに対し、化学的方法による場合には、任意のシーケンスをもつDNAの合成が原理的に可能である。ここに、核酸の化学合成の重要性がある。鎖長が10程度のシーケンスのあるDNAは、現在では確実に合成される。それ以上の鎖長のものになると、ブロック的に鎖長を延長させてゆく方法がとられることになる。もちろん、これには酵素的手法や化学的手法がとられることになる。したがって、遺伝子組み換えにおいて、化学法によるDNAの合成はますます重要な位置を占めるようになるであろう。

加えて、核酸合成は、遺伝子そのものとしてのDNAばかりではなく、ポリメラーゼのプライマー、合成オペレーター、合成プロモーターなど、いわゆる合成調節因子や、薬物への応用、また、t-RNAやアミノ酸識別、タンパクによる核酸の認識などの生命現象解明のための研究にも欠くことのできない役割を果たすものである。

* 最近、ヒトのインターフェロン- α_1 に対応する514の長さのDNAハイブリッドが合成されている。

2. オリゴヌクレオチドの化学合成

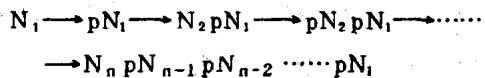
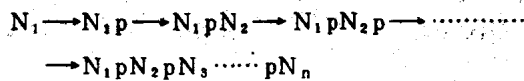
オリゴヌクレオチドの化学合成が、遺伝子組み換え技術において意味をもつようになるのには、どれだけ純粋なオリゴマーが取得できるかにかかっている。

2.1 オリゴヌクレオチドの構造と化学合成法

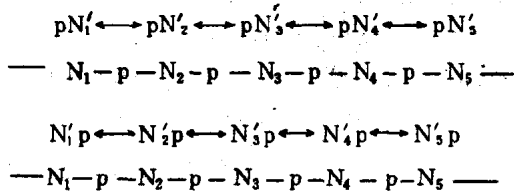
核酸はその基本構造において、デオキシリボ核酸 DNA とリボ核酸 RNA の2つに大別される (図 2.2.1)。前者はデオキシリボヌクレオシドの、後者はリボヌクレオシドの 3'-5' ホスホジエステル結合をもった鎖状高分子である (図 2.2.2)。

オリゴヌクレオチドの合成方法は、次の2つである。すなわち、

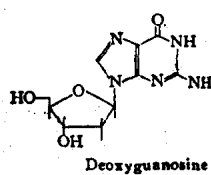
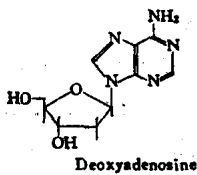
逐次付加型合成方法



鋳型合成方法



主なデオキシリボヌクレオシド



主なリボヌクレオシド

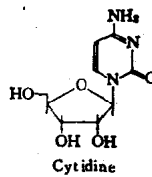
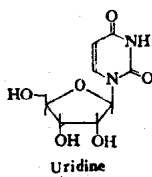
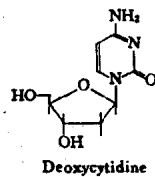
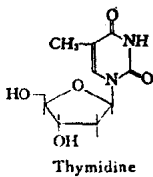
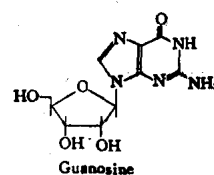
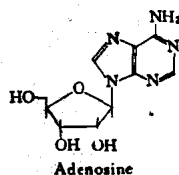


図 2.2.1 主なヌクレオシドの構造と慣用名

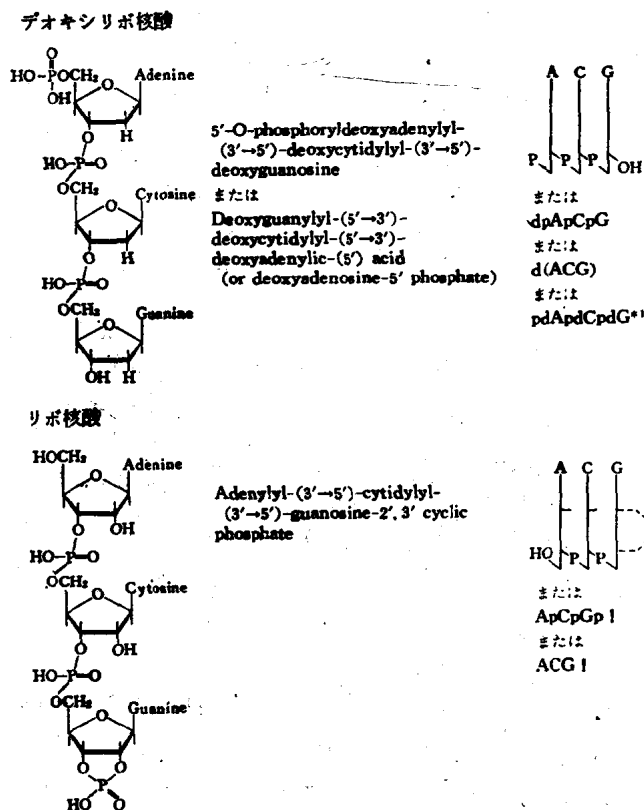


図 2.2.2 核酸の構造

である。このうち、鋳型合成方法は、生体における DNA や mRNA 型式を一にするものであるが、現在のところ、シーケンスのある純粋なオリゴヌクレオチドは得られていない。したがって、シーケンスのある純粋なオリゴヌクレオチドの取得という観点からは、逐次付加型方法がとられている。

この逐次付加型方法で行われている主な 2 つの方法を図 2.2.3 に示した。ジエステル法^{1), 2)}は単量体であるヌクレオチドを活性化してジエステルを形成させる方法である。これに対して、トリエステル法^{3), 4)}は、ジエステルを活性化してトリエステルを一旦形成させた後、保護基 R^{pm} を除いてジエステル結合を完成させる方法である。もちろん、前者で 3'-リン酸ヌクレオチド、後者で 5'-リン酸ヌクレオチドを使用することも可能である。ジエステル法は一行程が短いですが、単量体を活性化するとき、その保護基(後述する)が脱離して副反応の可能性がある。これに対して、トリエステル法では一行程は長いが中間体は解離基をもたないため、分離精製が容易である。もっとも最終行程の脱保護における副反応が問題となるが、ジエステル法の場合ほどバリエーションはない⁵⁾。