

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Příprava konjugátů oligonukleotidových sond s funkčními molekulami

Preparation of conjugates oligonucleotide probes with functional molecules

Diplomová práce

Petra Grossová



doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Hradec Králové, 12.8.2023

Petra Grossová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. za trpělivost při vedení méj diplomové práce a Mgr. Michaele Beranové za pomoc při plánování a vypracovávání experimentální práce i závěrečném psaní.

Poděkování patří také ostatním členům Azaphtalocyanine group za vytvoření skvělého prostředí nejen při práci v laboratoři.

Dále bych chtěla poděkovat společnosti Generi Biotech za syntézu oligonukleotidů, odpařování vzorků a změření hmotnostních spekter.

Děkuji i méj rodině a přátelům.

Tato práce byla finančně podpořena grantem Charles University reg. No. SVV 260 547.

„Každá práce trvá tak dlouho, kolik je na ni k dispozici času.“

-C. Northcote Parkinson

Obsah

| | |
|--|----|
| Obsah | 5 |
| Abstrakt..... | 7 |
| Abstract..... | 8 |
| Seznam použitých zkratk..... | 9 |
| 1. Úvod..... | 12 |
| 2. Teoretická část | 13 |
| 2.1 Syntetické oligonukleotidy..... | 13 |
| 2.1.1 Možnosti syntézy oligonukleotidů | 13 |
| 2.1.2 Fosforamiditová metoda..... | 14 |
| 2.1.3 Typy pevných fází..... | 16 |
| 2.1.4 DNA/RNA syntetizér | 18 |
| 2.1.5 Deprotekce oligonukleotidů | 18 |
| 2.1.6 Čištění oligonukleotidů | 19 |
| 2.1.7 Možnosti analýzy oligonukleotidů | 22 |
| 2.1.8 Modifikace nukleotidů | 23 |
| 2.1.9 Možnosti značení | 24 |
| 2.1.10 Využití..... | 27 |
| 2.2 Fluorescenční značení | 28 |
| 2.2.1 Cyaninová barviva | 30 |
| 2.3 Click chemie | 32 |
| 3. Cíl práce | 34 |
| 4. Experimentální část..... | 35 |
| 4.1 Metodika | 35 |
| 4.1.1 Chemikálie a použité přístroje..... | 35 |
| 4.1.2 Přípravy roztoků..... | 37 |
| 4.1.3 Značení ON..... | 38 |
| 4.1.4 Deprotekce | 39 |
| 4.1.5 Čištění | 39 |
| 4.1.6 Příprava vzorků pro analýzu | 40 |
| 4.1.7 HPLC analýza | 40 |
| 4.1.8 Vyhodnocení | 41 |
| 4.2 Výsledky | 44 |
| 4.2.1 Úprava deprotekčních podmínek | 44 |
| 4.2.2 Optimalizace značení | 46 |
| 4.2.3 Optimalizace doby reakce | 47 |
| 5. Diskuze..... | 49 |

| | | |
|-----|----------------------------------|----|
| 6. | Závěr | 53 |
| 7. | Seznam citované literatury | 54 |
| 8. | Přílohy | 57 |
| 8.1 | Příloha 1 | 57 |
| 8.2 | Příloha 2 | 60 |

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Školitel: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Michaela Beranová

Studentka: Petra Grossová

Název diplomové práce: Příprava konjugátů oligonukleotidových sond s funkčními molekulami

Cílem této diplomové práce bylo najít optimální podmínky konjugace oligonukleotidu s fluorescenčním barvivem pomocí click chemie na pevné fázi. Za značící molekulu bylo vybráno tradiční fluorescenční barvivo Cyanine5. Byl sledován vliv použité koncentrace fluorescenčního barviva, pozice značení, pevné fáze a doby reakce. Byly optimalizovány podmínky deprotektce.

Byly provedeny 2 série reakcí s následnou deprotektí a čištěním. Efektivita reakce byla vyhodnocována porovnáním ploch pod křivkou píků konjugovaných a nekonjugovaných molekul v chromatogramech vzorků po analýze metodou HPLC s UV detekcí. Integrace píků byla provedena v programu LabSolutions.

Nejvyšší výtěžnost poskytovaly reakce probíhající na polystyrenové pevné fázi, a to při značení na všech pozicích řetězce. Pro značení na 5'-konci řetězce bylo dosaženo více než 90% výtěžnosti při použití všech námi testovaných pevných fází. Dále bylo zjištěno, že pro click reakci postačuje koncentrace fluorescenčního barviva 100× nižší, než je běžně používána. Doba reakce může být výrazně kratší, než standardních 24 hodin. Reakce dosahovala již po 10 minutách 94% výtěžnosti (5'-CPG500Å, 1mM Cy5), nicméně maximální výtěžnosti je dosaženo mezi 1-12 hodinami. Pro konkrétnější určení je třeba provést důkladnější kinetickou studii.

Klíčová slova: oligonukleotidové sondy, fluorescenční barvivo, click chemie

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Supervisor: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Consultant: Mgr. Michaela Beranová

Student: Petra Grossová

Title of Thesis: Preparation of conjugates oligonucleotide probes with functional molecules

The aim of this thesis was to find the optimal conditions for conjugation of an oligonucleotide to a fluorescent dye by solid-phase click chemistry. The traditional fluorescent dye Cyanine5 was chosen as the labelling molecule. The effect of the concentration of fluorescent dye, the position of the labelling, the type of solid phase and the reaction time were examined. The deprotection conditions were optimized.

Two series of reactions followed by deprotection and purification were performed. The efficiency of the reaction was evaluated by comparing the peak areas under the curve of conjugated and unconjugated molecules in the chromatograms of the samples after analysis by HPLC with UV detection. Peak integration was performed in LabSolutions software.

The reactions running on the polystyrene solid phase gave the highest yields, with labelling at any position of the chain. For labelling at the 5'-end of the chain, more than 90% efficiency was achieved using all tested solid phases. Furthermore, it was found that a concentration of fluorescent dye 100× lower than that is commonly used was sufficient for the click reaction. The reaction time can be significantly shorter than the standard 24 hours. The reaction reached 94% yield after 10 minutes (5' CPG500Å, 1mM Cy5), however maximum yield is reached between 1-12 hours. For a more specific determination, a more thorough kinetic study is needed.

Key words: oligonucleotide probes, fluorescent dye, click chemistry

Seznam použitých zkratk

| | |
|-------|--|
| A | adenin |
| Å | Ångström |
| AAC | alkyn-azidová cykloadice |
| ACN | acetonitril |
| AEC | aniontově-výměnná chromatografie (z angl. anion-exchange chromatography) |
| AMA | 32% amoniak + 40% methylamin/voda (1:1) |
| C | cytosin |
| CPG | skleněná pevná fáze s řízenou velikostí pórů (z angl. controlled pore glass) |
| CuAAC | alkyn-azidová cykloadice katalyzovaná mědí (z angl. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition) |
| Cy3 | Cyanine3 |
| Cy5 | Cyanine5 |
| DBCO | dibenzoazacyklooktyn, dibenzo[b,f]azacyklookt-4-yn |
| dC | deoxycytidin |
| DMT | dimethoxytrityl |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dT | deoxythymidin |
| dU | deoxyuridin |
| ELISA | enzyme-linked immuno sorbent assay |
| EMA | Evropská agentura pro léčivé přípravky (z angl. European Medicines Agency) |

| | |
|-----------|---|
| EMSA | elektroforetické testy pohyblivosti (z angl. electrophoretic mobility shift assays) |
| ESI MS | hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. Food and Drug Administration) |
| FISH | fluorescenční in situ hybridizace |
| G | guanin |
| GPC | gelová permeační chromatografie, filtrace molekulovým sítem (SEC) |
| HCLPS | vysoce zesítěné polystyrenové pevné fáze (z angl. hyper-cross-linked polystyrene) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. high performance liquid chromatography) |
| IEC | iontově výměnná chromatografie (z angl. ion-exchange chromatography) |
| IP RP LC | iontově párová kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. ion-pair reverse phase liquid chromatography) |
| iqPCR | imunokvantitativní PCR (z angl. immunoquantitative real-time PCR) |
| LAMP | izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (z angl. loop-mediated isothermal amplification) |
| MALDI-TOF | hmotnostní spektrometrie s asistovanou laserovou desorpcí/ionizací s matricí v kombinaci s detektorem doby letu částic (z angl. matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry) |
| MeOH | methanol |
| mRNA | mediátorová RNA |
| miRNA | mikroRNA |
| MS | hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry) |

| | |
|-------------------|---|
| NADH | nikotinamidadenindinukleotid |
| NGS | sekvenování nové generace (next generation sequencing) |
| NMR | spektroskopie nukleární magnetické resonance |
| ON | oligonukleotidové řetězce modifikované DBCO vázané na pevné fázi |
| ONS | oligonukleotidová sonda (konjugát modifikovaného oligonukleotidu s fluorescenčním barvivem) |
| PAGE | elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. polyakrylamide gel electrophoresis) |
| PCR | polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction) |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězová reakce (z angl. quantitative/real-time polymerase chain reaction) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RP1 | kolonka s reverzní fází (z angl. reverse-phase cartridge purification) |
| RP-HPLC | kapalinová chromatografie na reverzních fázích (z angl. reverse-phase high performance liquid chromatography) |
| SEC | filtrace molekulovým sítem (z angl. size-exclusion chromatography), gelová permeační chromatografie (GPC) |
| SPAAC | pnutím podporovaná azido-alkynová cykloadice (z angl. strain promoted azide-alkyne cycloaddition) |
| T | thymin |
| TEA | triethylamin |
| TEAA | triethylaminoacetát |
| THF | tetrahydrofuran |
| U | uracil |
| uH ₂ O | demineralizovaná purifikovaná voda s použitím pro HPLC |

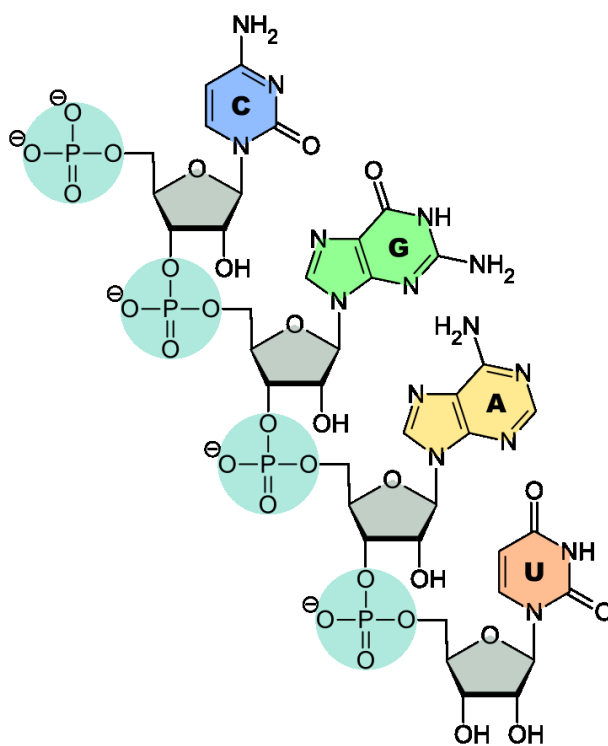
1. Úvod

Během pandemie Covid-19 došlo k velkému pokroku v oblasti laboratorní molekulárně biologické diagnostiky. Metoda PCR se stala rutinní záležitostí a její výsledky ovlivňovaly životy velké části populace. Vysoká specifita a citlivost detekce byly žádanější než kdy dřív. Největší zaměření ve výzkumu padlo na výběr ideální sekvence pro amplifikaci, stejně tak úpravu vzorku. Neméně důležitá je však i příprava oligonukleotidové sondy, na které závisí právě detekce amplifikovaného úseku. V této oblasti došlo také k jistému posunu, některé nové metody byly zavedeny do praxe, nicméně neexistuje ucelená studie porovnávající efektivitu jednotlivých metod přípravy fluorescenčních sond. V této práci jsme se zaměřili na postsyntetickou metodu značení oligonukleotidů pomocí click chemie na pevné fázi. Cílem bylo definovat a optimalizovat podmínky konjugace. Během práce jsme také zjistili, že pro kvantitativní proběhnutí reakce postačuje mnohem kratší doba reakce, než se obvykle při reakcích na pevné fázi používá, navíc jsme optimalizovali podmínky deprotektce.

2. Teoretická část

2.1 Syntetické oligonukleotidy

Oligonukleotidy jsou krátké jedno- nebo dvouřetězcové úseky DNA nebo RNA. Mohou mít délku 2–100 nukleotidů. Označují se počtem nukleotidů s koncovkou -mer. Chemicky jsou tvořeny z pěti základních heterocyklických dusíkatých bází (A, C, G, T, U) navázaných na cukr-fosfátové kostře z jednotek (deoxy)ribózy a zbytků kyseliny fosforečné (Obr. 1). Nativně vznikají enzymatickou syntézou nebo rozkladem větších molekul. V buňkách se tak nacházejí jako degradační meziprodukty nukleových kyselin, nebo v podobě miRNA, které pomáhají regulovat genovou expresi.



Obrázek 1 Základní dusíkaté báze – cytosin (C), guanin (G), adenin (A) a uracil (U) na ribózofosfátové kostře tvořící RNA.¹

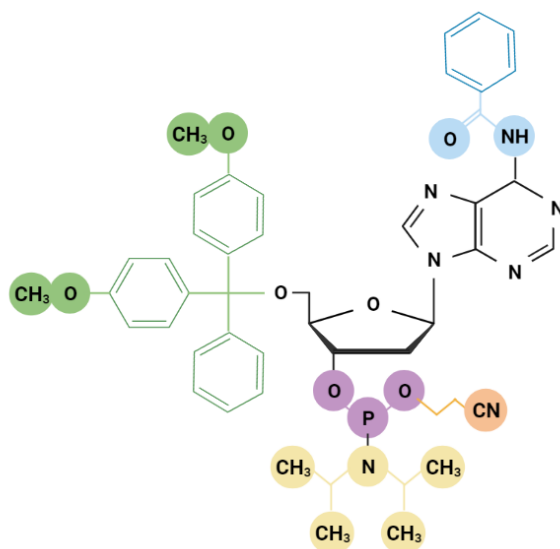
2.1.1 Možnosti syntézy oligonukleotidů

In vitro lze oligonukleotidy připravit biotechnologickými metodami (PCR, LAMP, klonování) nebo chemickou syntézou. Biotechnologické metody se používají pro syntézu dlouhých sekvencí, jejich nevýhodou je nízká variabilita vzniklých sekvencí. Chemickou syntézou lze připravit oligonukleotidy o délce do několika

desítek monomerů s velmi vysokou variabilitou. Existují dva způsoby provedení syntézy: v roztoku a na pevné fázi, přičemž pro každý způsob bylo navrženo několik možných metod. Nejstarší metoda, H-fosfonátová, je z roku 1955 (A.R. Todd et al., 1955).² O rok později popsal H.G. Khorana metodu fosfodiesterovou.^{3; 4} R. Letsinger popsal v roce 1969 metodu fosfortriesterovou a v roce 1975 fosfit-triesterovou.⁵ V 80. letech minulého století byla popsána metoda fosforamiditová, která se stala nejpoužívanější.⁶⁻⁸ Nyní se pro chemickou syntézu oligonukleotidů používá téměř výhradně fosforamiditová metoda na pevné fázi v DNA/RNA syntetizérech.⁹

2.1.2 Fosforamiditová metoda

Fosforamiditová metoda probíhá oproti biosyntéze ve směru od 3'-konce k 5'-konci. Základní stavební jednotky jsou v tomto případě fosforamidity nukleosidů. Místo fosfátové skupiny je zde přítomna skupina fosfitová, a pro omezení vedlejších reakcí jsou navíc náchylné hydroxylové a aminové skupiny modifikované chránicími skupinami: 5'-hydroxyskupina deoxyribózy je chráněna pomocí DMT (4,4'-dimethoxytrityl), jedna hydroxyskupina fosfitu je chráněna β -cyanoethylem, zatímco místo druhé je navázána aktivační diisopropylamino skupina (Obr. 2). Ochranu exocyklických aminoskupin nukleových bází (A, C, G) můžou poskytovat různé funkční skupiny. V případě syntézy RNA musí být chráněna i 2'-hydroxyskupina.¹⁰



Obrázek 2 Struktura standardně modifikovaného 2'-deoxyadenosinfosforamiditu: fialová – fosfitová skupina, zelená – 4,4'-dimethoxytritylová chránicí skupina, žlutá – diisopropylaminová aktivační skupina, oranžová – β -cyanoethylová chránicí skupina, modrá – benzoylamidová chránicí skupina.

Syntéza probíhá ve 4 krocích, které se cyklicky opakují až do požadované délky řetězce. Začíná **deprotectací** (Schéma 1, a) prvního nukleosidu (nebo linkeru), který je připevněn na pevné fázi. Odstranění DMT z 5'-hydroxyskupiny se provádí pomocí kyseliny trichloroctové nebo dichloroctové.^{11; 12} Do reakce je přiveden v několikanásobném přebytku fosforamidový monomer a aktivátor. Následuje **coupling** (Schéma 1, b) (kondenzace). Aktivátor, např. ETT (5-(ethylthio)-1H-tetrazol), protonizuje diisopropylaminoskupinu, která se odštěpí ze 3'-konce a na její místo se naváže ochráněná 5'-hydroxy skupina prvního nukleotidu. Vzniklý fosfit triester je **oxidován** (Schéma 1, c) pomocí jódu v prostředí pyridinu na stabilnější fosfát triester. Tzv. **capping** (Schéma 1, d) se provádí nejčastěji pomocí acetanhydridu s *N*-methylimidazolem a malým přídavkem pyridinu. Nezareagované 5'-hydroxyskupiny se zablokují acetylací, aby nedocházelo k dalšímu prodlužování chybných řetězců.¹³

Po každém cyklu je odstraněn nadbytek nezareagovaných fosforamiditů a vzniklých vedlejších produktů. Při syntéze oligonukleotidů na pevné fázi lze reakční prostor promýt po každém kroku, což usnadňuje konečné čištění a omezuje vznik nechtěných produktů. Cyklus se opakuje s dalšími nukleosid fosforamiditů, až do požadované délky řetězce. Na konec dojde k odstranění ochránících skupin (deprotectce) a uvolnění řetězce z pevné fáze.¹⁴

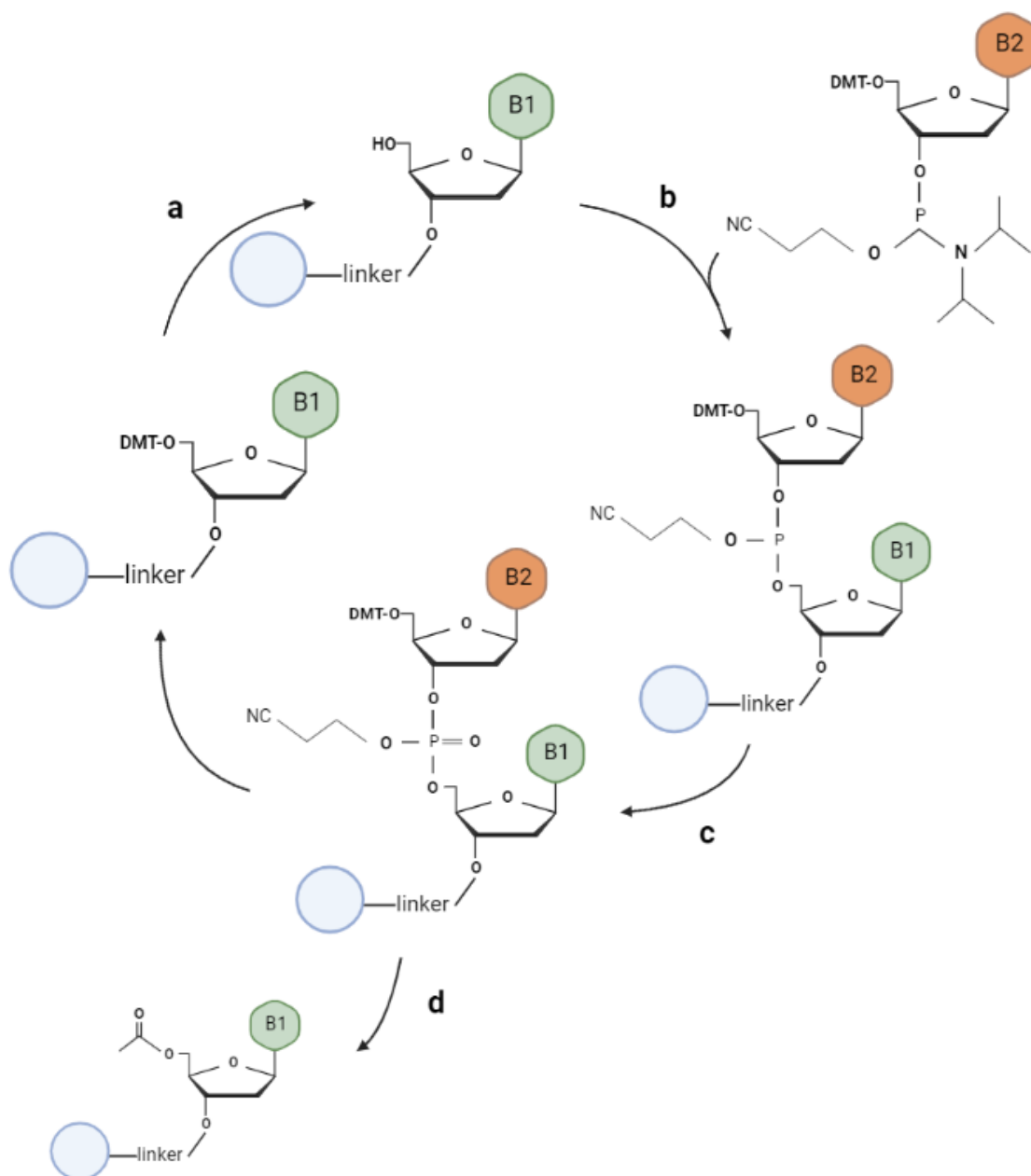
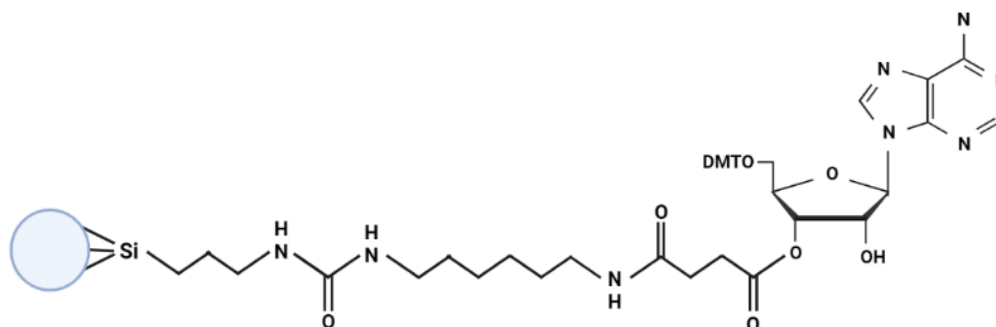


Schéma 1 Reakční cyklus fosforamiditové syntézy oligonukleotidu na pevné fázi – a) detritylace, b) coupling, c) oxidace, d) capping.

2.1.3 Typy pevných fází

Pevná fáze je polymerní inertní nosič s definovanou velikostí pórů, na který je obvykle kovalentně navázána první molekula nukleosidu, představující 3'-konec pro budoucí oligonukleotidový řetězec. Nosič musí obstát všechny kroky syntézy beze změny, po ukončení syntézy by však mělo snadno proběhnout odštěpení oligonukleotidového řetězce z pevné fáze. To většinou umožňuje **linker** – organická molekula spojující oligonukleotid s polymerem. Dlouhé molekuly linkeru také usnadňují přístup

reakčním agens k 5'-hydroxylové skupině syntetizovaného řetězce. Nejčastěji se používají alkylaminy s dlouhým řetězcem, esterově vázané přes sukcinyl na první nukleosid (Obr. 3).



Obrázek 3 Alkylamin s dlouhým řetězcem spojující fosforamidit nukleosidu a pevnou fázi. LCAA CPG 500 Å, Biosearch Technologies.

Pro fosforamiditovou metodu bývala téměř výhradně používána skleněná pevná fáze s řízenou velikostí pórů na bázi oxidu křemičitého (**CPG** – controlled pore glass). Tyto porézní nosiče jsou inertní vůči rozpouštědlům a činidlům používaným při syntéze. Velikost pórů určuje maximální možnou délku nasyntetizovaného oligonukleotidového řetězce. Komerčně dostupné jsou CPG nosiče s definovanou velikostí pórů 500 Å pro oligonukleotidy o délce do 30 nukleotidů, póry o velikosti 1000 Å pojmu řetězce dlouhé 50 nukleotidů a CPG s póry 2000 Å jsou pro řetězce do maximálně 150 nukleotidů. Nevýhodou CPG je jeho nestabilita v bazickém prostředí, které se používá při deprotekcii, což může vést ke zvýšení nečistot v konečném produktu.

Alternativou k CPG pevným fázím jsou vysoce zesíťené polystyrenové (**HCLPS**) a methakrylátové pevné fáze. Polystyrenový nosič byl prvním používaným nosičem při syntéze oligonukleotidů na pevné fázi. Kvůli některým jeho nepříznivým vlastnostem (bobtnání, rozpouštění) byl ale brzy vytěsněn silikonovými částicemi. Se zlepšením výrobní technologie se však jeho použití stává znovu populárnější a v posledních letech bylo uvedeno na trh mnoho nových materiálů (NittoPhase, NittoPhase HL, Nitto Denko; Primer Support 5G) a další jsou ve vývoji.¹⁴⁻¹⁶ Makromolekulární struktura většinou podléhá patentové ochraně. K dohledání bývají

zveřejněné pouze koncové modifikované skupiny, na kterých probíhá syntéza. Důležitými kritérii při výrobě pevných částic je reprodukovatelná úroveň bobtnání, loadingu a uniformní velikost částic.¹⁷

V případě automatizované syntézy v DNA/RNA syntetizéru je pevná fáze ve formě frit ukotvena v kolonkách nebo jamkových destičkách, díky čemuž jsou umožněny i následná deprotektce a čištění.

2.1.4 DNA/RNA syntetizér

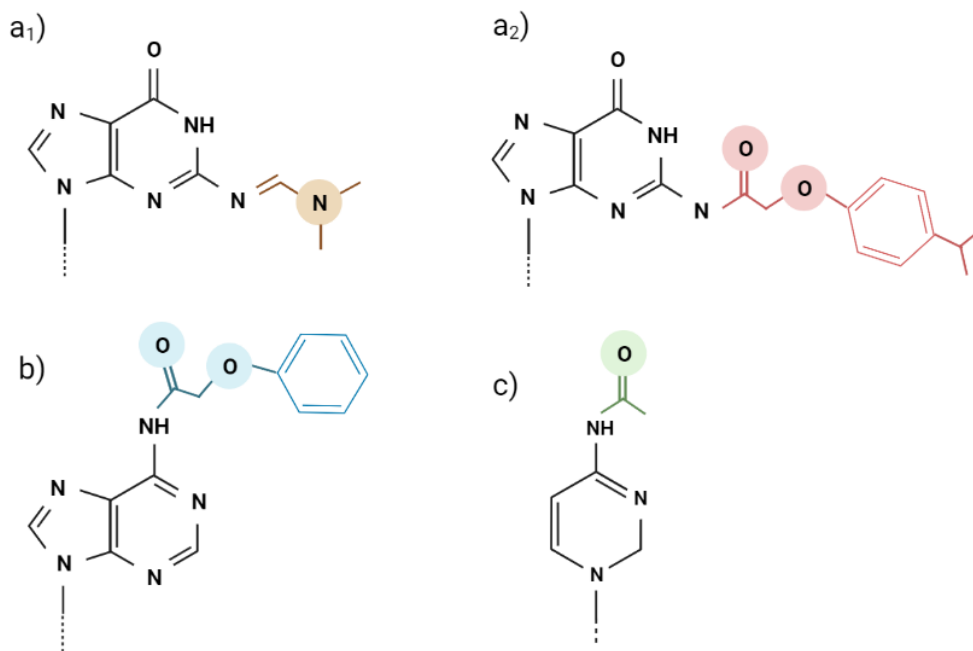
DNA/RNA syntetizér je zařízení umožňující automatizovanou syntézu oligonukleotidů o libovolné sekvenci. Součástí zařízení jsou zásobníky komponent a nádoby s reagensy, které jsou pomocí hadiček a pump přiváděny do reakční komory. Tu představuje soubor kolon (4–48 kolonek) nebo jamková destička (96 nebo 384 jamek), ve kterých je ukotven polymerní nosič. Proces je řízen z počítače a lze kontrolovat přes kontrolní panel. Doba trvání syntézy se pohybuje od desítek minut po několik hodin dle délky syntetizované sekvence.¹⁸

2.1.5 Deprotektce oligonukleotidů

Po nasyntetizování požadované délky řetězce musí dojít k jeho odštěpení od pevné fáze, resp. linkeru a ochránění jednotlivých reaktivních skupin. Standardně se vše děje během jednoho kroku pomocí koncentrovaného roztoku **hydroxidu amonného** ve vodě (28–33 %) za zvýšené teploty. Běžně používaným deprotektčním činidlem je i směs hydroxidu amonného a methylaminu v objemovém poměru 1:1 (tzv. AMA).¹⁹ Další možností je použití 0,4 M hydroxidu sodného ve směsi MeOH s vodou 4:1. Některé modifikace však mohou být labilní vůči bazickému prostředí a vyžadují mírnější podmínky deprotektce.²⁰

Skupina nejvíce labilních protektivních skupin se nazývá ochranná sada „UltraMild“. Tu lze odstranit methanolvým roztokem uhličitanu draselného, vodným amoniakem nebo vodným methylaminem při laboratorní teplotě, dále také směsí *tert*-butylamin:MeOH:voda v poměru 1:1:²¹ nebo *tert*-butylamin:voda v poměru 1:3. Ultra-UltraMild deprotektčním činidlem je 10% diisopropylamin v 0,25M roztoku β-merkptoethanolu v MeOH.²²

Příklady UltraMild chránících skupin jsou: *N*(2)-dimethylformamidyl nebo *N*(2)-isopropylfenoxyacetyl chránící guanin, *N*(2)-acetyl chránící cytosin, *N*(6)-fenoxyacetyl chránící adenin (Obr. 4).¹¹



Obrázek 4 UltraMild chránící skupiny: a₁) *N*(2)-dimethylformamidyl, a₂) *N*(2)-isopropylfenoxyacetyl, b) *N*(2)-acetyl, c) *N*(6)-fenoxyacetyl

2.1.6 Čištění oligonukleotidů

Během syntézy se nukleotid navazuje na 5'-konec prodlužujícího se řetězce. V každém reakčním cyklu je však malé procento řetězců, které nejsou prodlouženy. Vzniká tak směs oligonukleotidových řetězců o různých délkách. Čím delší řetězec se syntetizuje, tím je vyšší procento chyb a tedy větší množství nečistot (Tabulka 1). Některé aplikace vyžadují vysokou čistotu produktu, neboť přítomnost kratších sekvencí by mohla vést k nechtěným interakcím. V jiných případech (např. PCR primery) kratší řetězce výsledek neovlivní a přílišné čištění produktu by bylo neefektivní.

Tabulka 1 Výťažnosť syntézy dle počtu bází syntetizovaného oligonukleotidu

| Počet bází | Efektivita | | | | |
|------------|------------|---------|---------|---------|---------|
| | 90,00 % | 95,00 % | 97,00 % | 98,50 % | 99,50 % |
| 10 | 34,90 % | 59,90 % | 73,70 % | 86,00 % | 95,10 % |
| 20 | 12,20 % | 35,80 % | 54,40 % | 73,90 % | 90,50 % |
| 50 | 0,52 % | 7,70 % | 21,80 % | 47,00 % | 77,80 % |
| 100 | 0 % | 0,59 % | 4,80 % | 22,10 % | 60,60 % |
| 150 | 0 % | 0 % | 1,00 % | 10,40 % | 47,10 % |
| 200 | 0 % | 0 % | 0,23 % | 4,90 % | 36,70 % |

Následující metody se používají pro separaci požadovaného produktu od zkrácených řetězců a dalších nečistot:

Gelová permeační chromatografie (Size exclusion chromatography)

Pro odstranění nízkomolekulárních nečistot se používá gelová permeační chromatografie (GPC) neboli filtrace molekulovým sítem (SEC). Odstraňuje zbytkové vedlejší produkty, které zbyly po syntéze, štěpení a deprotekcii. Tomuto procesu se říká také odsolování. Provádí se v plastových kolonkách naplněných porézním dextranem nebo silikagelem. Během separace dochází k zachycení malých molekul (nedosyntetizované řetězce, nenavázané ionty solí) v pórech, zatímco delší molekuly oligonukleotidů procházejí kolonou s čelem mobilní fáze.

Pro mnoho aplikací (včetně PCR) je odsolování dostačující technika čištění pro oligonukleotidy do délky 35 bází, jelikož řetězce o plné délce v tomto případě převažují. Oligonukleotidy používané při klonování nebo delší než 35 bází vyžadují další metodu čištění. Výběr závisí na délce řetězce, scale syntézy a účelu použití oligonukleotidu.²³

Kolonka s reverzní fází (RP1)

Separace na kolonce s reverzní fází odstraní vysoký podíl nekompletních sekvencí. Předpokladem je, aby oligonukleotid byl syntetizován v režimu trityl-on, tedy aby byla ponechána DMT skupina na 5'-konci. Principem separace je rozdíl v hydrofobicitě mezi produktem s 5'-DMT a nekompletními sekvencemi bez 5'-DMT. Zatímco oligonukleotid v plné délce zůstává na koloně, nekompletní sekvence se vymyjí. Požadovaný produkt plné délky je poté na koloně zbaven DMT skupiny a eluován z kolonky.²³

Kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC)

S rostoucí délkou řetězce se zvyšuje podíl nedosyntetizovaných sekvencí. Ne všechny tyto nečistoty se pomocí RP1 odstraní, a proto se u delších řetězců, doporučuje purifikace pomocí HPLC nebo PAGE. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) funguje na stejném principu jako výše uvedená kolonka s reverzní fází. Vyšší rozlišení však umožňuje dosáhnout vyšší úrovně čistoty. HPLC je účinnou metodou čištění oligonukleotidů s fluorofory, jako jsou sondy qPCR, protože lipofilita fluoroforů zajišťuje vynikající oddělení produktu od kontaminantů. Kromě toho je RP-HPLC metodou volby pro větší množství produktu díky kapacitě a rozlišovacím vlastnostem kolony. Rozlišovací schopnost založená na lipofilitě se snižuje s rostoucí délkou řetězce. Proto se RP-HPLC obvykle nedoporučuje pro čištění produktů delších než 50 bází. Ačkoli lze touto metodou purifikovat i delší oligonukleotidy (až 80 bází), může to mít nepříznivý vliv na čistotu a výtěžnost.²³

Aniontově výměnná chromatografie (AEC)

Při iontovýměnné chromatografii dochází k dělení analytů na základě rozdílné síly iontových interakcí s funkčními skupinami stacionární fáze. AEC využívá jako stacionární fázi kvartérní aminy nebo jiné kladně nabitě molekuly. Ty interagují se záporně nabitými fosfátovými skupinami nukleotidů. Separace je umožněna gradientem MF. Tuto techniku lze spojit s purifikací pomocí RP-HPLC, čímž se separační proces rozšíří o druhý rozměr. Metoda je vhodná pro čištění menších množství produktů s délkou řetězce do 40-merů.^{23; 24}

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)

Principem separace PAGE je pohyb molekul v gelu působením elektrického pole. Separačními kritérii jsou náboj, a především molekulová hmotnost molekul. Tato metoda poskytuje velmi vysokou čistotu produktu (95-99 %). Výtěžnost z PAGE je nižší než u jiných metod kvůli složitým postupům potřebným pro extrakci oligonukleotidů z gelu a odstranění velké většiny zkrácených produktů. Tato technika se doporučuje, pokud je požadován vysoce purifikovaný produkt delších řetězců (≥ 50 bází).^{23; 24}

2.1.7 Možnosti analýzy oligonukleotidů

Potřeba analyzovat nasyntetizované oligonukleotidy má dva hlavní důvody. Prvním je identifikace nebo potvrzení struktury a charakterizace molekuly. Taková analýza se provádí po deprotekcii a purifikaci. Nejdůležitější charakteristiku a identifikaci poskytuje metoda **sekvenování**. Kvůli vysokým nákladům se ale příliš nevyužívá. V rutinní výrobě postačuje pro identifikaci a charakterizaci **hmotnostní spektrometrie**. V dnešní době se běžně používají dvě metody: hmotnostní spektrometrie s elektrosprejem (ESI MS) a hmotnostní spektrometrie s asistovanou laserovou desorcí/ionizací s maticí v kombinaci s detektorem doby letu částic (MALDI-TOF).²⁵ K potvrzení struktury lze také použít metodu NMR.²⁶

Častěji je ale analýza potřebná ještě před purifikací, a to z důvodu zjišťování profilu nečistot. Tyto detailnější informace o spektru nasyntetizovaných oligonukleotidů poskytují separační metody a metody kapilární elektroforézy. Před analýzou se většinou provádí tzv. prepurifikace k odstranění hrubých nečistot. Použitá analytická metoda pak může být shodná s metodou purifikační.

Ze separačních technik lze použít IEC (iontově výměnná chromatografie), IP RP LC (iontově párová kapalinová chromatografie na reverzní fázi), obojí s detekcí UV nebo MS. Z metod kapilární elektroforézy se nejčastěji používá kapilární zónová elektroforéza. Dobré výsledky poskytuje také kapilární elektroforéza s pulzním polem.²⁷ Variantou může být i kapilární gelová elektroforéza.²⁸

Optimální metodou se nedá nazvat žádná z vyjmenovaných, výběr je velmi individuální a závisí na délce řetězce, případně modifikacích oligonukleotidu, analyzovaném množství a také technickém vybavení laboratoře.

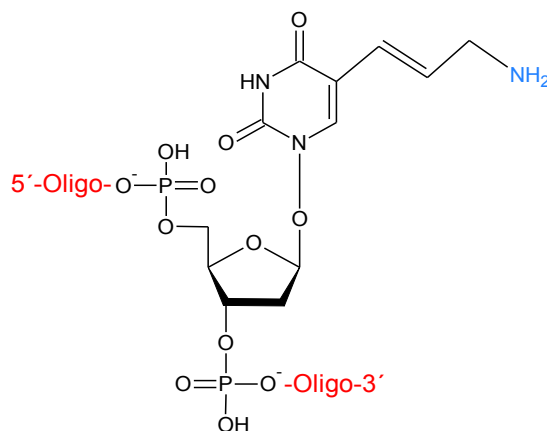
2.1.8 Modifikace nukleotidů

Pro syntézu oligonukleotidových řetězců se často používají modifikované monomery, a to z několika důvodů:

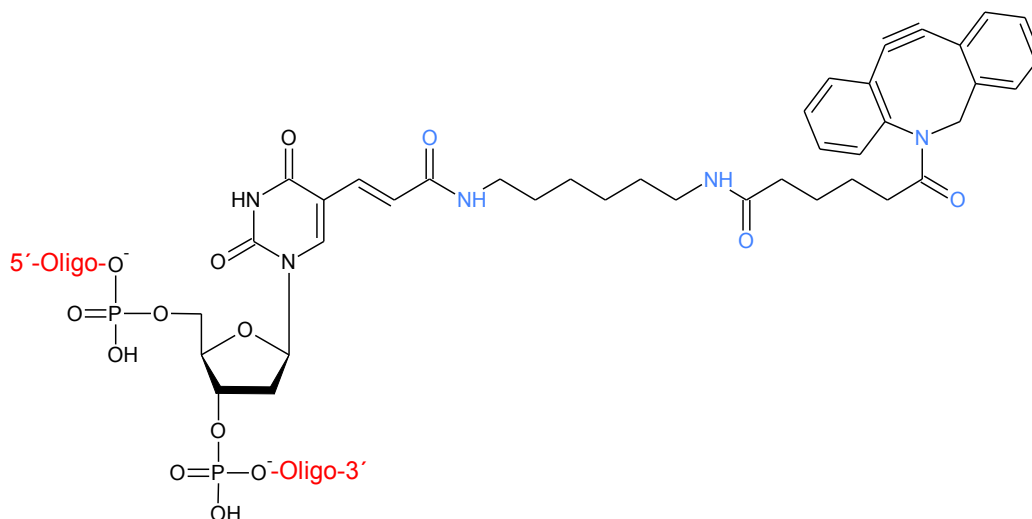
- usnadnění syntézy (použití chránících a aktivujících skupin),
- zlepšení vlastností pro použití *in vivo* (zvýšení rezistence vůči nukleázám, zvýšení lipofility pro lepší průnik přes buněčné membrány).
- umožnění detekce (navázání specifických molekul, např. fluoroforů, radioizotopů, biotinu).

Použití protektivních skupin bylo diskutováno v kapitole 2.1.2. Z důvodu zaměření této práce se dále budu zabývat pouze modifikacemi, které umožňují zavedení specifických neradioaktivních molekul pro umožnění detekce.

Obměny lze provádět na všech částech molekuly: bázi, cukru, fosfátu. Specifické molekuly lze připojit i na 3'- nebo 5'-konec oligonukleotidu. Reaktivní funkční skupiny pro přípravu konjugátů jsou: amin, thiol, karboxyl, azid, alkenyl, alkynyl, aldehyd a fosfátové funkční skupiny (např. 5'-monofosfát, fosforothioát). Pro připojení značící molekuly v řetězci oligonukleotidu se nejčastěji využívá substituce na thyminu nebo uracilu (Obr. 5,6).



Obrázek 5 Příklad modifikované báze nukleotidu - aminoallyl-dU.



Obrázek 6 Příklad modifikované báze nukleotidu - DBCO-dT.

2.1.9 Možnosti značení

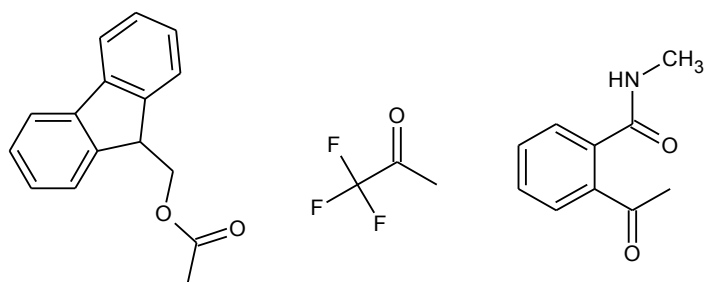
Existují dva hlavní způsoby, jak zavést molekulu fluoroforu do oligonukleotidového řetězce. První způsob zahrnuje přípravu fluorescenční značkou modifikovaného fosforamiditu. Taková molekula může být do řetězce inkorporována během syntézy oligonukleotidového řetězce fosforamiditovou metodou, většinou ale pouze na 5'-konec řetězce. Druhým způsobem je navázání reaktivní skupiny na požadované místo v řetězci a následná specifická reakce s ligandem nesoucím fluorofor. Výhodou druhého způsobu je možnost postsyntetické konjugace s fluoroforem na libovolnou pozici v oligonukleotidovém řetězci, a to buď před, nebo po finální deprotekcí, dle stability molekuly. Další možností je použití modifikovaných bází nebo pevných fází s fluorescenčními vlastnostmi.

Aminy

Nejčastěji používanou funkční skupinou navázanou na oligonukleotidovém řetězci je aminoskupina. Nejjednoduššími modifikacemi vznikají 5'-amino 2',5'-dideoxynukleosidové deriváty. Dále lze na nukleosidy navazovat 2-aminoethanol, 3-aminopropanol, 6-aminohexanol, 12-aminododekanol, aminoethylenglykol a amino-tetraethylenglykol.²⁹ Pro modifikaci oligonukleotidu na 3'-konci byly použity *N*-Fmoc-2-amino-1,3-propandiolové deriváty a *N*-Fmoc-2-aminobutyl-1,3-propandiolové deriváty. K přímé alkylationi 2'-OH skupiny ribonukleosidu může být použit *N*-(5-bromopentyl)ftalimid. Zavedená aminová

skupina musí být během syntézy chráněna před nežádoucími reakcemi. K tomu slouží některé z následujících protektivních skupin (Obr. 7).⁹

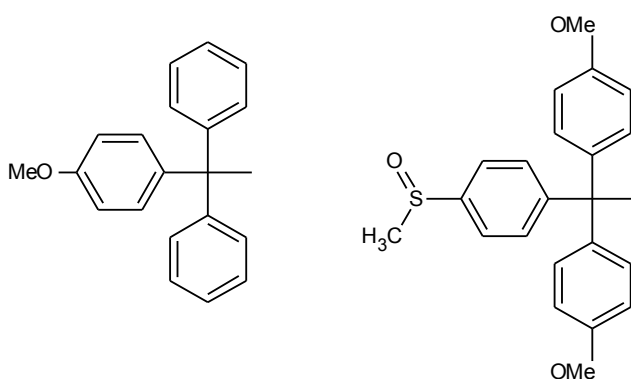
Ligandy, které reagují se zavedenou aminoskupinou, obsahují reaktivní skupiny, jako jsou: *N*-hydroxysukcinimidyl estery,^{30; 31} chloridy kyselin,³² sulfonylchloridy,³³ izothiokyanáty.³⁴



Fmoc

TFA

PDA



MMT

DMS(O)MT

Obrázek 7 Amino-chránící skupiny: Fmoc – fluorenylmethyloxykarbonyl, TFA – trifluoroacetyl, PDA – diamid kyseliny ftalové, MMT – monomethoxytrityl, DMS(O)MT – 4,4'-dimethoxy-4''-methylsulfonyl-trityl

Thioly

Thiolové deriváty tvoří konjugáty s maleinimidovými a haloacetamidovými ligandy. K jejich syntéze se používají S-trityl-5'-merkapt-2'-5'-dideoxynukleosidy³⁵ nebo merkptoalkoholy jako jsou 3-merkptopropanol a 6-merkptohexanol. Thiolová skupina bývá chráněna tritylovou skupinou.^{36; 37}

Karboxylové kyseliny

Oligonukleotidy modifikované deriváty karboxylových kyselin slouží spíše jako meziprodukty při přípravě aminoderivátů nebo pro imobilizaci oligonukleotidů na povrchy nesoucí aminoskupiny.

Modifikace nukleové báze karboxylovou skupinou na 5. pozici 2'-deoxyuridinu dává vzniknout karboxy-dT fosforamiditu. Tuto molekulu lze inkorporovat i do středu oligonukleotidového řetězce.³⁸

Aldehydy

Aldehydy velmi ochotně a selektivně reagují s hydraziny, hydrazidy a hydroxylaminovými deriváty, čehož se využívá pro imobilizaci oligonukleotidů na pevné fázi, reakci s proteiny, polymery a přípravu oligonukleotidových konjugátů.⁹

Alkeny, alkyny

V posledních letech zaznamenávají velký úspěch reakce, které mohou být provedeny selektivně v živých biologických vzorcích, takzvané bioortogonální reakce.³⁹ Zahrnují několik konjugačních reakcí, které využívají alkenové nebo alkynové deriváty oligonukleotidů. Jedny z prvních reakcí, které byly aplikovány, byly Diels-Alderovy cykloadice. Pro modifikaci oligonukleotidu byl použit 1,3-hexadien nebo furanový derivát a jako ligand sloužila funkční molekula s navázaným maleimidem, který se chová jako dienofil. Tento typ reakce byl použit pro přípravu konjugátů s fluorescenčními molekulami, biotinem a peptidy.⁴⁰⁻⁴²

Dalšími velmi oblíbenými postsyntetickými reakcemi oligonukleotidů je staly 1,3-dipolární cykloadice mezi alkyny a azidy, známé pod pojmem ‚**click chemie**‘ (viz kapitola 2.3).⁴³ Alkyny mohou být do oligonukleotidového řetězce zavedeny buď přímou inkorporací alkynového fosforamiditu nebo reakcí oligonukleotidu, nesoucí amino- nebo karboxylovou skupinu, s reaktivní aktivovanou esterovou nebo aminoskupinou na molekule alkynu.⁴⁴⁻⁴⁶ Další možností je enzymatická inkorporace nukleosidtrifosfátu do DNA pomocí DNA polymerázy.⁴⁷

Jedním z nejjednodušších fosforamiditů používaných pro zavedení alkynu do oligonukleotidového řetězce byl hex-5-yn-1-ol fosforamidit.^{46; 48} Reaktivitu měly usnadnit spojovací molekuly s aktivovaným donorem trojné vazby typu

propynylamino aromatických karboxylových kyselin a další.⁴⁹ Pro zavedení alkynové skupiny na pyrimidin byla vybrána pozice 5. Skupina Carella a Seela vyvinula alkynyl-dU a dC.^{50; 51} Purinové nukleosidy byly modifikovány na 7-deazapuriny.^{52; 53} Byla také popsána modifikace na 2'-pozici uridinu.⁵⁴

Do fosfátových vazeb byly zavedeny alkynylové skupiny záměnou 2-kyanoethylové skupiny za 4-pentynyllovou.⁵⁵ Dále byla popsána syntéza oligonukleotidů obsahujících 1-ethynyl-2-deoxy-β-D-ribofuranosu a účinná konverze ethynylové skupiny na několik 1,2,3-triazolů, čímž vznikají nová analoga nukleobází.⁵⁶ V jiné studii byla popsána syntéza 5-dipropargylamin-dU fosforamiditu.⁵⁷ Tento bifunkční derivát je schopen vést dvě po sobě jdoucí click reakce, čímž se zvyšuje počet potenciálních derivátů získaných click chemií.⁵⁸⁻⁶⁰

2.1.10 Využití

Syntetické oligonukleotidy našly široké uplatnění na poli molekulární biologie, genetiky i medicíny, od základního výzkumu až po klinické použití.

Neznačené oligonukleotidy slouží jako moderní léčiva pro genovou terapii. Celkem 16 terapeutik na bázi nukleotidů bylo schválených FDA/EMA v roce 2022. Jejich principem je znemožnění syntézy toxického proteinu nebo obnova syntézy chybějícího proteinu na genetické úrovni navázáním na cílovou mRNA na základě komplementarity bází (Watson-Crickovo párování).⁶¹

Značené oligonukleotidy slouží pro molekulárně-biologické a genetické experimenty, jako diagnostika, primery nebo sondy v PCR.

Oligonukleotidové sondy/značky umožňují detekci a kvantifikaci amplifikovaných požadovaných úseků DNA nebo RNA. To pomáhá objasňovat základní buněčné procesy, jako například skládání, replikaci, transkripci a translaci. Dále umožňuje vizualizovat subcelulární lokalizaci nukleových kyselin, zejména mRNA.

V biotechnologii umožňují značené nukleotidy sekvenování chromozomů, plazmidů i celých genomů, transkriptomovou analýzu, mutační analýzu, studium genetické variability nebo identifikaci osob. K tomu slouží zejména metody PCR a NGS (next generation sequencing).

2.2 Fluorescenční značení

Fluorofory jsou molekuly, které mají schopnost fluorescence nebo jejího zhášení (quenching). U těchto molekul se ve struktuře nejčastěji nachází aromatické jádro nebo jiný konjugovaný systém dvojných vazeb. Fluorofory můžeme dělit na vnitřní (intrinsic) a vnější (extrinsic). Vnitřní neboli vlastní fluorofory se vyskytují přirozeně. Jsou jimi například aromatické aminokyseliny (Trp, Tyr, Phe), NADH, vitamin A, hemoglobin, chlorofyl. Jejich aktivitu lze měřit přímo. Vnější neboli nevlastní fluorofory jsou syntetické molekuly. Mohou se vázat na biomolekuly, které nevykazují fluorescence, čímž umožňují jejich detekci. Pokud je vazba kovalentní, nazýváme je fluorescenční značkou (anglicky fluorescent labels/tags), nekovalentně vázané fluorofory jsou fluorescenční sondy (fluorescent probes).^{62; 63}

Jednotlivé fluorofory můžeme charakterizovat na základě jejich fotofyzikálních vlastností. Jsou jimi: vlnová délka při maximální absorpci ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$), poločas fluorescence (τ S), vlnová délka při maximální emisi ($\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$), fluorescenční kvantový výtěžek (Φ_F), Stokesův posun ($\Delta\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} - \lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$) a molární absorpční koeficient (ϵ). Pro použití v biologických vzorcích je třeba brát v potaz také rozpustnost ve vodných roztocích, náboj, velikost a tvar molekuly, cytotoxicitu a snadnost biokonjugace na požadovanou molekulu pro tvorbu značky. Ideální vlastnosti fluorescenční značky jsou shrnuty níže (Tabulka 2).

Tabulka 2 Optimální vlastnosti fluorescenční značky.

| Fotofyzikální | Chemické | Fyzikální |
|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| dlouhá doba dohasínání | vysoká rozpustnost ve vodě | malá velikost |
| značný Stokesův posun | netoxicity | nenáchylnost k agregaci |
| vysoká intenzita záření | snadná syntéza | náboj (+, -, neutrální) |
| vysoká fotostabilita | snadná biokonjugace | |
| | vysoká čistota | |

Dle velikosti molekuly se fluorofory dělí na fluorescenční barviva (200 – 1000 Da), proteiny, polymery a nanočástice (quantum dots).⁶⁴ Malé organické molekuly fluorescenčních barviv můžeme dále rozdělit na typy dle základního strukturního skeletu, od kterého jsou odvozené, viz Tabulka 3.

Tabulka 3 Rozdělení používaných fluoroforů dle chemické struktury.⁶⁴

| Základní strukturní skelet | Příklady používaných molekul |
|-------------------------------|--|
| xanthen | fluorescein, rhodamin, Oregon green, eosin, Texas red, aminobenzopyranoxanthy (ABPXs) přemostěné tetra-aryl-p-chinodimethany (BTAQs) ⁶⁵ |
| cyanin | cyaniny, indocarbocyaniny, oxarbocyaniny, thiocarbocyaniny, merocyaniny, SYBR Green I |
| squarain | Seta, Square, aminosquarain, dicyanomethylensquarain, Squarain-rotaxanové deriváty |
| naftalen | dansylové a prodanové deriváty |
| kumarin | kumariny, 7-hydroxykumariny, MUG, MUP, DiFMUP, Pacific blue |
| oxadiazol | pyridyloxazol, nitrobenzoxadiazol, benzoxadiazol |
| anthracen | anthrachinony, DRAQ5, DRAQ7, CyTRAK Orange |
| pyren | Cascade blue |
| oxazin | Nile red, Nile blue, Kresylova violet', oxazin170 |
| akridin | proflavin, akridinová oranž, akridinová žlut' |
| arylmethin | auramin, krystalová violet', malachitová zeleň |
| tetrapyrrol | porfin, ftalocyanin, bilirubin |
| dipyrrromethen | BODIPY (borondipyrrromethane), aza-BODIPY |

Pojem fluorescenční barvivo byl použit již na počátku 20. století, využití pro značení biomolekul se datuje od roku 1942.^{66; 67} Od té doby našly fluorofory široké uplatnění na poli molekulární biologie, genetiky a biomedicíny, a to jak ve výzkumu, tak i v klinické praxi. Nejčastěji bývají fluorescenční barviva součástí sond, které se používají k detekci proteinů a nukleových kyselin.

Konkrétní metody, ve kterých se fluorescenční značení používá, jsou např.:

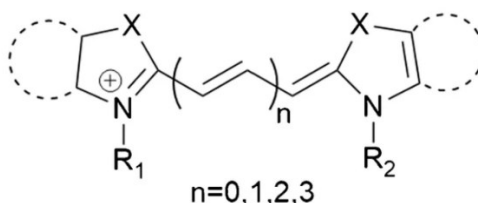
- imunoeseje – biochemické testy na principu vazby antigen-protilátka,
- DNA microarray (DNA čip) - profilování genové exprese,
- elektroforetické testy pohyblivosti (EMSA) - identifikace a analýza protein-DNA/RNA interakcí,

- real-time immunoquantitative PCR (iqPCR) - kombinace metod ELISA a PCR,
- fluorescenční in situ hybridizace (FISH) – hledání specifické sekvence v chromozomu (zjišťování mutací).

K detekci fluorescence slouží např. průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, spektrofluorimetry, fluorescenční skenery (se čtečkou mikrodestiček, "light-up probes," *in vivo* imaging).⁶⁸

2.2.1 Cyaninová barviva

Cyaninová barviva jsou rigidní planární molekuly vykazující fluorescenci.⁶⁹ Jejich struktura obsahuje většinou lichý počet elektronově deficitních methinových skupin, které tvoří systém konjugovaných dvojných vazeb. Tento řetězec mívá na každém konci navázaný heterocyklus (pyrrol, imidazol, thiazol, pyridin, chinolin indol, benzothiazol), aromatický kruh nebo jiný cykloalken obsahující dusík, z čehož jeden dusík je terciární a druhý kvarterní. To dohromady tvoří velký π -konjugovaný systém zodpovědný za fluorescenční vlastnosti molekuly (tzv. push-pull elektronový systém chromoforů).⁷⁰



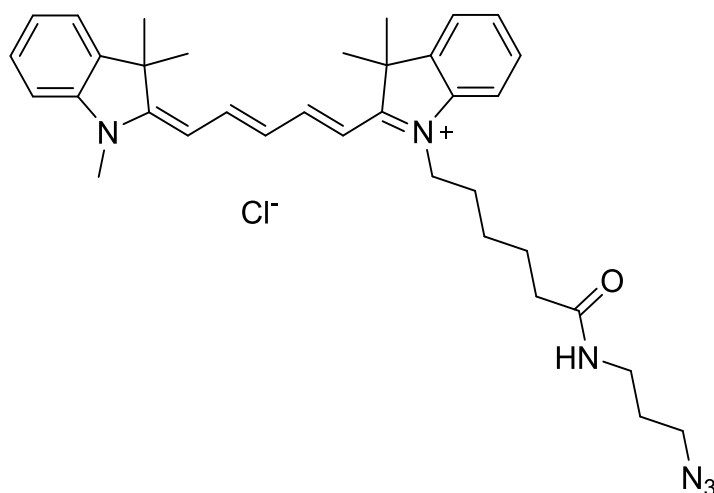
Obrázek 8 Obecná struktura cyaninů

Díky vynikajícím fotofyzikálním a chemickým vlastnostem, jako je vysoký molární absorpční koeficient, vysoký fluorescenční kvantový výtěžek, relativně dlouhé absorpční a emisní vlnové délky (mezi 450 a 750 nm), dobrá biokompatibilita a nízká toxicita, jsou cyaninová barviva hojně využívána pro přípravu biologických sond. Tyto fluorofory se váží specificky i nespecificky na různé biologické struktury, např. enzymy, protilátky, nukleové kyseliny. Nevýhodou použití těchto barviv je jejich nestabilita a zejména vysoká fotosenzitivita. Cyaniny také neprostupují membránami živých buněk, což snižuje možnost využití při *in vivo* experimentech.^{62; 71}

Cyaniny se dělí na různé strukturní typy, např. **streptocyaniny** mají dusíky pouze methylované, **hemicyaniny** mají jeden dusík součástí heterocyklu a **uzavřené cyaniny** mají oba dusíky součástí heterocyklu.⁷²

Pro přípravu fluorescenčních konjugátů s nukleovými kyselinami se nejvíce používají uzavřené cyaniny obsahující dva indolové kruhy spojené polymethinovým můstkem, tzv. **tetramethylindo(di)-karbocyaniny**, konkrétně barviva s kódovým označením Cy3 a Cy5. Číslovka v tomto případě udává počet methinových můstků mezi indoly. Molekuly mohou být dále modifikovány různými funkčními skupinami pro zvýšení hydrofility a specifickými reakčními skupinami pro konjugaci s biologickými molekulami.

Cy5 je dnes považováno za tradiční fluorescenční barvivo, které lze velmi jednoduše detekovat. Jeho maximální absorpce i emise se nachází v oblasti far-red ($\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}} = 648 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}} = 670 \text{ nm}$) a jeho molární absorpční koeficient má hodnotu $\epsilon = 250000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, tudíž lze snadno vidět i pouhým okem.⁷³



Obrázek 9 Strukturní vzorec sloučeniny Cyanine5-azid

2.3 Click chemie

Pojem ‚click chemie‘ představuje širokou skupinu reakcí, které jsou jednoduché na provedení, probíhají ve vodném prostředí, jsou stereospecifické a dosahují vysokých výtěžků s minimem vedlejších produktů.⁷⁴ Poprvé tento termín použil K.B. Sharpless v roce 1999 a v roce 2022 byl za objev click chemie oceněn Nobelovou cenou.^{39; 75}

Reakce, které splňují předchozí kritéria se rozdělují do 4 základních typů:

- nukleofilní substituce;
- adice na C-C násobnou vazbu (Michaelova adice, epoxidace, dihydroxylace, aziridinace);
- reakce nealdolového typu (kondenzace *N*-hydroxysukcinimidu);
- cykloadice (Diels–Adlerova reakce, Huisgenova cykloadice).⁷⁴

Při Huisgenově cykloadici se konjuguje azid s alkylovou skupinou za vzniku 1,2,3-triazolového můstku. Tyto funkční skupiny jsou chemicky nereaktivní vůči většině funkčních částí jiných biologických substrátů (lipidům, proteinům, nukleovým kyselinám), v biologických molekulách se téměř nevyskytují, přesto je lze snadno do skeletu velkých organických molekul zavést, tudíž reakce probíhá v živém prostředí velmi specificky. Takové reakce se označují jako bioortogonální a biokompatibilní.

CuAAC (alkyn-azidové cykloadice katalyzované mědí)

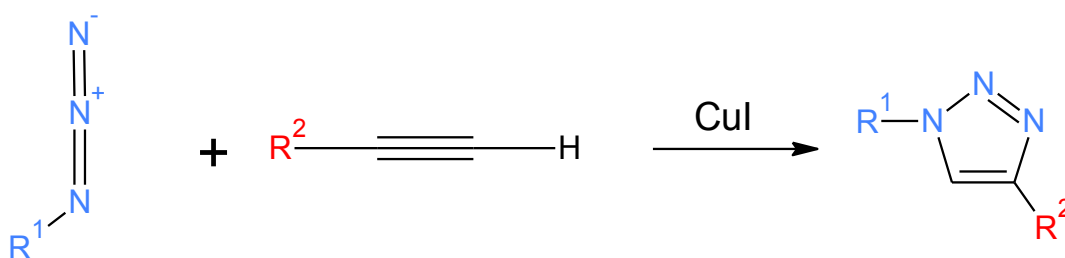


Schéma 2 Obecné schéma azid-alkynové cykloadice katalyzované mědí

Aby reakce proběhla kvantitativně, bývá katalyzována mědí. Katalýza CuI nejenže významně snižuje aktivační bariéru cykloadice s terminálními alkyny, ale také vede výhradně k 1,4-disubstituovaným 1,2,3-triazolům. CuI však způsobuje oxidační stres živým buňkám vedoucí k degradaci aminokyselin. To omezuje použití při *in vivo*

aplikacích. Navíc pro vysoký výtěžek bývá vhodné zvýšení teploty reakce, což může způsobit rozklad fluorescenčního barviva při jeho konjugaci na oligonukleotid.

S cílem překonat tato omezení bylo věnováno velké úsilí vývoji katalytických systémů obsahujících Cu^+ chelatuující ligandy pro zvýšení kinetiky a stabilizaci oxidačního stavu Cu^+ . Alternativně se jako účinné biokonjugační reakce pro aplikace *in vitro*, kde nelze použít katalyzátory Cu , ukázaly SPAAC, které byly původně vyvinuty pro studium dynamických procesů biomolekul v živých systémech.⁷⁶

SPAAC (pnutím podporované azido-alkynové cykloadice)

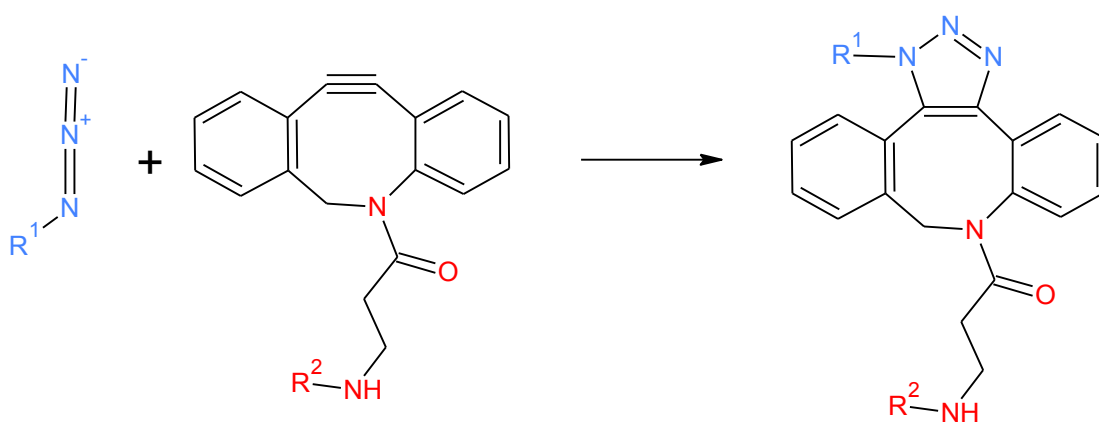


Schéma 3 Obecné schéma azid-alkynové cykloadice podporované pnutím

Skupina americké vědkyně Carolyn Ruth Bertozzi objevila výhody vnitřního kruhového napětí cyklooktynů, jako účinného způsobu snížení aktivační bariéry AAC, a vytvořila tak alternativu k použití kovových katalyzátorů. Tuto metodu následně použila pro fluorescenční značení proteinů a glykanů na povrchu buněk v živých buňkách a organismech. Díky své jednoduchosti a skvělé ortogonalitě si SPAAC rychle osvojilo mnoho dalších skupin nejen pro studium dynamických procesů biomolekul v živých systémech, ale také jako výkonnou spojovací technologii v nanotechnologiích a v materiálové a polymerní vědě. V roce 2022 získala C. R. Bertozzi za tento objev společně s Mortenem Meldalem a Karlem Barrym Sharplessem Nobelovu cenu za chemii.³⁹

3. Cíl práce

Cílem této práce bylo ověřit, zda lze pro přípravu oligonukleotidových sond použít postsyntetickou metodu značení na pevné fázi pomocí click chemie a optimalizovat tuto metodu pro její efektivní využití. Pro experiment bylo použito tradiční fluorescenční barvivo Cyanine5 ve formě azidu a oligodeoxyribonukleotidové sekvence vázané na porézním nosiči a s DBCO navázaným přes spojovací řetězec na 5'-konci (23. baze), nebo s DBCO modifikovanou T-bází na 2., resp. 10. pozici od 3'-konce řetězce. Díky DBCO je umožněn následný click fluorescenční značky reakcí SPAAC.

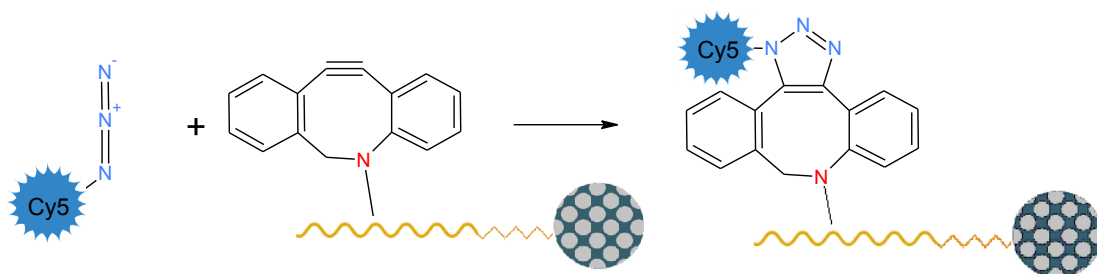


Schéma 4 Značení oligonukleotidu pomocí click chemie

Sledovali jsme vliv koncentrace fluorescenčního barviva a typ použité pevné fáze pro značení oligonukleotidů na třech různých pozicích. Samostatně jsme sledovali vliv doby reakce na efektivitu značení.

4. Experimentální část

4.1 Metodika

4.1.1 Chemikálie a použité přístroje

4.1.1.1 Chemikálie

- Cyanine5 azid (Cy5) – 25 mg v pevné formě, kat. č. D3030 (Lumiprobe, Německo)
- tetrahydrofuran (THF) bez stabilizátoru, pro HPLC, $\geq 99,9\%$, (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), sušený pomocí PureSolv MICRO Solvent Purification Systems,
- pevné fáze s nasyntetizovanými a nedeprotektovanými řetězci oligonukleotidů modifikovanými pomocí DBCO (ON) – viz 4.1.1.3 (Generi Biotech, Česko),
- deprotekční činidlo 1 (0,05M roztok K_2CO_3 v MeOH) – příprava viz 4.1.2,
- deprotekční činidlo 2 (32% vodný roztok NH_3) – (Merck, Německo),
- methanol (MeOH) – pro HPLC, gradient grade, $\geq 99,9\%$ (VWR Chemicals, Francie),
- roztok pro výměnu K^+ iontů za Na^+ (0,15M roztok octanu sodného ve vodě) – příprava viz 4.1.2,
- uH_2O – demineralizovaná purifikovaná voda s použitím pro HPLC, vyráběna pomocí membránového systému Millipore (Merck, Německo),
- triethylaminoacetátový pufr (TEAA) 0,05M – příprava viz 4.1.2,
- CH_3COOH – p.a., $\geq 99,8\%$ (Sigma Aldrich, St. Louis, USA),
- triethylamin bezvodý (TEA) (Fluorochem Ltd, Hadfield, UK),
- acetonitril (ACN) – pro HPLC, gradient grade, $\geq 99,9\%$, (Sigma Aldrich, St. Louis, USA; VWR Chemicals, Francie).

4.1.1.2 Přístroje a laboratorní zařízení

- Analytické váhy – AT21 Comparator FACT, $d = 0,001$ mg (Mettler Toledo, Belgie),

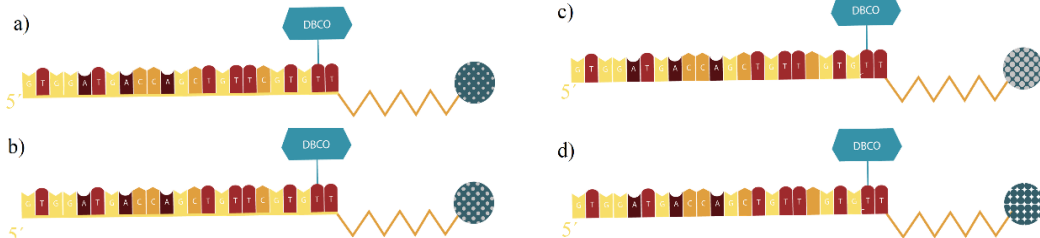
- analytické váhy – ABJ-NM/ABS-N, d = 0,1 mg (KERN, Německo),
- třepačka – Vibramax 100 (Heidolph, Německo),
- kolonky pro SEC – CentriPure N10, Zotadex Gel Filtration Columns (EmpBiotech, Německo),
- vortex – Wizard IR advanced (Velp scientifica, Itálie),
- vakuová centrifuga – Integrated SpeedVac (ThermoFisher, USA)
- rotační odparka s teflonovým nástavcem – Hei-VAP Value Digital (Heidolph, Německo),
- pH metr – (Druopta, Praha, Československo),
- nylonová membrána – 0,22 μm , 47 mm (GVS North America, USA),
- HPLC systém – Shimadzu LC20 chromatograf (DGU-20A3 solvent degasser, dvě binární gradientové pumpy LC-20AD, SIL-20AC autosampler, CTO-20AC termostat, SPD-M20A photodiode array detector (PDA), CBM-20A system controller) (Shimadzu, Kyoto, Japan),
- LabSolutions software 5.3 (Shimadzu, Kyoto, Japan),
- hmotnostní spektrometr – MALDI Autoflex II (Bruker DALTONICS, Německo).

4.1.1.3 *Výchozí oligonukleotidy*

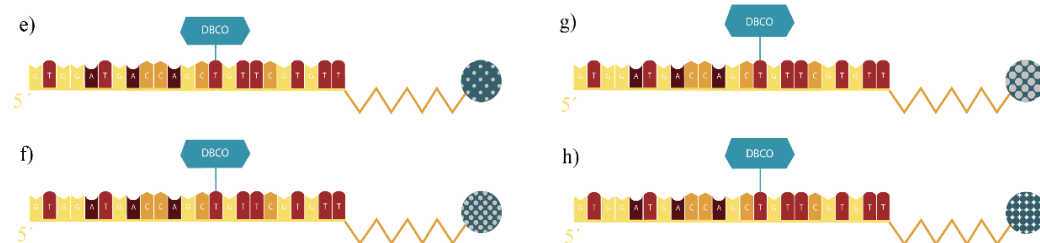
Pro všechny reakce byl použit oligodeoxyribonukleotidový řetězec 23-mer o shodné sekvenci 5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG TT-3', na který byl navázán DBCO ve formě fosforamiditu na 5'-konec řetězce (5') anebo byly použity T báze modifikované DBCO na 2. (3'), respektive 10. pozici (X') od 3'-konce řetězce. Báze jednotlivých nukleotidů byly chráněny sadou UltraMild. Každý typ modifikovaného oligonukleotidového řetězce byl navázán přes linker na jeden ze 4 typů použité pevné fáze (CPG500Å/1000Å/2000Å/HCLPS). Celkem tak bylo zkoumáno 12 druhů nedeprotektovaných oligonukleotidových řetězců modifikovaných DBCO vázaných na pevné fázi (ON). Jejich schématické znázornění je na Obr. 10.



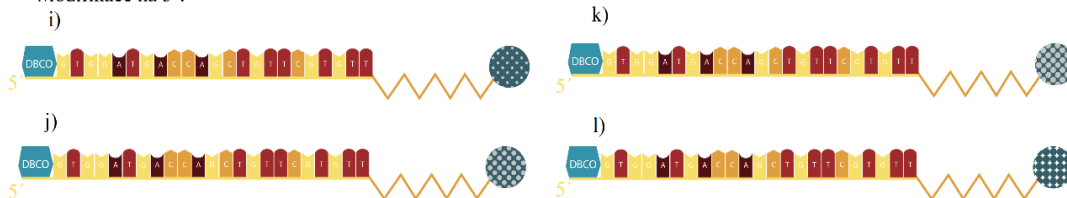
Modifikace na 3':



Modifikace na X':



Modifikace na 5':



Obrázek 10 Schématické znázornění jednotlivých druhů ON: a) 3'-CPG500Å, b) 3'-CPG1000Å, c) 3'-CPG2000Å, d) 3'-HCLPS, e) X'-CPG500Å, f) X'-CPG1000Å, g) X'-CPG2000Å, h) X'-HCLPS, i) 5'-CPG500Å, j) 5'-CPG1000Å, k) 5'-CPG2000Å, l) 5'-HCLPS.

4.1.2 Přípravy roztoků

Roztoky Cy5

Byly připraveny roztoky o čtyřech různých koncentracích navážením krystalické formy Cy5 do tmavých skleněných vialek a rozpuštěním v dostatečném množství THF pro 12 click reakcí prováděné najednou těsně po naředění (Tabulka 4). Kvůli malému

množství fluorescenčního barviva byly reakce se 100mM roztokem prováděné postupně.

Tabulka 4 Navážená a odměřená množství pro přípravu Cy5 roztoků.

| Koncentrace Cy5 [mmol/l] | Objem THF na 1 vzorek [μ l] | Navážka Cy5 [mg] | Celkový objem THF [μ l] |
|--------------------------|----------------------------------|------------------|------------------------------|
| 0,1 | 400 | 0,290 | 4800 |
| 1 | 200 | 1,443 | 2400 |
| 10 | 200 | 14,430 | 2400 |
| 100 | 200 | 12,025 | 200 |

Deprotekční činidlo 1 – připraveno navážením 0,691 g K_2CO_3 , rozpuštěním ve 100 ml MeOH a mícháním na magnetické míchače přes noc,

Roztok $Na^+ CH_3COO^-$ – připraven navážením 1,231 g octanu sodného a rozpuštěním ve 100 ml uH_2O .

TEAA – nejprve byl připraven 2M zásobní roztok smícháním 242 ml uH_2O , 48 ml CH_3COOH a 110 ml TEA. Tato směs byla míchána 48 hodin na magnetické míchače. Poté bylo pomocí TEA upraveno pH na 7,0. Tento roztok byl uchováván v tmavé lahvi. Pro analýzu byl připraven 0,05M roztok odebráním 12,5 ml zásobního roztoku a doplněním v odměrné baňce z tmavého skla o objemu 500 ml po rysku. Před použitím byl tento roztok přefiltrován přes nylonovou membránu.

4.1.3 Značení ON

Do skleněných vialek s neporušeným septem bylo navažováno množství odpovídající 30 nmol loadingu (molárního množství prvního navázaného nukleosidu) jednotlivých ON daných výrobcem. Navažováno bylo s přesností na tisícinu miligramu $\pm 15\%$ (Tabulka 5).

Tabulka 5 Loading a navažované množství dle typu pevné fáze

| typ pevné fáze | loading [nmol/mg] | navazované množství [mg] |
|----------------|-------------------|--------------------------|
| 500 Å CPG | 40 | 0,638 – 0,862 |
| 1000 Å CPG | 27 | 0,944 – 1,277 |
| 2000 Å CPG | 23 | 1,109 – 1,500 |
| 1000 Å HCLPS | 17 | 1,500 – 2,020 |

K naváženým ON bylo přidáváno 200 μ l roztoku Cy5 o koncentracích 1 mM, 10 mM, 100 mM a 400 μ l roztoku Cy5 o koncentraci 0,1 mM. Reakce probíhaly bez přístupu světla za nepřetržitého třepání 24 hodin při teplotě 23 °C.

4.1.4 Derotekce

Po 24 hodinách byl pipetou odebrán roztok nenavázaného fluorescenčního barviva. Konjugát ON s Cy5 na pevné fázi byl ve vialce promyt čistým THF do čira, čirý THF byl poté odpipetován a odpařen za přístupu vzduchu. Na závěr bylo přidáno 500 μ l derotekčního činidla pro UltraMild báze (0,05M roztok K_2CO_3 v MeOH). Derotekce probíhala opět bez přístupu světla za nepřetržitého třepání po dobu 2 hodin.

4.1.5 Čištění

K derotektovaným vzorkům bylo přidáno 500 μ l roztoku $Na^+ CH_3COO^-$. K přečištění výsledných konjugátů byly použity kolonky CentriPure N10 určené k odstranění malých molekul od oligonukleotidů delších než 10 nukleotidů metodou GPC. Kolonky byly nejprve několikrát promyty uH_2O . Celý objem vialky (1000 μ l) byl nanesen skleněnou Pasteurovou pipetou na kolonku o celkovém objemu 1500 μ l. Po vsáknutí vzorku bylo na kolonku naneseo 500 μ l uH_2O , přičemž se eluát nechal odkapávat do odpadní kádinky. Jelikož se oligonukleotidové řetězce o plné délce eluují s čelem mobilní fáze (uH_2O), bylo poté na kolonku naneseo 1000 μ l uH_2O , během níž bylo odebíráno 1000 μ l eluátu do popsané plastové vialky. Ve výsledném eluátu se tak nacházely mobilní fáze (uH_2O) a řetězce oligonukleotidů o délkách blízkých 23

nukleotidům s/bez navázaného barviva Cy5. Pokud došlo k viditelnému zadržení modré frakce při průchodu kolonkou, byla odebrána do další plastové vialky 2., případně 3. frakce.

4.1.6 Příprava vzorků pro analýzu

Eluát nasbíraný do plastových vialek byl odpařen v centrifuze za vakua ($T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 500\text{ kPa}$, $T = 6\text{ h}$, provedeno v Generi Biotech). Poté bylo k odparkům přidáno 60 μl uH_2O a vzorky byly rozpuštěny za pomoci třepání ve vortexu po dobu 5 minut. Takto vzniklé roztoky byly přeneseny do skleněných vialek (ND8, 1,5 ml) s inserty určenými pro HPLC a následně byly analyzovány.

4.1.7 HPLC analýza

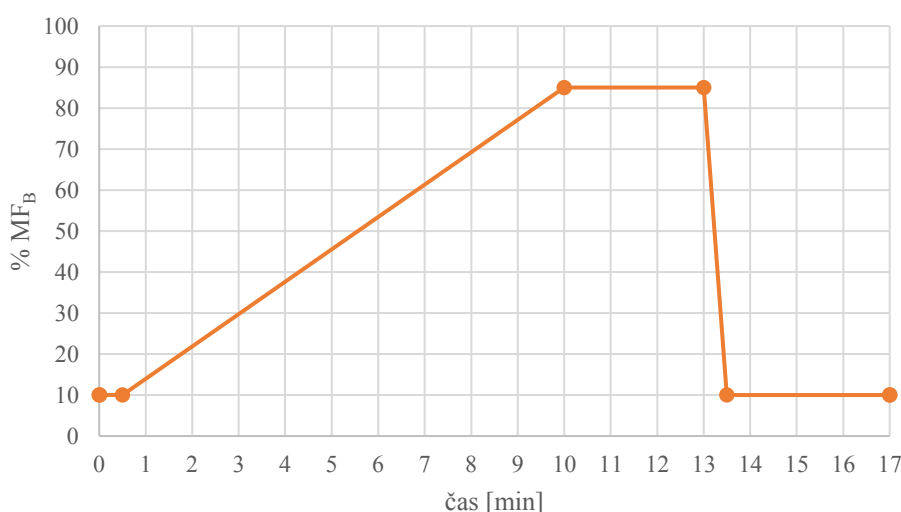
Oligonukleotidy i Cy5 mají svá charakteristická UV-spektra, pro detekci tedy byla použita analýza pomocí HPLC s UV detekcí při 260 nm (Grafy 2, 3 a 4).

Mobilní fáze: MF_A – 50 mM TEAA, MF_B – ACN.

Kolona: Clarity[®] Oligo-RP[™] 3 μm , 4,6 x 100 mm (Phenomenex, USA).

Metoda: 50 mM TEAA:ACN, gr. 10-85 %, 17 min (Graf 1).

HPLC chromatografie byla využita i k semipreparaci připravovaných sond pro jejich následnou charakterizaci pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. MS analýza byla provedena v Generi Biotech.

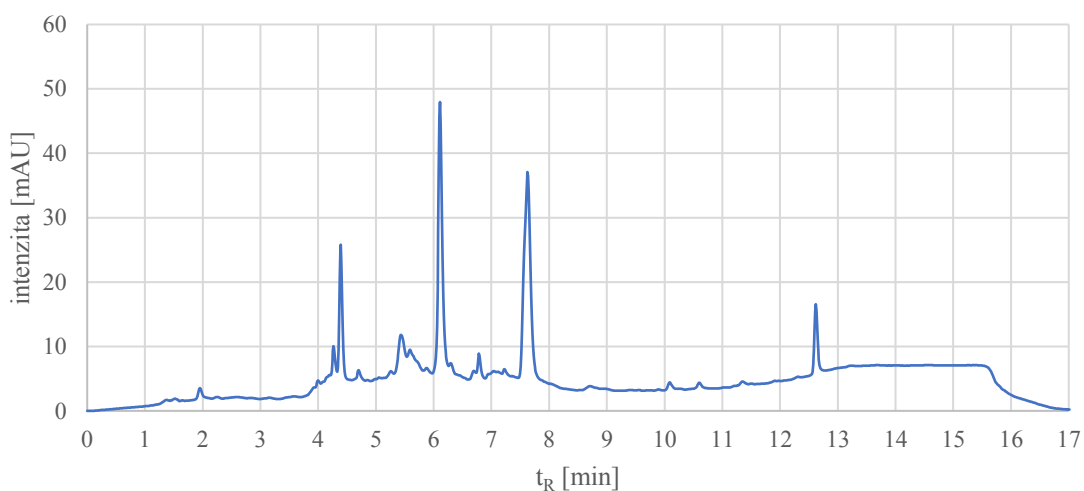


Graf 1 Průběh gradientové eluce při HPLC analýze. Křivka znázorňuje % zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi během analýzy.

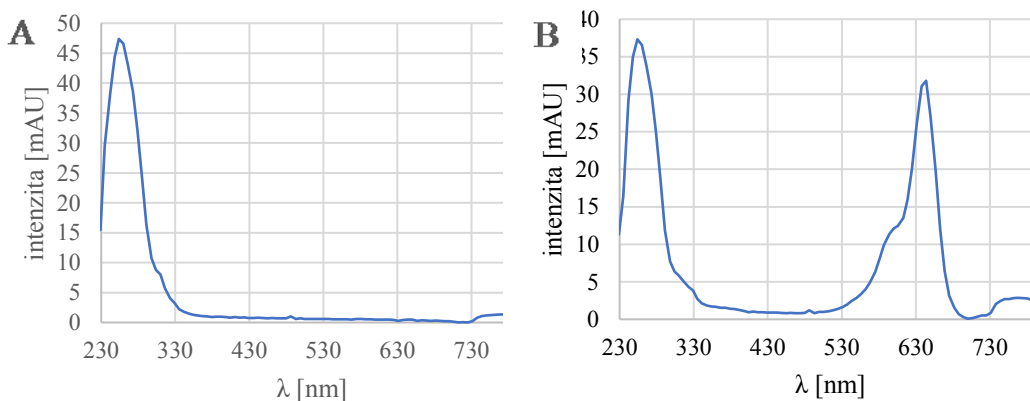
4.1.8 Vyhodnocení

Analýza výsledků byla provedena pomocí programu LabSolutions a MSExcel. Na výsledných chromatogramech byla integrována plocha pod křivkou píků oligonukleotidů modifikovaných DBCO s navázaným Cy5 (ONS) a oligonukleotidů modifikovaných DBCO bez navázaného Cy5 (ON). Z poměru ploch těchto dvou píků byla vypočítána procentuální efektivita reakce dle této rovnice:

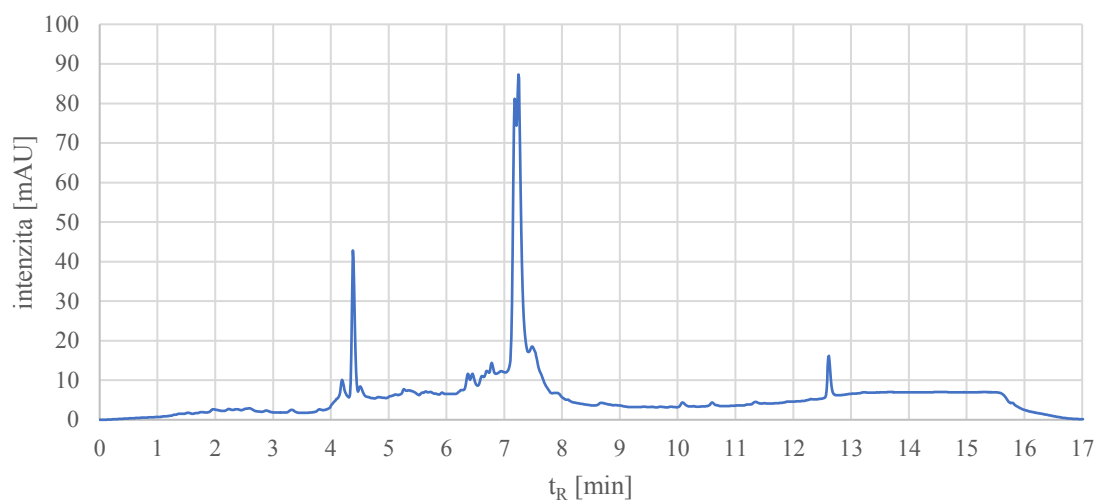
$$\% = \frac{AUC_{ONS}}{AUC_{ON} + AUC_{ONS}} \times 100$$



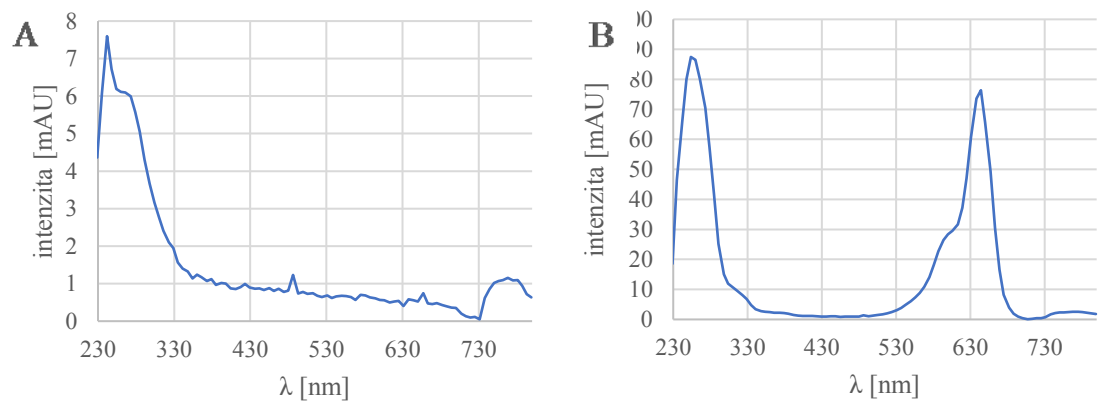
Chromatogram 1 Příklad chromatogramu pro ONS s modifikací na 2. pozici od 3'-konce (3'). Sledované píky: ON ($t_R = 6,095$ min), ONS ($t_R = 7,678$ min).



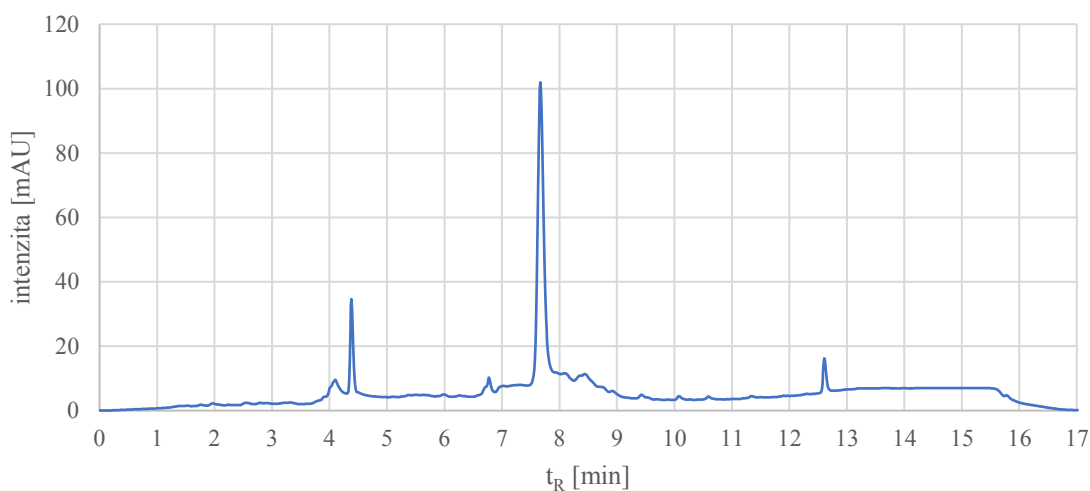
Graf 2 UV spektra sledovaných píků v Chromatogramu 1 (pás pro oligonukleotid v okolí 260 nm, pás pro Cy5 v okolí 650 nm). A – UV spektrum ON, B – UV spektrum ONS.



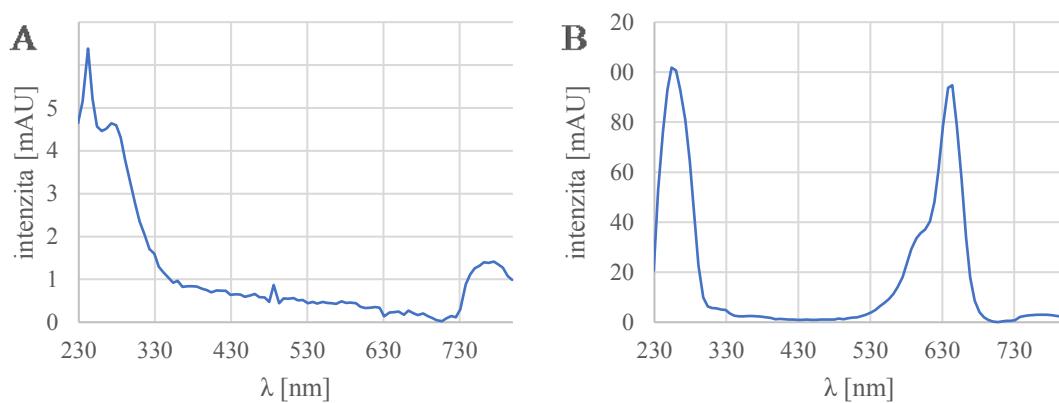
Chromatogram 2 Příklad chromatogramu pro ONS s modifikací na 10. pozici od 3'-konce (X'). Sledované piky: ON ($t_R = 6,095$ min), ONS ($t_R = 7,227$ min).



Graf 3 UV spektra sledovaných piků (pás pro oligonukleotid v okolí 260 nm, pás pro Cy5 v okolí 650 nm). A – UV spektrum ON, B – UV spektrum ONS.



Chromatogram 3 Příklad chromatogramu pro ONS s modifikací na 5'-konci (5'). Sledované piky: ON ($t_R = 6,095$ min), ONS ($t_R = 7,678$ min).



Graf 4 UV spektra sledovaných piků (pás pro oligonukleotid v okolí 260 nm, pás pro Cy5 v okolí 650 nm). A – UV spektrum ON, B – UV spektrum ONS.

4.2 Výsledky

4.2.1 Úprava deprotekčních podmínek

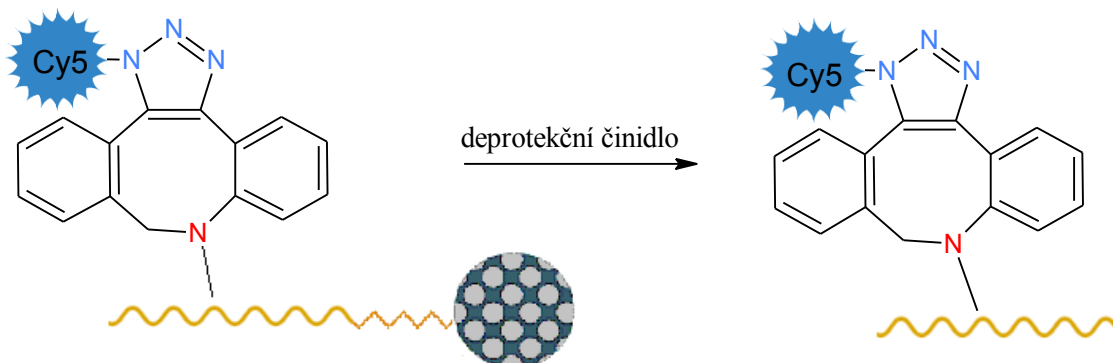


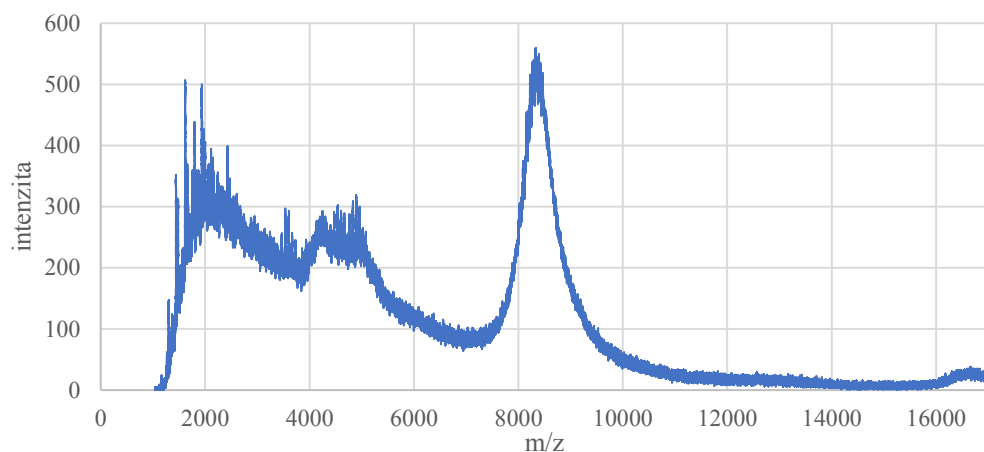
Schéma 5 Odštěpení oligonukleotidové sondy z pevné fáze

Pro nalezení vhodných deprotekčních podmínek byl použit roztok Cy5 o koncentraci 1 mM a 3 navážky ON (5'-CPG500Å). Postup byl dodržen dle metodiky (4.1.3. – 4.1.7.) s tím rozdílem, že jako deprotekční činidlo byl použit u jednoho vzorku roztok NH_3 a deprotektce probíhala 2 nebo 4 hodiny (Tabulka 6). Pro kontrolu byl použit oligonukleotid chráněný normální sadou, na jehož deprotektci byl použit roztok NH_3 na 1 hodinu. Po deprotektci bylo ke všem vzorkům přidáno 500 μl H_2O místo roztoku $\text{Na}^+ \text{CH}_3\text{COO}^-$. Eluát (1 ml modré frakce) byl sbírán do 4ml vialek a poté odpařen na odparce s teflonovým nástavcem.

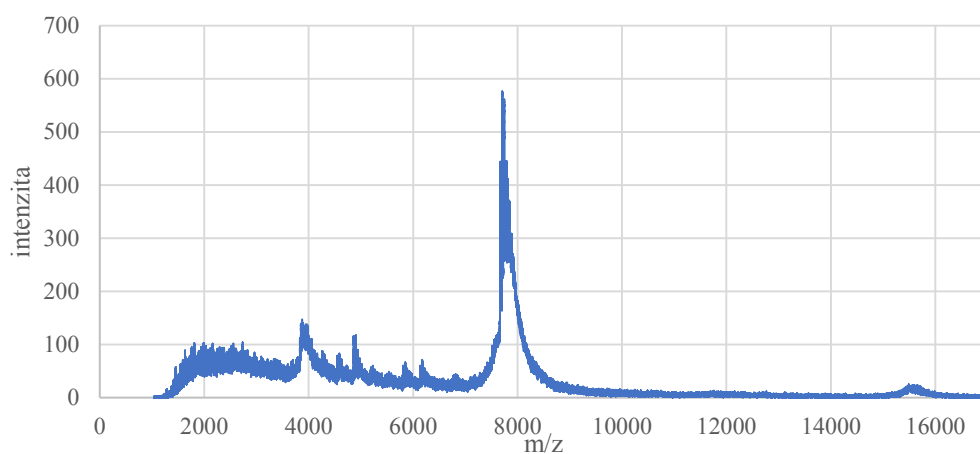
Tabulka 6 Zkoušené deprotekční podmínky

| deprotekční činidlo | čas deprotektce [h] |
|-------------------------|---------------------|
| NH_3 | 1 (kontrola) |
| NH_3 | 2 |
| K_2CO_3 | 2 |
| K_2CO_3 | 4 |

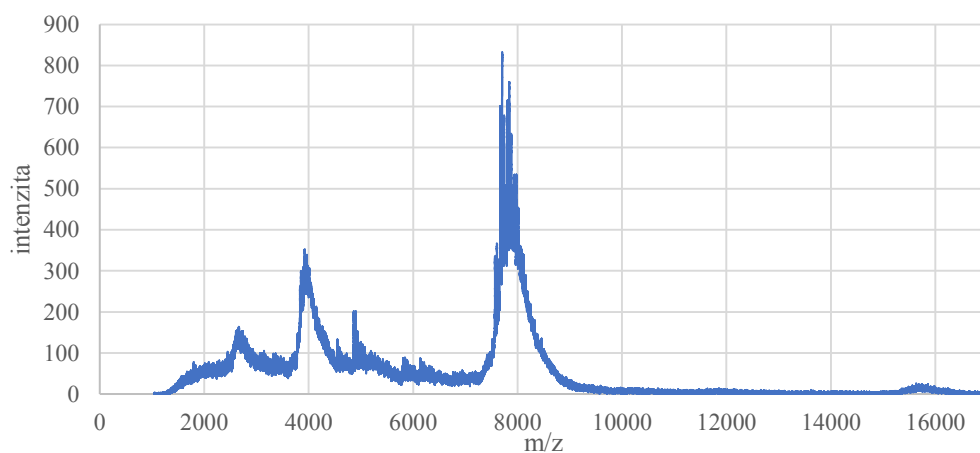
HPLC analýza byla použita zároveň pro semipreparaci. Nástřík analytu byl zvýšen na 20 μl , frakce hlavního píku (7,8 min pro kontrolní vzorek, 7,6 min pro ostatní) byla jímána do skleněné zkumavky a odpařena na odparce s teflonovým nástavcem. Frakce byly následně charakterizovány pomocí MALDI-TOF MS (Graf 5, 6, 7 a 8).



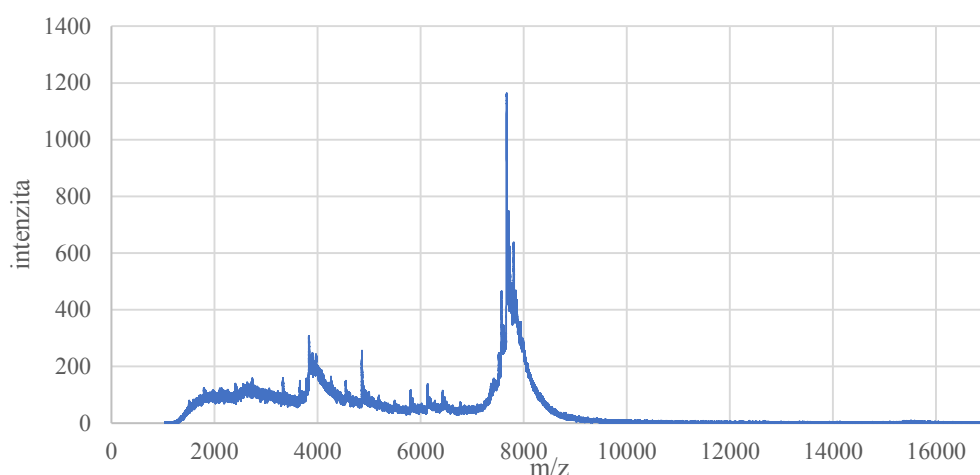
Graf 5 Hmotnostní spektrum kontrolního vzorku po deprotekcí amoniakem 1 hodinu.



Graf 6 Hmotnostní spektrum vzorku po deprotekcí amoniakem 2 hodiny.



Graf 7 Hmostnostní spektrum vzorku po deprotekcí K_2CO_3 2 hodiny.

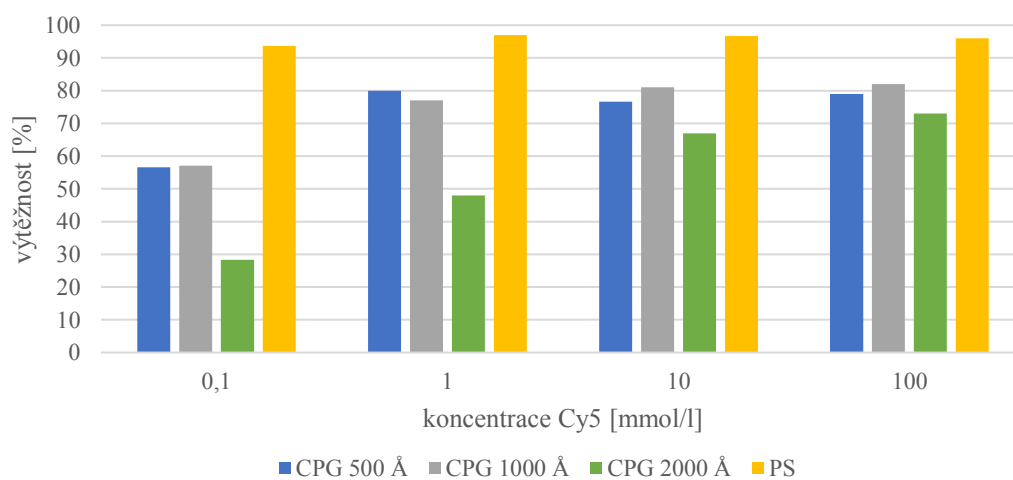


Graf 8 Hmotnostní spektrum vzorku po deprotekcí K_2CO_3 4 hodiny.

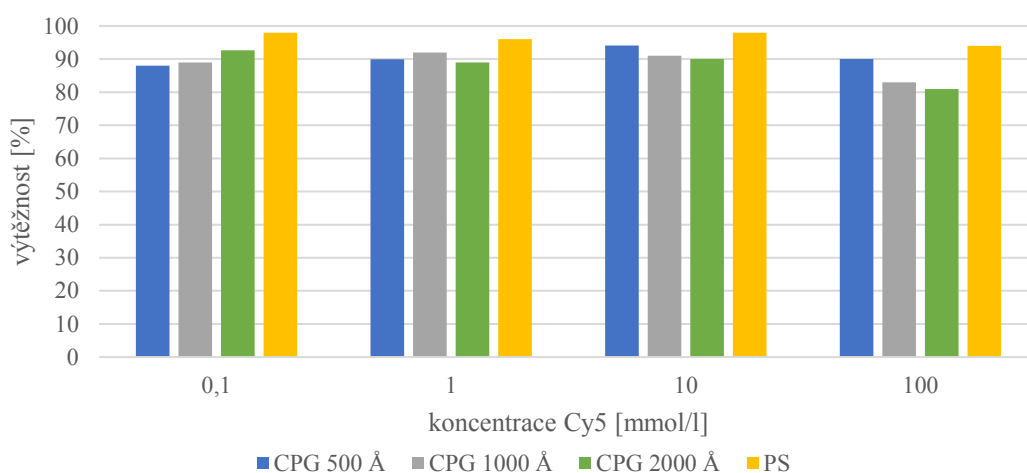
4.2.2 Optimalizace značení

Pro každý typ ON byla provedena click reakce s roztokem Cy5 ve čtyřech různých koncentracích. Postup byl dodržen dle metodiky. Byl sledován vliv použité pevné fáze a koncentrace Cy5 na efektivitu značení na 3 různých pozicích řetězce (3', X', 5'). Pro koncentrace Cy5 0,1 – 10 mM byla provedena 2 opakování.

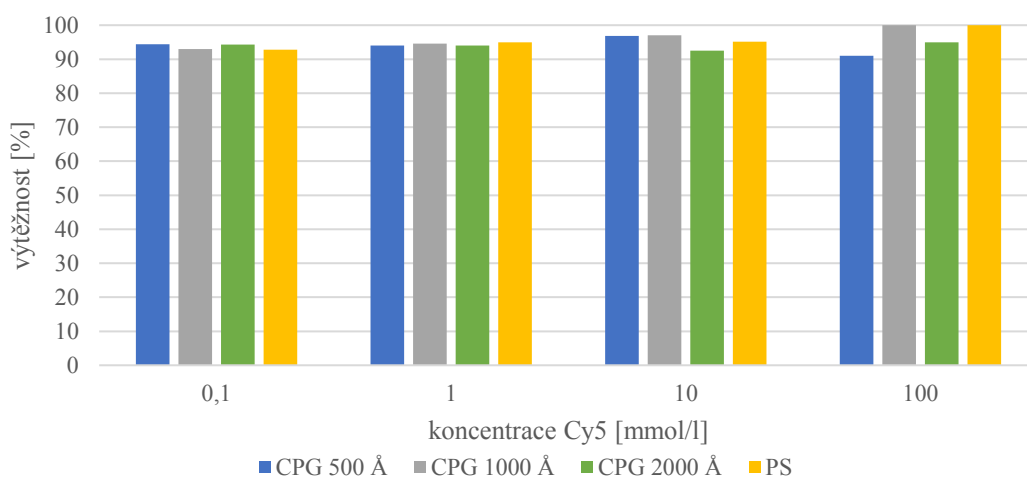
Shrnuté výsledky pro jednotlivé pozice jsou uvedeny níže (Graf 9, 10 a 11). Výsledné hodnoty ploch píků pod křivkou, retenčních časů a vypočtených výtěžků jsou uvedeny v Seznamu příloh (Příloha 1), včetně vypočtených aritmetických průměrů z obou sérií.



Graf 9 Výtěžnost click reakce na 3'-konci řetězce.



Graf 10 Výtěžnost click reakce na X'-pozici

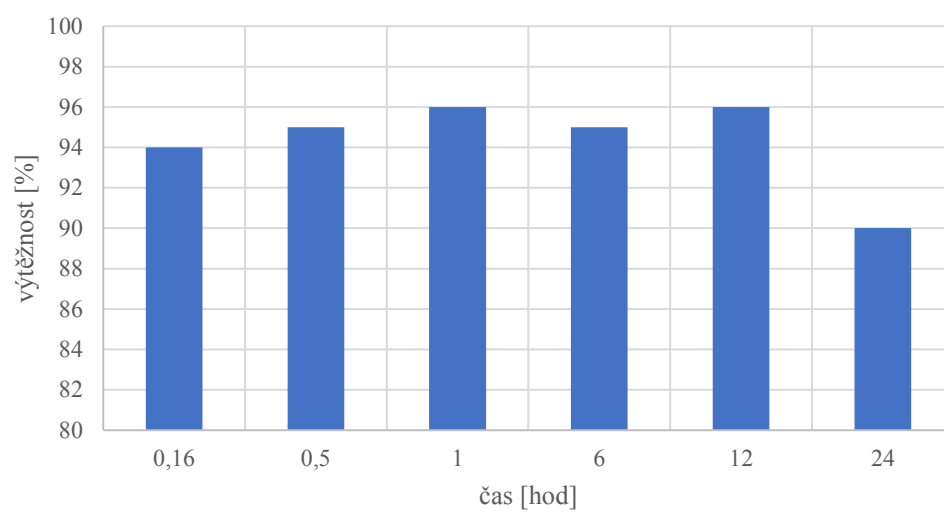


Graf 11 Výtěžnost click reakce na 5'-konci řetězce

4.2.3 Optimalizace doby reakce

V další části byl vybrán konkrétní ON (5'-CPG500Å) a koncentrace Cy5 (1 mM), a byl sledován pouze vliv času. Byl dodržen postup dle metodiky kromě času reakce, která probíhala 10 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h nebo 24 h. Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

Shrnuté výsledky jsou uvedeny níže (Graf 12). Výsledné hodnoty ploch píků pod křivkou, retenčních časů a vypočtených efektivit jsou uvedeny v Seznamu příloh (Příloha 2), včetně vypočtených aritmetických průměrů z obou sérií.



Graf 12 Vliv doby reakce na efektivitu značení DBCO modifikovaného oligonukleotidu na CPG 500 Å, při koncentraci Cy5 1 mmol/l.

5. Diskuze

Výhodou postsyntetického značení by měla být nižší spotřeba fluorescenčního barviva a jeho ochrana před extrémními reakčními podmínkami během syntézy oligonukleotidového řetězce (přídavek kyseliny trichloroctové, oxidace jódem). To se projeví zejména pokud je fluorofor nutné umístit na 3'-konec řetězce nebo některou další bázi uprostřed řetězce, na níž by syntetickým cyklem musel projít vícekrát.

Tato práce ověřuje možnost použití postsyntetického značení oligonukleotidů na pevné fázi pomocí click chemie. Cílem bylo definovat optimální typ pevné fáze a koncentraci fluorescenčního barviva Cy5 pro jeho konjugaci na 3 různé pozice oligonukleotidového řetězce. Samostatně jsme sledovali také vliv času reakce. Nejprve však bylo nutné upravit podmínky deprotektce.

5.1 Optimalizace deprotektce

Co se týká ochrany fluorescenčního barviva před náročnými reakčními podmínkami, v experimentu jsme se nevyhnuli slabě bazickému prostředí při deprotektci. Přestože nukleotidy byly chráněny sadou UltraMild, které postačují mírnější podmínky pro odchránění, než je běžné (místo hydroxidu sodného byl použit roztok K_2CO_3 v MeOH), vyskytly se problémy se stabilitou fluorescenčního barviva. Standardní doba deprotektce dle literatury a předchozích zkušeností skupiny byla 8 hodin, avšak po této době došlo k naprosté degradaci Cy5 a viditelné změně zbarvení z modré na žlutou. Proto byly zkoumány podmínky deprotektce.

Byl vybrán jeden typ ON, který byl z předchozích výsledků výzkumné skupiny vyhodnocen jako nejlepší (5'-CPG500Å) a 1mM koncentrace Cy5, která se ukázala jako dostačující. Jako deprotektční činidlo byl použit NH_3 s časem zkráceným na 2 hodiny a roztok K_2CO_3 v MeOH s časem zkráceným na 2 nebo 4 hodiny. Pro porovnání sloužily ONS chráněné normální sadou deprotektované NH_3 po dobu 1 hodiny. Po této době dojde k odštěpení řetězce od pevné fáze, ale ne k odchránění labilních skupin (viz Graf 5). Při deprotektci ONS po dobu 2 hodin rozkládal NH_3 více než K_2CO_3 a zároveň deprotektce K_2CO_3 po dobu 4 hodin vedla k většímu rozkladu ONS než po 2 hodinách (viz Graf 6, 7, 8). Jako nejvhodnější kombinace podmínek byl tedy vybrán roztok K_2CO_3 v MeOH s časem deprotektce 2 hodiny.

Alternativou by bylo provést konjugaci barviva s oligonukleotidovým řetězcem až po deprotekcii, tedy v roztoku. V takovém případě je ale komplikovanější separace hotového konjugátu od nadbytečného množství fluorescenčního barviva. Během experimentu jsme využívali oligonukleotidových řetězců ukotvených na pevné fázi, tudíž roztok nadbytečného barviva mohl být jednoduše odpipetován po jeho dekantaci. To po provedení deprotekce není možné, neboť během ní dochází zároveň k odštěpení oligonukleotidového řetězce z pevné fáze. Řešením by mohl být linker, který by se štěpil za jiných, než bazických podmínek a tyto kroky by probíhaly na sobě nezávisle.

5.2 Typ pevné fáze

Vhodný typ pevné fáze je nutné vybírat dle pozice značení na oligonukleotidovém řetězci. Nejčastější a také nejjednodušší je značení na 5'-konci řetězce. Výtěžnost reakce pro tuto pozici přesahovala 90 % u všech použitých pevných fázích (CPG500Å, CPG1000Å, CPG2000Å, HCLPS) a v celém rozsahu použitých koncentrací (0,1-100 mM). Obtížnější značení bývá na pozicích blíže k ukotvení k pevné fázi. Opět bychom se tu mohli zabývat možností značení v roztoku po deprotekcii. V takovém případě by pozice značení neměla mít na efektivitu takový vliv.

V námi zvoleném provedení se však ukázalo, že i pro značení na 10. pozici od 3'-konce řetězce (X') je efektivita vysoká. Při použití všech typů pevných fází se hodnoty výtěžnosti pohybovaly v rozmezí 80–100 %, přičemž horní hranice dosahovaly zejména oligonukleotidy vázané na polystyrenové pevné fázi.

V případě značení na 2. pozici od 3'-konce řetězce pak už polystyrenová pevná fáze výrazně převyšuje ve výsledcích všechny ostatní. Jako jediná umožňuje výtěžnost přes 90 % (94-97 %), a to při všech použitých koncentracích. U CPG (500Å, 1000Å, 2000Å) pevných fází lze pozorovat rostoucí tendenci dle použité koncentrace, efektivita značení však dosahuje sotva 80 % pro nejkonzentrovanejší roztok Cy5 (konkrétně bylo dosaženo 80, 82 a 73 % efektivit).

Obecně lze říci, že nejvhodnější pevnou fází je HCLPS, a to pro značení na všech pozicích oligonukleotidového řetězce. Pro značení na 5'-konci oligonukleotidu lze použít všechny testované pevné fáze.

5.3 Koncentrace fluorescenčního barviva

Běžně používaná koncentrace Cy5 pro značení efekt v praxi pohybuje okolo 100 mM, Z prvních experimentů však bylo zjištěno, že by měla být dostatečná koncentrace násobně nižší. Proto byl stanoven zkoumaný rozsah koncentrací ve značně širší, po desetinásobcích od 100 μ M do 100 mM.

Z výsledků je evidentní, že u většiny použitých ON postačuje pro kvantitativní průběh reakce i nejnižší použitá koncentrace (100 μ M). Pouze pro značení na 3'-konci bylo možné zvýšit efektivitu použitím více koncentrovaného roztoku Cy5. Pro značení na 5'-konci nemá koncentrace Cy5 na efektivitu žádný významný vliv. Efektivita konjugace je pravděpodobně maximální již při 100 μ M koncentraci Cy5 a použití koncentrovanějšího roztoku ji nezvýší. U některých ON je ale tendence dokonce opačná a 100mM koncentrace se jeví jako příliš vysoká (X'-CPG1000Å, X'-CPG2000Å). Důvodem by mohl být rozklad Cy5 právě z důvodu vysoké koncentrace.

Nutno však zdůraznit, že se 100mM Cy5 byla provedena pouze 1 série opakování, tudíž výsledky nemusejí být zcela validní. Důvodem bylo omezené množství a vysoká cena fluorescenčního barviva.

5.4 Čas click reakce

Pro sledování výše uvedených aspektů byla doba click reakce nadhodnocena na 24 hodin, aby bylo zajištěno kompletní proběhnutí reakce. Poté byl vybrán jeden konkrétní ON (5'-CPG500Å) a koncentrace Cy5 (1 mM), a byl sledován pouze vliv času.

Ve zjištěných výsledcích můžeme sledovat mírně vzrůstající tendenci mezi 10 minutami a 1 hodinou (94–96 %), naopak po 24 hodinách dochází k výraznějšímu poklesu efektivit (přibližně o 5 %), což by mohlo poukazovat na rozklad Cy5 nebo celé ONS. Hodnota 79 % výtěžnosti je však pravděpodobně odchylka způsobená chybou. Po vyřazení této hodnoty a zahrnutí hodnot předchozích měření by se výtěžnost pohybovala kolem 94 %, což by znamenalo, že je ve všech měřených časech téměř konstantní.

Pro lepší porozumění kinetiky reakce by bylo vhodné nechat reakci probíhat i kratší dobu, než 10 minut. Kratší časové úseky by ovšem bylo lepší optimalizovat až po převedení značící metody na syntetizér.

5.5 Vyhodnocení

Na chromatogramech lze pozorovat zdvojené píky (Chromatogram 2). Ty jsou způsobeny přítomností izomerů, které vznikají během click reakce. Podle chromatogramů se ve vzorku vyskytovalo také malé množství ON nemodifikovaných DBCO. Jejich píky jsme sledovali, měly odlišný retenční čas i UV-spektrum. Plocha těchto píků do výpočtu zahrnuta nebyla, neboť u nich click reakce nebyla možná, a došlo by tak ke zkreslení výsledků. Jejich plochy v chromatogramu tvořily zhruba 0-10 %, ale nevysledovali jsme žádný výraznější trend s ohledem na typ pevné fáze či pozice modifikace.

6. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo najít optimální podmínky konjugace oligonukleotidu s fluorescenčním barvivem pomocí click chemie na pevné fázi. Byly k tomu použity oligonukleotidové 23- mery modifikované na třech různých pozicích (2. a 10. báze od 3'-konce nebo na 5'-konci oligonuklotidového řetězce), vázané na čtyřech typech pevné fáze (CPG500Å, CPG1000Å, CPG2000Å, HCLPS). Celkem tak bylo vytvořeno 12 různých typů oligonukleotidových sond.

Za značící molekulu bylo vybráno tradiční fluorescenční barvivo Cyanine5, které bylo do reakce přidáváno v roztoku o koncentracích v rozmezí 0,1 – 100 mmol/l. Reakce probíhaly 24 hodin, ale v další části experimentální práce bylo zjištěno, že dostatečné efektivity je dosaženo již při době reakce 10 minut (94 %, 5'-CPG500Å, 1mM Cy5).

Také byly upraveny podmínky deprotektce. Bylo zachováno používané UltraMild deprotektční činidlo, ale doba deprotektce byla zkrácena na 2 hodiny, neboť během standardních 8 hodin docházelo k viditelnému rozkladu fluorescenčního barviva.

Nejvyšší výtěžnost poskytovaly reakce probíhající na polystyrenové pevné fázi, a to při značení na všech pozicích řetězce. Pro značení na 5'-konci řetězce bylo dosaženo víc než 90% efektivity při použití všech námi testovaných pevných fází. Dále bylo zjištěno, že pro click reakci postačuje koncentrace fluorescenčního barviva 100× nižší, než je běžně používaná, což ukazuje její potenciál pro zavedení do praxe.

7. Seznam citované literatury

- ¹ SPONK. *Linkage of the nucleobases C, G, A and U to the ribose phosphat backbone of RNA*. Online. Wikipedia, 2010. Dostupné z <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:RNA-Nucleobases.svg>. [Cit.2023-07-14].
- ² MICHELSON, A. M.; TODD, A. *Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3',5'-internucleotidic linkage*. J Chem Soc., 1955, s. 2632-2638.
- ³ KHORANA, H. G. *Synthesis in the study of nucleic acids. The fourth jubilee lecture*. Biochem J., 1968, vol. 109, s. 709-725.
- ⁴ KHORANA, H. G. *Total synthesis of a gene*. Science, 1979, vol. 203, no. 4381, s. 614-625.
- ⁵ LETSINGER, R. L.; LUNSFORD, W. B. *Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates*. J Am Chem Soc, 1976, vol. 98, no. 12, s. 3655-3661.
- ⁶ BEAUCAGE, S. L.; IYER R. P. *Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach*. Tetrahedron, 1992, vol. 48, s. 2223-2311.
- ⁷ BEAUCAGE, S. L.; IYER R. P. *The functionalization of oligonucleotides via phosphoramidite derivatives*. Tetrahedron, 1993, vol. 49, no. 10, s. 1925-1963.
- ⁸ BEAUCAGE, S. L.; IYER R. P. *The synthesis of modified oligonucleotides by the phosphoramidite approach and their applications*. Tetrahedron, 1993, vol. 49, no. 28, s. 6123-6194.
- ⁹ ERITJA, R.; DE GRUYTER, W. *Modifications and Conjugates for Biomedicine and Nanotechnology*. Online. [Nucleic Acids Chemistry]: ProQuest Ebook Central, 2021. Dostupné z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/cuni/detail.action?docID=6473650>. [Cit.2023-07-14].
- ¹⁰ BEAUCAGE, S.; CARUTHERS, M. H. *Deoxynucleoside phosphoramidites—a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis*. Tetrahedron lett, 1981, vol. 22, no. 20, s. 1859-1862.
- ¹¹ DOLEŽALOVÁ, P. *Syntetická biologie a její význam pro molekulární diagnostiku*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2021.
- ¹² PASELK, R. A. *Oligonucleotide synthesis, a practical approach*. Biochem Mol Biol Educ., 1987, vol. 15, s. 52., edited by M. J. Gait. IRL Press. Oxford. 1984, s. 217.
- ¹³ VERMA, S.; ECKSTEIN F. *Modified oligonucleotides: synthesis and strategy for users*. Annu Rev Biochem, 1998, vol. 67, s. 99-134.
- ¹⁴ LÖNNBERG, H. *Synthesis of oligonucleotides on a soluble support*. Beilstein J Org Chem, 2017, vol. 13, s. 1368-1387.
- ¹⁵ CHERUVALLATH, Z. S.; COLE, D. L.; RAVIKUMAR V. T. *A novel solid support for synthesis of oligonucleotide 3'-phosphorothioate monoesters*. Bioorg Med Chem Lett, 2003, vol. 13, no. 2, s. 281-284.
- ¹⁶ FARRE, C.; LANSALOT, M.; BAZZI, R.; ROUX, S. et al. *Automated oligonucleotide solid-phase synthesis on nanosized silica particles using nano-on-micro assembled particle supports*. Langmuir, 2010, vol. 26, no. 7, s. 4941-4950.
- ¹⁷ MENDONCA, A. J.; XIAO, X. Y. *Optimization of solid supports for combinatorial chemical synthesis*. Med Res Rev, 1999, vol. 19, no. 5, s. 451-462.
- ¹⁸ APPLIED BIOSYSTEMS. *DNA/RNA Synthesizers, Models 392 and 394, User's Manual*. Online. Dostupné z https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_095578.pdf. [Cit.2023-07-14].
- ¹⁹ REDDY, M. P.; HANNA, N. B.; FAROOQUI, F. *Ultrafast Cleavage and Deprotection of Oligonucleotides Synthesis and Use of CAC Derivatives*. Nucleos Nucleot Nucleic Acids, 1997, vol. 16, s. 1589-1598.
- ²⁰ KOSTELANSKÝ, F. *Výzkum látek ovlivňujících teplotu tání oligonukleotidových sond*. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2023.
- ²¹ MULLAH, B.; ANDRUS, A. *Automated synthesis of double dye-labeled oligonucleotides using tetramethylrhodamine (TAMRA) solid supports*. Tetrahedron lett, 1997, vol. 38, no. 33, s. 5751-5754.
- ²² GILLET, L. C.; ALZEER, J.; SCHÄRER O. D. *Site-specific incorporation of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-acetylaminofluorene (dG-AAF) into oligonucleotides using modified 'ultra-mild' DNA synthesis*. Nucleic Acids Res, 2005, vol. 33, no. 6, s. 1961-1969.
- ²³ NOLAN, T.; HUGGETT, J.; SANCHEZ, E. et al. *Good practice guide for the application of quantitative PCR (qPCR)*. LGC, 2013.
- ²⁴ ŠTĚRBOVÁ, P. *Využití chromatografických metod ve farmaceutické analýze*. Přednáška, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 2020.
- ²⁵ FRANCIS, A. J.; RESENDIZ, M. J. E. *Protocol for the Solid-phase Synthesis of Oligomers of RNA Containing a 2'-O-thiophenylmethyl Modification and Characterization via Circular Dichroism*. J Vis Exp (125), 2017.
- ²⁶ SPRING-CONNELL, A. M.; EVICH, M.; GERMANN, M. W. *NMR Structure Determination for Oligonucleotides*. Curr Protoc Nucleic Acid Chem, 2018, vol. 72, no. 1, kap. 7.28.21-27.28.39.
- ²⁷ LI, Z.; DOU, X.; NI, Y.; CHEN, Q. et al. *Is pulsed electric field still effective for RNA separation in capillary electrophoresis?* J Chromatogr A, 2012, vol. 1229, s. 274-279.
- ²⁸ MINKNER, R.; BOONYAKIDA, J.; PARK, E. Y.; WÄTZIG, H. *Oligonucleotide separation techniques for purification and analysis: What can we learn for today's tasks?* Electrophoresis, 2022, vol. 43, no. 23-24, s. 2402-2427.
- ²⁹ COULL, J. M.; WEITH, H. L.; BISCHOF, R. *A novel method for the introduction of an aliphatic primary amino group at the terminus of synthetic oligonucleotides*. Tetrahedron, 1986, vol. 27, s. 3991-3994.
- ³⁰ COOK, A. F.; VUOCOLO, E.; BRAKEL, C. L. *Synthesis and hybridization of a series of biotinylated*

- oligonucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, no. 9, s. 4077-4095.
- ³¹ MANOHARAN, M.; JOHNSON, L. K.; BENNETT, C. F.; VICKERS, T. A. et al. *Cholic acid-oligonucleotide conjugates for antisense applications*. *Bioorg Med Chem Lett*, 1994, vol. 4, no. 8, s. 1053-1060.
 - ³² PÉREZ-RENTERO, S.; KIELLAND, N.; TERRAZAS, M.; LAVILLA, R. et al. *Synthesis and properties of oligonucleotides carrying isoquinoline imidazo[1,2-a]azine fluorescent units*. *Bioconjug Chem*, 2010, vol. 21, no. 9, s. 1622-1628.
 - ³³ GUZAEV, A.; SALO, H.; AZHAYEV, A.; LÖNNBERG, H. *Novel non-nucleosidic building blocks for the preparation of multilabeled oligonucleotides*. *Bioconjug Chem*, 1996, vol. 7, no. 2, s. 240-248.
 - ³⁴ MANOHARAN, M.; GUINOSSO, C. J.; COOK, P. D. *Novel functionalization of the sugar moiety of nucleic acids for multiple labeling in the minor groove*. *Tetrahedron Lett*, 1991, vol. 32, no. 49, s. 7171-7174.
 - ³⁵ SPROAT, B. S.; BEIJER, B.; RIDER, P.; NEUNER, P. *The synthesis of protected 5'-mercapto-2',5'-dideoxyribonucleoside-3'-O-phosphoramidites; uses of 5'-mercapto-oligodeoxyribonucleotides*. *Nucleic Acids Res*, 1987, vol. 15, no. 12, s. 4837-4848.
 - ³⁶ SINHA, N. D.; COOK, R. M. *The preparation and application of functionalised synthetic oligonucleotides: III. Use of H-phosphonate derivatives of protected amino-hexanol and mercapto-propanol or -hexanol*. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, no. 6, s. 2659-2669.
 - ³⁷ ANSORGE, W.; ROSENTHAL, A.; SPROAT, B.; SCHWAGER, C. et al. *Non-radioactive automated sequencing of oligonucleotides by chemical degradation*. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16, no. 5, s. 2203-2206.
 - ³⁸ ALLABUSH, F.; MENDES, P. M.; TUCKER, J. H. R. *Acrylamide-dT: a polymerisable nucleoside for DNA incorporation*. *RSC Advances*, 2019, vol. 9, no. 54, s. 31511-31516.
 - ³⁹ KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. *Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions*. *Angew Chem Int Ed*, 2001, vol. 40, no. 11, s. 2004-2021.
 - ⁴⁰ MARCHÁN, V.; ORTEGA, S.; PULIDO, D.; PEDROSO, E. et al. *Diels-Alder cycloadditions in water for the straightforward preparation of peptide-oligonucleotide conjugates*. *Nucleic Acids Res*, 2006, vol. 34, no. 3, s. 24.
 - ⁴¹ GRAHAM, D.; GRONDIN, A.; MCHUGH, C.; FRUK, L. et al. *Internal labeling of oligonucleotide probes by Diels-Alder cycloaddition*. *Tetrahedron Lett*, 2002, vol. 43, s. 4785-4788.
 - ⁴² EL-SAGHEER, A. H.; CHEONG V. V.; BROWN, T. *Rapid chemical ligation of oligonucleotides by the Diels-Alder reaction*. *Org Biomol Chem*, 2011, vol. 9, no.1, s. 232-235.
 - ⁴³ HUISGEN, R. *1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions*. Edited by W. Carruthers, *Tetrahedron*, 1990, vol. 8, s. 269-331.
 - ⁴⁴ GRAMLICH, P. M.; WIRGES, C. T.; MANETTO, A.; CARELL, T. *Postsynthetic DNA modification through the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction*. *Angew Chem Int Ed*, 2008, vol. 47, no. 44, s. 8350-8358.
 - ⁴⁵ EL-SAGHEER, A. H.; BROWN, T. *Click chemistry with DNA*. *Chem Soc Rev*, 2010, vol. 39, no. 4, s. 1388-1405.
 - ⁴⁶ ALVIRA, M.; ERITJA, R. *Synthesis of oligonucleotides carrying 5' -5' linkages using copper-catalyzed cycloaddition reactions*. *Chem Biodivers*, 2007, vol. 4, s. 2798-2809.
 - ⁴⁷ GIERLICH, J.; GUTSMIEDL, K.; GRAMLICH, P. M.; SCHMIDT, A. et al. *Synthesis of highly modified DNA by a combination of PCR with alkyne-bearing triphosphates and click chemistry*. *Chemistry*, 2007, vol. 13, no. 34, s. 9486-9494.
 - ⁴⁸ EL-SAGHEER, A. H.; KUMAR, R.; FINDLOW, S.; WERNER, J. M. et al. *A very stable cyclic DNA miniduplex with just two base pairs*. *Chembiochem*, 2008, vol. 9, no. 1, s. 50-52.
 - ⁴⁹ WENSKA, M.; ALVIRA, M.; STEUNENBERG, P.; STENBERG, A. et al. *An activated triple bond linker enables 'click' attachment of peptides to oligonucleotides on solid support*. *Nucleic Acids Res*, 2011, vol. 39, no. 20, s. 9047-9059.
 - ⁵⁰ GIERLICH, J.; BURLEY, G. A.; GRAMLICH, P. M.; HAMMOND, D. M. et al. *Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA*. *Org Lett*, 2006, vol. 8, no. 17, s. 3639-3642.
 - ⁵¹ SEELA, F.; SIRIVOLU, V. R. *Nucleosides and Oligonucleotides with Diynyl Side Chains: Base Pairing and Functionalization of 2'-Deoxyuridine Derivatives by the Copper(I)-Catalyzed Alkyne-Azide 'Click' Cycloaddition*. *Helv Chim Acta*, 2007, vol. 90, s. 535-552.
 - ⁵² SEELA, F.; SIRIVOLU, V. R. *DNA containing side chains with terminal triple bonds: Base-pair stability and functionalization of alkynylated pyrimidines and 7-deazapurines*. *Chem Biodivers*, 2006, vol. 3, no. 5, s. 509-514.
 - ⁵³ SEELA, F.; SIRIVOLU, V. R.; CHITTEPU, P. *Modification of DNA with octadiynyl side chains: synthesis, base pairing, and formation of fluorescent coumarin dye conjugates of four nucleobases by the alkyne-azide "click" reaction*. *Bioconjug Chem*, 2008, vol. 19, s. 211-214.
 - ⁵⁴ SIRIVOLU, V. R.; CHITTEPU, P.; SEELA, F. *DNA with branched internal side chains: synthesis of 5-tripropargylamine-dU and conjugation by an azide-alkyne double click reaction*. *Chembiochem*, 2008, vol. 9, no. 14, s. 2305-2316.
 - ⁵⁵ BERNDL, S.; HERZIG, N.; KELE, P.; LACHMANN, D. et al. *Comparison of a nucleosidic vs non-nucleosidic postsynthetic "click" modification of DNA with base-labile fluorescent probes*. *Bioconjug Chem*, 2009, vol. 20, no. 3, s. 558-564.
 - ⁵⁶ LIETARD, J.; MEYER, A.; VASSEUR, J. J.; MORVAN, F. *New strategies for cyclization and bicyclization of oligonucleotides by click chemistry assisted by microwaves*. *J Org Chem*, 2008, vol. 73, no. 1, s. 191-200.
 - ⁵⁷ NAKAHARA, M.; KUBOYAMA, T.; IZAWA, A.; HARI, Y. et al. *Synthesis and base-pairing properties of C-*

- nucleotides having 1-substituted 1H-1,2,3-triazoles. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, vol. 19, no. 12, s. 3316-3319.
- ⁵⁸ LÖNNBERG, H. *Solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates useful for delivery and targeting of potential nucleic acid therapeutics*. *Bioconjug Chem*, 2009, vol. 20, no. 6, s. 1065-1094.
- ⁵⁹ KLÖCKER, N.; WEISSENBOECK, F. P.; RENTMEISTER, A. *Covalent labeling of nucleic acids*. *Chem Soc Rev*, 2020, vol. 49, no. 23, s. 8749-8773.
- ⁶⁰ CHAN, P.; YUEN, T.; RUF, F.; GONZALEZ-MAESO, J. et al. *Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent in situ hybridization*. *Nucleic Acids Res*, 2005, vol. 33, no. 18, e161.
- ⁶¹ KUIJPER, E. C.; BERGSMA, A. J.; PIJNAPPEL, W.; AARTSMA-RUS, A. *Opportunities and challenges for antisense oligonucleotide therapies*. *J Inher Metab Dis*, 2021, vol. 44, no.1, s. 72-87.
- ⁶² FIŠAR, Z. *Fluorofory v biomedicině* On-line. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zffisar/fluorescence/soubory/fluorofory.html>. [Cit.2023-07-14].
- ⁶³ LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition*. Edition ed. Berlin: Springer, 2006. ISBN 978-0-387-46312-4.
- ⁶⁴ LIU, J.; LIU, C.; HE, W. *Fluorophores and Their Applications as Molecular Probes in Living Cells*. *Curr Org Chem*, 2013, vol. 17, s. 564-579.
- ⁶⁵ KAMINO, S.; UCHIYAMA, M. *Xanthene-based functional dyes: towards new molecules operating in the near-infrared region*. *Org Biomol Chem*, 2023, vol. 21, no. 12, s. 2458-2471.
- ⁶⁶ CARTER, C. W. *The photo-oxidation of certain organic substances in the presence of fluorescent dyes*. *Biochem J*, 1928, vol. 22, no. 2, s. 575-582.
- ⁶⁷ MESCON, H.; GROTS, I. A. *Fluorescence microscopy in dermatology*. *J Invest Dermatol*, 1963, vol. 41, s. 181-196.
- ⁶⁸ ARMITAGE, B. A. *Cyanine Dye–DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding, and Aggregation*. Edited by M. J. Waring and J. B. Chaires. *DNA Binders and Related Subjects*. Springer Berlin Heidelberg, 2005, s. 55-76.
- ⁶⁹ EDDY, J.; MAIZELS, N. *Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome*. *Nucleic Acids Res*, 2006, vol. 34, no. 14, s. 3887-3896.
- ⁷⁰ PANIGRAHI, M.; DASH, S.; PATEL, S.; MISHRA, B. K. *Syntheses of Cyanines: A Review*. *Tetrahedron*, 2012, vol. 68, no. 3., s. 781-805.
- ⁷¹ MA, X.; SHI, L.; ZHANG, B.; LIU, L. et al. *Recent advances in bioprobes and biolabels based on cyanine dyes*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2022, vol. 414, no. 16, s. 4551-4573.
- ⁷² SHINDY, H. A. *Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: A review*. *Dyes Pigm.*, 2017, vol. 145, s. 505-513.
- ⁷³ AAT BIOQUEST, INC. *Extinction Coefficient [Cy5 (Cyanine-5)]*. On-line. Dostupné z: https://www.aatbio.com/resources/extinction-coefficient/cy5_cyanine_5. [Cit.2023-07-14]
- ⁷⁴ FANTONI, N. Z.; EL-SAGHEER, A. H.; BROWN, T. *A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids*. *Chem Rev*, 2021, vol. 121, no. 12, s. 7122-7154.
- ⁷⁵ NOBEL PRIZE. *Barry Sharpless – Nobel Prize lecture*. On-line. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2022/sharpless/facts/>. [Cit.2023-07-14]
- ⁷⁶ LALLANA, E.; RIGUERA, R.; FERNANDEZ-MEGIA, E. *Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions*. *Angew Chem Int Ed*, 2011, vol. 50, no. 38, s. 8794-8804.

8. Přílohy

8.1 Příloha 1

Tabulka 7 Naměřené a vypočtené hodnoty optimalizace značení pro 2. pozici oligonukleotidu od 3'-konce: c_{Cy5} -koncentrace přidávaného Cy5, S - série měření, A_{ONS} - plocha pod křivkou piku značené oligonukleotidové sondy, $t_{R(ONS)}$ - retenční čas piku značené oligonukleotidové sondy, A_{ON} - plocha pod křivkou piku modifikovaného oligonukleotidu bez Cy5, $t_{R(ON)}$ - retenční čas piku modifikovaného oligonukleotidu bez Cy5, A_{ONS+ON} - součet ploch pod křivkou piků značené oligonukleotidové sondy a modifikovaného oligonukleotidu bez Cy5, η - efektivita značení Cy5, $\varnothing\eta$ - průměrná efektivita značení.

| pozice značení: 3'-konec | | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|---|-----------|-----------------------|----------|----------------------|--------------|---------------|--------------------------|
| typ pevné fáze | c_{Cy5} [mmol/l] | S | A_{ONS} | $t_{R(ONS)}$ [min] | A_{ON} | $t_{R(ON)}$ [min] | A_{ONS+ON} | η [%] | $\varnothing\eta$ [%] |
| CPG 500 Å | 0,1 | 1 | 169740 | 7,641 | 120110 | 6,120 | 289850 | 59 | 57 |
| CPG 500 Å | 0,1 | 2 | 319210 | 7,636 | 264769 | 6,116 | 583979 | 55 | |
| CPG 500 Å | 1 | 1 | 732805 | 7,633 | 66077 | 6,111 | 798882 | 92 | 80 |
| CPG 500 Å | 1 | 2 | 179897 | 7,638 | 83080 | 6,107 | 262977 | 68 | |
| CPG 500 Å | 10 | 1 | 157156 | 7,666 | 60278 | 6,125 | 217434 | 72 | 77 |
| CPG 500 Å | 10 | 2 | 208169 | 7,643 | 48635 | 6,088 | 256804 | 81 | |
| CPG 500 Å | 100 | 1 | 259361 | 7,612 | 70349 | 6,032 | 329710 | 79 | 79 |
| CPG 1000 Å | 0,1 | 1 | 138008 | 7,637 | 150315 | 6,116 | 288323 | 48 | 57 |
| CPG 1000 Å | 0,1 | 2 | 42109 | 7,634 | 21499 | 6,107 | 63608 | 66 | |
| CPG 1000 Å | 1 | 1 | 272830 | 7,609 | 0 | - | 272830 | 100 | 77 |
| CPG 1000 Å | 1 | 2 | 90162 | 7,641 | 76924 | 6,118 | 167086 | 54 | |
| CPG 1000 Å | 10 | 1 | 230048 | 7,648 | 146694 | 6,130 | 376742 | 61 | 81 |
| CPG 1000 Å | 10 | 2 | 145852 | 7,654 | 0 | - | 145852 | 100 | |
| CPG 1000 Å | 100 | 1 | 155216 | 7,614 | 34990 | 6,060 | 190206 | 82 | 82 |
| CPG 2000 Å | 0,1 | 1 | 68485 | 7,637 | 131980 | 6,117 | 200465 | 34 | 28 |
| CPG 2000 Å | 0,1 | 2 | 87627 | 7,641 | 303002 | 6,120 | 390629 | 22 | |
| CPG 2000 Å | 1 | 1 | 370806 | 7,617 | 426640 | 6,099 | 797446 | 46 | 48 |
| CPG 2000 Å | 1 | 2 | 122276 | 7,617 | 124990 | 6,095 | 247266 | 49 | |
| CPG 2000 Å | 10 | 1 | 202050 | 7,645 | 90387 | 6,108 | 292437 | 69 | 67 |
| CPG 2000 Å | 10 | 2 | 236940 | 7,637 | 122758 | 6,105 | 359698 | 66 | |
| CPG 2000 Å | 100 | 1 | 84545 | 7,622 | 30689 | 6,043 | 115234 | 73 | 73 |
| PS | 0,1 | 1 | 799881 | 7,689 | 61126 | 6,066 | 861007 | 93 | 94 |
| PS | 0,1 | 2 | 1168884 | 7,640 | 69079 | 6,111 | 1237963 | 94 | |
| PS | 1 | 1 | 833194 | 7,620 | 28705 | 6,058 | 861899 | 97 | 97 |
| PS | 1 | 2 | 1047275 | 7,600 | 37407 | 6,043 | 1084682 | 97 | |
| PS | 10 | 1 | 1141754 | 7,693 | 34266 | 6,301 | 1176020 | 97 | 97 |
| PS | 10 | 2 | 1207820 | 7,687 | 45642 | 6,003 | 1253462 | 96 | |
| PS | 100 | 1 | 603022 | 7,599 | 26811 | 6,042 | 629833 | 96 | 96 |

Tabulka 8 Naměřené a vypočtené hodnoty optimalizace značení pro 10. pozici oligonukleotidu od 3'-konce (X')

| pozice značení: X' | | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------|---|------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------|-------|-----------|
| typ pevné fáze | c _{Cy5} [mmol/l] | S | A _{ONS} | t _{R(ONS)} [min] | A _{ON} | t _{R(ON)} [min] | A _{ONS+ON} | η [%] | øη [%] |
| CPG 500 Å | 0,1 | 1 | 495739 | 7,258 | 56397 | 5,948 | 552136 | 90 | 88 |
| CPG 500 Å | 0,1 | 2 | 239779 | 7,257 | 38133 | 5,950 | 277912 | 86 | |
| CPG 500 Å | 1 | 1 | 384527 | 7,243 | 30174 | 5,717 | 414701 | 93 | 90 |
| CPG 500 Å | 1 | 2 | 443635 | 7,264 | 63269 | 5,674 | 506904 | 88 | |
| CPG 500 Å | 10 | 1 | 311140 | 7,286 | 20437 | 6,059 | 331577 | 94 | 94 |
| CPG 500 Å | 10 | 2 | 625674 | 7,267 | 36663 | 6,069 | 662337 | 94 | |
| CPG 500 Å | 100 | 1 | 202271 | 7,239 | 22769 | 6,027 | 225040 | 90 | 90 |
| CPG 1000 Å | 0,1 | 1 | 431705 | 7,268 | 29867 | 6,056 | 461572 | 94 | 89 |
| CPG 1000 Å | 0,1 | 2 | 825504 | 7,265 | 152542 | 5,999 | 978046 | 84 | |
| CPG 1000 Å | 1 | 1 | 860411 | 7,241 | 99200 | 5,686 | 959611 | 90 | 92 |
| CPG 1000 Å | 1 | 2 | 429908 | 7,268 | 27218 | 6,036 | 457126 | 94 | |
| CPG 1000 Å | 10 | 1 | 377055 | 7,286 | 31344 | 6,113 | 408399 | 92 | 91 |
| CPG 1000 Å | 10 | 2 | 820454 | 7,269 | 92226 | 5,925 | 912680 | 90 | |
| CPG 1000 Å | 100 | 1 | 335505 | 7,247 | 68876 | 5,909 | 404381 | 83 | 83 |
| CPG 2000 Å | 0,1 | 1 | 491659 | 7,240 | 39459 | 5,773 | 531118 | 93 | 93 |
| CPG 2000 Å | 0,1 | 2 | 982093 | 7,257 | 76499 | 6,157 | 1058592 | 93 | |
| CPG 2000 Å | 1 | 1 | 405705 | 7,249 | 29122 | 5,728 | 434827 | 93 | 89 |
| CPG 2000 Å | 1 | 2 | 399326 | 7,241 | 74394 | 5,687 | 473720 | 84 | |
| CPG 2000 Å | 10 | 1 | 368231 | 7,269 | 64970 | 5,923 | 433201 | 85 | 90 |
| CPG 2000 Å | 10 | 2 | 596531 | 7,258 | 34832 | 6,112 | 631363 | 94 | |
| CPG 2000 Å | 100 | 1 | 346574 | 7,245 | 81627 | 5,909 | 428201 | 81 | 81 |
| PS | 0,1 | 1 | 1269756 | 7,249 | 27831 | 6,251 | 1297587 | 98 | 98 |
| PS | 0,1 | 2 | 1924879 | 7,259 | 38177 | 6,261 | 1963056 | 98 | |
| PS | 1 | 1 | 78202 | 7,235 | 0 | - | 78202 | 100 | 96 |
| PS | 1 | 2 | 1289619 | 7,230 | 121902 | 5,832 | 1411521 | 91 | |
| PS | 10 | 1 | 1397739 | 7,259 | 30279 | 6,259 | 1428018 | 98 | 98 |
| PS | 10 | 2 | 1930016 | 7,263 | 39878 | 6,264 | 1969894 | 98 | |
| PS | 100 | 1 | 370678 | 7,235 | 23664 | 5,894 | 394342 | 94 | 94 |

Tabulka 9 Naměřené a vypočtené hodnoty optimalizace značení na 5'-konci oligonukleotidu.

| pozice značení: 5'-konec | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|---|------------------|---------------------------|-----------------|--------------------------|---------------------|-------|------------|
| typ pevné fáze | c _{Cy5} [mmol/l] | S | A _{ONS} | t _{R(ONS)} [min] | A _{ON} | t _{R(ON)} [min] | A _{ONS+ON} | η [%] | øη [%] |
| CPG 500 Å | 0,1 | 1 | 403270 | 7,693 | 5508 | 6,050 | 408778 | 99 | 94 |
| CPG 500 Å | 0,1 | 2 | 902108 | 7,693 | 98202 | 6,066 | 1000310 | 90 | |
| CPG 500 Å | 1 | 1 | 758244 | 7,684 | 39491 | 6,001 | 797735 | 95 | 94 |
| CPG 500 Å | 1 | 2 | 455660 | 7,687 | 32916 | 6,024 | 488576 | 93 | |
| CPG 500 Å | 10 | 1 | 314899 | 7,731 | 0 | - | 314899 | 100 | 97 |
| CPG 500 Å | 10 | 2 | 527516 | 7,693 | 35857 | 6,036 | 563373 | 94 | |
| CPG 500 Å | 100 | 1 | 334690 | 7,666 | 31177 | 6,293 | 365867 | 91 | 91 |
| CPG 1000 Å | 0,1 | 1 | 366874 | 7,694 | 31568 | 6,042 | 398442 | 92 | 93 |
| CPG 1000 Å | 0,1 | 2 | 794377 | 7,692 | 51879 | 6,056 | 846256 | 94 | |
| CPG 1000 Å | 1 | 1 | 1316910 | 7,675 | 53885 | 6,018 | 1370795 | 96 | 95 |
| CPG 1000 Å | 1 | 2 | 475081 | 7,705 | 26298 | 6,037 | 501379 | 95 | |
| CPG 1000 Å | 10 | 1 | 406475 | 7,722 | 25827 | 6,042 | 432302 | 94 | 97 |
| CPG 1000 Å | 10 | 2 | 554601 | 7,704 | 0 | - | 554601 | 100 | |
| CPG 1000 Å | 100 | 1 | 231550 | 7,669 | 0 | - | 231550 | 100 | 100 |
| CPG 2000 Å | 0,1 | 1 | 635058 | 7,697 | 0 | - | 635058 | 100 | 94 |
| CPG 2000 Å | 0,1 | 2 | 352041 | 7,691 | 45418 | 6,057 | 397459 | 89 | |
| CPG 2000 Å | 1 | 1 | 1157326 | 7,665 | 48337 | 6,031 | 1205663 | 96 | 94 |
| CPG 2000 Å | 1 | 2 | 435136 | 7,679 | 36671 | 6,035 | 471807 | 92 | |
| CPG 2000 Å | 10 | 1 | 339100 | 7,709 | 24307 | 6,04 | 363407 | 93 | 93 |
| CPG 2000 Å | 10 | 2 | 388639 | 7,686 | 34844 | 6,02 | 423483 | 92 | |
| CPG 2000 Å | 100 | 1 | 539233 | 7,657 | 29408 | 5,964 | 568641 | 95 | 95 |
| PS | 0,1 | 1 | 788488 | 7,629 | 48768 | 6,067 | 837256 | 94 | 93 |
| PS | 0,1 | 2 | 1639962 | 7,693 | 152337 | 6,071 | 1792299 | 92 | |
| PS | 1 | 1 | 943945 | 7,664 | 45284 | 5,986 | 989229 | 95 | 95 |
| PS | 1 | 2 | 1096776 | 7,656 | 52685 | 6,012 | 1149461 | 95 | |
| PS | 10 | 1 | 1139165 | 7,643 | 35068 | 6,078 | 1174233 | 97 | 95 |
| PS | 10 | 2 | 551185 | 7,629 | 39440 | 6,044 | 590625 | 93 | |
| PS | 100 | 1 | 639502 | 7,667 | 0 | - | 639502 | 100 | 100 |

8.2 Příloha 2

Tabulka 10 Naměřené a vypočtené hodnoty při sledování vlivu doby reakce na efektivitu značení. S - série měření, A_{ONS} - plocha pod křivkou píku značené oligonukleotidové sondy, $t_{R(ONS)}$ - retenční čas píku značené oligonukleotidové sondy, A_{ON} - plocha pod křivkou píku modifikovaného oligonukleotidu bez Cy5, $t_{R(ON)}$ - retenční čas píku modifikovaného oligonukleotidu bez Cy5, A_{ONS+ON} - součet ploch pod křivkou píků značené oligonukleotidové sondy a modifikovaného oligonukleotidu bez Cy5, η – efektivita značení Cy5, $\varnothing\eta$ – průměrná efektivita značení.

| čas [h] | S | A_{ONS} | $t_{R(ONS)}$ [min] | A_{ON} | $t_{R(ON)}$ [min] | A_{ONS+ON} | η [%] | $\varnothing\eta$ [%] |
|------------|---|-----------|-----------------------|----------|----------------------|--------------|------------|--------------------------|
| 0,17 | 1 | 299212 | 7,655 | 19676 | 6,030 | 318888 | 94 | 94 |
| 0,17 | 2 | 222412 | 7,655 | 15052 | 6,029 | 237464 | 94 | |
| 0,5 | 1 | 165447 | 7,663 | 9054 | 6,027 | 174501 | 95 | 95 |
| 0,5 | 2 | 137086 | 7,669 | 7245 | 6,027 | 144331 | 95 | |
| 1 | 1 | 546681 | 7,650 | 46091 | 6,263 | 592772 | 92 | 96 |
| 1 | 2 | 91155 | 7,648 | 0 | - | 91155 | 100 | |
| 6 | 1 | 595187 | 7,651 | 28729 | 5,976 | 623916 | 95 | 95 |
| 6 | 2 | 613148 | 7,652 | 31011 | 5,973 | 644159 | 95 | |
| 12 | 1 | 20168 | 7,640 | 0 | - | 20168 | 100 | 96 |
| 12 | 2 | 713302 | 7,649 | 65894 | 5,983 | 779196 | 92 | |
| 24 | 1 | 180823 | 7,694 | 48336 | 6,003 | 229159 | 79 | 90 |
| 24 | 2 | 455660 | 7,687 | 32916 | 6,024 | 488576 | 93 | |
| 24 | 3 | 758244 | 7,684 | 39491 | 6,001 | 797735 | 95 | |
| 24 | 4 | 455660 | 7,687 | 32916 | 6,024 | 488576 | 93 | |