

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Vývoj HPLC metody pro monitorování přípravy oligodeoxynukleotidových sond

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Mgr. Tomáš Šemlej

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne.....

Podpis.....

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu práce panu doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, a také za jeho trpělivost a ochotu. Děkuji také všem pracovníkům a doktorandům katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za vytvoření příjemných pracovních podmínek. Tato práce vznikla za podpory projektu SVV 260 666.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Tomáš Šemlej

Vedoucí rigorózní práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vývoj HPLC metody pro monitorování přípravy oligodeoxynukleotidových sond

Uměle připravená oligodeoxynukleotidová sekvence s navázanou značkou je označována jako molekulární sonda. Molekulární sondy se uplatňují především ke kvantifikaci multiplikace při RT-PCR a identifikaci mutací při PCR analýzách. Typicky existují dva druhy molekulárních sond – jednoduše značené molekulární sondy a dvojitě značené molekulární sondy. Jednoduše značené molekulární sondy obsahují oligodeoxynukleotidovou sekvenci s navázaným fluoroforem nebo zhášečem. Zatímco dvojitě značené molekulární sondy se skládají z oligodeoxynukleotidové sekvence s navázaným fluoroforem na jednom konci a se zhášečem navázaným na druhém konci řetězce. V této práci jsme nejprve věnovali pozornost separaci dvojitě značených oligodeoxynukleotidů od jednoduše značených oligodeoxynukleotidů. Byly testovány různé typy stacionárních fází a pro separaci směsi značených oligodeoxynukleotidů byla vybrána kolona Clarity® Oligo-RP™, která byla selektivní ke všem testovaným standardům. V další části jsme se zaměřili na monitorování přípravy jednořetězcových oligodeoxynukleotidů značených zhášečem Q40 ze skupiny azaftalocyaninů, interkalačním činidlem FK8 a fluoroforem BDP16. Molekula navázané značky hrála zásadní roli při analýze. Podařilo se nám vyvinout tři specifické HPLC metody, pomocí kterých jsme dokázali vyhodnotit post-syntetické modifikace oligodeoxynukleotidových sond připravené *click* reakcí a rozlišit případné nečistoty ve vzorku.

Klíčová slova: HPLC, azaftalocyaniny, akridiny, bodipy, oligodeoxynukleotidy, molekulární sondy.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Tomáš Šemlej

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title of rigorosum thesis: The development of an HPLC method for monitoring the preparation of oligodeoxynucleotide probes

An artificially prepared oligodeoxynucleotide sequence with the attached label is referred to as a molecular probe. Molecular probes are mainly used to quantify multiplication in RT-PCR and identify mutations in PCR analyses. There are typically two different types of probes – mono-labeled molecular probes and double-labeled molecular probes. The mono-labeled molecular probes are constructed from fluorophore-labeled oligodeoxynucleotide sequence or quencher-labeled oligodeoxynucleotide sequence. Whereas double-labeled molecular probes consist of an oligodeoxynucleotide sequence with a fluorophore attached at one end together with a quencher attached at the other end of the chain. In this work, we first paid attention to the separation of double-labeled oligodeoxynucleotides from mono-labeled oligodeoxynucleotides. Several types of stationary phases were tested and based on that the column Clarity[®] Oligo-RP[™] was chosen to separate a mixture of labeled oligodeoxynucleotides. This column was selective for all tested standards. In the next part, we focused on monitoring the preparation of single-stranded oligodeoxynucleotides labeled with the quencher Q40 from the group of azaphtalocyanines, intercalating agent FK8 and fluorophore BDP16. Labeled molecule played a crucial role during the analysis. We managed to develop three specific HPLC methods. Due to these methods, we were able to evaluate the post-synthetic modification of oligodeoxynucleotide probes prepared by the click reaction and distinguish possible impurities in the sample.

Keywords: HPLC, azaphtalocyanines, acridines, bodipy, oligodeoxynucleotides, molecular probes.

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	8
1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Oligodeoxynukleotidy	11
2.1.1 Syntéza na pevné fázi.....	12
2.2 Molekulární sondy	14
2.2.1 Princip fluorescence a zhášení.....	15
2.2.2 Typy molekulárních sond.....	18
2.3 Fluorofory	24
2.3.1 Fluorofory odvozené od xanthenu	24
2.3.2 Fluorofory odvozené od indocyaninu	26
2.3.3 BODIPY.....	28
2.3.4 Strukturně odlišné fluorofory	29
2.4 Zhášeče	30
2.5 Azaftalocyaniny.....	33
2.5.1 Vlastnosti azaftalocyaninů.....	34
2.5.2 Použití azaftalocyaninů	35
2.5.3 Navázání azaftalocyaninu na oligodeoxynukleotid	36
2.6 Analýza oligodeoxynukleotidů.....	38
2.6.1 Vliv teploty na chromatografickou separaci.....	39
2.6.2 Chromatografické módy	40
2.6.3 Stacionární fáze pro IP-RP-HPLC.....	41
2.6.4 Iontově párová činidla.....	42
3 Cíl práce.....	44
4 Praktická část.....	44
4.1 Přístroje.....	44
4.2 Chromatografické kolony	44
4.3 Standardy	45
4.4 Oligodeoxynukleotidové sondy	46
4.5 Absorpční spektra modifikovaných oligodeoxynukleotidů	49
4.6 Chemikálie.....	50
4.7 Příprava pufrů	50
4.8 Testované chromatografické podmínky.....	50
5 Výsledky a diskuze.....	51

5.1	Výběr stacionární fáze pro analýzu molekulárních sond.....	51
5.1.1	Kolona Hypersil™ BDS C18.....	51
5.1.2	Kolona Xbridge BEH C18 XP.....	52
5.1.3	Kolona Clarity® Oligo-RP™.....	54
5.1.4	Kolona Synchronis aQ a Synchronis C18.....	55
5.1.5	Kolona ACE Excel 3 C18-PFP.....	56
5.1.6	Kolona ZirChrom®-MS.....	57
5.2	Optimalizace podmínek na koloně Clarity® Oligo-RP™.....	60
5.3	Vývoj metody pro hodnocení post-syntetické modifikace oligodeoxynukleotidových sond pomocí <i>click</i> reakce.....	64
5.4	Analýza oligodeoxynukleotidů se značkou Q40.....	67
5.4.1	CPG pevná fáze.....	68
5.4.2	Polystyrenová pevná fáze.....	70
5.5	Analýza oligodeoxynukleotidů se značkou FK8.....	72
5.6	Analýza oligodeoxynukleotidů se značkou BDP16 – pilotní vzorky.....	74
6	Závěr.....	76
7	Seznam použité literatury.....	77

Seznam použitých zkratek

A	adenin
ACN	acetonitril
BBQ	<i>BlackBerry[®] Quencher</i>
BHQ	<i>Black Hole Quencher[™]</i>
BODIPY	4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-S-indacen
C	cytosin
CPG	skleněný pevný nosič s kontrolovanou velikostí pórů
Cy	cyaninové barvivo
DABCYL	4-(fenyldiazenyl)anilin
DBCO	dibenzoazacyklooktyn
DLP	dvojitě značená molekulární sonda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
F	fluorofor
FAM	fluorescein
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
G	guanin
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
IP-RP	iontově párová chromatografie na reverzní fázi
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MeOH	methanol
MLP	jednoduše značená molekulární sonda
MS	hmotnostní spektrometrie
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PDA	detektor s diodovým polem
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	polymerázová řetězcová reakce v reálném čase
SARS-CoV-2	koronavirus způsobující syndrom akutního respiračního selhání

T	thymin
TAMRA	tetramethylrhodamin
TEA	triethylamin
TEAA	triethylamonium acetát
t_r	retenční čas
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
U	uracil
Z	zhášec

1 Úvod

Molekulární sonda je uměle připravená oligodeoxynukleotidová sekvence modifikovaná organickou molekulou. Oligodeoxynukleotid je modifikovaný nejčastěji navázáním fluoroforu, zhášedce nebo oběma značkami zároveň. Na základě navázané značky rozlišujeme dva typy molekulárních sond. Prvním typem je jednoduše značená molekulární sonda (MLP) a druhým typem je dvojitě značená molekulární sonda (DLP). Molekulární sondy se uplatňují především ke kvantifikaci při polymerázové řetězcové reakci v reálném čase (RT-PCR) nebo k identifikaci mutací při polymerázové řetězcové reakci (PCR). K monitorování průběhu a výsledku PCR se využívá fluorescenčních vlastností navázaného fluoroforu. Ve většině případů je součástí oligodeoxynukleotidové sondy zhášedce, který dokáže pohlcovat fluorescenci vyzářenou fluorescenčním barvivem. Po navázání oligodeoxynukleotidu na komplementární sekvenci dojde na základě specifického mechanismu ke zvýšení nebo naopak ke snížení pozorovatelné fluorescence.

Tato rigorózní práce navazuje na experimenty Mgr. A. Ščensné [1]. Dvojitě značené oligodeoxynukleotidy mohou obsahovat nečistoty ze syntézy. V případě dvojitě značených oligodeoxynukleotidů je obtížně separovat strukturně podobnou molekulu oligodeoxynukleotidu s navázaným zhášedcem. Z toho důvodu jsme se zaměřili na separaci těchto látek. Hledali jsme selektivní stacionární fázi a vhodné složení mobilní fáze. Dalším úkolem bylo nalezení optimálních chromatografických podmínek pro analýzu modifikovaných oligodeoxynukleotidů různými značkami. Příprava molekulárních sond probíhá na pevné fázi za pomoci *click* chemie. V případě jednoduše značeného oligodeoxynukleotidu může být ve vzorku přítomný nemodifikovaný oligodeoxynukleotid nebo oligodeoxynukleotid s modifikovanou bází s dibenzoazacyklooktynem (DBCO). Případné nečistoty mohou negativně ovlivňovat výsledek PCR. Pozornost byla zaměřena na vývoj chromatografických metod, které by umožnily identifikovat jednoduše značené oligodeoxynukleotidy a modifikované oligodeoxynukleotidy bez značky ve vzorku. Díky těmto metodám jsme mohli vyhodnotit post-syntetické modifikace oligodeoxynukleotidů, která probíhaly na odlišných pevných fázích.

2 Teoretická část

2.1 Oligodeoxynukleotidy

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je jedna z nejdůležitějších molekul v živé buňce. DNA je tvořena třemi základními složkami, jimiž jsou 5-uhlíkatý cukr, dusíkatá báze a zbytek kyseliny fosforečné. Ty jsou společně označovány jako nukleotid. Rozlišujeme čtyři elementární nukleové báze, tj. purinové báze adenin (A), guanin (G) a dvě pyrimidinové báze cytosin (C), thymin (T). Dusíkaté báze jsou v rámci nukleotidu propojeny 3',5'-fosfodiesterovou vazbou. V případě ribonukleové kyseliny (RNA) má každý furanózový kruh navíc hydroxylovou skupinu v poloze 2' a thymin je nahrazen uracilem (U). Jednotlivé nukleové báze jsou navzájem komplementární a jsou k sobě vázány vodíkovými můstky podle pravidel Watson-Crickova párování. Bylo prokázáno, že adenin se váže s thyminem a cytosin tvoří pár vždy s guaninem. Každý řetězec DNA má jasně definovanou strukturu, kdy na jednom konci je 5'-fosfátová skupina a druhý konec řetězce uzavírá 3'-hydroxylová skupina. Dvě antiparalelně jdoucí vlákna vytváří dvoušroubovici DNA [2]. Na základě rentgenových dat poskytnuté Franklinem představili vědci Watson a Crick již v roce 1953 trojrozměrný model DNA, za což následně dostali Nobelovu cenu [3]. Od té doby se vědci po celém světě snažili zkoumat vlastnosti oligodeoxynukleotidů, aby mohli manipulovat biologickými procesy na molekulární úrovni. Oligodeoxynukleotidy jsou stejně jako polynukleotidy nositeli genetické informace všech živých organismů, hrají klíčovou roli při duplikaci a formování proteinů. Genetický kód uložený v DNA představuje materiál, který je živými buňkami přeložen do proteinů a je důležitý pro správnou funkci všech buněčných procesů. Pochopení funkce DNA a prolomení genetického kódu otevřelo brány k hlubšímu zkoumání. Oligodeoxynukleotidy jsou neuvěřitelně všestranné biopolymery, které se ukázaly jako potencionální zdroj pro další výzkum, aplikaci cílené léčby ve farmakoterapii nebo jako předloha pro specifické analytické metody. Oligodeoxynukleotidy lze snadno naprogramovat k interakci s endogenními nukleovými kyselinami prostřednictvím jednoduchého Watson-Crickova párování bází, které slouží jako základ pro řadu zajímavých biotechnologií včetně molekulárních sond [4], fluorescenční in situ hybridizace (FISH) [5] a antisense terapeutik [6].

Oligodeoxynukleotidy existují přirozeně hlavně jako malé nekódující RNA (microRNA), které mají vliv na regulaci genové exprese. Ve většině případů se máme

možnost setkat pouze s uměle vytvořenými analogy oligodeoxynukleotidů. Syntetické oligodeoxynukleotidy bývají navrhovány podle sekvence cílové molekuly, aby bylo dosaženo ideálního párování dle pravidel Watson-Cricka na základě vzájemné komplementarity. Strukturní chemie nukleových kyselin ušla od prvních pokusů značný kus cesty a postupně krok za krokem se vědcům z různých částí světa podařilo syntetizovat základy nukleových kyselin od purinů, pyrimidinů a cukerných skupin až po celé nukleotidy [7,8].

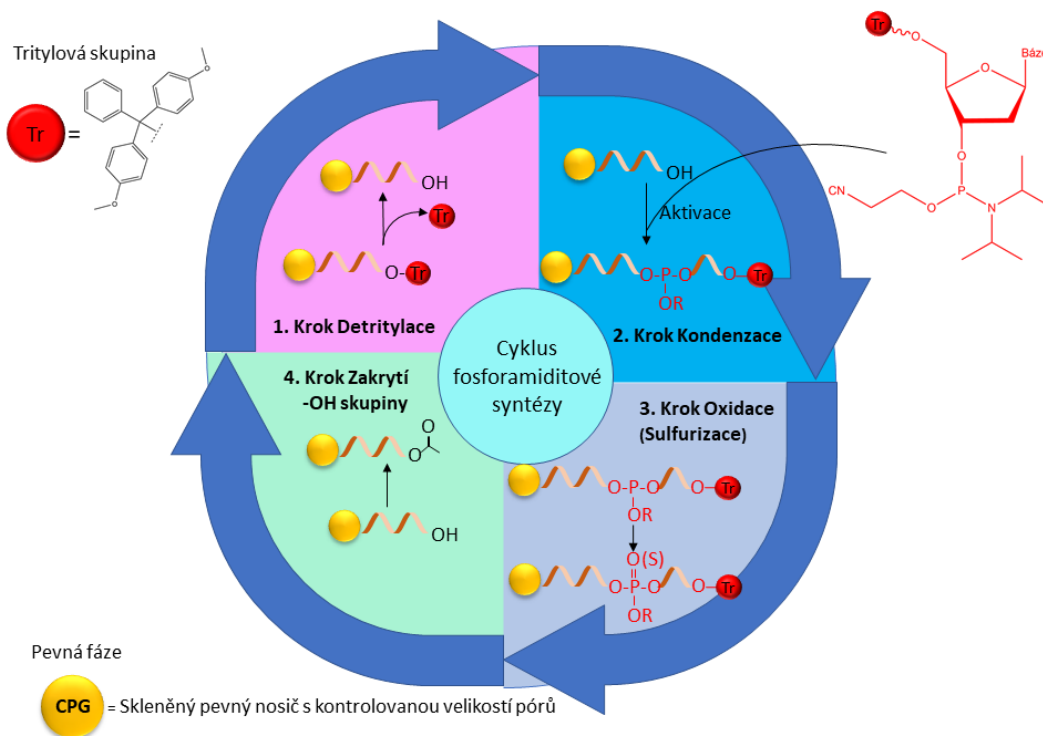
2.1.1 Syntéza na pevné fázi

První úspěšný pokus o vytvoření syntetického nukleotidu učinili Todd a kol., kdy se jim podařilo syntetizovat dinukleotid v roztoku [9]. Určitou alternativu pro syntézu oligodeoxynukleotidů představuje enzymatická syntéza, kde se využívá fosforyláza izolovaná z bakterie *Escherichia Coli* jako katalyzátor reakce [10]. V současné době bývá téměř veškerá syntéza oligodeoxynukleotidů prováděna na pevné fázi. Je to jednoznačně nejrychlejší a nejúčinnější způsob syntézy nukleotidů. Syntéza na pevné fázi se stala metodou volby pro přípravu oligodeoxynukleotidů. Jak již samotný název napovídá, syntéza se odehrává na pevné fázi. Nejčastěji je pevná fáze tvořená polymerní strukturou oxidu křemičitého s kontrolovanou velikostí pórů nebo vysoce zasítovaným polystyrenem. Oba materiály jsou dostatečně inertní vůči rozpouštědlům, mechanicky stabilní a poskytují spolehlivé výtěžky. Skleněný pevný nosič s kontrolovanou velikostí pórů (CPG) je obvykle derivatizován dlouhým řetězcem alkylaminu. Molekuly polystyrenu bývají spojeny s aminomethylovou skupinou. 3'-konec nukleosidu je k těmto pevným nosičům běžně připojen přes sukcinylovou skupinu [11,12].

Syntéza fosfotriesterů na pevné fázi byla z velké části nahrazena fosforamiditovou metodou, která byla poprvé popsána Beaucagem a Caruthersem v roce 1981. S fosforamiditovými stavebními bloky a s 1*H*-tetrazolem jako aktivačním činidlem, je možné dosáhnout průměrných výtěžků přes 98 %. Kromě toho je vazebná reakce skutečně velmi rychlá (cca 1 minuta). Zásadním přelomem v syntéze oligodeoxynukleotidů na pevné fázi byla komerční dostupnost snadno ovladatelných automatických syntezátorů na bázi fosforamiditové metody [13].

Hlavním pilířem fosforamiditové metody je přeměna relativně stabilních fosforamiditových derivátů na reaktivní meziprodukty vhodné pro reakci s 5'-koncem nukleotidu na pevné fázi [14]. Klíčové kroky fosforamiditové metody jsou detritylace,

kondenzace, sulfurazice/oxidace a ochránění nezreagované hydroxylové skupiny, jak je schematicky zobrazeno níže (Obrázek 1). Nukleotidový řetězec se postupně prodlužuje navázáním fosforamiditových bází a požadovaná sekvence přibývá směrem od 3'-konce oligodeoxynukleotidu k jeho 5'-konci [15].



Obrázek 1 Schematické znázornění syntézy oligodeoxynukleotidu fosforamiditovou metodou. Převzato a upraveno z [15].

Prvním krokem syntézy oligodeoxynukleotidu fosforamiditovou metodou je odblokování chránících skupin z nukleosidu, který je navázaný na pevné fázi. Odebrání tritylové skupiny (4,4'-methoxytrifenylylmethyl) probíhá v kyselém prostředí 3–10% dichloroctové kyseliny v toluenu. Důležitým krokem pro stanovení konečné čistoty oligodeoxynukleotidu a jeho výtěžku je správné načasování detritylace. Pokud je reakce v kyselém prostředí příliš dlouhá, může docházet hlavně u adenosinu k depurinaci. Naopak příliš krátká doba vede k nekompletnímu odstranění všech chránících skupin. To může znamenat vyšší výskyt nukleotidových sekvencí, které postrádají nějaký nukleotid a jsou označovány jako jednonukleotidové nečistoty (n-1) [16,17].

Druhý krok se nazývá kondenzace a jedná se o připojení aktivovaného 3'-fosforamiditu s volnou hydroxylovou skupinou nukleosidu v bezvodém prostředí. Normálně je pro vysokostupňovou syntézu vyžadován až dvojnásobný přebytek fosforamiditu, aby bylo dosaženo výtěžku vyššího než 99 %. Aktivace je typicky

prováděna buď pomocí 1*H*-tetrazolu (obvykle 5-(benzylthio)-1*H*-tetrazol, 5-(ethylthio)-1*H*-tetrazol nebo 4,5-dikyanimidazol). Výsledkem reakce je fosfit triester [18].

Následujícím krokem je sulfurizace nebo oxidace. V tomto kroku je fosfit triester převeden roztokem jódu v lutidinu na více stabilní formy triesteru. Ester kyseliny fosforité je převeden na ester kyseliny fosforečné. V případě sulfurizace je použito čerstvě připraveného fenylacetyldisulfidu rychlý a účinný proces s výtěžky nad 99,9 % [19].

Posledním krokem syntézy je opětovná ochrana řetězce, tzv. *capping*. Cílem je ochránění nezreagované hydroxylové skupiny na 5'-konci prodlužovaného řetězce acetylací a zabránění vzniku vedlejších produktů. V případě neúplného ochránění dochází k dalšímu prodlužování řetězce během následujících cyklů. Tím vznikají nežádoucí řetězce o různé délce a sekvenci, které se obtížně odstraňují. Když je syntéza oligodeoxynukleotidu kompletní, provádí se ještě závěrečné čištění a izolace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), iontově výměnné chromatografie (IEC) nebo gelové chromatografie [20,21].

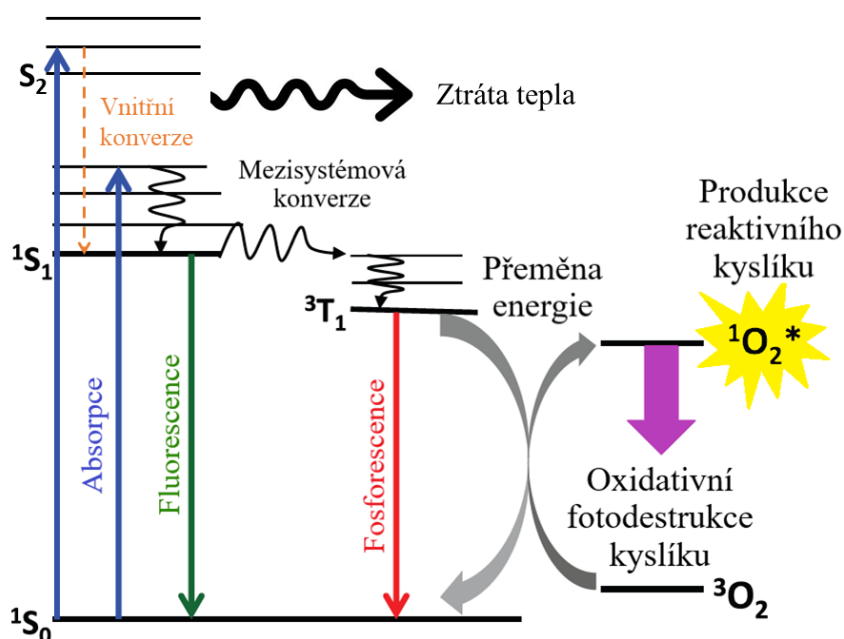
2.2 Molekulární sondy

Molekulární sonda je synteticky připravená oligodeoxynukleotidová sekvence, která je modifikovaná specifickou organickou molekulou. Oligodeoxynukleotidová sekvence (DNA nebo RNA) je typicky komplementární ke zkoumané sekvenci. Oligodeoxynukleotidový řetězec je nejčastěji modifikován navázáním fluoroforu, zhášedce nebo oběma značkami zároveň. Fluorofor se uplatňuje jako donor fluorescence. Naopak zhášedce plní roli akceptoru fluorescence (někdy označovaný jako sekundární fluorofor). Z praktického hlediska je k dispozici několik druhů molekulárních sond, které jsou od sebe konstrukčně odlišné (viz kapitola 2.2.2) [22,23].

Molekulární sondy nacházejí uplatnění v mnoha oblastech výzkumu, ale především slouží k monitorování přenosu genetické informace při DNA a RNA reakcích. Nezastupitelnou roli zastávají hlavně v analýze pro kvantifikaci a detekci DNA pomocí RT-PCR [24]. Molekulární sondy jsou využívány také k syntéze RNA [25], štěpení [26] nebo hybridizaci [27]. Vzhledem k jejich vysoké senzitivitě a selektivitě, minimální interferenci s živými biologickými systémy, jednoduchému designu a syntéze, pomáhají efektivně zvýraznit struktury *in vitro* i *in vivo* [28]. Využívají se také v podobě biosenzorů při stanovení koncentrace těžkých kovů [29], nádorových markerů [30], patogenních bakterií [31] a virů, včetně mechanismů pro detekci SARS-CoV-2 [32].

2.2.1 Princip fluorescence a zhášení

Fluorescence je založena na schopnosti látky akceptovat určité množství energie a tuto energii následně vydat zpět do okolí ve formě fotonu. Pro snadnější ilustraci probíhajících dějů je použit Jablonského diagram (Obrázek 2) [33].



Obrázek 2 Jablonského diagram. Převzato a upraveno z [34].

Molekula látky se nachází v základním energetickém stavu S_0 . Po absorpci světelného záření se může dostat ze základního stavu S_0 do excitovaného energetického stavu S_1 nebo S_2 . Každá energetická hladina se dělí na další energetické úrovně. Vlivem vnitřní konverze molekula přichází o energii a vrací se zpět z vyššího energetického stavu S_2 na nižší energetický stav S_1 , protože je termodynamicky stabilnější. Při návratu z energetické úrovně S_1 zpět do základního energetického stavu S_0 dochází k fluorescenci díky emisi fotonu do okolí [33].

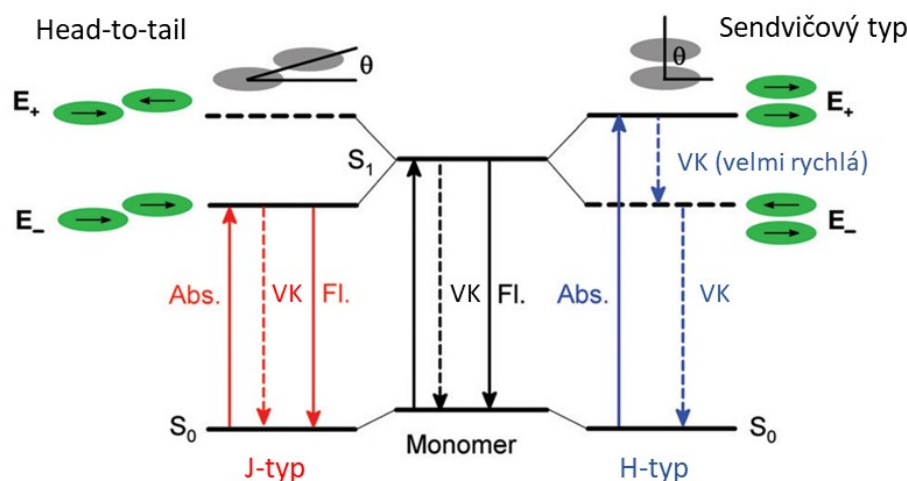
Emise fotonu není jediný způsob, jak může molekula v excitovaném stavu ztratit energii. Pokud se nachází jiný akceptor fluorescence v přijatelné vzdálenosti od excitované látky, dochází k vytvoření nefluorescenčního komplexu bez emise fotonu. Jelikož těmto látkám chybí schopnost fluorescence, dochází k vyzáření energie jiným způsobem, typicky ve formě tepla. Celková teplota reakční soustavy molekulární sondy se ale prakticky nemění, protože zhášeč je navázán na oligodeoxynukleotid v zanedbatelném množství [33].

V případě, že se energetický stav S_1 změní mezisystémovou konverzí na tripletový stav 3T_1 , může vznikat buď fosforescence, nebo nastává přeměna excitační energie ze základního tripletového stavu kyslíku 3O_2 , který se přemění na reaktivní kyslík $^1O_2^*$. Fotodestruktivní singletový kyslík $^1O_2^*$ způsobuje velmi často nevratné snížení fluorescence, popisované jako fotovybělování (*photobleaching*). Fotochemická stabilita je jedním z nejdůležitějších parametrů, které určují použitelnost organického barviva. Odolný fluorofor disponuje schopností odolávat mnoha opakujícím se cyklům během excitace a zároveň zvládat návrat zpět do základního stavu bez nevratného poškození [34].

Energie mezi dvěma značkami, konkrétně mezi donorem a akceptorem, může být přenesená bez vyzáření do okolí dvěma způsoby. První způsob je označován jako statické zhášení. Druhý způsob je známý jako dynamické zhášení. V praxi se využívají oba způsoby a je možné i jejich využití současně v závislosti na vzdálenosti použitého fluoroforu od zhášeče.

Statické zhášení

Statické zhášení je založené na tvorbě nefluorescenčního komplexu v základním energetickém stavu mezi fluoroforem a zhášečem, kdy se vytvoří tzv. intermolekulární dimer. Po absorpci světelné energie se komplex dostává do excitovaného stavu a ihned se vrací do základního stavu bez emise fotonu. Elektrostatické síly a sterické vlastnosti použitého fluoroforu přispívají ke stabilitě celého komplexu a tedy k efektivitě zhášení. Fotofyzikální vlastnosti dimeru se liší od součtu vlastností donoru a akceptoru. Orientace dipólových momentů hraje důležitou roli pro celkové elektronové vlastnosti a v závislosti na geometrii agregátů vznikají dva odlišné typy (Obrázek 3) [35].



Obrázek 3 Energetický diagram excitovaných pásem J-typ a H-typ agregátů. Základní singletový stav (S_0) a excitovaný singletový stav (S_1), absorpce (Abs.), fluorescence (Fl.), vnitřní konverze (VK), úroveň excitované energie (E_+ a E_-), úhel skluzu (θ). Převzato a upraveno z [35].

Dimery jsou nejčastěji charakterizovány při pozorování změny absorpčního maxima vzhledem k absorpčnímu maximu monomeru. Při zvýšení kvantového výtěžku fluorescence a posunu absorpce do červené oblasti (bathochromní posun), mluvíme o tzv. J-dimerech (*head-to-tail*). J-dimer vykazuje vzhledem k monomeru nižší energii a vytváří se lomená struktura, jelikož úhel svíraný mezi molekulami fluoroforu je nižší než $54,7^\circ$. Naopak v případě H-dimeru (sendvičový typ) je energie absorpčního pásu vyšší než u monomeru a nastává snížení emise fluorescence při posunu absorpce k modré části spektra (hypsochromní posun). Homodimer H-typu je složený ze dvou identických molekul a může u něj dojít k totálnímu potlačení fluorescence, jelikož stejně velké dipólové momenty působí proti sobě a způsobují vzájemnou eliminaci. Při vzniku heterodimeru H-typu pomocí dvou odlišných fluorescenčních barviv dochází ke zmírnění fluorescence následkem různé intenzity dipólových momentů. Statické zhášení nemá striktní požadavek pro překryv absorpčního a emisního spektra, nezávisí na teplotě, ale efektivní zhášení probíhá pouze v těsné vzdálenosti obou molekul [28,35–38].

Dynamické zhášení

Dynamické zhášení bývá v dostupné literatuře velmi často označované také jako Försterův rezonanční přenos energie (FRET). Na základě mechanismu je dynamické zhášení rozdělováno na dva základní typy [39].

První přenos energie je označován jako Försterův mechanismus, někdy také známý jako Coulombův mechanismus. Využívá dipól-dipól interakce mezi tranzitorními dipóly donoru a akceptoru. To mimo jiné znamená, že přenos energie funguje jen na určitou vzdálenost. Vzdálenost je vždy specifická pro konkrétní dvojici a závisí na spektrálním překryvu donoru a akceptoru. Zvolený fluorofor a zhášec musí splňovat podmínku, aby se emisní spektrum fluoroforu překrývalo s absorpčním spektrem zhášeče. Minimální vzdálenost fluoroforu a zhášeče byla naměřena od 1 nm do 10 nm [40].

Druhý typ je známý jako Dexterův mechanismus zhášení a někdy je označován jako výměnný nebo srážecí přenos energie. Tento přenos energie nastává v případě velmi blízké vzdálenosti fluoroforu se zhášečem a závisí na správném překryvu jejich molekulových orbitalů. Jedním ze způsobů, jak rozlišit Dexterův způsob přenosu energie od Försterového přenosu energie, je jejich odlišná závislost na separaci páru donor-akceptor. Popisovaný jev je vyjádřen pomocí vztahu e^{-R} , přičemž R představuje vzdálenost donoru a akceptoru. Účinnost přenosu energie je exponenciálně snížena s rostoucí vzdáleností donoru od akceptoru. Ve většině případů je však uplatňován především Försterův mechanismus a je proto považován za dominantní [41,42].

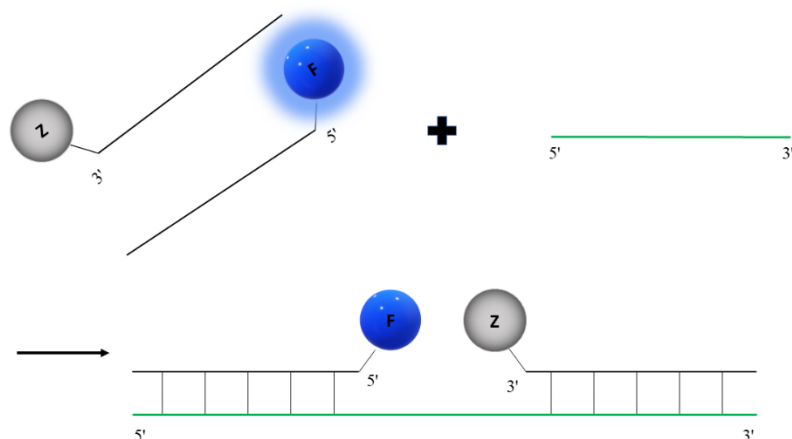
2.2.2 Typy molekulárních sond

Molekulární sondy s fluorescenčním barvivem využívající zhášení fluorescence je možné připravit několika postupy. První možností je aplikace dvou sekvencí oligodeoxynukleotidů, kdy je na jednu sekvenci navázáno fluorescenční barvivo a na druhou sekvenci je navázán pouze zhášec. Takové sondy jsou známé jako jednoduše značené (z angl. *mono-labeled probes*). Druhý typ molekulární sondy je založen na navázání fluorescenčního barviva společně se zhášečem na jednu sekvenci a sondy se označují jako dvojité značené (z angl. *double-labeled probes*). Nejrozšířenější molekulární sondy se dělí na základě jejich mechanismu detekce do následujících kategorií.

1. *Adjacent probes*
2. *Yin-Yang probes*
3. *Taq-Man probes*
4. *Molecular beacons*
5. *Scorpion primers*
6. *Light-up probes*

1. *Adjacent probes*

Vůbec první snaha o konstrukci molekulární sondy dala vzniknout tzv. *adjacent probes*. Sondy jsou založené na dvou jednořetězcových sekvencích, které jsou komplementární k cílové sekvenci. Oba značené řetězce se vážou na komplementárním řetězci blízko sebe. První sekvence obsahuje na jednom konci fluorofor a druhá sekvence obsahuje na opačném konci zhášec (Obrázek 4). Zpravidla se využívá navázání fluorescenčního barviva na 5'-konec a zhášec na 3'-konec nukleotidového řetězce, ale navázání značek v opačném pořadí bylo také testováno. S ohledem na sekvenci cílové molekuly jsou obě komplementární vlákna navržena tak, aby byla zachována minimální vzdálenosti fluoroforu se zhášečem pro co nejefektivnější přenos energie. Optimální vzdálenost mezi fluoresceinem a rhodaminem byla experimentálně stanovena na čtyři až pět bází [27]. V roztoku by nemělo docházet k žádnému přenosu energie. Hybridizace sond k cílové nukleové kyselině se měří snížením fluorescenčního signálu fluoroforu [43]. *Adjacent probes* jsou například využívány k RT-PCR identifikaci a rozlišení termofilních anaerobních bakterií [44].

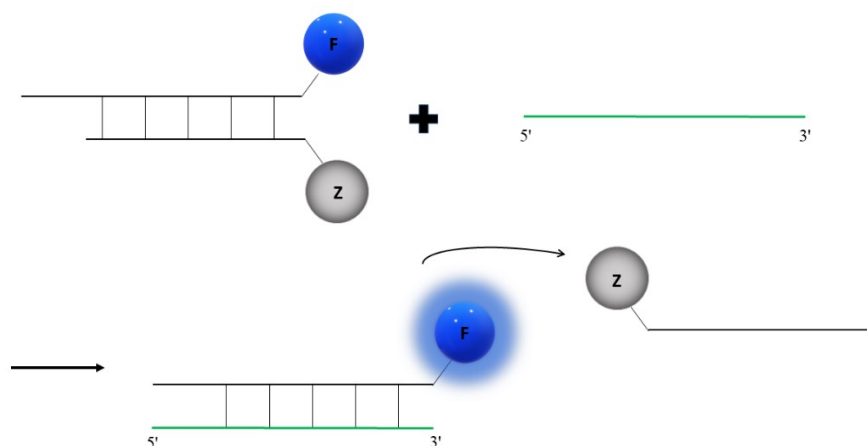


Obrázek 4 Schéma principu *adjacent probes*. V roztoku se nachází dvě modifikované nukleotidové sekvence a jedna nemodifikovaná sekvence DNA (zeleně). Jedna oligodeoxynukleotidová sekvence má navázaný fluorofor (F) na 5'-konci a druhá oligodeoxynukleotidová sekvence má navázaný zhášec (Z) na 3'-konci. Po hybridizaci dochází k efektivnímu přenosu energie z fluoroforu na zhášec a nastává zhášení fluorescence. Převzato a upraveno z [43].

2. *Yin-Yang probes*

Tento druh sondy využívá vzájemně komplementární vlákna nukleotidů. Delší oligodeoxynukleotidové vlákno má navázaný fluorofor a kratší vlákno má navázaný zhášec (Obrázek 5). Před navázáním na cílovou strukturu je zhášení fluorescence na maximální úrovni a přenos energie dosahuje nevyšší efektivity. Jakmile je přidána

komplementární sekvence k inaktivované sondě a následně dojde k zahřátí této směsi, nastává dehybridizace sondy. Tím se přeruší vazby mezi komplementárními řetězci značených oligodeoxynukleotidů a obě vlákna se od sebe oddělí. Po ochlazení se vlákno s navázaným fluoroforem samovolně naváže na komplementární část templátového řetězce a vytvoří více stabilní hybrid sonda-cílová sekvence. V roztoku zůstane druhé vlákno samostatně nenavázané. Přenos energie je zastaven a je možné detekovat zvýšené fluorescenční záření fluoroforu [43]. *Yin-Yang probes* se využívají ke kvantitativnímu měření plasmu RT-PCR pro stanovení viru HIV [45].

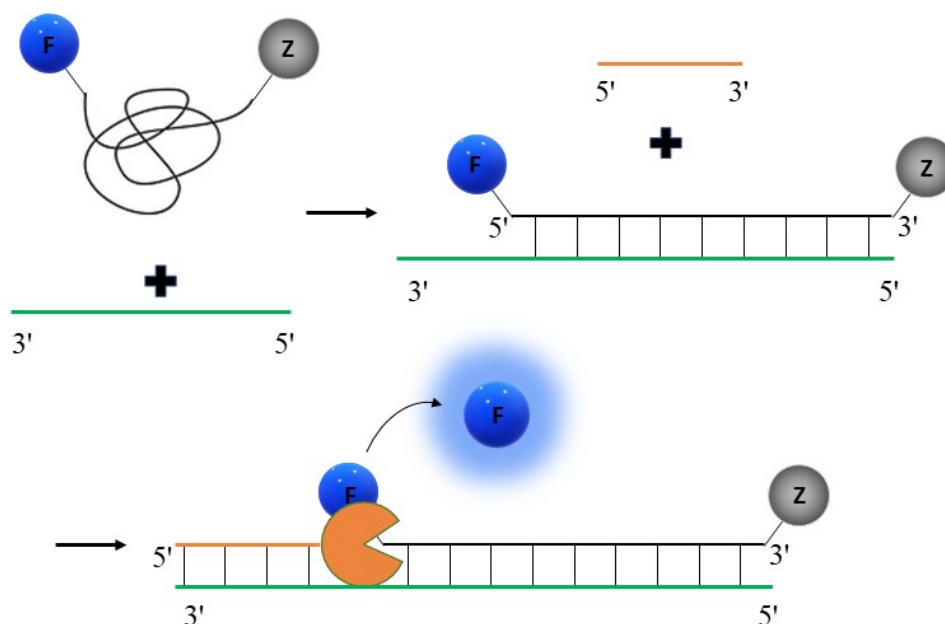


Obrázek 5 Schéma principu *Yin-Yang probes*. Princip spočívá ve vytvoření termodynamicky stabilnějšího páru komplementární sekvence s delším vláknem obsahující fluorofor (F). Po přidání templátové sekvence (zeleně) a zahřátí roztoku dojde k oddělení jednotlivých vláken sondy. Po ochlazení se komplementární vlákno s navázaným fluoroforem váže na templátovou sekvenci. Oddálení zhášecí (Z) od fluoroforu způsobí zvýšení fluorescence, které je možné detekovat. Převzato a upraveno z [45].

3. *Taq-Man probes*

Název *Taq-Man probes* je odvozen od enzymu *Taq* DNA polymerázy, která byla objevena u termostabilní bakterie *Thermus aquaticus*. Polymeráza je používána při PCR. Molekulární sonda *Taq-Man* patří ke dvojitě značeným sondám. To znamená, že fluorescenční barvivo i zhášecí jsou navázané na jeden oligodeoxynukleotidový řetězec. Fluorescenční barvivo je navázané na 5'-konec a zhášecí na 3'-konec [46]. Volná sonda nemá vzájemně komplementární sekvenci a v roztoku je sbalená v náhodném klubku (Obrázek 6). Před hybridizací na templátovou sekvenci se uplatňuje statické zhášení, protože vzdálenost fluoroforu a zhášecí je minimální. Po navázání sondy na komplementární řetězec je možný malý nárůst fluorescence, ale zhášení je stále aktivní díky FRET. Pomocí exonukleázové aktivity *Taq* DNA polymerázy je odštěpen terminální nukleotid z 5'-konce. Zároveň s tím dochází k odštěpení fluorescenčního barviva

navázaného na 5'-konci a oddálení barviva od zhášedce způsobí nárůst měřitelné fluorescence [47]. Jedná se o progresivní metodu, která nedávno našla využití například pro diagnostiku viru SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR [48].

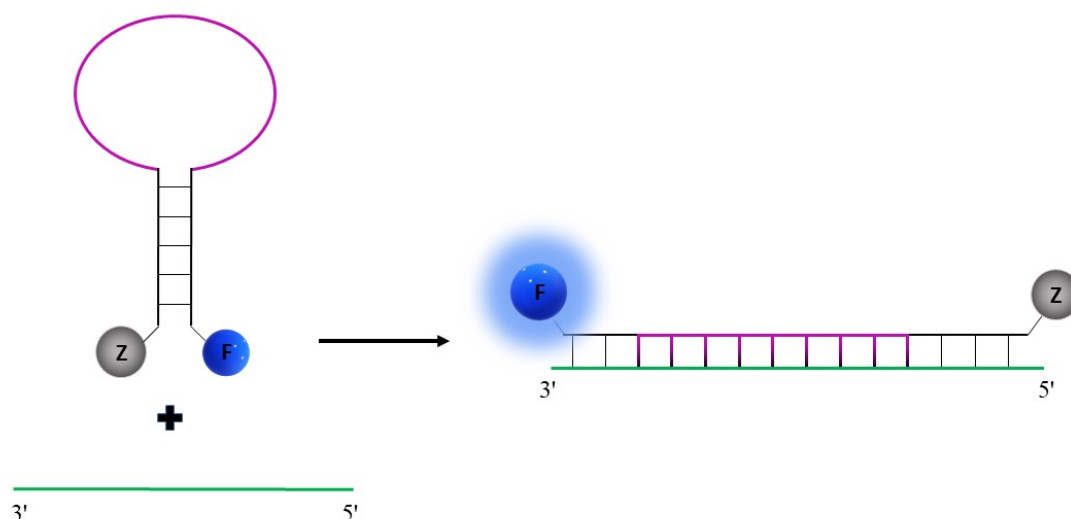


Obrázek 6 Schéma principu *Taq-Man probes*. Sonda je v roztoku ve formě náhodného klubka, kdy se uplatňuje především statické zhášení. K rozvolnění klubka dochází při hybridizaci na komplementární řetězec DNA (zeleně). Fluorofor (F) je stále relativně blízko zhášedce (Z) a nárůst fluorescence je minimální. Po navázání primeru (oranžové vlákno) dojde k aktivaci *Taq* DNA polymerázy (oranžová výseč) a zároveň s tím dochází k postupnému odštěpení nukleotidů z 5'-konce. Tím se fluorescenční barvivo vzdálí od zhášedce a je možné pozorovat nárůst fluorescence. Převzato a upraveno z [43].

4. *Molecular beacons*

Molecular beacons patří také k dvojité značeným molekulárním sondám. Modernější typ molekulární sondy má v tomto případě fluorescenční barvivo navázané společně se zhášedcem na jednom oligodeoxynukleotidovém řetězci. Tyto sondy se vyznačují specifickou strukturou, která má podobu vlásenky. Na každém konci oligodeoxynukleotidové sekvence je navázán fluorofor nebo zhášedce. Následuje sekvence pěti až šesti komplementárních párů guaninu a cytosinu, které vytvářejí krátkou stopku. Na stopku nasedá sekvence nukleotidů, která vytváří charakteristickou smyčku (Obrázek 7). Sonda má v neaktivním stavu zajištěnou potřebnou vzdálenost mezi zhášedcem a fluoroforem pro efektivní zhášení. V přítomnosti komplementární sekvence templátové matrice dochází k navázání sondy přes smyčku, čímž se vytvoří stabilnější formace. Tímto způsobem dojde k dostatečnému oddálení zhášedce od fluoroforu a následnému nárůstu fluorescence [49]. Výhodou *molecular beacons* je detekce cíle

bez nutnosti odstraňovat nezreagovanou sondu, protože nehybridizovaná sonda nevykazuje fluorescenci. Jsou to užitečné sondy pro monitorování cílové molekuly v živých buňkách v reálném čase. Typicky se jedná o aplikaci v živém organismu pro detekci mutací viru způsobující Hepatitidu B [50], pro PCR detekci viru HIV [51] nebo bakterie způsobující tuberkulózu [52]. V posledních dvou letech našli *molecular beacons* využití taktéž pro detekci viru SARS-CoV-2 [53].

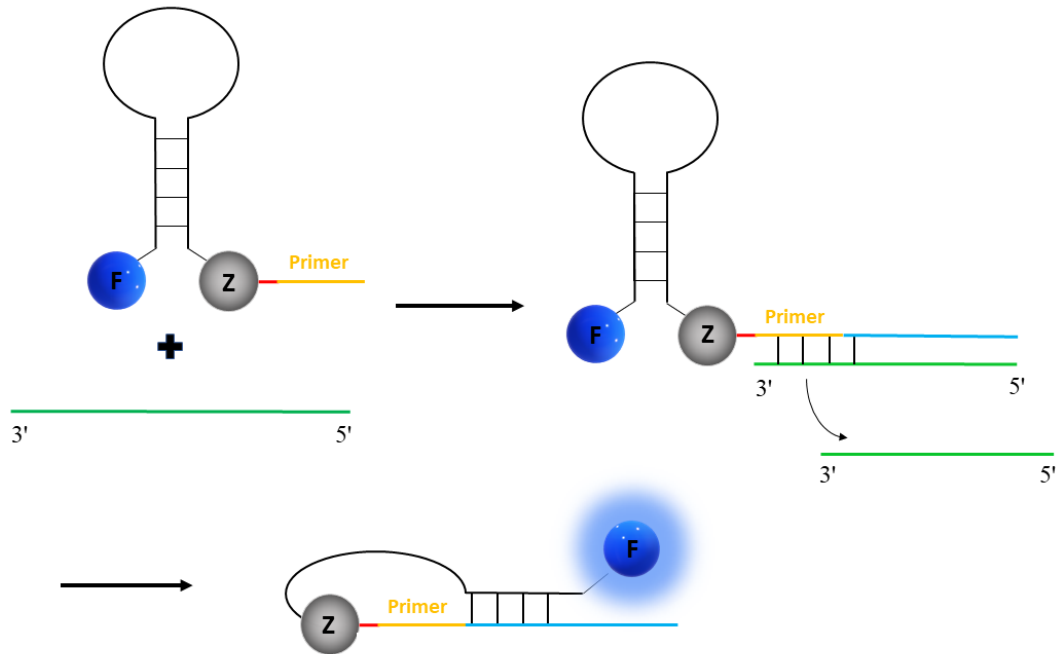


Obrázek 7 Schéma principu *molecular beacons*. Sonda se skládá ze smyčky (fialově) a stopky, která má na jednom konci navázaný fluorofor (F) a na druhém konci navázaný zhášec (Z). Inaktivovaná sonda tvoří vlásenku a v roztoku je fluorofor se zhášečem v těsné blízkosti, kdy dochází k efektivnímu zhášení fluorescence. Po hybridizaci s komplementární řetězcem (zeleně) dojde k výraznému oddálení obou konců molekulární sondy a nastává zvýšení fluorescenčního záření. Převzato a upraveno z [53].

5. *Scorpion primers*

Sondy *scorpion primers* jsou podobné sondám *molecular beacons*, protože obsahují na jednom konci řetězce fluorofor a na druhém konci zhášec. Patří tedy také mezi jednořetězcové dvojité značené sondy. Na rozdíl od předchozí sondy mají ve své struktuře navíc primer, který je typicky navázaný na zhášec neštěpitelnou vazbou (Obrázek 8). U jiných sond je během PCR nutné přidat primer do reakční směsi samostatně. Sonda v intaktním stavu má taktéž tvar vlásenky a na začátku PCR dochází k prodlužování řetězce sondy. Po syntéze komplementárního řetězce dochází během dalšího kroku k rozštěpení vazeb vlásenky, jejíž nukleotidy intramolekulárně hybridizují s nově připravenou sekvencí. Druhý konec sondy se naváže na tuto sekvenci a vznikne struktura podobná ocasu škorpióna. Tímto způsobem dojde k oddálení fluoroforu od zhášeče a dochází k emisi fluorescence. Výhodou sond *scorpion primers* je rychlejší

proces hybridizace v porovnání s ostatními sondami [54]. Molekulární sondy *scorpion primers* jsou používány pro detekci mutací cystické fibrózy [55].

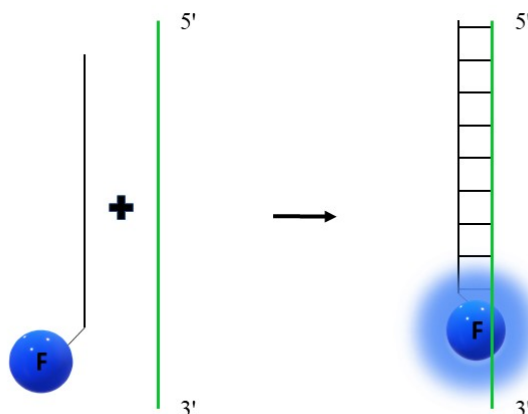


Obrázek 8 Schéma principu *scorpion primers*. Sonda má v intaktním stavu tvar vlásenky a na zhášec (Z) je neštěpitelnou vazbou (červeně) navázán primer (oranžově). Na začátku PCR se naváže primer na templátovou sekvenci DNA (zeleně). Po hybridizaci a ochlazení reakce nastává prodloužení řetězce (naznačeno modře). Během následné denaturace dochází k rozštěpení, jak vazeb mezi templátovou sekvencí a nově nasynthetizovaným řetězcem, tak mezi řetězci vlásenky. Sekvence nukleotidů vlásenky se komplementárně váže na novou sekvenci a dochází k ohnutí sondu do charakteristického tvaru. Tím přestane zhášení fluorescence, protože fluorescenční barvivo (F) je dostatečně vzdáleno od zhášec. Převzato a upraveno z [54].

6. Light-up probes

Light-up probes patří do zvláštní skupiny molekulárních sond, protože sondy se skládají pouze z oligodeoxynukleotidového řetězce a fluorescenčního barviva (Obrázek 9). Sonda funguje bez přítomnosti zhášec a nukleotidový řetězec obsahuje modifikovaný typ nukleových kyselin. Jedná se o peptidové nukleové kyseliny (PNA), které jsou blízkým analogem DNA. Pro tyto sondy je charakteristická velmi krátká sekvence, obvykle o délce 8 až 12 bází [56]. Typicky jsou využívány fluorofory jako thiazolová oranž nebo asymetrické cyaniny jako SYBR Green I, které svojí strukturou dokážou vklínit mezi vlákna DNA. Zvýšená vazebná afinita PNA spolu se schopností interkalace použitého fluoroforu vytvoří velmi stabilní komplexní uspořádání, kdy se zamezí volnému otáčení vazby aromatického systému fluorescenčního barviva. Samotná sonda prakticky neemituje fluorescenční záření, a to i bez absence zhášec ve své struktuře. Detekce zvýšené fluorescence nastává až po navázání na komplementární

sekvenci, kdy se tvoří výsledný duplex nebo triplex. Molekulární sondy tohoto typu patří mezi relativně levné a rychle dostupné, ale jsou omezeny nespecifickou fluorescencí, a tím způsobem nižší senzitivitou [57].



Obrázek 9 Schéma principu *light-up probes*. Ačkoliv se sonda skládá pouze z velmi krátké sekvence a navázaného fluoroforu (F), samotná sonda v roztoku nefluoreskuje. Zvýšení fluorescence nastává až po hybridizaci s komplementárním řetězcem (zeleně), kdy je omezena volná otáčivost aromatického systému fluorescenčního barviva. Převzato a upraveno z [57].

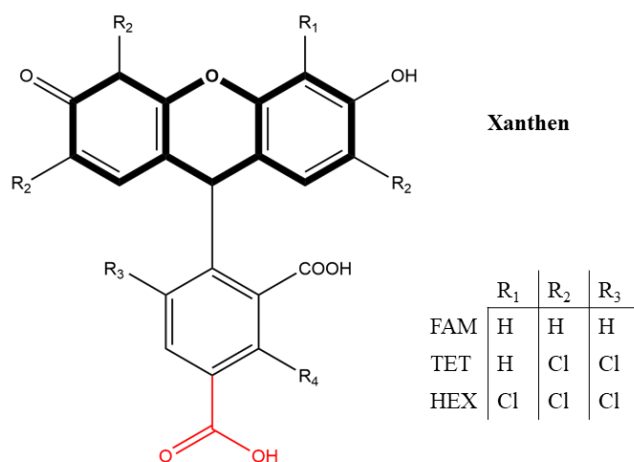
2.3 Fluorofory

Sloučeniny mající schopnost fluorescence se obecně nazývají fluorofory. Ve skutečnosti tyto molekuly ihned po absorbování světelného záření o určité vlnové délce odevzdávají přijatou energii zpět zářením o delší vlnové délce. Mezi fluorofory používané pro detekci DNA se řadí především synteticky vyráběná barviva. Komerčně dostupná barviva jsou k dispozici v různých formách. Výběr ideálního barviva pro konečnou aplikaci bývá na základě jejich spektrálních vlastností. Pro ucelený přehled nejpoužívanějších fluoroforů je můžeme rozdělit podle jejich chemické struktury [58].

2.3.1 Fluorofory odvozené od xanthenu

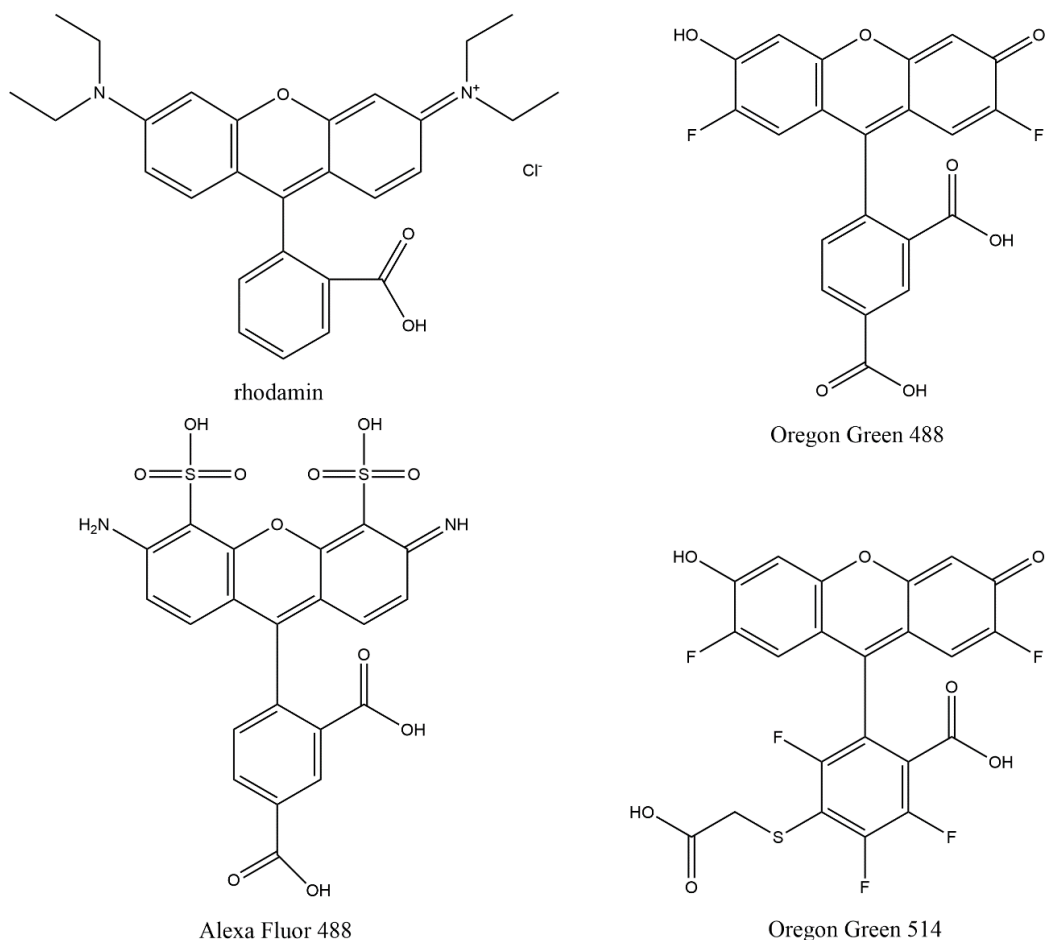
Prvním fluorescenčním barvivem vycházejícím ze struktury xanthenu byl fluorescein (Obrázek 10). Přestože se jedná o velmi starou molekulu, nachází četná využití ještě v dnešní době. Unikátní vlastnosti se projevují zejména ve vodném prostředí a fluorescein se stále s výhodou používá jako fluorescenční barvivo. Vysoký extinkční koeficient, dobrá rozpustnost ve vodě, a především vysoký kvantový výtěžek fluorescence jsou ideální parametry při využití jako fluorescenčního barviva [59]. Na druhou stranu, použití fluoresceinu je omezeno pro jeho závislost na okolním

prostředí pH a celkem výrazný *photobleaching* [34]. Nejúčinnější forma fluoresceinu je dianion, který je náchylný ke změnám pH a nejvíce ovlivňuje kvantový výtěžek fluorescence. Použitím vhodných pufrů a dodržením standardizovaných podmínek v průběhu reakce lze tento negativní jev eliminovat a je možné dosáhnout přijatelné opakovatelnosti reakce [60]. Vlastnosti fluoresceinu byly během let modifikovány substitucí na základním skeletu, což dělá z fluoresceinu nejrozšířenější skupinu ze všech fluoroforů [61].



Obrázek 10 Chemická struktura xanthenu a jeho derivátů. Fluorescein (FAM), tetrachlorfluorescein (TET) a hexachlorfluorescein (HEX). Červenou barvou je zvýrazněna karboxylová skupina, kterou se fluorescenční barvivo váže na nukleotid.

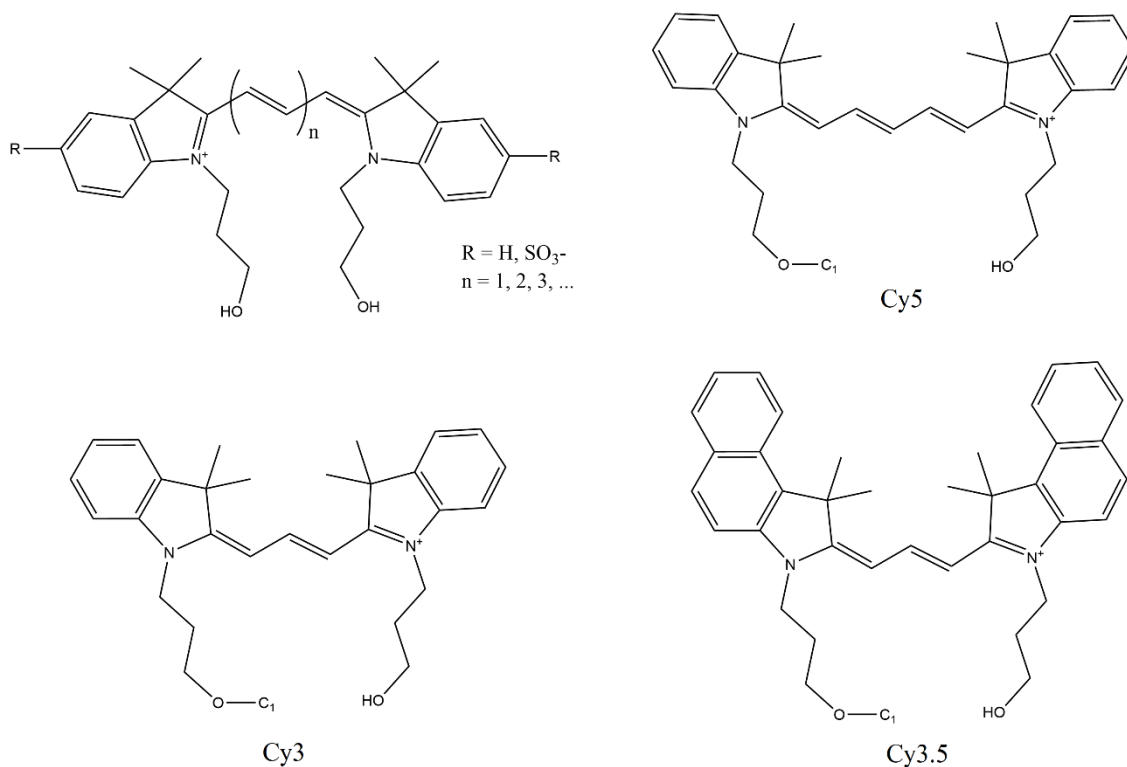
Dalším fluorescenčním barvivem odvozeným od xanthenu je rhodamin. Barviva na základě rhodaminu se vyznačují lepší stabilitou vůči změně pH prostředí a vyšší fotostabilitou, ale při porovnání s fluoresceinem dosahují nižšího kvantového výtěžku fluorescence. Mezi komerčně dostupné fluorofory patří sulfonovaný derivát rhodaminu Alexa Fluor 488, Oregon Green 488 a Oregon Green 514 (Obrázek 11) [62,63].



Obrázek 11 Přehled chemické struktury rhodaminu a derivátů odvozených z jeho struktury. Komerčně dostupné fluorofory jsou Alexa Fluor 488, Oregon Green 488 a Oregon Green 514.

2.3.2 Fluorofory odvozené od indocyaninu

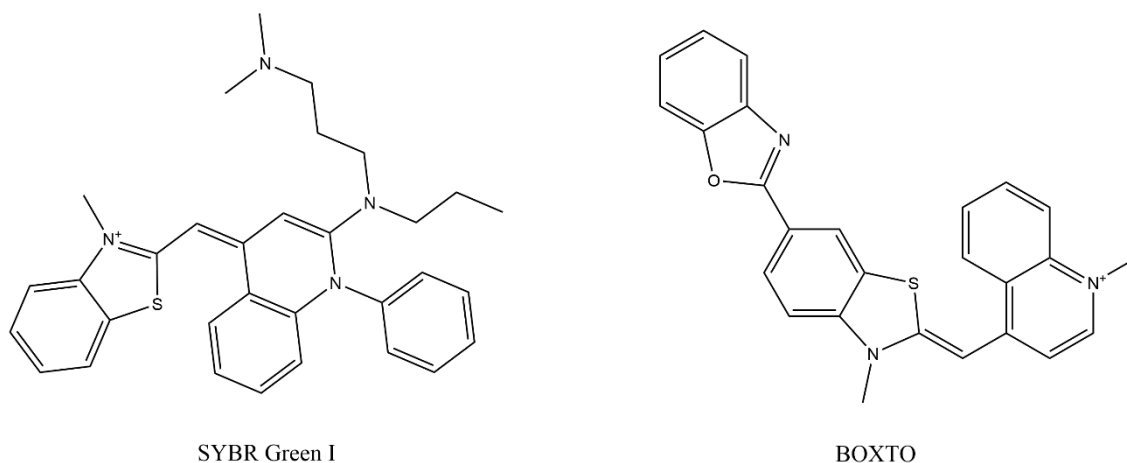
Fluorescenční barviva odvozené od struktury indocyaninu se vyznačují dvěma indolovými jádry, která jsou spojena různě dlouhým řetězcem obsahující konjugované dvojné vazby. Někdy bývají souhrnně označovány jako cyaninová barviva (Cy). Podle počtu opakujících se jednotek, která spojují indolová jádra, se pojmenují příslušnou číslicí na konci označení barviva. Například cyaninovému barvivu s celkem pěti spojovanými jednotkami mezi jádry indolu přísluší označení Cy5. Nejpoužívanější fluorescenční barviva jsou Cy3, Cy5 a Cy3.5. Jeden indolový kruh má připojený hydroxypropyl a druhý indolový kruh je tvořen tříuhlíkatým řetězcem, který je kovalentně spojený k 5'-konci fosfát cytidinu nukleotidu (Obrázek 12) [64–66].



Obrázek 12 Chemické struktury fluoroforů odvozených od indocyaninu. Komerčně dostupné fluorofory jsou Cy3, Cy5 a Cy3.5. Převzato a upraveno z [65].

Kondenzace jednoho nebo více benzenových jader k základní struktuře způsobí posun vlnové délky emisního záření do oblasti červeného spektra. Jedno benzenové jádro posunuje vlnovou délku zhruba o 30 až 40 nm k vyšším hodnotám. Modifikace cyaninového barviva rozšířením o aromatický kruh je patrné také ze samotného označení barviva. Pro ilustraci, cyaninové barvivo Cy3.5 představuje přidání benzenového kruhu na každém indocyaninu. Další modifikací upravující rozpustnost je sulfonace, která zabraňuje tvorbě agregátů ve vodném prostředí a má zanedbatelný účinek na změnu vlnové délky [67].

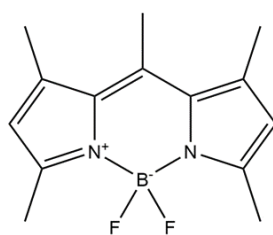
Deriváty asymetrických cyaninových barviv jsou odvozeny od struktury 3-methyl-2-[(*E*)-chinolin-4(*1H*)-ylidenmethyl]-1,3-benzothiazol-3-ium (Obrázek 13). Známými zástupci jsou fluorescenční barviva SYBR Green I [68] a BOXTO [69].



Obrázek 13 Přehled chemických struktur asymetrických cyaninových barviv, jejímž základem je 3-methyl-2-[(*E*)-chinolin-4(1*H*)-ylidenmethyl]-1,3-benzothiazol-3-ium. Komerčně dostupná fluorescenční barviva jsou SYBR Green I a BOXTO.

2.3.3 BODIPY

Dalšími používanými fluorescenčními barvivy jsou deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-*S*-indacenu (BODIPY). Takové molekuly našli své využití pro molekulární sondy zvláště díky svým výhodným vlastnostem. Mezi tyto vlastnosti patří dobrá rozpustnost ve vodě, minimální agregace, chemická stabilita, úzké emisní pásy s minimálním rozkladem světla, nezávislost na změnu pH a vysoké extinkční koeficienty. Fluorofory BODIPY mají navíc vyšší fotostabilitu než fluorescein. Substituce na různých místech struktury daly vzniknout skupině barviv čítající bezmála dvacet dalších derivátů. Typickým rozpoznávacím znakem pro tuto skupinu látek je připojení absorpčního/emisního maxima za název látky, např. BODIPY 493/503 (Obrázek 14) [70,71].

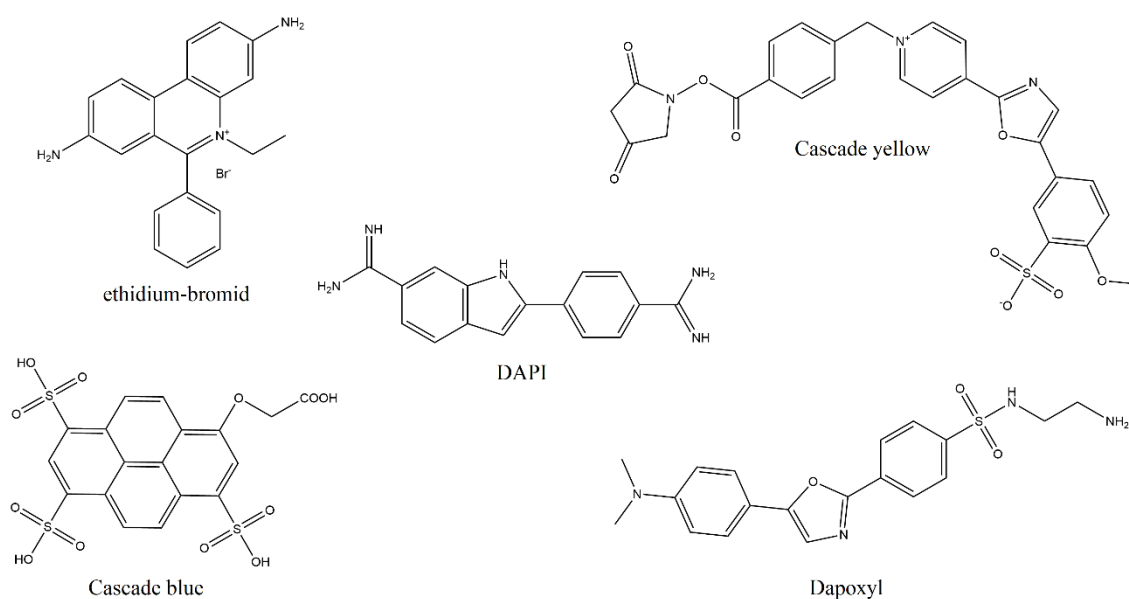


BODIPY 493/503

Obrázek 14 Chemická struktura fluoroforu odvozeného od 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-*S*-indacenu. Komerčně dostupné barvivo je standardně označované jako BODIPY 493/503.

2.3.4 Strukturně odlišné fluorofory

Další fluorofory již mají rozmanitou strukturu. Tato fluorescenční barviva jsou schopná přijímat a odevzdávat energii v rámci celého viditelného spektra. Některá z nich to dokážou i v ultrafialové oblasti. Zástupcem molekuly odvozené od fenanthridinu je ethidium-bromid (Obrázek 15). Toto užitečné fluorescenční barvivo se stalo nezbytnou sloučeninou v molekulární biologii při vizualizaci nukleových kyselin po celém světě [72]. Fluorescenční barviva odvozená od 4-(5-fenylloxazol-2-yl)-pyridinu, která se hojně využívají v průtokové cytometrii, se nazývají Cascade yellow [73] a Dapoxyl [74]. Dalším zástupcem vyráběným v americké výzkumné laboratoři, nedaleko pohoří Cascade mountains, je strukturní derivát pyrenu Cascade blue [73]. Fluorofor odvozený od fenyindolu, konkrétně 4',6-diamidin-2-fenyindolu, používá zkrácené označení DAPI. Toto fluorescenční barvivo je známé tím, že se váže v malém žlábků DNA zvláště v přítomnosti AT sekvencí [75]. Tabulka 1 shrnuje strukturní základy fluorescenčních barviv, jejich absorpční a emisní maxima.



Obrázek 15 Chemické struktury dalších fluoroforů. Komerčně dostupné fluorofory jsou ethidium-bromid, Cascade blue, DAPI, Cascade Yellow a Dapoxyl.

Tabulka 1 Komerčně dostupná fluorescenční barviva – strukturní základ, absorpční a emisní maxima. Převzato a upraveno z [76].

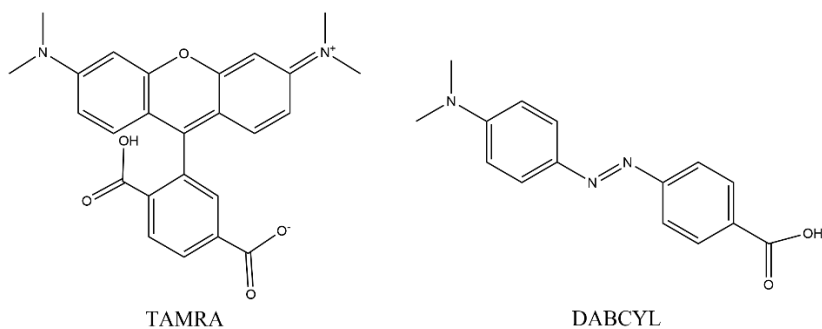
Barvivo	Strukturální základ	Absorpce λ_{\max} [nm]	Emise λ_{\max} [nm]
FAM	fluorescein	495	520
TET	fluorescein	521	536
HEX	fluorescein	535	556

TAMRA	rhodamin	555	576
Quasar-570/Cy3	cyanin	550	570
Cy3.5	cyanin	581	596
Quasar-670/Cy5	cyanin	649	670
BODIPY 493/503	indacen	493	503

2.4 Zhášee

Sloučeniny disponující schopností snížit fluorescenci vyzařovanou jinými látkami, nebo fluorescenci úplně potlačit, se obecně označují jako zhášee fluorescence. Již při návrhu molekulární sondy je žádoucí zvolit správný typ zhášee. Vzhledem k použitému fluorescenčnímu barvivu a následnému mechanismu zhášení se dbá na dodržení základních pravidel pro řádné fungování sondy jako celku. Při zhášení principem FRET se musí překrývat emisní spektrum fluoroforu a absorpční spektrum zhášee. Další podmínkou pro správnou funkci molekulární sondy je vysoká chemická stabilita zhášee vůči okolním měnícím se podmínkám při samotné syntéze oligodeoxynukleotidové sondy. Požadavek na dostatečnou odolnost je důležitým aspektem, protože zhášee se navrhuje nejčastěji na 3'-konec oligodeoxynukleotidového řetězce a je celou dobu přítomný při syntéze oligodeoxynukleotidové sondy v DNA syntezátoru [43].

V současnosti se rozlišují dvě generace zhášee, které se odlišují svými vlastnostmi. Mezi první objevené zhášee patří tetramethylrhodaminy (TAMRA), které jsou odvozeny od struktury rhodaminu (Obrázek 16). TAMRA se prezentují vlastní fluorescencí, která je u zhášee nežádoucí. Vlastní fluorescence dokáže negativně snížit citlivost při detekci [77]. Dalším zhášee z první generace je derivát 4-(fenyldiazenyl)anilinu (DABCYL). I přes nepřítomnost vlastní fluorescence je omezen na absorpci jen při nízké vlnové délce. Starší generace zhášee má celou řadu nežádoucích vlastností, které snižují jejich účinnost a omezují jejich použití. Z toho důvodu byly tyto zhášee nahrazeny novější generací označovanou jako *dark quenchers* [78].



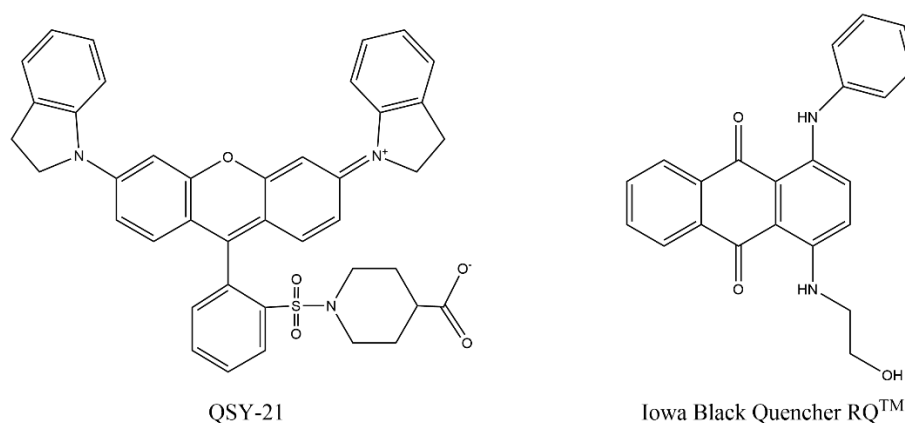
Obrázek 16 Chemické struktury zhášeců první generace. Komerčně dostupné zhášece jsou TAMRA a DABCYL.

Mladší skupina zhášeců se vyznačuje vlastní nulovou fluorescencí a rozšířenou oblastí absorpce fluorescence, která je schopna pokrýt většinu aplikovaných fluoroforů. Druhá generace zhášeců *dark quenchers* se nyní řadí ke komerčně nejpoužívanějším zhášecům. Protože *dark quenchers* nemají výraznou vnitřní fluorescenci, mohou být použity ve vysoké koncentraci [79]. Deriváty difenylazenu patří do skupiny nejrozšířenějších zhášeců známých jako Black Hole Quenchers™ (BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3) a BlackBerry® Quenchers (BBQ-650) (Obrázek 17). Tyto zhášece mají absorpční maxima od 480 nm k blízkému infračervenému záření a pokrývají takřka většinu aplikovaných fluoroforů. Nevýhodou je snížená chemická stabilita během post-syntetické modifikace oligodeoxynukleotidového řetězce, kdy může docházet k degradaci molekuly zhášecí při použití agresivních roztoků jódu nebo amoniaku [80–82].



Obrázek 17 Chemické struktury zhášeců druhé generace. Komerčně dostupné *dark quenchers* jsou BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3 a BBQ-650.

Zhášecí druhé generace odvozené také od struktury rhodaminu, se označují jako QSY-21 (Obrázek 18). *N,N'*-diaryl substituce na struktuře rhodaminu snižuje fluorescenci molekuly. Zhášecí QSY-21 absorbují záření v rozsahu vlnových délek 540–750 nm, což je rozsah často používány ve FRET sondách [83]. Molekula zhášecí vycházející ze struktury 1,4-diamino-9,10-antrachinonu náleží Iowa Black Quencher RQ™. Tento zhášecí má široké absorpční spektrum v rozsahu od 500 do 700 nm. Maximální absorpce zhášecí je při 656 nm, a proto dokáže zhaset emisní záření fluorescenčního barviva Cy5.5 [84]. Tabulka 2 shrnuje strukturální základ zhášecí fluorescence a jejich absorpční maxima.



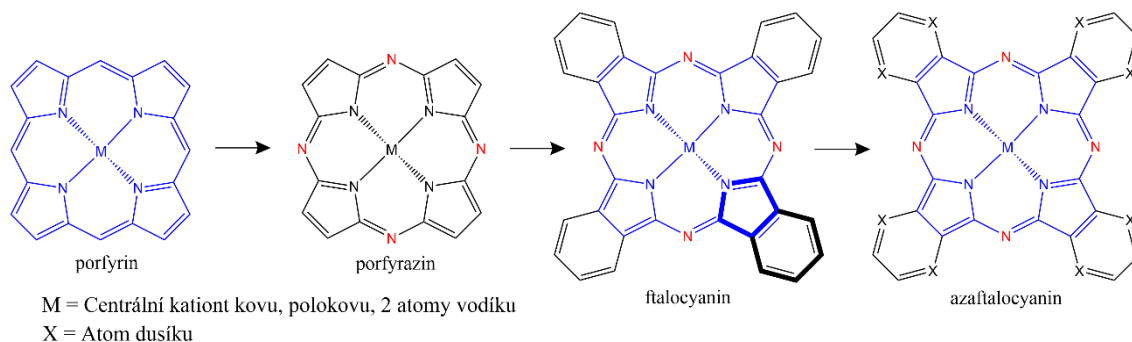
Obrázek 18 Chemické struktury zhášecí druhé generace. Komerčně dostupné *dark quenchers* jsou QSY-21 a Iowa Black Quencher RQ™.

Tabulka 2 Komerčně dostupné zhášecí fluorescence – strukturální základ a absorpční maxima. Převzato a upraveno z [76].

Zhášecí	Strukturální základ	Absorpce λ_{\max} [nm]
TAMRA	rhodamin	555
DABCYL	fenyldiazenylanilin	453
BHQ-1	difenyldiazen	543
BHQ-2	difenyldiazen	544
BHQ-3	difenyldiazen	672
BBQ-650	difenyldiazen	650
QSY-21	rhodamin	660
Iowa Black Quencher RQ™	antrachinon	656

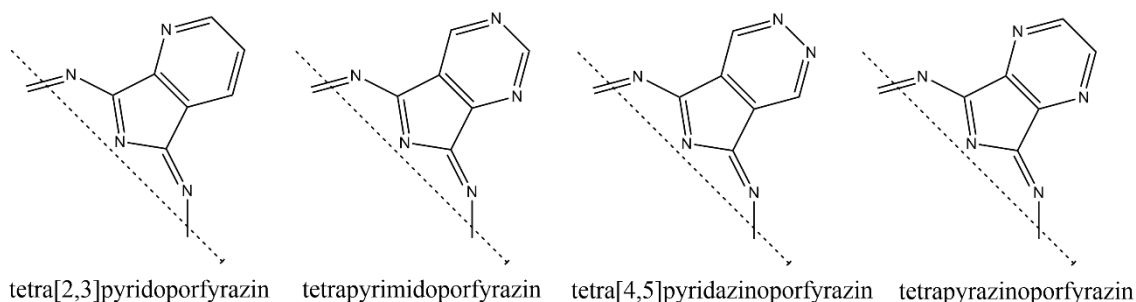
2.5 Azaftalocyaniny

Chemická struktura azaftalocyaninů vychází ze struktury porfyriu, který můžeme velmi často nalézt v přírodě jako chlorofyl nebo hem B. Izosterní záměna methinových můstků za atomy dusíku ve struktuře porfyriu vytvoří molekulu porfyrizinu (Obrázek 19). Z molekuly porfyrizinu vychází molekula ftalocyaninu. Při podrobnějším zkoumání lze pozorovat 4 samostatné isoindolové jednotky propojené v poloze 1 a 3 přes azomethinové můstky. Substitucí methinové skupiny na benzenovém jádře ftalocyaninu se vytvoří struktura azaftalocyaninu. Synteticky připravené sloučeniny obsahují rozsáhlý systém konjugovaných vazeb a mají proto planární uspořádání. Strukturní uspořádání azaftalocyaninů umožňuje vázat ve svém středu kationty kovů, polokovů nebo atomy vodíku. Navázání různých kationtů v centru molekuly zásadně ovlivňuje vlastnosti molekuly [85].



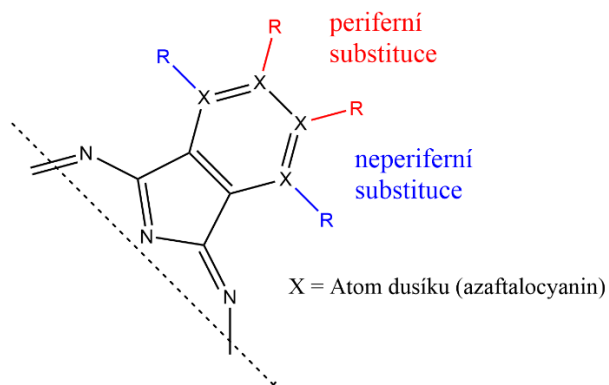
Obrázek 19 Strukturní znázornění azaftalocyaninu. Chemická struktura azaftalocyaninu vychází z porfyriu (zvýrazněno modrou barvou). Izosterní substitucí methinových můstků porfyriu čtyřmi dusíky (červeně) vzniká porfyrizin. Spojením 4 isoindolových jednotek (zvýrazněná struktura tučně) azomethinovými můstky vznikne ftalocyanin. Záměnou methinové skupiny benzenového jádra ftalocyaninu vznikne strukturní analog azaftalocyanin. Převzato a upraveno z [85].

Jak vyplývá z výše uvedeného, azaftalocyaniny jsou strukturní aza-analogy ftalocyaninů, které vznikly izosterní substitucí atomy dusíku místo methinové skupiny v benzenovém jádře. Dle počtu vyměněních atomů dusíku ve struktuře makrocyklu rozlišujeme jednotlivé modifikace azaftalocyaninů. Například tetra[2,3]pyridoporfyrizin, tetrapyrimidoporfyrizin, tetra[4,5]pyridazinoporfyrizin a tetrapyrizinoporfyrizin (Obrázek 20) [86].



Obrázek 20 Přehled strukturálních modifikací azaftalocyaninů náhradou dusíku v benzenovém jádře. Převzato a upraveno z [86].

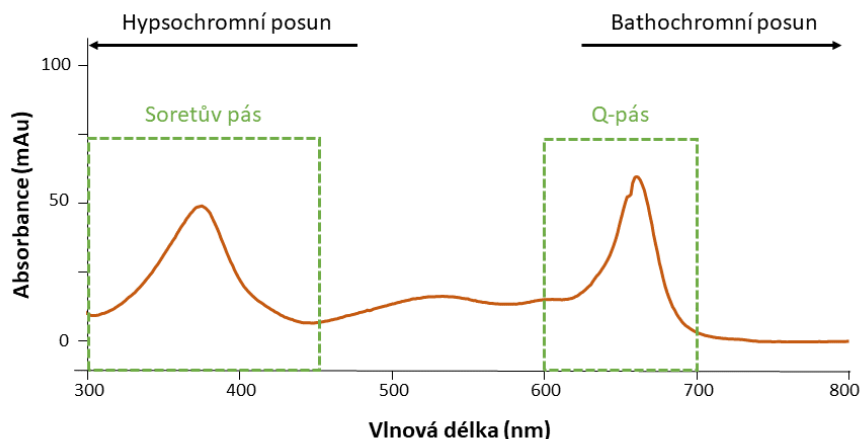
Za účelem nalezení vhodnějších fotofyzikálních a fotochemických vlastností azaftalocyaninů jsou velmi časté modifikace na aromatickém jádře vázané přes heteroatom. Rozlišujeme, jestli k navázání dalšího atomu dochází na periférii, nebo blíže středu makrocyklu (Obrázek 21) [87].



Obrázek 21 Polohy substituce azaftalocyaninů. Převzato a upraveno z [87].

2.5.1 Vlastnosti azaftalocyaninů

Jak je patrné ze struktury azaftalocyaninů, molekuly obsahují rozsáhlý konjugovaný systém dvojných vazeb umožňující absorpci světelné energie v širokém pásmu spektra. Kondenzace benzenových kruhů k porfyrazinu významně posouvá absorpční a emisní spektrum do širší oblasti vlnových délek a pokrývá dva pásy od viditelného spektra po začátek infračerveného spektra (300–800 nm). Zlepšené parametry rozšiřují jejich použití a substituenty ovlivňují elektronové prostředí lepšími redoxními vlastnostmi, vyšší tepelnou a chemickou stabilitou. Typicky se u azaftalocyaninů vyskytuje intenzivní absorpce v Soretově oblasti (300–450 nm) a v oblasti Q-pásmu (600–700 nm), což se projevuje výraznou barevností připravených látek (Obrázek 22) [85].



Obrázek 22 Absorpční spektrum azaftalocyaninu.

Vysokoenergetický Soretův pás je relativně stabilní v prostředí s měnícími se okolními podmínkami a využívá se ke stanovení koncentrace. Na druhou stranu nízkoenergetický Q-pás vykazuje vyšší variabilitu a je možné ho použít k identifikaci látky. V případě, že je Q-pás celistvý, bez výraznějších odchylek, tak se bude pravděpodobně jednat o symetrický azaftalocyanin obsahující koordinovaný centrální kationt. Rozdělený a nesouměrný Q-pás znamená výskyt méně symetrické molekuly, kde jsou místo centrálního kationtu ve středu jádra navázány pouze vodíky. Modifikace navázáním atomů na benzenový kruh výrazněji nemění polohu Q-pásu, ale je to účinný způsob, jak ovlivnit celkové vlastnosti výsledné molekuly. Posun směrem k vyšším hodnotám vlnové délky lze dosáhnout postupným přidáním π -konjugovaného systému a užívá se pro něj označení bathochromní posun. Každé další navázané benzenové jádro představuje posun asi o 20 nm. Naopak substituce benzenového jádra pyrazinem znamená posun Q-pásu přibližně o 50 nm směrem k nižším hladinám vlnové délky a jedná se hypsochromní posun. Substituce azaftalocyaninu na periférii pomocí alkylu o 5 nm, alkylaminu o 15 nm nebo thioetheru o 20 nm způsobuje bathochromní posun. Substituce alkoxy/aryloxy skupinou znamená hypsochromní posun přibližně o 10 nm [88,89].

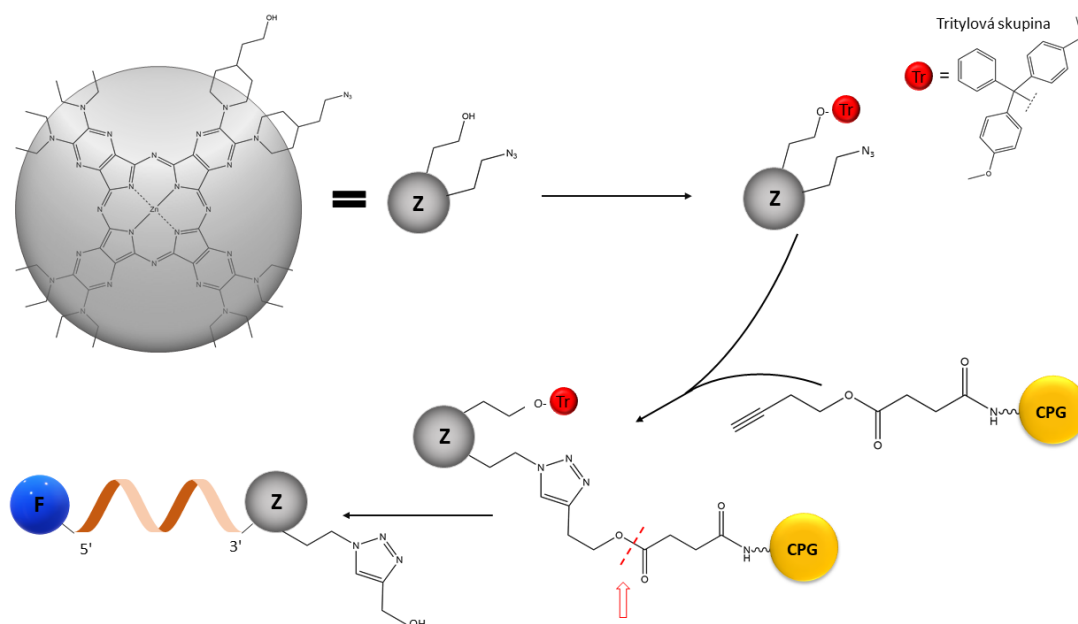
2.5.2 Použití azaftalocyaninů

Výzkumná skupina působící na katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy se zaměřuje na výzkum azaftalocyaninů pro jejich výhodné vlastnosti při zhášení fluorescence v oligodeoxynukleotidových sondách jako *dark quenchers*. Především tetrapyrazinoporfyraziny nemají vnitřní fluorescenci a zároveň jsou schopné zhášet fluorescenční záření v širokém pásmu vlnových délek. To z nich činí ideální kandidáty

na moderní zhášecí fluorescence. Detailnější studium azaftalocyaninů a jejich snadná dostupnost otevřelo dveře jejich praktickému využití v různých oblastech. Azaftalocyaniny nacházejí uplatnění nejen jako zhášecí fluorescence, ale používají se také v tisku. Využívá se jejich barevnosti pro výrobu tonerů do tiskáren nebo fungují jako fotoreceptory v laserových tiskárnách. Dobrá absorpce fluorescenčního záření o vlnové délce přes 650 nm a vysoké kvantové výtěžky singletového kyslíku jsou důležité vlastnosti pro použití při fotodynamické terapii k léčbě tumorů. Selektivní efekt na přenos intramolekulárního náboje využívají citlivé senzory pro detekci fluorescence v biologickém prostředí. Zablokováním aminoskupin na periférii molekuly nebo odebráním protonu hydroxylové skupiny fenolu slouží jako vybrané senzory citlivé na kationty kovů nebo ke stanovení hodnoty pH [85].

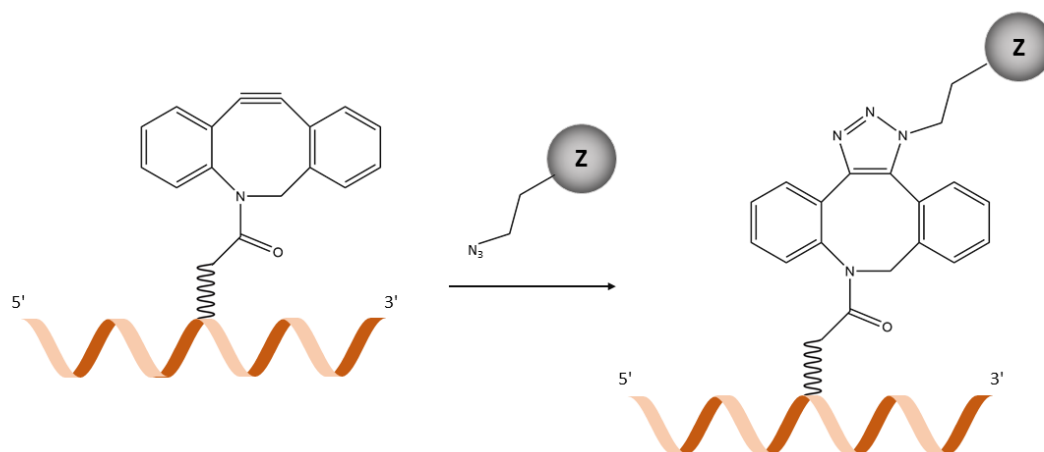
2.5.3 Navázání azaftalocyaninu na oligodeoxynukleotid

Syntéza molekulární sondy nejčastěji probíhá na pevné fázi ve směru od 3'-konce k 5'-konci. V případě dvojitě značené sondy se zhášecím na 3'-konci, syntéza začíná navázáním azaftalocyaninu na modifikovanou pevnou fázi a končí navázáním fluoroforu na 5'-konec oligodeoxynukleotidu. Navázání azaftalocyaninu na oligodeoxynukleotidový řetězec se provádí pomocí *click* chemie. *Click* chemie je velmi efektivní metoda vhodná pro přípravu látek, které se dají jednoduše spojit k sobě navzájem s vysokými výtěžky. Mechanismus reakce je založen na Cu(I)-katalyzované azido-alkynové Huisgenově cykloadici (Obrázek 23). Katalyzovaná reakce probíhá mezi azidem na modifikovaném azaftalocyaninu a alkynem na modifikované pevné fázi (CPG). Azaftalocyaninový zhášec byl navržen s ohledem na jeho jednoduchou a účinnou vazbu na pevnou fázi. Po detrylaci neboli odchránění hydroxylové skupiny azaftalocyaninu, dojde k navázání dalších monomerních jednotek dle požadované podoby oligodeoxynukleotidové sekvence v DNA/RNA syntezátoru fosforamiditovou metodou. Nakonec se naváže molekula fluoroforu na 5'-konec. Posledním krokem syntézy oligodeoxynukleotidové sondy je odštěpení připravené sondy z pevné fáze pomocí rozpouštědel specifických pro daný typ fluoroforu. Celá syntéza je zakončena finálním čištěním pomocí gelové chromatografie nebo HPLC [90].



Obrázek 23 Zjednodušené schéma syntézy dvojité značené molekulární sondy. Jako zhášec (Z) byl použit azaftalocyanin (šedivá struktura). Zhášec s tritylovou skupinou (Tr) se váže na modifikovaný povrch pevné fáze (CPG). Navázání probíhá pomocí azido-alkynové Huisgenovy cykloadice. Mezi azidem navázaným na azaftalocyaninu a terminálním alkynem na povrchu pevné fáze dojde k vytvoření triazolového kruhu. Po detritylaci pokračuje syntéza jednotlivých nukleotidů klasicky pomocí fosforamiditové metody. Jelikož se jedná o dvojité značenou sondu, tak je syntéza ukončena navázáním fluoroforu (F) na 5'-konec a uvolněním molekulární sondy z povrchu pevné fáze. Místo odštěpení od pevné fáze naznačuje červená šipka. Převzato a upraveno z [90].

K navázání značky na oligodeoxynukleotidový řetězec se také s výhodou využívá molekula dibenzoazacyklooktynu (DBCO) navázaná na vybrané thyminové bázi. Na základě Huisgenovy cykloadice se využívá *click* reakce mezi trojnou vazbou (DBCO) a azidové skupiny na modifikovaném zhášeci. Osmičlenný cyklus s trojnou vazbou umožňuje reakci s azidem díky velkému pnutí uvnitř molekuly bez katalyzátoru. Výsledkem kondenzace je triazolový kruh, podobně jako při syntéze molekulární sondy s azaftalocyaninem. Přes DBCO lze navázat značku na 5'-konec, 3'-konec a doprostřed řetězce. Navázání zhášce uprostřed oligodeoxynukleotidové sekvence ilustruje schéma níže (Obrázek 24) [91–93].



Obrázek 24 Zjednodušené schéma syntézy molekulární sondy se zhášecem (Z) navázaným uprostřed sekvenční na DBCO.

2.6 Analýza oligodeoxynukleotidů

Správně zvolená analytická technika je základem pro úspěšnou analýzu synteticky připravených oligodeoxynukleotidů. Během syntézy oligodeoxynukleotidů jsou kladeny vysoké nároky na kvalitu a čistotu výsledného produktu. Vzhledem k tomu, že v současné době dominuje syntéza oligodeoxynukleotidů na pevné fázi fosforamiditovou metodou, tak purifikační metoda musí být schopna oddělit strukturně blízké oligodeoxynukleotidy o jednu bázi kratší ($n-1$ nečistoty), nebo naopak nukleotidy o jednu bázi delší ($n+1$ nečistoty), a v případě nekompletní sulfurizace nečistoty fosfodiesteru [94]. Oligodeoxynukleotidy s jednou bází navíc ($n+1$) vznikají při syntéze na pevné fázi během kondenzace. Formace oligodeoxynukleotidů $n+1$ závisí na použitém aktivátoru, bázi v sekvenci oligodeoxynukleotidu a době trvání tohoto kroku [95]. Jen dokonale připravené oligodeoxynukleotidy mohou být bez problémů použity při PCR a dalších aplikacích. Odstranění nečistot je zásadní pro kompletní průběh PCR testů. Malá kontaminace v sekvenci primeru nebo oligodeoxynukleotidu může způsobit amplifikaci nežádoucích sekvencí DNA při PCR, což vede k rozsáhlému šumu na pozadí a dochází k falešně pozitivním nebo falešně negativním výsledkům při určení genotypu [96].

Mezi nejpoužívanější techniky pro separaci oligodeoxynukleotidů patří kapilární elektroforéza a vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Kapilární gelová elektroforéza se stala efektivním nástrojem pro analýzu oligodeoxynukleotidů, ale má řadu omezení, které znemožňují širší použití. Limitujícím faktorem je obtížná izolace DNA z gelu, pracné odstranění pufru ze vzorku, špatné zobrazení jednotlivých pásmo a nemožnost

on-line připojení k hmotnostnímu spektrometru (MS). Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC) a iontově výměnná chromatografie (IEC) jsou dva nejrozšířenější chromatografické módy pro analýzu oligodeoxynukleotidů. HPLC separace oligodeoxynukleotidů silně závisí na použité stacionární fázi, složení mobilní fáze a teplotě na koloně. Nejběžnější mobilní fáze pro separaci oligodeoxynukleotidů na reverzní fázi je vodný roztok pufru triethylamonium acetát (TEAA) s acetonitrilem, který slouží jako organický modifikátor. Ačkoliv samotný acetonitril má pozitivní vliv na intenzitu signálu v MS, tak přídavek soli snižuje celkový iontový proud a intenzitu signálu. Pro separaci oligodeoxynukleotidů se obvykle provádí gradientová eluce [97].

2.6.1 Vliv teploty na chromatografickou separaci

Zlepšení rozlišení a selektivity oligodeoxynukleotidů je možné dosáhnout zvýšením teploty analýzy. Zvýšená teplota dokáže významně zkrátit retenční čas oligodeoxynukleotidů. Teplota ovlivňuje celkovou dobu analýzy více než selektivitu [97]. Bylo zjištěno, že přenos hmoty ve stacionární fázi je hlavním faktorem přispívajícím k rozšíření píku na porézních C18 stacionárních fázích. Použitím zvýšené kolonové teploty lze minimalizovat negativní vliv přenosu hmoty mezi stacionární a mobilní fází. Během separace probíhá řada rovnovážných reakcí, kde jsou analyty buď rozpuštěny v mobilní fázi, nebo adsorbovány na stacionární fázi kolony. Čím vyšší teplota, tím rychlejší je výměna analytů mezi mobilní fází a stacionární fází. Podstatné je dodržet teplotní rozpětí udávané výrobcem kolony [98].

Zvýšená teplota ovlivňuje také viskozitu mobilní fáze, což má za následek redukcii zpětného tlaku v systému. Tlak na koloně roste lineárně s průtokem mobilní fáze a viskozita mobilní fáze určuje velikost tlaku. Čím je teplota kolony vyšší, tím nižší je viskozita mobilní fáze. Zároveň s tím klesá odpor proudění mobilní fáze uvnitř kolony a také protitlak systému. Lze konstatovat, že zvýšená teplota separace se s výhodou používá ke zkrácení doby analýzy, ke zlepšení účinnosti separace a pro dosažení nižšího protitlaku systému [99].

Maekawa a spol. publikovali zajímavou metodu pro analýzu oligodeoxynukleotidů pomocí chromatografie citlivé na teplotu se stacionární fází na bázi poly(*N*-isopropylakrylamidu). Díky zvýšené teplotě a použité koloně bylo možné kontrolovat fyzikální vlastnosti bez použití toxických organických rozpouštědel

a komplikovaných gradientových metod. Bylo tak dosaženo uspokojivé separace všech nukleotidů, i typických nečistot, za použití vysoké teploty (10–50 °C) a vodné mobilní fáze bez přítomnosti iontově párových činidel [100].

2.6.2 Chromatografické módy

Nejpoužívanějším chromatografickým módem pro separaci oligodeoxynukleotidů je aktuálně iontově párová chromatografie na reverzní fázi (IP-RP) s UV-VIS detektorem nebo ve spojení s MS. IP-RP v kombinaci s MS patří mezi nejrozšířenější techniku, která poskytuje vysokou citlivost a vysoké rozlišení. Použití hmotnostní spektrometrie poskytuje kvantitativní údaje spolu s detailními informacemi o struktuře oligodeoxynukleotidu, včetně jeho sekvence [101]. K separaci oligodeoxynukleotidů se také používá iontově výměnná chromatografie (IEC), nebo *mixed-mode* HPLC. Nemodifikované oligodeoxynukleotidy jsou polyestery s negativními náboji na fosfátových skupinách, které jsou vhodné pro iontově výměnnou kapalinovou chromatografii. V důsledku ionizace bází je významná sekundární interakce, když jsou hodnoty pH mobilní fáze výrazně vyšší než hodnoty pKa. Separace oligodeoxynukleotidů na iontově výměnné koloně je závislá na délce sekvence a složení nukleotidů, díky čemuž je tato technika vhodná pro rozlišení oligodeoxynukleotidových sekvencí různé délky. Nevýhodou IEC je kontaminace oligodeoxynukleotidů anorganickými solemi, a proto je vyžadován další krok k odsolení vzorku. *Mixed-mode* HPLC je technika založená na dvou nebo více typech interakcí mezi rozpuštěnou látkou a stacionární nebo mobilní fází. Tyto techniky jsou efektivní pro separace založené jak na velikosti, tak na pořadí nukleotidů, a lze je použít s reverzní fází [94].

V případě separace oligodeoxynukleotidů pomocí IP-RP je rozdíl mezi analýzou nemodifikovaného oligodeoxynukleotidu a oligodeoxynukleotidu s navázaným fluoroforem nebo zhášedčem. Retenční chování značených oligodeoxynukleotidů je odlišné od nemodifikovaných oligodeoxynukleotidů. Navázaná značka významně ovlivňuje retenční chování modifikovaného oligodeoxynukleotidu díky svému hydrofobnímu charakteru. Ve studii K. J. Fountainina a kol. byly nejprve eluovány nemodifikované oligodeoxynukleotidy, následované oligodeoxynukleotidy s fluoroforem, oligodeoxynukleotidy se zhášedčem, a nakonec dvojitě značené oligodeoxynukleotidy [102].

Pouze několik publikací použilo hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC) pro analýzu oligodeoxynukleotidů navzdory zřejmým výhodám oproti IP-RP. Hlavními benefity jsou absence iontově párových činidel a vyšší množství organického rozpouštědla pro ionizaci elektrosprejem (ESI). Kromě toho se používá acetonitril, což je aprotické rozpouštědlo, které může také přispívat k lepší ionizaci oligodeoxynukleotidů v režimu záporných iontů. Při použití triethylaminu (TEA) s 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanolem (HFIP) je vyžadován methanol, protože HFIP není rozpustný v acetonitrilu. HILIC představuje metodu s velkým potenciálem do budoucna, který by mohl učinit vhodnější alternativu k metodě IP-RP [103].

Dvourozměrná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem (2D-LC-MS) demonstruje schopnost spojit dvě IP-RP metody pro analýzu oligodeoxynukleotidů s cílem dosáhnout lepších výsledků než při klasické iontově párové chromatografii. Princip této metody spočívá v použití silného iontově párového činidla v první dimenzi a v druhé dimenzi je použito slabší iontově párové činidlo, které je více MS kompatibilní. Takový přístup dokáže určit n-1 nečistoty v řádu nanogramů. Závěrem lze říct, že se očekává zvýšený zájem o vícerozměrné metody 2D-LC-MS. Inovativní strategie budou v krátkodobém horizontu přibývat, aby bylo možné lépe charakterizovat a porozumět komplexní struktuře oligodeoxynukleotidů [94,96].

2.6.3 Stacionární fáze pro IP-RP-HPLC

Stacionární fáze hraje klíčovou roli v separaci oligodeoxynukleotidů. Bylo prokázáno, že dominantní postavení patří kolonám s reverzní fází. Roussis a kol. hodnotili stacionární fáze o různých délkách a průměrech (C18, C4, C30, fenyl, fluor a kyano). Dospěli k závěru, že použití C4 a C30 kolony oproti koloně C18 nemá významné výhody. Oligodeoxynukleotidy byly méně zadrženy na polární stacionární fázi (fluor a kyano stacionární fáze) pravděpodobně kvůli menší hydrofobní interakci mezi stacionární fází a oligodeoxynukleotidem. Vyšší retence byla pozorována na kolonách modifikovaných amidovými skupinami díky dalším interakcím stacionární fáze s negativními náboji na oligodeoxynukleotidu. Většina kolon obsahující aromatické skupiny dosahovala podobných výsledků jako kolona C18. Oligodeoxynukleotidy interagují s fenylovou stacionární fází elektrostaticky pomocí iontového páru a π - π interakce. V případě oktadecylové kolony C18 se uplatňují hydrofobní a elektrostatické interakce. Delší kolony s menšími částicemi vykazovaly lepší separaci oligodeoxynukleotidů. Nejlepších

výsledků pro separaci oligodeoxynukleotidů bylo dosaženo na kolonách C18 s menšími částicemi při zvýšené teplotě [104].

2.6.4 Iontově párová činidla

Oligodeoxynukleotidy jsou v podstatě polymerní anionty (polyfosfáty) [97]. Vzhledem k velmi polární povaze a náboji ve struktuře oligodeoxynukleotidů, musí být v případě iontově párové chromatografie do mobilní fáze přidána iontově párová činidla, aby se oligodeoxynukleotidy udržely na koloně. Separace oligodeoxynukleotidů závisí na dvou hlavních mechanismech. Vliv má jednak hydrofobní interakce a interakce náboje záporně nabitého oligodeoxynukleotidu mezi nábojem kladně nabitého alkylamoniového iontu v mobilní fázi [105]. Triethylamin s kyselinou octovou (TEAA) se běžně používal jako protiion v analýze oligodeoxynukleotidů v koncentraci 100 mM. Taková koncentrace však není vhodná pro detekci ESI-MS. Iontově párová činidla s krátkým alkylovým řetězcem, jako je TEAA, pouze částečně pokrývají stacionární fázi a umožňují hydrofobní interakce mezi stacionární fází a oligodeoxynukleotidem. Výsledkem je, že separace je založena jak na velikosti, tak na hydrofóbnosti oligodeoxynukleotidu. Kyselina octová byla identifikována jako hlavní složka zodpovědná za potlačení signálu oligodeoxynukleotidu při MS detekci [94]. Nicméně další studie zavedly použití jiných alkylamoniových solí. Nová iontově párová činidla zlepšují účinnost separace oligodeoxynukleotidů. Nedávno Levin a spol. publikovali rozsáhlou studii týkající se vývoje kombinace iontově párových činidel v mobilní fázi. Bylo prokázáno, že kombinace iontově párových činidel může zlepšit rozlišení a tvar píků studovaných analytů ve srovnání s použitím jednoho iontově párového činidla [106]. Studie Apffela a kol. má velký význam, protože spojili těžký triethylamin (TEA) s 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanolem (HFIP). Tato kombinace přinesla dobrou HPLC separaci s dostatečnou ionizací elektrosprejem v režimu záporných iontů. Autoři pozorovali pouze malé potlačení signálu u hmotnostní spektrometrie. Od té doby se pufr HFIP/TEA stal nejpoužívanějším iontově párovým činidlem, který je vhodný pro stanovení oligodeoxynukleotidů kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [107]. Alternativní fluorovaný alkohol 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-methyl-2-propanol (HFMIP) v kombinaci s *N,N*-dimethylcyklohexylaminem (DMCHA) poskytuje lepší výsledky pro LC-MS než HFIP [108]. Hexylamin (HA) slouží jako účinnější činidlo pro párování iontů než TEA, protože vykazuje silnější adsorpci na reverzní fázi díky

delšímu alkylovému řetězci. Dimethylbutylamin (DMBA) má stejný molekulový vzorec a podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako TEA, ale jeho struktura je odlišná. Jak TEA, tak DMBA jsou silné báze (pKa 10,7, resp. 10,19) a obě jsou aktivními iontovými páry během chromatografického procesu. HFIP je volatilnější (bod varu 59 °C) a při pH 7–8,3 je ionizován pouze částečně (pKa 8,25) ve srovnání s kyselinou octovou (pKa=4,75, bod varu=118 °C). HFIP je velmi slabá kyselina, má vysokou schopnost tvorby vodíkové vazby a může interagovat s většinou rozpouštědel. Navíc se během chromatografického procesu nenabíjí a může být volně odpařen [105]. Podrobné vlastnosti iontově párových činidel lze nalézt níže (Tabulka 3).

Tabulka 3 Struktura a chemické vlastnosti modifikátorů mobilní fáze běžně používaných jako iontově párová činidla pro analýzu oligodeoxynukleotidů na reverzní fázi. Převzato a upraveno z [94].

Název	Struktura	logD _{pH8,0}	pKa	Bod varu (°C)
Kyselina mravenčí		-3,59	4,27	101
Kyselina octová		-3,41	4,54	118
Triethylamin (TEA)		-0,93	10,21	89
Triethylamonium acetát (TEAA)		-0,93	10,21	164
Hexylamin (HA)		-0,56	10,21	131
<i>N,N</i> -dimethyl cyklohexylamin (DMCHA)		-0,21	10,22	160
Dibutylamin (DBA)		-0,17	10,75	160
1,1,1,3,3,3-hexafluor- 2-propanol (HFIP)		1,14	7,97	59
Tributylamin (TBA)		1,42	10,44	216
1,1,1,3,3,3-hexafluor- 2-methyl-2-propanol (HFMP)		1,47	8,08	61

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo:

– vybrat vhodnou stacionární fázi pro separaci dvojitě značeného oligodeoxynukleotidu a jednoduše značeného oligodeoxynukleotidu s dostatečným rozlišením.

– modifikovat danou HPLC metodu pro monitorování přípravy jednoduše značených molekulárních sond.

– využít tuto metodu pro hodnocení post-syntetické modifikace oligodeoxynukleotidových sond pomocí *click* reakce.

4 Praktická část

4.1 Přístroje

HPLC systém Prominence (Shimadzu, Japonsko)

- Zásobník mobilních fází
- Jednotka pro míchání mobilních fází FCV-11AL
- Degasser DGU-20A3
- Dvě vysokotlaká čerpadla LC-20AD
- Autosampler SIL-20AC
- Komunikační modul CBM-20A
- Kolonový termostat CTO-20AC
- Detektor SPD-M20A

4.2 Chromatografické kolony

- Hypersil™ BDS C18, (100×4.6) mm, velikost částic 2.4 μm, (ThermoFischer Scientific, USA)
- XBridge BEH C18 XP Column, (100×4.6) mm, velikost částic 2.5 μm, (Waters, USA)
- Clarity® Oligo-RP™, (100×4.6) mm, velikost částic 3 μm, (Phenomenex, USA)
- Synchronis aQ, (100×4.6) mm, velikost částic 3 μm, (ThermoFisher Scientific, USA)

- Synchronis C18, (100×4.6) mm, velikost částic 3 μm, (ThermoFisher Scientific, USA)
- ACE Excel 3 C18-PFP, (100×3) mm, velikost částic 3 μm, (Advanced Chromatography Technologies LTD, Velká Británie)
- ZirChrom[®]-MS, (150×4.6) mm, velikost částic 5 μm, (ZirChrom Separations, Inc., USA)

Laboratorní vybavení

Analytické váhy – Sartorius A200S, Česká republika

Vakuové filtrační zařízení s nylonovým filtrem (45 μm)

Laboratorní sklo, baňky, kádinky, odměrné baňky, odměrné válce, kyvety, pipety, mikropipety, vialky, vortex

4.3 Standardy

Molekulární sondy byly připraveny ve spolupráci s *AzaPc group* (Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové) a Generi Biotech (Hradec Králové). Oligodeoxynukleotidový řetězec v rozsahu 17 bází byl použit pro přípravu standardů č. 1, 2 a 3. Oligodeoxynukleotidový řetězec v rozsahu 23 bází (standardy č. 4–9) byl použit k modifikaci bází pomocí DBCO na 2. bázi (dále označovaný jako 3'-konec), 13. bázi (dále označovaný jako X), nebo na 23. bázi (dále označovaný jako 5'-konec) ve směru syntézy na pevném nosiči. Standard č. 9 reprezentoval nemodifikovanou oligodeoxynukleotidovou sekvenci bez modifikace. Všechny standardy (S1–S9) byly rozpuštěny ve 100 μl vody.

- Standard č. 1 (S1) – směs (1:1)
5'-FAM-GAT CAG CGT TCC ATC AG-BHQ-1-3'
5'-GAT CAG CGT TCC ATC AG-BHQ-1-3'
- Standard č. 2 (S2) – směs (1:1)
5'-Cy5-GAT CAG CGT TCC ATC AG-Q30-3'
5'-GAT CAG CGT TCC ATC AG-Q30-3' (1:1)
- Standard č. 3 (S3) – směs (1:1)
5'-FAM-GAT CAG CGT TCC ATC AG-Q30-3'
5'-GAT CAG CGT TCC ATC AG-Q30-3' (1:1)
- Standard č. 4 (S4) – Q40-DBCO-5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG TT-3'

- Standard č. 5 (S5) – FK8-DBCO-5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG TT-3'
- Standard č. 6 (S6) – 5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG [DBCOdT]T-3'
- Standard č. 7 (S7) – 5'-GTG GAT GAC CAG C[DBCOdT]G TTC GTG TT-3'
- Standard č. 8 (S8) – DBCO-5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG TT-3'
- Standard č. 9 (S9) – 5'-GTG GAT GAC CAG CTG TTC GTG TT-3'

4.4 Oligodeoxynukleotidové sondy

Jednoduše značené oligodeoxynukleotidové sondy byly připraveny:

- na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å, 1000 Å, 500 Å
- na pevné fázi na bázi polystyrenu (velikost pórů odpovídá přibližně 1000 Å)

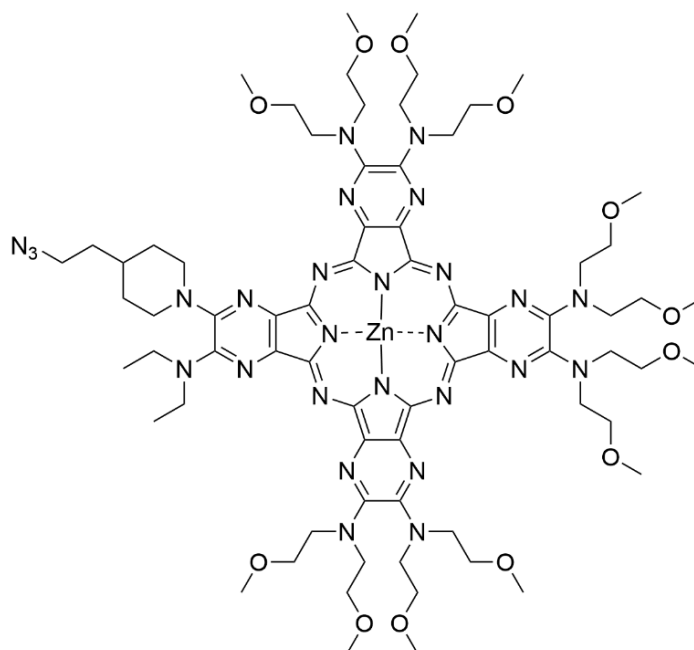
Jednotlivé oligodeoxynukleotidové sekvence (23 bází) připravené na stejné pevné fázi a modifikované na stejném místě se lišily koncentrací značky při *click* reakci. Veškeré vzorky uvedené níže byly naředěny na koncentraci 500 nmol/ml. Podrobné informace o připravených vzorcích shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4 Přehled jednoduše značených oligodeoxynukleotidových sond.

Vzorek	Značka	Pevná fáze	Pozice modifikace	Koncentrace při <i>click</i> reakci
A1	Q40	CPG, 2000 Å	3'	10 µM
A2	Q40	CPG, 2000 Å	3'	100 µM
A3	Q40	CPG, 2000 Å	3'	1 mM
A4	Q40	CPG, 2000 Å	3'	10 mM
A5	Q40	CPG, 2000 Å	3'	100 mM
B1	Q40	CPG, 2000 Å	X'	10 µM
B2	Q40	CPG, 2000 Å	X'	100 µM
B3	Q40	CPG, 2000 Å	X'	1 mM
B4	Q40	CPG, 2000 Å	X'	10 mM
B5	Q40	CPG, 2000 Å	X'	100 mM
C1	Q40	CPG, 2000 Å	5'	10 µM
C2	Q40	CPG, 2000 Å	5'	100 µM
C3	Q40	CPG, 2000 Å	5'	1 mM
C4	Q40	CPG, 2000 Å	5'	10 mM
C5	Q40	CPG, 2000 Å	5'	100 mM
D1	Q40	CPG, 1000 Å	3'	100 µM
D2	Q40	CPG, 1000 Å	3'	1 mM
D3	Q40	CPG, 1000 Å	3'	10 mM
E1	Q40	CPG, 1000 Å	X'	100 µM
E2	Q40	CPG, 1000 Å	X'	1 mM
E3	Q40	CPG, 1000 Å	X'	10 mM

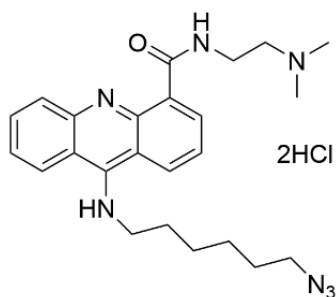
F1	Q40	CPG, 1000 Å	5'	100 µM
F2	Q40	CPG, 1000 Å	5'	1 mM
F3	Q40	CPG, 1000 Å	5'	10 mM
G1	Q40	CPG, 500 Å	3'	100 µM
G2	Q40	CPG, 500 Å	3'	1 mM
G3	Q40	CPG, 500 Å	3'	10 mM
H1	Q40	CPG, 500 Å	X'	100 µM
H2	Q40	CPG, 500 Å	X'	1 mM
H3	Q40	CPG, 500 Å	X'	10 mM
I1	Q40	CPG, 500 Å	5'	100 µM
I2	Q40	CPG, 500 Å	5'	1 mM
I3	Q40	CPG, 500 Å	5'	10 mM
P1	Q40	Polystyren, 1000 Å	3'	100 µM
P2	Q40	Polystyren, 1000 Å	3'	1 mM
P3	Q40	Polystyren, 1000 Å	3'	10 mM
Q1	Q40	Polystyren, 1000 Å	X'	100 µM
Q2	Q40	Polystyren, 1000 Å	X'	1 mM
Q3	Q40	Polystyren, 1000 Å	X'	10 mM
R1	Q40	Polystyren, 1000 Å	5'	100 µM
R2	Q40	Polystyren, 1000 Å	5'	1 mM
R3	Q40	Polystyren, 1000 Å	5'	10 mM
J1	FK8	CPG, 2000 Å	3'	100 µM
J2	FK8	CPG, 2000 Å	3'	1 mM
J3	FK8	CPG, 2000 Å	3'	10 mM
K1	FK8	CPG, 2000 Å	X'	100 µM
K2	FK8	CPG, 2000 Å	X'	1 mM
K3	FK8	CPG, 2000 Å	X'	10 mM
L1	FK8	CPG, 2000 Å	5'	100 µM
L2	FK8	CPG, 2000 Å	5'	1 mM
L3	FK8	CPG, 2000 Å	5'	10 mM
M1	FK8	CPG, 500 Å	3'	100 µM
M2	FK8	CPG, 500 Å	3'	1 mM
M3	FK8	CPG, 500 Å	3'	10 mM
N1	FK8	CPG, 500 Å	X'	100 µM
N2	FK8	CPG, 500 Å	X'	1 mM
N3	FK8	CPG, 500 Å	X'	10 mM
O3	FK8	CPG, 500 Å	5'	10 mM
BDP1	BDP16	CPG, 500 Å	5'	10 µM
BDP2	BDP16	CPG, 500 Å	5'	100 µM
BDP3	BDP16	CPG, 500 Å	5'	1 mM
BDP4	BDP16	CPG, 500 Å	5'	10 mM
BDP5	BDP16	CPG, 500 Å	5'	100 mM

Azaftalocyanin Q40 (Obrázek 25) byl navázán na DBCO pomocí azido-alkynové Huisgenovy cykloadice.



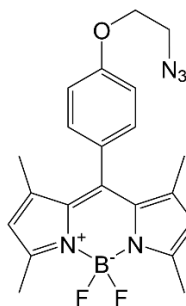
Obrázek 25 Chemická struktura azaftalocyaninu Q40.

Molekula FK8 (Obrázek 26) je derivátem akridinu a slouží jako interkalační činidlo pro zpevnění vazby na řetězec DNA.



Obrázek 26 Chemická struktura interkalačního činidla FK8.

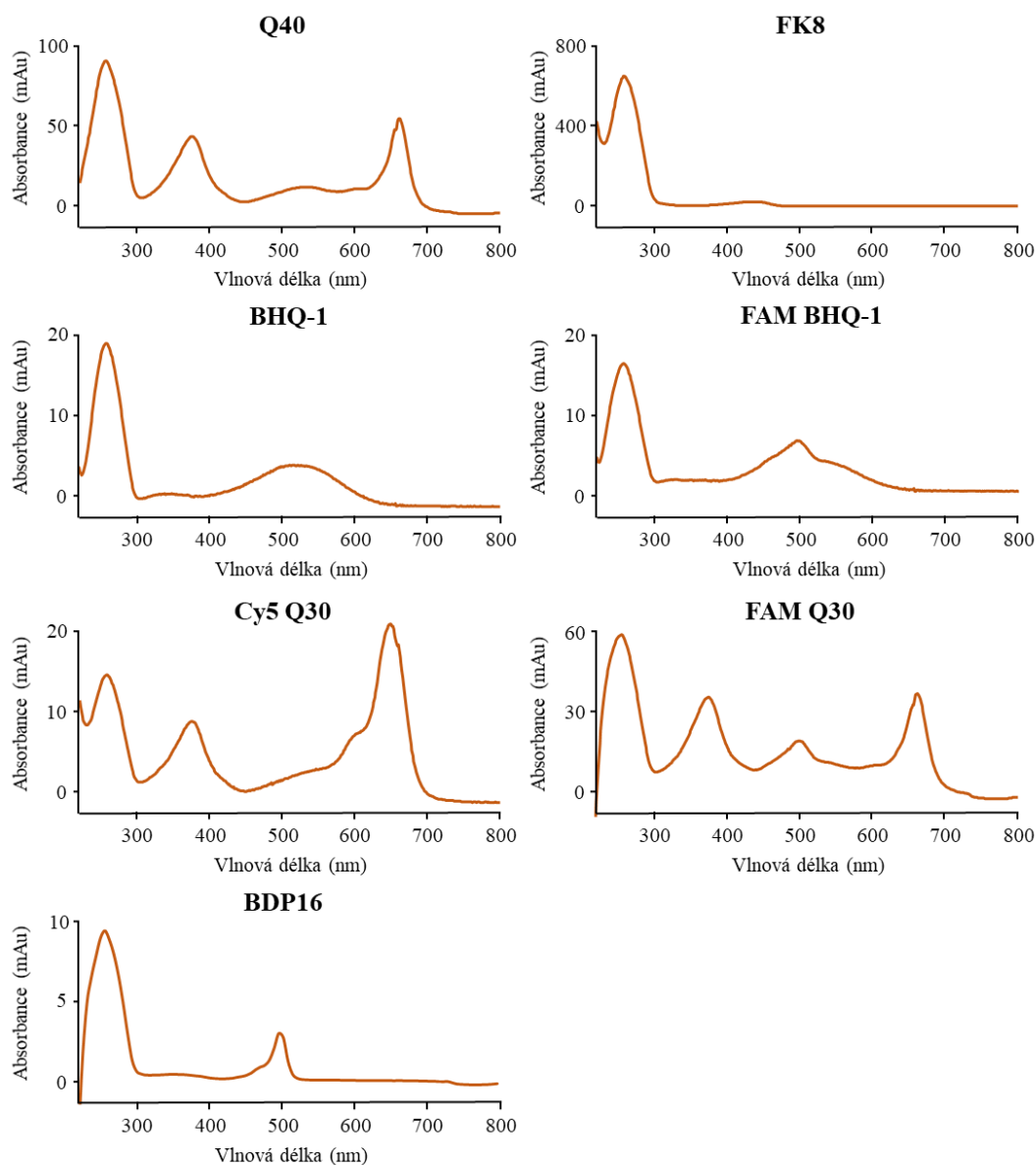
Molekula BDP16 (Obrázek 27) je derivátem fluoroforu BODIPY. Toto fluorescenční barvivo bylo použito k přípravě molekulární sondy navázáním na oligodeoxynukleotidový řetězec na 5'-konci.



Obrázek 27 Chemická struktura fluoroforu BDP16.

4.5 Absorpční spektra modifikovaných oligodeoxynukleotidů

Absorpční spektra modifikovaných oligodeoxynukleotidů (Obrázek 28) byla použita pro porovnání s absorpčními spektry testovaných vzorků k identifikaci píků na chromatografickém záznamu.



Obrázek 28 Přehled absorpčních spekter modifikovaných oligodeoxynukleotidů. **Q40** – oligodeoxynukleotid se značkou Q40 na 5'-konci. **FK8** – oligodeoxynukleotid se značkou FK8 na 5'-konci. **BHQ-1** – oligodeoxynukleotid se značkou BHQ-1 na 3'-konci. **FAM BHQ-1** – oligodeoxynukleotid se značkou FAM na 5'-konci a BHQ-1 na 3'-konci. **Cy5 Q30** – oligodeoxynukleotid se značkou Cy5 na 5'-konci a Q30 na 3'-konci. **FAM Q30** – oligodeoxynukleotid se značkou FAM na 5'-konci a Q30 na 3'-konci. **BDP16** – oligodeoxynukleotid se značkou BDP16 na 5'-konci.

4.6 Chemikálie

Acetonitril (ACN), methanol (MeOH), 99% kyselina octová – Sigma Aldrich, Německo

Triethylamin (TEA) – Hadfield, Spojené království

2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (TRIS), 36% kyselina chlorovodíková, 85% kyselina fosforečná – Penta, Česká republika

Fluorid amonný – Lach-Ner, Česká republika

4.7 Příprava pufrů

Příprava roztoku TEAA

Pro přípravu 500 ml 50 mM roztoku TEAA bylo použito 12,5 ml 2M zásobního roztoku TEAA a 487,5 ml čištěné vody. Výsledný roztok byl promíchán a přefiltrován vakuovou filtrací přes nylonový filtr (45 μ m) do odměrné baňky. Zředěním 2M zásobního roztoku TEAA byly připraveny také roztoky TEAA o koncentraci 5, 15, 25 mM. Hodnota pH výsledného roztoku byla 6,3.

Příprava roztoku TRIS

Na přípravu 500 ml roztoku TRIS o koncentraci 50 mM bylo naváženo 3,0285 g TRIS, který byl rozpuštěn v cca 450 ml vody a hodnota pH byla upravena na 6,3 pomocí HCl. Výsledný roztok byl v odměrné baňce doplněn vodou po rysku do 500 ml a roztok byl přefiltrován přes nylonový filtr (45 μ m).

4.8 Testované chromatografické podmínky

Složení mobilní fáze:	Vodná složka	Organická složka
	H ₂ O	ACN
	5; 15; 25; 50 mM TEAA	MeOH
	5; 25; 50 mM TRIS	
	10 mM NH ₄ F	
	20 mM H ₃ PO ₄	
Průtok mobilní fáze:	0,6; 1,0 ml/min	
Teplota kolonového prostoru:	40 °C; 55 °C	
Objem nastříkovaného vzorku:	1 μ l	
Detektor:	PDA (260 nm)	

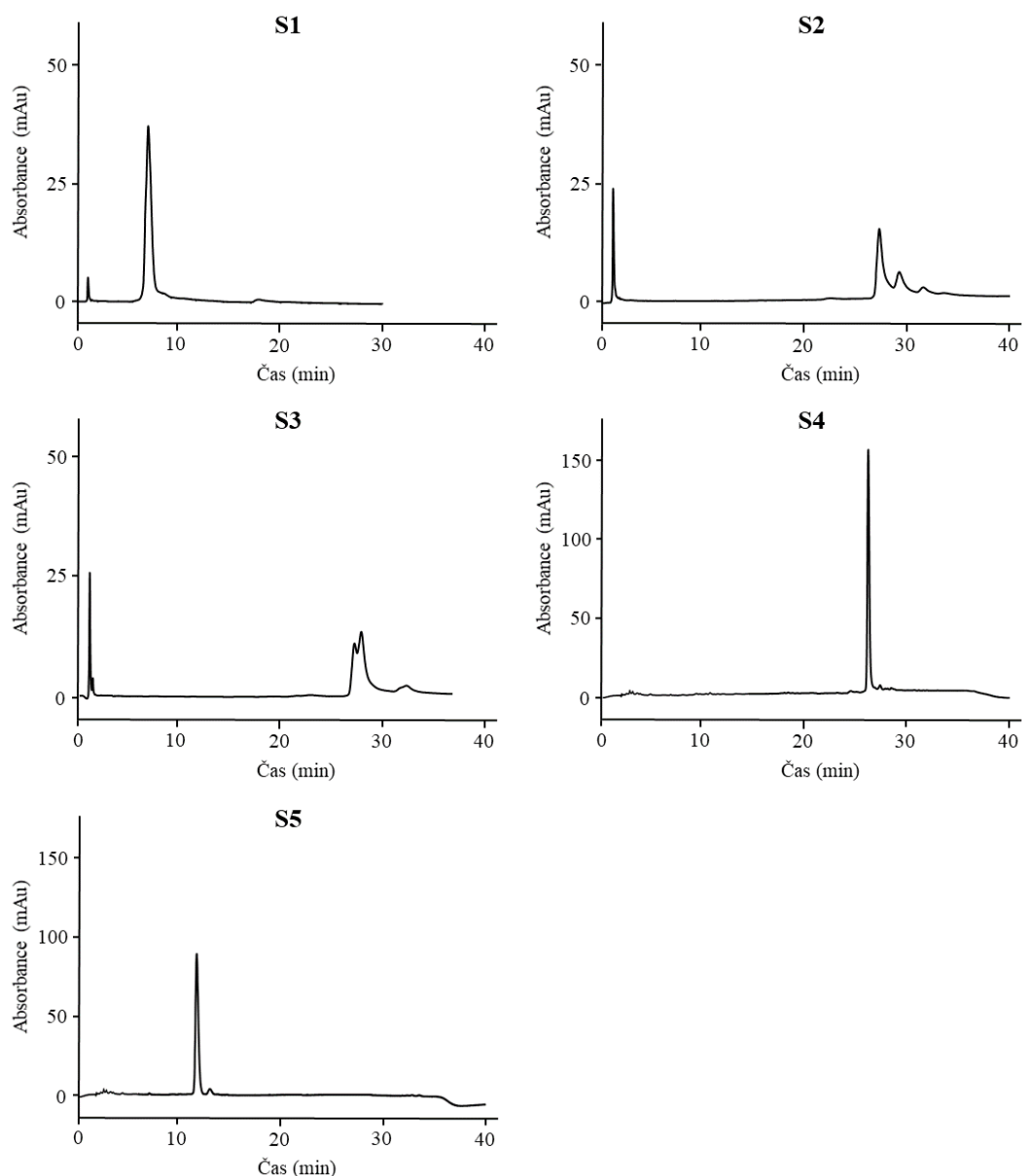
5 Výsledky a diskuze

5.1 Výběr stacionární fáze pro analýzu molekulárních sond

V první části této práce bylo navázáno na experimenty A. Ščensné [1]. V diplomové práci byly testovány chromatografické kolony s cílem dosáhnout dostatečné rozlišení zejména pro DLP sondu a MLP se zhášecem. Separace těchto dvou látek byla nejvíce problematická, protože retenční chování celé sondy bylo zásadně ovlivněno fyzikálně-chemickými vlastnostmi zhášecce a tedy retence DLP i MLP byla obecně velice podobná. V rámci této práce bylo testováno celkem 7 odlišných chromatografických kolon a pro každou kolonu bylo zkoušeno nalézt optimální chromatografické podmínky. K výběru chromatografické kolony byly používány standardy S1–S3. MLP S4 a S5 byly analyzovány za stejných podmínek. Standardy byly detekovány PDA detektorem při 260 nm a píky byly identifikovány pomocí UV-VIS spekter, viz Obrázek 28.

5.1.1 Kolona Hypersil™ BDS C18

První testovanou kolonou byla Hypersil™ BDS C18. Chromatografická kolona Hypersil™ BDS C18 obsahovala deaktivované silanolové skupiny v částicích o velikosti 2,4 μm . Úvodní měření bylo prováděno za použití gradientu 50 mM TEAA v ACN 10–70 % (3,5–33,5 min). Za těchto podmínek nebylo dosaženo uspokojivých výsledků. Chromatografické píky byly kromě jednoduše značených oligodeoxynukleotidů (S4 a S5) nízké, široké nebo byly eluovány v mrtvém čase. Počáteční množství organické fáze v gradientu TEAA 50 mM/ACN bylo zvýšeno, gradient ACN 40–70 % (3,5–33,5 min). Zvýšení podílu ACN v mobilní fázi nepřineslo výrazné zlepšení výsledků. Proto bylo zkoušeno prodloužení času analýzy a zpomalení nástupu organické fáze. Analýza byla prodloužena o více jak 30 minut a gradient byl ACN 40–70 % (3,5–66,5 min). Nicméně ani tento pokus nevedl ke zlepšené separaci a chromatogramy vypadaly velmi podobně. Nejlepší dosažené chromatogramy každého standardu byly vyexportovány (Obrázek 29). Naše výsledky korespondovaly se závěry v diplomové práci. Z té vyplynulo, že k separaci oligodeoxynukleotidových sond s navázaným fluoroforem FAM bylo lepší použít v mobilní fázi TRIS místo TEAA. Směs MLP a DLP standardu S2 byla od sebe rozdělená jako jediná. Ovšem píky chvostovaly a rozlišení bylo nízké.

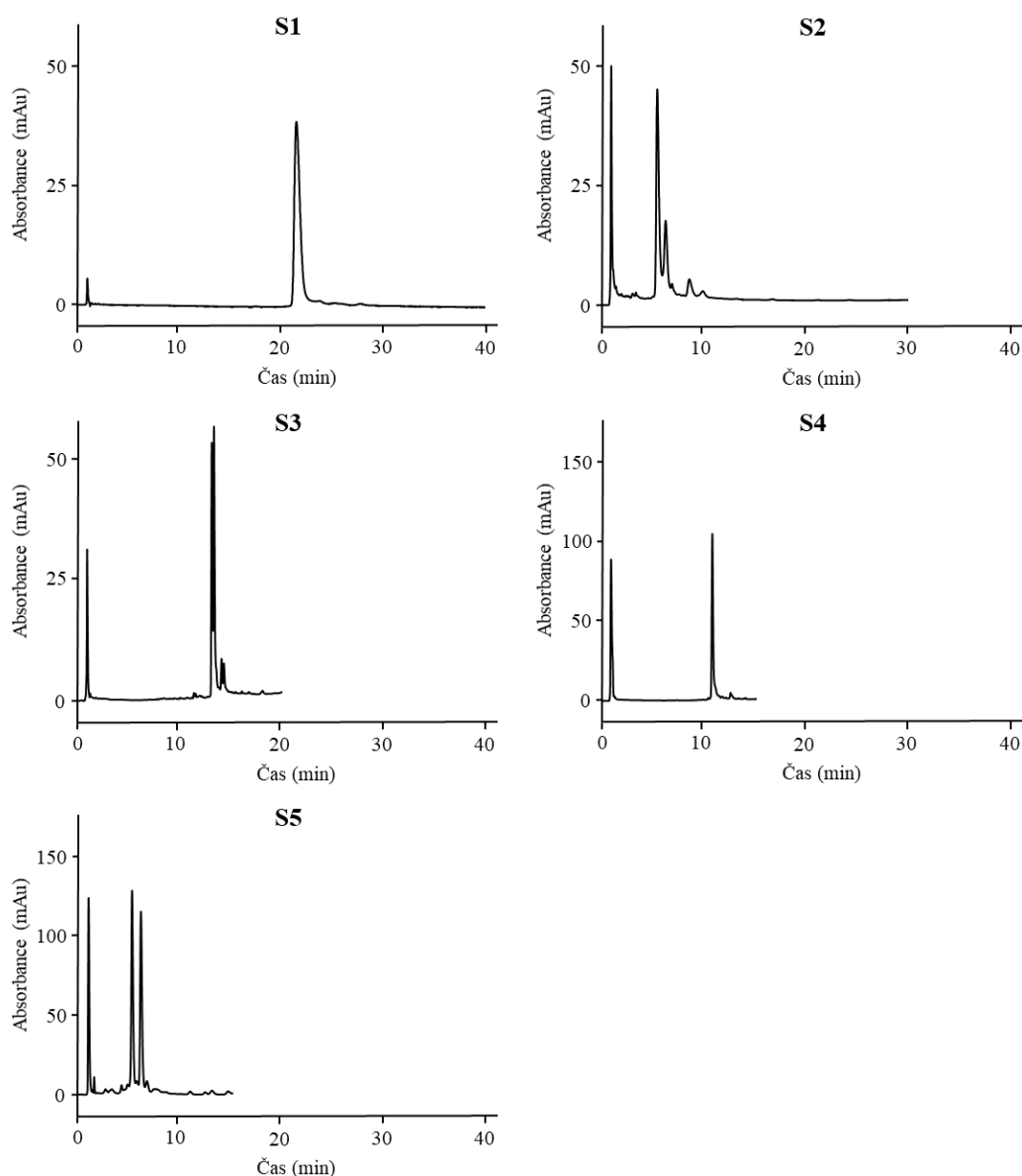


Obrázek 29 Srovnání vybraných chromatografických záznamů standardů S1–S5 na koloně Hypersil™ BDS C18. **S1** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (73:27), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S2, S3** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (40 % B), 3,5–66,5 min (40→70 % B), 66,5–68 min (70 % B), 68–68,5 min (70→40 % B), 68,5–73 min (40 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S4, S5** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (10 % B), 3,5–33,5 min (10→70 % B), 33,5–35 min (70 % B), 35–35,5 min (70→10 % B), 35,5–40 min (10 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min

5.1.2 Kolona Xbridge BEH C18 XP

Jako druhá kolona byla vybrána Xbridge BEH C18 XP s velikostí částic 2,5 μm . Jednalo se o kolonu s hybridní stacionární fází, která se vyznačovala vysokou stabilitou. Ethylenem zesíťované hybridy poskytovaly chemickou, mechanickou i teplotní odolnost. Počáteční chromatografické podmínky byly stejné jako v kapitole 5.1.1 a separace byla

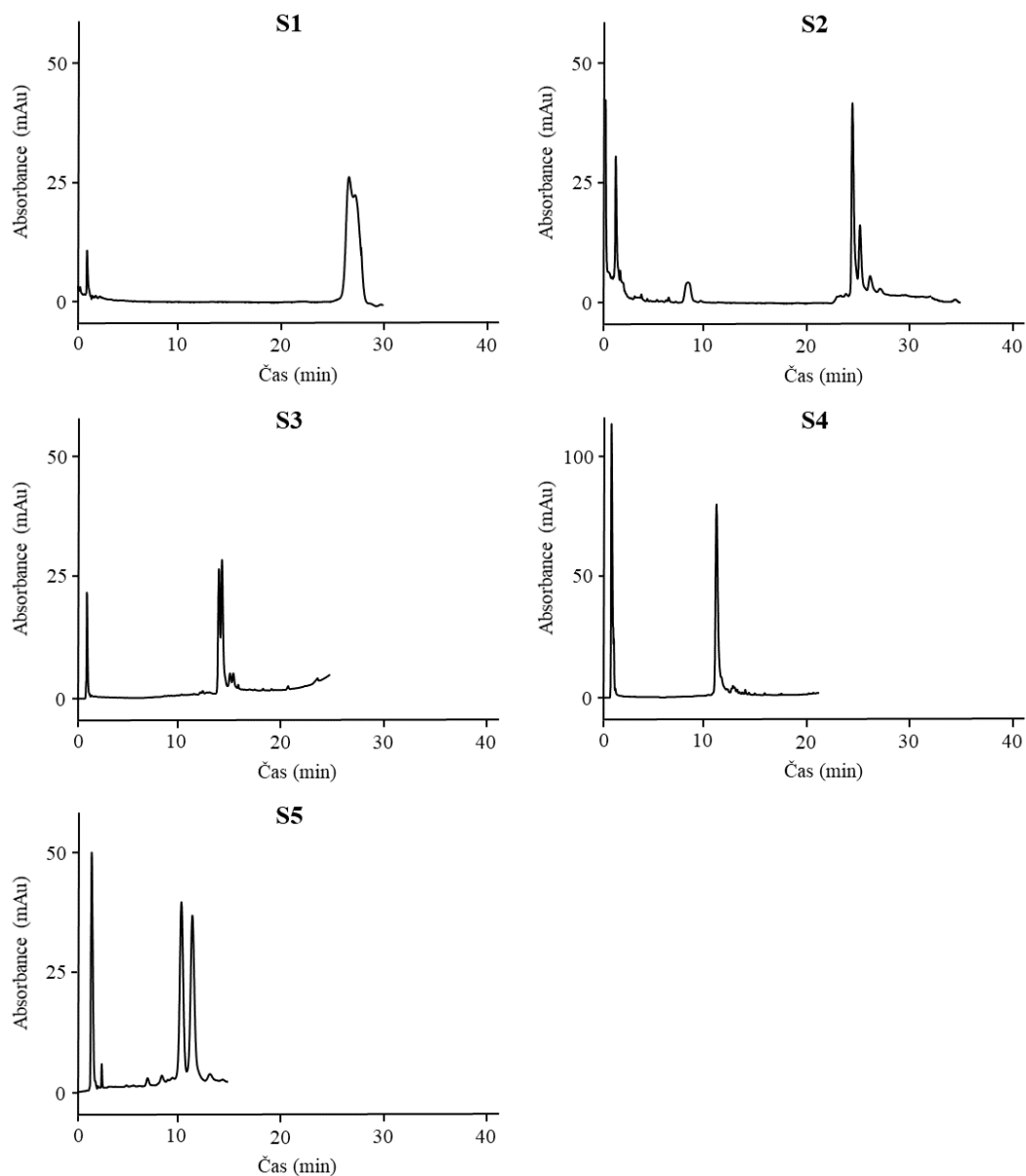
zkoušena v izokratickém módu. Nejlepší dosažené výsledky jsou zobrazeny níže (Obrázek 30). U S1 nebylo možné rozlišit jednoduše značený a dvojitě značený oligodeoxynukleotid. DLP byly při separaci odděleny od oligodeoxynukleotidu s navázaným zhášecem v případě standardů S2 a S3 za podmínek popsaných níže. Za pomoci gradientové metody byly separovány jednoduše značené oligodeoxynukleotidy (S4 a S5) při použití 50 mM TEAA v ACN 40–70 % (3,5–33,5 min). Standard S5 se začal dělit na dva izomery. Tyto izomery vznikly díky možnosti navázání značky FK8 na DBCO ze dvou stran, viz Obrázek 24.



Obrázek 30 Srovnání vybraných chromatografických záznamů standardů S1–S5 na koloně Xbridge BEH C18 XP. S1 – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (75:25), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. S2, S4 a S5 – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (40 % B), 3,5–33,5 min (40→70 % B), 33,5–35 min (70 % B), 35–35,5 min (70→40 % B), 35,5–40 min (40 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. S3 – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (82:18), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min.

5.1.3 Kolona Clarity® Oligo-RP™

Další kolona k testování byla vybrána Clarity® Oligo-RP™. Tato kolona obsahovala částice o velikosti 3 µm vyrobené TWIN™ technologií. Střed částice oxidu křemičitého nebyl během výrobního procesu změněn a byla tedy zachována mechanická pevnost a tuhost. Zatímco povrch částice byl chráněn před chemickými vlivy anorganicko-organickou vrstvou. Kolona byla vyvinuta speciálně pro separaci oligodeoxynukleotidů. Chromatografické podmínky testované výše s použitím TEAA 50 mM/ACN nebyly vhodné pro S1 a S2, tak bylo upraveno množství ACN v mobilní fázi, gradient ACN 40–90 % (3,5–33,5 min). Separace za izokratických podmínek byla rovněž testována. U S1 byl částečně oddělen MLP od DLP při 20 % ACN v izokratickém módu. Směs S2 byla eluována až po manuálním zvýšení na 60 % ACN. Pro S3 a S4 byly nejlepší chromatogramy v gradientu s vyšším množstvím ACN 40–90 % (3,5–33,5 min). Pro S5 bylo nejvýhodnější analyzovat modifikované oligodeoxynukleotidy pomocí izokratické metody (18 % ACN). Testovaná kolona byla selektivní ke všem testovaným standardům a v porovnání s předchozí kolonou byla selektivita lepší (Obrázek 31).



Obrázek 31 Srovnání vybraných chromatografických záznamů standardů S1–S5 na koloně Clarity® Oligo-RPTM. **S1** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (80:20), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S2** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (53:47), manuálně zvýšeno na 60 % B v 17 min, teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S3**, **S4** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (40 % B), 3,5–33,5 min (40→90 % B), 33,5–35 min (90 % B), 35–35,5 min (90→40 % B), 35,5–40 min (40 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S5** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (82:18), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min.

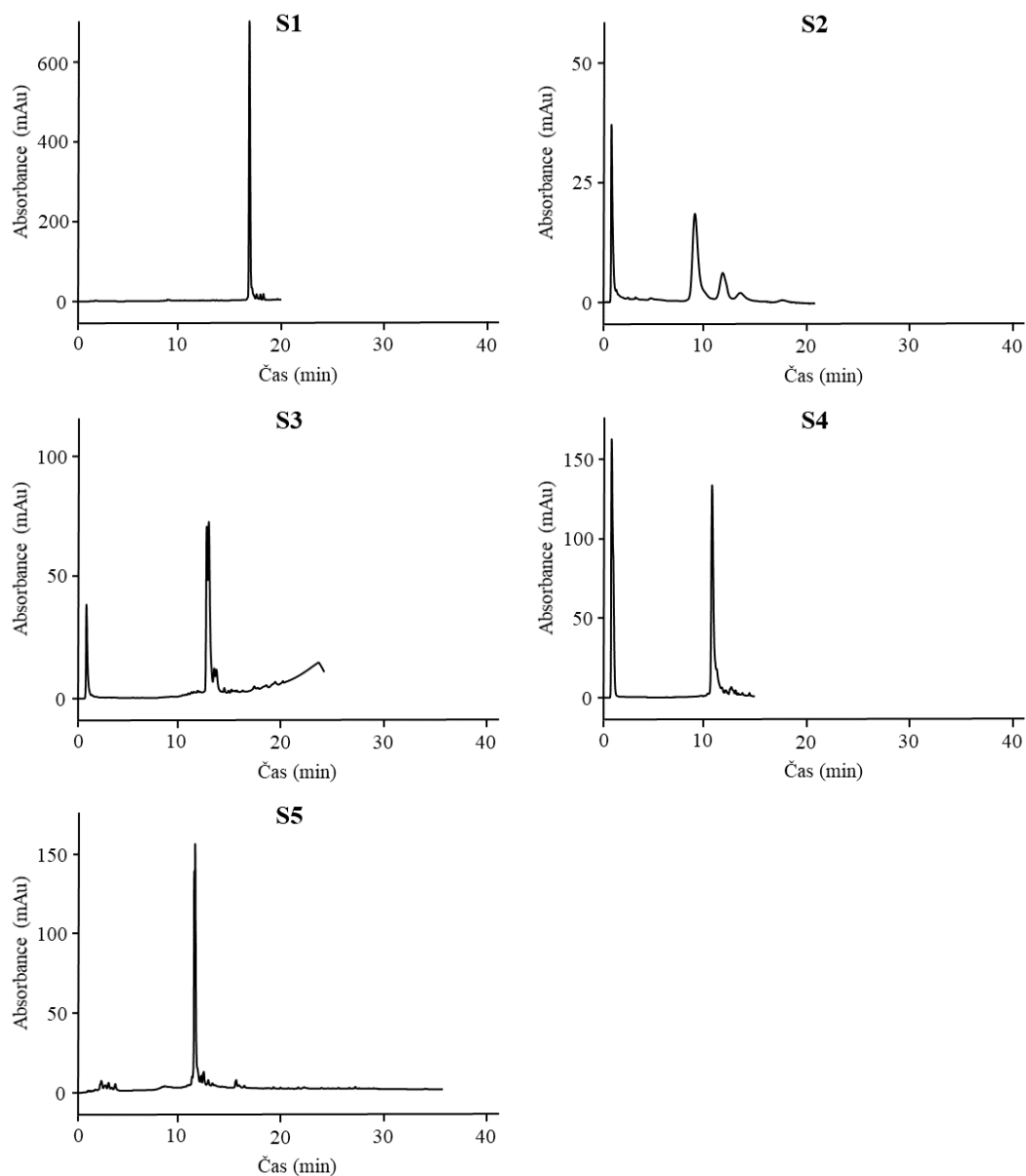
5.1.4 Kolona Synchronis aQ a Synchronis C18

Kolona Synchronis aQ byla polární endkapovaná C18 kolona umožňující provádět analýzu ve 100% vodné mobilní fázi. Obsahovala částice o velikosti 3 μm . Stejně jako u předchozích pokusů se vycházelo ze stejných počátečních podmínek s použitím TEAA 50 mM/ACN, gradient ACN 40–90 % (3,5–33,5 min) a bylo zkoušeno nastavit podmínky

jak pro izokratickou analýzu, tak pro gradientovou analýzu. Ovšem výsledky na této koloně nebyly prakticky vůbec použitelné. Na koloně byla slabá retence oligodeoxynukleotidů a píky byly navíc velmi rozmyté. Tato kolona nebyla vhodná pro separaci modifikovaných oligodeoxynukleotidů. V návaznosti na předchozí měření byla ještě vyzkoušena podobná kolona. Synchronis C18 s velikostí částic 3 μm byla klasickou obdobou kolony s kovalentně navázanými částicemi C18. Podobně jako u předchozí kolony nebylo možné spolehlivě detekovat jednotlivé látky.

5.1.5 Kolona ACE Excel 3 C18-PFP

Stejnou sérií experimentů byla otestována také kolona ACE Excel 3 C18-PFP. Tato kolona představovala alternativu k běžně dostupným kolonám C18 pro směsi látek, které jsou od sebe obtížně oddělitelné. Jednalo se o kolonu, která kombinovala C18 a pentafluorofenylovou stacionární fázi. Na separaci se podílejí hydrofobní interakce, π - π interakce, vodíkové můstky a dipól-dipól interakce. Jelikož byl během separace pozorován zvýšený zpětný tlak v systému, byl průtok snížen na 0,6 ml/min pro izokratickou i gradientovou metodu. Ve směsi S1 nebyly rozděleny MLP a DLP pomocí gradientové ani izokratické metody. Dva píky byly separovány u standardů S2 a S3, kde první pík patřil jednoduše značenému oligodeoxynukleotidu a druhý, menší pík příslušel dvojitě značenému oligodeoxynukleotidu. Směs S2 byla nejlépe separována pomocí izokratické metody (47 % ACN). Pro směs standardů S3 a jednoduše značený oligonukleotid S4 bylo nejvýhodnější použít TEAA 50 mM/ACN, gradient ACN 40–90 % (3,5–33,5 min). Na této koloně bylo možné spolehlivě detekovat jednoduše značený oligodeoxynukleotid (S5) s TEAA 50 mM/ACN, gradient ACN 10–60 % (3,5–33,5 min), viz Obrázek 32.

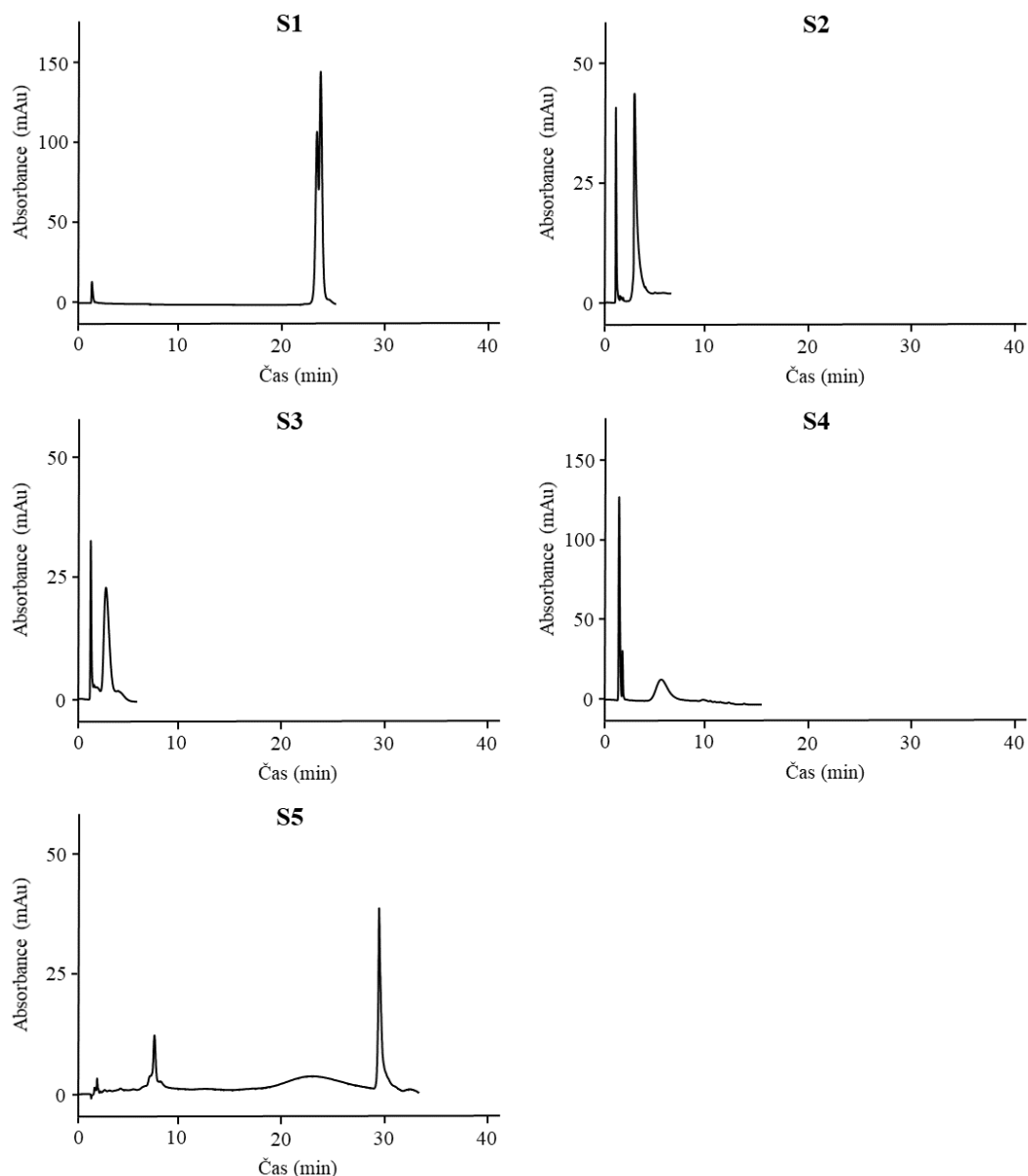


Obrázek 32 Srovnání vybraných chromatografických záznamů standardů S1–S5 na koloně ACE Excel 3 C18-PFP. **S1, S5** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (10 % B), 3,5–33,5 min (10→60 % B), 33,5–35 min (60 % B), 35–35,5 min (60→10 % B), 35,5–40 min (10 % B), teplota 40 °C, průtok 0,6 ml/min. **S2** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (53:47), teplota 40 °C, průtok 0,6 ml/min. **S3, S4** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (40 % B), 3,5–33,5 min (40→90 % B), 33,5–35 min (90 % B), 35–35,5 min (90→40 % B), 35,5–40 min (40 % B), teplota 40 °C, průtok 0,6 ml/min.

5.1.6 Kolona ZirChrom®-MS

Poslední testovanou kolonou byla ZirChrom®-MS, která se od ostatních testovaných kolon lišila typem částic a svojí délkou. Jednalo se o kolonu s reverzní fází obsahující zirkoniové částice o velikosti 5 μm . Kolona byla o 50 mm delší než všechny předchozí testované kolony. Nepolární stacionární fáze byla tvořena zesíťovaným

polybutadienem, který byl ukotven na povrchu deaktivovaného oxidu zirkoničitého. Dříve použité izokratické ani gradientové metody nevedly ke zlepšené separaci látek. Proto byla testována změna ve složení mobilní fáze. Pro analýzu S4 byly nejlepší podmínky pro separaci při použití gradientové metody s TEAA 50 mM/ACN, gradient ACN 40–90 % (3,5–33,5 min), viz Obrázek 33. U S5 bylo testováno místo ACN použití 20% MeOH v izokratickém módu. Ale pík značeného oligodeoxynukleotidu se objevil až po manuálním zvýšení podílu MeOH na 40 %. Dále byla zkoušena úprava složení mobilní fáze na 15 mM TEAA/ACN. Snížení koncentrace TEAA se projevilo nedostatečnou tvorbou iontového páru mezi TEA a oligodeoxynukleotidem, což byl důvod nedostatečné retence (eluce v mrtvém čase). Alternativně byl ještě upraven pufr přidáním 10 mM NH_4F , aby výsledná mobilní fáze byla (50 mM TEAA+10 mM NH_4F)/ACN. Přidání NH_4F nemělo kladný efekt na výsledek analýzy. Poslední modifikací bylo přidání kyseliny fosforečné k pufru 50mM TEAA a separace byla prováděna v mobilní fázi (50 mM TEAA+20 mM H_3PO_4)/ACN. Bohužel použití fosfátu nepřineslo žádný benefit v selektivitě.



Obrázek 33 Srovnání vybraných chromatografických záznamů standardů S1–S5 na koloně ZirChrom[®]-MS. **S1** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: MeOH, izokratická eluce A:B (75:25), manuálně zvýšeno na 40 % B v 20 min, teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S2** – mobilní fáze A: 15 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (70:30), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S3** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (53:47), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S4** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–3,5 min (40 % B), 3,5–33,5 min (40→90 % B), 33,5–35 min (90 % B), 35–35,5 min (90→40 % B), 35,5–40 min (40 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min. **S5** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: MeOH, izokratická eluce A:B (80:20), manuálně zvýšeno na 40 % B v 25 min, teplota 40 °C, průtok 1 ml/min.

Shrnutí:

Na základě předchozích experimentů bylo prokázáno, že nejproblematictější bylo oddělit MLP a DLP u S1. Nepovedlo se to na koloně Hypersil[™] BDS C18. Podobné výsledky byly zaznamenány na koloně Xbridge BEH C18 XP. Na této C18 koloně byla

úspěšně rozdělena směs dvojitě značeného oligodeoxynukleotidu a jednoduše značeného oligodeoxynukleotidu (S2 a S3). U S1 k rozdělení směsi oligodeoxynukleotidů nedošlo. Kolony Synchronis aQ a Synchronis C18 nebyly vhodné pro separaci modifikovaných oligodeoxynukleotidů. Zajímavé výsledky byly zaznamenány na koloně ACE Excel 3 C18-PFP s modifikovaným povrchem, ale ani na této koloně se nepodařilo oddělit směs standardu S1. Na koloně ZirChrom[®]-MS nebylo prakticky možné separovat dvojitě značený oligodeoxynukleotid od jednoduše značeného oligodeoxynukleotidu v žádném testovaném prostředí. Kolona Clarity[®] Oligo-RP[™] poskytovala nejlepší výsledky ze všech testovaných kolon. Tato chromatografická kolona jako jediná dokázala částečně separovat jednoduše značený oligodeoxynukleotid zhášečem BHQ-1 na 5'-konci a dvojitě značený oligodeoxynukleotid (S1). Proto byla v dalším kroku věnována pozornost optimalizaci chromatografických podmínek pro separaci dvojitě značených oligodeoxynukleotidových sekvencí (S1–S3) na koloně Clarity[®] Oligo-RP[™].

5.2 Optimalizace podmínek na koloně Clarity[®] Oligo-RP[™]

V sérii pokusů byl sledován typ použitého iontově párového činidla, jeho koncentrace a vliv teploty na koloně. Byly testovány standardy S1, S2 a S3 s mobilní fází obsahující pufr o koncentraci v rozmezí 5–50 mM TEAA. Separace značených oligodeoxynukleotidů byla zásadně ovlivněna koncentrací iontově párového činidla. Množství iontů dostupných pro vytvoření iontového páru bylo důležitým parametrem pro retenci na koloně. Experimenty byly prováděny při dvou různých teplotách na koloně (40 °C a 55 °C). Pro testování byly použity izokratické metody s průtokem mobilní fáze 1 ml/min a detekcí PDA. Vzhledem k tomu, že standardy s azaftalocyaninovým zhášečem obsahovaly lipofilnější molekulu než standardy se zhášečem BHQ-1, tak bylo použito vyšší množství organické fáze k separaci směsi standardů S2 a S3. Podrobné podmínky jsou uvedeny v přehledu chromatografických záznamů (Obrázek 34).

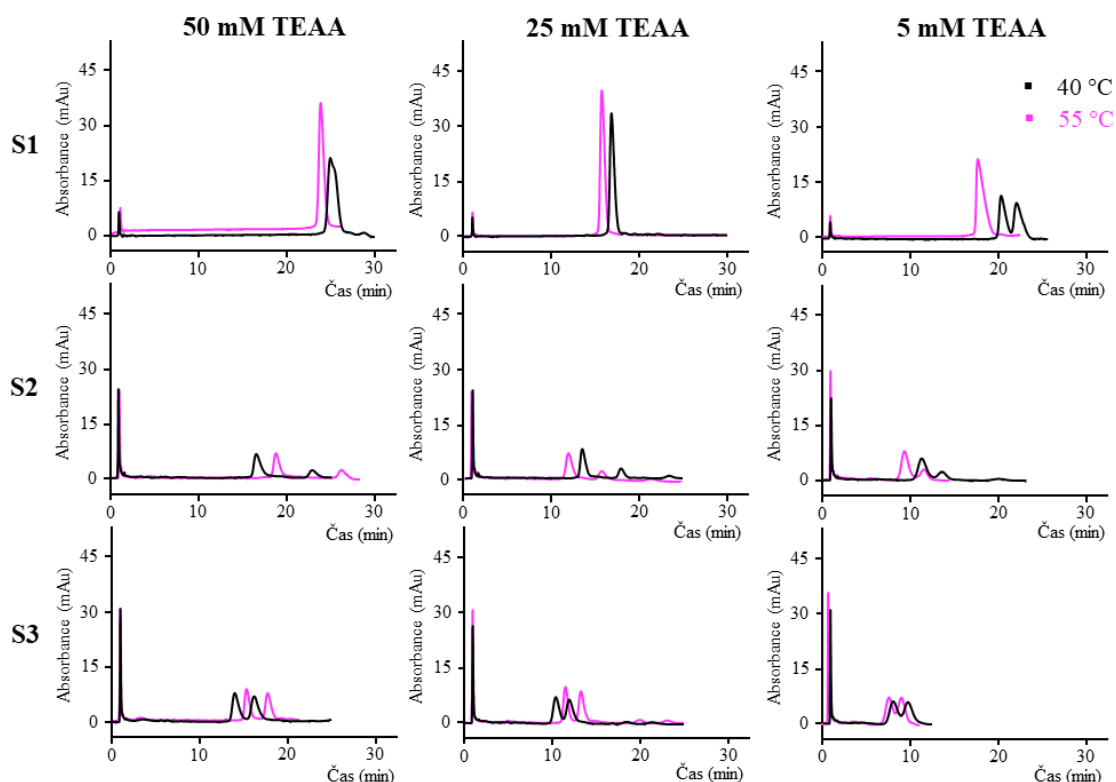
MLP a DLP v S1 byly překvapivě rozděleny pouze za použití 5 mM TEAA v ACN při teplotě na koloně 40 °C. Vyšší koncentrace TEAA neměla pozitivní efekt na separaci těchto látek podobně jako zvýšená teplota na koloně. Vlivem vyšší koncentrace TEAA došlo k prodloužení retenčního času.

Směs MLP a DLP ve S2 se podařilo rozdělit pomocí všech tří koncentrací TEAA. Bylo potvrzeno, že při vyšší koncentraci TEAA v mobilní fázi došlo k prodloužení retenčních časů. Rozlišení mezi MLP a DLP se zlepšilo díky vyššímu podílu TEAA

v mobilní fázi. Zvýšená teplota neměla rozhodující vliv na separaci, a dokonce při 50 mM TEAA došlo k prodloužení retenčních časů.

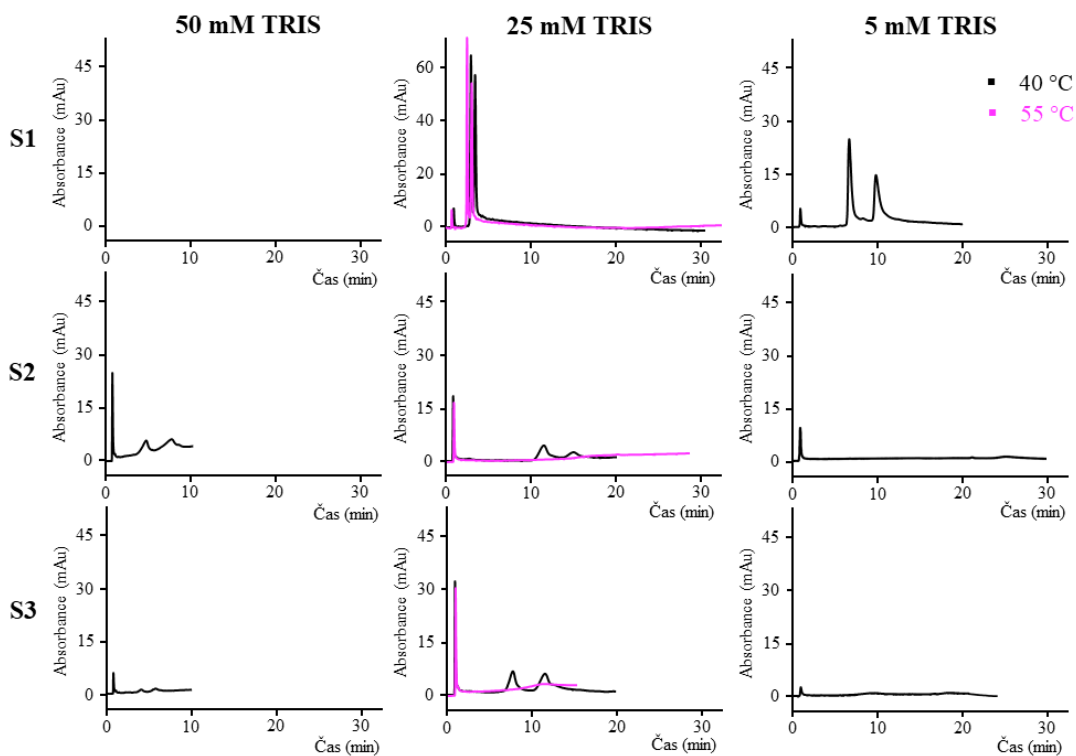
Podobné výsledky byly zaznamenány u S3. Zvýšená teplota na koloně měla negativní efekt na separaci MLP a DLP při použití 25 mM TEAA a 50 mM TEAA. Při použití 5 mM TEAA nebyl prakticky žádný rozdíl mezi testovanými teplotami.

Z výsledků vyplynulo, že při použití nižší koncentrace pufru TEAA byly píky značených oligodeoxynukleotidů širší. Čím vyšší byla koncentrace pufru, tím byl čas analýzy delší, s výjimkou S1 u 25 mM TEAA. Nicméně koncentrace 50 mM TEAA v kombinaci s acetonitrilem se zdála jako nejvhodnější pro mobilní fázi při separaci značených oligodeoxynukleotidů (S2 a S3). Celkový čas analýzy byl o něco málo delší než u koncentrací 5 mM a 25 mM TEAA, ale rozlišení separovaných molekul bylo lepší. Ukázalo se, že při použití 5 mM TEAA bylo v mobilní fázi příliš malé množství TEA k vytvoření stabilního iontového páru pro standardy S2 a S3. Naopak v případě S1 se za pomoci 5 mM TEAA v ACN podařilo separovat jednoduše značený oligodeoxynukleotid a dvojitě značený oligodeoxynukleotid v izokratickém módu. V některých případech došlo při zvýšené teplotě naopak k prodloužení analýzy, a proto teplota kolonového prostoru zůstala pro další experimenty nastavená na 40 °C.



Obrázek 34 Přehled chromatogramů standardů (S1, S2 a S3) za použití tří koncentrací TEAA v mobilní fázi při teplotě na koloně 40 °C (černě) a 55 °C (růžově). **S1** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA (25 mM), B: ACN, izokratická eluce A:B (75:25). **S1** – mobilní fáze A: 5 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (80:20). **S2, S3** – mobilní fáze A: 50 mM TEAA (25 mM), B: ACN, izokratická eluce A:B (50:50). **S2, S3** – mobilní fáze A: 5 mM TEAA, B: ACN, izokratická eluce A:B (53:47).

V následujícím experimentu byl vyzkoušen jiný typ iontově párového činidla. Místo TEA byl zvolen TRIS, který byl testován stejně jako u předchozích pokusů ve třech různých koncentracích (5 mM, 25 mM a 50 mM). Podobně jako při testování TEAA v mobilní fázi došlo u S1 k úspěšné separaci jednoduše značeného oligodeoxynukleotidu od dvojitě značeného oligodeoxynukleotidu při použití 5 mM TRIS (Obrázek 35). Při zvýšení koncentrace TRIS v mobilní fázi na 25 mM nedošlo ke zlepšení separace, a proto koncentrace 50 mM už nebyla testována. V případě standardů S2 a S3 analýza v prostředí TRIS nepřinesla v porovnání s TEAA zlepšení ani v jedné testované koncentraci. Za použití koncentrace 25 mM TRIS byla ještě zkoušena separace při zvýšené teplotě, ale vyšší teplota nepřinesla žádné zlepšení v rozlišení ani redukcii retenčních časů.



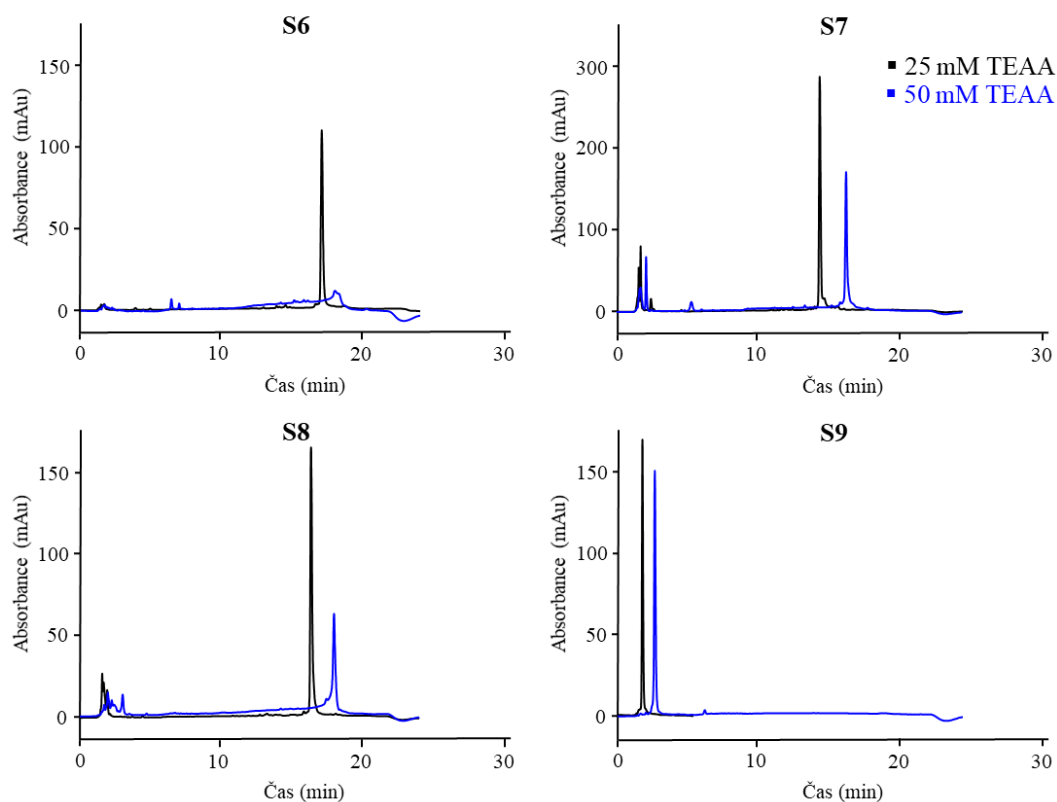
Obrázek 35 Přehled chromatogramů standardů (S1, S2 a S3) za použití tří koncentrací TRIS v mobilní fázi. Při použití 25 mM TRIS byly testovány dvě teploty na koloně 40 °C (černě) a 55 °C (růžově). **S1** – mobilní fáze A: 25 mM TRIS, B: ACN, izokratická eluce A:B (75:25). **S1** – mobilní fáze A: 5 mM TRIS, B: ACN, izokratická eluce A:B (80:20). **S2, S3** – mobilní fáze A: 50 mM TRIS, B: ACN, izokratická eluce A:B (50:50). **S4, S5** – mobilní fáze A: 25 mM TRIS, B: ACN, izokratická eluce A:B (53:47). **S2** – mobilní fáze A: 5 mM TRIS, B: ACN, izokratická eluce A:B (53:47). **S3** – mobilní fáze A: 5 mM TRIS, B: ACN, izokratická eluce A:B (50:50).

Shrnutí:

Nejlepší chromatografické podmínky pro separaci MLP a DLP v S1 byly při 40 °C v mobilní fázi 5 mM TRIS/ACN (80:20). Nejlepší chromatografické podmínky pro separaci MLP a DLP v S2 a S3 byly shodně izokratickou metodou při 40 °C v mobilní fázi 50 mM TEAA/ACN (50:50). V porovnání s výsledky Mgr. Ščensné byly naše nejlepší podmínky odlišné při separaci standardu S3. V diplomové práci bylo doporučováno použít 50 mM TRIS k separaci oligodeoxynukleotidu s navázaným azaftalocyaninovým zhášečem a fluoroforem FAM. Další odlišností bylo, že zvýšená teplota na koloně Clarity® Oligo-RP™ nezlepšila separaci směsi MLP a DLP. Naopak bylo potvrzeno, že pro oligodeoxynukleotidy značené zhášečem BHQ-1 a fluoroforem FAM bylo nejlepší použití pufru TRIS, jen separace na koloně Clarity® Oligo-RP™ vyžadovala nižší koncentraci (5 mM TRIS).

5.3 Vývoj metody pro hodnocení post-syntetické modifikace oligodeoxynukleotidových sond pomocí *click* reakce

V této části byla pozornost věnována separaci jednoduše značených oligodeoxynukleotidů a nečistot, které se mohou vyskytnout ve vzorku při jejich přípravě. Standardy (S6–S9) představovali rezidua při syntéze jednoduše značených oligodeoxynukleotidů. Pokud byla modifikovaná báze s DBCO přítomna v oligodeoxynukleotidu, ale selhalo navázání značky na DBCO, tak ve vzorku zůstal přítomný oligodeoxynukleotid s modifikovanou bází s DBCO na 3'-konci (S6), uprostřed řetězce (S7) nebo na 5'-konci (S8). Při syntéze mohl ve vzorku zůstat také nemodifikovaný oligodeoxynukleotidový řetězec bez DBCO (S9). Na začátku byla separace standardů testována v izokratickém módu 50 mM TEAA (25 mM TEAA) v ACN. S výjimkou S9 trvala separace více než 15 minut. Proto byla aplikována gradientová metoda s mobilní fází 25 mM TEAA/ACN a 50 mM TEAA/ACN. U testovaných standardů byl potvrzen stejný trend jako u předchozích experimentů. Při použití 25 mM TEAA/ACN byla analýza o trochu kratší než s 50 mM TEAA/ACN, ale úspora času (1–2 minuty) nebyla nijak zásadní (Obrázek 36). Analýza standardů byla ještě zkoušena alternativně v prostředí 25 mM a 50 mM TEAA v methanolu. Eluční síla methanolu byla slabší než v případě acetonitrilu. Navíc chromatografická metoda byla delší, a proto byl vybrán ACN.



Obrázek 36 Chromatogramy standardů S6–S9. Kolona Clarity® Oligo-RP™, mobilní fáze A: 50 mM TEAA modře (25 mM TEAA černě), B: ACN, gradient A:B, 0–2,5 min (11 % B), 2,5–16,5 min (11→25 % B), 16,5–20 min (25 % B), 20–20,5 min (25→11 % B), 20,5–25 min (11 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min, detekce PDA.

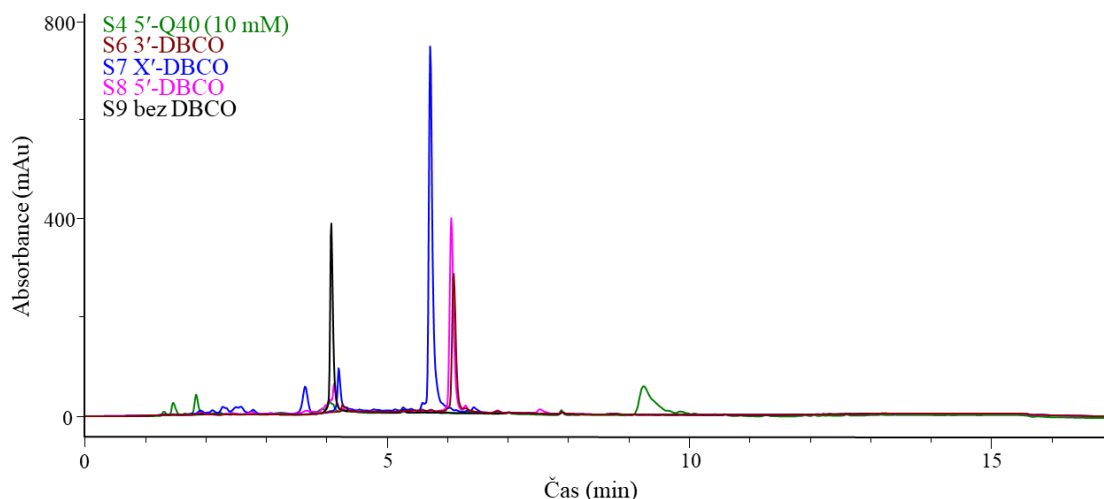
Gradientová metoda 2,5–20 min (10→50 % ACN) s mobilní fází 50 mM TEAA/ACN byla původně dlouhá 28 minut. Z experimentů vyplynulo, že 50 % ACN nemělo dostatečnou eluční sílu pro standard č. 4. Po optimalizaci množství ACN a doby analýzy jsou výsledné podmínky pro separaci nemodifikovaných oligodeoxynukleotidů a modifikovaného oligodeoxynukleotidu značkou Q40 shrnuty v tabulce 5. Pro analýzu molekulární sondy se značkou FK8 bylo sníženo množství acetonitrilu a celkový čas analýzy byl zkrácen o 1 minutu (Tabulka 5).

Tabulka 5 Přehled chromatografických podmínek pro separaci oligodeoxynukleotidů se značkou Q40 a FK8.

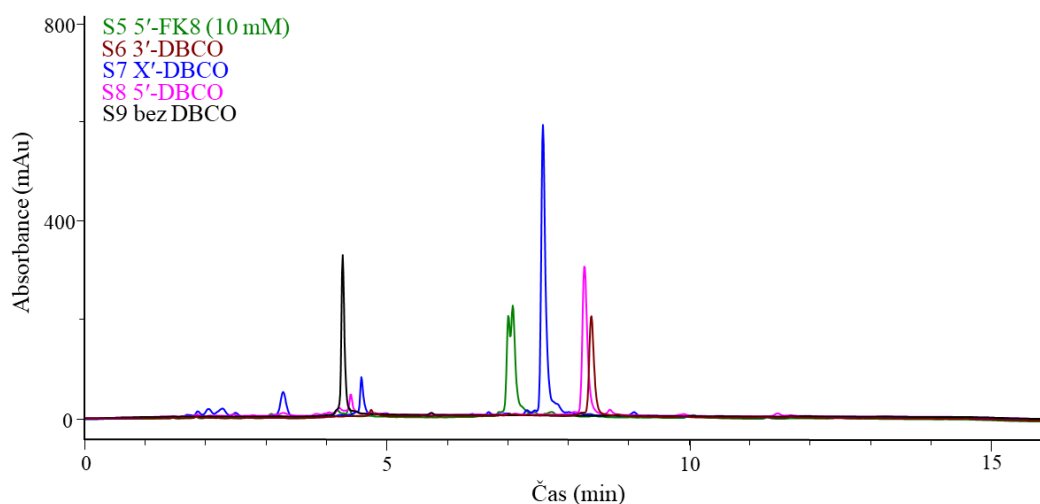
Kolona:	Clarity® Oligo-RP™, 3 μm, 4.6 × 100 mm			
Teplota kolony:	40 °C			
Mobilní fáze:	50 mM TEAA (A) : ACN (B)			
Průtok mob. fáze:	1 ml/min			
Dávkovaný objem:	1 μl			
Detektor:	PDA			
Gradientová eluce:	Značka Q40		Značka FK8	
	Čas (min)	Složka B (%)	Čas (min)	Složka B (%)
	0,0	10	0,0	10
	0,5	10	0,5	10
	10,0	85	10,0	46
	13,0	85	12,0	46
	13,5	10	12,5	10
	17,0	10	16,0	10
Celkový čas metody:	17 min		16 min	

Shrnutí:

Jak již bylo uvedeno, tak právě navázaná značka byla zásadní pro retenci na koloně. Na základě chromatografických záznamů byla demonstrována použitelnost těchto metod k hodnocení post-syntetické modifikace při přípravě jednoduše značených oligodeoxynukleotidů značkou Q40 (Obrázek 37) a FK8 (Obrázek 38). V prvním případě při porovnání retenčních časů byl na koloně nejméně zadržovaný nemodifikovaný oligodeoxynukleotid (S9), následovaný modifikovanými oligodeoxynukleotidy s DBCO (S6–S8) a nejvíce byl zadržovaný oligodeoxynukleotid se zhášečem Q40 (S4). Ve druhém případě byl nejprve z kolony eluován nemodifikovaný oligodeoxynukleotid (S9), následovaný oligodeoxynukleotidem s FK8 (S5) a nakonec modifikované oligodeoxynukleotidy s DBCO (S6–S8).



Obrázek 37 Porovnání chromatogramů S4 s koncentrací značky Q40 při *click* reakci 10 mM (zeleně), S6 (hnědě), S7 (modře), S8 (růžově) a S9 (černě). Kolona Clarity® Oligo-RP™, mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–0,5 min (10 % B), 0,5–10 min (10→85 % B), 10–13 min (85 % B), 13–13,5 min (85→10 % B), 13,5–17 min (10 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min, detekce PDA.



Obrázek 38 Porovnání chromatogramů S5 s koncentrací značky FK8 při *click* reakci 10 mM (zeleně), S6 (hnědě), S7 (modře), S8 (růžově) a S9 (černě). Kolona Clarity® Oligo-RP™, mobilní fáze A: 50 mM TEAA, B: ACN, gradient A:B, 0–0,5 min (10 % B), 0,5–10 min (10→46 % B), 10–12 min (46 % B), 12–12,5 min (46→10 % B), 12,5–16 min (10 % B), teplota 40 °C, průtok 1 ml/min, detekce PDA.

5.4 Analýza oligodeoxynukleotidů se značkou Q40

Na základě chromatografické metody vyvinuté specificky pro jednoduše značené oligodeoxynukleotidy značkou Q40 byly analyzovány vzorky připravené na různých typech pevné fáze. Byly porovnávány vzorky připravované na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å, 1000 Å, 500 Å a vzorky připravované na pevné fázi na bázi polystyrenu. Na všech čtyřech typech pevné fáze byly syntetizovány vzorky s koncentrací navázané

značky 100 μM , 1 mM a 10 mM. Zároveň bylo možné navíc otestovat vzorky oligodeoxynukleotidů značených 10 μM a 100 mM koncentrací značky Q40 připravené na pevné fázi s velikostí pórů 2000 Å.

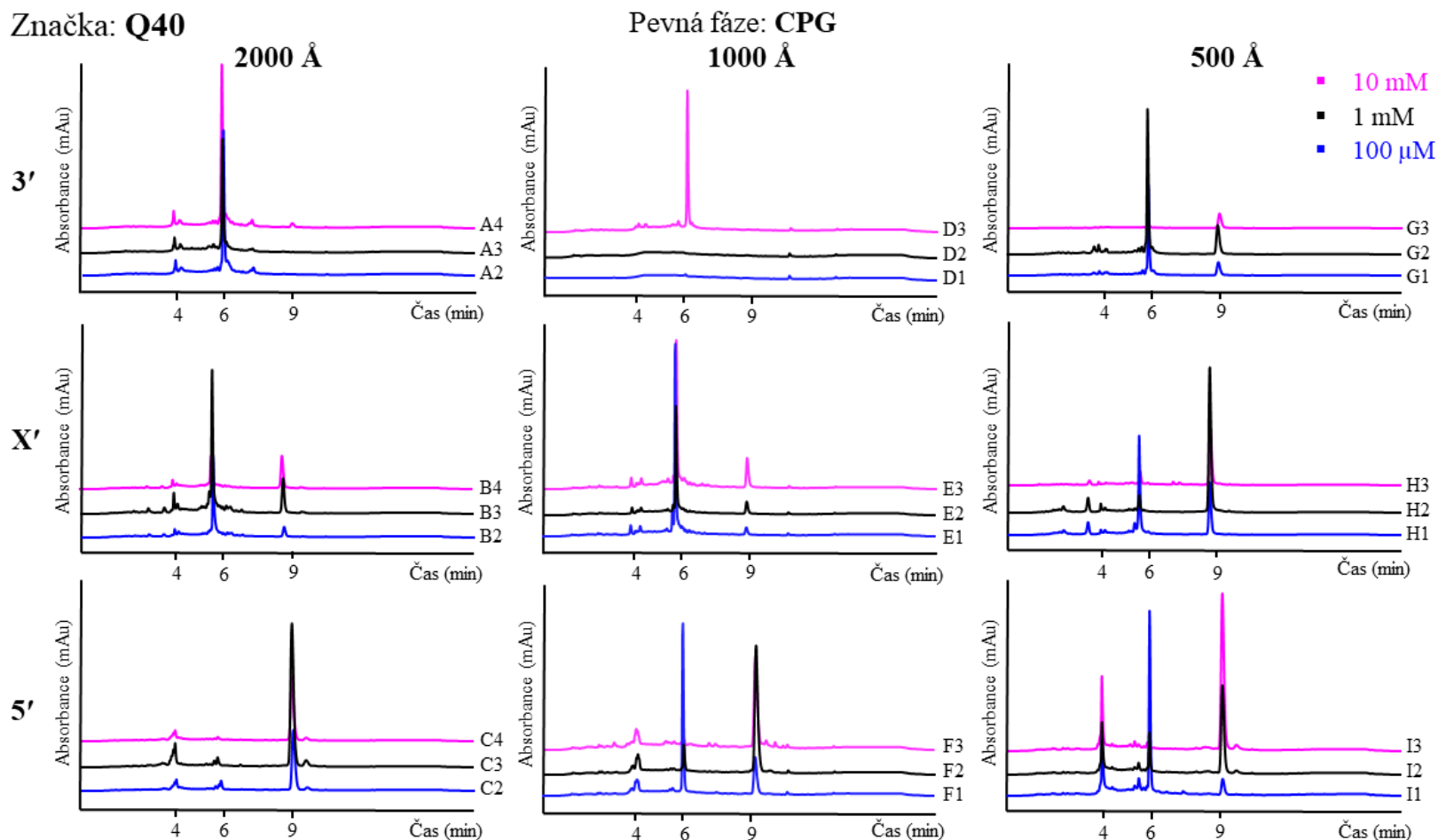
5.4.1 CPG pevná fáze

Z chromatogramů (Obrázek 39) je patrné, že retenční čas oligodeoxynukleotidů s navázanou značkou uprostřed řetězce byl o něco kratší než u vzorků se značkou na 3'-konci a 5'-konci. Azaftalocyanin Q40 navázaný uprostřed řetězce byl nejspíš zastíněn okolními nukleotidy a hydrofobicita sondy byla nižší. Mezi vzorky s modifikací na obou koncích prakticky nebyl rozdíl v retenci.

Obecně je možné říct, že na pevné fázi s velikostí pórů 2000 Å se podařilo celkem úspěšně připravit pouze oligodeoxynukleotidy značené na 5'-konci. Nejlepší výsledek byl pozorován při použití značky s koncentrací 1 mM při *click* reakci (C3). Značení uprostřed sekvence bylo neefektivní bez zásadního vlivu koncentrace zhášeče na výsledek. Značení na 3'-konci prakticky neproběhlo ani při jedné z dostupných koncentrací a převažovaly oligodeoxynukleotidy pouze s DBCO, viz Obrázek 40.

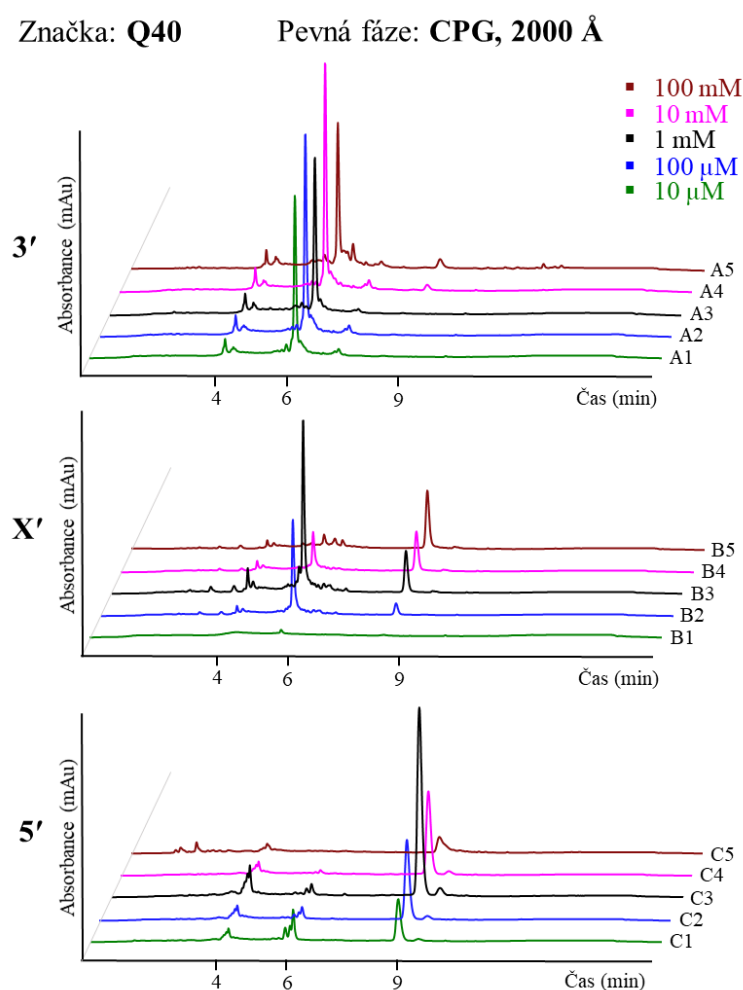
Podobné výsledky byly pozorovány u vzorků připravených na pevné fázi CPG s velikostí pórů 1000 Å. Nejvyšší množství navázané značky na oligodeoxynukleotid bylo opět na 5'-konci s koncentrací zhášeče 1 mM při *click* reakci (F2).

Nejlepší výsledky bylo možné pozorovat u vzorků připravených na pevné fázi s velikostí pórů 500 Å. Nejenže jsme dokázali zaznamenat viditelné množství oligodeoxynukleotidu se značkou na 5'-konci, ale poprvé bylo zaznamenáno výraznější množství oligodeoxynukleotidu se zhášečem uprostřed řetězce bez zřejmých nečistot (vzorky H2 a H3). Nejvíce navázané značky uprostřed řetězce bylo při koncentraci 1 mM při *click* reakci. Ovšem v případě navázání značky na 5'-konci bylo nejvíce azaftalocyaninového zhášeče s koncentrací 10 mM při *click* reakci (I3). Bohužel ani na pevné fázi s velikostí pórů 500 Å se nepodařilo zaznamenat oligodeoxynukleotid s navázaným zhášečem Q40 na 3'-konci u žádné testované koncentrace, patrně díky sterickému efektu jako u všech předchozích materiálů.



Obrázek 39 Porovnání chromatografických záznamů oligodeoxynukleotidů se značkou Q40 na 3'-konci, uprostřed řetězce (X') a na 5'-konci (koncentrace značky při *click* reakci: 10 mM růžově, 1 mM černě, 100 μM modře). Současně je zde porovnání vzorků připravených na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å, 1000 Å a 500 Å. Analyzováno metodou vyvinutou pro oligodeoxynukleotidy se značkou Q40. Pozn. u vzorků D1 a D2 se nepodařilo detekovat žádný pík, patrně došlo k chybě při jejich zpracování. Eluční pořadí: nemodifikovaný oligodeoxynukleotid ($t_r=4$ min), oligodeoxynukleotid s DBCO ($t_r=6$ min) a oligodeoxynukleotid se značkou Q40 ($t_r=9$ min), viz Obrázek 37.

Z hlediska použitého množství zhášedce Q40 se pro značení na 5'-konci jeví jako nejlepší koncentrace 1 mM. Vzhledem k obtížím se značením je vliv koncentrace na výsledek značení na 3'-konci a uprostřed řetězce těžko hodnotitelný (Obrázek 40).

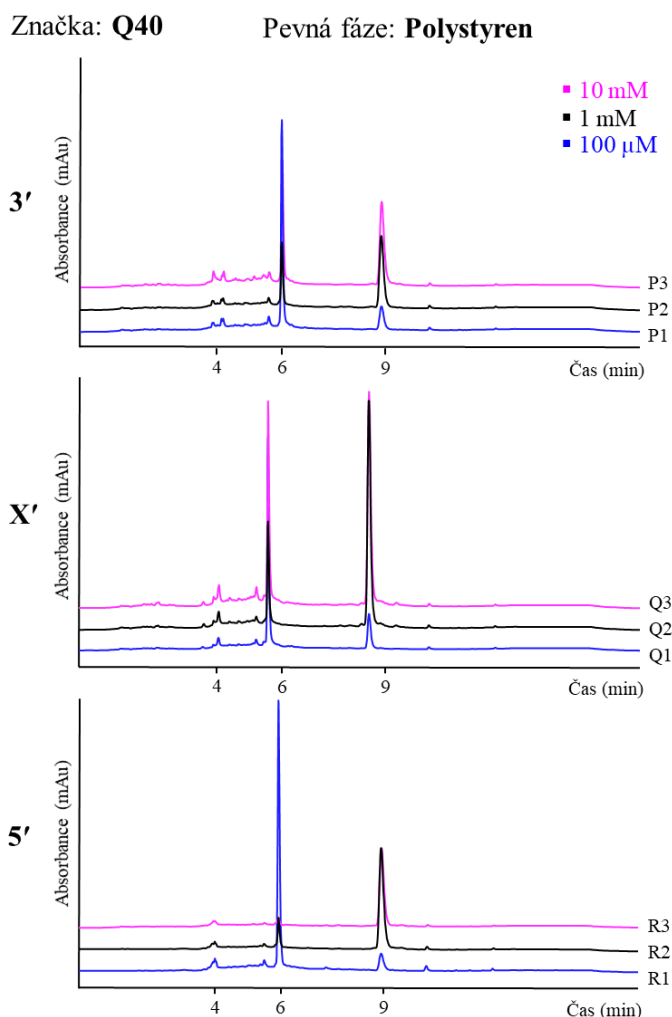


Obrázek 40 Porovnání chromatografických záznamů oligodeoxynukleotidů se značkou Q40 na 3'-konci, uprostřed řetězce (X') a na 5'-konci (koncentrace značky při *click* reakci: 100 mM hnědě, 10 mM růžově, 1 mM černě, 100 μM modře, 10 μM zeleně) připravených na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å. Analyzováno metodou vyvinutou pro oligodeoxynukleotidy se značkou Q40. Pozn.: u vzorku B1 se nepodařilo detekovat žádný pík, patrně došlo k chybě při jeho zpracování. Eluční pořadí: nemodifikovaný oligodeoxynukleotid ($t_r=4$ min), oligodeoxynukleotid s DBCO ($t_r=6$ min) a oligodeoxynukleotid se značkou Q40 ($t_r=9$ min), viz Obrázek 37.

5.4.2 Polystyrenová pevná fáze

V grafické podobě bylo možné srovnávat oligodeoxynukleotidy s navázanou značkou Q40 připravené na pevné fázi na bázi polystyrenu (Obrázek 41). Na této pevné fázi s největší pravděpodobností došlo ke správnému navázání modifikované báze s DBCO na oligodeoxynukleotid bez ohledu na lokaci. Z přehledu dále plyne, že koncentrace zhášedce 1 mM se zdála být dostatečná i v případě syntézy na polystyrenové pevné fázi. Zajímavé bylo, že se nám nepodařilo připravit vzorky s navázanou značkou

Q40 na 5'-konci v takovém množství jako na pevné fázi CPG bez ohledu na velikost pórů. Díky tomu zůstala dominantní pozice pro přípravu vzorků s navázanou značkou Q40 na 5'-konci skleněnému pevnému nosiči s kontrolovanou velikostí pórů.



Obrázek 41 Porovnání chromatografických záznamů oligodeoxynukleotidů se značkou Q40 na 3'-konci, uprostřed řetězce (X') a na 5'-konci (koncentrace značky při *click* reakci: 10 mM růžově, 1 mM černě, 100 μM modře) připravených na pevné fázi na bázi polystyrenu. Analyzováno metodou vyvinutou pro oligodeoxynukleotidy se značkou Q40. Eluční pořadí: nemodifikovaný oligodeoxynukleotid ($t_r=4$ min), oligodeoxynukleotid s DBCO ($t_r=6$ min) a oligodeoxynukleotid se značkou Q40 ($t_r=9$ min), viz Obrázek 37.

Shrnutí:

Z výsledků vyplynulo, že pro přípravu značeného oligodeoxynukleotidu azafthalocyaninem Q40 se zdá být ideální koncentrace zhašeče Q40 při *click* reakci 1 mM bez ohledu na typ pevné fáze. Menší množství zhašeče nebylo ve většině případů dostatečné pro navázání na oligodeoxynukleotidový řetězec. Naopak vyšší množství než 1 mM nemělo při navazování takový efekt, aby bylo použití výhodné, s výjimkou navázání značky na 5'-konec na pevné fázi CPG s velikostí pórů 500 Å. V případě pevné

fáze CPG se ani v jednom případě nepodařilo připravit oligodeoxynukleotidy se značkou Q40 na 3'-konci v dostatečném množství. Pravděpodobně to souviselo s velikostí molekuly Q40, která byla vzhledem ke způsobu syntézy v těsné blízkosti pevné fáze a nedokázala se přiblížit k DBCO na 2. bázi. Pevná fáze CPG s póry o velikosti 2000 Å byla vhodná pouze pro přípravu sond značených na 5'-konci. Zajímavé bylo, že na pevné fázi na bázi polystyrenu se podařilo připravit oligodeoxynukleotidy s navázaným zhášečem na všech třech místech.

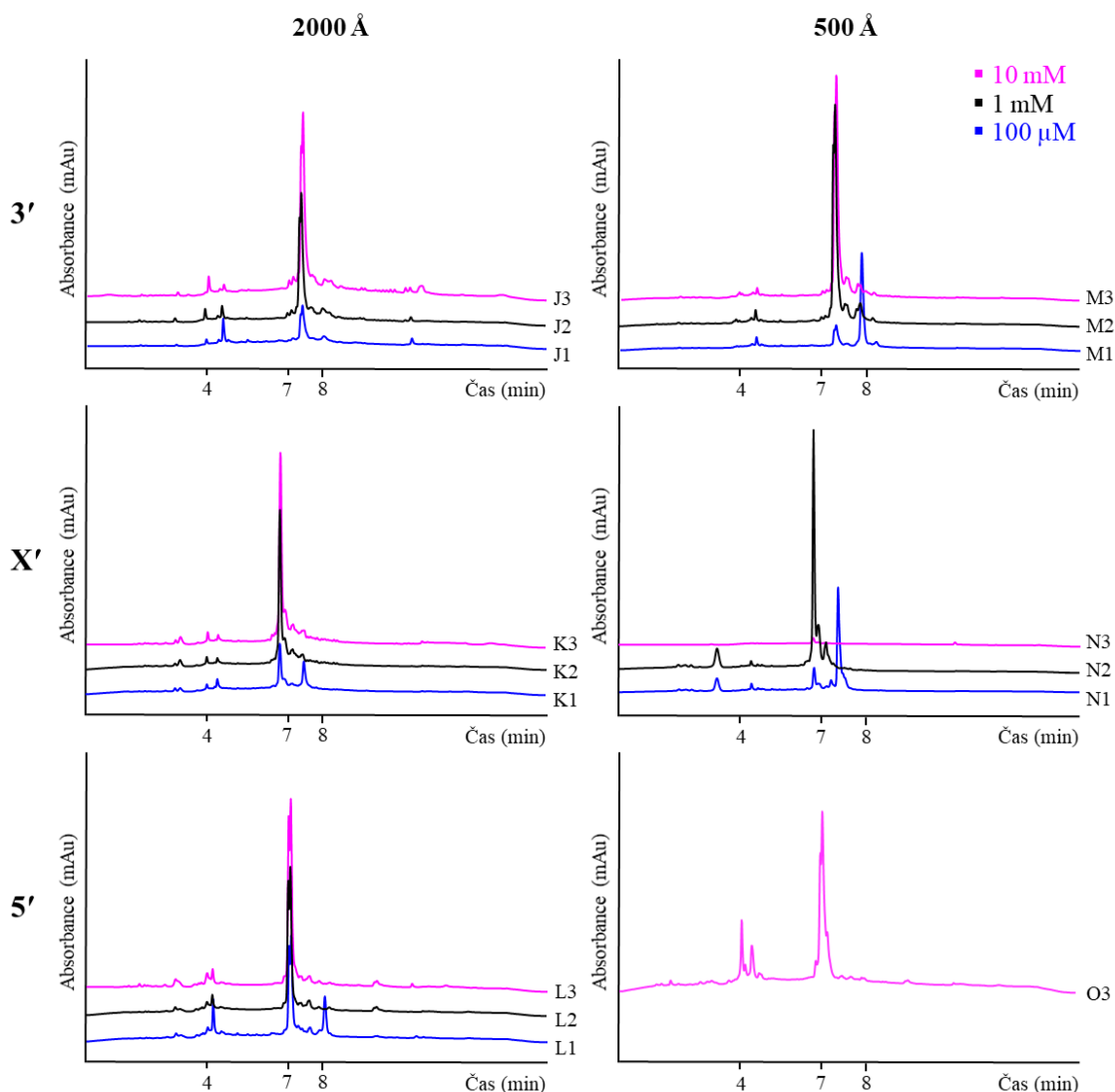
Závěrem bylo možné konstatovat, že pro přípravu oligodeoxynukleotidu se značkou Q40 je doporučeno: na 3'-konci používat polystyrenovou pevnou fázi; k přípravě oligodeoxynukleotidů značených uprostřed řetězce pevnou fázi CPG s velikostí pórů 500 Å; na 5'-konci pevnou fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å.

5.5 Analýza oligodeoxynukleotidů se značkou FK8

Oligodeoxynukleotidy s interkalačním činidlem FK8 byly připraveny na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å a 500 Å. Oligodeoxynukleotidy byly při *click* reakci modifikovány roztokem značky o koncentracích 100 µM, 1 mM a 10 mM. Vzorky se značkou na 5'-konci připravené na pevné fázi s velikostí pórů 500 Å byly v době testování připraveny pouze s koncentrací značky 10 mM, viz Obrázek 42.

Modifikace oligodeoxynukleotidu na 3'-konci na pevné fázi s velikostí pórů 2000 Å se podařilo připravit bez přítomnosti výraznějších nečistot (Obrázek 42). Jako nejlepší pro modifikaci se ukázala 10 mM koncentrace (J3). Velice podobně na tom byly také vzorky se značkou FK8 umístěnou uprostřed řetězce (K3) a na 5'-konci (L3).

K porovnání byly ještě vzorky, které byly syntetizovány na pevné fázi s velikostí pórů 500 Å. Dle výsledků se podařilo oligodeoxynukleotid modifikovat ve vysokém množství. U značky na 5'-konci bylo srovnatelné množství navázáno na oligodeoxynukleotidovou sekvenci při použití značky s koncentrací 1 mM i 10 mM při *click* reakci (M2 a M3). V případě značky uprostřed řetězce byl nejlepší výsledek pozorován při použití značky s koncentrací 1 mM při *click* reakci (N2). Vzorek O3 obsahoval oligodeoxynukleotid se značkou FK8 a zřejmě nějaké množství nemodifikovaného oligodeoxynukleotidu. Pro kompletní srovnání by bylo dobré doplnit vzorky připravené na 5'-konci také se značkou FK8 o koncentracích 100 µM a 1 mM.



Obrázek 42 Porovnání chromatografických záznamů oligodeoxynukleotidů se značkou FK8 na 3'-konci, uprostřed řetězce (X') a na 5'-konci (koncentrace značky při *click* reakci: 10 mM růžově, 1 mM černě, 100 μ M modře). Současně je zde porovnání vzorků připravených na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å a 500 Å. Analyzováno metodou vyvinutou pro oligodeoxynukleotidy se značkou FK8. Pozn.: u vzorku N3 se nepodařilo detekovat žádný pík, patrně došlo k chybě při jeho zpracování. Eluční pořadí: nemodifikovaný oligodeoxynukleotid ($t_r=4$ min), oligodeoxynukleotid se značkou FK8 ($t_r=7$ min) a oligodeoxynukleotid s DBCO ($t_r=8$ min), viz Obrázek 38.

Shrnutí:

Na základě dostupných výsledků je možné konstatovat, že 100 μ M koncentrace FK8 byla příliš malá na to, aby došlo k navázání na oligodeoxynukleotidový řetězec stejně jako v případě značky Q40. Dostačující koncentrace FK8 k navázání na oligodeoxynukleotidový řetězec bez ohledu na místo vazby byla 1 mM. Bohužel k vzájemnému porovnání nebyly k dispozici vzorky připravené na pevné fázi CPG

s velikostí pórů 1000 Å a na polystyrenové fázi, které by bylo dobré pro úplnost doplnit. Pevná fáze s velikostí pórů 500 Å byla vhodnější pro přípravu vzorků značených molekulou FK8 na 3'-konci a uprostřed řetězce. Množství navázané značky se zdá být vyšší než v případě pevné fáze s velikostí pórů 2000 Å. S ohledem na to, že nám chyběly vzorky se značkou FK8 na 5'-konci připravené na pevné fázi s velikostí pórů 500 Å, lze v současné chvíli doporučit provádět post-syntetické modifikace značkou FK8 na 5'-konci na pevné fázi s velikostí pórů 2000 Å. V porovnání se vzorky značenými zhášedem Q40 se nám na pevné fázi o velikosti pórů 2000 Å povedlo připravit vzorky s navázanou značkou FK8 na 3'-konci, uprostřed řetězce a na 5'-konci. Značka FK8 se dokázala lépe vmezeřit do pórů pevné fáze než objemná struktura azaftalocyaninu a *click* reakce proběhla podstatně lépe na všech třech místech oligodeoxynukleotidu.

5.6 Analýza oligodeoxynukleotidů se značkou BDP16 – pilotní vzorky

V návaznosti na předchozí analýzy byla ještě optimalizována HPLC metoda pro monitorování přípravy jednoduše značených molekulárních sond s navázanou molekulou fluoroforu BDP16. Oligodeoxynukleotidy byly připraveny stejným způsobem jako předchozí vzorky značené Q40 a FK8. Na pevné fázi CPG s velikostí pórů 500 Å bylo připraveno celkem pět pilotních vzorků značených pouze na 5'-konci. Jednalo se jen o pilotní testování a chromatografické podmínky byly upraveny tak, abychom dosáhli separace značených a nemodifikovaných oligodeoxynukleotidů (Tabulka 6).

Tabulka 6 Přehled chromatografických podmínek pro separaci vzorků se značkou BDP16.

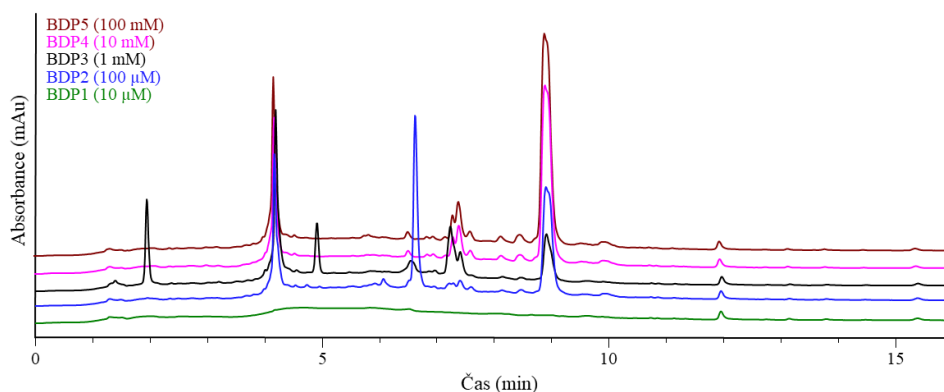
Kolona:	Clarity® Oligo-RP™, 3 µm, 4.6 × 100 mm	
Teplota kolony:	40 °C	
Mobilní fáze:	50 mM TEAA (A) : ACN (B)	
Průtok mob. fáze:	1 ml/min	
Dávkovaný objem:	1 µl	
Detektor:	PDA	
Gradientová eluce:	Čas (min)	Složka B (%)
	0,0	10
	0,5	10
	10,0	70
	20,0	70

20,5	10
24,0	10

Celkový čas metody: 24 minut

Shrnutí:

Z výsledků vyplynulo, že stejně jako v předchozích případech nebyla koncentrace značky 10 μM pro modifikaci efektivní (Obrázek 43). U vzorku BDP4 se podařilo navázat značku BDP16 na oligodeoxynukleotid v přijatelném množství a koncentrace 10 mM při *click* reakci se jevila jako dostatečná. Ovšem také u tohoto vzorku bylo na chromatogramu vidět výrazné množství nemodifikovaného oligodeoxynukleotidu, kdy zřejmě došlo k problému při syntéze oligodeoxynukleotidu s DBCO. Zvýšení koncentrace BDP16 na 100 mM již nepřineslo zlepšení. Bylo pozorováno, že pík oligodeoxynukleotidu s navázanou značkou BDP16 byl rozšířený díky vzniku dvou izomerů při *click* reakci, podobně jako v případě molekuly FK8. Vzhledem k tomu, že se jednalo pouze o pilotní měření a k dispozici nebyly kompletní vzorky k porovnání, tak je aktuálně doporučováno k modifikaci používat koncentraci značky při *click* reakci 10 mM. Bylo prokázáno, že také naše třetí chromatografická metoda byla použitelná k monitorování přípravy modifikovaných oligodeoxynukleotidů s odlišnou značkou. Bylo by určitě zajímavé sledovat post-syntetickou modifikaci oligodeoxynukleotidu s fluorescenčním barvivem BDP16 také na 3'-konci a uprostřed řetězce. Rovněž by bylo vhodné doplnit měření o výsledky vzorků, které by byly připraveny na různých typech pevné fáze.



Obrázek 43 Porovnání chromatografických záznamů oligodeoxynukleotidů se značkou BDP16 na 5'-konci (koncentrace značky při *click* reakci: 100 mM hnědě, 10 mM růžově, 1 mM černě, 100 μM modře, 10 μM zeleně) připravených na pevné fázi CPG s velikostí pórů 500 Å. Analyzováno metodou vyvinutou pro oligodeoxynukleotidy se značkou BDP16. Eluční pořadí: nemodifikovaný oligodeoxynukleotid ($t_r=4$ min), oligodeoxynukleotid s DBCO ($t_r=7$ min) a oligodeoxynukleotid se značkou BDP16 ($t_r=9$ min).

6 Závěr

V první části rigorózní práce bylo otestováno celkem 7 různých chromatografických kolon k separaci dvojitě značených oligodeoxynukleotidů od jednoduše značených oligodeoxynukleotidů. Kolona Clarity® Oligo-RP™ měla nejlepší selektivitu pro separaci jednoduše a dvojitě značených sond obsahující značky Q30, FAM, BHQ-1, Cy5, Q40 a FK8. U S1 se nám překvapivě podařilo separovat oligodeoxynukleotid s navázaným zhášecem BHQ-1 od oligodeoxynukleotidu s navázaným fluoroforem FAM a zhášecem BHQ-1 v mobilní fázi s nižší koncentrací (5 mM TRIS v ACN). Ukázalo se, že v případě vzorků S2 a S3 bylo nejlepší použít k separaci MLP od DLP mobilní fázi 50 mM TEAA v ACN i přes delší čas analýzy. Zvýšená teplota na koloně nevedla k lepšímu rozlišení. V další části byla věnována pozornost analýze jednoduše značených oligodeoxynukleotidů. K dispozici byly oligodeoxynukleotidy s navázanou značkou Q40, FK8 a BDP16. Pro monitorování přípravy modifikovaných oligodeoxynukleotidů byly vyvinuty tři HPLC metody. Chromatografické podmínky byly optimalizovány na stejné stacionární fázi jako v předchozím případě. Z výsledků vyplynulo, že k navázání značky na oligodeoxynukleotid bylo dostačující použít koncentraci 1 mM pro značky Q40 a FK8, ale pro BDP16 se zdála lepší koncentrace 10 mM při *click* reakci. Správný výběr pevné fáze byl zásadním způsobem ovlivněn navazovanou značkou na oligodeoxynukleotid. Pro vzorky se značkou Q40 na 3'-konci bylo nejvýhodnější používat pevnou fázi na bázi polystyrenu. Pevná fáze CPG s velikostí pórů 500 Å byla vybrána pro přípravu vzorků se značkou Q40 uprostřed řetězce. Vzorky se značkou Q40 na 5'-konci byly připraveny nejlépe na pevné fázi CPG s velikostí pórů 2000 Å. Oligodeoxynukleotidy se značkou FK8 na 3'-konci a uprostřed řetězce byly připraveny v nejvyšším množství na pevné fázi CPG s velikostí pórů 500 Å. Pevná fáze CPG s velikostí pórů 2000 Å byla identifikována jako nejlepší pro přípravu oligodeoxynukleotidů se značkou FK8 na 5'-konci. V rámci dalšího směřování výzkumu by bylo vhodné dokončit přípravu vzorků se značkou FK8 a BDP16 na ostatních typech pevné fáze, aby bylo možné lépe zhodnotit post-syntetické modifikace. Chromatografické metody by případně mohly být optimalizovány k semipreparativní separaci značených oligodeoxynukleotidů.

7 Seznam použité literatury

- [1] A. Ščensná, Použitie HPLC pre separáciu biokonjugátov azaftalocyanínov II, (2020). <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/121042> (accessed November 18, 2022).
- [2] O. Kennard, W.N. Hunter, Oligonucleotide structure: A decade of results from single crystal x-ray diffraction studies, *Q Rev Biophys.* 22 (1989). <https://doi.org/10.1017/S0033583500002997>.
- [3] J.D. Watson, F.H.C. Crick, Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature.* 171 (1953). <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- [4] X. Fang, Y. Mi, J.J. Li, T. Beck, S. Schuster, W. Tan, Molecular beacons: fluorogenic probes for living cell study, *Cell Biochem Biophys.* 37 (2002) 71–81. <https://doi.org/10.1385/CBB:37:2:071>.
- [5] A. Okamoto, DNA/RNA Fluorescence Imaging by Synthetic Nucleic Acids, *Adv Exp Med Biol.* 1310 (2021) 475–493. https://doi.org/10.1007/978-981-33-6064-8_17.
- [6] L. Moumné, A.C. Marie, N. Crouvezier, Oligonucleotide Therapeutics: From Discovery and Development to Patentability, *Pharmaceutics.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020260>.
- [7] P. Jolly, P. Estrela, M. Ladomery, Oligonucleotide-based systems: DNA, microRNAs, DNA/RNA aptamers, *Essays Biochem.* 60 (2016) 27–35. <https://doi.org/10.1042/EBC20150004>.
- [8] H.G. Khorana, B. Hall, Synthesis in the study of nucleic acids. The Fourth Jubilee Lecture., *Biochemical Journal.* 109 (1968) 709. <https://doi.org/10.1042/BJ1090709C>.
- [9] A.M. Michelson, A.R. Todd, Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage, *Journal of the Chemical Society (Resumed).* (1955) 2632–2638. <https://doi.org/10.1039/JR9550002632>.
- [10] S. Gillam, F. Rottman, P. Jahnke, M. Smith, Enzymatic synthesis of oligonucleotides of defined sequence: synthesis of a segment of yeast iso-1-cytochrome c gene., *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 74 (1977) 96–100. <https://doi.org/10.1073/PNAS.74.1.96>.

- [11] G.R. Gough, M.J. Brunden, P.T. Gilham, Recovery and recycling of synthetic units in the construction of oligodeoxyribonucleotides on solid supports, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 4177–4180. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)82097-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)82097-9).
- [12] C. McCollum, A. Andrus, An optimized polystyrene support for rapid, efficient oligonucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 32 (1991) 4069–4072. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79865-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79865-0).
- [13] S.L. Beaucage, Oligodeoxyribonucleotides synthesis. Phosphoramidite approach., *Methods Mol Biol.* 20 (1993). <https://doi.org/10.1385/0-89603-281-7:33>.
- [14] S.L. Beaucage, M.H. Caruthers, Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 1859–1862. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)90461-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90461-7).
- [15] M. Catani, C. De Luca, J. Medeiros Garcia Alcântara, N. Manfredini, D. Perrone, E. Marchesi, R. Weldon, T. Müller-Spâth, A. Cavazzini, M. Morbidelli, M. Sponchioni, Oligonucleotides: Current Trends and Innovative Applications in the Synthesis, Characterization, and Purification, *Biotechnol J.* 15 (2020). <https://doi.org/10.1002/BIOT.201900226>.
- [16] M. Septak, Kinetic studies on depurination and detritylation of CPG-bound intermediates during oligonucleotide synthesis., *Nucleic Acids Res.* 24 (1996) 3053. <https://doi.org/10.1093/NAR/24.15.3053>.
- [17] D. Chen, Z. Yan, D.L. Cole, G.S. Srivatsa, Analysis of internal (n-1)mer deletion sequences in synthetic oligodeoxyribonucleotides by hybridization to an immobilized probe array., *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 389. <https://doi.org/10.1093/NAR/27.2.389>.
- [18] X. Wei, Coupling activators for the oligonucleotide synthesis via phosphoramidite approach, *Tetrahedron.* 69 (2013) 3615–3637. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2013.03.001>.
- [19] D.C. Capaldi, H.J. Gaus, R.L. Carty, M.N. Moore, B.J. Turney, S.D. Decottignies, J. v. McArdle, A.N. Scozzari, V.T. Ravikumar, A.H. Krotz, Formation of 4,4'-dimethoxytrityl-C-phosphonate oligonucleotides, *Bioorg Med Chem Lett.* 14 (2004) 4683–4690. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2004.06.088>.
- [20] A.A. Rodriguez, I. Cedillo, A.K. McPherson, Conversion of adenine to 5-amino-4-pyrimidinylimidazole caused by acetyl capping during solid phase oligonucleotide synthesis, *Bioorg Med Chem Lett.* 26 (2016) 3468–3471. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2016.06.042>.

- [21] M.H. Caruthers, A.D. Barone, S.L. Beaucage, D.R. Dodds, E.F. Fisher, L.J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J.Y. Tang, Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method, *Methods Enzymol.* 154 (1987) 287–313. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)54081-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)54081-2).
- [22] X. Fang, Y. Mi, J.J. Li, T. Beck, S. Schuster, W. Tan, Molecular beacons: fluorogenic probes for living cell study, *Cell Biochem Biophys.* 37 (2002) 71–81. <https://doi.org/10.1385/CBB:37:2:071>.
- [23] N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution, *Anal Biochem.* 281 (2000) 26–35. <https://doi.org/10.1006/ABIO.2000.4534>.
- [24] B. Juskowiak, Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential, in: *Anal Bioanal Chem*, 2011: pp. 3157–3176. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4304-5>.
- [25] Y. Sei-Iida, H. Koshimoto, S. Kondo, A. Tsuji, Real-time monitoring of in vitro transcriptional RNA synthesis using fluorescence resonance energy transfer, 2000.
- [26] C. Ma, Z. Tang, X. Huo, X. Yang, W. Li, W. Tan, Real-time monitoring of double-stranded DNA cleavage using molecular beacons, *Talanta.* 76 (2008) 458–461. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2008.03.038>.
- [27] R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf, Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (1988) 8790. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.23.8790>.
- [28] M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, H. Kobayashi, H-type dimer formation of fluorophores: A mechanism for activatable, in vivo optical molecular imaging, *ACS Chem Biol.* 4 (2009). <https://doi.org/10.1021/cb900089j>.
- [29] J. Li, Y. Lu, A highly sensitive and selective catalytic DNA biosensor for lead ions, *J Am Chem Soc.* 122 (2000). <https://doi.org/10.1021/ja0021316>.
- [30] L. Yang, Z. Cao, Y. Lin, W.C. Wood, C.A. Staley, Molecular beacon imaging of tumor marker gene expression in pancreatic cancer cells, *Cancer Biol Ther.* 4 (2005). <https://doi.org/10.4161/cbt.4.5.1670>.
- [31] H. Hanschmann, S. Rödiger, T. Kramer, K. Hanschmann, M. Steidle, V. Fingerle, C. Schmidt, W. Lehmann, P. Schierack, LoopTag FRET Probe System for

- Multiplex qPCR Detection of *Borrelia* Species, *Life* (Basel). 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/LIFE11111163>.
- [32] A. Afzal, Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges, *J Adv Res.* 26 (2020) 149–159. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2020.08.002>.
- [33] J.C. Croney, D.M. Jameson, R.P. Learmonth, Fluorescence spectroscopy in biochemistry: Teaching basic principles with visual demonstrations, *Biochemistry and Molecular Biology Education.* 29 (2001). [https://doi.org/10.1016/S1470-8175\(01\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S1470-8175(01)00019-4).
- [34] A.P. Demchenko, Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection, *Methods Appl Fluoresc.* 8 (2020). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/AB7365>.
- [35] M. Bayda, F. Dumoulin, G.L. Hug, J. Koput, R. Gorniak, A. Wojcik, Fluorescent H-aggregates of an asymmetrically substituted mono-amino Zn(II) phthalocyanine, *Dalton Transactions.* 46 (2017) 1914–1926. <https://doi.org/10.1039/c6dt02651f>.
- [36] K.A. Paterson, J. Arlt, A.C. Jones, Dynamic and static quenching of 2-aminopurine fluorescence by the natural DNA nucleotides in solution, *Methods Appl Fluoresc.* 8 (2020). <https://doi.org/10.1088/2050-6120/AB71C3>.
- [37] R.F. Khairutdinov, N. Serpone, Photophysics of Cyanine Dyes: Subnanosecond Relaxation Dynamics in Monomers, Dimers, and H- and J-Aggregates in Solution, *Journal of Physical Chemistry B.* 101 (1997) 2602–2610. <https://doi.org/10.1021/JP9621134>.
- [38] M.K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R.M. Cook, Intramolecular dimers: a new strategy to fluorescence quenching in dual-labeled oligonucleotide probes, *J Am Chem Soc.* 124 (2002) 6950–6956. <https://doi.org/10.1021/JA025678O>.
- [39] M. Imani, N. Mohajeri, M. Rastegar, N. Zarghami, Recent advances in FRET-Based biosensors for biomedical applications, *Anal Biochem.* 630 (2021) 114323. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2021.114323>.
- [40] X. Zhang, Y. Hu, X. Yang, Y. Tang, S. Han, A. Kang, H. Deng, Y. Chi, D. Zhu, Y. Lu, Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications, *Biosens Bioelectron.* 138 (2019). <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2019.05.019>.

- [41] A. Cravcenco, C. Ye, J. Gräfenstein, K. Börjesson, Interplay between Förster and Dexter Energy Transfer Rates in Isomeric Donor-Bridge-Acceptor Systems, *Journal of Physical Chemistry A*. 124 (2020) 7219–7227. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c05035>.
- [42] F. Edhborg, B. Küçüköz, V. Gray, B. Albinsson, Singlet Energy Transfer in Anthracene-Porphyrin Complexes: Mechanism, Geometry, and Implications for Intramolecular Photon Upconversion, *Journal of Physical Chemistry B*. (2019). <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b07991>.
- [43] S.A.E. Marras, Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes, *Methods Mol Biol*. 335 (2006) 3–16. <https://doi.org/10.1385/1-59745-069-3:3>.
- [44] G.R. Connolly, B.K.C. Patel, Development of fluorescent adjacent hybridization probes and their application in real-time PCR for the simultaneous detection and identification of *Fervidobacterium* and *Caloramator*, *Int J Syst Evol Microbiol*. 52 (2002) 1837–1843. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1837>.
- [45] V.M. Farzan, M. v. Kvach, I.O. Aparin, D.E. Kireev, T.A. Prikazchikova, A. v. Ustinov, V. v. Shmanai, G.A. Shipulin, V.A. Korshun, T.S. Zatsepin, Novel homo Yin-Yang probes improve sensitivity in RT-qPCR detection of low copy HIV RNA, *Talanta*. 194 (2019) 226–232. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.10.043>.
- [46] P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson, D.H. Gelfand, Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-* 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (ofigonucleotide probe/human immunodeficiency virus), 1991.
- [47] K.J. Livak, S.J.A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz, Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization, *PCR Methods Appl*. 4 (1995) 357–362. <https://doi.org/10.1101/GR.4.6.357>.
- [48] A. Afzal, Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges, *J Adv Res*. 26 (2020) 149–159. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2020.08.002>.
- [49] S.A.E. Marras, S. Tyagi, F.R. Kramer, Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes, *Clinica Chimica Acta*. 363 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.037>.

- [50] T.L. Waltz, S. Marras, G. Rochford, J. Nolan, E. Lee, M. Melegari, H. Pollack, Development of a molecular-beacon assay to detect the G1896A precore mutation in hepatitis B virus-infected individuals, *J Clin Microbiol.* 43 (2005) 254–258. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.254-258.2005>.
- [51] J.A.M. Vet, S.A.E. Marras, Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays, *Methods Mol Biol.* 288 (2005) 273–290. <https://doi.org/10.1385/1-59259-823-4:273>.
- [52] S. Haldar, S. Chakravorty, M. Bhalla, S. De Majumdar, J.S. Tyagi, Simplified detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum using smear microscopy and PCR with molecular beacons, *J Med Microbiol.* 56 (2007) 1356–1362. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.47265-0>.
- [53] S. Sherrill-Mix, Y. Hwang, A.M. Roche, A. Glascock, S.R. Weiss, Y. Li, L. Haddad, P. Deraska, C. Monahan, A. Kromer, J. Graham-Wooten, L.J. Taylor, B.S. Abella, A. Ganguly, R.G. Collman, G.D. Van Duyne, F.D. Bushman, Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons, *Genome Biol.* 22 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02387-y>.
- [54] D. Whitcombe, J. Theaker, S.P. Guy, T. Brown, S. Little, Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence, *Nature Biotechnology* 1999 17:8. 17 (1999) 804–807. <https://doi.org/10.1038/11751>.
- [55] N. Thelwell, S. Millington, A. Solinas, J. Booth, T. Brown, Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 3752. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.19.3752>.
- [56] M. Leijon, M. Mousavi-Jazi, M. Kubista, LightUp® probes in clinical diagnostics, *Mol Aspects Med.* 27 (2006) 160. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2005.12.005>.
- [57] P. Wolffs, R. Knutsson, R. Sjöback, P. Rådström, PNA-based light-up probes for real-time detection of sequence-specific PCR products, *Biotechniques.* 31 (2001) 766–771. <https://doi.org/10.2144/01314ST01>.
- [58] L.D. Lavis, R.T. Raines, Bright ideas for chemical biology, *ACS Chem Biol.* 3 (2008) 142–155. <https://doi.org/10.1021/cb700248m>.
- [59] T.A. Robertson, F. Bunel, M.S. Roberts, Fluorescein Derivatives in Intravital Fluorescence Imaging, *Cells.* 2 (2013) 591. <https://doi.org/10.3390/CELLS2030591>.
- [60] I.L. Arbeloa, Dimeric and trimeric states of the fluorescein dianion. Part 1.— Molecular structures, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2:*

- Molecular and Chemical Physics. 77 (1981) 1725–1733.
<https://doi.org/10.1039/F29817701725>.
- [61] X.F. Zhang, J. Zhang, L. Liu, Fluorescence properties of twenty fluorescein derivatives: lifetime, quantum yield, absorption and emission spectra, *J Fluoresc.* 24 (2014) 819–826. <https://doi.org/10.1007/S10895-014-1356-5>.
- [62] N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, J. Bishop-Stewart, M.K. Bhargava, P.J. Millard, F. Mao, W.Y. Leung, R.P. Haugland, Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates, *J Histochem Cytochem.* 47 (1999) 1179–1188.
<https://doi.org/10.1177/002215549904700910>.
- [63] E. Rusinova, V. Tretyachenko-Ladokhina, O.E. Vele, D.F. Senear, J.B. Alexander Ross, Alexa and Oregon Green dyes as fluorescence anisotropy probes for measuring protein-protein and protein-nucleic acid interactions, *Anal Biochem.* 308 (2002) 18–25. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00325-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00325-1).
- [64] L.A. Ernst, R.K. Gupta, R.B. Mujumdar, A.S. Waggoner, Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups, *Cytometry.* 10 (1989) 3–10.
<https://doi.org/10.1002/CYTO.990100103>.
- [65] O. Kroutil, I. Romancová, M. Šíp, Z. Chval, Cy3 and Cy5 dyes terminally attached to 5' End of DNA: Structure, dynamics, and energetics, *Journal of Physical Chemistry B.* 118 (2014) 13564–13572. <https://doi.org/10.1021/jp509459y>.
- [66] B.A. Armitage, Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation, *Top Curr Chem.* 253 (2005) 55–76. <https://doi.org/10.1007/b100442>.
- [67] M.K. Johansson, H. Fidder, D. Dick, R.M. Cook, Intramolecular dimers: a new strategy to fluorescence quenching in dual-labeled oligonucleotide probes, *J Am Chem Soc.* 124 (2002) 6950–6956. <https://doi.org/10.1021/JA025678O>.
- [68] A.I. Dragan, R. Pavlovic, J.B. McGivney, J.R. Casas-Finet, E.S. Bishop, R.J. Strouse, M.A. Schenerman, C.D. Geddes, SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA, *J Fluoresc.* 22 (2012) 1189–1199.
<https://doi.org/10.1007/S10895-012-1059-8>.
- [69] M. Minoshima, T. Matsumoto, K. Kikuchi, Development of a fluorogenic probe based on a DNA staining dye for continuous monitoring of the histone deacetylase reaction, *Anal Chem.* 86 (2014) 7925–7930. <https://doi.org/10.1021/ac501881s>.
- [70] P. Rybczynski, A. Smolarkiewicz-Wyczachowski, J. Piskorz, S. Bocian, M. Ziegler-Borowska, D. Kędziera, A. Kaczmarek-Kędziera, *Photochemical*

- Properties and Stability of BODIPY Dyes, *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 6735. 22 (2021) 6735. <https://doi.org/10.3390/IJMS22136735>.
- [71] B. Qiu, M. Simon, BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry, *Bio Protoc.* 6 (2016). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.1912>.
- [72] R. Galindo-Murillo, T.E. Cheatham, Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA-ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) 3735–3747. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB143>.
- [73] M.T. Anderson, N. Baumgarth, R.P. Haugland, R.M. Gerstein, T. Tjioe, L.A. Herzenberg, Pairs of Violet-Light-Excited Fluorochromes for Flow Cytometric Analysis, *Cytometry.* 33 (1998) 435–444. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19981201\)33:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19981201)33:4).
- [74] J. Min, J.W. Lee, Y.H. Ahn, Y.T. Chang, Combinatorial dapoxyl dye library and its application to site selective probe for human serum albumin, *J Comb Chem.* 9 (2007) 1079–1083. <https://doi.org/10.1021/CC0700546>.
- [75] M.R. Beccia, T. Biver, A. Pardini, J. Spinelli, F. Secco, M. Venturini, N. Busto Vázquez, M.P. Lopez Cornejo, V.I. Martin Herrera, R. Prado Gotor, The fluorophore 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) induces DNA folding in long double-stranded DNA, *Chem Asian J.* 7 (2012) 1803–1810. <https://doi.org/10.1002/ASIA.201200177>.
- [76] M.K. Johansson, Choosing reporter-quencher pairs for efficient quenching through formation of intramolecular dimers, *Methods Mol Biol.* 335 (2006) 17–29. <https://doi.org/10.1385/1-59745-069-3:17>.
- [77] T. Oh, S. Kim, J.Y. Choi, H. Chang, M.J. Heller, Enhancement of fluorescent resonant energy transfer and the antenna effect in DNA structures with multiple fluorescent dyes, *RSC Adv.* 7 (2017). <https://doi.org/10.1039/c7ra01470h>.
- [78] P. Crisalli, E.T. Kool, Multi-path quenchers: Efficient quenching of common fluorophores, *Bioconjug Chem.* 22 (2011). <https://doi.org/10.1021/bc200424r>.
- [79] L. Le Reste, J. Hohlbein, K. Gryte, A.N. Kapanidis, Characterization of dark quencher chromophores as nonfluorescent acceptors for single-molecule FRET, *Biophys J.* 102 (2012) 2658–2668. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2012.04.028>.

- [80] A. Chevalier, P.Y. Renard, A. Romieu, Straightforward synthesis of bioconjugatable azo dyes. Part 2: Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) and BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650) scaffolds, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 6764–6768. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2014.10.054>.
- [81] A. Chevalier, C. Massif, P.Y. Renard, A. Romieu, Bioconjugatable azo-based dark-quencher dyes: Synthesis and application to protease-activatable far-red fluorescent probes, *Chemistry - A European Journal.* 19 (2013). <https://doi.org/10.1002/chem.201203427>.
- [82] A.T. Yeung, B.P. Holloway, P.S. Adams, G.L. Shipley, Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR, *Biotechniques.* 36 (2004). <https://doi.org/10.2144/04362rr01>.
- [83] M. Kabeláč, F. Zimandl, T. Fessler, Z. Chval, F. Lankaš, A comparative study of the binding of QSY 21 and Rhodamine 6G fluorescence probes to DNA: structure and dynamics, *Physical Chemistry Chemical Physics.* 12 (2010) 9677–9684. <https://doi.org/10.1039/C004020G>.
- [84] S. Zhang, G. Liu, X. Liu, D. Yin, S. Dou, J. He, M. Rusckowski, D.J. Hnatowich, Comparison of several linear fluorophore- and quencher-conjugated oligomer duplexes for stability, fluorescence quenching, and kinetics in vitro and in vivo in mice, *Bioconjug Chem.* 18 (2007). <https://doi.org/10.1021/bc070021j>.
- [85] V. Novakova, M.P. Donzello, C. Ercolani, P. Zimcik, P.A. Stuzhin, Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part II: Electronic structure, electrochemical, spectral, photophysical and other application related properties, *Coord Chem Rev.* 361 (2018) 1–73. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2018.01.015>.
- [86] M. Miletin, P. Zimcik, V. Novakova, Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines, *Photochem Photobiol Sci.* 17 (2018) 1749–1766. <https://doi.org/10.1039/C8PP00106E>.
- [87] E.A. Lukyanets, V.N. Nemykin, The key role of peripheral substituents in the chemistry of phthalocyanines and their analogs, *J Porphyr Phthalocyanines.* 14 (2010) 1–40. <https://doi.org/10.1142/S1088424610001799>.
- [88] Z. Musil, P. Zimcik, M. Miletin, K. Kopecky, J. Lenco, Synthesis, Separation and UV/Vis Spectroscopy of Pyrazino-quinoxalino-porphyrazine Macrocycles, *European J Org Chem.* 2007 (2007) 4535–4542. <https://doi.org/10.1002/EJOC.200700275>.

- [89] V. Novakova, P. Reimerova, J. Svec, D. Suchan, M. Miletin, H.M. Rhoda, V.N. Nemykin, P. Zimcik, Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core, *Dalton Transactions*. 44 (2015) 13220–13233. <https://doi.org/10.1039/C5DT01863C>.
- [90] J. Demuth, R. Kucera, K. Kopecky, Z. Havlínová, A. Libra, V. Novakova, M. Miletin, P. Zimcik, Efficient Synthesis of a Wide-Range Absorbing Azaphthalocyanine Dark Quencher and Its Application to Dual-Labeled Oligonucleotide Probes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reactions, *Chemistry - A European Journal*. 24 (2018) 9658–9666. <https://doi.org/10.1002/chem.201801319>.
- [91] K. Onizuka, Y. Yamano, A.M. Abdelhady, F. Nagatsugi, Hybridization-specific chemical reactions to create interstrand crosslinking and threaded structures of nucleic acids, *Org Biomol Chem*. 20 (2022) 4699–4708. <https://doi.org/10.1039/D2OB00551D>.
- [92] A. Foller, M. Wilhelmsson, Glen Report The DBCO Serinol 2'-OMe PACE Literature Highlight Methylene Blue II RNA Phosphorylation Introducing ribo-tC O, (2018).
- [93] P. Van Delft, N.J. Meeuwenoord, S. Hoogendoorn, J. Dinkelaar, H.S. Overkleeft, G.A. Van Der Marel, D. V. Filippov, Synthesis of oligoribonucleic acid conjugates using a cyclooctyne phosphoramidite, *Org Lett*. 12 (2010). <https://doi.org/10.1021/ol102357u>.
- [94] A. Goyon, P. Yehl, K. Zhang, Characterization of therapeutic oligonucleotides by liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal*. 182 (2020) 113105. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2020.113105>.
- [95] A.H. Krotz, P.G. Klopchin, K.L. Walker, G.S. Srivatsa, D.L. Cole, V.T. Ravikumar, On the formation of longmers in phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett*. 38 (1997). [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)00798-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)00798-3).
- [96] B. Koshel, R. Birdsall, W. Chen, Two-dimensional liquid chromatography coupled to mass spectrometry for impurity analysis of dye-conjugated oligonucleotides, *Journal of Chromatography B*. 1137 (2020) 121906. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121906>.

- [97] N.M. Djordjevic, F. Houdiere, P. Fowler, F. Natt, HPLC Separation of Oligonucleotides in Isocratic and Temperature-Programming Mode, *Anal Chem.* 70 (1998) 1921–1925. <https://doi.org/10.1021/AC9711697>.
- [98] M. Gilar, K.J. Fountain, Y. Budman, U.D. Neue, K.R. Yardley, P.D. Rainville, R.J. Russell, J.C. Gebler, Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: Retention prediction, *J Chromatogr A.* 958 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00306-0).
- [99] L.C. Chen, High-temperature liquid chromatography and the hyphenation with mass spectrometry using high-pressure electrospray ionization, *Mass Spectrometry.* 8 (2019). <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.S0079>.
- [100] Y. Maekawa, K. Yamazaki, M. Ihara, K. Nagase, H. Kanazawa, Simultaneous analysis of multiple oligonucleotides by temperature-responsive chromatography using a poly(N-isopropylacrylamide)-based stationary phase, *Anal Bioanal Chem.* 412 (2020) 5341–5351. <https://doi.org/10.1007/S00216-020-02749-8>.
- [101] S. Studzińska, R. Rola, B. Buszewski, The impact of ion-pairing reagents on the selectivity and sensitivity in the analysis of modified oligonucleotides in serum samples by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal.* 138 (2017) 146–152. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.02.014>.
- [102] K.J. Fountain, M. Gilar, Y. Budman, J.C. Gebler, Purification of dye-labeled oligonucleotides by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B.* 783 (2003) 61–72. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00490-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00490-7).
- [103] J.M. Sutton, G.J. Guimaraes, V. Annavarapu, W.D. Van Dongen, M.G. Bartlett, Current State of Oligonucleotide Characterization Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: Insight into Critical Issues, *J Am Soc Mass Spectrom.* 31 (2020) 1775–1782. <https://doi.org/10.1021/jasms.0c00179>.
- [104] S.G. Roussis, M. Pearce, C. Rentel, Small alkyl amines as ion-pair reagents for the separation of positional isomers of impurities in phosphate diester oligonucleotides, *J Chromatogr A.* 1594 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.02.026>.
- [105] S. Studzińska, L. Pietrzak, B. Buszewski, The Effects of Stationary Phases on Retention and Selectivity of Oligonucleotides in IP-RP-HPLC, *Chromatographia.* 77 (2014) 1589–1596. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2766-x>.

- [106] D.S. Levin, B.T. Shepperd, C.J. Gruenloh, Combining ion pairing agents for enhanced analysis of oligonucleotide therapeutics by reversed phase-ion pairing ultra performance liquid chromatography (UPLC), *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879 (2011) 1587–1595. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2011.03.051>.
- [107] A. Apffel, J.A. Chakel, S. Fischer, K. Lichtenwalter, W.S. Hancock, New procedure for the use of high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleotides and oligonucleotides, *J Chromatogr A.* 777 (1997) 3–21. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00256-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00256-2).
- [108] B. Basiri, H. van Hattum, W.D. van Dongen, M.M. Murph, M.G. Bartlett, The Role of Fluorinated Alcohols as Mobile Phase Modifiers for LC-MS Analysis of Oligonucleotides, *J Am Soc Mass Spectrom.* 28 (2017) 190–199. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1500-3>.