



SÍNTESE DE OLIGOS DE DNA

INFORMAÇÕES AO USUÁRIO



LABORATÓRIO DE SÍNTESE DE BIOMOLÉCULAS - LSB / LNBio / CNPEM

Sumário

1.	Síntese de Oligonucleotídeos - Método da Fosforamidita	3
1.1.	Efeito da Eficiência de Acoplamento no Rendimento Global	4
1.2.	Escala de Síntese e Rendimento Mínimo Garantido	5
1.3.	Bases Especias, Modificações Químicas e Marcações	6
1.3.1.	deoxyUridina (dU)	7
1.3.2.	deoxyInosina (dI)	9
1.3.3.	Amino	10
1.3.4.	Biotina	11
1.3.5.	Fosforilação	13
1.3.6.	Fosforotioato	14
1.3.7.	Fluoróforos	16
	• FAM	17
1.3.8.	Quenchers	18
	• BHQ-1	19
	• BHQ-2	19
1.4.	Purificação de Oligonucleotídeos	20
1.4.1	Cartridge	21
1.4.2	RP-HPLC	21

1. Síntese de Oligonucleotídeos - Método da Fosforamidita

O LSB sintetiza oligonucleotídeos de DNA pelo método de Síntese Química em Fase Sólida por Adição de Fosforamiditas que ocorre na direção 3' para 5' (oposta à direção 5' para 3' da biossíntese na replicação do DNA). Por meio dessa técnica, cada ciclo de síntese ocorre a adição de uma base de DNA. O processo de síntese química de oligos envolve uma sequência de passos, conforme detalhado na Figura 1.

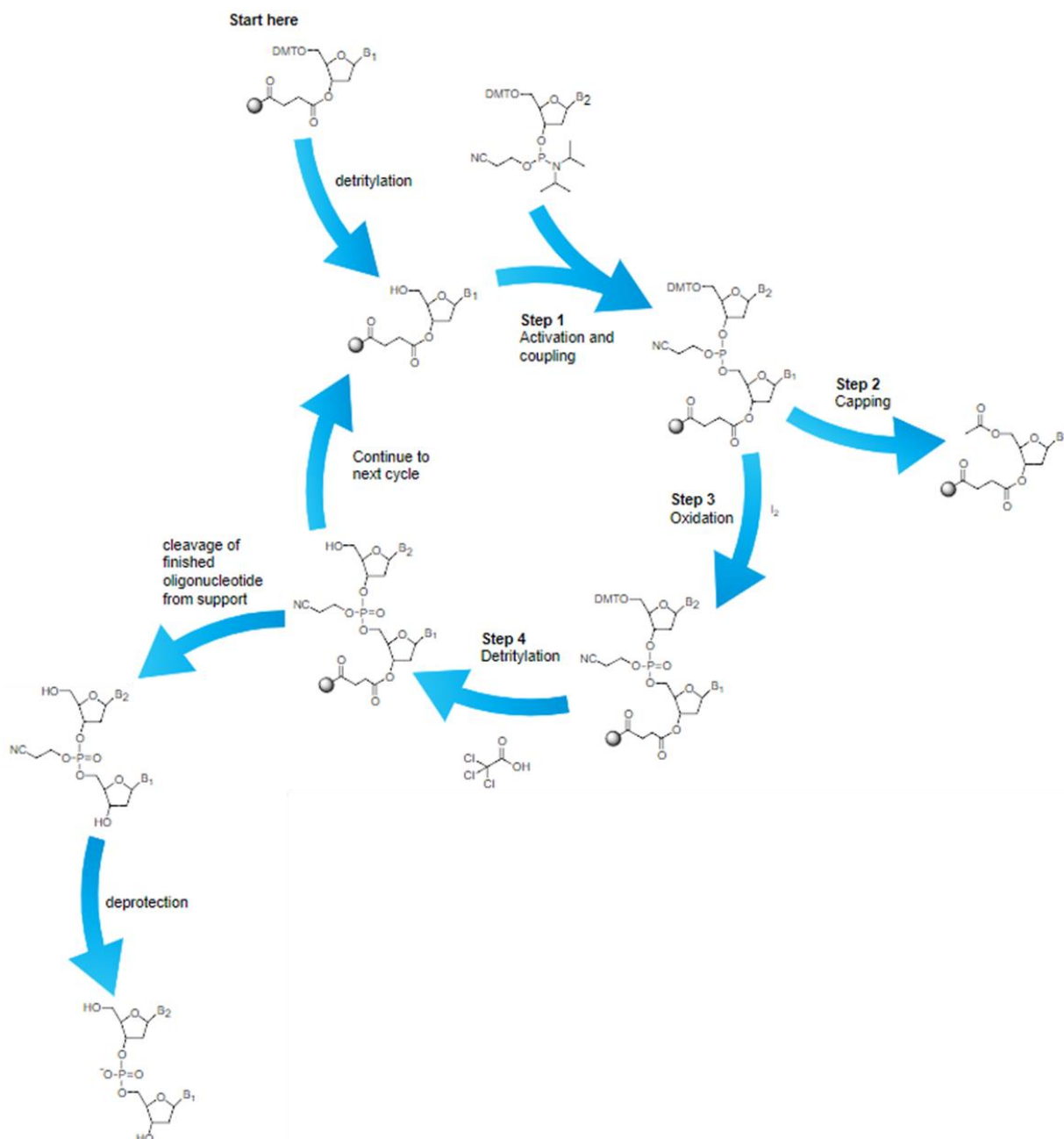


Figura 1. Ciclo Sintético de DNA pelo Método de Adição de Fosforamidita.

Referência: [ATDBio](#)

Leia mais:

Herdewijn, 2008. Oligonucleotide synthesis: methods and applications. Springer Science & Business Media. DOI:<https://doi.org/10.1385/1592598234>

Kozlov *et al.*, 2005. Significant improvement of quality for long oligonucleotides by using controlled pore glass with large pores. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. DOI:<http://dx.doi.org/10.1081/ncn-200059761>

Laikhter & Linse, 2017. BioSynthesis: [The Chemical Synthesis of Oligonucleotides](#).

Obexer *et al.*, 2024. Modern approaches to therapeutic oligonucleotide manufacturing. Science. DOI:<http://dx.doi.org/10.1126/science.adl4015>

Roy *et al.*, 2016. Recent trends in nucleotide synthesis. Chemical Reviews. DOI:<http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00174>

Schiffelers *et al.*, 2019. Oligonucleotides. In: Pharmaceutical Biotechnology. DOI:https://doi.org/10.1007/978-3-030-00710-2_15

Vaijayanthi *et al.*, 2003. Recent advances in oligonucleotide synthesis and their applications. Indian J. Biochem Biophys. PMID:[22900365](#)

Virta, 2021. More versatile synthesis of oligonucleotides. Science. DOI:<http://dx.doi.org/10.1126/science.abk3478>

1.1. Efeito da Eficiência de Acoplamento no Rendimento Global

O efeito do rendimento médio escalonado por etapas - eficiência de acoplamento - e o seu efeito no rendimento global da síntese de oligonucleotídeos é ilustrado abaixo na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem teórica de oligos completos formados em uma síntese de oligonucleotídeos, de acordo com o número de bases (nt) e a eficiência de acoplamento.

Bases (nt)	Eficiência de Acoplamento					
	90,0 %	95,0 %	97,0 %	98,5 %	99,0 %	99,5 %
10	34,9 %	59,9 %	73,7 %	86,0 %	90,4 %	95,1 %
20	12,2 %	35,8 %	54,4 %	73,9 %	81,8 %	90,5 %
50	0,5 %	7,7 %	21,8 %	47,0 %	60,5 %	77,8 %
100	< 0,01 %	0,6 %	4,8 %	22,1 %	36,6 %	60,6 %
150	< 0,01 %	< 0,1 %	1,0 %	10,4 %	22,1 %	47,1 %
200	< 0,01 %	< 0,01 %	0,2 %	4,9 %	13,4 %	36,7 %

O efeito cumulativo de uma série de acoplamentos com baixa eficiência resulta em baixo rendimento global do oligonucleotídeo desejado e elevado volume de sequências incompletas e, por consequência, em um oligo com muitas sequências inespecíficas e de difícil purificação.

É evidente, a partir da tabela acima, que são necessários rendimentos escalonados muito elevados para sintetizar oligonucleotídeos com mais de 100 bases de comprimento. Na prática, atingir uma eficiência de acoplamento de 98,5% é uma meta perfeitamente realizável na síntese de oligonucleotídeos de DNA. No entanto, é possível atingir eficiências de acoplamento em torno de 99% ou superiores, desde que se utilizem reagentes de elevada pureza. Ademais, é fundamental empregar solventes anidros rigorosamente dessecados, visto que a reação de acoplamento da fosforamidita é extremamente sensível à umidade.

1.2. Escala de Síntese e Rendimento Mínimo Garantido

A escala de síntese refere-se à quantidade molar da resina com a qual iniciamos a síntese, e não é igual ao rendimento final da síntese. O comprimento do oligonucleotídeo, modificações na sequência e a eficiência de acoplamento podem variar o rendimento global do oligo após a síntese. Além disso, ocorrem perdas adicionais durante o processamento, transferência de material na purificação e no controle de qualidade.

Nossa produção garante o rendimento total de oligonucleotídeos com um número mínimo de unidades OD (*Optical Density*) em 260 nm (OD_{260}). A Tabela 2 mostra os rendimentos mínimos de OD_{260} . Observe que a garantia é válida para oligos de DNA padrão de até 80 bases.

Tabela 2. Rendimento garantido de oligonucleotídeos de DNA, de acordo com o tipo de purificação e tamanho do oligo.

Escala (nmol)	Número de Bases 20 - 80 nt	
	Cartridge [OD_{260}]	RP-HPLC [OD_{260}]
25	3	1
50	6	2
100	10	3

1.3. Bases Especias, Modificações Químicas e Marcações

Bases especias, modificações químicas e marcações em oligonucleotídeos são ferramentas versáteis que permitem a manipulação química desses oligos, aumentando sua funcionalidade e eficiência mediante os processos biológicos e tecnológicos. Essas customizações podem ser utilizadas, por exemplo, para:

1. **Conjugação com Outros Compostos:** Moléculas como grupos amino, tiol ou ferroceno podem servir como pontos de ancoragem para a ligação de outras moléculas, como fluoróforos, enzimas, anticorpos ou outras biomoléculas. Isso é útil para criar sondas fluorescentes, quimicamente ativas ou que podem ser usadas em ensaios de detecção.
2. **Resistência à Degradação:** Modificações químicas podem aumentar a estabilidade dos oligos de DNA contra degradação por nucleases, tornando-os mais adequados para aplicações em ambientes biológicos.
3. **Aumento da Especificidade:** A introdução de modificações pode influenciar a afinidade de hibridização dos oligos de DNA às suas sequências complementares, permitindo ajustes na especificidade e na eficiência de hibridização em técnicas como PCR, *microarrays* e sequenciamento.
4. **Aumento da Estabilidade Térmica:** Algumas modificações e nucleotídeos especiais fazem com que os oligos formem ligações mais fortes e estáveis com seus pares complementares, aumentando a temperatura de *melting* (T_m) do duplex de DNA. Isso resulta em uma maior estabilidade térmica das hélices formadas, o que é particularmente útil em ambientes biológicos e para ensaios que exigem alta especificidade de hibridização.
5. **Ligação a Superfícies Sólidas:** A inserção de algumas modificações nas extremidades dos oligos pode ser utilizada para ancorar oligos de DNA a superfícies sólidas, como esferas magnéticas, *chips* de *microarray* ou placas de ensaio. Isso é essencial para muitos tipos de ensaios baseados em captura e detecção de ácidos nucleicos.
6. **Entrega e Internalização Celular:** Em alguns casos, as modificações podem ajudar na entrega de oligos de DNA dentro de células, seja para fins de terapia gênica, edição de genes (como CRISPR) ou para estudos de expressão gênica.

7. **Rastreamento e Monitoramento:** As modificações com fluoróforos podem ser utilizadas para criar sondas de detecção específicas, como as sondas de hidrólise (Sondas *Taqman*) ou os *Beacons* moleculares. Essas sondas mudam sua conformação ou fluorescência em resposta à ligação ao alvo, permitindo a detecção precisa de sequências de DNA específicas, e assim viabilizam, por exemplo, o rastreamento visual e a quantificação de oligonucleotídeos, como em estudos de localização celular, tráfego intracelular e ensaios de interação molecular (FRET) entre outros.
8. **Supressão Estratégica de Fluorescência:** Os *quencher*s são modificações frequentemente utilizadas junto aos fluoróforos. Eles suprimem a fluorescência dessas moléculas quando estão próximos, e quando se afastam, o fluoróforo emite seu sinal. Assim, os *quencher*s tornam a emissão de fluorescência específica de acordo com os eventos químicos e biológicos que ocorrem diante da interação com os oligos.

Essas customizações podem ser inseridas internamente ao longo da sequência dos oligos, assim como nas extremidades 5' e/ou 3'. O LSB possui algumas bases especiais, modificações químicas e marcações em seu catálogo.

Se precisar de uma customização que não esteja disponível em nosso catálogo, entre em contato conosco por e-mail para que possamos avaliar a possibilidade de incluí-la!

E-mail: lsb@lnbio.cnpem.br

Leia mais:

Ochoa & Milam, 2020. Modified nucleic acids: Expanding the capabilities of functional oligonucleotides. *Molecules*. DOI:<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25204659>

Glazier *et al.*, 2020. Chemical synthesis and biological application of modified oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry*. DOI:[10.1021/acs.bioconjchem.0c00060](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00060)

1.3.1. deoxyUridina (dU)

Posição: Modificação 5', 3' ou interna

A uridina, que é a forma nucleosídica da uracila, é conhecida por fazer parte do RNA, onde substitui a timidina e se emparelha às adenosinas. Mas você sabia que o DNA também pode naturalmente conter uridinas?

Isso acontece por exemplo por ação da enzima AID (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*), que desamina a citosina no DNA, convertendo-a em uracila. Geralmente, a base errada (uracila em vez de citosina) é reconhecida e removida pelas enzimas de reparo de DNA, como uracil-DNA glicosilase (UDG). A remoção da uracila cria um local abásico que pode ser processado de várias maneiras, levando a mutações ou quebras de fita dupla. Esses processos são importantes no sistema imunológico, levando ao aumento da diversidade de anticorpos e ocasionando trocas de classes de imunoglobulinas. A desaminação da citidina também está implicada na imunidade inata aos retrovírus. Nesse caso, a desaminação do dC é mediada pela enzima APOBEC3G, presente nas células T, atuando na primeira cadeia de cDNA dos retrovírus. A geração de dU produz uma incompatibilidade dU / dG no duplex de cDNA retroviral, e a presença de dU no cDNA pode levar à imunidade inata por diversos mecanismos.

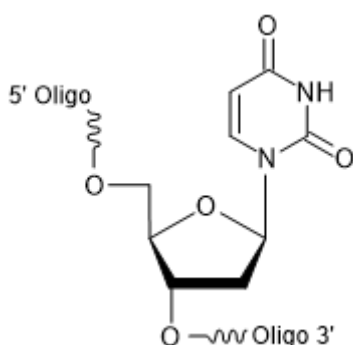


Figura 2. Modificação deoxyUridina (dU).

As deoxyUridinas (dU) em oligos de DNA são utilizadas por suas propriedades únicas que facilitam diversas aplicações em biologia molecular e biotecnologia. Elas servem como marcadores para clivagem específica pela UDG, podem aumentar a especificidade de hibridização, ajustar a estabilidade térmica do duplex de DNA, permitir a criação de quebras controladas nas fitas de DNA. Elas também podem ser aplicadas em estudos mecanísticos de imunidade adaptativa e inata, mutagênese, reparo de DNA, e ajudam a entender como células processam bases não usuais.

Leia mais:

Durandy *et al.*, 2013. Potential roles of activation-induced cytidine deaminase in promotion or prevention of autoimmunity in humans. *Autoimmunity*. DOI:[10.3109/08916934.2012.750299](https://doi.org/10.3109/08916934.2012.750299)

Harris *et al.*, 2003. DNA deamination: not just a trigger for antibody diversification but also a mechanism for defense against retroviruses. *Nature Immunology*. DOI:[10.1038/ni0703-641](https://doi.org/10.1038/ni0703-641)

Lecossier *et al.*, 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the Absence of the Vif Protein. *Science*. DOI:[10.1126/science.1083338](https://doi.org/10.1126/science.1083338)

Muramatsu *et al.*, 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. DOI:[10.1016/S0092-8674\(00\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00078-7)

1.3.2. deoxyinosina (dI)

Posição: Modificação 5', 3' ou interna

O desenho de oligos é frequentemente complicado pela degenerescência do código genético. No LSB, temos disponíveis estratégias para enfrentar este problema. Como primeira opção, utiliza-se uma adição de base mista (N) para formar o sítio degenerado. Esta abordagem é melhor se o número de sítios degenerados for pequeno.

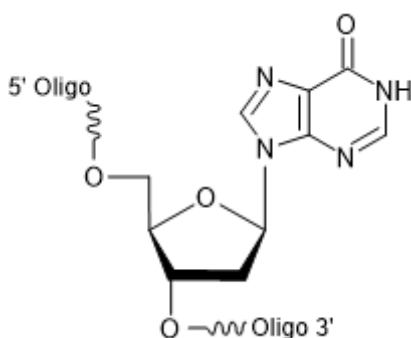


Figura 3. Modificação deoxyinosina (dI).

Uma segunda opção é o uso de 2'-desoxilinosina ou 2'-desoxinebularina. Ela é classificada como um análogo de base de nucleotídeo, é estruturalmente semelhante à guanossina, mas não possui o grupo 2-amino, e pode se ligar com qualquer uma das outras bases de ácidos nucleicos. Logo, a incorporação de deoxyinosina em oligos permite a criação de sondas ou *primers* que podem se ligar a diferentes sequências alvo em um único experimento, aumentando a eficiência e a versatilidade em aplicações de detecção multiplexada.

A deoxyinosina pode ser usada em estudos de engenharia de DNA, onde a flexibilidade no emparelhamento de bases é desejada, como na criação de bibliotecas de variantes de sequências gênicas ou na introdução controlada de mutações em DNA.

No entanto, a estabilidade de ligação da inosina com cada uma das bases não é a mesma, sendo a ordem de estabilidade termodinâmica a seguinte **I-C >= I-A > I-G ~ I-T/U**. Essa estabilidade também é afetada pelas bases vizinhas, e se torna mais pronunciada quando as inosinas estão na região 3' do oligo. Portanto, ao usar dI como uma alternativa a bases mistas, tenha em mente que o viés de emparelhamento de bases pode levar a diferenças na eficiência de ligação do oligo nas regiões degeneradas ou em experimentos multiplexados.

Leia mais:

Alseth *et al.*, 2014. Inosine in DNA and RNA. Current Opinion in Genetics & Development. DOI:[10.1016/j.gde.2014.07.008](https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.07.008)

Ben-Dov *et al.*, 2006. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. Applied and Environmental Microbiology. DOI:[10.1128/AEM.00849-06](https://doi.org/10.1128/AEM.00849-06)

Jeyaraj & Voruganti, 2024. Multifaceted role of inosine in complex diseases and human health. *Nutrition Reviews*. DOI:[10.1093/nutrit/nuae029](https://doi.org/10.1093/nutrit/nuae029)

Liu & Nichols, 1994. PCR amplification using deoxyinosine to replace entire codon and at ambiguous positions. *Biotechniques*. PMID:[8136131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8136131/)

Martin *et al.*, 1985. Base pairing involving deoxyinosine: implications for probe design. *Nucleic Acids Res.* DOI:[10.1093/nar/13.24.8927](https://doi.org/10.1093/nar/13.24.8927)

Srinivasan *et al.*, 2021. Inosine in biology and disease. *Genes*. DOI:[10.3390/genes12040600](https://doi.org/10.3390/genes12040600)

1.3.3. Amino

Posição: Modificação 5' ou 3'

Um grupo amino primário incorporado a um oligo serve como ponto de ancoragem para a ligação de outras moléculas, desde que tenham afinidade química com essa amina. Assim, o grupo amino permite ao usuário marcar o oligo aminado com uma variedade de ligantes diferentes, como biotina, digoxigenina, corantes, fluoróforos, *quencher*s e enzimas. Muitas moléculas são disponibilizadas no mercado com um grupo ligante NHS Éster, o que permite a conjugação com moléculas que contêm grupos amino (Figura 4).

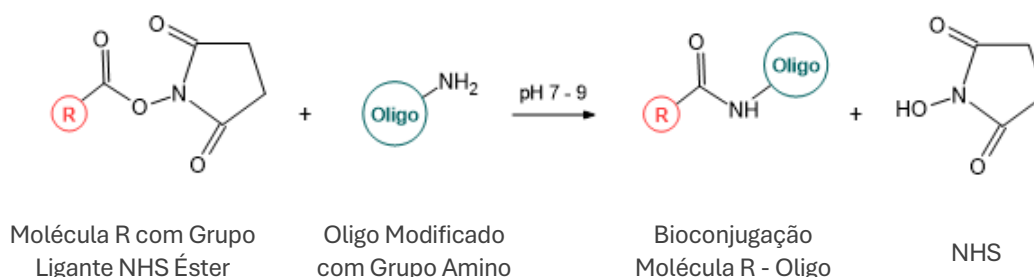


Figura 4. Bioconjugação de oligo aminado a uma molécula R com um grupo ligante NHS Éster.

O grupo amino também pode ser utilizados para ancorar oligos a superfícies sólidas, como esferas magnéticas, *chips* de *microarray* ou placas de ensaio (Figura 5). Isso é essencial para muitos tipos de ensaios baseados em captura e detecção de ácidos nucleicos. Dessa forma, os oligos aminados se tornam extremamente versáteis para uma variedade de aplicações. O grupo amino pode ser inseridos em qualquer posição no oligo e, atualmente, estão disponíveis no LSB apenas na posição 3'.

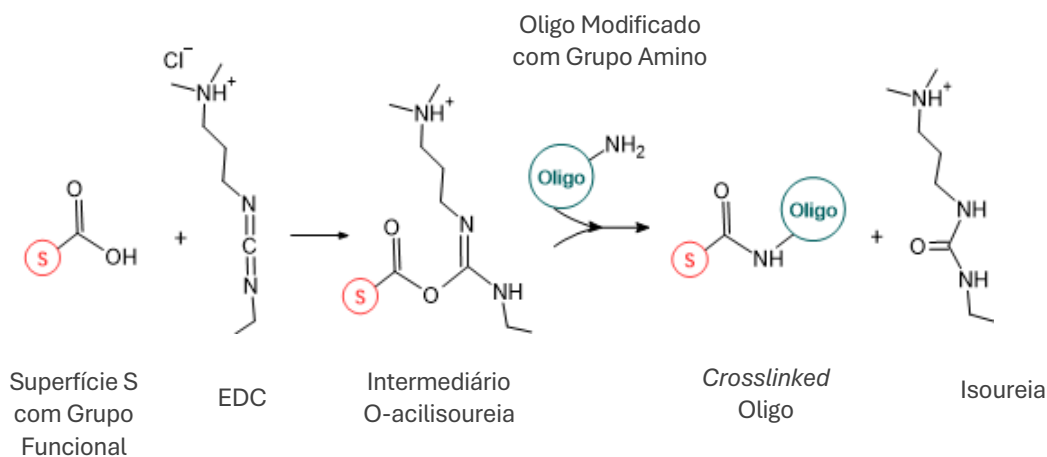


Figura 5. Ancoragem de um oligo aminado a um suporte sólido (S) através de grupos funcionais carboxila, por meio de uma reação mediada por EDC*.

*1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) é um reagente que contém a funcionalidade carbodiimida, utilizado como agente de desidratação. Especificamente, é frequentemente empregado para conversão de ácidos carboxílicos em amidas ou ésteres.

Leia mais:

Kozlov *et al.*, 2004. Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to antibodies enabling highly sensitive protein detection. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. DOI:[10.1002/bip.20009](https://doi.org/10.1002/bip.20009)

Singh *et al.*, 2010. Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chemical Society Reviews*. DOI:[10.1039/B911431A](https://doi.org/10.1039/B911431A)

Smith *et al.*, 1985. The synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus: synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis. *Nucleic Acids Research*. DOI:[10.1093/nar/13.7.2399](https://doi.org/10.1093/nar/13.7.2399)

Venkatesan *et al.*, 2006. Peptide conjugates of oligonucleotides: synthesis and applications. *Chemical Reviews*. DOI:[10.1021/cr0502448](https://doi.org/10.1021/cr0502448)

1.3.4. Biotina

Posição: Modificação 5' ou 3'

A biotina, também conhecida como vitamina B7 ou vitamina H, é uma vitamina solúvel em água que desempenha papéis cruciais em diversas funções biológicas e processos celulares. Desde a descoberta de sua afinidade pela avidina nos anos 70, a biotina transformou-se em uma ferramenta essencial nas ciências moleculares. Poucos pares de moléculas exibem a elevadíssima afinidade que é observada entre a biotina e a estreptavidina: essa ligação é essencialmente irreversível; é resistente a agentes caotrópicos, a extremos de pH e a força iônica. Assim, as condições de eluição podem ser bastante rigorosas, e essas

características fazem da biotina um ligante versátil, com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. Por exemplo, a biotina pode ser utilizada para conjugar oligos a uma enorme variedade de outras biomoléculas, polímeros e superfícies, e assim oligos biotinilados podem ser aplicados como sondas ou iniciadores em uma variedade de aplicações *in vitro* e *in vivo*, em ensaios de mudança de mobilidade, para captura, imobilização, enriquecimento e/ou purificação de moléculas, e para marcação, detecção ou amplificação de alvos.

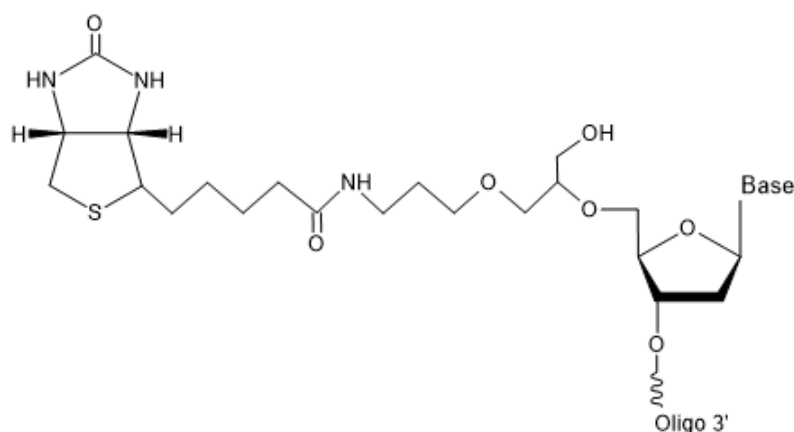


Figura 6. Modificação biotina na extremidade 5'.

Oligos biotinilados podem ser conjugados a anticorpos e assim utilizados em ensaios de iPCR (*Imuno-Polymerase Chain Reaction*), PLA (*Proximity Ligation Assay*), PEA (*Proximity Extension Assay*), ECPA (*Electrochemical Proximity Assay*), DNA-PAINT (*DNA Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography*), em matrizes de anticorpos (Figura 7a), em biossensores, como sistemas de transporte e/ou entrega em aplicações terapêuticas (Figura 7b), e em terapias e ensaios baseadas em *pretargeting* (Figura 7c).

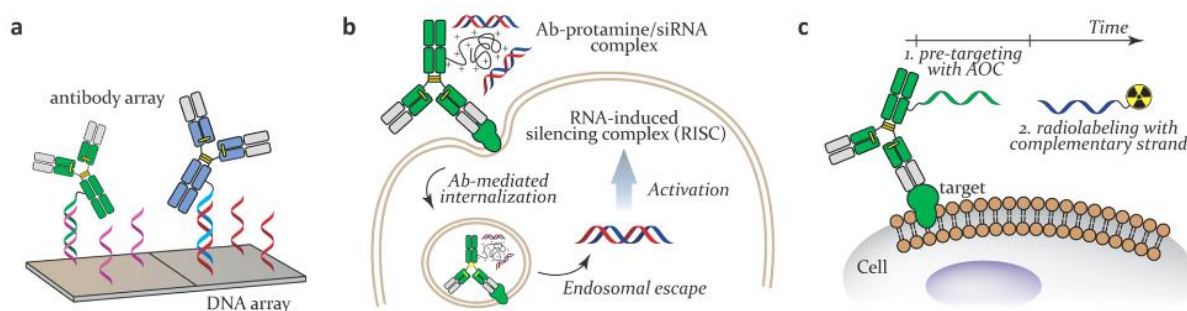


Figura 7. Representação esquemática do uso de AOC em (a) matrizes de anticorpos; (b) terapêutico; e (c) aplicações terapêuticas baseadas em Pretargeting. Fonte: [Dogvan et al., 2019](#).

Leia mais:

Schnitzbauer *et al.*, 2017. Super-Resolution Microscopy with DNA-PAINT. Nature Protocols. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2017.024>

Dovgan *et al.*, 2019. Antibody-Oligonucleotide Conjugates as Therapeutic, Imaging, and Detection Agents. Bioconjugate Chemistry.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00306>

Green, 1975. Avidin. Advances in Protein Chemistry.

DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3233\(08\)60411-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60411-8)

Chollet & Kawashima, 1985. Biotin-Labeled Synthetic Oligodeoxyribonucleotides: Chemical Synthesis and Uses as Hybridization Probes. Nucleic Acids Research.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/13.5.1529>

1.3.5. Fosforilação

Posição: Modificação 5' ou 3'

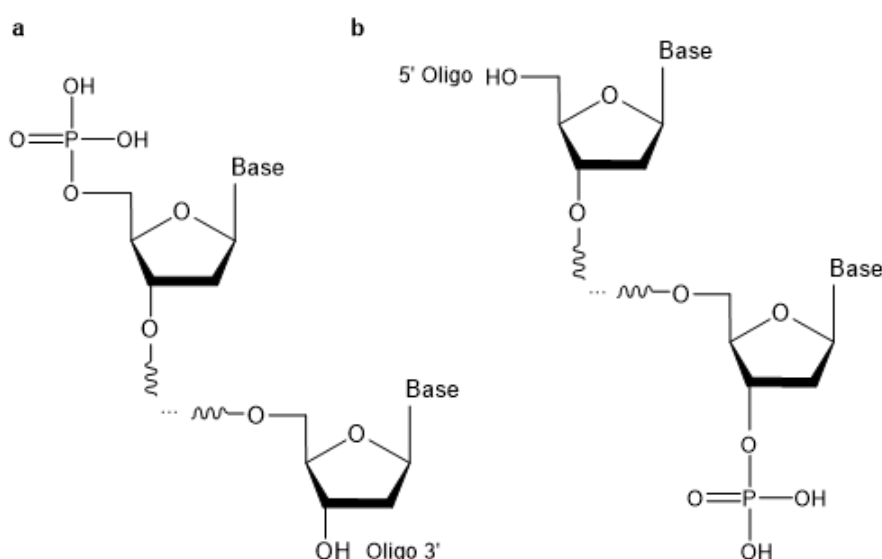


Figura 8. Na figura (a), a fosforilação ocorre na posição 5'; na figura (b), na extremidade 3'.

Após a síntese, os oligonucleotídeos apresentam naturalmente grupos hidroxila (OH) nas extremidades 5' e 3'. A fosforilação de oligonucleotídeos é um processo químico que adiciona um grupo fosfato (PO₄³⁻) a essas extremidades, podendo ocorrer no terminal 3', no terminal 5' ou em ambos. Essa modificação é realizada para uma variedade de propósitos em biologia molecular e biotecnologia, incluindo a ligação de duas sequências de DNA, ligação de um oligo a um vetor de clonagem,

a proteção do oligo contra exonucleases para aumentar sua estabilidade, estudos de modificação pós-transcricional, entre outras aplicações.

Leia mais:

Camden *et al.*, 2016. DNA oligonucleotide 3'-phosphorylation by a DNA enzyme. *Biochemistry*. DOI:<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00151>

Chakravarty & Shuman, 2011. RNA 3'-phosphate cyclase (RtcA) catalyzes ligase-like adenylation of DNA and RNA 5'-monophosphate ends. *Journal of Biological Chemistry*. DOI:<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.196766>

Kikuchi *et al.*, 1978. Addition of mononucleotides to oligoribonucleotide acceptors with T4 RNA ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. DOI:<https://doi.org/10.1073/pnas.75.3.1270>

Roberts *et al.*, 2020. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. DOI:<https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>

Sekiguchi & Shuman, 1997. Ligation of RNA-containing duplexes by vaccinia DNA ligase. *Biochemistry*. DOI:<https://doi.org/10.1021/bi970705m>

1.3.6. Fosforotioato

Posição: Modificação interna

O fosforotioato é uma modificação química específica no *backbone* do oligo, na qual um dos átomos de oxigênio ligados ao fosfato na ligação fosfodiéster entre dois nucleosídeos é substituído por um átomo de enxofre, formando uma ligação fosforotioato. Essa modificação é realizada durante a síntese de oligos, substituindo alguns reagentes químicos durante a etapa de estabilização da cadeia do oligo.

A inserção de fosforotioato nas terminações 5' e 3' de um oligo é geralmente recomendada para evitar a degradação do oligo por exonucleases, resultando em oligos mais estáveis e com uma vida útil prolongada em ambientes biológicos. Embora seja possível que um oligonucleotídeo contenha todas as suas ligações internucleotídicas na forma de fosforotioato em vez de fosfodiéster, é crucial que o pesquisador leve em consideração que altas concentrações de fosforotioato no oligonucleotídeo podem resultar em citotoxicidade. O fosforotioato é frequentemente utilizado em oligos para fins terapêuticos, diagnósticos e de pesquisa, onde a estabilidade é essencial. Além disso, essa modificação pode afetar a estrutura e as propriedades físicas do oligo, o que pode ser explorado em estudos de interação molecular. Por exemplo, a substituição de ligações

fosfodiéster por ligações fosforotioato pode reduzir a temperatura de fusão (T_m) do duplex, uma vez que as ligações fosforotioato tendem a ser mais fracas do que as ligações fosfodiéster. É importante ressaltar que o efeito do fosforotioato na T_m pode ser influenciado pela localização das ligações fosforotioato, o número de ligações modificadas e pelas condições experimentais, como concentração de íons e presença de agentes denaturantes. Portanto, é recomendado realizar experimentos de determinação da T_m específicos para cada oligonucleotídeo modificado com fosforotioato para entender completamente seu comportamento térmico.

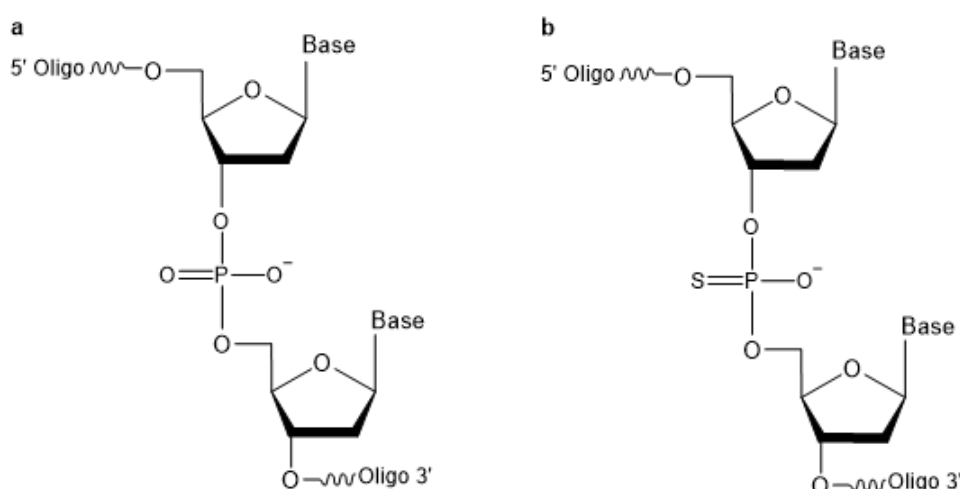


Figura 9. Na figura (a), ligação fosfodiéster; na figura (b), ligação fosforotioato.

Leia mais:

Egli & Manoharan, 2023. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Research*. DOI:<https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>

Iannitti *et al.*, 2014. Phosphorothioate oligonucleotides: effectiveness and toxicity. *Current Drug Targets*. DOI:<http://dx.doi.org/10.2174/1389450115666140321100304>

Kilanowska & Studzińska, 2020. *In vivo* and *in vitro* studies of antisense oligonucleotides – a review. *RSC Advances*. DOI:[10.1039/D0RA04978F](https://doi.org/10.1039/D0RA04978F)

Levin *et al.*, 2019. The pharmacokinetics and toxicity of phosphorothioate oligonucleotides. In *Biotechnology and Safety Assessment*. DOI:<http://dx.doi.org/10.1201/9780367811662-7>

Pawłowska & Guga, 2023. Phosphorothioate Nucleic Acids: Artificial Modification Envisaged by Nature. In: *Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids*. DOI:http://dx.doi.org/10.1007/978-981-16-1313-5_51-1

1.3.7. Fluoróforos

Os oligos marcados com corantes fluorescentes, frequentemente chamados de sondas ou *probes*, são ferramentas versáteis na biologia molecular porque permitem flexibilidade e agilidade em uma vasta gama de aplicações, ao passo em que combinam sensibilidade e seletividade muito altas na detecção de alvos.

Oligos marcados apenas com um fluoróforo (sondas de marcação simples ou única) são usados como sondas em experimentos de citogenética molecular, como na hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou hibridização genômica *in situ* fluorescente (GISH), técnicas utilizadas para detectar e localizar sequências específicas de DNA, genomas e subgenomas em tecidos, células ou cromossomos no contexto de estudos genéticos, macroevolutivos ou citotaxonômicos. Outras aplicações comuns de sondas simples marcadas são o sequenciamento baseado em fluorescência e *primers* de genotipagem, ensaio de ligação de oligonucleotídeos, detecção de SNP em microarranjos, rastreamento de alvos em células e tecidos e de transporte e entrega de biomoléculas em sistemas celulares, e estudos de função estrutural de DNA e de complexos proteína-oligonucleotídeo, entre outros.

Oligos marcados com dois fluoróforos, ou com um fluoróforo e um supressor de fluorescência (*quencher*), são particularmente úteis em experimentos de transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), ou se utilizam desse fenômeno para outros experimentos baseados na emissão da fluorescência mediante um evento biológico. Um exemplo é a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), em que na fase de extensão, ocorre a hidrólise da sonda e a emissão da fluorescência, permitindo a quantificação de alvos biológicos (*i.e.* quantificação de patógenos em uma amostra, ou de expressão gênica).

A escolha do fluoróforo adequado para o seu oligo deve levar em consideração as características físico-químicas do fluoróforo, como o espectro de absorção e emissão, a intensidade de fluorescência e a estabilidade, sua compatibilidade com a aplicação desejada e a sequência do oligo, haja visto que as bases próximas ao fluoróforo podem reduzir ou aumentar a sua fluorescência.

Leia mais:

Carter, 1996. Fluorescence in site hybridization state of the art. Bioimaging. DOI:[http://dx.doi.org/10.1002/1361-6374\(199606\)4:2%3C41::aid-bio2%3E3.0.co;2-x](http://dx.doi.org/10.1002/1361-6374(199606)4:2%3C41::aid-bio2%3E3.0.co;2-x)

Didenko, 2001. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Design and Applications. Biotechniques. DOI:<http://dx.doi.org/10.2144/01315rv02>

Eggerding *et al.*, 1995. Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. Hum. Mutat. DOI:<http://dx.doi.org/10.1002/humu.1380050209>

Fan *et al.*, 2000. Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. Genome Res. DOI:<http://dx.doi.org/10.1101/gr.10.6.853>

Livak *et al.*, 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl. DOI:<http://dx.doi.org/10.1101/gr.4.6.357>

Maierhofer *et al.*, 2002. Multicolor FISH in two and three dimensions for clastogenic analyses. Mutagenesis. DOI:<http://dx.doi.org/10.1093/mutage/17.6.523>

Thelwell *et al.*, 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Nucleic Acids Res. DOI:<http://dx.doi.org/10.1093/nar/28.19.3752>

Kekić & Lietard, 2022. Sequence-Dependence of Cy3 and Cy5 Dyes in 3' Terminally-Labeled Single-Stranded DNA. Scientific Reports. DOI:[10.1038/s41598-022-19069-9](https://doi.org/10.1038/s41598-022-19069-9)

• FAM

Posições: Modificação 3' ou 5'

A 6-carboxifluoresceína (6-FAM) é o corante fluorescente mais utilizado para marcação de oligos, por ser um fluoróforo bastante reativo, solúvel em água e que emite um sinal bastante forte. Ele apresenta uma absorvância máxima de 492 nm, emissão máxima de 517 nm e coeficiente de extinção molar de $83.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O FAM não é estável a mudanças de pH, podendo alterar suas características espectrais dependendo do pH do meio, e por isso não é recomendado para estudos em ambientes biológicos. Além disso, o FAM tem sua fluorescência reduzida quando está próximo a guaninas, e aumentada na proximidade de bases pirimídicas (citossina e timina).

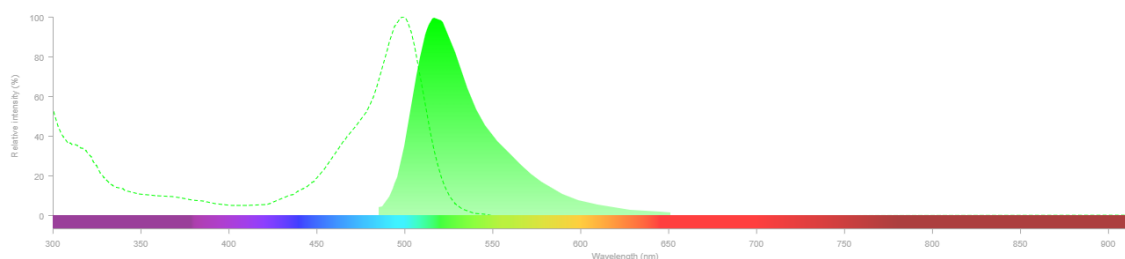


Figura 10. Características espectrais do FAM. Pico em linha pontilhada: faixa de excitação. Pico verde: faixa de emissão.

Leia mais:

Lietard *et al.*, 2022. Sequence-Dependent Quenching of Fluorescein Fluorescence on Single-Stranded and Double-Stranded DNA. RSC Advances. DOI:[10.1039/d2ra00534d](https://doi.org/10.1039/d2ra00534d)

Herling & Dmochowski, 2023. Ratiometric, pH-Sensitive Probe for Monitoring siRNA Delivery. Journal of the American Chemical Society.
DOI:<http://dx.doi.org/10.1021/jacs.3c01032>

1.3.8. Quenchers

Quenching é um mecanismo usado para absorver a fluorescência emitida por uma molécula (o repórter), por meio de um fenômeno de transferência de energia (FRET - *Forster Resonance Energy Transfer*). Quando o *quencher* está próximo a uma molécula que emite fluorescência (um repórter, ou fluoróforo), ele atua como receptor da energia, e esse sistema não emite nenhum sinal. Quando ocorre alguma mudança no sistema, fazendo com que o *quencher* se afaste do repórter (por exemplo por hidrólise de uma sonda ou mudança conformacional de um aptâmero contendo *quencher* e fluoróforo), a fluorescência desse repórter não mais é absorvida pelo *quencher*, e pode ser detectada. Qualquer molécula capaz de agir como um aceitador de energia, pode ser um *quencher*, tendo ou não fluorescência própria. Por exemplo, os primeiros *quenchers* utilizados na biologia molecular, TAMRA e Dabcyl, são fluoróforos por si só, e agem como *quencher* quando associados a outros fluoróforos. No entanto, logo foram desenvolvidos os “*dark quenchers*”, que não possuem fluorescência própria e são capazes de suprimir a fluorescência do repórter sem contribuir para o sinal de *background* do sistema, mesmo em altas concentrações, sendo, portanto, mais recomendados.

Quenchers são bastante utilizados em ensaios em que se deseja detectar ou um fenômeno biológico por meio da emissão de um sinal, como a detecção e quantificação de patógenos e de expressão gênica por qPCR, produção de biossensores, entre outras aplicações.

No LSB utilizamos os *dark quenchers* BHQ-1 e BHQ-2 (*Black Hole Quenchers*). As sondas BHQ duplamente marcadas são sondas FRET lineares tradicionais usadas em oligos entre 20 e 30 bases com um fluoróforo e um extintor covalentemente ligados às extremidades 5' e 3', respectivamente.

Leia mais:

Biosearch Technologies: [Innovative applications for Black Hole Quencher dyes.](#)

Le Reste *et al.*, 2012. Characterization of dark quencher chromophores as nonfluorescent acceptors for single-molecule FRET. Biophysical Journal. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.028>

Marras *et al.*, 2002. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. Nucleic Acids Research. DOI:<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gnf121>

• BHQ-1

Posição: Modificação 3'

O BHQ-1 é capaz de suprimir fluoróforos entre 480-580 nm, como o FAM, TET e VIC.

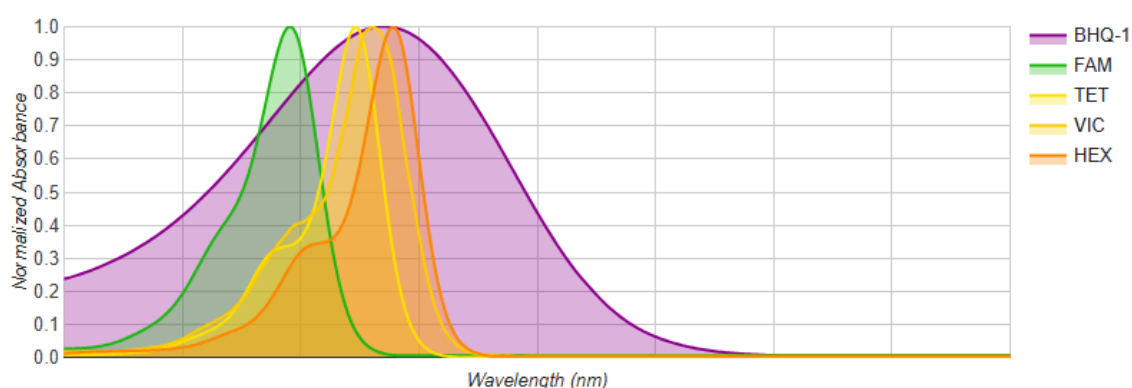


Figura 11. Sobreposição de espectros do *quencher* BHQ-1 e fluoróforos apropriados.

Referência: LGC Biosearch

• BHQ-2

Posição: Modificação 3'

O BHQ-2 é capaz de suprimir fluoróforos entre 560-670 nm, como o CY3 e o CY5.

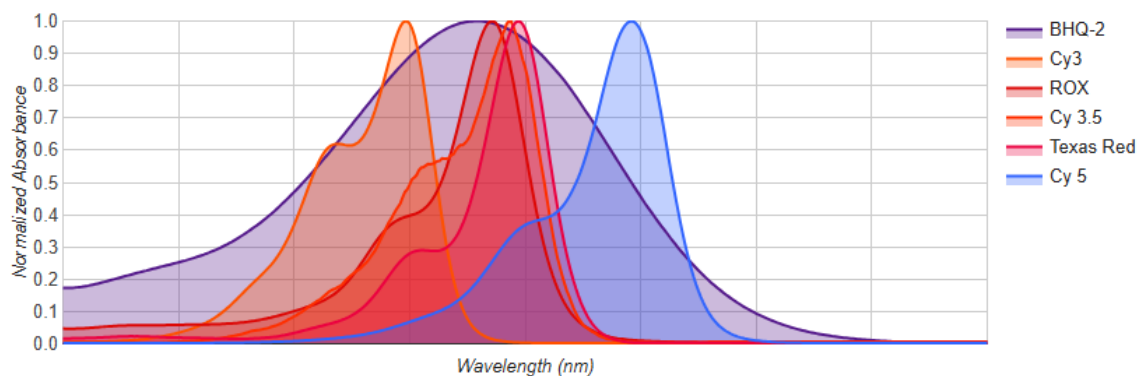


Figura 12. Sobreposição de espectros do *quencher* BHQ-2 e fluoróforos apropriados.

Referência: LGC Biosearch

1.4. Purificação de Oligonucleotídeos

A produção de oligos no LSB é realizada utilizando o sintetizador MerMade 6 (LGC, Biosearch Technologies) que promove a distribuição e o gerenciamento dos reagentes e das fosforamidas no ciclo sintético. O oligo é sintetizado na direção 3' → 5' e cada adição de base é realizada por meio de uma série de reações químicas. No entanto, é importante destacar que as reações químicas não são 100% eficientes, o que é natural e inerente a essas reações.

No LSB, a eficiência de acoplamento de bases durante a síntese ultrapassa os 99%. Isso implica que, a cada ciclo, no momento da adição de base, ~1% das bases disponíveis não reage com a base a ser incorporada. As sequências com falhas / oligos truncados, que naturalmente se formam no processo de síntese, podem competir com o produto completo em algumas aplicações e, por isso, pode ser necessária a remoção por purificação dessas sequências incompletas, para que o oligo esteja puro e seja utilizado com sucesso pelo pesquisador.

Leia mais:

Gilar & Bouvier, 2000. Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00521-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00521-5)

A purificação adequada do seu oligonucleotídeo depende da configuração e da aplicação específica. Para mais detalhes, consulte a tabela abaixo.

Purificação	Aplicações	Observações
Cartridge Cartucho de Purificação de Oligonucleotídeos por Fase Reversa (RP-OPC): Remove sais e sequências incompletas.	Oligos <i>short</i> ou <i>long</i> não marcado. Aplicações: PCR, qPCR, <i>microarray</i> , <i>blotting</i> , clonagem, sequenciamento, mutagenese, entre outras.	Opção de custo intermediário. Proporciona maior pureza ao oligo, pois contém uma proporção mais elevada de sequências completas em relação às incompletas.
RP-HPLC Remove sais, sequências incompletas e/ou resíduos de fluoróforos provenientes da síntese.	Sonda de hidrólise, oligo customizado e <i>ultramer</i> . Aplicações: PCR, qPCR, <i>microarray</i> , <i>blotting</i> , clonagem, mutagenese, multiplex, <i>antisense</i> , aptâmeros, entre outras.	Opção de maior custo. Produto obtido com alta pureza. Logo, é a purificação com o menor rendimento mínimo garantido.

1.4.1 Cartridge

Baseado na cromatografia de Fase Reversa utilizando o Cartucho de Purificação de Oligos (RP-OPC), consiste em uma coluna preenchida com resina polimérica de alta performance que remove sais e as sequências incompletas. Logo, fornece enriquecimento para sequências completas.

1.4.2 RP-HPLC

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Fase Reversa (RP-HPLC) remove as sequências com falhas e/ou subprodutos não incorporados (por ex., fluoróforos, *quenchers*, entre outras marcações). Garante um oligo altamente purificado, necessário em aplicações como em sondas fluorescentes, oligos customizados, oligos *ultramer*, oligos *antisense* (ASO), aptâmeros, entre outras modificações e/ou análogos químicos diversos.