



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Síntesis química de oligonucleótidos: Método de fosforamiditas.

Chemical synthesis of Oligonucleotides: Phosphoramidite method.

Ongay-Larios, Laura^{1*} y Mora Cabrera, D. Minerva¹.

1. Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

*Correspondencia. Instituto de Fisiología Celular, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, CDMX, México.
CP. 04510 Tel. +52 (55) 56 22 56 56, longay@ifc.unam.mx

Resumen

Los oligonucleótidos son cadenas de ácido nucleico relativamente cortas; van de unos cuantos nucleótidos hasta unos 200 nucleótidos los más largos. El uso de estas moléculas es de gran importancia en la biología molecular ya que se emplean en una gran variedad de técnicas como son el ADN recombinante, la mutagénesis dirigida, los microarreglos, la PCR, y la secuenciación, entre otras.

Los oligonucleótidos generalmente se producen por síntesis química. Actualmente el método más utilizado es el de fosforamiditas en fase sólida, utilizando como soporte perlas de vidrio con poros de tamaño controlado (CPG). Este proceso utiliza nucleósidos modificados que tienen sus grupos reactivos protegidos, los cuales se activan de manera específica en el momento adecuado, lo que promueve la síntesis lineal, y evita la ramificación del oligonucleótido. La síntesis involucra la adición secuencial de los nucleósidos en dirección 3'-5': el nucleósido es incorporado a la cadena creciente mediante un ciclo de síntesis que consta de cuatro pasos: desprotección, acoplamiento, bloqueo y oxidación. El ciclo se repite hasta obtener el oligonucleótido de la longitud deseada. Una vez que se completa la síntesis el oligonucleótido es liberado del soporte sólido y se eliminan todas las protecciones para obtener una molécula de ADN de cadena sencilla activa. Esta molécula se purifica y

Abstract

Oligonucleotides may be defined as short nucleic acid strands up to 200 nucleotides. These molecules have an important use in molecular biology techniques, such as recombinant DNA, site directed mutagenesis, microarrays, PCR, DNA sequencing methods, among others.

Oligonucleotides can be synthesized chemically. At present, the phosphoramidite method in solid phase with controlled pore glass (CPG) support is the most commonly used. This method employs modified nucleosides that have their reactive groups protected with different molecules; the protected groups can be removed selectively at the appropriate moment which renders the precise group of the molecule active allowing the coupling of the nucleosides to perform the synthesis. These protective groups prevent unwanted side reactions. Nucleosides are sequentially incorporated to the growing chain in 3'-5' direction through a four steps synthesis cycle: deprotection, coupling, capping, and oxidation. The cycle is repeated until the oligonucleotide is complete; then the oligonucleotide is cleaved from the solid support and all protections are removed. This renders a functional single-stranded DNA molecule, which is afterwards purified by alcoholic precipitation. Chemical synthesis is carried out on automatic synthesizers; the process is highly efficient, reproducible and with very high yield.

se concentra por precipitación alcohólica. El proceso de síntesis se lleva a cabo en sintetizadores automatizados con muy alta eficiencia, reproducibilidad y rendimiento. La calidad del oligonucleótido sintetizado se puede evaluar en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Los oligonucleótidos son estables por varios años si se almacenan a -20°C y libres de nucleasas.

Palabras claves: oligonucleótido, síntesis química, fosforamidita, grupo protector.

Oligonucleotides can be analyzed through polyacrylamide gel electrophoresis to determine their quality. Oligonucleotides are stable several years when stored at -20°C and free of nucleases.

Keywords: oligonucleotide, chemical synthesis, phosphoramidite, group protection.

Introducción

Los oligonucleótidos son cadenas de ácido nucleico relativamente cortas que tienen gran importancia en diferentes procesos biológicos y que se utilizan ampliamente en diferentes técnicas de laboratorio. El desarrollo y evolución de las técnicas de síntesis química de oligonucleótidos ha permitido avances significativos en distintas técnicas de biología molecular y en particular en la tecnología del ADN recombinante. Es interesante mencionar que mediante este proceso se han podido sintetizar varios genes [1].

La demostración de que el ADN contiene la información genética por Avery y colaboradores [2] y el descubrimiento de la estructura de la molécula como una doble hélice por Watson y Crick en 1953 [3], permitieron inferir varias actividades esenciales en el proceso de expresión génica, lo que impulsó de manera muy importante el interés por entender los mecanismos moleculares involucrados en dicho proceso. El avance en el conocimiento de los sistemas biológicos impulsó el desarrollo de técnicas que pusieron en evidencia, entre otras cosas, la importancia del uso de oligonucleótidos sintéticos para entender y manipular distintos procesos biológicos. Por ejemplo, mediante el uso de oligoribonucleótidos sintéticos se pudo descifrar la mayoría de los codones del código genético [revisado en 4, 5]. Este tipo de estrategias planteó la necesidad de tener la capacidad de sintetizarlos de manera eficiente.

Antecedentes

Las primeras técnicas eran extremadamente complicadas y laboriosas que permitían acoplar tan sólo unos cuantos nucleótidos. Sin embargo, el enorme potencial de la aplicación de este tipo de moléculas sintéticas en diferentes experimentos biológicos, bioquímicos y biofísicos impulsó un mejoramiento dramático en las técnicas de síntesis química de oligonucleótidos [6].

La síntesis química de oligonucleótidos tiene sus inicios en los años 1950's con los experimentos de Michelson y Todd en los que reportan la síntesis de dinucleótidos con un enlace fosfodiéster entre dos nucleósidos de timidina [7]. Posteriormente Khorana y colaboradores desarrollan el método de fosfato diéster, en donde una de sus principales aportaciones fue el uso de grupos protectores en algunos de los grupos reactivos de los nucleótidos utilizados durante la síntesis y de esta forma controlar el acoplamiento de los nucleótidos [8,9]. En los siguientes cuarenta años se implementaron otros protocolos, como el método de fosfato triéster y el de fosfito triéster que introdujeron algunas modificaciones al método de Khorana; que hacen el proceso general más rápido y eficiente.

En el método de fosfato triéster implementado por Letsinger y Rees se introdujo la protección del fosfato en el extremo 3' del nucleósido con un grupo β -cianoetilo y evitar que se den ramificaciones del oligonucleótido durante el proceso de síntesis, que era uno de los problemas del método de fosfato diéster [4]. Otra aportación importante fue implementar el proceso de síntesis del oligonucleótido en fase sólida, en el cual la extensión de la cadena nucleotídica se da sobre un soporte sólido [10]. Estas modificaciones permitieron desarrollar los primeros sistemas de síntesis semiautomatizados y aparecen los primeros sintetizadores de ADN [4]. Finalmente, este mismo grupo de investigadores proponen el método de fosfito triéster en el cual se sustituye el grupo fosfato del extremo 3' del nucleósido por un grupo fosfito, lo que permite que la reacción de acoplamiento entre los nucleósidos durante la extensión de la cadena sea mucho más rápido y eficiente (aunque se requiere introducir un paso adicional de oxidación para dar estabilidad al enlace éster internucleotídico), reduciendo el tiempo de síntesis debido a la velocidad de acoplamiento [6].

Poco después, a principios de los 1980's, Caruthers hace una modificación al método de fosfito triéster e introduce el uso de fosforamiditas en las cuales se cambia el grupo cloruro por un grupo amina en el nucleósido, con este cambio las fosforamiditas son activadas justo antes del acoplamiento añadiendo un ácido débil a la mezcla de reacción [11]. La ventaja de estos compuestos es que son más estables lo que permite un mejor manejo y almacenamiento [4]. Así mismo este grupo trabajó intensamente en el mejoramiento del soporte sólido y publican el uso de matrices inorgánicas como soporte sólido [6].

Estas modificaciones han mejorado la selectividad, la velocidad y la eficiencia de síntesis; así mismo han permitido que la longitud del polinucleótido pueda ser mucho mayor y actualmente se pueden hacer oligonucleótidos hasta de unos 200 nucleótidos.

Método de fosforamiditas

Actualmente el método mas utilizado para la síntesis química de oligonucleótidos es el de fosforamiditas en fase sólida. Las fosforamiditas son

nucleósidos modificados con grupos químicos de protección en los grupos reactivos de la molécula, cuya función es evitar reacciones no deseadas durante la síntesis. Un punto importante es que los grupos protectores son fácilmente removibles de manera selectiva en el momento necesario durante el proceso de síntesis, para permitir la reacción específica [5]. Existen diversas moléculas que pueden usarse para proteger los sitios reactivos, pero actualmente los más utilizados son: *a)* un grupo dimetoxitritilo (DMT) en el extremo 5' del nucleósido, mientras que *b)* el grupo fosfito en el 3' está protegido con un β -cianoetilo y un diisopropilamino [11].

También se tienen modificaciones en los grupos amino de los anillos heterocíclicos de las bases nitrogenadas, los mas utilizados son: *i)* un benzoilo para adenina, *ii)* para citosina se puede usar el benzoilo o acetilo y *iii)* para la guanina un isobutirilo; la timina no contiene grupo protector ya que no presenta un grupo amino. Estos grupos protectores evitan que se generen reacciones no deseadas o ramificaciones de la cadena durante la síntesis del oligonucleótido. La figura 1 muestra la estructura de las fosforamiditas.

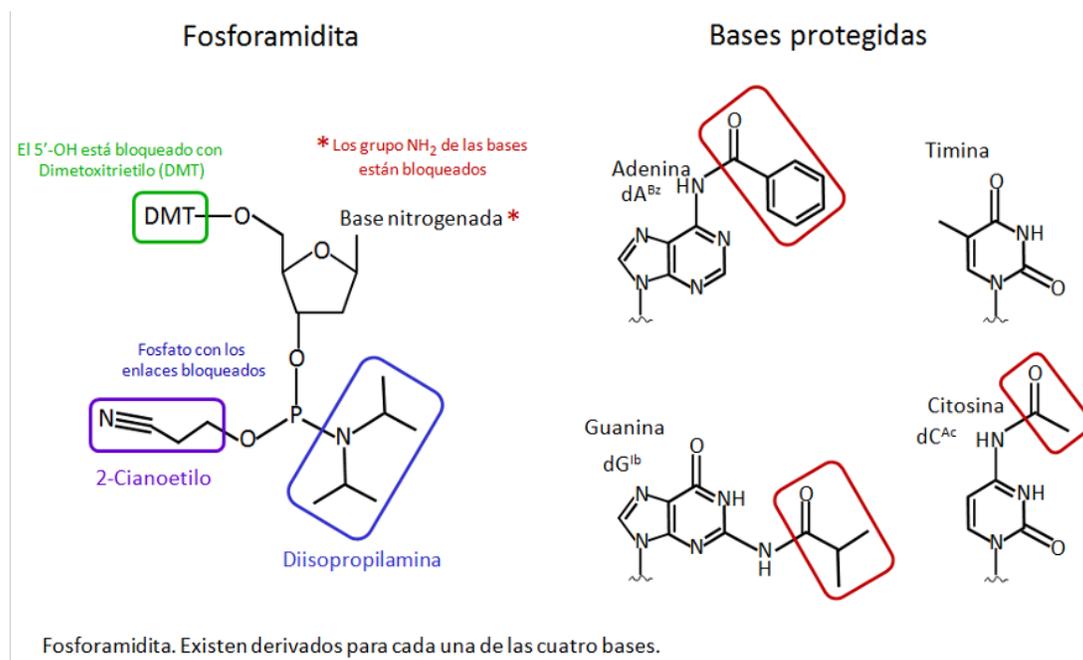


Figura 1. Esquema general de las fosforamiditas. Se muestran los grupos protectores: Dimetoxitritilo en el 5'-OH, β -cianoetilo y diisopropilamina en el grupo fosfito 3', un grupo benzoilo en el grupo amino reactivo de la adenina, un acetilo en la citosina y un isobutirilo en la guanina.

La síntesis involucra la adición secuencial de los monómeros (fosforamiditas) a la cadena creciente mediante ciclos de síntesis que involucran cuatro

pasos fundamentales; 1) desprotección o eliminación del dimetoxitritilo, 2) activación y acoplamiento, 3) bloqueo y 4) oxidación. La síntesis se lleva a cabo en

fase sólida en donde el nucleósido del extremo 3' de la cadena a sintetizar se encuentra covalentemente unido al soporte sólido mediante un espaciador (conector); el soporte sólido puede ser CPG (vidrio con poros y canales de tamaño controlado) o poliestireno. La síntesis se realiza en dirección 3' – 5' (dirección opuesta a la síntesis enzimática) (Figura 2).

Ciclo de síntesis

1. Desprotección

El ciclo inicia con la eliminación del grupo dimetoxitriilo (DMT) mediante un tratamiento con un ácido, generalmente ácido tricloroacético (TCA) o ácido dicloroacético (DCA), lo cual expone el hidroxilo en el extremo 5' del nucleósido, al cual será unido el siguiente nucleósido.

2. Acoplamiento

El siguiente monómero es añadido junto con un activador, como el tetrazol que actúa como un ácido débil, el diisopropilamino del nucleósido entrante es eliminado y se forma un intermediario tetrazolilfosforamidito que reacciona con el hidroxilo 5' libre de la cadena oligonucleotídica anclada en el soporte

sólido y se forma el enlace fosfito-triéster internucleotídico.

3. Bloqueo

Un porcentaje muy bajo de moléculas, menor al 1-2%, que no reaccionan en el paso de acoplamiento son bloqueadas de manera permanente mediante una reacción de acetilación del extremo 5' hidroxilo libre con ácido acético anhidro y N-metilimidazol, esto se hace antes del paso de oxidación para impedir que participen en el siguiente ciclo de síntesis y evitar que se generen oligonucleótidos con deleciones internas.

4. Oxidación

El último paso del ciclo de síntesis es una reacción de oxidación para estabilizar el enlace internucleotídico recién formado. Esto se lleva a cabo añadiendo una solución de yodo, el fósforo trivalente del enlace fosfito es oxidado a un fósforo pentavalente formando así un enlace fosfato triéster estable.

Este ciclo de síntesis se repite para cada nucleótido hasta obtener la cadena de ADN deseada.

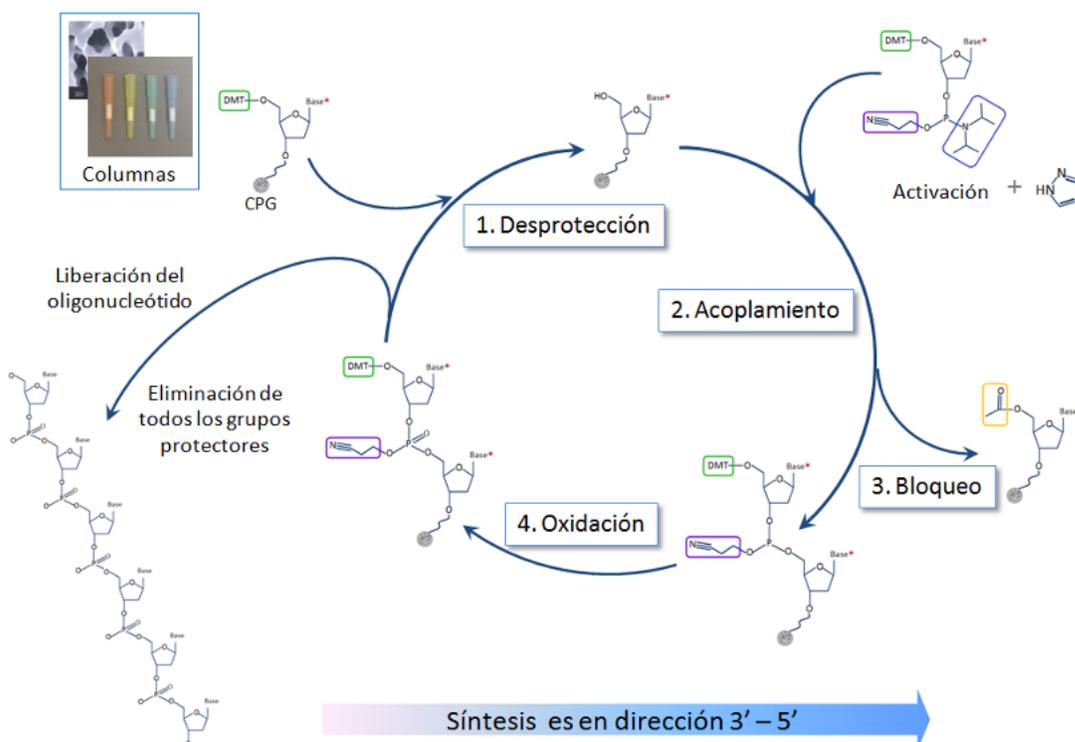


Figura 2. Ciclo de síntesis del método de las fosforamiditas. El proceso se lleva a cabo en fase sólida, el soporte sólido (CPG) está contenido en columnas entre filtros, el ciclo consta de cuatro pasos: desprotección, activación/acoplamiento, bloque y oxidación, este ciclo se repite hasta obtener el oligonucleótido completo, el cual es liberado del soporte y se eliminan todos los grupos protectores.

Procesamiento final del oligonucleótido

Cuando la síntesis se completa, el oligonucleótido permanece anclado al soporte sólido y aun contiene varios grupos protectores tanto en las bases como en el eje azúcar-fosfato que deben ser removidos. El grupo tritilo en el extremo 5' puede ser eliminado mediante un paso adicional de desbloqueo con TCA. El oligonucleótido es entonces liberado del soporte sólido con una solución ligeramente básica y con un tratamiento a alta temperatura en esta misma solución se eliminan el resto de los grupos protectores, posteriormente el oligonucleótido es purificado para remover sales y otros contaminantes. De esta manera se obtiene una molécula química- y biológicamente activa que puede ser utilizada en diferentes aplicaciones.

Automatización

La síntesis de oligonucleótidos se lleva a cabo en sintetizadores de ácidos nucleicos automáticos controlados por computadoras. Existen varios sintetizadores comerciales, que varían básicamente en la capacidad de síntesis, en la escala de síntesis y la cantidad de oligonucleótidos que pueden sintetizar simultáneamente, así como en la capacidad de monitorear automáticamente la eficiencia de acoplamiento.

Materiales y reactivos

Fosforamiditas: dA-CE Phosphoramidite (Bz), dC-CE Phosphoramidite (Bz), dG-CE phosphoramidite (iBu) y dT-CE Phosphoramidite.

Acetonitrile anhydrous (ultra seco) (diluyente para las fosforamiditas). 0.25M 5-Ethylthiol-1H-Tetrazol en acetonitrilo (activador). THF/2,6-Lutidina/Acetic anhydride (Capmix A). 16% 1-Metilimidazol/THF (Capmix B). 0.02M Iodine/THF/Piridina/H₂O (Oxidante). 3% TCA/DCM (Desbloqueador). Acetonitrilo anhidro grado HPLC. Columnas de síntesis de 200nmol: dT CPG1000, dA(Bz) CPG1000, dG(Dmf) CPG1000 y dC(Ac) CPG1000. Trampas para humedad. Tanque de Argón de ultra alta pureza. Hidróxido de amonio concentrado. Etanol Absoluto. Etanol al 70%. Agua destilada estéril. Pipetas y puntas para microvolúmenes. Tubos de diferentes volúmenes.

Equipos

- Sintetizador automatizado de oligonucleótidos *MerMade 4* de BioAutomation. El equipo está diseñado para sintetizar oligonucleótidos en formato de columnas, configurado para 4 columnas, puede sintetizar oligonucleótidos estándar, degenerados y modificados, en escalas de 50 nmol a 5 µmol, con una eficiencia de acoplamiento del 99%. El progreso de la síntesis puede ser monitoreado en todas las columnas con un monitor de la línea de tritilo. El tiempo de síntesis depende de la longitud del oligonucleótido, una corrida típica de 4 oligonucleótidos de 20 nucleótidos (nt) es menor a tres horas. En las condiciones estándar que se utilizan en la UBM se pueden sintetizar oligonucleótidos de 2 a 100 nt. Las columnas contienen el soporte sólido CPG entre dos filtros, que permite el flujo de reactivos sin que se pierda el soporte (Figura 3).

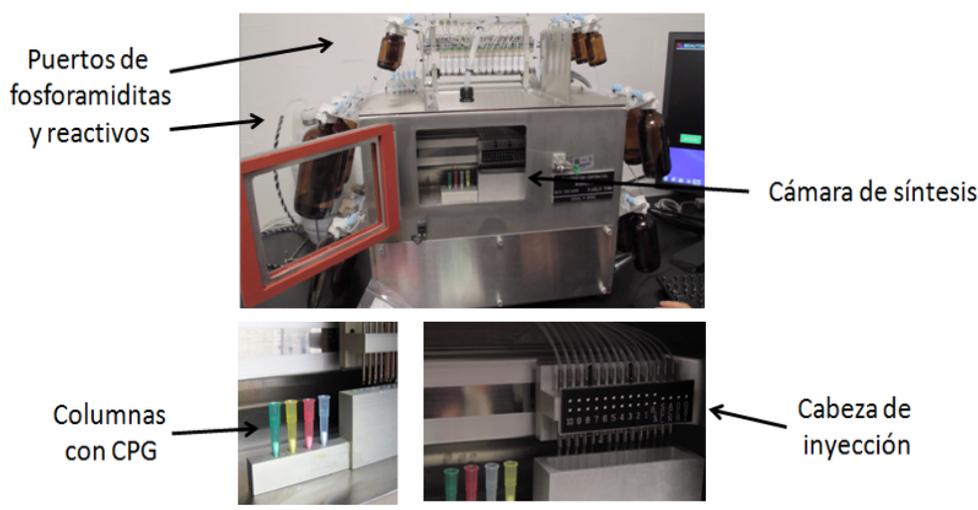


Figura 3. Sintetizador automático de oligonucleótidos, *MerMade 4*.

El equipo tiene cuatro componentes: cámara de síntesis con capacidad para acomodar 4 columnas, sistema de vacío, cabeza de inyección que dispensa los reactivos en las columnas y un sistema de movimiento para posicionar la cabeza de inyección.

Todos los reactivos se ponen en puertos conectados con líneas que permiten llevarlos a la cámara de síntesis, cada línea cuenta con válvulas de precisión que controlan la cantidad específica de reactivo depositado en las columnas, una válvula de vacío asociada a la base de cada columna dreña los reactivos al término de cada reacción. El equipo tiene conectado un tanque de argón, este se utiliza para generar una atmósfera libre de humedad necesaria para que la síntesis se lleve de manera óptima y promover el flujo de los reactivos controlado por el sistema de vacío. El sintetizador está conectado a una computadora con el software MM4 que tiene los programas para el mantenimiento

y los scripts para controlar la operación del equipo en los distintos pasos del ciclo de síntesis. Se incluyen protocolos estandarizados y comprobados, adicionalmente los scripts se pueden crear o modificar.

- Otros equipos. Centrifugas Eppendorf 5430R y 5415C. Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Termobloque de temperatura controlada.

Procedimiento

La síntesis de oligonucleótidos en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto se lleva a cabo con el método de fosforamiditas en fase sólida en sintetizadores automáticos. A continuación se describe el protocolo para la síntesis en el sintetizador *MerMade 4* de BioAutomation (Figura 4).

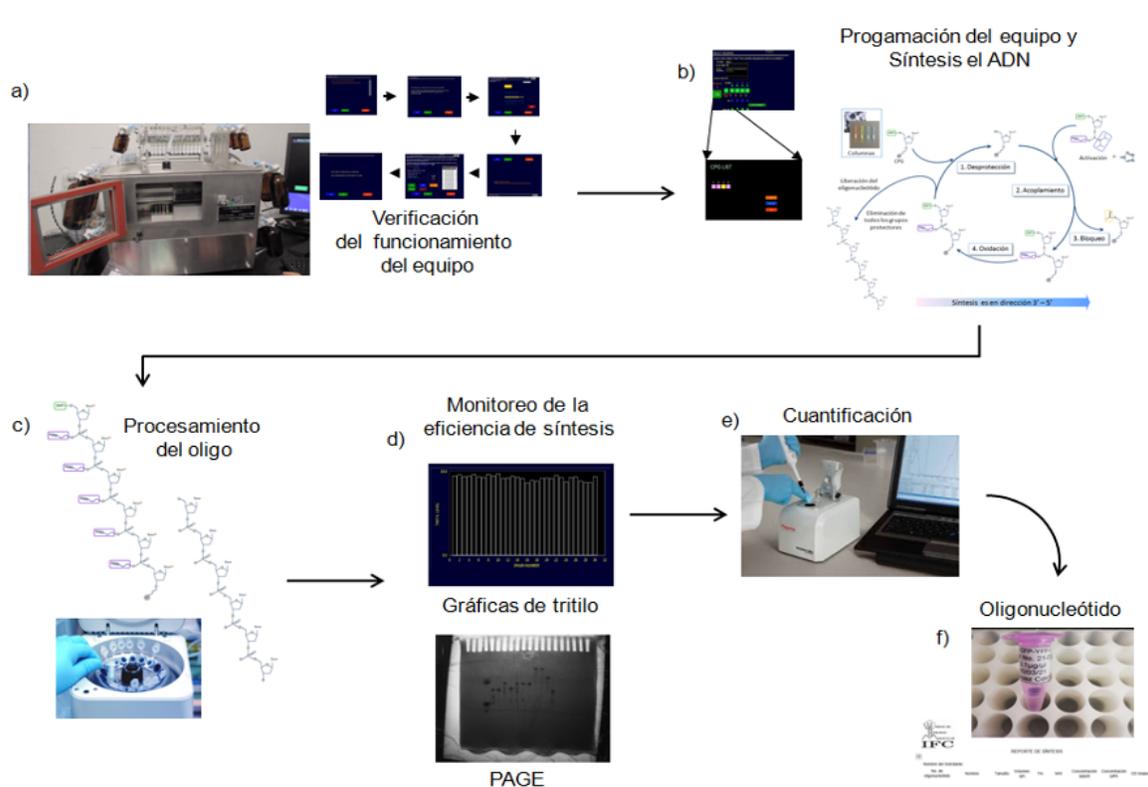


Figura 4. Esquema general del procedimiento para la síntesis química de oligonucleótidos. El primer paso es la verificación del sistema, se revisa tanto el funcionamiento del equipo como las condiciones de los reactivos (a). Se hace la programación del equipo con la secuencia a sintetizar y el script apropiado para esa síntesis, y se procede a hacer la síntesis, en este punto es conveniente inspeccionar visualmente los primeros ciclos de síntesis (b). Una vez terminada la síntesis se procesa el oligonucleótido para librarlo de la columna y eliminar todos los grupos protectores (c). Se verifica la calidad de la síntesis analizando los resultados del monitor de tritilo y se verifican los productos sintetizados en geles de poliacrilamida (d). Finalmente el oligonucleótido es cuantificado por espectrofotometría, se genera un reporte de síntesis y el tubo se etiqueta y se guarda a -20°C hasta su uso (e-f).

Verificación del sistema

Previo a la síntesis se verifica el funcionamiento del sintetizador:

1. Verificar que la cantidad de reactivos en el equipo es suficiente para llevar a cabo el proceso, así como el tiempo que han estado en el sintetizador ya que estos tienen una vida media una vez que han sido colocados en el equipo, en caso necesario reemplazarlos. Las fosforamiditas liofilizadas se disuelven en acetonitrilo de muy alta pureza (ultra seco) de acuerdo a las recomendaciones del proveedor antes de colocarlas en el sintetizador. Colocar dentro de los reactivos trampas para humedad.
2. Verificar que el contenedor de desechos tiene suficiente espacio para colectarlos.
3. Verificar que la cabeza dispensadora de reactivos en la cámara de síntesis se mueve sin problemas y que las líneas que dispensan los reactivos no estén tapadas, ni presentan fugas.
4. Verificar que el equipo tiene la presión y nivel de vacío adecuados.
5. Hacer un prueba de para verificar que el flujo de los reactivos tanto en volumen como en tiempo es adecuado.

Síntesis del ADN

1. Una vez comprobado el funcionamiento correcto del equipo se edita la secuencia de ADN que se quiere sintetizar y el programa de síntesis específico que se usará en el proceso utilizando los programas del equipo, siguiendo las indicaciones que se van desplegando en el programa [12]. Este sintetizador tiene capacidad para sintetizar 4 oligonucleótidos simultáneamente. Se puede programar diferentes escalas de síntesis que van de 50 nmol a 5 μ mol. En la UBM usamos generalmente una escala 200 nmol.
2. Colocar en la cámara de síntesis las columnas adecuadas, dependiendo del nucleótido del extremo 3' de los oligonucleótidos a sintetizar y se procede a iniciar la síntesis de los oligonucleótidos.
3. Es conveniente que se monitoree el funcionamiento del equipo un par de ciclos para

asegurarse de que el proceso se lleva de manera adecuada.

Procesamiento del oligonucleótido

1. Una vez terminada la síntesis retirar las columnas del sintetizador, sacar el soporte sólido con los oligonucleótidos anclados y ponerlo en un vial de 2 ml con tapón de rosca. Añadir 2 ml de hidróxido de amonio concentrado (30%) frío, cerrar perfectamente el tubo y sellar el tapón con parafilm para evitar que pueda ser expulsado por la presión que se genera en el vial.
2. Incubar a 55°C toda la noche (12-16 h) en un baño con temperatura controlada (termobloque) para liberar los oligonucleótidos del soporte sólido y remover todas las modificaciones protectoras.
3. Retirar los viales del termobloque y enfriarlos durante un par de horas a -20°C para poder abrirlos sin que se derrame el líquido. Transferir la solución de hidróxido de amonio que contiene el oligonucleótido ya liberado a un tubo de 10ml, evitar transferir las perlas de CPG que se encuentra en el fondo del vial.
4. Añadir tres volúmenes de EtOH al 100% frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M a pH 5.2 para precipitar el ADN incubando a -20°C durante 2 h. Centrifugar a 10,000 rpm en frío durante 20 min, eliminar el sobrenadante y hacer un lavado con EtOH al 70% frío, repetir la centrifugación.
5. Eliminar completamente el sobrenadante y dejar secar el botón de ADN a temperatura ambiente. Resuspender el botón en 250 μ l de agua destilada.
6. Cuantificar por espectrofotometría a 260 nm y con este valor determinar la concentración del oligonucleótido.
7. Etiquetar el tubo y guardar a -20°C hasta que sea entregado para su uso.
8. Generar un reporte de síntesis que se entregará junto con el oligonucleótido.

Nota: Este proceso de purificación (desalar) es suficiente para la mayoría de las aplicaciones. Para oligonucleótidos muy largo, mayores a 75-80 nt o algunas aplicaciones se recomiendan hacer una purificación que elimine productos truncados que se pueden generar debido a que la eficiencia de

acoplamiento no es del 100%. Los métodos de purificación más ampliamente utilizados para este propósito son electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Puntos clave

- La síntesis química de ácidos nucleicos es altamente sensible a la presencia de agua, la cual inhibe de manera muy importante las reacciones que se llevan a cabo en el proceso.
- El uso de equipos y reactivos de buena calidad es crítico para garantizar una buena eficiencia de acoplamiento y rendimiento.
- Las fosforamidas se deben mantener liofilizadas y se resuspenden en acetonitrilo anhidro de muy alta pureza (ultra seco) justo antes de colocar en el sintetizador, la vida media de estos reactivos en el equipo es de dos semanas. Evitar abrir repetidas veces las botellas de acetonitrilo, ya que esto puede introducir humedad que afectará negativamente la síntesis.
- Se recomienda colocar trampas para humedad dentro de los frascos de reactivos al momento de colocarlos en el equipo.
- Es importante que el equipo esté perfectamente calibrado y se revisen regularmente los flujos de los reactivos.
- El argón utilizado para generar la presión interna en el equipo debe ser de muy alta pureza para garantizar una atmósfera libre de humedad dentro del sistema.
- Los oligonucleótidos se deben resuspender en agua o amortiguadores libres de nucleasas y serán estables meses o años si se almacenan a -20°C.

Monitoreo de la eficiencia de síntesis

La eficiencia de acoplamiento se puede monitorear mediante la visualización del catión DMT liberado en el primer paso del ciclo de síntesis (desbloqueo), el DMT liberado presenta un color naranja brillante el cual sirve como indicador de la efectividad del proceso de acoplamiento [13]. El *MerMade 4* de la UBM cuenta con un sistema incorporado de monitoreo del tritilo liberado que mide la cantidad de catión liberado en cada ciclo y presenta gráficas que permiten visualizar el nivel de tritilo liberado ciclo a ciclo.

Otro método utilizado para verificar la calidad de síntesis es el uso de geles de poliacrilamida, en los cuales se puede detectar la presencia del producto completo y si hay productos de síntesis truncados. Una alícuota del producto sintetizado se corre en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% y se visualiza por absorción de luz UV (*UV shadowing*) en placas de cromatografía.

Servicio

Para solicitar la síntesis de oligonucleótidos en la UBM llenar una solicitud con la información requerida, asignar un nombre a cada oligonucleótido con un máximo de 10 caracteres, no utilizar símbolos, escribir la secuencia de ADN con letras minúsculas en dirección 5'-3'.

Los oligonucleótidos se entregan desalados y resuspendidos en 250 µl de agua destilada estéril, junto con un reporte de síntesis que contiene los siguientes datos: Folio asignado por la UBM, nombre del oligonucleótido, tamaño (número de nucleótidos), volumen (µl), T_m, MW, concentración en µg/µl y µM, OD totales.

Resultados

Resultados representativos del rendimiento de la síntesis química en la UBM se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento obtenido de la síntesis de oligonucleótidos de diferente longitud, escala de síntesis 200nmol. (Valores representativos de la UBM)

Longitud del oligonucleótido (nt)	µg/µl	µg totales
20	3.7	925
30	5.2	1300
40	6.9	1725
63	9.1	2275

El rendimiento es bueno y dentro de los límites esperados de acuerdo a la escala de síntesis utilizada y es semejante a la reportada en la literatura. Es importante hacer notar que el rendimiento varía de acuerdo a la longitud del oligonucleótido.

El análisis en geles de poliacrilamida por la técnica de *UV shadowing* en placas de cromatografía permite observar las bandas correspondientes al producto de síntesis. Con este método podemos estimar la eficiencia de síntesis, la calidad del producto sintetizado y determinar la presencia de productos truncados que se generan como consecuencia de la eficiencia de acoplamiento durante cada ciclo de síntesis.

En la figura 5 se muestra el resultado obtenido de la síntesis de oligonucleótidos de diferente tamaño en el *MerMade 4*, las bandas oscuras corresponden a las moléculas de ADN. Como se puede observar en moléculas de ADN pequeñas, hasta de unos 40 nucleótidos (nt), no se alcanza a detectar la presencia de subproductos (productos truncados), aún en los oligonucleótidos mayores (65nt y 73nt) sólo se detectan algunas bandas sumamente tenues de subproductos, esto debido a que el porcentaje de productos truncados cuando se tiene una eficiencia de acoplamiento del 99% es muy bajo y no representa ningún problema para la mayoría de las aplicaciones, lo que hace que en términos generales no se requiera una purificación para eliminarlos en la mayoría de los casos.

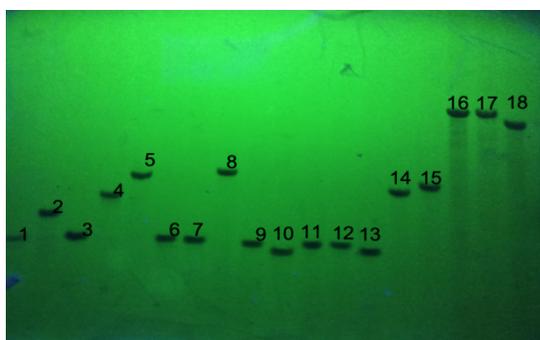


Figura 5. Oligonucleótidos de diferentes tamaños analizados en gel de poliacrilamida al 12% con la técnica de *UV shadowing*. 20nt (1), 25nt (2), 21nt (3, 6, 7, 9, 11, 12), 30nt (4, 15), 40nt (5, 8), 19nt (10, 13), 28nt (14), 73nt (16, 17) y 65nt (18).

Otra manera de evaluar la eficiencia de síntesis es mediante el análisis de la liberación del catión tritilo (DMT), como se mencionó anteriormente el

synetizador *MerMade 4* cuenta con un monitor de la línea de tritilo para todas las columnas, esto permite monitorear el progreso de la síntesis y obtener gráficas de barras como las que se muestran en la figura 6, cada barra representa el nivel de tritilo liberado que es un indicador de la eficiencia de acoplamiento para cada ciclo de síntesis, como se puede observar el nivel de tritilo presenta ligeras variaciones en cada acoplamiento debido a la sensibilidad del sistema y a que el acoplamiento también es afectado por la composición de la cadena, sin embargo se mantiene bastante constante aun en oligonucleótidos muy largos (73nt, gráfica d) indicando que la eficiencia de acoplamiento es buena en los distintos ciclos de síntesis. Este tipo de monitoreo es bastante útil, ya que si se llega a observar una caída drástica en el nivel de tritilo en alguna de las columnas se puede abortar la síntesis para esa columna particular y evitar así un gasto innecesario de reactivos.

Conclusiones

Este protocolo permite sintetizar oligonucleótidos de muy alta calidad con un buen rendimiento. El proceso es altamente reproducible y eficiente con el sintetizador automático. El tiempo de síntesis es relativamente corto. La eficiencia de acoplamiento es elevada y constante a lo largo de la síntesis aun en oligonucleótidos muy largos, la presencia de productos trancos es mínima y solo se hace evidente en oligonucleótidos de longitudes mayores a los 70nt. Esto establece un límite a la longitud del oligonucleótido que se puede sintetizar.

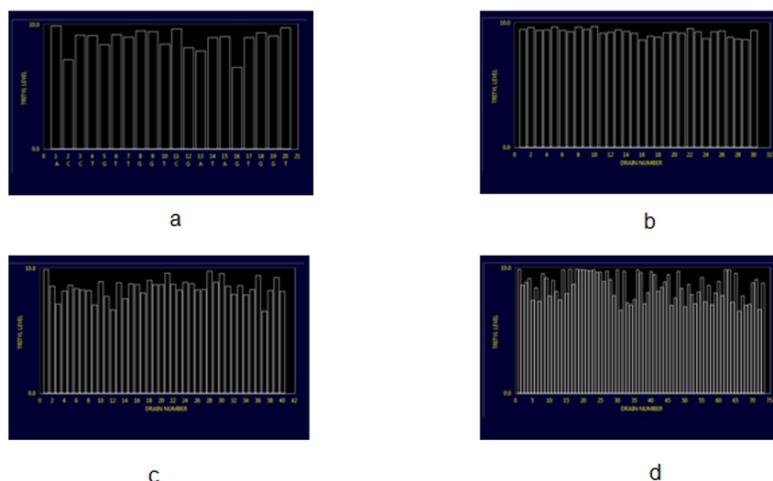


Figura 6. Histogramas obtenidos por el monitor de tritilo integrado en el sintetizador. Se muestra el nivel de tritilo, indicador de la eficiencia de acoplamiento, ciclo a ciclo en la síntesis de oligonucleótidos de diferentes tamaños, a) 20nt, b) 30nt, c) 40nt y d) 73nt.

Referencias

1. Jiménez, V., Padrón, G., Castellanos, L., y Rodes, L. (1984) Síntesis química de oligonucleótidos por el método de fosfotriéster. *Interferón y Biotecnología*. **1**(3), 39-51
2. Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **79**, 137-158
3. Watson, J.D., Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**(4356), 737-738
4. Brown, D.M. (1993) A brief history of oligonucleotide synthesis. Chapter 1. From Methods in Molecular Biology, **20**, Protocols for oligonucleotides and Analogs. Edited by S. Agrwal. Human Press Inc. Totowa, NJ
5. Integrated DNA Technologies (2011) Chemical synthesis and purification of oligonucleotides. Integrated DNA Technologies (IDT), 1-12
6. Hogrefe R. (2015) A short history of oligonucleotide synthesis. [online] San Diego. TriLin Bio Technologies. <https://www.trilinkbiotech.com/a-short-history-of-oligonucleotide-synthesis> (consultado 21 de enero 2021)
7. Michelson, A.M., and Todd, A.R. (1955) Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containin a 3':5'-internucleotidic linkage. *J. Chem Chem. Soc.* 2632 (resumen)
8. Smith, M., Rammler, D.H., Goldberg, I.H., and Khorana, G. (1961) Studies on polynucleotides. XIV. Specific synthesis of C_{3'}-C_{5'}-internucleotide linkage. Syntheses of uridylyl-(3''-5'')-uridine and uridylyl-(3''-5'')-adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 430 (resumen)
9. Schaller, H., Weimann, G., Lerch, B., and Khorana, G. (1963) Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribopolynucleotides. Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3'' phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3821 (resumen)
10. Letsinger, R.L., and Mahadevan, V. (1965) Oligonucleotide synthesis on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3526 (resumen)
11. McBride, L.J., and Caruthers, M.H. (1983) An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Letters* **24**(3):245-248. 10.1016/S0040-4039(00)81376-3
12. BioAutomation (2012) MerMade 4 DNA synthesizer user manual v2.3.7
13. Kaufman, J., Le, M., Ross, G., Hing, P., Budiansky, M., Yu, E., Campbell, E., Yoshimuraa, V., Fitzpatrick, V., Nadimi, K. (1993) Tritylmonitoring of automated DNA synthesizer operation by conductivity: a new method of real time analysis. *Biotechniques* **14**(5):834-839.



DRA. LAURA ONGAY LARIOS

Bióloga egresada de la Facultad de Ciencias de la UNAM, realizó estudios de posgrado, Maestría y Doctorado, en la Universidad de Southampton en Inglaterra.

Fue Profesor-Investigador durante 5 años en la Universidad de Guanajuato, México. Posteriormente

se incorporó al Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM, actualmente es Técnico Académico Titular C, Jefe de la Unidad de Biología Molecular (UBM) del IFC y pertenece al Sistema Nacional de Investigadores.

Desde su incorporación a la UBM se ha especializado en técnicas de Biología Molecular. Ha contribuido a la formación de recursos humanos como asesor de seis tesis de licenciatura y una de maestría, ha participado como profesor en diferentes cursos teóricos y teórico-prácticos en Biología Celular y Molecular, tanto de licenciatura, como de posgrado.

Proporciona asesoría especializada en técnicas de Biología Molecular y también ha dado varios entrenamientos en el uso y aplicaciones de equipos para la síntesis y secuenciación de ADN.

Ha publicado 29 artículos en revistas internacionales indizadas, 2 artículos en revistas nacionales y un capítulo de libro.