



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02811492.2

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1639356A

[22] 申请日 2002.5.3 [21] 申请号 02811492.2

[30] 优先权

[32] 2001. 5. 4 [33] FR [31] 01/06039

[86] 国际申请 PCT/FR2002/001542 2002. 5. 3

[87] 国际公布 WO2002/090584 法 2002. 11. 14

[85] 进入国家阶段日期 2003. 12. 8

[71] 申请人 比奥·麦利尤股份有限公司

地址 法国马西埃图瓦勒

共同申请人 约瑟夫福理埃大学(格勒诺布尔 1)
国家科学研究中心

[72] 发明人 C·鲍格特 M·柯特拉 J·洛姆

E·特里维希奥 A·拉扬

C·托拉 I·索提尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 周承泽

权利要求书 4 页 说明书 91 页

[54] 发明名称 标记和片段化 DNA 的方法

[57] 摘要

本发明涉及标记和片段化单链或双链脱氧核糖核酸的方法，包括如下步骤：a. 通过在所述 DNA 上制造至少一个脱碱基位点而化学片段化 DNA，b. 通过标记试剂的方式将标记物连接到至少一个片段上，所述的试剂共价而永久地偶联到所述片段的至少一个磷酸基上。本发明优选用于诊断领域。

1. 一种标记和片段化单链或双链脱氧核糖核酸(DNA)的方法，其特征在于，所述方法包括下列步骤：

- 5 — 通过在所述 DNA 上制造至少一个脱碱基位点而使 DNA 片段化，
- 通过标记试剂的方式将标记物连接到至少一个片段上，所述试剂主要是共价偶联到所述片段的至少一个磷酸基上。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述片段化和标记在两步中完成。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述片段化和标记在一步中完成。

10 4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中，所述脱碱基位点通过酸性含水介质的作用而产生。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中，所述酸性含水介质的 pH 低于 5，优选的是低于 4。

15 6. 如权利要求 5 所述的方法，其中，所述酸性含水介质是 pH 约为 3 的甲酸钠缓冲液。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的方法，其中，所述 DNA 至少含有一个能产生脱碱基位点的修饰碱基。

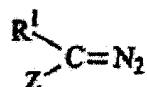
8. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述能产生脱碱基位点的修饰碱基选自 8-溴嘌呤衍生物。

20 9. 如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中，所述脱碱基位点通过烷基化试剂或氧化剂产生。

10. 如权利要求 1-9 中任一项所述的方法，其中，所述标记试剂含有一个作为反应官能团的基团，该基团选自如下化合物：叠氮甲基；烷基卤化物；亚硝基脲；氮杂环丙烷；氮丙啶；环氧化物；三氟甲烷磺酸盐。

25 11. 如权利要求 10 所述的方法，其中，所述标记试剂是 5-(溴甲基)-荧光素。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其中，所述标记试剂选自具有结构式(I)的化合物：

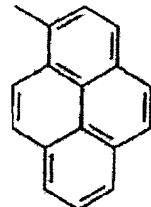


其中：

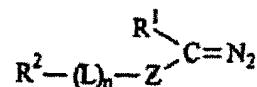
30 • R¹ 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，以及

• Z 代表可检测的标记物,

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, Z 是:



14. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述标记试剂选自具有结构式(2)的化
5 合物:



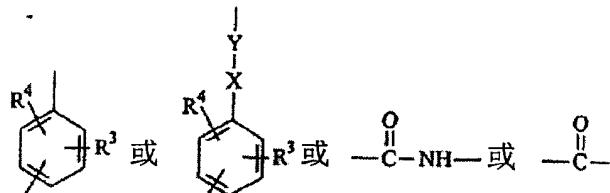
其中:

• R¹ 代表 H 或烷基, 取代的烷基, 芳基或取代的芳基,

• R² 是一个可检测的标记物,

10 • L 是一个连接臂, 含有一个至少有两个共价键的线形连接物, n 等于 0 或 1,
以及

• Z 选自以下基团:

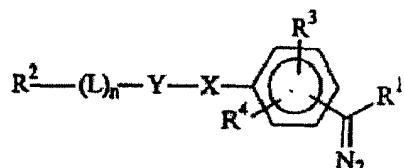


其中:

15 • R³ 和 R⁴ 分别代表: H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR,
COOR, R=烷基或芳基, 以及

• -Y-X- 代表 -CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中, 所述标记试剂具有结构式(3):



20 其中:

• R¹ 代表 H 或烷基, 取代的烷基, 芳基或取代的芳基,

• R² 是一个可检测的标记物，

• L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，

• R³ 和 R⁴ 分别代表: H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基，以及

5 • -Y-X-代表-CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-。

16. 如权利要求 14 和 15 所述的任何一种方法，其中，R² 是荧光化合物或半抗原。

17. 如权利要求 10-16 中任一项所述的方法，其中，所述标记试剂可溶于水溶性溶剂。

10 18. 一种检测单链或双链靶脱氧核糖核酸(DNA)的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

• 按照权利要求 1-17 中任一项所述的种方法片段化和标记所述 DNA，

• 使标记片段与至少一种核酸探针杂交，该探针对于靶核酸来说具有足够高的特异性，以及

15 • 用标记物检测形成的杂交物。

19. 检测如权利要求 18 所述双链靶脱氧核糖核酸(DNA)的方法，其特征在于，所述方法还包括片段化和标记后的变性步骤。

20. 如权利要求 19 所述的方法，其中，所述片段化，标记和变性在一步中完成。

21. 一种检测靶核酸的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

20 • 酶催化扩增靶核酸以产生大量双链 DNA 扩增子，

• 按照权利要求 1-17 中任一项所述的种方法片段化核昔标记所述 DNA 扩增子，

• 使标记片段与至少一种核酸探针杂交，该探针对于靶核酸来说具有足够高的特异性，以及

15 • 用标记物检测形成的杂交物。

22. 如权利要求 21 所述的方法，它还包括片段化和标记后的变性步骤。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其中，所述片段化，标记和变性在一步中完成。

24. 一种检测靶核酸在预先确定或非预先确定的位置上多态性分布的方法，该方法是通过检测所述靶核酸序列相对于所谓参考序列所具有的缺失和/或插入和/或突变，包括下列步骤：

30 • 制备一种含有整个所要研究的多态性的靶 DNA，所述 DNA 可随意选择一种酶催化扩增技术制备。

• 用权利要求 1-17 中任一项所述的种方法片段化和标记所述 DNA，

-
- 将所述的片段与多种称为捕获探针的核酸探针杂交，这些捕获探针附着在固体支持物上，并且至少完全涵盖了所要研究的多态性，
 - 用标记物检测标记片段与至少一部分核酸探针形成的杂交物并由此推断靶DNA的多态性。
- 5 25. 如权利要求 24 所述的方法，它还包括片段化和标记后的变性步骤。
26. 如权利要求 25 所述的方法，其中，所述片段化，标记和变性在一步中完成。
27. 如权利要求 24-26 中任一项所述的方法，其中，所述固体支持物至少含有 10 个不同序列的核酸探针，较好的是至少 400 个，最好的是至少 1000 个。
28. 用权利要求 1-17 中任一项所述方法标记的核酸片段在作为探针以检测靶核
10 酸中的应用。

标记和片段化 DNA 的方法

发明背景

本发明涉及片段化和标记 DNA 的方法，以及该方法的应用，特别是在诊断领域内的应用。

现有技术的描述

通过调查本领域的已有技术发现有很多的方法可以用于标记核酸。

第一种方法是将标记物附着于天然碱基或修饰上。第二种方法计划将标记物附着于糖基上，同样该碱基可以是天然的也可以是经过修饰的。第三种方法的目的在于把标记物附着于磷酸基上。

碱基的标记主要用于通过掺入直接标记的核苷酸来标记核酸。

糖基的标记常用于标记化学合成的寡核苷酸。

磷酸的标记常用于引入已被功能化的连接臂以及在化学合成寡核苷酸时引入标记物。

事实上，本领域的技术人员在标记核苷酸、核苷酸类似物或核酸时，更倾向于在碱基或糖基上附着标记物，因为这样更方便而且可以有更多的选择。事实上这些方法在许多文献的试验中都有描述，如与标记碱基有关的 EP-A-0, 329, 198, EP-A-0, 302, 175; EP-A-0, 097, 373; EP-A-0, 063, 879; US-A-5, 449, 767; US-A-5, 328, 824; WO-A-93/16094; DE-A-3, 910, 151; EP-A-0, 567, 841，或与标记糖基有关的 EP-A-0, 286, 898。

在磷酸上附着标记物的技术要比功能化碱基或糖基的技术复杂，现在被使用的已经少多了，主要是因为磷酸的低反应性(见 Jencks W. P. 等, J. Amer. Chem. Soc., 82, 1778-1785, 1960)。而且，在 O'Donnell 和 McLaughlin 的综述(“分析核酸的报告基团”，216-243 页，《生物有机化学：核酸》，Hecht S. M. 编，Oxford University Press, 1996)中，关于将探针引入寡核苷酸片段的方法，核苷间磷酸二酯键的有效烷基化被认为是不可能的。

第二个问题在于标记核酸，特别是大片段的核酸，也就是说超过核苷酸的核酸时将不得不与核酸探针杂交。这个问题与空间位阻或与核酸和核探针之间缺乏特异性有关。这将导致检测灵敏度下降。

空间位阻现象的出现可能不仅是由于核酸的长度，而且可能与二级结构的存在和保持也有关系。片段化可以使破坏这些结构成为可能，从而使杂交达到最优化。这种空间位阻在表面含有高密度的捕获探针的杂交中扮演特别重要的角色，例如有 Affymetrix 公司开发的 DNA 芯片 (Accessing Genetic Information with High-Density DNA arrays", M. Shee 等, Science, 274, 610-614. "Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis", A. Caviani Pease 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 5022-5026)。

关于核酸的片段化，本领域已有很多方法。

首先，片段化可以用酶催化的方法，就是说核酸的片段化可以用核酸酶 (DNases) 实现。

其次，片段化可以用化学的方法。例如，DNA 的片段化可以通过 DNA 的脱嘌呤或脱嘧啶作用，然后通过一种所谓的“ β -消除”机制实现。除此之外，DNA 的片段化还可以通过氧化、烷化和添加自由基等机制而实现。

最后，可以用物理的方法片段化，比如用超声降解法或光化学的方法。

难点是如何把片段化和标记这两步结合起来。

专利申请 WO-A-99/65926 描述了一种标记合成的或自然的核糖核酸 (RNA) 的方法，包括片段化 RNA 和在末端磷酸基标记。这份文献描述了大量能用于把标记和片段化结合起来的活波功能基团。这些功能基团可以标记 RNA，但为了有效的标记，必须把片段化的步骤与之相结合，因为在片段化过程中被释放出来的磷酸基团是标记的位点。此外，为获得有效的标记必须加入相对于 RNA 过量的标记试剂，这就会出现由于过量标记物的存在而产生背景噪音的问题。最后，这种方法并不适用于双链 DNA。

因此就需要有一种简单而有效的 DNA 标记技术以达到良好的标记率，因而有良好的敏感性，具有标记位点特异性，而且不影响通过氢键形成的双螺旋内碱基的杂交特性，最后还可以将 DNA 片段化以使这些标记的 DNA 片段杂交到核酸探针上，特别是吸附在固相支持物的核酸探针上。

发明概述

本发明描述的是标记和片段化单或双链脱氧核糖核酸 (DNA) 的方法，包括以下步骤：

- 通过在所述DNA上制造至少一个脱碱基位点而使DNA片段化，
- 通过标记试剂的方式将标记物连接到至少一个片段上，所述试剂主要是共

价偶联到所述片段的至少一个磷酸基上。

片段化和标记可以在一步或两步内完成，标记可以在片段化之前、之后或是同时进行。

优选的标记和/或片段化是在实质为均一的水溶液中进行。优选同时进行片段化和标记，也就是说这两步所需的试剂与核酸都混合到水溶液中。这种方式特别适于化学法和酶催化法进行的片段化过程中。对于用物理方式进行的机械片段化来说，标记和片段化同时进行意味着这种物理方法应用的溶液中至少包含有核酸和标记试剂。

所谓的实质为均一的水溶液可以被理解为溶液中至少含有 50% 的水。较好的这种溶液是含有盐的，如缓冲液。均一的溶液可以被理解为单相溶液，如水 / DMSO 溶液，与之对应的是两相溶液如水/氯仿溶液。

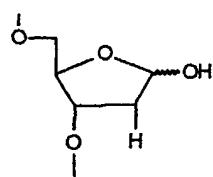
通过创造一个脱碱基位点片段化 DNA 可以用酶、化学或物理的方法进行。

利用化学途径进行 DNA 片段化是指通过将核酸与化学试剂接触而获得脱碱基位点。

通过 DNA 的脱碱基位点进行化学片段化的条件见文献 G. Pratviel 等, Angew. Chem. Int. Engl. 编, 34, 746–769 页, 1995; G. Pratviel 等, Adv. Inorg. Chem. , 45, 251–312 页, 1998; D. S. Sigman 等, Chem. Rev. , 93, 2295–2316 页, 1993; J. Lhomme 等, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences), 52, 65–83 页, 1999 的描述。

连接修饰的碱基和脱氧核糖的 N-糖苷键被水解，同时完整地保留磷酸酯键，这就创造了一个脱碱基的位点。这种现象被称为脱嘌呤(对于嘌呤来说)或者脱嘧啶(对于嘧啶来说)。脱嘌呤的频率要远高于脱嘧啶。

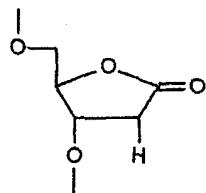
化学试剂如酸性 pH、氧化剂或烷化剂都能诱导脱嘌呤现象，从而形成脱碱基位点。这些烷化剂的亲电子基团可与 DNA 片段上的亲核位点发生反应，鸟嘌呤 7-位上的氮原子是 DNA 烷基化的首要位点。除了使嘌呤质子化之外，烷基化是一种能够使 N-糖苷键变得更不稳定的化学修饰。



脱碱基位点

DNA 的氧化也可以产生所谓的“碱性作用”的脱碱基损害导致 DNA 在特定位点的片段化。举个例子，羟基(OH)与 C1' 碳的反应可以导致核糖内酯(ribonolactone)

残基。



核糖内酯

脱碱基位点是非常不稳定的。在醛式结构中，吸附在 3'-位置的磷酸二酯很容易发生 β -消除，从而导致 DNA 链的片段化。

脱嘌呤在生理条件下 (pH7.4, 37°C) 可以自发进行，但反应发生率很低，大约每秒 3×10^{-11} 次脱嘌呤作用，也就是说不适合于有效的片段化。为提高反应速度，可使 N-糖苷键变脆的烷化试剂和诸如 DNA 糖基化酶都可被采用。

片段化的优选实施方式是在酸性 pH 条件进行，也就是说 pH 要低于 5，更优选的 pH 大约为 3。

按照本发明的方法，pH 为 3 的甲酸钠缓冲液就可以使核酸有效片段化。该缓冲液与一步标记的反应条件相一致，这在实施例中将被证实。更好的反应是在酸性介质 (HC1, 碳酸盐, H₂SO₄) 中进行。

在本发明的某些特定实施方式中，为了进一步提高片段化的效率，所用的脱氧核糖核酸至少含有一个能更容易产生脱碱基位点的修饰碱基。

各种修饰碱基都可以被采用，如 N7-烷基嘌呤，N3-烷基嘌呤，06-烷基嘌呤，8-溴嘌呤，8-硫代嘌呤，8-烷基硫代嘌呤，8-叠氮基嘌呤 或 8-烷基磺酰基嘌呤这样的。

在用酶催化扩增技术如 PCR 制备标记核酸的实施例中，使用 8-溴嘌呤可以使所述核苷在扩增过程中有效掺入成为可能，从而可以在保持酶扩增步骤的高敏感性的同时相应地改善本发明的片段化和标记方法。8-甲硫基嘌呤也可被掺入而不影响 PCR 扩增和掺入的效率。修饰碱基被掺入以后，硫醚碱基被过酸或单过硫酸盐衍生物如过氧单硫酸钾氧化成相应的不稳定的磺酰基。已证实，水解一个 8-甲磺酰鸟嘌呤核苷的半寿期少于两分钟，其天然同源物的半寿期是 1000 个小时。

所谓的标记物可以被理解为至少有一个标记物能直接或间接产生可检测的信号。这些标记物包括但不限于：

- 通过比色法、荧光法、激发光法能产生可检测信号的酶，如山葵过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，
- 发色团如荧光、激发光或色素混合物，

- 可通过电子显微镜检测电子密度或通过其电子特性如传导性、电流分析法、伏安测量法、阻抗等而被检测的基团，
- 可检测的基团，例如分子有足够的尺寸来诱导它们的物理或化学特征产生可检测的修饰，这类检测可用光学法如衍射、细胞质基因组的表面共振、表面变化、接触角度变化或物理方法如原子力分光镜检查，隧道效应，
- 放射性同位素如³²P、³⁵S 或 ¹²⁵I。

优选没有放射性的标记物，以避免与这些标记物有关的安全问题。

在本发明的某些特定实施方式中，标记物可用电化学方法检测，尤其在标记物是一种铁复合物的衍生物如二茂铁时。

间接的方法也可被采用，例如，能与抗配基反应的配体。配基和抗配基对是本领域技术人员所熟知的，例如以下的配对：生物素/链亲和素，半抗原/抗体，抗原/抗体，肽/抗体，糖/凝集素，多聚核苷酸/多聚核苷酸的互补链。在这些例子中，它是带有活波功能基团的配基。抗配基可以通过上述段落里描述的标记物直接检测出来，也可以通过另一个配体/抗配体对被检测。

间接系统的另一个例子采用配基和抗配基之间的特异性共价键，例如甲基酮和烷氨基胺。专利申请 WO-A-00/40590 和 WO-A-98/05766 描述了这种检测系统。

在本发明的方法种，标记试剂和核苷酸之间的连接是共价的，但非共价的相互作用也被用于某些特定的堆集系统或标记物被间接检测的例子里。因而术语“附着”涵盖了各种可能性。

在某些特定的条件下这种间接检测可能导致信号的放大，参见前述的专利申请 WO-A-00/07982，WO-A-01/92361 和 WO 95/08000 使用聚合物进行化学扩增的实施例或专利申请 WO-A-01/44506 所用的堆集化学扩增系统的实施例。

在信号放大的某些特定实施方式中，标记试剂至少含有两种标记物。

在本发明的优选特定实施方式中，示踪剂是一种低空间位阻的荧光化合物，如荧光素，DANSYL，IR 形式(Li-COR Inc., Lincoln NE, USA)的发色团，青色素的衍生物如 Cy5 和 Cy3(Randolph J. B. 等, Nucleic Acids Res., 25(14), 2923-2929 页, 1997)，特别是 Cy5 的衍生物，示踪剂也可以是一种低空间位阻的半抗原如生物素或者松香烷的衍生物(见专利申请 WO-A-00/07982)。低空间位阻的意思也可以理解为分子重量低于 1000 g/mol。

在荧光发色团的例子中，优选激发波长超过 450 nm 的荧光发色团，超过 600 nm 的更为适宜。

在示踪剂是半抗原的案例中，半抗原自身不产生信号，例如生物素，其检测是

通过与上述的抗配基的反应而实现的。在生物素的案例中，链亲和素或一个抗生物素抗体结合到一个荧光复合物上，优选荧光素，Cy5 或藻红蛋白。在松香烷的案例中，采用的是如 WO-A-00/07982 所描述的单克隆抗体。

术语“脱氧核糖核酸”或 DNA 是指至少含有 2 个脱氧核糖核苷酸的连续序列，并且至少有一个修饰的核苷酸，例如至少有一个核苷酸含有修饰碱基，如次黄嘌呤核苷，甲基-5-脱氧胞苷，二甲氨基-5-脱氧尿嘧啶核苷，脱氧尿嘧啶核苷，二胺-2, 6-嘌呤，溴-5-脱氧尿嘧啶核苷或其它可交的修饰碱基。

DNA 也可以在核苷内键的水平上修饰，如 phosphorothioates, H-磷酸基，烷基磷酸基，或在主链水平例如 α -寡核苷酸 (FR-A-2 607 507) 或 PNAs (M. Egholm 等, J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992)。DNA 可以是天然的，也可以是人工合成的，和/或是一个片段的形式。DNA 可以是单链或双链。

在某些特定情况下 DNA 可以通过酶催化扩增技术制备，如：

• PCR(聚合酶链式反应)，在专利 US-A-4683195, US-A-4683202 和 US-A-4 800159 中有描述，及其衍生出的 RT-PCR(反转录-PCR)，特别适用于一步法，如专利申请 EP-A-0 569 272 所描述的。

- LCR(连接酶链式反应)，例如专利申请 EP-A-0 201 184 所描述。

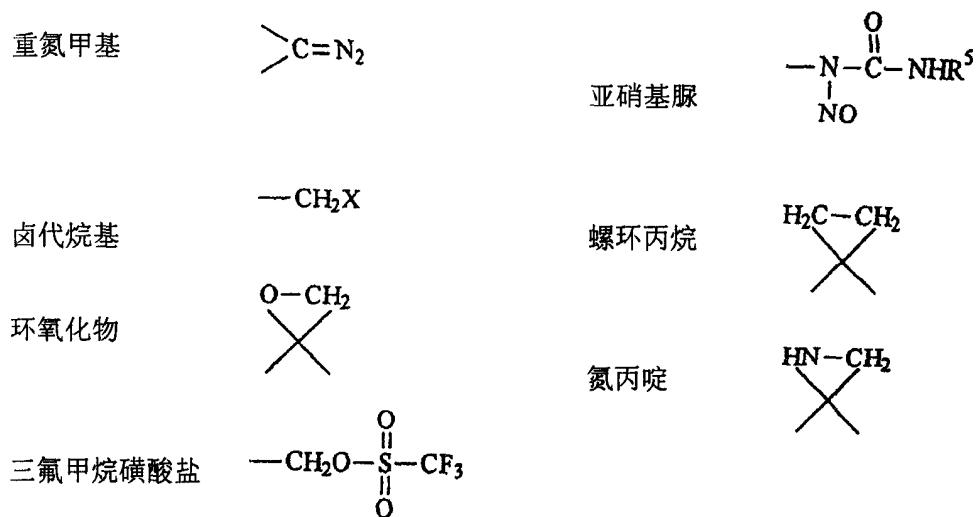
- RCR(修复链式反应)，专利申请 WO-A-90/01069 中有描述。

术语扩增子用于定义用酶催化扩增技术所制备的 DNA。DNA 也可以含有少量的核糖核苷酸，例如低于 10%。

这些修饰方法可以结合使用，只要 DNA 中至少含有一个磷酸基。

标记试剂含有作为活波功能基团的基序，这些基序选自：叠氮甲基，烷基卤化物，亚硝基脲，螺旋环丙烷，氮丙啶，环氧化物，三氟甲烷磺酸盐。

反应功能基团描述如下：



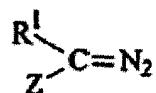
烷基卤化物活波功能基团 X 可以是 Br, Cl 或 I。优选的标记试剂是 5-(溴甲基) 荧光素。

亚硝基脲活波功能基团 R⁵ 是一个烷基或 H。

叠氮甲基功能基团已经被用于磷酸基团的烷基化作用，但是存在一些问题。其一，通常叠氮衍生物自身是不稳定的，用其作为标记试剂盒的标记试剂就会出现问题，其二，偶合产物是不稳定的，如果用标记产物来检测样品中是否存在生物靶分子，或者要检测的是标记靶位，则可排除用其作为标记试剂的可能性。

最后，带有叠氮甲基功能基团的衍生物是不溶于水的，这就需要采用双相的条件来结合只在水或水性缓冲液中溶解和稳定的核酸，但是这些条件减慢了反应速度因此阻碍了结合的效率。

在本发明的优选实施方式中，标记试剂选自具有结构式(1)的化合物：

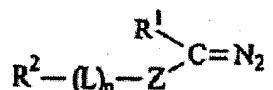


其中：

- R¹ 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，以及
- Z 代表一个可检测的标记物，

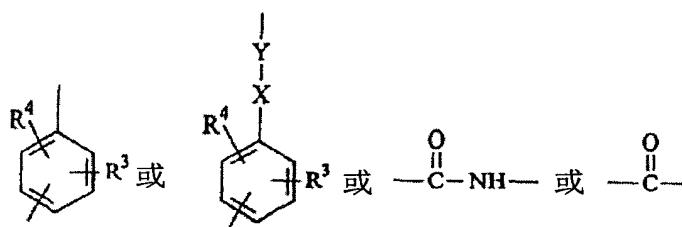
Z 和/或 R¹ 的选择是为了稳定叠氮甲基功能基团，也就是说两个基团中至少有一个含有苯核。

标记试剂优选具有结构式(2)的化合物：



其中：

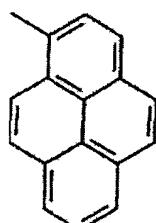
- R¹ 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R² 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，以及
- Z 选自以下基团：



其中：

- R³ 和 R⁴ 分别代表: H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基, 以及
- -Y-X- 代表 -CONH-, -NHC0-, -CH₂O-, -CH₂S-。

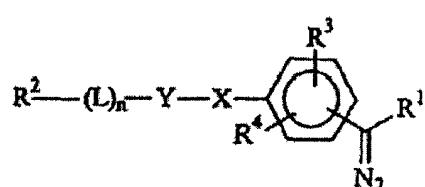
在结构式(1)的某些特定实施方式中, Z 有以下结构:



在这个案例中, 以及如果 R² 是 H, 标记试剂是 1-芘基叠氮甲烷(PDAM)。

虽然这个标记物是荧光物质, 但其激发波长太接近核酸了。一种采用抗芘基序的单克隆抗体进行间接检测是较好的。制备这种抗体的方法是本领域技术人员所熟知的(如专利申请 WO-A-00/07982)。

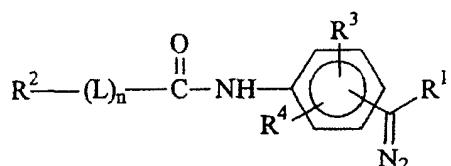
在本发明的一个优选实施方式中, 标记试剂是具有结构式(3)化合物:



其中:

- R¹ 代表 H 或烷基, 取代的烷基, 芳基或取代的芳基,
- R² 是一个可检测的标记物,
- L 是一个连接臂, 含有一个至少有两个共价键的线形连接物, n 等于 0 或 1,
- R³ 和 R⁴ 分别代表: H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基, 以及
- -Y-X- 代表 -CONH-, -NHC0-, -CH₂O-, -CH₂S-。

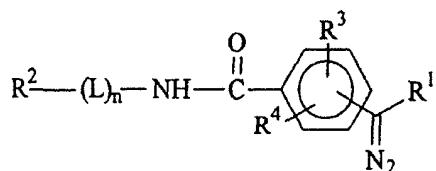
较好的标记试剂是具有结构式(4)的化合物:



其中：

- R¹ 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R² 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，
- R³ 和 R⁴ 分别代表：H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基，以及
- -Y-X- 代表 -CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-。

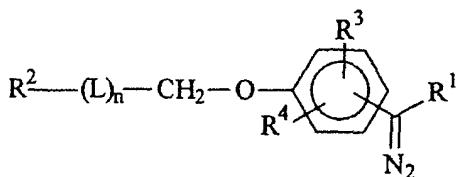
较好的标记试剂是具有结构式(5)的化合物：



其中：

- R¹ 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R² 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，
- R³ 和 R⁴ 分别代表：H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基，以及
- -Y-X- 代表 -CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-。

较好的标记试剂是具有结构式(6)的化合物：



其中：

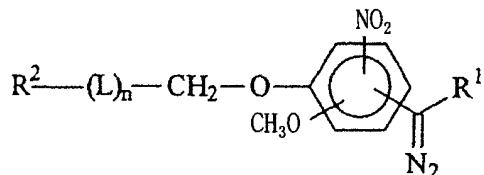
- R¹ 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R² 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，
- R³ 和 R⁴ 分别代表：H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR², R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基，以及

COOR, R=烷基或芳基, 以及

- -Y-X-代表-CO NH-, -NHC O-, -CH₂O-, -CH₂S-。

在上述结构式(3)到(6)中, R³和R⁴分别优选: H, NO₂, OCH₃。

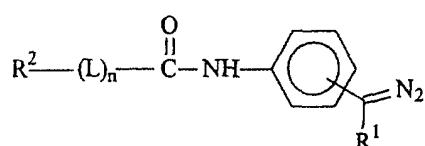
因此, 结构式(6)相应的优选化合物是具有结构式(6')的化合物:



其中:

- R¹代表H或烷基, 取代的烷基, 芳基或取代的芳基,
- R²是一个可检测的标记物,
- L是一个连接臂, 含有一个至少有两个共价键的线形连接物, n等于0或1。

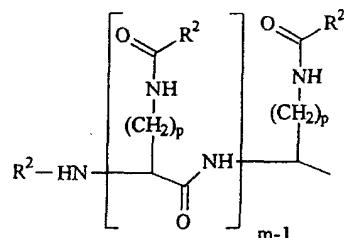
结构式(4)相应的优选化合物是具有结构式(4')的化合物::



其中:

- R¹代表H或烷基, 取代的烷基, 芳基或取代的芳基,
- R²是一个可检测的标记物,
- L是一个连接臂, 含有一个至少有两个共价键的线形连接物, n等于0或1。

在本发明的某些特定实施方式中, 希望信号被放大, 因此在标记试剂里至少含有两个标记物。因此本发明能够将信号放大的试剂具有如结构式(7)的R²-(L)_n-结构:

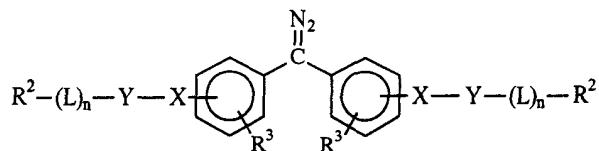


其中:

- R²代表一个可检测标记物。
- m是一个1到100的整数, 优选1到20,
- p是一个1到10的整数, 优选2到6, 最优选4。

这个 $R^2-(L)_n$ 结构与上述结构(2)到(6)在应用上没有差别。

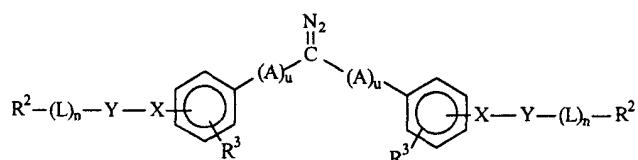
其它优选的具有信号放大功能的试剂是具有结构式(8)的试剂：



其中：

- R^2 代表一个可检测标记物，
- R^3 代表 H, NO_2 , Cl, Br, F, I, OR, SR, NR^2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，
- $-Y-X-$ 代表 $-CONH-$, $-NHC0-$, $-CH_2O-$, $-CH_2-$ 。

较好的具有信号放大功能的试剂是具有结构式(9)的试剂：

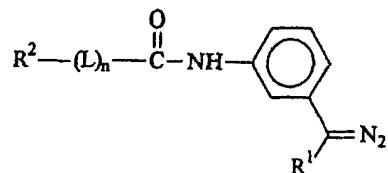


其中：

- R^2 代表一个可检测标记物，
- R^3 代表 H, NO_2 , Cl, Br, F, I, OR, SR, NR^2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, R=烷基或芳基, R^3 优选 H, NO_2 或 OCH_3 ,
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1，
- $-Y-X-$ 代表 $-CONH-$, $-NHC0-$, $-CH_2O-$, $-CH_2-$ 。

本发明的其他一些优选试剂有：

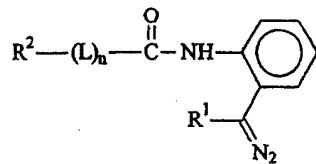
a) 具有结构式(10)的试剂：



其中：

- R^1 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R^2 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1。

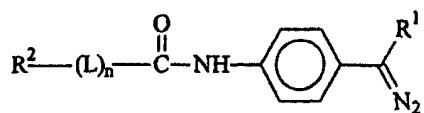
b) 具有结构式(11)的试剂：



其中：

- R^1 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R^2 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1。

c) 具有结构式(12)的试剂：

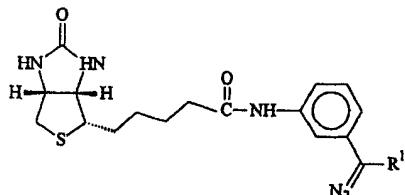


其中：

- R^1 代表 H 或烷基，取代的烷基，芳基或取代的芳基，
- R^2 是一个可检测的标记物，
- L 是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n 等于 0 或 1。

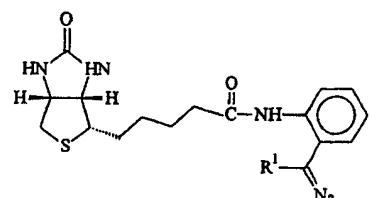
优选的标记试剂含有：

a) 结构



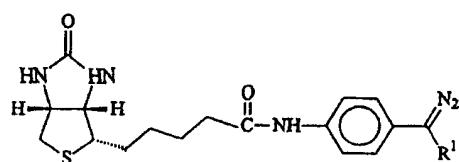
其中， R^1 代表一个甲基或一个苯基，或

b) 结构



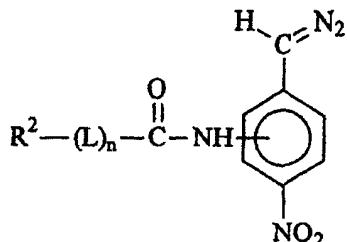
其中， R^1 代表一个甲基或一个苯基，或

c) 结构



其中，R¹代表一个甲基或一个苯基。

本发明的其他优选试剂具有结构式(13)：



其中：

- R²代表一个可检测的标记物，
- L是一个连接臂，含有一个至少有两个共价键的线形连接物，n等于0或1。

在本发明的某些特定实施方式中，标记试剂溶于水溶性的极性试剂如 DMF，DMSO，CH₃CN，THF，DMA(二甲乙酰胺)，NMP(N-甲基吡咯烷酮)，DME(二甲氧基乙烷)。

优选的标记试剂是可溶于 DMSO 或水中的。

所谓的水溶性溶剂可以理解为是至少可以5%的体积比溶与水或含盐的水性缓冲液混合的溶剂。

在前述结构式中，优选的L臂含有一个乙烯甘油或聚乙烯甘油基序以增加试剂在水中的溶解度。

因此这些试剂可以与匀相溶液中的核酸结合，匀相溶液是含有实质为水溶性的溶液，也就是说，至少含有50%的水。

本发明的目的之一是描述一种检测单链或双链靶脱氧核糖核酸(DNA)的方法，该方法包括：

- a) 按照上面所述任一方法片段化和标记所述DNA，
- b) 用至少一个能与靶核酸高效特异结合的核酸探针与标记片段杂交，
- c) 用标记物检测形成的杂交物。

在实施例中已证实，DNA杂交前变性可以提高敏感性。变性的步骤在片段化和标记后进行。

在本方法的特定实施方式中，酶催化扩增步骤是在片段化和标记之前。酶催化扩增步骤可以从一个靶DNA核酸也可以从一个靶RNA核酸如信使RNA，转运RNA或核糖体RNA中制备DNA扩增子。例如，已知的RT-PCR技术就是用于扩增RNA的。

优选的片段化、标记和杂交步骤是同时进行的，模板可以是天然的核酸，也可以是通过酶催化扩增技术制备的核酸。

通过产生脱碱基位点而进行的片段化会导致一个碱基的丢失。在检测靶核酸的

方法中，特别是在基因分型的方法，即靶核酸序列呈现多态性的方法中，需要鉴别序列的多种修饰，其中的一些修饰是靶核酸与核酸探针之间的单个碱基修饰，该核酸探针用于检测这种修饰(捕获探针)。因此本文中特异性是最基本的。令人惊讶的是，本发明证实单个碱基的丢失对根据本发明的方法制备的标记和片段化的核酸的杂交特异性无任何影响。

本发明还涉及一种检测靶核酸在预先确定或非预先确定位置上多态性分布的方法，该方法是通过检测所述靶核酸序列相对于所谓参考序列所具有的缺失和/或插入和/或突变，包括下列步骤：

- a) 制备一种含有整个所要研究的多态性的靶DNA，所述DNA可随意选择一种酶催化扩增技术制备。
- b) 按照权利要求1到17所述的任何一种方法标记和片段化所述DNA，
- c) 将所述的片段与多种被称为捕获探针的核酸探针杂交，这些捕获探针是被附着在固体支持物上，并且完全涵盖了所要研究核酸的多态性，
- d) 用标记物检测标记片段与至少一部分核酸探针形成的杂交物，从而推断出靶DNA的多态性。

前面指出，片段化和标记步骤之后的变性步骤可能提高方法的敏感性，因此优选的是这一步与标记和片段化同时进行。

本发明的片段化和标记方法特别适用于与一段核酸杂交的标记和片段化的DNA，尤其是寡核苷酸，这些核酸吸附在固体支持物的预定位置上以构成DNA芯片。术语“DNA”芯片可以理解为在预定位置上的吸附有各种捕获探针的小尺寸固相载体。术语“各种”可以理解为一个固相载体上吸附有至少十个具有不同序列的核酸探针，较好的为至少400个，更好的为至少1000个。

吸附在固相载体上的核酸的密度确实是杂交过程中的一个主要位阻因素，因而片段化有助于改善杂交步骤的效果。这些DNA芯片的实施例在系列文献中有描述，如，G. Ramsay, Nature Biotechnology, 16, 40-44页, 1998; F. Ginot, Human Mutation, 10, 1-10, 1997页; J. Cheng等, Molecular diagnosis, 1(3) ~ 183-200页, 1996; T. Livache等, Nucleic Acids Research, 22(15), 2915-2921页, 1994; J. Cheng等, Nature Biotechnology, 16, 541-546页, 1998。本文所用的术语“固相载体”包括各种能够吸附核酸的材料。固相载体可以是微量滴定板、膜、微粒或实质平板。

本发明涉及标记DNA应用，如前所述，可以用作检测靶核酸的探针。

为了检测和/或定量和/或纯化靶核酸，标记DNA应该能够与核酸探针形成杂交

复合物。经由实施例证实，标记核酸与靶 DNA 充分互补以形成特异性杂交复合物依赖于反应的条件，特别是温度和反应介质的盐浓度。

检测方法适用于序列分析，信使 RNA 的表达谱或以研究为目的的突变筛选和制药企业的药物筛选，传染性疾病(细菌学，病毒学和寄生虫学)或基因疾病的诊断，食品或工业质量控制。

许多文献描述了这类应用：Antoine de Saizieu 等，Nature Biotechnology, 16, 44-48 页, 1998; Thomas R. Gingeras 等, Genome Research, 8, 435-448 页, 1998; David J. Lockhart 等, Nature Biotechnology, 14, 1675-1680 页, 1996; Daniel D. Shoemaker 等, Nature Genetics, Vol. 14, 450-456 页, 1996; R. J. Lipshutz 等, BioTechniques, 19(3), 442-447 页, 1995; David G. Wang 等, Science, 280, 1077-1082 页, 1998; Kevin L. Gunderson 等, Genome Research, 8, 1142-1152 页, 1998; Joseph G. Hacia0360 等, Nature Genetics, Vol. 14, 441-447 页, 1996。

诊断领域的趋势，特别是传染性疾病(如 AIDS 和结核病)，要把检测的敏感性提高？到从几毫升如血、尿和脑脊液这样的液体样本中检测出一个单分子的水平。只有所有的步骤，从样本的采集到结果的发布都达到最优化才能得到这样的敏感性水平。特别是在需要用酶催化扩增步骤来获得必须的敏感性的例子(病毒或细菌性传染病如 HIV, HCV 或结核病)中，本发明的标记和/或片段化方法不会影响扩增技术的敏感性，因为不需要取代在酶催化扩增技术中的脱氧核糖核酸，或者掺入的脱氧核糖核酸不会影响敏感性。

另外的信息可以从申请者于 2001 年 5 月 4 日提交的注册号为 FR 01/06040 的另一个专利申请，以及在与本发明同一天提交的国际专利申请中可以找到。

附图简述

将附图与实施例结合描述只是代表了某些特定的实施方式，并不意味着对本发明范围的限制。

图 1 显示的是本发明中使用的各种试剂的结构式及其名称缩写(o-代表邻位, m 代表间位，以及 p 代表对位)。

图 2A 到 2I 显示的是时间对按照实施例 6.1 描述的方法进行的携带叠氮甲基功能基团的试剂与尿嘧啶 3'-单磷酸共价偶合的影响，所用的分析方法是毛细管电泳。其中的试剂如下：

- PDAM, 见图 2A,
- DPQAM, 2 mM(毫摩尔每升), 见图 2B,

- DPDAM, 20 mM , 见图 2C,
- PMDAM, 见图 2D,
- NPDAM, 见图 2E,
- BioDPDAM, 见图 2F,
- 间-BioPMDAM, 见图 2G,
- 对-BioPMDAM , 见图 2H,
- 邻-BioPMDAM, 见图 2I。

图 3A 到 3D 显示的是时间对按照实施例 6. 2 描述的方法进行的携带叠氮甲基功能基团的试剂与四种核苷 3'-单磷酸共价偶合的影响, 所用的分析方法是毛细管电泳。其中的核苷酸如下:

- 核糖核苷酸中的 3' -CMP, 见图 3A,
- 核糖核苷酸中的 3' -AMP, 见图 3B,
- 核糖核苷酸中的 3' -GMP, 见图 3C,
- 脱氧核糖核苷酸中的 3' -TMP, 见图 3D。

图 4 显示的是时间对按照实施例 6. 3 描述的方法进行的间-BioPMDAM 试剂二核苷 5'-ApUp 反应的影响, 所用的分析方法是毛细管电泳。

图 5A 到 5D 显示的是实施例 6. 4 中间-BioPMDAM 试剂与四种核糖核苷 3' -单磷酸之间各种连接的 D₂O 中的质子 NMR 光谱。其中的核糖核苷酸如下:

- 3' -GMP , 见图 5A,
- 3' -AMP , 见图 5B,
- 3' -CMP , 见图 5C, 以及
- 3' -UMP , 见图 5D。

图 6 显示的是一种标记试剂的合成流程, 该试剂携带两种用于信号化学放大的生物素。

图 7 显示在酸性介质中通过形成一个脱碱基位点而片段化的机制。

图 8 显示是各种修饰核苷(8-溴-2' -脱氧腺苷(8-BrdA)和 5-溴-2' -脱氧胞苷(5-BrdC)以及四种天然核苷(dA, dC, dG 和 dT)在酸性 PH 条件下的降解动力学, 如实施例 8. 1 所述。结果用起始核苷的水解百分率(Y 轴)与以分钟计的反应时间(X 轴)之间的关系表示。

图 9 显示的是在温度为 60°C 的条件下, 时间对 PDAM 试剂标记合成的 ODN5' -磷酸动力学的影响, 如实施例 11. 2 所描述。结果用标记百分率(Y 轴)与以分钟计的反应时间(X 轴)之间的关系表示。

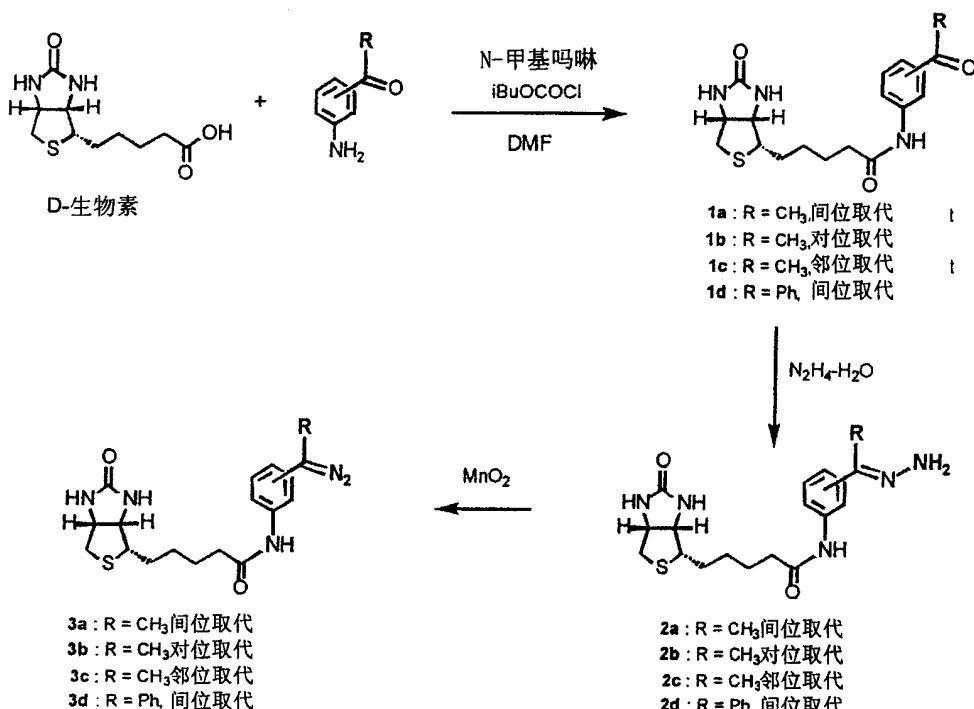
图 10 显示的是反应温度对标记百分率的影响，如实施例 11.3 所描述，。结果如图 10 所显示，标记百分率在 Y 轴上，反应温度(℃)在 X 轴上。

图 11 描述的是利用商用 5-硝基香草醛合成具有结构式 4` 的试剂的路线。醛功能基团是叠氮甲基功能基团的前体。

优选实施方式的描述

实施例 1：用生物素合成试剂：

普通合成流程：



实施例 1.1：间-BioPMDAM 的合成：

• 化合物生物素间-苯乙酮 1a:

将 D-生物素(1.0 克(g), 4.1 毫摩尔 mmol))溶解到 45 毫升(ml)预加热的无水 DMF 中。氩气下混合物冷却至 0°C，然后相继加入 N-甲基吗啉(590 微升(μl), 5.33 mmol)和异丁基氯甲酸盐(840μl, 6.60 mmol)。混合物持续搅拌 30 分钟(min)，然后加入溶于 10mlDMF 的 3-氨基苯乙酮(824mg, 6.10mmol)和 N-甲基吗啉(480μl , 4.35 mmol)。溶液在 0°C持续搅拌 2 小时(h)，然后蒸发干燥。残留物收集到 3ml MeOH 中，然后加入 50ml 水。过滤获得沉淀，用水、CH₂Cl₂ 和乙醚洗涤，得到 1.2g(80 %)粗产物 1a，从 MeOH-H₂O 对中重结晶得到白色粉末状产物 1a(1.01g, 70%)。

熔点 145°C-IR(KBr)：3280, 2931, 2857, 1691, 1590, 1540, 1487, 1434, 1298, 1266 cm⁻¹。¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆)δ= 1.3–1.7(m, 6H); 2.33(t, J=8 Hz, 2H); 2.55(s, 3H); 2.58; (d, J=12 Hz, 1H); 2.83(dd, J=12 和 5 Hz, 1H); 3.13(m,

1H)；4.15(m, 1H)；4.31(m, 1H)；6.34(s, 1H)；6.41(s, 1H)；7.44(t, J=8 Hz, 1H)；7.64(d, J=8 Hz, 1H)；7.85(d, J=8 Hz, 1H)；8.17 .(s, 1H)；10.05(s, 1H). - MS(FAB/甘油), m/z: 362 [M+H]⁺。

化合物间-腙 2a:

将 1a(500 mg, 1.38 mmol) 和溶于无水乙醇(8 ml)中的一水合肼(200μl, 4.15 mmol)混和后回流加热 2h。冷却至室温后, 过滤得到白色沉淀物, 沉淀物先用水洗涤, 然后用乙醚洗涤并干燥。从而得到 385 mg(74%)白色粉末状产物 2a。

熔点 185°C-IR(KBr): 3298, 2931, 2857, 1698, 1665, 1626, 1541, 1494, 1470, 1446, 1330, 1265 cm⁻¹. ¹H NMR{(300 MHz, DMSO-d₆)δ= 1.3–1.7(m, 6H)；1.98(s, 3H)；2.26(t, J=8 Hz, 2H)；2.56(d, J=12 Hz, 1H)；2.81(dd, J=12 和 5 Hz, 1H)；3.11(m, 1H)；4.13(m, 1H)；4.29(m, 1H)；6.39(s, 3H)；6.42(s, 1H)；7.22(m, 2H)；7.50(d, J=8 Hz, 1H)；7.84(s, 1H)；9.82(s, 1H). -MS(FAB/甘油), m/z: 376 [M+H]⁺

化合物间-重氮甲烷 3a:

2a(180 mg, 0.48 mmol)溶于 2ml DMF 中, 然后加入 MnO₂(340 mg, 3.9 mmol)。室温下搅拌 30 分钟后, 混合物用含硅藻土(厚度: 0.5 cm)和 3 分子筛(0.5 cm)的烧结的漏斗过滤。反应混合物浓缩到 0.5ml, 然后加入 5ml 乙醚。过滤后得到沉淀物, 沉淀物用水洗涤然后干燥。得到粉红色粉末状化合物 3a(170 mg, 95%)。

熔点 160°C-IR(KBr): 3278, 2935, 2859, 2038, 1704, 1666, 1605, 1577, 1536, 1458, 1430, 1263 cm⁻¹. ¹H NMR(300 MHz)δ= 1.3–1.7(m, 6H)；2.11(s, 3H)；2.28(t, J=8 Hz, 2H)；2.57(d, J=12 Hz, 1H)；2.81(dd, J=12 和 5 Hz, 1H)；3.11(m, 1H)；4.13(m, 1H)；4.29(m, 1H)；6.33(s, 1H)；6.41(s, 1H)；6.60(m, 1H)；7.25(m, 3H)；9.84(s, 1H)。

实施例 1.2: 对-BioPMDAM 的合成:

- 化合物生物素对-乙酰苯 1b:

将 D-生物素(1 g, 4.1 mmol)溶于 45ml 预热的无水 DMF 中。混合物在氩气下冷却至 0°C, 然后相继加入 N-甲基吗啉(590μl, 5.33 mmol)和氯甲酸异丁酯(840μl, 6.60 mmol)。混合物持续搅拌 30 分钟, 然后加入 4-氨基乙酰苯(824 mg, 6.10 mmol)。溶液在 0°C 下持续搅拌 2h, 然后蒸发干燥。残留物收集到 50ml 水中。过滤得到沉淀物, 先水洗涤, 然后用 50ml 预热的 MeOH 洗涤。将得到的白色沉淀物边加热边溶于 DMF, 然后将得到的溶液过滤并用 MeOH 洗涤。回收过滤物蒸发干燥得到

888mg 1b (2.46 mmol, 60%)。

熔点 260°C - IR (KBr) : 3260, 2930, 2358, 1706, 1673, 1610, 1526, 1401, 1380, 1322, 1257, 1150 cm⁻¹. -¹H NMR { (200 MHz, DMSO-d₆) δ= 8.82 (s, 1H, NH-CO); 7.57 (d, 2H, J=9 Hz, Ar-H); 6.83 (d, 2H, J=9 Hz, Ar-H); 6.40 (宽 (broad) s, 1H, NH-CO-NH); 6.32 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 4.28 (m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.12 (m, 1H, CH-CH-NH); 3.11 (m, 1H, CH-S); 2.80 和 2.55 (ABX 系统, 2H, 2J_{AB}=5 Hz, ³J_{Ax}=12 Hz, ³J_{sx}=0 Hz, CH₂-S); 2.35 (t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 2.10 (s, 3H, CH₃); 1.60-1.34 (m, 6H, (CH₂)₃) }

• 化合物对-脲 2b:

将化合物 1b (870 mg, 2.4 mmol) 溶于预热的乙醇 (99%, 8 ml) 中, 然后加入一水合肼 (995 μl, 19.5 mmol)。溶液回流加热 3h。将得到的白色沉淀物过滤并用冰水洗涤。从而得到 820mg (90%) 白色粉末状的产物 2b。

熔点 305°C - IR (KBr) : 3281, 3183, 2930, 2857, 1698, 1658, 1593, 1521, 1459, 1401, 1325, 1263, 1187 cm⁻¹. -¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ=9.68 (s, 1H, NH-CO); 7.52 (s, 4H, J=9 Hz, Ar-H); 6.43 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 6.35 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 6.21 (s, 2H, NH₂); 4.29 (m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.12 (m, 1H, CH-CH-NH); 3.12 (m, 1H, 1CH-S); 2.81 和 2.56 (ABX 系统, 2H, 2J_{AB}=5 Hz, ³J_{Ax}=12 Hz, ³J_{Bx}=0 Hz, CH₂-S); 2.32 (t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 1.97 (s, 3H, CH₃); 1.63-1.36 (m, 6H, (CH₂)₃)。

• 化合物对-重氮甲烷 3b:

2b (200mg, 0.53 mmol) 溶于 10ml DMF 中。然后加入 800mg MnO₂。搅拌 10 分钟后, 用硅藻土 (0.5cm)-分子筛 (0.5cm 粉状形式) 的混合层过滤。反应混合物蒸发干燥, 然后用乙醚洗涤并干燥。得到粉红色粉末状化合物 3b (190mg, 96%)。

熔点 180°C - IR (dec) : 3257, 2930, 2857, 2032, 1698, 1597, 1524, 1510, 1455, 1404, 1307, 1259, 1180 cm⁻¹. -¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ=10.18 (s, 1H, NH-CO); 7.88 (d, 2H, J=6 Hz, Ar-H); 7.7 (d, 2H, J=6 Hz, Ar-H); 6.41 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 6.34 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 4.28 (m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.12 (m, 1H, CH-CH-NH); 3.11 (m, 1H, CH-S); 2.80 和 2.55 (ABX 系统, 2H, 2J_{AB}=5 Hz, ³J_{Ax}=12 Hz, ³J_{Bx}=0 Hz, CH₂-S); 2.35 (t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 2.10 (s, 3H, CH₃); 1.60-1.34 (m, 6H, (CH₂)₃)。

实施例 1.3 邻-BioPMDAM 的合成:

• 化合物生物素邻-乙酰苯 1c:

将 D-生物素(1g, 4.1mmol)溶于 45ml 预热的无水 DMF 中。氩气环境下将混合物冷却至 0°C。然后连续加入 N-甲基吗啉(590μl, 5.33mmol)和异丁基氯甲酸酯(840μl, 6.60mmol)。混合物持续搅拌 30 分钟后，加入 2-氨基乙酰苯(824mg, 6.10mmol)。溶液在室温下持续搅拌 3h 30min，然后蒸发干燥。残留物收集到 50ml 水中。过滤得到沉淀物，先用水洗涤，然后用 50ml 预热的 MeOH 洗涤。过滤得到沉淀物，用水洗涤。将产物溶于预热的 MeOH 中使之重结晶，然后加入水使之重新沉淀。过滤得到沉淀物，先用水洗涤后再用乙醚洗涤，得到 1.1g(2.95mmol, 72%)粗产物 1c。

熔点 150°C - IR(KBr): 3248, 2930, 2857, 2359, 1691, 1669, 1651, 1582, 1528, 1448, 1354, 1310, 1245, 1161 cm⁻¹. -¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆) δ= 11.24(s, 1H, NH-CO); 8.33(d, 1H, J=8.5 Hz, Ar-H); 7.97(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H); 7.57(t, 1H, J=7 Hz, Ar-H); 7.18(t, 1H, J=7 Hz, Ar-H); 6.44(宽 s, 1H, NH-CO-NH); 6.35(宽 s, 1H, NH-CO-NH); 4.30(m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.14(m, 1H, CH-CH-NH); 3.12(m, 1H, CH-S); 2.80 和 2.55(ABX 系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, CH₂-S); 2.61(s, 3H, CH₃); 2.37(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 1.62-1.38(m, 6H, (CH₂)₃)。

• 化合物邻-腙 2c:

将化合物 1c(500, 1.38mmol)溶于预热的乙醇(99%, 8ml)中，然后加入一水合肼(572μl, 11.1mmol)。溶液回流加热 50 分钟。然后将溶液蒸发干燥。过滤得到白色沉淀物，用水洗涤后用乙醚干燥。得到 416mg(11.1mmol, 80%)白色粉末状产物 2c。

熔点 161°C - IR(KBr): 3412, 3240, 2930, 2857, 2351, 1706, 1677, 1604, 1590, 1531, 1463, 1444, 1372, 1303, 1270, 1169 cm⁻¹. -¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆) δ=11.97(s, 1H, NH-CO); 8.35(d, 1H, J=8 Hz, Ar-H); 7.45(d, 1H, J=7 Hz, Ar-H); 7.19(t, 1H, J=7.5 Hz, Ar-H); 7.04(t, 1H, J=7 Hz, Ar-H); 6.61(s, 2H, NH₂); 6.42(宽 s, 1H, NH-CO-NH); 6.35(宽 s, 1H, NH-CO-NH); 4.32(m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.14(m, 1H, CH-CH-NH); 3.12(m, 1H, CH-S); 2.81 和 2.56(ABX 系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, CH₂-S); 2.31(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 2.09(S, 3H, CH₃); 1.63-1.36(m, 6H, (CH₂)₃)

• 化合物邻-重氮甲烷 3c:

将 2c(200mg, 0.53mmol)溶于 10ml DMF 中。然后加入 800mg MnO₂。搅拌 15 分

钟后，用硅藻土(0.5cm)-分子筛(0.5cm粉状形式)的混合层过滤混合物。反应混合物蒸发干燥，然后用乙醚洗涤并干燥。获得粉红色粉末状化合物3c(130mg, 65%)。熔点110°C- IR(KBr): 3248, 2930, 2857, 2367, 2342, 2038, 1699, 1521, 1456 cm⁻¹. ¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆) δ=9.37(s, 1H, NH-CO); 7.26-7.00(m, 4H, Ar-H); 6.43(宽s, 1H, NH-CO-NH); 6.35(宽s, 1H, NH-CO-NH); 4.30(m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.15(m, 1H, CH-CH-NH); 3.12(m, 1H, CH-S); 2.82和2.54(ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, CH₂-S); 2.24(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 2.12(s, 3H, CH₃); 1.63-1.37(m, 6H, (CH₂)₃)。

实施例1.4: 间-BioDPDAM的合成:

- 化合物间-苯甲酮1d:

将D-生物素(50mg, 2.05mmol)溶于23ml预热的无水DMF中。混合物在氩气下冷却至0°C，然后加入连续加入N-甲基吗啉(295μl, 2.67mmol)和异丁基氯甲酸酯(420μl, 3.28mmol)。混合物持续搅拌30min，然后加入7ml含3-氨基二苯酮(605mg, 3.07mmol)和N-甲基吗啉(240μl, 2.17mmol)的DMF。溶液在0°C持续搅拌2h，然后蒸发干燥。残留物收集到1ml MeOH中，然后加入25ml水。过滤得到沉淀物，先用水洗涤然后用乙醚洗涤得到810mg(93%)粗产物1d，用MeOH-H₂O对重结晶得到白色粉末状的1d(630mg, 72%)。

¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆) δ=10.10(s, 1H, NH-CO); 8-7.39(m, 9H, Ar-H); 6.43(宽s, 1H, NH-CO-NH); 6.35(宽s, 1H, NH-CO-NH); 4.27(m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.13(m, 1H, CH-CH-NH); 3.12(m, 1H, CH-S); 2.84和2.55(ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, CH₂-S); 2.31(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO); 1.59-1.36(m, 6H, (CH₂)₃)。

- 化合物间-腙2d:

将1d(350mg, 0.83mmol)溶于5.5ml无水乙醇中，然后加入一水合肼(140μl, 2.48mmol)。溶液回流加热过夜。蒸发后，产物收集到1ml乙醇和水中。将白色沉淀物重结晶：将沉淀物溶于最少量的预热乙醇中，然后加入水直到有薄絮状的沉淀出现。冷却后，得到的沉淀物用水洗涤，然后用乙醚干燥。得到264mg(73%)白色粉末状产物2d。

¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆) δ=9.99(s, 1H, NH-CO); 9.80(s, 2H, NH₂); 7.54-6.88(m, 9H, Ar-H); 6.26(宽s, 1H, NH-CO-NH); 6.21(宽s, 1H, NH-CO-NH); 4.28(m, 1H, CH₂-CH-NH); 4.13(m, 1H, CH-CH-NH); 3.12(m, 1H, CH-S); 2.78和2.59(ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, CH₂-S); 2.27(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO);

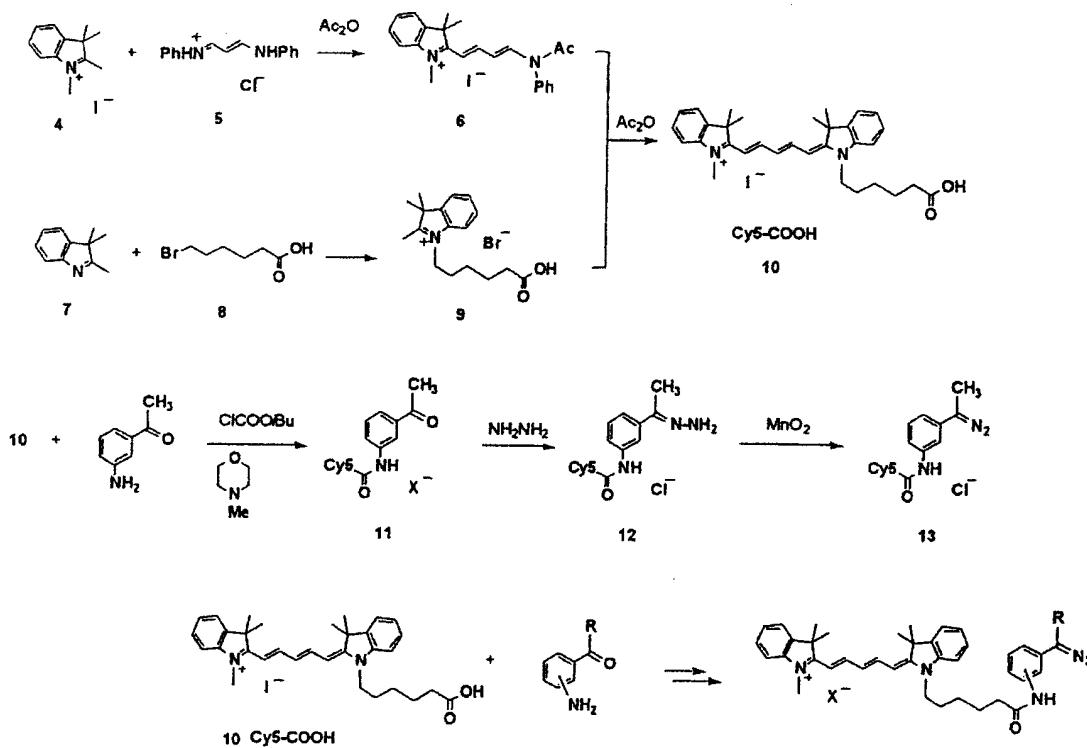
1.57–1.36 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3$)。

• 化合物间-diazodiphenyl 3d:

将 3d (500 mg, 0.53 mmol) 溶于 1ml THF 中。然后加入 80mg 活化的 MnO_2 。室温下搅拌 5 分钟后，用硅藻土 (0.5cm)–分子筛 (0.5cm 粉状形式) 的混合层过滤混合物。将反应混合物蒸发干燥。获得紫色油状的化合物 3d (47 mg, 100%)。

^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-\text{d}_6$) δ =9.95 (s, 1H, NH-CO)；7.60–6.9 (m, 9H, Ar-H)；6.42 (宽 s, 1H, NH-CO-NH)；6.35 (宽 s, 1H, NH-CO-NH)；4.28 (m, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}$)；4.14 (m, 1H, CH-CH-NH)；3.12 (m, H, CH-S)；2.83 和 2.59 (ABX 系统, 2H, $^2J_{\text{AB}}=5$ Hz, $^3J_{\text{AX}}=12$ Hz, $^3J_{\text{BX}}=0$ Hz, CH₂-S)；2.27 (t, 2H, J=8 Hz, CH_2-CO)；1.58–1.35 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3$)。

实施例 2：含 Cy5 的标记试剂：Cy5-PMDAM：



• 化合物 2-[4-(N-乙酰基-N-苯基氨基)丁-1, 3-二烯基]-1, 2, 3, 3-四甲基[3H]碘咯碘化物 6(2-[4-(N-acetyl-N-phenylamino)buta-1, 3-dienyl]-1, 2, 3, 3-四甲基[3H]碘咯碘化物 6)：

将乙酸酐 (75 ml) 中丙醛二(苯基亚胺)单盐酸 5 (18.3 g, 70.0 mmol), NaOAc (9.0 g, 110 mmol) 和 1, 2, 3, 3-四甲基[3H]碘咯碘化物(碘咯碘化物)4 (4.25 g; 14.1 mmol) 的混合物在 110°C 加热 20 分钟。冷却后，加入醚 (350 ml)，然后将沉淀的棕色固体过滤，用醚洗涤 (3 × 100 ml)。将此固体溶于

150 ml CH₂Cl₂, 过滤(除去无机盐)然后蒸发得到棕色固体(6.0 g, 90%)。

¹H NMR(CDCl₃): δ=8.64(d, 1H, J=12 Hz, 1-H); 8.14(t, 1H, J=16, 12 Hz, 3-H); 7.63–7.19(m, 9H); 6.90(d, 1H, J=15 Hz, 4-H); 5.82(t, 1H, J=12, 13 Hz, 2-H); 4.06(s, 3H, NCH₃); 2.16(s, 3H, -COCH₃); 1.74(s, 6H, CH₃)。

• 化合物 1-(5-羧基戊基)-2, 3, 3-三甲基[3H]碘喀碘化物 9:

将 2, 3, 3-三甲基吲哚 7(10.0 g, 62.8 mmol)和 6-溴己酸 8(12.3 g, 62.8 mmol)不加溶剂混合, 在氩气下 110°C 加热 12h。紫红色粘性反应混合物先用醋酸乙酯洗涤(2 x 60 ml, 粘性物用药刀研磨, 弃去上清), 然后用丙酮洗涤(50 ml, 固化粘性物)。将粉红色固体过滤, 然后真空干燥(16.0 g; 73%)。

• 化合物 Cy5COOH 10:

将碘化物 6(6.0 g, 12.7 mmol), 溴化物 9(4.5 g, 12.7 mmol)和 NaOAc(2.6 g, 32 mmol)溶于乙酸酐(35ml)中, 混和物在 110°C 加热 20min。冷却后, 加入乙醚(150ml), 将沉淀物过滤并用乙醚(3 x 50 ml)洗涤。固体溶于 100ml CH₂Cl₂, 过滤, SiO₂柱色谱纯化, (洗脱液: MeOH 5–10% / CH₂Cl₂), 得到 3.4 g(44%)产物 10。
¹H NMR(CDCl₃): δ= 8.03(t, 2H, J=10, 11 Hz, 2-H, 4-H); 7.38–6.91(m, 9H, Ar-H, 3-H); 6.41(d, 1H, J=14 Hz, 1-H); 6.31(d, 1H, J=13 Hz, 5-H); 4.07(t, 2H, J=7, 7 Hz, α-CH₂); 3.68(s, 3H, NCH₃); 2.47(t, 2H, J=7, 7 Hz, ε-CH₂); 1.71(m, 18H, CH₃, β, γ 和 δ-CH₂)。

• 3-氨基苯乙酮偶合 Cy5COOH 10 的化合物(产物 11):

将 N-甲基吗啉(360μl, 3.2 mmol)加入到 12ml 含 Cy5COOH 10(1.19 g, 1.9 mmol)的 CH₂Cl₂ 溶液中。溶液置于冰浴中冷却, 然后加入异丁基氯甲酸酯(480μl, 3.7 mmol)。搅拌 5min, 加入 3-氨基乙酰苯(488 mg, 3.6 mmol)。室温下搅拌 3h。加入 250ml 乙醚后得到粘性固体。搅拌后固体黏附在圆底烧瓶的瓶底, 将上清弃去。再加入 50ml 乙醚, 用药刀研磨介质得固体物质。将固体过滤, 用水和乙醚洗涤后真空干燥。然后将产物(碘化物)溶于乙醇, 过离子交换树脂 IRA900(Cl⁻; 15 g)柱。回收乙醇溶液, 蒸发干燥后过 SiO₂ 柱, 得到 0.93g(77%)蓝色固体。

• 化合物 Cy5-腙 12:

在一水合肼(180μl, 3.1 mmol)加入到 5ml 含苯乙酮(0.93 g, 1.46 mmol)的无水乙醇溶液中, 室温下搅拌 7h。然后加入 50ml 乙醚, 过滤沉淀物, 并用乙醚洗涤。粗产物溶于 50ml CH₂Cl₂ 中, 将溶液过滤后浓缩到 10ml。加入 100ml 乙醚沉淀产物, 过滤, 用乙醚洗涤, 真空干燥。得到 540mg(57%)产物 12。

• 化合物 Cy5PMDAM 12a:

将 300 mg MnO₂ 加入到 2ml 含 100mg 脱 12 的 DMF 中，混合物剧烈搅拌 10min。上清液通过一层硅藻土过滤，用 DMF(3 x 500μl)洗涤。加入 50ml 乙醚，油性沉淀物用药刀研磨，上清液弃去。用 25ml 乙醚重复洗 3 次。将得到的固体过滤并干燥。得到 65mg(65%)产物 12a。产物的纯度大约为 80-85% (¹H NMR)。

实施例 3：其它试剂的合成：

实施例 3.1：对-硝基苯基叠氮甲烷(NPDAM)：

4-硝基苯甲醛是商品化的(参见 28, 118-2, Aldrich, France)。

将 600mg(3. 64mmol)4-硝基苯甲醛溶于 9ml THF 中。溶液持续搅拌 5min，然后小心加入 1. 26 g(4 价物，14. 56 mmol)MnO₂。混合物持续搅拌 10min，然后过滤。将回收的过滤物蒸发干燥。用戊烷洗涤，得到亮橙色粉状的对-硝基苯基叠氮甲烷(468 mg, 2. 87 mmol)，产率为 79%。

熔点 80-82°C. ¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ=8. 11(d, 2H, J=9 Hz, Ar-H₂/3); 7. 18(d, 2H, J=9 Hz, Ar-H₂); 6. 06(s, 1H, CH₁-N₂)。

实施例 3.2：苯甲基叠氮甲烷的合成(PMDAM)：

乙酰苯腙：苯乙酮(2. 0 g, 16 mmol)用 16ml 无水乙醇稀释，然后加入肼(2. 3 ml, 48 mmol)。混合物加热到回流温度。2h 后，溶剂蒸发，残留物收集到乙醚(150ml)中。溶液用水洗涤(100ml)。用 Na₂SO₄ 干燥后，将乙醚蒸发掉。得到淡黄色油状物(1. 5 g, 11 mmol, 69%)。

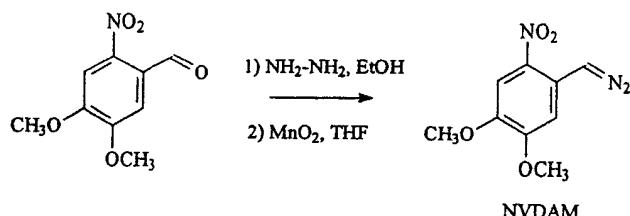
苯甲基叠氮甲烷(PMDAM)：将腙(150 mg, 1. 1 mmol)溶于 3ml THF 中。加入 MnO₂(480 mg, 5. 5 mmol)。溶液在室温下搅拌 30 分钟后变为红色。将溶液过滤然后将溶剂蒸发。得到红色油状物(145 mg, 100%)。此试剂不需纯化。

实施例 3.3：联苯叠氮甲烷的合成(DPDAM)：

苯甲酮腙是从市场上购买的(参见 B 960-2 Aldrich, France)。

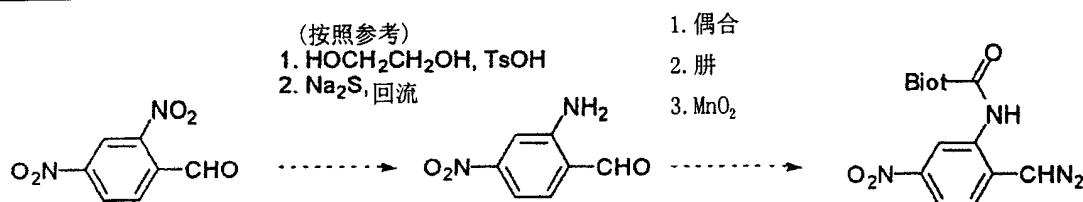
将 196mg 苯甲酮腙溶于 5ml THF 中。加入 435 mg(5 eq, 5. 0 mmol)MnO₂。混合物持续搅拌 10min，然后过滤。回收的过滤物蒸发干燥。得到 193 mg(0. 99 mmol)产物。此试剂不需纯化。

实施例 3.4：NVDAM 的合成：



按照上述步骤从 6-硝基亚藜芦醛(Aldrich, reference 27, 960-9)进行合成。

实施例 4: 合成 the 生物素化的衍生物 from NPDAM:



2-氨基-4-硝基苯甲醛衍生物按照上述 ME Wall 等人的方法制备。

叠氮甲烷 NPDAM 的制备方法与上述的实施例 3.1 相同。

实施例 5: DNA 核酸的制备:

用 PCR 从 16S 结核分支杆菌基因组 DNA 靶位中扩增 DNA, 所用的试剂为 Roche 的 Fast Start 试剂盒, 每种脱氧核糖核苷酸 0.2mM(d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP), 引物 0.3 μM 和酶 0.4 μl。

PCR 设定参数如下: -95°C: 4min, 然后 35 个循环(95°C: 30sec; 55°C: 30sec; 72°C: 30sec), 最后到 4°C。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳(1.5%, TBE 0.5×)分析。上样体积为 5μl, 在 100 伏(V)电压下迁移 20min。用溴化乙啶染色后可在紫外灯下观察到 PCR 产物。

细菌培养的条件、分支杆菌的提取方法和扩增所用的引物在专利申请 WO-A-99/65926 中已有描述。

实施例 6: 标记试剂在模板核酸上的反应性

标记试剂的合成见实施例 1 至 4 的描述。本发明所描述的 PDAM 已经商品化(参见《分子探针》(Molecular Probes)1405 页, Eugene, OR)。

实施例 6.1: 单体 UMP 3'-磷酸的标记:

为了控制反应的特异性, 研究了携带叠氮甲基功能基团的标记试剂的反应性。

设计出了一种实验方案, 该方案包括用毛细管电泳研究模型化合物 3'-UMP(3'-单磷酸尿嘧啶核苷, 参见 U1126, Sigma)在下列标准条件下的反应性:

3'-UMP 0.04mM; H₃BO₃ 2.0mM; 2.0mM 标记物[添加适当的有机溶剂(THF, AcOEt 或 DMSO)]; 溶剂 H₂O-CH₃CN-有机溶剂(比例: 1/3/1)。

溶液分成 10 份, 每份 250μl, 加热到 60°C。经过一段固定的时间, 每份溶液都

用 250 μ l 二氯甲处理。搅拌后去除有机相(底层相)。离心(5min, 5000 转/分钟(rpm))后用毛细管电泳分析水相。毛细管电泳(CE)的条件如下: CE 所用的仪器为 Beckman P/ACE 5000。所用的毛细管为未处理的熔合硅毛细管(75 μ m 50cm)。所用的电压为 30kv(正常极性), 毛细管的温度维持在 23°C。记录 254nm 处的电泳图。硼酸盐缓冲液(0.1M, pH 8.3)用硼酸制备, 用 NaOH 溶液调节 pH, 然后用 0.2 μ m 的滤膜过滤。样品加压注射到毛细管中(0.5 psi, 5 sec)。每次分析前通过连续用 NaOH 溶液(0.1M, 2 min)、水(2 min)和硼酸盐缓冲液(2 min)加压(20 psi)洗涤毛细管使其再生。

如每幅图中所示, 反应所用的时间从 0 到 4 小时不等, 每一种试剂所得到的结果都显示在图 2A 到图 2I 中, 每种试剂的浓度也标示在图中。

反应时间都标示在每一幅电泳图中。

所实验的所有试剂都得到了过量的单烷基化产物, 说明了反应的特异性。

反应性可以用试剂与 3'-UMP 反应完成一半时所需要的时间来表示, 因此可以通过比较峰的高度来计算反应性, 其结果列在下面的表中(如上所述的标准条件):

化学式和名称				
反应性	5 min	20 h	30 min	4 h

化学式和名称				
反应性	10 h	15 min	5 min	1 min

*用 o-BioPMDAM 时, 反应时间是估计的, 因为在标记试剂的浓度为 2 mM 的条件下反应在 5 min 内就完成了。因此图 2I 所用的浓度为 0.2 mM。

表 1: 试剂的反应性(反应一半所用的时间)

然而需要强调的是由于反应是非常特异的并且所有的试剂都不产生副产品, 因此从选择性的观点来看? 增加标记试剂的浓度对标记可能不会造成影响。

因此, 如果将 DPDAM 的浓度增加到 20 mM(见图 2C), 反应性(反应一半所需时间)是 2 h。BioDPDAM(图 2F)也得到同样的结果, 在浓度为 30 mM 时反应性是 45 min。实施例 6.2: 各种 3'-单磷酸核苷的检测:

为了避免出现任何解释的错误, 对间-BioPMDAM 做了附加的试验, 作为一个有意义的实施例与其他 3'-单磷酸核苷一起进行。

所检测的核苷如下：3'-AMP(参见 85, 194-9 Aldrich), 3'-GMP(参见 151214, ICN), 3'-CMP(参见 C1133, Sigma), 3'-TMP(脱氧核糖系列)(参见 T1008, Sigma)。各种核苷所得到的电泳图显示在图 3A 到图 3D 中。图 3A 所显示的反应时间与图 3B 到 3D 所显示的一致。

不论从何种核苷开始(核糖核苷或脱氧核糖核苷系列)，在 60℃ 条件下反应 130min 都可以观察到过量的和完全的烷基化产物形成。需要强调的是如果用鸟嘌呤(与常用烷化剂反应最活泼的碱基)，其产物只有磷酸被烷基化，说明反应具有极高的选择性。

本实验也证实反应的速率不依赖于所使用的核苷底物的性质。

实施例 6.3：双核苷试验：

用间-BioPMDAM 进行双核苷 ApUp(参见 A4298, Sigma)的烷基化以证实反应的选择性是在末端磷酸上而不是在核苷内的磷酸上。反应的电泳监测结果显示在图 4 中。反应条件是实施例 6.1 所描述的标准条件。

可以观察到产生了过量的单一产物，说明间-BioPMDAM 具有良好的反应选择性，反应位点是在末端磷酸上而不是在核苷内的磷酸上。

实施例 6.4：与 4 种 3'-单体磷酸核苷加合物的特征：

为了确保所得到的产物确实来自于磷酸的烷基化，合成了单体磷酸 3'-UMP, 3'-CMP, 3'-GMP 和 3'-AMP 于间-BioPMDAM 试剂的加合物。烷基化反应是以如下的制备规模进行的。加合物的产率为 70%，产物纯化后进行质子 NMR 研究或磷 NMR 研究。

制备操作规程：

3'-UMP(以二钠盐的形式存在, 9.3 mg, 21.1 μmol)溶于 2 ml 0.1M 的 H₃BO₃ 水溶液中，然后相继加入 2 ml CH₃CN 和 6 ml MeOH，最后加入间-BioPMDAM(75 mg, 0.20 mmol)。在室温下反应 2.5 小时。用毛细管电泳监测。加入 3 ml 水，然后用 CH₂Cl₂ 萃取以去除多余的试剂。将水相蒸发掉，残留物溶于少量水中，然后用反相硅胶柱(Lichroprep RP-18, Merck, 洗脱液为 MeOH/H₂O(20/80))纯化。可以得到 10g(69%)3'-UMP 的加合物。

所得到的 3'-NMP(N=G, U, C, A)加合物的质子 NMR 谱显示在图 5A 到 5D 中。加合物的鉴定是通过双-二维 ¹H/¹H NMR 试验(COSY)。这些加合物的两个非对映异构体以 1/1 的比例显示。

磷 NMR 只在 0 ppm(300 MHz, D₂O)附近出现一个峰。

这些试验说明反应确实是特异性的，只观察到一种加合物，标记确实发生在磷

上。在碱基上没有烷基化副反应发生。因此标记的产物特别适合用于杂交。

实施例 7：温度稳定性研究：

上述实施例 6.1 中表 1 所描述的所有重氮甲烷衍生物以固体状态在-20℃冰箱中保存至少 3 个月其反应性不会丢失。

两种试剂 NPDAM 和间-BioPMDAM 在室温下放置于实验台上的稳定性用 ^1H NMR 确定。我们发现将 NPDAM 放置于无警告标志的实验台上 1 个月也不会出现分解。而间-BioPMDAM 在实验台上放置 25 天时就会降解掉 50%。

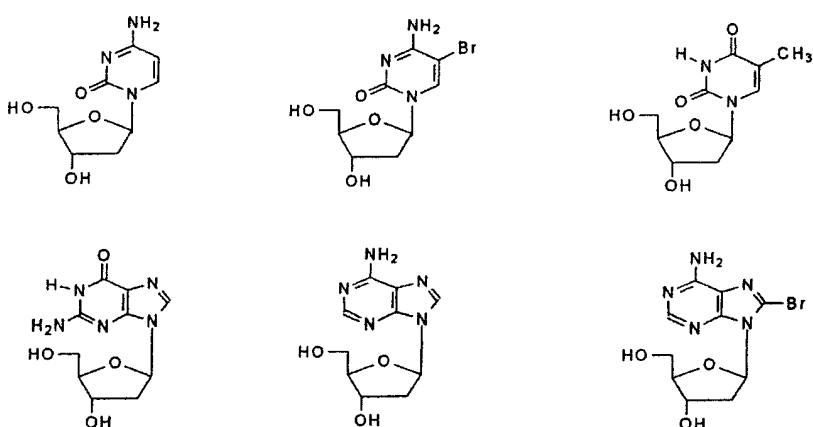
标记试剂对温度的稳定性是一个基本特征。事实上，这种试剂在工业应用上的最终目的是标记试剂盒。在-20℃条件下 15 天内，最好是 1 个月内就会不稳定的试剂是没有市场前景的。即使在-110℃条件下储存和运输，-110℃和-20℃的稳定性存在相关关系，这就是为什么在-20℃条件下至少要稳定 15 天，最好是 1 个月是工业化的最低限度。如果是-110℃以下，从使用者和制造商的角度看实验室缺乏必要的冷冻设备(冰箱)，并且从制造商的角度看也没有一种简单的利用干冰运输这些试剂的方式。

至于室温下的稳定性，稳定数小时，最好是 1 天就足以使使用者完成标记操作。

实施例 8：DNA 片段化研究：

实施例 8.1：各种核苷在酸性介质中的水解：

本试验的目的在于证明天然核苷、修饰核苷以及嘌呤核苷和嘧啶核苷之间在酸性 pH 条件下稳定性的差异。本试验也可以使我们通过考虑 DNA 的碱基组成而更好地控制其片段化。



两种修饰核苷，8-溴-2'-脱氧腺苷(8-BrdA)和 5-溴-2'-脱氧胞苷(5-BrdC)以及 4 种天然核苷(dA, dC, dG 和 dT)用于本试验中。

每种核苷取 50 nmol 培养到 95°C、pH 为 3 的 50 mM 甲酸盐中，培养时间从 0 到 45 min。真空干燥后加入 20 μl 纯水，取 10 nmol 样品用反相 HPLC 分析。结果以起始核苷的水解百分率(y 轴)与以分钟计的培养时间(x 轴)的关系表示，见图 8。

图 8 的曲线显示当腺苷在 8 位上用溴原子修饰时其稳定性与天然核苷相比下降。然而，结果显示在相同的条件下，去嘌呤作用要远强于去嘧啶作用。

本试验说明去嘌呤作用或去嘧啶作用而使 DNA 片段化可以通过优化水解的条件或通过掺入比天然碱基稳定性低的修饰碱基或者在掺入后可以被修饰和水解的碱基来控制。

实施例 8.2：掺入修饰核苷或其他物质的双链 DNA 的片段化：

以 16S 结核分支杆菌基因组 DNA 为模板(10^{+4} 个起始拷贝)，用 Roche 的 Fast Start 试剂盒，加入 0.2mM 4 种脱氧核糖核苷酸(d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP)，0.3 μM 引物和 0.4 μl 酶平行进行 3 组 PCR 扩增。

PCR 参数与实施例 5 相同。

第一组 PCR 所用的条件为所谓的天然 PCR。

第二组 PCR 所用的条件加以修改，是为了得到加入 30% 8Br-dATP 后的 PCR 产物。加入 0.2mM 的 d-CTP, d-GTP 和 d-TTP，以及 0.14 mM 的 d-ATP 和 0.06 mM 的 8-BrdATP。(8-BrdATP 是市场上买到的(参见 N-2005-1, TriLink Biotechnologies, San Diego CA)。

第三组 PCR 所用的条件加以修改，是为了得到加入 50% 8Br-dATP 后的 PCR 产物。加入 0.2mM 的 d-CTP, d-GTP 和 d-TTP，以及 0.1 mM 的 d-ATP 和 0.1 mM 的 8-BrdATP。

这些扩增子的单独片段化试验按照上面所描述的条件进行：50 mM 甲酸钠，pH 为 3, 95°C。

PCR 产物的分析用溴化乙啶染色的变性聚丙烯酰胺凝胶进行(8%聚丙烯酰胺，7M 尿素，1×TBE)。

在 pH=3 的 50mM 的甲酸钠中 95°C 培养 15min 后，没有观察到三个 PCR 产物出现差异。所有的 PCR 扩增子都已完全片段化。

PCR 扩增子的去嘌呤作用也可以在不同的 pH 值、不同的温度和不同的培养时间下进行。在上述的条件下进行凝胶分析表明当 pH=3 时在 95°C 培养 10 min 片段化就可以完成。在此 pH 条件下，60°C 培养 30 min 也可以完成片段化。

在 pH=4 时，即使在 95°C 的条件下也需要 30 min 的培养才能完成 DNA 扩增子的片段化。这一结果非常重要，说明在酸性 pH 条件下产生的脱碱基位点是不稳定的，

因而即使不经过特别的处理也会导致 DNA 链的片段化。

实施例 9：以两个步骤标记和片段化带有间-bioPMDAM 衍生物(3a)的 DNA：

间-bioPMDAM 衍生物(3a)来自于实施例 1.1 所描述的反应。

DNA 扩增子的制备是按照实施例 5 描述的试验方案进行 PCR 扩增得到的。

标记

将 10 μ l PCR 产物, 38 μ l 纯水(Sigma)和 50 μ l 甲酸钠(100 mM, 溶于纯水中)混和, 60°C 培养 30 min。然后加入 2 μ l 间-bioPMDAM(100 mM DMSO)。溶液剧烈振荡, 然后 60°C 再培养 15 min。

试验作两份以便能在凝胶上分析 DNA 的片段化同时通过 DNA 芯片的杂交和阅读来分析标记的效率。

纯化

纯化用 QIAQUICK™ 柱(核昔去除试剂盒, Qiagen, Hilden, Germany)进行。所用的纯化方案是厂家推荐的。

纯化后洗脱下来的物质转到一个含有 400 μ l 杂交缓冲液(1.75 ml 20× SSPE; 2.9 ml 5M 甘氨酸三甲内盐; 290 μ l 0.1M DTAB; 10 μ l 消泡剂 30%)的干净试管中。这些物质参见如下:

- 甘氨酸三甲内盐参见 B-2754 Sigma,
- DTAB 参见 D-5047 Sigma。

溶液剧烈振荡, 95°C 培养 10 min 以使在片段化的标记步骤(变性步骤)没有分开的 DNA 双链分开。然后在与 DNA 芯片杂交前将试管浸润到 0°C 的冰-水中。

与 DNA 芯片杂交

经过片段化的标记步骤后, 将所得到的片段与 DNA 芯片杂交, 该芯片是专门设计用于分析结核杆菌 16S RNA “Genbank” M20940 序列的 213-215 区的。这种芯片在文献 A. Troesch 等, J. Clin. Microbiol., 37(1): 49-55, 1999 中有描述。

杂交步骤是在液体状态下进行(Affymetrix, Santa Clara, CA), 所用的杂交方法和缓冲液见文献 A. Troesch 等, J. Clin. Microbiol., 37(1): 49-55, 1999。需附加步骤以使生物素显色(间接检测)。

杂交的显色是通过结合标记藻红蛋白(PE)的链亲和素, PE 可与间-BioPMDAM 上的生物素相互作用, 反应条件如下: 300 μ l 纯水; 300 μ l 100mM 的 Tris 缓冲液(pH 7/1 M NaCl/0.05% Tween/0.005%消泡剂); 6 μ l BSA(50 mg/ml); 6 μ l 链亲和素-PE(300 μ g/ml)。这些物质参见:

- 链亲和素-藻红蛋白：参见 R0438, Dako, Denmark,
- 链亲和素-CY5：参见 C0050, Dako, Denmark,
- 消泡剂：参见 M5-575, Ultra Additives Inc., 以及
- Tween 参见 P-7949, Sigma。

DNA 芯片的阅读：

标记和杂交后 DNA 芯片表面发射的荧光以及信号强度和同源性百分数的数据用 Affymetrix 所提供的阅读系统及其分析软件(GeneChip® Instrument System 和 GeneChip® Information System, Santa Clara CA)进行阅读和分析。

阅读系统所提供的信号强度和背景噪音强度用 rfu(相对荧光单位)表示。同源性百分数是指与参考序列的一致性，本试验是指结核杆菌序列。

以平均强度所表示的信号(I)、背景噪音(B)和同源性百分数(%)见下面表 2 所列出的。

一般来说，同源性百分数大于 90% 就可以认为是比较满意的结果了，虽然大于 95% 的结果也常常出现。如果是 95% 以上，这个值就不能说明问题了，因为这在分支杆菌 DNA 芯片上是没有意义的。高强度、低背景噪音是在下面的例子中所看到的第二个结果。在所有的结果中，背景噪音 B 是由平均强度 I 推算出来的。

聚丙烯凝胶分析

打算在凝胶上分析的样品需要真空干燥，加入 10 μl 纯水和 10 μl 2× 甲酰胺蓝。

电泳是用 8% 的乙酰胺凝胶，电泳缓冲液是 1×TBE，150V 迁移 1 小时。

酸性 pH 用于 DNA 的片段化。事实上，在此 pH 条件下，去嘌呤现象会产生极不稳定的脱碱基位点，导致 DNA 序列在高温下迅速片段化。这种片段化产生的是 DNA-5' 磷酸片段。

凝胶分析表明 PCR 扩增子在 60°C 的甲酸盐缓冲液(50 mM, pH 3)中培养 30 min 可以使其完全片段化。这就使我们可以评价在间-bioPMDAM 存在的情况下 DNA 扩增子片段化期间的标记效果。

DNA 扩增子片段化期间的标记结果以同源性百分率、信号及背景噪音的强度这三个指标列示在下面的表 2 中。

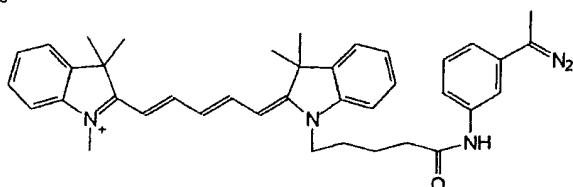
PCR 扩增子标记的条件	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
缓冲液：50mM, pH3 的甲酸盐 标记物：2mM 的间-bioPMDAM 培养：60°C, 30min	>95	4456	593	7.5

表 2：以同源性百分率、信号(I)及背景噪音(B)的强度表示的 DNA 扩增子标记和片段化。

本实施例说明本发明的衍生物可用于标记以两步法酶催化扩增的 DNA 片段。也可用于标记非扩增的天然 DNA。

实施例 10：含有 Cy5-PMDAM 衍生物(12a) 的 DNA 的标记

含有新型标记物的 DNA 标记效果的评价是用合成的 DNA 片段，这种新型标记物携带重氮甲基功能基团。



Cy5-PMDAM (12a)

标记试剂 Cy5-PMDAM (12a) 是根据实施例 2 所描述的方法制备的。

按照所谓的亚磷酸酰胺方法制备一种 20mer 的寡脱氧核糖核苷(ODN)。用标准磷酸化试剂将一个磷酸基引入到 5' 末端，该磷酸化试剂与亚磷酸酰胺化学一致。这种 ODN 的序列含有 DNA 的所有天然碱基(ODN 的序列：5'-CTGAACGGTAGCATCTTGAC-3')。这个序列与所谓的“模型”DNA 芯片上的捕获序列互补，DNA 芯片上的捕获序列是根据 Affymetrix 的技术合成的。这种 DNA 芯片含有捕获探针，该探针在序列上是一致的，作为一种可检测物位于芯片的表面。通过读取 DNA 芯片可以得到信息，因此可以根据信号强度而不是同源性的结果了解标记的效果。

标记：将 10 μl 的 Cy5-PMDAM (100 mM, 溶于 DMSO 中) 加入到 50 pmol 的 ODN 中。最终的体积是 100 μl。混和均匀后 60℃ 培养 30min。

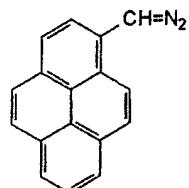
纯化和阅读：为了去除多余的标记试剂，需要按照实施例 9 的方法进行纯化。DNA 芯片的阅读是按照实施例 17 的方法进行。

结果：从 DNA 芯片上读取的平均标记强度(I)是 16644 rfu，背景噪音(B)是 450 rfu。

这一强度水平是很高的，说明标记试剂 Cy5-PMDAM (12a) 可完全适用于标记 DNA 片段上的磷酸基团。

实施例 11：用 PDAM 试剂标记和片段化 DNA：

实施例 11. 1：以 1-芘基叠氮甲烷(PDAM) 标记：



1-芘基叠氮甲烷

PDAM 从 Molecular Probes (Eugene, OR) 获得，可溶于无水 DMSO 中。

两种 20mer 的 ODN 作为 DNA 模板：一种 ODN 含有 5'-羟基，另一种在其 5' 末端含有一个磷酸基团。ODN 的序列在实施例 10 中有描述。标记反应是在一种含有 50 %DMSO 和 1.5 mM 1-芘基叠氮甲烷 (PDAM) 的混合物中进行，60℃ 反应 30 min 或 1 h。

标记效率用薄层色谱 (正相) 评价，洗脱液为异丙醇/氨水/水 (60/10/30)。30 min 后在 ODN 5'-磷酸上的偶合反应就可以完成。部分偶合到 ODN 5'-羟基上的时间需要 1 h，就是说大约 50%。

实施例 6 的结果在含有 20 个碱基的模型序列上得到证实，即末端磷酸上携带叠氮甲基功能基团的试剂极易标记。在核苷中间磷酸上标记是不方便的，因为可能由于在核酸片段上引入多个标记物而导致敏感性升高。这就使核酸与互补序列杂交时具有高度的敏感性同时又有良好的杂交特异性。

本领域的普通技术人员可以通过优化反应的条件来控制标记的特异性，例如通过改变标记试剂的种类，反应时间和温度达到只在末端磷酸上标记的目的。

实施例 11. 2：用 PDAM 进行标记反应的动力学研究：

本研究用 20mer 的 ODN 5'-磷酸在上述条件下进行，反应时间加以改变。标记效率通过反相高压液相色谱 (HPLC) 进行分析，条件如下：

5 μ m, 220×4.6 mm 的反相色谱柱 Spheri-5 RP-15 (Perkin Elmer)。缓冲液和洗脱梯度如下：

- 缓冲液 A: 0.1 M TEAA; 缓冲液 B=50% 缓冲液 A+50%CH₃CN，以及
- 洗脱梯度从 10% 到 50% 的缓冲液 B, 30min, 1ml/min, 室温。

结果见图 9，其中 x 轴是以分钟表示的反应时间，y 轴是标记百分率。

60℃ 仅培养 10 min 产率就接近 90%。

实施例 11. 3：温度对 PDAM 标记的影响：

用 20mer 的 ODN 5'-磷酸在上述条件下进行标记，培养温度加以改变，培养时间都是 10 min。

标记产率通过反相 HPLC 进行分析。

结果见图 10，其中 y 轴是标记百分率，x 轴是以℃表示的反应稳定。

需要强调的是即使在室温下(25℃)也可以观察到有ODN 的标记。25℃培养 10 分钟后，标记的产率大约为 25%。温度高于 50℃，得到的产率大于 80%。

这说明用携带叠氮甲基功能基团的试剂标记 DNA 是高效的而且是灵活的。

实施例 12：用标记试剂间-bioPMDAM(3a)标记和片段化 PCR 方法得到的 DNA 扩增子：

间-bioPMDAM(3a)衍生物是按照实施例 1.1 描述的反应条件制备的。

DNA 扩增子是按照实施例 5 描述的试验方法通过 PCR 扩增制备的。

实施例 12.1：比较片段化和未片段化 DNA 的标记效果：

a: 在片段化条件下的标记：

将 50 μl 甲酸钠(pH 3, 50mM)和 2 μl 间-bioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μl PCR 产物中。体积调整到 100 μl。溶液在 60℃培养 30 min。

b: 未经片段化的标记：

将 2 μl 间-bioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μl PCR 产物中。体积调整到 100 μl。溶液在 60℃培养 30 min。

其他试验方法与实施例 9 相同。

结果：

试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
在片段化条件下的标记	>95	3995	569	7.0
未经片段化的标记	94.1	500	542	0.9

表 3：片段化和未片段化 DNA 标记效果的比较

上面表 3 中的结果说明未片段化的平均强度与背景噪音处于同一水平(500rfu)。而片段化后得到的标记效果(大约 4000rfu)要远远高于未片段化的，并且具有很高的同源性百分率。两个步骤结合以后以后确实可以明显改善大于 100 核苷的核酸片段的检测。

实施例 12.2：与 DNA 芯片杂交前进行变性的影响：

分别在两个试管中平行进行两个标记反应，方法如下：将 50 μl 甲酸钠(pH 3, 50mM)和 2 μl 间-bioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μl PCR 产物中。总体积调整到 100 μl，溶液在 60℃培养 30 min。

在色谱柱上纯化后，第一管所得到的溶液在 95℃培养 10 min(为了打开 DNA 双

链), 然后将在试管浸润到 0°C 的冰-水中直到与 DNA 芯片杂交。

第二管所得到的溶液不进行预先变性而直接与 DNA 芯片杂交。

与 DNA 芯片表面的捕获探针杂交的生物素化的片段通过加入标记 PE 的链亲和素显示, 反应条件如实施例 9 所描述。

结果

使用的条件	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
变性	>95	22812	570	40.1
未变性	93.5	4795	681	7.0

表 4: 与 DNA 芯片杂交前进行变性的影响

所得到的结果列在表 4 中, 杂交前变性所得到的结果要高于未变性的。这说明 DNA 变性是必须的, 可以得到较高的信号强度。通过脱碱基位点进行片段化是一种促进双链 DNA 变性的方式, 可以增强 DNA 与捕获探针的杂交能力。

为了检验其他标记试剂和考虑到用上述各种条件所得到的结果, 我们设计了一个参考试验方案, 其中包括用甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)片段化以及一步杂交前变性。

实施例 13: 用生物素化的试剂通过一步标记和片段化 PCR 扩增子:

按照实施例 1.1, 1.2 和 1.3 描述的试验方案分别制备间-bioPMDAM、邻-bioPMDAM 和对-bioPMDAM。它们都可溶于无水 DMSO 中, 浓度为 100 mM。

试验方案与上述实施例 12.2 所描述的相同(经过杂交前的变性后一步标记和片段化)。

结果

标记物	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
间-bioPMDAM	>95	25951	820	31.6
邻-bioPMDAM	>95	22960	581	39.5
对-bioPMDAM	94.1	43785	1205	36.3

表 5: 用生物素化的试剂通过一步标记和片段化 PCR 扩增子

用优化的试验方案通过一个步骤进行片段化和标记就可以得到极佳的结果, 含

有活波叠氮甲基功能基团的各种标记试剂所得到的结果都很好，如表 5 中所显示的。

实施例 14：用 BioDPDAM 标记和片段化 DNA：

按照实施例 5 所描述的方法通过 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。

标记试剂的合成见实施例 1 的描述。

试验方案与实施例 12.2 的相同，包括在杂交前 95°C 变性。

结果：

标记物	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
间-bioDPDAM	93.0	32359	3610	9.1

表 6：用 BioDPDAM 标记和片段化 DNA

表 6 所显示的结果说明用与苯基同样重要的基团替代也可用于优化携带叠氮甲烷功能基团标记试剂的反应性。

实施例 15：用 5-(溴甲基) 荧光素标记和片段化 DNA：

按照实施例 5 所描述的方法通过 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。

将 50 μl 甲酸钠(pH 3, 50mM) 和 2 μl 5-(溴甲基) 荧光素(Molecular probes, Eugene, OR) (100 mM, 溶于 DMSO 中) 加入到 10 μl PCR 产物中。体积调整到 100 μl，溶液在 60°C 培养 30 min。

纯化条件与实施例 9 的相同。变性步骤按实施例 12.2 描述的方案进行。

杂交和阅读的其他条件与文献 A. Troesch 等, J. Clin. Microbiol., 37(1): 49-55, 1999 描述的一致。荧光素可以在阅读系统上直接检测。

所用的试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
用 5-(溴甲基) 荧光素标记片段化期间的 PCR 扩增子	>95	855	183	4.7

表 7：用 5-(溴甲基) 荧光素标记和片段化 DNA

表 7 所显示的结果说明通过制造脱碱基位点而产生的 DNA 片段化完全适用于用携带活波卤烷基功能基团的标记试剂标记。试验只需要一个步骤就可以完成(片段化和标记)，但是其标记的强度要比用携带叠氮甲基功能基团的标记物要低。

实施例 16：在另一种衍生于菲绕啉的化学片段化试剂存在的情况下标记和片段化 DNA 扩增子：

按照实施例 5 所描述的方法通过 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。所使用的试验条件有两种：

条件 a:

将 $20 \mu l$ 菲绕啉- FeSO_4 (25mM) 和 $2 \mu l$ 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中) 加入到 $10 \mu l$ PCR 产物中。总体积调整到 $100 \mu l$, 混合物在 95°C 培养 60 min 。

条件 b:

将 $50 \mu l$ 甲酸钠缓冲液(pH 3, 100mM 溶于纯水中) 和 $2 \mu l$ 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中) 加入到 $10 \mu l$ PCR 产物中。总体积调整到 $100 \mu l$, 混合物在 95°C 培养 60 min 。

其他条件与实施例 9 一致。

条件	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
菲绕啉- FeSO_4 (5mM) 间-BioPMDAM(2mM) 60min, 95°C	>95	2236	500	4.5
甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM) M(2mM) 60min, 95°C	>95	6786	565	12.0

表 8：在菲绕啉存在的情况下标记和片段化 DNA 扩增

两种片段化的条件都得到了满意的结果，如表 8 所示。

最好的结果是用在酸性 pH 下片段化的条件(b)得到的。

实施例 17：通过掺入 d-UTP-荧光素标记的 PCR 扩增子的片段化：

标记核苷的掺入

按照下面的条件进行 PCR 扩增以得到有荧光素标记的 PCR 扩增子(标记在碱基上)。

以 $16S$ 结核杆菌基因组 DNA(10^{+4} 拷贝)为起始模板，用 Roche 的 Fast Start 试剂盒进行 PCR，加入 0.2 mM 的脱氧核糖核苷 d-ATP、d-CTP 和 d-GTP，以及 0.14 mM 的 d-TTP 和 0.06 mM 的 dUTP-12-荧光素， $0.3 \mu \text{M}$ 的引物和 $0.4 \mu \text{l}$ 的酶。标记核苷

占其天然同源核苷的 30%。这个比例一般用于通过掺入标记核苷来标记扩增子的反应。

dUTP-12-荧光素是从 Roche Diagnostics 购买的，参见 1373242, Mannheim, Germany。

PCR 的参数与实施例 5 相同。

a. 用 30% dUTP-12-荧光素标记的 PCR 扩增子的片段化：

将 50 μ l 甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)加入到 10 μ l PCR 产物中。体积调整到 100 μ l，溶液在 60°C 培养 30 min。

b. 含 30% dUTP-12-荧光素的 PCR 扩增子片段化期间的标记：

将 50 μ l 甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)和 2 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μ l PCR 产物中。体积调整到 100 μ l，然后将溶液在 60°C 培养 30 min。这个试验与参考试验方案一致，因此有可能通过省却由于扩增步骤不同而造成的差异来比较各种标记策略。

所有试验组在色谱柱上的纯化步骤和变性步骤都与实施例 9 一致。

试验方案(a1)：

d-UTP-12-荧光素标记的扩增子经片段化后得到的核酸(条件 a)与 DNA 芯片杂交，首先通过直接读取荧光素发出的荧光信号检测，如实施例 15 所描述的。

试验方案(a2)：

信号放大步骤用于提高标记的敏感性。信号的放大通过在杂交步骤掺入生物素活化的抗荧光素抗体(参见 216-065-084, Jackson ImmunoResearch)，然后加入 PE 标记的链亲和素，所用的连续反应条件如下：

- 300 μ l 纯水，
- 300 μ l 100 mM Tris 缓冲液 pH 7/1M NaCl/0.05% Tween/0.005% 消泡剂，2.4 μ l BSA(50 mg/ml)，1.2 μ l 生物素化的抗荧光素抗体(1 mg/ml)，
- 300 μ l 纯水，以及
- 300 μ l 100 mM Tris 缓冲液 pH 7/1M NaCl/0.05% Tween/0.005% 消泡剂；6 μ l BSA(50 mg/ml)；6 μ l 链亲和素-PE(300 μ g/ml)。

在本试验方案中，荧光素是作为半抗原(可用标记抗体间接检测的示踪剂)而不是荧光物质。

试验方案(b)：

与 DNA 芯片杂交的生物素化的片段(条件 b)通过加入标记 PE 的链亲和素显示，所用条件如下：

- 300 μ l 纯水,
- 300 μ l 100 mM Tris 缓冲液 pH 7/1M NaCl/0.05%Tween/0.005%消泡剂; 6 μ l BSA (50 mg/ml), 6 μ l 标记的链亲和素-PE (300 μ g/ml)。

标记和杂交后 DNA 芯片表面发射的荧光以及信号强度和同源性百分数的数据用 Affymetrix 所提供的阅读系统及其分析软件(GeneChip® Instrument System 和 GeneChip® Information System, Santa Clara CA)进行阅读和分析。在此需要注意的是所用的阅读系统含有两个过滤装置, 因此可以直接检测:

- 按照试验方案 a1 或其他方法单独标记 d-UTP-荧光素的扩增子检测荧光素
- 如果扩增子按照下列方法标记则检测 PE:
 - 按照试验方案 a2 用 d-UTP-荧光素标记放大信号, 或
 - 按照试验方案 b 在片段化期间用间-bioPMDAM 标记。

在两种情况下显影都是用的 PE, 使用滤膜可以使荧光素产生的信号被去除, 确保被检测到的是 PE 信号。

结果

所用试验方案	检测的标记物	同源性 (%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
A1. d-UTP-荧光素标记的 PCR 扩增子片段化	Flu*	81.6	595	342	1.7
A2. 有信号放大的 d-UTP-荧光素标记扩增子的片段化	PE*	>95	22107	3461	6.4
经 d-UTP-荧光素修饰和间-bioPMDAM 标记后的同一 PCR 扩增子的片段化和标记	PE*	>95	21700	1503	14.4

*Flu=荧光素, PE=藻红蛋白

表 9: 通过加入 d-UTP-荧光素标记的 PCR 扩增子的片段化

上面表 9 所显示的结果表明利用制造脱碱基位点的方法进行的化学片段化适用于 DNA 扩增子的酶催化标记, 标记可在片段化前进行。

通过酶催化掺入荧光物质而得到的信号强度水平和同源性百分率要低于在片段化期间用含有叠氮甲基功能基团的标记试剂如间-bioPMDAM(条件 b)标记而得到的信号强度水平和同源性百分率

要达到与间-bioPMDAM 衍生物标记同样的信号强度就需要进行信号放大(条件 a2)。结果显示叠氮甲基活波功能基团的效率确实与传统的掺入修饰碱基如 d-UTP-荧光素(参见试验方案(b))所达到的效率相同。

实施例 18：超声法使双链 DNA 片段化：

按照实施例 5 所描述的方法制备 DNA 扩增子。在标记物存在和缺失的情况下用超声法将这些扩增子片段化。

a. 超声期间标记 DNA 扩增子：

将 $2 \mu l$ 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 $10 \mu l$ PCR 产物中。用纯水将体积调整到 $100 \mu l$, pH 调节到 6.5。混合物在超声容器(频率 35 kHz, model T460-H, Bioblock, France)中 60°C 培养 30 min。

b. 在 PCR 扩增子化学片段化期间标记(一步法参考方案)：

将 $50 \mu l$ 甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)和 $2 \mu l$ 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 $10 \mu l$ PCR 产物中。体积调整到 $100 \mu l$, 溶液在 60°C 培养 30 min。

试验分两份平行进行以便能在凝胶上分析 DNA 的片段化同时通过 DNA 芯片的杂交和阅读来分析标记的效率, 如上面所描述的(实施例 9 中 PE 的检测)。

凝胶分析

分析所用的是溴化乙啶染色的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(8%聚丙烯酰胺, 7 M 尿素, $1\times\text{TBE}$)。

凝胶分析结果表明经过 60°C 超声处理后 DNA 扩增子已经被片段化。

结果

条件	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 超声片段化期间进行标记	93.8	2271	631	3.6
b. 化学片段化期间进行标记(参考条件)	>95	19639	1459	13.5

表 10：超声法使双链 DNA 片段化

表 10 的结果说明通过超声片段化后的标记(条件 a)是令人满意的。这说明通过超声将 DNA 进行物理片段化也适于用携带叠氮甲基功能基团的标记试剂标记。

本试验中出现较弱的标记结果可能是由于超声的作用而导致标记物降解。而通过酸性 pH 的作用产生脱氨基位点而造成的片段化结果更好。

实施例 19：一步法标记、片段化及变性 DNA

按照实施例 5 所描述的方法通过 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。

两种标记反应如下：

a. 在 95°C 条件下通过一步法标记、片段化和变性：

将 50 μ l 甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)和 2 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μ l PCR 产物中。总体积调整到 100 μ l, 溶液在 95°C 培养 30 min。本试验中反应混合液不经过预先变性就与 DNA 芯片杂交。

b. 60°C 条件下标记和片段化：

将 50 μ l 甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)和 2 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μ l PCR 产物中。总体积调整到 100 μ l, 溶液在 60°C 培养 30 min。反应混和液按照上面所描述的方法纯化。在本试验中 DNA 片段在与 DNA 芯片杂交前先按照实施例 12.2 描述的方法变性。

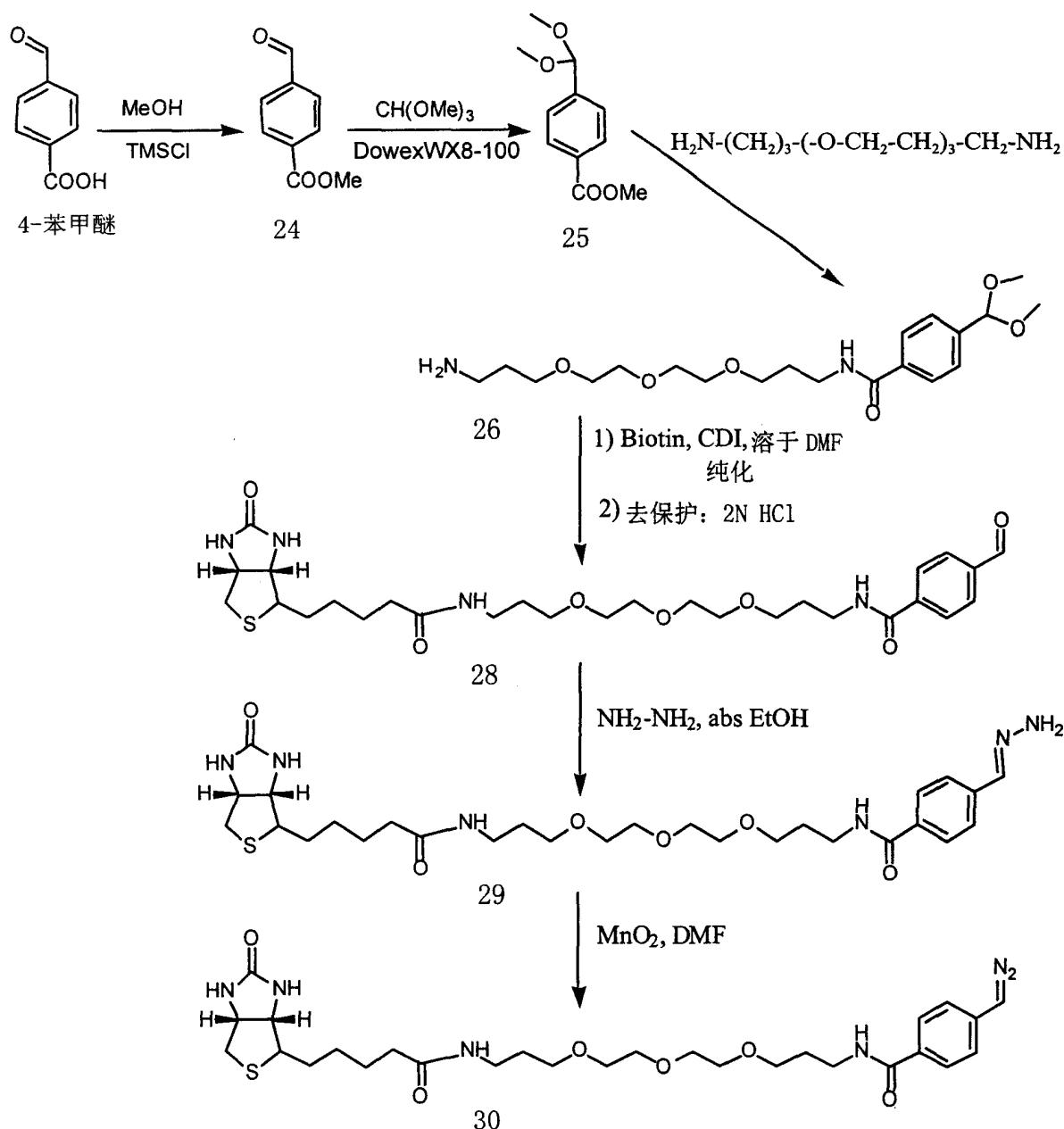
结果

所用试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 95°C 标记、片段化和变性	>95	5426	506	10.7
b. 60°C 标记和片段化，然后 95°C 变性	>95	7015	818	6.8

表 11：一步法标记、片段化及变性 DNA

实施例 12.2 证明了变性对于双链 DNA 检测敏感性的重要性。表 11 中的结果表明通过制造脱碱基位点产生片段化, DNA 的标记、片段化和变性可以在一步中完成, 从简易性及节约操作者时间的观点来看这是一个值得注意的进步, 并且不会影响检测的敏感性。

实施例 20：对-Bio-EG3-PDAM 的合成：



4-羧基苯甲醛的保护:

4-羧基苯甲醛是从市场上购买的。将其溶于 100ml 三甲基甲硅烷基氯(10 g; 20 mmol)的 MeOH 溶液中。混合物在室温下持续搅拌 40 h。蒸发后留下白色固体为 4-甲氧基羧基苯甲醛 24，用 NMR 确证其结构，然后用于下一步的反应。

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ=10.07(s, 1H, -CHO); 8.17(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6}), 7.92(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5}); 3.93(s, 3H, CO-O-CH₂)。

4-甲氧基羧基苯甲醛的保护:

4-甲氧基羧基苯甲醛(3.35 g; 20 mmol)溶于含有Dowex 50WX8-100(1 g)的三甲基原甲酸盐(4.8 g; 40 mmol)。混合物在回流条件下加热2 h，然后过滤并蒸发。经过重结晶试验后，NMR分析，结果表明反应是不完全的，因此从新在30 ml MeOH，

30 ml CH(Ome)₃和1 g Dowex 50WX8-100中室温下反应。然后再过滤和蒸发得到3.55 g(16.89 mmol, 84%)的产物25。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ=8.01(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6})； 7.50(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5})； 5.41(s, 1H, CH)； 3.93(s, 3H, -CO-O-CH₃)； 3.29(s, 6H, -O-CH₃)。

化合物26

化合物25(3.1 g; 14.8 mmol)溶于16 ml(73 mmol)4, 7, 10-三氧-1, 13-三癸二胺中。溶液在140–150°C 加热2 h。然后将混合物溶解到100 ml DCM(二氯甲烷或CH₂Cl₂)，用10 ml水洗涤6次。有机相通过MgSO₂干燥，然后蒸发直到得到油性物质。将这种油性物质用倾泻法连续以戊烷洗涤3次，然后用DCM和水抽提。经过MgSO₂干燥和蒸发后分离出产物26，产率为63%(9.27 mmol)。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ=7.78(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6})； 7.46(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5})； 5.39(s, 1H, CH)； 3.62–3.47(m, 14H, H_{7, 8, 10, 11}和H_{5, 13}和H₃)； 3.29(s, 6H, -O-CH₃)； 2.72(m, 2H, H₁₅)； 1.87(m, 2H, H₄)； 1.64(m, 2H, H₁₄)； 1.30(宽s, 2H, NH₂)。

化合物27的生物素化：

将生物素(500 mg; 2.05 mmol)悬于10 ml DMF，然后键入365 mg(2.25 mmol)CDI。溶液在室温下持续搅拌30 min。将化合物26(900 mg; 2.26 mmol)溶于1 ml DMF中，然后一点一点地加入到上述溶液中，混合物在室温下持续搅拌1 h。蒸发后通过急骤层析纯化，所用的色谱柱为20 mm 直径，洗脱液为250 ml MeOH-DCM 6%，然后是200 ml MeOH-DCM 7%，最后是200 ml MeOH-DCM 8%。产物27的相应组分混和后蒸发干燥，得到1.00 g 油性物质，产率约为50%。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ=9.50(宽s, 1H, NH咪唑)； 7.80(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6})； 7.64(s, 1H, H咪唑)； 7.46(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5}和1H, NH₂)； 7.05(S, 2H, H咪唑)； 6.76(t, 1H, NH₁₆)，6.20(宽s, 1H, NH_{B1})； 5.44(宽s, 1H, NH_{B3})； 5.37(s, 1H, CH)； 4.42(m, 1H, H_{B6a})； 4.24(m, 1H, H_{B3a})； 3.59–3.44(m, 14H, H_{7, 8, 10, 11}和H_{5, 13}和H₃)； 3.29(m, 8H, H₁₅和2-O-CH₃)； 3.07(m, 1H, H_{B4})； 2.84和2.66(ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6})； 2.13(t, 2H, J=8 Hz, H_{B10})； 1.85(m, 2H, H₄)； 1.66(m, 2H, H₁₄)； 1.40–1.37(m, 6H, H_{B7, B8, B9})。

醛化合物28：

乙缩醛27溶于50 ml 氯仿中，然后加入20 ml 2N HC1。两相混和物剧烈搅拌15 min。有机相回收，用无水NaHCO₃干燥。过滤并蒸发后得到膏状化合物28(495 mg; 0.855 mmol)，根据生物素计算总产率为42%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ= 10.05 (s, 1H, CHO); 7.98 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6}); 7.92 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5}); 7.58 (t, 1H, NH₂); 6.46 (t, 1H, NH₁₆), 6.02 (宽s, 1H, NH_{B1}); 5.19 (宽s, 1H, NH_{B3}); 4.46 (m, 1H, H_{B6a}); 4.27 (m, 1H, H_{B3a}); 3.66–3.56 (m, 10H, H_{7, 8, 10, 11}和H₅); 3.50–3.29 (m, 4H, H_{3, 13}); 3.28 (m, 2H, H₁₅); 2.95 (m, 1H, H_{B4}); 2.84和2.71 (ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}); 2.15 (t, 2H, J=8 Hz, H_{B10}); 1.89 (m, 2H, H₄); 1.72–1.63 (m, 6H, H₁₄, H_{B7, B9}); 1.23 (m, 2H, H_{B8})。

腙化合物29:

将醛化合物18 (495 mg; 0.855 mmol) 溶于10 ml无水乙醇中。加入肼 (350 μl; 7.20 mmol)，然后将反应混合物在回流条件下加热1 h。蒸发后得到的油性物质溶于无水乙醇中以便再次蒸发。用戊烷研磨后得到泡状物质。膏状产物29 (511 mg; 0.862 mmol) 的产率为100%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ= 7.76 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6}); 7.72 (s, 1H, CH); 7.56 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5}); 7.34 (t, 1H, NH₂); 6.45 (t, 1H, NH₁₆); 5.98 (宽s, 1H, NH_{B1}); 5.78 (宽s, 2H, NH₂); 5.18 (宽s, 1H, NH_{B3}); 4.44 (m, 1H, H_{B6a}); 4.26 (m, 1H, H_{B3a}); 3.62–3.56 (m, 10H, H_{7, 8, 10, 11}和H₅); 3.48–3.45 (m, 4H, H_{3, 13}); 3.27 (m, 2H, H₁₅); 3.07 (m, 1H, H_{B4}); 2.84 和2.68 (ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}); 2.11 (t, 2H, J=8 Hz, H_{B10}); 1.86 (m, 2H, H₄); 1.72–1.59 (m, 6H, H₁₄, H_{B7, B9}); 1.21 (m, 2H, HB8)。

重氨基化合物30:

将腙化合物29 (357 mg; 0.602 mmol) 溶解到17.5 ml DMF中，然后加入 MnO₂ (700 mg; 7.7 mmol)，室温下搅拌12 min后将混合物用含有硅藻土 (厚度: 2 cm) 和3 Å (0.5 cm) 粉状分子筛的微孔过滤，反应混合物蒸发干燥。得到的残留油性物质用乙醚连续洗三次。可以得到淡粉红色固体化合物30 (290 mg, 0.491 mmol)，产率为82%。

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ= 8.28 (t, 1H, NH₂); 7.77 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6}); 7.74 (t, 1H, NH₁₆); 7.00 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5}); 6.38 (宽s, 1H, NH_{B1}), 6.32 (宽s, 1H, NH_{B3}); 5.80 (s, 1H, CH-N₂); 4.27 (m, 1H, H_{B6a}); 4.11 (m, 1H, H_{B3a}); 3.51–3.44 (m, 10H, H_{7, 8, 10, 11}和H₅); 3.37 (m, 2H, H₁₅); 3.32 (m, 4H, H_{3, 13}); 3.05 (m, 1H, H_{B4}); 2.79 和2.58 (ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}); 2.02 (t, 2H, J=8 Hz, H_{B10}); 1.69 (m, 2H, H₄); 1.59–1.48 (m, 6H, H₁₄, H_{B7, B9}); 1.25 (m, 2H, H_{B8})。

化合物30的反应性用尿嘧啶3'-单磷酸鉴定，用毛细管电泳监测。分析条件与实

施例6. 1相同。结果显示化合物的半衰期是45分钟。试剂在-20°C 条件下至少可以保存1个月。

实施例21：用标记试剂对-Bio-EG3-PDAM标记和片段化DNA扩增子：

这种类型的分子，也就是携带聚乙二醇连接臂的PDAM衍生物所具有的主要优点在于其可以使叠氮功能几天和生物素保持分离，因而增加了其可溶性，并且在最后的分析中这些分子的反应性得到提高。

对-Bio-EG3-PDAM衍生物30是按照实施例20的方法制备的。DNA扩增子是按照实施例5描述的方法制备的。两种标记反应方法如下。

a. 对-Bio-EG3-PDAM试剂：

将10μl 对-Bio-EG3-PDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77μl无DNA酶和RNA酶的水加入到10μl PCR产物中。溶液混匀后没有出现沉淀。将溶液在95°C培养10 min, 然后加入3μl 0.1M HCl再于95°C培养10 min。

试验方法的其他步骤与实施例8相同。

b. 用间-BioPMDAM试剂标记：

将10μl 对-Bio-EG3-PDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77μl无DNA酶和RNA酶的水加入到10μl PCR产物中。这种产物的合成在实施例1. 1中已经提及。溶液出现轻微沉淀。将溶液在95°C培养10 min, 然后加入3μl 0.1M HCl再于95°C培养10 min。

试验方法的其他步骤与实施例8相同。

结果

所用试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 用对-Bio-EG3-PDAM试剂标记	> 95%	15151	621	24.4
b. 用 间-BioPMDAM试剂标记	> 95%	11226	515	21.8

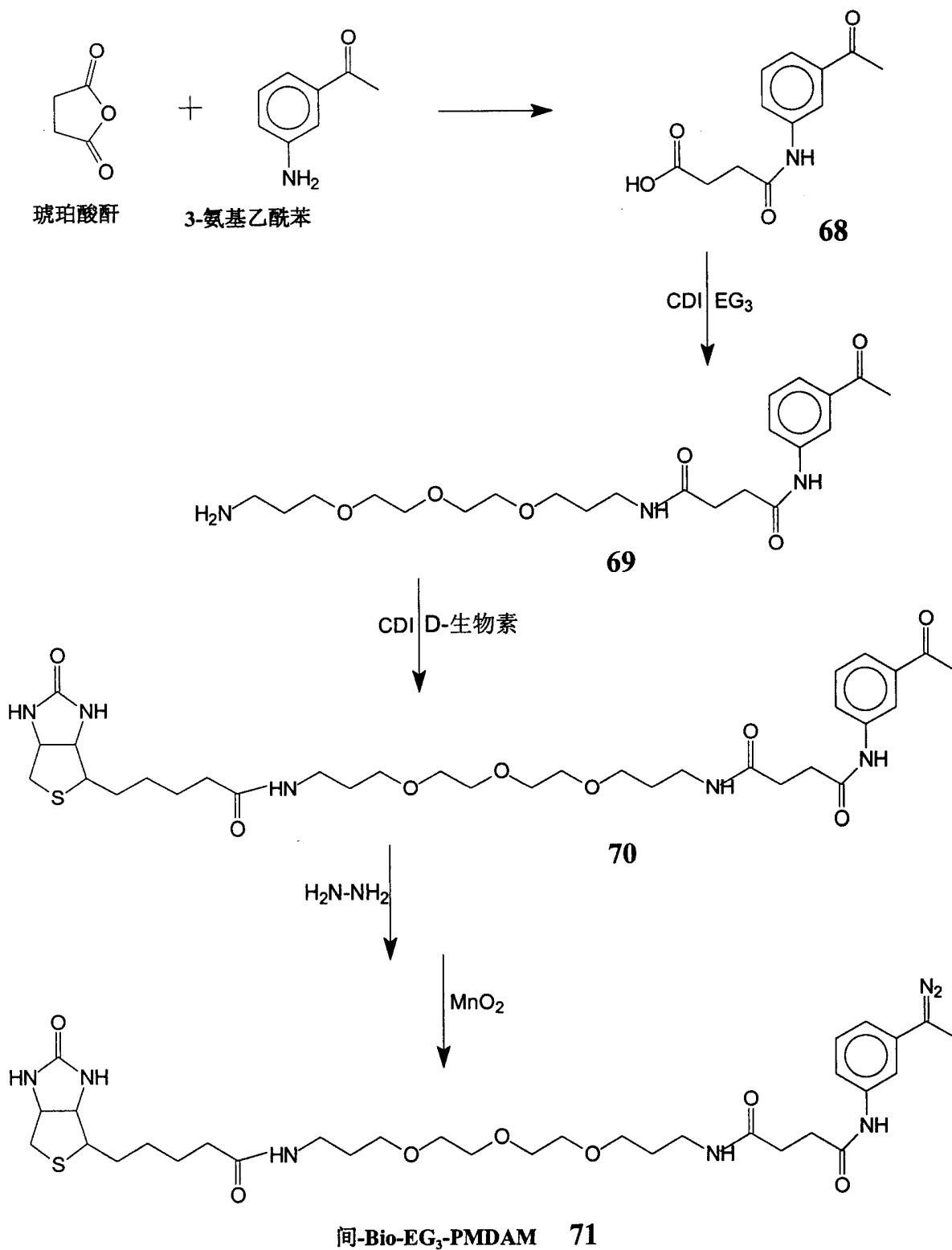
表12：用对-Bio-EG3-PDAM和间-BioPMDAM标记和片段化DNA扩增子的比较研究

表12中显示的信号强度是令人满意的，同源性百分率也是很高的。结果说明将聚乙二醇臂引入到叠氮标记分子上可以增加试剂的水溶性。因此试验比较均一。而且溶解度的增加可以提高标记物的反应性。

实施例22：其他含有聚乙二醇连接臂的PDAM衍生物的合成：

实施例22. 1：间-Bio-EG3-PDAM的合成：

合成步骤



D-生物素

化合物68:

3-氨基苯乙酮(14.5 g, 107 mmol)溶于50 ml无水DMF中。加入琥珀酐(10.7 g, 107 mmol)，混合物在室温下通氩气持续搅拌。6 h后将溶液抽真空浓缩，加入50 ml甲醇。得到的沉淀物过滤并用甲醇和乙醚洗涤。因而得到粉末状的19.4 g(81%产物)

68，其颜色为掺着少量灰黄颜色的白色。

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ=2. 5–2. 6 (m, 7H) ; 7. 45 (t, 1H) ; 7. 64 (d, 1H) ; 7. 83 (d, 1H) ; 8. 19 (s, 1H) ; 10. 16 (S, 1H) ; 12. 12 (s, 1H)。

化合物69:

将5. 07 g (22 mmol) 化合物68溶于10 ml无水DMF中，通氩气。混合物置于冰上，加入5. 00 g (32 mmol) 羧基二咪唑。20min后，缓慢加入20 ml (94. 6 mmol) 4, 7, 10-三氧三癸二胺(EG3)，室温下反应3小时，将DMF蒸发掉，残留物收集到100 ml CH₂Cl₂中。用饱和NaHCO₃和水抽提，然后用无水Na₂SO₄干燥有机相，溶剂被蒸发掉。因此得到4. 34 g (46%) 产物69。

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ =1. 59 (m, 2H) ; 1. 87 (m, 2H) ; 2. 16 (S, 3H) ; 2. 40 (m, 2H) ; 2. 55 (m, 2H) ; 3. 08 (m, 2H) ; 3. 45 (m, 16H) ; 7. 30 (t, 1H) ; 7. 42 (d, 1H) ; 7. 70 (d, 1H) ; 7. 83 (t, 1H) ; 7. 97 (s, 1H) ; 10. 00 (s, 1H)。

生物素化的化合物70:

在氩气下将D-生物素 (1. 0 g, 4. 1 mmol) 溶于10 ml无水DMF中，混合物在冰上冷却，加入溶于10ml无水DMF中的羧基二咪唑(CDI) (0. 665 g, 4. 1 mmol)。15min后，加入溶于2 ml DMF中的化合物69 (1. 8 g, 4. 1 mmol)。在35℃下反应3 h，然后蒸发掉DMF，残留物收集到100 ml CH₂Cl₂中。用饱和NaHCO₃和水抽提，然后用无水Na₂SO₄干燥有机相，溶剂被蒸发掉。产物的NMR特征表明所得到的是产物70和游离EG₃的混合物。在继续合成前要作进一步的纯化。

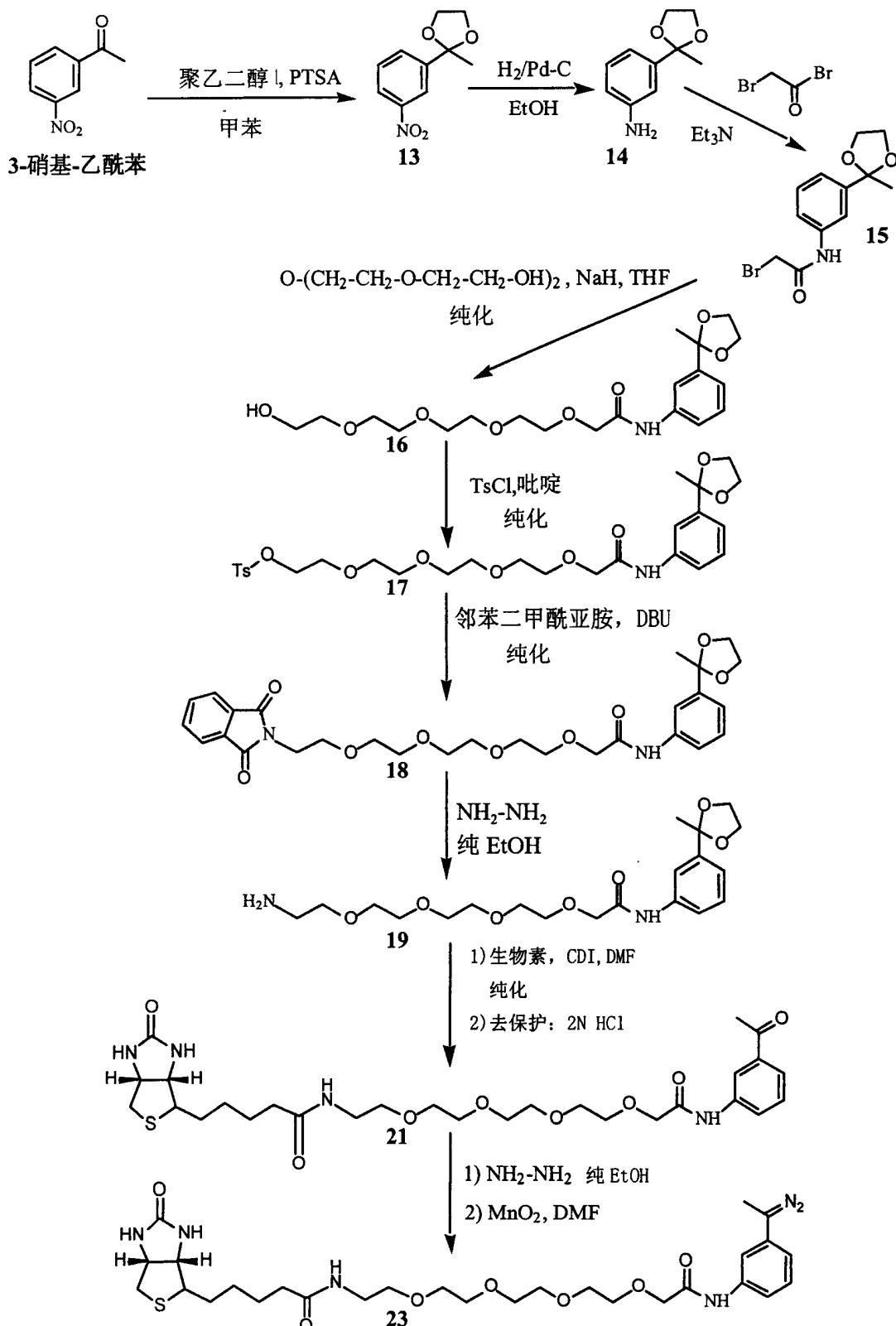
按照实施例1描述的方法经过两个合成步骤就得到了最终的化合物间-Bio-EG₃-PMDAM。

本合成方法的优势有两个。其一，只需两步就可以得到产物69；这个产物可以作为叠氮基的前体通过末端的氨基连接到不同性质的可检测分子上。通过这个基团也可以将化合物69嫁接到固相支持物上。其二，化合物71与间-Bio-PMDAM(我们的参照分子)具有相同的活性中心，这就使乙烯甘油(EG₃)臂的连接更容易，具有检测优势。

本试剂在-20℃条件下至少能稳定1月。

实施例22. 2：间-Bio-EG4-PMDAM的合成：

合成方案:



3-硝基苯乙酮13的保护:

将33g(0.20 mol)3硝基苯乙酮溶于400 ml甲苯中，然后加入40 ml(0.717 mol)乙烯甘油和600 mg(3.15 mmol)旁-甲苯磺酸(PTSA)。用Dean Stark system计数。

溶液在130°C加热3 h。溶液的稳定降到室温时，加入400 ml乙酸乙酯，然后用8 ml饱和NaHCO₃溶液洗涤。有机相用MgSO₄干燥。蒸发后得到暗黄色固体13(39.72 g; 0.190 mol)，产率为95%。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ = 7.11(t, 1H, J=8 Hz, Ar-H); 6.87–6.78(m, 2H, Ar-H); 6.59(dd, 1H, J=6.5 Hz, Ar-H); 4.00(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 3.79(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 1.61(s, 3H, CH₃)。

胺14的制备：

将化合物13(39.7 g; 0.190 mol)溶于500 ml乙醇中，然后加入1 g 10% 的附在碳上的钯。混合物加热以使其完全溶解，然后使溶液降到室温。抽真空后将液体置于H₂中，持续剧烈搅拌5 h。然后将溶液在热的状态下过滤冰蒸发。产物14用戊烷洗涤，分离出固体形式的产物(34 g; 0.189 mol)，产率为99%。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ = 7.14(t, 1H, J=8 Hz, Ar-H); 6.85(m, 2H, J=7.5 Hz, Ar-H); 6.79(s, 1H, Ar-H); 6.59(dd, 1H, J=6.5 Hz, Ar-H); 4.00(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 3.77(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 1.61(s, 3H, CH₃)。

溴化化合物15：

胺14(12.3 g; 68.7 mmol)和三乙胺(7 g; 69 mmol)在氩气下溶于150 ml DCM。在-5°C下滴加溶于150 ml DCM 中的13.8 g(60 mmol)溴乙基溴化物溶液。在滴加的最后加入100 ml 1N NaHCO₃水溶液。有机相用NaHCO₃水溶液连续洗涤两次然后用MgSO₄干燥。蒸发干燥后得到22.6 g褐色油性物质，就是化合物15，用于下一步的反应。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ=8.29(宽s, 1H, NH); 7.62(dt, 1H₄, J=5 Hz, Ar-H); 7.47(s, 1H, Ar-H₂); 7.38–7.19(m, 2H, Ar-H_{5,6}); 4.00(m, 2H, Br-CH₂); 3.75(m, 4H, H₂C-H₂C_{羧醛}); 1.61(s, 3H, CH₃)。

乙醇化合物16：

氢化钠(3.3 g; 82.5 mmol)用戊烷洗涤三次，然后悬于150 ml THF中，在室温下加入四乙烯甘油(50 ml; 0.29 mol)。溶液持续搅拌15 min，然后冷却到-5°C。

将化合物15预先滴加稀释到25 ml THF中。混合物持续搅拌30 min以使其降到室温。将溶液浓缩到100ml然后稀释到500 ml CHCl₃中。有机相用250ml 1N的NaHCO₃水溶液连续洗涤三次然后用MgSO₄干燥。产物在二氧化硅柱(柱径65 mm)上通过急骤层析纯化，洗脱液为1.5 1 MeOH-DCM 5%，然后是500 ml MeOH-DCM 7%，最后是500 ml MeOH-DCM 10%。化合物16相应的组分混和在一起蒸发干燥，得到17.4 g(42.1 mmol)产物，产率为61%。

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ=8.86(宽s, 1H, NH); 7.71(d, 1H, J=7.5 Hz, Ar-H₄); 7.51(s, 1H, Ar-H₂); 7.29–7.24(m, 2H, Ar-H_{5, 6}); 4.09(m, 2H, CO-CH₂-O); 3.99(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 3.72–3.53(m, 20H, O-CH₂-CH₂-O, H₂C_{羧醛} 和 HO-CH₂); 1.61(s, 3H, CH₃)。

甲苯磺酸盐化合物17:

将乙醇16(4.13 g; 10.0 mmol)溶于5 ml 吡啶中。然后在室温下2.0 g(10.5 mmol)甲苯磺酰氯。混和物下氩气中搅拌10 h。溶液用100 ml DCM稀释，有机相用20ml 1N的NaHCO₃水溶液洗涤三次，然后在与甲苯共同蒸发前用MgSO₄干燥。产物通过急骤层析纯化，色谱柱径50 mm，洗脱液为500ml MeOH-DCM 2%，然后是500 ml MeOH-DCM 3%，最后是500 ml MeOH-DCM 4%。产物17的相应组分混和后蒸发干燥，得到3.68 g(6.48 mmol)油性物质，产率约为65%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ=8.86(宽s, 1H, NH); 7.76(d, 4H, J=5.5 Hz, Ar-H_{甲苯磺酰}); 7.60(d, 1H, J=7.5 Hz, Ar-H₄); 7.50(s, 1H, Ar-H₂); 7.32–7.22(m, 2H, Ar-H_{5, 6}); 4.10(m, 2H, CO-CH₂-O); 4.00(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 3.73–3.54(m, 20H, O-CH₂-CH₂-O, H₂C_{羧醛} 和 HO-CH₂); 2.42(s, 3H, Ar-CH₃); 1.61(s, 3H, CH₃)。

邻苯二甲酰亚胺化合物18:

甲苯磺酸盐化合物17(3.68 g ; 6.48 mmol)用1.52 g(10.0 mmol)DBU(1, 8-叠氮二环[5.4, 0]十一碳烯)溶解，然后加入邻苯二甲酰亚胺(1.47 g; 10 mmol)。所得到的溶液在85–90°C加热17 h，然后蒸发。产物在二氧化硅柱(柱径65 mm)上通过急骤层析纯化，洗脱液为1 1丙酮-DCM 15%，然后是1 1丙酮-DCM 20%。化合物18相应的组分混和在一起蒸发干燥，得到3.15 g(5.8 mmol)产物，产率为90%。

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ=8.73(宽S, 1H, NH); 7.79(m, 2H, Ar-H_{邻苯(phtha)}); 7.99(m, 2H, Ar-H_{邻苯(phtha)} 和 Ar-H₄); 7.49(s, 1H, Ar-H₂); 7.27–7.18(m, 2H, Ar-H_{5, 6}); 4.10(m, 2H, CO-CH₂-O); 4.00(m, 2H, H₂C_{羧醛}); 3.69–3.56(m, 20H, O-CH₂-CH₂-O, H₂C_{羧醛} 和 N_{邻苯(phtha)}-CH₂); 1.61(s, 3H, CH₃)。

氨基化合物19:

产物18在75–80°C回流加热下溶于20 ml无水乙醇中。然后加入肼(1.07 ml; 22.1 mmol)，混合物持续搅拌1 h 15 min。沉淀物在烧结玻璃上过滤并蒸发掉乙醇相。然后用DCM洗涤白色沉淀物并蒸发掉DCM相。得到的黄色油性物质(2.3 g; 5.57 mmol)直接用于下一步的反应，即使含有咪唑也可以在下面乙缩醛去保护步骤去除。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ=8.83(宽s, 1H, NH); 7.69(d, 1H, J=7.5 Hz, Ar-H₄); 7.51(s, 1H, Ar-H₂); 7.30–7.19(m, 2H, Ar-H_{5, 6}); 4.10(m, 2H, CO-CH₂-O); 4.00(m,

2H, $\underline{\text{H}_2\text{C}_{\text{actal}}}$)；3.69–3.56(m, 20H, 0– CH_w – CH_w –0, $\underline{\text{H}_2\text{C}_{\text{羧醛}}}$ 和 $\text{H}_2\text{N}–\text{CH}_2$)；1.61(s, 3H, CH_3)。

生物素化的化合物20:

将D-生物素(1.05 g; 4.32 mmol)溶于10 ml无水DMF中。在氩气中加入790 mg(4.87 mmol)羧基二咪唑(CDI)。搅拌10 min后将稀释在5 ml DMF中的氨基19加入。溶液持续搅拌40 min，然后在通过急骤层析纯化前蒸发。

所用色谱柱径为50mm，洗脱液为500 ml MeOH–DCM 5%，然后是500 ml MeOH–DCM 10%，最后是500 ml MeOH–DCM 15%。化合物20相应的组分混和在一起蒸发干燥，得到3. 黄色油性物质(1.66 g; 2.6 mmol)。

根据NMR谱可知，得到的黄色油性物质(2.4 g)含有重量百分比为30%的咪唑。由此可以推断出产物20的产率相对于起始生物素来说是60%。

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ = 8.80(宽s, 1H, NH)；7.66(m, 3H, Ar– H_4 和 $\text{H}_{\text{咪唑}}$)；7.54(s, 1H, Ar– H_2)；7.28–7.24(m, 2H, Ar– $\text{H}_{5,6}$)；7.07(s, 2H, $\text{H}_{\text{咪唑}}$)，6.59(t, 1H, NH_{15})；6.06(宽s, 1H, $\text{NH}_{\text{B}1}$)；5.19(宽s, 1H, $\text{NH}_{\text{B}3}$)；4.45(m, 1H, $\text{H}_{\text{B}6\text{a}}$)；4.27(m, 1H, $\text{H}_{\text{B}3\text{a}}$)；4.10(s, 2H, $\text{H}_{3\cdot}$)，4.00(m, 2H, $\underline{\text{H}_2\text{C}_{\text{羧醛}}}$)；3.75–3.49(m, 18H, 0– CH_2 – CH_2 –0 和 $\underline{\text{H}_2\text{C}_{\text{羧醛}}}$)；3.36(m, 2H, $\text{H}_{14\cdot}$)；3.09(m, 1H, $\text{H}_{\text{B}4}$)；2.85 和 2.66(ABX系统, 2H, $^2\text{J}_{\text{AB}}=5$ Hz, $^3\text{J}_{\text{AX}}=12$ Hz, $^3\text{J}_{\text{BX}}=0$ Hz, $\text{H}_{\text{B}6}$)；2.16(t, 2H, $\text{J}=8$ Hz, $\text{H}_{\text{B}10}$)；1.61(S, 3H, CH_3)；1.59–1.3(m, 6H, $\text{H}_{\text{B}9, \text{B}8, \text{B}7}$)。

酮化合物21:

将乙缩醛化合物20溶于80 ml 氯仿中，然后加入30 ml 2N HCl。混合物持续剧烈搅拌45 min。有机相回收然后用无水 NaHCO_3 干燥。过滤后将溶液蒸发，得到的油性物质用戊烷洗涤得到产物21(1.48 g; 2.48 mmol)，产率为99%。

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ =8.99(宽s, 1H, NH)；8.07(s, 1H, Ar– H_2)；7.98(d, 2H, $\text{J}=8$ Hz, Ar– H_4)；7.66(d, 2H, $\text{J}=8$ Hz, Ar– H_6)；7.42(t, 2H, $\text{J}=8$ Hz, Ar– H_5)；6.38(t, 1H, NH_{15})；5.78(宽s, 1H, $\text{NH}_{\text{B}1}$)；4.96(宽s, 1H, $\text{NH}_{\text{B}3}$)；4.47(m, 1H, $\text{H}_{\text{B}6\text{a}}$)；4.29(m, 1H, $\text{H}_{\text{B}3\text{a}}$)；4.13(s, 2H, $\text{H}_{3\cdot}$)；3.76–3.37(m, 16H, 0– CH_2 – CH_a –0)；3.32(m, 2H, $\text{H}_{14\cdot}$)；3.11(m, 1H, $\text{H}_{\text{B}4}$)；2.89 和 2.75(ABX系统, 2H, $^2\text{J}_{\text{AB}}=5$ Hz, $^3\text{J}_{\text{AX}}=12$ Hz, $^3\text{J}_{\text{BX}}=0$ Hz, $\text{H}_{\text{B}6}$)；2.59(s, 3H, CH_3)；2.16(t, 2H, $\text{J}=8$ Hz, $\text{H}_{\text{B}10}$)；1.64–1.40(m, 6H, $\text{H}_{\text{B}9, \text{B}8, \text{B}7}$)。

腙化合物22:

将酮21溶于20 ml无水乙醇中。混合物在75–80 °C下回流加热。然后加入肼(816 μ l; 16.81 mmol)，混合物持续搅拌3 h。过滤后将混合物蒸发干燥，残留物从

新溶解到乙醇中直到出现厚厚的白色泡沫。在第二个例子中，将此泡沫溶解到50 ml 氯仿中，然后加入20 ml NaHCO₃溶液。混合物完全洗涤后回收有机相。用无水Na₂CO₂ 干燥，过滤蒸发干燥后得到新的黏性泡沫。后者就是产物22(842 mg; 1.38 mmol)，产率为66%。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ= 8.81(宽s, 1H, NH); 8.82(s, 1H, Ar-H₂); 7.64(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H₄); 7.32(m, 4H, Ar-H_{5, 6}); 6.43(t, 1H, NH_{15'}); 5.89(宽s, 1H, NH_{B1}); 5.46(宽s, 2H, NH₂); 4.99(宽s, 1H, NH_{B3}); 4.44(m, 1H, H_{B6A}); 4.27(m, 1H, H_{B3a}); 4.11(s, 2H, H_{3'}); 3.70–3.37(m, 16H, 0-CH₂-CH₂-0); 3.32(m, 2H, H_{14'}); 3.08(m, 1H, H_{B4}); 2.87 和 2.67(ABX系统, 2H, ²J_{AB}= 5 Hz, ³J_{AX} =12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}); 2.11(m, 5H, CH₃ 和H_{B10}); 1.64–1.40(m, 6H, H_{B9, B8, B7})。

叠氮化合物23:

将腙化合物22(100 mg; 0.164 mmol)在氩气下溶解到1 ml DMF中。加入80 mg 活化的MnO₂，混合物持续剧烈搅拌30 min。混合物通过塞里塑料(3cm)-粉状分子筛(1cm)复合层过滤。然后将溶液蒸发干燥。在蒸发结束时得到的油性物质磨碎直到得到粉红色粉末，该粉末就是化合物23(78 mg; 0.128 mmol; 78%)。

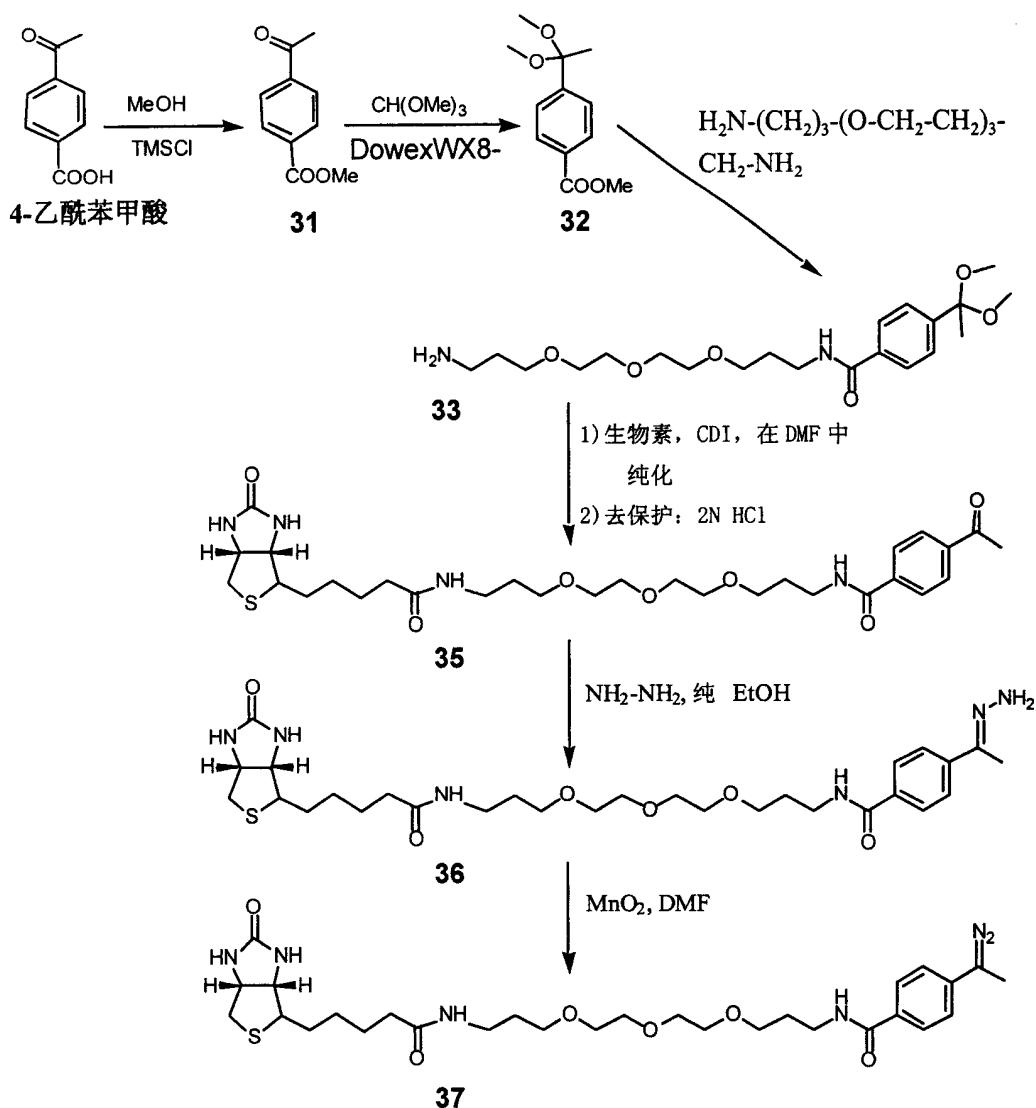
¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ= 9.60(宽s, 1H, NH); 7.89(S, 1H, Ar-H₂); 7.76(t, 1H, NH_{15'}); 7.35–7.25(m, 4H, Ar-H_{5, 6}); 6.64(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H₄); 6.36(宽s, 1H, NH_{B1}); 6.32(宽s, 1H, NH_{B3}); 4.28(m, 1H, H_{B6a}); 4.08(m, 1H, H_{B3a}); 4.06(s, 2H, H_{3'}); 3.55–3.31(m, 16H, 0-CH₂-CH₂-0); 3.17(m, 2H, H_{14'}); 3.08(m, 1H, H_{B4}); 2.80 和 2.59(ABX系统, 2H, ²J_{AB}= 5 Hz, ³J_{AX} =12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}); 2.13(m, 5H, CH₃); 2.13(t, 2H, J=8 Hz, H_{B10}); 1.99–1.30(m, 6H, H_{B9, B8, B7})。

检测化合物23在尿嘧啶3'-单磷酸上的反应性并用毛细管电泳监测。分析条件与实施例6.1一致。结果显示其半衰期是30min。

该试剂在-20°C的稳定性大于1月。

实施例22. 3: 对-Bio-EG3-PMDAM的合成:

合成流程:



• 4-乙酰苯甲酸的保护:

将4-乙酰苯甲酸(1 g; 6.1 mmol)溶解到5 ml MeOH配制的三甲基甲硅烷基氯化物溶液(TMScI, 10 g; 92 mmol)中。混合物90°C加热过夜。蒸发后得到白色固体化合物31(1.21 g; 5.75 mmol)。通过NMR鉴定其特征并用于下一步的反应。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 8.08(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{2, 6})； 7.59(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{3, 5})； 3.18(s, 6H, -O-CH₃)； 1.53(s, 3H, CH₃)。

化合物32:

将化合物31(1.21 g; 5.75 mmol)溶解到5 ml含有Dowex 50WX8-100(0.3 g)的三甲基正甲酸盐中。混合物60°C加热过夜，然后过滤蒸发得到化合物32(1.19 g; 5.3 mmol)，产率为87%。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ =8.00(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{2, 6})； 7.54(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{3, 5})； 3.89(s, 1H, CO-O-CH₃)； 3.16(s, 6H, -O-CH₃)； 1.51(s, 3H, CH₃)。

化合物33:

将化合物32(1.17 g; 5.22 mmol)溶于5 ml(22.7 mmol)4, 7, 10-三氧-1, 13-三癸二胺中。得到的溶液140°C加热4 h。然后将混合物溶解到30 ml DCM中，用10 ml水洗涤三次。有机相通过MgSO₄干燥，然后蒸发直到得到油性产物33(1.44 g; 3.49 mmol)，产率为67%。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ=7.76(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6})；7.51(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5})；3.62–3.47(m, 14H, H_{7, 8, 10, 11}和H_{5, 13}和H₃)；3.15(s, 6H, -O-CH₃)；2.73(m, 2H, H₁₅)；1.88(m, 2H, H₄)；1.65(m, 2H, H₁₄)；1.38(宽s, 2H, NH₂)。

生物素化的化合物34:

将生物素(780 mg; 3.19 mmol)悬于13 ml DMF中。然后加入590 mg(3.60 mmol)CDI。溶液在室温下持续搅拌30 min。化合物33溶于1 ml DMF中，然后将前面的溶液一点一点的加入。得到的混合物在室温下持续搅拌1 h。蒸发掉DMF后，通过急骤层析纯化，所用的色谱柱径为35 mm，所用洗脱液为500 ml MeOH-DCM 6%，然后是250 ml MeOH-DCM 8%，最后是250 ml MeOH-DCM 8%。产物34相应的组分混和后蒸发干燥，得到1.05 g 油性物质，产率约为30%。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃)δ=8.49(宽s, 1H, NH_{咪唑})；7.79(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6})；7.66(s, 1H, H_{咪唑})；7.50(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5})；7.38(t, 1H, NH₂)；7.11(S, 2H, H_{咪唑})；6.67(t, 1H, NH₁₆)；5.99(宽s, 1H, NH_{B1})；5.15(宽s, 1H, NH_{B3})；4.46(m, 1H, H_{B6A})；4.27(m, 1H, H_{B3a})；3.61–3.45(m, 14H, H_{7, 8, 10, 11}和H_{5, 13}和H₃)；3.28(m, 2H, H₁₅)；3.15(s, 6H, -OCH₃)；2.85(m, 1H, H_{B4})；2.85 和2.69(ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6})；2.14(t, 2H, J=8 Hz, H_{B10})；1.86(m, 2H, H₄)；1.69(m, 2H, H₁₄)；1.49(s, 3H, CH₃)；1.42–1.39(m, 6H, H_{B7, B8, B9})。

化合物35:

乙缩醛化合物34溶于45 ml氯仿中，然后加入10 ml 2N的HCl。两相混合物剧烈搅拌5 min。回收有机相，用无水NaHCO₂干燥。过滤、蒸发后得到淡黄色固体形态的化合物35(504 mg; 0.87 mmol)，按照生物素计算产率为27%。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃)δ=7.97(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{2, 6})；7.91(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H_{3, 5})；7.51(t, 1H, NH₂)；6.50(t, 1H, NH₁₆)，6.05(宽s, 1H, NH_{B1})；5.23(宽s, 1H, NH_{B3})；4.45(m, 1H, H_{B6a})；4.27(m, 1H, H_{B3a})；3.62–3.56(m, 10H, H_{7, 8, 10, 11}和H₅)；3.48–3.46(m, 4H, H_{3, 13})；3.27(m, 2H, H₁₅)；3.10(m, 1H, H_{B4})；2.85和2.71(ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6})；2.60(s, 3H, CH₃)；2.14(t, 2H, J=8 Hz, H_{B10})；1.89(m, 2H, H₄)；1.72–1.61(m, 6H, H₁₄, H_{B7, B9})；1.40(m, 2H, H_{B8})。

腙化合物36:

将酮化合物35(500 mg; 0.864 mmol)溶解到11 ml 无水乙醇中。加入肼(335 μ l; 6.911 mmol)，然后将反应混合物回流加热1 h。蒸发后得到的油性物质溶于无水乙醇中以便再次蒸发。得到黏性泡沫状产物(488 mg; 0.823 mmol)，产率为95%。 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ = 7.76(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{2, 6})；7.67(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{3, 5})；7.29(t, 1H, NH₂)；6.46(t, 1H, NH₁₆)，5.98(宽s, 1H, NH_{B1})；5.55(宽s, 2H, NH₂)；5.14(宽s, 1H, NH_{B3})；4.45(m, 1H, H_{B6a})；4.24(m, 1H, H_{B3a})；3.62–3.51(m, 10H, H_{7, 8, 10, 11}和H₅)；3.47–3.45(m, 4H, H_{3, 13})；3.27(m, 2H, H₁₅)；3.07(m, 1H, H_{B4})；2.84 和 2.69(ABX系统, 2H, $^2J_{AB}=5$ Hz, $^3J_{AX}=12$ Hz, $^3J_{BX}=0$ Hz, H_{B6})；2.11(t, 2H, $J=8$ Hz, H_{B10}和s, 3H, CH₃)，1.86(m, 2H, H₄)；1.72–1.59(m, 6H, H₁₄, H_{B7, B9})；1.21(m, 2H, H_{B8})。

叠氮化合物37:

将腙化合物36(200 mg; 0.337 mmol)溶于5 ml DMF中。加入MnO₂(450 mg; 5.17 mmol)。室温下搅拌15 min后将混合物通过含有硅藻土(厚度2 cm)和3 Å(0.5 cm)粉末状分子筛的微孔过滤。反应混合物蒸发干燥。得到的残留油性物质用乙醚连续洗三次，直到得到粉末状物质。得到的化合物37(290 mg, 0.491 mmol)呈粉红色固体状态，产率为93%。

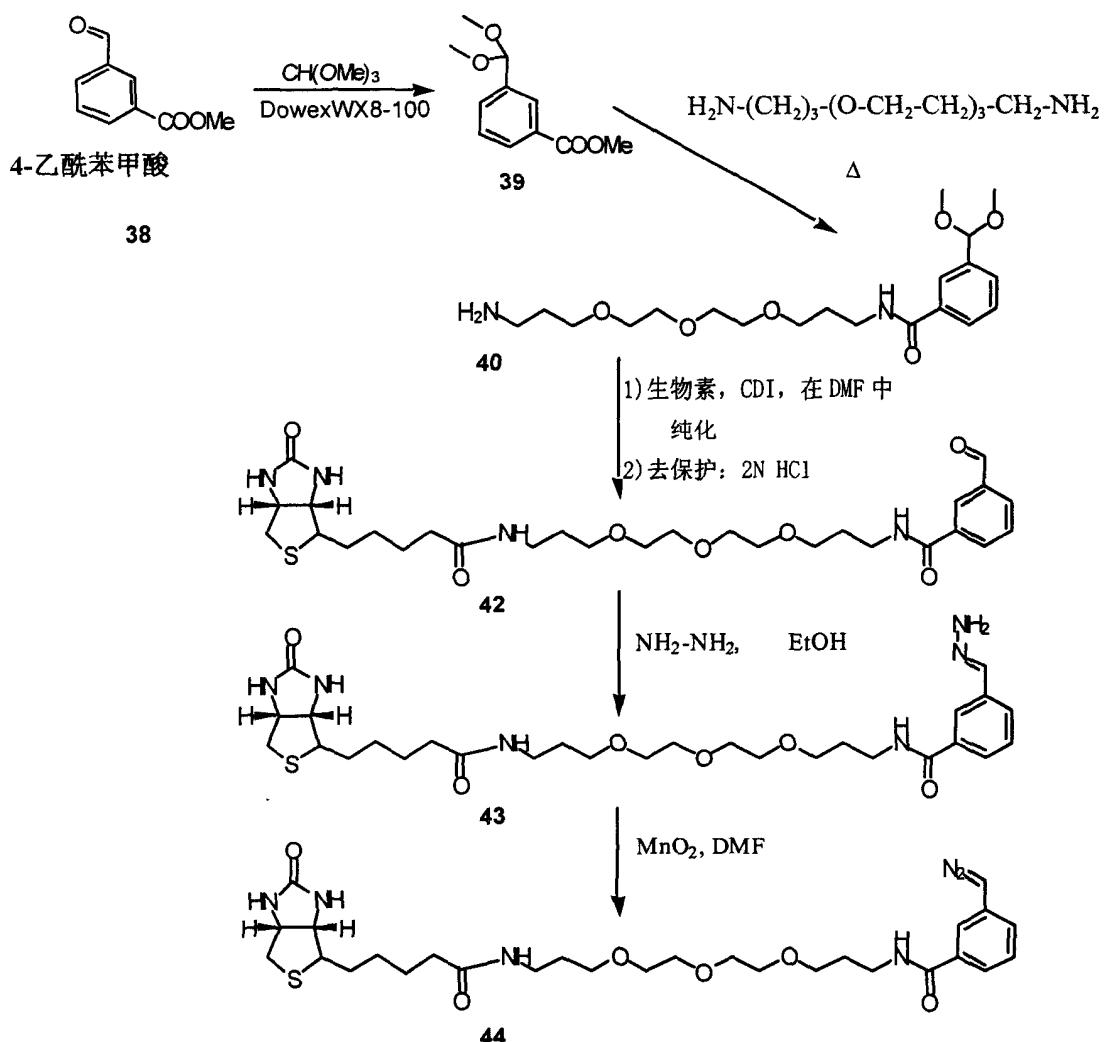
^1H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.33(t, 1H, NH₂)；7.83(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{2, 6})；7.73(t, 1H, NH₁₆)；6.98(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar-H_{3, 5})；6.39(宽s, 1H, NH_{B1})；6.33(宽s, 1H, NH_{B3})；4.30(m, 1H, H_{B6a})；4.12(m, 1H, H_{B3a})；3.51–3.45(m, 16H, H_{7, 8, 10, 11}和H₅和H₁₅和H_{3, 13})；3.07(m, 1H, H_{B4})；2.79 和 2.58(ABX系统, 2H, $^2J_{AB}=5$ Hz, $^3J_{AX}=12$ Hz, $^3J_{BX}=0$ Hz, H_{B6})；2.14(s, 3H, CH₃)；2.04(t, 2H, $J=8$ Hz, H_{B10})；1.77(m, 2H, H₄)；1.62–1.48(m, 6H, H₁₄, H_{B7, B9})；1.31(m, 2H, H_{B8})。

检测化合物37在尿嘧啶3'-单磷酸上的反应性并用毛细管电泳监测。分析条件与实施例6.1一致。结果显示其半衰期是60min。

该试剂在-20℃的稳定性至少为1月。

实施例22.4: 间-Bio-EG₃-PDAM的合成:

合成流程:



甲基3-甲酰苯甲酸盐38的保护:

将Dowex 50WX8-100 树脂(2 g) $\text{H}_2\text{N}-\text{(CH}_2)_3-\text{(O-CH}_2\text{-CH}_2)_3-\text{NH}_2$ 溶于25 ml MeOH 和 25 ml 三甲基o:CH₂-NH₂中，持续搅拌15 min。滗析后用20 ml MeOH连续洗涤树脂两次。然后将树脂置于100ml MeOH内，然后加入50 ml CH(OMe)₃和7.12g(43.4 mmol)甲基3-甲酰苯甲酸盐。溶液持续搅拌15min，然后在蒸发前用折叠的滤纸过滤。分离出淡黄色液体状产物39(9 g; 43.1 mmol)，产率为99%。

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ= 8.10 (s, H, Ar-H₂)；7.9 (d, H, J=8 Hz, Ar-H₄)；7.63 (d, H, J=8 Hz, Ar-H₆)；7.42 (t, H, J=8 Hz, Ar-H₅)；5.40 (s, 1H, CH)；3.90 (s, 3H, -CO-O-CH₃)；3.31 (s, 6H, -O-CH₃)。

化合物40:

将化合物39(2 g; 9.5 mmol)溶于10.4 ml(47.6 mmol)4, 7, 10-三氧-1, 1, 3-三癸二胺中。得到的溶液在165℃下加热2h。然后将混合物溶解到80 ml DCM中，用20ml水洗涤4次。用MgSO₄干燥和蒸发后分离出产物40(2.27 g; 5.69 mmol)。

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ= 7.84 (s, H, Ar-H₂)；7.75 (d, H, J=8 Hz, Ar-H₄)；7.53 (d,

H, J=8 Hz, Ar-H₆) ; 7.39(t, H, J=8 Hz, Ar-H₅) ; 5.38(s, 1H, CH) ; 3.64–3.43(m, 14H, H₇, 8', 10', 11' 和H_{5'}, 13'和H_{3'}) ; 3.29(s, 6H, -O-CH₃) ; 2.72(m, 2H, H₁₅) ; 1.87(m, 2H, H₄) ; 1.64(m, 2H, H₁₄) ; 1.30(宽s, 2H, NH₂)。

生物素化的化合物41:

将D-生物素(344 mg; 1.40 mmol)悬于4 ml DMF中。然后加入250 mg(1.54 mmol)CDI。溶液在室温下持续搅拌30 min。化合物40溶于2 ml DMF中，然后将前面的溶液一点一点的加入。得到的混合物在室温下持续搅拌50min。蒸发后，通过急骤层析纯化，所用的色谱柱径为30 mm，所用洗脱液为750 ml MeOH-DCM 10%，然后是250 ml MeOH-DCM 15%。产物41相应的组分混和后蒸发干燥，得到740mg 油性物质，产率约为50%。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)δ= 7.87(s, H, Ar-H₂) ; 7.78(d, H, J=8 Hz, Ar-H₄) ; 7.65(s, 1H, H_{咪唑}) ; 7.53(d, H, J=8 Hz, Ar-H₆) ; 7.39(t, H, J=8 Hz, Ar-H₅) ; 7.07(s, 2H, H_{咪唑}) ; 6.65(t, 1H, NH₁₆) ; 5.95(宽s, 1H, NH_{B1}) ; 5.38(s, 1H, CH) ; 5.15(宽s, 1H, NH_{B3}) ; 4.43(m, 1H, H_{B6a}) ; 4.27(m, 1H, H_{B3a}) ; 3.59–3.44(m, 14H, H₇, 8', 10', 11' 和H_{5'}, 13'和H_{3'}) ; 3.29(m, 8H, H₁₅和2-O-CH₃) ; 3.07(m, 1H, H_{B4}) ; 2.84 和 2.66(ABX系统, 2H, ²J_{AB}= 5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}) ; 2.13(t, 2H, J=8 Hz, H_{B10}) ; 1.85(m, 2H, H₄) ; 1.66(m, 2H, Hn.) ; 1.40–1.37(m, 6H, H_{B7}, _{B8}, _{B9})。

醛化合物42:

将乙缩醛化合物41溶于20 ml 氯仿中，然后加入5 ml 2N HCl。两相混合物持续剧烈搅拌15 min。有机相回收然后用无水NaHCO₃干燥。过滤后将溶液蒸发，得到淡黄色油性状态的化合物42(593 mg; 1.02 mmol)，产率为87%。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃)δ=10.04(s, 1H, CHO) ; 8.34(s, H, Ar-H₂) ; 8.16(d, H, J=8 Hz, Ar-H₆) ; 7.96(d, H, J=8 Hz, Ar-H₆) ; 7.72(t, 1H, NH₂) ; 7.39(t, H, J=8 Hz, Ar-H₅) ; 6.51(t, 1H, NH₁₆) ; 6.00(宽s, 1H, NH_{B1}) ; 5.30(宽s, 1H, NH_{B3}) ; 4.46(m, 1H, H_{B6a}) ; 4.27(m, 1H, H_{B3a}) ; 3.66–3.56(m, 10H, H₇, 8', 10', 11' 和H_{5'}) ; 3.50–3.29(m, 4H, H_{3'}, _{13'}) ; 3.28(m, 2H, H₁₅) ; 2.95(m, 1H, H_{B4}) ; 2.84 和 2.71(ABX系统, 2H, ²J_{AB}= 5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6}) ; 2.15(t, 2H, J=8 Hz, H_{B10}) ; 1.89(m, 2H, H₄) ; 1.72–1.63(m, 6H, H₁₄, H_{B7}, _{B9}) ; 1.23(m, 2H, H_{B8})。

腙化合物43:

将醛化合物42(593 mg; 1.02 mmol)溶解到10 ml 无水乙醇中。加入肼(400 μl; 8.19 mmol)，然后将反应混合物回流加热50min。蒸发后得到的黄色油性物质用乙醚磨碎直到得到浅褐色粉末状产物43(404 mg; 0.68 mmol)，产率为66%。通过急

骤层析纯化，所用的色谱柱径为15 mm，上样量为150 mg，所用洗脱液为200 mL MeOH-DCM 20%。各组分混和后蒸发干燥，得到144mg 产物43，产率为76%。

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ=7.95 (s, H, Ar-H₂)；8.16 (d, H, J=8 Hz, Ar-H₄)；7.76 (s, 1H, CH)；7.96 (d, H, J=8 Hz, Ar-H₆)；7.38 (t, H, J=8 Hz, Ar-H₅)；6.45 (t, 1H, NH₁₆)；5.98 (宽s, 1H, NH_{B1})；5.72 (宽s, 2H, NH₂)；5.18 (宽s, 1H, NH_{B3})；4.44 (m, 1H, H_{B6a})；4.26 (m, 1H, H_{B3a})；3.62-3.56 (m, 10H, H_{7'}, _{8'}, _{10'}, _{11'} 和 H_{5'})；3.48-3.45 (m, 4H, H_{3'}, _{13'})；3.27 (m, 2H, H_{15'})；3.07 (m, 1H, H_{B4})；2.84 和 2.68 (ABX 系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6})；2.11 (t, 2H, J=8 Hz, H_{B10})；1.86 (m, 2H, H_{4'})；1.72-1.59 (m, 6H, H_{14'}, H_{B7}, _{B9})；1.21 (m, 2H, H_{B8})。

叠氮化合物44:

将腙化合物43(100 mg; 0.187 mmol)溶于4 mL DMF中。加入MnO₂(200 mg; 2.3 mmol)。室温下搅拌13 min后将混合物通过含有硅藻土(厚度2 cm)和3 Å(0.5 cm)粉末状分子筛的微孔过滤。反应混合物蒸发干燥。得到的残留油性物质用乙醚连续洗三次，得到橙色固体化合物44(290 mg, 0.491 mmol)呈粉红色固体状态，产率为83%。

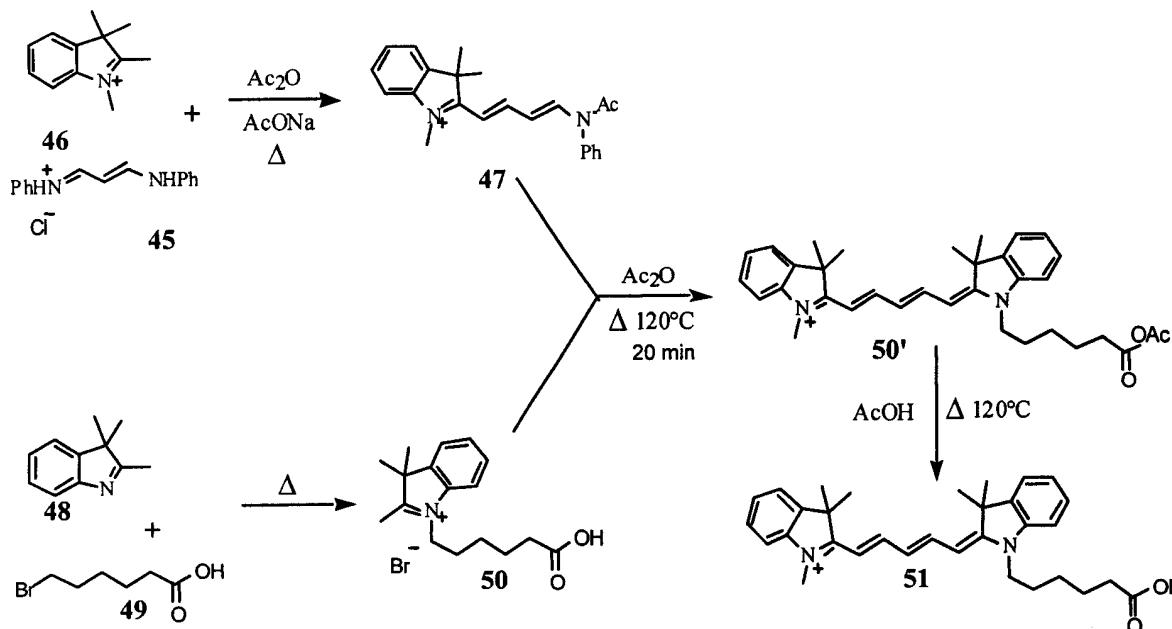
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ=8.39 (t, 1H, NH₂)；7.78 (t, 1H, NH₁₆)；7.39-7.34 (m, Ar-H)；7.09 (d, Ar-H)；6.38 (宽s, 1H, NH_{B1})；6.32 (宽s, 1H, NH_{B3})；5.78 (s, 1H, CH-N₂)；4.27 (m, 1H, H_{B6a})；4.11 (m, 1H, H_{B3a})；3.51-3.44 (m, 10H, H_{7'}, _{8'}, _{10'}, _{11'} 和 H_{5'})；3.37 (m, 2H, H_{15'})；3.32 (m, 4H, H_{3'}, _{13'})；3.05 (m, 1H, H_{B4})；2.79 和 2.58 (ABX 系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, H_{B6})；2.02 (t, 2H, J=8 Hz, H_{B10})；1.69 (m, 2H, H_{4'})；1.59-1.48 (m, 6H, H_{14'}, H_{B7}, _{B9})；1.25 (m, 2H, H_{B8})。

产物在-20°C条件下稳定性大于1月。

实施例23：对-Cy5-EG3-PDAM的合成：

如实施例2所提及的，生物素可以被其他标记物如Cy5替代。本实施例说明PDAM携带的叠氮功能基团也可以通过一个聚乙二醇连接臂连接到这种Cy5标记物上。

合成流程：抗衡离子I⁻不存在于结构式46, 47, 50'和51中。



2-[4-(N-乙酰基-N-苯基胺基)丁-1, 3-二烯]-1, 2, 3, 3-四甲基[3H]碘咯碘化物

47:

将溶于乙酸酐(50 ml)的丙醛二(苯基亚氨基)一盐酸45(13 g; 50.2 mmol)、NaOAc(6.0 g; 69.7 mmol)和1, 2, 3, 3-四甲基[3H]碘咯碘化物46(3.01 g; 10 mmol)的混合物在100°C精确加热20min。冷却后加入乙醚(350 ml)，然后将沉淀下来的棕色固体过滤，用乙醚(3 × 100 ml)洗涤。固体重新溶解到150 ml CH₂Cl₂中，过滤(去除有机盐)，然后用350 ml乙醚沉淀得到棕色固体(3.54 g, 54%)。

¹H NMR(CDCl₃): δ=8.64(d; 1H; J=12 Hz; 1-H); 8.14(t; 1H; J=16; 12 Hz; 3-H); 7.63–7.19(m; 9H); 6.90(d; 1H; J=15 Hz; 4-H); 5.82(t; 1H; J=12; 13 Hz; 2-H); 4.06(s; 3H; NCH₃); (2.16(s; 3H; -COCH₃); 1.74(s; 6H; CH₃)。

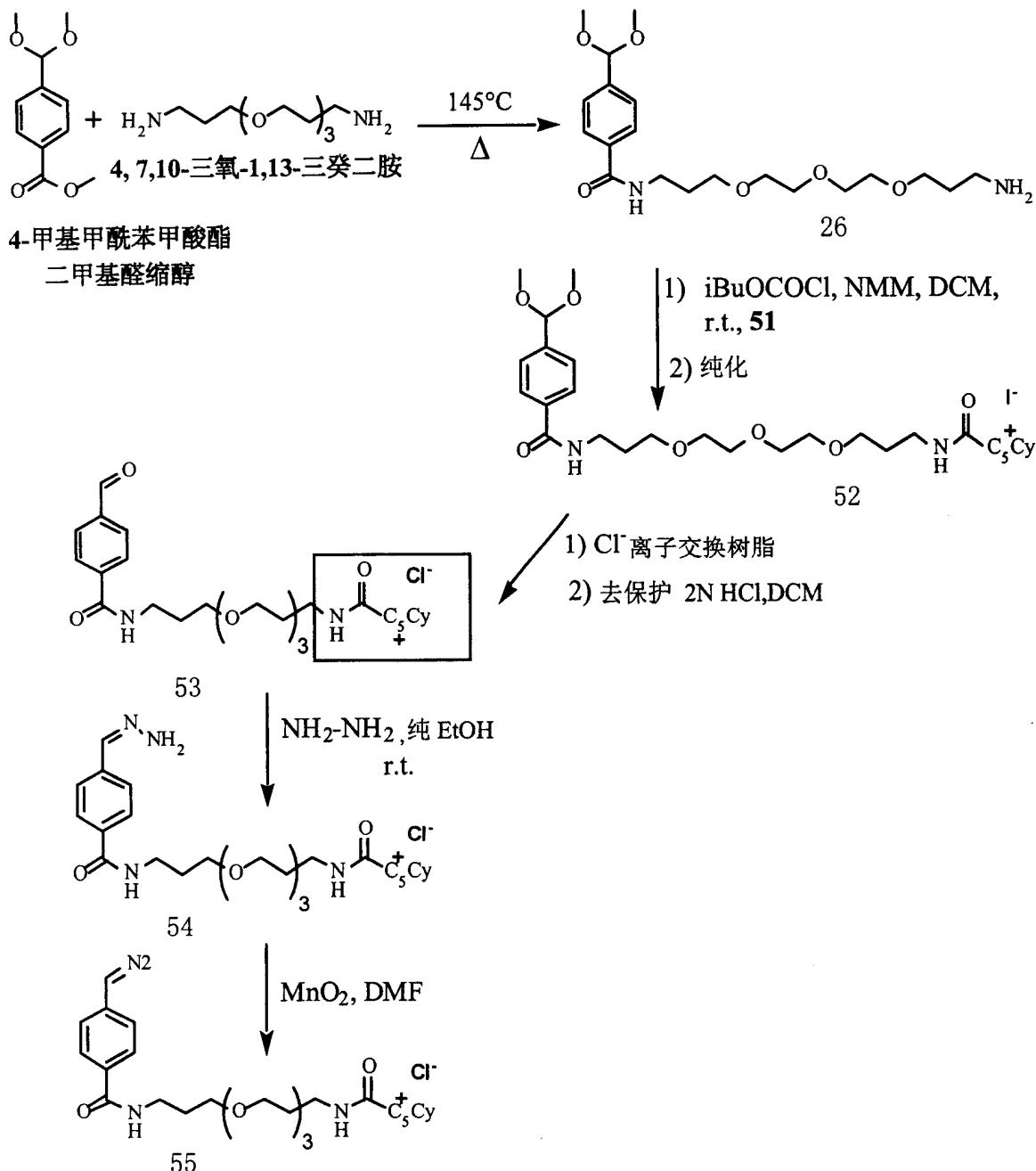
1-(5-羧基戊基)-2, 3, 3-三甲基[3H]碘咯碘化物50:

2, 3, 3-三甲基吲哚 48(10.0 g; 62.8 mmol)和6-溴己酸49(12.3 g; 62.8 mmol)不加溶剂混和，在氩气下110°C加热12 h。紫红色的浆糊状混合物用乙酸乙酯(2 × 60 ml, 浆糊状物质用软膏刀研磨，倾析出上清)洗涤，然后用丙酮(50 ml, 浆糊状物质固化)洗涤。将粉红色固体过滤并在真空下干燥(16.0 g; 73%)。

Cy5COOH 化合物 51:

溶于乙酸酐(11 ml)中的碘化物47(2.5 g; 5.3 mmol)、溴50(1.87 g; 5.3 mmol)和NaOAc(1.08g; 12.1 mmol)的混合物120°C加热25min。冷却后加入乙醚(200 ml)，沉淀物过滤并用乙醚(3 × 50 ml)洗涤。与产物50'对应的固体溶于100ml CH₂Cl₂中，然后蒸发。然后将其溶解到15ml 醋酸中，120°C搅拌30min。加入200ml乙醚并在烧结玻璃上过滤后得到产物51相应的沉淀物(2.71 g; 4.44 mmol)，产率为84%。

¹H NMR (CDCl₃) : δ=8.03(t; 2H; J=10; 11 Hz, 2-H, 4-H); 7.38–6.91(m; 9H; Ar-H, 3-H); 6.41(d; 1H; J=14 Hz; 1-H); 6.31(d; 1H; J=13 Hz; 5-H); 4.07(t; 2H, J=7; 7 Hz; α-CH₂); 3.68(s; 3H; NCH₃); 2.47(t; 2H, J=7; 7 Hz; ε-CH₂); 1.71(m; 18H; CH₃, β, γ和δ-CH₂)。



化合物26与Cy5COOH 51的偶合(产物52):

N-甲基吗啉(NMM, 405μl, 3.68 mmol)加入到溶于15 ml CH₂Cl₂的Cy5COOH 51(1.5 g; 2.46 mmol)溶液中。溶液在冰浴中冷却，放置于氩气中，然后加入异丁基氯甲酸盐(494μl, 3.81 mmol)。搅拌10 min后，加入稀释于8ml CH₂Cl₂中的氨基26(1.86

mg; 4.67 mmol)。混合物在室温下持续搅拌1 h 30 min。加入20 ml CH₂Cl₂, 混合物用25 ml 的NaHCO₃(1N)连续洗涤3次。用Na₂CO₃干燥后过滤以回收蒸发的二氯甲烷相。

通过急骤层析 纯化, 所用色谱柱径为45mm, 20ml组分。洗脱液为MeOH-DCM 10%。产物52相应的组分混和后蒸发干燥得到蓝色固体, 将其溶于CH₂Cl₂。产物52沉淀下来, 用乙醚洗涤后得到蓝色产物(1.45 g; 1.77 mmol), 产率为72%。

将产物52溶于54 ml甲醇中, 然后通过安珀莱特IRA900柱(Cl⁻; 15 g)。回收的甲醇溶液蒸发干燥后得到黏性油状物, 将其溶于CH₂Cl₂中。蒸发后可以得到产物52', 产率为87%。

醛53:

乙缩醛化合物52'溶于10 ml DCM中, 然后加入10 ml 2N的HCl。溶液剧烈搅拌3 h 30 min。加入20 ml DCM后, 回收二氯甲烷相, 然后用NaHCO₃干燥。蒸发后得到的产物用乙醚洗涤, 得到醛53(1.18 g; 1.46 mmol), 产率为90%。

腙54:

将醛化合物53(200 mg; 0.247 mmol)溶解到1 ml 无水乙醇中, 加入一水合肼(15.6 μl; 0.321 mmol), 溶液在室温下加热30min。加入8 ml乙醚; 混合物通过滗析用乙醚连续洗涤三次, 然后在真空下干燥。得到172mg腙54(0.209 mmol; 85%产率), 储存在冰箱中。

叠氮55:

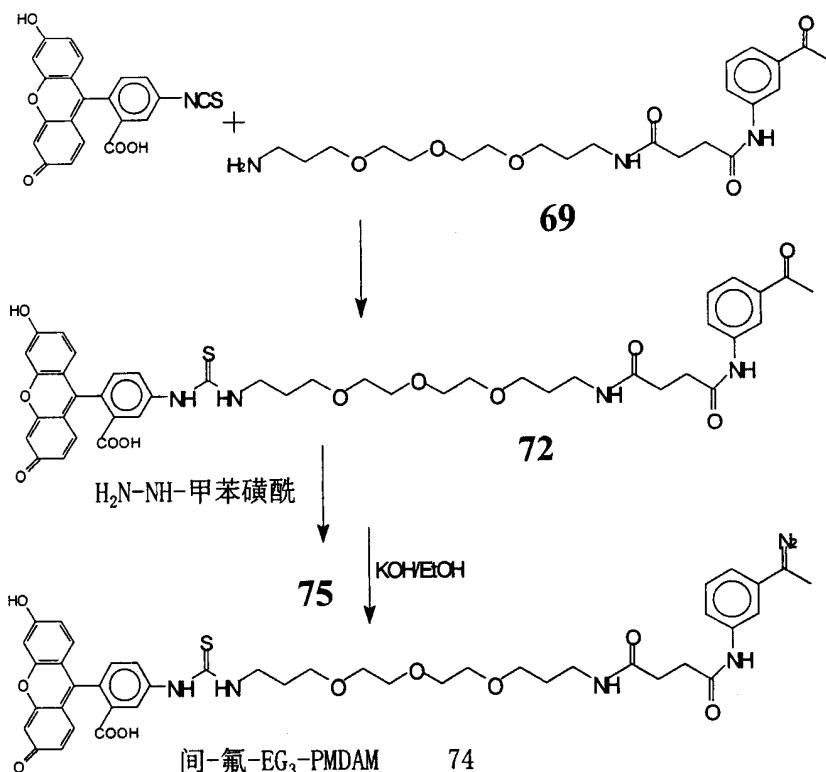
将100mg MnO₂加入到溶于2 ml DMF中的20 mg(0.243 mmol)腙化合物54溶液中, 混合物在室温下通氩气剧烈搅拌5 min。悬液通过一层硅藻土(厚度2 cm)和 3 Å(0.5 cm)粉末状分子筛过滤, 然后用DMF洗涤。溶液蒸发后残留物用乙醚磨碎, 将得到的固体干燥, 就得到了18mg(0.185 mmol; 76%)叠氮55。

试剂在-20℃条件下稳定性大于1月。

实施例24: 间-氟-EG3-PMDAM的合成:

如实施例23所提及的, 生物素可以被其他标记物替代。本实施例说明PDAM携带的叠氮功能基团也可以通过一个聚乙二醇连接臂连接到这种荧光标记物上。

合成流程:



化合物72:

在通氩气条件下将异硫氰酸荧光素(250 mg, 0.64 mmol)溶于1.6 ml含2%吡啶的无水DMF中。然后将溶于1.6 ml 无水DMF中的产物69(0.356 g, 0.81 mmol)加入溶液中。混合物在室温下反应3.5 h, 然后将DMF蒸发掉, 残留物溶于25 ml水中。然后用50 ml CH₂Cl₂抽提三次, 蒸发掉水相。得到255mg(48%)产物72。

间-氟-EG₃-腙-甲苯磺酰化合物75:

在回流状态下将化合物72(255 mg, 0.31 mmol)溶于1.5 ml乙醇中。加入溶于1.5 ml 乙醇中的对-甲苯磺酰-肼(69.2 mg, 0.37 mmol), 混合物反应6 h。将混合物蒸发干燥, 固体用CH₂Cl₂, 水和乙醚洗涤。得到18.5 mg(74%)橙色粉末状产物75。¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ=1.6–1.8 (m, 4H); 2.13 (s, 1H); 2.28 (s, 1H); 2.36 (s, 1H); 2.80 (m, 1H); 3.07 (m, 2H); 3.46 (m, 12H); 6.5–6.7 (m, 6H); 7.1–8.3 (m, 9H)。

间-氟-EG₃-PMDAM 化合物74:

将腙75(176 mg, 0.18 mmol)溶于720μl 10% KOH 无水甲醇溶液中。溶液在回流中保持3 h。等溶液冷却后出现沉淀, 将溶液过滤并蒸发干燥。残留物用乙醚洗涤并干燥。

NMR分析结果表明在2.36 和 2.13 ppm(分别对应于甲苯磺酰和腙的甲基)处信号

消失，而在1.96 ppm(对应于叠氮的甲基)处出现一个峰。

实施例25：制备叠氮甲基中间体以进行下一步的标记：

不用携带标记物R²的叠氮甲基标记试剂直接标记而是分两个阶段间接标记可能更有优势。在这种情况下，含有叠氮甲基功能基团的标记试剂是被预先功能化了的，就是说其含有能进一步与直接或间接标记物反应的化学功能基团。预先功能化可以通过将一个活波的共价功能基团引入到标记试剂上，该标记试剂可以与抗直接或间接标记物的活波共价功能基团抗体反应。这些功能基团包括亲电子的有机化学功能基团和亲核的有机化学功能基团，或者相反。

这种标记策略的一个实施例在下面的试验方案中进行了阐释



其中除了叠氮功能基团外，标记试剂还含有一个亲电子或亲核的功能基团W¹，该基团可与含有功能基团W²的标记物R²反应，W²与W¹互补。

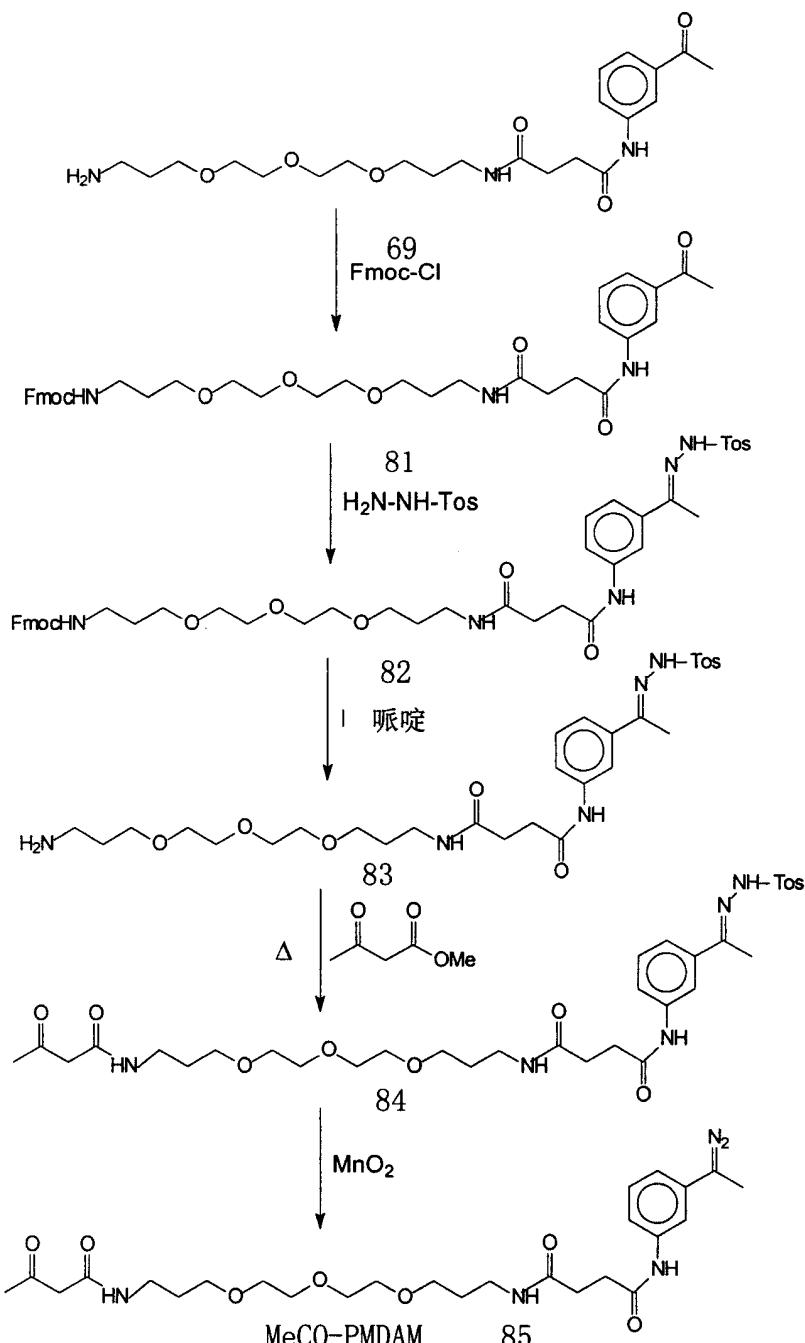
例如，如果W¹是甲基酮或醛功能基团，W²就是烷氧氨基功能基团。

在一种标记生物分子如核酸的方法中，先将核酸与含有叠氮甲基功能基团的标记试剂反应，然后标记物W²-R²通过功能基团W¹与核酸反应。

这种标记方法可用于扩增一段核酸序列分方法中或进行信号放大的方法中。这种类型的标记的其他信息见专利申请WO-A-98/05766，其优先申请日为1996年8月2日，以及专利申请WO-A-00/40590，其优先申请日为1999年1月5日。

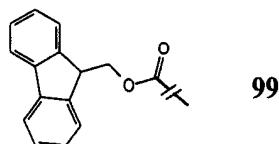
实施例25. 1：MeCO-PMDAM的合成：

合成流程：



产物85，其合成方法已在本实施例中描述，可以使其通过叠氮甲基功能基团与磷酸基团的反应性来标记天然核酸，因此可以引入甲基酮功能基团，该基团在下一步可用于引入一种含有烷氧氨基基团的可检测分子(荧光素，生物素)。

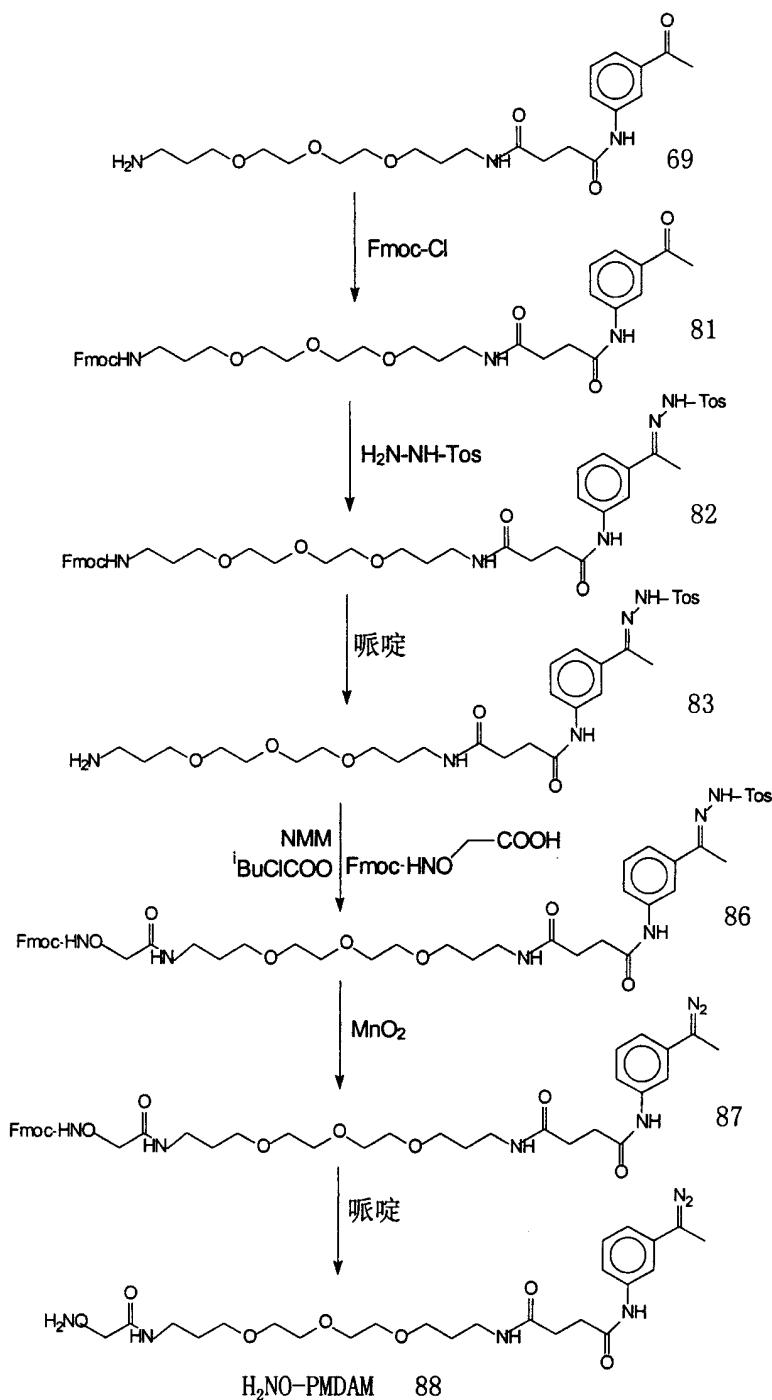
该合成是基于化学中常用的已知方法。起始材料与标记物71和74合成所用的材料相同。第一步包括用芴甲基甲酸酯(Fmoc, 99)保护末端氨基。所以选择这个保护基团是基于其稳定性和裂解条件的考虑。



用前面所述的方法(间-氟-EG3-PMDAM实施例)制备出被保护的腙82后,末端氨基的保护在温和碱性条件下进行以确保腙化合物的稳定性。甲基乙酰乙酸用于产生甲基酮功能基团,通过末端氨基的乙酰化反应(见化合物26和36的合成)。叠氮甲基的形成是按照上面所描述的方法进行的。

实施例 25. 2: H₂NO-PMDAM的合成:

合成流程:



产物88, 其合成方法已在本实施例中描述, 可以使其通过叠氮甲基功能基团与

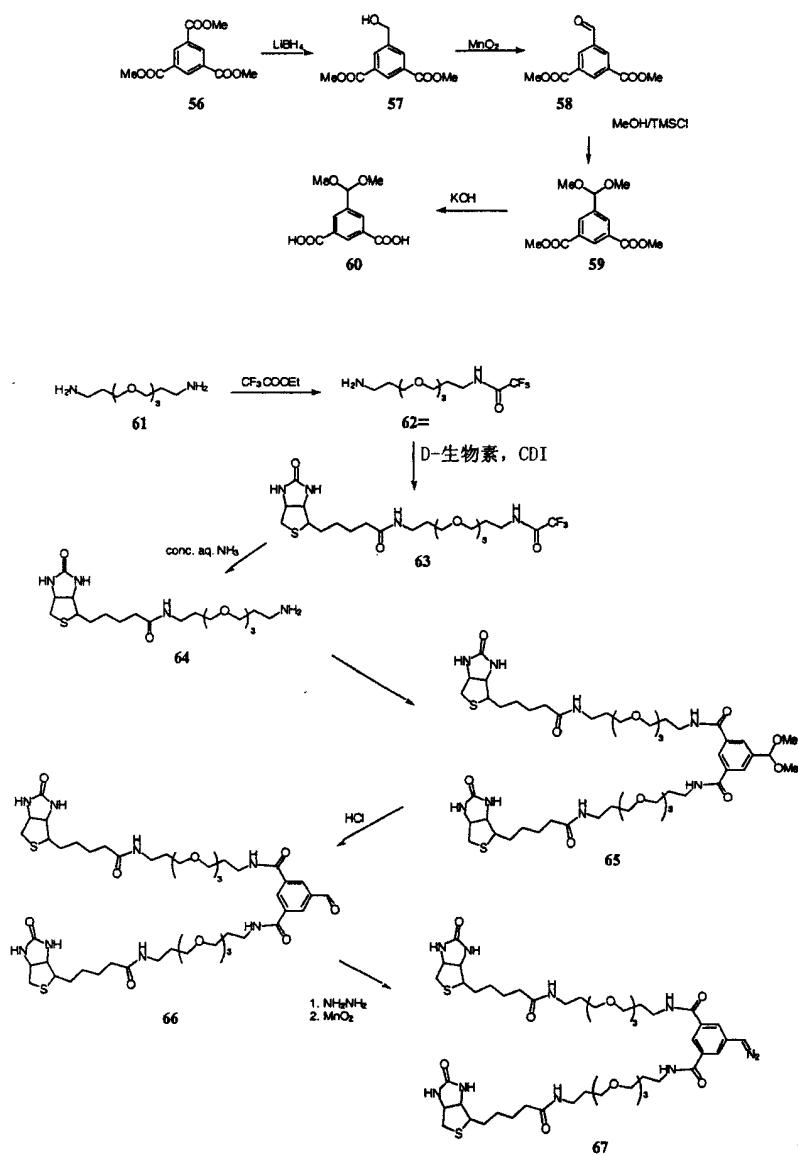
磷酸基团的反应性来标记天然核酸，因此可以引入烷氧氨基功能基团，该基团在下一步可用于引入一种含有甲基酮基团的可检测分子(荧光素，生物素)。

本合成方法是基于前面所述的合成流程，就是说使用前体69；Fmoc的氨基保护以及甲苯磺酰的腙保护。烷氧氨基功能基团(化合物86)的引入是通过用Fmoc功能基团(E. Trévisiol Thesis, LEDSS Grenoble, 1999)来保护羧基甲氧基胺(市售的)来实现的。最后去保护(化合物88)的条件是温和的，并且在叠氮甲基形成后立即进行。

实施例26：PDAM衍生物的制备以放大信号：

实施例26. 1：双生物素化标记物如[Bio-EG3]2-PDAM的合成：

合成流程：



三甲基1, 3, 5-苯三羧化物56降解成乙醇57:

将三酯56(12.6 g; 50.0 mmol)溶于100 ml THF中，然后在室温下加入1.1 g(50.5 mmol) LiBH₄。红色溶液在氩气中40–45°C加热1 h。冷却后(冰上)，通过加入水(200 ml)和2N HCl(30 ml)小心地破坏氢化物(释放出氢气)。可以观察到颜色变成淡黄色。溶液用CH₂Cl₂(100 ml)洗一次，然后用50 ml洗三次，有机相用无水NaHCO₃洗涤，用MgSO₄干燥，然后将溶剂蒸发直到获得油性物质(11.1 g)。利通过急骤层析在硅色谱柱(直径=40 mm, 洗脱液：乙酸乙酯/环己烷=1/1)上纯化得到乙醇57(6.38 g, 57%)。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)：δ=8.53(t, 1H, J=2 Hz); 8.18(d, 2H, J=2 Hz); 4.76(s, 2H); 3.91(s, 6H), 2.30(s, 1H)。

乙醇57氧化成醛58:

将乙醇57(5.86 g; 26.1 mmol)溶解到100 ml THF中，然后在室温下用超过5min的时间缓慢加入40.0 g MnO₂。溶液在氩气下持续搅拌过夜。溶液通过具有一层硅藻土 545的布氏漏斗过滤，用CH₂Cl₂洗涤，然后将溶剂蒸发。粗产物固体(4.4 g)通过急骤层析纯化在硅色谱柱(直径=50 mm, 洗脱液：乙酸乙酯/环己烷=3/7)纯化。得到3.44 g(59%)醛化合物58。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)：δ=10.11(s, 1H); 8.89(t, 1H, J=1 Hz); 8.69(d, 2H, J=1 Hz); 3.98(s, 6H)。

乙缩醛59的形成:

将醛58(3.21 g; 14.4 mmol)溶于30 ml甲醇中，然后加入6.0 ml TMSCl。溶液在室温下通氩气持续搅拌1 h。溶液用200 ml CH₂Cl₂稀释，加入1M NaHCO₃(100 ml)搅拌(小心CO₂散发)。两相分离后用CH₂Cl₂(25 ml)洗涤水相三次，有机相混和后用MgSO₄干燥，然后将溶剂蒸发。得到3.55 g(92%)醛乙缩醛59。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃)：δ=8.63(t, 1H, J=2 Hz); 8.29(d, 2H, J=2 Hz); 5.45(s, 2H); 3.93(s, 6H); 3.32(s, 6H)。

二酯59水解成二酸60:

二酯59(3.18 g; 11.9 mmol)溶解到10 ml THF中，然后加入溶于10ml甲醇中的KOH(2.0 g, 丸状占85%)溶液中。置于室温中15 min后将溶剂蒸发。残留物溶于水中(50 ml)。加入磷酸(大约2.5 ml, 85%)将pH调整到3，出现的白色沉淀物在烧结玻璃(#3)上过滤，用水洗涤冰在真空中干燥。得到2.59 g(91%)二酸60。

¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆)：δ=8.43(t, 1H, J=1 Hz); 8.15(d, 2H, J=1 Hz); 5.53(s, 1H); 3.27(s, 6H)。

三氟乙酰胺62:

二胺61(66 g; 0.30 mol)溶解到250 ml CH₂Cl₂中，然后滴加乙酰三氟乙酸盐(11.8 ml, 0.10 mol)，在10℃条件下通氩气边搅拌边加入，滴加时间要大于5min。在室温下静置15min后将溶液转移到分离漏斗中，用水(3 × 100 ml)洗涤，MgSO₄干燥，然后将溶剂蒸发。得到的单胺62的纯度大约为85%(¹⁹F NMR确定)将化合物储存在-20℃，不经纯化就可以使用。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃): δ=3.5–3.6(m, 12H); 3.42(t, 2H, J=6 Hz); 2.75(t, 2H, J=6 Hz); 1.81(量化(quantiplet), 2H, J=6 Hz); 1.67(量化, 2H, J=6Hz); 1.30(宽 s, 2H)。

¹⁹F NMR(190 MHz, CDCl₃): δ=-76.3。

化合物63:

将羰基二咪唑(CDI, 6.32 g, 80%, 31.2 mmol)加入到溶于50 ml DMF中的D-生物素(6.39 g; 26.2 mmol)悬液中。混合物在55–60℃通氩气边搅拌边加热30min。加入的物质开始可完全溶解，然后聚集成一团白色固体沉淀物(CO₂散发出)。在5ml CH₂Cl₂的帮助下加入胺(油性)以便漂洗。混合物在55–60℃加热3 h。在真空(< 1 mmHg)中蒸发掉DMF，残留物用CH₂Cl₂(700 ml)和2N HCl(100 ml)搅拌。两相通过一层硅藻土 545过滤后分离，水相用CH₂Cl₂(15×100 ml)抽提，有机相混和后用无水NaHCO₃和MgSO₄干燥，然后将溶剂蒸发。油性残留物用150ml乙醚研磨获得悬液。粘性固体难以过滤。将上清倾析掉，然后用乙醚重复洗涤。真空干燥后得到9.13 g(64%)化合物63。

¹H NMR(200 MHz, CDCl₃): δ= 3.5–3.6(m, 12H); 3.42(t, 2H, J=6 Hz); 2.75(t, 2H, J=6 Hz); 1.81(量化, 2H, J=6 Hz); 1.67(量化, 2H, J=6 Hz); 1.30(宽s, 2H)。

化合物64:

将溶于氨水(100 ml, 22%的水)中的化合物63 加入到一个250 ml 的带有隔膜的圆底烧瓶中于55–60℃加热2 h。冷却后将溶剂蒸发。残留物溶于甲醇(20 ml)中，通过一个装有Dowex 21K阴离子树脂的柱子高度12cm × 直径，通过预先用1 N NaOH(1.5 l)，然后是水(1.5 l)，最后是甲醇(1.5 l)洗涤调整好OH⁻的排列]。不含三氟乙酸盐离子的化合物64最先和200 ml甲醇一起通过柱子为第一组分。将其蒸发后残留物用50ml乙醚研磨并将上清倾析掉，然后用乙醚连续洗涤5次。干燥后得到化合物64(6.43 g, 86%)。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ= 6.77(t, 1H, J=4 Hz); 6.32(s, 1H); 5.52(s, 1H):

4.45(m, 1H); 4.28(m, 1H), 3.50–3.68(m, 12H); 3.30(m, 2H), 3.11(m, 1H); 2.86(dd, 1H, J=13和5 Hz), 2.75(t, 2H, J=13 Hz), 2.68(d, 1H, J=13 Hz); 2.16(t, 2H, J=7 Hz); 1.60–1.85(m, 8H); 1.41(m, 2H)。

[Bio-EG₃]₂-乙缩醛65:

将羰基二咪唑(225 mg, 90%, 1.25 mmol)加入到溶于二氯乙烷的二酸60(120 mg; 0.500 mmol)悬液中, 混合物在55–60°C加热30 min, 在氩气下搅拌。加入胺64(550 mg; 1.23 mmol), 溶液在55–60°C加热6 h。蒸发后残留物通过硅柱(直径: 25 mm, 洗脱液: 甲醇15–30%溶于CH₂Cl₂中)。得到413 mg(75%)化合物65。

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ=8.34(s, 1H); 8.06(s, 2H); 7.87(m, 2H); 6.85(m, 2H); 6.60(s, 2H); 5.93(s, 2H); 5.40(s, 1H); 4.45(m, 2H); 4.27(m, 2H), 3.43–3.68(m, 24H); 3.31(s, 6H); 3.25(m, 4H), 3.08(m, 2H); 2.83(dd, 2H, J=13和5 Hz), 2.70(t, 2H, J=13 Hz); 2.13(t, 4H, J=7 Hz); 1.89(quintuplet, 4H, J=7 Hz); 1.55–1.70(m, 12H); 1.37(m, 4H)。

[Bio-EG₃]₂-醛 66:

将溶解到35m1甲醇中的乙缩醛65(413 mg; 0.376 mmol)用2N HCl(0.5 m1)处理。蒸发后用乙醚洗涤, 得到醛66(0.37 g, 90%)。

¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ= 10.11(s, 1H); 8.82(t, 2H, J=6 Hz); 8.62(s, 1H), 8.47(s, 2H); 7.73(t, 2H, J=5 Hz); 4.30(m, 2H); 4.11(m, 2H), 3.30–3.60(m, 24H); 3.06(m, 6H); 2.80(dd, 2H, J=12和5 Hz), 2.56(t, 2H, J=12 Hz); 2.03(t, 4H, J=7 Hz); 1.78(quintuplet, 4H, J=7 Hz); 1.35–1.60(m, 12H); 1.28(m, 4H)。

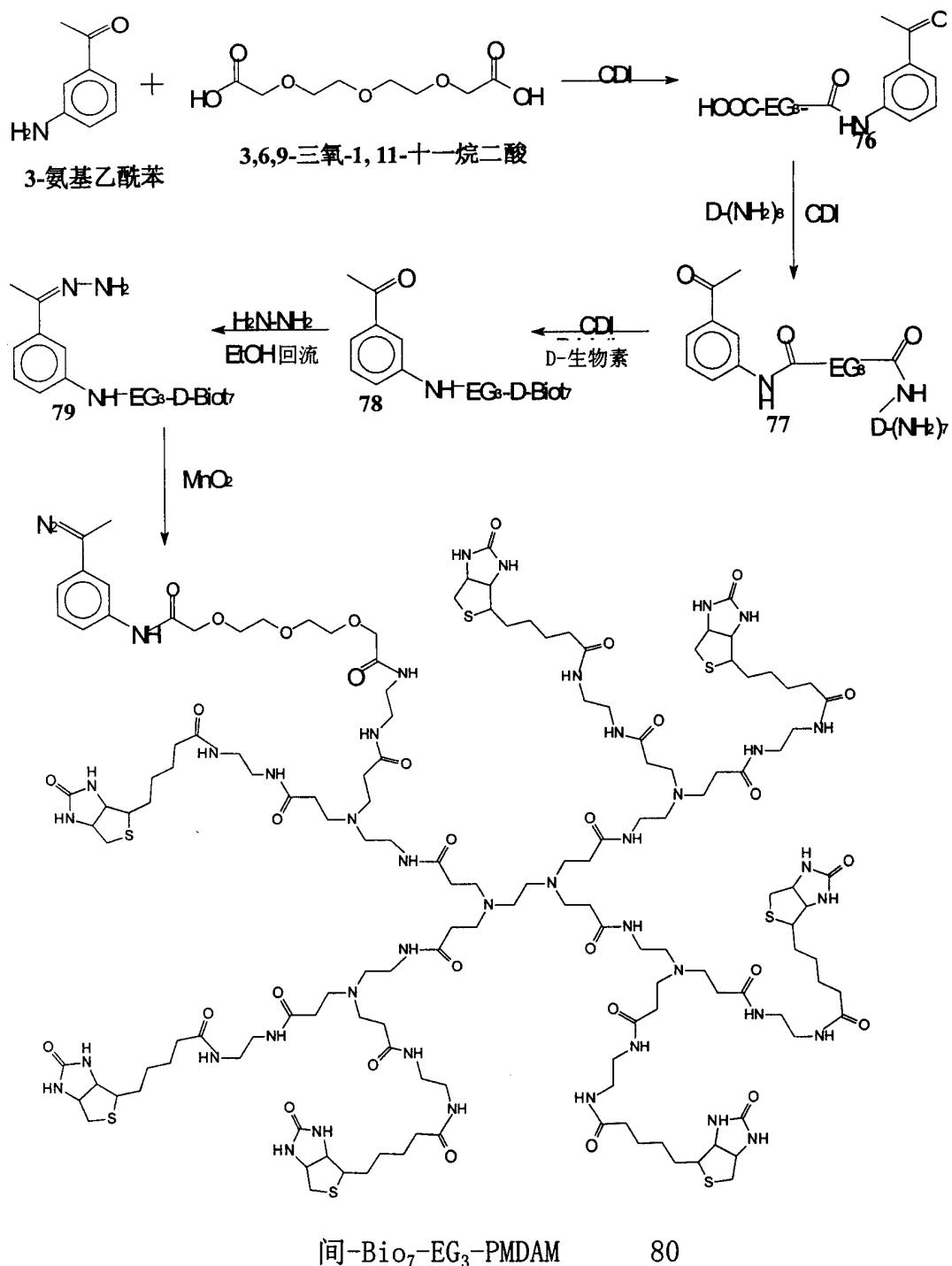
[Bio-EG₃]₂-PDAM 67:

用制备叠氮甲烷(实施例1)的方法将醛66转化成叠氮甲烷67。

该试剂的稳定性在-20°C大于1月。

实施例26. 2: 间-Bio7-EG3-PMDAM的合成:

合成流程:



EG₃-苯乙酮化合物76:

将3, 6, 9-三氧-1, 11-十一烷二酸(EG₃, 12.64 ml, 74 mmol)在氩气下溶解到80ml无水DMF中，在冰浴中冷却。将二环己基碳化二亚胺(DCC, 11.45 g, 55.5 mmol)溶解到无水20 ml DMF中，然后缓慢加到上述溶液中。30min后加入3-氨基苯乙酮(5.0 g, 37 mmol)，反应在室温下通氩气进行1 h。然后在真空中将DMF蒸发，加入70 ml CH₂Cl₂。溶液过滤后用3 × 25 ml 1% 乙酸抽提。将水相混和后用25 ml CH₂Cl₂洗涤。

有机相混和后用无水硫酸钠干燥并蒸发干。产物从MeOH:HaO pair重结晶。因此得到8.74 g(70%)产物76。

¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆): δ=2.55(s, 3H); 3.5–3.7(m, 8H); 4.0(s, 2H); 4.1(s, 2H); 7.45(t, 1H); 7.65(d, 1H); 7.90(d, 2H); 8.2(s, 1H); 9.8(s, 1H)。

(NH₂)₇-EG₃-苯乙酮化合物77:

将产物76(120 mg, 0.35 mmol)在氩气下溶解到15 ml无水DMF中，在冰上冷却，然后加入DCC(110 mg, 0.53 mmol)。30min后将此溶液缓慢加到一种市售的dendrimer(一种树枝状物) "Starburst PAMAM Dendrimer, Generation 1"(Aldrich, St Quentin Fallavier)(1 g, 0.71 mmol, 溶于5ml甲醇中)溶液表面，剧烈搅拌。反应在室温下进行1 h，将混合物蒸发。残留物收集到10 ml CH₂Cl₂中，用30ml 1%的乙酸抽提两次。

Biot₇-EG₃-苯乙酮化合物78:

将D-生物素(1.73 g, 7.08 mmol)在氩气下溶解到80 ml 无水DMF中，溶液在冰上冷却。相继加入N-甲基吗啉(NMM, 856μl, 7.7mmol)和异丁基氯甲酸酯(1022 μl, 7.7 mmol)。30min后加入产物77(1.13 g, 0.7 mmol, 溶于5 ml甲醇中)，反应在冰上置于氩气中进行3h。混合物在真空中浓缩到50ml，然后加入100ml CH₂Cl₂。过滤后得到的沉淀物用乙醚洗涤，在真空中干燥，得到1.3 g白色粉末形式的产物78。

Biot₇-EG₃-腙化合物 79:

在回流中将化合物78(300 mg, 0.09 mmol)溶解到10ml无水乙醇中。加入一水合肼(20 ml, 0.40 mmol)，反应在回流中进行3小时。冷却后沉淀形成，将沉淀过滤，用乙醚洗涤并在真空中干燥。因而得到109mg(36%)白色粉末状的产物79。

Biot₇-EG₃-PMDAM化合物80:

将腙79(100 mg, 0.03 mmol)溶于5 ml 70°C的无水DMF中。等混合物降到室温后加入MnO₂(31 mg, 0.36 mmol)。反应进行10 min，用含有硅藻土(0.5 cm)和粉末状分子筛(0.5 cm)的烧结玻璃过滤去除氧化镁。过滤物蒸发干燥，用乙醚洗涤并在真空中干燥。因此得到78 mg(78%)产物80。

Dendrimers是一种树枝状分子，在其末端含有几种活波基团如氨基，羧基，羟基等(综述参见Newcome 等, (1996)Dendritic Molecules; Concept, Syntheses, Perspectives. VCH Ed., Weinheim, Germany)。这些分子的合成在现在很容易控制，有许多dendrimers已被化学制造企业推上了市场。选择PAMAM是基于其稳定性、可溶性和柔韧性的考虑，因为在市场上有好几种具有不同末端数目和类型的这类分

子。通过“PAMAM Generation 1”可以在一个叠氮甲基基团上添加上7种标记物分子(只需一个合成步骤)。

实施例27：用间-BioPMDAM通过两步标记和片段化DNA扩增子：

DNA扩增子是按照实施例5描述的方法制备的。两种标记反应方法如下。

a. 标记和片段化分两步进行：

将10 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在95°C培养10 min, 然后加入3 μ l 0.1M HCl再于95°C培养10 min。

b. 标记和片段化在一步中完成：

将10 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)、5 μ l 0.1 M的HCl和75 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在60°C培养30 min。试验方法的其他步骤与实施例9相同。

结果

所用试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 标记和片段化分两步进行	99.5	14129	624	22.7
b. 标记和片段化在一步中完成	98.9	4431	667	6.6

表13：在两个不同的步骤和一个步骤中进行标记和片段化的比较研究

如表13所显示的，用一个步骤的方案所得到的结果是令人满意的，而分两步进行标记和片段化效果更好。这个实施例说明标记和裂解步骤可以分开进行以便根据不同的靶位提高标记效率。

实施例28：在不同的反应体系中进行DNA扩增子的标记和片段化：

DNA扩增子是按照实施例5描述的方法制备的。三种标记反应方法如下。

a. 在250 μ l反应体系中标记和片段化：

将75 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和102.5 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到50 μ l PCR产物中。溶液在95°C培养25 min, 然后加入22.5 μ l 0.1M HCl再于95°C培养5 min。

b. 在200 μ l反应体系中标记和片段化：

将75 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和52.5 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到50 μ l PCR产物中。溶液在95°C培养25 min, 然后加入22.5 μ l 0.1M HCl再于95°C培养5 min。

c. 在150 μ l反应体系中标记和片段化:

将75 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和2.5 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到50 μ l PCR产物中。溶液在95°C培养25 min, 然后加入22.5 μ l 0.1M HCl再于95°C培养5 min。

试验方法的其他步骤与实施例9相同。

结果

所用试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 250 μ l反应体系	100.0	5606	549	10.2
b. 200 μ l反应体系	99.4	5886	557	10.6
c. 150 μ l反应体系	99.4	6800	537	12.7

表14: 按照不同的反应体系标记和片段化

从信号强度和同源性百分率来看所有试验方案得到的结果都是令人满意的。而且尽管反应体系从150 μ l变化到250 μ l, 所得到的结果是一样的。本实施例说明标记试验的反应体系具有较好的灵活性, 可以用不同体积的体系, 尤其是不同体积的扩增产物。

实施例29: 片段化前进行纯化的试验方案和片段化后进行纯化的试验方案比较:

DNA扩增子是按照实施例5描述的方法制备的。两种标记反应方法如下。

a. 标记、纯化, 然后片段化DNA扩增子:

将10 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和80 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在95°C培养10 min。纯化按照实施例9描述的方法进行。在纯化后的标记的DNA扩增子溶液中加入6 μ l 0.1M HCl, 再于95°C培养10 min。加入400 μ l 在95°C预热10min的杂交缓冲液。杂交缓冲液的组成和其余的试验步骤与实施例9相同。

b. 标记、片段化, 然后纯化DNA扩增子:

将10 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在95°C培养10 min。然后加入3 μ l 0.1M HCl, 再于95°C培养10 min。其余的试验步骤与实施例9相同。

结果:

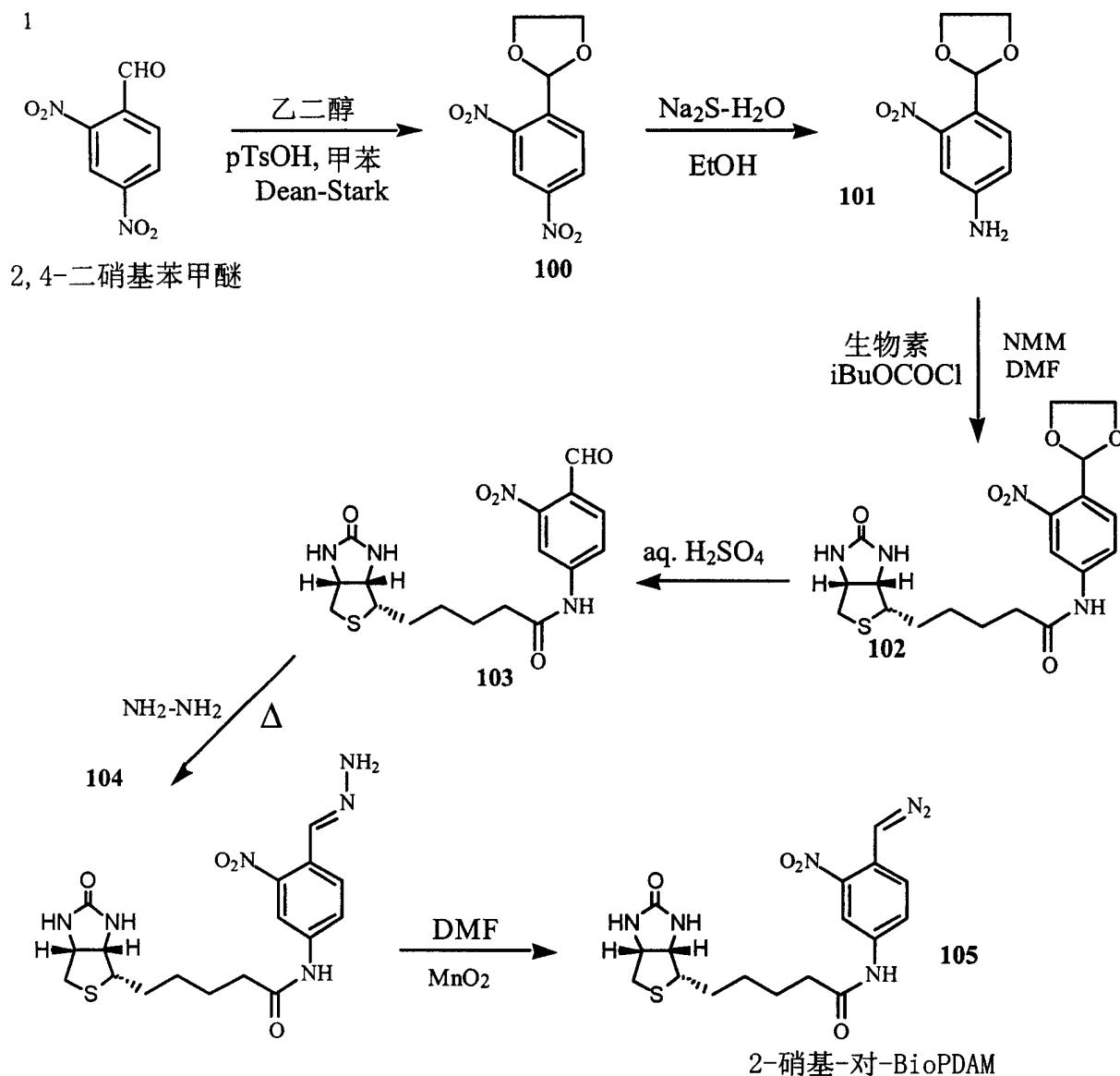
所用试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 片段化前纯化	98.9	6256	473	13
b. 纯化前片段化	96.1	6066	556	11

表15：片段化前进行纯化的试验方案和片段化后进行纯化的试验方案比较

表15中所显示的结果说明纯化步骤可以在标记和片段化步骤之间进行。而且在标记和片段化步骤之间进行纯化可以使在裂解期间进行变性以及将所有的标记扩增子片段杂交到芯片上成为可能。

实施例30：2-硝基-对-BioPDAM的合成：

合成流程：



醛基的保护：

将5g(25.5 mmol)2, 4-二氮苯甲醛溶解到250 ml甲苯仲，加入20 ml乙酸甘油和150 mg副甲苯磺酸。混合物在回流中加热6h，水在Dean-Stark 系统回收。混合物用150 ml EtOAc和100ml水处理，溶液用乙酸乙酯抽提两次，有机相用MgSO₄干燥，

然后蒸发。得到产物100相应的油性物质，用于下一步的反应。

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) : δ=8.70 (d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃) ; 8.44 (dd, 1H_{aro}, J=2 Hz, J=6 Hz, H₅) ; 8.02 (d, 1H_{aro}, J=8 Hz, H₆) ; 6.49 (s, 1H, CH) ; 4.12–4.06 (m, 4H, CH₂–CH₂)。

二氮衍生物100的分解：

被保护的2, 4-二氮苯甲醛(6.4 g; 25.5 mmol)溶解到乙醇-水混合物(6/1)中，然后加入二倍当量的无水Na₂S(12.3 g; 51.1 mmol)。反应混合物加热30min。蒸发后用二氯甲烷抽提。干燥并过滤后将反应介质蒸发以收获油性物质，产物在硅色谱柱上直接纯化(环己烷/乙酸乙酯 60/40)。得到化合物101，产率为45%。
化合物101：熔点58–60°C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) : 7.49 (d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃) ; 7.09 (d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₆) ; 6.80 (dd, 1H_{aro}, J=2 Hz, J=6 Hz, H₅) ; 6.27 (s, 1H, CH) ; 3.99–3.97 (m, 4H, CH₂–CH₂)。

与生物素偶合：

将D-生物素(1.0 g; 4.1 mmol)溶解到20 ml无水DMF和600 μl N-甲基吗啉中。在氩气下加入异丁基氯甲酸酯(700μl; 5.5 mmol)，同时在冰浴上冷却。混合物持续搅拌5 min，然后加入1 g(4.75 mmol)化合物101和500μl N-甲基吗啉。溶液在室温中持续搅拌4h，然后蒸发干燥。得到的油性物质直接通过硅色谱柱，洗脱溶剂为MeOH-DCM 7%，然后是MeOH-DCM10%。得到产物102(1.1 g; 2.52 mmol)，产率为62%。

¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ=10.40 (s, 1H, NH-CO) ; 8.31 (d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃) ; 7.77 (dd, 1H_{aro}, J=2 Hz, J=6 Hz, H₅) ; 7.68 (d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₆) ; 6.43 (宽s, 1H, NH-CO-NH) ; 6.36 (宽s, 1H, NH-CO-NH) ; 6.23 (s, 1H, CH) ; 4.28 (m, 1H, CH₂-CH-NH) ; 4.14 (m, 1H, CH-CH-NH) ; 3.92 (s, 4H, CH₂-CH₂) ; 3.12 (m, 1H, CH-S) ; 2.85和2.76 (ABX系统, 2H, ²J_{AB}=5 Hz, ³J_{AX}=12 Hz, ³J_{BX}=0 Hz, CH₂-S) ; 2.29 (t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO) ; 1.61–1.39 (m, 6H, (CH₂)₃)。

乙缩醛的去保护：

将产物102(768 mg; 1.76 nmol)悬于25 ml THF中。加入4 ml 2N的H₂SO₄后全部溶解。混合物持续搅拌2h。蒸发后在烧结玻璃漂洗和洗涤。得到黄色粉末状的产物103(694 mg)，产率为90%。

熔点165°C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) : δ=10.69 (s, 1H, NH-CO) ; 10.09 (s, H, CHO) ; 8.43 (d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃) ; 7.91 (s, 2H_{aro}, H₅和H₆) ; 6.42 (宽s, 1H, NH-CO-NH) ; 6.35 (宽s, 1H, NH-CO-NH) ; δ=6.23 (s, 1H, CH) ; 4.29 (m, 1H, CH₂-CH-NH) ; 4.13 (m,

1H, CH-CH-NH)；3.12(m, 1H, CH-S)；2.84和2.78(ABX系统, 2H, ${}^2J_{AB}=5$ Hz, ${}^3J_{AX}=12$ Hz, ${}^3J_{BX}=0$ Hz, CH₂-S)；2.29(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO)；1.61-1.39(m, 6H, (CH₂)₃)。

腙104的制备:

将醛103悬于乙醇中, 悬液加热到80℃。加入肼后全部溶解, 溶液立刻变成橙色。5min后沉淀形成。混合物边搅拌边加热1h。在烧结玻璃上过滤后将沉淀物干燥。得到产物104(700 mg; 690 mmol), 产率为98%。

熔点169℃。¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆)：δ=10.31(s, 1H, NH-CO)；8.31(d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃)；7.96(s, H, CHO)；7.87(d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₆)；7.68(dd, 1H_{aro}, J=2 Hz, J=6 Hz, H₅)；7.31(s, 2H, NH₂)；6.42(宽s, 1H, NH-CO-NH)；6.34(宽s, 1H, NH-CO-NH)；4.29(m, 1H, CH₂-CH-NH)；4.13(m, 1H, CH-CH-NH)；3.12(m, 1H, CH-S)；2.84和2.78(ABX系统, 2H, ${}^2J_{AB}=5$ Hz, ${}^3J_{AX}=12$ Hz, ${}^3J_{BX}=0$ Hz, CH₂-S)；2.29(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO)；1.61-1.39(m, 6H, (CH₂)₃)。

叠氮105的制备:

将化合物104(200 mg; 0.492 mmol)溶于8ml DMF中。加入400 mg MnO₂。混合物剧烈搅拌10min。在含有硅藻土(厚度: 2 cm)和粉末状分子筛3Å(0.5 cm)的微孔上过滤。蒸发干燥后用乙醚洗涤。混和物再于微孔上过滤。得到橙色粉末状化合物105(180 mg; 0.445 mmol), 产率为98%。

熔点155℃。¹H NMR(200 MHz, DMSO-d₆)：δ=10.21(s, 1H, NH-CO)；8.60(d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃)；7.77(d, 1H_{aro}, J=6 Hz, H₅)；7.22(d, 1H_{aro}, J=6 Hz, H₆)；6.60(s, H, CH-N)；6.41(宽s, 1H, NH-CO-NH)；6.33(宽s, 1H, NH-CO-NH)；4.29(m, 1H, CH₂-CH-NH)；4.13(m, 1H, CH-CH-NH)；3.12(m, 1H, CH-S)；2.84和2.78(ABX系统, 2H, ${}^2J_{AB}=5$ Hz, ${}^3J_{AX}=12$ Hz, ${}^3J_{BX}=0$ Hz, CH₂-S)；2.29(t, 2H, J=8 Hz, CH₂-CO)；1.61-1.39(m, 6H, (CH₂)₃)。

化合物105的反应性用尿嘧啶3'-单磷酸鉴定, 用毛细管电泳监测。分析条件与实施例6.1相同。结果显示化合物的半衰期是45分钟。试剂在-20℃ 条件下的稳定性大于1个月。

实施例31: 用标记试剂2-硝基-对-BioPDAM标记和片段化DNA扩增子:

按照实施例30所描述的方法制备2-硝基-对-BioPDAM衍生物。按照实施例5描述的方法用PCR制备DNA扩增子。两种标记反应如下:

a. 用2-硝基-对-BioPDAM试剂标记:

将2μl 2-硝基-对-BioPDAM(100 mM, 溶于DMSO中)、5μl 0.1M HC1和83μl无DNA

酶和RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在60°C培养30 min。

b. 用间-bioPMDAM试剂标记:

将2 μ l 间-bioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)、5 μ l 0.1M HCl和83 μ l无DNA酶和RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在60°C培养30 min。

试验方案的其他步骤与实施例9相同。

结果:

所用的试验方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 用2-硝基-对-BioPDAM试剂标记	100.0	24392	899	27.1
b. 用间-bioPMDAM试剂标记	98.9	21883	774	28.3

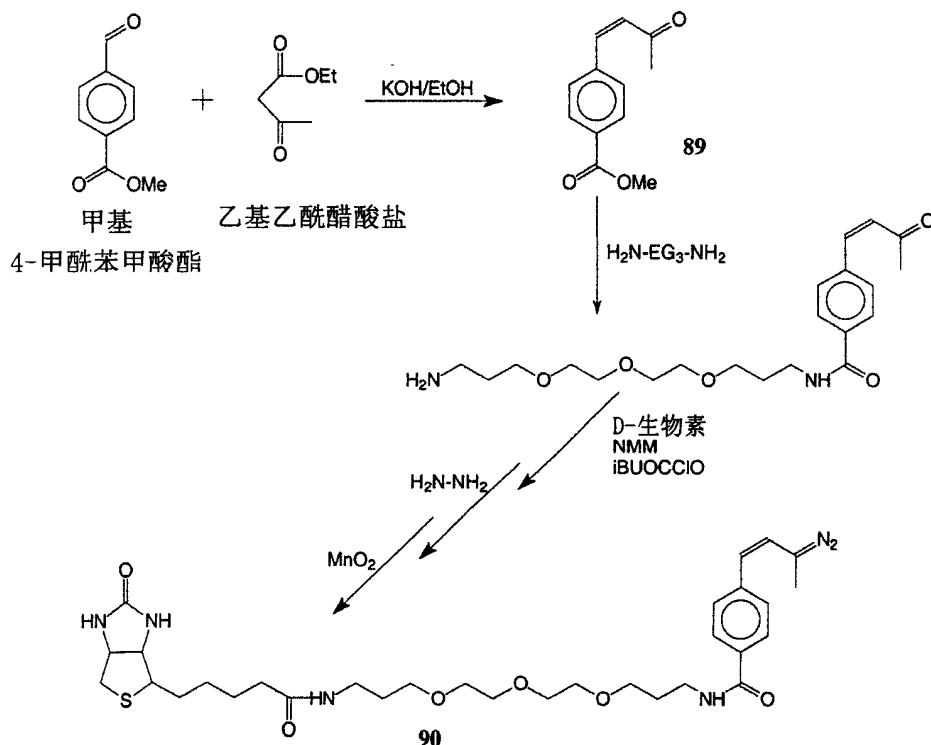
表16: 用2-硝基-对-BioPDAM衍生物和间-bioPMDAM衍生物进行标记的比较研究

从标记强度和同源性百分率来看用2-硝基-对-BioPDAM试剂标记DNA具有优势。

实施例32: 在叠氮甲基功能基团和苯核之间插入双键, 使DAM远离, 以及特别适用于这种远离的分子的合成:

本实施例的目的在于使芳香族结构的叠氮(DAM)功能基团远离以便在磷酸基团烷基化时以及标记核酸与其互补序列杂交时尽量减少位阻效应。

合成流程:



为了羟基丁醛反应以形成(对-甲氧羰基)苯乙烯基甲基酮89, 用乙酰醋酸乙酯提高亚甲基质子的酸性, 从而促进对亚酰基的攻击, 进而消除H₂O(通过双键与芳香环

的结合而促进)，以及由于碱性介质而水解去羧基化。本合成流程的其他步骤与其他实施例相同。

终产物对-Bio-EG₃-SMDAM 90在叠氮甲基核芳香环之间多了两个碳原子，这就限制了出现位阻效应，通过与芳香系统连接从而保证了叠氮甲基的稳定性。

实施例33：携带叠氮基团的固体支持物上核酸的捕获与检测：

研究携带叠氮甲基基团的树脂的反应性来确定其与核酸结合的能力。

4-(重氮甲基)苯氧基甲基聚苯乙烯(参见17338, Fluka)是一种树脂，已有文献描述了它和羧基，尤其是蛋白质上的羧基结合的能力(G. Bhalay, A. R. Dunstan. Tetrahedron Lett. 39, 7803–1998)，但是没有描述其与DNA分子结合的能力。我们检测了用这种试剂捕获核酸的能力，通过比色试验来观察。

本实验是用HLA-DR 寡-检测试剂盒(oligo-detection kit)(参见33202, bioMerieux, France, 基本原理见专利EP 549 776-B1)的一部分试剂来做的，该试剂盒可以检测在微孔板上通过PCR扩增的核酸，用比色方法来读取数据。根据所描述的试验方法，通过PCR扩增的核酸同时与检测的树脂和对-Bio-EG₃-PDAM分子反应，对-Bio-EG₃-PDAM的合成在实施例20中已经有描述。如果DNA与两个化合物上的叠氮甲基功能基团反应，经过洗涤和去除未共价结合的分子以后，用包括与链亲和素结合的酶的比色反应就可以观察到结果。链亲和素与辣根过氧化物酶结合，后者可以将邻苯二胺分子(试剂盒的Color 1 试剂)降解成可在492 nm处被检测到的化合物。

实施例33. 1：DNA的捕获与检测：

将50μl 按照实施例5描述的方法扩增的PCR产物加到400μl 纯水(Sigma)和5μl 对-Bio-EG₃-PDAM混合物中，然后加入10 mg树脂在60°C培养30 min。然后用500μl PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color 0 HIA试剂，PBS pH 7.0; 1% Tween, 0.2 g/1 BND; 0.01 g/1 Ciprofloxacin)洗涤，然后将树脂悬于100μl PBS Tween和250μl添加以1/10000稀释的链亲和素HRP(S-911, MOLECULAR PROBES, EUGENE, OR, USA)的链亲和素杂交缓冲液(PBS pH 7.0 0.5% TWEEN)中。反应混合物在室温下培养30min。然后用500μl PBS Tween缓冲液洗涤树脂三次，在发色试剂(1 Color 1 Tablet, 邻-苯二胺盐酸，稀释在5ml Color 2 缓冲液中，100 mM 磷酸钠，50 mM枸橼酸，0.03% H₂O₂)存在的条件下于室温下培养。在暗处培养20min后，培养液用50μl H₂SO₄(1.8N Color 3试剂)终止反应。上清液用移液管吸出放到微孔板中，读取反应介质在492 nm处的吸光度值。

实施例33. 2：无核酸对照：

将10 mg树脂加入到添加5μl 对-Bio-EG3-PDAM的425μl纯水(Sigma)中，60℃培养30min。然后用500μl PBS缓冲液洗涤树脂。样品的其余处理方式与实施例33. 1相同。

实施例33. 3：无模板的PCR产物对照：

将10 mg树脂加入到添加5μl 对-Bio-EG3-PDAM和50μl PCR产物的400μl纯水中，60℃培养30min，其中的PCR产物是用25μl纯水代替相同体积的DNA模板所扩增出来的。然后用500μl PBS缓冲液洗涤树脂。样品的其余处理方式与实施例33. 1相同。

实施例33. 4：无显色分子的PCR对照：

将10 mg树脂加入到添加5μl 对-Bio-EG3-PDAM的400μl纯水中，60℃培养30min。然后用500μl PBS Tween缓冲液洗涤树脂。样品的其余处理方式与实施例33. 1相同。

实施例33. 5：非捕获核酸对照：

将10 mg树脂加入到添加5μl 对-Bio-EG3-PDAM的400μl纯水中，60℃培养30min。然后用500μl PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color O HIA试剂，PBS pH 7. 0；1% Tween, 0. 2 g/1 BND；0. 01 g/1 Ciprofloxacin)洗涤树脂。然后将树脂悬于100μl PBS Tween和250μl添加以1/10000稀释的链亲和素HRP的链亲和素杂交缓冲液中。加入50μl按如下方法制备的DNA样品。

将5μl 对-Bio-EG3-PDAM和70μl纯水加入到25μl 按照实施例5描述的方法通过PCR制备的DNA中。混合物在60℃培养30min，然后用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)按照厂商提供的说明书去除多余的标记物，最后洗脱出50μl体积的液体。

反应混合物在室温下培养30min，然后按照实施例33. 1描述的方法处理。

结果：

条件	在492nm处的吸光度值
Ex. 33. 1：捕获在树脂上的DNA	527
Ex. 33. 2：无核酸	249
Ex. 33. 3：无模板的PCR产物	261
Ex. 33. 4：无标记物对照	264
Ex. 33. 5：非捕获核酸	249

表17：携带叠氮甲基基团的树脂的反应性研究

在表17中，高比色值说明了在反应介质中有高浓度的酶，相应的就会有大量携带生物素衍生物的核酸存在。对照组的数据说明信号不是由于DNA非特异吸附到小

珠上，不是对-Bio-EG3-PDAM与树脂反应，也不是链亲和素HRP吸附到树脂上，而是由于有被共价捕获并被对-Bio-EG3-PDAM标记的核酸的存在。

实施例34：标记PCR产物以便其被捕获和在微孔板上检测：

本实施例所要证实的是仅用一种类型的携带叠氮甲基功能基团的分子就可能标记DNA分子，从而在一步中就可以完成这种核酸分子的捕获和检测。

本试验用HLA-DR 寡-检测试剂盒(参见33202, bioMérieux)的一部分试剂进行，用比色方法检测微孔板上通过PCR扩增的核酸。根据所描述的试验方法，对-Bio-EG₃-PDAM与通过PCR扩增的核酸反应，对-Bio-EG₃-PDAM的合成在实施例20中已经有描述。DNA与分子的叠氮甲基反应，因此在其磷酸基团上被连接上生物素。因而有可能通过在微孔板上培养来捕获核酸，其中微孔板上吸附有链亲和素，然后通过比色反应就可以观察。所用的检测试剂也是链亲和素分子，它可以与辣根过氧化物酶(HRP)反应。在适当条件下，过氧化物酶可以将邻苯二胺分子(试剂盒的Color 1试剂)降解成可在492 nm处被检测到的化合物。

实施例34. 1在微孔板上捕获和检测来源于PCR反应的DNA:

将10μl用PCR扩增得到的DNA加入到添加10μl 对-Bio-EG3-PDAM的80μl纯水(Sigma)中, 60℃培养30min。标记后DNA用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)按照厂商推荐的方法纯化，将最终洗脱下来的物质溶解到50μl EB 缓冲液(10 mM Tris EDTA, pH 8.5)中。将20μl这种洗脱液稀释到180μl添加以1/10000稀释的链亲和素HRP(S-911, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)的PEG缓冲液(0. 1M NaPO₃; 0. 5M NaCl; 0. 65% Tween 20; 0. 14 mg/ml 鲑精DMA(Gibco); 2% PEG 4000)中。在链亲和素包被的Combiplate 8(参见95029263, Labsystem, Helsinki, Finland)的孔中或Maxisorb条带(Maxisorb strip)(Nunc, Denmark)的对照孔中加入100μl上述液体。

实施例34. 2: 对照组

对照样品同时按照下列方式制备：

A. 无DNA的标记对照：

将添加10μl 对-Bio-EG3-PDAM的90μl纯水(Sigma)在60℃培养30min。然后

B. 无标记物的标记对照：

将10μl按照实施例5描述的方法通过PCR制备的DNA加入到90μl纯水中, 60℃培养30min。然后将混合物按照实施例34. 1描述的方法处理。然后将所有的条带用含有链亲和素HRP的100μl PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color 0 HLA 试剂, PBS pH 7.0;

1% Tween, 0.2 g/1 BND; 0.01 g/1 Ciproflaxacin)洗涤三次, 加入100 μ l比色试剂(1 Color 1片, 邻苯二胺盐酸, 稀释到5 ml Color 2 缓冲液中, 100mM 磷酸钠, 50 mM 柠檬酸, 0.03% H₂O₂), 在暗处培养20min, 然后用50 μ l H₂SO₄(1.8N Color 3 试剂)终止反应。然后测量反应介质在492 nm处的吸光度值。

结果:

条件	Combiplate	Maxisorp对照
A - 标记DNA	1382	152
B - 非标记DNA	178	136
C - 无DNA	140	192

表18: 用对-Bio-EGB-PDAM标记被捕获的DNA的检测

表18中的试验结果表明用对-Bio-EG3-PDAM标记的DNA在微孔板上仅通过一步就可以被捕获和检测。如对照组所提示的, 对照组的信号只是由于DNA而产生的, 不是来自于核酸对微孔板壁的非特异吸附, 也不是来自于核酸与链亲和素的非特异结合, 或者链亲和素HRP与非标记DNA或微孔板塑料的非特异反应。

实施例35: 双标记PCR产物以利于其在微孔板类的固体支持物上被捕获和检测:

本实施例所描述的是用两种携带叠氮甲基功能基团的分子在一个步骤中标记DNA分子, 以便于其在微孔板上被捕获和检测。

试验所用的一部分试剂来自于HLA-DR 寡-检测试剂盒, 通过简单的比色方法来检测在微孔板上的PCR扩增核酸。上文中所描述的1-嵌二萘基重氮甲烷(PDAM)和对-Bio-EG3-PDAM同时于PCR扩增的核酸反应。

如果DNA与两个化合物的叠氮甲基基团反应, DNA就可以结合到携带抗-苅抗体的支持物上, 因此就有可能通过一种与辣根过氧化物酶结合的链亲和素分子来检测它。该酶作为一种显色剂可以将邻-苯二胺分子降解成可在492nm波长下被检测的化合物。

实施例35. 1: 双标记DNA并在微孔板上检测:

将抗苅抗体吸附到8-孔Maxisorp条带, 室温下培养过夜。每孔加入100 μ l溶液, 该溶液是将1.1 μ l抗苅抗体稀释到100 μ l 碳酸氢盐缓冲液(0.05M pH 9.6)中。这种所谓的兔抗苅抗体(参见: YSRT-AHP236)可以从Accurate Chemical & Scientific(Westbury, New York, United States of America)购买到。当然也可以用其他公司的抗体来完成本试验, 并且用其他公司的抗体所得到的结果与本实施例所得到的结果没有明显差异。

将10 μ l按照实施例5描述的方法通过PCR制备的DNA加入到40 μ l纯水(Sigma)、

10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM、2 μ l PDAM(P-1405, 1-嵌二氨基重氮甲烷, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)和38 μ l DMSO中标记, 60°C培养30min。

标记完成后, DNA用QIAquick试剂盒(QIAGEN)纯化, 最后的洗脱物溶解到50 μ l EB 缓冲液(10 mM Tris EDTA, pH 8.5)中。将20 μ l此种洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链亲和素HRP(S-911, MOLECULAR PROBES, EUGENE, OR, USA)的180 μ l PEG 缓冲液(0.1M NaPO₃; 0.5M NaCl; 0.65% Tween 20; 0.14 mg/ml 鲑精DNA(Gibco); 2% PEG 4000)中。然后将100 μ l此种制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中, 37°C培养1h。

实施例35. 2: 准备对照组

对照样品同时按照下列方式制备:

A. 单独用对-Bio-EG3-PDAM标记的对照:

将10 μ l按照实施例5描述的方法通过PCR制备的DNA加入到添加10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM的90 μ l纯水中标记, 60°C培养30min。标记完成后, DNA用QIAquick试剂盒纯化, 最后的洗脱物溶解到50 μ l EB 缓冲液中。将20 μ l此种洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链亲和素HRP的180 μ l PEG缓冲液中。然后将100 μ l此种制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中, 37°C培养1h。

B. 单独用PDAM标记的对照:

将10 μ l按照实施例5描述的方法通过PCR制备的DNA加入到添加2 μ l PDAM和38 μ l DMSO的90 μ l纯水中标记, 60°C培养30min。标记完成后, DNA用QIAquick试剂盒纯化, 最后的洗脱物溶解到50 μ l EB 缓冲液中。将20 μ l此种洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链亲和素HRP的180 μ l PEG缓冲液中。然后将100 μ l此种制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中, 37°C培养1h。

C. 无标记对照:

将10 μ l按照实施例5描述的方法通过PCR制备的DNA加入到100 μ l纯水中标记, 60°C培养30min。标记完成后, DNA用QIAquick试剂盒纯化, 最后的洗脱物溶解到50 μ l EB 缓冲液中。将20 μ l此种洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链亲和素HRP的180 μ l PEG缓冲液中。然后将100 μ l此种制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中, 37°C培养1h。

所述条带用100 μ l PBS Tween 缓冲液(Color 0)洗涤三次, 然后通过加入100 μ l 显色试剂(Color 2)在暗处培养20min就可以观察到链亲和素HRP的存在, 用50 μ l H₂SO₄(Color 3)终止反应。然后测量反应介质在492 nm处的吸光度值。

结果:

条件	吸附在微孔板上的抗苅抗体(rfu)	无吸附对照微孔板(rfu)
Ex. 35. 1: PDAM+对-Bio-EG3-PDAM-标记DNA	348	16
Ex. 35. 2. A: 对-Bio-EG3-PDAM-标记DNA	44	19
Ex. 35. 2. B: PDAM-标记 DNA	68	12
Ex. 35. 2. C: 无标记DNA	75	19

表19: 用PDAM 和 对-Bio-EG3-PDAM双标记DNA

表19中的结果清楚地表明强信号是来自于被孔壁上抗苅抗体捕获的同时也是被连接的链亲和素HRP标记的DNA。对照组的结果说明这种DNA检测是特异的，高强度信号不是来自于DNA或链亲和素HRP与塑料的非特异吸附，也不是来自于酶与捕获DNA的非特异结合。因此本实施例说明在一个步骤中双标记DNA是可能的，这种双标记用于同时捕获和检测DNA也是可能的。

实施例36: 标记PCR产物的同时用互补核酸探针捕获和标记:

本实施例在于证明通过与DNA上的磷酸基团反应的叠氮甲基功能基团特异性地检测DNA是可能的，所述DNA是被捕获在固体支持物的表面。

本试验用HLA-DR 寡-检测试剂盒(参见33202, bioMérieux, France)的一部分试剂进行，用比色方法检测微孔板上通过PCR扩增的核酸。根据所描述的试验方法，对-Bio-EG₃-PDAM与通过PCR扩增的核酸反应。DNA与分子的叠氮甲基反应，因此在其磷酸基团上被连接上生物素。因而有可能通过在微孔板上培养来捕获核酸，其中微孔板上吸附有链亲和素，然后一个含有与捕获序列互补的寡核苷酸探针来检测DNA，该探针上连接有辣根过氧化物酶，该酶可以将邻苯二胺分子(试剂盒的Color 1试剂)降解成可在492 nm处被检测到的化合物。

实施例36. 1: 在微孔板上捕获和特异性检测DNA:

将10μl用PCR扩增得到的DNA与20μl 对-Bio-EG3-PDAM在60℃培养30min以标记DNA，设双复孔。标记后DNA用QIAquick柱(Nucleotide Removal 试剂盒, Qiagen, Hilden, Germany)按照厂商推荐的方法纯化，将最终洗脱下来的物质溶解到50μl EB缓冲液(10 mM Tris EDTA, pH 8.5)中。将85μl这种洗脱液用8.5μl试剂R4(2N NaOH)在室温下培养5min使之变性，然后用8.5μl试剂R5(2N 乙酸)中和。混合物中加入850μl 杂交缓冲液(R6-10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.2 g/1 BND, 0.01 g/1 Ciprofloxacin)和85μl检测寡核苷酸(R7-4 mM 磷酸钠, 1 mM 磷酸钾, pH 7.0, 0.1%

牛血清白蛋白，0.5% 酚)。将100 μ l上述制备液加入到试剂盒提供的Strip R1的阳性对照孔(被扩增基因的一致序列捕获)中，或链亲和素包被的Combiplate 8平板(参见95029263, Labsystem, Helsinki, Finland)的孔中，或者对照Maxisorb平板(Nunc, Denmark)的对照孔中。

平行的试验中，同样的杂交缓反应是将DNA用EB缓冲液10倍和100稀释以检测该技术的灵敏度。

实施例36.2：对照组

对照样品同时按照下列方式制备：

A. 比较HLA-DR试剂盒：

将10 μ l按照实施例5描述的方法用PCR扩增得到的DNA与20 μ l 对-Bio-EG3-PDAM在60℃培养30min。标记后DNA用QIAquick柱纯化，将最终洗脱下来的物质溶解到50 μ l EB 缓冲液中。将45 μ l这种洗脱液用4.5 μ l试剂R4在室温下培养5min使之变性，然后用4.5 μ l试剂R5中和。混合物中加入450 μ l杂交缓冲液R6和45 μ l检测寡核苷酸。将100 μ l上述制备液加入到试剂盒提供的Strip R1的阳性对照孔(被扩增基因的一致序列捕获)中，或链亲和素包被的Combiplate 8平板中，或者对照Maxisorb平板中。

B. 杂交所用DNA不与特异性探针杂交：

将10 μ l按照实施例5描述的方法用PCR扩增得到的DNA与20 μ l 对-Bio-EG3-PDAM在60℃培养30min。样品的其他处理方法与上面实施例A描述的相同。

C. 无DNA对照：

将10 μ l试剂R6(杂交缓冲液)和100 μ l试剂R7(检测寡核苷酸)加入到试剂盒提供的Strip R1的阳性对照孔中，或链亲和素包被的Combiplate 8平板中，或者对照Maxisorb平板中。

将上述所有试验中的Strips在37℃培养1 h 30 min，然后用100 μ l PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color 0 HLA 试剂)洗涤三次，加入100 μ l显色试剂(Color 2 试剂，PBS pH 7.0; 1% Tween, 0.2g/l BND; 0.01g/l Ciproflaxacin)在暗处培养20min可以看到特异性检测探针的存在，然后用50 μ l H₂SO₄(1.8N Color 3 试剂)终止反应。然后测量反应介质在492 nm处的吸光度值。

结果：

条件	R1条带HLA DR试剂盒 (特异性捕获)	Combiplate (链亲和素)	Maxisorb (对照)
A - 标记-Ex. 36.1	1215	2160	16

A - 标记DNA(1/10稀释)	NA	900	NA
A - 标记DNA(1/100稀释)	NA	53	HA
B-非标记DNA对照-Ex. 36. 2 A	1153	40	17
C-细菌DNA对照-Ex. 36. 2 B	34	15	NA
D - 无DNA对照 - Ex. 36. 2 C	13	12	17

表20：在微孔板上特异性检测PCR扩增的DNA

表20的结果显示模板的优越的扩增可使其用于诊断成为可能。本实施例说明在磷酸基团上的标记可以使DNA被捕获而不会影响其特异性杂交。

实施例37：细菌裂解物来源的DNA的捕获和扩增以及用对-Bio-EG3-PDAM标记：

本实施例用于说明利用叠氮甲基功能基团与核酸上磷酸基的反应性捕获和扩增细菌DNA是可能的。

在本实施例中，细菌裂解物中的核酸被对-Bio-EG3-PDAM标记，然后被捕获到链亲和素包被的磁珠上。利用磁珠可以通过磁性使核酸被固定，以便在接下来的连续洗涤过程中除去反应介质中的细胞残留物，去除残留物是必须的，因为它们可能会抑制下一步的PCR扩增。

扩增产物可以通过与DNA芯片杂交而分析。

细菌DNA的获得是通过裂解结核杆菌培养物中的细胞。裂解的方式是用机械手段。准确的说是用超声破碎法，所处理的液体样品中含有玻璃珠。这种方法中关于磁珠的部分已被专利申请WO-A-99/15621的申请人所描述，超声破碎的方法在专利申请WO-A-00/60049中也有描述。超声也可用液体水浴进行。

但是本领域的普通技术人员所熟知的其他方法也可使用，如专利US-A-5, 902, 746 以及专利申请WO-A-98/54306 和WO-A-00/05338所描述的方法。所有这些方法的工业产权都属于专利申请人。

细菌DNA的定量是用Picogreen(P-7589; Molecular Probes. Eugene, OR, USA)按照厂商提供的说明书进行，浓度为10⁷拷贝/1μl。

将10μl细菌裂解物与20μl 对-Bio-EG3-PDAM混和后在60℃培养30min。作为平行对照，将10μl细菌裂解物加入到20μl纯水(Sigma) 中在相同条件下培养。

然后用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)纯化反应混和液。纯化方法是厂商推荐的。最终的洗脱物体积为50μl。

然后将 标记的DNA片段捕获到Dynal磁珠(Dynabeads M-280 链亲和素；参见112. 05; Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway)上，其制备方法如下：

90 μ l Dynal珠用200 μ l纯水(Sigma)洗涤两次,然后收集到200 μ l PEG缓冲液(0.1M NaPO₄, pH 7, 0.5M NaCl; 0.65% Tween 20; 0.14 ml鲱精DNA(参见15634-017, GibcoBRL); 2% PEG 4000),在37°C培养30min。然后用200 μ l含0.5% Tween的1×PBS缓冲液洗涤两次,最后的洗脱物收集到90 μ l相同缓冲液中。

10 μ l标记或未标记的DNA洗脱物与40 μ l PEG缓冲液和2.5 μ l如上所述制备的磁珠在室温下培养5min。

然后用200 μ l含0.5% Tween的1×PBS缓冲液洗涤磁珠三次,然后收集到200 μ l水中,60°C培养20min,然后再用200 μ l PBS Tween洗涤四次。最后将磁珠收集到25 μ l水中,按照实施例5描述的方法进行PCR。设两个对照,一个25 μ l纯水,另一个是2.5 μ l制备的磁珠,用与生物样品相同的条件制备和洗涤,收集到25 μ l水中。

结果: PCR产物用Picogreen(P-7589; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)按照厂商所提供的说明书定量。该方法的原理是基于所用的分子(Picogreen)只有在定位到DNA分子内部(嵌入到两个碱基之间)时才能变成荧光物质。由于这种嵌入具有很高的特异性,并且所产生的荧光信号与介质中存在的DNA量成正比,因此可以用这种方式很精确地分析样品中所含有的DNA浓度。所检测到的信号用rfu(相对荧光单位)表示。

凝胶分析PCR结果显示从对-Bio-EG3-PDAM标记的基因组DNA制备的样品在凝胶的预期位置上出现一条单一的特异性条带。如果用非标记基因组DNA进行PCR扩增就检测不到该条带。以Picogreen进行DNA定量使确定产生的DNA量成为可能,这些DNA是通过扩增捕获在磁珠上的DNA得到的。

条件	rfu
非标记对照	51
标记DNA	170
背景噪音	20

表21: 从细菌裂解物中通过PCR扩增处的DNA的定量、定量以及通过对-Bio-EG3-PDAM的纯化

按照实施例8描述的方法在DNA芯片上进行分析就有可能用于确定下面表34中所列举的扩增的特异性。

同源性	I(rfu)	B(rfu)	I/B
样品	98	11531	723

表22: 用对-Bio-EG3-PDAM捕获和纯化的靶的特异性检测

本实施例说明制备生物学样品以扩增其所含有的核酸是可能的, 所用的捕获技

术是基于叠氮甲基功能基团与磷酸基团的反应性。

实施例38：连续扩增两个来源于被捕获在固体支持物上的细菌DNA的基因：

本实施例用于说明利用叠氮甲基功能基团与核酸上磷酸基的反应性扩增几次不同的靶DNA是可能的。

在本实施例中，细菌裂解物中的核酸被对-Bio-EG3-PDAM标记，然后被捕获到链亲和素包被的磁珠上。利用磁珠可以通过磁性使核酸被固定，以便在接下来的连续洗涤过程中除去反应介质中的细胞残留物，去除残留物是必须的，因为它们可能会抑制下一步的PCR扩增。这些扩增发生在基因组DNA不同的两个基因上，分别命名为16S和rpoB。这两个基因通过与DNA芯片杂交而被分析。

细菌DNA的获得是按照实施例37所描述的方法通过裂解结核杆菌培养物中的细胞。细菌DNA的定量是用Picogreen按照厂商提供的说明书进行，浓度为 10^7 拷贝/ $1\mu\text{l}$ 。

将 $10\mu\text{l}$ 细菌裂解物与 $20\mu\text{l}$ 对-Bio-EG3-PDAM混和后在 60°C 培养 30min 。作为平行对照，将 $10\mu\text{l}$ 细菌裂解物加入到 $20\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)中在相同条件下培养。

然后用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)纯化反应混和液。纯化方法是厂商推荐的。最终的洗脱物体积为 $50\mu\text{l}$ 。

然后将标记的DNA片段捕获到Dynal磁珠(Dynabeads M-280 链亲和素；参见112.05; Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway)上，其制备方法如下：

$90\mu\text{l}$ Dynal珠用 $200\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)洗涤两次，然后收集到 $200\mu\text{l}$ PEG缓冲液(0.1M NaPO₄, pH 7, 0.5M NaCl; 0.65% Tween 20; 0.14 ml 鲑精DNA(参见15634-017, GibcoBRL); 2% PEG 4000)，在 37°C 培养 30min 。然后用 $200\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween 20的 $1\times$ PBS缓冲液洗涤两次，最后的洗脱物收集到 $90\mu\text{l}$ 相同缓冲液中。

$10\mu\text{l}$ 标记或未标记的DNA洗脱物与 $40\mu\text{l}$ PEG缓冲液和 $2.5\mu\text{l}$ 如上所述制备的磁珠在室温下培养 5min 。

然后用 $200\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween的 $1\times$ PBS缓冲液洗涤磁珠三次，然后收集到 $200\mu\text{l}$ 水中， 60°C 培养 20min ，然后再用 $200\mu\text{l}$ PBS Tween洗涤四次。最后将磁珠收集到 $25\mu\text{l}$ 水中，按照实施例5描述的方法进行PCR。设两个对照，一个 $25\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)，另一个是 $2.5\mu\text{l}$ 制备的磁珠，用与生物样品相同的条件制备和洗涤，收集到 $25\mu\text{l}$ 水中。

扩增以后，收集反应液，将磁珠分离，用 $150\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween的 $1\times$ PBS洗涤，然后悬于 $25\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)中。另外一个扩增是在磁珠上进行，只是所用的引物是用于扩增rpoB基因的。

对照组的扩增是用非捕获基因组DNA，与上两个扩增系统(rpo和16S)同时进行。
结果：

所得到的产物用DNA芯片按照实施例8描述的方法分析。

条件		同源性 (%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
对照PCR 16S	16S	96	4662	387	12
rpoB序列的结果	RpoB	23	237	358	1
对照PCR rpoB	RpoB	98	5438	397	14
16S序列的结果	16S	17	183	391	1
PCR扩增磁珠上的16S	16S	98	2726	534	5
rpoB序列结果	RpoB	8	161	480	<1
PCR扩增洗涤磁珠上的16S	RpoB	97	3205	349	9
16S序列的结果	16S	14	84	358	<1

表23：DNA芯片分析经过连续PCR扩增或不连续扩增得到的DNA扩增子
凝胶分析PCR结果显示从对-Bio-EG3-PDAM标记的基因组DNA制备的样品在凝胶的预期位置上出现一条单一的特异性条带。如果用非标记基因组DNA进行PCR扩增就检测不到该条带。

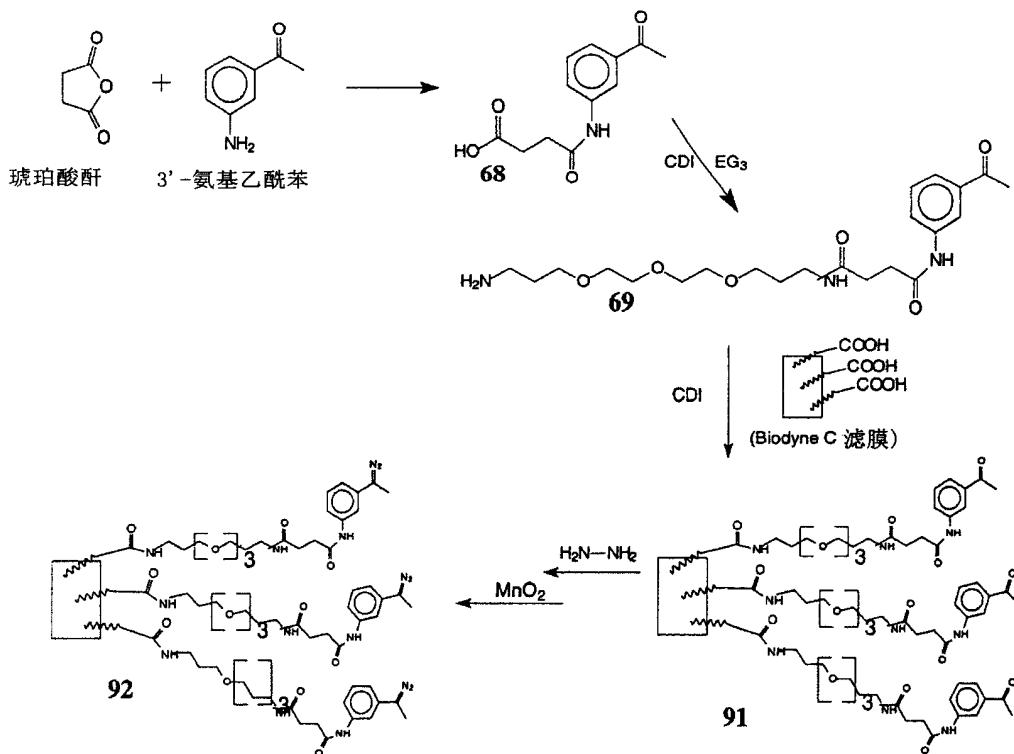
如上面表23所显示的用DNA芯片进行分析可以确定两次连续扩增的特异性，因而就能够从固定在固体支持物上的DNA中连续扩增出几个基因，从而就无需开发multiplex systems，这样的系统常常会降低核酸扩增的敏感性和效率。

实施例39：在携带叠氮甲基基团的尼龙膜上捕获和扩增DNA：

将尼龙膜活化以使其些但叠氮甲基基团，用于捕获细菌DNA，然后通过PCR扩增这些DNA。

实施例39. 1： Biodyne C 滤膜的修饰：

合成流程：



化合物68:

将3'-氨基苯乙酮(14.5 g, 107 mmol)溶解到50ml无水DMF中。加入琥珀酐(10.7 g, 107 mmol)，混合物在室温下通氩气持续搅拌。6h后将溶液在真空中浓缩，然后加入50ml甲醇。过滤后得到的沉淀物用甲醇和乙醚洗涤。从而得到19.4 g(81%)掺着少量灰黄颜色的白色粉末状产物68。

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) : δ =2.5–2.6 (m, 7H)；7.45 (t, 1H)；7.64 (d, 1H)；7.83 (d, 1H)；8.19 (s, 1H)；10.16 (s, 1H)；12.12 (s, 1H)。

化合物69:

将5.07 g(22 mmol)化合物68在氩气下溶于10 ml无水DMF中。溶液置于冰上，然后加入5.00 g(32mmol)羰基二咪唑。20分钟后缓慢加入20 ml(94.6 mmol)4, 7, 10-三氧三癸二胺(EG3)。在室温下反应3h后将DMF蒸发掉，残留物收集到100ml CH_2Cl_2 中。用饱和 NaHCO_3 和 H_2O 提取，然后用无水 Na_2SO_4 干燥有机相，将溶剂蒸发。从而得到4.34 g(46%)产物69。

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) : δ =1.59 (m, 2H)；1.87 (m, 2H)；2.16 (s, 3H)；2.40 (m, 2H)；2.55 (m, 2H)；3.08 (m, 2H)；3.45 (m, 16H)；7.30 (t, 1H)；7.42 (d, 1H)；7.70 (d, 1H)；7.83 (t, 1H)；7.97 (s, 1H)；10.00 (s, 1H)。

化合物91:

在一张Biodyne C 滤膜(参见60314; Pall Gelman Laboratory; Ann Arbor; Michigan; USA)上剪出一个4cm²的矩形, 放入一个瓶子中, 使之与3 ml含有0.97 g(6 mmol) 碳基二咪唑(CDI)的无水DMF接触, 瓶子置于冰上, 通氩气剧烈搅拌。20min后将溶液去掉, 滤膜用DMF洗涤。然后加入3ml含0.53 g产物68(1 mmol)的无水DMF, 在室温下反应过夜。然后去掉溶液, 滤膜用乙醇研磨, 在真空中干燥并保存在氩气中。

化合物92:

将修饰的滤膜91放到97 ml一水合肼(2 mmol)和4 ml无水乙醇的混合物中。溶液回流5h。溶液冷却后用水、乙醇和乙醚洗涤滤膜, 真空中干燥然后置于氩气中。然后加入4 ml无水DMF和86 mg MnO₂(1 mmol), 混合物剧烈搅拌使之反应。20min后将溶液弃掉, 滤膜用DMF和乙醚研磨。得到的叠氮甲基修饰滤膜92存在在氩气中, 保存稳定为-19到-31℃。

实施例39. 2: 生物学检测:

将活化的膜剪成2 mm² 的小片, 与25μl结核杆菌裂解物和375μl 纯水(Sigma)一起在室温下培养30min, 所用的细菌裂解物是通过机械方式制备的, 其方法和最终的浓度与实施例37相同。

然后将膜置于100 ml洗涤缓冲液(5% 甲酰胺(Sigma), 1×SSPE(Perbio), 0.01% Triton X-100) 中在65℃培养60min以去除非特异性吸附到膜上的核酸, 然后将膜储存在1 ml纯水中以便进行扩增。

按照实施例5. 1所描述的进行PCR, 反应混合物的体积用纯水补足。

平行对照的设置是按照与上面一样的过程进行, 只是所用的膜无核酸共价结合。

- 非修饰Biodyne C 膜(膜A),
- 按照上述方法化学修饰的Biodyne膜, 但不用无水DMF和MnO₂处理; 此对照的目的在于说明在无叠氮甲基基团的情况下膜的情况(膜B), 以及
- Biodyne C 膜, 不进行修饰, 但是用无水DMF和MnO₂剧烈搅拌20min处理, 此对照的目的在于说明这种处理步骤不会影响DNA对膜的吸附(膜C)。

为了说明对膜的处理不会抑制PCR, 同时用另外三个膜A, B和C的小片与25μl细菌裂解物进行PCR扩增(管A', B' 和C')。

PCR产物用Picogreen按照厂商提供的说明书进行定量。

结果:

试验组	信号(rfu)
修饰膜	111
未修饰膜(A)	18
未修饰膜, 与25μl细菌裂解物一起扩增(A')	260
未活化的修饰膜(B)	26
未修饰膜, 与25μl细菌裂解物一起扩增(B')	264
活化的未修饰膜(C)	21
活化的未修饰膜, 与25μl细菌裂解物一起扩增(C')	268

表24: PCR扩增捕获在固体支持物上的细菌裂解物DNA所得到的DNA 的量化

表24中的这些结果说明将核酸通过叠氮化学方法共价捕获在固体支持物上是可行的。所观察到的扩增不是由于DNA与膜的非特异吸附。另外，通过对照组试验可以看出膜不会抑制扩增反应。

为了检测膜上扩增产物的性质，扩增产物按照上述的方法用DNA芯片分析。