

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02812490.1

[51] Int. Cl.

C07C 245/14 (2006.01)
C07C 245/18 (2006.01)
C07D 209/14 (2006.01)
C07D 495/04 (2006.01)
C07D 311/82 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月8日

[11] 授权公告号 CN 100509761C

[22] 申请日 2002.5.3 [21] 申请号 02812490.1

[30] 优先权

[32] 2001.5.4 [33] FR [31] 01/06040

[86] 国际申请 PCT/FR2002/001543 2002.5.3

[87] 国际公布 WO2002/090319 法 2002.11.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.22

[73] 专利权人 比奥·麦利尤股份有限公司

地址 法国马西埃图瓦勒

共同专利权人 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 J·洛姆 A·拉扬

M·柯特拉 E·特里维希奥

L·梅诺 E·博纳门德兹

[56] 参考文献

Fluorescence Detection of DNA Using A Novel PeroxidaseSubstrate,. MASANOBU SHIGA ET AL. ANALYTICAL SCIENCES, Vol. 11 No. 4. 1995

Synthesis of a Novel Biotin Derivative That Bears a DiazoGroup as the Reactive Site. MASANOBU SHIGA ET AL. ANALYTICAL SCIENCES, Vol. 9 No.4. 1993

审查员 吕青

[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 11 页 说明书 117 页 附图 13 页

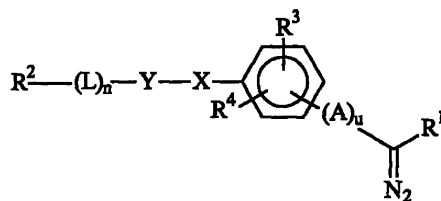
[54] 发明名称

标记试剂,合成该试剂的方法以及检测生物分子的方法

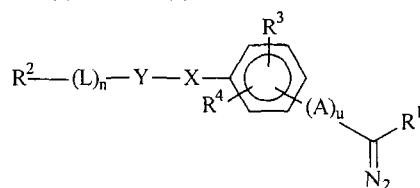
[57] 摘要

本发明涉及对温度稳定的标记试剂,它具有以下结构:其中:·R¹表示H或烷基,芳基或取代的芳基,·R²表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,·L是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂,n是等于0或1的整数,·R³和R⁴分别表示:H,NO₂,Cl,Br,F,I,R²-(L)_n-Y-X-,OR,SR,NR₂,R,NHCOR,CONHR,COOR,其中R=烷基或芳基,·A是包含至少一个共价双键的连接臂,它能使重氮官能团和芳环共轭,u是0-2之间的整数,优选等于0或1,和·-Y-X-表示-CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-。本发明还描述了合成所述标记的方法,以及带有重氮甲基官能团的标记试剂在标记生物分子,尤其是核

酸中的应用。本发明发现了在诊断领域的优选应用。



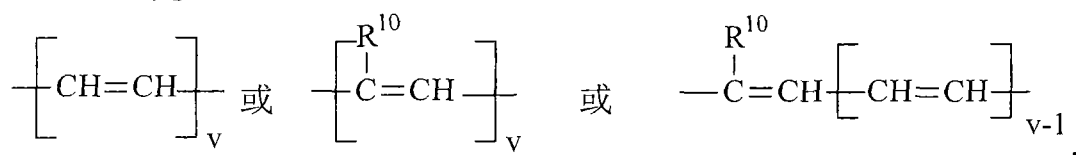
1. 对温度稳定的式(0)所示标记试剂:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 等于 0 或 1 的整数,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基,

• A 是

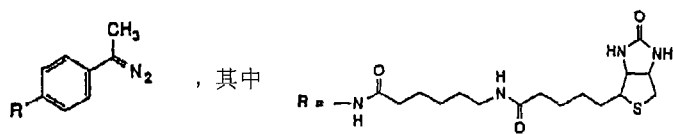


其中: v 是 1-10 之间的整数, R^{10} 是 H 或烷基,

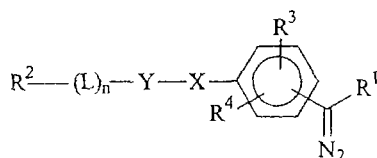
u 是 0-2 之间的整数, 和

- -Y-X-表示 -CONH-, -NHCO-, -CH₂O- 或 -CH₂S-;

条件是, 所述标记试剂不是以下化合物:



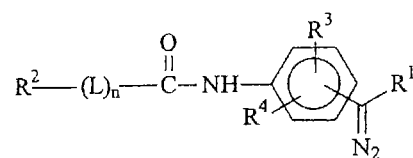
2. 如权利要求 1 所述的标记试剂, v 是 1 或 2。
3. 如权利要求 1 所述的标记试剂, R^{10} 是 H, 甲基或乙基。
4. 如权利要求 1 所述的标记试剂, u 等于 0 或 1。
5. 如权利要求 1 所述的标记试剂, 如式(1)所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基, 和 $-Y-X-$ 表示 $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 。

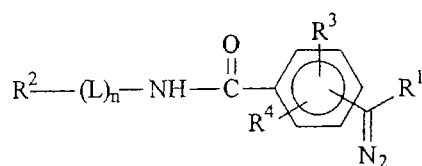
6. 如权利要求 1 或 5 所述的试剂, 如式(2)所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数, 和
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基。

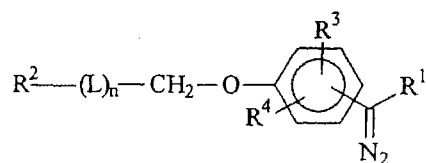
7. 如权利要求 1 或 5 所述的试剂, 如式(3)所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数, 和
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基。

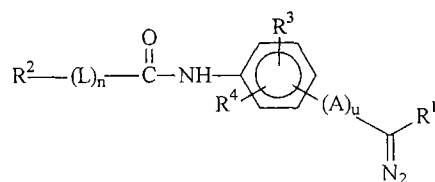
8. 如权利要求 1 或 5 所述的试剂, 如式(4)所示:



其中:

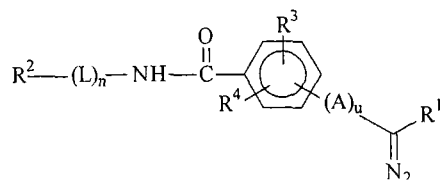
- R¹ 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R² 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数, 和
- R³ 和 R⁴ 分别表示: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基。

9. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式(21)所示:



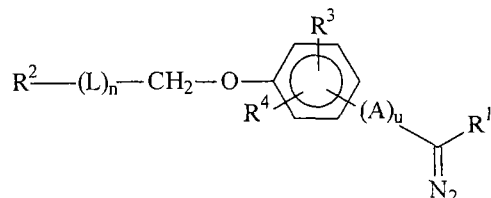
其中: u 等于 1。

10. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式(22)所示:



其中: u 等于 1。

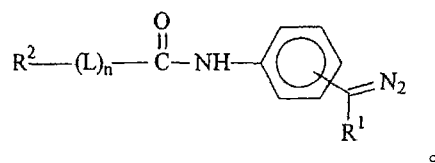
11. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式(23)所示:



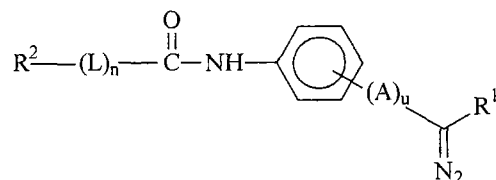
其中: u 等于 1。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的试剂, 其中, R³ 和 R⁴ 分别表示: H, NO₂, OCH₃, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R² 或 -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R²。

13. 如权利要求 5 所述的试剂，如式 (2') 所示：

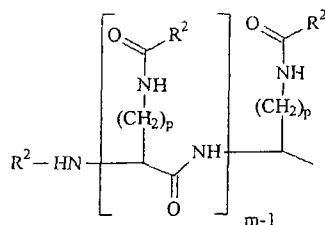


14. 如权利要求 1 或 9 所述的试剂，如式 (24) 所示：



其中：u 等于 1。

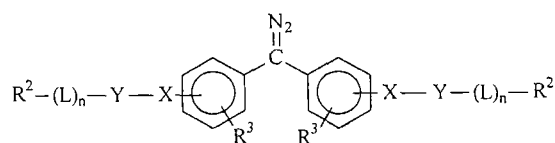
15. 如权利要求 1 所述的试剂，其中，结构 $R^2-(L)_n$ -如式 (5)：



其中：

- m 是 1-100 之间的整数，和
- p 是 1-10 之间的整数。

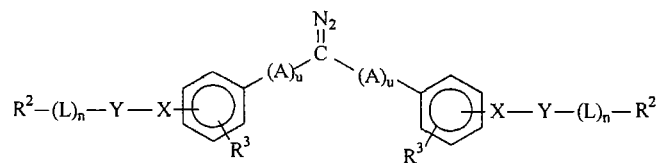
16. 如权利要求 1 所述的试剂，如式 (6) 所示：



其中：

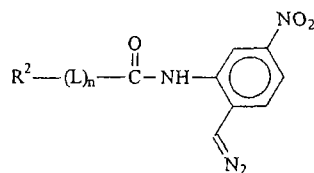
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，
- R^3 表示 H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR，其中 R=烷基或芳基，
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂，n 是等于 0 或 1 的整数，和
- $-Y-X-$ 表示 $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$ 或 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 。

17. 如权利要求 1 所述的试剂，如式 (25) 所示：



其中:u 等于 1。

18. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式 (14) 所示:

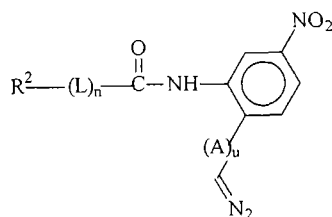


其中:

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记, 和

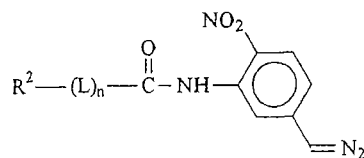
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数。

19. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式 (26) 所示:



其中:u 是等于 1。

20. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式 (15) 所示:

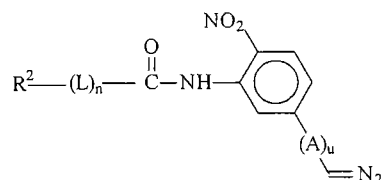


其中:

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,

- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数。

21. 如权利要求 1 所述的试剂, 如式 (27) 所示:



其中:u 等于 1。

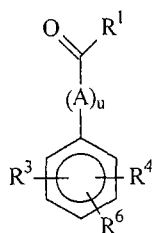
22. 如权利要求 1 所述的试剂, 其特征在于, L 包含单元 $-(O-CH_2-CH_2)-$, 该单元重复 1-20 次。

23. 如权利要求 22 所述的试剂, 其中, 所述单元重复 1-10 次。

24. 如权利要求 22 所述的试剂, 其中, 所述单元重复 2-5 次。

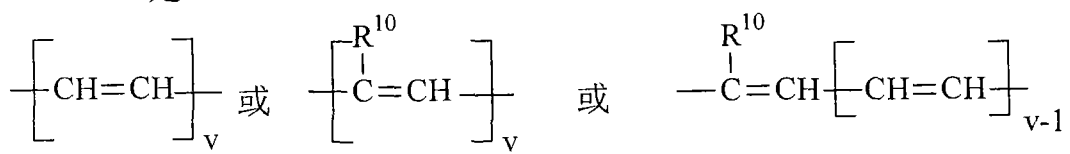
25. 合成如权利要求 1-24 中任一项所述标记试剂的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

a) 得到式(16a)所示的衍生物:



其中:

- R¹ 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基,
- R³ 和 R⁴ 分别表示: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R⁶, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基,
- R⁶ 表示 COOH, COOM, NH₂, OH 或 SH, 其中 M=烷基, 和
- A 是



其中: v 是 1-10 之间的整数, R¹⁰ 是 H 或烷基,

u 是等于 0 或 1 的整数,

b) 得到具有与 R⁶ 互补的反应官能团 R⁷ 的标记或标记前体,

如果官能团 R⁶ 是 COOH 或 COOM, 互补官能团 R⁷ 是 NH₂,

如果官能团 R⁶ 是 NH₂, 互补官能团 R⁷ 是 COOH,

如果官能团 R⁶ 是 OH, 互补官能团 R⁷ 选自: 烷基卤, 磺酸盐, 甲苯磺酸盐,

如果官能团 R⁶ 是 SH, 互补官能团 R⁷ 选自: 烷基卤, 马来酰亚胺,

c) 在至少一种偶联剂存在时, 使所述标记或标记前体的互补官能团与式(16a)的衍生物的官能团 R⁶ 反应以形成共价键,

d) 使肼或它的一个衍生物与酮或醛官能团反应以形成腙, 和

e) 用合适的方法将脞转化成重氮甲基官能团。

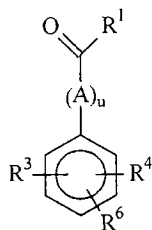
26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, v 是 1 或 2。

27. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, R^{10} 是 H, 甲基或乙基。

28. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, M = 甲基或乙基。

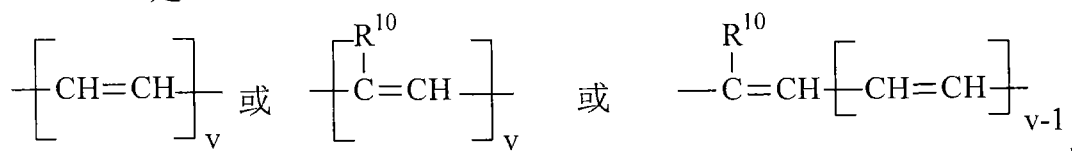
29. 合成如权利要求 1-24 中任一项所述标记试剂的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

a) 得到式 (16a) 的衍生物:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, R^6 , OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基,
- R^6 表示 COOH, COOM, NH_2 , OH 或 SH, 其中 M=烷基, 和
- A 是



其中: v 是 1-10 之间的整数, R^{10} 是 H 或烷基,

u 是等于 0 或 1 的整数,

b) 得到具有至少两个相同或不同的反应官能团 R^8 的连接臂 L, 第一个官能团 R^8 与 R^6 互补, 第二个官能团 R^8 与 R^7 互补, 此外, 得到具有反应官能团 R^7 的标记或标记前体,

如果官能团 R^6 是 COOH 或 COOM, 互补官能团 R^7 是 NH_2 ,

如果官能团 R^6 是 NH_2 , 互补官能团 R^7 是 COOH,

如果官能团 R^6 是 OH, 互补官能团 R^7 选自: 烷基卤, 磺酸盐, 甲苯磺酸盐,

如果官能团 R^6 是 SH, 互补官能团 R^7 选自: 烷基卤, 马来酰亚胺,

如果官能团 R^6 和/或官能团 R^7 是 COOH 或 COOM, 则第一个和/或第二个互补官能团 R^8 是 NH_2 ,

如果官能团 R^6 和/或官能团 R^7 是 NH_2 ，则第一个和/或第二个互补官能团 R^8 是 $COOH$ ，

如果官能团 R^6 和/或官能团 R^7 是 OH ，则第一个和/或第二个互补官能团 R^8 独立选自：烷基卤、磺酸盐、甲苯磺酸盐，

如果官能团 R^6 和/或官能团 R^7 是 SH ，则第一个和/或第二个互补官能团 R^8 独立选自：烷基卤、马来酰亚胺，

c) 在至少一种偶联剂存在时，使连接臂 L 的第一个反应官能团 R^8 与式(16a)的衍生物反应以形成共价键，然后在至少一种偶联剂存在时，使连接臂 L 的第二个反应官能团 R^8 与标记或标记前体反应以形成共价键，

d) 使胍或它的一个衍生物与酮或醛官能团反应以形成脎，和

e) 用合适的方法将脎转化成重氮甲基官能团。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其中， v 是 1 或 2。

31. 如权利要求 29 所述的方法，其中， R^{10} 是 H，甲基或乙基。

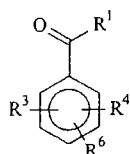
32. 如权利要求 29 所述的方法，其中， M = 甲基或乙基。

33. 如权利要求 25 或 29 所述的合成方法，它还包含：

- 保护化合物(16a)的酮或醛官能团的步骤，和
- 将所述酮或醛官能团去保护的后续步骤。

34. 如权利要求 25 所述的合成方法，它包括进行以下步骤：

a) 得到式(16)的衍生物：



其中：

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基，
- R^3 和 R^4 分别表示：H, NO_2 , Cl, Br, F, I, R^6 , OR, SR, NR_2 , R, $NHCOR$, $CONHR$ 或 $COOR$ ，其中 R = 烷基或芳基，和
- R^6 表示 $COOH$, NH_2 , OH 或 SH 。

b) 得到具有与 R^6 互补的反应官能团 R^7 的标记或标记前体，

如果官能团 R^6 是 $COOH$ 或 $COOM$ ，互补官能团 R^7 是 NH_2 ，

如果官能团 R^6 是 NH_2 ，互补官能团 R^7 是 $COOH$ ，

如果官能团 R^6 是 OH ，互补官能团 R^7 选自：烷基卤，磺酸盐，甲苯磺酸盐，

如果官能团 R^6 是 SH ，互补官能团 R^7 选自：烷基卤，马来酰亚胺，

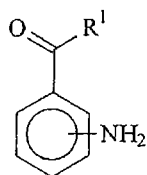
c) 在至少一种偶联剂存在时, 使所述标记或标记前体的互补官能团与式(16)的衍生物的官能团 R^6 反应以形成共价键,

d) 使肼或它的一个衍生物与酮或醛官能团反应以形成腙, 和

e) 用合适的方法将腙转化成重氮甲基官能团。

35. 合成如权利要求 13 所述的标记试剂的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

a) 得到式(17)的衍生物:



其中 R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基,

b) 得到具有羧酸官能团的标记或标记前体,

c) 在至少一种偶联剂存在时, 使所述标记或标记前体的羧基官能团与式(17)的衍生物的伯胺官能团反应以形成酰胺键,

d) 使肼与式(17)的衍生物的酮或醛官能团反应以形成腙, 和

e) 在 MnO_2 存在时氧化所述腙以形成重氮甲基官能团。

36. 标记生物分子的方法, 其特征在于, 所述方法包括使生物分子与权利要求 1-24 中任一所述的试剂在基本上是含水缓冲液的均匀溶液中接触。

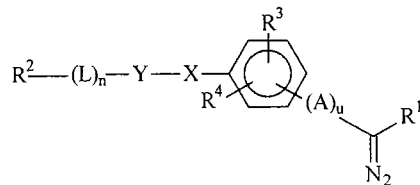
37. 如权利要求 36 所述的方法, 所述生物分子是核酸。

38. 用权利要求 36 所述的方法可获得的标记的生物分子。

39. 标记并片段化单链或双链核酸的方法, 其特征在于, 所述方法包括任何顺序的以下步骤:

- 将所述核酸片段化,

- 通过选自式(0)所示化合物的标记试剂将一个标记附到至少一个片段上:



其中:

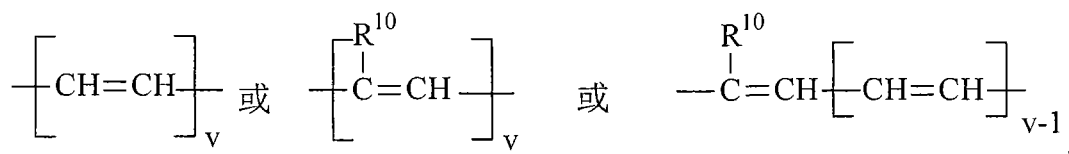
R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,

R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,

L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 等于 0 或 1 的整数,

R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基,

A 是

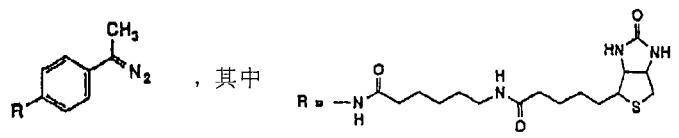


其中: v 是 1-10 之间的整数, R^{10} 是 H 或烷基,

u 是 0-2 之间的整数, 和

-Y-X-表示 -CONH-, -NHCO-, - CH_2O -或 - CH_2S -,

条件是, 所述标记试剂不是以下化合物:



所述试剂主要和所述片段的至少一个磷酸共价偶合。

40. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, v 是 1 或 2。

41. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, R^{10} 是 H, 甲基或乙基。

42. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, u 等于 0 或 1

43. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, 所述片段化和标记在两个步骤中进行。

44. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, 所述片段化和标记在一个步骤中进行。

45. 如权利要求 39-44 中任一项所述的方法, 其中, 所述标记是在基本上水性的均匀溶液中进行的。

46. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, 所述片段化是通过酶, 物理或化学途径进行的。

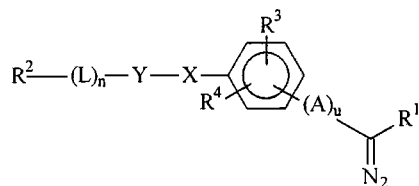
47. 能够用权利要求 39-46 中任一所述方法获得的标记的核酸。

48. 用来检测靶核酸的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包含权利要求 39 所述的标记的核酸。

49. 其上附有权利要求 1-24 中任一项所述试剂的固相支持物。

50. 捕获核酸的方法, 其特征在于, 所述方法包括以下步骤:

- 得到其上直接或间接附有至少一个式 (0) 所示的分子的固相支持物,



其中:

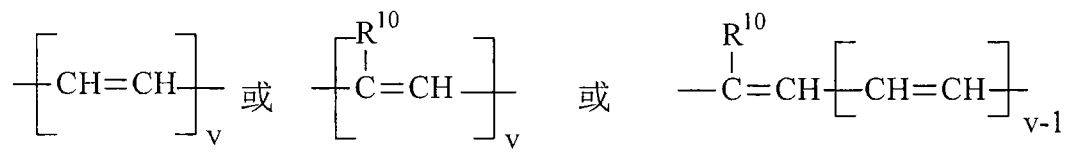
R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,

R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,

L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 等于 0 或 1 的整数,

R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR 或 COOR, 其中 R=烷基或芳基,

A 是

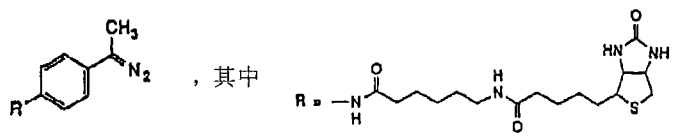


其中: v 是 1-10 之间的整数, 和 R^{10} 是 H 或烷基,

u 是 0-2 之间的整数 0, 和

-Y-X-表示 -CONH-, -NHCO-, -CH₂O- 或 -CH₂S-,

条件是, 所述标记试剂不是以下化合物:



- 使可能含有游离核酸的生物样品与其接触, 和
- 将固相支持物上共价结合了至少一个核酸的一个或多个分子洗去。

51. 如权利要求 50 所述的方法, 其中, v 是 1 或 2。

52. 如权利要求 50 所述的方法, 其中, R^{10} 是 H, 甲基或乙基。

53. 如权利要求 50 所述的方法, 其中, u 等于 0 或 1。

标记试剂，合成该试剂的方法以及检测生物分子的方法

发明背景

本发明涉及用来标记生物分子的新型试剂，涉及合成所述标记的方法以及涉及标记生物分子的应用，尤其在用核酸探针诊断的领域。

现有技术的描述

现有技术显示了各种用于标记核苷酸、寡核苷酸或核酸的方法。

第一种方法包括将标记附到碱基上，无论后者是天然的碱基或是经修饰的碱基。第二种方法将标记附到糖上，同样，无论后者是天然的糖或是经修饰的糖。第三种方法将标记附到磷酸上。

在碱基上标记特别用于通过直接掺入标记的核苷酸来标记核酸。

在糖上标记通常在用化学合成制备核探针的情况下使用。

在磷酸上标记也被用于在化学合成寡核苷酸时引入已被功能化的臂和标记。

事实上，精通此领域的技术人员能够标记核苷酸、核苷酸类似物或核酸，倾向于在碱基或糖上进行这种附着，这样更加方便且更利于选择。这也是为什么许多文献，如 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 都把研究放在碱基上，而 EP-A-0,286,898 研究了糖。

与使碱基或糖功能化的技术相比，将标记附到磷酸上是一项比较复杂的技术，尤其是由于磷酸的低反应性它已较少使用（参见，例如，Jencks W.P. 等，*J. Amer. Chem. Soc.*, 82, 1778-1785, 1960）。同时，可参见 O'Donnel 和 McLaughlin 的综述（“用于核酸结构分析的报道基因”，216-243 页，收录在《生物有机化学：核酸》（“Bioorganic Chemistry:Nucleic Acids”），Hecht S.M. 编，牛津大学出版社，1996）涉及将探针引入寡核苷酸片段的方法，核苷酸间磷酸二酯的有效烷基化被认为是不可能的。

专利申请 WO 99/65926 描述了标记合成的或天然的核糖核酸(RNA)的方法，它包括片段化 RNA 和在末端磷酸的水平上进行标记。该文献描述了许多可与片段化一起用于标记的官能团，如羟基、胺、肼、烷氧基胺、烷基卤和苄基型的烷基卤官能团，尤其是 5'-(溴甲基)荧光素衍生物。这些官能团能够标记核酸，但必需与

片段化步骤结合以进行有效标记，因为这种标记发生在片段化时释放的磷酸上。此外，必需加入相对于 RNA 的大量过量的标记试剂以获得有效的标记，这就导致了过量标记产生的背景噪音的问题。最后，该方法对双链 DNA 不能有效工作。

因此需要有新的标记试剂，从标记领域的观点来看这种试剂是有效的，它在标记位点的水平上是特异的，且特别地，它不会影响通过氢键形成双螺旋时所涉及的碱基的杂交特性，它可用于 DNA 和 RNA，最后，它可用来标记天然来源的或通过酶扩增制备的核苷酸，寡核苷酸或核酸。

发明概述

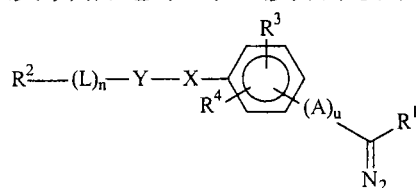
本发明描述了新型标记，所述标记可满足上述情况，且可将重氮甲基官能团用作标记的反应官能团。

所述重氮甲基官能团(式-C(N₂)-)已被用于磷酸基团的烷基化，但存在许多问题。一方面，所述重氮衍生物本身通常是不稳定的，故将这些标记试剂用于标记试剂盒就会产生问题，另一方面，偶合产物是不稳定的，因此，如果标记产物被用来检测任何样品中靶生物分子的存在情况，就不能使用这种方法。

最后，带有重氮甲基官能团的衍生物不溶于水，因此在和仅溶于水或含水缓冲液且在水或含水缓冲液中稳定的生物分子偶合时就要采用两相条件，但这些条件会降低反应速度从而影响偶合效率。

本发明的新型标记试剂可解决这些问题。

根据第一个实施方案，本发明描述了对温度稳定的式(0)的标记试剂：

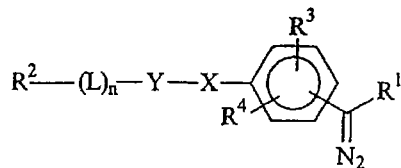


其中：

- R¹ 表示 H 或烷基，芳基或取代的芳基，
- R² 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，
 - L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂，n 是等于 0 或 1 的整数，
 - R³ 和 R⁴ 分别表示：H，NO₂，Cl，Br，F，I，R²-(L)_n-Y-X-，OR，SR，NR₂，R，NHCOR，CONHR，COOR，其中 R = 烷基或芳基，
 - A 是包含至少一个共价双键的连接臂，它能使重氮官能团和芳环共轭，u 是 0-2 之间的整数，优选等于 0 或 1，和

- $-Y-X$ 表示 $-CONH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$ 。

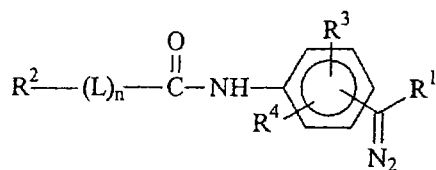
根据第二个实施方案, 本发明描述了对温度稳定的式(1)的标记试剂:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基, 和
- $-Y-X$ 表示 $-CONH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$ 。

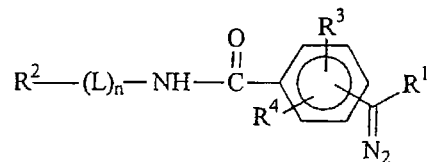
有利地是, 根据第二个实施方案的第一个变化, 所述对温度稳定的试剂如式(2)所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数, 和
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基。

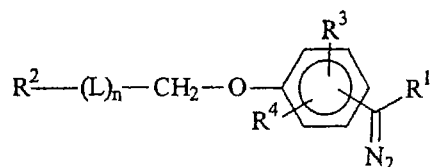
有利地是, 根据第二个实施方案的第二个变化, 所述对温度稳定的试剂如式(3)所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数, 和
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基。

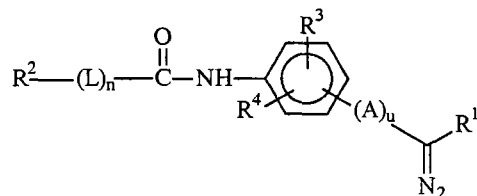
有利地是, 根据第二个实施方案的第三个变化, 所述对温度稳定的试剂如式 (4) 所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基。

有利地是, 根据第一个实施方案的第一个变化, 所述对温度稳定的试剂如式 (21) 所示:



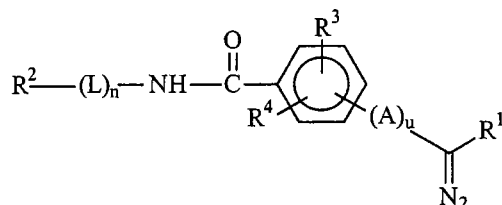
其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,
- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭,

u 是 0-2 之间的整数, 优选等于 0 或 1, 和

- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基。

有利地是, 根据第一个实施方案的第二个变化, 所述对温度稳定的试剂如式 (22) 所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,

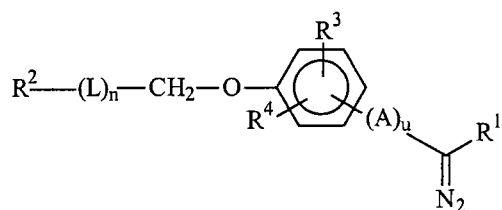
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,

- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭,

u 是 0-2 之间的整数, 优选等于 0 或 1, 和

- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基。

有利地是, 根据第一个实施方案的第三个变化, 所述对温度稳定的试剂如式 (23) 所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,

- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,

- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭,

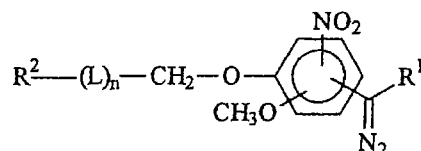
u 是 0-2 之间的整数, 优选等于 0 或 1, 和

- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 ,

R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基。

在上述结构式(0)-(4)和(21)-(23)中, R³和R⁴分别表示:H, NO₂, OCH₃, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R²是有利的。

因此, 按照如第二个实施方案的第三个变化(式(4))优选地化合物如式(4')所示:

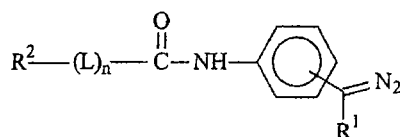


其中:

- R¹表示H或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R²表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记, 和

- L是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n是等于0或1的整数。

类似地, 优选地如第二个实施方案的第一个变化(式(2))所述的化合物如式(2')所示:



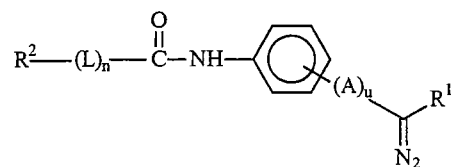
其中:

- R¹表示H或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R²表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记, 和

- L是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n是等于0或1的整数。

有利地是, 在式(2')中, 带有重氮甲基官能团的取代基在邻位或间位。

类似地, 按照第一个实施方案的第一个变化(式(21))优选地化合物如式(24)所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记, 和
 - A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭, u 是 0-2 之间的整数, 优选等于 0 或 1。

表述“多聚体结构”是指由化学或生物合成子的重复单位形成的聚合物。一个例子如下面实施例 34.2 所述。许多可用于本发明的这种结构的变体是已知的, 例如:

- 线性聚合物 (EP-A-0, 561, 722, EP-A-0, 669, 991),
- 支链聚合物 (WO-A-01/92361)。
- 颗粒 (EP-A-0 827 552),
- 树状聚体 (dendrimer) (US-A-4, 507, 466; US-A-4, 568, 737; US-A-6, 083, 708),
- 多核苷酸, 和
- 多肽。

表述“可检测标记”是指至少一种能够直接或间接产生可检测信号的标记。这些标记的非限制性例子有:

- 产生例如可通过比色法、荧光、发光检测的信号酶的酶, 如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,
- 生色团, 如荧光、发光或着色化合物,
- 具有电子密度的基团, 所述电子密度可通过电子显微镜检测, 或通过其电学特性, 如电导率、电流分析、电量法、阻抗检测,
- 可检测基团, 例如, 其分子大小足以使其物理和/或化学特性产生可检测的修饰, 这种检测可通过光学方法如衍射、表面胞质基因组共振、表面变异、接触角变化进行, 或通过物理方法如原子力光谱、隧道效应进行,
- 放射性分子, 如 ^{32}P , ^{35}S 或 ^{125}I 。

优选地, 所述标记不是放射性标记以避免表面与这些标记有关的安全问题。

在本发明一个特别的实施方案中, 所述标记可通过电化学方法检测, 特别地, 所述标记是铁络合物如二茂铁的衍生物。

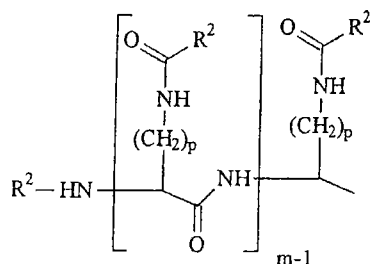
也可使用间接系统, 如, 例如能够和抗配体反应的配体。所述配体/抗配体对是精通此领域的技术人员熟知的, 例如, 有以下的对: 生物素/链霉抗生物素蛋白, 半抗原/抗体, 抗原/抗体, 肽/抗体, 糖/凝集素, 多核苷酸/多核苷酸的互补链。

在此情况中，它是带有重氮甲基反应官能团的配体。所述抗配体可通过上述标记直接检测，或者其自身可通过其它配体/抗配体对检测。这种叠加系统(stacking system)在实施例中的例举。

间接系统的另一个例子利用了配体和抗配体之间的特定的共价键，例如甲基酮和烷氧基胺。这种系统的例子描述在专利申请 WO-A-00/40590 和 WO-A-98/05766 中。某些情况下，这些间接检测系统会导致信号放大，如可参看在先专利申请 WO-A-00/07982, WO-A-01/92361 和 WO-A-95/08000 以了解用聚合物进行化学放大的例子，或参阅专利申请 WO-A-01/44506 以了解叠加化学放大系统(stacking chemical amplification system)。

在信号放大的特别实施方案中，标记试剂上至少有两个标记。

特别地，可按照本发明进行信号放大的试剂有以下式(5)的 $R^2-(L)_n$ -结构：

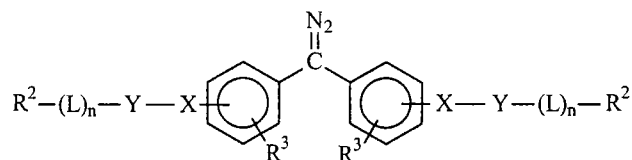


其中：

- R^2 表示可检测标记，
- m 是 1-100 之间的整数，优选 1-20 之间，和
- p 是 1-10 之间的整数，优选 2-6 之间，最优选是 4。

采用结构 $R^2-(L)_n$ 与采用上述式(0)-(4)和(21)-(23)没有差别。

另一个优选地用于信号放大的标记试剂如式(6)所示：



其中：

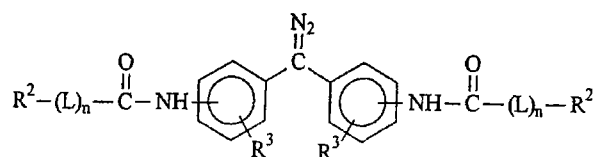
• R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，

• R^3 表示 H, NO_2 , Cl, Br, F, I, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基，

• L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂， n 是等于 0 或 1 的整数，和

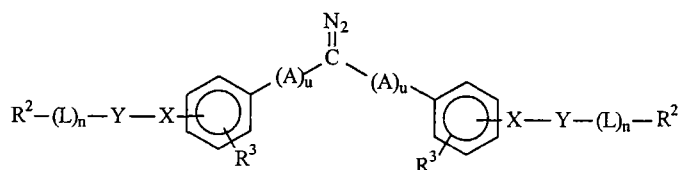
- $-Y-X-$ 表示 $-CONH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$ 。

有利地是，用于信号放大的试剂如式(7)所示



其中：

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，
- R^3 表示 H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基, 优选 R^3 表示 H, NO_2 , OCH_3 , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ 或 $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, 和
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数。再一个优选地用于信号放大的标记试剂如式(25)所示：



其中：

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，
- R^3 表示 H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基，
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数，
- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭, u 是等于 1, 和
- $-Y-X-$ 表示 $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$ 。

在本发明优选地实施方案中，所述示踪剂是低位阻的荧光化合物，如荧光素，丹酰，IR 类型的生色团(Li-COR Inc., Lincoln NE, USA)，花青衍生物如 Cy5 和 Cy3(Randolph J.B. 等, Nucleic Acid Res., 25(14), 2923-2929 页, 1997)，尤其是 Cy5 衍生物，或者所述示踪剂是低位阻的半抗原，如生物素或枞烯(abietane)衍生物(参见申请 WO-A-00/07982)。术语低位阻是指分子量小于 1000 g/mol。

就荧光团而论，优选使用激发波长大于 450nm 的荧光团，优选大于 600 nm。

如果所述示踪剂是不会通过其自身产生信号的半抗原,如生物素,则检测是通过识别如上述标记的抗配体进行的。在与荧光化合物如荧光素偶合的生物素、链霉抗生物素蛋白或抗-生物素抗体的情况下,则优选使用 Cy5 或藻红蛋白。就枞烯而论,则可使用专利申请 WO-A-00/07982 所述的单克隆抗体。

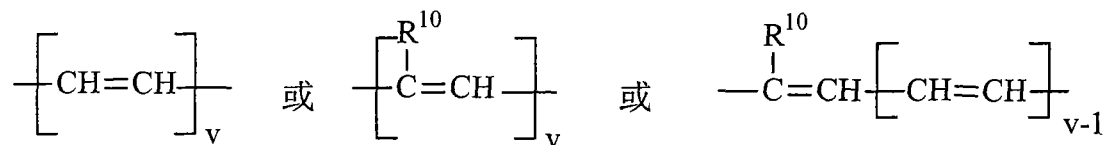
特别地,本发明的标记试剂溶于极性溶剂如 DMF, DMSO, CH₃CN, THF, DMA(二甲基乙酰胺), NMP(N-甲基吡咯酮), DME(二甲氧基乙烷)。

优选地,所述标记试剂溶于 DMSO 或水。

表述水-可混溶的溶剂是指可与体积比至少为 5%的水或含有盐的含水缓冲液混溶的溶剂。

有利地是,在上式中,臂 L 包含乙二醇或聚乙二醇基元(motif)以增加试剂在水中的溶解度。

A 是包含至少一个乙烯型的双键的连接臂,它能使重氮甲基官能团和芳环共轭。连接臂 A 的作用是将重氮甲基官能团与该环隔离以降低位阻,从而保持重氮甲基官能团的稳定性。表述“共轭”是指芳环上的电子沿着连接臂 A 的碳链离域。例如,臂 A 可有以下结构:



其中:

- v 是 1-10 之间的整数,优选 v 是 1 或 2, 和
- R¹⁰ 是 H 或烷基,优选 R¹⁰ 是 H, 甲基或乙基。

因此,这些试剂可结合在生物分子的均匀相中,所述均匀相主要包括含水溶液,即含有至少 50%的水。

表述“生物分子”是指含有至少一个能够与感兴趣的靶生物分子反应的识别位点的化合物。生物分子的例子有核酸、抗原、抗体、多肽、蛋白质和半抗原。

术语“核酸”是指一系列至少有两个脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,它任选含有至少一个经修饰的核苷酸,如至少一个含有经修饰的碱基、如肌苷、5-甲基脱氧胞苷、5-二甲基氨基脱氧尿苷、脱氧尿苷、2、6-二氨基嘌呤、5-溴脱氧尿苷、或其它经修饰的可进行杂交的碱基的核苷酸。也可在核苷酸间连键水平如硫代磷酸, H-磷酸, 烷基磷酸; 主链水平如 α-寡核苷酸(FR 2 607 507)或 PNAs(M. Egholm 等, J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992)或 2'-O-烷基核糖上修饰这种多核苷酸。所述核酸可以是天然或合成的寡核苷酸、多核苷酸、核酸片段、核糖体 RNA、信使

RNA、转移 RNA，用酶扩增技术获得的核酸，如：

- PCR(聚合酶链式反应)，描述在专利 US-A-4, 683, 195, US-A-4, 683, 202 和 US-A-4, 800, 159 中，及其 RT-PCR(逆转录 PCR)衍生物，尤其是如专利 EP-B-0, 569, 272 所述的一步模式，
- LCR(连接酶链式反应)，描述在如专利申请 EP-A-0, 201, 184 中，
- RCR(修复链式反应)，描述在专利申请 WO-A-90/01069，
- 3SR(自动维持序列复制)，见专利申请 WO-A-90/06995，
- NASBA(基于核酸序列的扩增)，见专利申请 WO-A-91/02818，和
- TMA(转录介导的扩增)，见专利 US-A-5, 399, 491。

因此，术语扩增子被用来定义用酶扩增技术产生的核酸。

这些修饰可以相互结合，只要核酸中至少有一个磷酸。

表述“多肽”是指一系列至少两个氨基酸。

表述“氨基酸”是指：

- 编码蛋白质的一级氨基酸，
- 酶作用后产生的氨基酸，如反-4-羟脯氨酸，
- 天然的但不存在于蛋白质中的氨基酸，如正缬氨酸，N-甲基-L-亮氨酸，staline(参见 Hunt S.，《氨基酸的化学和生物化学》(Chemistry 和 Biochemistry of the amino acids), Barrett G. C. 编，Chapman 和 Hall, London, 1985)，和
- 用化学官能团保护的氨基酸，所述官能团可用于在固相支持物或在液相中合成，以及非天然的氨基酸。

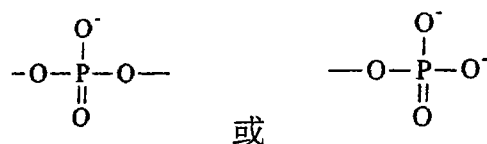
术语“半抗原”是指非免疫原性化合物，即其自身无法通过产生抗体促进免疫反应，但能够通过已知条件下免疫动物，尤其是用半抗原-蛋白质共轭物进行免疫而得到的抗体识别的化合物。这些化合物的分子量通常小于 3000 Da，更多情况下小于 2000 Da，例如，可以是糖基化的肽、代谢物、维生素、激素、前列腺、毒素或各种药物、核苷和核苷酸。

术语“抗体”包括多克隆或单克隆抗体，通过遗传重组获得的抗体以及抗体片段，如 Fab 或 F(ab')₂ 片段。

术语“抗原”是指能够产生抗体的化合物。

术语“蛋白质”包括全蛋白质和杂蛋白，如核蛋白、脂蛋白、磷蛋白、金属蛋白和糖蛋白，纤维状或球状的，以其特有的构象形式。

有利地是，所述生物分子含有磷酸基团，即至少具有以下一种基元的基团：

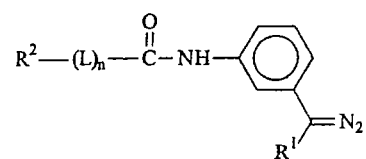


它可以天然存在于生物分子中，或者可通过化学修饰或酶修饰将其引入生物分子。化学修饰蛋白质的例子表示在《蛋白质共轭和交联的化学》（“Chemistry of protein conjugation and cross linking”），S. S. Wong, CRC Press, 1991。

优选地，所述生物分子是核酸。

本发明的一些有利的试剂是：

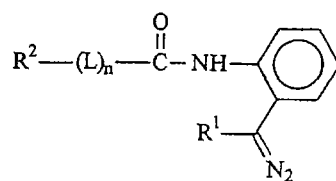
a) 式(8)的试剂：



其中：

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基，
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，
- L 是含有至少两个共价键的线性连续的连接臂，和
- n 是等于 0 或 1 的整数。

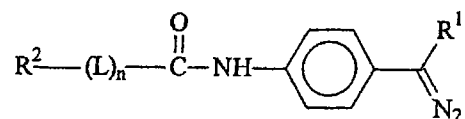
b) 式(9)的试剂：



其中：

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基，
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，
- L 是含有至少两个共价键的线性连续的连接臂，和
- n 等于 0 或 1 的整数。

c) 式(10)的试剂：



其中:

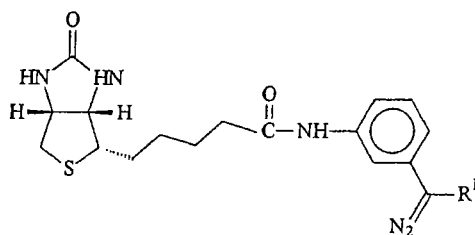
- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基,
- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起

的可检测标记,

- L 是含有至少两个共价键的线性连续的连接臂, 和
- n 等于 0 或 1 的整数。

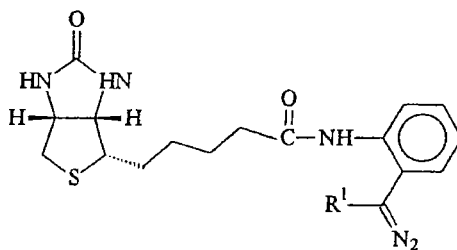
优选地, 所述标记试剂有以下结构:

a) 式(11):



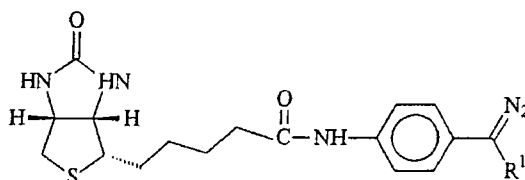
其中 R^1 表示甲基或苯基,

b) 式(12):



其中 R^1 表示甲基或苯基,

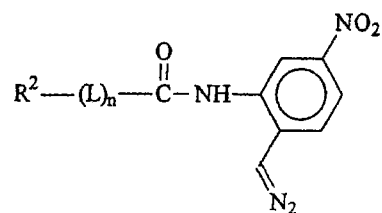
c) 式(13):



其中 R^1 表示甲基或苯基。

本发明其它优选地试剂具有以下结构:

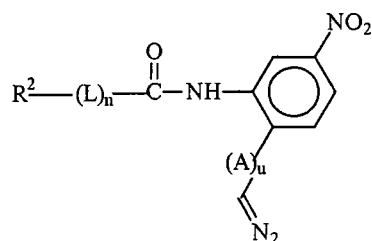
a) 式(14):



其中:

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是含有至少两个共价键的线性连续的连接臂, 和
- n 等于 0 或 1 的整数,

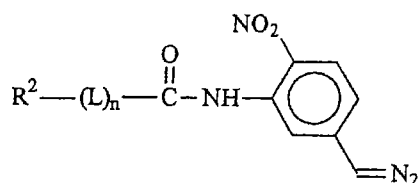
b) 式 (26):



其中:

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭, u 是等于 1, 和
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数。

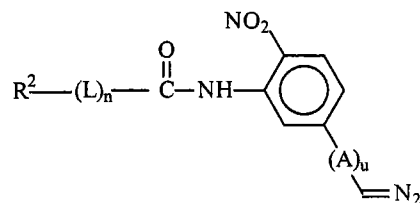
c) 式 (15):



其中:

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是含有至少两个共价键的线性连续的连接臂, 和
- n 是等于 0 或 1 的整数。

d) 式 (27):



其中：

- R^2 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记，

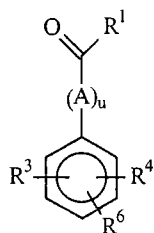
- A 是包含至少一个共价双键的连接臂，它能使重氮官能团和芳环共轭， u 是等于 1，和

- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂， n 是等于 0 或 1 的整数。

不考虑试剂的变体或实施例，L 可包含单元 $-(O-CH_2-CH_2)-$ ，该单元重复 1-20 次，优选重复 1-10 次，更优选重复 2-5 次。

本发明的另一个目的是描述用来合成一种标记试剂以及几种标记试剂的方法，这些试剂对温度稳定，且能够用所述方法获得，该方法包括以下步骤：

a) 得到式 (16a) 的衍生物：



其中：

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基，

- R^3 和 R^4 分别表示：H, NO_2 , Cl, Br, F, I, R^6 , OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR，其中 R = 烷基或芳基，

- R^6 表示 COOH, COOM, NH_2 , OH 或 SH, M = 烷基，尤其是甲基或乙基，和

- A 是包含至少一个共价双键的连接臂，它能使重氮官能团和芳环共轭， u 是等于 0 或 1 的整数，

b) 得到具有与 R^6 互补的反应官能团 R^7 的标记或标记前体，

c) 在至少一种偶联剂存在时，使所述标记或标记前体的互补官能团与式 (16a) 的衍生物的官能团 R^6 反应以形成共价键，

d) 使肼或肼衍生物与酮或醛官能团反应以形成腙，和

e) 用合适的方法将腙转化成重氮甲基官能团。

如果官能团 R^6 是 COOH 或 COOM，互补官能团 R^7 是 NH_2 。

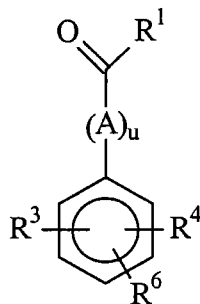
如果官能团 R^6 是 NH_2 , 互补官能团 R^7 是 COOH 。

如果官能团 R^6 是 OH , 互补官能团 R^7 选自: 烷基卤, 磺酸盐, 甲苯磺酸盐。

如果官能团 R^6 是 SH , 互补官能团 R^7 选自: 烷基卤, 马来酰亚胺。

所述合成方法的一个变体包括以下步骤:

a) 得到式 (16a) 的衍生物:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, R^6 , OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , 其中 R = 烷基或芳基,
- R^6 表示 COOH , COOM , NH_2 , OH 或 SH, 其中 M = 烷基, 尤其是甲基或乙基, 和
- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭, u 是等于 0 或 1 的整数,

b) 得到具有至少两个相同或不同的反应官能团 R^8 的连接臂 L, 第一个官能团 R^8 与 R^6 互补, 第二个官能团 R^8 与 R^7 互补, 此外, 得到具有反应官能团 R^7 的标记或标记前体,

c) 在至少一种偶联剂存在时, 使连接臂 L 的第一个反应官能团 R^8 与式 (16a) 的衍生物反应以形成共价键, 然后在至少一种偶联剂存在时, 使连接臂 L 的第二个反应官能团 R^8 与标记或标记前体反应以形成共价键,

d) 使肼或肼衍生物与酮或醛官能团反应以形成脎, 和

e) 用合适的方法将脎转化成重氮甲基官能团。

在这个特例中, 所述方法包括一个额外步骤, 该步骤中, 连接臂 L 是在与标记或标记前体反应之前加到化合物 (16a) 上的。此时, 连接臂 L 至少带有与 R^6 互补的第一个反应官能团 R^8 , 以与化合物 (16a) 的臂 L 偶合, 和至少带有第二个官能团 R^8 , 以使标记或标记前体与连接臂 L 偶合, 根据偶合策略和化合物 (16a) 和标记或标记前体各自携带的反应官能团 R^6 和 R^7 , 臂 L 所带的两个官能团可以是相同或不同的。

如果官能团 R^6 和/或官能团 R^7 是 COOH 或 COOM , 则第一个和/或第二个互补官能

团 R⁸ 是 NH₂。

如果官能团 R⁶ 和/或官能团 R⁷ 是 NH₂，则第一个和/或第二个互补官能团 R⁸ 是 COOH。

如果官能团 R⁶ 和/或官能团 R⁷ 是 OH，则第一个和/或第二个互补官能团 R⁸ 独立选自：烷基卤、磺酸盐、甲苯磺酸盐。

如果官能团 R⁶ 和/或官能团 R⁷ 是 SH，则第一个和/或第二个互补官能团 R⁸ 独立选自：烷基卤、马来酰亚胺。

如果 R⁶ 是 OH 或 SH，则所述偶联剂是碱，如氢氧化钾或碳酸钾或有机碱。

如果 R⁶ 是 COOH 或 NH₂，则偶联剂选自，例如用于肽合成的偶联剂。可参考 M. Bodansky 的《肽化学—实用教科书》“Peptide Chemistry, a practical textbook”，Springer Verlag 出版，柏林，1988，第 5 章，55-73 页。

表述“胍衍生物”是指具有 NH₂-NH-官能团的分子。这种衍生物的例子有甲苯磺酰胍。

胍到重氮甲基的转化是用常规方法进行的，尤其是用 MnO₂ 氧化。

其它可用的方法如 X. Creary, 《有机合成》(Organic Syntheses), Wiley: 纽约, Coll. 第 7 卷, 438-443 页, 1990; H. Zollinger, 《重氮基化学 II》(Diazo Chemistry II), VCH, Weinheim, 34-47 页, 1995; T. L. Holton 和 H. Shechter, J. Org. Chem., 60, 4725-4729, 1995 所述。

就使用甲苯磺酰胍衍生物而论，该方法描述在 X. Creary, 《有机合成》(Organic Synthesis); Wiley: 纽约, Coll. 第 7 卷, 438-443 页, 1990。

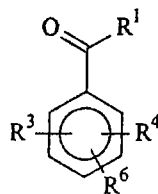
在任何方法的一个特别实施例中，所述方法包括：

- 保护化合物(16a)的酮或醛官能团的额外步骤(如果 R¹ 是 H)，和
- 将所述酮或醛官能团去保护的额外的后续步骤。

例如，这种保护是用缩醛基团实现的。去保护是通过合适的方法进行的，如对缩醛基团可在酸性介质中进行。精通此领域的技术人员可根据化合物确定在合成的那个阶段进行保护和去保护步骤。

根据本发明的另一个实施方案，描述了合成一种和几种标记试剂的方法，所述标记试剂对温度稳定，且能够用所述方法获得，该方法包括以下步骤：

a) 得到式(16)的衍生物：



其中:

- R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, R^6 , OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , 其中 R = 烷基或芳基, 和
- R^6 表示 COOH , NH_2 , OH 或 SH。

b) 得到具有与 R^6 互补的反应官能团 R^7 的标记或标记前体,

c) 在至少一种偶联剂存在时, 使所述标记或标记前体的互补官能团与式 (16a) 的衍生物的官能团 R^6 反应以形成共价键,

d) 使胼或它的一个衍生物与酮或醛官能团反应以形成脎, 和

e) 用合适的方法将脎转化成重氮甲基官能团。

如果官能团 R^6 是 COOH , 则互补官能团 R^7 是 NH_2 。

如果官能团 R^6 是 NH_2 , 则互补官能团 R^7 是 COOH 。

如果官能团 R^6 是 OH, 则互补官能团 R^7 选自: 烷基卤、磺酸盐、甲苯磺酸盐。

如果官能团 R^6 是 SH, 则互补官能团 R^7 选自: 烷基卤, 马来酰亚胺。

如果 R^6 是 OH 或 SH, 则偶联剂是碱, 如氢氧化钾或碳酸钾。

如果 R^6 是 COOH 或 NH_2 , 则偶联剂选自, 例如用于肽合成的偶联剂。可参考 M. Bodansky 的《肽化学—实用教科书》, Springer Verlag 出版, 柏林, 1988, 第 5 章, 55-73 页。

表述“胼衍生物”是指具有 $\text{NH}_2\text{-NH-}$ 官能团的分子。这种衍生物的例子有甲苯磺酰胼。

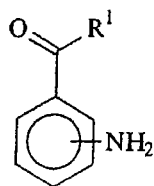
脎到重氮甲基的转化是用常规方法进行的, 尤其是用 MnO_2 氧化。

其它可用的方法如 X. Creary, 《有机合成, Wiley: 纽约, Coll. 第 7 卷, 438-443 页, 1990; H. Zollinger, 《重氮基化学 II》, VCH, Weinheim, 34-47 页, 1995; T. L. Holton 和 H. Shechter, J. Org. Chem., 60, 4725-4729, 1995 所述。

就使用甲苯磺酰胼衍生物而论, 该方法描述在 X. Creary, 《有机合成》Wiley: 纽约, Coll. 第 7 卷, 438-443 页, 1990。

本发明优选地方法包括以下步骤:

a) 得到式 (17) 的衍生物:



其中 R^1 表示 H 或烷基或芳基或取代的芳基，

b) 得到具有羧酸官能团的标记或标记前体，

c) 在至少一种偶联剂存在时，使所述标记或标记前体的羧基官能团与式(17)的衍生物的伯胺官能团反应以形成酰胺键，

d) 使肼与式(17)的衍生物的酮或醛官能团反应以形成脎，和

e) 在 MnO_2 存在时将所述脎氧化成重氮甲基官能团。

在所有上述方法中，有利地是，烷基是直链或支链 C_1-C_4 基团，芳基是任选取代的苯基。

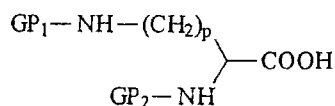
优选地， R^1 是甲基或苯基，这就是说，式(17)的衍生物是在邻、间或对位被胺取代的乙酰苯或二苯甲酮。

根据所需的最终产物，衍生物(17)的胺官能团位于邻、间或对位，优选在邻位或间位。

如上所述，所述偶联剂特别选自用于肽合成的偶联剂，例如，当碱如 N-甲基吗啉存在时为 $iBuOCOC1$ 。

表述“标记前体”是指至少有一个被任选保护的反应官能团的化合物，所述反应官能团不同于重氮甲基官能团且与所述随后可被附上标记的官能团相容，即在该方法的任一步骤后尤其是在 MnO_2 的氧化步骤之前。特别地，所述标记前体可包含连接臂 L。下面给出了在信号放大中使用标记前体的方法，但采用精通此领域的技术人员熟知的各种保护基团其它变体是可能的。

就是信号放大而论，合成方法是类似的。所述标记前体具有下式(18)所示的结构。



其中， GP_1 和 GP_2 表示两个保护胺官能团的基团，它们是相同或不同的，且 p 是 1-10 之间的整数，优选 2-6，最好是 4。有利地是， GP_1 和 GP_2 是不同的以便能加入一些基元，解释如下。

可用于本发明的保护基团 GP_1 或 GP_2 的例子表示在 T. W. Greene 和 P. G. M. Wuts, 《有机合成中的保护基团》(Protective Groups in Organic Synthesis), 第二

版, John Wiley 和 Sons, 纽约, 1991, 优选通常用于肽合成的那些, 如 Boc (叔-丁氧基羰基), Fmoc (9-苄基亚甲氧基羰基), Cbz (羧苄基) 或 Alloc (烯丙氧基羰基)。

特别地, GP1 和 GP2 分别是保护基团 Boc 和 Fmoc。

这种是有羧基官能团的前体和式 (17) 的衍生物之间的反应是在偶联剂存在下进行的以形成酰胺键。在常规条件下将这两个保护基团之一去保护后, 例如用碱如哌啶将 Fmoc 去保护, 释放的胺官能团被用来偶合另一个式 (18) 的分子。如必要该过程被重复多次以得到多个被保护基团 (如 Boc 官能团) 保护的 NH₂ 官能团。加入的基元在 1 和 100 之间, 优选在 1-20 之间。

使胍与苯基酮衍生物的酮官能团反应以形成脎, 然后在 MnO₂ 存在时将其氧化以形成重氮甲基残基。然后, 将带有 Boc 基团的胺官能团去保护后, 将示踪剂, 如用 N-羟基琥珀酰亚胺基活化的生物素, 与胺官能团偶合以得到具有如式 (5) 所示单元 R²-(L)_n-的试剂。

本发明的另一个目的是描述标记生物分子, 尤其是核酸的方法, 以及用该方法获得的产物, 所述方法包括使生物分子和本发明的标记试剂在基本上为含水均匀溶液的溶液中接触。

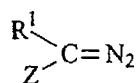
表述“基本上为含水溶液”是指至少含 50% 水的溶液。该溶液优选含有像缓冲溶液那样的盐。

表述“均匀溶液”是指单相溶液, 如水/DMSO 溶液, 而不是两相溶液, 如水/氯仿溶液。

标记反应的特定条件根据生物分子和标记而不同。就核酸而言, 则 pH 在 5-8 之间可有效进行标记。特别地, pH 在 5.5-7.0 之间对本发明的所有试剂都是优选地。用式 (11) 的试剂, 则标记的 pH 范围就较宽。对该试剂, pH 在 3-8 之间就足以得到良好的标记。

特别地, 标记和片段化单链或双链核酸的方法包括以任何次序的以下步骤:

- 将所述核酸片段化,
- 通过选自式 (19) 的化合物将一个标记附到至少一个片段上:



其中:

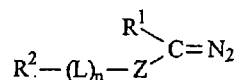
- R¹ 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基, 和
- Z 包括一个可检测标记,

所述试剂主要和所述片段的至少一个磷酸共价偶合。

选择根 Z 和/或 R¹ 以稳定重氮甲基官能团, 这就是说 Z 或 R¹ 这两个基团中至少有一个具有苯基核。

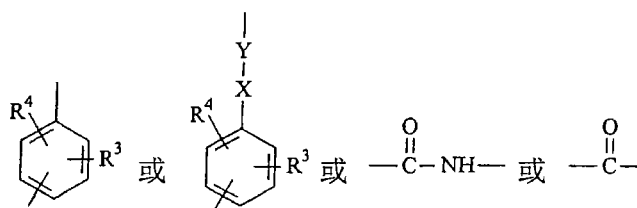
标记试剂和核酸之间的键是共价的, 但前面已描述过, 尤其在叠加系统或者在标记是间接可检测的情况下可使用非共价相互作用。因此, 术语“附着”包括这些不同的可能性。

优选地, 所述标记试剂选自式(20)的化合物:



其中:

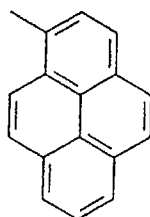
- R¹ 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R² 表示一个可检测标记或至少两个通过至少一个多聚体结构连在一起的可检测标记,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数, 和
- Z 选自:



其中:

- R³ 和 R⁴ 分别表示: H, NO₂, Cl, Br, F, I, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基, 和
- -Y-X- 表示 -CONH-, -NHCO-, -CH₂O-, -CH₂S-。

在按照式(19)的特定实施方案中, Z 具有以下结构:



此时, 如果 R¹ 是 H, 标记试剂是 1-苾基重氮甲烷 (PDAM)。

尽管这种标记是荧光的, 其激发波长与核酸的激发波长很接近。用直接抗苾基元的单克隆抗体进行间接检测是优选地。产生这种抗体的方法是精通此领域的技术人员熟知的(参见, 如专利申请 WO-A-00/07982)。

本发明的其它新型试剂由式(1)-(27)描述,能够用本发明的合成方法获得的试剂也是优选地用于上述片段化和标记方法的试剂。

所述标记和片段化方法特别适用于被标记的核酸要与许多核酸,尤其是寡核苷酸杂交的情况,所述核酸附着在固相支持物的预定位置上以形成 DNA 芯片。表述“DNA 芯片”是指小的固相支持物,其上在预定的位置上附有许多捕获探针。实际上,附到固相支持物上的核酸的密度在杂交时可造成高的空间约束,且所述片段化可改进这种杂交步骤。这些 DNA 芯片的例子表示在以下出版物中,例如, G. Ramsay, *Nature Biotechnology*, 16, 40-44 页, 1998; F. Ginot, *Human Mutation*, 10, 1-10 页 1997; J. Cheng 等, *Molecular diagnosis*, 1(3), 183-200 页, 1996; T. Livache 等, *Nucleic Acid Research*, 22(15), 2915-2921 页, 1994; J. Cheng 等, *Nature Biotechnology*, 16, 541-546 页, 1998。

所述片段化和标记是在一个步骤或在两个步骤中进行的,且标记可在片段化之前、之后或与其同时进行。

优选地,标记和片段化是同时进行的,即这两个步骤必需的试剂和,例如核酸,被同时放在基本上含水的均匀溶液中。尤其是在化学或酶片段化的情况下。在用物理方法进行机械片段化时,标记和片段化可同时进行,意指物理方法被同时用于至少含有核酸和标记试剂的基本上含水的均匀溶液。

核酸的片段化是用酶、化学或物理途径进行的。

例如,通过酶途径片段化核酸是通过核酸酶进行的。

例如,通过物理途径片段化核酸是通过超声处理法或放射法进行的。

如果核酸是 RNA,通过化学途径片段化是通过常规的方法进行的(参见,如 Oivanen M. 等, *Chem. Rev.*, 98, 961-990, 1998)。

G. Pratviel 等在 *Adv. Org. Chem.*, 45, 251-312 页, 1998 或 G. Pratviel 等在 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 746-769 页, 1995 综述中描述了金属络合物可用于 DNA 或 RNA 的片段化。

在第一个实施方案中, RNA 的化学片段化是用组合的金属阳离子或用化学催化剂进行的。此时,金属阳离子是 Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ru^{3+} , Ce^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} 或 Lu^{3+} 离子,化学催化剂包括咪唑,或取代的类似物,如 N-甲基咪唑,或任何与 RNA 亲合的化学分子且带有咪唑核或取代的类似物。采用金属的片段化条件描述在专利申请 WO-A-99/65926 中。有利地是,金属是 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Tb^{3+} 或 Ce^{3+} , 优选 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} 。

用浓度在 2-100mM 之间的金属阳离子如 Mn^{++} , 浓度在 2-100mM 之间的咪唑可得

到有效的片段化条件。

用浓度在 3-15mM 之间的金属阳离子如 Mn^{++} 和浓度在 20-50mM 之间, 尤其是 30mM 的咪唑可得到特别有效的片段化条件。

反应 pH 应在 5 和 8 之间。有利地是, pH 在 5.5 和 6.5 之间, 优选 pH 为 6。因此, pH 为 6 对用 RNA 进行标记和片段化非常有利(参见上面对标记的讨论)。

在第二个实施方案中, RNA 的化学片段化是通过聚胺如精胺、腐胺或尸胺的作用进行的。浓度为 5-100mM 可进行片段化。后者完全来自 10 mM 聚胺。

在第三个实施方案中, RNA 的化学片段化是通过人工核酸酶的作用进行的(参见 G.Pratviel 等, *Adv. Inorg. Chem.*, 45, 251-312 页, 1998; D.S.Sigman 等 *Chem. Rev.*, 93, 2295-2316 页, 1993), 如和金属阳离子如铁、铜或锌结合的 1, 10-菲咯啉。这些阳离子分别获自 $FeSO_4$ 或 $CuCl_2$ 或 $ZnCl_2$ 溶液。浓度在 2-50 mM 之间, 尤其是 4-10mM 之间的 1, 10-菲咯啉被用于 RNA 的片段化。

通过化学途径片段化 DNA 是通过使核酸与产生脱碱基位点的化学方法接触的。脱碱基位点的形成来自连接 2-脱氧核糖和核碱基的 N-糖苷键的切割。它包括对嘌呤(鸟嘌呤, 腺嘌呤)损失的或对嘧啶(胞嘧啶, 胸腺嘧啶)的脱嘧啶作用。

这种脱嘌呤作用是在生理条件(pH 7.4, 37°C)下自发产生的, 但反应速度非常低, 为每秒 3×10^{-11} 脱嘌呤作用, 即不足以进行片段化。为增加反应速度, 使用了烷基化剂, 它使 N-糖苷键脆弱, 或使用酶如 DNA 糖基化酶, 尤其是尿嘧啶 DNA 糖基化酶。

通过脱嘌呤或脱嘧啶作用获得的脱碱基位点很不稳定。室温下, 在碱性介质中获得了在这一位点水平上的片段化。在酸性介质中, 高温也可加速这种片段化。用能够引发 β -消除现象的分子也能加速片段化。

片段化的优选实施例是用酸性 pH 获得的, 即 pH 小于 5。优选地 pH 是 3。

pH3 的甲酸钠缓冲液可有效片段化本发明的片段。这种缓冲液适合于一步标记条件, 这将在实施例中证实。更加有利的是, 可用酸性介质(HCl, 碳酸盐, H_2SO_4)。

在本发明特别地实施方案中, 出于进一步提高片段化的目的, 所述脱氧核糖核酸含有至少一个经修饰的更易于产生脱碱基位点的碱基。

可使用各种经修饰的碱基、如 N7-烷基嘌呤、N3-烷基嘌呤、O6-烷基嘌呤、8-溴代嘌呤、8-硫代嘌呤、8-烷基硫代嘌呤、8-叠氮嘌呤或 8-烷基磺酰嘌呤。

当要标记的核酸是通过酶扩增技术如 PCR 产生时, 使用 8-溴代嘌呤可在扩增时进行有效的掺入, 相对而言, 这可简化本发明的片段化和标记的方法, 同时保持酶扩增步骤极好的敏感性。

本发明描述了标记的生物分子，尤其是能够用本发明任一方法获得的标记的核酸。

本发明还涉及用来检测生物分子，尤其是含有本发明标记试剂的靶核酸的试剂盒。根据试剂盒的应用，可在试剂盒中加入其它成分，如溶胞方法(微生物和/或细胞)和/或浓缩方法(如二氧化硅或磁性颗粒)和/或酶催化扩增方法。

本发明涉及如上定义的标记的生物分子，尤其是标记的核酸的应用，它被作为探针以检测靶生物分子，尤其是靶核酸。

本发明还涉及上述核酸的应用，它被作为可与捕获探针结合的标记的靶。

为检测和/或量化和/或纯化靶生物分子，所述标记的生物分子能够与靶生物分子形成复合物。例如，为检测核酸类型的靶分子，标记的核酸应与靶充分互补，以根据反应条件，尤其是温度或反应介质的盐度，进行特异地杂交。

出于研究和在制药工业中筛选药物、诊断传染性疾病或遗传疾病或食品或工业控制的目的，所述检测方法被用于测序、信使 RNA 表达序型分析或突变的筛选。

诊断领域，尤其是传染性疾病(例如 AIDS 或肺结核)的趋势是降低灵敏度水平以检测样品中的单个分子，血液或尿液或脑脊液类型的液体样品可以有几个毫升。只有当所有步骤，从取样到得出结果都是最优化的，才可得到此灵敏度水平。本发明的各种方法可以没有困难地实现这种最优化，因为本发明的试剂、方法和过程可广泛用于各种生物分子。特别地，当需要采用酶扩增步骤以得到必需的灵敏度时(病毒或细菌感染，如 HIV, HCV 或肺结核)，本发明所述的标记和/或片段化方法不会影响扩增技术的灵敏度，因为它不必替代酶扩增技术中所用的脱氧核糖核苷酸，或者因为掺入的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸不会改变灵敏度。

本发明所述的化学移植方法的特征在于其反应性和特异性，描述如下：

- 在第一个实施方案中，所述化学移植方法被用于核酸共价附着于固相支持物上。
- 在该方法的第一个变化中，重氮甲基官能团的前体，如上述酮或肼，在化学合成时被引入，且重氮甲基官能团在第二步中被引入核酸上。
- 在该方法第二个优选地变化中，重氮甲基官能团被引入所述固相支持物，且核酸通过核酸的磷酸，尤其是末端(5' 或 3')磷酸，附到固相支持物上。

在核酸的 3' 或 5' 端引入磷酸是熟知的(参见《寡核苷酸和类似物的方案、合成和特性》(“Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties”)由 S. Agrawal 出版, Humana Press, Totowa, New Jersey)。

在这种固相支持物的一个特实施例中，带有配体，尤其是半抗原如生物素或枞

烯的标记试剂被附到固相支持物上, 该固相支持物上已经共价附着或吸附了抗配体, 如链霉抗生物素蛋白或如抗体。这些固相支持物是精通此领域的技术人员熟知的, 且可在商业上获得(例如微量滴定平板-链霉抗生物素蛋白或乳胶-链霉抗生物素蛋白)。此时, 标记的作用不再是进行检测, 而且要使标记试剂附到固相支持物上。然后重氮甲基官能团就可与核酸反应。这种试剂的例子是式(11)、(12)、(13)的衍生物或 PDAM 衍生物, 它们可被用来制造这种固相支持物。可用单克隆抗体技术来制备抗大量标记如荧光素或 Cy5 的衍生物的抗体。利用制备固相支持物的间接模式, 不必太困难, 精通此领域的技术人员就可使用带有本发明标记试剂的固相支持物, 其中配体/抗配体反应被用来使重氮甲基官能团附到固相支持物上。

固相支持物的第二个实施方案涉及特殊的支持物如乳胶。可用不同的聚合反应模式从带有重氮甲基官能团或优选一个官能团的可聚合官能团单体制备带有重氮甲基官能团的颗粒, 优选一个官能团是在重氮甲基官能团的前体, 如醛或酮, 尤其是:

- 在间歇反应器中进行的聚合反应:在与其它成分反应开始之前将单体引入此反应器, 随后不必再加入。由于单体反应性差异, 该方法通常会导致成分漂变。产生成分与转化率函数大不相同的大分子可证明这一点。该方法对于在表面引入不是非常有效, 因为大部分功能性单体都有在颗粒内部或以水溶性聚合物形式流失的危险。当用具有极性性质的单体分批进行共聚反应时, 可得到较大量的小颗粒, 但转化率有限。这种行为与高水溶性单体有关, 并且是由于均相成核机制占优势造成的。

- 半连续聚合:至少部分单体是在反应开始和结束之间被引入反应器的。此添加可以固定速度或根据给定分布进行。目的是控制单体混合物的加入以得到有受控组成(控制界面的组成)的共聚物; 因此常有添加条件, 这样聚合反应的速度高于添加的速度。

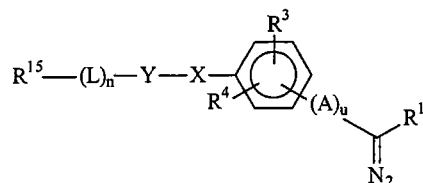
- 喷射加成聚合(Shot addition polymerization):一旦聚合反应在进行中, 或在碱性单体存在时, 只有功能性单体以受模的方式引入受控的系统。因此, 操作的成功取决于共聚动力学的现有知识。这是促进表面掺入的有效方法。实验条件(添加时的转化程度, 组成以及单体混合物的浓度)的选择能够使表面产率最优化。

- 接种聚合(Seed polymerization):它包括在含有乳胶的已经构成并完全定性的系统中加入功能性单体。所述功能性单体可单独加入或与作为种子的

碱性单体的混合物加入，加入可一步或半连续进行。

接种聚合、喷射加成聚合和半连续聚合技术是优选地，因为它们在表面最大限度地引入了带有重氮甲基官能团前体的衍生物。带有醛官能团的颗粒的例子如 B. Charleux 等, *Die Makromolekular Chem.*, 193, 187 页和 205 页, 1992 或在专利 EP-B-0, 350, 407 中所述。

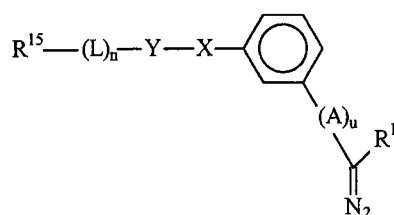
本发明的另一个目的是描述式 (30) 的对温度稳定的结合中间体:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^{15} 表示亲核或亲电子的反应官能团, 尤其是 COOH, NH_2 , SH, OH, O- NH_2 , 烷基酮, 醛, 异氰酸盐, 异硫氰酸盐, 马来酰亚胺, 烷基卤, 活化的酯, 甲苯磺酸盐,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,
- R^3 和 R^4 分别表示: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^{15}-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR, 其中 R = 烷基或芳基,
- A 是包含至少一个共价双键的连接臂, 它能使重氮官能团和芳环共轭, u 是等于 1, 和
- $-Y-X-$ 表示 $-CONH-$, $-NHCO-$, $-CH_2O-$, $-CH_2S-$ 。

本发明优选地结合中间体如式 (30a) 所示:



其中:

- R^1 表示 H 或烷基, 芳基或取代的芳基,
- R^{15} 表示亲核或亲电子的反应官能团, 尤其是 COOH, NH_2 , SH, OH, O- NH_2 , 烷基酮, 醛, 异氰酸盐, 异硫氰酸盐, 马来酰亚胺, 烷基卤, N-羟基琥珀酰亚胺酯, 甲苯磺酸盐,
- L 是包含至少两个共价键的线性连续的连接臂, n 是等于 0 或 1 的整数,

- A 是包含至少一个共价双键的连接臂，它能使重氮官能团和芳环共轭，u 是等于 1，和

- -Y-X-表示-CONH-，-NHCO-，-CH₂O-，-CH₂S-。

固相支持物的第三个实施方案包括得到带有第一亲核或亲电子反应官能团的固相支持物，如 NH₂，SH，OH，O-NH₂，烷基酮，醛，异氰酸盐，异硫氰酸盐，马来酰亚胺，烷基卤，N-羟基琥珀酰亚胺酯，甲苯磺酸盐，然后与上述式(30)或(30a)的结合中间体反应，其官能团 R¹⁵ 与固相支持物的第一反应官能团互补。固相支持物和结合中间体之间的反应任选发生在偶联剂存在时以形成共价键。

根据上述不同的实施方案，这种固相支持物至少含有重氮甲基官能团，尤其是间接附有本发明标记试剂的固相支持物，这也是本发明的一个主题，以及含有核酸的固相支持物，所述核酸通过重氮甲基官能团附到固相支持物上。

这种固相支持物的第一个应用是制造 DNA 芯片。已有固相支持物上不连续位置和预定位置分布核酸的方法。

专利 US-A-6, 110, 426 提出了用毛细管生产这些 DNA 芯片的方法，所述毛细管与固体表面接触以输送受控体积的液体。在毛细管末端和固相支持物之间发生有效接触，这样滴液就可由毛细管存放。同样，专利 US-A-6, 083, 763 描述了一套在装置中滑行的毛细管以补偿其高度的差异。它们与由特定寡核苷酸的毛细管放置的平整表面接触。

专利 US-A-6, 083, 762 涉及分布滴液的系统，所述滴液含有与压电换能器偶联的微分配器，以将体积小于 1 纳升的滴液射到固体表面。对毛细管臂施加热源以形成喷射出预定体积溶液的泡也可得到类似的结果(见 T. Okamoto 等, Nature Biotechnology, 18, 438-441 页, 2000)。

重氮甲基官能团可将核酸共价移植到支持物上。尤其与吸附相比，移植是简单的，连接是稳定的，且与末端磷酸有关的反应的选择性使得能够将核酸定向偶合到固相支持物上，这样就减小了位阻以利于随后的杂交步骤。

本发明固相支持物的第二个应用是核酸纯化。

就纯化而论，纯化是直接(带有重氮甲基官能团的固相支持物与待纯化的核酸反应)或间接的(将捕获的核酸附到固相支持物上。)。这些捕获的核酸与将被捕获以便以所需的特异性程度与其杂交的靶充分互补，且“捕获的核酸/固相支持物”复合物使靶核酸纯化。

固相支持物优选为分散形式以作为乳胶颗粒用于纯化，如磁性颗粒。

表述“纯化步骤”是指将微生物的核酸和在溶胞阶段释放的细胞组分分离，所述

溶胞发生在核酸纯化之前。这些溶胞阶段是熟知的。例如，作为指导可用专利申请中描述的溶胞方法：

- WO-A-00/60049，关于超声溶胞，
- WO-A-00/05338，关于磁性溶胞和机械溶胞相结合，
- WO-A-99/53304，关于电溶胞，以及
- WO-A-99/15621，关于机械溶胞。

精通此领域的技术人员能够用其它熟知的溶胞方法，如热休克或渗透休克 (osmotic shock) 或用离液剂如胍盐处理 (专利 US-A-5, 234, 809)。

这个步骤通常可浓缩核酸。例如，可用使用磁性颗粒 (见关于此主题的专利 US-A-4, 672, 040 和 US-A-5, 750, 338)，并通过洗涤步骤纯化核酸，所述核酸已经附到这些磁性颗粒上。如果还需要随后扩增所述核酸，这种纯化核酸的步骤特别有利。关于这些磁性颗粒的一个特别有利的实施方案描述在专利申请 WO-A-97/45202 和 WO-A-99/35500 中。

这里使用的术语“固相支持物”包括所有可附着核酸的物质。可将合成材料或天然材料任选地化学修饰，作为固相支持物，尤其是以多糖如纤维素为基质的材料，如纸、纤维素衍生物如醋酸纤维素和硝基纤维素或葡聚糖；聚合物，共聚物，尤其是基于苯乙烯型单体的，天然纤维如棉花，以及合成纤维如尼龙；无机物质，如二氧化硅、石英、玻璃、陶瓷；乳胶；磁性颗粒；金属衍生物，凝胶等。固相支持体的形式可以是微量滴定平板、膜、颗粒或用玻璃或硅或衍生物制成的基本上呈平面的板。

本发明最后涉及捕获核酸的方法，所述方法包括以下步骤：

- 得到其上直接或间接附有至少一种含有重氮甲基官能团的分子的固相支持物，
 - 将可能含有游离核酸的生物样品与其接触，和
 - 洗涤分子共价附着到至少一种核酸上的固相支持物。

在申请人于 2001 年 5 月 4 日提交的注册号为 FR01/06039 号的另一项专利申请以及与本发明同日提交的其国际延期申请中可找到其它信息。

附图简述

附图和实施例代表了特定的实施方案，而不是要限制本发明的范围。

图 1 表示本发明所用各种试剂的结构式及其缩写 (o-表示邻位，m-表示间位，p-表示对位)。

图 2A-2I 表示通过毛细管电泳分析得到的作为各种试剂的共价偶合与时间函数的分布图, 所述试剂在尿苷 3'-单磷酸(3'-UMP)上带有重氮甲基官能团, 如实施例 6.1 所述:

- 图 2A, PDAM,
- 图 2B, 2 毫摩每升(mM) DPDAM,
- 图 2C, 20 mM DPDAM,
- 图 2D, PMDAM,
- 图 2E, NPDAM,
- 图 2F, BioDPDAM,
- 图 2G, 间-BioPMDAM,
- 图 2H, 对-BioPMDAM,
- 图 2I, 邻-BioPMDAM。

图 3A-3D 表示通过毛细管电泳分析得到的作为时间的函数的间-BioPMDAM 与四种(4)核苷酸 3'-磷酸反应的分布图, 如实施例 6.2 所述:

- 图 3A, 核糖核苷酸序列中的 3'-CMP,
- 图 3B, 核糖核苷酸序列中的 3'-AMP,
- 图 3C, 核糖核苷酸序列中的 3'-GMP, 和
- 图 3D, 脱氧核糖核苷酸序列中的 3'-TMP。

图 4 表示通过毛细管电泳分析得到的作为时间函数的间-BioPMDAM 与二核苷酸 5'-ApUp 反应的分布图, 如实施例 6.3 所述。

图 5A-5D 表示间-BioPMDAM 试剂和四种(4)核糖核苷酸 3'-单磷酸间各种结合物的 D₂O 的质子 NMR 谱, 如实施例 6.4 所述:

- 图 5A, 3'-GMP,
- 图 5B, 3'-AMP,
- 图 5C, 3'-CMP, 和
- 图 5D, 3'-UMP。

图 6 表示合成标记试剂的流程, 所述标记试剂带有两种(2)生物素, 用于信号的化学放大。

图 7 表示酸介质中通过形成脱碱基位点的片段化机制。

图 8 显示, 根据实施例 16.1, 酸性 pH 时各种修饰的核苷, 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(4)天然核苷(dA, dC, dG 和 dT)的降解动力学。结果是以相对于以分钟表示的反应时间(x-轴), 起始核苷的百

分水解(y-轴)形式表示的。

图 9 表示, 根据实施例 19.2, 在 60°C, 作为时间函数的 PDAM 试剂对合成的寡脱氧核苷酸(ODN) 5'-磷酸的标记动力学。结果是以相对于以分钟(min)表示的反应时间(x-轴)的百分标记形式表示的。。

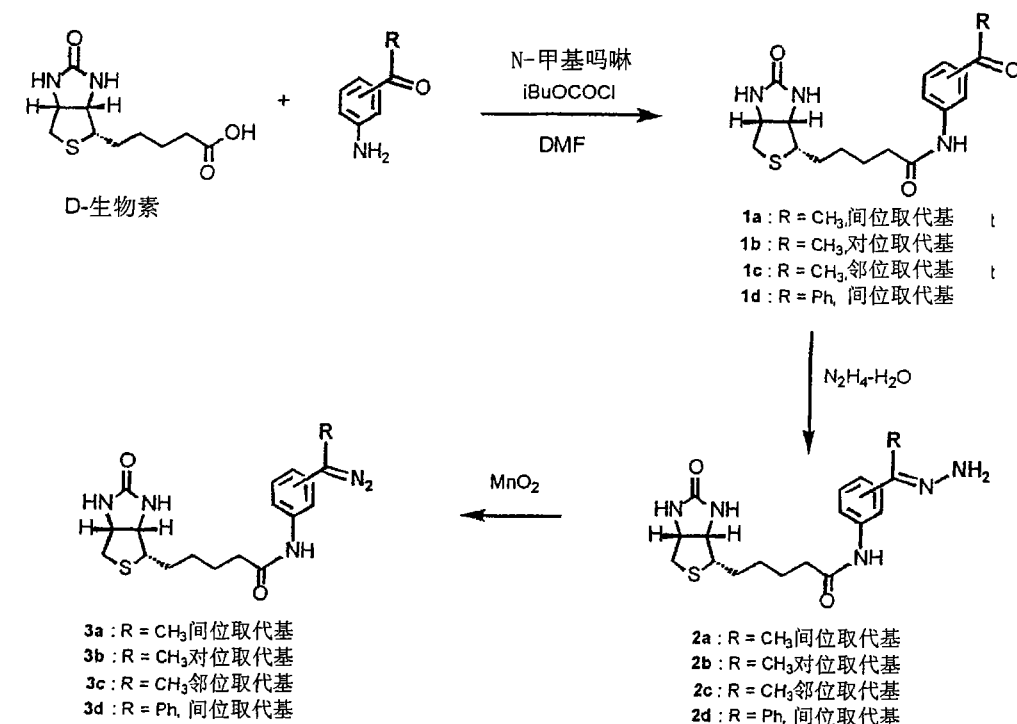
图 10 表示, 根据实施例 19.3, 作为反应温度函数的百分标记。结果如图 10 所示, y-轴表示百分标记, x-轴表示以°C的反应温度。

图 11 表示用商业试剂 5-硝基香草醛合成式(4')的试剂的途径。通过形成腈然后脎与 MnO₂ 氧化使醛官能团能得到重氮甲基官能团。

优选实施方案的描述

实施例 1: 用生物素合成试剂:

一般合成流程:



实施例 1.1: 间-BioPMDAM 的合成:

• 化合物生物素间-乙酰苯 1a:

将 D-生物素(1.0 克(g), 4.1 毫摩尔(mmol)溶于 45 毫升(ml)热的无水 DMF。将混合物在氩气下冷却至 0°C, 然后连续加入 N-甲基吗啉(590 微升(μl), 5.33 mmol)和异丁基氯甲酸酯(840 μl, 6.60 mmol)。将混合物搅拌 30 分钟(min), 然后加入溶于 10ml DMF 的 3-氨基乙酰苯(824 mg, 6.10 mmol)和 N-甲基吗啉(480 μl, 4.35 mmol)。将溶液在 0°C 搅拌 2 小时(h), 然后蒸发至干。将残余物溶于 3 ml MeOH, 然后加入 50 ml 水。过滤所得沉淀, 用水、CH₂Cl₂

和醚洗涤以得到 1.2 g (80%) 粗产品 **1a**。从 MeOH-H₂O 对中重结晶得到白色粉末状的 **1a** (1.01 g, 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-腺 **2a**:

将 **1a** 溶液 (500 mg, 1.38 mmol) 和溶于无水乙醇 (8 ml) 的胍一水合物溶液 (200 μl, 4.15 mmol) 加热回流 2 h。冷却至室温后, 滤出白色沉淀, 用水洗涤, 然后用醚洗涤并干燥。由此得到 385 mg (74%) 白色粉末状的产物 **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**:

将 **2a** (180 mg, 0.48 mmol) 溶于 2 ml DMF。然后加入 MnO₂ (340 mg, 3.9 mmol)。在室温搅拌 30 分钟后, 将此混合物通过烧结的漏斗过滤, 漏斗中装有硅藻土 (厚度: 0.5 cm) 和 3 Å 粉状分子筛 (0.5 cm)。将反应混合物浓缩至体积约为 0.5 ml, 然后加入 5 ml 醚。过滤所得沉淀, 用水洗涤然后干燥。得到粉红色粉末状的化合物 **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(1.0 g, 4.1 mmol)溶于 45 ml 热的无水 DMF。将混合物在氩气下冷却至 0°C, 然后连续加入 N-甲基吗啉(590 μ l, 5.33 mmol)和异丁基氯甲酸酯(840 μ l, 6.60 mmol)。将混合物搅拌 30 min, 然后加入 4-氨基乙酰苯(824 mg, 6.10 mmol)。将溶液在 0°C 搅拌 2h, 然后蒸发至干。将残余物溶于 50 ml 水。过滤所得沉淀, 用水洗涤, 然后用 50 ml 热 MeOH 洗涤。在加热的同时将白色沉淀溶于 DMF, 然后过滤所得溶液并用 MeOH 洗涤。回收滤液并蒸发至干得到 888 mg 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} 。- $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) 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 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, $^2J_{\text{AB}} = 5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{AX}} = 12 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{BX}} = 0 \text{ Hz}$, 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)溶于热的乙醇(99%, 8 ml), 然后加入脲一水合物(995 μ l, 19.5 mmol)。将此溶液加热回流 3 h。过滤所得白色沉淀并用冰水洗涤。由此得到 820 mg(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} 。- $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) 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, CH-S); 2.81 和 2.56(ABX 系统, 2H, $^2J_{\text{AB}} = 5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{AX}} = 12 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{BX}} = 0 \text{ Hz}$, 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:

将 2b(200 mg, 0.53 mmol)溶于 10 ml DMF。然后加入 800 mg MnO₂。搅拌 10 分钟后将混合物通过硅藻土(0.5 cm)-分子筛(0.5 cm, 粉末状)混合层过滤。将反应混合物蒸发至干, 然后用醚洗涤并干燥。得到粉色粉末状的化合物 3b(190 mg, 96%)。

熔点 180°C(dec.)。- IR(KBr):3257, 2930, 2857, 2032, 1698, 1597, 1524, 1510, 1455, 1404, 1307, 1259, 1180 cm^{-1} 。- $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) 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(1.0 g, 4.1 mmol)溶于 45 ml 热的无水 DMF。将混合物在氩气下冷却至 0°C, 然后连续加入 N-甲基吗啉(590 μ l, 5.33 mmol)和异丁基氯甲酸酯(840 μ l, 6.60 mmol)。将混合物搅拌 30 min, 然后加入 2-氨基乙酰苯(824 mg, 6.10 mmol)。将溶液在室温搅拌 3 小时 30 分钟, 然后蒸发至干。将残余物溶于 50 ml 水。过滤所得沉淀, 用水洗涤, 然后用 50 ml 热 MeOH 洗涤。过滤所得沉淀并用水洗涤。将产物溶于热的 MeOH 并加水再沉淀以进行重结晶。将沉淀物过滤, 用水洗涤, 然后用醚洗涤以得到 1.1 g(2.95 mmol, 72%)粗产品 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) $\delta = 11.24$ (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-脲 2c:

将化合物 1c(500 mg, 1.38 mmol)溶于热的乙醇(99%, 8 ml), 然后加入脲一水合物(572 μ l, 11.1 mmol)。将溶液加热回流 50 分钟。将溶液蒸发至干。过滤所得白色沉淀, 用水洗涤然后用醚干燥。由此得到 416 mg(11.1 mmol, 80%)白色粉末状的产物 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) $\delta = 11.97$ (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** (200 mg, 0.53 mmol) 溶于 10 ml DMF。然后加入 800 mg MnO₂。搅拌 15 分钟后将混合物通过硅藻土(0.5 cm)-分子筛(0.5 cm, 粉末状)混合层过滤。将反应混合物蒸发至干, 然后用醚洗涤并干燥。得到粉红色粉末状的化合物 **3c** (130 mg, 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-偶合物 1d:

将 D-生物素(500 mg, 2.05 mmol)溶于 23 ml 热的无水 DMF。将混合物在氩气下冷却至 0°C, 然后连续加入 N-甲基吗啉(295 μl, 2.67 mmol)和异丁基氯甲酸酯(420 μl, 3.28 mmol)。将混合物搅拌 30 min, 然后加入溶于 7 ml DMF 的 3-氨基二苯甲酮(605 mg, 3.07 mmol)和 N-甲基吗啉(240 μl, 2.17 mmol)。将溶液在 0°C 搅拌 2 h, 然后蒸发至干。将残余物溶于 1 ml MeOH, 然后加入 25 ml 水。过滤所得沉淀, 用水洗涤, 然后用醚洗涤, 得到 810 mg (93%) 粗产品 **1d**。从 MeOH-H₂O 对重结晶得到白色粉末状的 **1d** (630 mg, 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-脲 2d:

将 **1d** (350 mg, 0.83 mmol) 溶于 5.5 ml 无水乙醇, 然后加入胍一水合物

(140 μ l, 2.48 mmol)。将溶液加热回流过夜。蒸发后将产物溶于 1 ml 乙醇和水。将白色沉淀重结晶:将其溶于最小量的热乙醇, 然后加入水直至有轻微混浊出现。冷却后, 用水洗涤所得沉淀然后用醚干燥。得到 264 mg (73%) 白色粉末状的产物 **2d**。

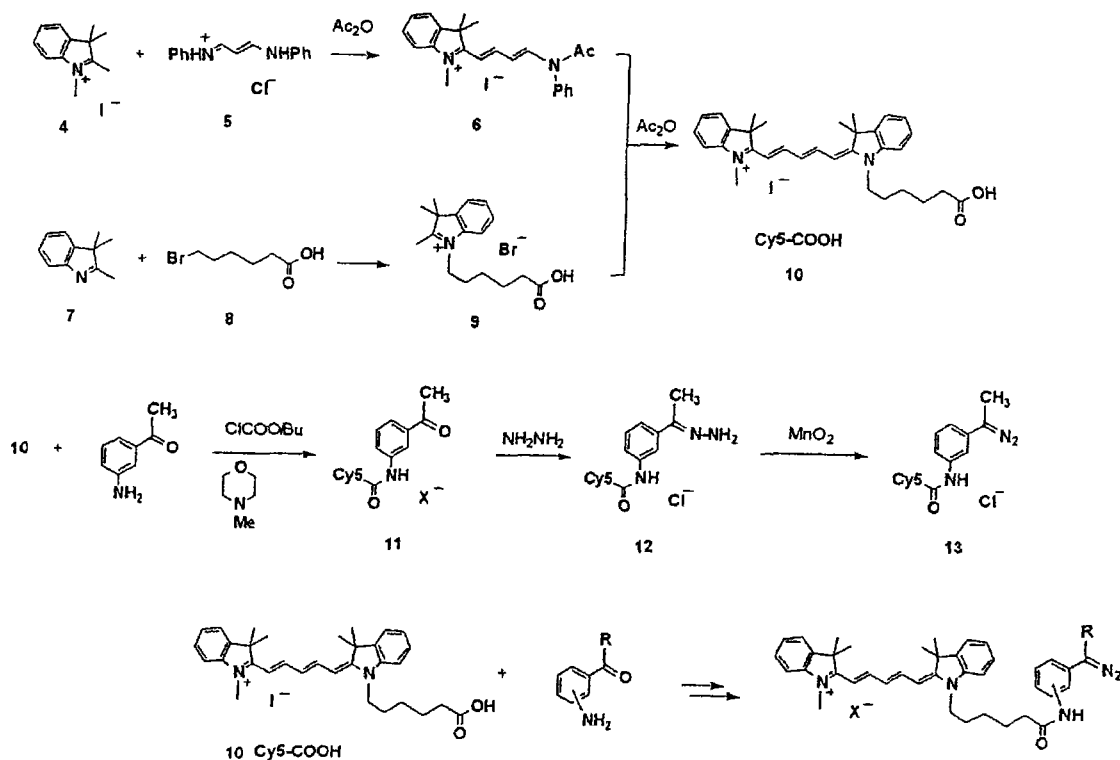
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6) δ = 9.99 (s, 1H, NH-CO); 9.80 (s, 2H, NH_2); 7.54-6.88 (m, 9H, Ar-H); 6.26 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 6.21 (宽 s, 1H, NH-CO-NH); 4.28 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$); 4.13 (m, 1H, CH-CH-NH); 3.12 (m, 1H, CH-S); 2.78 和 2.59 (ABX 系统, 2H, $^2J_{\text{AB}} = 5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{AX}} = 12 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{BX}} = 0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-S}$); 2.27 (t, 2H, $J = 8 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-CO}$); 1.57-1.36 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3$)。

• 化合物间-重氮二苯基 3d:

将 **3d** (500 mg, 0.53 mmol) 溶于 1 ml THF。然后加入 80 mg 活化的 MnO_2 。在室温搅拌 5 分钟后, 将混合物通过硅藻土 (0.5 cm)-分子筛 (0.5 cm, 粉末状) 混合层过滤。将反应混合物蒸发至干。得到紫色油状的化合物 **3d** (47 mg, 100%)。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO-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, $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$); 4.14 (m, 1H, CH-CH-NH); 3.12 (m, 1H, CH-S); 2.83 和 2.59 (ABX 系统, 2H, $^2J_{\text{AB}} = 5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{AX}} = 12 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{BX}} = 0 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-S}$); 2.27 (t, 2H, $J = 8 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-CO}$); 1.58-1.35 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3$)。

实施例 2: 用 Cy5 标记的试剂: Cy5PMDAM:



• 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(indolium iodide)6:

将乙酸酐(75 ml)中的丙醛二(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 4(4.25 g; 14.1 mmol)的混合物在 110℃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]碘咯溴化物 9:

2, 3, 3-三甲基吡咯 7(10.0 g, 62.8 mmol)和 6-溴己酸 8(12.3 g, 62.8 mmol)在没有溶剂时混合并于 110℃在氩气下加热 12 小时。用乙酸乙酯洗涤紫红色糊状反应混合物(2 × 60 ml, 用刮刀将此糊状物捣碎并倒出上清液),然后用丙酮洗涤(50 ml, 糊状物凝固)。滤出粉红色固体然后在真空下干燥(16.0 g; 73%)。

• 化合物 Cy5COOH 10:

将乙酸酐(35 ml)中所述碘化物 6(6.0 g, 12.7 mmol), 溴化物 9(4.5 g, 12.7 mmol)和 NaOAc(2.6 g, 32 mmol)的混合物在 110℃加热 20 分钟。冷却后,加入醚(150 ml),

过滤沉淀物并用醚洗涤(3 × 50 ml)。将固体溶于 100 ml CH₂Cl₂, 过滤并在 SiO₂ 柱(洗脱液: MeOH 5-10%/CH₂Cl₂) 上通过层析纯化。得到 3.4 g (44%)。

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-氨基乙酰苯与 Cy5COOH 10(产物 11) 偶合的化合物:

在溶于 12 ml CH₂Cl₂ 的 Cy5COOH 10 (1.19 g, 1.9 mmol) 溶液中加入 *N*-甲基吗啉 (360 μl, 3.2 mmol)。用冰浴冷却此溶液, 然后加入异丁基氯甲酸酯 (480 μl, 3.7 mmol)。搅拌 5 分钟后, 加入 3-氨基乙酰苯 (488 mg, 3.6 mmol)。将混合物在室温搅拌 3 h。加入 250 ml 醚, 得到糊状固体。搅拌后, 将固体至于圆底烧瓶底部并倒去上清液。再加入 50 ml 醚并用刮刀将介质捣碎以得到固体。将后者过滤, 用水、醚洗涤, 然后在真空下干燥。然后将产物(碘化物)溶于乙醇, 通过安珀莱特 (amberlite) IRA900 (Cl⁻; 15 g) 柱。将回收的乙醇溶液蒸发至干, 然后通过 SiO₂ 柱。得到 0.93 g (77%) 蓝色固体。

• 化合物 Cy5-脲 12:

在溶于 5 ml 无水乙醇的乙酰苯 11 溶液 (0.93 g, 1.46 mmol) 中加入脲一水合物 (180 μl, 3.1 mmol) 并在室温搅拌 7 h。加入 50 ml 醚, 将沉淀过滤并用醚洗涤。将粗产品溶于 50 ml CH₂Cl₂, 将溶液过滤然后浓缩至 10 ml。加入 100 ml 醚沉淀产物, 过滤, 用醚洗涤然后在真空下干燥。得到 540 mg 产物 12 (57%)。

• 化合物 Cy5PMDAM 12a:

在溶于 2 ml DMF 的 100 mg 脲 12 溶液中加入 300 mg MnO₂, 然后将混合物剧烈搅拌 10 min。将上清液通过硅藻土层过滤并用 DMF (3 × 500 μl) 洗涤。加入 50 ml 醚, 用刮刀将沉积的油状物捣碎, 然后倒去上清液。用 25 ml 醚重复洗涤三次并将所得固体过滤并干燥。得到 65 mg (65%) 产物 12a。产物的纯度约为 80-85% (¹H NMR)。

实施例 3: 合成其它试剂:

实施例 3.1: 对-硝基苯基重氮甲烷 (NPDAM) 的合成:

4-硝基苯甲醛脲是在商业上获得的(参考目录 28, 118-2, Aldrich, France)。

将 600 mg (3.64 mmol) 这种产物溶于 9 ml THF。溶液持续搅拌 5 分钟, 然后小心加入 1.26 g (4 当量, 14.56 mmol) MnO₂。将混合物搅拌 10 分钟, 然后过滤。将滤

液回收并蒸发至干。用戊烷洗涤后，得到亮橙色粉末状的化合物对-硝基苯基重氮甲烷，产率为 79% (468 mg, 2.87 mmol)。

熔点 80–82°C。-¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 8.11 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H₃); 7.18 (d, 2H, J = 9 Hz, Ar-H₂); 6.06 (s, 1H, CH₁-N₂)。

实施例 3.2: 苯基甲基重氮甲烷 (PMDAM) 的合成:

乙酰苯胺: 将乙酰苯 (2.0 g, 16 mmol) 稀释在 16 ml 无水乙醇中，然后加入肼 (2.3 ml, 48 mmol)。将混合物加热至回流温度。2h 后，将溶剂蒸发并将残余物溶于醚 (150 ml)。用水 (100 ml) 洗涤介质。在 Na₂SO₄ 上干燥后，蒸发去醚。得到淡黄色油状物 (1.5 g, 11 mmol, 69%)。

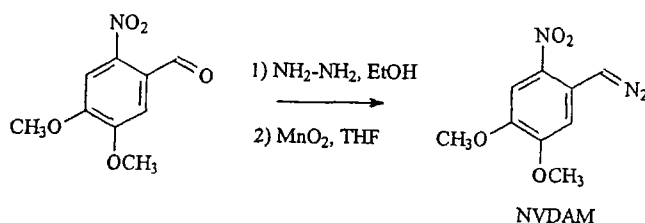
苯基甲基重氮甲烷 (PMDAM): 将胺 (150 mg, 1.1 mmol) 溶于 3 ml THF。加入 MnO₂ (480 mg, 5.5 mmol)。介质在室温搅拌 30 min。介质变为红色。过滤并蒸发去溶剂。得到红色油状物 (145 mg, 100%)。该试剂无需纯化即可使用。

实施例 3.3: 二苯基重氮甲烷 (DPDAM) 的合成:

二苯甲酮胺是从商业上获得的 (参考目录 B 960-2 Aldrich, France)。

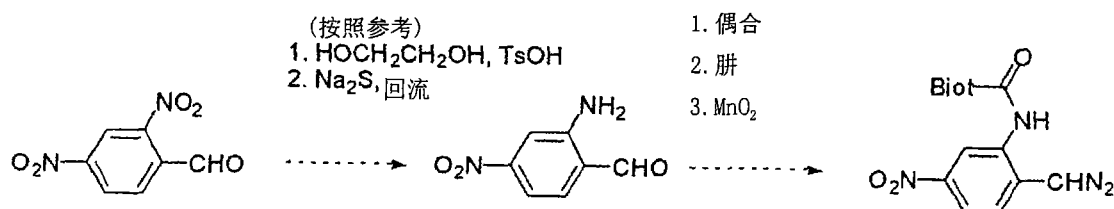
将 196 mg (1.0 mmol) 物质溶于 5 ml THF。加入 435 mg (5 当量, 5.0 mmol) MnO₂，混合物搅拌 10 分钟，然后过滤。将回收的滤液蒸发至干。得到 193 mg (0.99 mmol)。该试剂无需纯化即可使用。

实施例 3.4: NVDAM 的合成:



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

实施例 4: 从 NPDAM 合成生物素化的衍生物:



M. E. Wall 等, *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 2689.

按照上述 ME Wall 等的方法制备 2-氨基-4-硝基苯甲醛衍生物。

重氮甲烷 NPDAM 的制备与上述实施例 3.1 是相同的。

实施例 5:制备 DNA 和 RNA 核酸:

实施例 5.1:制备 DNA 扩增子:

采用罗氏(Roche)的 Fast Start Kit, 0.2 mM 脱氧核糖核苷酸(d-ATP, d-CTP, d-GTP, d-TTP), 0.3 μ M 引物和 0.4 μ l 酶, 通过 PCR 从 16S 结核分枝杆菌(分枝杆菌 *bacterium tuberculosis*)基因组 DNA 靶标(以 10^E+4 份拷贝作为起始靶标)产生了 DNA 扩增子。

PCR 参数如下:

-95°C:4 分钟, 然后循环 35 次(95°C:30 秒; 55°C:30 秒; 72°C:30 秒), 然后 4°C。

通过琼脂糖凝胶电泳(1.5%, TBE 0.5X)定性分析扩增子。加样体积为 5 μ l, 在 100 伏(V)下迁移 20 min。用溴化乙锭染色后在 UV 灯下观察 PCR 产物。

培养条件、分枝杆菌的提取和引物的扩增专利 WO-A-99/65926 中描述。

实施例 5.2:制备转录的 RNAs:

用 Ambion 的 MEGAscript 试剂盒从 PCR 靶标(结核分枝杆菌 16S RNA 片段)进行转录: 7.5 mM 核苷酸(ATP, CTP, GTP 和 UTP)和 2 μ l 酶(RNA 聚合酶)。在 37°C 温育 3 小时(h)。PCR 的扩增引物带有 T3 或 T7 聚合酶启动子, 该启动子如申请 WO-A-99/65926 中所述或如 J. Clin. Microbiol. 37(1), 49-55 页, 1999 文章中所述, 可进行转录。

用琼脂糖凝胶电泳(1.5%, TBE 0.5X)分析转录物。加样体积为 5 μ l 并在 100V 下迁移 20 min。用溴化乙锭染色后在 UV 灯下观察 PCR 产物。

用其它扩增技术如 NASBA 或 TMA 可得到与本发明观点相同的结果, 这些技术可直接产生 RNA 扩增子。

实施例 6:标记试剂在样品核苷酸上的反应性:

标记试剂的合成描述在实施例 1-4 中。本发明所述的 PDAM 是商业上获得的(参考目录 P1405, Molecular Probes, Eugene, OR)。

实施例 6.1:单体 UMP 3'-磷酸的标记:

研究带有重氮甲基官能团的标记试剂的反应性以控制反应的特异性。

开发的方法包括在以下标准条件下在典型化合物 3'-UMP(尿苷 3'-单磷酸, 参考目录 U1126 Sigma)上通过毛细管电泳来研究这种反应性:

3'-UMP 0.04 mM; H₃BO₃ 2.0 mM; 2.0 mM 标记[和合适的有机溶剂(THF, AcOEt

或 DMSO)一起加入]; 溶剂 H₂O-CH₃CN-有机溶剂(比例:1/3/1)。





将此溶液分成 250 μ l 的十份, 加热至 60 $^{\circ}$ C。一定时间后, 用 250 μ l 二氯甲烷处理每份溶液。搅拌后, 除去有机相(下相)。重复该操作两次以上。离心(5 min, 每分钟 5000 转)后, 通过毛细管电泳分析含水相。毛细管电泳(CE)条件如下:用 Beckman P/ACE 5000 设备进行 CE 分析。使用未经处理的熔融二氧化硅毛细管(75 μ m \times 50 cm)。施加电压为 30 kV(正极), 且毛细管的温度保持在 23 $^{\circ}$ C。在 254nm 记录电泳图。用 NaOH 溶液调节硼酸的 pH 并通过 0.2 μ m 过滤器过滤以制备硼酸盐缓冲液(0.1 M, pH 8.3)。在压力(0.5 psi, 5 sec)下注射样品。每次分析前在压力下(20 psi)连续通入 NaOH 溶液(0.1 M, 2 min), 水(2 min)和硼酸盐缓冲液(2 min)以使毛细管再生。

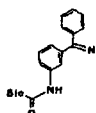
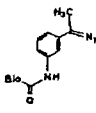
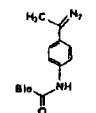
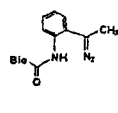
如图所示, 通过在 0-4 小时之间改变反应时间来进行反应, 结果表示所用试剂浓度的图 2A-2I 中所测试的各个试剂。

在各幅电泳图上都标出了反应时间。

对所有测试的试剂, 只得到了单烷基化产物, 这证明了反应的特异性。

因此可比较峰高度以计算反应性, 即试剂和 3'-UMP 的发生一半反应的时间, 结果列在下面的表 1 中(标准条件如上所述):

化学式和名称	 PDAM	 DPDAM	 PMDAM	 NPDAM
反应性	5 min	20 h	30 min	4 h

化学式和名称	 BioDPDAM	 <i>m</i> -BioPMDAM	 <i>p</i> -BioPMDAM	 <i>o</i> -BioPMDAM *
反应性	10 h	15 min	5 min	1 min

* 对 *o*-BioPMDAM 估计了反应性, 因为在标记试剂浓度为 2 mM 的条件下, 反应在 5 分钟内完成。因此图 2I 使用的浓度为 0.2 mM。

表 1: 试剂的反应性(半反应时间)

需要注意的是, 由于对于所有被测试剂反应是非常特异的且不会产生副产品。

因此可增加标记试剂的浓度而不会影响标记的选择性。

因此，对于 DPDAM 试剂，如果浓度增加至 20 mM(见图 2C)，则反应性(半反应时间)为 2 小时。用 BioDPDAM(图 2F)得到了相同的结果，当浓度为 30mM 时反应性为 45 分钟。

实施例 6.2:各种核苷酸 3'-单磷酸的测试:

为避免任何解释错误，用其它核苷酸 3'-单磷酸对作为重要例子的间-BioPMDAM 标记进行了额外的研究。

测试的核苷酸如下：3'-AMP(参考目录 85, 194-9 Aldrich)，3'-GMP(参考目录 151214, ICN)，3'-CMP(参考目录 C1133, Sigma)，3'-TMP(脱氧核糖系列)(参考目录 T1008, Sigma)。用不同核苷酸获得的电泳图显示在图 3A-3D 中。图 3A 中显示的反应时间与图 3B-3D 中的反应时间是相同的。

无论起始核苷酸是(核糖或脱氧核糖系列)，在 60°C 130 分钟时只形成且完全形成了烷基化产物。值得注意的是，在鸟嘌呤(最容易和常规的烷基化剂反应的碱基)的情况下，只观察到被磷酸烷基化的产物，这证明了该反应的很高选择性。

该研究还可证明反应速度不取决于作为底物的核苷酸的性质。

实施例 6.3:二核苷酸的研究:

用间-BioPMDAM 进行二核苷酸 ApUp(参考目录 A4298, Sigma)的烷基化以证实朝相对于对核苷酸核间磷酸的末端磷酸反应的选择性。如图 4 所示，通过电泳监控反应。电泳条件是实施例 6.1 已经描述的标准条件。

观察到只形成了一种产物，这显示了朝相对于核苷酸间磷酸的末端磷酸的间-BioPMDAM 试剂有良好的选择性。

实施例 6.4:4 具有核苷酸 3'-单磷酸的加合物的鉴定:

为确保所得产物确由磷酸的烷基化产生，用间-BioPMDAM 试剂合成了单磷酸 3'-UMP, 3'-CMP, 3'-GMP 和 3'-AMP 的加合物。所述烷基化反应是在下述制备规模上进行的。所得加合物的产率为 70%，是纯的，然后通过质子或磷 NMR 研究。

制备方法:

将 3'-UMP(二钠盐形式, 9.3 mg, 21.1 μmol)溶于 2 ml 0.1 M H_3BO_3 水溶液，然后连续加入 2 ml CH_3CN , 6 ml MeOH 和间-BioPMDAM 试剂(75 mg; 0.20 mmol)。反应在室温下进行 2.5 h。通过毛细管电泳监控反应。加入 3 ml 水，然后用 CH_2Cl_2 萃取除去多余的试剂。蒸发去含水相。将残余物溶于少量的水并通过反相硅胶柱(Lichroprep RP-18, Merck; 洗脱液 MeOH/ H_2O (20/80))纯化。得到 10 g(69%) 3'-UMP 的加合物。

图 5A-5D 显示了 3'-NMP (N = G, U, C, A) 加合物的质子 NMR 谱。通过二维 $^1\text{H}/^1\text{H}$ NMR 实验 (COSY) 鉴定加合物。对每个加合物得到了比例为 1/1 的两种非对映异构体。

在 0 ppm (300 MHz, D_2O) 附近磷 NMR 只有一个峰。

这些实验证明该反应确实是特异的, 因为只观察到一种加合物且标记确实是对磷进行的。这些碱基没有发生烷基化副反应。因此, 标记产物特别适合杂交步骤。

实施例 7: 稳定性研究:

实施例 7.1: 标记试剂对温度的稳定性:

上述实施例 6.1 的表中所描述的所有重氮甲烷衍生物以固体状态在 -20°C 冰箱中保存至少 3 个月其反应性不会丧失。

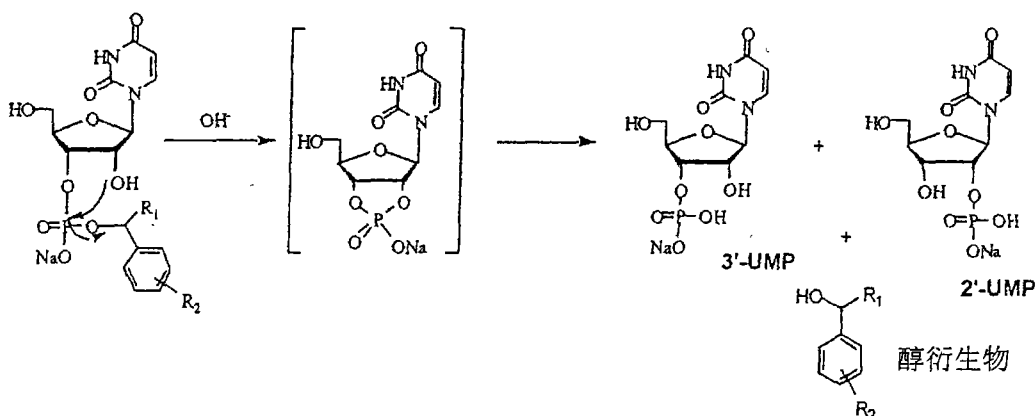
两种试剂 NPDAM 和间-BioPMDAM 在室温放置于实验台上的稳定性用 ^1H NMR 确定。我们发现将 NPDAM 放置于无特别预防的实验台上 1 个月也不会分解。而间-BioPMDAM 在实验台上放置 25 天就会分解约 50%。

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°C 至少 15 天内, 最好是 1 个月内就不稳定的试剂是没有市场前景的。即使在 -110°C 下储存和运输, -110°C 和 -20°C 的稳定性存在相互关系, 这就是为什么在 -20°C 下要稳定 15 天, 最好是 1 个月是工业上的最低限度。在 -110°C 以上, 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干冰方法运输这些试剂。

至于室温下的稳定性, 稳定数小时, 最好是 1 天就足以使使用者进行标记。

实施例 7.2: 各种核苷酸 3'-UMP 标记结合物的水解:

我们测试了 [3'-UMP-标记] 结合物在碱性介质中的稳定性。水解机制可用以下方式表示:



用以下方法合成使用的各种结合物，以通过间-BioPMDAM 对单磷酸 3'-UMP (核糖核苷酸序列) 的烷基化。

用 3'-UMP 测试的各种标记试剂是：

- 间-BioPMDAM,
- 邻-BioPMDAM,
- 对-BioPMDAM,
- DPDAM, 和
- PDAM。

步骤

在 DMSO 中制备 20 mM 标记试剂溶液。

为进行反应，加入以下物质：

- 20 μ l 该溶液,
- 40 μ l 1N NaOH,
- 10 μ l 浓度为 40mM 的参照产物, 和
- 130 μ l H₂O。

将此溶液加热至 60°C 并在精确时间取样。

对样品进行以下处理：

- 10 μ l 加热溶液,
- 40 μ l 0.5M H₃BO₃, 和
- 150 μ l H₂O。

对每种样品，取 15 μ l 这种最终溶液进行毛细管电泳。

通过毛细管电泳测定水解反应的速度，研究结合物数量的减少作为时间的函数 (测量峰的表面积，与内标物：3, 5-二氨基苯甲酸或萘甲酸相比)。

用这种方法，我们可比较各种结合物的稳定性。

结果如表 2 所示：

与 3'-UMP 偶合的标记试剂	结合物的半衰期(min)
间-BioPMDAM	197
邻-BioPMDAM	30
对-BioPMDAM	8
DPDAM	54
PDAM	16

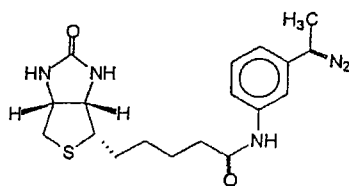
表 2: 反应性 (与核苷酸 3'-UMP-标记结合的试剂的半反应期)

因此, 我们发现与间-BioPMDAM 结合的半衰期为 197 min, 这比对-BioPMDAM 衍生物高 25 倍, 比 DPDAM 衍生物高 7 倍, 比邻-BioPMDAM 衍生物高 4 倍。

邻位和对位衍生物比结合物更稳定, 在诊断测试时可进行更好的检测。

实施例 8: 用间-bioPMDAM 衍生物(3a) 标记转录的 RNA:

标记:



间-bioPMDAM(3a)

间-bioPMDAM 衍生物(3a)是按实施例 1.1 所述的反应流程得到的。RNA 靶是按照实施例 5.2 所述的方法通过 PCR 后转录(post-PCR transcription)制得的。

在 50 μ l 含有 RNA 转录物的溶液中加入 9 μ l 纯水(Sigma), 9 μ l 0.1M 咪唑和 9 μ l 1M $MnCl_2$ 。咪唑和 $MnCl_2$ 的浓度分别为 6 mM 和 60 mM。加入含有 RNA 靶的溶液和片段化所需的缓冲液, 以及 3 μ l 间-bioPMDAM(3a) (100 mM, 溶于 DMSO), 然后温育。间-bioPMDAM 标记的最终浓度为 2 mM。用纯水将此溶液调至 150 μ l 后, 将反应混合物匀浆并在 60 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。温育 30 分钟并加入 EDTA 后(最终为 100 mM), 用供应商提供的缓冲液和方法, 在 QIAVACTM 柱(Qiagen, Hilden, Germany) 上纯化以除去过量的标记。

杂交

经过片段化期间的标记步骤后, 将得到的片段在 DNA 芯片上杂交, 该芯片是设计用于分析结核分枝杆菌 16S RNA 的“Genbank” M20940 序列的 213-215 区域。这种 DNA 芯片在 A. Troesch 等, J. Clin. Microbiol., 37(1): 49-55, 1999 中有描述。

杂交步骤是在流体站(Affymetrix, Santa Clara, CA)上进行的, 所用的杂交方法和缓冲液见 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)。

引入用藻红蛋白和 Cy5 标记的链霉抗生物素蛋白(激发波长分别为 488nm 和

650nm) 以显示在 DNA 芯片表面与捕获探针杂交的生物素化的片段。如下条件: 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 标记的链霉抗生物素蛋白 (200 μ g/ml)。采用的组分的参考目录是:

- 链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白: 参考目录 R0438, Dako, Denmark,
- 链霉抗生物素蛋白-CY5: 参考目录 C0050, Dako, Denmark,
- 消泡剂: 参考目录 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软件 (GeneChip® Instrument System 和 GeneChip® Information System, Santa Clara CA) 进行阅读。

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。同源性百分数以参考序列为基准, 在此情况中是指结核分枝杆菌序列。

以平均强度所表示的信号 (I)、背景噪音 (B) 和同源性百分数 (%) 的结果列于表 2。

一般来说, 同源性百分数大于 90% 被认为是满意的结果, 虽然大于 95% 的结果也常常出现。在 95% 以上, 值就不再指明, 因为这在分枝杆菌 DNA 芯片的例子中是没有意义的。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。

标记	% 同源性	I (rfu)	B (rfu)	I/B
藻红蛋白	> 95%	2358	397	6.9
Cy5	> 95%	4688	72	66.3

表 3: 标记和杂交后 DNA 芯片表面发射的荧光读数

用两种标记, 同源性比例大于 95%。以 rfu 表示的信号强度大于那些用标准标记技术得到的值。

这些结果显示, 在片段化 RNA 转录物时用间-bioPMDAM 衍生物进行标记反应可在 DNA 芯片上产生可检测的足够标记的片段。因此, 重氮甲基官能团可使生物素标记引入 RNA 转录物的序列。这一反应没有改变生物素-链霉抗生物素蛋白相互作用的性质。实际上, 无论是用荧光团藻红蛋白或是 Cy5, 强度水平和信噪比 (I/B)

都很好。采用这一技术可根据用途使用不同的荧光团，甚至在两种不同波长下进行检测(参见，如 Nature Genetics 14 卷，441-447 页，1996)。

实施例 9:用间-bioPMDAM 衍生物进行标记的最佳化:

实施例 9.1:片段化盐(MnCl₂)浓度的最佳化:

用不同浓度的 MnCl₂ 按实施例 8 所述的方法标记 RNA 转录物。

杂交和阅读按实施例 8 所描述的方法进行。

标记结果显示，用低浓度的 MnCl₂ 得到了高的强度。

MnCl₂:0 mM, 强度 I:3857 rfu, 同源性:93.5%,

MnCl₂:5 mM, 强度 I:3031 rfu, 同源性:93.5%, 和

MnCl₂:10 mM, 强度 I:2471 rfu, 同源性:94.1%。

在不同 MnCl₂ 浓度下分析 RNA 转录物的片段化显示，对于金属来说，通过在 60 °C 温育，5mM 时片段化总是有效的。

这显示，在最佳的标记和片段化条件下用标记试剂可得到非常好的标记结果。

实施例 9.2:咪唑浓度的最佳化:

在 4 个含有 50 μl RNA 转录物(16S 分枝杆菌)溶液的试管中加入 4.5 μl 或 18 μl 或 36 μl 咪唑(1M, 溶于纯水)，以使最终浓度分别为 30, 120 和 240 mM。然后加入 3μl 间-bioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO)，并用纯水将总体积调至 150 μl。

在 60°C 将 4 个试管中的溶液涡流搅拌且温育 10 分钟。

纯化

将四种标记反应溶液在 QIAVAC™ 柱上纯化以除去多余的标记。

杂交和阅读步骤如实施例 8 所述(链霉抗生物素蛋白藻红蛋白检测)。

以信号强度表示的结果如下:

咪唑 30 mM 强度 3600 rfu,

咪唑 120 mM 强度 1600 rfu, 和

咪唑 240 mM 强度 1400 rfu。

从标记强度看，用 30mM 咪唑得到了最好的结果。可能高浓度(120 和 240 mM)产生过量的片段化，因此，产生较短的片段。

该结果还显示，基于重氮甲基官能团的标记的化学机理可最优化，并使其适合标记条件和要标记的靶。

实施例 9.3:间-bioPMDAM 标记浓度的影响:

在 6 个含有 50 μ RNA 转录物(实施例 5.2)溶液的试管中加入 4.5 μl 咪唑(1M,

溶于纯水)和体积分别为 0.38; 0.75; 1.5; 3; 4.5 和 7.5 μl 的间-bioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO)。用纯水将总体积调至 150 μl 。

在 60 $^{\circ}\text{C}$ 将溶液涡漩搅拌且温育 10 分钟。

杂交和阅读步骤如实施例 8 所述。

结果列于表 4:

间-bioPMDAM 浓度	标记	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
0.25 mM	PE	72.4	193	786	0.2
	Cy5	60.5	3263	487	6.7
0.5 mM	PE	88.6	454	785	0.6
	Cy5	77.3	7925	589	13.5
1.0 mM	PE	91.4	891	809	1.1
	Cy5	84.3	11194	662	16.9
2.0 mM	PE	94.6	2361	787	3.0
	Cy5	91.4	15375	417	36.8
3.0 mM	PE	95.1	3944	797	5.0
	Cy5	93.5	23248	222	104.8
5.0 mM	PE	93.5	6112	820	7.5
	Cy5	92.4	34794	479	72.6

表 4: 标记结果的总结, 它是 bioPMDAM 标记浓度的函数。在 DNA 芯片上用链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白(PE)和链霉抗生物素蛋白-Cy5(Cy5)进行观察。

从 2 mM 间-bioPMDAM 可见, 同源性百分数和标记强度高。这和用生物素和用带有藻红蛋白的链霉抗生物素蛋白, 以及用与 Cy5 连接的链霉抗生物素蛋白观察到的结果是一样的。超过此浓度, 信号的增强和同源性百分数不受影响。

实施例 9.4: 标记后纯化步骤的省略:

为省去纯化步骤, 在 DNA 芯片上用不同的标记反应体积进行杂交, 未事先纯化。

在片段化时, 在 50 μl RNA 转录物(实施例 5.2)溶液中加入标记缓冲液, 然后将混合物在 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟。片段化时的标记条件为: 30 mM 咪唑(4.5 μl 咪唑溶液, 1M, 溶于纯水), 10 mM MnCl_2 (1.5 μl 氯化锰溶液, 1M, 溶于纯水)和 2 mM 间-BioPMDAM(3 μl 100 mM 溶液, 溶于无水 DMSO)。

温育后, 将不同体积的标记溶液在 DNA 芯片上杂交, 事先未进行任何纯化。杂交方法如上所述。引入用藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白以显示在 DNA 芯片表面与捕获探针杂交的生物素化的片段(激发波长: 488 nm), 条件如实施例 8 所述。

还按照 Affymetrix 提供的方法检测藻红蛋白标记并分析结果, 该方法描述在实施例 8 中。

结果列于表 5。

在 DNA 芯片表面上杂交的体积(μl)	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
20	94.1	932	801	1.2
Ref.*	> 95	728	752	1.0

注*: 标记后将标记反应物的总体积在柱上纯化

表 5: 标记后纯化步骤的省略

这些结果显示, 如果所有反应物体积没有杂交, 使用 2 mM 间-BioPMDAM 可省略纯化步骤。使用 20 μl 在 DNA 芯片上杂交, 从同源性百分数和信号强度看, 所得结果可与用采用纯化步骤的标准方法获得的结果相比。

用没有金属(MnCl_2)的标记方法获得了相同的结果, 列于表 6。信号较强。

在 DNA 芯片上杂交的体积(μl)	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
20	93.5	2057	875	2.3

表 6: 在没有 MnCl_2 时标记后纯化步骤的省略

这些结果显示, 使用片段化试剂而不是金属可避免沉淀问题和高背景噪音。

在实施例 9.4 中, 所用 RNA 转录物被降解了, 这解释了信号的减弱, 但用参照物可进行比较。

实施例 10: 可用来标记 RNA 的其它片段化试剂:

实施例 10.1: 使用多胺链:

为解决盐存在时标记产量的减少问题, 我们使用了“生源的”多胺, 精胺作为片段化试剂。实际上, 已知这种多胺链用于其与核酸的磷酸相互作用。

将 50 μl RNA 转录物(实施例 5.2)和各种浓度的精胺(参考目录 13275-0010, Acros, FR, 0.5 M 储备溶液 pH 7.5)以及 2 mM 间-BioPMDAM(3 μl 100 mM BioPMDAM 溶液, 溶于无水 DMSO)在 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟, 最终体积为 150 μl 。

按照实施例 8 所述的方法在 DNA 芯片上进行纯化、杂交和检测(链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白检测)。

标记结果列于表 7:

精胺 (mM)	同源性 (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
6	93.0	444	537	0.8
5	94.1	842	552	3.3
4	94.6	1884	461	4.1
1	94.6	2925	449	6.5

表 7: 精胺用作片段化试剂

以精胺作为片段化试剂在片段化时进行标记, 同源性百分数和信号强度是令人满意的。因此可在用带有重氮甲基官能团的标记试剂进行标记时, 多胺链可用来片段化 RNA 靶。

实施例 10.2: 使用菲咯啉衍生物:

实验 1: 在 5 μ l RNA 转录物中加入 20 μ l 菲咯啉-FeSO₄ (参考目录 P1929, Sigma, 25 mM) 和 2 μ l 间-BioPMDAM (100 mM, 溶于 DMSO)。将体积调至 100 μ l。试管在 95 $^{\circ}$ C 温育 60 min。

实验 2: 在 5 μ l RNA 转录物中加入 3 μ l 咪唑 pH 9.5 (1M, 溶于纯水), 0.5 μ l MnCl₂ 和 2 μ l 间-BioPMDAM (100 mM, 溶于 DMSO)。将体积调至 100 μ l。试管在 60 $^{\circ}$ C 温育 10 min。

两种情况下, 都在 DNA 芯片上对样品进行杂交、检测和分析。

如上所述, 引入与荧光团、藻红蛋白偶合的链霉抗生物素蛋白以显示在 DNA 芯片表面与捕获探针杂交的生物素化的片段 (激发波长: 488 nm)。

条件	同源性 (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
5 mM 菲咯啉 FeSO ₄ , 2 mM 间-bioPMDAM 95 $^{\circ}$ C, 60 min	> 95	21821	633	34.5
30 mM 咪唑 pH 9.5, 10 mM MnCl ₂ , 2 mM 间-bioPMDAM 60 $^{\circ}$ C, 10 min	> 95	10719	540	19.9

表 8: 使用菲咯啉衍生物

以菲咯啉作为片段化试剂获得的结果, 如表 8 所示, 高于用使用金属和咪唑的标准方法获得的结果。

还可使用与 Fe^{++} 之外其它金属络合的其它菲咯啉衍生物，如 Cu^{++} ， Zn^{++} 等。

实施例 11: 在两个步骤中用间-bioPMDAM 标记并片段化 RNA:

在片段化缓冲液: 30 mM 咪唑和 10 mM MnCl_2 存在时，将按实施例 5.2 所述方法获得的 50 μl RNA 转录物溶液在 60°C 温育 30 分钟。然后加入间-bioPMDAM 衍生物，时最终浓度为 2 mM，并在 60°C 再温育 5 min。

在杂交前，按照上述方法(实施例 8)将标记的 RNA 片段在柱上纯化。

所用方法	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
1. 片段化，然后标记	81.1	44245	791	56.0
2. 在片段化时标记	91.9	20548	588	35.0

表 9: 在两个步骤中用间-bioPMDAM 标记并片段化 RNA

这里，按照表 9，在进行比较时应考虑强度和 I/B 比，因为用方法 1(片段化，然后标记)所得信号太强。观察到阅读器的饱和现象，这会导致较低的同源性百分数(81%)，而用参照方法获得的同源性百分数为 91.9%。

然而，该实施例显示，片段化和标记步骤是可以分离的。

实施例 12: 放大信号以用间-bioPMDAM 试剂标记 RNA:

此方法的目的是放大荧光信号，这是通过在每个间-bioPMDAM 分子中引入几个荧光团实现的。

标记反应

在 5 μl 转录物(分枝杆菌 16S)中加入 89 μl 纯水(Sigma)，30 μl 咪唑(1M，溶于纯水)，1 μl MnCl_2 (1M，溶于纯水)和 2 μl 间-bioPMDAM(100 mM，溶于 DMSO)。

试管涡漩搅拌，然后在 60°C 温育 10 分钟。

然后按照实施例 8 所述的方法进行柱纯化并在 DNA 芯片上进行杂交。

未放大信号

将链霉抗生物素蛋白(用藻红蛋白:PE 标记)和标记试剂间-bioPMDAM 相互作用以显示生物素化的片段。在 DNA 芯片上加入链霉抗生物素蛋白时方法如实施例 8 所述。

放大信号

第一步: 附上链霉抗生物素蛋白(300 μl 纯水，300 μl 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; 4 μ l 链霉抗生物素蛋白, 1.5 mg/ml)。

第二步:附上生物素化的抗-链霉抗生物素蛋白抗体(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; 3 μ l 生物素化的抗-链霉抗生物素蛋白抗体, 1 mg/ml)。

第三步:附上用藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白(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 用藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白, 300 μ g/ml)。

然后在上述步骤中使用生物素化的抗-链霉抗生物素蛋白:参考目录 216-065-084, Jackson Immuno Research。

按照实施例 8 所述的方法阅读 DNA 芯片上的信号。结果以同源性百分数和标记强度表示, 列于表 10:

杂交后标记	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
未放大信号	> 95	2400	581	4.1
放大信号	> 95	13798	860	16.0

表 10:放大信号以用间-bioPMDAM 试剂标记 RNA 信号的放大显著地改善了检测的灵敏度。

实施例 13:用对-bioPMDAM(3b)和邻-bioPMDAM(3c)衍生物标记 RNA:

在片段化 RNA 转录物时, 在标记方法中评价两种按实施例 1.2 和 1.3 所述方法制备的试剂。

按实施例 5.2 所述方法获得 RNA 转录物。

标记、杂交、引入用藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白以及纯化方法如实施例 8 所述。

结果列于表 11:

所用分子	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
对-bioPMDAM	> 95	1665	620	2.7
邻-bioPMDAM	> 95	3657	532	6.9

表 11:用对-bioPMDAM 和邻-bioPMDAM 标记 RNA

这些结果显示, 邻位和对位的取代对标记强度和同源性百分数也有有用的效果。

实施例 14:用 BioDPDAM 衍生物(3d) 标记 RNA 转录物:

按实施例 1.4 所述的方法制备 BioDPDAM 衍生物(3d)。

按实施例 5.2 所述的方法获得 RNA 转录物。

与间-BioPMDAM 试剂相比, 标记和片段化方法是在表 12 所述的条件下(反应体积 100 μ l)在一个步骤中完成的。

杂交、引入用藻红蛋白标记的链霉抗生物素蛋白以及纯化方法如实施例 8 所述。

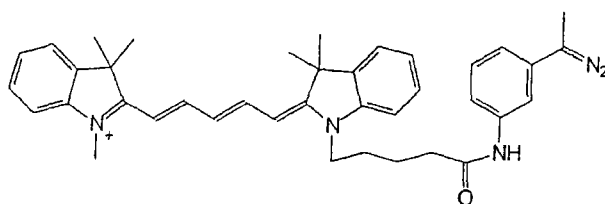
结果列于表所

标记条件	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
参考过程: 30 mM Im pH 9.5; 5 mM MnCl ₂ ; 2 mM 间-bioPMDAM(3a) 10 min, 60°C	89.7	35519	528	67.2
30 mM Im pH 9.5; 5 mM MnCl ₂ ; 2 mM BioDPDAM(3d) 10 min, 60°C	> 95	3252	446	7.3
30 mM Im pH 9.5; 5 mM MnCl ₂ ; 2 mM BioDPDAM(3d) 15 min, 60°C	> 95	4482	435	10.3
30 mM Im pH 9.5; 5 mM MnCl ₂ ; 2 mM BioDPDAM(3d) 30 min, 60°C	> 95	6429	428	15.0

Im = 咪唑

表 12:用 BioDPDAM(3d) 标记 RNA 转录物

衍生物 3d 对在磷酸上标记 RNA 有良好的结果。这一结果显示, 取代基(如苯基)可用来调节带有重氮甲基官能团的标记的反应性和稳定性。

实施例 15:用 Cy5-PMDAM 衍生物(12a) 标记 RNA:

Cy5-PMDAM(12a)

按实施例 2 所述的方法制备标记 Cy5-PMDAM(12a)。

在各种片段化和标记条件下,用 Cy5-PMDAM 标记 5 μl RNA 转录物(实施例 5.2)。常规条件如下:

- 最终反应体积 100 μl ,
- 30 mM 咪唑 pH 8(3 μl 1M 储备溶液),
- 5 mM MnCl_2 (6 μl 0.1M 储备溶液), 和
- 3 mM Cy5-PMDAM(3 μl 100 mM 储备溶液溶于无水 DMSO)。

在第一个实验中,在片段化期间在一个步骤中进行标记。

在第二个实验中,标记和片段化是在两个步骤中完成的:片段化之后进行标记。与 MnCl_2 一起温育后,加入 20 μl 0.5 M EDTA 溶液以中和盐。

若在一个步骤中进行标记和片段化,则在 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。对于第二个实验,其中标记和片段化是在两个步骤中进行的,对每个步骤使用 15 min 温育。

按实施例 8 所述的方法将标记的片段纯化、杂交并检测。不同之处仅在于,在杂交步骤中不需要加入标记的链霉抗生物素蛋白,因为标记是通过合适的阅读器(GMS 418 阵列扫描仪, Affymetrix, Santa Clara, CA)直接检测的。

标记结果列于表 13:

标记方法	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
在片段化时标记	> 95	6612	352	17.3
片段化, 然后标记	94.1	8378	158	53.1

表 13:用 Cy5-PMDAM 衍生物标记 RNA 转录物

从标记强度和同源性百分数来看,用标记试剂(12a)在 RNA 转录物的磷酸上标记有非常满意的结果。

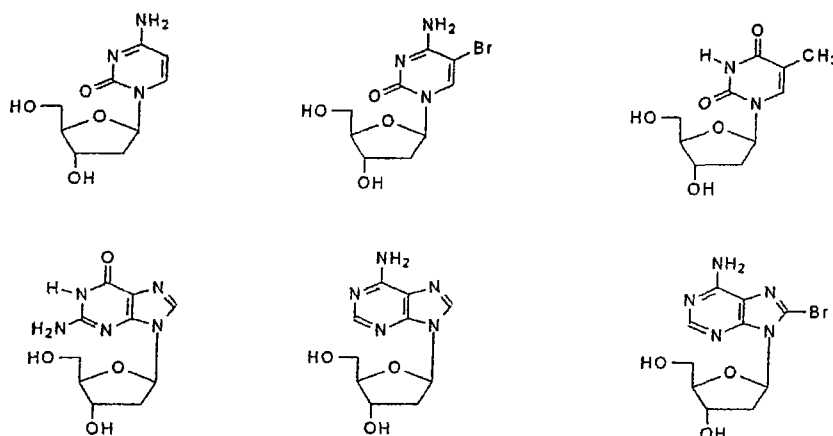
值得一提的是,用这种标记得到的信号背景噪声比非常令人满意。实际上,花青衍生物的激发和发射波长远不同于那些生物分子。

这些结果还显示,重氮甲基官能团可在核酸的磷酸水平引入生物素以外的标记。

实施例 16: DNA 片段化的研究:

实施例 16.1: 各种核苷在酸性介质中的水解:

研究的目的是证明天然核苷、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。此研究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。



2 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)用于此研究中。

每种核苷取 50 nmol 在 95°C、pH 为 3 的 50 mM 甲酸盐中温育, 温育时间从 0 到 45 min。真空干燥后加入 20 μ l 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)与以分钟计的温育时间(x 轴)的关系表示, 见图 8。

图 8 的曲线显示, 腺苷在 8 位上用溴原子修饰使此核苷没有天然核苷稳定。然而, 结果显示在使用的条件下, 去嘌呤作用要远大于去嘧啶作用。

此研究表明去嘌呤作用或去嘧啶作用使 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 16.2: 掺入修饰核苷酸或其他物质的双链 DNA 的片段化:

以 16S 结核分枝杆菌基因组 DNA 靶(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 μ M 引物和 0.4 μ l 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, 以得到加入 30% 8Br-dATP 后的 PCR 产物。这可以通过引 0.2mM d-CTP, d-GTP 和 d-TTP 来实现。还引入 0.14 mM d-ATP 和 0.06 mM 的 8-BrdATP。(8-BrdATP 是市场上买到的(参考目录 N-2005-1, TriLink Biotechnologies, San Diego CA)。

第三组 PCR 所用的条件加以修改, 人得到加入 50% 8Br-dATP 后的 PCR 产物。这可以通过引入 0.2mM d-CTP, d-GTP 和 d-TTP 来实现。还引入 0.1 mM d-ATP 和 0.1 mM 8-BrdATP。

这些扩增子的单独片段化研究在上述条件下进行: 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 (8%聚丙烯酰胺, 7M 尿素, 1×TBE) 进行。

在 pH3 的 50mM 甲酸钠中 95°C 温育 15min 后, 没有观察到三个 PCR 产物之间有差异。在所有情况下观察到 PCR 扩增子的完全片段化。

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温育时间下进行。在上述的条件下进行凝胶分析表明, pH3 时仅在 95°C 温育 10 min 后片段化就完成了。在此 pH 条件下, 60°C 温育 30 min 也可以完成片段化。

在 pH4 时, 即使在 95°C 也需要 30 min 的温育才能完成 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, 因而不经过特别的处理也会导致 DNA 链的片段化。

实施例 17: 以两个步骤用间-bioPMDAM 衍生物(3a) 标记和片段化 DNA:

按照实施例 1.1 描述的反应流程获得间-bioPMDAM 衍生物(3a)。

按照实施例 5.1 描述的方案用 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。

标记

将 10 μl PCR 产物, 38 μl 纯水(Sigma)和 50 μl 甲酸钠(100 mM, 溶于纯水中)在 pH3 时混和, 混合物 60°C 温育 30 min。然后加入 2 μl 间-bioPMDAM(100 mM 溶于 DMSO 中)。溶液旋涡搅拌, 然后 60°C 再温育 15 min。

试验作两份进行以便能在凝胶上分析 DNA 的片段化, 并通过 DNA 芯片的杂交和阅读来分析标记的效率。

纯化

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

纯化后, 洗脱物转到一个含有 400 μl 杂交缓冲液(1.75 ml 20× SSPE; 2.9 ml 5M 甜菜碱; 290 μl 0.1M DTAB; 10 μl 消泡剂 30%)的干净试管中。这些物质的参考目录如下:

- 甜菜碱参考目录 B-2754 Sigma, 和
- DTAB 参考目录 D-5047 Sigma。

溶液旋涡搅拌, 95°C 温育 10 min 以分离在片段化期间的标记步骤(变性步骤)中没有分开的 DNA 双链分开。然后在 DNA 芯片上杂交前将试管浸在 0°C 的冰-水中。

在 DNA 芯片上杂交

经过片段化期间的标记步骤后,将得到的片段在 DNA 芯片上杂交,该芯片是设计用于分析结核分枝杆菌 16S RNA 的“Genbank”M20940 序列的 213-215 区域的。这种 DNA 芯片在 A. Troesch 等, J. Clin. Microbiol., 37(1): 49-55, 1999 中有描述。

杂交步骤是在流体站 (Affymetrix, Santa Clara, CA) 上进行的,所用的杂交方法和缓冲液见 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)。

杂交是通过结合标记藻红蛋白(PE)的链霉抗生物素蛋白显示的,PE 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 的 100mM 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 链霉抗生物素蛋白-PE(300 μ g/ml)。这些物质的参考目录:

- 链霉抗生物素蛋白-藻红蛋白: 参考目录 R0438, Dako, Denmark,
- 链霉抗生物素蛋白-CY5: 参考目录 C0050, Dako, Denmark,
- 消泡剂: 参考目录 M5-575, Ultra Additives Inc., 以及
- Tween 参考目录 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软件(GeneChip® Instrument System 和 GeneChip® Information System, Santa Clara CA)进行阅读。

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。同源性百分数以参考序列为基准,在此情况中是指结核分枝杆菌序列。

以平均强度所表示的信号(I)、背景噪音(B)和同源性百分数(%)的结果列于表 2。

一般来说,同源性百分数大于 90%被认为是满意的结果,虽然大于 95%的结果也常常出现。在 95%以上,值就不再指明,因为这在分支枝杆菌 DNA 芯片的例子中是没有意义的。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在真空下干燥,加入 10 μ l 纯水和 10 μ l 2 \times 蓝甲酰胺。

电泳是用 8% 丙烯酰胺凝胶,缓冲液是 1 \times TBE, 150V 迁移 1 小时。

酸性 pH 用于 DNA 的片段化。事实上,在此 pH 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。这种类型的片段化产生 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) 中温育 30 min 可以使这些扩增子完全片段化。这就使我们可以评价在间-bioPMDAM 标记存在的情况下 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数、信号及背景噪音的强度表示列于表 14 中。

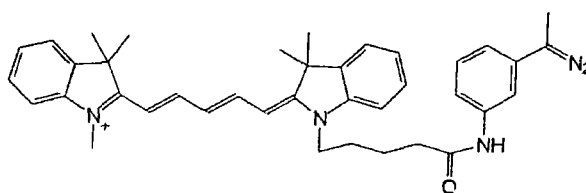
PCR 扩增子标记的条件	同源性 (%)	I (rfu)	B (rfu)	I/B
缓冲液: 甲酸盐 50mM, pH3 标记物: 2mM 间-bioPMDAM 温育: 60°C, 30min	>95	4456	593	7.5

表 14: 以同源性百分数、信号 (I) 及背景噪音 (B) 的强度表示的 DNA 扩增子的标记和片段化

本实施例说明本发明的试剂可用于标记以两步法酶扩增产生的 DNA 片段。也可用于标记非扩增的天然 DNA。

实施例 18: 用 Cy5-PMDAM 衍生物 (12a) 的标记 DNA

用合成的 DNA 片段评估具有新型标记物的 DNA 标记效果，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。

按照所谓的亚磷酰胺方法制备一种 20mer 的寡脱氧核糖核苷酸 (ODN)。用标准磷酸化试剂将一个磷酸引入到 5' 末端，该磷酸化试剂与亚磷酰胺化学一致。这种 ODN 的序列包括 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 芯片的捕获序列互补，DNA 芯片的捕获序列是根据 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，并显示芯片表面上的方格式。读取此 DNA 芯片可以，根据强度而不是同源性

的结果得到标记性能的信息。

标记：将 10 μ l 的 Cy5-PMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 50pmol 的 ODN 中。最终的体积是 100 μ l。均浆后 60°C 温育 30min。

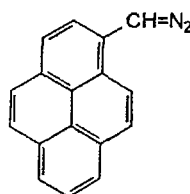
纯化和阅读：为了去除多余的标记试剂，按照实施例 17 的方法进行纯化。DNA 芯片的阅读是按照实施例 17 的方法进行的。

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

这一强度水平是很高的，说明标记试剂 Cy5-PMDAM(12a)完全适合于标记磷酸基团上的 DNA 片段。

实施例 19：用 PDAM 试剂标记和片段化 DNA：

实施例 19.1：用 1-苝基叠氮甲烷(PDAM)标记：



1-苝基叠氮甲烷

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

两种 20 mer 的 ODN 用作 DNA 模型：一种 20mer 的 ODN 含有 5'-羟基，同样的 20mer 的 ODN 在 5'末端带有一个磷酸。ODN 的序列在实施例 10 中描述。标记反应在含有 50%DMSO 和 1.5 mM 1-苝基叠氮甲烷(PDAM)的混合物中进行，60°C 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(60/10/30)。30 min 后，在 ODN 5'-磷酸上的偶合反应完成。获得部分偶合到 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 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最优先标记。在核苷酸内磷酸上标记是方便的，因为通过在核酸片段上引入多个标记物可导致敏感性升高。这就使核酸与互补序列杂交时具有良好的敏感性，同时保持良好的杂交特异性。

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，反应时间和温度以达到只在末端磷酸上标记的目的。

实施例 19.2：用 PDAM 进行标记反应的动力学研究：

本研究用 20 mer 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效液相色谱(HPLC)进行分析, 条件如下:

5 μ m, 220 \times 4.6 mm 的反相色谱柱 Spheri-5 RP-18(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
- 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 轴是标记百分数。

60 $^{\circ}$ C 仅温育 10 min 产率就接近 90%。

实施例 11.3: 温度对 PDAM 标记的影响:

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

标记产率通过反相 HPLC 进行分析。

结果见图 10, 其中 y 轴是标记百分数, x 轴是以 $^{\circ}$ C 表示的反应温度。

非常重要的是, 即使在室温(25 $^{\circ}$ C)也观察到有 ODN 的标记。25 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟后, 标记的产率大约为 25%。温度高于 50 $^{\circ}$ C, 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 是有效的和灵活的。

实施例 20: 用标记试剂间-bioPMDAM(3a) 标记和片段化 PCR 扩增得到的 DNA 扩增子:

间-bioPMDAM(3a) 衍生物是按照实施例 1.1 描述的反应流程制备的。

DNA 扩增子是按照实施例 5.1 描述的方法通过 PCR 扩增制备的。

实施例 20.1: 经片段化和未经片段化标记效果的比较:

a: 在片段化条件下的标记:

将 50 μ l 甲酸钠(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。溶液在 60 $^{\circ}$ C 温育 30 min。

b: 未经片段化的标记:

将 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。溶液在 60 $^{\circ}$ C 温育 30 min。

其他方法与实施例 17 相同。

结果:

所用方法	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 15: 经片段化和未经片段化标记效果的比较

表 15 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)大大高于未片段化的,并且具有很好的同源性百分数。因此两个步骤结合确实可以明显改善大于 100 核苷酸长的核酸的检测。

实施例 20.2: 在 DNA 芯片上杂交前变性的影响:

分别在两个试管中平行进行两个标记反应,方法如下:将 50 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 温育 30 min。

在色谱柱上纯化后(实施例 17),第一管所得到的溶液在 95°C 温育 10 min(为了使开 DNA 双链不成对),然后将试管浸在 0°C 的冰-水中直到在 DNA 芯片上杂交。

第二管所得到的溶液不预先变性而直接在 DNA 芯片上杂交。

与 DNA 芯片表面的捕获探针杂交的生物素化的片段通过引入标记 PE 的链霉抗生物素蛋白显示,反应条件如实施例 17 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 16: 在 DNA 芯片上杂交前变性的影响

所得到的结果列在表 16 中,杂交前变性所得到的结果要高于未变性的。这说明 DNA 变性是必需的,以得到良好的强度水平。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 与捕获探针杂交的能力。

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,采用甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM)片段化以及杂交前变性步骤。

实施例 21: 以一步方案用生物素化的试剂标记和片段化 PCR 扩增子:

按照实施例 1.1, 1.2 和 1.3 描述的方案制备间-bioPMDAM、邻-bioPMDAM 和对-bioPMDAM。它们都溶于无水 DMSO 中,浓度为 100 mM。

方案与上述实施例 20.2 所描述的相同(经过杂交前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 17: 以一步方案用生物素化的试剂标记和片段化 PCR 扩增子

用优化的方案以一个步骤进行片段化和标记得到极佳的结果, 含有活性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 17 中所示。

实施例 22: 用 BioDPDAM 标记和片段化 DNA:

按照实施例 5.1 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。

方案与实施例 20.2 所述的相同, 包括在杂交前 95°C 变性。

结果:

使用的标记物	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
BioDPDAM	93.0	32359	3610	9.1

表 18: 用 BioDPDAM 标记和片段化 DNA

表 18 描述的结果说明, 用与苯基同样重要的基团取代也可优化携带叠氮甲烷功能基团标记试剂的反应性。

实施例 23: 用 5-(溴甲基) 荧光素标记和片段化 DNA:

按照实施例 5.1 所描述的方法通过 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。

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

纯化条件与实施例 17 的相同。变性步骤按实施例 20.2 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 描述的相同。荧光素可以在阅读器上直接检测。

所用的方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
用 5-(溴甲基) 荧光素标记和片段化 PCR 扩增子	>95	855	183	4.7

表 19: 用 5-(溴甲基) 荧光素标记和片段化 DNA

表 19 中的结果说明, 通过产生脱碱基位点的 DNA 片段化完全适合于携带活性

卤烷基功能基团的标记试剂。试验以一个步骤进行(片段化和标记),但是标记的强度比用携带叠氮甲基功能基团的标记物要低。

实施例 24: 在另一种衍生于菲咯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 5.1 所描述的方法通过 PCR 扩增制备 DNA 扩增子。使用的两种类型的条件:

条件 a:

将 20 μ l 菲咯啉-FeSO₄ 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, 混合物在 95°C 温育 60 min。

条件 b:

将 50 μ l 甲酸钠缓冲液(pH 3, 100mM 溶于纯水中)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, 混合物在 95°C 温育 60 min。

其他条件与实施例 17 相同。

条件	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
菲咯啉-FeSO ₄ (5mM) 间-BioPMDAM(2mM) 60min, 95°C	>95	2236	500	4.5
甲酸钠缓冲液(pH 3, 50mM) 间-bioPMDAM(2mM) 60min, 95°C	>95	6786	565	12.0

表 20: 在菲咯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 20 所示。

最好的结果是用酸性 pH 下片段化的条件(b)得到的。

实施例 25: 通过掺入 d-UTP-荧光素标记的 PCR 扩增子的片段化:

标记核苷酸的掺入

按照下面的方案进行 PCR 扩增以产生有荧光素标记的 PCR 扩增子(标记在碱基上)。

以 16S 结核分枝杆菌基因组 DNA 靶(10⁺⁴拷贝)为起始, 用 Roche 的 Fast Start 试剂盒, 加入 0.2 mM 的脱氧核糖核苷酸 d-ATP、d-CTP 和 d-GTP, 以及 0.14 mM d-TTP

和 0.06 mM dUTP-12-荧光素, 0.3 μ M 的引物和 0.4 μ l 的酶。标记核苷酸占其天然同源物 d-UTP 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, 参考目录 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 温育 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 温育 30 min。这个试验与参考方案一致, 因此有可能通过省去由于扩增步骤造成的易差异性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在 95°C 进行, 如实施例 17 所述。

方案(a1):

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

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期间掺入生物素活化的抗荧光素抗体(参考目录 216-065-084, Jackson ImmunoResearch)进行, 然后加入 PE 标记的链霉抗生物素蛋白, 所用的连续条件如下:

- 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 链霉抗生物素蛋白-PE (300 μ g/ml)。

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

方案(b):

在 DNA 芯片上杂交的生物素化的片段(条件 b)通过引入标记 PE 的链霉抗生物素蛋白显示, 所用条件如下:

- 300 μ l 纯水, 和
- 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 标记的链霉抗生物素蛋白(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软件 (GeneChip® Instrument System 和 GeneChip® Information System, Santa Clara CA) 进行阅读。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:

- 按照方案 a1 或其他方法仅标记 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:
 - 按照方案 a2 用 d-UTP-荧光素标记信号的放大, 或
 - 按照方案 b 在片段化期间用间-bioPMDAM 标记。

在两种情况下显示都是用 PE 进行的, 使用过滤器可以省去荧光素产生的信号, 确保被检测到的是 PE 信号。

结果

所用方案	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-荧光素标记的 PCR 扩增子的片段化	PE*	>95	22107	3461	6.4
经 d-UTP-荧光素修饰和间-bioPMDAM 标记的相同 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 21: 通过掺入 d-UTP-荧光素标记的 PCR 扩增子的片段化

上面表 21 所显示的结果表明, 利用产生脱碱基位点的方法进行的化学片段化适合于 DNA 扩增子的酶促标记, 标记可在片段化前进行。

通过酶促掺入荧光团得到的信号强度水平和同源性百分数要低于在片段化期

间用含有叠氮甲基功能基团的标记试剂如间-bioPMDAM(条件 b)标记得到的信号强度水平和同源性百分数。

为到与用-bioPMDAM 衍生物标记得到的信号强度水平就需要信号放大步骤(条件 a2)。这表明叠氮甲基活性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(参见方案(b))所达到的效率相对应。

实施例 26: 用超声法使双链 DNA 片段化:

用实施例 5.1 所描述的方法得到 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 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于 DMSO 中)加入到 10 μ l PCR 产物中。用纯水将体积调整到 100 μ l, pH 调节到 6.5。混合物在超声容器(频率 35 kHz, 型号 T460-H, Bioblock, France)浴中 60°C 温育 30 min。

b. 在 PCR 扩增子的化学片段化期间标记(一步法参考方案):

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, 溶液在 60°C 温育 30 min。

试验从两份平行进行以便能在凝胶上分析 DNA 的片段化, 并通过 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 17 有关 PE 的检测)。

凝胶分析

分析采用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×TBE)。

凝胶分析表明经过 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 22: 用超声法使双链 DNA 片段化

表 22 的结果说明, 在超声期间的标记(条件 a)是令人满意的。这说明通过超声将 DNA 进行物理片段化适合于用携带叠氮甲基功能基团的标记试剂标记。

本试验中出现弱的标记结果可能是由于超声的作用下导致标记物降解。而通过酸性 pH 的作用产生脱碱基位点的片段化则结果更好。

实施例 27：以一步法标记、片段化及变性 DNA

按照实施例 5.1 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 下以一步法标记、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 标记物 (100 mM, 溶于 DMSO 中) 加入到 10 μ l PCR 产物中。终体积调整到 100 μ l, 溶液在 95°C 温育 30 min。本试验中反应混合液不经过预先纯化就在 DNA 芯片上杂交。

b. 60°C 下标记和片段化：

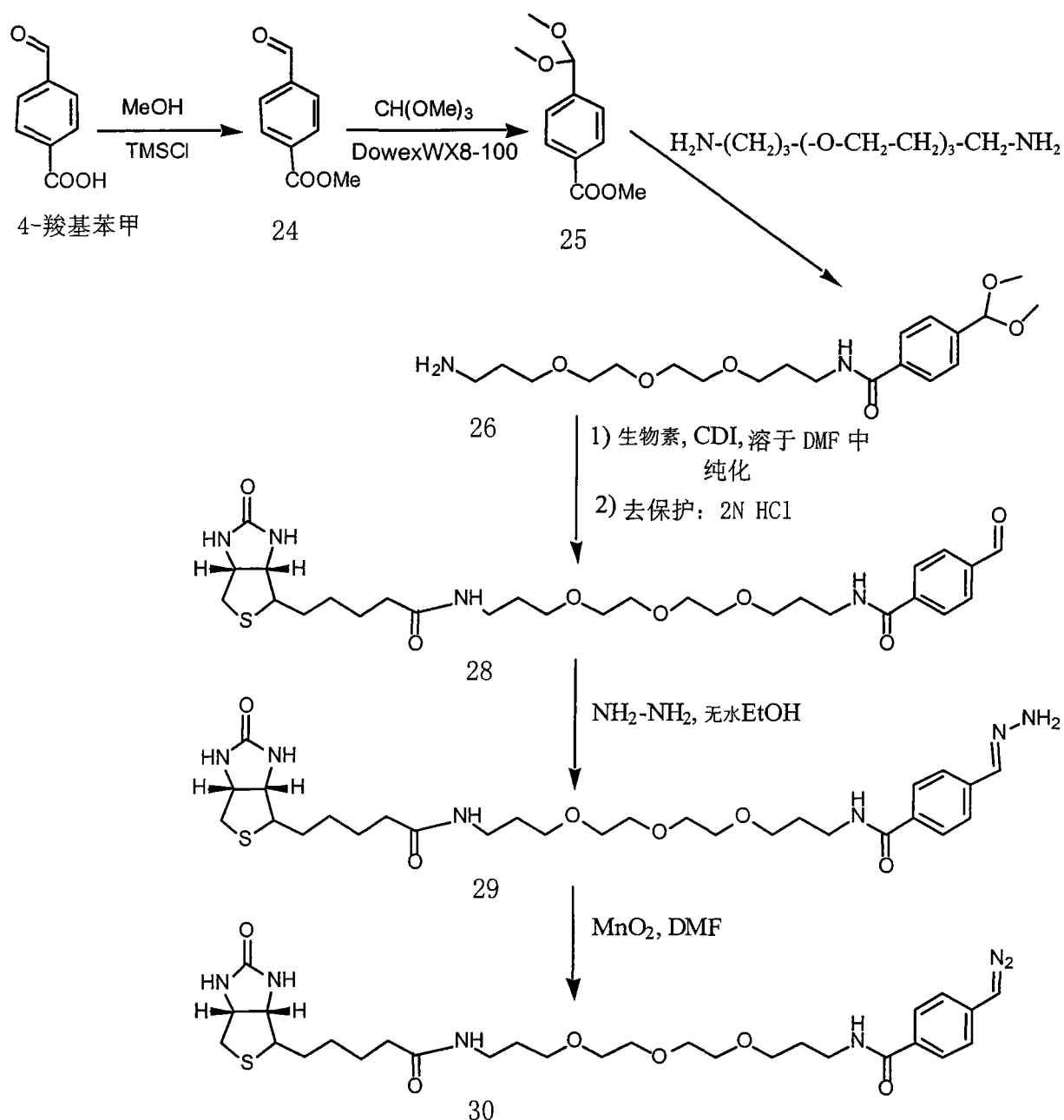
将 50 μ l 甲酸钠缓冲液 (pH 3, 50mM) 和 2 μ l 间-BioPMDAM 标记物 (3d) (100 mM, 溶于 DMSO 中) 加入到 10 μ l PCR 产物中。终体积调整到 100 μ l, 溶液在 60°C 温育 30 min。然后反应混和液按照上面所描述的方法纯化。本试验中在 DNA 芯片上杂交前, 按照实施例 20.2 描述的方法使片段变性。

结果

所用方案	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 23: 以一步法标记、片段化及变性 DNA

实施例 20.2 证明了变性对于双链 DNA 检测敏感性的重要性。表 23 中的结果表明, 用通过产生脱碱基位点的片段化方法, 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改进, 并且不会影响检测的敏感性。



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(3g; 20mmol)溶于含有三甲基甲硅烷基氯(10 g; 92mmol)的100ml MeOH溶液中。混合物在室温搅拌40 h。蒸发后分离白色固体为4-甲氧基羧基苯甲醛24, 用NMR鉴定, 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-H₂, ₆), 7.92 (d, 2H, J=8 Hz, Ar-H₃, ₅); 3.93 (s, 3H, CO-O-CH₂)。

4-甲氧基羧基苯甲醛的保护:

在有Dowex 50WX8-100 (1 g)的情况下, 4-甲氧基羧基苯甲醛(3.35 g; 20 mmol)用三甲基原甲酸酯(4.8 g; 40 mmol)溶解。混合物在回流下加热2 h, 然后过滤并蒸发。经过重结晶试验后, NMR分析表明反应是不完全的, 因此重新在30 ml MeOH,

30 ml $\text{CH}(\text{Ome})_3$ 和1 g Dowex 50WX8-100中室温下反应。然后过滤和蒸发得到3.55 g (16.89 mmol, 84%)的产物25。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ =8.01 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$); 7.50 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 5.41 (s, 1H, CH); 3.93 (s, 3H, $-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$); 3.29 (s, 6H, $-\text{O}-\text{CH}_3$)。

化合物26

化合物25 (3.1 g; 14.8 mmol)溶于16 ml (73 mmol) 4, 7, 10-三噁-1, 13-三癸二胺中。溶液在140-150°C 加热2 h。然后将混合物溶于100 ml DCM (二氯甲烷或 CH_2Cl_2)，用10 ml水洗涤6次。有机相通过 MgSO_2 干燥，然后蒸发直到获得油性物。将这种油性物用倾泻法连续用戊烷洗涤3次，然后用DCM和水抽提。经过 MgSO_2 干燥和蒸发后分离出产物26，产率为63% (9.27 mmol)。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 7.78 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$); 7.46 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 5.39 (s, 1H, CH); 3.62-3.47 (m, 14H, $\text{H}_{7',8',10',11'}$ 和 $\text{H}_{5',13'}$ 和 $\text{H}_{3'}$); 3.29 (s, 6H, $-\text{O}-\text{CH}_3$); 2.72 (m, 2H, $\text{H}_{15'}$); 1.87 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$); 1.64 (m, 2H, $\text{H}_{14'}$); 1.30 (宽s, 2H, NH_2)。

生物素化的化合物27:

将生物素 (500 mg; 2.05 mmol)悬浮于10 ml DMF中，然后加入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，然后一点一点地加到上述溶液中。混合物在室温持续搅拌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至干，得到1.00 g 油性物，产率约为50%。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 9.50 (宽s, 1H, $\text{NH}_{\text{咪唑}}$); 7.80 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$); 7.64 (s, 1H, $\text{H}_{\text{咪唑}}$); 7.46 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$ 和 1H, NH_2); 7.05 (s, 2H, $\text{H}_{\text{咪唑}}$); 6.76 (t, 1H, NH_{16}), 6.20 (宽s, 1H, NH_{B1}); 5.44 (宽s, 1H, N_{HB3}); 5.37 (s, 1H, CH); 4.42 (m, 1H, H_{B6a}); 4.24 (m, 1H, H_{B3a}); 3.59-3.44 (m, 14H, $\text{H}_{7',8',10',11'}$ 和 $\text{H}_{5',13'}$ 和 $\text{H}_{3'}$); 3.29 (m, 8H, $\text{H}_{15'}$ 和 $2-\text{O}-\text{CH}_3$); 3.07 (m, 1H, H_{B4}); 2.84和2.66 (ABX系统, 2H, $^2J_{\text{AB}}=5$ Hz, $^3J_{\text{AX}}=12$ Hz, $^3J_{\text{BX}}=0$ Hz, H_{B6}); 2.13 (t, 2H, $J=8$ Hz, H_{B10}); 1.85 (m, 2H, $\text{H}_{4'}$); 1.66 (m, 2H, $\text{H}_{14'}$); 1.40-1.37 (m, 6H, $\text{H}_{\text{B7, B8, B9}}$)。

醛化合物28:

乙缩醛27溶于50 ml 氯仿中，然后加入20 ml 2N HCl。两相混和物剧烈搅拌15 min。有机相回收，用无水 NaHCO_3 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, CDCl_3) δ = 10.05 (s, 1H, CHO); 7.98 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$); 7.92 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 7.58 (t, 1H, NH_2); 6.46 (t, 1H, NH_{16}), 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, $\text{H}_{7,8,10,11}$ 和 H_5); 3.50-3.29 (m, 4H, $\text{H}_{3,13}$); 3.28 (m, 2H, H_{15}); 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, H_4); 1.72-1.63 (m, 6H, H_{14} , $\text{H}_{B7, B9}$); 1.23 (m, 2H, H_{B8})。

脞化合物29:

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

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ = 7.76 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$); 7.72 (s, 1H, CH); 7.56 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 7.34 (t, 1H, NH_2); 6.45 (t, 1H, NH_{16}); 5.98 (宽s, 1H, NH_{B1}); 5.78 (宽s, 2H, NH_2); 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, $\text{H}_{7,8,10,11}$ 和 H_5); 3.48-3.45 (m, 4H, $\text{H}_{3,13}$); 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} , $\text{H}_{B7, B9}$); 1.21 (m, 2H, H_{B8})。

重氨基化合物30:

将脞化合物29 (357 mg; 0.602 mmol) 溶于17.5 ml DMF中, 然后加入 MnO_2 (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。反应混合物蒸发到干燥。得到的残留油性物用乙醚连续洗三次。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, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.28 (t, 1H, NH_2); 7.77 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{2,6}$); 7.74 (t, 1H, NH_{16}); 7.00 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 6.38 (宽s, 1H, NH_{B1}), 6.32 (宽s, 1H, NH_{B3}); 5.80 (s, 1H, $\text{CH}-\text{N}_2$); 4.27 (m, 1H, H_{B6a}); 4.11 (m, 1H, H_{B3a}); 3.51-3.44 (m, 10H, $\text{H}_{7,8,10,11}$ 和 H_5); 3.37 (m, 2H, H_{15}); 3.32 (m, 4H, $\text{H}_{3,13}$); 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}).

化合物30的反应性用尿嘧啶3'-单磷酸测试,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下至少可以稳定1个月。

实施例29: 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,也就是携带基于聚乙二醇连接臂的PDAM衍生物的主要优点是其可以使叠氮功能基团和生物素保持分离,因而增加了溶解性,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28描述的反应流程得到的。DNA扩增子是按照实施例5.1描述的方法制备的。两种标记反应方法如下。

a. 用对-Bio-EG3-PDAM试剂标记:

将10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77 μ l无DNA酶/RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液是均匀的,没有沉淀。将溶液在95°C温育10 min,然后加入3 μ l 0.1M HCl,溶液于95°C温育10 min。

其余方法与实施例8相同。

b. 用间-BioPMDAM试剂标记:

将10 μ l 间-Bio-EG3-PDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77 μ l无DNA酶/RNA酶的水加入到10 μ l 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温育10 min,然后加入3 μ l 0.1M HCl,溶液于95°C温育10 min。

其余方法与实施例8相同。

结果

所用方案	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

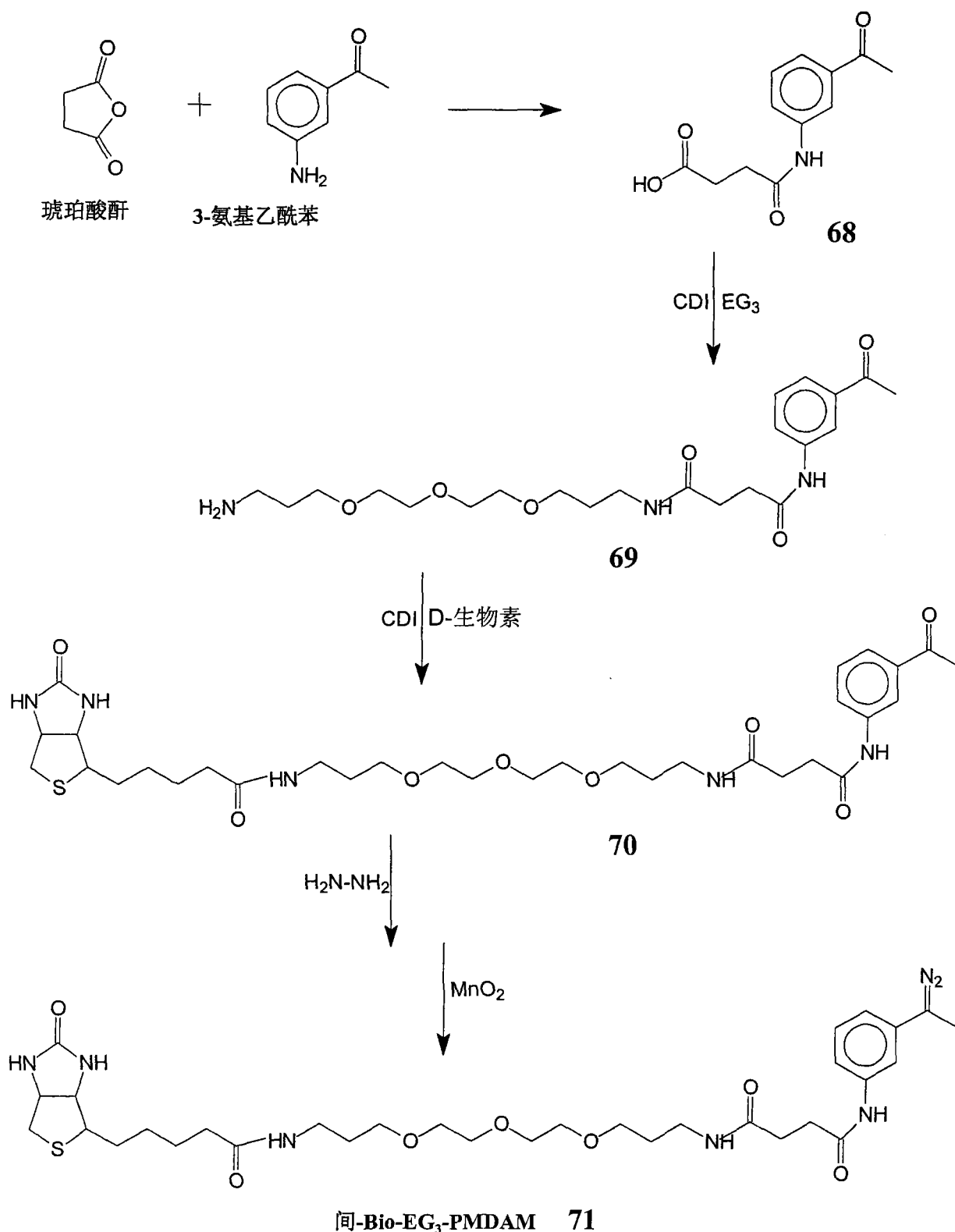
表24: 用对-Bio-EG3-PDAM和间-BioPMDAM标记和片段化DNA扩增子的比较研究

表24中得到的信号强度是很满意的,同源性百分数是高的。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相溶解度。因此试验均一。而且溶解度的增加可以提高标记物的反应性。

实施例30: 其他含有基于聚乙二醇连接臂的PDAM衍生物的合成:

实施例30.1: 间-Bio-EG3-PDAM的合成:

合成流程



化合物68:

3-氨基苯乙酮(14.5 g, 107 mmol)溶于50 ml无水DMF中。加入琥珀酸酐(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。得到粉末状的19.4 g(81%)产物68,

其颜色为米色。

$^1\text{H NMR}$ (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:

在氩气下将5.07 g(22 mmol)化合物68溶于10 ml无水DMF中。混合物置于冰上,加入5.00 g(32 mmol)羰基二咪唑。20min后,缓慢加入20 ml(94.6 mmol)4, 7, 10-三噁十三烷二胺(EG3)。室温反应3小时后,将DMF蒸发掉,残留物收集到100 ml CH_2Cl_2 中。用饱和 NaHCO_3 和水抽提,然后用无水 Na_2SO_4 干燥有机相,蒸发溶剂。由此得到4.34 g(46%)产物69。

$^1\text{H NMR}$ (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)。

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中的羰基二咪唑(CDI)(0.665 g, 4.1 mmol)。15min后,加入溶于2 ml无水DMF中的化合物69(1.8 g, 4.1 mmol)。在35°C反应3 h,然后蒸发DMF,残留物收集到100 ml CH_2Cl_2 中。用饱和 NaHCO_3 和水抽提,然后用无水 Na_2SO_4 干燥有机相,蒸发溶剂。产物的NMR特征表明所得到的是产物70和游离EG₃的混合物。在继续合成前进行另一纯化步骤。

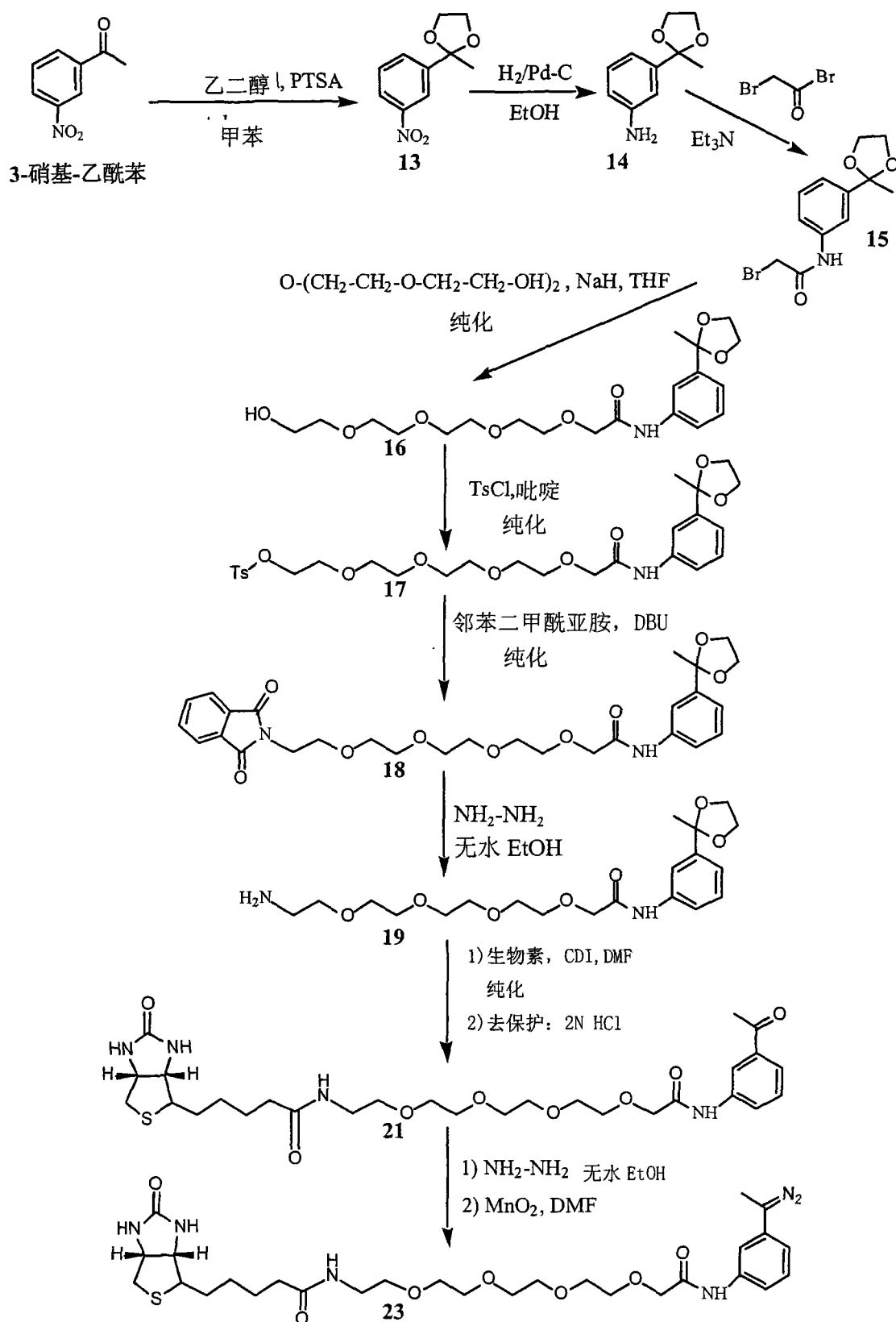
按照实施例1描述的方法两个合成步骤后得到最终的化合物间-Bio-EG₃-PMDAM。

本合成方法的优点有两个。其一,只需两步就得到产物69;这个产物可用作叠氨基的前体通过末端的胺基连接到不同性质的可检测分子上。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,这有利于分析优先连接于乙烯甘油(EG₃)臂的内含物。

本试剂在-20°C下至少稳定1个月。

实施例30.2: 间-Bio-EG₄-PMDAM的合成:

合成流程:



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) 乙二醇和600 mg (3.15 mmol) 对-甲苯磺酸(PTSA)。置于Dean Stark系统中。溶液

在130℃加热3 h。溶液的温度降到室温后，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。蒸发后得到浅黄色固体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_{乙缩醛}); 3.79(m, 2H, H₂C_{乙缩醛}); 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。抽真空后将溶液置于H₂下，持续剧烈搅拌5 h。然后将溶液在热的状态下过滤并蒸发。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_{乙缩醛}); 3.77(m, 2H, H₂C_{乙缩醛}); 1.61(s, 3H, CH₃)。

溴化的化合物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℃下滴加溶于150 ml DCM中的13.8 g(60 mmol)溴乙酰溴溶液。在添加结束时加入100 ml 1N NaHCO₃水溶液。有机相用NaHCO₃水溶液连续洗涤两次并用MgSO₄干燥。蒸发至干后得到22.6 g褐色油性物就是化合物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_{乙缩醛}); 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，然后悬浮于150 ml THF中，在室温下加入四乙二醇(50 ml; 0.29 mol)。溶液持续搅拌15 min，然后冷却到-5℃。

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，然后用500 ml CHCl₃中稀释。有机相用250ml 1N的NaHCO₃水溶液连续洗涤三次，然后蒸发前用MgSO₄干燥。产物在二氧化硅柱(柱直径65 mm)上通过急骤层析纯化，洗脱液为1.5 l 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至干，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_{乙缩醛}); 3.72-3.53(m, 20H, O-CH₂-CH₂-O, H₂C_{乙缩醛}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。然后在室温下加入2.0 g(10.5 mmol)甲苯磺酰氯。混和物在氩气下搅拌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, 然后在与甲苯共蒸发前用MgSO₄干燥。产物通过急骤层析纯化, 色谱柱直径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至干, 得到3.68 g(6.48 mmol)油性物, 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_{乙缩醛}); 3.73-3.54(m, 20H, O-CH₂-CH₂-O, H₂C_{乙缩醛}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℃加热17 h, 然后蒸发。产物在二氧化硅柱(柱直径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至干, 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_{乙缩醛}); 3.69-3.56(m, 20H, O-CH₂-CH₂-O, H₂C_{乙缩醛}和N_{邻苯(phtha)}-CH₂); 1.61(s, 3H, CH₃)。

胺化合物19:

产物18在75-80℃回流下加热溶于20 ml无水乙醇中。然后加入胍(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(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随后的乙缩醛去保护步骤中去除。

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, $\text{H}_2\text{C}_{\text{乙缩醛}}$); 3.69-3.56 (m, 20H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$, $\text{H}_2\text{C}_{\text{乙缩醛}}$ 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。在氩气下加入790 mg(4.87 mmol)羰基二咪唑(CDI)。搅拌10 min后加入稀释在5 ml DMF中的胺19。溶液持续搅拌40 min, 然后在通过急骤层析纯化前蒸发。

所用色谱柱直径为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至干, 得到黄色油性物(1.66 g; 2.6 mmol)。

根据NMR谱可知, 得到的黄色油性物(2.4 g)含有重量约为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约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, NH_{B1}); 5.19 (宽s, 1H, NH_{B3}); 4.45 (m, 1H, H_{B6a}); 4.27 (m, 1H, H_{B3a}); 4.10 (s, 2H, H_3), 4.00 (m, 2H, $\text{H}_2\text{C}_{\text{乙缩醛}}$); 3.75-3.49 (m, 18H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$ 和 $\text{H}_2\text{C}_{\text{乙缩醛}}$); 3.36 (m, 2H, H_{14}); 3.09 (m, 1H, H_{B4}); 2.85 和 2.66 (ABX系统, 2H, $^2J_{\text{AB}}=5$ Hz, $^3J_{\text{AX}}=12$ Hz, $^3J_{\text{BX}}=0$ Hz, H_{B6}); 2.16 (t, 2H, $J=8$ Hz, H_{B10}); 1.61 (s, 3H, CH_3); 1.59-1.3 (m, 6H, $\text{H}_{\text{B9, B8, B7}}$)。

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, $J=8$ Hz, Ar- H_4); 7.66 (d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- H_6); 7.42 (t, 2H, $J=8$ Hz, Ar- H_5); 6.38 (t, 1H, NH_{15}); 5.78 (宽s, 1H, NH_{B1}); 4.96 (宽s, 1H, NH_{B3}); 4.47 (m, 1H, H_{B6a}); 4.29 (m, 1H, H_{B3a}); 4.13 (s, 2H, H_3); 3.76-3.37 (m, 16H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$); 3.32 (m, 2H, H_{14}); 3.11 (m, 1H, H_{B4}); 2.89 和 2.75 (ABX系统, 2H, $^2J_{\text{AB}}=5$ Hz, $^3J_{\text{AX}}=12$ Hz, $^3J_{\text{BX}}=0$ Hz, H_{B6}); 2.59 (s, 3H, CH_3); 2.16 (t, 2H, $J=8$ Hz, H_{B10}); 1.64-1.40 (m, 6H, $\text{H}_{\text{B9, B8, B7}}$)。

脞化合物22:

将酮化合物21溶于20 ml无水乙醇中。混合物在75-80 $^\circ\text{C}$ 回流加热。然后加入胍(816 μl ; 16.81 mmol), 混合物持续搅拌3 h。过滤后将混合物蒸发至干, 残留物

重新溶于乙醇中直到出现厚的白色泡沫。在第二个例子中，将此泡沫溶于50 ml 氯仿中，然后加入20 ml 饱和的NaHCO₃溶液。混合物充分洗涤后回收有机相。用无水Na₂CO₂干燥，过滤蒸发至干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, NH₁₅); 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, H₃); 3.70-3.37(m, 16H, O-CH₂-CH₂-O); 3.32(m, 2H, H₁₄); 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:

将脘化合物22(100 mg; 0.164 mmol)在氩气下溶于1 ml DMF中。加入80 mg活化的MnO₂，混合物持续剧烈搅拌30 min。混合物通过含硅藻土(3cm)-粉状分子筛(1cm)复合层过滤。然后将溶液蒸发至干。在蒸发结束时得到的油性物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%)。

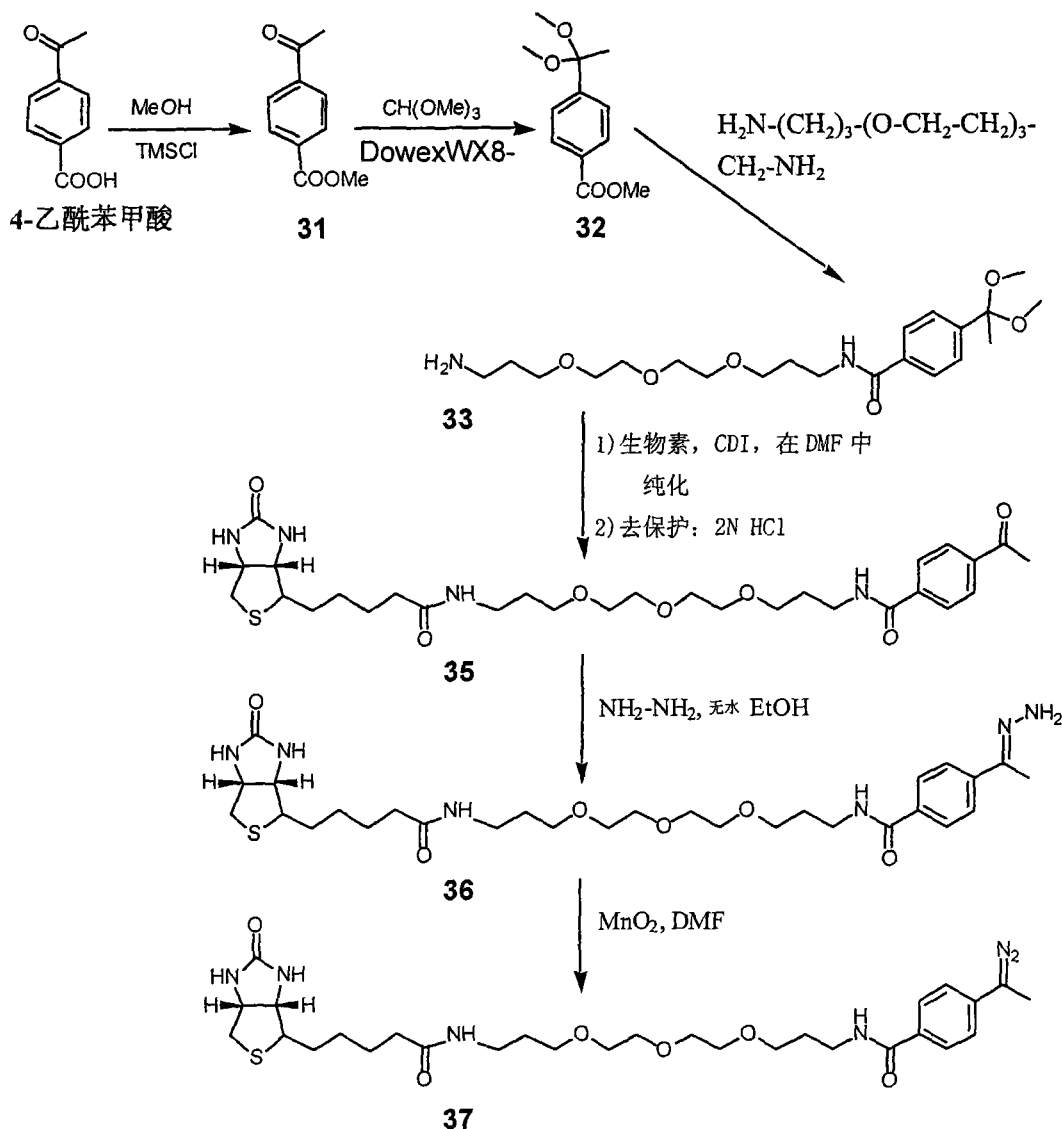
¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ= 9.60(宽s, 1H, NH); 7.89(s, 1H, Ar-H₂); 7.76(t, 1H, NH₁₅); 7.35-7.25(m, 4H, Ar-H_{5, 6}); 6.64(d, 2H, J=8 Hz, Ar-H₄); 6.36(宽s, 1H, NH_{B1}); 6.32(宽s, 1H, NH_{B3}); 4.28(m, 1H, H_{B6a}); 4.08(m, 1H, H_{B3a}); 4.06(s, 2H, H₃); 3.55-3.31(m, 16H, O-CH₂-CH₂-O); 3.17(m, 2H, H₁₄); 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℃的稳定性大于1个月。

实施例30.3: 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)溶于含5 ml MeOH的三甲基甲硅烷基氯化物溶液(TMSCl, 10 g; 92 mmol)中。混合物90℃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- $\text{H}_{2,6}$); 7.59(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 3.18(s, 6H, $-\text{O}-\text{CH}_3$); 1.53(s, 3H, CH_3)。

化合物32:

在有Dowex 50WX8-100(0.3 g)的情况下, 将化合物31(1.21 g; 5.75 mmol)溶于5 ml三甲基原甲酸酯中。混合物60℃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- $\text{H}_{2,6}$); 7.54(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $\text{H}_{3,5}$); 3.89(s, 1H, $\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_3$); 3.16(s, 6H, $-\text{O}-\text{CH}_3$); 1.51(s, 3H, CH_3)。

化合物33:

将化合物32(1.17 g; 5.22 mmol)溶于5 ml(22.7 mmol)4, 7, 10-三噁-1, 13-十三烷二胺中。得到的溶液140°C加热4 h。然后将混合物溶于30 ml DCM中, 用10 ml 水洗涤三次。有机相用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H_{3'}); 3.15(s, 6H, -O-CH₃); 2.73(m, 2H, H_{15'}); 1.88(m, 2H, H_{4'}); 1.65(m, 2H, H_{14'}); 1.38(宽s, 2H, NH₂)。

生物素化的化合物34:

将生物素(780 mg; 3.19 mmol)悬浮于13 ml DMF中。然后加入590 mg(3.60 mmol)CDI。溶液在室温持续搅拌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持续搅拌1 h。蒸发DMF后, 通过急骤层析纯化, 色谱柱直径为35 mm, 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至干, 得到1.05 g 油性物, 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, NH_{16'}); 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H_{3'}); 3.28(m, 2H, H_{15'}); 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, H_{4'}); 1.69(m, 2H, H_{14'}); 1.49(s, 3H, CH₃); 1.42-1.39(m, 6H, H_{B7, B8, B9})。

化合物35:

乙缩醛34溶于45 ml氯仿中, 然后加入10 ml 2NHCl。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状态的化合物35(504 mg; 0.87 mmol), 按照生物素计算总产率为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, NH_{16'}), 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H_{5'}); 3.48-3.46(m, 4H, H_{3', 13'}); 3.27(m, 2H, H_{15'}); 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, H_{4'}); 1.72-1.61(m, 6H,

$H_{14'}$, $H_{B7, B9}$); 1.40(m, 2H, H_{B8})。

脘化合物36:

将酮化合物35(500 mg; 0.864 mmol)溶于11 ml 无水乙醇中。加入脘(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溶于无水乙醇中以便再次蒸发。得到黏性泡沫状产36物(488 mg; 0.823 mmol), 产率为95%。
 $^1\text{H NMR}$ (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, $\text{NH}_{2'}$); 6.46(t, 1H, $\text{NH}_{16'}$), 5.98(宽s, 1H, NH_{B1}); 5.55(宽s, 2H, NH_2); 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 H_5); 3.47-3.45(m, 4H, $H_{3', 13'}$); 3.27(m, 2H, $H_{15'}$); 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, CH_3), 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37:

将脘化合物36(200 mg; 0.337 mmol)溶于5 ml DMF中。加入 MnO_2 (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。反应混合物蒸发至干。得到的残留油性物用乙醚连续洗三次, 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%。

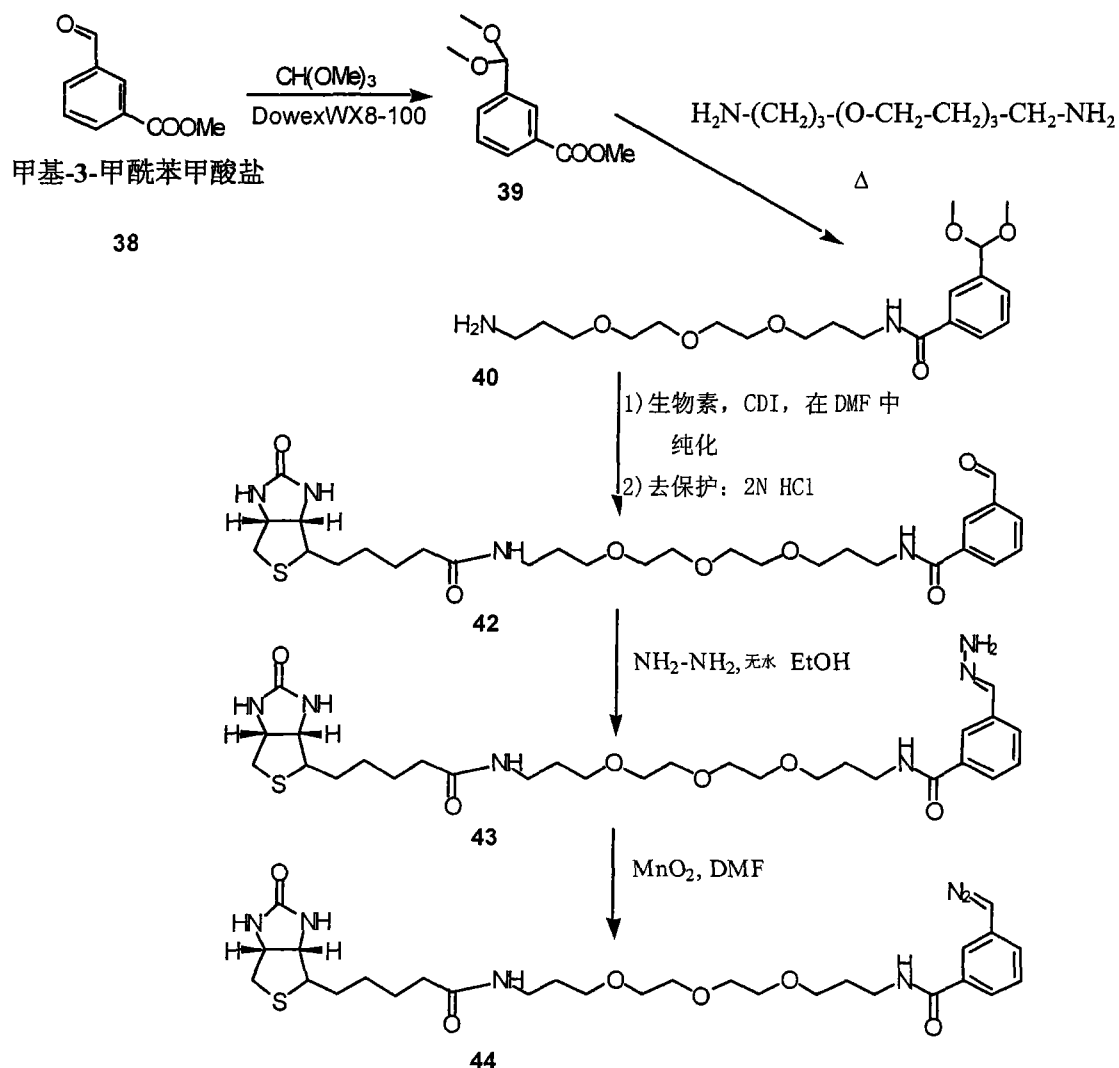
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 8.33(t, 1H, NH_2); 7.83(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $H_{2, 6}$); 7.73(t, 1H, $\text{NH}_{16'}$); 6.98(d, 2H, $J=8$ Hz, Ar- $H_{3, 5}$); 6.39(宽s, 1H, NH_{B1}); 6.33(宽s, 1H, NH_{B3}); 4.30(m, 1H, H_{B6a}); 4.12(m, 1H, H_{B3a}); 3.51-3.45(m, 16H, $H_{7', 8', 10', 11'}$ 和 H_5 ,和 $H_{15'}$,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, CH_3); 2.04(t, 2H, $J=8$ Hz, H_{B10}); 1.77(m, 2H, H_4); 1.62-1.48(m, 6H, $H_{14'}$, $H_{B7, B9}$); 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°C的稳定性至少为1个月。

实施例30.4: 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)溶于25 ml MeOH 和 25 ml 三甲基原甲酸酯中,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 $\text{CH}(\text{OMe})_3$ 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%。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 8.10(s, H, Ar- H_2); 7.9(d, H, J =8 Hz, Ar- H_4); 7.63(d, H, J =8 Hz, Ar- H_6); 7.42(t, H, J =8 Hz, Ar- H_5); 5.40(s, 1H, CH); 3.90(s, 3H, -CO-O- CH_3); 3.31(s, 6H, -O- CH_3)。

化合物40:

将化合物39(2 g; 9.5 mmol)溶于10.4 ml(47.6 mmol)4, 7, 10-三噁-1, 13-三烷二胺中。得到的溶液在165 $^\circ\text{C}$ 加热2h。然后将混合物溶于80 ml DCM中, 用20ml 水洗涤4次。用 MgSO_4 干燥和蒸发后分离出产物40(2.27 g; 5.69 mmol), 产率为60%。
 $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ = 7.84(s, H, Ar- H_2); 7.75(d, H, J =8 Hz, Ar- H_4);

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H₅, 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).

生物素化的化合物41:

将D-生物素(344 mg; 1.40 mmol)悬浮于4 ml DMF中。然后加入250 mg(1.54 mmol) CDI。溶液在室温持续搅拌30 min。化合物40(616mg; 1.54mmol)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, 色谱柱直径为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至干, 得到740mg 油性物, 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H₅, 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}, H_{B8}, H_{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, 得到淡黄色油性状的化合物42(593 mg; 1.02 mmol), 按照生物素计算在产率为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-H₄); 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H₅); 3.50-3.29(m, 4H, H₃, 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}, H_{B9}); 1.23(m, 2H, H_{B8})。

脎化合物43:

将醛化合物42(593 mg; 1.02 mmol)溶于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用乙醚

磨碎直到得到米色粉末状产物43(404 mg; 0.68 mmol), 产率为66%。通过急骤层析纯化, 色谱柱直径为15 mm, 上样量为150 mg(0.253mmol), 洗脱液为200 ml MeOH-DCM 20%。各组分混和后蒸发至干, 得到144mg 产物43, 产率为76%。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) 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, H₇, ₈, ₁₀, ₁₁ 和H₅); 3.48-3.45(m, 4H, H₃, 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}, H_{B9}); 1.21(m, 2H, H_{B8})。

叠氮化合物44:

将脘化合物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。反应混合物蒸发至干。得到的残留油性物用乙醚连续洗三次, 得到橙色固体化合物44(290 mg, 0.491 mmol)呈粉红色固体状, 产率为83%。

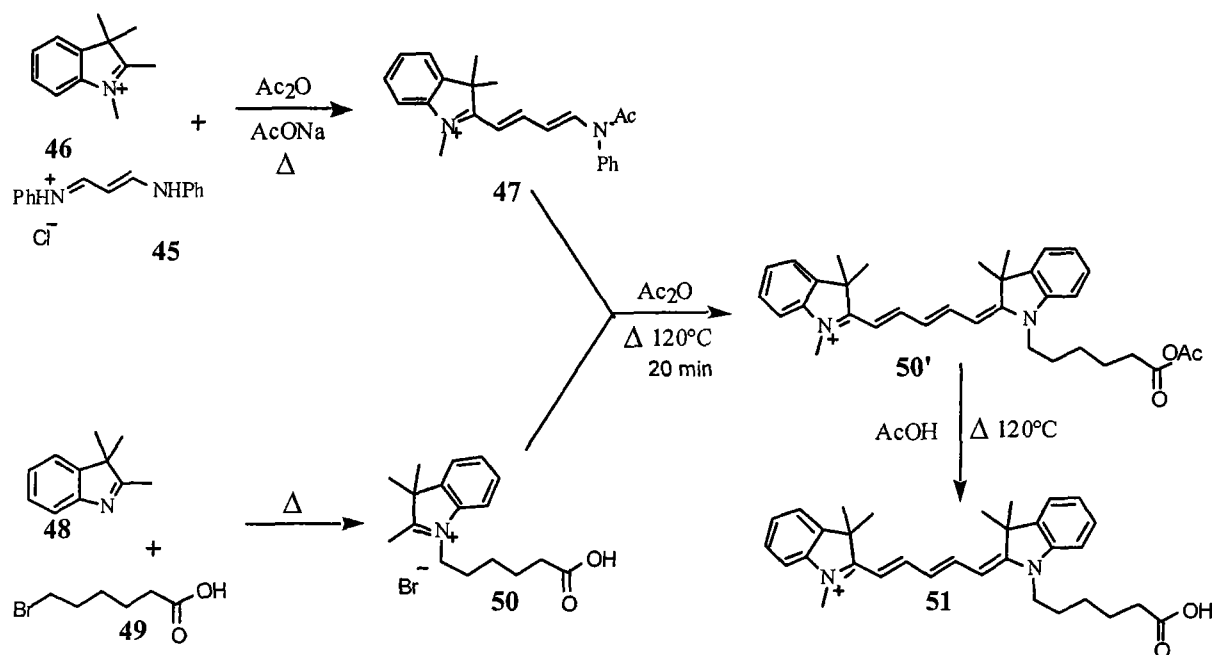
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ =8.39(t, 1H, NH₂); 7.78(t, 1H, NH₁₆); 7.39-7.34(m, Ar-H); 7.09(d, Ar-H); 6.38(宽s, 1H, NH_{B1}); 6.32(宽s, 1H, NH_{B3}); 5.78(s, 1H, CH-N₂); 4.27(m, 1H, H_{B6a}); 4.11(m, 1H, H_{B3a}); 3.51-3.44(m, 10H, H₇, ₈, ₁₀, ₁₁ 和H₅); 3.37(m, 2H, H₁₅); 3.32(m, 4H, H₃, ₁₃); 3.05(m, 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}, H_{B9}); 1.25(m, 2H, H_{B8})。

产物在-20°C下稳定性大于1个月。

实施例31: 对-Cy5-EG3-PDAM的合成:

如实施例2已提及的, 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: 反荷离子I⁻不在结构式46, 47, 50'和51中表示。



2-[4-(N-乙酰基-N-苯基氨基)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)一氢氯化物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),然后将沉淀的棕色固体过滤,用乙醚(3 × 100 ml)洗涤。固体重新溶于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:

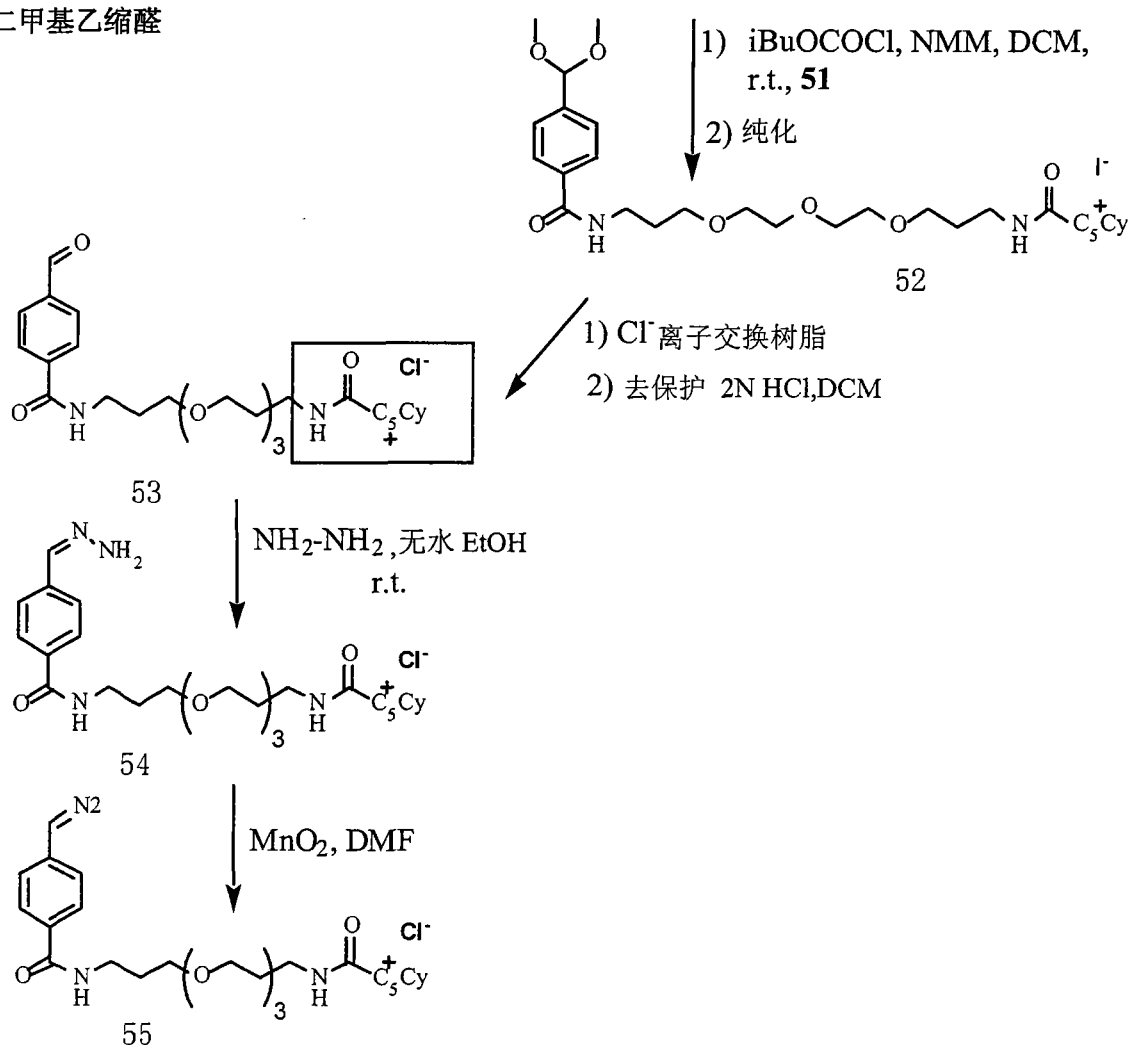
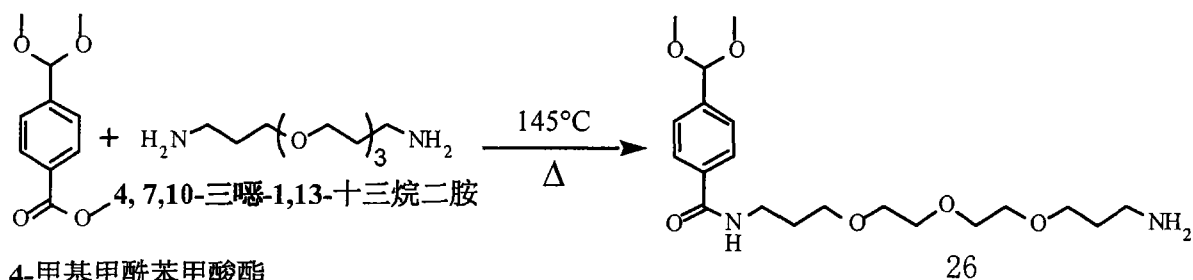
2,3,3-三甲基吲哚 48(10.0 g; 62.8 mmol)和6-溴己酸49(12.3 g; 62.8 mmol)不加溶剂混和,在氩气下110°C加热12 h。紫红色的浆糊状混合物用乙酸乙酯(2 × 60 ml,浆糊状物质用刮刀研磨,倾析出上清液)洗涤,然后用丙酮(50 ml,浆糊状物固化)洗涤。将粉红色固体过滤并在真空下干燥(16.0 g; 73%)。

Cy5C00H 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)的混合物在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。然后将其溶于15ml醋酸中,120°C搅拌30 min。加入200ml乙醚并在烧结玻璃上过滤后得到与产物51相应的沉淀物(2.71 g; 4.44 mmol),产率为84

%

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): 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 - CH_2); 3.68 (s; 3H; NCH_3); 2.47 (t; 2H, J =7; 7 Hz; ε - CH_2); 1.71 (m; 18H; CH_3 , β , γ 和 δ - CH_2).



化合物26与Cy5COOH 51的偶合(产物52):

N-甲基吗啉(NMM, 405 μl , 3.68 mmol)加入到溶于15 ml CH_2Cl_2 的Cy5COOH 51(1.5 g; 2.46 mmol)溶液中。溶液在冰浴中冷却, 放置于氩气下, 然后加入异丁基氯甲

酸盐(494 μ l, 3.81 mmol)。搅拌10 min后, 加入稀释于8ml CH_2Cl_2 中的胺26(1.86 mg; 4.67 mmol)。混合物在室温持续搅拌1 h 30 min。加入20 ml CH_2Cl_2 , 混合物用25 ml 的 NaHCO_3 (1N)连续洗涤3次。用 Na_2CO_3 干燥后, 过滤溶液以回收蒸发的二氯甲烷相。

通过急骤层析 纯化, 色谱柱直径为45mm, 20ml组分。洗脱液为MeOH-DCM 10%。产物52相应的组分混和后蒸发至干得到蓝色固体, 将其溶于 CH_2Cl_2 。然后沉淀产物52, 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(磺化物)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至干后得到黏性油状物, 将其重新溶于 CH_2Cl_2 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 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 NaHCO_2 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%。

脎54:

将醛化合物53(200 mg; 0.247mmol)溶于1 ml 无水乙醇中, 加入一水合脎(15.6 μ l; 0.321 mmol), 溶液在室温搅拌30min。加入8 ml 乙醚; 混合物通过液析用乙醚连续洗涤三次, 然后在真空下干燥。得到172mg脎54(0.209 mmol; 85%产率), 储存在冰箱中。

叠氮55:

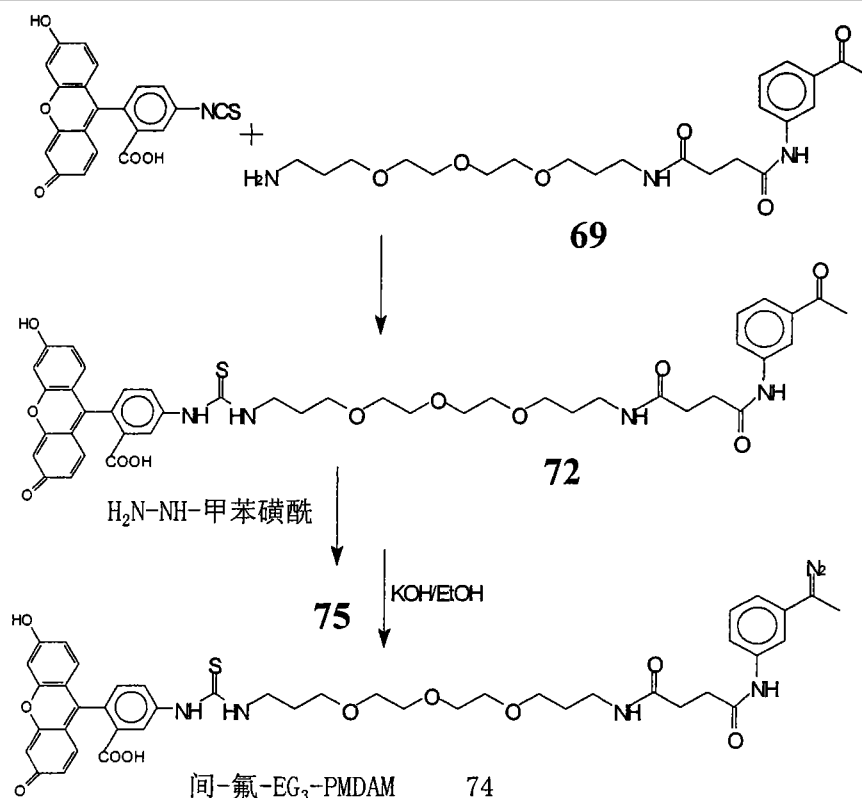
将100mg MnO_2 加入到溶于2 ml DMF中的20 mg(0.243 mmol)脎化合物54溶液中, 混合物在室温氩气下剧烈搅拌5 min。悬液通过一层硅藻土(厚度2 cm)和 3 Å(0.5 cm)粉末状分子筛过滤, 然后用DMF洗涤。溶液蒸发后残留物用乙醚磨碎, 干燥得到的固体, 得到18mg(0.185 mmol; 76%)叠氮55。

试剂在-20°C下稳定性大于1个月。

实施例32: 间-氟-EG3-PMDAM的合成:

如实施例23和25已提及的, 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。然后加入溶于1.6 ml 无水DMF中的产物69(0.356 g, 0.81 mmol)。混合物在室温反应3.5 h, 然后蒸发DMF, 残留物溶于25 ml水中。然后用50 ml CH₂Cl₂抽提三次, 蒸发水相。得到255mg(48%)产物72。

间-氟-EG₃-脞-甲苯磺酰化合物75:

在回流下将化合物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-脞(69.2 mg, 0.37 mmol), 混合物反应6 h。将混合物蒸发至干, 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:

将脞75(176 mg, 0.18 mmol)溶于720μl 10% KOH (含无水甲醇)溶液中。溶液在回流下保持3 h。溶液冷却后出现沉淀, 过滤溶液并蒸发至干。残留物用乙醚洗涤并干燥。

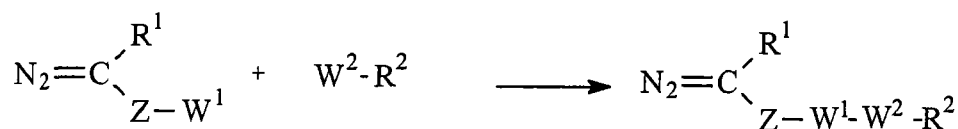
NMR分析结果表明, 在2.36 和 2.13ppm(对应于甲苯磺酰和脞的甲基)处信号消

失，而在1.96 ppm(对应于叠氮的甲基)处出现一个峰。

实施例33: 制备叠氮甲基中间体以进行随后的标记:

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利。在这种情况下，含有叠氮甲基官能团的标记试剂是被预先功能化了的，就是说其也含有能随后与直接或间接标记物反应的化学官能团。预先功能化可以通过将一个活性的共价官能团引入到标记试剂中，该标记试剂可以与直接或间接标记物的抗活性共价官能团反应。这些官能团包括亲电子的有机化学官能团和亲核的有机化学官能团，或者相反。

这种标记策略的一个实施例在下面流程图中说明。



其中除了叠氮官能团外，标记试剂还含有一个亲电子或亲核的官能团W¹，该基团能与含有官能团W²的标记物R²反应，W²与W¹互补。

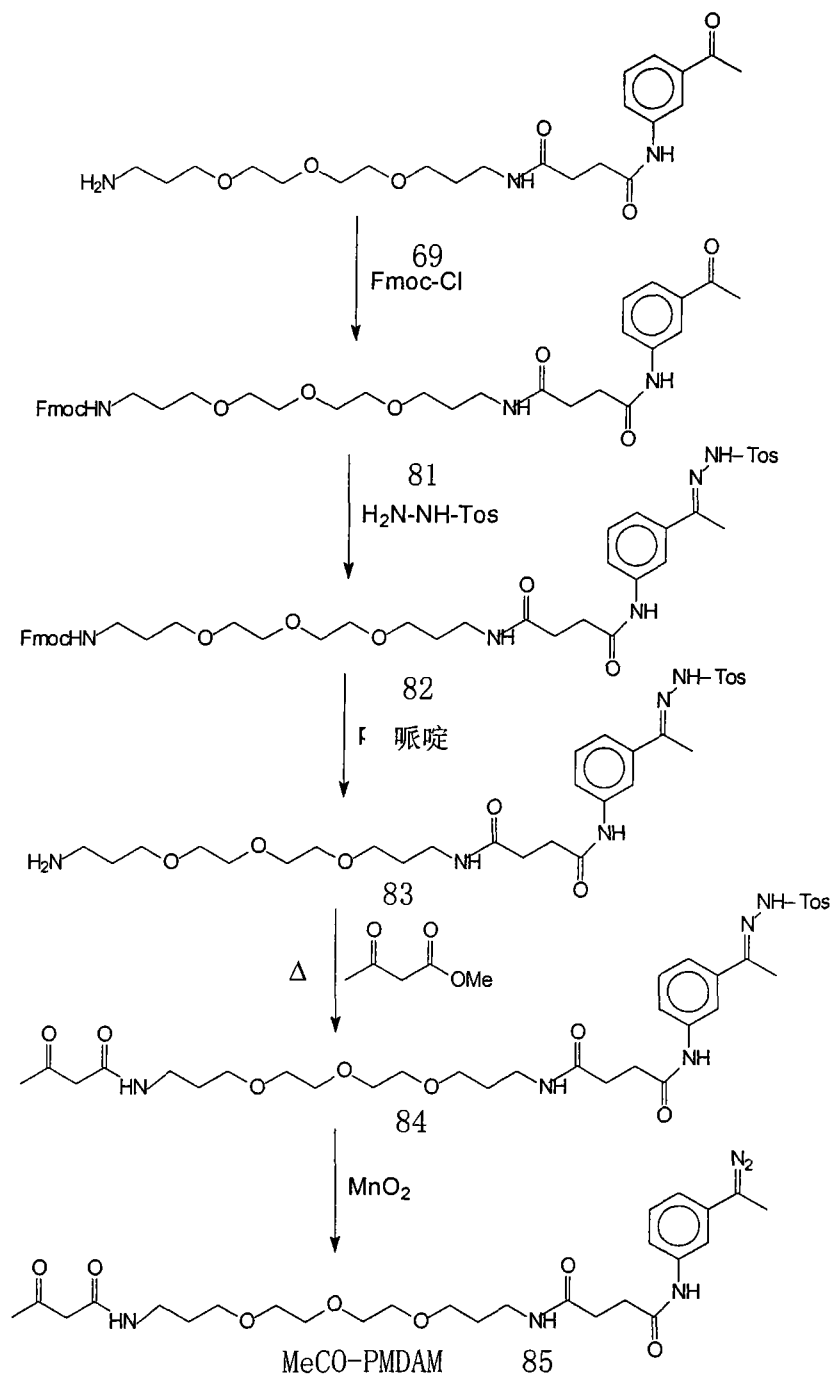
例如，如果W¹是甲基酮或醛官能团，W²就是烷氧胺官能团。

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官能团的标记试剂接触，然后标记物W²-R²通过官能团W¹与核酸反应。

例如，这些用途之一是扩增一段核酸序列的方法或信号放大的方法。这种类型的标记的其他信息见专利申请W0-A-98/05766，其优先申请日为1996年8月2日，以及专利申请W0-A-00/40590，其优先申请日为1999年1月5日。

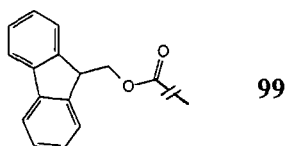
实施例33.1: MeCO-PMDAM的合成:

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官能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官能团，该基团随后用于引入一种具有烷氧胺基团的可检测分子(荧光素，生物素)。

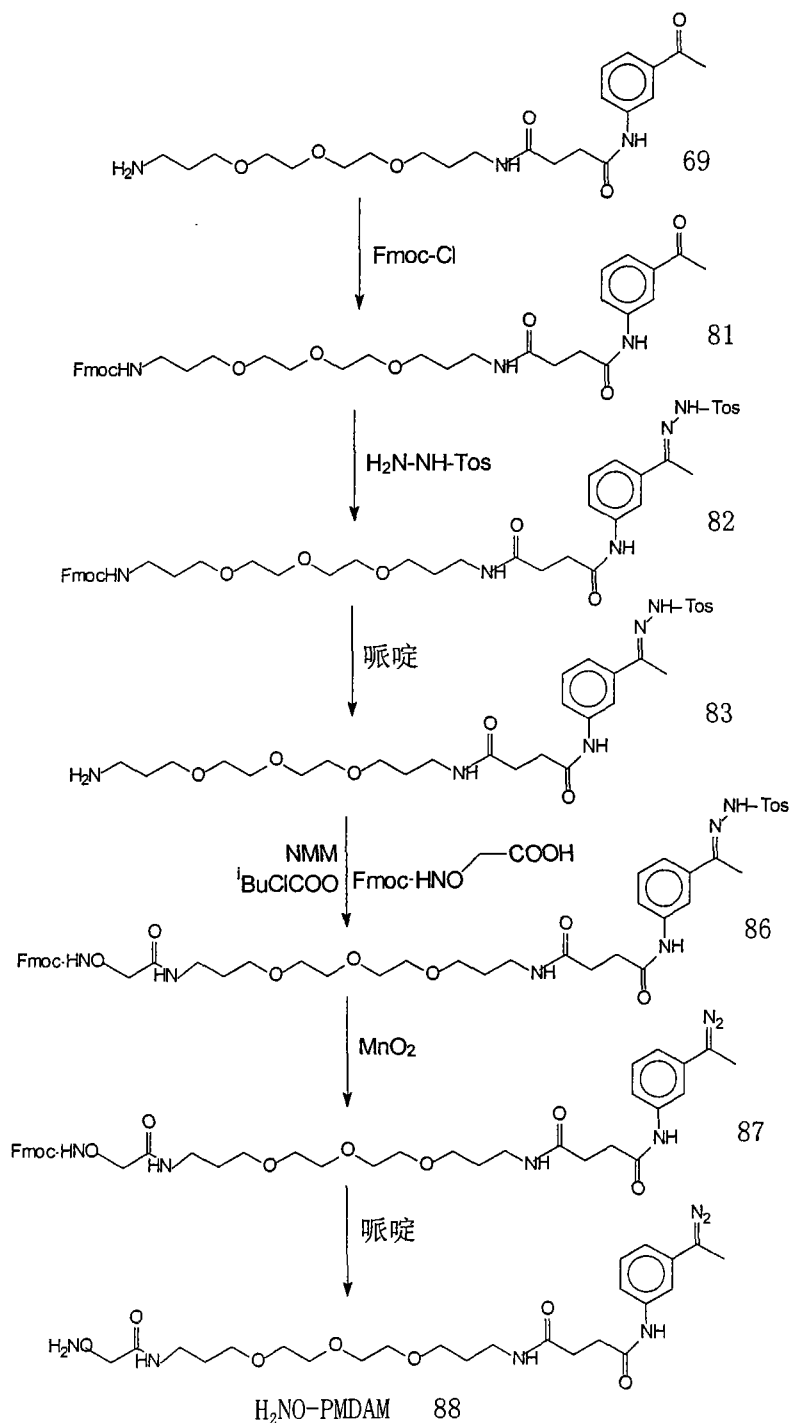
该合成是基于化学中常用的已知方法。起始材料与标记物71和74合成所用的材料相同。第一步包括用芴甲基甲酸酯(Fmoc, 99)保护末端胺。选择这个保护基团是基于其稳定性和裂解条件。



用前面使用的方法(间-氟-EG3-PMDAM实施例)形成保护的脞82后,末端胺在温和碱性条件下去保护以确保脞的稳定性。甲基乙酰乙酸用于产生甲基酮官能团,通过末端胺的乙酰化反应(见化合物26和36的形成)。叠氮甲基的形成是按照述方法进行的。

实施例 33.2: 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

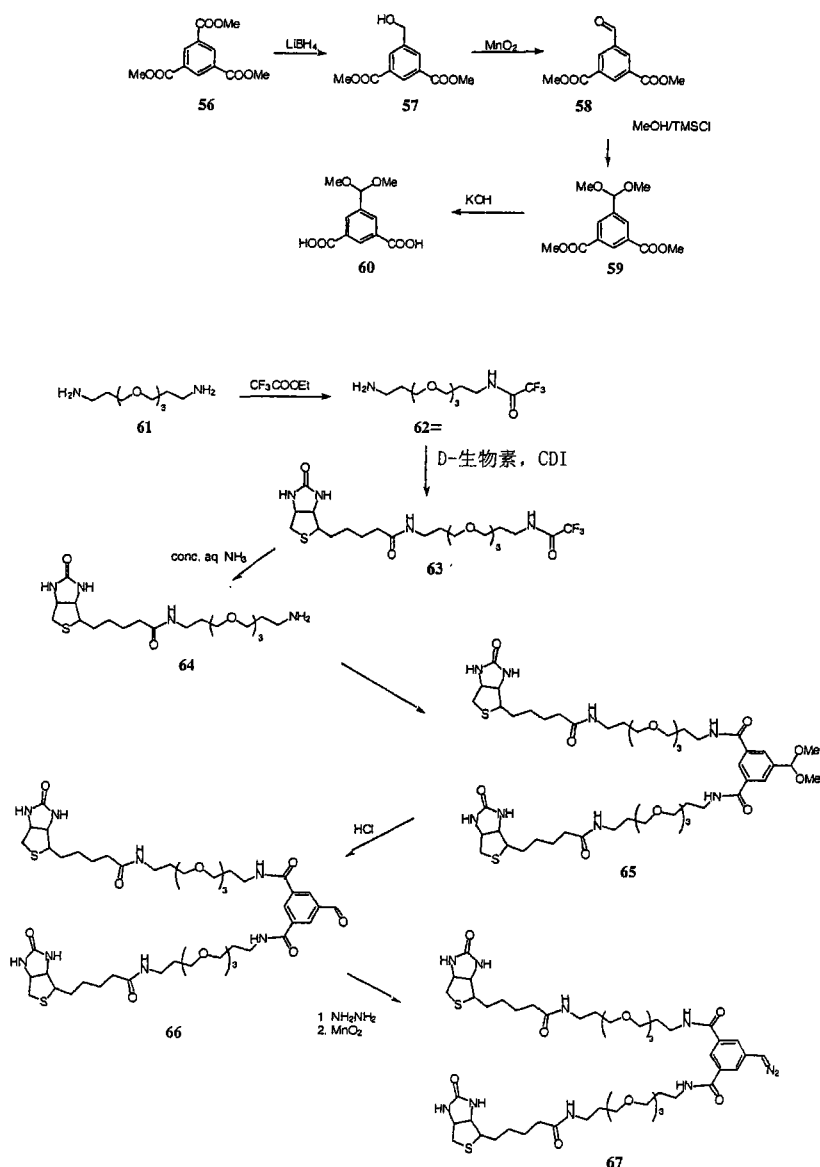
磷酸基团的反应性来标记天然核酸，因此可以引入烷氧氨基官能团，该基团随后可用于引入一种具有甲基酮基团的检测分子(荧光素，生物素)。

本合成方法是基于前面所述的合成模式，就是说使用前体69；使用Fmoc保护胺以及使用甲苯磺酰保护脲。烷氧氨基官能团(化合物86)的引入是用Fmoc功能基团(E. Trévisiol Thesis, LEDSS Grenoble, 1999)来保护羧基甲氧基胺(市售的)发生的。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34: PDAM衍生物的制备以放大信号:

实施例34.1: 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-苯三羧酸盐56还原成乙醇57:

将三酯56(12.6 g; 50.0 mmol)溶于100 ml THF中,然后在室温加入1.1 g(50.5 mmol)LiBH₄。红色溶液在氩气下40-45℃加热1 h。冷却后(冰上),通过加入水(200 ml)和2N HCl(30 ml)小心地破坏多余的氢化物(释放出氢气)。观察到颜色变成淡黄色。溶液用CH₂Cl₂提取(100 ml,然后50 ml三次),有机相用无水NaHCO₃洗涤,用MgSO₄干燥,然后蒸发溶剂直到获得油性物(11.1g)。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)溶于100 ml THF中,然后在室温用超过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,然后蒸发溶剂。粗固体(4.4 g)通过急骤层析在硅色谱柱(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。溶液在室温氩气下持续搅拌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,用CH₂Cl₂(25 ml)提取水相三次,有机相混和,用MgSO₄干燥,然后蒸发溶剂。得到3.55 g(92%)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)溶于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15 min后蒸发溶剂。残留物溶于水(50 ml)中。加入磷酸(大约2.5 ml, 85%)将pH调整到3,白色沉淀物在烧结玻璃(#3)上过滤,用水洗涤并在真空下干燥。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)溶于250 ml CH₂Cl₂中,然后滴加乙酰三氟乙酸盐(11.8

ml, 0.10 mol), 在10℃氩气下边搅拌边加入, 滴加时间超过5min。在室温静置15min后将溶液转移到分离漏斗中, 用水(3 × 100 ml)洗涤, 用MgSO₄干燥, 然后蒸发溶剂。得到的单酰胺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(量化态(quantiplet), 2H, J=6 Hz); 1.67(量化态, 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℃氩气下边搅拌边加热30min。加入的物质一开始完全溶解, 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)下蒸发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, 用无水NaHCO₃和MgSO₄干燥, 然后蒸发溶剂。油性残留物用150ml乙醚研磨获得悬液。粘性固体难以过滤。将上清液倾析掉, 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(量化态, 2H, J=6 Hz); 1.67(量化态, 2H, J=6 Hz); 1.30(宽 s, 2H)。

化合物64:

将溶于氨水(100 ml, 22%含水)中的化合物63 加入到一个250 ml带有隔膜的圆底烧瓶中于55-60℃加热2 h。冷却后蒸发溶剂。残留物溶于甲醇(20 ml)中, 通过Dowex 21K阴离子树脂的柱[高度12cm × 直径35mm, 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)洗涤得到OH⁻型]。不含三氟乙酸盐离子的化合物64和200 ml甲醇一起通过柱为第一组分。将其蒸发后残留物用50ml乙醚研磨并将上清倾析掉, 然后用乙醚重复洗涤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(5ml)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(五重态, 4H, J=7 Hz); 1.55-1.70(m, 12H); 1.37(m, 4H)。

[Bio-EG₃]₂-醛 66:

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

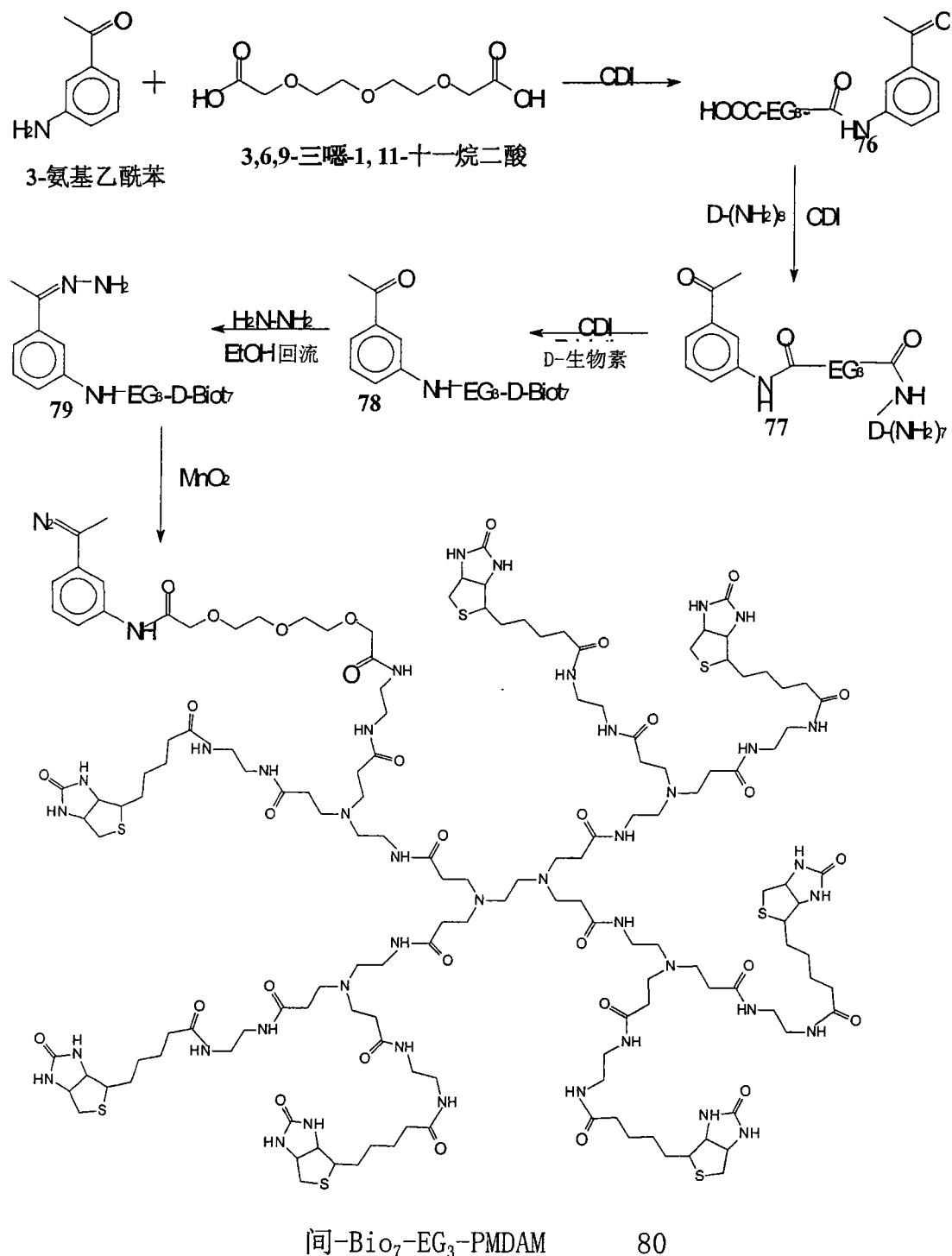
¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ= 10.11(s, 1H); 8.82(t, 2H, J=6 Hz); 8.62(s, 1H), 8.47(s, 2H); 7.73(t, 2H, J=5 Hz); 4.30(m, 2H); 4.11(m, 2H), 3.30-3.60(m, 24H); 3.06(m, 6H); 2.80(dd, 2H, J=12和5 Hz), 2.56(t, 2H, J=12 Hz); 2.03(t, 4H, J=7 Hz); 1.78(五重态, 4H, J=7 Hz); 1.35-1.60(m, 12H); 1.28(m, 4H)。

[Bio-EG₃]₂-PDAM 67:

按照制备叠氮甲烷(实施例1)的方法将醛66转化成叠氮甲烷67。

该试剂在-20°C的稳定性大于1个月。

实施例34.2: 间-Bio7-EG3-PMDAM的合成:合成流程:



EG₃-苯乙酰化合物76:

将3,6,9-三噁-1,11-十一烷二酸(EG₃, 12.64 ml, 74 mmol)在氩气下溶于80ml无水DMF中,在冰浴中冷却。将二环己基碳二亚胺(DCC, 11.45 g, 55.5 mmol)溶于无水20 ml DMF中,然后缓慢加到上述溶液中。30min后加入3-氨基苯乙酰(5.0 g, 37 mmol),反应在室温氩气下进行1 h。然后在真空下蒸发DMF,加入70 ml CH₂Cl₂。过滤溶液并用3 × 25 ml 1% 乙酸抽提。将水相混和,并用25 ml CH₂Cl₂洗涤。有

机相混和，用无水硫酸钠干燥并蒸发至干。产物从MeOH:HaO对重结晶。因此得到8.74 g (70%)产物76。

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO-d_6): $\delta=2.55(\text{s}, 3\text{H}); 3.5-3.7(\text{m}, 8\text{H}); 4.0(\text{s}, 2\text{H}); 4.1(\text{s}, 2\text{H}); 7.45(\text{t}, 1\text{H}); 7.65(\text{d}, 1\text{H}); 7.90(\text{d}, 2\text{H}); 8.2(\text{s}, 1\text{H}); 9.8(\text{s}, 1\text{H})$ 。

$(\text{NH}_2)_7\text{-EG}_3\text{-苯乙酮化合物77:}$

将产物76 (120 mg, 0.35 mmol) 在氩气下溶于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树状聚体“星暴PAMAM 树状聚体，第一代” (Aldrich, St Quentin Fallavier) (1 g, 0.71 mmol, 溶于5ml 甲醇中) 溶液表面，剧烈搅拌。反应在室温进行1 h，蒸发混合液。残留物收集到10 ml CH_2Cl_2 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) 在氩气下溶于80 ml 无水DMF中，溶液在冰上冷却。连续加入N-甲基吗啉 (NMM, 856 μl , 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下进行3h。混合物在真空下浓缩到50ml，然后加入100ml CH_2Cl_2 。过滤后得到的沉淀物用乙醚洗涤，在真空下干燥，得到1.3 g 白色粉末状的产物78。

Biot₇-EG₃-脲化合物 79:

在回流下将化合物78 (300 mg, 0.09 mmol) 溶于10ml 无水乙醇中。加入一水合脒 (20 ml, 0.40 mmol)，反应在回流下进行3小时。冷却后沉淀形成，将沉淀过滤，用乙醚洗涤并在真空下干燥。由此得到109mg (36%) 白色粉末状的产物79。

Biot₇-EG₃-PMDAM化合物80:

将脲79 (100 mg, 0.03 mmol) 在70 $^\circ\text{C}$ 溶于5 ml 的无水DMF中。混合液降到室温后加入 MnO_2 (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。滤液蒸发干燥，用乙醚洗涤并在真空下干燥。由此得到78 mg (78%) 产物80。

树状聚体是一种树枝状分子，在末端具有几种活性基团如胺，羧基，羟基等 (综述参见Newcome 等, (1996) 《树状分子: 原理、合成、展望》 (Dendritic Molecules; Concept, Syntheses, Perspectives). VCH Ed., Weinheim, Germany)。这些分子的合成现在很容易控制，许多树状聚体已由化学制造企业推上了市场。选择PAMAM (sigma-Aldrich) 是基于其稳定性、溶解性和柔韧性，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第一代”可以在每个叠氮甲基基团上添加7种标记物的分子 (以一个合成步骤)。

实施例35: 用间-BioPMDAM以两步标记和片段化DNA扩增子:

DNA扩增子是按照实施例5.1描述的方法制备的。两种标记反应方法如下。

a. 标记和片段化以两步进行:

将10 μ l 间-BioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)和77 μ l无DNA酶/RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在95 $^{\circ}$ C温育10 min, 然后加入3 μ l 0.1M HCl, 溶液于95 $^{\circ}$ C温育10 min。

b. 标记和片段化以一步进行:

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/RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在60 $^{\circ}$ C温育30 min。其余方法与实施例17相同。

结果

所用方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
a. 标记和片段化以两步进行	99.5	14129	624	22.7
b. 标记和片段化以一步进行	98.9	4431	667	6.6

表25: 以两个不同的步骤和以一个步骤进行标记和片段化的比较研究

如表25所示, 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以便根据所用的靶位提高标记效率。

实施例36: 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5.1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/RNA酶的水加入到50 μ l PCR产物中。溶液在95 $^{\circ}$ C温育25 min, 然后加入22.5 μ l 0.1M HCl, 溶液于95 $^{\circ}$ C温育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/RNA酶的水加入到50 μ l PCR产物中。溶液在95 $^{\circ}$ C温育25 min, 然后加入22.5 μ l 0.1M HCl, 溶液于95 $^{\circ}$ C温育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/RNA酶的水加入到

50 μ l PCR产物中。溶液在95 $^{\circ}$ C温育25 min, 然后加入22.5 μ l 0.1M HCl, 溶液于95 $^{\circ}$ C温育5 min。

其余试验方法与实施例17相同。

结果

所用的方案	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26: 按照不同的反应体系标记和片段化

从信号和同源性百分数来看, 所有方案得到的结果都是很满意的。而且尽管反应体系从150 μ l变化到250 μ l, 所得到的结果是相似的。本实施例说明标记方案的反应体系具灵活性, 可以接受不同体积的体系, 尤其是不同体积的扩增产物。

实施例37: 采用片段化前进行纯化的方案和采用片段化后进行纯化的方案的比较:

DNA扩增子是按照实施例5.1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/RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在95 $^{\circ}$ C温育10 min。纯化按照实施例17描述的方法进行。在纯化后标记的扩增子溶液中加入6 μ l 0.1M HCl, 溶液于95 $^{\circ}$ C温育10 min。加入400 μ l 在95 $^{\circ}$ C预热10min的杂交缓冲液。杂交缓冲液的组成和其余的方案与实施例17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/RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在95 $^{\circ}$ C温育10 min。然后加入3 μ l 0.1M HCl, 溶液再于95 $^{\circ}$ C温育10 min。其余的方案与实施例17相同。

结果:

所用的方案	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

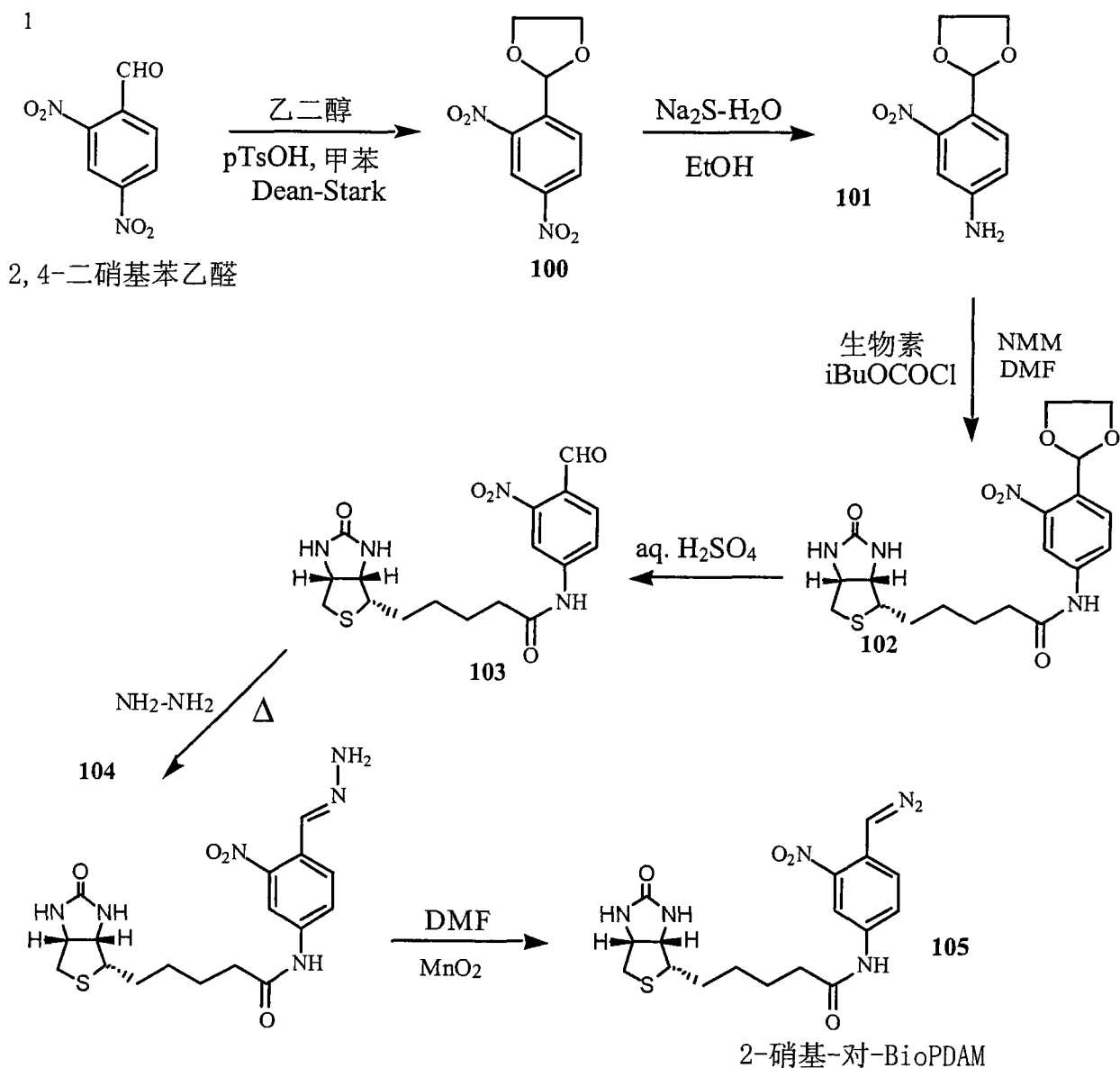
表27: 采用片段化前进行纯化的方案和采用片段化后进行纯化的方案的比较

表27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标记的

扩增子片段杂交到芯片上成为可能。

实施例38: 2-硝基-对-BioPDAM的合成:

合成流程:



醛基的保护:

将5g (25.5 mmol) 2, 4-二硝基苯乙醛溶于250 ml甲苯中, 加入20 ml乙二醇和150 mg对-甲苯磺酸。混合液在回流下加热, 水在Dean-Stark 系统中回收6h。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, 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)。

二硝基衍生物100的还原:

保护的2,4-二硝基苯乙醛(6.4 g; 25.5 mmol)溶于乙醇-水混合液(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,然后用二氯甲烷抽提。干燥并过滤后将反应介质蒸发以获得油性物,产物在硅柱上直接纯化(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)溶于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。溶液在室温持续搅拌4h,然后蒸发至干。得到的油性物直接通过硅柱,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 mmol)悬浮于25 ml THF中。加入4 ml的2N H₂SO₄后全部溶解。混合物持续搅拌2h。蒸发后在烧结玻璃用水漂洗和洗涤。得到黄色粉末状的化合物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)。

脎104的形成:

将醛103悬浮于乙醇中,悬液加热到80°C。加入肼时全部溶解,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°C. ^1H NMR(200 MHz, DMSO-d_6): 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的形成:

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。蒸发至干后用乙醚洗涤。混合物再于微孔上过滤。得到橙色粉末状化合物105(180 mg; 0.445 mmol), 产率为98%。

熔点155°C. ^1H NMR(200 MHz, DMSO-d_6): δ =10.21(s, 1H, NH-CO); 8.60(d, 1H_{aro}, J=2 Hz, H₃); 7.77(d, 1H_{arro}, 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'-单磷酸测试, 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的稳定性大于1个月。

实施例39: 用2-硝基-对-BioPDAM衍生物标记RNA:

按照实施例38所描述的方法制备2-硝基-对-BioPDAM衍生物。按照实施例5.2描述的方法得到RNA转录物。标记和片段化方法是在表28所述的条件下用2-硝基-对-BioPDAM试剂以一个步骤进行。两种标记反应如下:

a. 用2-硝基-对-BioPDAM试剂标记:

将2 μ l 2-硝基-对-BioPDAM(100 mM, 溶于DMSO中)、3 μ l 咪唑(1M, 溶于水)、5 μ l MnCl₂和85 μ l无DNA酶/RNA酶的水加入到10 μ l转录物中。溶液在60°C温育30 min。

其余方案与实施例8相同。

b. 用间-bioPMDAM试剂标记:

将2 μ l 间-bioPMDAM(100 mM, 溶于DMSO中)、3 μ l 咪唑(1M, 溶于水中)、5 μ l MnCl₂和85 μ l无DNA酶/RNA酶的水加入到10 μ l转录物中。溶液在60 $^{\circ}$ C温育30 min。

其余方案与实施例8相同。

结果:

所用的方案	同源性(%)	I(rfu)	B(rfu)	I/B
30 mM Im pH 9.5; 5 mM MnCl ₂ 2 mM 2-硝基-对-BioPDAM 60 $^{\circ}$ C, 5分钟	98.9	14911	656	22.7
30 mM Im pH 9.5; 5 mM MnCl ₂ 2 mM 间-bioPMDAM 60 $^{\circ}$ C, 10分钟	98.4	13611	694	19.6

表28: 用2-硝基-对-BioPDAM衍生物和间-bioPMDAM衍生物标记RNA的比较研究

从表28可见, 2-硝基-对-BioPDAM衍生物对RNA有良好的标记效果。可用例如硝基的取代基来调节带有重氮甲基官能团的标记的反应性和稳定性。

实施例40: 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38所描述的反应流程得到2-硝基-对-BioPDAM衍生物。按照实施例5.1描述的方法用PCR扩增制备DNA扩增子。两种标记反应如下:

a. 用2-硝基-对-BioPDAM试剂标记:

将2 μ l 2-硝基-对-BioPDAM(100 mM, 溶于DMSO中)、5 μ l 0.1M HCl和83 μ l无DNA酶/RNA酶的水加入到10 μ l PCR产物中。溶液在60 $^{\circ}$ C温育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 $^{\circ}$ C温育30 min。

其余方案与实施例17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

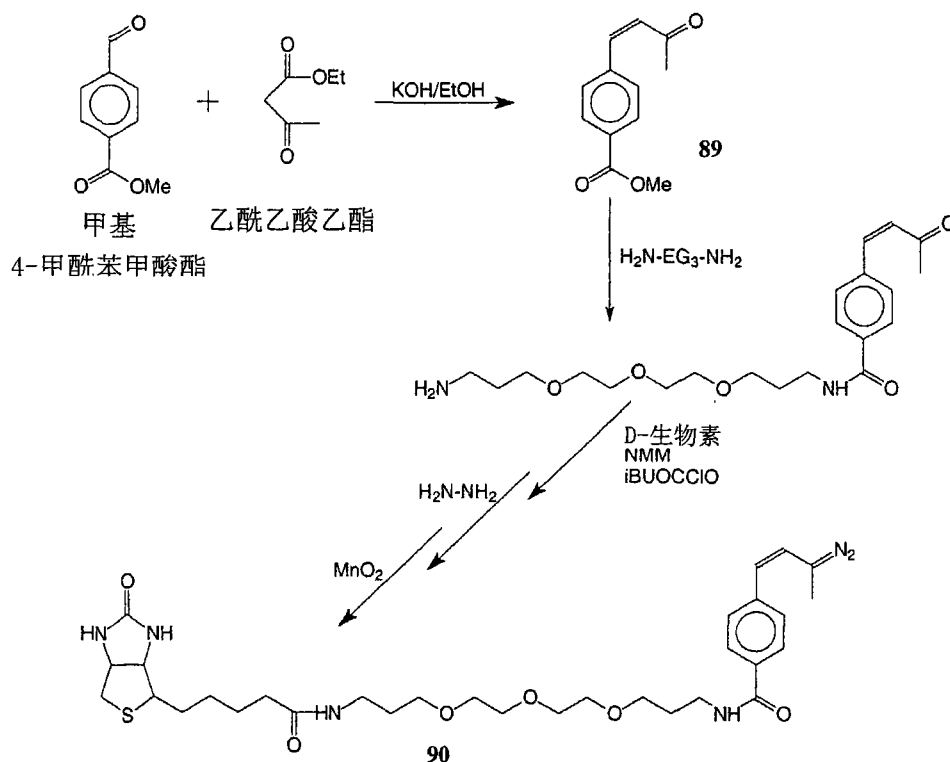
表29: 用2-硝基-对-BioPDAM衍生物和间-bioPMDAM衍生物标记DNA的比较研究

从标记强度和同源性百分数来看，用2-硝基-对-BioPDAM试剂标记DNA是有利的。

实施例41：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甲基(DAM)功能基团远离以便在磷酸的烷基化时以及标记核酸与其互补序列杂交时最大限度地减少位阻效应。

合成流程：



为了3-羟基丁醛反应以形成(对-甲氧羰基)苯乙烯基甲基酮89，用乙酰乙酸乙酯提高亚甲基质子的酸性，从而促进甲酰基的攻击，随后消除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。本合成的其他步骤与其他实施例相似。

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，这就限制了可能的位阻问题，通过与芳香系统连接从而保持叠氮甲基的稳定性。

实施例42：携带叠氮基团的固相支持体上核酸的捕获与检测：

研究了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(参考上当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)(参考目录33202, bioMerieux, France, 基本原理见专利EP 549 776-B1描述)中的一部分试剂进行的, 该试剂盒可以检测在微孔板上通过PCR扩增的核酸, 用比色方法读取数据。根据所描述的实验, 通过PCR产生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中已提及。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, 用包括与链霉抗生物素蛋白结合的酶的比色反应就可以观察到结果。链霉抗生物素蛋白与辣根过氧化物酶结合, 可以将邻苯二胺分子(试剂盒的Color 1 试剂)分解成可在492 nm波长处被检测到的化合物。

实施例42.1: DNA的捕获与检测:

将50 μ l 按照实施例5.1描述的方法扩增的PCR产物加到400 μ l 纯水(Sigma)和5 μ l 对-Bio-EG₃-PDAM混合物中, 然后加入10 mg树脂, 在60 $^{\circ}$ C温育30 min。然后用500 μ l PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color 0 HLA试剂, PBS pH 7.0; 1% Tween, 0.2 g/l BND; 0.01 g/l Ciproflaxacin)洗涤。然后将树脂重悬于100 μ l PBS Tween和250 μ l添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白HRP(S-911, MOLECULAR PROBES, EUGENE, OR, USA)的链霉抗生物素蛋白杂交缓冲液(PBS pH 7.0 0.5% TWEEN)中。反应混合物在室温温育30min。然后用500 μ l PBS Tween缓冲液洗涤树脂三次, 在显色试剂(1 Color 1片, 邻-苯二胺盐酸, 稀释在5ml Color 2 缓冲液中, 100 mM 磷酸钠, 50 mM柠檬酸, 0.03% H₂O₂)存在的情况下于室温温育。在暗处温育20min后, 用50 μ l 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。

实施例42.2: 无核酸对照:

将10 mg树脂加入到添加5 μ l 对-Bio-EG₃-PDAM的425 μ l纯水(Sigma)中, 60 $^{\circ}$ C温育30min。然后用500 μ l PBS缓冲液洗涤树脂。样品的处理方式与实施例42.1描述的方法相同。

实施例42.3: 与无靶进行的PCR对照:

10 mg树脂在添加5 μ l 对-Bio-EG₃-PDAM和50 μ l PCR产物的400 μ l纯水中, 60 $^{\circ}$ C温育30min, PCR用25 μ l体积的纯水代替基因组DNA的体积进行。然后用500 μ l PBS缓冲液洗涤树脂。样品的处理方式与实施例42.1描述的方法相同。

实施例42.4: 与无显色分子的PCR对照:

10 mg树脂加入到含有50 μ l PCR产物的400 μ l纯水中，60 $^{\circ}$ C温育30min。然后用500 μ l PBS Tween缓冲液洗涤树脂。样品的处理方式与实施例42.1描述的方法相同。

实施例42.5：与非捕获的核酸对照：

将10 mg树脂加入到添加5 μ l 对-Bio-EG3-PDAM的400 μ l纯水中，60 $^{\circ}$ C温育30min。然后用500 μ l PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color 0 HLA试剂，PBS pH 7.0；1% Tween，0.2 g/l BND；0.01 g/l Ciproflaxacin)洗涤树脂。然后将树脂悬浮于100 μ l PBS Tween和250 μ l添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白HRP的链霉抗生物素蛋白杂交缓冲液中。加入50 μ l按如下方法制备的DNA制剂。

将5 μ l 对-Bio-EG3-PDAM和70 μ l纯水加入到25 μ l 按照实施例5.1描述的方法通过PCR制备的DNA中。混合液在60 $^{\circ}$ C温育30min，然后用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)按照厂商提供的方案去除多余的标记物，最后洗脱体积为50 μ l。

反应混合物在室温温育30min，然后按照实施例42.1描述的方法处理。

结果：

条件	在492nm处的吸光度
Ex. 42. 1: 捕获在树脂上的DNA	527
Ex. 42. 2: 无核酸	249
Ex. 42. 3: 无靶的PCR	261
Ex. 42. 4: 无标记物对照	264
Ex. 42. 5: 非捕获的核酸	249

表30：携带叠氮甲基基团的树脂的反应性研究

在表30中，高比色值说明了在反应介质中有高浓度的酶，相应的就会大量存在携带生物素衍生物的核酸。对照组说明信号不是由于DNA非特异吸附到小珠上，不是与树脂上的-Bio-EG3-PDAM反应，也不是与树脂上的链霉抗生物素蛋白HRP吸附，而是由于存在被共价捕获并用对-Bio-EG3-PDAM标记的DNA。

实施例43：标记PCR产物以使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，从而以一步在微孔板上捕获和检测这种核酸分子。

本试验用HLA-DR 寡-检测试剂盒(参考目录33202, bioMérieux)中的一部分试剂进行，用比色读数检测微孔板上通过PCR扩增的核酸。根据所描述的试验，对-Bio-EG₃-PDAM与通过PCR产生的核酸反应，对-Bio-EG₃-PDAM的合成在实施例28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嫁接上生物素。有可能通过在微孔板上温育来捕获核酸，微孔板上吸附有链霉抗生物素蛋白分子，然后通过比色反应观察。所用的检测试剂也是链霉抗生物素蛋白分子，它可以与辣根过氧化物酶(HRP)结合。在使用的条件下，过氧化物酶可以将邻苯二胺分子(试剂盒的Color 1 试剂)分解成可在492 nm波长处被检测到的化合物。

实施例43.1在微孔板上捕获和检测来源于PCR反应的DNA:

将10 μ l用PCR扩增得到的DNA加入到添加10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM的80 μ l纯水(Sigma)中，60 $^{\circ}$ C温育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，将最终洗脱物溶于0 μ l EB 缓冲液(10 mM Tris EDTA, pH 8.5)中。将20 μ l这种洗脱液稀释到180 μ l 添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白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DNA(Gibco); 2% PEG 4000)中。在链霉抗生物素蛋白包被的Combiplate 8(参考目录95029263, Labssystem, Helsinki, Finland)的孔中或Maxisorb条带(Maxisorb strip)(Nunc, Denmark)的对照孔中加入100 μ l上述制备，37 $^{\circ}$ C温育1小时。

实施例43.2: 对照组的制备

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10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM的90 μ l纯水(Sigma)在60 $^{\circ}$ C温育30min。然后反应混合物按照实施例43.1所述的相似方法处理。

B. 无标记物的标记对照:

将10 μ l按照实施例5.1描述的方法通过PCR扩增得到的DNA加入到90 μ l纯水中，60 $^{\circ}$ C温育30min。然后将反应混合物按照实施例34.1描述的相似方法处理。然后将所有的条带用100 μ l PBS Tween缓冲液(试剂盒的Color 0 HLA 试剂, PBS pH 7.0; 1% Tween, 0.2 g/l BND; 0.01 g/l Ciproflaxacin)洗涤三次，加入100 μ l显色试剂(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)，在暗处温育20min就显示链霉抗生物素蛋白HRP的存在，然后用50 μ l H₂SO₂(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。

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31: 用对-Bio-EGB-PDAM捕获的标记DNA的检测

表31中的结果表明, 用对-Bio-EG3-PDAM标记的DNA在微孔板上通过一步就可以捕获和检测。如对照组所提示的, 对照组的信号只是由于DNA而产生的, 不是由核酸对微孔板壁的非特异吸附产生的, 也不是来自于核酸与链霉抗生物素蛋白的非特异结合, 或者链霉抗生物素蛋白HRP与非标记DNA或微孔板塑料的非特异反应。

实施例44: 双标记PCR产物以使其在微孔板类的固相支持物上捕获和检测:

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

试验所用的一部分试剂来自于HLA-DR 寡-检测试剂盒, 通过简单的比色读数来检测微孔板上由PCR扩增的核酸。在上下文所描述的试验中: 1-苝基重氮甲烷 (PDAM) 和对-Bio-EG3-PDAM同时与PCR产生的核酸反应。

如果DNA与两个化合物的叠氮甲基官能团反应, DNA就能结合到携带抗-苝抗体的支持物上, 就有可用一种与辣根过氧化物酶结合的链霉抗生物素蛋白分子来显示它。该酶作为一种显色剂可以将邻-苯二胺分子分解成可在492nm波长处被检测的化合物。

实施例44.1: DNA的双标记和在微孔板上检测:

将抗苝抗体吸附到8-孔Maxisorp条带上, 室温下温育过夜。每孔加入100 μ l溶液, 该溶液是将1.1 μ l抗苝抗体稀释到100 μ l 碳酸氢盐缓冲液(0.05M pH 9.6)中。这种所谓的兔抗苝抗体(参考目录: YSRT-AHP236)可以从Accurate Chemical & Scientific(Westbury, New York, USA)购买到。当然也可以用市场上可买到的抗体来进行本试验, 与本实施例所得到的结果相比没有分歧的结果。

将按照实施例5.1描述的方法通过PCR扩增得到的10 μ l DNA加入到40 μ l纯水(Sigma)、10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM、2 μ l PDAM(P-1405, 1-苝基重氮甲烷, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)和38 μ l DMSO中, 60 $^{\circ}$ C温育30min进行标记。

标记后, DNA用QIAquick试剂盒(QIAGEN)纯化, 最后的洗脱物溶于50 μ l EB 缓冲液(10 mM Tris EDTA, pH 8.5)中。将20 μ l此洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白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此制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对

照孔中，37℃温育1h。

实施例44.2: 对照组的制备

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:

将按照实施例5.1描述的方法通过PCR扩增得到的10 μ l DNA加入到添加10 μ l 对-Bio-EG3-PDAM的90 μ l纯水中，60℃温育30min进行标记。标记完成后，DNA用QIAquick试剂盒纯化，最后的洗脱物溶于50 μ l EB 缓冲液中。将20 μ l此洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白HRP的180 μ l PEG缓冲液中。然后将100 μ l此制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中，37℃温育1h。

B. 单独用PDAM标记的对照:

将按照实施例5.1描述的方法通过PCR扩增得到的10 μ l DNA加入到添加2 μ l PDAM和38 μ l DMSO的90 μ l纯水中，60℃温育30min进行标记。标记后，DNA用QIAquick试剂盒纯化，最后的洗脱物溶于50 μ l EB 缓冲液中。将20 μ l此洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白HRP的180 μ l PEG缓冲液中。然后将100 μ l此制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中，37℃温育1h。

C. 无标记对照:

将按照实施例5.1描述的方法通过PCR拉增得到的10 μ l DNA加入到100 μ l纯水中，60℃温育30min进行标记。标记后，DNA用QIAquick试剂盒纯化，最后的洗脱物溶于50 μ l EB 缓冲液中。将20 μ l此洗脱物稀释到添加以1/10000稀释的链霉抗生物素蛋白HRP的180 μ l PEG缓冲液中。然后将100 μ l此制备液加入到吸附的Maxisorp条带孔或非吸附对照孔中，37℃温育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)在暗处温育20min就显示链霉抗生物素蛋白HRP的存在，用50 μ l H₂SO₂(Color 3)终止反应。然后测量反应介质在492 nm处的吸光度。

结果:

条件	吸附在微孔板上 的抗苾抗体(rfu)	非吸附对照微 孔板(rfu)
Ex. 44. 1: PDAM+对-Bio-EG3-PDAM-标记DNA	348	16
Ex. 44. 2. A: 对-Bio-EG3-PDAM-标记DNA	44	19
Ex. 44. 2. B: PDAM-标记 DNA	68	12
Ex. 44. 2. C: 非标记DNA	75	19

表32: 用PDAM 和 对-Bio-EG3-PDAM双标记DNA

表32的结果清楚地表明大信号来自于被孔壁中抗芑抗体捕获的及同时被连接的链霉抗生物素蛋白HRP标记的DNA。如对照组中没有信号所示,这种对标记的DNA特异的检测不是由于DNA的非特异性吸附或链霉抗生物素蛋白HRP与塑料的非特异吸附,或酶与捕获的DNA的非特异结合。因此本实施例说明在一个步骤中进行双标记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45: 标记PCR产物的同时用互补核酸探针捕获和标记:

本实施例在于证明采用与DNA上的磷酸基团反应的叠氮甲基官能团特异性地检测DNA是可能的,所述DNA被捕获在固相表面上。

本试验用HLA-DR 寡-检测试剂盒(参考目录33202, bioMérieux, France)的一部分试剂进行,用比色读数检测微孔板上通过PCR扩增的核酸。在上下文描述的试验中,对-Bio-EG₃-PDAM与通过PCR产生的核酸反应。DNA与分子的叠氮甲基官能团反应,因此在其磷酸基团上被嫁接上生物素。因而有可能通过在微孔板上温育来捕获核酸,微孔板上吸附有链霉抗生物素蛋白分子,然后用一个含有与捕获序列互补的寡核苷酸的探针来显示DNA,该探针与辣根过氧化物酶结合,该酶可以将邻苯二胺分子(试剂盒的Color 1 试剂)分解成可在492 nm波长处被检测到的化合物。

实施例45.1: 在微孔板上捕获和特异性检测DNA:

将用PCR扩增得到的10 μ l DNA与20 μ l 对-Bio-EG₃-PDAM在60 $^{\circ}$ C温育30min以双份进行标记。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,将最终洗脱物溶于50 μ l EB 缓冲液(10 mM Tris EDTA, pH 8.5)中。将85 μ l这种洗脱液用8.5 μ l试剂R4(2N NaOH)在室温下变性培养5min,然后溶液用8.5 μ l试剂R5(2N 乙酸)中和。混合物中加入850 μ l 杂交缓冲液(R6-10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 0.2 g/l BND, 0.01 g/l Ciproflaxacin)和85 μ l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上述制备液置于试剂盒提供的Strip R1的阳性对照孔(被扩增基因的共有序列捕获)上,或链霉抗生物素蛋白包被的Combiplate 8平板(参考目录95029263, Labssystem, Helsinki, Finland)的孔上,或者对照Maxisorb平板(Nunc, Denmark)的孔上。

平行试验中,同样的杂交反应是用EB缓冲液10倍和100稀释DNA制备液以测试该技术的灵敏度。

实施例45.2: 对照组的制备

对照样品同时按照下列方式制备:

A. 比较HLA-DR试剂盒:

将按照实施例5.1描述的方法用PCR扩增得到的10 μ l DNA与20 μ l 对-Bio-EG3-PDAM在60 $^{\circ}$ C温育30min。标记后, DNA用QIAquick柱纯化, 将最终洗脱物溶于50 μ l EB缓冲液中。将45 μ l洗脱液用4.5 μ l试剂R4在室温下变性5min, 然后溶液用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上述制备液置于试剂盒提供的Strip R1的阳性对照孔(与扩增基因的共有序列杂交)上, 或链霉抗生物素蛋白Combiplate 8平板上, 或者对照Maxisorb平板上。

B. 在不与特异性探针杂交的DN上进行杂交:

将按照实施例5.1描述的方法用PCR扩增得到的10 μ l DNA与20 μ l 对-Bio-EG3-PDAM在60 $^{\circ}$ C温育30min。样品的其他处理方法与上面实施例A描述的步骤相同。

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)置于试剂盒提供的Strip R1的阳性对照孔上, 或链霉抗生物素蛋白平板上, 或者Maxisorb对照平板上。

将上述试验中所有条带在37 $^{\circ}$ C温育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)在暗处温育20min显示特异性检测探针的存在, 然后用50 μ l H₂SO₂(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。

结果:

条件	R1条带HLA DR试剂盒 (特异性捕获)	Combiplate (链霉抗生物素蛋白)	Maxisorp (对照)
A - 标记DNA-Ex. 45.1	1215	2160	16
A - 标记DNA(1/10稀释)	NA	900	NA
A - 标记DNA(1/100稀释)	NA	53	NA
B-非标记DNA对照-Ex. 45.2 A	1153	40	17
C-细菌DNA对照-Ex. 45.2 B	24	15	NA
D - 无DNA对照 - Ex. 45.2 C	13	12	17

NA=没有

表33: 在微孔板上特异性检测PCR得到的DNA

表33的结果显示靶的极好的扩增有可能使其用于诊断。本实施例说明在磷酸基团上的标记可以使DNA被捕获且不会阻碍其特异性杂交。

实施例46：细菌裂解物来源的DNA的捕获和扩增以及用对-Bio-EG3-PDAM标记：

本实施例说明用基于叠氮甲基官能团对核酸上磷酸基的反应性的捕获有可能捕获的扩增细菌DNA。

在本实施例中，细菌裂解物中含有的核酸用对-Bio-EG3-PDAM标记，然后被捕获到链霉抗生物素蛋白包被的磁珠上。利用磁珠可以通过磁性使核酸固定，以便在连续洗涤过程中除去反应介质中存在的细胞残留物，去除这些残留物是必需的，因为它们可抑制随后进行的PCR扩增。

扩增产物可以通过DNA芯片分析。

细菌DNA是通过裂解结核分枝杆菌培养物中的细胞获得的。裂解是用机械裂解进行的。准确的说是用超声法进行的，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由专利申请W0-A-99/15621的申请人描述，超声法在专利申请W0-A-00/60049中也有描述。超声法也可用液体浴进行。

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W0-A-98/54306 和W0-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的定量用Picogreen(P-7589; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)按照厂商提供的说明书进行，浓度为 10^7 拷贝/ μl 。

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

然后用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)纯化反应介质。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 链霉抗生物素蛋白; 参考目录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 NaPO_4 , pH 7, 0.5M NaCl ; 0.65% Tween 20; 0.14 ml 鲑精DNA(参考目录15634-017, GibcoBRL); 2% PEG 4000)，在 37°C 温育30min。然后用 $200\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween 的 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液洗涤两次，最后收集到 $90\mu\text{l}$ 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温育5min。

然后用200 μ l 含0.5% Tween 的1 \times PBS缓冲液洗涤磁珠三次, 收集到200 μ l水中, 60 $^{\circ}$ C温育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5.1描述的方法进行PCR。进行两个反应对照, 一个是25 μ l纯水, 另一个是2.5 μ l制备的磁珠, 在与生物样品相同的条件下洗涤, 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)时才能变成荧光的特征。由于这种嵌入具有很高的特异性, 并且因为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存在的DNA浓度。检测到的信号用rfu(相对荧光单位)表示。

凝胶分析PCR的结果显示, 在用对-Bio-EG3-PDAM标记的基因组DNA制备的样品中, 在凝胶的预期位置上出现一条单一的特异性条带。当用非标记基因组DNA进行PCR时就检测不到该条带。用Picogreen进行DNA定量有可能确定从捕获在磁珠上的基因组DNA中生产的DNA。

条件	rfu
非标记对照	51
标记DNA	170
背景噪音	20

表34: 从细菌裂解物中通过PCR产生的DNA的定量以及通过对-Bio-EG3-PDAM的捕获和纯化

按照实施例8描述的方法在DNA芯片上分析有可能确定下面表35中所示的扩增的特异性。

	同源性	I(rfu)	B(rfu)	I/b
样品	98	11531	723	16

表35: 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官能团对磷酸基团的反应性。

实施例47: 连续扩增两个来源于捕获在固相支持物上的细菌DNA的基因:

本实施例说明利用叠氮甲基官能团对磷酸基团的反应性对捕获的不同的靶DNA扩增几次是可能的。

在本实施例中, 细菌裂解物中含有的核酸用对-Bio-EG3-PDAM标记, 然后被捕

获到链霉抗生物素蛋白包被的磁珠上。利用磁珠可以通过磁性使核酸固定，以便在连续洗涤过程中除去反应介质中存在的细胞残留物，去除这些残留物是必需的，因为它们可抑制随后进行的PCR扩增。这些扩增发生在基因组DNA中存在的两个不同的基因上，分别命名为16S和rpoB。采用与DNA芯片分析这两个基因。

按照实施例46所描述的方法通过裂解结核分枝杆菌培养物中的细胞获得细菌DNA。细菌DNA的定量用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 $10\mu\text{l}$ 裂解物与 $20\mu\text{l}$ 对-Bio-EG3-PDAM混和，在 60°C 温育30min。作为平行对照，将 $10\mu\text{l}$ 裂解物加入到 $20\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)中在相同条件下温育。

然后用QIAquick柱(Nucleotide Removal Kit, Qiagen, Hilden, Germany)纯化反应介质。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 NaPO_4 , pH 7, 0.5M NaCl ; 0.65% Tween 20; 0.14 ml 鲑精DNA(GibcoBRL); 2% PEG 4000)，在 37°C 温育30min。然后用 $200\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween 20的 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液洗涤两次，最后收集到 $90\mu\text{l}$ 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温育5min。

然后用 $200\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween 的 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液洗涤磁珠三次，然后收集到 $200\mu\text{l}$ 水中， 60°C 温育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5.1描述的方法进行PCR。进行两个反应对照，一个是 $25\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)，另一个是 $2.5\mu\text{l}$ 制备的磁珠，在与生物样品相同的条件下洗涤，收集到 $25\mu\text{l}$ 水中。

扩增以后，收集反应介质，将磁珠分离，用 $150\mu\text{l}$ 含 0.5% Tween的 $1\times\text{PBS}$ 洗涤，然后重悬于 $25\mu\text{l}$ 纯水(Sigma)中。另外一个扩增是在磁珠上进行的，但在有引物的情况下用于扩增rpoB基因。

对照组的扩增是用非捕获的基因组DNA，与两个扩增系统(rpo和16S)平行进行。结果：

所得到的PCR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
磁珠上的PCR16S	16S	98	2726	534	5
rpoB序列结果	RpoB	8	161	480	<1
洗涤磁珠上的PCR16S	RpoB	97	3205	349	9
16S序列的结果	16S	14	84	358	<1

表36: 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的结果显示, 在用-Bio-EG3-PDAM标记的基因组DNA制备的样品中, 在凝胶的预期位置上出现一条单一的特异性条带。在用非标记基因组DNA进行PCR时就检测不到该条带。

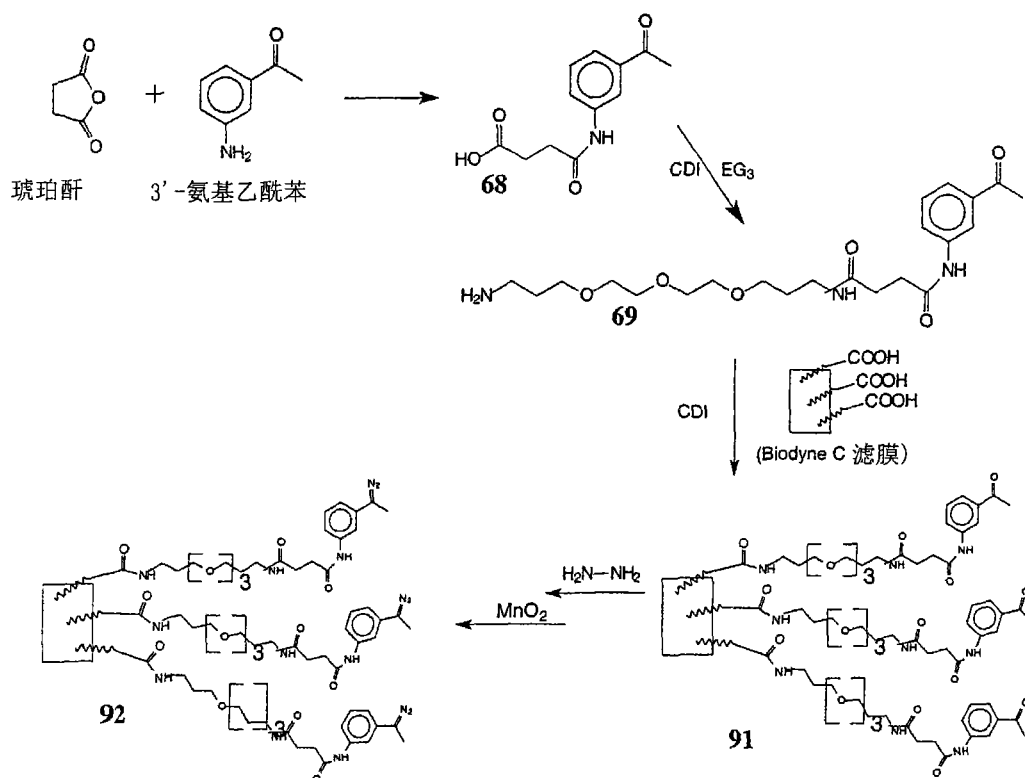
如上面表36所显示的用DNA芯片进行分析可能确定两次连续扩增的特异性, 因而能够从固定在固相支持物上的DNA中连续扩增几个基因, 从而有可能避免开发多重系统 (multiplex systems), 这种系统常常会降低核酸扩增的敏感性和效率。

实施例48: 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携带叠氮甲基基团, 用于捕获细菌DNA, 目的是通过PCR扩增DNA。

实施例48.1: Biodyne C 滤膜的修饰:

合成流程:



化合物68:

将3'-氨基苯乙酮(14.5g, 107mmol)溶于50ml无水DMF中。加入琥珀酐(10.7 g, 107 mmol), 混合物在室温氩气下续搅拌。6h后溶液在真空下缩, 然后加入50ml甲醇。过滤后得到的沉淀物用甲醇和乙醚洗涤。由此19.4 g(81%)在色粉末状产物68。
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, 10-三噁十三烷二胺(EG3)。在室温下反应3h后蒸发DMF, 残留物收集到100ml CH₂Cl₂中。用饱和NaHCO₃和H₂O提取, 然后用无水Na₂SO₄干燥有机相, 蒸发溶剂。由此得到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)。

化合物91:

在一张Biodyne C 滤膜(参考目录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) 羰基二咪唑(CDI)的无水DMF接触, 瓶子置于冰上, 氩气下剧烈搅拌。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, 滤膜用乙醇漂洗, 在真空下干燥并在氩气下保存。

化合物92:

将修饰的滤膜91置于97 ml一水合肼(2 mmol)和4 ml无水乙醇的溶液中。溶液回流5h。溶液冷却后用水、乙醇和乙醚洗涤滤膜, 真空下干燥然后置于氩气下。然后加入4 ml无水DMF和86 mg MnO_2 (1 mmol), 混合物剧烈搅拌使之反应。20min后将溶液弃掉, 滤膜用DMF和乙醚漂洗。叠氮甲基修饰的滤膜92于氩气下贮存于-19到-31°C。

实施例48.2: 生物学试验:

将活化的膜剪成2 mm²的小片, 与25 μ l结核分枝杆菌裂解物和375 μ l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裂解制备的, 其方法和最终浓度与实施例46相同。

然后将膜置于100 ml洗涤缓冲液(5% 甲酰胺(Sigma), 1 \times SSPE(Perbio), 0.01% Triton X-100)中在65°C温育60min以去除吸附到膜上的非特异性核酸, 然后在扩增前将膜储存在1 ml纯水中。

按照实施例5.1.1所描述的进行PCR, 反应体积用足够量的纯水调整。

平行对照的设置按照与上面一样的过程进行, 所用的膜没有核酸共价结合。

- 非修饰Biodyne C 膜(膜A),
- 按照描述的方法化学修饰Biodyne膜, 但不用无水DMF和 MnO_2 处理; 此对照有可能确定在无叠氮甲基基团的情况下膜的特性(膜B), 以及
- Biodyne C 膜不进行修饰, 但是用无水DMF和 MnO_2 剧烈搅拌20min处理, 此对照有可能确定这种处理步骤不会改变DNA对膜的吸附(膜C)。

为了检验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25 μ l细菌裂解物进行扩增(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:

进行的试验	信号(rfu)
修饰膜	111
未修饰膜(A)	18
未修饰膜, 与25 μ l细菌裂解物扩增(A')	260
未活化的修饰膜(B)	26
未修饰膜, 与25 μ l细菌裂解物共扩增(B')	264
经活化的未修饰膜(C)	21
经活化的未修饰膜, 与25 μ l细菌裂解物共扩增(C')	268

表37: 从捕获在固相支持物上的细菌裂解物的DNA经PCR得到的DNA 的定量

表37的这些结果说明, 将从裂解液得到的核酸通过叠氮化学方法共价捕获在固相支持物上是可能的。观察到扩增不是由于DNA与膜的非特异吸附。另一方面, 用PCR进行的对照观察到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通过DNA芯片分析。

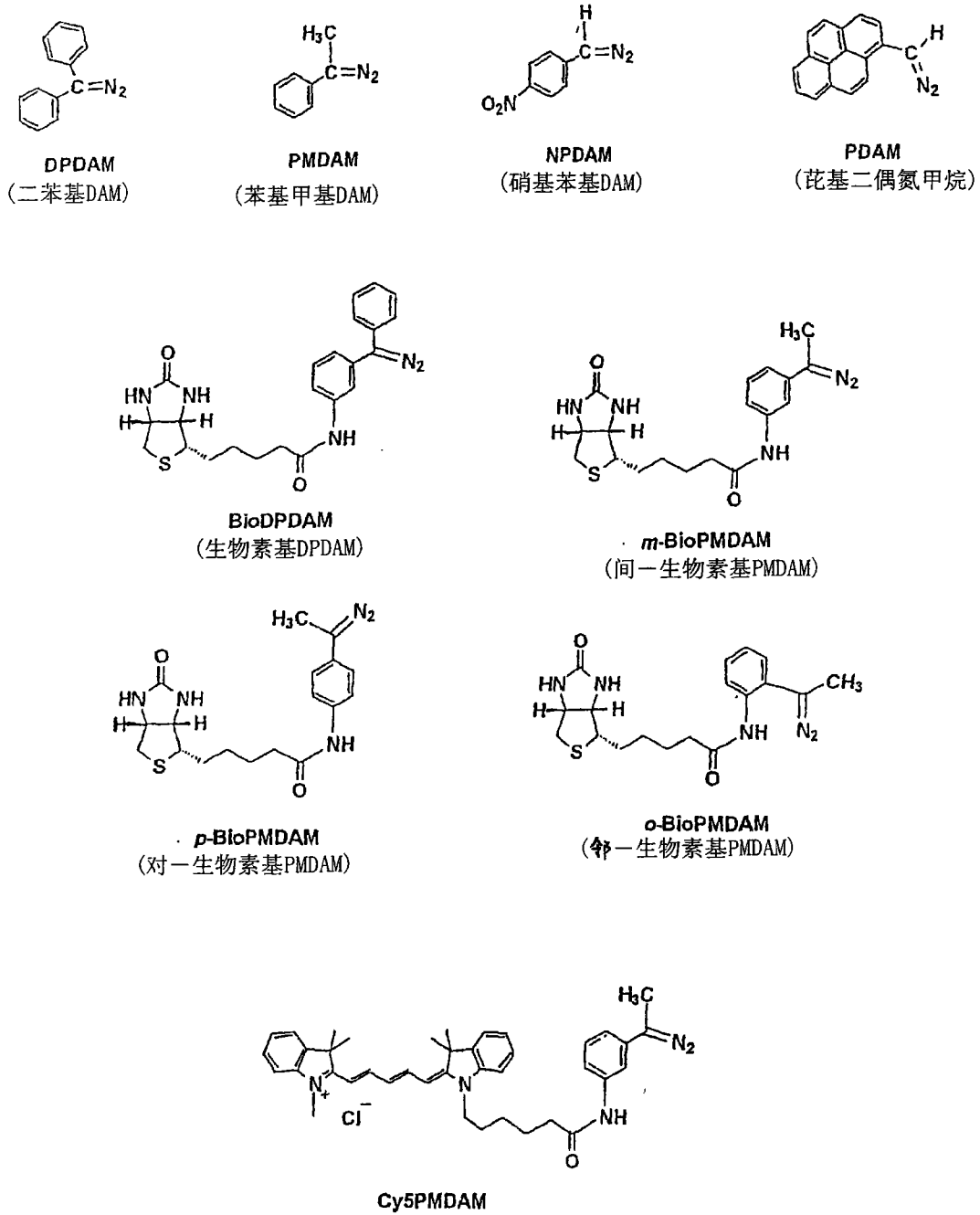


图 1

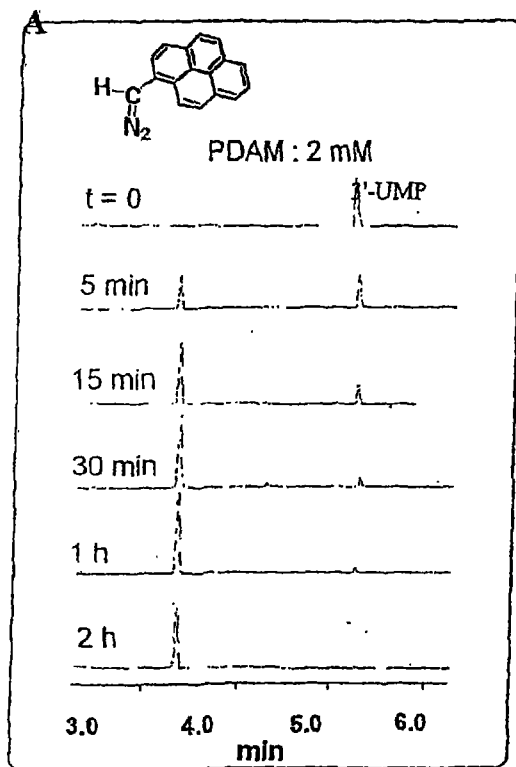


图 2A

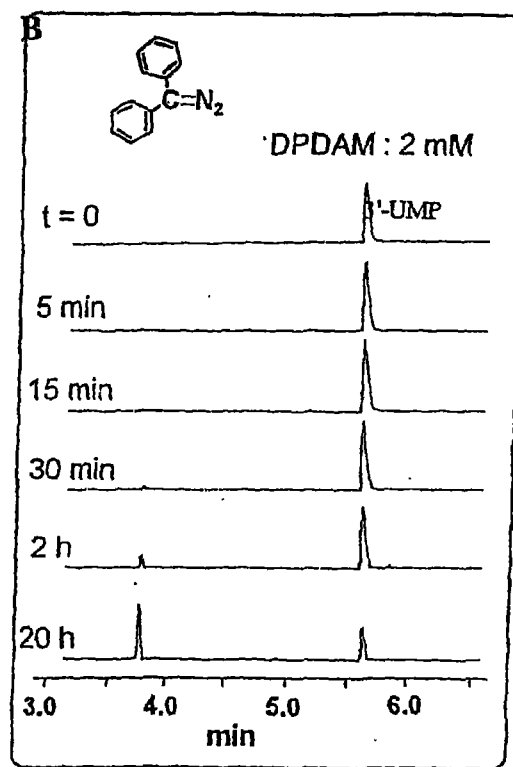


图 2B

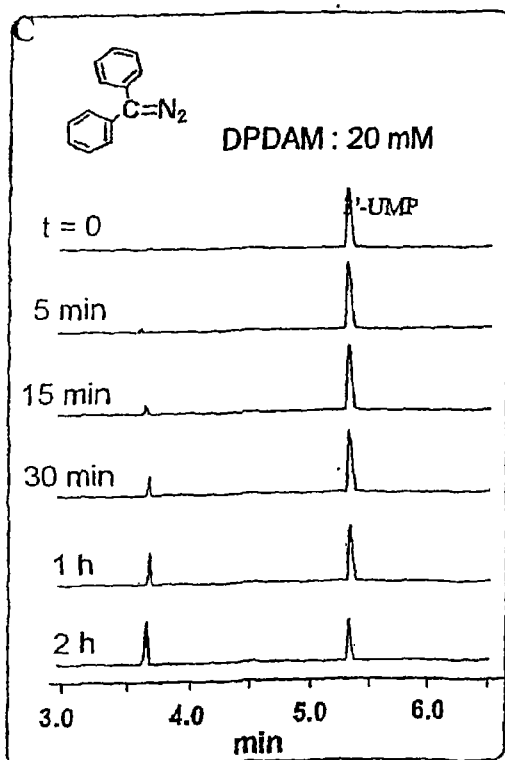


图 2C

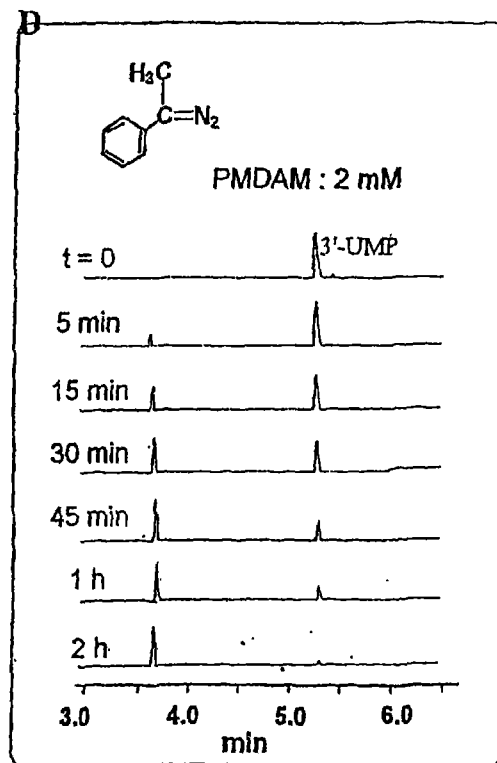


图 2D

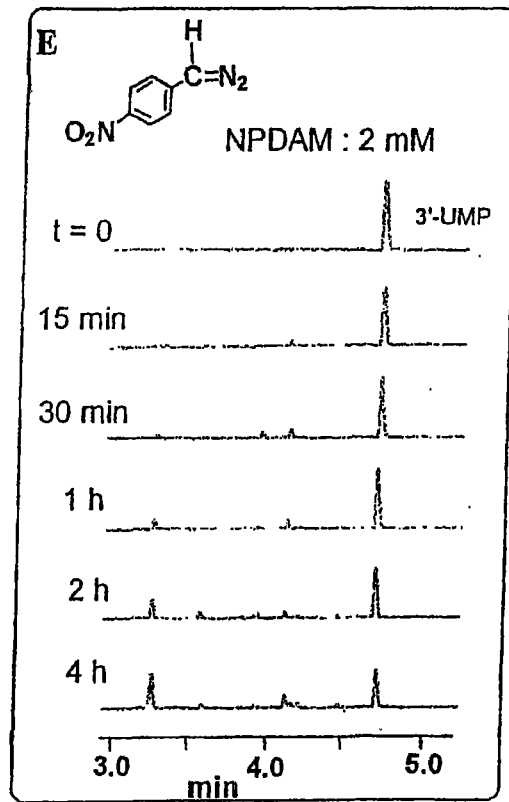


图 2E

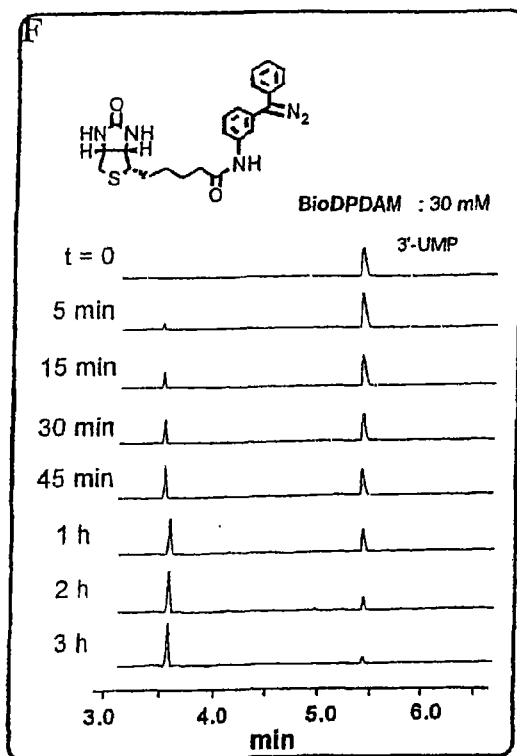


图 2F

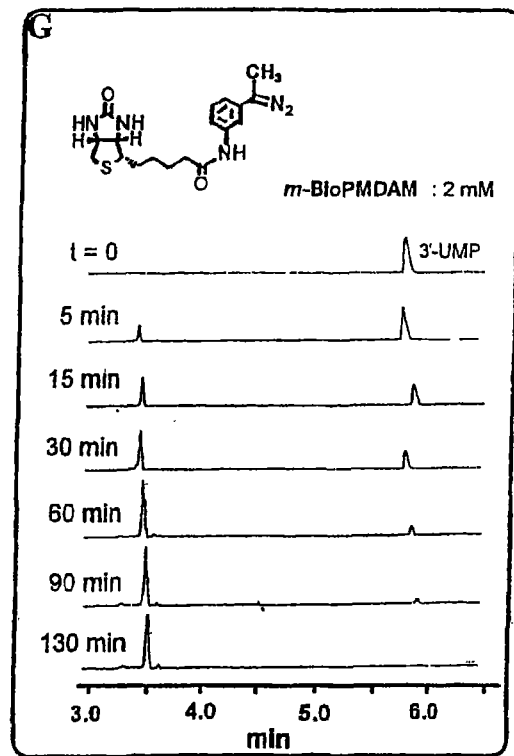


图 2G

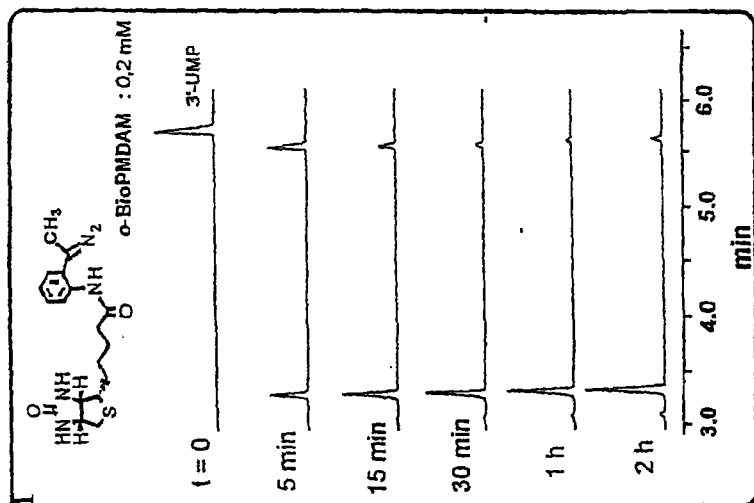


图 2I

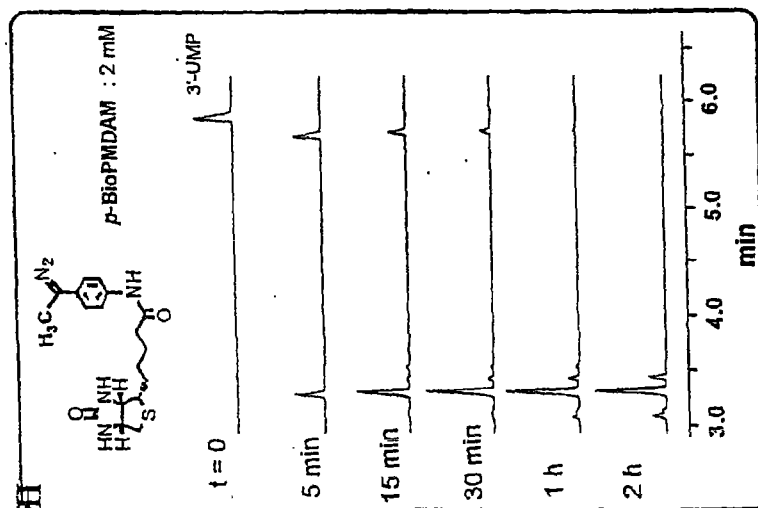


图 2H

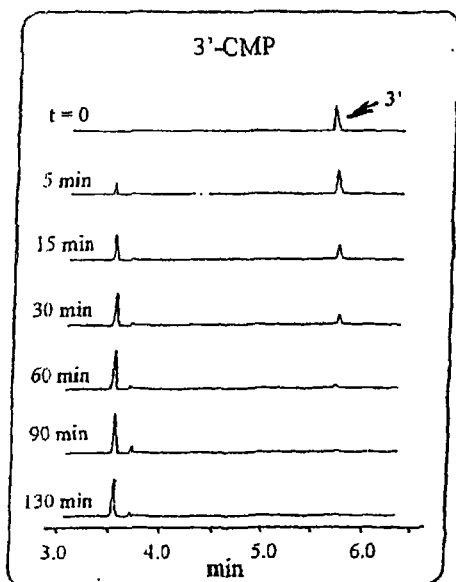


图 3A

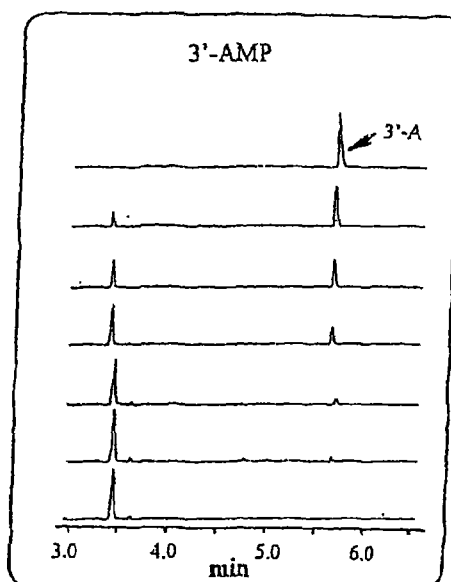


图 3B

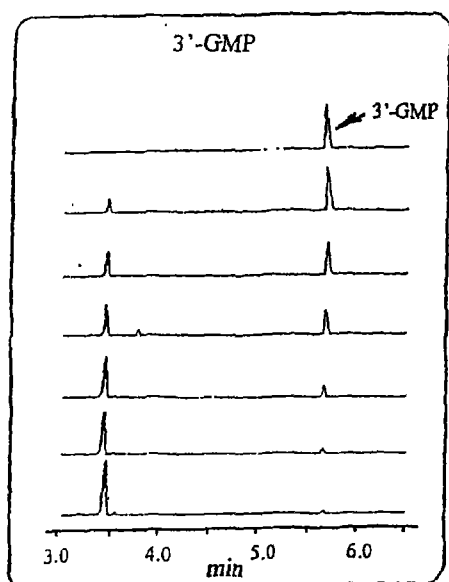


图 3C

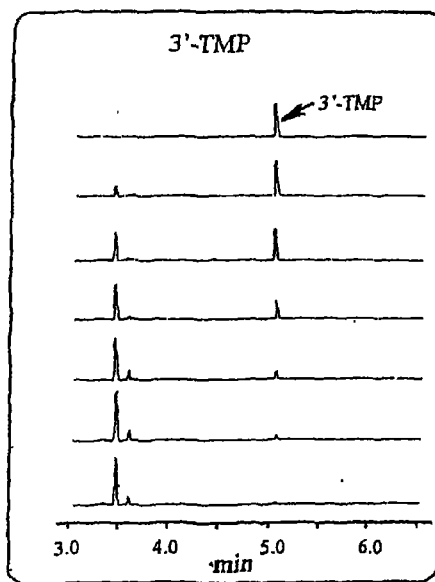


图 3D

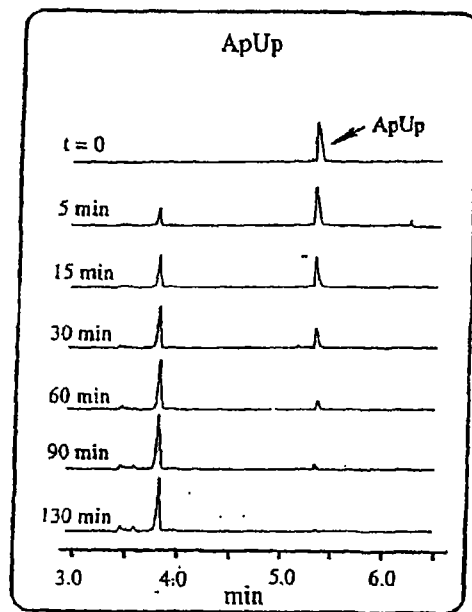


图 4

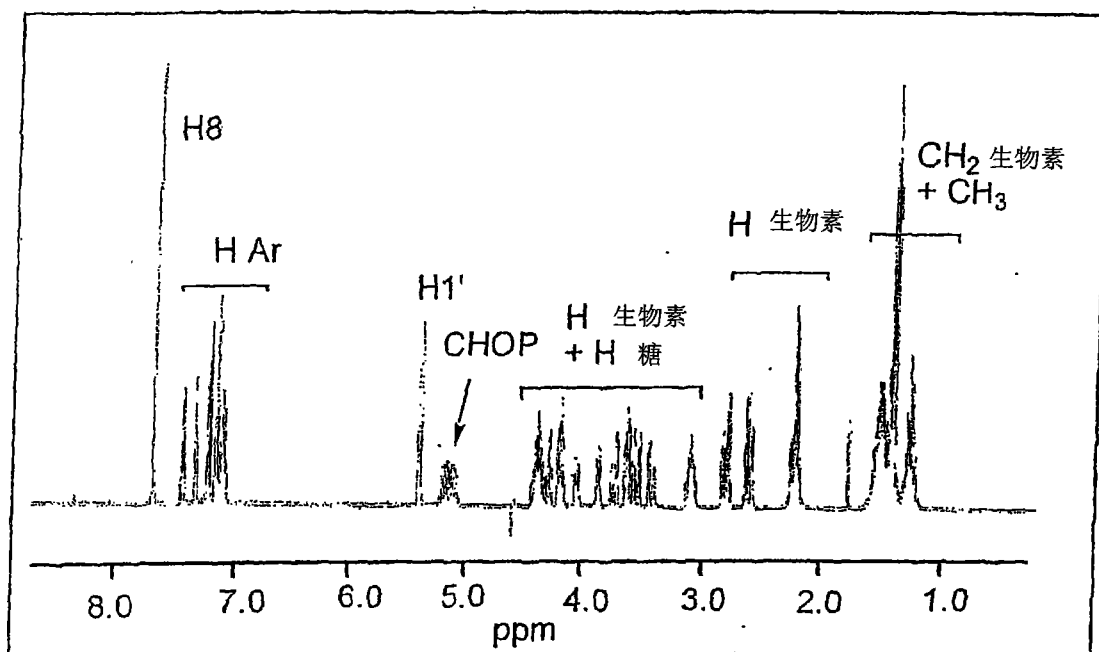


图 5A

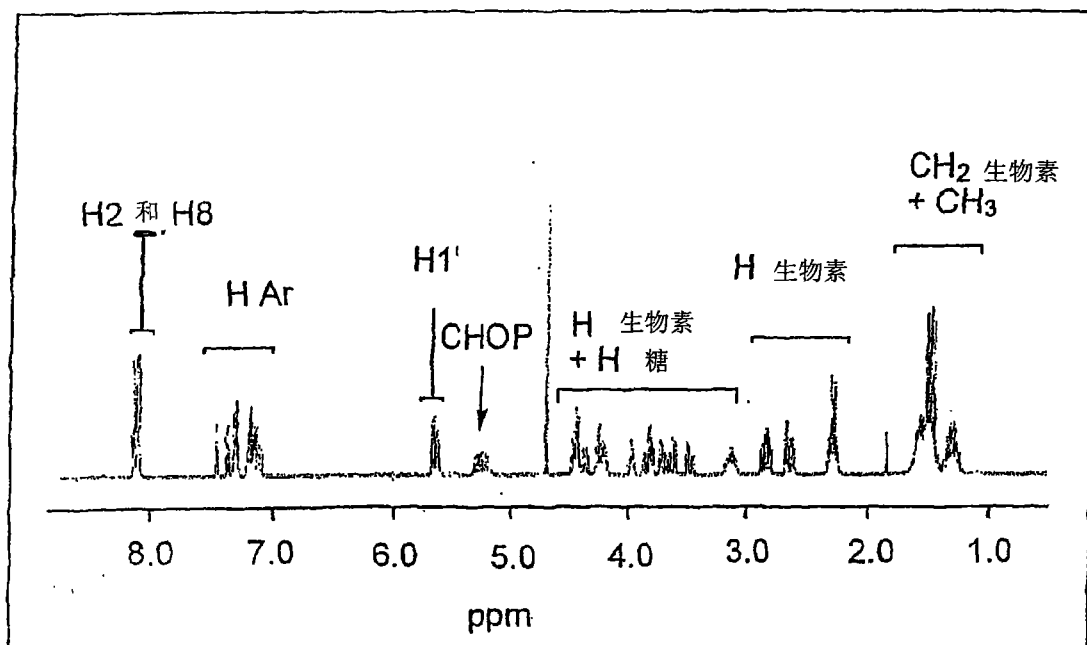


图 5B

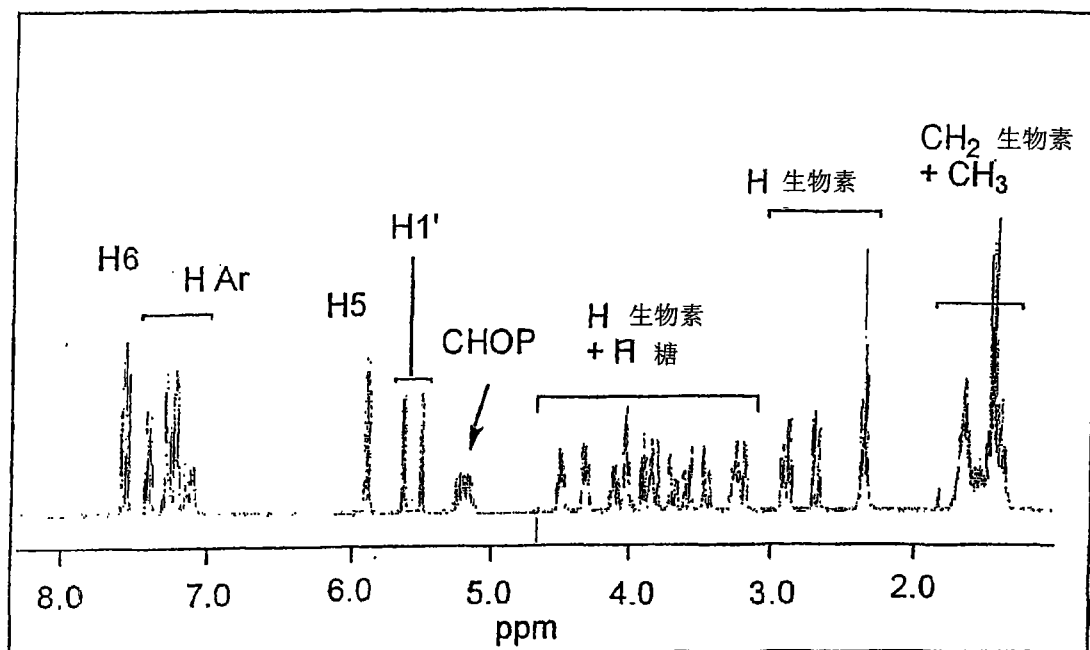


图 5C

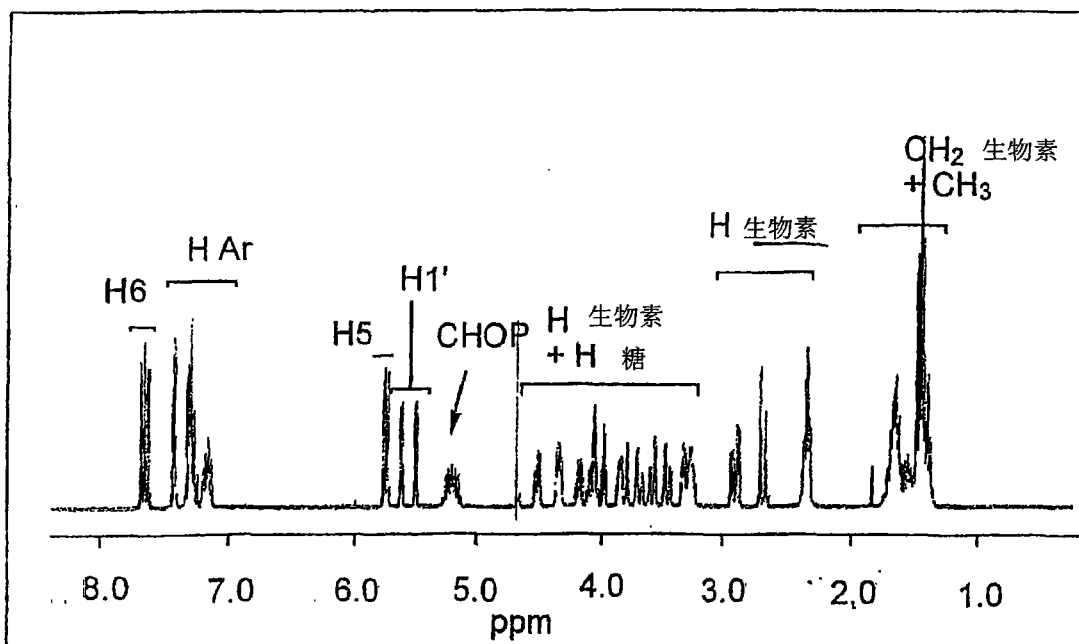


图 5D

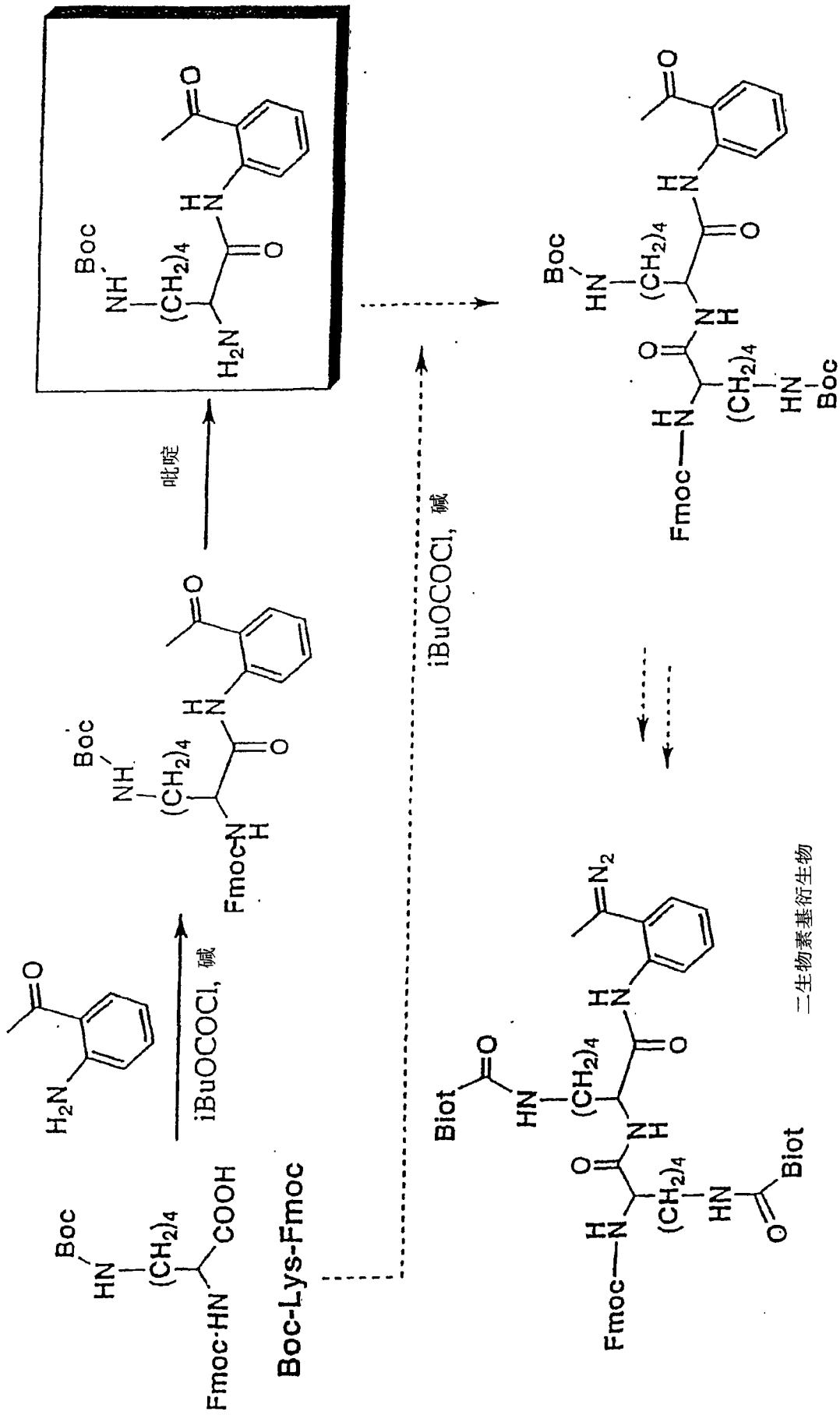


图 6

二生物素基衍生物

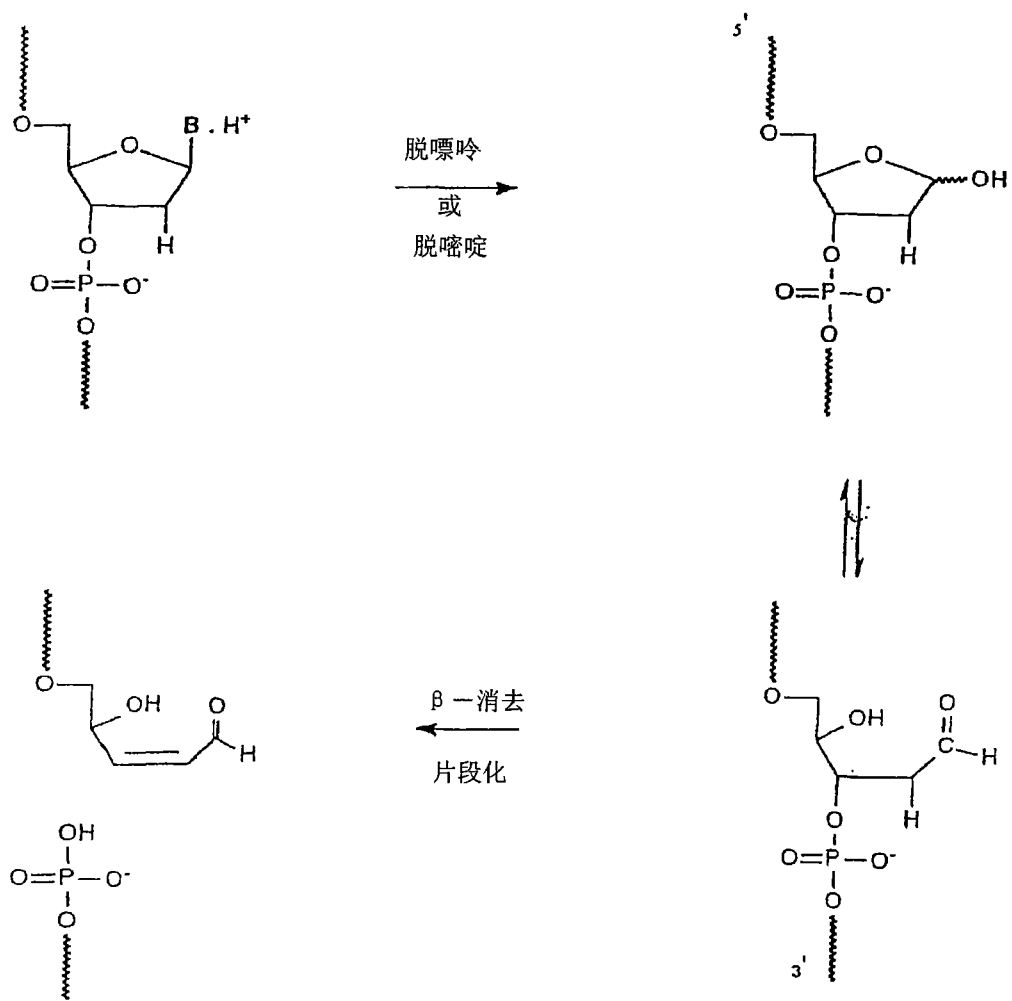


图 7

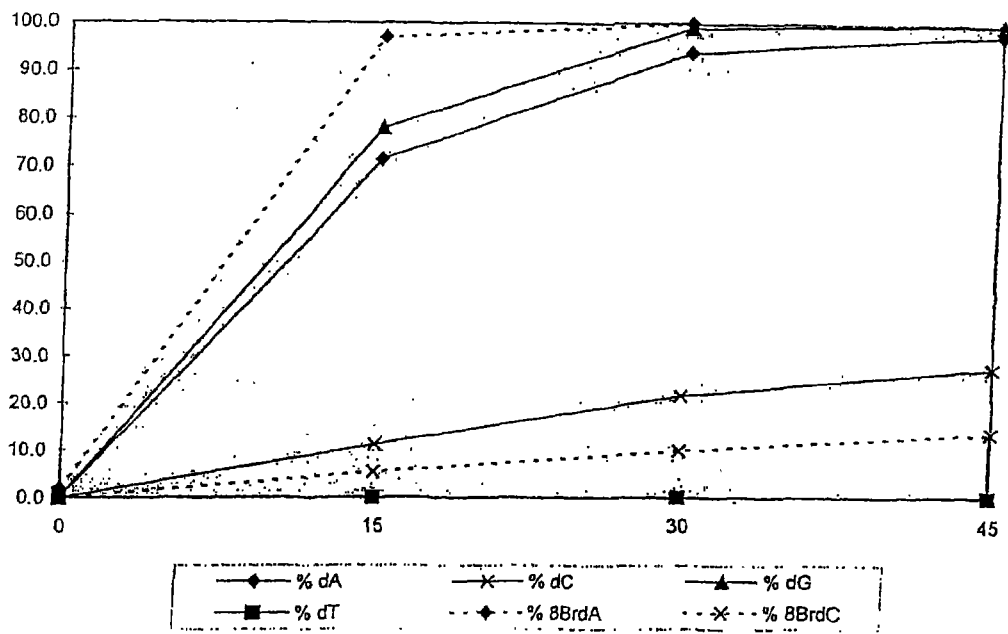


图 8

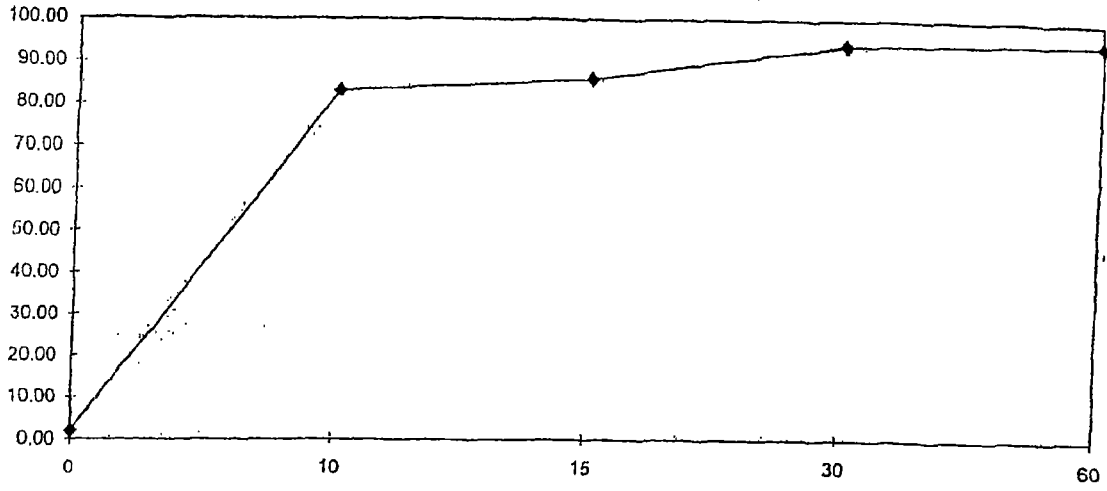


图 9

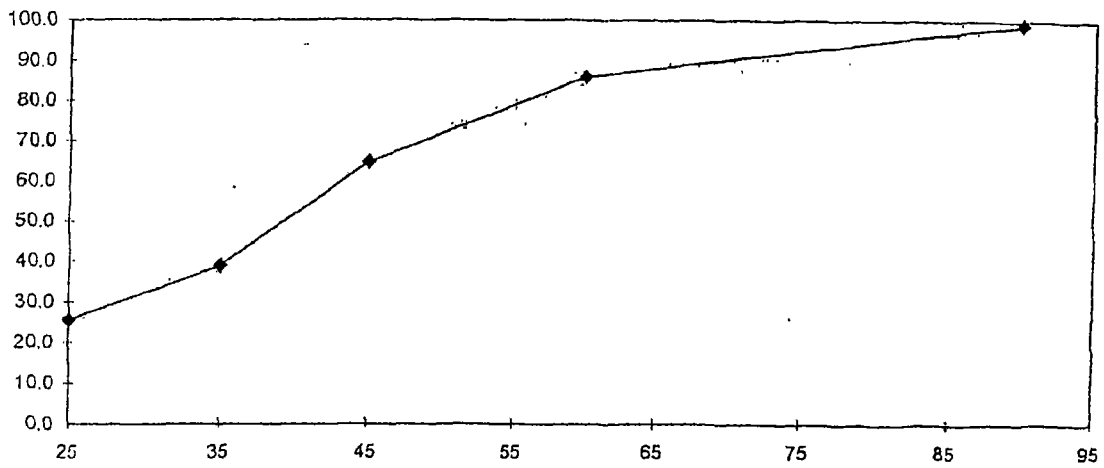


图 10

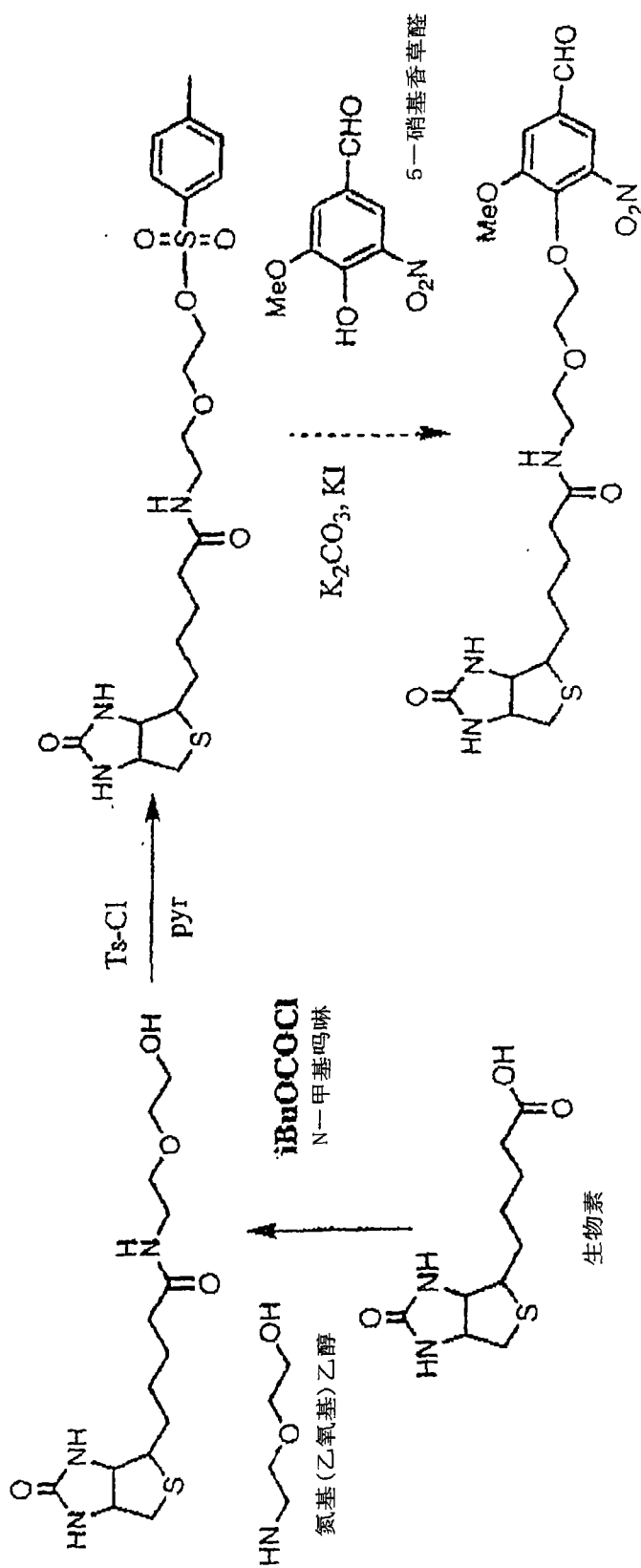


图 11