

[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 200480011356. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 100355886C

[22] 申请日 2004.6.29

[21] 申请号 200480011356. X

[30] 优先权

[32] 2003.6.30 [33] JP [31] 186151/2003

[32] 2004.6.25 [33] JP [31] 187133/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2004/009524 2004.6.29

[87] 国际公布 WO2005/014808 日 2005.2.17

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.27

[73] 专利权人 松下电器产业株式会社

地址 日本大阪府

[72] 发明人 上甲茂树

[56] 参考文献

CN1324410A 2001.11.28

WO03/12100A2 2003.2.13

CN1345328A 2002.4.17

用地高辛标记的 DNA 探针进行无放射性原位杂交. 苑金香. 昌潍师专学报, 第 18 卷第 2 期. 1999

审查员 滕 蕾

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 范 征

权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 9 页

[54] 发明名称

核苷酸链修饰方法

[57] 摘要

本发明提供的核苷酸链修饰方法的特征在于, 对 3' 端存在具有次黄嘌呤 (Hx) 等特定碱基的核苷酸序列的作为修饰对象的核苷酸链 (I), 用对含有所述特定碱基的核苷酸特异的分解酶进行作用, 在所述作为修饰对象的核苷酸链 (I) 的 3' 端加上对目标修饰物质 (例如具有氨基的 $\text{NH}_2 - \text{R}$) 具有结合能力的官能团 (例如醛基), 并在具有所述官能团的核苷酸链的 3' 端结合所述修饰物质。其特征还在于, 通过将 3' 端存在具有成为酶底物的特定碱基的核苷酸序列的核苷酸链作为修饰对象, 只分解所述的核苷酸序列部分, 形成与目标修饰物质反应并结合的官能团。通过这样, 可以对核苷酸链用修饰物质直接进行修饰, 简便地标记化、标志化的同时, 在以核苷酸链的固定化为目的的情况下, 可以将修饰物质作为连接物质进行稳定、牢固的固定化。

1. 核苷酸链修饰方法，其中，对3'端存在具有特定碱基的核苷酸序列的作为修饰对象的核苷酸链，用对含有所述特定碱基的核苷酸特异的分解酶进行作用，在所述作为修饰对象的核苷酸链的3'端加上对目标修饰物质具有结合能力的官能团，并在具有所述官能团的核苷酸链的3'端结合所述修饰物质，所述具有特定碱基的核苷酸序列位于作为主链的核苷酸链的3'端，所述特定碱基是不存在于所述主链中的碱基，使用次黄嘌呤作为所述特定碱基，使用3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶作为所述特异的分解酶，且加上醛基作为所述官能团。

2. 如权利要求1所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，将具有特定碱基的核苷酸序列添加到作为主链的核苷酸链的3'端。

3. 如权利要求2所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，将具有特定碱基的核苷酸序列通过加尾法添加。

4. 如权利要求2所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，将在3'端区域具有与该核苷酸链3'端区域互补的序列的核苷酸链退火结合到作为修饰对象的单链核苷酸链上，从而在所述作为修饰对象的核苷酸链的3'端添加含有特定碱基的互补核苷酸序列。

5. 如权利要求2所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，将至少一条核苷酸链作为修饰对象的双链核苷酸，用对作为修饰对象的核苷酸链的3'端区域的碱基序列能特异性识别的限制性酶剪切，从而在剪切的作为修饰对象的核苷酸链的3'端添加含有特定碱基的互补核苷酸序列。

6. 如权利要求2所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，在双链核苷酸中至少一条的作为修饰对象的核苷酸链的3'端，将在5'端区域具有含有特定碱基的核苷酸序列的双链核苷酸用DNA连接酶连接，通过对该连接的核苷酸链的所述特定碱基到3'端的碱基序列用特异性识别的限制性酶剪切，从而在所述的作为修饰对象的核苷酸链的3'端添加含有特定碱基的核苷酸序列。

7. 如权利要求4或5所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，核苷酸序列的添加通过使用DNA聚合酶掺入核苷酸而进行。

8. 如权利要求1所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，存在具有特定碱基的核苷酸序列的核苷酸链是化学合成的核苷酸链。

9. 如权利要求1所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，用分解酶作用

之前，添加具有与特定碱基互补的碱基序列的寡核苷酸。

10. 如权利要求1所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，修饰物质具有与核苷酸链3'端带有的官能团形成化学键的氨基。

11. 如权利要求1或10所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，修饰物质是使核苷酸链标记化、标志化的物质。

12. 如权利要求11所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，修饰物质是荧光物质、维生素、脂类、氨基酸、寡肽、蛋白质或者生物外源性物质。

13. 如权利要求1或10所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，修饰物质是具有与用于基因分析的基板结合的能力的物质。

14. 如权利要求13所述的核苷酸链修饰方法，其特征还在于，修饰物质是氨基烷烃硫醇或者氨基硅烷偶联化合物。

核苷酸链修饰方法

技术领域

本发明涉及核苷酸链修饰方法，尤其涉及用修饰物质直接修饰核苷酸链的3'端，将核苷酸链标记化、标志化、固定化的方法。

背景技术

以往，在基因分析中，用于将DNA、RNA、寡核苷酸、核酸等核苷酸链标记化、标志化的修饰物质一直采用放射性同位素，但因为由半衰期产生的使用期限的限制、使用场所的限制、被射线照射的问题、废弃的问题等问题，其使用逐渐减少。近年来，作为替代放射性同位素的修饰物质，用荧光素等荧光物质或者生物素等，对核苷酸链进行修饰，将其标记化、标志化的方法被广泛使用。修饰核苷酸链的方法可以分为5'端修饰法、3'端修饰法、内部修饰法这3种。

5'端修饰法，提出过通过5'端的磷酸基用生物素修饰的方法（参照例如下述的非专利文献1）。关于生物素，报道有利用生物素和亲和素（avidin）的高亲和性，用碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶等酶修饰，利用这些酶的化学发光使基因分析高灵敏度化的方法（参照例如非专利文献2～3）。通过5'端的磷酸基修饰的方法除此之外还提出了很多（参照专利文献1和非专利文献4～13）。

但是在通过5'端的磷酸基修饰的方法中，对核苷酸链，修饰物质的修饰量一般为1，而碱性磷酸酶会使核苷酸链5'端的磷酸基解离，所以为了实现高灵敏度化，一般必须避免与碱性磷酸酶的组合。碱性磷酸酶也存在于浮游在空气中的细菌中，掺杂到基因分析中的情况下，与5'端的磷酸基结合的修饰物质容易解离，修饰状态变得缺乏稳定性，也成为背景噪声的主要原因。而作为5'端修饰法广泛使用的亚磷酰胺法，由于反应进行得不完全，必须用液相色谱法等分离除去未反应物，操作繁杂。

内部修饰法，开发了在核苷酸链进行复制的反应时，将用于标记化、标志化的修饰物质预先进行修饰处理的脱氧核苷酸三磷酸掺入核苷酸链内，使核苷酸链标记化、标志化的随机引物法(random primer method)和切口平移法(nick

translation method) (参照例如专利文献4和非专利文献20~22)。

该修饰方法,通过与作为基因扩增反应的聚合酶链式反应,即PCR法(参照例如专利文献5~8和非专利文献23~25)组合,可以同时进行核苷酸链的扩增和标记化、标志化(参照例如非专利文献26),由此带来基因分析的高灵敏度化,实现了以基因芯片为代表的基因分析的高效化(参照例如专利文献9和非专利文献27~29)。

在这些随机引物法、切口平移法和PCR法中,从核苷酸链的掺入效率、修饰核苷酸链的合成等方面来看,多采用将胸苷用尿嘧啶或者预先以荧光物质等标记化、标志化的尿嘧啶代替掺入的核苷酸链的形成。而且,作为用尿嘧啶代替的优点,还有在使用PCR法时,向夹杂在反应混合液中的来自外源性污染的核苷酸链中掺入尿嘧啶,通过用尿嘧啶DNA糖基化酶作用,防止来自污染的核苷酸链的扩增的方法(参照例如专利文献11~13和非专利文献31~33)。

但是通过PCR法修饰物质向核苷酸链内的掺入,掺入数为10~20或30左右(参照例如非专利文献30),是随机的,没有达到完全的定量化。由于脱氧核苷酸三磷酸的标记化、标志化处理烦琐,任意的标记化、标志化处理产物不是人人都能容易地得到的,因此修饰物质的种类受到限制。而且,由于在核苷酸链内掺入修饰物质,在基因分析的杂交时,即核苷酸链形成双链时,会产生因为修饰物质引起的立体障碍。该方法也有用途限于将核苷酸链一开始就用荧光物质等标志化的缺点。

3'端修饰法,开发有合成预先进行标记化、标志化处理的脱氧核苷酸三磷酸或双脱氧核苷酸三磷酸(参照例如非专利文献14和专利文献2),将该标记化、标志化的核苷酸通过末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)添加在核苷酸链的3'端的加尾法(tailing method)(参照例如专利文献3和非专利文献15~18)。3'端修饰法可以根据需要修饰核苷酸链,与5'端修饰法相比修饰物质的持续稳定性更高,更适合作为修饰部位,所以被广泛采用。

但是脱氧核苷酸三磷酸或双脱氧核苷酸三磷酸的标记化、标志化处理烦琐,任意的标记化、标志化处理产物不是人人都能容易地得到的,因此修饰物质的种类受到限制。此外,在加尾阶段,因为在核苷酸链3'端添加不需要的核苷酸序列,特别是在使用脱氧核苷酸三磷酸的情况下,根据反应条件核苷酸的添加数是随机的(参照例如非专利文献19),所以虽然可以实现基因分析的高灵敏度化,但定量性存在问题。在3'端添加不需要的碱基序列也成为在基

因分析的杂交时错配的主要原因。

就添加多余的碱基这一点，在专利文献10中，提出了将添加的尿嘧啶的糖苷键用尿嘧啶DNA糖苷酶分解。但上述随机引物法、切口平移法和PCR法中，将胸苷用尿嘧啶代替掺入的核苷酸链的形成被广泛采用。在使用PCR法时，为了防止来自污染的核苷酸链的扩增而使用的尿嘧啶也掺入了扩增的核苷酸链中。因此，如果对于掺入尿嘧啶的核苷酸链使用专利文献10所记载的方法，尿嘧啶DNA糖基化酶不仅作用于添加在3'端的尿嘧啶，也作用于修饰对象核苷酸链中的尿嘧啶，结果核苷酸链自身被分解。

其他的3'端修饰法，也有在形成化学合成核苷酸链的合成初期，直接在3'端的核苷酸上结合用于标记化、标志化的修饰物质的方法，实现对核苷酸链的修饰物质较高的持续稳定性。但化学合成得到的核苷酸链的核苷酸数，由于合成副产物、收率等合成能力的关系，在100左右，这里使用的在3'端直接结合修饰物质的方法，对于用机体抽提和PCR等扩增的核苷酸数超过100的核苷酸链的3'端修饰不适用。即，被修饰的核苷酸链的链长有限制。

更进一步，这3种修饰方法在核苷酸链以双链的状态存在时，难以对其中一条核苷酸链进行选择性的修饰。即，用以往的方法对核苷酸链进行标记化、标志化的情况下，通常以双链的状态存在的核苷酸链的两条链同时被修饰，难以对其中某一条核苷酸链选择性地修饰，而将另一条核苷酸链分离除去。因此，对双链内的一条核苷酸链所含的基因信息进行分析时，无所需信息的另一条核苷酸链也被用于分析，成为产生疑似结果的主要原因。

另一方面，核苷酸链的修饰除了标记化、标志化，也有为了将核苷酸链固定到基板上而进行的。该用途的基板最初使用疏水性和正电荷的单面或者两面由硝化纤维素、尼龙、聚氟乙烯构成的基板，固定化的核苷酸链有时会解离。近年来，逐渐使用进行让核苷酸链的5'端或3'端带有氨基、醛基等官能团的修饰处理，采用玻璃、硅等基板，通过进行使其表面带有醛基、环氧基或氨基的预处理，使核苷酸链在基板上固定化的方法。通过用这样的方法在基板单位面积上固定化多个序列不同的核苷酸链，可实现基因分析芯片。但在这样的核苷酸链的固定化中，存在上述的核苷酸链修饰的问题。

（专利文献）

- 1 日本专利特许1706289号
- 2 日本专利特开昭61-115094号
- 3 日本专利特公平7-31194号

- 4 日本专利特表2000—508709号
- 5 日本专利特许1814713号
- 6 日本专利特许2093730号
- 7 日本专利特许2093731号
- 8 日本专利特许2613877号
- 9 日本专利特表平10—503841号
- 10 日本专利特愿2002—049055号
- 11 日本专利特许2103155号
- 12 日本专利特表2000—502251号
- 13 日本专利特开平11—113599号

(非专利文献)

- 1 Chu B.C.F等, Nucleic Acids Res., 第11卷, 第6543页, 1983年
- 2 Beck.S., Methods Enzymol., 第216卷, 第143页, 1992年
- 3 Bronstein.I.等, Methods Enzymol., 第217卷, 第398页, 1993年
- 4 Alves.A.M.等, Tetrahedron Lett., 第30卷, 第3089页, 1989年
- 5 Cocuzza.A.J., Tetrahedron Lett., 第30卷, 第6287页, 1989年
- 6 Theisen.P.等, Tetrahedron Lett., 第33卷, 第5033页, 1992年
- 7 Kempe.T.等, Nucleic Acids Res., 第13卷, 第45页, 1985年
- 8 Smith.L.M.等, Nucleic Acids Res., 第13卷, 第2399页, 1985年
- 9 Ansorge.W.等, Nucleic Acids Res., 第15卷, 第4593页, 1987年
- 10 Cook.A.F., Nucleic Acids Res., 第16卷, 第4077页, 1988年
- 11 Roget.A等, Nucleic Acids Res., 第17卷, 第1989年
- 12 Misiura.K.等, Nucleic Acids Res., 第18卷, 第4545页, 1990年
- 13 Pieles.U.等, Nucleic Acids Res., 第18卷, 第4355页, 1990年
- 14 Langer.P.R.等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 第78卷, 第6633页, 1981年
- 15 Roychoudhury.R.等, Nucleic Acids Res., 第3卷, 第101页, 1976年
- 16 Vincent.C.等, Nucleic Acids Res., 第10卷, 第6787页, 1982年
- 17 Yousaf.S.I.等, Gene, 第3卷, 第309页, 1984年
- 18 Schmitz.G.G.等, Anal.Biochem., 第192卷, 第222页, 1991年
- 19 Jackson.D.A.等Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 第69卷, 第2905页, 1972年

- 20 Feinberg. A. P等, Anal. Biochem., 第132卷, 第6页, 1983年
- 21 Feinberg. A. P等, Anal. Biochem., 第137卷, 第266页, 1984年
- 22 Rigby. P. W. J等, J. Mol. Biol., 第113卷, 第237页, 1977年
- 23 Mullis. K. B. 等, Methods Enzymol., 第155卷, 第335页, 1987年
- 24 Saiki. R., Science, 第239卷, 第487页, 1988年
- 25 Siebert. P. D. 等, Nature, 第359卷, 第557页, 1991年
- 26 Day. P. J. R. 等, Biochem. J., 第267卷, 第119页, 1990年
- 27 Schena. M. 等, Science, 第270卷, 第467页, 1992年
- 28 Schalon. D. 等, Genome Res., 第6卷, 第639页, 1996年
- 29 核酸芯片特集, Nature Genet., 第21卷, Supplement, 1月, 1999年
- 30 Amersham Bioscience公司网站
(http://www1.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/microarrays_labelling%5Cmicroarrays_labelling_cyscribe_postlabelling?OpenDocument&hometitle=microarrays, 2003年4月14日连接)
- 31 Longo. M. C. 等, Gene, 第93卷, 第125页, 1990年
- 32 Thornton. C. G. 等, BioTechniques, 第13卷, 第180页, 1992年
- 33 Sobek. H. 等, FEBS Lett., 第388卷, 第1页, 1996年

本发明是鉴于上述以往的问题而完成的, 目的是提供可以不论核苷酸链的碱基结构, 不伴随核苷酸链的分解, 在3'端用修饰物质直接修饰的核苷酸链修饰方法。

本发明的目的还在于提供不仅单链的核苷酸链的3'端, 还可以简便地对形成双链的其中一条核苷酸链的3'端进行选择性地修饰的核苷酸链修饰方法。

发明的揭示

为了达成上述目的, 本发明的核苷酸链修饰方法的特征在于, 对3'端存在具有特定碱基的核苷酸序列的作为修饰对象的核苷酸链, 用对含有所述特定碱基的核苷酸且特异性的分解酶进行作用, 在所述作为修饰对象的核苷酸链的3'端加上对目标修饰物质具有结合能力的官能团, 并在具有所述官能团的核苷酸链的3'端结合所述修饰物质。通过将3'端存在具有成为酶底物的特定碱基的核苷酸序列的核苷酸链作为修饰对象, 只分解所述的核苷酸序列部分, 形成与目标修饰物质反应并结合的官能团。通过这样做, 可以对核苷酸链用修饰

物质直接修饰，在可以简便地标记化、标志化的同时，在以核苷酸链的固定化为目的的情况下，可以将修饰物质作为连接物质进行稳定、牢固的固定。

具有特定碱基的核苷酸序列位于作为主链的核苷酸链的3'端，以所述特定碱基是不存在于所述主链中的碱基为佳。由此，即使分解酶作用，也可以避免主链被分解，可以将主链部分的序列信息保持完整状态。所谓的核苷酸链的序列信息以具有至少10个碱基左右的核苷酸序列为佳。

可以将具有特定碱基的核苷酸序列添加到作为主链的核苷酸链的3'端。所述方法是有目的地添加具有作为酶底物的碱基的核苷酸的方法。无论作为修饰对象的核苷酸链是单链还是双链，可以限定对核苷酸链的3'端用修饰物质简便地修饰。通过适当地选择添加的核苷酸序列，也排除不需要的碱基序列的掺入。

具体地，将在3'端区域具有与该核苷酸链3'端区域互补的序列的核苷酸链退火结合到作为修饰对象的单链核苷酸链上，可以在所述作为修饰对象的核苷酸链的3'端添加含有特定碱基的互补核苷酸序列。

此外，将至少一条链作为修饰对象的双链核苷酸链，用对作为修饰对象的核苷酸链的3'端区域的碱基序列能特异性识别的限制性酶剪切，可以在剪切了的作为修饰对象的核苷酸链的3'端添加含有特定碱基的互补核苷酸序列。

此外，在双链核苷酸链中至少一条的作为修饰对象的核苷酸链的3'端，将在5'端区域具有含有特定碱基的核苷酸序列的双链核苷酸链用DNA连接酶连接，通过对从连接的核苷酸链的所述特定碱基到3'端的碱基序列用特异性识别的限制性酶剪切，可以在所述的作为修饰对象的核苷酸链的3'端添加含有特定碱基的核苷酸序列。

核苷酸序列的添加可以通过使用DNA聚合酶掺入核苷酸进行。

存在具有特定碱基的核苷酸序列的核苷酸链可以是化学合成的核苷酸链。

用分解酶作用之前，添加具有与特定碱基互补的碱基序列的寡核苷酸为佳。通过使双链核苷酸的碱基间产生互补结合，能够提高酶的底物特异性，可以提高反应效率。

在作为修饰对象的核苷酸链的3'端可以使其带有例如醛基。具体地，通过将DNA糖苷酶作为分解酶，可以使作为修饰对象的核苷酸链的3'端带有醛基。更具体地，当特定碱基是次黄嘌呤时，通过将3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶作为分解酶，可以使作为修饰对象的核苷酸链的3'端带有醛基。

特定碱基和分解酶可以是各种组合，但是有时例如因为向核苷酸链掺入尿

嘧啶在基因分析的各种方法中被广泛采用，不希望将其用作特定碱基。通过使用频率低的次黄嘌呤及其分解酶，可以大幅提高实施核苷酸链的3'端修饰时使用者的便利性。此外，可以不管核苷酸链的碱基的结构和链长，对核苷酸链的3'端直接地、简便地，用任意的修饰物质定量地、稳定地修饰。该方法是排除不需要的碱基序列、被修饰的碱基向核苷酸链内的掺入，只对核苷酸链3'端用修饰物质进行修饰的方法。

除了上述的次黄嘌呤和3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶的组合外，还可以使用例如以下表1中所示的组合，使作为修饰对象的核苷酸链的3'端带有醛基。

表1

向核苷酸链3'端掺入的核苷酸的碱基	适用的DNA糖苷酶、DNA修复酶
• 次黄嘌呤	• 次黄嘌呤DNA糖苷酶
• 3-甲基腺嘌呤 • 3-乙基腺嘌呤	• 3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶 I 型
• 3-甲基腺嘌呤 • 次黄嘌呤 • 黄嘌呤 • 3-甲基鸟嘌呤 • 7-甲基鸟嘌呤 • 1, N ⁶ -乙酰基腺嘌呤 • 8-氧代鸟嘌呤 • 7-乙基嘌呤 • 3-乙基嘌呤 • 7, 3-二乙基嘌呤 • 1-羧乙基腺嘌呤 • 7-羧乙基鸟嘌呤 • 0 ² -甲基嘧啶 • 7 (2-乙氧基乙基) 鸟嘌呤 • 7 (2-羟乙基) 鸟嘌呤 • 7 (2-氯乙基) 鸟嘌呤 • 1, 2-二 (7-鸟嘌呤基) 乙烷 • 3-乙硫基乙基嘌呤 • N ^{2,3} -桥亚乙基鸟嘌呤 • N ^{2,3} -亚乙烯基鸟嘌呤 • 5-羟甲基尿嘧啶 • 5-甲酰基尿嘧啶 • 1, N ⁴ -亚乙烯基胞嘧啶 • 1, N ² -亚乙烯基鸟嘌呤 • 3, N ² -亚乙烯基鸟嘌呤	• 3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶 II 型

表1 (续)

向核苷酸链3'端掺入的核苷酸的碱基	适用的DNA糖苷酶、DNA修复酶
• 尿嘧啶 • 5-羟基尿嘧啶 • 5,6-二羟基尿嘧啶 • 5-氟尿嘧啶	• 尿嘧啶DNA糖苷酶
• 胸腺嘧啶乙二醇 • 5,6-二氢胸腺嘧啶 • 5,6-二羟基二氢胸腺嘧啶 • 羟基胞嘧啶 • 尿素 • 5-羟基-5-甲基乙内酰脲 • 6-羟基-5,6-二羟基嘧啶 • 5-羟基尿嘧啶 • 5-羟基-6-氢胸腺嘧啶 • 5,6-二氢尿嘧啶 • 尿嘧啶乙二醇 • 5-羟基-6-氢尿嘧啶	• 核酸内切酶III
• 8-氧代鸟嘌呤 • 7,8-二氢-8-氧代鸟嘌呤 • 8-氧代腺嘌呤 • 甲酰胺基鸟嘌呤 • 甲基甲酰胺基鸟嘌呤	• 8-氧代鸟嘌呤DNA糖苷酶
• 7-甲基鸟嘌呤 • 1,6-二氨基-5-甲酰胺基嘧啶 • 甲酰胺基鸟嘌呤 • 甲基甲酰胺基鸟嘌呤 • 甲酰胺基腺嘌呤 • 8-氧代腺嘌呤 • 8-氧代鸟嘌呤 • 7,8-二氢-8-氧代鸟嘌呤 • 羟基胞嘧啶 • 5-羟基尿嘧啶 • 黄曲霉素结合咪唑开环鸟嘌呤 • 咪唑开环N-2-氨基苄-8-鸟嘌呤	• 甲酰胺基嘧啶DNA糖苷酶
• 8-氧代鸟嘌呤 • 腺嘌呤/鸟嘌呤错配	• MutY-DNA糖苷酶
• 1,N⁴-乙基胞嘧啶 • 尿嘧啶/鸟嘌呤错配	• 错配尿嘧啶DNA糖基化酶
• 嘧啶二聚体	• 嘧啶二聚体DNA糖基化酶
• 胸腺嘧啶/鸟嘌呤错配 • 鸟嘌呤/鸟嘌呤错配	• 胸腺嘧啶DNA糖苷酶

修饰物质可以适用具有与使核苷酸链3'端带有的官能团形成化学键的氨基的物质。

修饰物质可以是使核苷酸链标记化、标志化的物质。由此，可以将被修饰的核苷酸链作为基因分析中的检出探针或靶。

这样的修饰物质可以适用荧光物质、维生素、脂类、氨基酸、寡肽、蛋白质或者生物外源性物质。由于氨基酸、寡肽、蛋白质具有氨基，通过使其他物质带有氨基，可以使之与核苷酸链3'端的醛基融合。由此，在核苷酸链上可以添加荧光物质、维生素、脂类、氨基酸、寡肽、蛋白质或者生物外源性物质具有的功能。

修饰物质可以是具有与用于基因分析的基板的结合能力的物质。由此，可以将被修饰的核苷酸链作为检出探针或靶稳定地固定化在基板上。

这样的修饰物质可以适用氨基烷烃硫醇或者氨基硅烷偶联化合物。这些化合物可以在贵金属制、玻璃制或树脂制的基板上稳定地结合。

附图的简单说明

图1是表示本发明实施方式1的核苷酸链修饰方法的原理的说明图；

图2表示了图1所示的核苷酸链修饰方法的部分过程，将生成的醛衍生物用荧光素修饰的过程的化学反应式；

图3表示了图1所示的核苷酸链修饰方法的部分过程，将生成的醛衍生物用氨基烷烃硫醇修饰的过程和将其固定化在贵金属基板上的过程的化学反应式；

图4是表示本发明实施方式2的核苷酸链修饰方法的原理的说明图；

图5表示了图4的核苷酸链的反应中心部分的化学反应式；

图6是表示本发明实施方式3的核苷酸链修饰方法的原理的说明图；

图7是表示本发明实施方式4的核苷酸链修饰方法的原理的说明图；

图8是表示本发明实施方式5的核苷酸链修饰方法的原理的说明图；

图9表示了本发明实施例1的核苷酸链修饰方法中各反应过程的核苷酸链的聚丙烯酰胺电泳的结果；

图10表示了本发明实施例2的核苷酸链修饰方法中各反应过程的核苷酸链的底片曝光的结果；

图11表示了本发明实施例3的核苷酸链修饰方法中各反应过程的核苷酸链的聚丙烯酰胺电泳和底片曝光的结果。

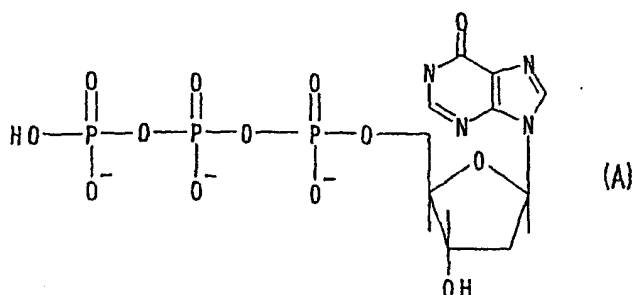
实施发明的最佳方式

以下，参照附图对本发明的实施方式进行了说明。

(实施方式1)

基于图1对本发明的实施方式1进行说明。图中，1、m和n表示0或者任意的自然数，碱基表示腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶等任意碱基，Hx表示次黄嘌呤，Cyt表示胞嘧啶。

通过将任意碱基序列的核苷酸链(I)和2'-脱氧次黄嘌呤核苷-5'-三磷酸(A)(如下所示构造具有次黄嘌呤Hx)以末端脱氧核苷酸转移酶作用，在核苷酸链(I)的3'端添加含有次黄嘌呤的核苷酸序列，得到核苷酸链(II)。



通过让具有胞嘧啶的数十个核苷酸长度的寡核苷酸链(B)退火结合到得到的核苷酸链(II)上，得到核苷酸链(III)。

通过对该成为部分双链的核苷酸链(III)用3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶II型作用，进行碱性热处理，将具有次黄嘌呤的核苷酸的糖苷键切断，将残存的脱氧核糖-磷酸键切断，得到在3'端具有醛基的核苷酸链(IV)。

通过将具有氨基的修饰物质($\text{H}_2\text{N}-\text{R}$ (关于修饰物质在后面讨论))与该核苷酸链(IV)反应，得到核苷酸链(IV)与修饰物质脱水缩合得到的席夫碱，即3'端被修饰物质直接修饰的核苷酸链(V)。

如果目标核苷酸链是可化学合成的数十个核苷酸链长的核苷酸链，通过预先合成具有特定碱基序列的核苷酸链，可以省去第一阶段的反应。

如图2所示，如果将已知作为荧光物质的荧光素尸胺(C)与在3'端具有醛基的核苷酸链(IV)反应，则得到在核苷酸链的3'端直接结合荧光素尸胺的修饰核苷酸链(VI)。

通过这样用荧光素修饰，可以将核苷酸链荧光标记化(标志化)，能够将该核苷酸作为用于杂交等基因分析的探针或靶。

如图3所示，如果将具有氨基的硫醇，这里用8-氨基-1-辛硫醇(D)与

在3'端具有醛基的核苷酸链(IV)反应,则得到在核苷酸链的3'端直接结合8-氨基-1-辛烷硫醇残基的修饰核苷酸链(VII)。

通过将该修饰核苷酸链(VII)与贵金属的基板(E)反应,使硫醇基和基板(E)形成牢固的共价键,可以将核苷酸链(VII')固定化在基板(E)上。

通过这样固定化在基板(E)上,可以将把贵金属用于基板的电化学测定法、晶体振荡子微平衡法、表面等离子体振子共振法等测定法进行基因分析。

用于将核苷酸链标记化、标志化的修饰物质,具有对于核苷酸链3'端带有的官能团的结合能力即可。例如是荧光物质的荧光素、德克萨斯红(Texas red)、若丹明、以Cy3·Cy5为代表的花青化合物,或者非荧光物质的生物素、异羟基洋地黄毒甙元等,通过在末端形成氨基,可以作为修饰物质使用。可以将用这些修饰物质标记化(标志化)的核苷酸链作为用于杂交等基因分析的探针或靶。

氨基酸、肽、蛋白质也可以用作修饰物质。氨基酸中,因为苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸具有荧光性,可以用于标记化、标志化。不具有荧光性的氨基酸和肽,通过在侧链上结合上荧光素等(下称标记化合物),也可以用于标记化、标志化。

氨基酸连接成的肽,由于存在对应于氨基酸数的侧链,所以可以连接多个标记化合物。例如,三聚赖氨酸中侧链上存在3个氨基,可以任意地结合具有羧基、琥珀酰亚胺基等的标记化合物达到总共3个。

不局限于肽,使用将具有氨基的烷基、烯丙基、环烷基、芳香族、糖类等烃类以标记化合物修饰得到的物质,也可以用作修饰物质,对核苷酸链进行修饰,实现核苷酸链的标记化、标志化。

还可以将例如碱性磷酸酶、过氧化物酶、具有有色性或荧光性的运铁蛋白、血红蛋白、绿色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、水母蛋白(aequorin)等蛋白质用作修饰物质,对核苷酸链进行标记化、标志化,对基因分析,尤其是原位杂交,十分有用。

除此之外,在表面形成氨基的金胶体、银胶体等贵金属胶体,磁性微粒,聚苯乙烯珠粒等高分子微粒为代表的微粒等也可以用作核苷酸链的修饰物质。

要将核苷酸链固定化在贵金属上的情况下,可以采用在统称为烷烃硫醇的硫醇化合物中具有氨基的化合物作为修饰物质。因为可以通过修饰物质将核苷酸链固定化在贵金属上,可以将把贵金属用于基板的电化学测定法、晶体振荡子微平衡法、表面等离子体振子共振法等测定法进行基因分析。

烷烃硫醇只要存在与贵金属结合的硫醇基和氨基，可以对结构等无特别限制地使用。氨基、硫醇基间的烃残基可以是直链状、具支链状、环状、烯丙基链状、芳香环状等各种形态，其碳原子数、氨基的位置等也有各种可能。

基板晶体振荡子微平衡法、表面等离子体振子共振法等中，广泛使用金的基板，但根据测定法等，也可以使用铂、银、铜、钯、铟、镍、铁、铝及它们的合金等作为基板。

修饰物质可以使用具有氨基的硅烷偶联化合物，由此，可以将核苷酸链固定化在玻璃、硅、二氧化硅、氧化铝、云母以及聚苯乙烯、尼龙、环氧树脂等高分子树脂等的基板上，也可适用于以往的各种基因分析方法。

硅烷偶联化合物只要是具有氨基和烷氧基的化合物，就和烷烃硫醇一样，可以对结构等无特别限制地使用。可以使用的硅烷偶联化合物有例如 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷、N- β （氨基乙基）- γ -氨基丙基三甲氧基硅烷、N- β （氨基乙基）- γ -氨基丙基三甲氧基硅烷、N- β （氨基乙基）- γ -氨基丙基三乙氧基硅烷、 γ -氨基丙基三甲氧基硅烷等。

本来不具有氨基的物质，通过使用适当的具有氨基的间隔基团（spacer），也可以对核苷酸链进行修饰。例如具有羧基的物质，通过使用1,2-二氨基乙烷、1,6-二氨基己烷等具有二氨基结构的物质，作为间隔基团，可以对核苷酸链进行修饰。

更进一步，具有胍基、氨基氧基、氰基的物质，或者类似格利雅试剂（Grignard reagent）具有卤化镁的物质，也可以作为修饰物质使用。

（实施方式2）

图4表示了本发明实施方式2的核苷酸链修饰方法的原理，图5表示了图4的核苷酸链的反应中心部分的化学反应式。

在图4和图5中， N_0 表示腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶中任意的碱基， N_1 表示与 N_0 形成互补的碱基对的腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶中任意的碱基。 N_2 表示与 N_0 不形成互补的碱基对的腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶中任意的碱基， N_3 表示与 N_2 形成互补的碱基对的腺嘌呤、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶中任意的碱基。C表示胞嘧啶，Hx表示次黄嘌呤，这些 N_0 、 N_1 、 N_2 、 N_3 、C、Hx均包含于2'-脱氧核苷酸（以下简称核苷酸）中。 N_0 、 N_1 、 N_2 、 N_3 只表示了部分，并没有限定个数。

dITP、dATP、dCTP、dTTP分别表示2'-脱氧次黄嘌呤核苷-5'-三磷酸、2'-脱氧腺嘌呤核苷-5'-三磷酸、2'-脱氧胞嘧啶核苷-5'-三磷酸、

2'-脱氧胸腺嘧啶核苷-5'-三磷酸。 $\text{NH}_2\text{-R}$ 表示如前所述的具有氨基的任意的修饰物质。

作为修饰对象的核苷酸链(2-1;表示图4中的编号。以下同)在3'端区域有碱基 N_0 的序列。将另外得到的核苷酸链(2-2)与该核苷酸链(2-1)退火结合,形成双链核苷酸。核苷酸链(2-2)在3'端具有与核苷酸链(2-1)3'端区域的碱基 N_0 互补的任意碱基 N_1 的序列,在其靠近5'端具有胞嘧啶C,接着具有与碱基 N_0 不互补的任意碱基 N_2 的序列,退火结合后5'端区域突出。

对该部分双链的核苷酸通过将DNA聚合酶作为催化剂,掺入dITP、dATP、dCTP、dTTP形成完整的双链核苷酸。这时形成的核苷酸链(2-3)是在核苷酸链(2-1)的3'端加上与核苷酸链(2-2)单链区域互补的核苷酸序列的核苷酸链,具有对应于核苷酸链(2-2)的胞嘧啶C的次黄嘌呤Hx。

通过对形成的完整的双链核苷酸以3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶II型作用,并进行碱性热处理,含有次黄嘌呤Hx的核苷酸(脱氧核糖)的1'位碳原子和氧原子之间糖苷键特异性地分解,由此形成的核苷酸链(2-4)的3'端带有醛基。

然后,添加具有氨基的修饰物质($\text{NH}_2\text{-R}$),通过使各个醛基和氨基反应,形成席夫碱。这时形成的核苷酸链(2-5)是目标产物,成为在初始物质核苷酸链(2-1)3'端直接结合修饰物质的核苷酸链。

修饰结束后,将不需要的核苷酸链(2-2)分离除去。该核苷酸链(2-2)的除去可以通过对结合修饰物质的双链核苷酸进行热处理,或者使核苷酸链(2-2)5'端成为磷酸基,以将其特异性分解的 λ 核酸外切酶作用,容易进行。通过预先将核苷酸链(2-2)的碱基 N_1 、 N_2 的鸟嘌呤部分替换成次黄嘌呤,可以通过3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶II型将其小片段化。

(实施方式3)

图6表示了本发明实施方式3的核苷酸链修饰方法的原理。该方法中,在双链核苷酸中作为修饰对象的其中一条核苷酸链上,添加含有作为上述3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶II型酶底物的次黄嘌呤的核苷酸序列。

图中, N_0 、 N_1 、 N_2 、C、Hx、5'和3'的含义与前述相同, N_4 表示与 N_2 形成互补碱基对的腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶中任意的碱基,A、G、T分别表示腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶。

双链核苷酸由第1核苷酸链(2-11)和第2核苷酸链(2-12)构成,其中核苷酸链(2-11)为修饰对象。核苷酸链(2-11)在3'端区域具有碱基 N_0

的序列，核苷酸链（2-12）在5'端区域具有碱基 N_1 的序列。

对该双链核苷酸进行加热处理或者碱性处理解离为单链，将第3核苷酸链（2-13）退火结合到解离的核苷酸链（2-11），形成部分双链的核苷酸。第2核苷酸链（2-13）在3'端具有与核苷酸链（2-11）的3'端区域的碱基 N_0 互补的任意的碱基 N_1 的序列，在靠近5'端具有胞嘧啶C，接着具有与碱基 N_0 不互补的任意的碱基 N_2 的序列，在退火后从胞嘧啶C开始5'端成为单链。

对该部分双链的核苷酸通过将DNA聚合酶作为催化剂，掺入dITP、dATP、dCTP、dTTP形成完整的双链核苷酸。这时形成的核苷酸链（2-14）是在核苷酸链（2-11）的3'端加上与核苷酸链（2-2）单链区域互补的核苷酸序列的核苷酸链，对应于核苷酸链（2-2）的胞嘧啶C的位置上具有次黄嘌呤Hx。

对该完整的双链核苷酸可以通过进行与实施方式2同样的操作，使核苷酸链（2-11）的3'端带有醛基，使其结合修饰物质，除去不需要的核苷酸链。

在这里示例了只将其中一条核苷酸链作为修饰对象的情况的修饰方法，但可以知道将两条核苷酸链都作为修饰对象的情况下也同样是可以修饰的。

（实施方式4）

图7表示了本发明实施方式4的核苷酸链修饰方法的原理。该方法是在形成双链的核苷酸链上存在适当的限制性酶剪切位点的情况下的核苷酸链修饰方法。

图中， N_0 、 N_1 、A、G、T、C、Hx的含义与前述相同， N_2 、 N_4 表示任意选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、次黄嘌呤、尿嘧啶等碱基的相互互补的碱基。

双链核苷酸由第1核苷酸链（2-21）和第2核苷酸链（2-22）构成，其中核苷酸链（2-21）为修饰对象。在核苷酸链（2-21）的3'端区域（核苷酸链（2-22）的5'端区域）存在限制性酶Bam HI可识别、剪切的碱基序列（GGATCC/CCTAGG）。

首先，将双链核苷酸用Bam HI剪切，形成由 N_0 的3'端只存在G的核苷酸（2-23）和 N_1 的5'端存在CCTAG的核苷酸（2-24）构成的部分双链的核苷酸。

对该部分双链的核苷酸通过将DNA聚合酶作为催化剂，掺入dITP、dATP、dCTP、dTTP形成完整的双链核苷酸。这时形成的核苷酸链（2-25）是在核苷酸链（2-23）的3'端加上与核苷酸链（2-24）单链区域互补的核苷酸序列的核苷酸链，对应于核苷酸链（2-24）的胞嘧啶C的位置上具有次黄嘌呤Hx。

对该完整的双链核苷酸可以通过进行与实施方式2同样的操作，在核苷酸

链(2-21)的3'端只添加1核苷酸并使其带有醛基,使其结合修饰物质,除去不需要的核苷酸链。

(实施方式5)

图8表示了本发明实施方式5的核苷酸链修饰方法的原理。在该方法中,连接在碱基序列中预先掺入次黄嘌呤的双链核苷酸。

图中, N_0 、 N_1 、C、Hx的含义与前述相同, N_2 、 N_4 表示任意选自腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、次黄嘌呤、尿嘧啶等碱基的相互互补的碱基。

双链核苷酸由第1核苷酸链(2-31)和第2核苷酸链(2-32)构成,其中核苷酸链(2-31)为修饰对象。核苷酸链(2-31)在3'端区域具有碱基 N_0 的序列,核苷酸链(2-32)在5'端区域具有与核苷酸链(2-31)的3'端区域形成互补碱基对的碱基 N_1 的序列。

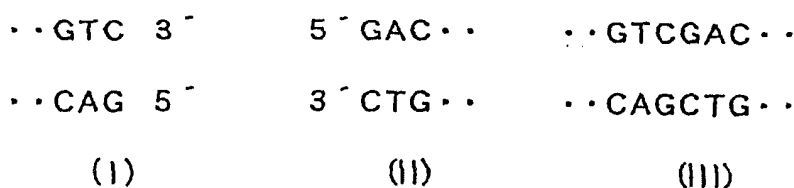
在该双链核苷酸上,以DNA连接酶作为催化剂连接另外的双链核苷酸。该另外的双链核苷酸使用由在次黄嘌呤Hx两侧具有碱基 N_4 的序列的核苷酸链(2-33)和在胞嘧啶C的两侧具有与碱基 N_4 互补的碱基 N_2 的核苷酸链(2-34)构成的核苷酸链,连接后使得在修饰对象核苷酸链(2-31)的3'端为核苷酸链(2-33)。由此,形成由核苷酸链(2-35)(核苷酸链(2-31)和核苷酸链(2-33))和核苷酸链(2-36)(核苷酸链(2-31)和核苷酸链(2-33))构成的双链核苷酸。

对该完整的双链核苷酸可以通过进行与实施方式2同样的操作,使核苷酸链(2-31)的 N_0 序列旁的3'端带有醛基,使其结合修饰物质,除去不需要的核苷酸链。

在该实施方式5中,从次黄嘌呤Hx的位置开始在5'端(和从胞嘧啶C的位置开始在3'端)使其具有对应于3碱基对(N_2-N_4)的核苷酸序列,这部分核苷酸序列也可以省略。

但是,如果在连接处形成由限制性酶识别的序列,通过DNA连接酶的连接反应效率提高,所以预先在次黄嘌呤Hx的位置开始的5'端(和胞嘧啶C的位置开始的3'端)使其具有对应于3~4个碱基对的核苷酸序列为佳。

例如,核苷酸链(2-31)3'端的碱基 N_0 的序列和核苷酸链(2-32)5'端的碱基 N_1 的序列为如下序列(I)的情况下,如果使核苷酸链(2-33)中次黄嘌呤Hx的位置开始的5'端和核苷酸链(2-34)中胞嘧啶C的位置开始的3'端具有如下序列(II),在连接处形成序列(III),由于该序列(III)为限制性酶Hinc II识别剪切的序列,连接反应高效地进行。



连接的2组双链核苷酸的末端，可以是如上述的核苷酸链的平头末端，也可以是如由Bam HI剪切部位的一条核苷酸链突出的粘性末端。

这样的通过限制性酶的剪切和通过DNA连接酶的连接，以往便被使用于向基因的载体等的插入。通过同时使用本发明方法，可以将向基因（核苷酸链）的载体等的插入和通过修饰物质的修饰在同一反应条件下实现，可以不浪费从微量的试样通过PCR法等扩增的珍贵的核苷酸链样本，并有效地使用。例如，作为基因表达载体的pET类载体（Studier, F.等，Methods Enzymol, 第185卷，第60页）在其基因插入位点具有Bam HI位点，所以可以通过适用实施方式4中所示的方法，同时实现核苷酸链的修饰和向载体的插入。

作为修饰对象的核苷酸链的链长至少3以上即可，但用于基因分析必须限定核苷酸链的序列，因此核苷酸链的链长至少10以上为佳。

设置于次黄嘌呤Hx的3'端的核苷酸序列在使用实施方式2和实施方式3的方法的情况下，对应于至少1碱基对的链长即可，但在使用实施方式4和实施方式5的方法的情况下，至少2~4碱基对的链长为佳。这是因为要使限制性酶和连接酶充分作用，需要比各酶识别的序列区域稍长的链长。

上述各种实施方式中，示例了添加含有次黄嘌呤Hx的核苷酸序列和将含有次黄嘌呤Hx的核苷酸作为酶底物用3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶II型作用的方法，但并不局限于此。在3'端含有表1（前示）的碱基的核苷酸和DNA糖苷酶的组合也同样可以对核苷酸链3'端用目标修饰物质修饰。

以下，例举具体的实施例进一步对本发明进行详细说明。

（实施例1）

作为修饰对象的核苷酸链使用核苷酸数30的单链化学合成核苷酸链（委托Sigma-Genosya公司合成）。该核苷酸链编码大肠杆菌16S核糖体核酸基因的第8~37位，5'端起具有以下的碱基序列。A、T、G、C分别表示脱氧核苷酸中的碱基腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶。

AGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCT（序列1）

首先，按照核苷酸链为5 μ M，将其混合到2单位（以下省略为u）/ μ l末端

脱氧核苷酸转移酶（Invitrogen公司制）、10mM 2'-脱氧次黄嘌呤核苷-5'-三磷酸、2mM 氯化钴、1mM 二硫苏糖醇、0.1M 二甲砷酸钾（pH 7.2）的50 μ l的反应液中，在37℃下反应4小时，将具有次黄嘌呤碱基的核苷酸序列加尾到核苷酸链3'端。

将该核苷酸链通过乙醇沉淀回收，添加100 μ M 寡聚脱氧胞嘧啶（核苷酸数18，New England BioLabs公司制），将其退火结合到加尾到核苷酸链3'端的核苷酸序列的次黄嘌呤碱基上。

接着，将核苷酸链混合到0.3u/ μ l 3-甲基腺嘌呤DNA糖基化酶II型（Trevigen制）、1mM 乙二胺四乙酸、1mM 乙二醇醚二胺四乙酸、1mM 二硫苏糖醇、10mM 2-（4-（2-羟乙基）-1-哌嗪基）乙磺酸-氢氧化钾（pH7.4）的反应液中，在37℃下反应一昼夜，将在核苷酸链3'端加尾的核苷酸序列的糖苷键切断。

在反应液中按照0.1M添加氢氧化钠，在100℃下加热5分钟，使核苷酸链3'端残存的磷酸基解离，在3'端形成醛基。

将该核苷酸链通过乙醇沉淀回收，在0.1M 碳酸钠（pH 9.5）的条件下自5mM 荧光素尸胺（Molecular Probes公司制）混合，使反应液体积为50 μ l，在室温下反应2小时，使核苷酸链3'端的醛基和存在于荧光素尸胺中的氨基之间形成席夫碱。然后，按照1mg/ml添加硼氢化钠，使反应液体积为100 μ l，通过在4℃下反应一昼夜，将席夫碱还原，使结合稳定化。

将该修饰过程用7摩尔脲-聚丙烯酰胺凝胶电泳（Molecular Cloning 第2版 12.23页 1989年）追踪的结果如图9所示。图中左侧的数字和箭头表示具有各碱基数的核苷酸链的电泳位置。核苷酸链的检测根据银染色法（Electrophoresis 第4卷 第92页 1983年）进行。

泳道A、B和C分别表示分子量标记、寡聚胞嘧啶和未处理的核苷酸链。泳道D表示于3'端加尾了具有次黄嘌呤的核苷酸序列的核苷酸链，核苷酸数增加到100以上。泳道E表示寡聚脱氧胞嘧啶退火结合的核苷酸链。泳道F表示在3'端形成醛基的核苷酸链，核苷酸数减少到30。泳道G表示3'端被用荧光素尸胺修饰并稳定化了的核苷酸链。

在泳道D中，没有发现具有次黄嘌呤的核苷酸的加尾，而发现残留了一些

未反应的核苷酸链，这可能是由于加尾反应时间的延长、末端脱氧核苷酸转移酶添加量的增加等，核苷酸链变得容易消解。

作为修饰对象的核苷酸链的腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶也具有氨基，也有可能发生在核苷酸链内部发生反应，自我聚合，但如泳道F所示，没有发生自我聚合。不过如果有必要，可以使用在核苷酸链的化学合成时被用到的苯甲酰基、异丁酰基等适当的保护基对核苷酸链的氨基进行保护。

（实施例2）

将在实施例1中电泳的各个过程的核苷酸链，根据Southern的方法（J. Mol. Biol. 第98卷，第503页，1975年）印迹到尼龙膜（Schleicher & Schuell公司制）上。

对尼龙膜上的核苷酸链滴加用辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体（Amersham Biosciences公司制），通过化学发光法（Amersham Biosciences公司制，ECL检测试剂）使底片（Amersham Biosciences公司制，Hyperfilm ECL）曝光检测荧光素的有无。结果如图10所示。图中左侧的数字和箭头与图9相同，表示具有各碱基数的核苷酸链的位置。

泳道A表示分子量标记。该标记使用以末端脱氧核苷酸转移酶加尾处理了的预先荧光素标记的2', 3' - 二脱氧尿苷-5' - 三磷酸（EnzoDiagnostics公司制）。

泳道B~F中没有发现发光的检出，可以知道核苷酸链没有被荧光素修饰。

泳道G中，检出核苷酸数30的核苷酸链的发光，可以知道修饰核苷酸链确实被荧光素尸胺修饰。

泳道G中，核苷酸数18的寡聚脱氧胞嘧啶也被荧光素尸胺修饰。这是由于已加尾的次黄嘌呤的核苷酸链部分随机退火结合有寡聚脱氧胞嘧啶，局部没有形成双链，存在3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶II型不发生作用的地方。而且，由此生成较少核苷酸数的寡聚脱氧次黄嘌呤，其3'端形成醛基，荧光素尸胺对其醛基进行修饰，在这些反应中寡聚脱氧次黄嘌呤和寡聚脱氧胞嘧啶再退火结合。但是，将不需要的寡聚脱氧胞嘧啶，通过与用适当的方法固定化在凝胶层析、离子交换层析或者聚苯乙烯珠粒等微粒上的寡聚脱氧次黄嘌呤、寡聚脱氧鸟嘌呤或者将它们混合得到的寡聚核苷酸退火结合，可以容易地分离除去。

以上,如实施例1和实施例2所示,根据本发明的方法,可以在核苷酸链3'端直接以修饰物质进行修饰。

上述各实施例中所示的核苷酸链的结构和链长、修饰物质、反应条件、反应组成等只是示例,并不局限于此,可以任意改变。

(实施例3)

作为修饰对象的核苷酸链使用对应于人骨骼肌肌球蛋白重链1的cDNA序列第5831~5850位(美国国家生物技术信息中心的基因库网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>),登录号:NM_005963,截至2004年2月)的核苷酸数20的单链脱氧核苷酸链(委托Sigma-Genosys公司合成)。与该核苷酸链互补的核苷酸链使用核苷酸数29的单链脱氧核苷酸链(委托Sigma-Genosys公司合成)。修饰物质使用氨基氧基甲基羰基脒-Cy5。各核苷酸链具有以下碱基序列。

被修饰的核苷酸链

TGCTG AAAGG TGACC AAAGA (序列2)

互补的核苷酸链

ATCGGATCCTCTTTGGTCACCTTTCAGCA (序列3)

步骤1

通过将被修饰的核苷酸链(以下记作MYH1)和互补的核苷酸链(以下记作MYH1-Bam HI)按照最终浓度分别为10 μ M和20 μ M,悬浮于50mM 氯化钠、10mM 氯化镁、1mM 二硫苏糖醇、10mM Tris-HCl (pH 7.5)的缓冲液(溶液总量100 μ l)中,在65℃下加温10分钟后,冷却30分钟以上至室温,形成cMYH1-Bam HI的5'区域(CTTTCAGCA)突出的双链。

步骤2

将形成的双链核苷酸用乙醇沉淀回收,通过加入到10mM dITP、10mM dATP、10mM dTTP、10mM dCTP、50mM 氯化钠、20mM 氯化镁、40mM Tris-HCl (pH 7.5)的溶液中,按照最终浓度0.5u/ μ l添加T7DNA聚合酶的修饰酶シーケネース ver. 2.0 (USB公司)(溶液总量100 μ l),在37℃下反应4小时,在MYH1的3'端添加含有与MYH1-Bam HI互补的次黄嘌呤的核苷酸序列,形成29对碱基对的完整的双链核苷酸。这时形成的MYH1以(序列1)-HxHxATCCHxAT表示。

步骤3

将形成的双链核苷酸用乙醇沉淀回收，通过加入到1mM 乙二胺四乙酸、1mM 乙二醇一二（2-氨基乙醚）四乙酸（=乙二醇醚二胺四乙酸）、1mM 二硫苏糖醇、10mM 4-（2-羟乙基）哌嗪-1-乙磺酸-氢氧化钾（pH 7.4）的溶液中，按照最终浓度0.2u/ μ l添加3-甲基腺嘌呤DNA糖苷酶II（Trevigen公司）（溶液总量100 μ l），在37℃下反应一昼夜，将具有次黄嘌呤的脱氧核糖的糖苷键水解，使MYH1的3'端带有醛基。该MYH1以（序列1）-CHO表示。

步骤4

将在MYH1末端具有醛基的双链核苷酸通过加入到50mM 4-（2-羟乙基）哌嗪-1-乙磺酸-氢氧化钾（pH 7.2）的溶液中，按照最终浓度240 μ M添加作为修饰物质的氨基氧基甲基羰基脒-Cy5（溶液总量100 μ l），在室温下反应一昼夜，使得在MYH1的3'端的醛基和Cy5的氨基之间形成席夫碱。该MYH1以（序列1）-CHHNOCHNHNH-Cy5表示。

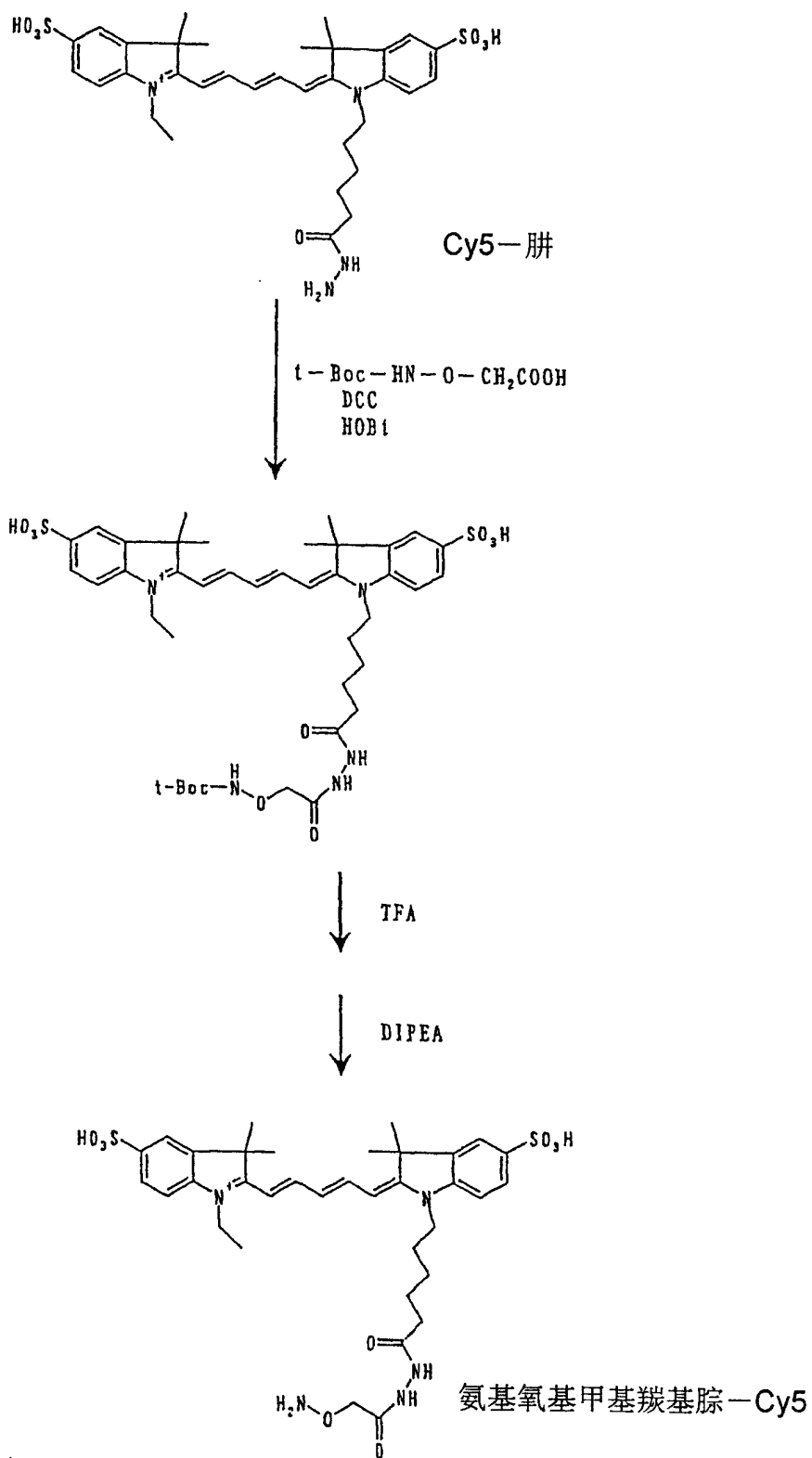
各步骤的核苷酸链用16%聚丙烯酰胺凝胶电泳（90mM Tris-硼酸·2mM 乙二胺四乙酸缓冲液）跟踪的结果如图11所示。核苷酸链用SYBRGold（Molecular Probes公司）染色。图中的M表示分子量标记，20bp、30bp、50bp、100bp分别表示20碱基对、30碱基对、50碱基对、100碱基对的双链核苷酸的电泳位置。

泳道1的条带表示被修饰的核苷酸链（MYH1）；泳道2的条带表示互补的核苷酸链（MYH1-Bam HI）；泳道3中在30碱基对左右位置出现的条带表示在步骤1中形成的部分双链的核苷酸；泳道4中与泳道3相比移动速度稍慢的条带表示在步骤2中形成的29碱基对的完整的双链核苷酸；在泳道5中与泳道4相比移动速度稍快的条带表示MYH1上带有醛基的双链核苷酸；泳道6中的条带表示MYH1被修饰物质修饰了的双链核苷酸。

在泳道5和泳道6之间没有发现移动速度的显著差异，将电泳后的各泳道的双链核苷酸根据Southern的方法（J.Mol.Biol. 第98卷，第503页，1975年）印迹到尼龙膜（Schleicher & Schuell公司）上，利用辣根过氧化物酶标记的抗花青抗体（Rockland公司），用底片（商品名Hyperfilm ECL，Amersham Biosciences公司）考察鲁米诺反应引起的化学发光的有无，只有泳道6的双链核苷酸使底片曝光（泳道6'）。其结果，在泳道6的双链核苷酸上结合了辣根

过氧化物酶标记的抗花青抗体，即表示所述抗体可结合的氨基氧基甲基羰基脒—Cy5结合到了MYH1上。

作为修饰物质的氨基氧基甲基羰基脒—Cy5（花青类色素），以Cy5—胍（Amersham Biosciences公司）作为初始物质，按照Ide等（Ide et al., *Biochemistry*, 第32卷，第8276页，1993年）和Gruber等（Gruber et al., *Bioconjugate Chemistry*, 第11卷，第161页，2000年）的方法，如下进行合成并纯化。



将1mM Cy5-胍和3mM 叔丁氧基羰基氨基氧基乙酸 ($t\text{-Boc-NH-O-CH}_2\text{COOH}$) (Fluka公司) 在3mM N,N'-二环己基碳二亚胺 (DCC) 和3mM 1-羟基-1H-苯并噻唑 (HOBt) 的存在下 (溶液总量300 μl) , 在4℃下反应一昼夜使其缩合, 将该反应混合物浓缩后, 通过添加50%三氟乙酸 (TFA) (2000 μl) , 在室温下反应1小时, 将缩合物的叔丁氧基羰基 ($t\text{-Boc}$) 切去, 最后将反应物混合物用5% N,N'-二异丙基乙胺 (DIPEA) 中和, 通过用C₁₈硅胶柱纯化, 得到目标化合物。收率为13.4%。

如上所述, 根据本发明可以对单链核苷酸、以及双链核苷酸中选出一条或者两条核苷酸链的3'端直接用修饰物质, 在与核苷酸链链长无关的情况下进行修饰。可以通过选择不存在于主链部分的碱基, 例如本来不作为基因存在、且在PCR扩增等时没有掺入核苷酸链的碱基作为特定的碱基, 来避免主链部分的分解。本发明的方法是在不考虑核苷酸链 (主链部分) 的碱基结构和链长的情况下, 对核苷酸链的3'端直接地、简便地, 用任意的修饰物质定量地、稳定地修饰。

因此, 可以在只对具有目标的基因信息的核苷酸链标记化、标志化的同时, 在以核苷酸链的固定化为目的的情况下, 将修饰物质作为连接物质进行稳定、牢固的固定化, 还可以防止基因分析的疑似结果。

产业上利用的可能性

本发明的核苷酸链修饰方法可以对作为修饰对象的核苷酸链的3'端, 不论核苷酸链是单链或是双链, 用任意的修饰物质定量地、稳定地修饰, 可用于需要核苷酸链的标记化、标志化、固定化等的基因分析等。

 序列表

- <110> 松下电器产业株式会社(MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.)
- <120> 核苷酸链修饰方法
- <130> pct4020
- <150> JP 2004-187133
- <151> 2004-06-25
- <150> JP 2003-186151
- <151> 2003-06-30
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 编码大肠杆菌(Escherichia coli)16S rRNA 基因的第 8-37 位碱基
- <400> 1
- agagtttgat catggctcag attgaacgct 30
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 编码人成熟肌球蛋白重链 1 第 5831~5850 位的寡聚脱氧核苷酸
- <400> 2
- tgctgaaagg tgaccaaaga 20
- <210> 3
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> 人工的
- <220>
- <223> 与人成熟肌球蛋白重链 1 第 5850~5831 位互补的序列, 在 5' 端外加 9 个 Bam HI 限制性内切核酸酶识别的核苷酸
- <400> 3
- atcggtacct ctttggtcac ctttcagca 29

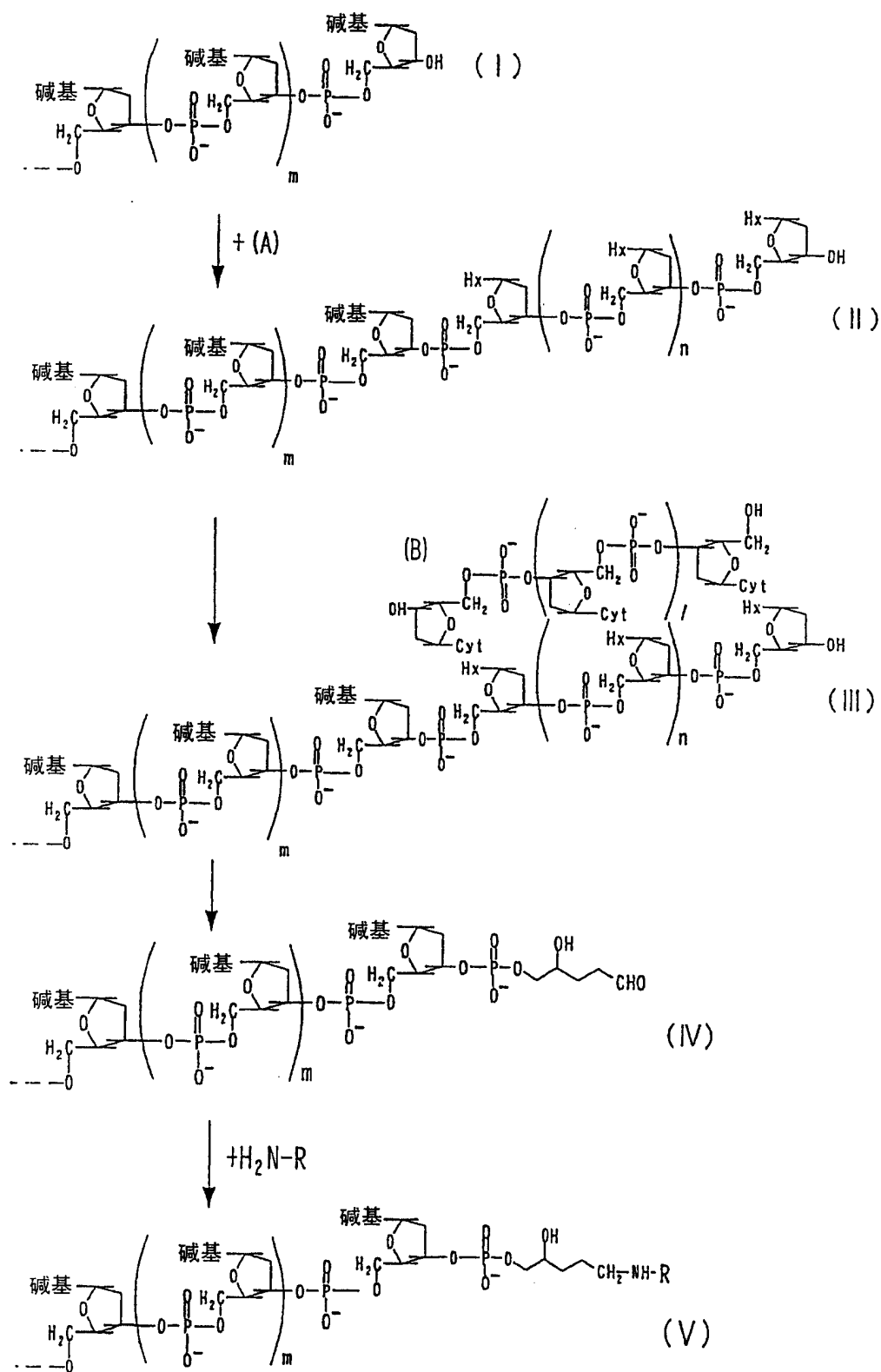


图 1

图 2

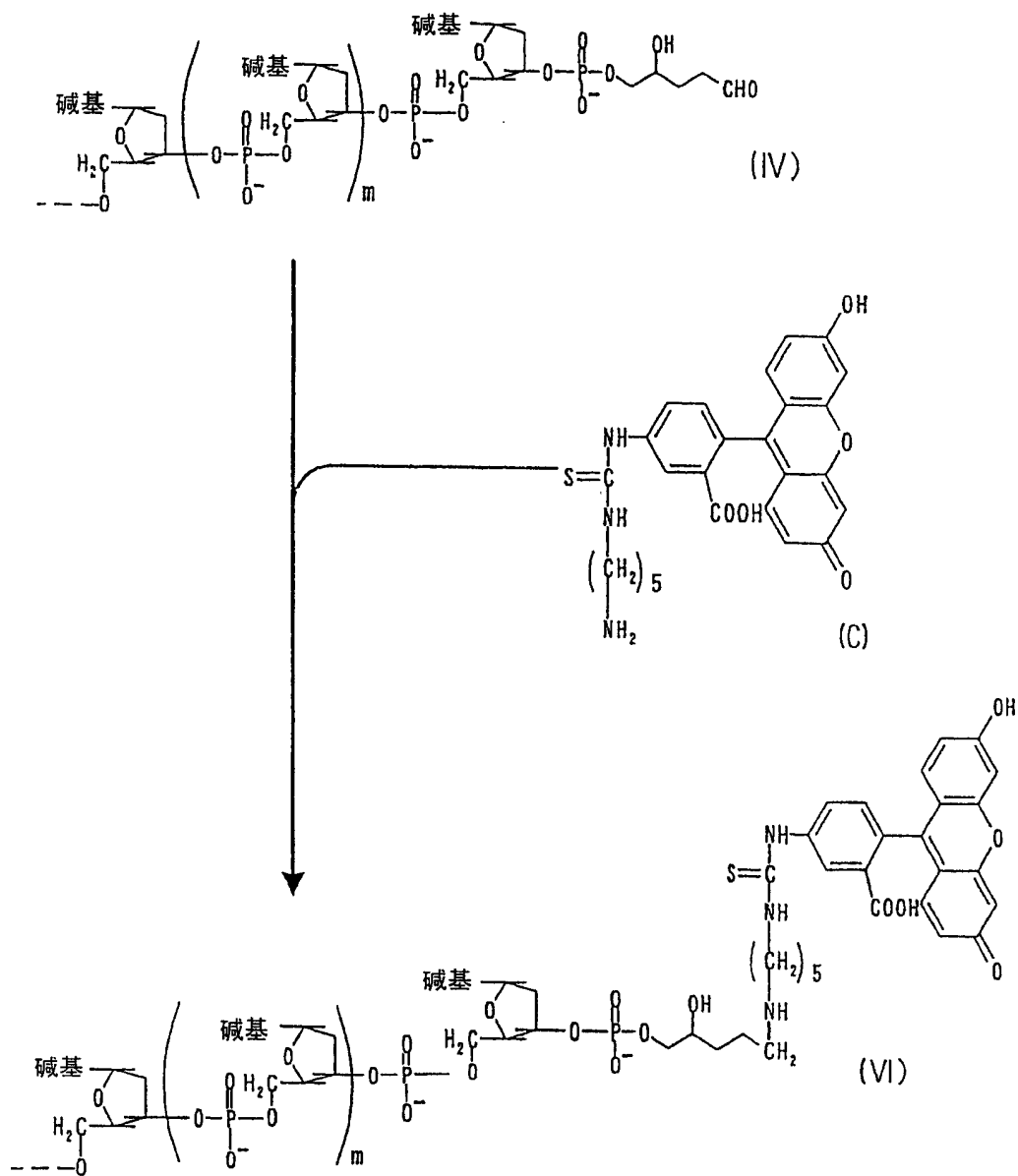


图 2

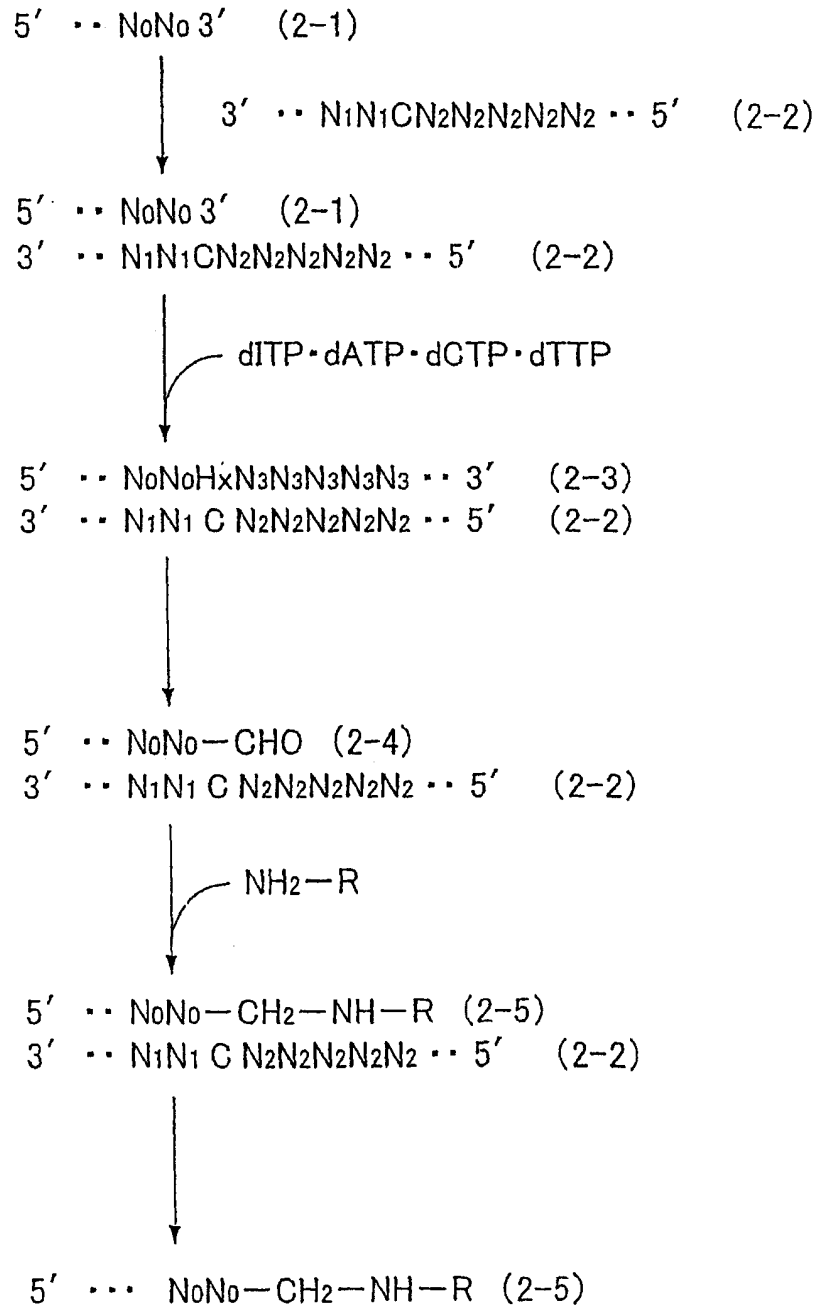


图 4

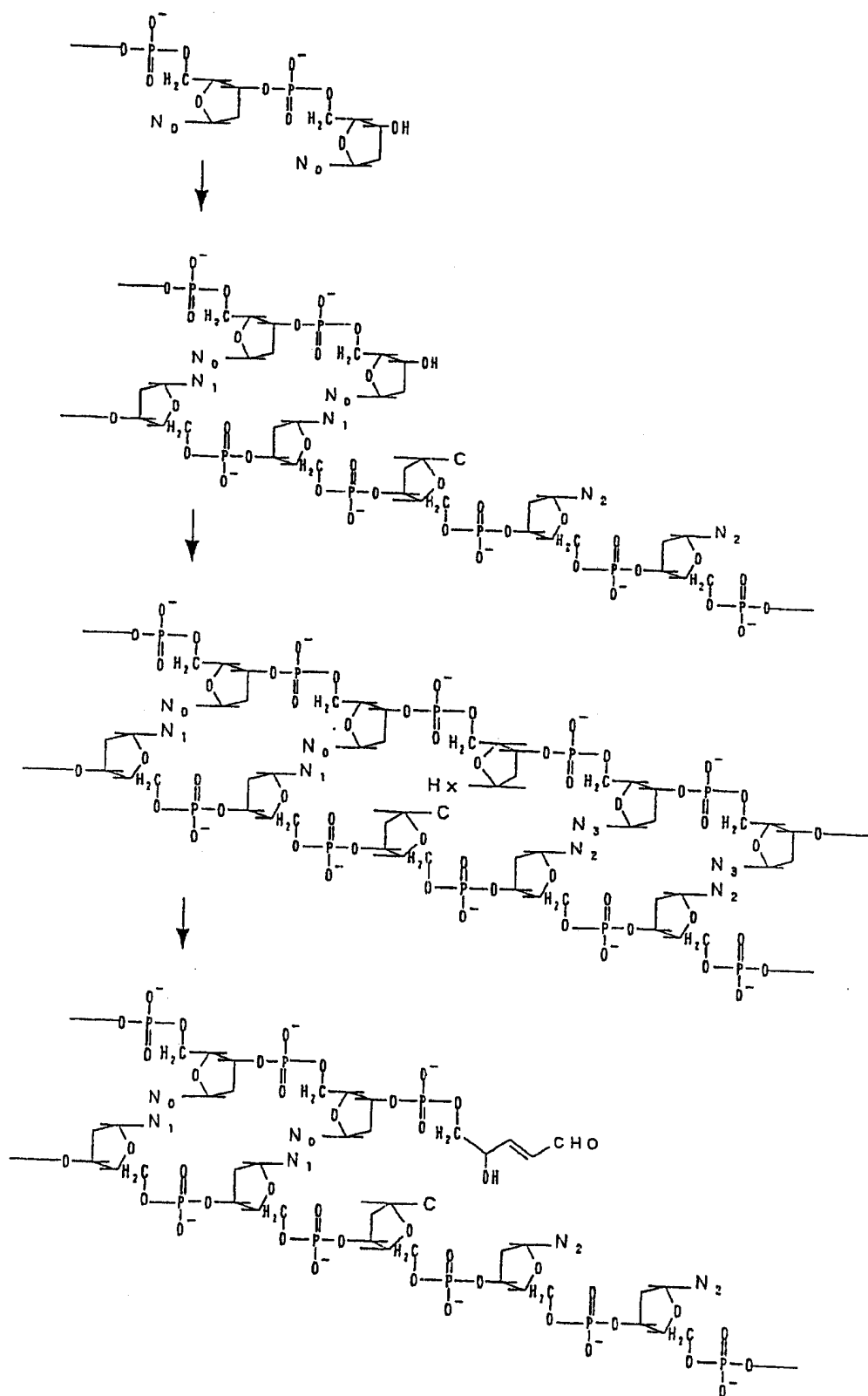
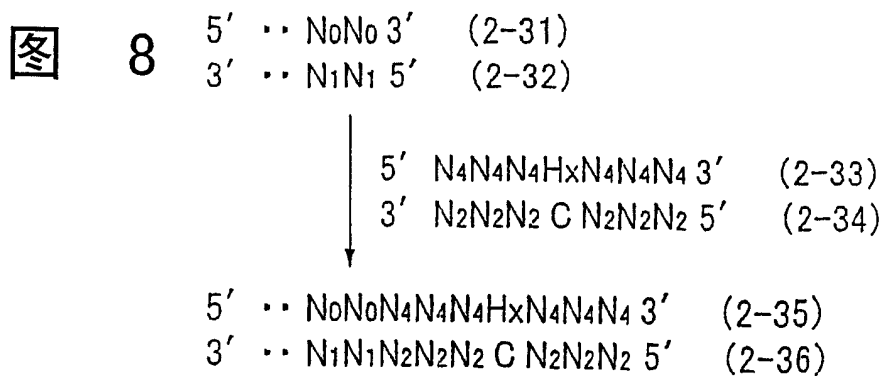
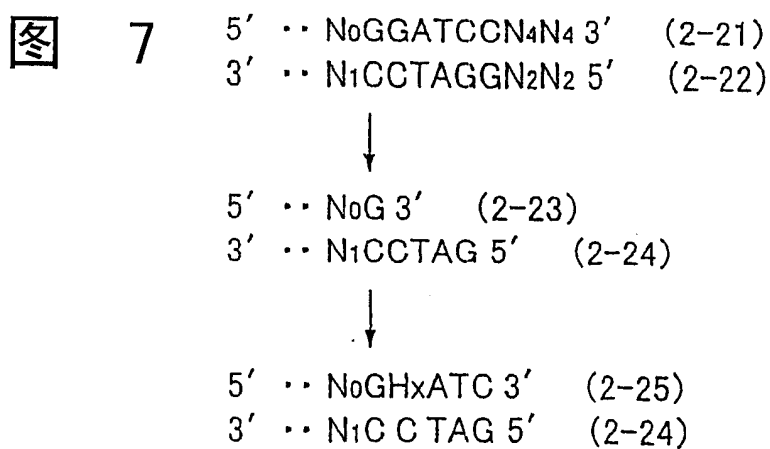
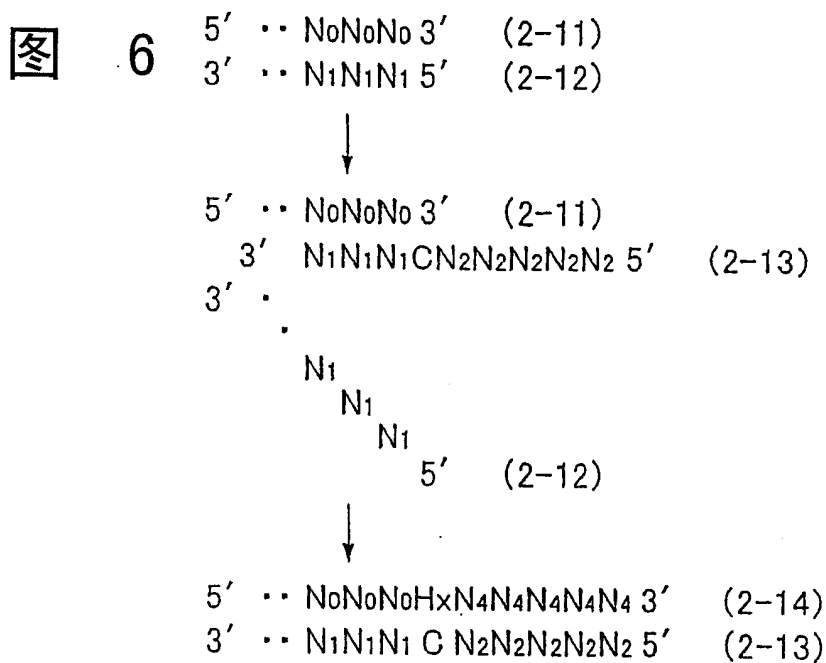


图 5



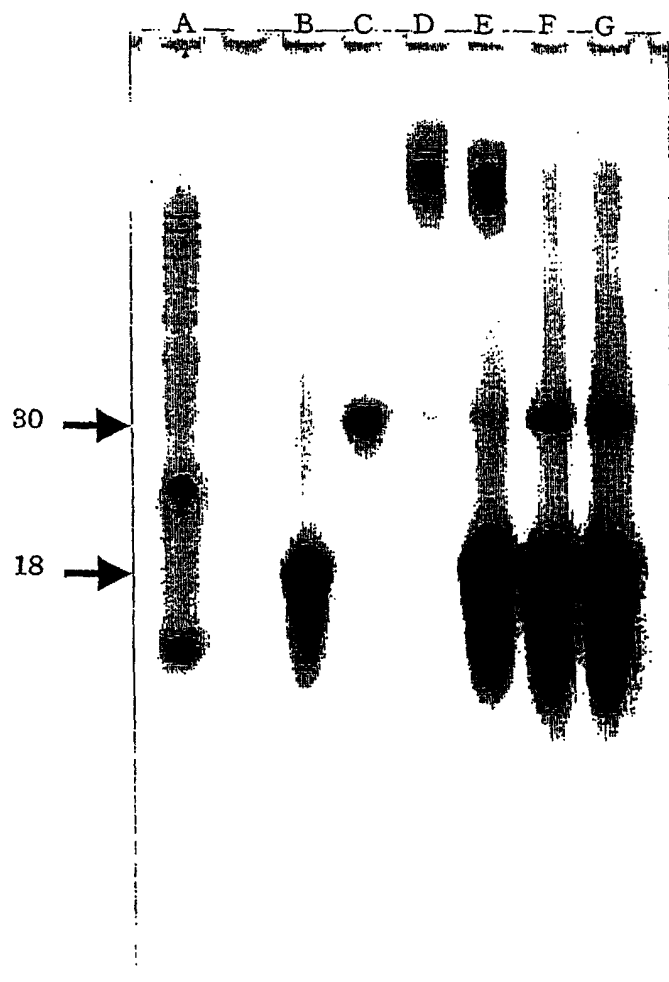


图 9

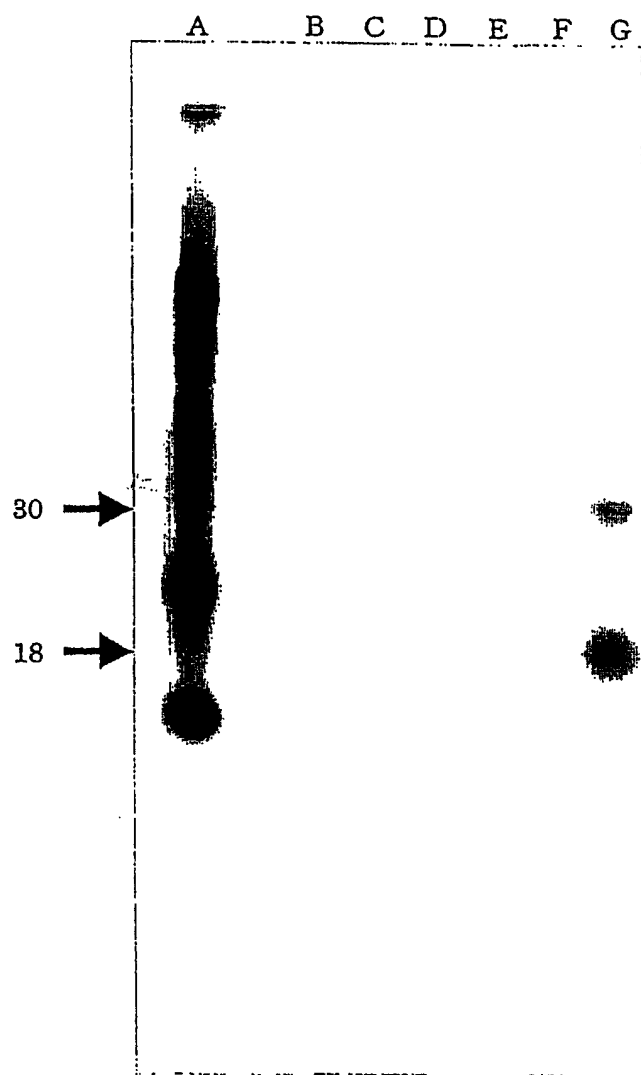


图 10

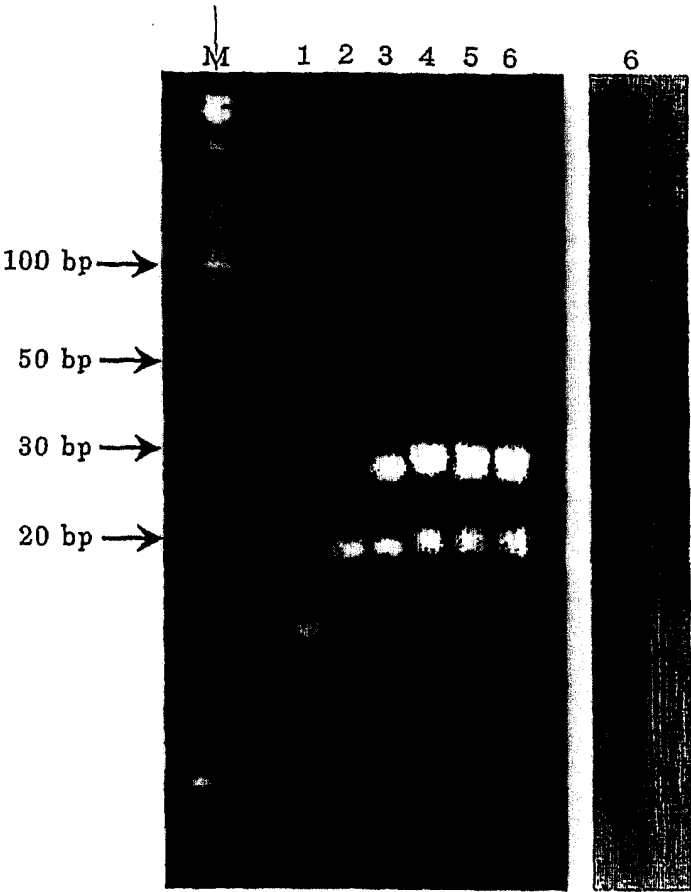


图 11