

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95115432

※ 申請日期：95.4.28

※IPC 分類：C12Q

一、發明名稱：(中文/英文)

分析物之敏感偵測的新標記策略

NEW LABELLING STRATEGIES FOR THE SENSITIVE DETECTION
OF ANALYTES

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 德商巴地斯顏料化工廠

BASF AKTIENGESELLSCHAFT

2. 德國路德維希-馬克西米連-大學，慕尼黑

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITAET MUENCHEN

代表人：(中文/英文)

1. 貝蕾爾

BIELLER

寇斯特

KOESTER

2. 路德維希 哈德維希

HADWIG, LUDWIG

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 德國來恩河勞域沙芬市卡羅玻斯克街

CARL-BOSCH-STRASSE, 67056 LUDWIGSHAFEN, GERMANY

2. 德國慕尼黑市蓋什維斯特-修廣場1號

GESCHWISTER-SCHOLL-PLATZ 1, 80539 MUENCHEN,
GERMANY

國籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY

2. 德國 GERMANY



四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2005年05月02日；05009618.9
2. 美國；2005年05月02日；60/676,785
3. 歐洲專利機構；2005年12月14日；05027370.5
4. 美國；2005年12月14日；60/750,100

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於偵測例如核酸之分析物的方法及試劑。該等新方法及試劑即使在複雜生物樣品中亦允許簡單及敏感之偵測。

【先前技術】

對於遺傳材料之特異性靶向序列、例如單核苷酸多態現象之存在、某一基因(例如抗性基因)之存在或 mRNA 之存在的快速分析需要易於使用、有效及可靠之新工具。主要問題係需要直接在諸如患者血液或植物之少量生物樣品中偵測所關心之 DNA 或 RNA。此等者提供僅為微量之分析物。為了達成所需之敏感性，通常需要擴增步驟，其中：在分析之前將核酸分析物擴增；或使用一種偵測方法，其中將直接自 DNA/RNA 分析物獲得之微小偵測訊號擴增。

用於將核酸分析物擴增之方法包括 PCR 及其他核酸擴增方案。PCR 擴增具有在自生物材料獲得之不同 DNA 鏈的組合區內僅使所關心之 DNA 序列擴增的主要優勢。此在複雜生物樣品中為單一基因之可靠分析的基礎。然而，PCR 擴增需要複雜方法步驟，其在一些情況下非常不便且代價昂貴。偵測訊號之擴增可藉由使諸如辣根過氧化物酶之酶結合至使給定基質連續轉化為著色產物之分析物來達成。

DNA 金屬化為將偵測訊號擴增之另一種方法。附著於 DNA/RNA(核)之單一金屬粒子催化更多金屬沉積，其催化進一步之金屬沉積[1-9]。由金屬沉積所導致之訊號因此呈

指數方式增長。金屬沉積可以電方法(若將分析物置於兩電極之內)或以光學方法(例如以眼睛)來偵測，此係因為所沉積之金屬例如於紙上、於凝膠中或於試管中產生黑點之故。原則上，金屬沉積為最敏感之偵測方法，因為小金屬簇(核)足以引起反應。然而，實際上，方法之敏感性受例如經由(例如)於電極上、於凝膠中或於固持分析物之紙上在空間上緊密接近於分析物之雜質的非特異性金屬成核作用所限制。事實上，非特異性金屬沉積係為何不將DNA之銀染色常規用於寡核苷酸分析之主要原因。銀染色由於DNA不能自身構建初始核之事實而進一步複雜化。其需要預先修飾。現今選擇之方法為DNA與戊二醛之反應，後者藉由序列非特異性地結合至核鹼基上之第一胺基團而共價地附著於DNA[7]。此加合物若以銀鹽處理，則使鹽之 Ag^+ 還原為原子銀，其在結合至DNA時用作所需之核。以銀鹽及還原劑對有核DNA所進行之進一步處理促成指數性金屬沉積。另一可能係以 Ag^+ 交換DNA鏈上之平衡離子，隨後使該 Ag^+ 還原以產生 Ag^0 成核位點。主要缺點在於戊二醛亦與接近於分析物之雜質或其他化學物質反應，此又導致非特異性銀沉積。

諸如附著於DNA之Au、Pd粒子或Pt-錯合物的金屬簇亦用作使金屬進一步沉積直至構成導線的成核位點[1-9]。此處，該等簇附著於與DNA形成共價鍵之反應基團或僅為插入或另外結合至DNA/RNA之單元。所有此等方法標記生物樣品中之整個DNA且因此並不允許序列特異性標記，並

因此並不允許對複雜生物樣品中諸如單一基因之靶向DNA的序列特異性分析。

在[8]中描述藉由端粒酶(telomerase)調節將經胺修飾之三磷酸核苷併入經引子引發修飾之調聚物重複物中來製備經標記之DNA結構域。將含有胺之調聚物以經活化之金奈米粒子N-琥珀鹽亞胺基酯加以官能化以產生金奈米粒子DNA鏈。此等奈米粒子位點藉由沿著DNA使金屬進一步沉積而擴大，此實際上得到金屬簇之快速增長直至構成DNA模板化分子奈米線。然而，將經胺修飾之三磷酸酯併入正增長之調聚物末端的效率低且需要三磷酸酯摻雜劑，後者導致成核位點分佈。因此，程序並不允許序列特異性標記。

近來亦已嘗試藉由複雜微影法來對DNA作位點特異性標記[4]。根據此方法，藉由結合RecA來實現DNA分子之部分保護。接著將未經保護之DNA序列以戊二醛處理，後者標記此等用於金屬化之序列。藉由DNA結合之醛官能基使銀離子發生位點特異性還原，此使得沿著此等區形成線。然而，在複雜生物樣品中核酸分子之序列特異性標記係不可能的。

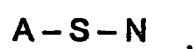
雖然此等文件表明對DNA之新標記策略的關注，但為了達成標記所涉及之複雜過程防止此等系統用於任何實際應用中。詳言之，此等方法無法直接在粗生物樣品中選擇性地標記所關心之DNA或RNA序列。

因此，本發明之一目標係提供新穎方法及試劑，其允許

分析物的試劑套組，其包含：

- (a)包含選自醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團或用於引入醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團之操縱基團之官能基的官能化化合物；
- (b)視情況用於該操縱基團之反應搭配物，其包含醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團；
- (c)視情況能夠使經保護之醛基及醛前驅體基團轉化為醛基之醛形成試劑；及
- (d)標記試劑。

此第一態樣之又一實施例係關於式(I)之化合物：



其中A為選自醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團之官能基；

S為間隔基或一鍵，較佳為共價鍵，且

N為諸如核苷或核苷酸化合物之核酸或核酸類似物建構嵌段。

在第二態樣中，本發明係關於用於偵測分析物(例如樣品中之核酸)之方法及試劑套組，其包括使用與該待偵測之分析物形成聯合產物之Click官能化化合物。標記基團之序列特異性引入係藉由使該Click官能化化合物與包含標記基團或標記前驅體基團之適當反應搭配物反應來實現。

此第二態樣之一實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的方法，其包含以下步驟：

- (i)提供一樣品；

(ii)使該樣品與包含至少一種作為用於Click反應之第一反應搭配物之官能基的官能化化合物在其中該化合物與該待偵測之分析物形成聯合產物之條件下接觸；

(iii)使該聯合產物與用於Click反應之第二反應搭配物在其中Click反應在該第一及第二反應搭配物之間發生之條件下接觸，其中該第二反應搭配物進一步包含標記基團及標記前驅體基團；

(iv)若需要，則使標記前驅體基團轉化為標記基團；及

(v)偵測該等標記基團。

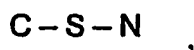
此第二態樣之另一實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的試劑套組，其包含：

(a)包含至少一種作為用於Click反應之第一反應搭配物之官能基的官能化化合物；

(b)用於Click反應之第二反應搭配物，其中該第二反應搭配物進一步包含標記基團或標記前驅體基團；及

(c)視情況能夠使標記前驅體基團轉化為標記基團之標記形成試劑。

此第二態樣之又一實施例係關於一種式(II)之化合物：



其中C為作為用於Click反應之第一反應搭配物的官能基；

S為間隔基或一鍵，較佳為共價鍵；且

N為諸如核苷或核苷酸化合物之核酸或核酸類似物建構嵌段。

在第三態樣中，本發明係關於用於偵測分析物(例如樣

品中之核酸)之方法及試劑，其包括使用與該待偵測之分析物形成聯合產物之光敏劑化合物。較佳地，將光敏劑基團序列特異性地引入核酸中。光敏劑基團之存在係藉由照射與光敏性媒質接觸之經標記之聯合產物來偵測，其中光敏劑基團之存在選擇性地促使在該標記媒質中位點特異性地形成標記基團。

此第三態樣之一實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的方法，其係藉由形成該分析物與包含光敏劑基團之官能化化合物之聯合產物且實現能量轉移，尤其自該等光敏劑基團使輻射能量轉移至光敏性媒質來進行，其中該能量轉移促使在該光敏性媒質中選擇性地形成標記基團。

此第三態樣之另一實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的方法，其包含以下步驟：

- (i) 提供一樣品；
- (ii) 使樣品與包含至少一種選自光敏劑基團或用於引入光敏劑基團之操縱基團之官能基的官能化化合物在其中該化合物與該待偵測之分析物形成聯合產物之條件下接觸；
- (iii) 若需要，則使該操縱基團與包含光敏劑基團之反應搭配物反應；
- (iv) 在其中標記基團在該聯合產物中於光敏劑基團之存在下形成於光敏性媒質中的條件下照射與該光敏性媒質接觸之該聯合產物；及
- (v) 偵測該等標記基團。

此第三態樣之又一實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的試劑套組，其包含：

- (a) 包含至少一種選自光敏劑基團或用於引入光敏劑基團之操縱基團之官能基的官能化化合物；
- (b) 視情況用於該操縱基團之反應搭配物，其包含光敏劑基團；及
- (c) 在光敏劑基團之存在下一旦照射即形成標記基團之光敏性媒質。

本發明允許高度敏感性地偵測分析物，例如生物樣品中(例如臨床樣品、環境樣品或農業樣品)之核酸或核酸結合蛋白。較佳應用包括(但不限於)：偵測遺傳變異性，例如單核苷酸多態性(SNP)、殺蟲劑或藥物抵抗性、耐受性或不耐性、基因分型，例如偵測有機體之物種或品系、偵測經遺傳修飾之有機體或品系或偵測病原體或害蟲；及診斷疾病，例如遺傳疾病、過敏性疾病、自體免疫性疾病或傳染性疾病。另一較佳應用係偵測用於商標保護之樣品中的核酸，其中將如農產品、食品或有價值之商品之產品及/或此等產品之封裝以產品特定資訊編碼，該產品特定資訊例如(但不限於)：生產地、生產日期、經銷商等，且其中此資訊係以如上所述之方法來偵測。

【實施方式】

本發明提供允許以標記基團，例如以複雜樣品中之反應性醛基對分析物作特異性標記之方法及試劑。在一較佳實施例中，金屬沉積，例如銀沉積可特定地在與待偵測之核

酸相關之醛基上來實現。在另一較佳實施例中，金屬沉積，例如銀沉積可特定地藉由使能量自光敏基團轉移至光敏性媒質(例如照相紙)來實現。由於特異性標記程序，背景得到強烈簡化且獲得更高敏感性及可靠性。

本發明包含偵測分析物。該偵測可為定性偵測，例如測定分析物(例如待分析之樣品中之特異性核酸序列)的存在或缺失。然而，本發明亦允許定量地偵測分析物，例如待分析之樣品中的核酸序列。定性及/或定量偵測可包含根據此項技術中已知之方法測定標記基團。

待偵測之分析物較佳係選自核酸及核苷-、核苷酸-或核酸-結合分子，例如核苷-、核苷酸-或核酸-結合蛋白。更佳地，該分析物為核酸，例如可根據已知技術、尤其雜交技術來偵測之任何類型之核酸。例如，核酸分析物可選自DNA，例如雙鏈或單鏈DNA、RNA或DNA-RNA雜交體。核酸分析物之特別實例為基因體DNA、mRNA或源於其之產物，例如cDNA。

本發明之方法可根據適用於偵測分析物、尤其樣品中之核酸分析物的任何已知測試格式來進行。例如，方法可包括例如於南方或北方墨點(Southern or Northern blots)、晶片、陣列或諸如珠粒之粒子中偵測固定於諸如膜之固體表面上的分析物。此外，可在凝膠中，例如在將樣品電泳分離之後於凝膠(例如瓊脂糖或聚丙烯醯胺凝膠)中進行偵測。方法可包括例如在晶片或微陣列格式中偵測單一分析物或平行偵測複數個分析物。

在一較佳實施例中，偵測包括在含有指示分析物之聯合產物之樣品的存在下照射光敏性媒質，其中該聯合產物包含能夠實現使能量轉移至光敏性媒質之光敏劑基團，其中標記基團形成於該媒質中。

樣品可為可含有待偵測之分析物的任何樣品。例如，樣品可為諸如農業樣品之生物樣品，例如包含植物材料及/或與其中植物生長，將植物材料儲存或加工之位置相關之材料的樣品。換言之，樣品亦可為臨床樣品，諸如組織樣品或諸如血液、血清、血漿等之體液樣品，尤其為人類來源之樣品。樣品之另外類型包括(但不限於)：環境樣品、土壤樣品、食物樣品、法醫樣品或來自測試其商標保護作用之有價值商品的樣品。

由於其高敏感性，本發明之方法適用於在未擴增之情況下直接偵測分析物。根據本發明，即使在未擴增之情況下，即使微量之例如核酸的分析物，例如 0.1 ng 或更低，較佳 0.01 ng 或更低，更佳 1 pg 或更低，更佳 0.1 pg 或更低，甚至更佳 0.01 pg 或更低及最佳 0.001 pg 或更低亦得以偵測。特別高之敏感性可藉由將多種經修飾之核苷酸藉由使用未經保護之醛基且/或藉由使用經最優化之染色技術而併入核酸分子中來獲得。例如，偵測分析物，例如生物樣品中之基因，此可藉由將南方墨點法與本發明之方法組合來進行。然而，應注意本發明之方法亦允許與擴增步驟相組合來偵測核酸，該擴增步驟可根據諸如 PCR 或如不對稱 PCR、即時 PCR、逆轉錄 PCR 等其修正體之已知方案

或諸如LCR之其他擴增方案來進行。

在本發明之一較佳實施例中，對分析物進行序列特異性偵測，其中例如具有特異性序列之核酸不同於樣品中之其他核酸序列，或者能夠結合特異性核酸序列之多肽不同於樣品中之其他多肽。該序列特異性偵測較佳包含一序列特異性雜交反應，藉由該反應使待偵測之核酸序列與攜帶標記基團或標記前驅體基團之化合物相關。然而，應注意本發明亦允許對核酸進行序列非特異性偵測，例如偵測樣品中所存在之任何核酸。

為了鑑定待偵測之分析物，可使樣品與醛官能化、Click官能化或光敏劑官能化化合物在其中與例如核酸之分析物形成聯合產物之條件下接觸。醛官能化化合物包含可為醛基、經保護之醛基、醛前驅體基團(意即可轉化為醛基而對偵測程序無顯著有害影響之基團)或用於引入醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團之操縱基團的官能基。

官能化化合物可包含單個官能基或複數個官能基。例如，官能化化合物可偶合至包含複數個(例如2、3、4、5、6、7、8個或更多)如上所指之官能基之樹枝狀聚合物部分。樹枝狀聚合物部分可藉由已知技術來合成。樹枝狀聚合物部分較佳係經由例如如實例5中所述之Click反應來合成。

官能基附著於能夠與分析物形成聯合產物之化合物。該化合物可為核苷或核苷酸化合物，例如核苷或核苷類似物或核苷酸或核苷酸類似物或包含至少一種官能化化合物之

寡聚物或聚合物，例如核酸或核酸類似物。核苷或核苷酸化合物為能夠例如藉由化學或酶方法併入核酸或核酸類似物中之核苷或核苷類似物或核苷酸或核苷酸類似物。所得核酸或核酸類似物應能夠與分析物形成聯合產物，例如核酸雜交體。較佳地，該化合物包含：鹼基部分，例如核鹼基或能夠與核鹼基形成鹼基對之另一雜環鹼基部分；及一骨架部分，其例如包含核苷或核苷酸中之糖部分及視情況之磷酸酯部分；或核苷或核苷酸類似物中之不同骨架部分。

其中核鹼基為7-dN-G、C、7-dN-A或T且R為官能基之官能性核苷化合物之較佳實例顯示於圖1中。

較佳地，官能基附著於鹼基部分，例如附著至核鹼基。然而，官能基亦可附著於骨架部分，例如糖基、磷酸酯基或在核苷或核苷酸類似物之情況下附著於經修飾之糖基、經修飾之磷酸酯基或肽骨架部分等。較佳地，官能基係經由直接鍵或經由間隔基共價地附著於化合物。若附著係經由間隔基來實現，則官能基可連接至脂族或環脂族基團、芳族或雜芳族基團、烯烴基及/或炔烴基。更佳地為，官能基可連接至芳族或雜芳族基團或連接至炔烴基。特別較佳地為，醛基包括諸如苯甲醛之芳族及脂族醛基或諸如丙糖、丁糖、戊糖或己糖(如葡萄糖或甘露糖)之醛糖中的醛基。

官能基可為游離醛基。官能基亦可為經保護之醛基，意即可在分析條件下轉化為醛基之基團。較佳之經保護之醛

基為可藉由以例如有機或無機酸之酸處理而轉化為游離醛基之縮醛或半縮醛基團。縮醛或半縮醛基團之較佳實例為與諸如丙二醇或乙二醇之多元醇形成之縮醛基團或在諸如醛糖(例如葡萄糖或半乳糖)之糖或糖相關化合物中之半縮醛基團。經保護之醛基的另外實例為一旦以酸處理即產生醛基之亞胺基(例如=NH基團)、一旦以汞鹽處理即產生醛基之硫縮醛或二硫縮醛基團(例如C(SR)₂基團, 其中R可為烷基)、一旦以酸處理即產生醛基之肟基(例如=NOH基團)、一旦以酸處理即產生醛基之肟基(例如=N-NHR基團, 其中R可為烷基)及一旦例如藉由酸水解即產生醛之咪唑酮或咪唑啉基團或苯并噻唑或二氫苯并噻唑基團。包含游離或經保護之醛基之官能化合物及製備該等化合物之方法的特定實例顯示於圖2、3a、3c、7、8、9d及9e中。

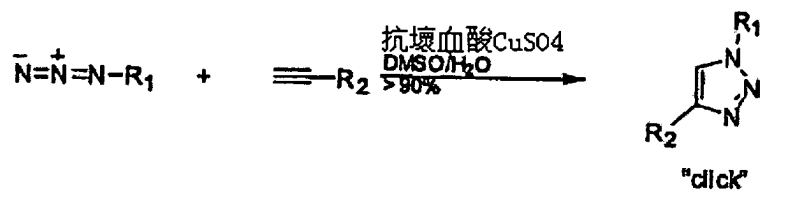
官能基亦可為醛前驅體基團, 意即可轉化為醛基而對核酸偵測程序無顯著有害影響核酸之基團。較佳之醛前驅體基團可選自羧酸及羧酸衍生物, 其包括一旦還原即產生醛之腈及一旦氧化即產生醛之第一醇。

在一不同實施例中, 官能基可為光敏劑基團, 意即能夠實現能量轉移(例如使光能轉移至光敏性媒質, 意即諸如照相紙之照相媒質)之基團。光敏劑基團可選自諸如基於花青之吖啶基團、喹啉基團之已知螢光及/或染料標記基團, 例如諸如Cy5或Cy5.5之市售螢光基團。光敏劑基團之特定實例顯示於圖22中。

官能基亦可為操縱基團, 意即藉由與適當反應搭配物

(意即包含上述基團之一之化合物)反應用於引入醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團或用於引入光敏劑基團的基團。在一較佳實施例中，操縱基團係選自 Click 官能化基團，意即可在環加成反應中與適當反應搭配物反應之基團，其中在 Click 官能基與反應搭配物之間形成環鍵，例如雜環鍵，且其中反應搭配物包含醛或經保護之醛基或光敏劑基團。該 Click 反應之一特別較佳的實例為在疊氮化物與炔烴基之間之 (3+2) 環加成反應，其導致形成 1,2,3-三唑環。為此，醛基可藉由進行疊氮化物或炔烴操縱基團及相應反應搭配物(意即包含互補炔烴或疊氮化物基團及額外之醛、經保護之醛基或醛前驅體的反應搭配物)之 Click 反應而產生。然而，在本發明之另一實施例中，Click 官能化之反應搭配物亦可含有諸如螢光標記基團或光敏劑基團之不同標記或標記前驅體基團。

Click 反應之一特別較佳的實施例包含在疊氮化物與炔烴基之間之銅催化 (3+2) 環加成反應。由於疊氮化物/炔烴環加成而不可逆地形成之 1,2,3-三唑為直角，所需化學基團較小(包括生物分子環境之最小破壞)且具有選擇性，此係由於缺乏自然中發現之疊氮化物及炔烴之故。



其中 R_1 及 R_2 為有機基團。

Click官能化化合物及製備該等化合物之方法的特定實例顯示於圖3b、9a-c及10中。用於Click官能化化合物之反應搭配物的特定實例顯示於圖11及12中。

官能基，例如醛官能化基團或Click官能化基團或光敏劑官能化基團較佳附著於可選自天然出現及非天然出現之嘌呤及嘧啶鹼基之核鹼基。較佳地，核鹼基係選自胞嘧啶核苷、尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤、鳥嘌呤、7-脫氮雜腺嘌呤、7-脫氮雜鳥嘌呤、肌苷及黃嘌呤。官能基較佳附著於嘧啶核鹼基之位置5或位置6，更佳附著至位置5，或附著於嘌呤核鹼基之位置7或位置8，更佳附著至位置7，尤其若希望酶促地併入至核酸中則亦如此。

官能基可例如經由直接鍵或間隔基(例如具有高達20個原子之鏈長度的間隔基)共價地附著於化合物。該間隔基可為：可彎曲間隔基，例如基於伸烷基之間隔基，其視情況含有諸如O、S及/或N之雜原子；或為至少部分不可彎曲之間隔基，例如包含至少一種選自烯烴基、炔烴基、環基，尤其芳族或雜芳族基團以及環脂族基團及其組合之間隔基。若官能化化合物包含作為用於Click反應之第一反應搭配物且隨後與用於Click反應之第二反應搭配物反應的Click官能化基團，則較佳為官能基係經由直接鍵、可彎曲性間隔基或部分不可彎曲間隔基來附著，其中可彎曲間隔基可例如具有高達6個原子、更尤其高達4個原子之鏈長度，且其中部分不可彎曲間隔基較佳具有高達20個原子(例如高達10個原子)之鏈長度且包含：至少一種如上定義

之不可彎曲基團，尤其為炔烴基；及至少一種可彎曲基團，例如伸烷基。若換言之，官能基為醛基或經保護之醛基或醛前驅體基團，則經由如上定義之部分不可彎曲間隔基或具有2至10個原子之鏈長度之至少部分不可彎曲間隔基的附著為較佳。含有不可彎曲基團之間隔基(例如部分不可彎曲間隔基)的結構較佳使不可彎曲基團直接附著於核鹼基。部分不可彎曲間隔基之一較佳實例顯示於圖15a及b中。

官能化化合物能夠與待偵測之分析物形成聯合產物。一方面，官能化化合物可選自可併入核酸或核酸類似物中之化合物，意即核酸或核酸類似物建構嵌段。該等化合物之較佳實例為核苷酸或核苷酸類似物，例如醛官能化核苷酸或核苷酸類似物、Click官能化核苷酸或核苷酸類似物或光敏劑官能化核苷酸或核苷酸類似物。另一方面，官能化化合物可選自核酸或核酸類似物，例如醛官能化核酸或核酸類似物、Click官能化核酸或類似物或光敏劑官能化核酸或類似物。

根據本發明之術語"核苷酸"尤其係指核糖核苷酸、2'-脫氧核糖核苷酸或2',3'-二脫氧核糖核苷酸。核苷酸類似物可選自經糖或骨架修飾之核苷酸，尤其選自可酶促地併入核酸中之核苷酸類似物。在較佳之經糖修飾之核苷酸中，核糖之2'-OH或H-基為選自OR、R、鹵基、SH、SR、NH₂、NHR、NR₂或CN之基團所置換，其中R為C₁-C₆烷基、烯基或炔基且鹵基為F、Cl、Br或I。核糖自身可為諸如環戊

烷或環己烯基團之其他碳環或雜環5-或6-員基團所置換。在較佳之經骨架修飾之核苷酸中，磷酸(三)酯基可為經修飾之基團，例如為硫代磷酸酯基團或H-膦酸酯基團所置換。另外較佳之核苷酸類似物包括用於合成諸如嗎啉基核酸、肽核酸或鎖核酸之核酸類似物的建構嵌段。

醛-、Click-或光敏劑-官能化核酸可為寡核苷酸，例如具有高達30個核苷酸(或核苷酸類似物)建構嵌段之長度的核酸；或為聚核苷酸，其具有30或30個以上核苷酸(或核苷酸類似物)建構嵌段之長度。較佳地，核酸及核酸類似物能夠特異性地結合至分析物，例如能夠與核酸分析物在分析條件下雜交。最小長度較佳為12個及更佳14個核苷酸(或核苷酸類似物)建構嵌段。

官能化核酸或核酸類似物建構嵌段可藉由化學合成之標準技術且/或藉由酶促合併而併入核酸中。化學合成例如可藉由標準胺基磷酸酯化學方法在標準合成方案中使用經修飾之核苷胺基磷酸酯作為建構嵌段來進行。化學合成之較佳建構嵌段的其他類型包括H-膦酸酯或磷酸三酯修飾之核苷。

另一方面，可藉由酶促方法將經修飾之核苷酸併入核酸中。驚奇地發現，醛-或Click-官能化三磷酸核苷係為由諸如DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆轉錄酶或端粒酶之核酸合成酶所接受的酶基質。例如，咸發現經修飾之三磷酸核苷為通常用於引子延長及擴增方案之DNA聚合酶(例如諸如實例7中所述之Taq聚合酶、Vent聚合酶、Pfx聚合酶、Pwo

聚合酶或Therminator聚合酶之熱穩定性DNA聚合酶)所接受。酵素可接受經修飾之三磷酸酯而不會減損忠實性，且允許以模板為基礎方式併入至諸如DNA及RNA之核酸中。

本發明方法提供分析物偵測之各種實施例。例如，本發明提供連同適當酵素之官能化核酸建構嵌段(例如核苷酸或核苷酸類似物)，該等建構嵌段可酶促地併入至與分析物形成聯合產物之核酸分子中。在本發明中，可採用單一類型之官能化核苷酸或複數種不同類型之官能化核苷酸。另外地或額外地，官能化核酸或核酸類似物業經存在，其業已例如藉由化學性或酶促合成作用製備之，且其係例如以特異性地結合雜交至待偵測分析物。

在一較佳實施例中，本方法包含引子延長反應，其視情況與諸如PCR之後繼核酸擴增步驟相組合。例如，本發明提供至少一種引子分子，其在分析條件下與待偵測核酸分析物或其互補序列雜交。接著使所結合之引子延長，其中獲得可偵測之延長產物，其係指示待偵測核酸分析物之存在及/或含量。根據此實施例，可使用併入延長產物中之官能化引子及/或官能化核苷酸或核苷酸類似物。

另外及/或其他，本發明之方法可包含使用官能化雜交探針，其在分析條件下與待偵測之核酸分析物或其互補序列雜交，其中雜交產物之形成指示待偵測之核酸分析物之存在及/或含量。

本發明之偵測方法可藉由任何已知核酸偵測方案(例如包括使用固體載體)來進行。例如，可提供固體載體，例

如晶片或陣列或諸如珠粒之特殊材料，能夠雜交至待偵測之分析物的俘獲探針與其結合。結合固相之核酸分析物可藉由使用與核酸分析物雜交在不同序列部分中作為俘獲探針之官能化雜交探針且隨後例如以金屬化試劑偵測經結合之雜交探針來進行偵測。此方法尤其適用於農業及臨床領域內之診斷應用，例如用於偵測來自植物(例如經遺傳修飾之植物)之DNA及/或mRNA、來自病原體或植物害蟲等之DNA。

在一特定實施例中，偵測可包括使分析物與包含光敏劑基團之官能化化合物的聯合產物與光敏性媒質接觸，此例如藉由使其中可存在聯合產物之樣品或樣品等分試樣轉移至光敏性媒質上來實現，例如藉由點樣、移液等。一旦照射即實現自光敏劑基團至光敏性媒質之能量轉移以便在光敏劑基團存在(而非缺乏)之情況下使諸如金屬(例如銀)核之標記基團形成於光敏性媒質中。若有必要，則可使標記基團經受顯影程序，例如根據照相技術之化學或光化學顯影程序。光敏性媒質可為能夠形成標記基團(例如金屬核)之任何固體載體或任何受支承之材料。較佳地，光敏性媒質為光敏感性媒質，諸如光敏感性紙或支承性材料上之光敏感性乳液或凝膠。更佳地，光敏性媒質為諸如照相紙之照相媒質。在例如照射光之波長及/或強度的條件下進行照射，在該等條件下在光敏劑基團存在下發生選擇性標記基團之形成。較佳地，視媒質之敏感性而定，照射發生於紅外線及/或長波長可見光。照射波長可例如為可見光之

500 nm或更高，520 nm或更高，540 nm或更高，560 nm或更高，580 nm或更高或為紅外線之700 nm至10 μ m。

本發明之一重要態樣係偵測遺傳變異性，例如單核苷酸多態性(SNP)。例如人類之基因體含有平均頻率高達0.1%之核苷酸序列變異。為此，此等變異性提供用於鑒別促成複雜疾病感染性之遺傳因子的極佳標記[16, 17]。雖然可用於偵測SNP之技術具有廣泛範圍，但大多數此等方法進行速度緩慢，需要大量儀器及PCR擴增[18]。然而，本發明之方法不僅耗費低且靈活，其足以以高速度、敏感性及效率適應低、中及高產量篩選需要。選擇性地標記僅完全匹配或錯配鏈以允許使用本發明用於偵測SNP之方法存在若干可能性。

舉例而言，偵測例如SNP中之核酸匹配或錯配可包含使用官能化雜交探針，其在分析條件下與待偵測之核酸分析物或其互補序列雜交且使雜交產物經受處理程序，其中使含有至少一種錯配之雜交產物溶解且其中未溶解之雜交產物的存在指示具有與雜交探針完全互補(意即無錯配)之序列之核酸的存在及/或含量。

溶解含有錯配之雜交產物的處理可包含錯配消化處理，意即視錯配之存在而定使用使雜交產物分解之錯配偵測酶。適用於該錯配消化處理之酶包括錯配糖基化酶，諸如經基因hMSH2及hMLH1及Mut S、Mut L及Mut H編碼之彼等者。額外蛋白為MutY及Mig.Mth1。Mig.Mth1自TG錯配切除T，MutY切除AG錯配中之A且酶TDG切除TG錯配中之

T。

另外或其他，含有錯配之雜交產物可藉由差異雜交處理而溶解，該處理包括雜交條件之調整，例如考慮到溫度、鹽濃度及/或利用氯化二甲基銨之洗滌，其中使含有錯配之雜交產物溶解且完全互補之雜交產物保持穩定。

在又一實施例中，例如 SNP 之錯配可藉由酶催化之選擇性引子延伸來測定。為此目的，提供一引子，其中該引子之 3' 端直接位於模板分析物上之潛在錯配位點的上游。引子延長僅當與模板上下一鹼基互補之核苷酸存在時才可能。藉由選擇單一類型之官能化核苷酸且判定其是否併入引子中，可測定潛在錯配位點上之鹼基。

本發明之方法包含偵測併入分析物與官能化化合物之聯合產物中之標記基團。該等標記基團較佳選自金屬沉積形成基團(例如醛官能化基團)、螢光或螢光形成基團或氧化還原活性基團。

金屬沉積之形成需要利用金屬化試劑對醛基進行處理，該金屬化試劑例如為包含選自 Ag、Au、Bi、Cu、Pd 或 Pt 之金屬原子及/或離子的試劑，其可例如藉由還原選擇性地沉積於醛基周圍。較佳地，金屬化試劑包含諸如 Ag-銨錯合物之 Ag^+ 鹽，意即 Tollens 試劑。金屬化試劑之另外較佳實例為 $\text{Cu}(\text{NO}_3)/\text{I}_2$ 、諸如 $[\text{Pt}(\text{三聯吡啶})\text{Cl}]\text{Cl}$ 之三聯吡啶鉑錯合物、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 或 KAuCl_4 。

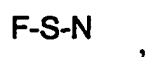
此外，官能基亦可用作操縱物以附著諸如螢光標記基團之其他標記基團。例如，具有胺基之標記化合物可藉由在

諸如氰基硼氫化鈉之還原劑存在下產生還原胺化反應而偶合至醛基。或者，脞或脞形成可用於提供標記基團。

標記基團之偵測可根據已知方法進行。例如，金屬沉積可藉由光方法及/或電方法來定性及/或定量地測定。在比較佳實施例中，固體表面上之金屬沉積可藉由量測例如傳導率之電參數來測定。螢光標記基團可藉由已知螢光量測方法來定性及/或定量地測定，例如經由諸如雷射之合適光源來激發且偵測所發射之螢光而進行測定。

在另一實施例中，本發明包含偵測在分析物與官能化化合物之聯合產物中於光敏劑基團之存在下位點特異性地形成於光敏性媒質中的標記基團。光敏劑基團較佳選自螢光或發光基團。光敏劑基團可直接地或經由操縱物(例如經由上文詳細解釋之Click反應)併入聯合產物中。光敏性媒質包含當在光敏劑基團之存在下進行照射時形成可根據標準照相技術(例如藉由化學或光化學顯影技術)而顯影之諸如金屬核之可偵測標記基團的基團。

本發明亦係關於用於偵測分析物(例如樣品中之核酸分析物)之試劑套組，其包含附著至少一種如上所述之官能基的官能化化合物。通常，套組可包含式(III)之化合物：



其中F為如上所述之任何官能基，例如如式(I)中定義之基團A、如式(II)中定義之基團C及/或光敏劑基團；

S為間隔基或一鍵，較佳為共價鍵，且

N為諸如核苷或核苷酸化合物之核酸或核酸類似物建構

嵌段。

試劑套組可視情況含有醛形成試劑或用於Click反應之第二搭配物及標記或標記形成試劑或光敏性媒質。該等套組較佳用於如上所指之方法中。

此外，本發明係關於如上指出之式(I)之醛官能化化合物或式(II)之Click官能化化合物。官能化化合物可為用於化學性或酶促合成核酸或核酸類似物或其前驅體之建構嵌段。較佳地，該等化合物為三磷酸核苷，尤其為核糖、2'-脫氧核糖或三磷酸2',3'-二脫氧核糖核苷或其可酶促地併入核酸中之類似物。

此外，化合物可為用於化學合成諸如肽核酸、嗎啉基核酸或鎖核酸之核酸或核酸類似物的建構嵌段。為此，核苷胺基磷酸酯、H-膦酸酯、磷酸三酯或Fmoc及/或Boc保護之核鹼基胺基酸為合適者。

本發明亦係關於一種其中併入至少一種式(I)及/或式(II)之化合物的核酸或核酸類似物分子。該分子可為選自DNA及RNA之核酸或例如選自上文詳述之肽核酸、嗎啉基核酸或鎖核酸之核酸類似物。

此外，本發明係關於一種合成核酸或核酸類似物分子之方法，其包含使至少一種包含化合物(I)及/或(II)之核苷酸或核苷酸類似物建構嵌段併入核酸或核酸類似物分子中。該方法可包含化學性合成及/或酶促合成。

此外，本發明係關於一種如上所指之核酸或核酸分子之金屬化產物，其可藉由以如上詳述指出之金屬化試劑對含

有核酸之醛官能化合物進行處理而獲得。

此外，本發明係關於一種如上所指之核酸或核酸類似物分子與如上所述之分析物的聯合產物。較佳地，該聯合產物為與互補核酸之雜交產物。

在一較佳實施例中，本發明之方法及試劑套組用於農業應用。舉例而言，本發明適用於偵測來自植物、植物病原體或植物害蟲(諸如病毒、細菌、真菌或昆蟲)的核酸。此外，本發明適用於偵測遺傳變異性，例如植物或植物部分、植物病原體或植物害蟲(諸如昆蟲)中之SNP。

另一應用為偵測或監測除草劑、殺真菌劑或殺蟲劑抵抗性、耐受性或不耐性，例如在有機體或有機體群落中於真菌、昆蟲或植物中之抵抗性、耐受性或不耐性。本發明亦適用於快速基因分型，例如適用於快速偵測及/或區分真菌、昆蟲或植物之物種或品系。此外，有可能偵測及/或區分經遺傳修飾之有機體的品系，例如真菌、昆蟲或植物之有機體或品系。

由於本發明之高敏感性，病原體之早期診斷係有可能的，意即診斷在病原體存在之第一症狀之前為可見。此對於診斷大豆鏽(*Phakospora pachyrizi*)或例如小麥白粉病菌(*Blumeria graminis*)、小麥葉枯菌(*Septoria tritici*)或卵菌(*Oomycete*)之其他病原體或若在可自視覺上識別之前偵測其存在則對其控制僅為有可能之其他病原體而言尤其重要。

此外，本發明適用於醫學、診斷及法醫應用，例如用於

人類或獸醫醫學，例如適用於偵測來自病原體(例如人類病原體或家畜或寵物之病原體)之核酸。

另外較佳之應用包括偵測遺傳變異性(例如人類中之SNP)或偵測藥物抵抗性、耐受性或不耐性或過敏性。此外，本發明適用於基因分型，尤其人類之基因分型以便判定與病症、過敏性及不耐性之誘因或高危險性相關的突變。本發明亦可用於偵測經遺傳修飾之有機體或品系、細菌或病毒之有機體或品系，且亦用於經遺傳修飾之活牲畜動物等。本發明尤其適用於快速診斷疾病，例如遺傳疾病、過敏性疾病、自體免疫性疾病或傳染性疾病。

此外，例如為研究目的，本發明適用於偵測基因之功能及/或表現。

又一實施例係用於商標保護之方法的用途，例如用於偵測在諸如有價值之商品之產品中編碼的特定資訊，該等有價值之商品，如植物保護產品、醫藥品、化妝品及精細化學品(例如維生素及胺基酸)以及飲料產品、燃料產品(例如汽油及柴油)、消耗性電子器具可得以標記。此外，此等及其他產品之封裝可得以標記。資訊係藉由已併入產品及/或產品之封裝中的核酸或核酸類似物來編碼。資訊可與廠商、生產地、生產日期及/或經銷商之識別碼相關。利用本發明，可進行快速地偵測產品特定資料。樣品可自產品之等分試樣來製備，接著使其與能夠偵測樣品中經核酸編碼之資訊之存在的一或若干個序列特異性官能化雜交探針接觸。

本發明亦適用於營養物領域。舉例而言，在飼料領域內，動物營養物(例如玉米)經較多數量之諸如丙酸的防腐劑所補充。藉由應用本發明之方法，可減少防腐劑之添加。此外，藉由本發明之方法進行基因體分析，其允許預測個體利用特定營養物(營養基因體)之能力。

又一較佳實施例係關於後生領域。此實施例尤其係關於分析DNA，例如有關胞嘧啶鹼基之甲基化的基因體DNA。在此實施例中，DNA可以胞嘧啶特異性試劑(例如胍及/或肼)來處理。藉由處理，發生胞嘧啶或甲基胞嘧啶殘基之選擇性反應。例如以肼處理導致胞嘧啶殘基之選擇性修飾。較佳地，試劑係以亞化學計量之量來添加以獲得例如胞嘧啶殘基之部分修飾。隨後，例如藉由引子延長反應使用至少一種如上所指之經修飾之核酸建構嵌段(例如dU及/或dC鹼基)來分析經處理之DNA。較佳使用經Click修飾之鹼基，例如經炔烴修飾之鹼基。引子延長反應產生由在經修飾之dC或5-甲基-dC鹼基上之反應中斷引起的特徵性定序梯階(參見圖26)。

另一較佳實施例係關於將報導核酸分子用於光敏性媒質(例如照相紙或任何其他光敏感性媒質)的應用。較佳地，報導分子攜帶光敏劑基團及淬滅劑基團。在無分析物時，使光敏劑基團淬滅。例如，報導分子可具有髮夾結構，光敏劑及淬滅劑基團在空間關係緊密之分子的末端上或接近其末端。當報導分子係以髮夾結構存在時，使光敏劑基團淬滅(根據已知分子信標技術)。為此，當將光照射光敏性

媒質時具有完整髮夾結構之報導分子不能實現敏化。在分析物之存在下，髮夾結構破壞。分析物可為互補核酸鏈或使髮夾結構分解之酶或結合至髮夾且因此使結構破壞之蛋白。光敏劑基團自淬滅劑基團分離且因此能夠光敏化。在此情況下，光照射導致照相媒質之敏化且因此偵測分析物(參見圖27)。

在此實施例中，本發明係關於一種用於偵測樣品中之分析物的方法，其包含以下步驟：

- (i) 提供一樣品；
- (ii) 提供包含光敏劑基團或用於引入光敏劑基團之操縱基團及淬滅劑基團之報導分子，其中在無該待偵測之分析物時使該光敏劑基團淬滅；
- (iii) 使該樣品與該報導分子在其中在該分析物之存在下該光敏劑基團之淬滅至少部分減少或終止的條件下相接觸；
- (iv) 若有必要，則使該操縱基團與包含光敏劑基團之反應搭配物反應；
- (v) 在其中在未淬滅之光敏劑基團存在下於該報導分子中標記基團形成於該光敏性媒質中的條件下照射與光敏性媒質接觸之該報導分子；及
- (vi) 偵測該等標記基團。

此外，此實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的試劑套組，其包含：

- a) 包含光敏劑基團或用於引入光敏劑基團之操縱基團及

淬滅劑基團的報導分子，其中在無該待偵測之分析物時使該光敏劑基團淬滅；

- b) 視情況用於該操縱基團之反應搭配物，其包含光敏劑基團；及
- c) 一旦照射未淬滅之光敏劑基團即形成標記基團之光敏性媒質。

方法及試劑套組之較佳態樣及較佳應用如上所述。

本發明進一步藉由下列圖示及實例加以解釋。

實例

實例 1

經醛修飾之核苷及核苷酸的合成

具有經醛修飾之核鹼基的核苷及三磷酸核苷係自攜帶諸如 I 之離去基的經適當修飾之核苷，較佳在例如 T、U 及 C 之嘧啶鹼基的 5 位上或在如圖 1 中所示之例如 7-脫氮雜 G、7-脫氮雜 A、G 及 A 之嘌呤鹼基的 7 位上來合成。此等位置上之所有修飾自 DNA 大溝突出。

首先經由 Sonogashira 調節之炔基化 [20]，繼而與適當官能基反應來合成經醛修飾之 T(U) 核苷胺基磷酸酯，此如圖 2 中所示進行。醛官能作為縮醛基保持為受保護狀態。縮醛保護基可藉由以酸處理而移除。經修飾之核苷胺基磷酸酯可藉由化學合成併入核酸中。

經縮醛修飾之三磷酸核苷的合成如圖 3a 中所示進行。另外之炔烴(對於 Click 反應而言)、縮醛-及半縮醛修飾之三磷酸核苷顯示於圖 3b 中。經修飾之三磷酸核苷可藉由酶促

12]之程序。此程序微呈酸性以使吾人獲得(若需要)可藉由HPLC分離之醛及縮醛-TTP之混合物[13]。

以縮醛及醛三磷酸酯以及各種不同DNA聚合酶進行研究。其顯示所有聚合酶可接受經修飾之三磷酸酯作為基質，且其選擇性地合併經修飾之鹼基。多重合併亦證實不成問題。下列聚合酶在引子延長研究及PCR中加以測試。以經縮醛保護之胸苷且亦以經去保護之醛官能化胸苷來進行實驗。

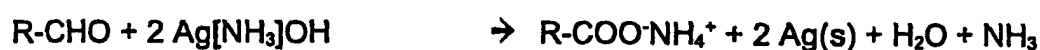
引子延長	PCR
Therminator(NEB)	Pfx(A)
Vent	Taq(A)
Vent(外 ⁺)	Vent(B)
Taq	

吾人亦以經合成之三磷酸酯(縮醛及醛)代替之TPP進行PCR研究。PCR實驗顯示經修飾之鹼基可併入2400個鹼基對長之全部基因中以確定吾人可產生經數百個醛源成核位點特異性標記之基因。

實例3

偵測經標記之寡核苷酸及基因

金屬沉積於醛上之一較佳方法係基於Tollens測試[14]。



在此反應中，銀-銨錯合物係由醛而還原。若醛之濃度高，則吾人可在反應管之內側上看到固體銀之膜。

含有核苷之醛及化學合成之經醛修飾的核酸兩者可在指

示醛官能之銀染色測試中來偵測(圖4)。未經標記之DNA鏈相比之下在相同條件下產生清晰陰性之結果，此顯示選擇性地引入特異性DNA序列中之醛允許選擇性地偵測此等經修飾之序列。

藉由銀染色偵測經醛修飾之核酸亦於凝膠上進行。DNA上之醛基足以使凝膠內之銀離子還原。可使在DNA上藉由該方法形成之晶種顯影直至在凝膠上可看到由所沉積之銀構成的清晰黑色帶。

此藉由對來自引子延長反應及來自PCR(分別為圖5(I)及(II))之經醛修飾的核酸染色而加以證實。

如圖5中所示，含有經修飾之核苷的DNA獨佔式地經Ag-染色，而未經修飾之DNA保持為未染色。此對於延長之引子及PCR產物係正確的。染色程序係基於SilverXPress套組(Invitrogen)，但用更強Tollens溶液進行。遵循其他程序之染色亦有可能。

實例4

敏感性之測定

為了測定偵測方法之敏感性，進行稀釋實驗(圖6)。發現以標準Ag染色套組對醛官能化DNA染色的敏感性比利用溴化乙錠之染色的敏感性(約0.5 ng DNA之長度為50 bp)大至少五倍。

此極其令人印象深刻之敏感性甚至係以粗糙視覺偵測來獲得。

實例5

經疊氮化物-及炔烴-修飾之核苷及核苷酸的合成

具有經疊氮化物及炔烴-修飾之鹼基的核苷及三磷酸核苷實質上如實例1中所述來合成。

5.1 經炔烴-修飾之核苷酸的合成

合成經炔烴-修飾之三磷酸核苷的一詳細反應流程顯示於圖10中。

核苷(1)及其相應三磷酸酯(2)之製備如先前[23, 24]而進行。

向3(1.00 g, 1.72 mmol.)、 $^{[3]}$ Pd(PPh₃)₄(0.198 g, 0.172 mmol.)及CuI(0.065 g, 0.344 mmol.)於DMF(3 mL)中之經完全脫氣的溶液中添加經脫氣之N,N-二異丙基乙胺(1.5 mL, 8.59 mmol.)，且將該反應混合物在室溫下攪拌10分鐘。經1小時將4-戊炔-1-醇(320 μ L, 3.44 mmol.)於DMF(1 mL)中之經脫氣的溶液逐滴添加至該反應混合物中。在添加完成之後，將反應混合物在室溫下攪拌隔夜。在真空濃縮之後，將粗混合物以乙酸乙酯(200 mL)稀釋，且使有機層以鹽水(3 $\times$ 50 mL)、繼之水(50 mL)洗滌。將有機層乾燥(MgSO₄)，過濾且真空濃縮。以乙酸乙酯：異己烷(1:1)、繼之乙酸乙酯：異己烷(2:1)梯度溶離而進行急驟管柱層析(SiO₂)以提供呈淡黃色泡沫之4(0.790 g, 86%)。¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0.01 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.00 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.05 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.07 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.81 (s, 6 H, OSi(CH₃)₃), 0.85 (s, 6 H, OSi(CH₃)₃), 1.74 (m, 2 H, CH₂-CH₂CH₂-OH), 1.95 (m, 1H, H-2 β), 2.20 (m, 1H,

H-2 α), 2.42 (t, 2 H, $J = 6.0$ Hz, C=C-CH₂CH₂-), 3.67 (dd, 1H, $J = 11.4$, 2.1 (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 5.4 (SiCH₃), -5.3 (SiCH₃), -4.8 (SiCH₃), -4.6 (SiCH₃), 16.7 (C=C-CH₂CH₂), 18.0 (SiC(CH₃)₃), 18.5 (SiC(CH₃)₃), 26.1 (SiC(CH₃)₃), 26.4 (SiC(CH₃)₃), 31.5 (CH₂-CH₂-CH₂-OH), 42.3 (C-2'), 61.9 (CH₂-CH₂CH₂-OH), 63.3 (C-5'), 72.4 (C=C), 72.7 (C-3'), 86.0 (C-1'), 88.7 (C-4'), 95.0 (C $\equiv$ C), 100.9 (C-5), 101.0 (C=C), 141.9 (C-6), 149.6 (C-2), 162.4 (C-4). HRMS (ESI, +ve) 計算值 C₂₆H₄₆N₂NaO₆Si₂ 561.2792 [M+Na]⁺ 實驗值 561.2803。

在室溫下在氮氣氛下經5分鐘向4(0.300 g, 0.56 mmol.)於二氯甲烷(5 mL)中之經攪拌的溶液中逐滴添加 Dess-Martin 高碘烷(0.378 g, 0.89 mmol.)於二氯甲烷(5 mL)中之溶液。將該反應混合物攪拌2小時，繼而以飽和硫代硫酸鈉溶液(10 mL)中止。接著使粗混合物以二氯甲烷(200 mL)稀釋且將有機層以鹽水(2 x 30 mL)及水(2 x 30 mL)洗滌。接著將有機層乾燥(MgSO₄)，過濾且真空濃縮。以異己烷中之35%乙酸乙酯溶離進行管柱層析(急驟矽石)以提供呈淡黃色泡沫之5(0.193 g, 65%)。 ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 0.07 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.00 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.05 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.06 (s, 3 H, OSiCH₃), 0.81 (s, 6 H, OSi(CH₃)₃), 0.85 (s, 6 H, OSi(CH₃)₃), 1.95 (m, 1H, H-2 β), 2.21 (m, 1H, H-2 α), 2.61 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, -CH₂CH₂-), 2.67 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, -CH₂CH₂-), 3.68 d(d, 1 H, $J = 11.4$,

2.4 Hz, *H*-5'), 3.81 (dd, 1 H, *J* = 11.4, 2.4 Hz, *H*-5'), 3.89 (m, 1 H, *H*-4'), 4.32 (m, 1 H, *H*-3'), 6.20 (dd, 1 H, *J* = 7.2, 6 Hz, *H*-1'), 7.84 (s, 1 H, *H*-6), 8.99 (bs, 1 H, N-H), 9.72 (s, 1 H, CHO). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150.8 MHz): δ 3.8 (SiCH_3), -3.7 (SiCH_3), -3.1 (SiCH_3), -2.9 (SiCH_3), 14.4 ($\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2$), 19.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 20.1 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.4 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 27.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 43.7 (C-2'), 44.1 ($\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CHO}$), 64.6 (C-5'), 74.0 (C-3'及 $\text{C}\equiv\text{C}$), 87.5 (C-1'), 90.0 (C-4'), 94.3 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 101.9 (C-5), 143.8 (C-6), 150.9 (C-2), 163.7 (C-4), 201.6 (CHO). HRMS (ESI, +ve) 計算值 $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{Si}_2$ 559.2635 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 實驗值 559.2634。

在室溫下在氮氣氛下向 5 (0.530 g, 1.00 mmol.) 及 K_2CO_3 (0.269 g, 1.98 mmol.) 於無水甲醇 (20 mL) 中之溶液中添加 1-重氮基-2-氧代-丙基-磷酸二甲基酯 (0.261 g, 1.19 mmol.) 於無水甲醇 (5 mL) 中之溶液。將該反應混合物在室溫下攪拌隔夜，過濾且真空濃縮。將粗混合物溶解於乙酸乙酯 (200 mL) 中且使有機層以鹽水 (2 x 30 mL) 及水 (2 x 30 mL) 洗滌，乾燥 (MgSO_4) 且真空濃縮。以異己烷中之 20% 乙酸乙酯溶離進行管柱層析 (急驟矽石) 以提供呈無色泡沫之 6 (0.290 g, 55%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 0.00 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.01 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.06 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.07 (s, 3 H, OSiCH_3), 0.82 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.86 (s, 6 H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 1.93 (m, 1H, *H*-2 β), 1.95 (s, 1 H, $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$), 2.22 (m, 1H, *H*-2 α), 2.39 (dt, 2 H, *J* = 8.4, 2.4 Hz, -

CH₂CH₂-), 2.55 (t, 2 H, $J = 8.4$ Hz, -CH₂CH₂-), 3.68 (dd, 1 H, $J = 11.4, 2.4$ Hz, H-5'), 3.81 (d, 1 H, $J = 11.4, 2.4$ Hz, H-5'), 3.89 (m, 1 H, H-4'), 4.33 (m, 1 H, H-3'), 6.20 (dd, 1 H, $J = 7.8, 6$ Hz, H-1'), 7.85 (s, 1 H, H-6), 8.33 (bs, 1 H, N-H)。¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 7.0 (SiCH₃), -6.9 (SiCH₃), -6.4 (SiCH₃), -6.2 (SiCH₃), 16.5 (C $\equiv$ C-CH₂CH₂), 16.9 (C $\equiv$ C-CH₂CH₂), 17.0 (SiC(CH₃)₃), 18.2 (SiC(CH₃)₃), 24.2 (SiC(CH₃)₃), 24.5 (SiC(CH₃)₃), 40.4 (C-2'), 61.4 (C-5'), 67.9 (C $\equiv$ C-H), 70.8 (C-3'), 70.9 (C $\equiv$ C), 80.9 (C $\equiv$ C), 84.1 (C-1'), 86.8 (C-4'), 91.2 (C $\equiv$ C), 98.7 (C-5), 140.6 (C-6), 147.5 (C-2), 159.9 (C-4)。¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.88 (s, 1 H, C $\equiv$ C-H), 2.07 (m, 2 H, H-2'), 2.36 (dt, 2 H, $J = 7.2, 2.4$ Hz, -CH₂CH₂-), 2.54 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, -CH₂CH₂-), 3.53 (dd, 1 H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5'), 3.58 (dd, 1 H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 4.19 (m, 1 H, H-3'), 5.07 (bs, 1 H, O-H), 5.23 (bs, 1 H, O-H), 6.08 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 8.11 (s, 1 H, H-6), 11.55 (bs, 1 H, N-H)。¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 17.6

C₂₇H₄₃N₂O₅Si₂ + H 533.28670 [M+H]⁺ 實驗值 533.26009。

在氮氣氛下向 6 (0.270 g, 0.51 mmol.) 於 THF (5 mL) 中之冷卻溶液 (0°C) 中添加 TBAF (1.0 M, 1.52 mL, 1.52 mmol.)。將該反應混合物攪拌 3 小時，以冰醋酸 (1.0 mL) 中止且真空濃縮。以乙酸乙酯中之 10% 甲醇溶離進行管柱層析 (急驟矽石) 以提供呈無色油之 7 (0.127 g, 82%)。¹H NMR (d₆-DMSO, 400 MHz): δ 1.88 (s, 1 H, C $\equiv$ C-H), 2.07 (m, 2 H, H-2'), 2.36 (dt, 2 H, $J = 7.2, 2.4$ Hz, -CH₂CH₂-), 2.54 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, -CH₂CH₂-), 3.53 (dd, 1 H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5'), 3.58 (dd, 1 H, $J = 12.0, 4.0$ Hz, H-5'), 3.76 (m, 1 H, H-4'), 4.19 (m, 1 H, H-3'), 5.07 (bs, 1 H, O-H), 5.23 (bs, 1 H, O-H), 6.08 (t, 1 H, $J = 6.4$ Hz, H-1'), 8.11 (s, 1 H, H-6), 11.55 (bs, 1 H, N-H)。¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 17.6

(C≡C-CH₂CH₂), 18.9 (C≡C-CH₂CH₂), 39.5 (C-2'), 60.7 (C-5'), 70.0 (C-3'), 73.7 (C≡C-H), 75.1 (C≡C), 84.6 (C-1'), 87.3 (C-4'), 89.1 (C≡C), 93.0 (C≡C), 100.2 (C-5), 144.7 (C-6), 151.0 (C-2), 163.2 (C-4)。HRMS (FAB, +ve) 計算值 C₁₅H₁₆N₂O₅+Na [M+Na]⁺ 327.28771 實驗值 327.09635。HRMS (FT-ICR MS -) 計算值 C₁₅H₁₆N₂O₅ + AcO⁻ [M+AcO]⁻ 363.1198 實驗值 363.1221, MS-MS 計算值 C₁₅H₁₅N₂O₅⁻ [M]⁻ 303.1 實驗值 303.1。

在氮氣氛下經5分鐘向7(0.060 g, 0.197 mmol.)及1,8-雙(二甲胺基)萘(質子海綿, 0.068 g, 0.316 mmol.)、磷酸三甲酯(2 mL)之冷卻溶液(0°C)中逐滴添加磷醯氯(22 μL, 0.237 mmol.)。將該反應混合物在0°C下攪拌3小時。將焦磷酸三丁基銨(0.080 g, 0.237 mmol.)於無水DMF(2.0 mL)中之溶液添加至該反應混合物中且攪拌1分鐘, 繼而以重碳酸三乙銨(1.0 M, 20 mL, pH=8.5)中止。將該反應混合物攪拌2 h且凍乾隔夜。RP-HPLC純化(0-50% 0.1 M乙酸三乙銨→20:80 H₂O:MeCN, 以0.1 M乙酸三乙銨梯度在5 mL.min.⁻¹之流速下經45分鐘)產生作為三乙銨鹽之8(17.7 min.)。 ³¹P NMR (D₂O, 81 MHz): δ 22.4 (t, 1 P, J = 19.8 Hz, P-β), -10.5 (d, 1 P, J = 20.3 Hz, P-α), -9.7 (d, 1 P, J = 19.8 Hz, P-γ)。MALDI-TOF(ATT矩陣, 負性模式): 271 [M + 2 H]²⁻, 542 [M + 2 H]⁻。

5.2 樹枝狀疊氮化物-官能化Click反應搭配物之合成

合成含有複數個半縮醛基團(經保護之醛基)之疊氮化物

官能化樹枝狀聚合物之一詳細反應流程顯示於圖 11 中。

Cu(I)-催化之三唑連接反應的通用程序

向 9 (7.31 g, 0.0256 mol.)、10 (3.00 g, 0.0128 mol.) 於 THF:H₂O (3:1, 40 mL) 中之溶液中添加 CuSO₄ (0.103 g, 0.641 mmol.) 於 H₂O (3 mL) 中之溶液，繼而添加固體抗壞血酸鈉 (0.253 g, 1.28 mmol.)。將該反應混合物在室溫下攪拌隔夜。將懸浮液以 H₂O (50 mL) 稀釋，冷卻至 0°C 且以濃 NH₄OH (5 mL) 處理 10 分鐘。使反應混合物以二氯甲烷 (500 mL) 稀釋且將有機層以鹽水 (2 x 50 mL)、繼之 H₂O (2 x 50 mL) 洗滌。保留有機層，將其乾燥 (MgSO₄) 且真空濃縮。以 1:1 乙酸乙酯:石油溶離進行管柱層析 (急驟矽石) 以提供 9 (2.76 g)、呈無色泡沫之單-Click 產物 (11, 3.94 g)、繼之 12 (4.92 g, 48%)。接著使單-黏著 (click) 產物 (11) 與一當量之 9 反應以提供 12，其在反應逐漸完成之後定量且無需進一步純化。

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 1.29 (s, 6 H, C-CH₃), 1.35 (s, 6 H, C-CH₃), 1.38 (s, 6 H, C-CH₃), 1.49 (s, 6 H, C-CH₃), 4.19 (m, 4 H, H4'/H5'), 4.32 (dd, 2 H, J = 4.8, 2.4 Hz, H 2'), 4.46 (dd, 2 H, J = 14.4, 8.4 Hz, H6''), 4.50 (s, 2 H, -CH₂-), 4.62 (m, 2 H, H 3'), 4.64 (m, 2 H, H 6'), 5.18 (s, 4 H, -CH₂-), 5.51 (d, 2 H, J = 4.8 Hz, H 1'), 6.59 (t, 1 H, J = 1.8 Hz, Ar-H), 6.64 (d, 2 H, J = 1.8 Hz, Ar-H), 7.79 (s, 2 H, C=CH-)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 24.4 (C-CH₃), 24.7 (C-CH₃), 25.9 (C-CH₃), 26.0 (C-CH₃), 46.1 (CH₂-),

50.6 (-CH₆'/H₆"), 62.2 (Ar-CH₂-), 67.0 (CH₄'), 70.1 (CH₂'), 70.5 (CH₃'), 70.9 (CH₅'), 96.0 (CH₁'), 102.0 (Ar-CH), 107.9, 109.1, 110.0, 124.0 (C=CH), 139.6, 143.4, 160.0。ESI-MS *m/z* 806 [M + H]⁺。

將 13(1.53 g, 1.88 mmol.) 及 10(0.220 g, 0.94 mmol.) 在 CuSO₄(0.008 g, 0.047 mmol.) 及 抗壞血酸鈉(0.019 g, 0.094 mmol.) 之存在下的反應在管柱層析(急驟 SiO₂; 乙酸乙酯: 甲醇 9:1) 之後提供呈無色泡沫之 14(1.65 g, 95%)。 ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 1.26 (s, 12 H, C-CH₃), 1.27 (s, 6 H, C-CH₃), 1.34 (s, 12 H, C-CH₃), 1.35 (s, 12 H, C-CH₃), 1.48 (s, 6 H, C-CH₃), 4.19 (m, 8 H, H₄'/H₅'), 4.32 (m, 4 H, H₂'), 4.46 (m, 4 H, H₆"), 4.47 (s, 2 H, -CH₂-), 4.62 (m, 4 H, H₃'), 4.64 (m, 4 H, H₆'), 5.12 (s, 8 H, -CH₂-), 5.15 (s, 4 H, -CH₂-), 5.40 (s, 4 H, -CH₂-), 5.49 (bd, 4 H, J = 4.8 Hz, H₁'), 6.50 (m, 4 H, Ar-H), 6.55 (m, 2 H, Ar-H), 6.58 (m, 1 H, Ar-H), 6.61 (m, 2 H, Ar-H), 7.59 (s, 2 H, C=CH-), 7.78 (s, 4 H, C=CH-)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 24.4 (C-CH₃), 24.9 (C-CH₃), 25.9 (C-CH₃), 26.0 (C-CH₃), 45.9 (CH₂-), 50.4 (-CH₆'/H₆"), 53.9 (Ar-CH₂-), 61.8 (Ar-CH₂-), 61.9 (Ar-CH₂-), 67.0 (CH₄'), 70.1 (CH₂'), 70.5 (CH₃'), 71.1 (CH₅'), 96.1 (CH₁'), 101.6, 101.7, 107.2, 108.0, 109.0, 109.9, 122.9, 124.2, 136.7, 140.0, 143.2, 144.1, 159.5, 160.0。MALDI-TOF(ATT, 正性模式): *m/z* 1859[M+H]⁺。

樹枝狀氯化物轉化至疊氮化物之通用程序

向 12 (4.84 g, 6.01 mmol.) 於丙酮:水 (4:1, 100 mL) 中之溶液中添加 NaN_3 (0.586 g, 9.01 mmol.), 且在氮氣氛下將其加熱回流 3 小時。將反應混合物以乙酸乙酯 (600 mL) 稀釋, 且將有機層以鹽水 (2 x 50 mL)、繼之水 (2 x 50 mL) 洗滌。保留有機層, 將其乾燥 (MgSO_4) 且真空濃縮以產生呈白色無定形固體之 13 (4.72 g, 97%)。

^1H NMR (d_6 -丙酮, 400 MHz): δ 1.28 (s, 6 H, C- CH_3), 1.35 (s, 6 H, C- CH_3), 1.36 (s, 6 H, C- CH_3), 1.44 (s, 6 H, C- CH_3), 4.30 (dd, 2 H, $J = 3.6, 2.0$ Hz, $H_{6/6''}$), 4.32 (dd, 2 H, $J = 3.2, 1.6$ Hz, $H_{5'}$), 4.36 (dd, 2 H, $J = 7.6, 1.6$ Hz, $H_{4'}$), 4.39 (dd, 2 H, $J = 4.8, 2.4$ Hz, $H_{2'}$), 4.61 (d, 2 H, $J = 3.6$ Hz, $H_{6/6''}$), 4.64 (s, 2 H, $-\text{CH}_2-$), 4.70 (dd, 2 H, $J = 7.6, 2.4$ Hz, $H_{3'}$), 5.20 (s, 4 H, $-\text{CH}_2-$), 5.47 (d, 2 H, $J = 4.8$ Hz, $H_{1'}$), 6.73 (m, 3 H, Ar-H), 8.07 (s, 2 H, $\text{C}=\text{C}-\text{H}$)。 ^{13}C NMR (d_6 -丙酮, 150.8 MHz): δ 25.7 (C- CH_3), 26.1 (C- CH_3), 27.2 (C- CH_3), 27.4 (C- CH_3), 47.6 (CH_2-), 52.0 ($-\text{CH}_6'/\text{H}_6''$), 63.4 (Ar- CH_2-), 68.8 (CH_4'), 72.0 (CH_2'), 72.5 (CH_3'), 72.9 (CH_5'), 98.2 (CH_1'), 103.3 (Ar-CH), 109.9 (Ar-CH), 110.4, 111.2, 126.3 ($\text{C}=\text{CH}$), 141.9, 144.8, 161.8。 HRMS (ESI, +ve) 計算值 $\text{C}_{37}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{12}\text{Na}$ 834.3398 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 實驗值 834.3404。

14 (1.51 g, 0.81 mmol.) 及 NaN_3 (0.079 g, 1.22 mmol.) 之反應提供呈白色無定形固體之 15 (1.45 g, 96%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1.27 (s, 12 H, C- CH_3), 1.34 (s, 12 H,

C-CH₃), 1.37 (s, 12 H, C-CH₃), 1.48 (s, 12 H, C-CH₃), 4.19 (m, 8 H, H4'/H5'), 4.24 (s, 2 H, -CH₂-), 4.32 (m, 4 H, H 2'), 4.46 (dd, 4 H, $J = 13.8, 8.4$ Hz, H6"), 4.62 (m, 4 H, H 3'), 4.64 (m, 4 H, H 6'), 5.12 (s, 4 H, -CH₂-), 5.18 (s, 8 H, -CH₂-), 5.43 (s, 4 H, -CH₂-), 5.49 (bd, 4 H, $J = 4.8$ Hz, H 1'), 6.50 (m, 2 H, Ar-H), 6.55 (m, 4 H, Ar-H), 6.58 (m, 1 H, Ar-H), 6.60 (m, 2 H, Ar-H), 7.78 (s, 2 H, C=CH-), 7.79 (s, 4 H, C=CH-)。 ¹³C NMR (CDCl₃, 150.8 MHz): δ 24.4 (C-CH₃), 24.8 (C-CH₃), 25.8 (C-CH₃), 25.9 (C-CH₃), 45.9 (CH₂-), 50.4 (-CH6'/H6"), 54.6 (Ar-CH₂-), 62.0 (Ar-CH₂-), 62.1 (Ar-CH₂-), 67.1 (CH4'), 70.3 (CH2'), 70.7 (CH3'), 71.1 (CH5'), 96.2 (CH1'), 101.7, 101.8, 107.4, 107.7, 109.0, 109.9, 124.0, 124.2, 137.8, 143.1, 143.4, 144.1, 159.7, 159.9。 HRMS (ESI, +ve) 計算值 C₈₇H₁₁₀N₂₁O₂₆Na 1886.7829 [M+Na+H]⁺ 實驗值 1887.7862。

樹枝狀亞異丙基去保護之通用程序

在氮氣氛下向 TFA:水之混合物 (1:1 ; 10 mL) 中添加 13 (0.020 g, 24.7 μ mol.)。將該反應混合物加熱至 50°C, 歷時 4 小時, 繼而真空濃縮。將水 (20 mL) 添加至該混合物中且將水層以 DCM (3 x 20 mL) 洗滌若干次, 保留且凍乾隔夜以提供呈淡黃色泡沫之 16 (0.015 g, 63%)。MALDI-TOF (ATT, 正性模式): m/z 652 [M + H]⁺。

15 (1.40 g, 0.75 mmol.) 與 TFA:水 (1:1 ; 20 mL) 之反應提供呈淡黃色無定形固體之 17 (1.05 g, 90%)。MALDI-

TOF(ATT, 正性模式): m/z 1545 $[M+H]^+$ 。

實例 6

將經疊氮化物-及炔烴-修飾之核苷及核苷酸併入核酸中

實質上如實例 2 中所述藉由化學性或酶促合成將經疊氮化物-及炔烴修飾之核苷及核苷酸有效地併入核酸中。可根據所要應用例如藉由螢光標記或金屬沉積對所得經修飾之核酸作特異性標記。

此標記策略為一種甚至無需 PCR 擴增之情況下即用於偵測核酸、核酸序列及基因的快速及表現極其敏感之方法。

在第一實驗中，為了研究 Click 反應在 DNA 架構中之性能，製備核苷 1 及 2 (圖 9a 及 b) 且經由標準固相合成方法併入寡核苷酸中。Click 反應之效率係使用苯甲基疊氮化物、 CuSO_4 、還原劑 (抗壞血酸鹽或 TCEP) 及銅 (I) 穩定配位體來研究。此等者之結果概述於表 2 中。與可撓性炔烴 2 相比，包含不可彎曲鹼基 1 之寡核苷酸始終提供較低產率之 Click 產物。溫度 (10 至 40°C) 並不影響 Click 反應之產率。

接著將 Click 反應之效率作為展現適於偵測之特性之疊氮化物類型的函數來分析 (圖 12)。螢光素疊氮化物為極其敏感之螢光標記 (螢光量子產率幾乎一致)，而香豆素疊氮化物提供 Click 標記當三唑一旦形成即產生螢光時之證據 [19]。

表2：使用苯甲基疊氮化物、CuSO₄及TCEP之Click反應的概述。

ODN序列	X = 1			X = 2		
	產率(%)					
	起始材料	所要產物	其他產物	起始材料	所要產物	其他產物
3'-GCG CTT ACX TGT CGC G-5'	3	97	-	-	100	疊氮化物 還原物
3'-GCG CTT ACX XGT CGC G-5'		84	16 (單黏著)	-	100	疊氮化物 還原物
3'-GCG CTT ACX TGX CGC G-5'		94	6 (單黏著)	-	100	疊氮化物 還原物
3'-GCG CTX ACX TGX CGC G-5'		84	16 (雙黏著)	NA	NA	NA

與涉及使用苯甲基疊氮化物之實驗一致，包含不可彎曲炔烴之寡脫氧核苷酸提供較低之Click轉化產率。根據HPLC及MALDI-TOF，含有可彎曲炔烴之寡核苷酸相比之下提供幾乎定量之轉化。DNA之標記又有可能直接在凝膠上發生。含有經修飾之核鹼基的DNA係藉由凝膠電泳自其他DNA鏈分離且接著將凝膠以螢光素疊氮化物及Cu(I)處理以進行Click。凝膠之洗滌移除過量螢光素，在凝膠中留下經染色之DNA(圖13)。

自此等實驗可清晰地推斷含有經炔烴修飾之鹼基的DNA可以螢光素來作選擇性標記。如A2之色帶1及B2之色帶3(圖13)中，CYBR綠使DNA非特異性地染上色且因此在黏著(click)反應之前亦標記未經修飾之DNA。

螢光素為一種作為單體且在黏著(clicking)至DNA之後強烈發出螢光的分子。與螢光素黏著反應之後，因此凝膠必須加以洗滌以移除過量螢光素，留下經染色之DNA。

香豆素係一種可供選擇之發螢光分子，然而其不作為單



體而發螢光。其僅在Click反應之後當疊氮化物轉化為三唑時開始發出螢光。如在下列實驗中於反應管中所見在黏著反應之後，香豆素之螢光有效發出(圖14)。一類似實驗可於凝膠上進行。

在又一實驗中，Click反應之效率係藉由合併核苷2之寡脫氧核苷酸(ODN)來研究(圖15)。此核苷係經由標準固相合成方案使用相應胺基磷酸酯1併入寡核苷酸中(圖15)。包含單一或多個炔烴報導基團之寡核苷酸顯示於表3中。

表 3

ODN序列	X =19	
	質量	
	起始材料	產物
3'-GCG CTT ACX TGT CGC G-5'	ODN1 4952(計算值) 4955(觀察值)	ODN1-P 5157(計算值) 5157(觀察值)
3'-GCG CTT ACX XGT CGC G-5'	ODN2 5042(計算值) 5042(觀察值)	ODN2-P 5452(計算值) 5455(觀察值)
3'-GCG CTT XXX XXX CGC G-5'	ODN6 5407(計算值) 5413(觀察值)	ODN6-P 6637(計算值) 6646(觀察值)

Click程序涉及將疊氮化物3(圖15)(DMSO溶液，10 mM，50當量)、CuSO₄/配位體[29]錯合物(DMSO溶液，0.05 M，20當量)及TCEP(水溶液，0.1 M，40當量)溶液連續添加至相應ODN之0.2 mM溶液中。將反應混合物在室溫下震盪隔夜。接著使樣品藉由膜脫去鹽且其質量藉由MALDI-TOF(HPA矩陣)來測定。

實例 7

DNA模板與經修飾之dNTP的PCR擴增

7.1 來自酵母之 pol η 的 PCR 擴增

用於 PCR 實驗之模板及引子：

正向引子 5'-GATTTGGGCCGGATTTGTTTC

逆向引子 3'-TTTTATGCTATCTCTGATACCCTTG

模板：318 bp(*Rad30*之 nt483-800)之酵母的序列：

```
GGGCCGGATTTGTTTCAATATGCTAATGTTTGATAATGAGTACGAGC
TTACAGGCGACTTGAAACTGAAAGATGCATTAAGCAATATTCGTGA
GGCTTTTATAGGGGGCAACTATGATATAAATTCCCATCTACCTCTTAT
ACCCGAAAAGATAAAGTCTCTGAAGTTTGAAGGCGATGTTTTCAAT
CCAGAGGGCAGAGATCTGATCACAGATTGGGACGATGTAATACTTG
CACTAGGATCTCAGGTATGCAAGGGTATCAGAGATAGCATAAAAGAT
ATTCTCGGTTATACTACTTCGTGTGGTTTGTCTAGCAC
```

318 bp 模板含有 59.75% [A+T] 及 40.25% [C+G]。

使用 PCR 反應評定一系列市售熱穩定性聚合酶合併經修飾之三磷酸脫氧尿苷 2 及 8 (圖 10) 的能力。所用 DNA 聚合酶為：

Pwo 及 Taq (外⁺) DNA 聚合酶 (Roche)

Vent、Vent (外⁺)、therminator 聚合酶 (來自 New England Biolabs)、Taq (promega)。

典型 PCR 反應含有 0.05 μ g 基因體釀酒酵母 (*S. cerevisiae*) YPH 499 或 0.5 μ g DNA 模板 (pDest17-Pol η 酵母 [1-1889])、各自為 0.3 mM 之正向及逆向引子、1.25 U 聚合酶及 10x 具有鎂之聚合酶緩衝液、200 μ M 各未經修飾之 dNTP (dATP、dCTP 及 dGTP；NEB) 及 200 μ M 經修飾之

dUTP。對於對照組，使用天然三磷酸酯(dATP、dCTP、dGTP及dTTP)。反應係以50 μ L之總體積來進行。PCR實驗係於Eppendorf Mastercycler Personal上進行。

對於擴增，使用熱啟動(在94 $^{\circ}$ C下2 min)，繼而10次循環擴增(在94 $^{\circ}$ C下15秒，在53 $^{\circ}$ C下30秒，在72 $^{\circ}$ C下45秒)、25次循環(在94 $^{\circ}$ C下15秒，在56 $^{\circ}$ C下30秒，在72 $^{\circ}$ C下45秒)且在72 $^{\circ}$ C下最終培育2 min。在2%瓊脂糖凝膠上藉由以溴化乙錠染色來分析PCR產物(圖16)。在QIAquick PCR純化套組(Qiagen)上對PCR產物進行純化且將其用於銀染色，定序或消化。PCR反應之產物係藉由含有溴化乙錠之2%瓊脂糖凝膠電泳而分離。產物以Ultra-Violet Products CCD照相機記錄。

7.2 來自人類之polH的PCR擴增

典型PCR反應含有0.5 μ g DNA模板(pDest17-plH人類[1-2142])、各自為0.3 mM之正向及逆向引子、1.25 U Pwo聚合酶及10x具有鎂之聚合酶緩衝液、200 μ M各未經修飾之dNTP(dATP、dCTP及dGTP；NEB)及200 μ M經修飾之dUTP。對於對照組，使用天然三磷酸酯(dATP、dCTP、dGTP及dTTP)。反應係以50 μ L之總體積來進行。PCR實驗係於Eppendorf Mastercycler Personal上進行。

對於擴增，使用熱啟動(在94 $^{\circ}$ C下2 min)，繼而10次循環擴增(在94 $^{\circ}$ C下15秒，在53 $^{\circ}$ C下30秒，在72 $^{\circ}$ C下210秒)、30次循環(在94 $^{\circ}$ C下15秒，在56 $^{\circ}$ C下30秒，在72 $^{\circ}$ C下210秒)且在72 $^{\circ}$ C下最終培養7 min。在1%瓊脂糖凝膠上藉由以溴化

乙錠染色來分析PCR產物。於QIAquick PCR純化套組(Qiagen)上對PCR產物進行純化且用於消化或定序。

PCR反應之產物係藉由含有溴化乙錠之1%瓊脂糖凝膠電泳而分離。產物以Ultra-Violet Products CCD照相機記錄。結果顯示於圖17中。

對於處理，添加6 μ L 0.1 M HCl且將探針離心(6000 rpm, 5 min)。消化係藉由HPLC(interchim Interchrom Uptisphere 3 HDO管柱(150 x 2.1 mm)，緩衝液A：2 mM TEA/HOAc於H₂O中；緩衝液B：2 mM TEA/HOAc H₂O:MeCN 1:4；0→30 min；0%→30% B；30→32 min；30%→100% B；32→36 min；100%B；36→38 min；100%→0% B；38→60 min；0% B；流速0.2 mL/min)來分析(圖18)。不同峰係藉由共注射、UV及FT-ICR-HPLC-MS-MS使用相同條件指定。

7.3 合併炔烴調節之核苷酸之PCR片段(318 mer)的酶促消化

對於酶促消化，係將含有經修飾之核苷酸8(圖10)(約10 μ g於100 μ L水中)的318 bp DNA 模板於10 μ L緩衝液A(300 mM乙酸銨、100 mM CaCl₂、1 mM ZnSO₄，pH 5.7)、22單位核酸酶P1(*Penicilinum citrium*)及0.05單位牛脾磷酸二酯酶II中培養。將樣品在37°C下震盪3 h。藉由添加12 μ L緩衝液B(500 mM Tris-HCl、1 mM EDTA)、10單位鹼性磷酸酶(CIP)及0.1單位蛇毒磷酸二酯酶I(響尾蛇毒液(*Crotalus adamanteus* venom))來完成消化。將樣品在37°C下震盪另外3 h。

7.4 糖疊氮化物與經修飾之ds DNA於聚丙烯醯胺凝膠上的

經 Cu(I)-催化之三唑連接反應之通用程序

所有黏著實驗於包含 2 或 8(圖 10)以代替 dTTP 之 318 bp PCR 片段上進行。使經修飾之 PCR 片段於 5% 聚丙烯醯胺凝膠上進行分離，接著將各凝膠置於包含 1:1 MeOH:H₂O(25 mL)之浴中。將糖疊氮化物溶液(0.1 M, 3 mL)添加至浴中，繼而添加 CuSO₄(0.1 M, 600 μL)溶液且最後添加 TCEP(0.1 M, 1.2 mL)。將此等溶液在室溫下溫和震盪隔夜。

7.5 連接至雙鏈 DNA 之糖疊氮化物之銀染色的通用程序

將黏著溶液傾析且使各凝膠以 1:1 MeOH:H₂O(3 x 50 mL, 各洗滌 10 min.)，繼而以 H₂O(3 x 50 mL, 各洗滌 10 min.)洗滌。接著將各凝膠以 Tollens 試劑*(40 mL)培養 30 min。在以 H₂O(3 x 50 mL, 各洗滌 10 min.)後繼洗滌之後，將凝膠以包含 100 mL H₂O、檸檬酸(1%, 250 μL)及甲醛(35%, 80-200 μL)之顯影溶液加以顯影。視甲醛濃度而定，顯影處理可自 2 min.至 20 min.變化。

結論

所提議之本發明包括一種用於藉由經由有效合併經修飾之三磷酸酯對核酸作位點特異性標記的新穎及模組化方法。此等經修飾之三磷酸酯包含根據使用者需要可進一步官能化、標記或染色之基團。可預見 RNA 標記可經由此等方法且分別使用 RNA 聚合酶及逆轉錄酶來達成。因此可實現宿主內病毒基因體之早期及有效偵測。所報導之新穎核酸標記方案簡單、有效、具敏感性及高度選擇性。

* Tollens試劑之製備：

向 80 mL H_2O 中添加 AgNO_3 (0.5 M, 5 mL)，繼而添加 NaOH (3.0 M, 1.0 mL)，且最後添加 NH_4OH (1:1 濃 $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$, 2.2 mL)。

實例 8

使用照相方法偵測核酸

黑色及白色照相方法為已知之最敏感的化學方法之一。於照相紙上俘獲之光子促使形成少量 Ag -核，其在隨後之顯影加工期間進一步催化銀之沉積 [22]。此導致介於 10^5 (對於 Ag^+ 化學還原而言) 與 10^{11} (對於 Ag^+ 光化學還原而言) 之間之訊號擴增因子，此類似於使用 PCR 獲得之結果。

吾人已開發一種利用與核酸繫鏈之光敏性染料的敏感方法，該方法能夠使吾人在亞毫微微莫耳敏感性下潛在地偵測特殊基因 (圖 21)。此新方法簡單 (可使用習知照相材料)、快速 (以分鐘偵測)、有效 (每生物分子僅需要一光敏性分子) 且敏感 (當前非最佳敏感性水平為約 10^{-14} - 10^{-15} mol)。此方法與諸如引子延長及 PCR 技術之基因特異性生物化學工具結合以提供一種偵測核酸及其他分析物之新穎及有效方法。

研究眾多螢光花青吡啶 (1 及 2) 及喹啉染料衍生物 (3) 在照相方法中充當光敏劑之能力 (圖 22)。1-3 之可見吸收最大值分別為 546 nm、646 nm 及 607 nm。

吡啶染料 (1) 易於偵測直至 3×10^{-14} mol (30 fmol)，而 (2) 之偵測極限為約 1-3 fmol (圖 22a 及 22b)。發現喹啉花青

染料(3)之偵測比吡啶染料(圖 22c)更敏感(偵測極限為約 0.3 fmol)。一旦強光照射即可出現背景霧，然而，霧可藉由使用低強度紅外光源而抑制，但敏感性略微降低(圖 22d-f)。

使用未經修飾之寡脫氧核糖核苷酸(ODN-1、ODN-2、ODN-3)之對照實驗(圖 23)一旦以高能量照射即產生 50 nmol.(意即 3 個數量級之差異)水平之小背景陰性照相反應。若以紅外燈進行照射 5 分鐘，則陰性背景水平可得以完全抑制(圖 23b)。概述之，未經修飾之 DNA 未染上色。

接著測試與 ODN 繫鏈之市售染料 Cy5($\lambda_{\max}=646$ nm, ODN-4)及 Cy5.5($\lambda_{\max}=646$ nm, ODN-5)的稀釋系列(圖 16)。發現 ODN-4 之偵測極限為 100 fmol，而 Cy5.5 ODN-5 偵測之敏感性為 10 倍以上(偵測極限 10 fmol)。因此，雖然觀察到與其未經繫鏈之對照組相比，與花青染料共軛之 ODN 敏感性略微降低(圖 24)，但結果清晰證明諸如 ODN 之光敏劑共軛生物分子的攝影可以高度敏感之分析工具加以使用。

例如化合物 4 或 5 之光敏性染料亦可經由 Click 化學併入核酸中(圖 25)。

結論

照相方法可與光敏化染料-核酸相結合以產生一種用於分析物(例如核酸)偵測之快速、簡單、有效及敏感的方法。

光敏劑基團之合適實例為如圖 22 中所示之喹啉基花青染

料(例如3)或吡啶染料(例如1或2),其提供至少10 fmol(1)、1 fmol(2)或0.1 fmol(3)之敏感性。

繫鏈至寡脫氧核糖核苷酸之諸如Cy5及Cy5.5之吡啶基染料可分別以100 fmol及10 fmol之含量來偵測。

文獻

- [1] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775。
- [2] M. Mertig, L. C. Ciacchi, R. Seidel, W. Pompe, A. De Vita, *Nano Letters* **2002**, *2*, 841。
- [3] J. Richter, *Physica E* **2003**, *16*, 157。
- [4] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun, *Science* **2002**, *297*, 72。
- [5] F. Patolsky, Y. Weizmann, O. Lioubashevski, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2323。
- [6] E. Katz, I. Willner, *Angewandte Chemie-International Edition* **2004**, *43*, 6042。
- [7] K. Keren, R. S. Berman, E. Braun, *Nano Letters* **2004**, *4*, 323。
- [8] Y. Weizman, F. Patolsky, I. Popov, I. Willner, *Nano Letters* **2004**, *4*, 787。
- [9] C. F. Monson, A. T. Woolley, *Nano Letters* **2003**, *3*, 359。
- [10] S. Brakmann, S. Lobermann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 1427。

- [11] K. Burgess, D. Cook, *Chemical Reviews* **2000**, 100, 2047.
- [12] J. Ludwig, F. Eckstein, *Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56, 1777.
- [13] A. Roychowdhury, H. Illangkoon, C. L. Hendrickson, S. A. Benner, *Organic Letters* **2004**, 6, 489.
- [14] B. Tollens, *Chem. Ber.* **1882**, 15, 1635.
- [15] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004.
- [16] B. W. Kirk, M. Feinsod, R. Favis, R. M. Kliman, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 3295.
- [17] X.-b. Zhong, R. Reynolds, J. R. Kidd, K. K. Kidd, R. Jenison, R. A. Marlar, D. C. Ward, *PNAS* **2003**, 100, 11559.
- [18] A. C. Syvanen, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, 2, 930.
- [19] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Organic Letters* **2004**, 6, 4603.
- [20] J. D. Kahl, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 598-604.
- [21] R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 813), 2265-2269.
- [22] T. H. James, 於 *Advances in Photochemistry* 第13卷 (D. H. Volman, K. Gollnick, G. Hammond 編), John Wiley & Sons New York, **1986**, 第329頁及以下中。

- [23] P. J. Barr, A. S. Jones, P. Serafinowski, R. T. Walker, *J. Chem. Soc. Perk. Trans.* 1, **1978**, 10, 1263。
- [24] L. Otvos, J. Szecsi, J. Sagi, T. Kovacs, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1987**, 18, 125。
- [25] K. Fujimoto, S. Matsuda, N. Takahashi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5646。
- [26] F. MorisVaras, X. H. Qian, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7647。
- [27] D. C. M. Kong, M. von Itzstein, *Carbohydrate Research* **1997**, 305, 323。
- [28] D. Graham, J. A. Parkinson, T. Brown, *J. Chem. Soc, Perkin Trans.* 1, **1998**, 1131-1138。
- [29] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, *J. Am. Chem. Soc* **2003**, 125, 3192-3193。

【圖式簡單說明】

圖1官能基(R)(例如醛官能化基團)在用於使標記基團酶促地併入寡核苷酸中之不同核鹼基 7-dN-G、C、7-dN-A及 T上的較佳附著位點。

圖2用於核酸固相合成之醛官能化核苷建構嵌段之合成的圖示。

圖3a用於核酸酶促合成之縮醛(經保護之醛)官能化三磷酸核苷之合成的圖示。

圖3b用於DNA中之有效Click化學之炔官能化三磷酸核

苷的一實例，其中n較佳為0-4。

圖3c經保護之醛官能化三磷酸酯的一實例。

圖3中所示之化合物適用於將有效PCR併入DNA中。

圖4藉由使Tollens試劑與經醛修飾之鹼基接觸而進行之金屬化反應的結果：(1)糖溶液作為參照；(2)具有一個經醛修飾之基團的DNA；(3)具有兩個醛基之DNA及(4)未經修飾之DNA。

圖5(I)以Ag(a)或使用標準螢光染料(b)染色之引子延長產物：I.1a：在引子延長中經醛修飾之TTP。I.1b：在引子延長中經縮醛修飾之TTP。I.3a：未經修飾之DNA。銀染色僅在色帶1及2上呈陽性。I.1b-3b同樣成凝膠狀，但經螢光染料非特異性染色。(II)-2142 bp PCR產物經螢光染料(a)或經Ag(b)染色：II 2a：在PCR中經縮醛修飾之TTP。M：標記；II1b：在PCR中經醛修飾之TTP，2：在PCR中經縮醛修飾之TTP，II 3b：未經修飾之DNA。

圖6具有含有單一醛官能基之合成DNA分子之稀釋系列的結果。偵測藉由Ag-染色法來進行。

圖7具有攜帶縮醛(經保護之醛)官能之不同核鹼基的核苷之實例，該等核苷可轉化為相應胺基磷酸酯、H-膦酸酯或三酯以用於核酸之化學合成或轉化為5'-三磷酸酯以用於核酸之酶促合併。

圖8利用螢光標籤作為金屬化之另一選擇經由還原胺化的經醛修飾之DNA或PNA之衍生化。

圖9經炔烴修飾(a,b)、經疊氮化物修飾(c)及經保護之醛

修飾(d,e)的核苷及核苷酸單體，其中n較佳為0-4。

圖10炔烴官能化核苷及三磷酸核苷酸之合成的圖示。

圖11合成包含經保護之醛基之疊氮化物官能化樹枝狀聚合物的圖示。

圖12用於與經炔烴或疊氮化物修飾之核苷酸或核酸發生Click反應的具有標記或標記前驅體基團之疊氮化物及炔烴疊氮化物衍生物之實例。

圖13上方：關於含有經修飾之鹼基2(圖9b)的寡核苷酸與作為黏著搭配物之螢光素疊氮化物(m: 495)之Click反應的MALDI-TOF分析。下方：經單體2及螢光素疊氮化物修飾之DNA之Click反應的凝膠電泳。A1：螢光影像，色帶1：Click反應前之初始材料；2、3：原反應混合物；4：在Click條件下之疊氮化物；A2：經SYBR綠染色之相同凝膠。B1：色帶1、2：原反應混合物；3：起始材料；B2相同凝膠但經SYBR綠染色。

圖14用於將香豆素疊氮化物引入DNA中之Click反應產生螢光產物(右反應管)。

圖15經炔烴修飾之胺基磷酸酯(a)、經炔烴修飾之核苷(b)及經疊氮化物修飾之半乳糖(c)。

圖16使用200 μ M之8、dATP、dCTP及dGTP、0.05 μ g來自釀酒酵母499之基因體DNA、10x具有鎂之聚合酶緩衝液、0.3 mM每一引子及1.25 U聚合酶的PCR分析。色帶1)Vent、2)Vent(外)、3)Pwo、4)來自Roche之Taq(外)、5)Therminator、6)來自Promega之Taq及7)標記。

圖 172142 bp DNA與經修飾之三磷酸酯 1 或 8(圖 10)代替 dTTP 的 PCR 擴增。使用瓊脂糖凝膠 (2%) 且以溴化乙錠染色。總共運行 35 次 PCR 循環，每次培養 45 秒。色帶 1) NEB 2-log DNA 梯階 (0.1-10.0 kb)、色帶 2) 陰性對照組 (減去 dTTP)、色帶 3) 使用基質 (1) 代替 dTTP、4) 使用基質 (8) 代替 dTTP 及 5) 陽性對照組 (使用 dTTP)。

圖 18(a) 合併三磷酸酯 8(圖 10)之 PCR 片段 (318 mer) 之酶促消化、(b) 合併 dTTP 之 PCR 片段之酶促消化、(c) 核苷 7(圖 10) 的 HPLC 層析圖。

圖 19 合併三磷酸酯 1 及 2、繼而 "凝膠上" 黏著及銀染色之 318 bp PCR 片段的稀釋系列。(a) 合併 1 (色帶 1 7.0 ng, 色帶 2 3.5 ng, 色帶 3 1.3 ng, 色帶 4 0.7 ng) 及 2 (色帶 5 7.0 ng, 色帶 6 3.5 ng, 色帶 7 1.3 ng, 色帶 8 0.7 ng) 之 PCR 片段的稀釋系列於 TBE-尿素 PAAG 凝膠上運行。使凝膠經受與疊氮化物 3 之 "凝膠上" 黏著且隨後銀染色。(b) 經由 (i) 選擇性銀染色法 (按照 (a)) 且經由 (ii) SYBR 綠 II (色帶 1 7 ng, 色帶 2 3.5 ng, 色帶 3 1.3 ng, 色帶 4 0.9 ng, 色帶 5 0.5 ng, 色帶 6 0.3 ng) 對於合併 2 之 PCR 片段之稀釋系列的對照性偵測。(c) 合併 2 (色帶 1 7 ng, 色帶 2 3.5 ng, 色帶 3 1.3 ng, 色帶 4 0.9 ng, 色帶 5 0.5 ng, 色帶 6 0.3 ng) 及 2 色帶 1 7.0 ng, 色帶 2 3.5 ng, 色帶 3 1.3 ng, 色帶 4 0.7 ng) 之 PCR 片段的稀釋系列在 TBE-尿素 PAAG 凝膠上運行。接著使凝膠經受與經醛修飾之疊氮化物 4 之 "凝膠上" 黏著且隨後銀染色。(d) 合併 2 (色帶 1 7 ng, 色帶 2 3.5 ng, 色帶 3 1.3

ng，色帶4 0.9 ng，色帶5 0.5 ng，色帶6 0.3 ng)之PCR片段的稀釋系列在TBE-尿素PAAG凝膠上運行。接著使凝膠經受與經醛修飾之疊氮化物5之"凝膠上"黏著且隨後銀染色。

圖20天然DNA(a)及經醛修飾之DNA(b)在曝露至Ag染色條件之後以及經醛修飾之DNA在Ag染色但未經顯影之後(c)、在2 min顯影之後(d)及在2次2 min顯影之後(e)的AFM照片。

圖21使用黑色及白色攝影原理之分析物(例如DNA分析物)偵測方法的示意性描述。DNA分析物在序列選擇性引子之存在下的初始複製產生經敏化劑(S)標記之靶序列。在照射且隨後照相顯影之後，可在例如照相紙之光敏性媒質上偵測分析物。

圖22花青染料(1)、(2)及(3)之描述。花青染料之稀釋系列使用配備520 nm截斷濾波器之高架投影燈使用(a)1、(b)2及(c)3照射10秒或以紅外燈使用(d)1、(e)2及(f)3照射5分鐘。光點實驗對應於下列稀釋液：光點1： 1×10^{-11} mol，光點2： 1×10^{-12} mol，光點3： 3×10^{-13} mol，光點4： 1×10^{-13} mol，光點5： 3×10^{-14} mol，光點6： 1×10^{-14} mol，光點7： 3×10^{-15} mol，光點8： 1×10^{-15} mol，光點9： 3×10^{-16} mol，光點10： 1×10^{-16} mol。

圖23使用(a)高能量照射及截斷濾波器(520 nm)以及(b)低能量照射經由延長曝露(5分鐘)使用紅外燈對均為50 nmol之寡脫氧核糖核苷酸ODN-1 [5'-GCG ATT CGT TCG TCG

C-3']、ODN-2 [5'-CGC GAA TGA ACA GCG C-3']及ODN-3 [5'-GCG ACC GAT TCG C-3']進行的光點測試。

圖 24 花青染料 Cy5 及 Cy5.5 之描述。繫鏈至 ODN 之花青染料的稀釋系列使用配備 520 nm 截斷濾波器之高架投影燈使用 (a)ODN-4 [5'-Cy5-GCG CTG TTC ATT CGC G-3']、(b)ODN-5 [5'-Cy5.5-GCG CTG TTC ATT CGC G-3'] 照射 10 秒；或以紅外燈使用 (c)ODN-4、(d)ODN-5 照射 5 分鐘。光點實驗對應於下列稀釋液：光點 1： 1×10^{-11} mol，光點 2： 3×10^{-12} mol，光點 3： 1×10^{-12} mol，光點 4： 3×10^{-13} mol，光點 5： 1×10^{-13} mol，光點 6： 3×10^{-14} mol，光點 7： 1×10^{-14} mol，光點 8： 3×10^{-15} mol。

圖 25 "Click 及照相" 方法之過程的示意性描述。對所關心之例如基因的序列進行特定選擇且經由與經炔烴修飾之三磷酸酯 (dU^*TP) 及基因選擇性引子之 PCR 而擴增。此等炔烴官能可經由與合適光敏劑 (S) 之黏著化學過程以產生光敏化 DNA 雜種體而得以標記。照射在照相紙上之樣品且隨後顯影將提供一種超敏感性及特異性偵測基因之新方法。

圖 26 一種藉由胞嘧啶-特異性化學修飾鑒別 DNA 中之甲基化模式之方法的示意性描述。使 DNA 分析物與例如胍之胞嘧啶 (或甲基胞嘧啶) 特異性修飾劑較佳以亞化學計量之量發生反應以便產生經部分修飾之胞嘧啶殘基 (C^*)。進行與經炔基修飾之鹼基之引子延長反應。此反應在經修飾之胞嘧啶殘基導致具有特徵長度之延長產物 "梯階" 時終止。在例如於凝膠上使引子延長產物分離之後，進行與經疊氮

化物修飾之標記基團(例如經修飾之糖)之Click反應及標記基團之後繼偵測(例如藉由銀染色)。DNA樣品之甲基化模式可藉由比較來自甲基化DNA樣品之延長產物與來自已經受相同處理之未甲基化之DNA樣品的延長產物來測定。

圖27光敏性媒質上之分子信標偵測方法的示意性描述。提供具有螢光基團(F)及淬滅基團(Q)之報導分子。在無分析物時，報導分子具有髮夾結構且螢光得以淬滅。在分析物之存在下，淬滅基團自螢光基團移除，後者變為未淬滅狀態(F^*)。對樣品在諸如照相紙或其他光敏性材料之照相媒質之存在下進行照射且使其顯影。

五、中文發明摘要：

本發明係關於用於偵測例如核酸之分析物的方法及試劑。該等新方法及試劑即使在複雜生物樣品中亦能提供簡單及敏感之偵測。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：

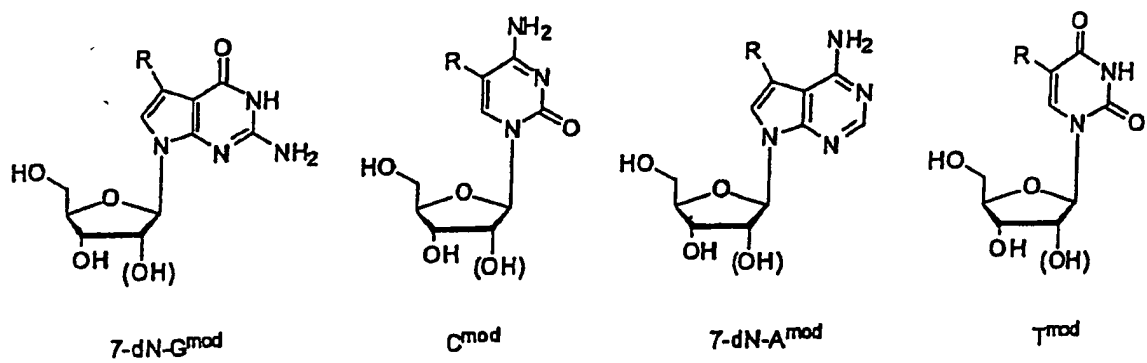


圖 1

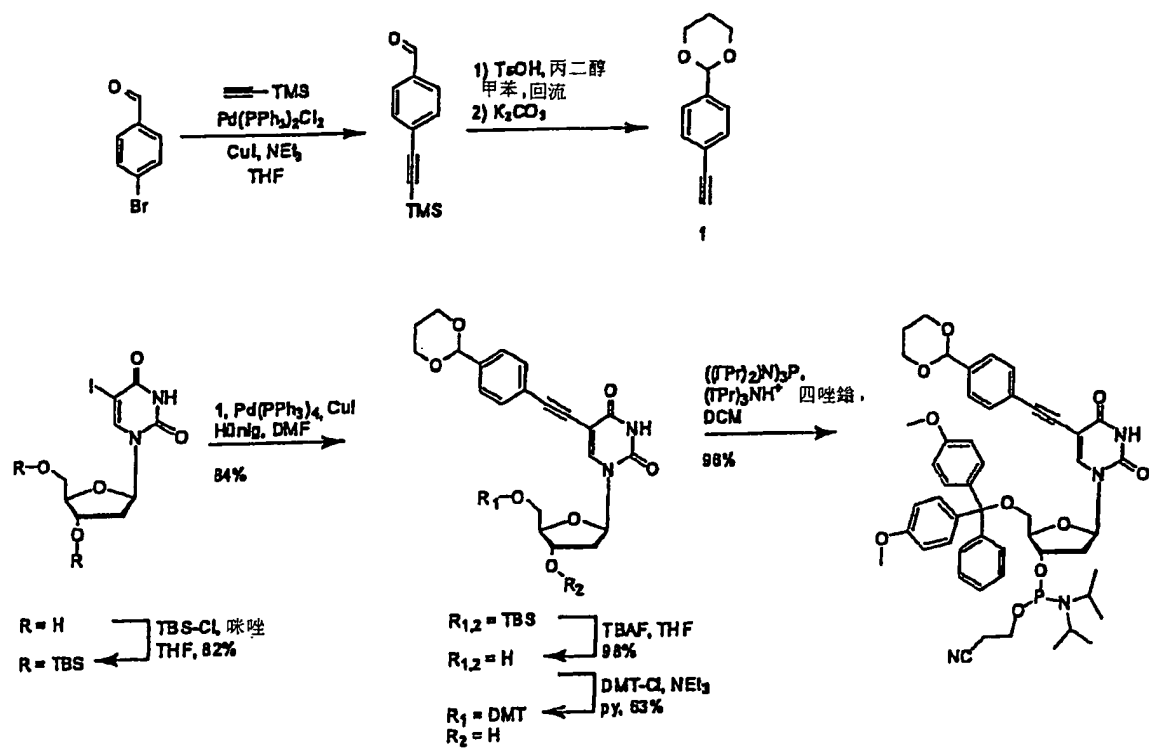


圖2

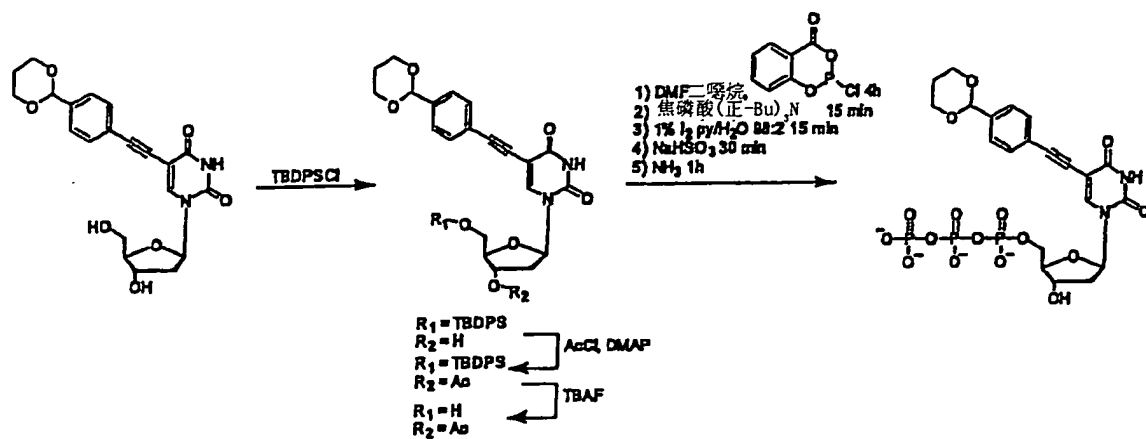


圖3a

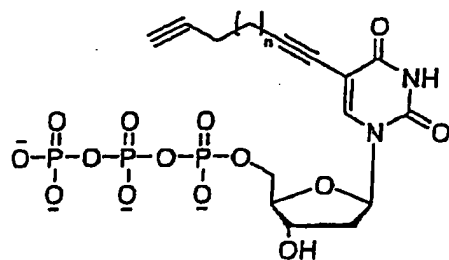


圖3b

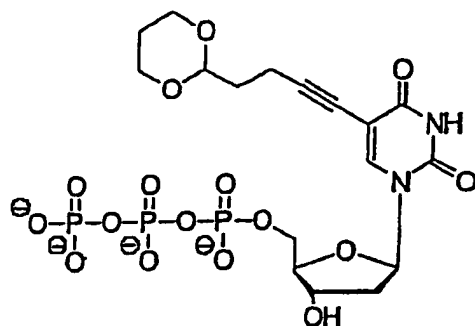


圖3c

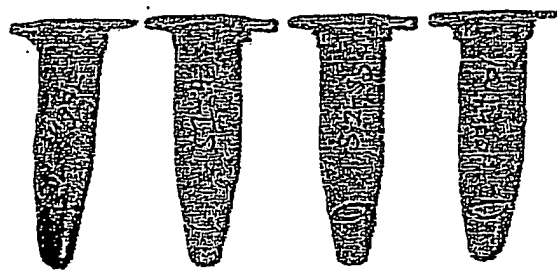


圖4

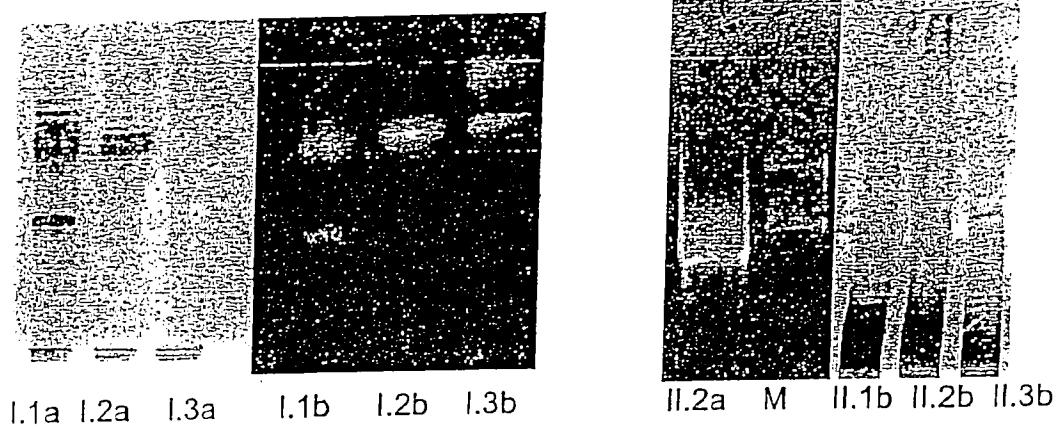


圖5

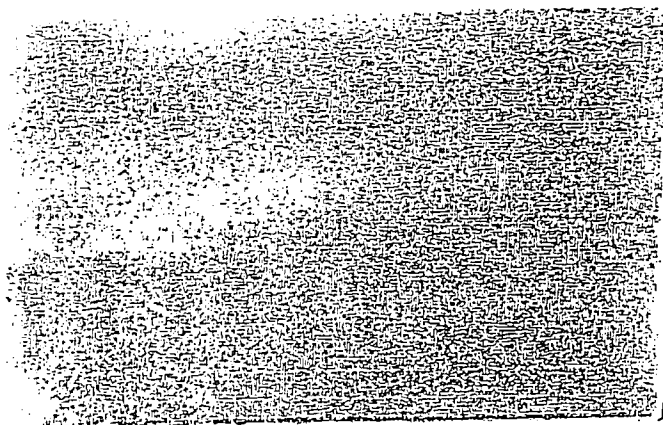


圖6

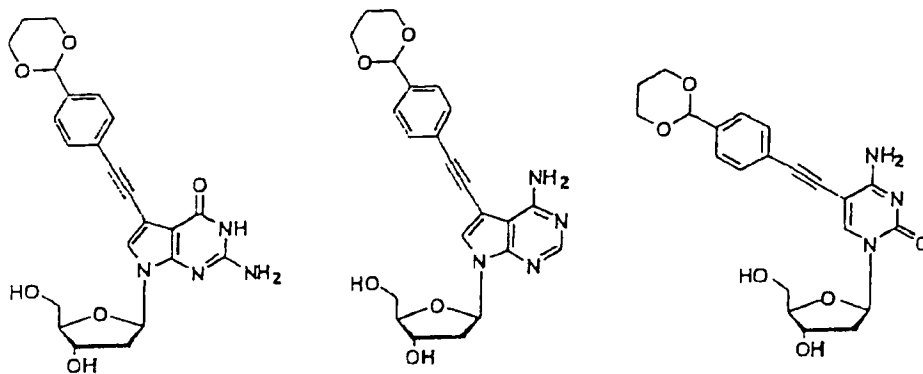


圖 7

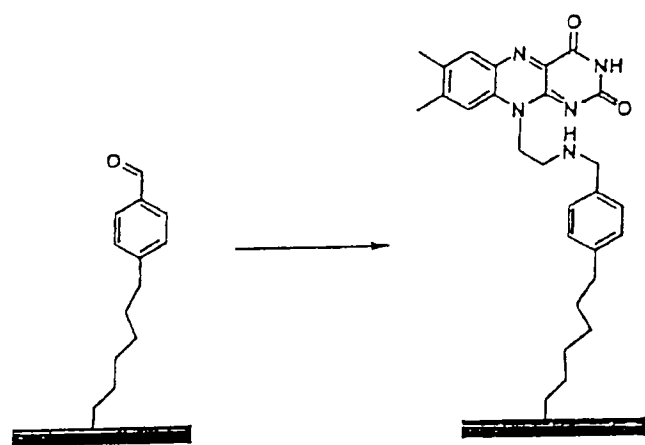
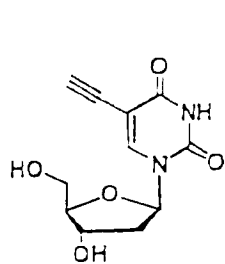
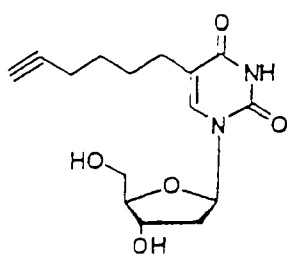


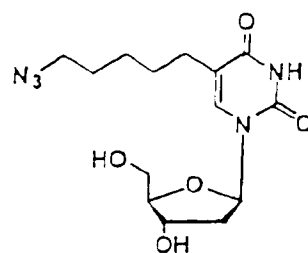
圖8



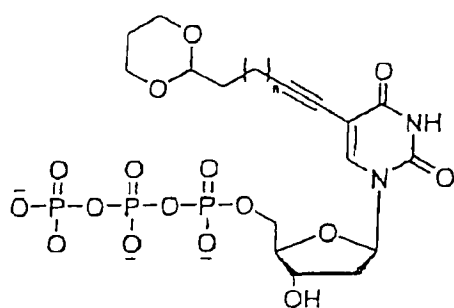
a



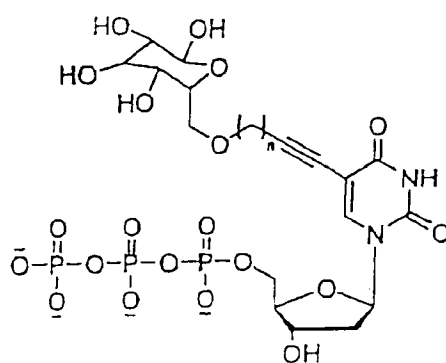
b



c

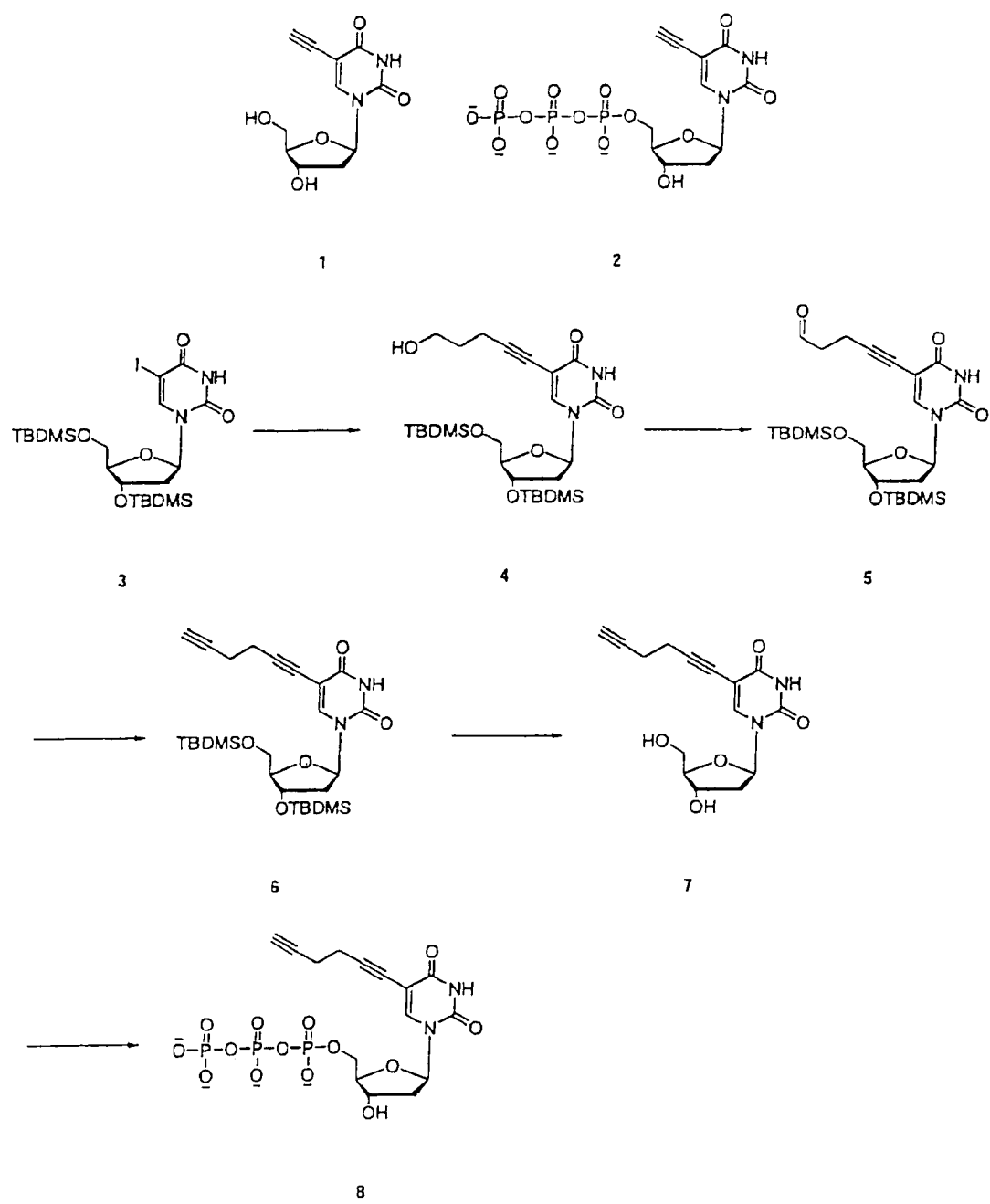


d



e

圖 9

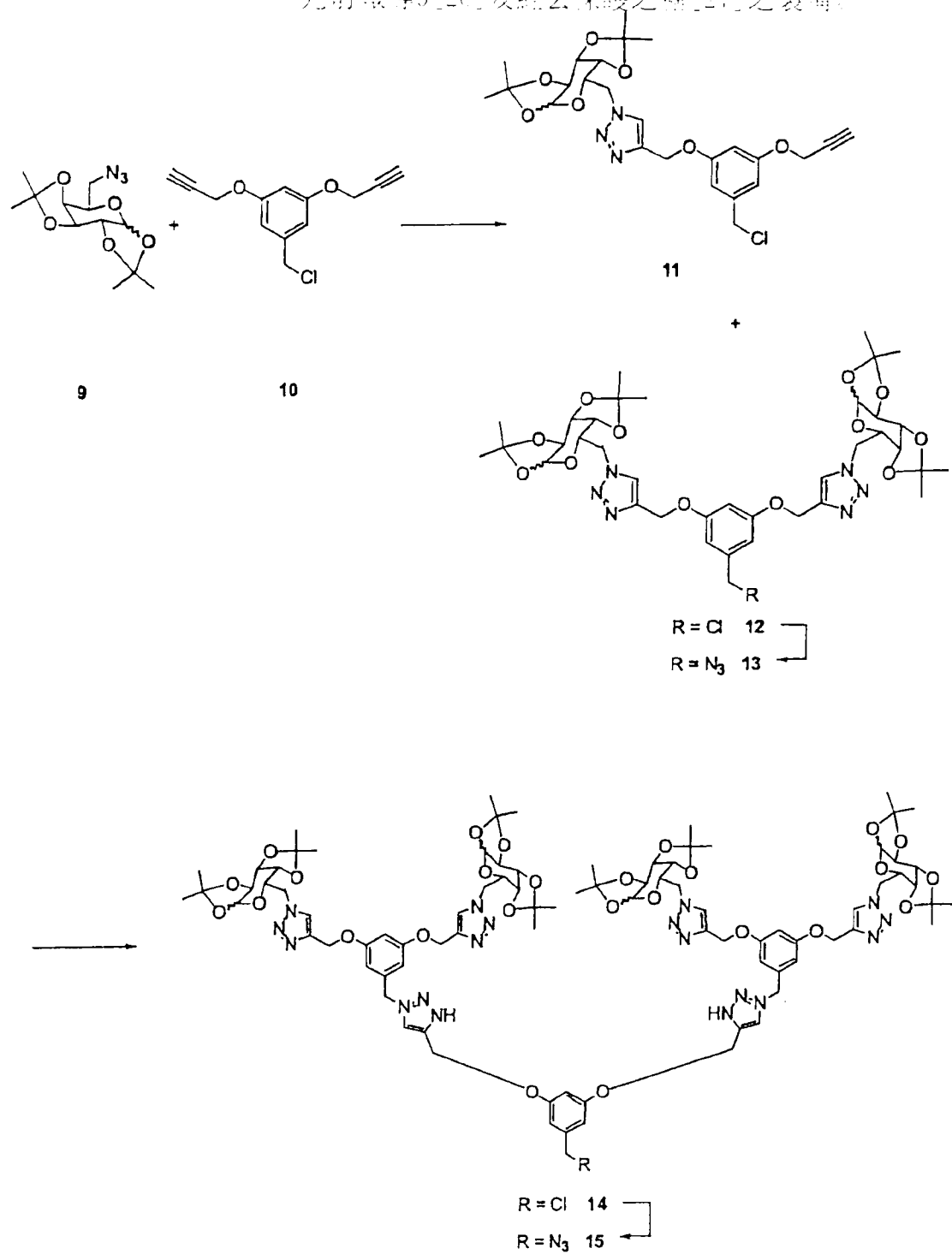


流程 1

圖 10

樹枝狀聚合物合成

先前報導9 [26] 及經去保護之糖 [27] 之製備。



流程 2

圖 11

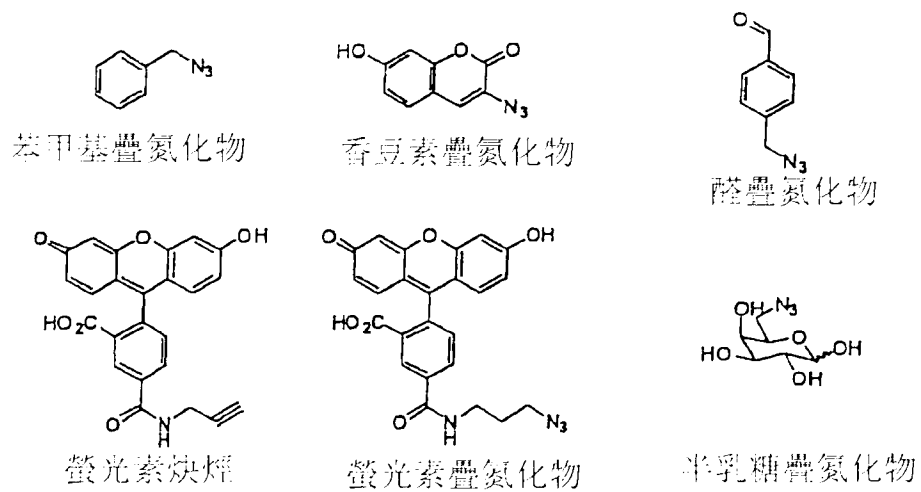


圖12

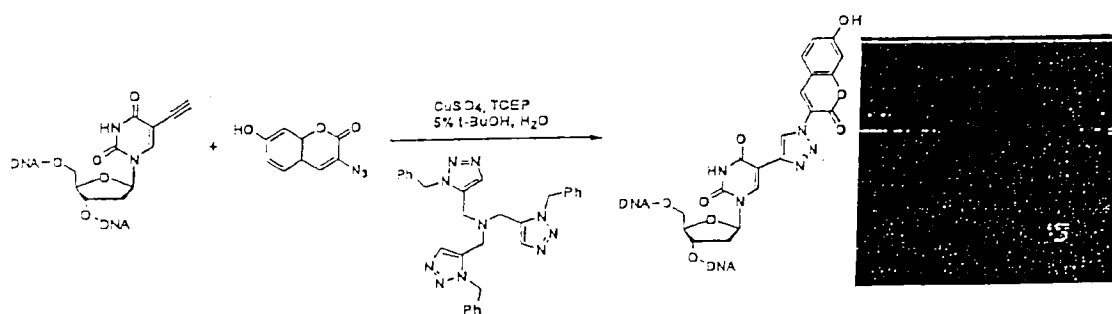


圖14

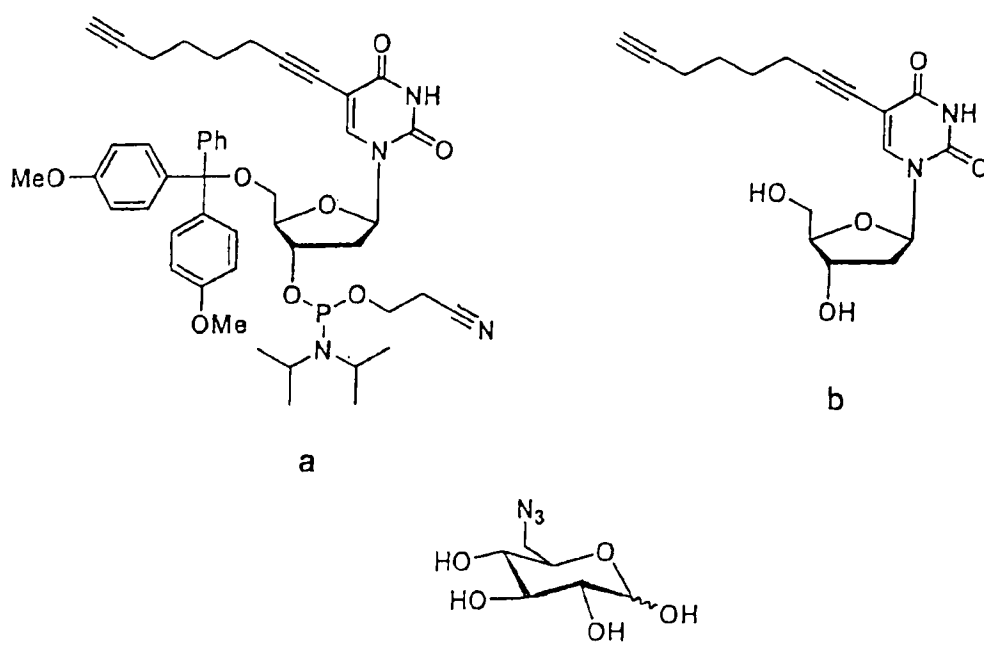


圖 15^c

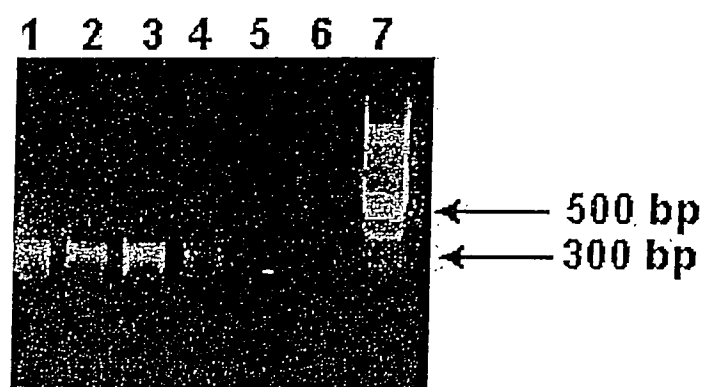


圖16



圖17

HPLC

峰分配:

9.5 min 胞嘧啶核苷

13.1 min 肌苷 (作為蛇毒液之副產物)

13.6 min 烏苷

14.6 min 胸苷

16.7 min 腺苷

26.3 min. 7

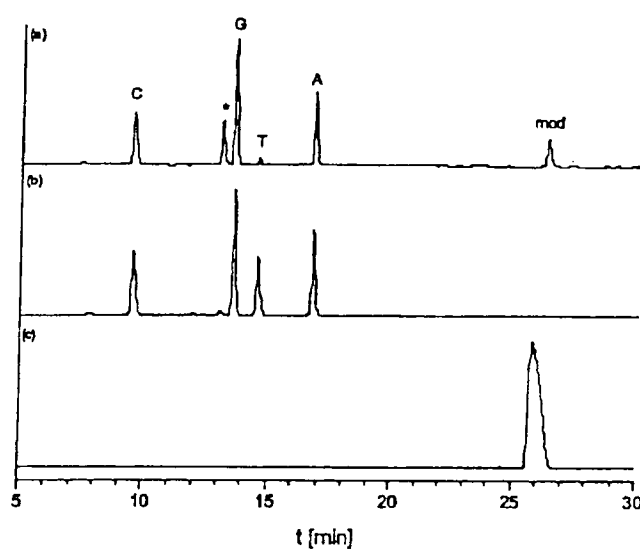


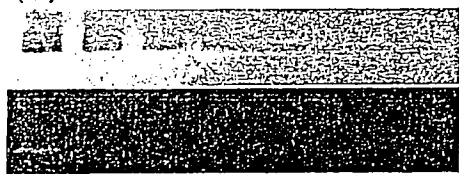
圖 18

稀釋系列

(a)



(b)



(c)



(d)



圖 19

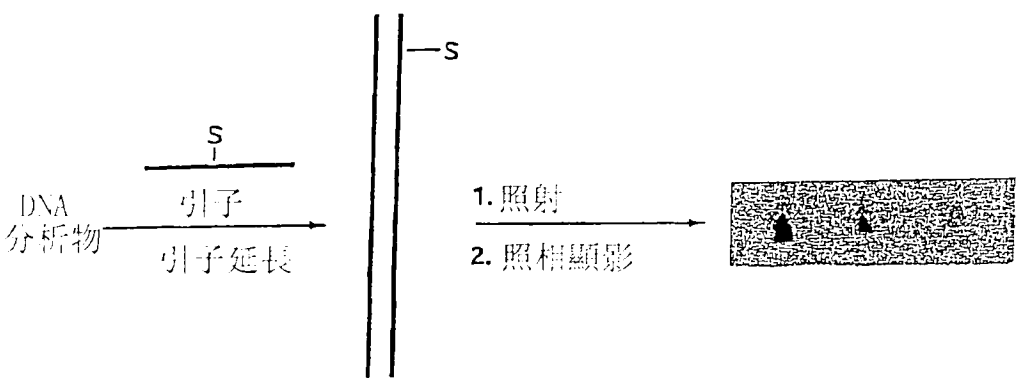
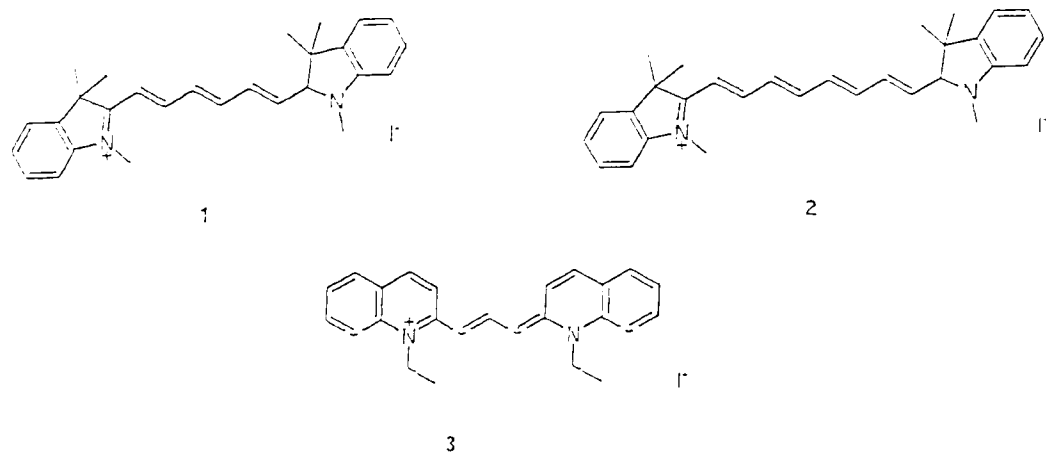
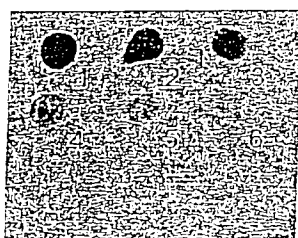


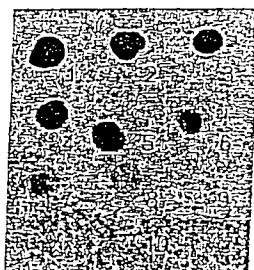
圖21



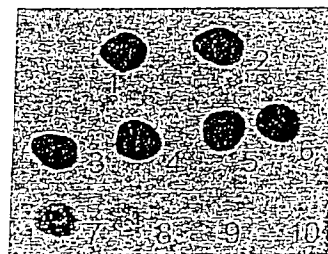
(a)



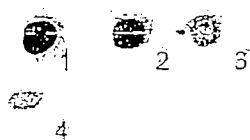
(b)



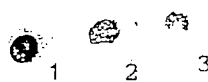
(c)



(d)



(e)



(f)

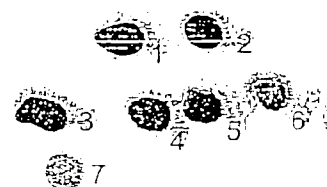


圖 22

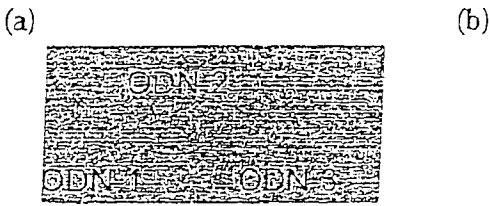
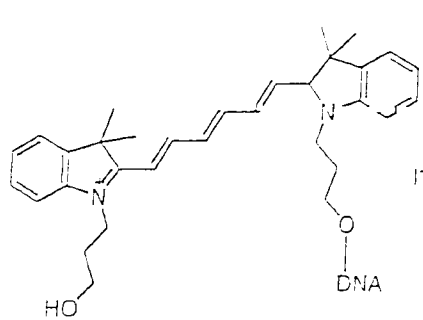
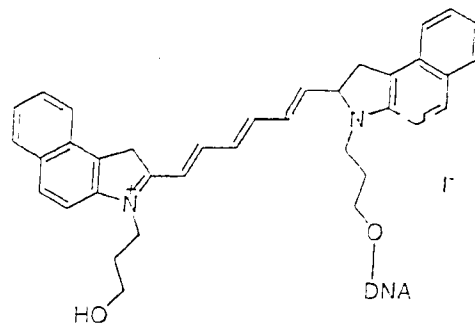


圖23



ODN-4



ODN-5

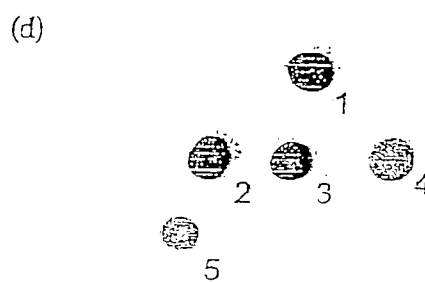
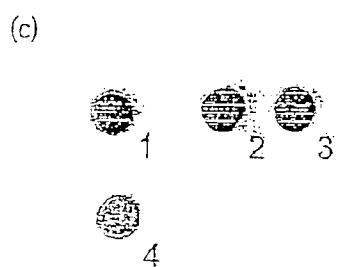
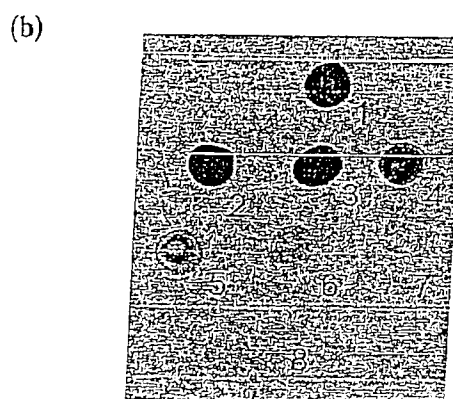
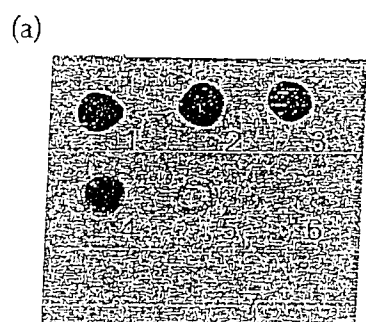


圖 24

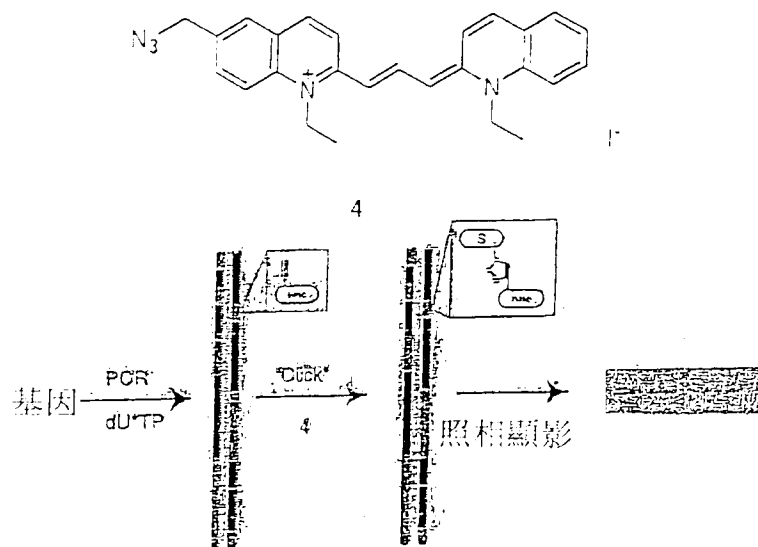


圖25

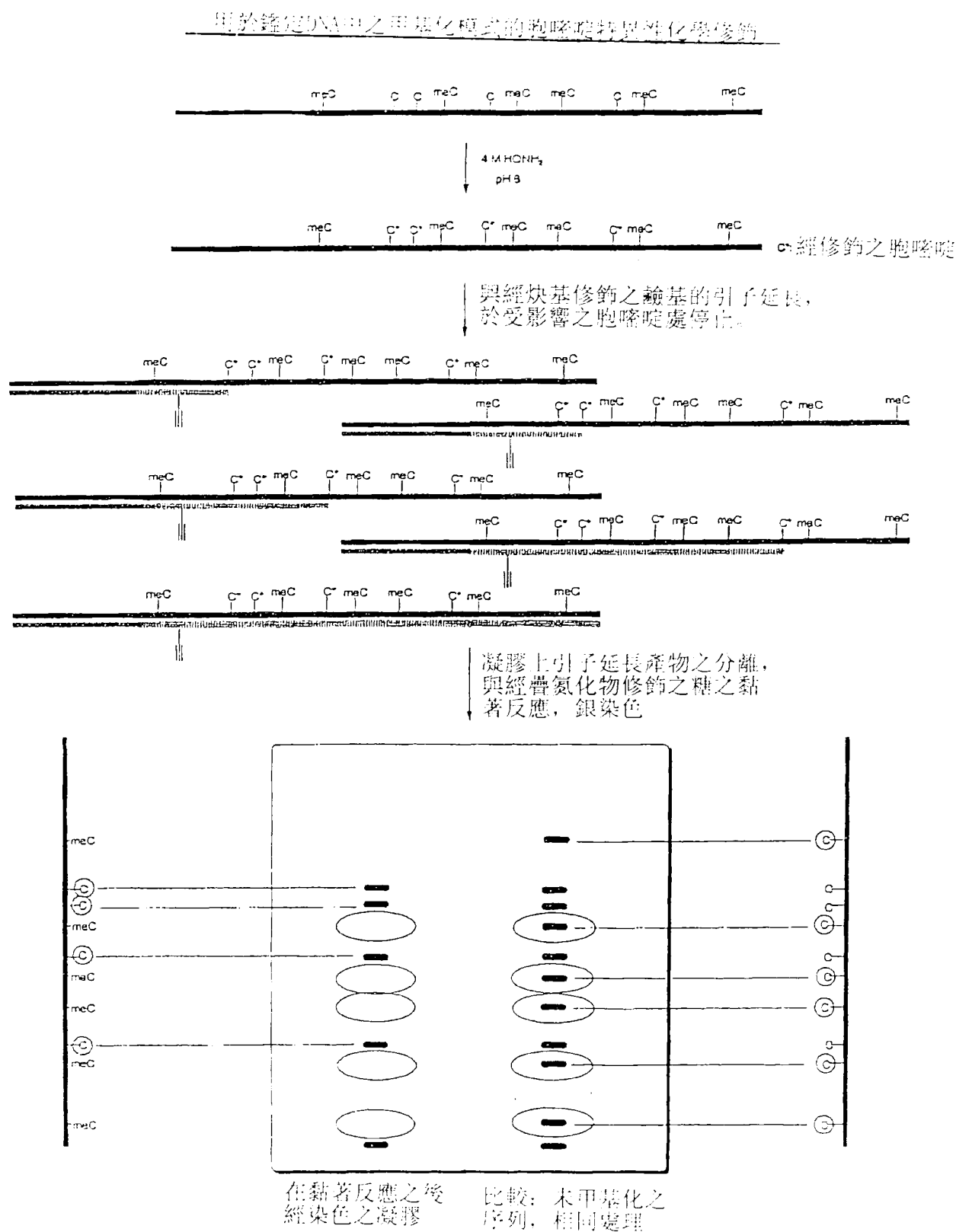


圖 26

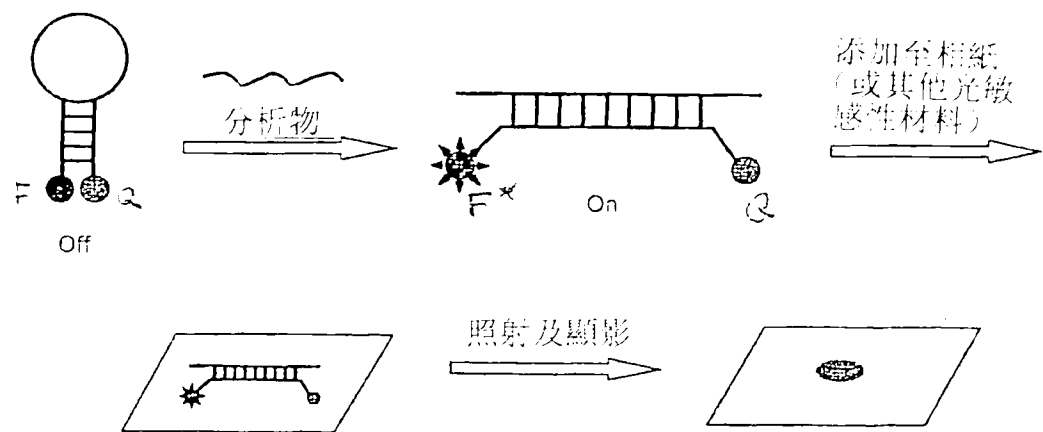


圖27

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

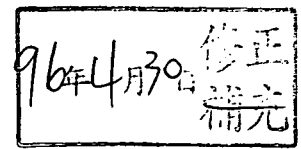
(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

A-S-N

C-S-N

第 095115452 號專利申請案
中文說明書替換頁(96 年 4 月)



三、發明人：(共 5 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 湯瑪士 卡瑞爾
CARELL, THOMAS
2. 安亞 史奇伍革勒
SCHWOEGLER, ANJA
3. 葛連 A 柏利
BURLEY, GLENN A.
4. 約翰尼斯 吉爾利奇
GIERLICH, JOHANNES
5. 慕罕默德 雷札 莫非德
MOFID, MOHAMMAD REZA

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 德國 GERMANY
3. 澳大利亞 AUSTRALIA
4. 德國 GERMANY
5. 德國 GERMANY

簡單、有效及特異性地偵測分析物、尤其複雜生物樣品中之核酸。

【發明內容】

本發明之第一態樣係關於用於偵測分析物(例如樣品中之核酸)的方法及試劑套組，其中形成該待偵測之分析物與新穎醛官能化化合物之聯合產物，其藉由在該聯合產物中在醛基周圍形成標記基團(例如金屬沉積物)以允許序列特異性偵測。

更特定言之，此態樣之一實施例係關於一種用於偵測樣品中之分析物的方法，其包含以下步驟：

(i)提供一樣品；

(ii)使該樣品與包含至少一種選自醛基、經保護之醛基、醛前驅體基團或用於引入醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團之操縱基團(handle group)之官能基的官能化化合物在其中該化合物與該待偵測之分析物形成聯合產物之條件下接觸；

(iii)若需要，則使該操縱基團與包含醛基、經保護之醛基或醛前驅體基團之反應搭配物反應；

(iv)若需要，則使經保護之醛基及醛前驅體基團轉化為醛基；

(v)使具有醛基之該聯合產物與標記試劑在其中在該聯合產物中於醛基周圍形成標記基團之條件下接觸；及

(vi)偵測該等標記基團。

此第一態樣之另一實施例係關於一種用於偵測樣品中之

合成併入核酸中。

使用諸如藉由 Sonogashira/Suzuki [20] 之 Pd-基 C-C 形成反應來提供用於合成具有不同醛基、具有不同經修飾之核鹼基的經醛修飾之核苷及核苷酸的通用合成方法。此外，可合成具有不同空間、電子及功能特徵之醛基。

實例 2

將經醛修飾之核苷及核苷酸併入寡核苷酸中

2.1 藉由化學合成合併

經縮醛/醛修飾之核苷胺基磷酸酯之合併係藉由習知固相合成來達成[21]。含有一或多個經縮醛/醛修飾之核鹼基的若干 DNA 寡核苷酸如表 1 中所述製備。縮醛基之去保護提供經醛修飾之 DNA 寡核苷酸。

測試寡核苷酸與互補 DNA 鏈形成鹼基對，以便獲得雙鏈 DNA 分子之能力。咸發現由於醛基之存在所致之雙重穩定性的降低率較低。每一修飾雙鏈之熔點僅降低約 2°C。然而，此非穩定之量對於意欲應用而言係完全可接受的。

表 1：藉由固相合成法合成寡脫氧核苷酸。

		T_m [°C]	
1	TTTTTXXTTTTT		
2	TTTTTXXTTTTT		
3	GCCGAXGCGC	53.8	(未經修飾之對照組 56,5)
4	GCGXATAXATAXTCGC	48.4	(未經修飾之對照組 53,7)
5	TTXTTXXTTXTTXX		

2.2 藉由酶促方法合併

經縮醛修飾之三磷酸酯單體係根據圖 3 製備。合成三磷酸酯之最具選擇性的方法為遵循 Ludwig 及 Eckstein [11,

十、申請專利範圍：

1. 一種用於偵測樣品中選自於核酸之分析物之方法，該方法包含以下步驟：
 - (i) 提供一樣品；
 - (ii) 使該樣品與一官能化化合物接觸，該官能化化合物包含至少一個選自炔烴及疊氮化物基團之官能基，其係用於 Click 反應之第一反應搭配物 (reaction partner)，該 Click 反應為在疊氮化物與炔烴基之間之 (3+2) 環加成反應，其形成 1,2,3-三唑環，且其中該官能基附著於核苷或核苷酸化合物或其寡聚物或多聚物之核鹼基，其接觸條件係其中該化合物與該待偵測分析物或其互補序列會形成聯合產物；
 - (iii) 使該聯合產物與用於 Click 反應之包含互補疊氮化物或炔烴基團之第二反應搭配物接觸，其接觸條件係其中 Click 反應會在該第一及第二反應搭配物間發生，其中該第二反應搭配物進一步包含標記基團或標記前驅體基團，及
 - (iv) 偵測該等標記基團。
2. 如請求項 1 之方法，進一步包含在步驟 (iii) 後使標記前驅體基團轉化為標記基團之步驟。
3. 如請求項 1 之方法，其包含定性偵測。
4. 如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其包含定量偵測。
5. 如請求項 1 至 3 中任一項之方法，其中該待偵測分析物為選自 DNA 及 RNA 之核酸。

6. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該樣品為生物樣品。
7. 如請求項6之方法，其中該樣品為農業或營養樣品。
8. 如請求項6之方法，其中該樣品為臨床樣品。
9. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該偵測無需擴增即直接完成。
10. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該偵測係與擴增步驟組合而完成。
11. 如請求項1至3中任一項之方法，其中一核酸分析物之序列-特異性偵測係經完成。
12. 如請求項11之方法，其中形成該聯合產物包含序列-特異性雜交反應。
13. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該核鹼基係選自天然出現及非天然出現之嘌呤及嘧啶核鹼基。
14. 如請求項13之方法，其中該官能基附著於嘧啶核鹼基之位置5及位置6，或附著於嘌呤核鹼基之位置7及位置8。
15. 如請求項14之方法，其中該官能基附著於嘧啶核鹼基之位置5。
16. 如請求項14之方法，其中該官能基附著於嘌呤核鹼基之位置7。
17. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該官能基係經由直接鍵結或間隔基附著於該化合物。
18. 如請求項17之方法，其中該間隔基為可彎曲間隔基或至少部分不可彎曲間隔基。

19. 如請求項18之方法，其中該間隔基包含至少一種選自烯烴基團、炔烴基團、環狀基團及其組合之基團。
20. 如請求項19之方法，其中環狀基團為芳族或雜芳族基團。
21. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該官能化化合物係選自：
 - (i) 官能化核酸或核酸類似物建構嵌段，及/或
 - (ii) 官能化核酸或核酸類似物。
22. 如請求項21之方法，其中該聯合產物之形成包含將該官能化建構嵌段併入至核酸或核酸類似物分子中。
23. 如請求項22之方法，其中該官能化核苷酸或核苷酸類似物係酶促地併入至核酸分子中。
24. 如請求項22之方法，其中該聯合產物之形成包含將該官能化核酸或核酸類似物結合至該待偵測分析物。
25. 如請求項24之方法，其中該結合包含雜交至一核酸分析物。
26. 如請求項21之方法，其包含與核酸擴增反應組合或不與之組合之引子延長反應。
27. 如請求項26之方法，其包含：

提供至少一種引子分子，其在該等分析條件下與該待偵測核酸分析物或其互補序列進行雜交；及

使該引子延長；

其中使至少一種官能化核苷酸或核苷酸類似物係併入該延長產物中。

28. 如請求項26之方法，其包含：

提供至少一種官能化引子分子，其在該等分析條件下與該待偵測核酸分析物或其互補序列雜交；

使該引子分子延長；

其中形成經延長之引子分子。

29. 如請求項25之方法，其包含：

提供一官能化雜交探針，其在該等分析條件下與該待偵測核酸分析物或其互補序列雜交，

其中形成一雜交產物。

30. 如請求項23之方法，其包含：

提供一官能化雜交探針，其在該等分析條件下與該待偵測核酸分析物或其互補序列雜交；及

使該雜交產物經受一處理，其中含有至少一個錯配之雜交產物係經解離，其中未解離之雜交產物的存在意指具有與該雜交探針完全互補之序列之核酸存在及/或含量。

31. 如請求項30之方法，其中該處理包含錯配消化處理。

32. 如請求項31之方法，其中該錯配消化處理包含使該雜交產物與一錯配鹼基化酶接觸。

33. 如請求項30之方法，其中該處理包含差異性雜交處理。

34. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該偵測係藉由光學方法完成。

35. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該偵測係藉由電方法完成。

36. 如請求項1至3中任一項之方法，其包含複數種核酸之平行偵測。
37. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該偵測係於一固體表面上完成進行。
38. 如請求項37之方法，其中固體表面係微陣列晶片。
39. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該官能基選自疊氮化物基團或炔烴基團。
40. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該第二反應搭配物包含標記基團，該標記基團選自光學性可偵測之標記基團，或選自氧化還原活性標記基團。
41. 如請求項40之方法，其中該光學性可偵測之標記基團係螢光標記基團。
42. 如請求項1至3中任一項之方法，其中該第二反應搭配物包含標記前驅體基團，該標記前驅體基團選自醛基及經保護之醛基及醛前驅體基團。
43. 如請求項42之方法，其中使該等標記前驅體基團轉化為標記基團包含在醛基周圍形成金屬沉積物。
44. 一種用於偵測樣品中分析物之試劑套組，其包含：
- (a)官能化化合物，其包含
- (i)至少一種選自炔烴及疊氮化物基團之Click官能基，其係用於Click反應之第一反應搭配物，該Click反應為在疊氮化物與炔烴基團之間之(3+2)環加成反應，其形成1,2,3-三唑環，及
- (ii)核酸或核酸類似物建構嵌段，其中官能基附著於

核鹼基，及

(b)包含互補疊氮化物或炔烴基團之用於Click反應之第二反應搭配物，其中該第二反應搭配物進一步包含標記基團或標記前驅體基團。

45. 如請求項44之試劑套組，進一步包含一標記形成試劑，其能夠使標記前驅體基團轉化為標記基團。
46. 一種如請求項44之試劑套組之用途，其係用於如請求項1至43中任一項之方法。
47. 一種式(II)化合物之用途，其係用於偵測樣品中核酸分析物之方法：

C-S-N (II)

其中C為選自炔烴及疊氮化物基團之Click官能基，其為Click反應之第一反應搭配物，該Click反應為在疊氮化物與炔烴基團之間之(3+2)環加成反應，其形成1,2,3-三唑環，

S為間隔基，及

N為核酸或核酸類似物建構嵌段，其中該Click官能基附著於核鹼基，

其中式II化合物與待測分析物形成聯合產物。

48. 如請求項47之用途，其中核酸或核酸類似物建構嵌段為核苷或核苷酸化合物。
49. 如請求項47之用途，其中式II化合物與包含標記基團或標記前驅體基團之反應搭配物反應。
50. 如請求項47至49中任一項之用途，其中該核鹼基係選自

S

天然存在及非天然之嘌呤及嘧啶鹼基。

51. 如請求項50之用途，其中該核鹼基係選自腺嘌呤、7-脫氮雜腺嘌呤、鳥嘌呤、7-脫氮雜鳥嘌呤、胞嘧啶、胸苷、尿嘧啶、肌苷及黃嘌呤。
52. 如請求項50之用途，其中該官能基附著於嘧啶核鹼基之位置5及位置6，或附著於嘌呤核鹼基之位置7及位置8。
53. 如請求項52之用途，其中該官能基附著於嘧啶核鹼基之位置5。
54. 如請求項52之用途，其中該官能基附著於嘌呤核鹼基之位置7。
55. 如請求項47至49中任一項之用途，其中該間隔基為至少部分不可彎曲之間隔基。
56. 如請求項55之用途，其中該間隔基包含至少一種選自烯烴基團、炔烴基團、環狀基團及其組合之基團。
57. 如請求項56之用途，其中環狀基團為芳族或雜芳族基團。
58. 如請求項47至49中任一項之用途，其中該化合物為建構嵌段，該建構嵌段係用於核酸或核酸類似物或其前驅體之化學或酶促合成作用。
59. 如請求項47至49中任一項之用途，其中該化合物為核苷三磷酸、H-磷酸酯或磷酸三酯。
60. 如請求項59之用途，其中核苷三磷酸為核糖、2'-脫氧核糖或三磷酸2',3'-二脫氧核糖核苷或核苷胺基磷酸酯。
61. 如請求項47至49中任一項之用途，其為建構嵌段，該建

構嵌段用於肽核酸、嗎啉基核酸或鎖核酸之合成。

62. 如請求項47至49中任一項之用途，其中該官能基係經由具有鏈長至多達10個原子之間隔基附著於該核鹼基。
63. 如請求項62之化合物，其中該鏈長為至多達3個原子。
64. 一種核酸或核酸類似物分子，其併入至少一種如請求項47至63中任一項之式(II)化合物，其中官能基為附著於嘧啶核鹼基之位置5及位置6，或附著於嘌呤核鹼基之位置7及位置8之炔烴基團，且其中核酸或核酸類似物分子能夠與互補核酸雜交。
65. 如請求項64之核酸或核酸類似物分子，其中該官能基附著於嘧啶核鹼基之位置5。
66. 如請求項64之核酸或核酸類似物分子，其中該官能基附著於嘌呤核鹼基之位置7。
67. 如請求項64之核酸或核酸類似物分子，其為選自DNA及RNA之核酸，或選自肽核酸、嗎啉基核酸或鎖核酸之核酸類似物分子。
68. 一種合成能夠與互補核酸雜交之核酸或核酸類似物分子之方法，其包含將核苷酸或核苷酸類似物建構嵌段併入至核酸或核酸類似物分子中，該核苷酸或核苷酸類似物建構嵌段包含如請求項49至63中任一項之化合物(II)，其中官能基為附著於嘧啶核鹼基之位置5及位置6，或附著於嘌呤核鹼基之位置7及位置8之炔烴基團。
69. 如請求項68之方法，其中該官能基附著於嘧啶核鹼基之位置5。

70. 如請求項64之方法，其中該官能基附著於嘌呤核鹼基之位置7。
71. 如請求項68之方法，其包含化學性合成作用及/或酶促合成作用。
72. 如請求項68或71中任一項之方法，其進一步包含使該核酸或核酸類似物分子與化合物(II)之第二反應搭配物接觸，及在該第一及第二反應搭配物之間進行Click反應，該Click反應為在疊氮化物與炔烴基團之間之(3+2)環加成反應，其形成1,2,3-三唑環。
73. 一種如請求項64至67中任一項之核酸或核酸類似物分子與一分析物之聯合產物。
74. 如請求項73之產物，其為與互補核酸之雜交產物。
75. 一種如請求項1至43中任一項之方法或如請求項44之試劑套組之用途，其用於農業應用。
76. 如請求項75之用途，其用於偵測來自植物、植物病原體或植物害蟲之核酸。
77. 如請求項76之用途，其中該植物害蟲為昆蟲。
78. 如請求項75或76之用途，其用於偵測遺傳變異性。
79. 如請求項78之用途，其中該遺傳變異性為植物、植物病原體或植物害蟲中之SNP。
80. 如請求項75至77中任一項之用途，其用於偵測或監測除草劑、殺真菌劑或殺蟲劑抵抗性、耐受性或不耐性。
81. 如請求項80之用途，其用於偵測或監測真菌、昆蟲或植物中之殺蟲劑抵抗性、耐受性或不耐性。

82. 如請求項 75 至 77 中任一項之用途，其用於基因分型。
83. 如請求項 82 之用途，其用於偵測及/或區分真菌、昆蟲或植物之物種或品系。
84. 如請求項 75 至 77 中任一項之用途，其用於偵測及/或區分基改有機體或品系。
85. 如請求項 84 之用途，其中該有機體或品系係真菌、昆蟲或植物之有機體或品系。
86. 一種如請求項 1 至 43 中任一項之方法或如請求項 44 之試劑套組之用途，其用於醫學、診斷及法醫應用。
87. 如請求項 86 之用途，其係用在人類或獸醫醫學。
88. 如請求項 87 之用途，其用於偵測來自病原體之核酸。
89. 如請求項 88 之用途，其中該病原體為人類病原體。
90. 如請求項 86 至 89 中任一項之用途，其用於偵測遺傳變異性。
91. 如請求項 90 之用途，其中該遺傳變異性為人類中之 SNP。
92. 如請求項 86 至 89 中任一項之用途，其用於偵測藥物抵抗性、耐受性或不耐性或過敏性。
93. 如請求項 86 至 89 中任一項之用途，其用於基因分型。
94. 如請求項 86 至 89 中任一項之用途，其用於偵測基改有機體或品系。
95. 如請求項 94 之用途，其中該有機體或品系為細菌或病毒之有機體或品系。
96. 如請求項 86 至 89 中任一項之用途，其用於診斷疾病。

97. 如請求項96之用途，其中該疾病為遺傳疾病、過敏性疾病、自體免疫性疾病或傳染性疾病。
98. 一種如請求項1至43中任一項之方法或如請求項44之試劑套組之用途，其用於偵測基因之功能及/或表現。
99. 一種如請求項1至43中任一項之方法或如請求項44之試劑套組之用途，其係用於產品資訊偵測。
100. 如請求項99之用途，其用於偵測產物中編碼之特定資訊。
101. 一種如請求項1至43中任一項之方法或如請求項44之試劑套組之用途，其用於營養應用。
102. 如請求項101之用途，其用於飼養領域之營養應用。
103. 一種如請求項1至43中任一項之方法或如請求項44之試劑套組之用途，其用於外來基因分析。
104. 如請求項103之用途，其係用於DNA甲基化型態之分析。
105. 一種化合物，可得自如請求項72之方法之反應產物。
106. 一種如請求項105之化合物與互補核酸之聯合產物。

修正頁四

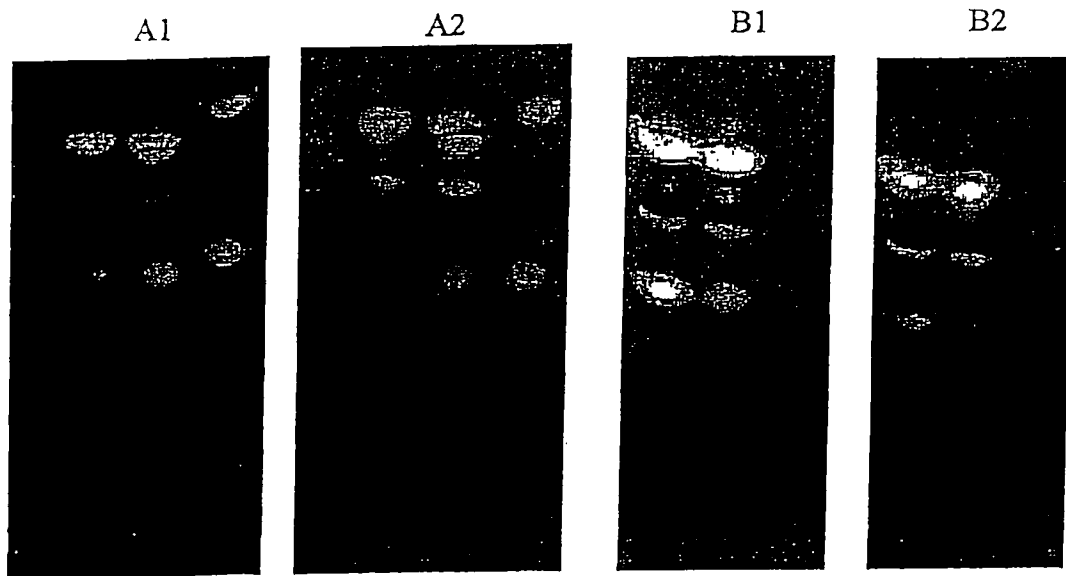
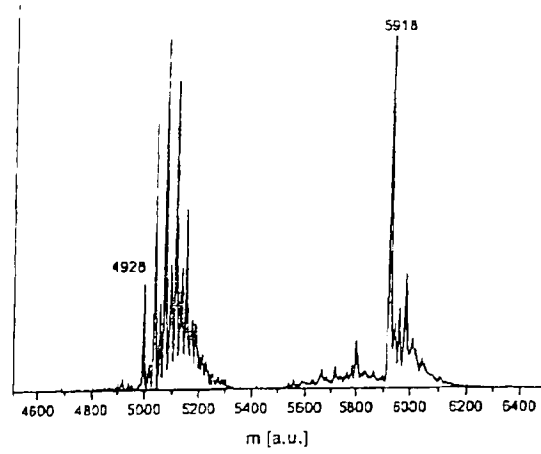


圖13

修正
年 月 日 起 施行

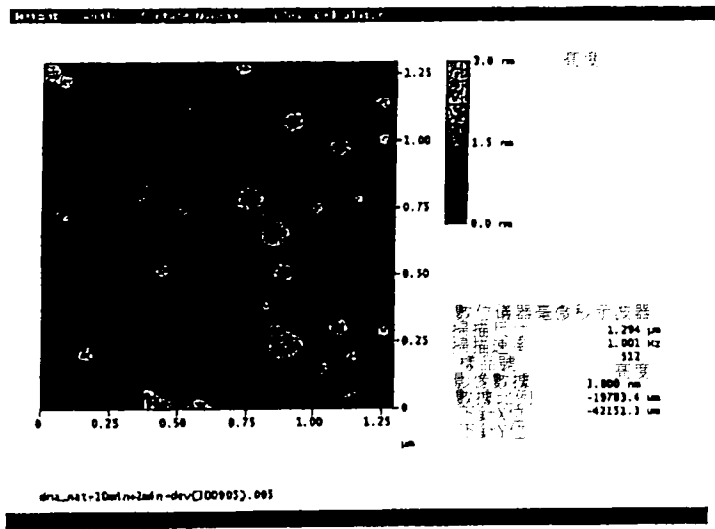


圖 20a

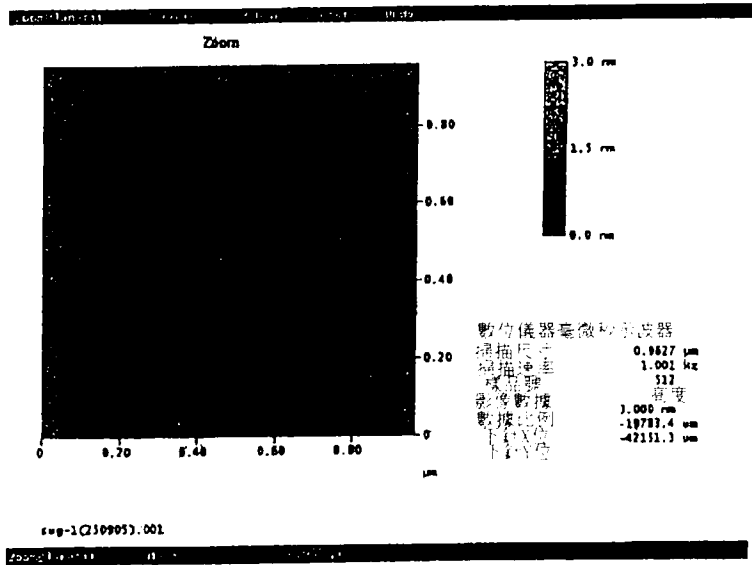


圖 20b

修正頁(六)
年 月 日

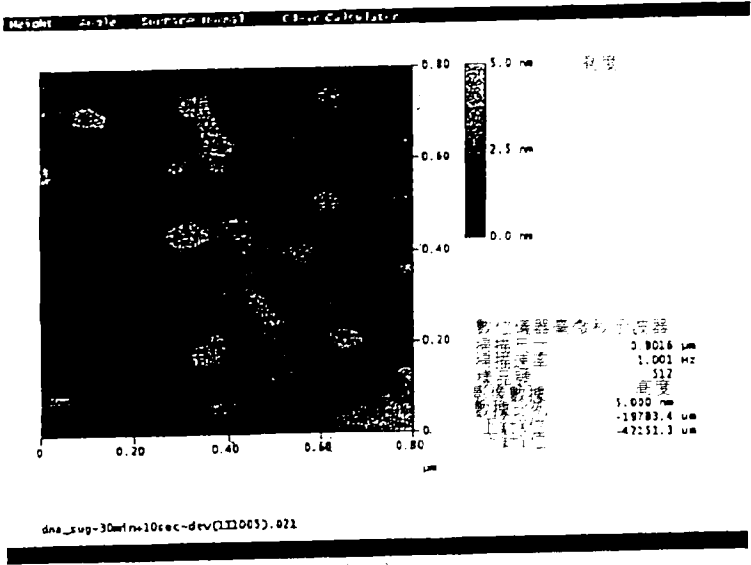


圖20c

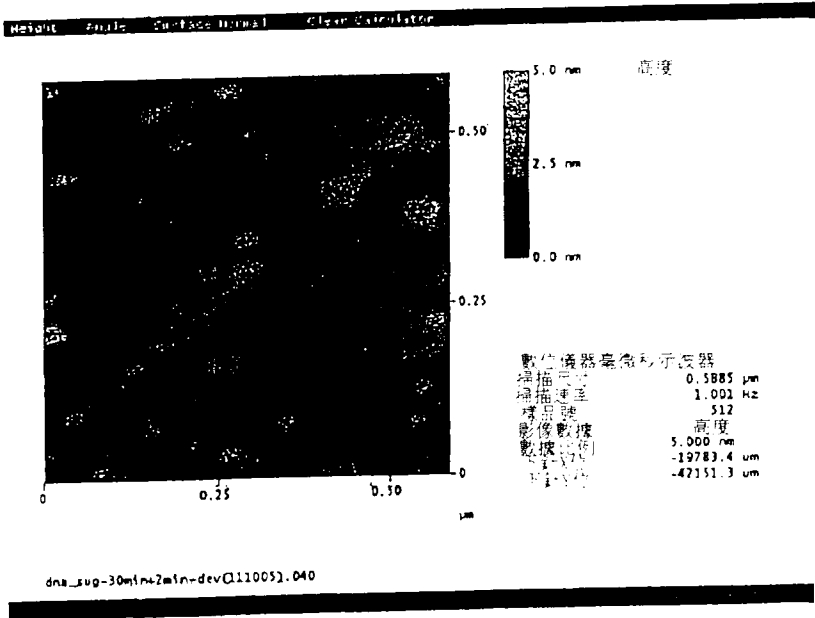


圖20d

C1108671DBX201306C.doc