

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成22年8月19日(2010.8.19)

【公開番号】特開2010-53137(P2010-53137A)

【公開日】平成22年3月11日(2010.3.11)

【年通号数】公開・登録公報2010-010

【出願番号】特願2009-272932(P2009-272932)

【国際特許分類】

C 07 D 491/147 (2006.01)

C 07 F 9/655 (2006.01)

G 01 N 21/64 (2006.01)

【F I】

C 07 D 491/147

C 07 F 9/655

G 01 N 21/64 F

【手続補正書】

【提出日】平成22年7月1日(2010.7.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

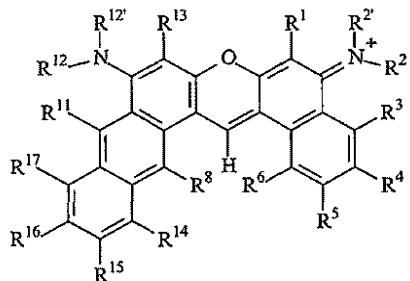
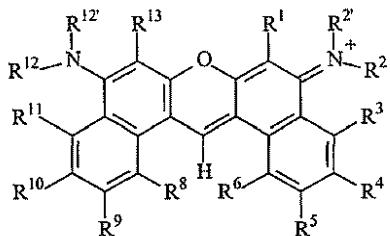
【請求項1】

標識されたプライマー伸長産物を生成する方法であって、該方法は、以下の工程：

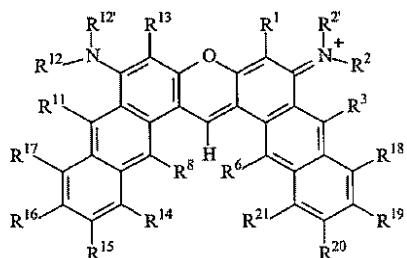
酵素学的に組み込み可能なヌクレオチドを用いてプライマー-標的ハイブリッドを伸長させる工程を包含し、ここで、該プライマーまたは該ヌクレオチドは、以下の式のうちの1つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式：

【化1】



, または



のうちの 1 つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、ここで、
R² および R^{1 2} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 1 2 個の炭素原子を有する炭化水素、 - (C_H₂)_n - R^{4 0}、 - (C_H₂)_m - Ph - R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R²’ および R^{1 2}’ は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 1 2 個の炭素原子を有する炭化水素、 - (C_H₂)_n - R^{4 0}、 - (C_H₂)_m - Ph - R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、R²’ および R¹’ が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、R^{1 2}’ および R^{1 3}’ が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち 1 つ以上を含み；

n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり；

m は 0 または 1 であり；

R^{4 0} はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R^{1 0}、R^{1 6} および R^{1 9} は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R^{1 1}、R^{1 3}、R^{1 4}、R^{1 5}、R^{1 7}、

R¹~8、R²~0およびR²~1は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~8個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル(-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4-アミノピリジニウム(ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する炭化水素で置換される)、ヒドロキシメチル(-CH₂OH)、メトキシ(-OCH₃)、-ROH、チオメチル(-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO₂Ar)、スルホンアミド(-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド(-SOR)、アリールスルホキシド(-SOAr)、アミノ(-NH₂)、アンモニウム(-NH₃⁺)、アミド(-CONR₂)、ニトリル(-CN)、C₁~C₈アルコキシ(-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各Rは、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該プライマーまたは該ヌクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するよう構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該プライマーまたは該ヌクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；で標識され、それによって、該プライマーが伸長される、方法。

【請求項2】

ポリヌクレオチド配列決定の方法であって、該方法は、以下の工程：

第一、第二、第三、および第四のクラスのポリヌクレオチドの混合物を形成する工程であり、該クラスは、以下のとおりであり：

該第一のクラスの各ポリヌクレオチドは、3'末端ジデオキシアデノシンを含み、かつ第一の色素で標識されており；

該第二のクラスの各ポリヌクレオチドは、3'末端ジデオキシチジンを含み、かつ第二の色素で標識されており；

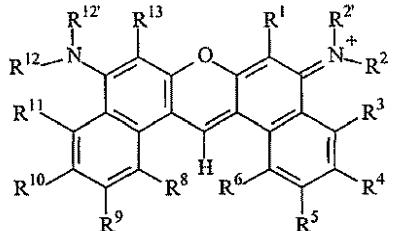
該第三のクラスの各ポリヌクレオチドは、3'末端ジデオキシグアノシンを含み、かつ第三の色素で標識されており；そして、

該第四のクラスの各ポリヌクレオチドは、3'末端ジデオキシチミジンを含み、かつ第四の色素で標識されており；ここで、

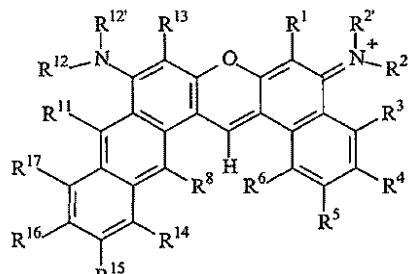
該第一、第二、第三、または第四の色素の1つ以上は、以下：

(a) 以下の式：

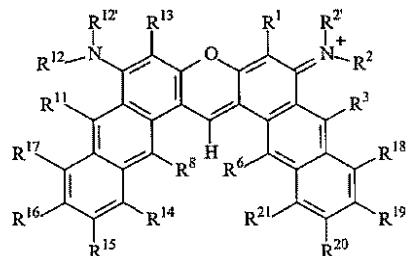
【化2】



,



、または



のうちの1つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、ここで、

R^2 および $R^{1,2}$ は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する炭化水素、 $-(CH_2)_n-R^{4,0}$ 、 $-(CH_2)_m-Ph-R^{4,0}$ 、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

$R^{2'}$ および $R^{1,2'}$ は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する炭化水素、 $-(CH_2)_n-R^{4,0}$ 、 $-(CH_2)_m-Ph-R^{4,0}$ 、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、 $R^{2'}$ および R^1 が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された4~7個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、 $R^{1,2'}$ および $R^{1,3}$ が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された4~7個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~8個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち1つ以上を含み；

n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり；

m は 0 または 1 であり；

R^{4 0} はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R^{1 0}、R^{1 6} および R^{1 9} は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R^{1 1}、R^{1 3}、R^{1 4}、R^{1 5}、R^{1 7}、

R^{1 8}、R^{2 0} および R^{2 1} は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不

飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレ

ート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル (-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有す

る、アミノで置換された炭化水素、4 - アミノピリジニウム (ここで、アミノは、飽和も

しくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素で二

置換される)、ヒドロキシメチル (-CH₂OH)、メトキシ (-OCH₃)、-ROH

、チオメチル (-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ (-SAr)、ア

リールスルホン (-SO₂Ar)、スルホンアミド (-SO₂NR₂)、アルキルスルホ

キシド (-SOR)、アリールスルホキシド (-SOAr)、アミノ (-NH₂)、アン

モニウム (-NH₃⁺)、アミド (-CONR₂)、ニトリル (-CN)、C₁ ~ C₈ ア

ルコキシ (-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジ

ル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレン

オキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各 R は、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するよう構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するよう構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；

であり、該色素は、各々がスペクトルにより互いに分解可能である、工程；ならびに、

該ポリヌクレオチドを電気泳動によって分離する工程、

を包含する、方法。

【請求項 3】

蛍光検出によって前記分離したポリヌクレオチドを検出する工程をさらに包含する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記色素の蛍光スペクトルによって前記ポリヌクレオチドの3'末端ヌクレオチドを同定する工程をさらに包含する、請求項2に記載の方法。

【請求項5】

オリゴヌクレオチドのライゲーション方法であって、該方法は、以下：

2つのプローブを標的配列にアニーリングする工程；および

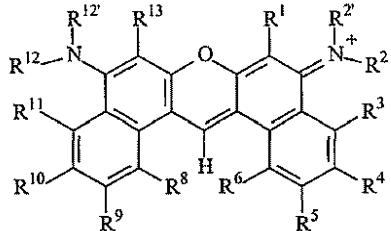
一方のプローブの5'末端と他方のプローブの3'末端との間にホスホジエステル結合を形成する工程

を包含し；ここで、

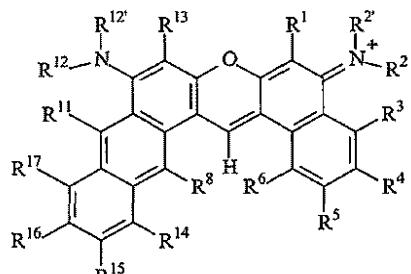
プローブの一方または両方が、以下の式のうちの1つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式：

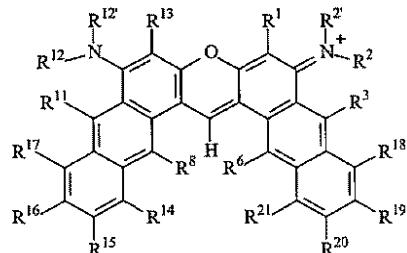
【化3】



,



または



のうちの1つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、ここで、

R²およびR¹⁻²は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する炭化水素、-(-CH₂)_n-R⁴⁻⁰、-(-CH₂)_m-Ph-R⁴⁻⁰、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R^{2'}およびR^{1-2'}は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有する炭化水素、-(-CH₂)_n-R⁴⁻⁰、-(-CH₂)_m-Ph-R⁴⁻⁰、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、R^{2'}およびR¹が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された4~7個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、R^{1-2'}およびR^{1-3'}が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された4~7個の環原子を有する第二の環構造を形成

し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち1つ以上を含み；

nは1～6の範囲の整数であり；

mは0または1であり；

R^{4 0}はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R^{1 0}、R^{1 6}およびR^{1 9}は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R^{1 1}、R^{1 3}、R^{1 4}、R^{1 5}、R^{1 7}、R^{1 8}、R^{2 0}およびR^{2 1}は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル(-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4-アミノピリジニウム(ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素で二置換される)、ヒドロキシメチル(-CH₂OH)、メトキシ(-OCH₃)、-ROH、チオメチル(-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO₂Ar)、スルホンアミド(-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド(-SOR)、アリールスルホキシド(-SOAr)、アミノ(-NH₂)、アンモニウム(-NH₃⁺)、アミド(-CONR₂)、ニトリル(-CN)、C₁～C₈アルコキシ(-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各Rは、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスルキニジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペニタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するよう構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；で標識されたポリヌクレオチドである、方法。

【請求項 6】

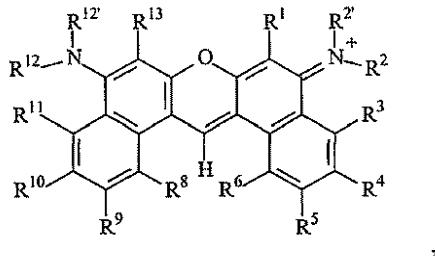
増幅方法であって、該方法は、以下：

2つ以上のプライマーを標的ポリヌクレオチドにアニーリングする工程、ならびに、
ポリメラーゼおよび酵素学的に伸長可能なヌクレオチドの混合物によって該プライマー
を伸長させる工程
を包含し；ここで、

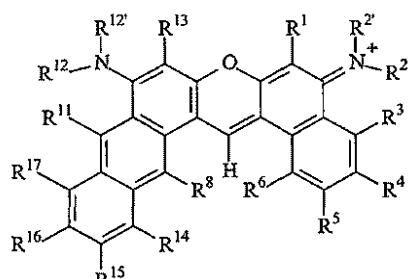
該プライマーの少なくとも1つ、または、該酵素学的に伸長可能なヌクレオチドの少な
くとも1つが、以下の式のうちの1つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式：

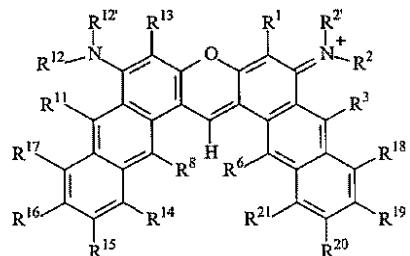
【化4】



,



, または



のうちの1つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、
ここで、

R² および R¹⁻² は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和も
しくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素、 -
(C₂H₂)_n - R⁴⁻⁰、 - (C₂H₂)_m - Ph - R⁴⁻⁰、フェニル、置換フェニル、ベン
ジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、
置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R^{2'} および R^{1-2'} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽
和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素
、 - (C₂H₂)_n - R⁴⁻⁰、 - (C₂H₂)_m - Ph - R⁴⁻⁰、フェニル、置換フェニル、
ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素
環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、R^{2'} および R¹
が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された4～7個の環原子を
有する第一の環構造を形成し、そして、R^{1-2'} および R¹⁻³ が、これらが結合する原子
と一緒にになって、必要に応じて置換された4～7個の環原子を有する第二の環構造を形成
し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アノモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち1つ以上を含み；

nは1～6の範囲の整数であり；

mは0または1であり；

R⁴0はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R¹⁰、R¹⁶およびR¹⁹は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R¹¹、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁷、R¹⁸、R²⁰およびR²¹は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル(-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4-アミノピリジニウム(ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素で置換される)、ヒドロキシメチル(-CH₂OH)、メトキシ(-OCH₃)、-ROH、チオメチル(-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO₂Ar)、スルホンアミド(-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド(-SOR)、アリールスルホキシド(-SOAr)、アミノ(-NH₂)、アンモニウム(-NH₃⁺)、アミド(-CONR₂)、ニトリル(-CN)、C₁～C₈アルコキシ(-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各Rは、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該プライマーまたは該スクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するように構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該プライマーまたは該スクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；で標識される、方法。

【請求項 7】

増幅方法であって、該方法は、以下：

2つ以上のプライマーおよび蛍光色素消光剤プローブを標的核酸にアニーリングする工程、ならびに、

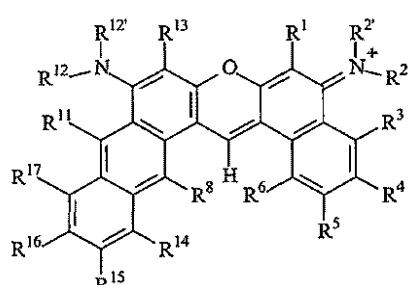
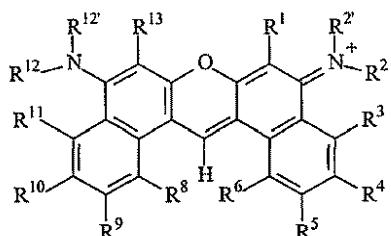
ポリメラーゼおよび酵素学的に伸長可能なヌクレオチドの混合物によって該プライマーを伸長させる工程

を包含し；ここで、

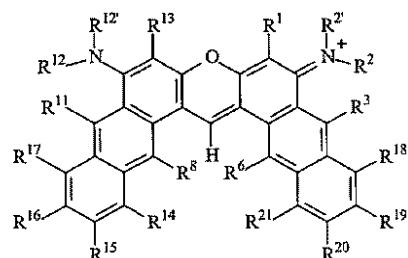
該プローブが、蛍光化合物および消光剤化合物で標識されたポリヌクレオチドであり；該蛍光化合物および該消光剤化合物の少なくとも一方は、以下の式のうちの1つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式：

【化5】



，または



のうちの1つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、
ここで、

R² および R^{1 2} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素、-(C₂H₅)_n-R^{4 0}、-(C₂H₅)_m-Ph-R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R^{2'} および R^{1 2'} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素、-(C₂H₅)_n-R^{4 0}、-(C₂H₅)_m-Ph-R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、R^{2'} および R^{1'} が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された4～7個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、R^{1 2'} および R^{1 3'} が、これらが結合する原子

と一緒にになって、必要に応じて置換された4～7個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち1つ以上を含み；

nは1～6の範囲の整数であり；

mは0または1であり；

R^{4 0}はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R^{1 0}、R^{1 6}およびR^{1 9}は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R^{1 1}、R^{1 3}、R^{1 4}、R^{1 5}、R^{1 7}、R^{1 8}、R^{2 0}およびR^{2 1}は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル(-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4-アミノピリジニウム(ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素で二置換される)、ヒドロキシメチル(-CH₂OH)、メトキシ(-OCH₃)、-ROH、チオメチル(-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO₂Ar)、スルホンアミド(-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド(-SOR)、アリールスルホキシド(-SOAr)、アミノ(-NH₂)、アンモニウム(-NH₃⁺)、アミド(-CONR₂)、ニトリル(-CN)、C₁～C₈アルコキシ(-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各Rは、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスルホニミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペニタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するように構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；

である、方法。

【請求項 8】

ハイブリダイゼーション方法であって、該方法は、以下：

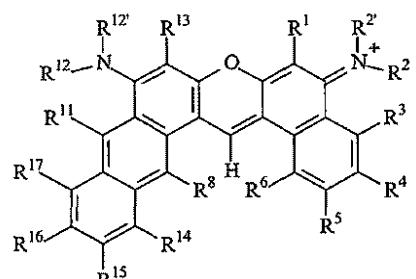
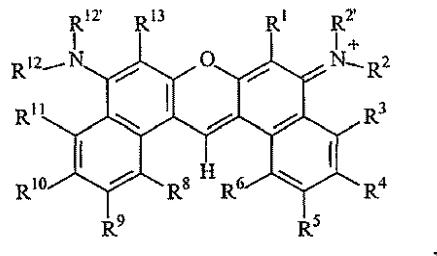
標的ポリヌクレオチドを固定化プローブにアニーリングする工程；および
標的 - プローブ複合体からの蛍光を検出する工程
を包含し、ここで、

該固定化プローブが平坦表面に共有結合しており；そして

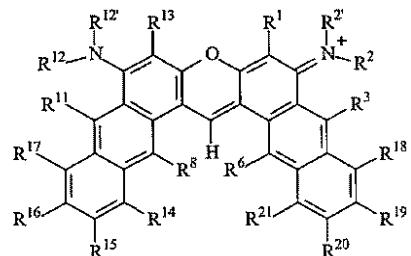
該標的ポリヌクレオチドが、以下の式のうちの1つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式 :

【化 6 】



、または



のうちの 1 つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、ここで、

R^2 および $R^1 R^2$ は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、
 $(CH_2)_n - R^{4-0}$ 、 $- (CH_2)_m - Ph - R^{4-0}$ 、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R^2 および $R^{1,2}$ は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、 $-(CH_2)_n-R^{4,0}$ 、 $-(CH_2)_m-Ph-R^{4,0}$ 、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、 R^2 および R^1 が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、 $R^{1,2}$ および $R^{1,3}$ が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アノモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち1つ以上を含み；

n は 1 ～ 6 の範囲の整数であり；

m は 0 または 1 であり；

R^{4 0} はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R^{1 0}、R^{1 6} および R^{1 9} は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R^{1 1}、R^{1 3}、R^{1 4}、R^{1 5}、R^{1 7}、R^{1 8}、R^{2 0} および R^{2 1} は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル(-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4-アミノピリジニウム(ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素で二置換される)、ヒドロキシメチル(-CH₂OH)、メトキシ(-OCH₃)、-ROH、チオメチル(-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO₂Ar)、スルホンアミド(-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド(-SOR)、アリールスルホキシド(-SOAr)、アミノ(-NH₂)、アンモニウム(-NH₃⁺)、アミド(-CONR₂)、ニトリル(-CN)、C₁～C₈アルコキシ(-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各 R は、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するよう構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するよう構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；で標識されたポリヌクレオチドである、方法。

【請求項 9】

前記平坦表面がアドレス可能なアレイである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

標的ポリヌクレオチドの存在を検出する方法であって、該方法は、以下：

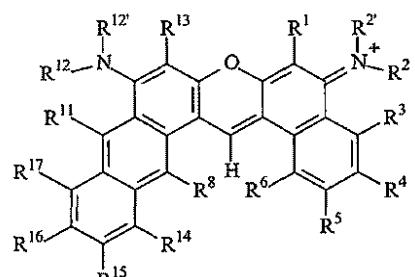
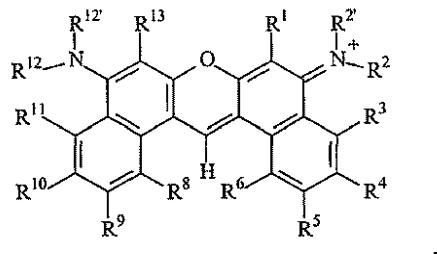
塩基対形成により標的ポリヌクレオチドを固定化プローブにハイブリダイズさせる工程；および

標的-プローブ複合体からの蛍光を検出する工程

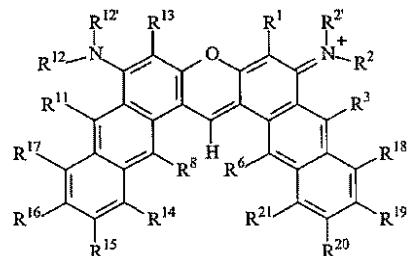
を包含し、ここで、該標的ポリヌクレオチドは、以下の式のうち 1 つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式：

【化 7】



、または



のうちの 1 つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、ここで、

R² および R^{1 2} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、 - (C_H₂)_n - R^{4 0}、 - (C_H₂)_m - Ph - R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R^{2'} および R^{1 2'} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、 - (C_H₂)_n - R^{4 0}、 - (C_H₂)_m - Ph - R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、R^{2'} および R¹ が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、R^{1 2'} および R^{1 3'} が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフ

チルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち1つ以上を含み；

nは1～6の範囲の整数であり；

mは0または1であり；

R⁴₀はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R¹₀、R¹₆およびR¹₉は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R¹₁、R¹₃、R¹₄、R¹₅、R¹₇、R¹₈、R²₀およびR²₁は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル(-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4-アミノピリジニウム(ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素で二置換される)、ヒドロキシメチル(-CH₂OH)、メトキシ(-OCH₃)、-ROH、チオメチル(-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ(-SAr)、アリールスルホン(-SO₂Ar)、スルホンアミド(-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド(-SOR)、アリールスルホキシド(-SOAr)、アミノ(-NH₂)、アンモニウム(-NH₃⁺)、アミド(-CONR₂)、ニトリル(-CN)、C₁～C₈アルコキシ(-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各Rは、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N-ヒドロキシスルホニミジルエステル、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するように構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該ポリヌクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；

で標識され、それにより、該固定化プローブにハイブリダイズした該標的ポリヌクレオチドの配列が推定される、方法。

【請求項 11】

前記標的ポリヌクレオチドの配列から前記固定化プローブの相補的配列を決定する工程をさらに包含する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記固定化プローブが、複数のプローブの固相アレイに固定化される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記標的ポリヌクレオチドが 5 ~ 40 個のモノマーヌクレオチド単位を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記標的ポリヌクレオチドが 2 ~ 1000 ヌクレオチドを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 15】

前記プライマー、前記ヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドが、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物または前記エネルギー移動色素で標識される場合、該プライマー、該ヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドは、プリン核酸塩基の 8 - C、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 7、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 8 またはピリミジン核酸塩基の 5 位で標識される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環が、スルホネートで置換される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

R²、R^{2'}、R^{1 2} および R^{1 2'} のうち少なくとも 1 つが、- (CH₂)_n - R^{4 0} または - (CH₂)_m - Ph - R^{4 0} であり、ここで、Ph はフェニレンであり、n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり、m は 0 または 1 であり、そして、R^{4 0} はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記プライマー、前記ヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドが前記スルホン化ジアリールローダミン化合物で標識される場合、前記 R^{4 0} カルボキシル部分は、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該プライマー、該ヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに結合する連結部分であるか、あるいは、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該プライマー、該ヌクレオチドまたは該ポリヌクレオチドに結合されたリンカーに結合する連結部分である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

前記プライマーまたは前記ヌクレオチドに連結された前記リンカー、および、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物の連結部分に連結された前記リンカーが、アルキニルリンカーである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記リンカーが、以下の式：

【化 8】



の構造を有し、ここで、n が 0、1 または 2 である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記プライマー、前記ヌクレオチドまたは前記ポリヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、該エネルギー移動色素は、結合、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有し、かつ 2 つの一価のラジカル中心を有する炭化水素基、または、C₆ ~ C₂₀ アリールジイルからなる群より選択されるリンカーによって、該プライマー、該ヌクレオチドまたは該ポリヌクレオ

チドに共有結合される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記プライマー、前記スクレオチドまたは前記ポリスクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、該エネルギー移動色素は、アルキニルリンカーによって該プライマー、該スクレオチドまたは該ポリスクレオチドに共有結合される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記リンカーが以下の式：

【化 9】



の構造を有し、ここで、n が 0、1 または 2 である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記プライマー、前記スクレオチドまたは前記ポリスクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物の前記 R^{4 0} カルボキシル部分は、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該プライマー、該スクレオチドまたは該ポリスクレオチドに結合する連結部分であるか、あるいは、該プライマー、該スクレオチドまたは該ポリスクレオチドに結合されたリンカーに該スルホン化ジアリールローダミン化合物を結合する連結部分である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R¹¹、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁷、R¹⁸、R²⁰ および R²¹ が水素である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

R¹ および R² が、これらが結合する原子と一緒にになって、4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し；そして、R¹² および R¹³ が、これらが結合する原子と一緒にになって、4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記第一および第二の環構造のうち一方または両方が 5 個の環原子を有する、請求項 26 に記載の方法。

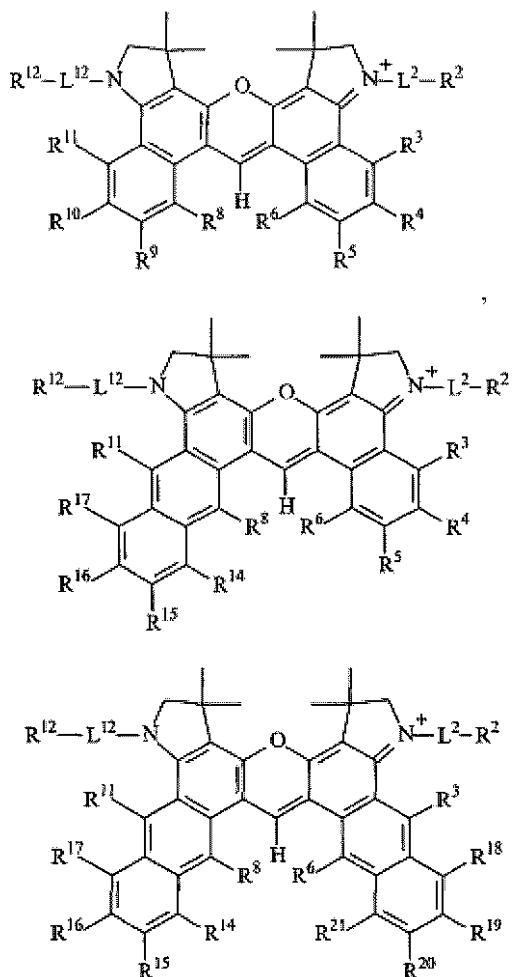
【請求項 28】

前記環構造が、1 つの gem 二置換炭素を含み、該 gem 置換基の各々が飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記スルホン化ジアリールローダミン化合物が、以下の式：

【化10】

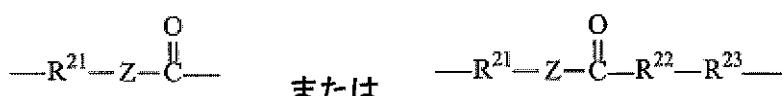


のうちの 1 つの構造を有し、ここで、 L^2 および L^{1-2} は、各々が独立して、 $-(CH_2)_n-R^{4-0}$ または $-(CH_2)_m-Ph-R^{4-0}$ から選択され、ここで、 Ph はフェニレンであり、 n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり、 m は 0 または 1 であり、そして、 R^{4-0} はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記エネルギー移動色素の前記ドナー色素および前記アクセプター色素を連結する前記リンカーが、以下の構造：

【化11】



を有し、ここで：

Z は、 NH 、 S および O からなる群より選択され；

R^{2-1} は、該ドナー色素に結合される、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素であり；

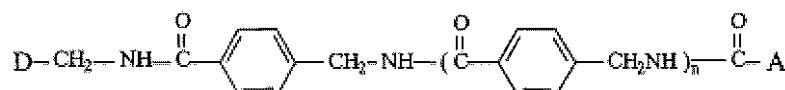
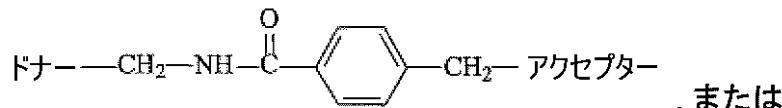
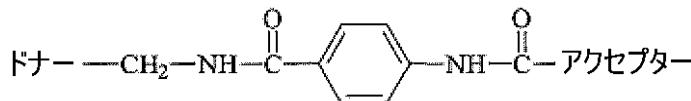
R^{2-2} は、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、5員環、少なくとも 1 つの不飽和結合を有する 6 員環、および該カルボニル炭素に結合される縮合環構造からなる群より選択される置換基であり；そして

R² R³ は、該リンカーを該アクセプター色素に結合する官能基を含む、方法。

【請求項 3 1】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記エネルギー移動色素が、以下の構造：

【化 1 2】



を有し、ここで、D はドナー色素であり、A はアクセプター色素であり、そして、n は 1 または 2 である、方法。

【請求項 3 2】

前記アクセプター色素が、スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、前記ドナー色素がシアニン、フタロシアニン、スクアライン、ボディピー、ベンゾフェノキサジン、フルオレセイン、ジベンゾローダミン、またはローダミン色素である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記アクセプター色素がスルホン化ジアリールローダミン化合物であり、前記ドナー色素が、該アクセプター色素に連結されたフルオレセインまたはローダミンである、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記酵素学的に組み込み可能なヌクレオチドを組み込む酵素がポリメラーゼである、請求項 1、6 または 7 に記載の方法。

【請求項 3 5】

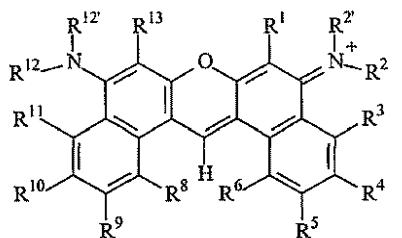
前記酵素学的に組み込み可能なヌクレオチドを組み込む酵素がリガーゼである、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 3 6】

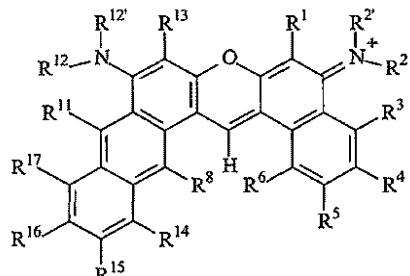
標識されたプライマー伸長産物を生成するためのキットであって、該キットは、1 以上の酵素学的に組み込み可能なヌクレオチドとプライマーとを含み、ここで、該プライマー、または該 1 以上の酵素学的に組み込み可能なヌクレオチドは、以下の式のうちの 1 つの構造を有する化合物：

(a) 以下の式：

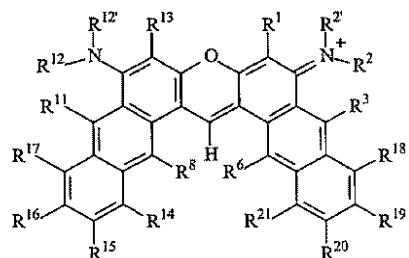
【化13】



,



, または



のうちの 1 つの構造を有するスルホン化ジアリールローダミン化合物であって、
ここで、

R² および R^{1 2} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、- (C_{H₂})_n - R^{4 0}、- (C_{H₂})_m - Ph - R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択され；

R^{2'} および R^{1 2'} は、各々が互いに独立して、水素、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素、- (C_{H₂})_n - R^{4 0}、- (C_{H₂})_m - Ph - R^{4 0}、フェニル、置換フェニル、ベンジル、置換ベンジル、ビフェニル、置換ビフェニル、ナフチル、置換ナフチル、複素環、置換複素環、水溶性基および連結部分から選択されるか、または、R^{2'} および R¹ が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第一の環構造を形成し、そして、R^{1 2'} および R^{1 3} が、これらが結合する原子と一緒にになって、必要に応じて置換された 4 ~ 7 個の環原子を有する第二の環構造を形成し；

ここで、該置換炭化水素、置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環は、ハロ、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素、スルフェート、スルホネート、スルホン、アミノ、アンモニウム、アミド、ニトリル、低級アルコキシ、フェノキシ、フェニル、多環式芳香族、複素環、水溶性基または連結部分のうち 1 つ以上を含み；

n は 1 ~ 6 の範囲の整数であり；

m は 0 または 1 であり；

R^{4 0} はスルホネートまたはカルボキシレートであり；

R⁴、R^{1 0}、R^{1 6} および R^{1 9} は各々がスルホネートであり；そして

R¹、R³、R⁵、R⁶、R⁸、R⁹、R¹¹、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁷、R¹⁸、R²⁰ および R²¹ は、各々が独立して、水素、フッ素、塩素、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 8 個の炭素原子を有する炭化水素、カルボキシレート、スルフェート、スルホネート、アルキルスルホネート、アミノメチル (-CH₂NH₂)、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する、アミノで置換された炭化水素、4 - アミノピリジニウム (ここで、アミノは、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素で二置換される)、ヒドロキシメチル (-CH₂OH)、メトキシ (-OCH₃)、-ROH、チオメチル (-CH₂SH)、-RSH、-SO₂R、アリールチオ (-SAr)、アリールスルホン (-SO₂Ar)、スルホンアミド (-SO₂NR₂)、アルキルスルホキシド (-SOR)、アリールスルホキシド (-SOAr)、アミノ (-NH₂)、アンモニウム (-NH₃⁺)、アミド (-CONR₂)、ニトリル (-CN)、C₁ ~ C₈ アルコキシ (-OR)、フェノキシ、フェノール類、トリル、フェニル、アリール、ベンジル、複素環、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリエチレンオキシ、水溶性基および連結部分から選択され；

ここで、各 R は、独立して、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する炭化水素であり；

ここで、各水溶性基は、独立して、カルボキシレート、スルホネート、ホスホネート、ホスフェート、第四級アミン、スルフェート、ポリヒドロキシルまたは水溶性ポリマーであり；

ここで、各連結部分は、独立して、アジド、一置換の第一級アミン、二置換の第二級アミン、チオール、ヒドロキシル、ハライド、エポキシド、N - ヒドロキシスルフィド、カルボキシル、イソチオシアネート、塩化スルホニル、スルホネートエステル、シリルハライド、クロロトリアジニル、スクシンイミジルエステル、ペントフルオロフェニルエステル、マレイミド、ハロアセチル、エポキシド、飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の 1 ~ 12 個の炭素原子を有する、ハライドで置換された炭化水素、アリルハライド、アルデヒド、アシルアジド、ヨードアセトアミドまたはホスホラミダイトであり；そして

ここで、該スルホン化ジアリールローダミン化合物は、リンカーを介して該プライマーまたは該スクレオチドに結合される、スルホン化ジアリールローダミン化合物；あるいは

(b) エネルギー移動色素であって、以下：

第一の波長において光を吸収し、かつそれに応答して励起エネルギーを放射するように構成された、ドナー色素；

該ドナー色素によって放射された該励起エネルギーを吸収し、かつそれに応答して第二の波長において蛍光を発するように構成された、アクセプター色素；および

該ドナー色素および該アクセプター色素を連結するための、リンカー、を含み、ここで、該ドナー色素またはアクセプター色素のうち少なくとも一方が該スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、該エネルギー移動色素は、該リンカーを介して該プライマーまたは該スクレオチドに結合される、エネルギー移動色素；で標識される、キット。

【請求項 37】

前記プライマーまたはスクレオチドが、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物または前記エネルギー移動色素で標識される場合、該プライマーまたはスクレオチドは、プリン核酸塩基の 8 - C、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 7、7 - デアザプリン核酸塩基の C - 8 またはピリミジン核酸塩基の 5 位で標識される、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 38】

前記置換フェニル、置換ベンジル、置換ビフェニル、置換ナフチルまたは置換複素環が、スルホネートで置換される、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 39】

R^2 、 $R^{2'}$ 、 $R^{1\ 2}$ および $R^{1\ 2'}$ のうち少なくとも1つが、 $-(CH_2)_n-R^{4\ 0}$ または $-(CH_2)_m-Ph-R^{4\ 0}$ であり、ここで、Phはフェニレンであり、nは1~6の範囲の整数であり、mは0または1であり、そして、 $R^{4\ 0}$ はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項36に記載のキット。

【請求項40】

前記プライマーまたは前記ヌクレオチドが前記スルホン化ジアリールローダミン化合物で標識される場合、前記 $R^{4\ 0}$ カルボキシル部分は、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該プライマーまたは該ヌクレオチドに結合する連結部分であるか、あるいは、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該プライマーまたは該ヌクレオチドに結合されたリンカーに結合する連結部分である、請求項39に記載のキット。

【請求項41】

前記プライマーまたは前記ヌクレオチドに連結された前記リンカー、および、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物の連結部分に連結された前記リンカーが、アルキニルリンカーである、請求項40に記載のキット。

【請求項42】

前記リンカーが、以下の式：

【化14】



の構造を有し、ここで、nが0、1または2である、請求項41に記載のキット。

【請求項43】

前記プライマーまたは前記ヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、該エネルギー移動色素は、結合、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の、分枝鎖、直鎖もしくは環式の1~12個の炭素原子を有し、かつ2つの一価のラジカル中心を有する炭化水素基、または、 C_6-C_{20} アリールジイルからなる群より選択されるリンカーによって、該プライマーまたは該ヌクレオチドに共有結合される、請求項36に記載のキット。

【請求項44】

前記プライマーまたは前記ヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、該エネルギー移動色素は、アルキニルリンカーによって該プライマーまたは該ヌクレオチドに共有結合される、請求項36に記載のキット。

【請求項45】

前記リンカーが以下の式：

【化15】



の構造を有し、ここで、nが0、1または2である、請求項44に記載のキット。

【請求項46】

前記プライマーまたは前記ヌクレオチドが前記エネルギー移動色素で標識される場合、前記スルホン化ジアリールローダミン化合物の前記 $R^{4\ 0}$ カルボキシル部分は、該スルホン化ジアリールローダミン化合物を該プライマーまたは該ヌクレオチドに結合する連結部分であるか、あるいは、該プライマーまたは該ヌクレオチドに結合されたリンカーに該スルホン化ジアリールローダミン化合物を結合する連結部分である、請求項36に記載のキット。

【請求項47】

R^1 、 R^3 、 R^5 、 R^6 、 R^8 、 R^9 、 $R^{1\ 1}$ 、 $R^{1\ 3}$ 、 $R^{1\ 4}$ 、 $R^{1\ 5}$ 、 $R^{1\ 7}$ 、 $R^{1\ 1}$

8、R²⁰およびR²¹が水素である、請求項36に記載のキット。

【請求項48】

R¹およびR²が、これらが結合する原子と一緒にになって、4～7個の環原子を有する第一の環構造を形成し；そして、R¹²およびR¹³が、これらが結合する原子と一緒にになって、4～7個の環原子を有する第二の環構造を形成する、請求項36に記載のキット。

【請求項49】

前記第一および第二の環構造のうち一方または両方が5個の環原子を有する、請求項48に記載のキット。

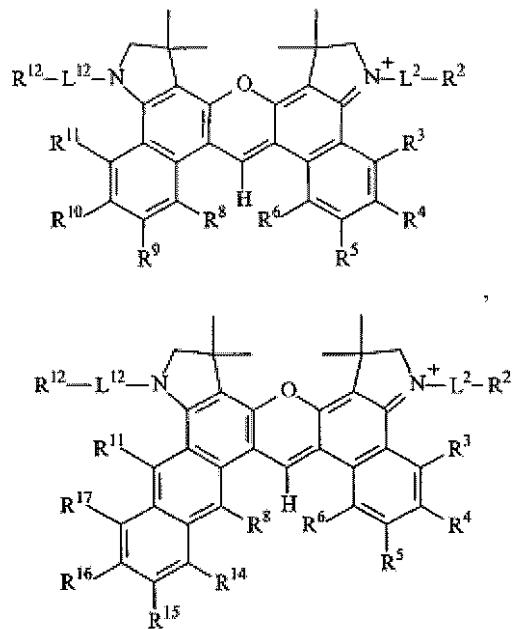
【請求項50】

前記環構造が、1つのgem二置換炭素を含み、該gem置換基の各々が飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～8個の炭素原子を有する炭化水素である、請求項49に記載のキット。

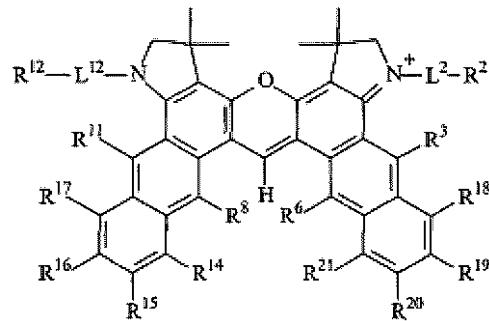
【請求項51】

前記スルホン化ジアリールローダミン化合物が、以下の式：

【化16】



, または

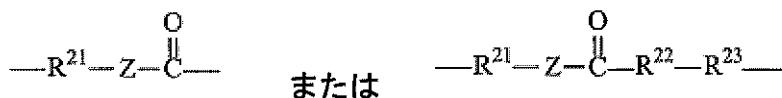


のうちの1つの構造を有し、ここで、L²およびL¹²は、各々が独立して、-(CH₂)_n-R⁴⁰または-(CH₂)_m-Ph-R⁴⁰から選択され、ここで、Phはフェニレンであり、nは1～6の範囲の整数であり、mは0または1であり、そして、R⁴⁰はスルホネートまたはカルボキシレートである、請求項36に記載のキット。

【請求項52】

請求項36に記載のキットであって、前記エネルギー移動色素の前記ドナー色素および前記アクセプター色素を連結する前記リンカーが、以下の構造：

【化17】



を有し、ここで：

Zは、N H、SおよびOからなる群より選択され；

R²¹は、該ドナー色素に結合される、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素であり；

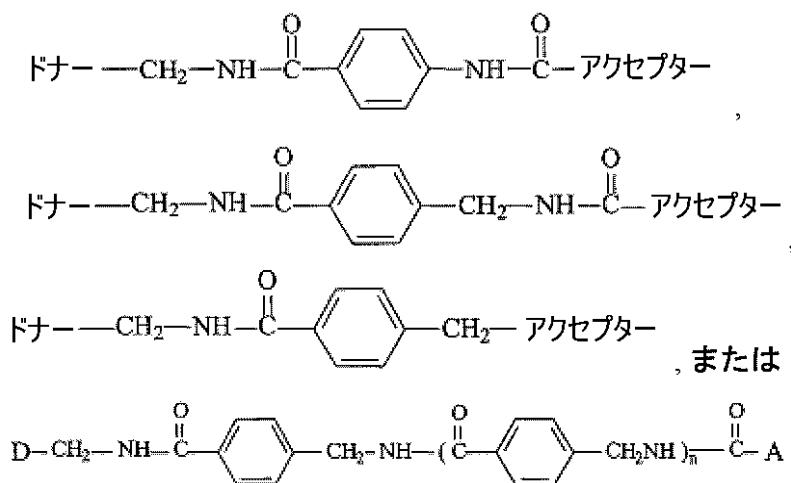
R²²は、必要に応じて置換された飽和もしくは不飽和の分枝鎖、直鎖もしくは環式の1～12個の炭素原子を有する炭化水素、5員環、少なくとも1つの不飽和結合を有する6員環、および該カルボニル炭素に結合される縮合環構造からなる群より選択される置換基であり；そして

R²³は、該リンカーを該アクセプター色素に結合する官能基を含む、キット。

【請求項53】

請求項36に記載のキットであって、前記エネルギー移動色素が、以下の構造：

【化18】



を有し、ここで、Dはドナー色素であり、Aはアクセプター色素であり、そして、nは1または2である、キット。

【請求項54】

前記アクセプター色素が、スルホン化ジアリールローダミン化合物であり、前記ドナー色素がシアニン、フタロシアニン、スクアライン、ボディピー、ベンゾフェノキサジン、フルオレセイン、ジベンゾローダミン、またはローダミン色素である、請求項36に記載のキット。

【請求項55】

前記アクセプター色素がスルホン化ジアリールローダミン化合物であり、前記ドナー色素が、該アクセプター色素に連結されたフルオレセインまたはローダミンである、請求項54に記載のキット。

【請求項56】

前記プライマーがエネルギー移動色素で標識される場合、前記ドナー色素が該プライマーの5'末端に連結される、請求項36に記載のキット。

【請求項57】

前記プライマーがスルホン化ジアリールローダミン化合物で標識される場合、該スルホン化ジアリールローダミン化合物が該プライマーの5'末端に連結される、請求項36に記

載のキット。

【請求項 5 8】

前記又クレオチドがエネルギー移動色素で標識される場合、前記ドナー色素が該又クレオチドに連結される、請求項 3 6 に記載のキット。

【請求項 5 9】

ポリメラーゼをさらに含む、請求項 3 6 に記載のキット。

【請求項 6 0】

リガーゼをさらに含む、請求項 3 6 に記載のキット。