(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 104854152 A
(43)申请公布日 2015.08.19

(21)申请号 201380065304.X
(22)申请日 2013.10.11
(30)优先权数据
61/713,329 2012.10.12 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.06.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/064658 2013.10.11
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/059352 EN 2014.04.17
(71)申请人 NVS技术股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 奥尔德里奇·N·K·劳
罗伯特·G·伊森
(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 安佳宁
(51)Int.Cl.
C08F 220/56(2006.01)
C08F 293/00(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

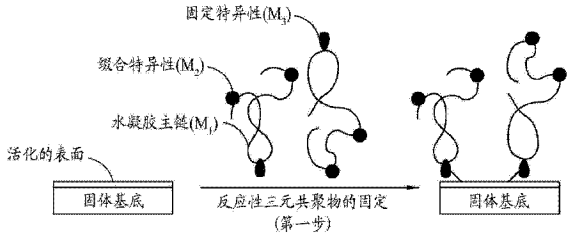
权利要求书24页 说明书56页 附图4页

(54)发明名称

具有正交反应基团的聚合物及其用途

(57)摘要

提供了具有正交反应基团的聚合物以及包含固定于其上的聚合物的固体支撑物。所述聚合物在许多应用中有实用性,包括使分析物分子固定于固体支撑物以用于高通量测定。



CN 104854152 A

1. 包含固定于固体基底外表面的聚合物的固体支撑物，其中所述聚合物包含 B 亚基、D 亚基和 E 亚基，其中：

所述 B 亚基每次出现时独立地包含亲水性官能团；

所述 D 亚基每次出现时独立地包含具有对与捕获探针的共价缀合特异的反应性的反应基团，或所述 D 亚基包含与捕获探针的共价键；以及

所述 E 亚基每次出现时独立地包含两种互补点击官能团的反应产物，其中所述反应产物包含与所述固体基底外表面的共价键或与在所述 E 亚基和所述固体基底外表面之间的任选连接物 (L^4) 的共价键。

2. 如权利要求 1 所述的固体支撑物，其中所述聚合物具有下列结构 (VI)：

$T^3-(B)_q(D)_r(E)_s-T^4$

(VI)

其中：

T^3和 T^4各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；以及

q、r 和 s 各自独立地为 1 至 350,000 的整数。

3. 如权利要求 1 或 2 中任一项所述的固体支撑物，其中所述反应产物通过炔、胺、烃基甲硅烷基 - 保护的炔、叠氮化物、腈、硫醇、烯、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶或硫杂丙环官能团与互补点击反应基团的反应形成。

4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的固体支撑物，其中至少一个 E 亚基位于所述聚合物的末端位置。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 E 亚基每次出现时独立地包含下列结构 (VI)：



(VI)

其中：

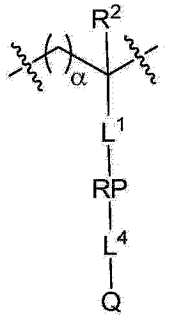
L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物；

RP 为所述反应产物；

L^4为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

Q 表示所述固体基底外表面。

6. 如权利要求 1-5 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 E 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (VII)：



(VII)

其中：

L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物；

RP 为所述反应产物；

L^4为任选的至多 100 个原子长度的连接物；

R^2为 H 或烃基；以及

Q 表示所述固体基底外表面。

7. 如权利要求 5 或 6 中任一项所述的固体支撑物，其中 L^1包含亚烃基、酯、醚或二硫代部分，或其组合。

8. 如权利要求 5 或 6 中任一项所述的固体支撑物，其中 L^1不存在。

9. 如权利要求 5-8 中任一项所述的固体支撑物，其中 α 为 1。

10. 如权利要求 5-9 中任一项所述的固体支撑物，其中 R^2为 H。

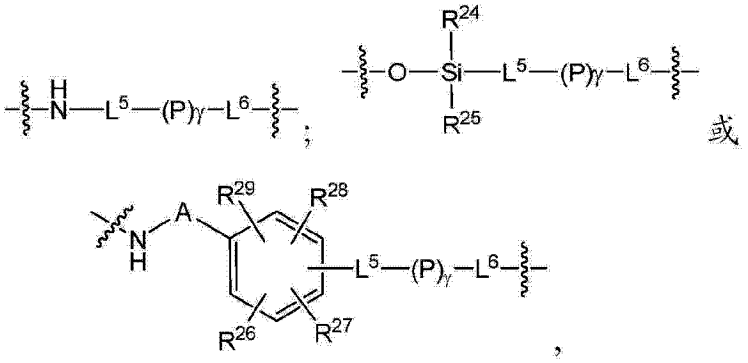
11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的固体支撑物，其中 L^4包含硅 - 氧键、亚烃基链、聚合物或其组合。

12. 如权利要求 11 所述的固体支撑物，其中所述聚合物为聚乙二醇。

13. 如权利要求 12 所述的固体支撑物，其中所述聚乙二醇包含 1 至 50,000 个单体亚基。

14. 如权利要求 13 所述的固体支撑物，其中所述聚乙二醇包含 55 至 90 个单体亚基。

15. 如权利要求 1-14 中任一项所述的固体支撑物，其中 L^4具有下列结构中的一种：



其中：

L^5和 L^6各自独立地为任选的包含亚烃基、烯化氧、酰亚胺、醚、酯或酰胺部分或其组合的连接物；

R^{24}和 R^{25}各自独立地为 H、羟基、烃基、烃氧基或 -OQ，其中 Q 为所述固体基底外表面；

R^{26}、R^{27}、R^{28}和 R^{29}各自独立地为 H、烃基、卤素、腈、硝基或铵；

P 表示聚合物亚基；

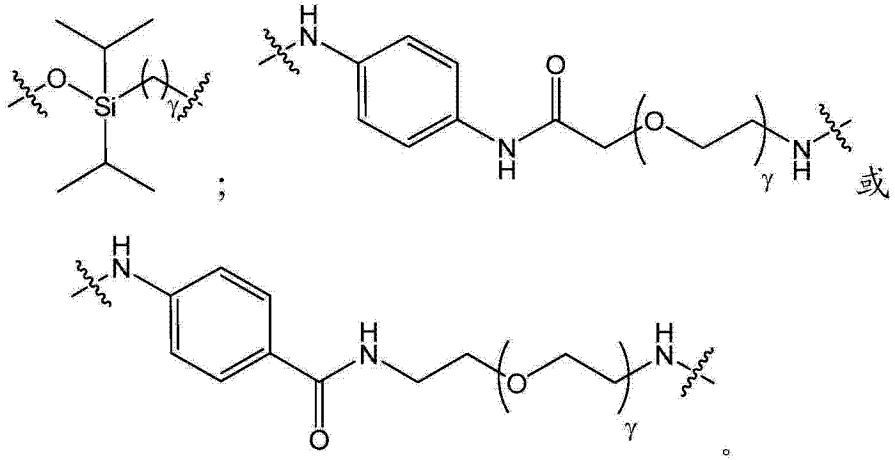
A 为直接键或 $-S(O)_2-$；以及

γ 为 1 至 2000 的整数，

其中 L^4通过末端氮原子或氧原子结合至所述固体基底。

16. 如权利要求 15 所述的固体支撑物，其中 P 为 $-CH_2-$ 或 $-OCH_2CH_2-$。

17. 如权利要求 15 所述的固体支撑物，其中 L^4具有下列结构中的一种：



或

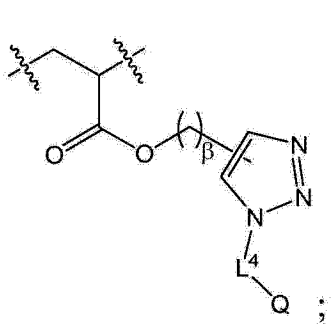
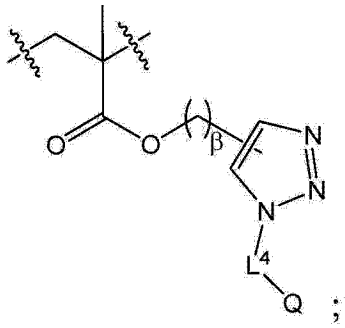
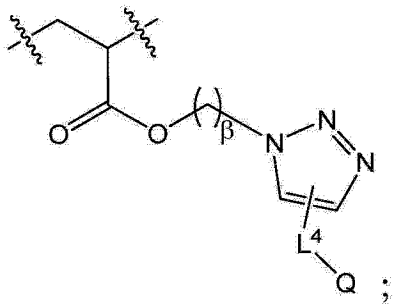
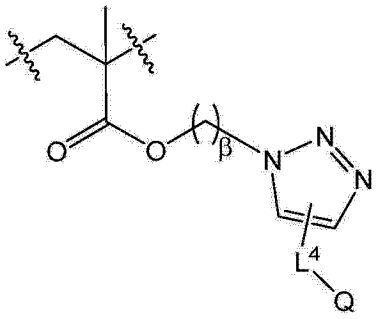
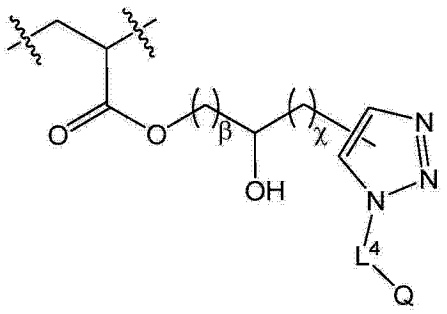
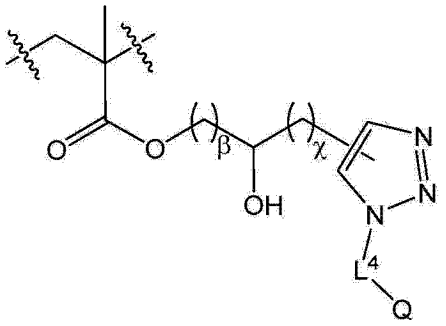
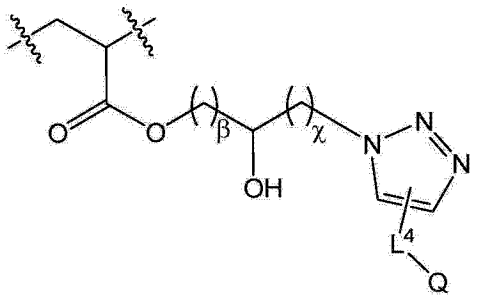
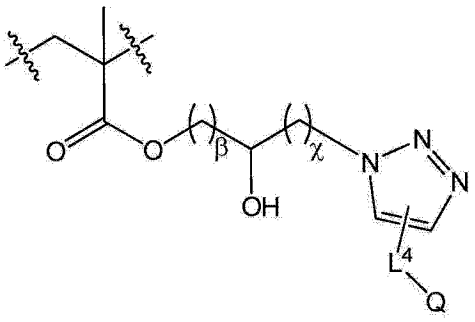
。

18. 如权利要求 17 所述的固体支撑物，其中 γ 为 1 至 90。

19. 如权利要求 1-10 中任一项所述的固体支撑物，其中 L^4不存在。

20. 如权利要求 1-19 中任一项所述的固体支撑物，其中所述反应产物为三唑。

21. 如权利要求 1-20 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 E 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

其中：

β 和 x 各自独立地为 1 至 5 的整数；

L^4为任选的连接物；以及

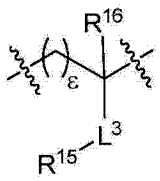
Q 表示所述固体基底。

22. 如权利要求 1-21 中任一项所述的固体支撑物，其中至少一个 E 亚基位于共价结合至 T^4的末端位置处。

23. 如权利要求 22 所述的固体支撑物，其中 T^4为 H。

24. 如权利要求 21 所述的固体支撑物，其中 L^4包含一个或多个聚乙二醇重复单元。

25. 如权利要求 1-24 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 B 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (V)：



(V)

其中：

R^{15}为所述亲水性官能团；

R^{16}为氢或烃基；

L^3为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

ε 为 0 至 10 的整数。

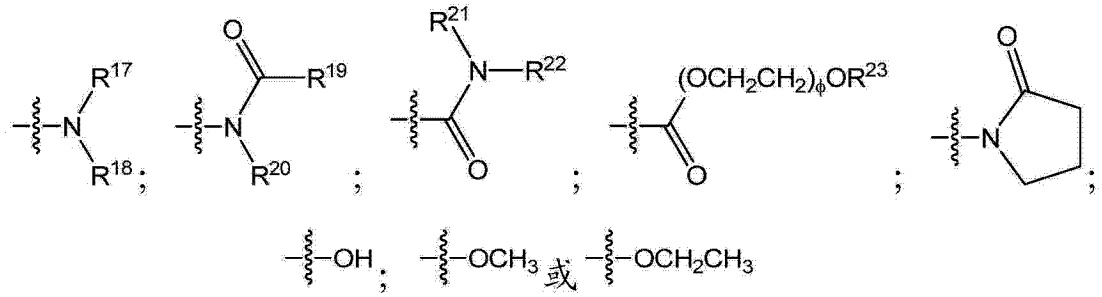
26. 如权利要求 25 所述的固体支撑物，其中 L^3包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。

27. 如权利要求 25 所述的固体支撑物，其中 L^3不存在。

28. 如权利要求 25-27 中任一项所述的固体支撑物，其中 ε 为 1。

29. 如权利要求 25-28 中任一项所述的固体支撑物，其中 R^{16}为 H。

30. 如权利要求 1-29 中任一项所述的固体支撑物，其中 R^{15}每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



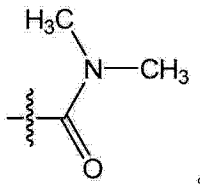
其中：

R^{17}、R^{18}、R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}和 R^{23}各自独立地为 H、烃基或羟基烃基；以及

Φ 为 1 至 200 的整数。

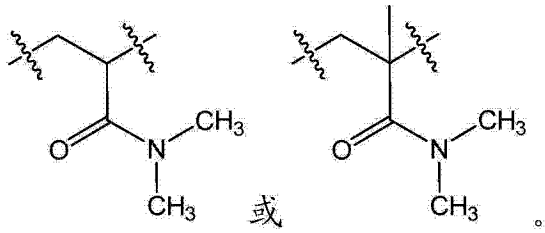
31. 如权利要求 30 所述的固体支撑物，其中 R^{17}、R^{18}、R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}和 R^{23}各自独立地为 H 或甲基。

32. 如权利要求 1-31 中任一项所述的固体支撑物，其中至少一种 R^{15}具有下列结构：



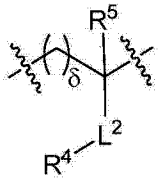
。

33. 如权利要求 1-32 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 B 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



。

34. 如权利要求 1-33 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (IV)：



(IV)

其中：

R^4为第二反应基团；

R^5为氢或烃基；

L^2为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

δ 为 0 至 10 的整数。

35. 如权利要求 34 所述的固体支撑物，其中 L^2包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。

36. 如权利要求 34 所述的固体支撑物，其中 L^2不存在。

37. 如权利要求 34-36 中任一项所述的固体支撑物，其中 δ 为 1。

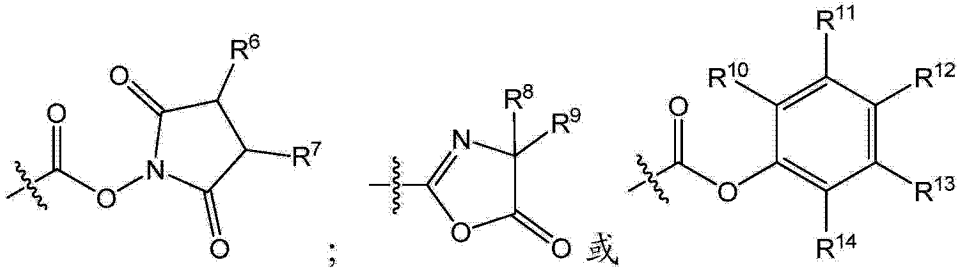
38. 如权利要求 34-37 中任一项所述的固体支撑物，其中 R^5为 H。

39. 如权利要求 1-38 中任一项所述的固体支撑物，其中所述反应基团每次出现时独立地具有对与所述捕获探针中的胺基团形成共价键特异的反应性。

40. 如权利要求 1-39 中任一项所述的固体支撑物，其中所述反应基团每次出现时独立地为 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯、N- 羟基硫代琥珀酰亚胺 (硫代 -NHS) 酯、乙酰硫代醋酸琥珀酰亚胺酯 (SATA)、碳化二亚胺、羟基甲基膦、马来酰亚胺、芳基酯、亚氨酸酯、异氰酸酯、补骨脂素、乙烯砜、吡啶基二硫化物、吖内酯或二苯甲酮。

41. 如权利要求 40 所述的固体支撑物，其中所述反应基团每次出现时独立地为 NHS 酯、吖内酯或芳基酯。

42. 如权利要求 41 所述的固体支撑物，其中所述反应基团每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



其中：

R^6、R^7、R^8和 R^9各自独立地为 H 或烃基；以及

R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}和 R^{14}各自独立地为 H、吸电子基团、-NCS、-NCO、$-CO_2H$、$-SO_3H$、-L′ - 多聚物或其盐，其中 L′ 为任选的至多 100 个原子长度的连接物并且多聚物为水溶性聚合物。

43. 如权利要求 42 所述的固体支撑物，其中 R^6、R^7、R^8和 R^9均为 H。

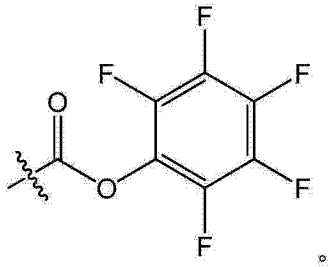
44. 如权利要求 43 所述的固体支撑物，其中 R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或 R^{14}中的至少一个为吸电子基团。

45. 如权利要求 44 所述的固体支撑物，其中 R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或 R^{14}均为吸电子基团。

46. 如权利要求 44-45 中任一项所述的固体支撑物，其中所述吸电子基团为卤素、硝基或腈。

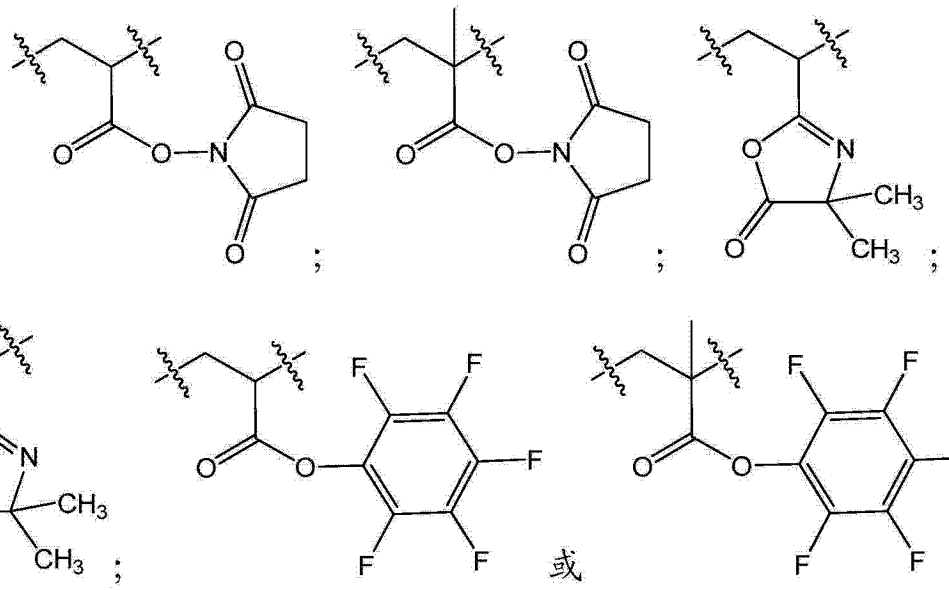
47. 如权利要求 46 所述的固体支撑物，其中所述吸电子基团为氟。

48. 如权利要求 47 所述的固体支撑物，其中所述第二反应基团具有下列结构：



。

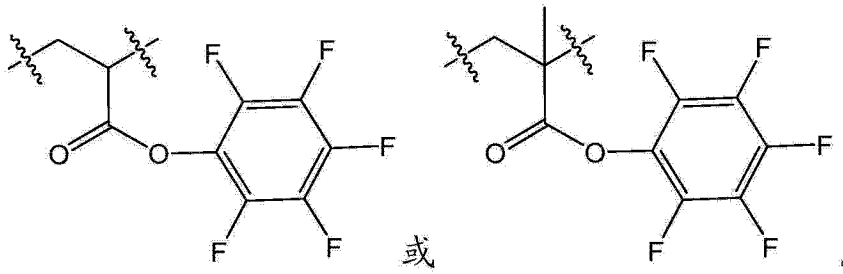
49. 如权利要求 1-48 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



；或

。

50. 如权利要求 49 所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



。

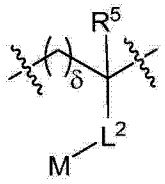
51. 如权利要求 42 所述的固体支撑物，其中多聚物为聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚（二甲基丙烯酰胺）、聚（丙烯酸）、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚（甲基乙烯基醚）、聚（乙基乙烯基醚）、聚 (N- 乙烯基甲酰胺）、聚 (N- 乙烯基乙酰胺）或聚 (N- 甲基 -N- 乙烯基乙酰胺）。

52. 如权利要求 1-51 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基位于共价结合至 T^2 的末端位置处。

53. 如权利要求 52 所述的固体支撑物，其中 T^2 为 H。

54. 如权利要求 1-33 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基包含与捕获探针的共价键。

55. 如权利要求 54 所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (VIII)：



(VIII)

其中：

M 为所述捕获探针；

R^5 为氢或烃基；

L^2 为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

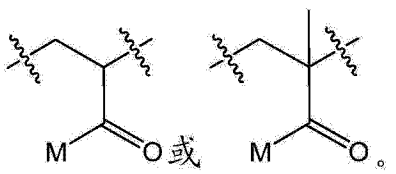
δ 为 0 至 10 的整数。

56. 如权利要求 55 所述的固体支撑物，其中 L^2 包含亚烃基、酯、羰基、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。

57. 如权利要求 55 或 56 中任一项所述的固体支撑物，其中 δ 为 1。

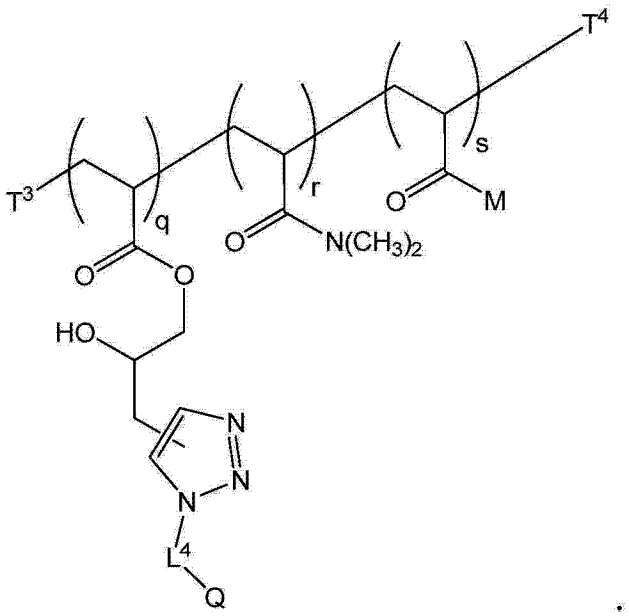
58. 如权利要求 55-57 中任一项所述的固体支撑物，其中 R^5 为 H。

59. 如权利要求 57-58 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基每次出现时独立地具有下列结构：

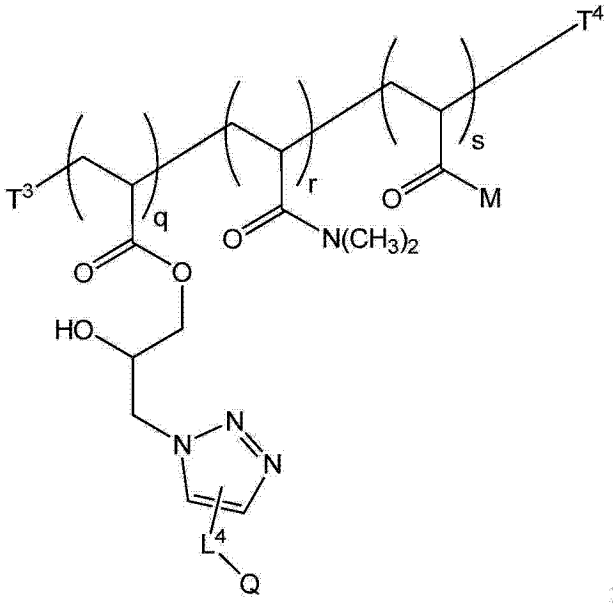


。

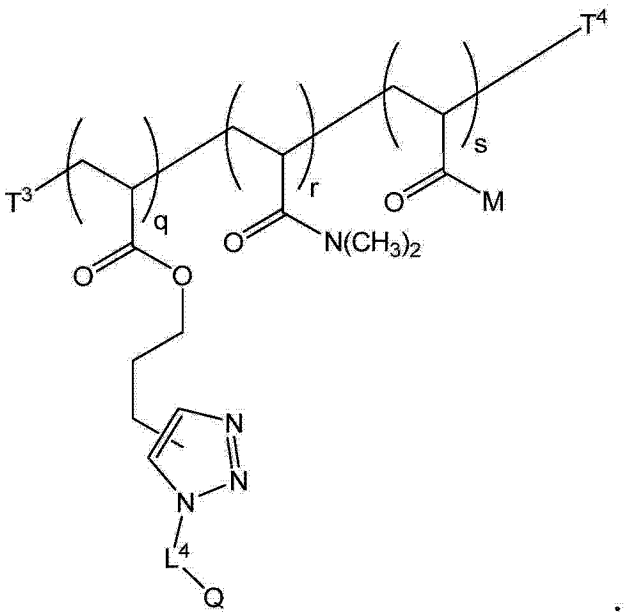
60. 如权利要求 1-59 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体支撑物的表面具有下列结构中的一种：


T4
T3
q
r
s
O
M
O
N(CH3)2
O
O
HO
N
N
N
L4
Q

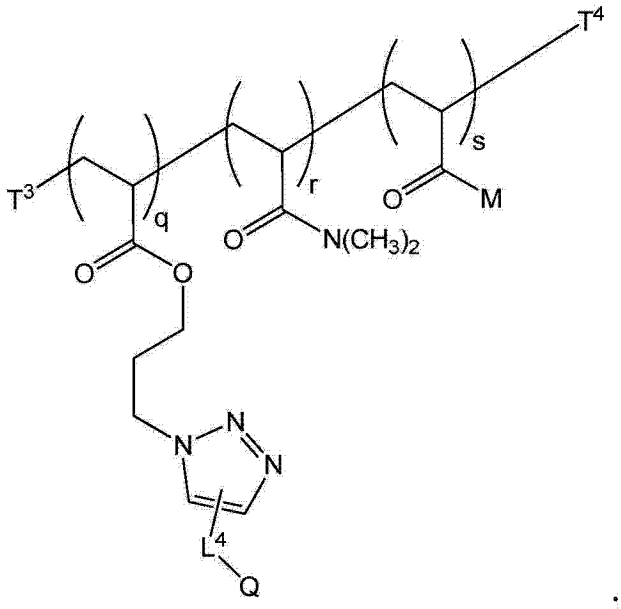
;


T4
T3
q
r
s
O
M
O
N(CH3)2
O
O
HO
N
N
N
L4
Q

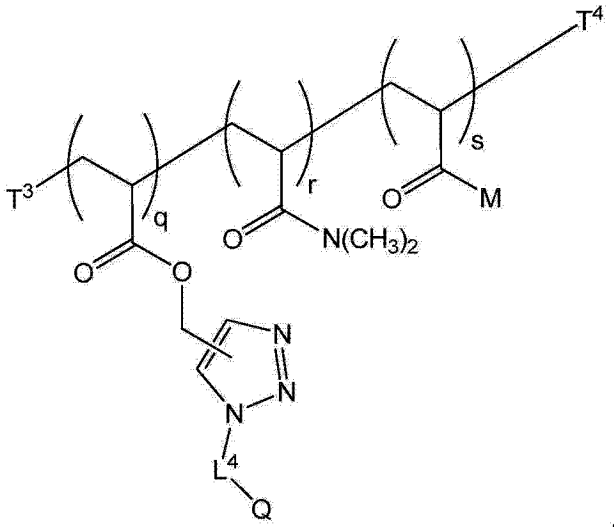
;


T4
T3
q
r
s
O
M
O
N(CH3)2
O
O
N
N
N
L4
Q

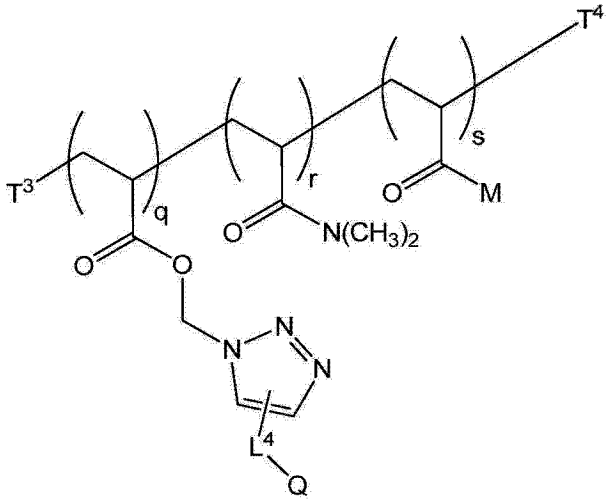
;


T4
T3
q
r
s
O
M
O
N(CH3)2
O
O
N
N
N
L4
Q

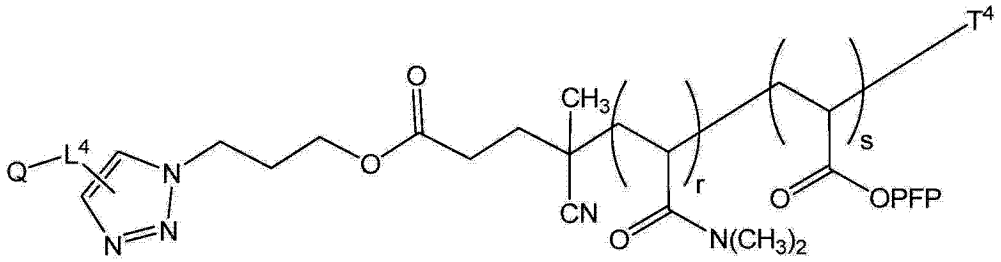
;



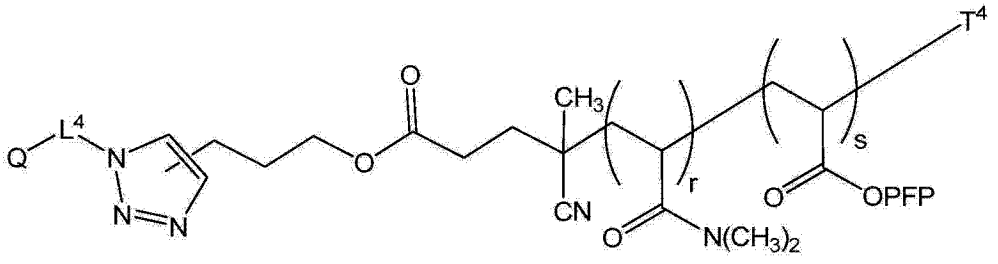
;



;



或



，

其中：

所述 B、D 和 E 亚基在聚合物中存在至少一次；

T^3和 T^4各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；

q、r 和 s 各自独立地为 1 至 350,000 的整数；

L^4为任选的连接物；

M 表示所述捕获探针；以及

Q 表示所述固体基底外表面。

61. 如权利要求 60 所述的固体支撑物，其中 L^4为在权利要求 11-18 中任一项中所定义的。

62. 如权利要求 54-61 中任一项所述的固体支撑物，其中所述捕获探针通过氮原子共价结合至所述 D 亚基。

63. 如权利要求 54-62 中任一项所述的固体支撑物，其中所述捕获探针为肽、蛋白质、碳水化合物、多核苷酸、寡核苷酸或多肽。

64. 如权利要求 63 所述的固体支撑物，其中所述捕获探针为多核苷酸。

65. 如权利要求 64 所述的固体支撑物，其中所述捕获探针为 DNA。

66. 如权利要求 1-65 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体支撑物具有 50° 至 90° 的水接触角。

67. 如权利要求 1-66 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体支撑物包含有机聚合物。

68. 如权利要求 67 所述的固体支撑物，其中所述固体基底包含聚（苯乙烯）、聚（碳酸酯）、聚（醚砜）、聚（酮）、聚（脂族醚）、聚（芳基醚）、聚（酰胺）、聚（酰亚胺）、聚（酯）、聚（丙烯酸酯）、聚（甲基丙烯酸酯）、聚（烯烃）、聚（环烯烃）、聚（乙烯醇）或其共聚物、卤化衍生物或交联的衍生物。

69. 如权利要求 68 所述的固体支撑物，其中所述卤化衍生物为卤化聚（芳基醚）、卤化聚（烯烃）或卤化聚（环烯烃）。

70. 如权利要求 68 所述的固体支撑物，其中所述固体基底包含环聚（烯烃）。

71. 如权利要求 1-66 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体基底包含氧化物。

72. 如权利要求 71 所述的固体支撑物，其中所述固体基底包含硅、熔融二氧化硅、玻璃、石英、氧化铟锡、二氧化钛、氧化铝或其组合。

73. 如权利要求 1-66 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体基底包含有机聚合物，其中所述固体支撑物包含具有粘附至其上的氧化层的外表面。

74. 如权利要求 1-73 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体基底为基本上光学透明的。

75. 如权利要求 1-74 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体基底在约 400nm 至约 800nm 之间为基本上光学透明的。

76. 如权利要求 1-75 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体基底为至少约 90％光学透明的。

77. 如权利要求 1-76 中任一项所述的固体支撑物，其中所述固体支撑物包含不同位置的系统阵列，每个不同位置独立地包含缀合至其上的至少一种所述聚合物。

78. 如权利要求 77 所述的固体支撑物，其中每个不同位置独立地包含缀合至其上的多种所述聚合物。

79. 如权利要求 77-78 中任一项所述的固体支撑物，其中在每个不同位置处的至少一

种聚合物包含通过 D 亚基共价结合至其上的捕获探针。

80. 如权利要求 77-79 中任一项所述的固体支撑物，其中每个不同位置包含结合至其上的至少一种捕获探针，其中所述捕获探针在结构上不同于在每一个其他不同位置处结合的至少一种捕获探针。

81. 如权利要求 77 所述的固体支撑物，其中每个不同位置包含结合至其上的多种结构上不同的分析物分子。

82. 如权利要求 77-80 中任一项所述的固体支撑物，其中所述捕获探针为肽、蛋白质、碳水化合物、多核苷酸、寡核苷酸、寡肽或多肽。

83. 如权利要求 82 所述的固体支撑物，其中所述捕获探针为多核苷酸。

84. 如权利要求 83 所述的固体支撑物，其中所述捕获探针为 DNA。

85. 如权利要求 83 或 84 中任一项所述的固体支撑物，其中所述多核苷酸或 DNA 包含与靶多核苷酸或 DNA 的序列互补的序列。

86. 包含 A 亚基、B 亚基和 C 亚基的聚合物，其中：

所述 A 亚基每次出现时独立地包含具有对与固体基底上的靶官能团形成共价键特异的反应性的第一反应基团；

所述 B 亚基每次出现时独立地包含亲水性官能团；以及

所述 C 亚基每次出现时独立地包含具有对与捕获探针的共价缀合特异的反应性的第二反应基团，

其中所述第一反应基团和所述第二反应基团的所述反应性相互正交。

87. 如权利要求 86 所述的聚合物，其中所述聚合物具有下列结构 (I)：

$T^1-(A)_x(B)_y(C)_z-T^2$

(I)

其中：

T^1 和 T^2 各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；以及

x、y 和 z 独立地为 1 至 350,000 的整数。

88. 如权利要求 86 或 87 所述的聚合物，其中所述聚合物包含位于所述聚合物末端位置处的 A 亚基。

89. 如权利要求 86-88 中任一项所述的聚合物，其中所述第一反应基团每次出现时独立地具有点击反应性。

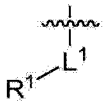
90. 如权利要求 89 所述的聚合物，其中所述第一反应基团每次出现时独立地对与叠氮化物的反应特异。

91. 如权利要求 90 所述的聚合物，其中所述第一反应基团每次出现时独立地为炔。

92. 如权利要求 89 所述的聚合物，其中所述第一反应基团每次出现时独立地对与炔的反应特异。

93. 如权利要求 92 所述的聚合物，其中所述第一反应基团每次出现时独立地为叠氮化物。

94. 如权利要求 86-93 中任一项所述的聚合物，其中所述 A 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (II)：



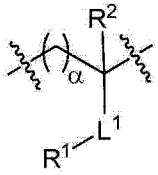
(II)

其中：

R^1为所述第一反应基团；以及

L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物。

95. 如权利要求 86-94 中任一项所述的聚合物，其中所述 A 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (III)：



(III)

其中：

R^1为所述第一反应基团；

R^2为氢或烃基；

L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

α 为 0 至 10 的整数。

96. 如权利要求 94 或 95 中任一项所述的聚合物，其中 L^1包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。

97. 如权利要求 94 或 95 中任一项所述的聚合物，其中 L^1不存在。

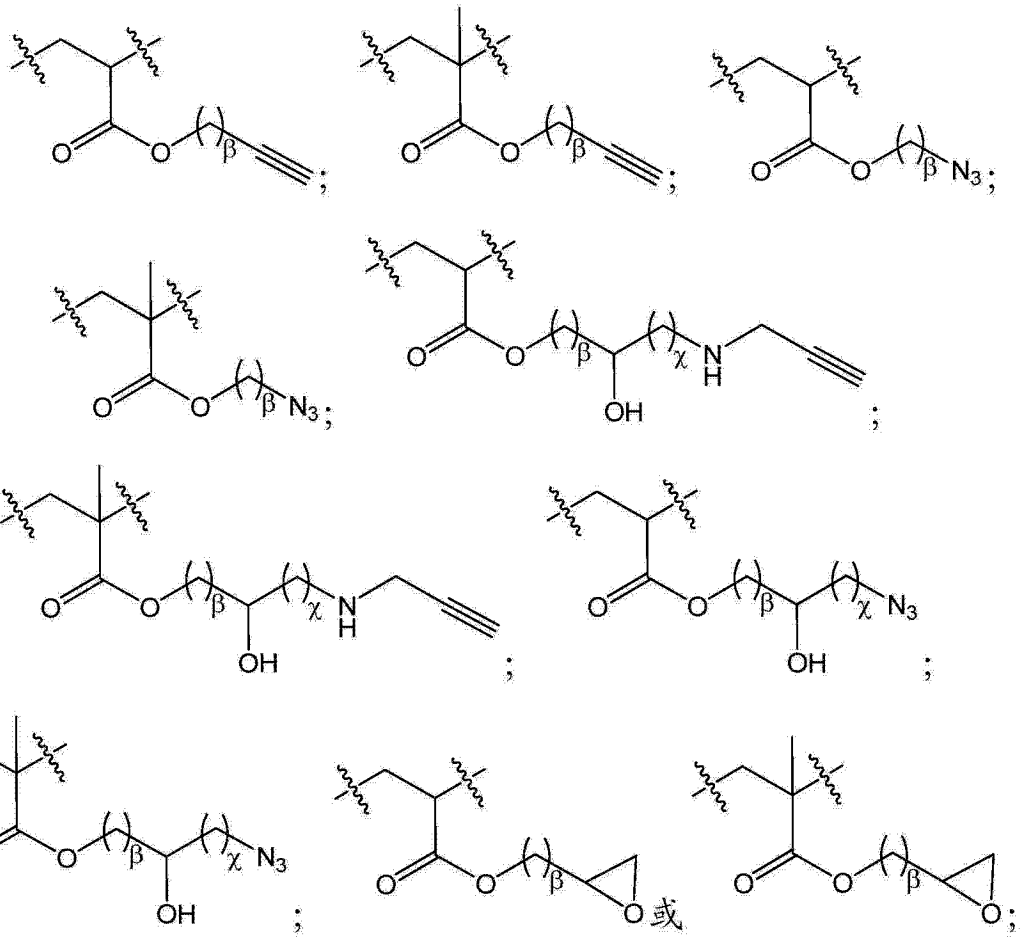
98. 如权利要求 95-97 中任一项所述的聚合物，其中 α 为 1。

99. 如权利要求 95-98 中任一项所述的聚合物，其中 R^2为 H。

100. 如权利要求 94-99 中任一项所述的聚合物，其中 R^1为炔、烃基甲硅烷基 - 保护的炔、叠氮化物、腈、硫醇、烯、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶或硫杂丙环官能团。

101. 如权利要求 94-99 中任一项所述的聚合物，其中 R^1为炔或叠氮化物官能团。

102. 如权利要求 86-101 中任一项所述的聚合物，其中所述 A 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

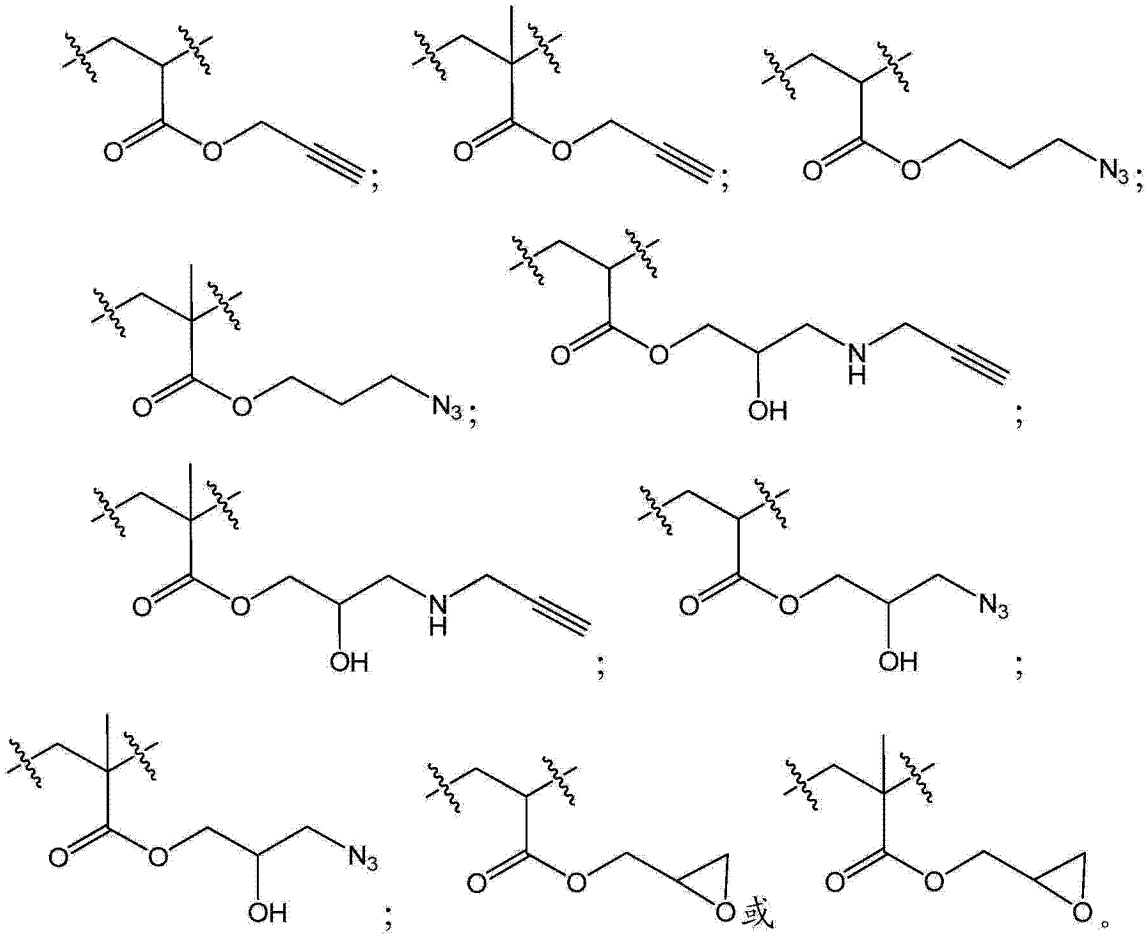


其中 β 和 x 各自独立地为 1 至 5 的整数。

103. 如权利要求 102 所述的聚合物，其中 β 为 1 或 3。

104. 如权利要求 102 所述的聚合物，其中 x 为 1。

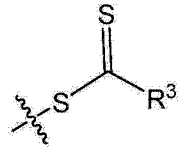
105. 如权利要求 102 所述的聚合物，其中所述 A 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



106. 如权利要求 86-105 中任一项所述的聚合物，其中至少一种所述 A 亚基位于共价结合至 T^1 的末端位置处。

107. 如权利要求 106 所述的聚合物，其中 T^1 为 H。

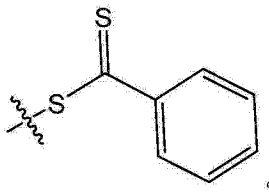
108. 如权利要求 86-88 中任一项所述的聚合物，其中所述 A 亚基每次出现时独立地具有下列结构：



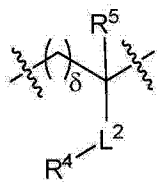
其中：

R^3 为芳基。

109. 如权利要求 108 所述的聚合物，其中所述 A 亚基具有下列结构：



110. 如权利要求 86-109 中任一项所述的聚合物，其中所述 C 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (IV)：



(IV)

其中：

R^4为所述第二反应基团；

R^5为氢或烃基；

L^2为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

δ 为 0 至 10 的整数。

111. 如权利要求 110 所述的聚合物，其中 L^2包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。

112. 如权利要求 110 所述的聚合物，其中 L^2不存在。

113. 如权利要求 110-112 中任一项所述的聚合物，其中 δ 为 1。

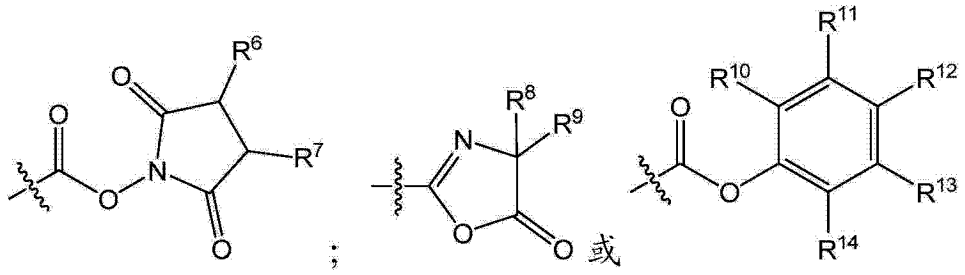
114. 如权利要求 110-113 中任一项所述的聚合物，其中 R^5为 H。

115. 如权利要求 86-114 中任一项所述的聚合物，其中所述第二反应基团的所述反应性每次出现时独立地对所述捕获探针中的胺基团特异。

116. 如权利要求 86-115 中任一项所述的聚合物，其中所述第二反应基团每次出现时独立地为 N- 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯、N- 羟基硫代琥珀酰亚胺 (硫代 -NHS) 酯、乙酰硫代醋酸琥珀酰亚胺酯 (SATA)、碳化二亚胺、羟基甲基膦、马来酰亚胺、芳基酯、亚氨酸酯、异氰酸酯、补骨脂素、乙烯砜、吡啶基二硫化物、吖内酯或二苯甲酮。

117. 如权利要求 116 所述的聚合物，其中所述第二反应基团每次出现时独立地为 NHS 酯、吖内酯或芳基酯。

118. 如权利要求 117 所述的聚合物，其中所述第二反应基团每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



其中：

R^6、R^7、R^8和 R^9各自独立地为 H 或烃基；以及

R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}和 R^{14}各自独立地为 H、吸电子基团、-NCS、-NCO、$-CO_2H$、$-SO_3H$、-L′ - 多聚物或其盐，其中 L′ 为任选的至多 100 个原子长度的连接物并且多聚物为水溶性聚合物。

119. 如权利要求 118 所述的聚合物，其中 R^6、R^7、R^8和 R^9均为 H。

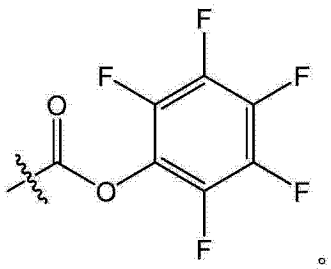
120. 如权利要求 118-119 中任一项所述的聚合物，其中 R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或 R^{14}中的至少一个为吸电子基团。

121. 如权利要求 120 所述的聚合物，其中 R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或 R^{14}均为吸电子基团。

122. 如权利要求 118-121 中任一项所述的聚合物，其中所述吸电子基团为卤素、硝基或腈。

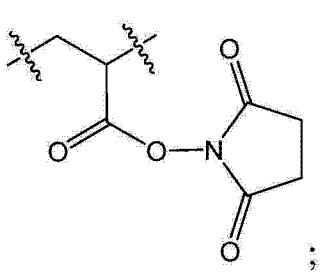
123. 如权利要求 122 所述的聚合物，其中所述吸电子基团为氟。

124. 如权利要求 123 所述的聚合物，其中所述第二反应基团具有下列结构：

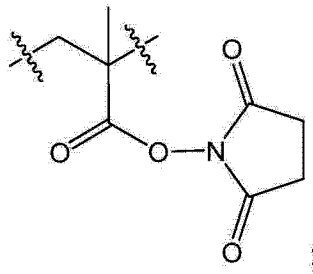


。

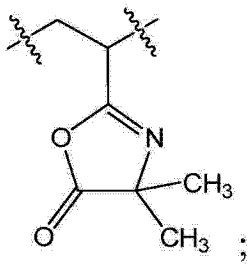
125. 如权利要求 86-124 中任一项所述的聚合物，其中所述 C 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



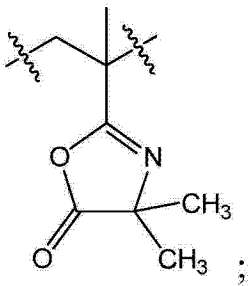
；



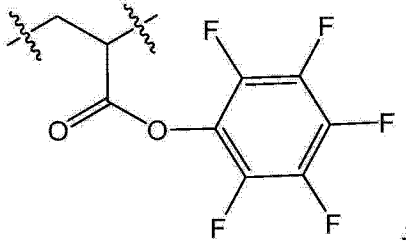
；



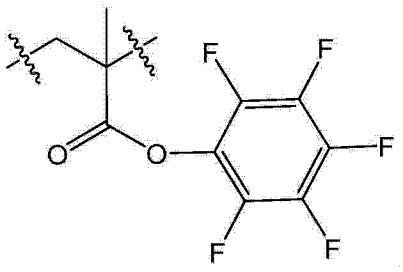
；



；

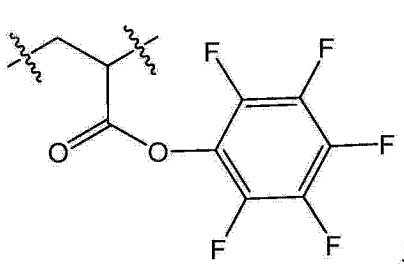


或

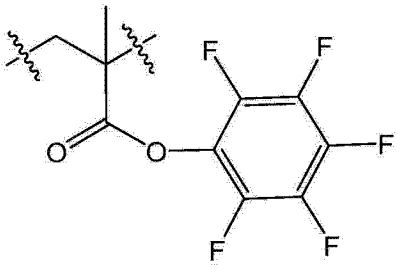


。

126. 如权利要求 125 所述的聚合物，其中所述 C 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



或



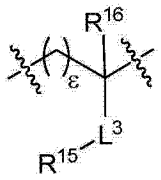
。

127. 如权利要求 118 所述的聚合物，其中多聚物为聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚（二甲基丙烯酰胺）、聚（丙烯酸）、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚（甲基乙烯基醚）、聚（乙基乙烯基醚）、聚 (N- 乙烯基甲酰胺)，聚 (N- 乙烯基乙酰胺）或聚 (N- 甲基 -N- 乙烯基乙酰胺)。

128. 如权利要求 86-127 中任一项所述的聚合物，其中至少一个 C 亚基位于共价结合至 T^2的末端位置处。

129. 如权利要求 128 所述的聚合物，其中 T^2 为 H。

130. 如权利要求 86-127 中任一项所述的聚合物，其中所述 B 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (V)：



(V)

其中：

R^{15} 为所述亲水性官能团；

R^{16} 为氢或烃基；

L^3 为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

ε 为 0 至 10 的整数。

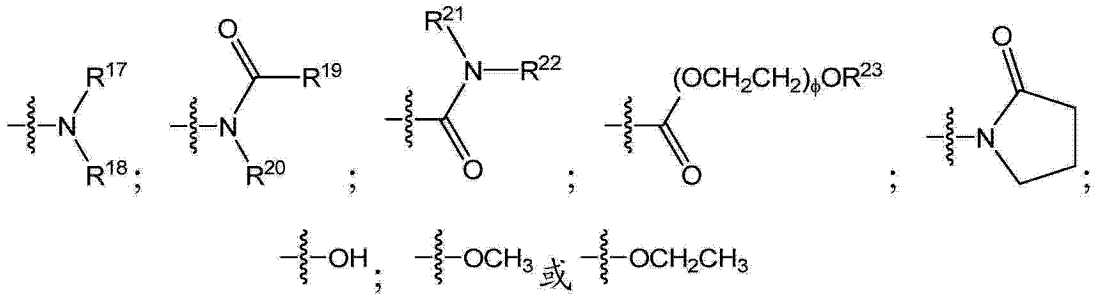
131. 如权利要求 130 所述的聚合物，其中 L^3 包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。

132. 如权利要求 130 所述的聚合物，其中 L^3 不存在。

133. 如权利要求 130-132 中任一项所述的聚合物，其中 ε 为 1。

134. 如权利要求 130-133 中任一项所述的聚合物，其中 R^{16} 为 H。

135. 如权利要求 86-134 中任一项所述的聚合物，其中所述亲水性官能团每次出现时独立地具有下列结构中的一种：



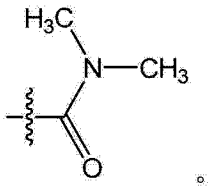
其中：

R^{17}、R^{18}、R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22} 和 R^{23} 各自独立地为 H、烃基或羟基烃基；以及

Φ 为 1 至 200 的整数。

136. 如权利要求 135 所述的聚合物，其中 R^{17}、R^{18}、R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22} 和 R^{23} 各自独立地为 H 或甲基。

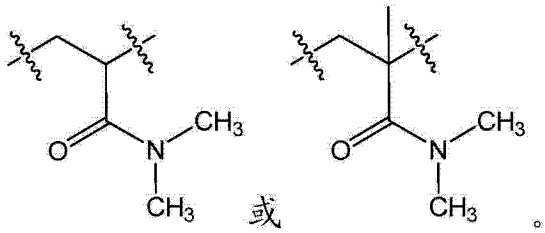
137. 如权利要求 135 所述的聚合物，其中所述亲水性官能团具有下列结构：



。

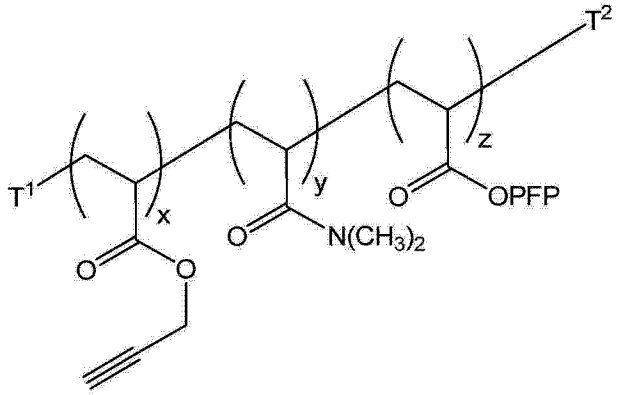
138. 如权利要求 86-137 中任一项所述的聚合物，其中所述 B 亚基每次出现时独立地具

有下列结构中的一种：

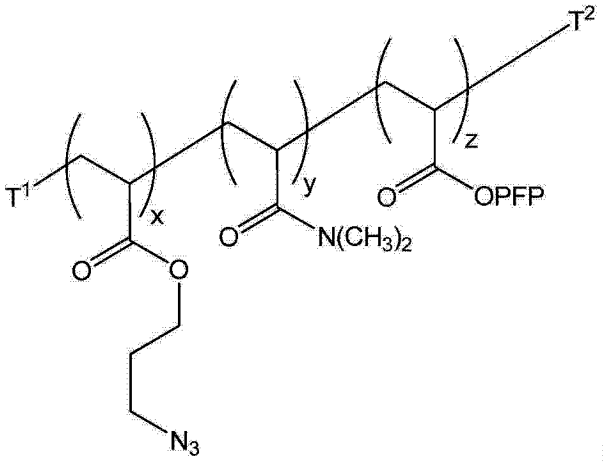


。

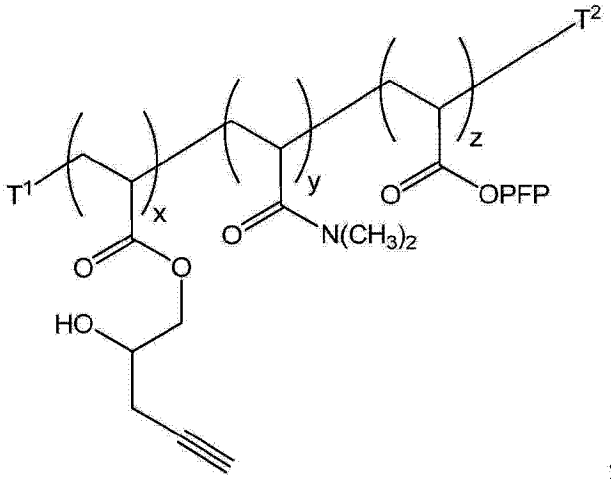
139. 如权利要求 86 所述的聚合物，其中所述聚合物具有下列结构中的一种：



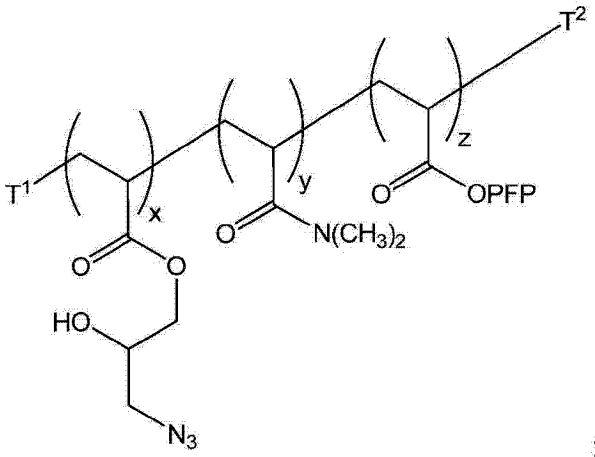
；



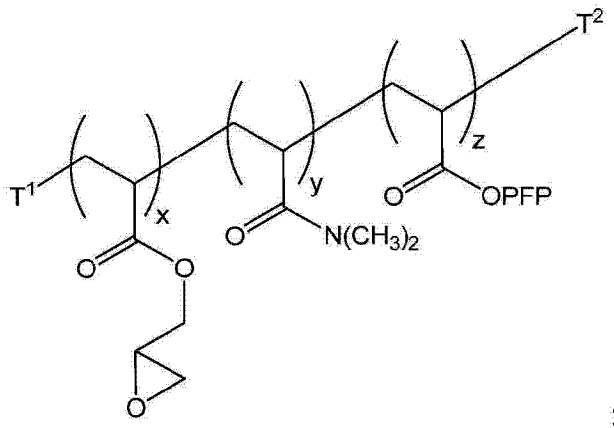
；


T2
T1
x
y
z
O
OPFP
N(CH3)2
HO

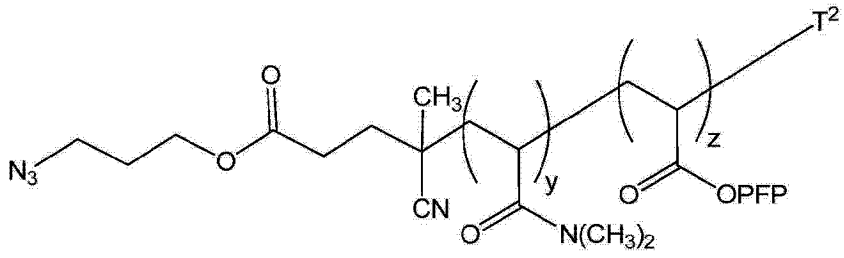
;


T2
T1
x
y
z
O
OPFP
N(CH3)2
HO
N3

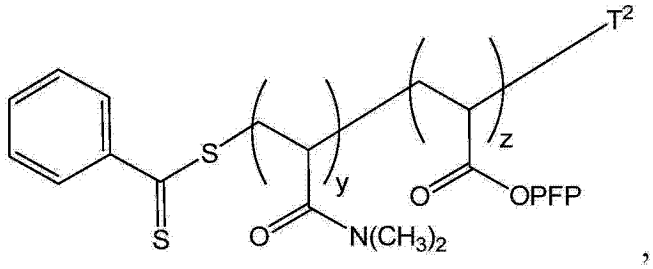
;


T2
T1
x
y
z
O
OPFP
N(CH3)2

;


T2
N3
O
CH3
CN
y
z
OPFP
N(CH3)2

；或



，

其中：

A、B 和 C 亚基在聚合物中存在至少一次；

OPFP 表示五氟苯氧基；

T^1和 T^2各自独立地不存在或为选自于 H 和烃基的聚合物末端基团；

x、y 和 z 各自独立地为 1 至 350,000 的整数。

140. 如权利要求 86-139 中任一项所述的聚合物，其中在所述聚合物中至少 30％的亚基为 B 亚基。

141. 如权利要求 86-140 中任一项所述的聚合物，其中在所述聚合物中至少 75％的亚基为 B 亚基。

142. 如权利要求 86-141 中任一项所述的聚合物，其中在所述聚合物中至少 90％的亚基为 B 亚基。

143. 如权利要求 86-142 中任一项所述的聚合物，其中在所述聚合物中至少 95％的亚基为 B 亚基。

144. 如权利要求 86-143 中任一项所述的聚合物，其中所述聚合物只包含一种 A 亚基。

145. 如权利要求 144 所述的聚合物，其中所述 A 亚基位于所述聚合物的末端。

146. 如权利要求 86-145 中任一项所述的聚合物，其中所述捕获探针为多核苷酸、寡核苷酸、肽、多肽或碳水化合物。

147. 如权利要求 146 所述的聚合物，其中所述捕获探针为多核苷酸。

148. 如权利要求 147 所述的聚合物，其中所述捕获探针为 DNA。

149. 包含外表面的固体基底，其中所述固体基底包含共价结合至所述外表面的叠氮化物或炔部分。

150. 如权利要求 149 所述的固体基底，其中所述固体基底具有下列结构中的一种：



其中：

Q 表示所述固体基底的外表面；

L^4为任选的连接物；

以及 ι 为 0 至 10 的整数。

151. 如权利要求 150 所述的固体基底，其中 L^4存在。

152. 如权利要求 150 所述的固体基底，其中 L^4为在如权利要求 11-18 中任一项中所定义的。

153. 如权利要求 149-152 中任一项所述的固体基底，其中 ι 为 1、2 或 3。

154. 制备具有结合至其上的捕获探针的固体支撑物的方法，所述方法包括使权利要求

149-153 中任一项所述的固体支撑物与权利要求 86-148 中任一项所述的聚合物接触以得到包含结合至其上的聚合物的固体支撑物。

155. 如权利要求 154 所述的方法，还包括使 Cu(I) 催化剂与权利要求 149-153 中任一项所述的固体支撑物和权利要求 86-148 中任一项所述的聚合物接触。

156. 如权利要求 154 或 155 中任一项所述的方法，还包括使具有胺官能团的捕获探针与包含结合至其上的聚合物的所述固体支撑物接触。

157. 测定靶分析物分子存在或不存在的方法，所述方法包括：

a) 提供权利要求 1-85 中任一项所述的固体支撑物，其中所述 D 亚基包含共价结合至其上的捕获探针；

b) 使分析物探针与所述固体支撑物接触；以及

c) 检测由所述捕获探针与所述分析物探针的相互作用产生的信号的存在或不存在。

158. 如权利要求 157 所述的方法，其中所述固体支撑物为权利要求 54-65 中任一项所述的固体支撑物。

159. 如权利要求 157 或 158 中任一项所述的方法，其中所述捕获探针为多核苷酸。

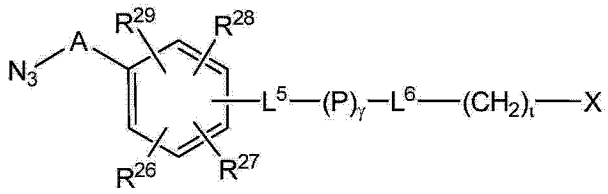
160. 如权利要求 157-159 中任一项所述的方法，其中所述靶分析物分子为多核苷酸。

161. 如权利要求 157-160 中任一项所述的方法，其中所述信号为荧光信号。

162. 如权利要求 161 所述的方法，其中所述荧光信号是由所述分析物探针与捕获探针的特异性杂交产生的。

163. 如权利要求 157-162 中任一项所述的方法，其中所述分析物探针包含荧光团或荧光团淬灭剂。

164. 具有下列结构 (IX) 化合物：



(IX)

其中：

X 为叠氮化物或炔部分；

L^5和 L^6各自独立地为包含亚烃基、烯化氧、酰亚胺、醚、酯或酰胺部分或其组合的任选的连接物；

R^{26}、R^{27}、R^{28}和 R^{29}各自独立地为 H、烃基、卤素、腈、硝基或铵；

P 为 $-(OCH_2CH_2)-$ 或 $-(CH_2)-$；

A 为直接键或 $-S(O)_2-$；

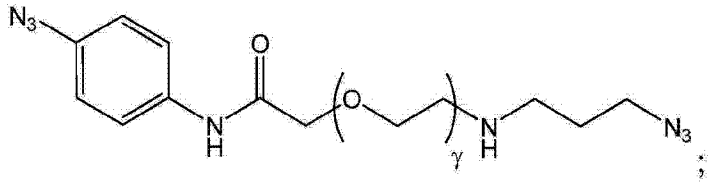
ι 为 0 至 10 的整数；以及

γ 为 1 至 2000 的整数。

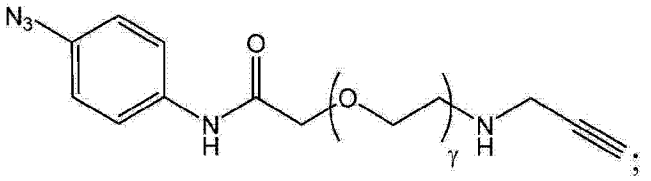
165. 如权利要求 164 所述的化合物，其中 R^{26}、R^{27}、R^{28}和 R^{29}均为 H。

166. 如权利要求 164 或 165 中任一项所述的化合物，其中 A 为直接键。

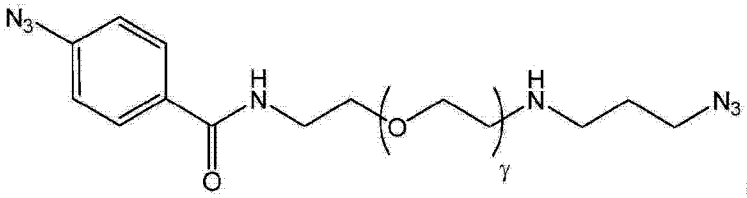
167. 如权利要求 164 所述的化合物，其中所述化合物具有下列结构中的一种：



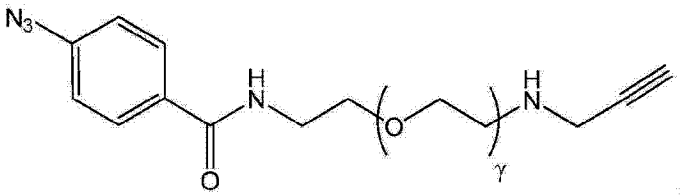
;



;



或



。

168. 如权利要求 167 所述的化合物，其中 γ 为 1 至 90。

具有正交反应基团的聚合物及其用途

[0001] 政府利益声明

[0002] 本文所描述的工作的部分资金是由美国国土安全部根据资助号HSHQDC-10-C-00053提供的。美国政府拥有此发明的某些权利。

[0003] 背景

发明领域

[0004] 本发明通常涉及新颖的聚合物、包含该聚合物的固体支撑物及其使用方法。

[0005] 相关技术的描述

[0006] 生物测定用于探测生物样品中的分析物质的存在和/或数量。在基于表面的测定中，例如DNA微阵列，通常在固体支撑物或固体基底上获取和检测分析物种类。由于同时监控大量基因的能力，DNA微阵列的使用在基因表达和基因型分型的研究中已被广泛采用(Schena等，Science 270:467-470(1995)；Pollack等，Nat.Genet.23:41-46(1999))。为了促进以阵列形式的多种生物测定，也可用其他结合部分例如碳水化合物、抗体、蛋白质、半抗原或适体来制造表面阵列。

[0007] 用于生物测定应用的有效的官能化材料必须具有足够的能力从相关样品固定足量的分析物，从而当经受检测（例如，聚合酶链式反应）时提供合适的信号。为了将其有利地应用于图谱表征实验中，合适的官能化材料还必须提供高度可再现的表面，特别是在其中样品和对照必须在它们所结合的不同支撑物表面上进行分析的测定形式，例如，在不同的支撑物或在相同的支撑物上的不同位置。例如，当进行测定（例如，图谱表征对比）时由于支撑物之间或在相同支撑物上的不同位置的差异，未基于高度可再现的表面化学的支撑物可导致显著误差。

[0008] 通过利用聚合物制备出表面阵列（例如，“DNA芯片”）以使分析物连接在固体支撑物上。一般而言，包含聚合物的阵列通过前体单体或预聚合物在固体基底（例如珠、颗粒、板等）上的原位聚合形成。包含有机聚合物的阵列的选择性和再现性经常高度取决于许多实验变量，包括单体浓度、单体比率、引发剂类型和浓度、溶剂蒸发速率、环境湿度（在溶剂为水时的情况下）、交联剂类型和浓度、单体/交联剂/溶剂的纯度、实验室温度、移液时间、喷射条件、反应温度（在热聚合的情况下）、反应湿度、紫外线辐射的均匀性（在UV光聚合的情况下）和环境氧气条件。虽然在生产设定中可以控制上述参数中的很多种，但是即使可能也难以控制所有的上述参数。因此，原位聚合导致从点-到-点，从芯片-到-芯片，从批次-到-批次的相对较差的再现性。另外，残余的单体/交联剂/引发剂以及副产品需要额外的不容易实施的纯化步骤。

[0009] 此外，虽然在使用二氧化硅基基底（例如玻璃、石英、熔融二氧化硅和硅）的阵列表面的开发上已耗费大量的工作（参见例如，D.Cuschin等，Anal.Biochem.1997,250,203-211；G.M.Harbers等，Chem.Mater.2007,19,4405-4414；和Shi等的第6,790,613号美国专利，Boles等的第5,932,711号美国专利，Bardhan等的第6,994,972号美国专利，Frutos等的第7,781,203美国专利和Lewis等的第7,217,512和7,541,146号美国专利），

但是从使用比较便宜的、更容易生产的基底（例如聚合物基底）中取得了某些优点。然而，选择和制备用于生物测定目的的此类基底遇到了额外的挑战。例如，聚合物基底不但经受将原位聚合的涂层与位于下方的聚合物基底连接或结合的挑战，而且要经常经受由于额外的表面官能化（例如增加的自动荧光、增加的疏水性）带来的严重的问题。

[0010] 因此，虽然在本领域中取得到了进步，但是本领域仍然对改善的官能化固体基底、聚合物，使分析物与用于多种测定例如 DNA 微阵列的这些固体基底和包含此类聚合物的固体支撑物连接的方法存在需求。本发明满足了该需求并提供了进一步的相关优点。

[0011] 发明概述

[0012] 简而言之，本发明通常涉及具有正交反应基团的聚合物。该聚合物在许多应用（包括使捕获探针固定于固体基底以用于分析测定）中获得实用性。提供了包含适于与该聚合物反应或相互作用的反应基团的固体基底，和包含该聚合物和任选捕获探针的固体支撑物。本文所公开的聚合物、固体基底和固体支撑物可用于多种分析应用中，例如用于个人医疗状况点（医生办公室、急救室、家庭、在野外等）、高通量测试和其他应用的 DNA 和蛋白质微阵列中。

[0013] 本文所描述的聚合物、固体基底、固体支撑物和相关方法在多个的实施方案中提供了许多优点。例如，除了在固定反应期间提供的特定条件下之外，在某些实施方案中本文所描述的使聚合物固定于固体基底上的反应基团基本上为惰性的，确保在表面涂层过程中反应性的可预测和最佳水平。一些实施方案还利用点击化学使聚合物固定在固体基底上，并且这种化学基本上为 pH- 不敏感并生产出有限的反应副产品或无反应副产品。在利用具有点击反应性的官能团通过点击化学使聚合物与捕获探针（例如，生物分子例如 DNA 或寡核苷酸）缀合的某些实施方案中获得相关的优点。

[0014] 因为聚合物包含正交反应基团从而实现进一步优点。例如，聚合物的实施方案包括这样的聚合物，其具有一个或多个对聚合物固定于固体基底（“固定基团”）特异的反应基团和一个或多个对缀合至捕获探针（“缀合基团”）例如多核苷酸或抗体特异的官能团。因此，只有一种类型的反应基团可以在阵列点样期间与捕获探针反应（例如，胺 - 改性生物分子）。存在于聚合物 - 涂覆的表面上的任何未反应的固定基团（例如，第一反应基团）在用于缀合的条件下为惰性的并且不会影响生物测定性能。本发明的某些实施方案还利用几乎为定量的和几乎瞬时（数分钟）的偶联反应，而以前的方法由于竞争性水解可耗费几个小时且仅可偶联一部分反应基团。

[0015] 在一实施方案中，提供了聚合物，该聚合物包含 A 亚基、B 亚基和 C 亚基，其中：

[0016] A 亚基每次出现时独立地包含具有对与靶官能团反应特异的反应性的第一反应基团；

[0017] B 亚基每次出现时独立地包含亲水性官能团；以及

[0018] C 亚基每次出现时独立地包含具有对与捕获探针的共价缀合特异的反应性的第二反应基团，

[0019] 其中所述第一反应基团和第二反应基团的反应性为相互正交。

[0020] 靶官能团可为位于固体基底的外表面和 / 或内表面的官能团，例如在多孔整料的表面。

[0021] 在另一实施方案中，本发明提供了包含固定于固体基底上的聚合物的固体支撑

物，其中该聚合物包含 B 亚基、D 亚基和 E 亚基，其中：

[0022] B 亚基每次出现时独立地包含亲水性官能团；

[0023] D 亚基每次出现时独立地包含具有对与捕获探针的共价缀合特异的反应性的反应基团，或 D 亚基包含与捕获探针的共价键；以及

[0024] E 亚基每次出现时独立地包含点击官能团和与固体基底的共价键或与设置于 D 亚基和固体基底之间的任选连接物 (L^4) 的共价键。

[0025] 还提供了包含用于使聚合物固定至其上的反应基团的固体基底、制备此类固体支撑物的化合物（例如，聚合物）和方法以及相关分析方法。

[0026] 通过参考下列详细描述，本发明的上述方面和其他方面是显而易见的。为此，本文示出了多篇参考文献，其更详细地描述了某些背景信息、过程、化合物和 / 或组合物，并每一篇在此通过引用整体并入本文中。

[0027] 附图简要描述

[0028] 在附图中，同一参考编号确定为相似元件。在附图中不必按比例绘制元件的尺寸和相对位置，并且任意增大或定位一些上述元件以提高附图的易读性。进一步地，所绘制的元件的特定形状并不意图传达关于特定元件的实际形状的任何信息，并仅选择其用于在附图中易于识别。

[0029] 图 1 为将生物分子固定于本发明实施方案的固体支撑物表面上的示意图。

[0030] 图 2A、2B 和 2C 说明了示例方法。

[0031] 发明详述

[0032] 在下列描述中，为了提供对本发明多种实施方案的充分理解，提出了某些具体细节。然而，本领域技术人员应理解不需要上述细节也可实施本发明。

[0033] 除非上下文另有要求，否则在整个说明书和权利要求中，将词语“包括 (comprise)”和其变型，例如，“包括 (comprises)”和“包含 (comprising)”解释为开放的、包含的意义，即作为“包括，但不限于”。

[0034] 在通篇说明书中参考“一 (one) 实施方案”或“一 (an) 实施方案”是指结合实施方案所描述的具体的特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此，在通篇说明书不同的地方出现的短语“在一 (one) 实施方案中”或“在一 (an) 实施方案中”并不必所有都指相同的实施方案。而且，具体的特征、结构或特性可以在一个或多个实施方案中以任何合适的方式组合。

[0035] “氨基”是指 $-NH_2$ 基。

[0036] “氰基”是指 -CN 基。

[0037] “羟基”或“羟基 (hydroxyl)”是指 -OH 基。

[0038] “亚氨基”是指＝ NH 取代基。

[0039] “硝基”是指 $-NO_2$ 基。

[0040] “氧代”是指＝ O 取代基。

[0041] “硫代”是指＝ S 取代基。

[0042] “烃基”是指仅仅由碳原子和氢原子组成的直链或直链烃链基，其是饱和的或不饱和的（也就是，包含一个或多个双键和 / 或三键），含有 1 到 12 个碳原子 (C_1-C_{12} 烃基），优选 1 到 8 个碳原子 (C_1-C_8 烃基）或 1 到 6 个碳原子 (C_1-C_6 烃基），并且其通过单键连接于分

子的其余部分，例如，甲基、乙基、正丙基、1- 甲基乙基（异 - 丙基）、正丁基、正戊基、1,1- 二甲基乙基（叔丁基）、3- 甲基己基、2- 甲基己基、乙烯基、丙 -1- 烯基、丁 -1- 烯基、戊 -1- 烯基、戊 -1,4- 二烯基、乙炔基、丙炔基、丁炔基，戊炔基、己炔基等。除非在说明书中另有具体说明，否则烃基基团可被任选取代。

[0043] “亚烃基”或“亚烃基链”是指连接分子的其余部分与根基基团的直链或直链二价烃链，仅由碳和氢组成，其为饱和的或不饱和的（也就是，包含一个或多个双键和 / 或三键），以及含有 1 到 12 个碳原子，例如，亚甲基、亚乙基、亚丙基、正亚丁基、亚乙烯基、亚丙烯基、正 - 亚丁烯基、亚丙炔基、正亚丁炔基等。亚烃基链通过单键或双键连接于分子的其余部分并通过单键或双键连接于根基基团。亚烃基链与分子的其余部分和基团的连接点可以为通过链内的一个碳或任意两个碳。除非在说明书中另有具体说明，否则亚烃基链可被任选取代。

[0044] “烃氧基”是指式 $-OR_a$ 的根基其中 R_a 为如上所定义的包含 1 到 12 个碳原子的烃基。除非在说明书中另有具体说明，否则烃氧基可被任选取代。

[0045] “烃基氨基”是指式 $-NHR_a$ 或式 $-NR_aR_a$ 的根基其中每个 R_a 是独立地如上所定义的包含 1 到 12 个碳原子的烃基。除非在说明书中另有具体说明，否则烃基氨基基团可被任选取代。

[0046] “硫代烃基”是指式 $-SR_a$ 的根基其中 R_a 是如上所定义的包含 1 到 12 个碳原子的烃基。除非在说明书中另有具体说明，否则硫代烃基基团可被任选取代。

[0047] “芳基”是指包含氢、6 到 18 个碳原子和至少一个芳香环的烃环系统基。为了本发明的目的，芳基可为单环、双环、三环或四环系统，其可包含稠合或桥接环系统。芳基包括但不限于由醋蒽烯、苊、醋菲烯、蒽、荚、苯、䓛、荧蒽、芴、不对称引达省 (as-indacene)、对称引达省 (s-indacene)、茚满、茚、萘、非那烯、菲、七曜烯、苉和苯并菲衍生的芳基。除非在说明书中另有具体说明，否则术语“芳基”或前缀“芳”（例如在“芳烃基”中）意为包含被任选取代的芳基。

[0048] “芳烃基”是指式 $-R_b-R_c$ 的根基其中 R_b 为如上所定义的亚烃基链且 R_c 为一个或多个如上所定义的芳基，例如苄基、二苯甲基等。除非在说明书中另有具体说明，否则芳烃基基团可被任选取代。

[0049] “环烃基”或“碳环”是指仅由碳原子和氢原子组成的稳定的非芳香的单环或多环烃基，其可包含稠合或桥接环系统，具有 3 到 15 个碳原子，优选具有 3 到 10 个碳原子，以及其为饱和或不饱和的并且通过单键连接至分子的其余部分。单环基包含，例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。多环基包含，例如金刚烷基、降冰片基、十氢萘基、7,7- 二甲基 - 二环 [2.2.1] 庚基等。除非在说明书中另有具体说明，否则环烃基基团可被任选取代。

[0050] “环烃基烃基”是指式 $-R_bR_d$ 的根基其中 R_b 为如上所定义的亚烃基链且 R_d 为如上所定义的环烃基。除非在说明书中另有具体说明，否则环烃基烃基基团可被任选取代。

[0051] “稠合的”是指稠合至本发明的化合物中的现有环结构的本文所描述的任何环结构。当稠合环为杂环或杂芳基环时，现有环结构（其变为稠合杂环或稠合杂芳基环的一部分）上任意碳原子可被氮原子替代。

[0052] “卤代”或“卤素”是指溴、氯、氟或碘。

[0053] “卤代烃基”是指被一个或多个如上所定义的卤代基所取代的如上所定义的烃基，例如，三氟甲基、二氟甲基、三氯甲基、2,2,2- 三氟乙基、1,2- 二氟乙基、3- 溴 -2- 氟丙基、1,2- 二溴乙基等。除非在说明书中另有具体说明，否则卤代烃基基团可被任选取代。

[0054] “杂环基”或“杂环”是指稳定的 3- 元至 18- 元非芳香环基其由 2 到 12 个碳原子和 1 到 6 个选自于氮、氧和硫的杂原子组成。除非在说明书中另有具体说明，否则杂环基可为单环、双环、三环或四环环系统，其可包含稠合或桥接环系统；并且在杂环基中的氮原子、碳原子或硫原子可任选地被氧化；氮原子可任选地被季铵化；以及杂环基可为部分或全部饱和的。此类杂环基的实例包括但不限于，二氧戊环基、噻吩基 [1,3] 二噻烷基、十氢异喹啉基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑烷基、异噁唑烷基、吗啉基、八氢吲哚基、八氢异吲哚基、2- 氧代哌嗪基、2- 氧代哌啶基、2- 氧代吡咯烷基、噁唑烷基、哌啶基、哌嗪基、4- 哌啶酮基、吡咯烷基、吡唑烷基、奎宁环基、噻唑烷基、四氢呋喃基、三噻烷基、四氢吡喃基、硫代吗啉基、硫杂吗啉基、1- 氧代 - 硫代吗啉基和 1,1- 二氧代 - 硫代吗啉基。除非在说明书中另有具体说明，否则杂环基基团可被任选取代。

[0055] “N- 杂环基”是指如上所定义的杂环基其包含至少一个氮并且杂环基与分子的其余部分的连接点是通过杂环基中的氮原子来实现。除非在说明书中另有具体说明，否则 N- 杂环基基团可被任选取代。

[0056] “杂环基烃基”是指式 $-R_bR_e$ 的根基其中 R_b 为如上所定义的亚烃基链且 R_e 为如上所定义的杂环基，并且如果杂环基为含氮杂环基，则该杂环基可在氮原子处与烃基连接。除非在说明书中另有具体说明，否则杂环基烃基基团可被任选取代。

[0057] “杂芳基”是指包含氢原子、1 到 13 个碳原子、1 到 6 个选自于氮、氧和硫的杂原子和至少一个芳香环的 5- 元至 14- 元的环系统基。为了本发明的目的，杂芳基可为单环、双环、三环或四环环系统，其可包括稠合或桥接环系统；且在杂芳基中的氮原子，碳原子或硫原子可任选被氧化；氮原子可任选被季铵化。实例包括但不限于，吖庚因、吖啶基、苯并咪唑基、苯并噻唑基、苯并茚基、苯并间二氧杂环戊烯基 (benzodioxolyl)、苯并呋喃基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并噻二唑基、苯并 [b][1,4] 二氧杂庚基 (dioxepinyl)、1,4- 苯并二噁烷基、苯并萘呋喃基 (benzonaphthofuranyl)、苯并噁唑基、苯并间二氧杂环戊烯基、苯并二噁英基、苯并吡喃基、苯并吡喃酮基 (benzopyranonyl)、苯并呋喃基、苯并呋喃酮基、苯并噻吩基（苯并苯硫基）、苯并三唑基、苯并 [4,6] 咪唑并 [1,2-a] 吡啶基、咔唑基、噌啉基、二苯并呋喃基、二苯并苯硫基、呋喃基、呋喃酮基、异噻唑基、咪唑基、吲唑基、吲哚基、吲唑基、异吲哚基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、异喹啉基、中氮茚基 (indolizinyl)、异噁唑基、萘啶基、噁二唑基、2- 氧代吖庚因、噁唑基、环氧乙烷基、1- 氧吡啶基、1- 氧嘧啶基、1- 氧吡嗪基、1- 氧哒嗪基、1- 苯基 -1H- 吡咯基、吩嗪基、吩噻嗪基、吩噁嗪基、酞嗪基、蝶啶基、噁吟基、吡咯基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、喹啉基、奎宁环基、异喹啉基、四氢喹啉基、噻唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、三嗪基和苯硫基（也就是噻吩基）。除非在说明书中另有具体说明，否则杂芳基基团可被任选取代。

[0058] “N- 杂芳基”是指如上所定义的杂芳基其包含至少一个氮并且杂芳基与分子的其余部分的连接点是通过杂芳基中的氮原子来实现。除非在说明书中另有具体说明，否则 N- 杂芳基基团可被任选取代。

[0059] “杂芳基烃基”是指式 $-R_bR_f$ 的根基其中 R_b 为如上所定义的亚烃基链且 R_f 为如上

所定义的杂芳基。除非在说明书中另有具体说明，否则杂芳基烃基基团可被任选取代。

[0060] 本文所用的术语“取代”意指上述基团的任何一种（也就是，烃基、亚烃基、烃氧基、烃基氨基、硫代烃基、芳基、芳烃基、环烃基、环烃基烃基、卤代烃基、杂环基、N-杂环基、杂环基烃基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烃基），其中至少一个氢原子被与非-氢原子的键替代，该非-氢原子例如为，但不限于：诸如F、Cl、Br和I的卤素原子；诸如羟基基团、烃氧基基团和酯基团的基团中的氧原子；诸如硫醇基团、硫代烃基基团、砜基团、磺酰基基团和亚砜基团的基团中的硫原子；诸如胺、酰胺、烃基胺、二烃基胺、芳基胺、烃基芳基胺，二芳基胺、N-氧化物、酰亚胺和烯胺的基团中的氮原子；诸如三烃基甲硅烷基基团、二烃基芳基甲硅烷基基团、烃基二芳基甲硅烷基基团和三芳基甲硅烷基基团的基团中的硅原子；以及各种其它基团中的其它杂原子。“取代”还意指上述基团的任何一种，其中一个或多个氢原子被与杂原子（例如在氧代、羰基、羧基和酯基团中的氧；诸如亚胺、肟、腙和腈的基团中的氮）的更高等级的键（例如，双键或三键）替代。例如，“取代”包括其中一个或多个氢原子被$-NR_gR_h$、$-NR_gC(=O)R_h$、$-NR_gC(=O)NR_gR_h$、$-NR_gC(=O)OR_h$、$-NR_gSO_2R_h$、$-OC(=O)NR_gR_h$、$-Or_g$、$-SR_g$、$-SOR_g$、$-SO_2R_g$、$-OSO_2R_g$、$-SO_2OR_g$、$=NSO_2R_g$和$-SO_2NR_gR_h$替代的上述基团的任何一种。“取代”还意指其中一个或多个氢原子被$-C(=O)R_g$、$-C(=O)Or_g$、$-C(=O)NR_gR_h$、$-C_{H2}SO_2R_g$、$-C_{H2}SO_2NR_gR_h$替代的上述基团的任何一种。在上述中，R_g和R_h为相同的或不同的并且独立地为氢、烃基、烃氧基、烃基氨基、硫代烃基、芳基、芳烃基、环烃基、环烃基烃基、卤代烃基、杂环基、N-杂环基、杂环基烃基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烃基。“取代”进一步意指其中一个或多个氢原子被与基团（例如氨基、氰基、羟基、亚氨基、硝基、氧代、硫代、卤素、烃基、烃氧基、烃基氨基、硫代烃基、芳基、芳烃基、环烃基、环烃基烃基、卤代烃基、杂环基、N-杂环基、杂环基烃基、杂芳基、N-杂芳基和/或杂芳基烃基基团）的键替代的上述基团的任何一种。此外，上述取代基均还可任选地被一个或多个上述取代基取代。

[0061] “稳定的化合物”和“稳定的结构”意为表示足够稳定从而可在从反应混合物分离至有用纯度时保存下来的化合物。

[0062] “任选的(optional)”或“任选地(optionally)”意指随后描述的情况事件可发生或可不发生，并且该描述包括该事件或情况发生的例示和该事件或情况不发生的示例。例如，“任选取代的芳基”意指芳基可被取代或可不被取代并且该描述包括取代的芳基和未取代的芳基。

[0063] 通常，结晶或沉淀产生本发明的化合物的溶剂化物。如本文所用的，术语“溶剂化物”是指包含一个或多个本发明的化合物的分子和一个或多个溶剂分子的集合体。溶剂可为水，在该情况下溶剂化物可为水合物。作为另一种选择，溶剂可为有机溶剂。因此，本发明的化合物可作为水合物（包含单水合物、二水合物、半水合物、倍半水合物、三水合物、四水合物等），以及相应的溶剂化物形式而存在。本发明的化合物可为真正的溶剂化物，然而在其他情况下，本发明的化合物可仅仅保留外来的水或为水加上一些外来溶剂的混合物。

[0064] 本发明的化合物，或其盐或互变异构体可包含一个或多个不对称中心因此可产生对映异构体、非对映异构体和其它立体异构形式，根据绝对立体化学可将它们定义为(R)-或(S)-，或对于氨基酸可定义为(D)-或(L)-。本发明意为包含所有此类可能的异构体，以及其外消旋和光学纯形式。可使用手性合成子或手性试剂制备光学活性(+)和(-)、(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体，或使用常规技术（例如，色谱法和分步结晶）将其解

析。用于制备/分离单个对映体的常规技术包括由合适的光学纯前体手性合成或使用例如手性高压液相色谱(HPLC)使外消旋物(或者盐或衍生物的外消旋物)拆分。当本文所描述的化合物包含烯烃双键或其他几何不对称中心,并且除非另外指出时,其目的是,化合物包括E和Z几何异构体。同样,还预期包括所有互变异构形式。

[0065] "立体异构体"是指由相同的原子构成且该相同的原子通过相同的键而键合但是具有不同的三维结构(其不可互换)的化合物。本发明涵盖多种立体异构体和其混合物,并且包含"对映体",其是指分子彼此为非重叠的镜像的两种立体异构体。

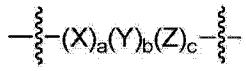
[0066] "互变异构体"是指从分子的一个原子到相同分子的另一个原子的质子移动。本发明包括任何所述化合物的互变异构体。

[0067] "聚合物"是指具有一个或多个重复亚基的分子。亚基("单体")可为相同的或不同的,并且可发生在聚合物内的任何位置或顺序。聚合物可为天然来源或合成来源。本发明包括多种类型聚合物,其包括具有有序的重复亚基的聚合物、无规共聚物和嵌段共聚物。

[0068] "无规共聚物"是指包含多于一种类型的亚基的聚合物,其中亚基沿着聚合物链以无规顺序连接。无规共聚物可包含许多不同亚基。也就是说,无规共聚物为在聚合物链中的任何指定位点处发现指定单体单元的可能性不依赖于邻近单元的性质的聚合物。"统计共聚物"为单体亚基的序列遵循统计学规律的共聚物。如果在聚合物链中的特定点发现指定类型的单体残基的可能性等于该单体残基在链中的摩尔分数,则该聚合物可被称为真正的无规共聚物。

[0069] 在某些实施方案中,本文所描述的聚合物为"无规三元共聚物",其意指聚合物包含以无规顺序连接的三种不同的亚基。在无规聚合物中单个亚基可以任何摩尔比存在,例如相对于聚合物中其他亚基的摩尔数,每个亚基可以约0.1摩尔%至约99.8摩尔百分比存在。在一些实施方案中,无规三元共聚物的亚基可通过下列一般结构来表示:

[0070]



[0071] 其中X、Y和Z为独立的独特亚基,并且a、b和c为表示每个亚基在聚合物中的数目的整数。为了便于示例说明,上述结构描述了X、Y和Z的线型连接;然而,应强调的是,本发明的无规共聚物(例如,无规三元共聚物)并不限于具有所描述的亚基连接方式的聚合物,并且无规聚合物中的亚基可以任何无规序列连接,以及共聚物和三元共聚物可被支化。

[0072] "嵌段共聚物"是指包含两种或更多种亚基的重复嵌段的聚合物。

[0073] "官能团"为具有特定类型反应性(例如,酸性的、碱性的、亲核的、亲电子的等)的分子的一部分。"反应基团"为官能团的类型。官能团的非限制性实例包括叠氮化物、炔、胺、醇类等。"靶官能团"为另一官能团意欲与其反应的任何官能团。"亲水性官能团"为具有亲水性能的官能团。亲水性官能团通常趋向于增加整体分子在极性溶剂(例如水)中的可溶性。

[0074] "共价缀合"是指通过两种或更多种官能团的反应形成共价键。

[0075] "正交"或"正交反应性"是指官能团和/或反应基团的反应性能。如果两种反应基团具有正交反应性,其意指在第二反应基团很大程度上不与靶官能团反应的条件下,其中一种反应基团将与靶官能团反应,反之亦然。

[0076] “引发剂”为用于引发聚合反应的分子。用于制备公开的聚合物的引发剂为本领域所熟知。代表性引发剂包括但不限于，用于原子转移自由基聚合、活性聚合的引发剂，AIBN族引发剂和二苯甲酮引发剂。“引发剂残基”为通过自由基或其他机制连接至聚合物的引发剂的部分。在一些实施方案中，将引发剂残基连接至所公开的聚合物的末端。

[0077] “点击化学”是指至少具有下列特点的反应：(1) 表现出官能团正交性（也就是，官能部分只与和该官能部分互补的反应性位点反应，而不与其他反应性位点反应）；和 (2) 所得的键为不可逆的（也就是，一旦反应物经过反应形成产物，很难将该产物分解成反应物）或在一些情况下中所得的键为可逆的（也就是，在适当的条件下恢复至反应物）。任选地，“点击”化学可进一步具有一个或多个下列特点：(1) 立体定向性；(2) 不涉及严格纯化、大气控制等的反应条件；(3) 容易获得的起始物质和试剂；(4) 使用温和溶剂或无溶剂的能力；(5) 通过结晶或蒸馏进行产物分离；(6) 生理学稳定性；(7) 大热力学驱动力（例如，10-20kcal/mol）；(8) 单独的反应产物；(9) 高（例如，高于 50％）化学产率；以及 (10) 基本上无副产物或副产物为环境良好型副产物。

[0078] 使用“点击”官能性的反应的实例可包括但不限于，加成反应、环加成反应、亲核取代等。环加成反应的实例可包括 Huisgen 1,3- 双极性环加成、Cu(I) 催化的叠氮化物 - 炔环加成和 Diels-Alder 反应。加成反应的实例包括对碳 - 碳双键的加成反应例如环氧化反应和双烃基化反应。亲核取代的实例可包括对张力大的环（例如环氧化合物和氮丙啶化合物）的亲核取代。其他实例可包括尿素塑料和酰胺的形成。点击化学的一些加成描述可在下列中找到：Huisgen，Angew. Chem. Int. Ed.，Vol. 2，No. 11，1963，633-696 页；Lewis 等，Angew. Chem. Int. Ed.，Vol. 41，No. 6，2002，1053-1057 页；Rodionov 等，Angew. Chem. Int. Ed.，Vol. 44，2005，2210-2215 页；Punna 等，Angew. Chem. Int. Ed.，Vol. 44，2005，2215-2220 页；Li 等，J. Am. Chem. Soc.，Vol. 127，2005，14518-14524 页；Himo 等，J. Am. Chem. Soc.，Vol. 127，2005，210-216 页；Noodleman 等，Chem. Rev.，Vol. 104，2004，459-508 页；Sun 等，Bioconjugate Chem.，Vol. 17，2006，52-57 页；以及 Fleming 等，Chem. Mater.，Vol. 18，2006，2327-2334 页，其内容在此通过引用整体并入本文中。

[0079] “点击反应性”是指在点击化学条件下能够反应的官能团。

[0080] “点击官能团”为由具有点击反应性的两种官能团的反应得到的官能团，例如三唑部分等。

[0081] “固体基底”是指具有外表面的任何固体物质。通常，该外表面具有能够使聚合物固定的官能团（例如，通过共价连接）或者该外表面具有可改性的官能团以便该表面能够固定聚合物。合适的固体基底包括本领域已知的固体基底的任何一种例如玻璃和聚合物支撑物。固体基底可为光学透明的、不透明的或部分光学透明的。固体基底包括二维基底（也就是，具有至少一个平面的形状）以及珠、颗粒、多孔基质、多孔整料等。下文提供了具体的但非限制性固体基底的实例。

[0082] 本文所用的“固体支撑物”是指包括固定于其上的聚合物和 / 或捕获探针的固体基底。通常，将聚合物通过共价键固定于固体基底上，例如通过分别由叠氮化物和炔的反应或由活性酯和胺的反应得到的叠氮化物官能团或酰胺键。

[0083] 关于固体支撑物的“固定 (immobilizing)”或“固定的 (immobilized)”包括共价缀合、非 - 特异性缔合、离子相互作用和将物质（例如，聚合物）粘附至固体基底的其他方

式。

[0084] 具有“对靶官能团特异的反应性”的反应基团意指该反应基团在反应条件下优先与靶官能团反应并且使与其他官能团的副反应减至最低或不存在副反应。相似地，具有对与捕获探针缀合特异的反应性的反应基团意指该反应基团在反应条件下优先与捕获探针缀合并且使与其他官能团的副反应减至最低或不存在副反应。

[0085] “分析物”或“分析物分子”是指为分析对象的化合物或分子，例如分析物分子可为未知结构并且该分析包括结构鉴定。分析物分子包含许多常见的分子（包括 DNA、蛋白质、肽和碳水化合物）、有机分子和无机分子、金属（包括放射性同位素）等。分析物包括病毒、细菌、疟原虫属、真菌以及金属和生物 - 战争材料，生物 - 危害材料和化学战争材料。分析物还包括本文所定义的分析物探针。

[0086] “捕获探针”为能够与分析物分子相互作用的分子，例如通过氢键合（例如，DNA 杂交）、螯合、共价键合、离子相互作用等。示例性捕获探针包括能够与寡核苷酸探针或翼 (flap)、寡糖（例如外源凝集素 (lechtins)）和蛋白质序列特定性结合（杂交）的寡核苷酸。在一些实施方案中，捕获探针包含荧光团标记。例如该捕获探针可包含荧光团标记且分析物分子（例如，分析物探针）可包含淬灭剂，并通过捕获探针的荧光信号不存在来检测分析物分子的存在（因为荧光会与淬灭剂相互作用而淬灭）。在相关的实施方案中，捕获探针包含淬灭剂。在这些实施方案中，荧光标记的分析物分子的荧光通过捕获探针的捕获而发生淬灭。

[0087] “探针”或“分析物探针”是指用于间接鉴定分析物分子的分子。例如，探针可携带能够独特地鉴定分析物分子的序列信息。示例性探针包括寡核苷酸等。

[0088] “翼”是指探针的任选部分。在某些实施方案中，翼包含序列信息以独特地鉴定探针（因此可鉴定分析物分子）。可将翼从探针的剩余部分切割（例如在 PCR 条件下）并与固体支撑物上的捕获探针杂交。在固体支撑物上结合的翼的存在表明具体分析物的存在。

[0089] A. 聚合物

[0090] 如上所述，本公开内容的一个方面涉及具有正交反应基团的聚合物（也就是，“正交聚合物”）。该聚合物可用于多种应用中。在某些实施方案中，通过第一反应基团在固体基底上与靶官能团反应可将该聚合物共价连接于固体基底，导致产生固体支撑物。在相关的实施方案中，通过第二反应基团与捕获探针上的靶官能团缀合将基底 - 结合聚合物用于使捕获探针共价连接于固体支撑物。共价连接于固定的聚合物的捕获探针能够从样品中捕获 / 螯合分析物分子，例如溶解在水性样品中的分析物分子。在某些实施方案中，捕获的机理可包括络合、氢键合（例如 DNA 杂交）和 / 或共价的或非 - 共价的（例如，抗体 - 链霉亲和素相互作用）相互作用。

[0091] 在其他实施方案中，提供了用于制备固体基底的化合物，该化合物具有使聚合物固定在固体基底上的反应基团。包含聚合物的固体支撑物用于多种方法中，包括在阵列形式中多核苷酸的高通量分析。在这方面的分析方法在本领域中是已知的并且下文将详细描述。

[0092] 所公开的聚合物的某些实施方案提供了优于使捕获探针固定至固体支撑物的其他方法的优点。例如，由于聚合物的实施方案包含正交反应基团，因此可得以精确控制固体支撑物和捕获探针的连接。如图 1 示例说明的，聚合物包含用于固定至固体基底的一个或

多个亚基、用于缀合至捕获探针（例如，生物分子、多核苷酸、DNA 等）的一个或多个亚基以及用于控制聚合物亲水性（在图 1 中注为“水凝胶骨架”）的一个或多个亚基。可改变固定亚基和缀合亚基的数目和位置以获得具有所需的形态和捕获探针浓度的反应性表面（也就是，包含用于缀合至捕获探针的一个或多个反应基团的固体支撑物表面）。

[0093] 相比于本文所描述的方法和聚合物，使用缺少正交反应基团的聚合物的现有方法无法对反应性表面的形态发挥这种控制作用，并且通常得到从一批到一批可发生变化的无规形态。进一步地，通过控制聚合物中的亲水性亚基（例如，亚基 B）的数目，可得到聚合物的所需的亲水性。因为使捕获探针缀合至固定在固体基底上的聚合物通常需要活性表面与溶解在溶剂中的捕获探针反应（也就是，“界面反应”），水接触角可根据反应溶剂的亲水性质或疏水性质发生改变，因此控制活性表面的水接触角的能力导致更易于进行界面反应。

[0094] 因此，在本发明的一个实施方案中，提供了包含用于固定至固体基底的一个或多个亚基和用于缀合至捕获探针的一个或多个亚基的聚合物。该聚合物可任选地还包含控制聚合物亲水性的亚基。在本发明的一个实施方案中提供了包含 A 亚基、B 亚基和 C 亚基的聚合物，其中：

[0095] A 亚基每次出现时独立地包含具有对与靶官能团反应特异的反应性的第一反应基团；

[0096] B 亚基每次出现时独立地包含亲水性官能团；以及

[0097] C 亚基每次出现时独立地包含具有对与捕获探针共价缀合特异的反应性的第二反应基团，

[0098] 其中第一反应基团和第二反应基团的反应性相互正交。

[0099] 在一些实施方案中，靶官能团是在固体基底上，例如在固体基底的外表面上或在多孔网络中。

[0100] 在某些实施方案中，聚合物为无规共聚物，例如无规三元共聚物。例如，在一些实施方案中聚合物具有下列结构（I）：

[0101] $T^1-(A)_x(B)_y(C)_z-T^2$

[0102] （I）

[0103] 其中：

[0104] T^1和 T^2各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；以及

[0105] x、y 和 z 独立地为 1 至 350,000 的整数。

[0106] 在上述的一些实施方案中，x、y 和 z 独立地为 1 至 50,000 的整数，

[0107] 所描述的结构（I）的 A 亚基、B 亚基和 C 亚基的连接性决不是进行限制，并且结构（I）的聚合物的实际结构包括其中结构（I）聚合物为无规共聚物的实施方案，在其中 A 亚基、B 亚基和 C 亚基的每一个可出现在聚合物的任何位置处。

[0108] 在其他实施方案中，聚合物具有下列结构（Ia）：

[0109] $T^1-[(A)_{x1}(B)_{y1}(C)_{z1}]_n-T^2$

[0110] （Ia）

[0111] 其中：

[0112] A、B 和 C 在结构（Ia）的聚合物中存在至少一次；

[0113] T^1和 T^2各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；

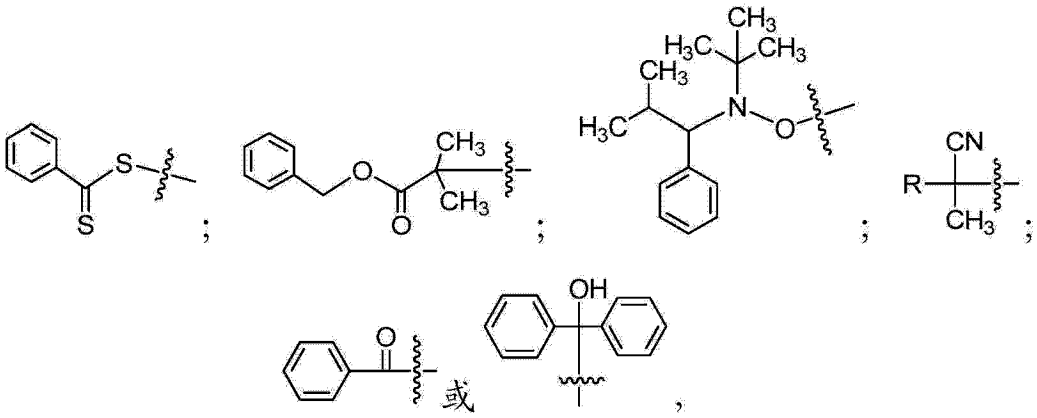
[0114] x1、y1 和 z1 每次出现时独立地为 0 或 1；以及

[0115] n 为 1 至 700,000 的整数。

[0116] 在上述的其他实施方案中，n 为 1 至 150,000 的整数。

[0117] 当存在时，引发剂残基是由引发剂和聚合物的反应得到的。引发剂残基的确切结构可发生变化并且取决于在聚合反应期间所使用的引发剂的类型。在某些实施方案中，引发剂残基具有下列结构中的一种：

[0118]

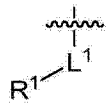


[0119] 其中 R 为包含 1-10 个碳原子和任选氮原子和氧原子的烃基基团。

[0120] 在任一种上述实施方案中，聚合物包含位于聚合物末端位置处的 A 亚基。

[0121] 在其他的上述实施方案中，A 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (II)：

[0122]



(II)

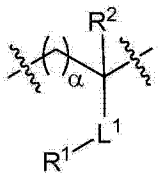
[0123] 其中：

[0124] R^1为第一反应基团；和

[0125] L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物。

[0126] 在另外其他的上述实施方案中，A 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (III)：

[0127]



(III)

[0128] 其中：

[0129] R^1为第一反应基团；

[0130] R^2为氢或烃基，

[0131] L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

[0132] α 为 0 至 10 的整数。

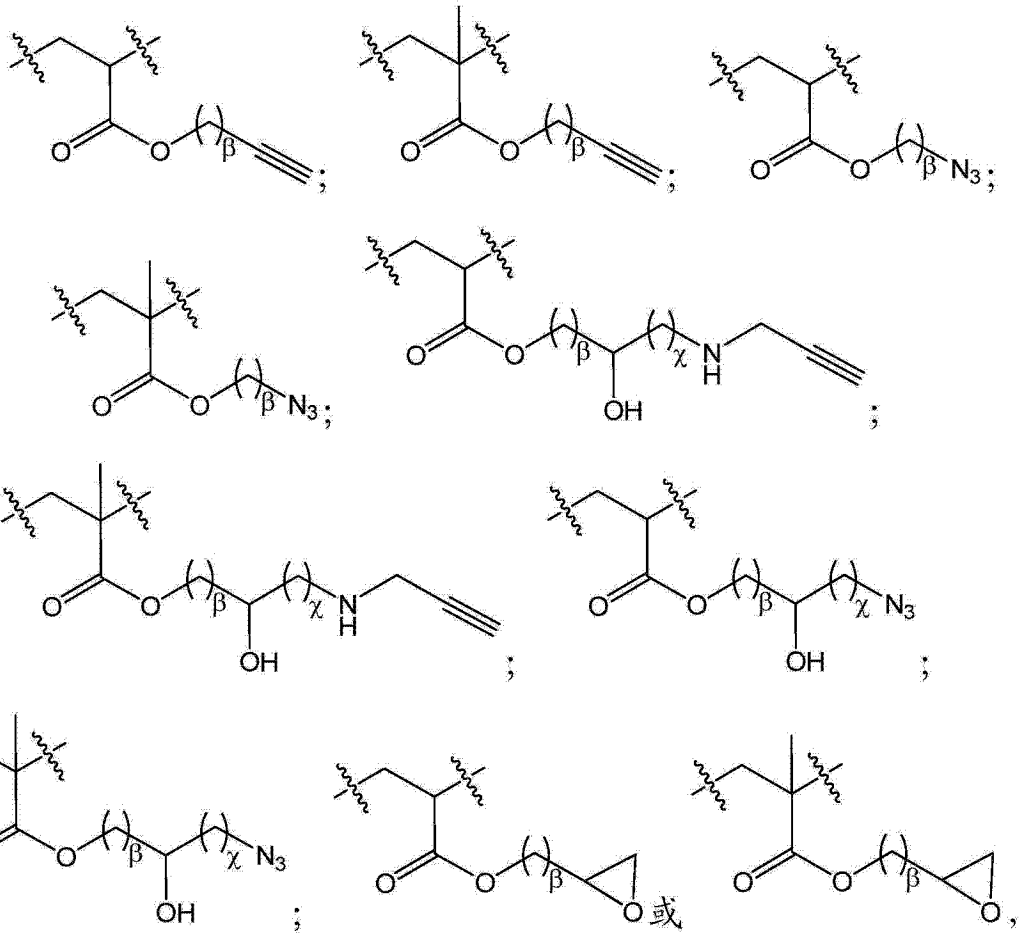
[0133] 在进一步的上述实施方案中，L^1包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。在其他实施方案中，L^1不存在。

[0134] 在一些上述实施方案，α 为 1。在一些其他上述实施方案，R^2为 H。

[0135] 第一反应基团的实际结构或反应性是非限制性的，但是第一反应基团对第二反应基团具有正交反应性。在一些实施方案中，R^1为炔、烃基甲硅烷基 - 保护的炔、叠氮化物、腈、硫醇、烯、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶或硫杂丙环官能团。在某些实施方案中，R^1为炔或叠氮化物官能团。

[0136] 在进一步的上述实施方案中，A 亚基每次出现时独立地具有下列结构中其中一种：

[0137]

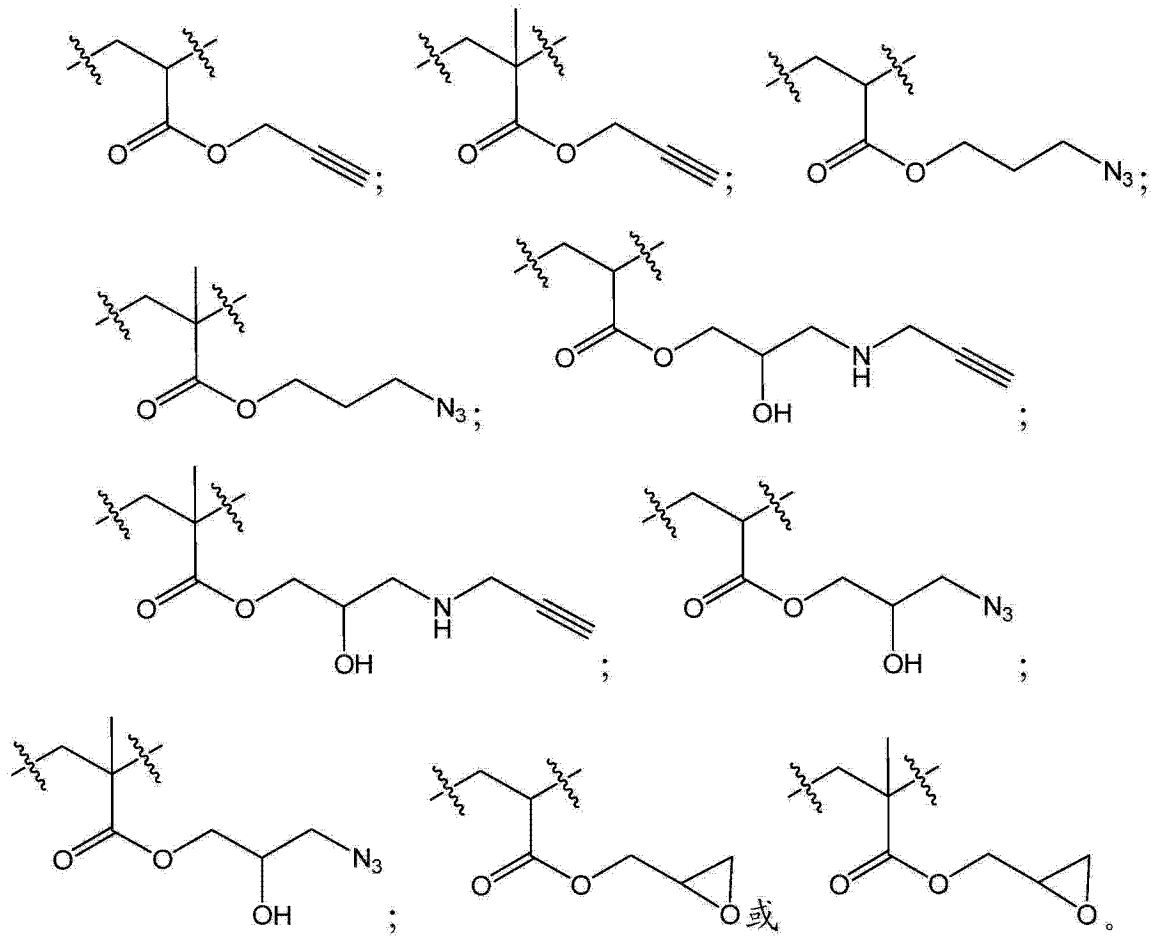


[0138] 其中 β 和 χ 各自独立地为 1 至 5 的整数。

[0139] 在其他实施方案中，β 为 1 或 3，且在其他方面中 χ 为 1。

[0140] 在上述其他更具体的实施方案中，A 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

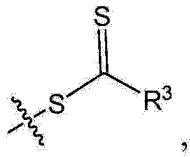
[0141]



[0142] 在其他实施方案中，至少一个 A 亚基位于共价结合至 T^1的末端位置处。例如，在一些实施方案中 T^1为 H。

[0143] 在其他方面中 A 亚基中的至少一种具有下列结构：

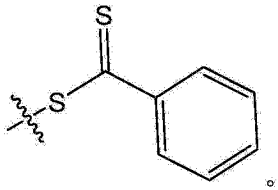
[0144]



[0145] 其中：

[0146] R^3为芳基。例如，此类结构可用于制备包含炔部分的聚合物。例如，在某些实施方案中 A 亚基中的至少一种可具有下列结构：

[0147]



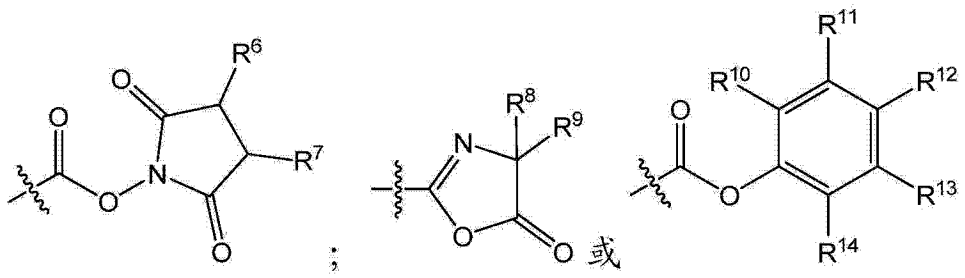
[0148] 在一些其他的上述实施方案中，第一反应基团每次出现时独立地具有点击反应性。例如，在某些实施方案中第一反应基团每次出现时独立地为对与叠氮化物的反应特异。例如，在一些实施方案中第一反应基团每次出现时独立地为炔。在其他实施方案中，第一反

应基团每次出现时独立地为对与炔的反应特异。例如，在一些实施方案中，第一反应基团每次出现时独立地为叠氮化物。

[0149] 在某些在其他实施方案中，第一反应基团的反应性每次出现时独立地对固体基底上的胺基团特异。在其他实施方案中，第一反应基团每次出现时独立地为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、N-羟基硫代琥珀酰亚胺(硫代-NHS)酯、乙酰硫代醋酸琥珀酰亚胺酯(SATA)、碳化二亚胺、羟基甲基膦、马来酰亚胺、芳基酯、亚氨酸酯、异氰酸酯、补骨脂素、乙烯砜、吡啶基二硫化物、吖内酯或二苯甲酮。在一些更具体的实施方案中，第一反应基团每次出现时独立地为NHS酯、吖内酯或芳基酯。

[0150] 在一些其他的上述实施方案中，第一反应基团每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0151]



[0152] 其中：

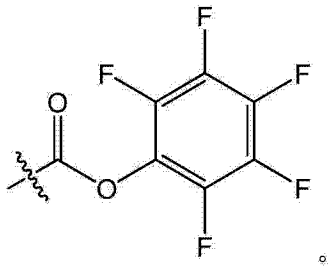
[0153] R^6、R^7、R^8和R^9各自独立地为H或烃基；以及

[0154] R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}和R^{14}各自独立地为H、吸电子基团、-NCS、-NCO、$-CO_2H$、$-SO_3H$、-L′-多聚物或其盐，其中L′为任选的至多100个原子长度的连接物且多聚物为水溶性聚合物。

[0155] 在一些实施方案中，R^6、R^7、R^8和R^9均都为H。在其他实施方案中，R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或R^{14}中的至少一个为吸电子基团。在其他实施方案中，R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或R^{14}均为吸电子基团。例如，在一些实施方案中吸电子基团为卤素、硝基或腈，并且在其他更具体的实施方案中吸电子基团为氟。

[0156] 在一些上述实施方案中，第一反应基团中的至少一种具有下列结构：

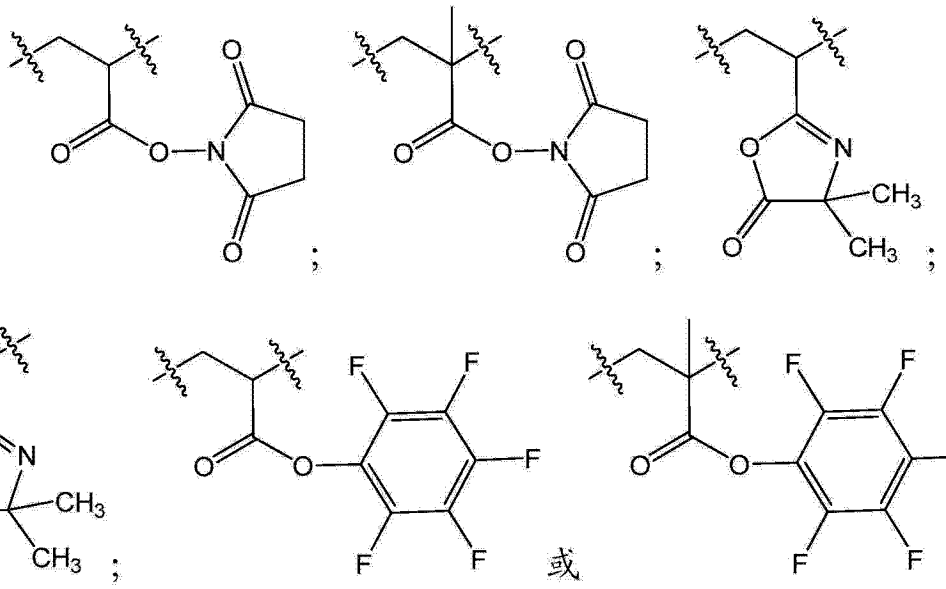
[0157]



[0158] 在一些其他实施方案中，第一反应基团的每一种具有上述结构。

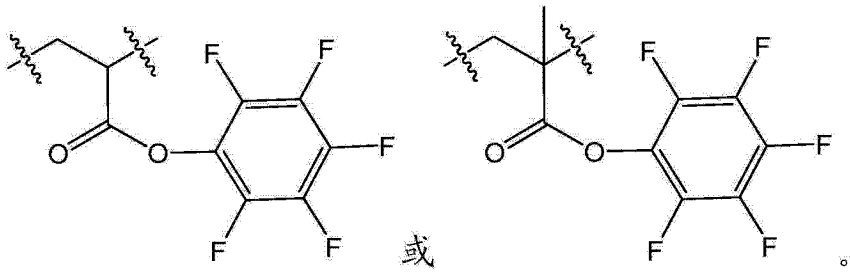
[0159] 在其他的上述实施方案中，A亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0160]



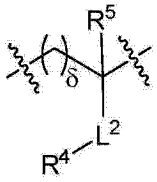
[0161] 在一些更具体的方面中，A 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0162]



[0163] 在一些其他的上述实施方案中，C 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (IV)：

[0164]



[0165]

(IV)

[0166] 其中：

[0167] R^4为第二反应基团；

[0168] R^5为氢或烃基；

[0169] L^2为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

[0170] δ 为 0 至 10 的整数。

[0171] 在一些上述实施方案中，L^2包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。在其他实施方案中，L^2不存在。

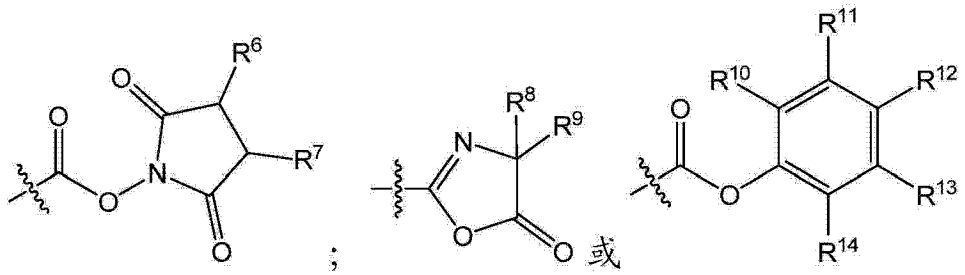
[0172] 在上述的一些其他实施方案中，δ 为 1，以及在其他实施方案中 R^5为 H。

[0173] 在某些实施方案中，第二反应基团的反应性每次出现时独立地对捕获探针中的胺基团特异。在其他实施方案中，第二反应基团每次出现时独立地为 N- 羟基琥珀酰亚胺

(NHS)酯、N-羟基硫代琥珀酰亚胺(硫代-NHS)酯、乙酰硫代醋酸琥珀酰亚胺酯(SATA)、碳化二亚胺、羟基甲基膦、马来酰亚胺、芳基酯、亚氨酸酯、异氰酸酯、补骨脂素、乙烯砜、吡啶基二硫化物、吖内酯或二苯甲酮。在一些更具体的实施方案中,第二反应基团每次出现时独立地为NHS酯、吖内酯或芳基酯。

[0174] 在一些其他的上述实施方案中,第二反应基团每次出现时独立地具有下列结构中的一种:

[0175]



[0176] 其中:

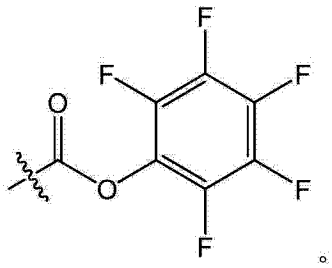
[0177] R^6、R^7、R^8和R^9各自独立地为H或烃基;以及

[0178] R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}和R^{14}各自独立地为H、吸电子基团、-NCS、-NCO、$-CO_2H$、$-SO_3H$、-L′-多聚物或其盐,其中L′为任选的至多100个原子长度的连接物并且多聚物为水溶性聚合物。

[0179] 在一些实施方案中,R^6、R^7、R^8和R^9均为H。在其他实施方案中,R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或R^{14}中的至少一个为吸电子基团。在其他实施方案中,R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}或R^{14}均为吸电子基团。例如,在一些实施方案中吸电子基团为卤素、硝基或腈,以及在其他更具体的实施方案中吸电子基团为氟。

[0180] 在一些上述实施方案中,第二反应基团中的至少一种具有下列结构:

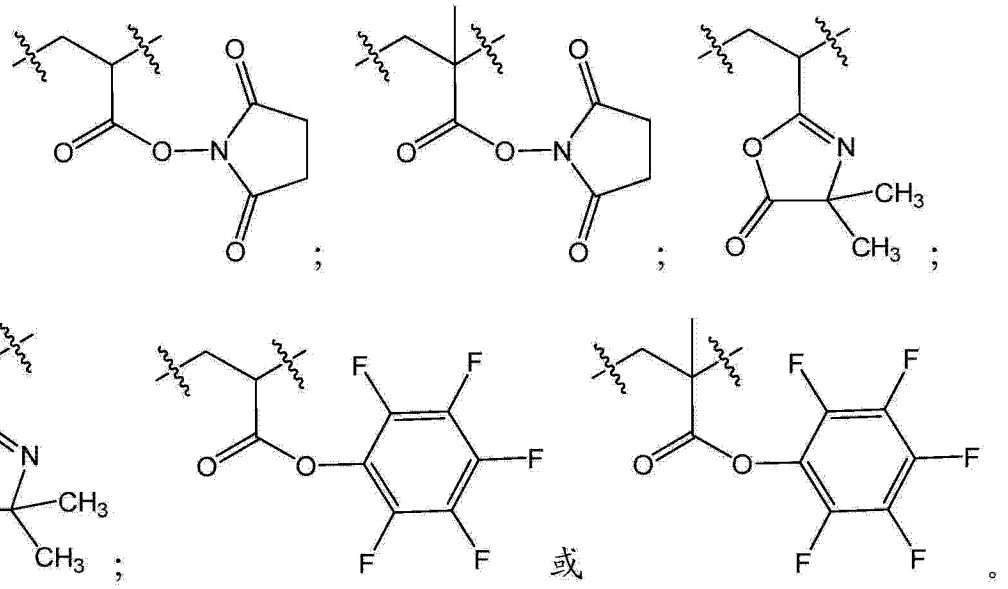
[0181]



[0182] 在其他实施方案中,第二反应基团的每一种具有上述结构。

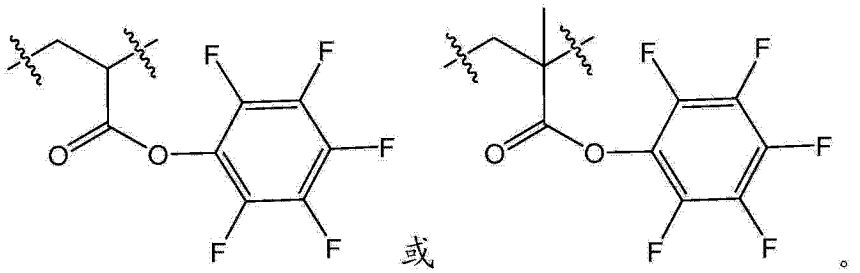
[0183] 在其他的上述实施方案中,C亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种:

[0184]



[0185] 在一些更具体的方面中，C 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

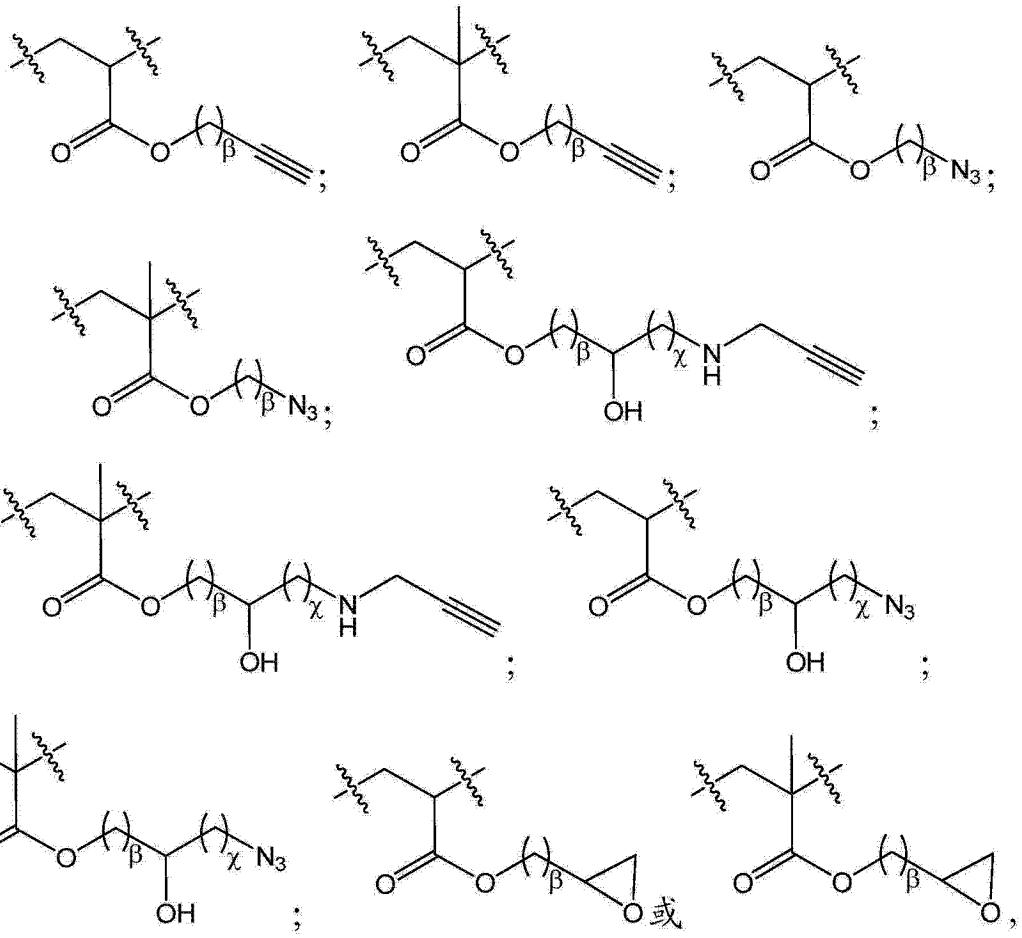
[0186]



[0187] 在一些其他实施方案中，C 亚基每次出现时独立地具有点击反应性。例如，捕获探针可包含点击官能团并且利用点击化学将捕获探针缀合至聚合物。在一些实施方案中，R^4 为炔、烃基甲硅烷基 - 保护的炔、叠氮化物、腈、硫醇、烯、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶或硫杂丙环官能团。在某些实施方案中，R^4 为炔或叠氮化物官能团。

[0188] 在进一步的上述实施方案中，C 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0189]

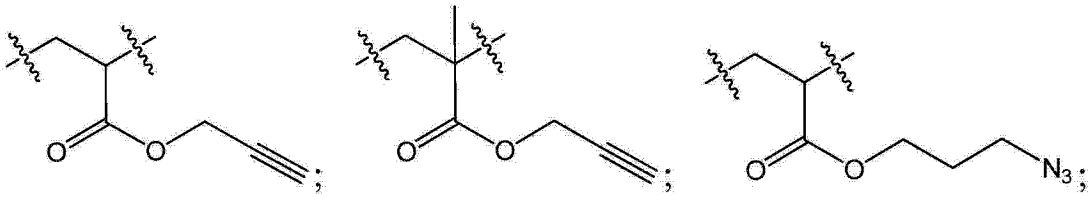


[0190] 其中 β 和 x 各自独立地为 1 至 5 的整数。

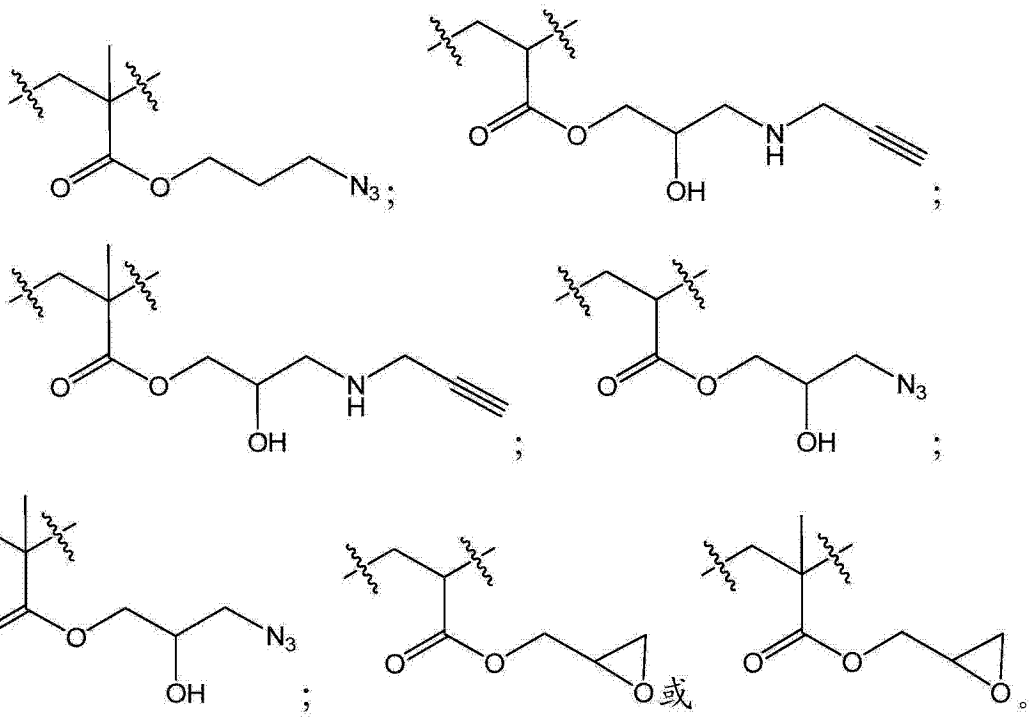
[0191] 在其他实施方案中，β 为 1 或 3，并且在其他方面中 x 为 1。

[0192] 在上述的其他更具体的实施方案中，C 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0193]



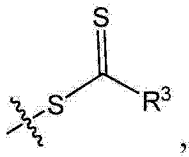
[0194]



[0195] 在其他实施方案中，至少一种 C 亚基位于共价结合至 T^2的末端位置处。例如，在一些实施方案中 T^2为 H。

[0196] 在其他方面中，C 亚基中的至少一种具有下列结构：

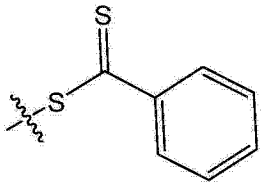
[0197]



[0198] 其中：

[0199] R^3为芳基。例如，此类结构可用于制备包含炔部分的聚合物。例如，在某些实施方案中 C 亚基中的至少一种可具有下列结构：

[0200]

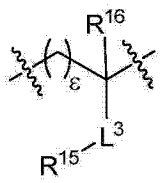


[0201] 在一些实施方案中，多聚物为聚乙二醇、聚丙烯酰胺、聚（二甲基丙烯酰胺）、聚（丙烯酸）、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚（甲基乙烯基醚）、聚（乙基乙烯基醚）、聚（N- 乙烯甲酰胺）、聚（N- 乙烯基乙酰胺）或聚（N- 甲基 -N- 乙烯基乙酰胺）。

[0202] 在上述聚合物的其他具体的实施方案中，C 亚基的至少一种位于共价结合至 T^2的末端位置处。例如，在某些实施方案中 T^2为 H。

[0203] 在一些上述实施方案中，B 亚基每次出现时独立地具有下列结构（V）：

[0204]



(V)

[0205] 其中：

[0206] R^{15}为亲水性官能团；

[0207] R^{16}为氢或烃基；

[0208] L^3为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

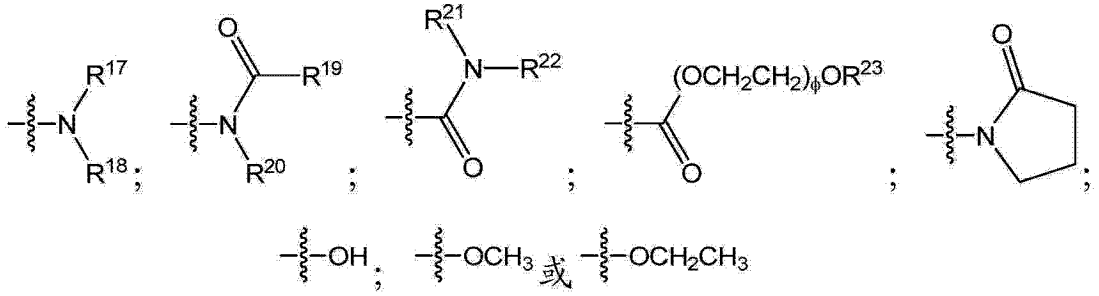
[0209] ε 为 0 至 10 的整数。

[0210] 在某些实施方案中，L^3包含亚烃基、酯、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。在其他实施方案中，L^3不存在。

[0211] 在一些实施方案中，ε 为 1，以及在其他实施方案中 R^{16}为 H。

[0212] 在其他的上述实施方案中，R^{15}每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0213]



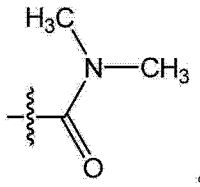
[0214] 其中：

[0215] R^{17}、R^{18}、R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}和 R^{23}各自独立地为 H、烃基或羟基烃基；以及

[0216] φ 为 1 至 200 的整数。

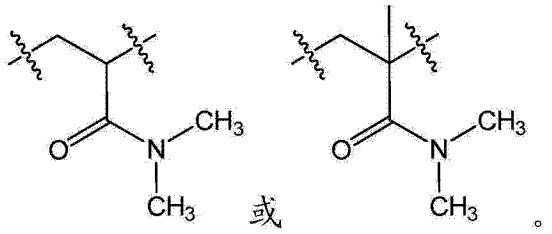
[0217] 在上述的一些实施方案中，R^{17}、R^{18}、R^{19}、R^{20}、R^{21}、R^{22}和 R^{23}各自独立地为 H 或甲基。在其他实施方案中，R^{15}每次出现时独立地具有下列结构：

[0218]



[0219] 例如，在一些实施方案中 B 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

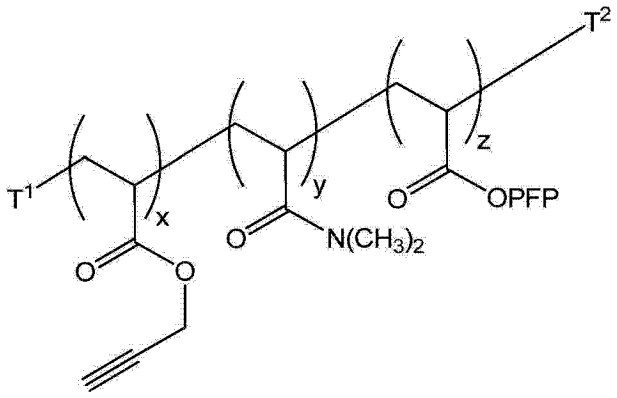
[0220]



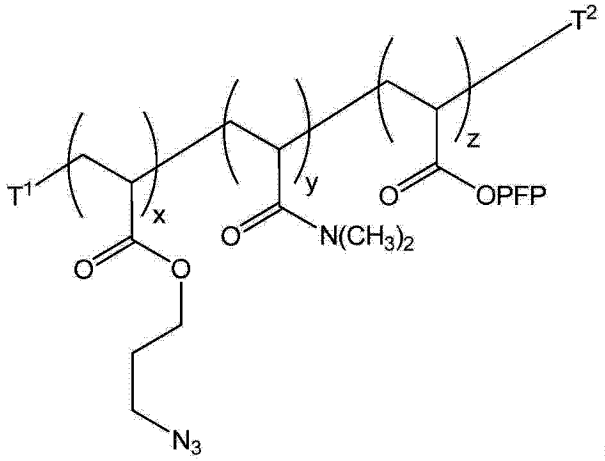
。

[0221] 在任一种的上述实施方案的中，聚合物具有下列结构中的一种：

[0222]

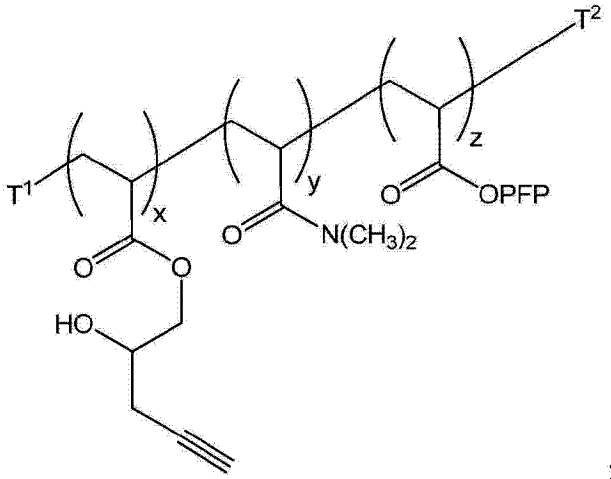


;

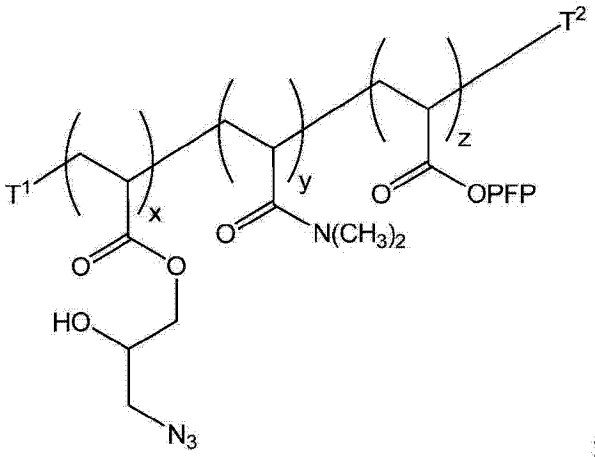


;

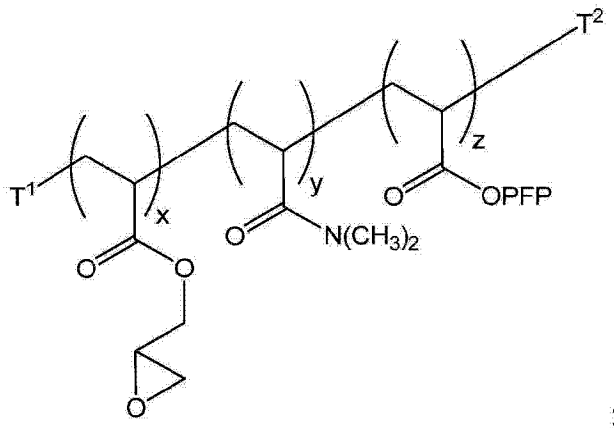
[0223]


T2
T1
x
y
z
O
OPFP
N(CH3)2
HO

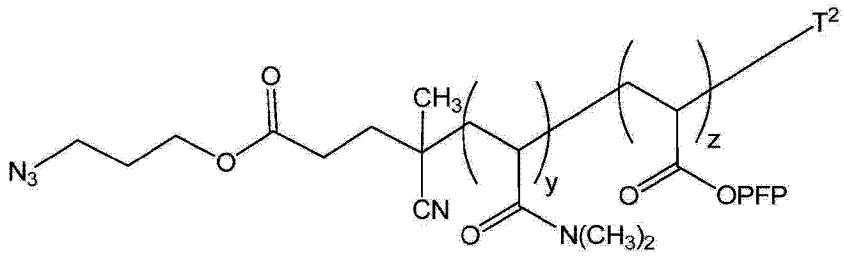
;


T2
T1
x
y
z
O
OPFP
N(CH3)2
HO
N3

;

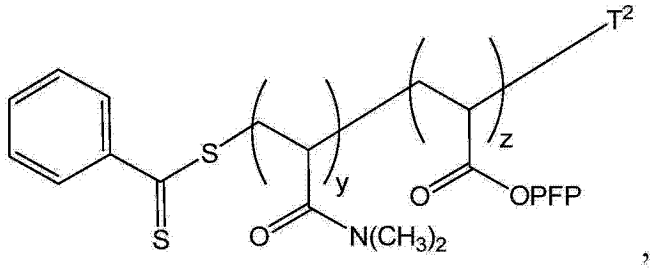

T2
T1
x
y
z
O
OPFP
N(CH3)2

;


T2
CH3
z
y
N3
O
CN
OPFP
N(CH3)2

；或

[0224]



,

[0225] 其中：

[0226] A 亚基、B 亚基和 C 亚基在聚合物中存在至少一次；

[0227] OPFP 表示五氟苯氧基；

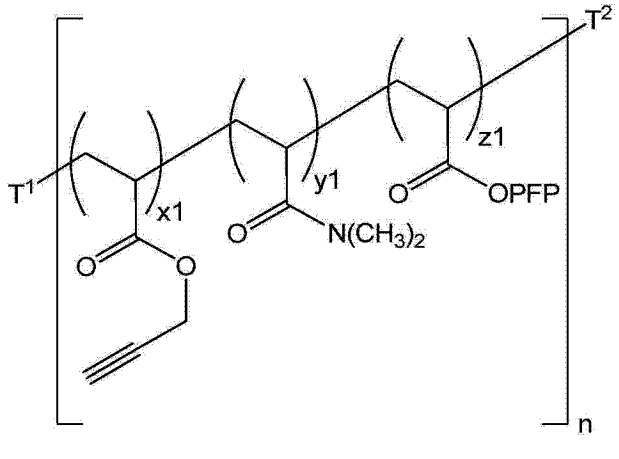
[0228] T^1和 T^2各自独立地不存在或为选自于 H 和烃基的聚合物末端基团；以及

[0229] x、y 和 z 各自独立地为 1 至 350,000 的整数。

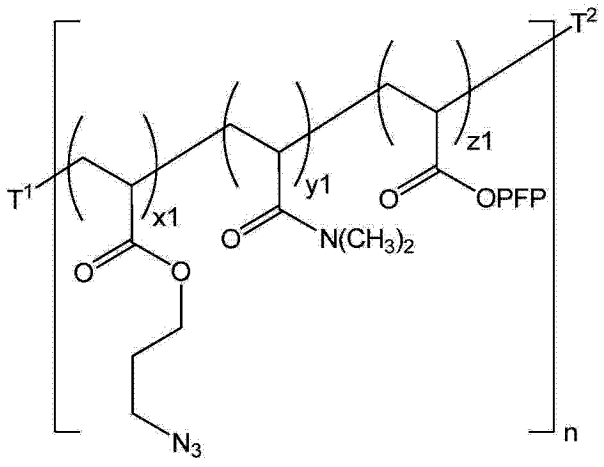
[0230] 在一些上述实施方案中，x、y 和 z 各自独立地为 1 至 50,000 的整数。

[0231] 在其他典型的实施方案中，聚合物具有下列结构中的一种：

[0232]

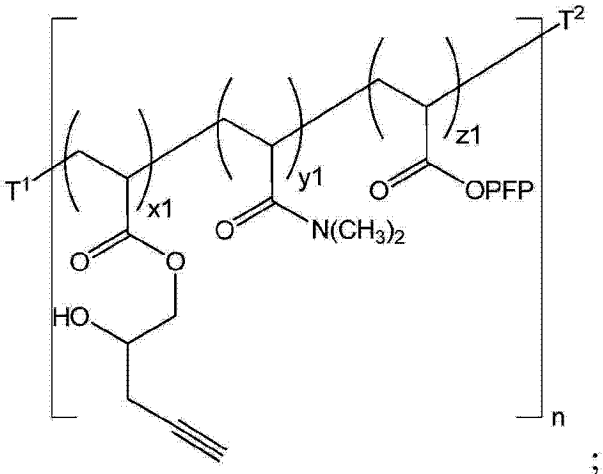


;

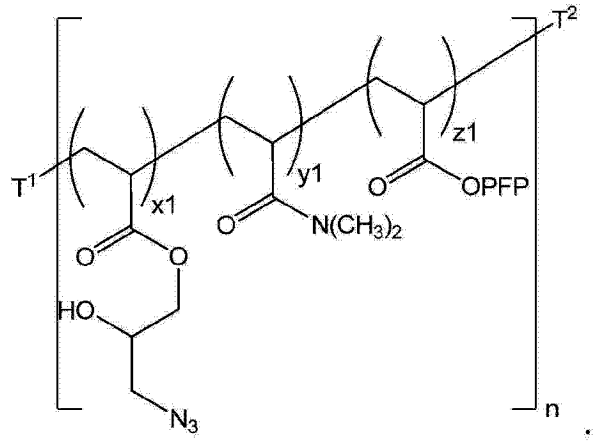


;

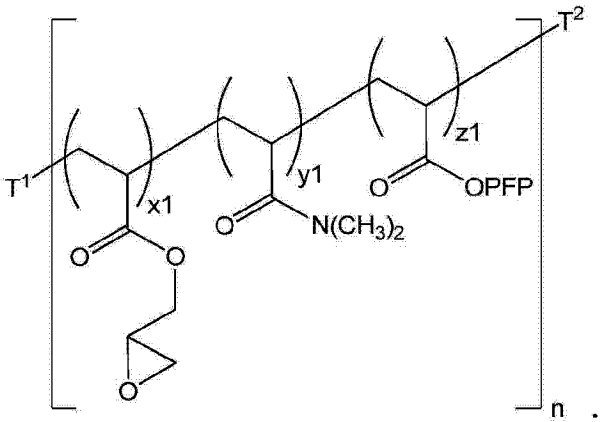
[0233]


T2
T1
x1
y1
z1
O
OPFP
N(CH3)2
HO
n

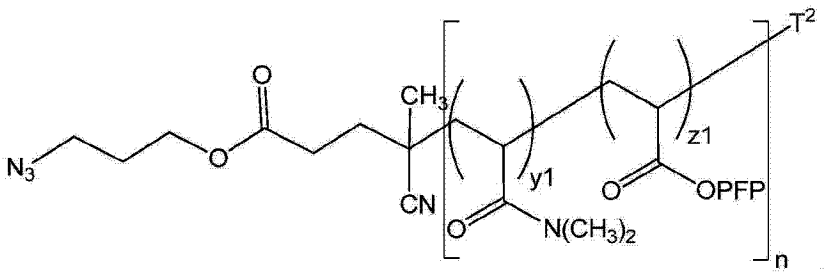
;


T2
T1
x1
y1
z1
O
OPFP
N(CH3)2
HO
N3
n

;

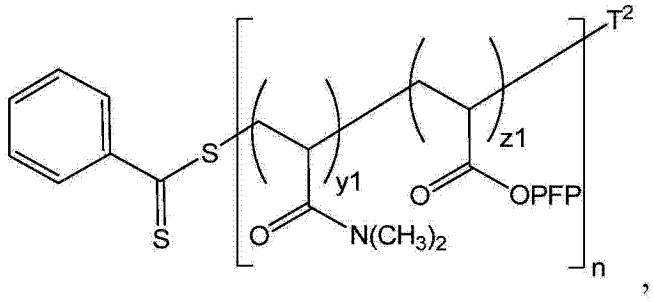

T2
T1
x1
y1
z1
O
OPFP
N(CH3)2
n

;


T2
N3
O
CH3
CN
y1
z1
OPFP
N(CH3)2
n

；或

[0234]



[0235] 其中：

[0236] A 亚基、B 亚基和 C 亚基在聚合物中存在至少一次；

[0237] OPFP 表示五氟苯氧基；

[0238] T^1和 T^2各自独立地不存在或为选自于 H 和烃基的聚合物末端基团；

[0239] x1、y1 和 z1 每次出现时独立地为 0 或 1；以及

[0240] n 为 1 至 700,000 的整数。

[0241] 在上述的其他实施方案中，n 为 1 至 150,000 的整数。

[0242] 如上所述，通过适当选择并入到聚合物中的 B 亚基和亚基数目，可至少部分控制聚合物的亲水性以及所得的固体支撑物表面的水接触角。因此，在一些实施方案中，在聚合物中至少 20％、至少 25％、至少 30％、至少 35％、至少 40％、至少 45％、至少 50％、至少 55％、至少 60％、至少 65％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％或至少 99％的亚基为 B 亚基。

[0243] 在其他实施方案中，A、B 和 C 亚基的摩尔分数可发生变化。例如 A 亚基、B 亚基和 C 亚基的每一种的摩尔分数可从约 0.1 摩尔％至约 99.8 摩尔％改变。在一些典型的实施方案中，A、B 和 C 亚基的总数的总摩尔百分数为 100％。

[0244] 在某些实施方案中，A 亚基的摩尔百分数为约 1％至约 30％，例如约 15％至约 25％。在其他实施方案中，B 亚基的摩尔百分数为约 20％至约 60％，例如约 35％至约 45％。在其他实施方案中，C 亚基的摩尔百分数为约 20％至约 60％，例如约 35％至约 45％。在其他进一步的实施方案中，A 亚基的摩尔百分数为约 15％至约 25％，B 亚基的摩尔百分数为约 35％至约 45％以及 C 亚基的摩尔百分数为约 35％至约 45％。在另外其他的实施方案中，A 亚基的摩尔百分数为约 20％，B 亚基的摩尔百分数为约 40％以及 C 亚基的摩尔百分数为约 40％。

[0245] 在某些实施方案中，聚合物仅包含一种 A 亚基。例如，在一些实施方案中 A 亚基位于聚合物的末端处。

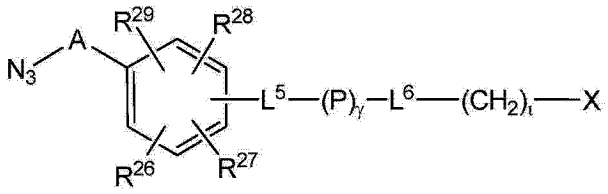
[0246] 在任何一种的上述的多种实施方案中捕获探针为多核苷酸、寡核苷酸、肽、多肽或碳水化合物。例如，在一些实施方案中捕获探针为多核苷酸。在其他实施方案中，捕获探针为 DNA。

[0247] 在某些实施方案中，本发明还提供了用于活化固体基底表面的化合物。继而，活化的基底可用于许多应用中，包括固定上述聚合物（例如，通过共价连接）以制备固体支撑物。在一些实施方案中，该化合物包含可光分解的叠氮化物部分以及烃基叠氮化物或者炔部分，其中炔或烃基叠氮化物通过连接物部分（例如，聚合物）连接至可光分解的叠氮化物。可光分解的叠氮化物可为能够在合适光源的辐射下将氮宾插入至固体基底表面上的

C-H键之间的任何叠氮化物部分。此类方法为本领域所熟知。在某些实施方案中，可光分解的叠氮化物为芳基叠氮化物。

[0248] 在一些实施方案中，用于活化固体基底表面的化合物具有下列结构（IX）：

[0249]



(IX)

[0250] 其中：

[0251] X为叠氮化物或炔部分；

[0252] L^5和L^6各自独立地为任选的包含亚烃基、烯化氧、酰亚胺、醚、酯或酰胺部分或其组合的连接物；

[0253] R^{26}、R^{27}、R^{28}和R^{29}各自独立地为H、烃基、卤素、腈、硝基或铵；

[0254] P为$-(OCH_2CH_2)-$或$-(CH_2)-$；

[0255] A为直接键或$-S(O)_2-$；

[0256] ι为0至10的整数；以及

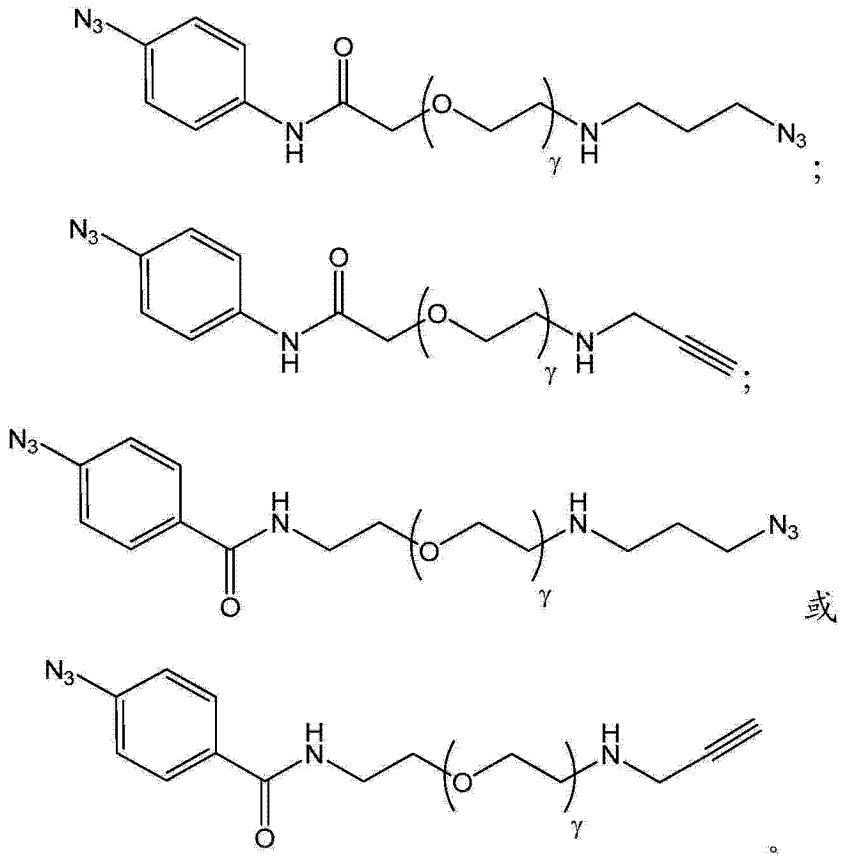
[0257] γ为1至2000的整数。

[0258] 在一些实施方案中，R^{26}、R^{27}、R^{28}和R^{29}的每一个为H。在其他实施方案中，A为直接键。

[0259] 在一些实施方案中，P为$-(OCH_2CH_2)-$。在其他实施方案中，P为$-(CH_2)-$。通过仔细选择P部分和此处重复亚基的数目（也就是，γ），本申请人发现可对所得表面的水接触角进行最优化以进行固定上述聚合物所需的界面反应。

[0260] 因此，在一些实施方案中该化合物具有下列结构中的一种：

[0261]



[0262] 在上述化合物的一些具体的实施方案中，γ 为 1 至 100，例如为 55 至 90。

[0263] 应理解，本文所示出的化合物和 / 或聚合物的任何实施方案，和在本文所描述的化合物和 / 或聚合物中的任何具体的取代基（本文所示出的），可与其他的实施方案和 / 或本文所描述的化合物和 / 或聚合物的取代基组合以形成上述没有具体提出的发明的实施方案。此外，在具体的实施方案和 / 或权利要求中对任何具体的 R 基团列出一列取代基的情况下，应理解，每一种独立取代基可从具体实施方案和 / 或权利要求中删除并且认为剩余的取代基列表是在本发明的范围中。

[0264] 应理解，在本文描述中，仅当所描述的式的取代基和 / 或变量的组合产生稳定化合物时，才可允许此类组合。

[0265] 制备所公开的化合物和聚合物的方法对本领域普通技术人员来说是显而易见的。例如，在某些实施方案中可通过混合所需的亚基比率和任选的活化剂（例如，用于热聚合物的 AIBN 或用于 ATRP 的催化剂）来制备本发明的聚合物。可根据本领域已知的方法制备或从商业来源购买亚基和包含点击官能团（例如叠氮化物或炔）的聚合物（例如，炔丙基丙烯酸酯或 3- 叠氮丙基丙烯酸酯）。参见例如，S. R. Gondi 等，Macromolecules 2007，40，474-481 ；P. J. Roth 等，J. Polym. Sci. Part A:Polym. Chem. 2009，47，3118-3130 ；以及 C. Li 等，Macromolecules，2009，42，2916-2924，其公开内容在此通过引用整体并入本文。在实例中提供了示例性方法。

[0266] 本领域技术人员还应明白，在本文所描述的方法中需要通过合适的保护基团来保护中间体化合物的官能团。此类官能团包含羟基、氨基、巯基和羧酸。用于羟基的合适的保护基团包含三烃基甲硅烷基或二芳基烃基甲硅烷基（例如，叔丁基二甲基甲硅烷基，叔丁基二苯基甲硅烷基或三甲基甲硅烷基）、四氢吡喃基、苄基等。用于氨基、脒基和胍

基的合适的保护基团包含叔丁氧基羰基、苄氧基羰基等。用于巯基的合适的保护基团包含 -C(O)-R"（其中 R"为烃基、芳基或芳基烃基）、对甲氧基苄基、三苯甲基等。用于羧酸的合适的保护基团包含烃基、芳基或芳基烃基酯。可依据标准技术（其对本领域技术人员来说是已知的并且如本文所描述）加入或去除保护基团。在 Green, T.W. 和 P.G.M.Wutz, Protective Groups in Organic Synthesis(1999),3rd Ed., Wiley 中详细描述了保护基团的使用。作为本领域技术人员应明白，保护基团还可为聚合物树脂例如 Wang 树脂、Rink 树脂或 2- 氯代三苯甲基 - 氯化物树脂。

[0267] 而且，本发明所有的以游离的碱或酸形式存在的化合物和 / 或聚合物可通过本领域技术人员已知的方法用适当的无机或有机碱或酸进行处理转化为盐。本发明的化合物的盐可通过标准技术转化为其游离的碱或酸形式。

[0268] B. 固体支撑物

[0269] 如上所述，本发明的某些方面还包括固体支撑物。该固体支撑物可包含固定于其上的聚合物。在一些实施方案中，该聚合物包含将其他聚合物固定在固体支撑物上的官能团。在其他实施方案中，固定的聚合物包含与捕获探针共价缀合的官能团或固定的聚合物包含缀合至其上的捕获探针。固体支撑物可用于多种分析测定中，在具体的实施方案中此类测定包括以阵列形式的测定，例如 DNA 微阵列测定。

[0270] 因此，在一些实施方案中本公开内容提供了包含固定于固体基底外表面的聚合物的固体支撑物，其中该聚合物包含 B 亚基、D 亚基和 E 亚基，其中：

[0271] B 亚基每次出现时独立地包含亲水性官能团；

[0272] D 亚基每次出现时独立地包含具有对与捕获探针的共价缀合特异的反应性的反应基团，或者 D 亚基包含与捕获探针的共价键；以及

[0273] E 亚基每次出现时独立地包含两种互补的点击官能团的反应产物，其中该反应产物包含与固体基底外表面的共价键或与设置于 E 亚基和固体基底外表面之间的任选的连接物 (L^4) 的共价键。

[0274] 在一些实施方案中，该聚合物为无规共聚物，例如无规三元聚合物。

[0275] 在上述固体支撑物的一些实施方案中，该聚合物为无规共聚物，例如无规三元聚合物。在上述固体支撑物的一些实施方案中，该聚合物具有下列结构 (VI)：

[0276] $T^3-(B)_q(D)_r(E)_s-T^4$

[0277] (VI)

[0278] 其中：

[0279] T^3和 T^4各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；以及

[0280] q、r 和 s 各自独立地为 1 至 350,000 的整数。

[0281] 在一些其他实施方案中，q、r 和 s 各自独立地为 1 至 50,000 的整数。

[0282] 结构 (VI) 的 B 亚基、D 亚基和 E 亚基的所描述的连接性决不是进行限制，并且在某些实施方案中，结构 (VI) 的聚合物的实际结构为无规共聚物，其中 B 亚基、D 亚基和 E 亚基的每一种可出现在聚合物中的任何位置处。

[0283] 在上述固体支撑物的一些其他实施方案中，该聚合物具有下列结构 (VIa)：

[0284] $T^3-[(B)_{q1}(D)_{r1}(E)_{s1}]_m-T^4$

[0285] (VIa)

[0286] 其中：

[0287] B、D 和 E 在结构 (VIa) 的聚合物中存在至少一次；

[0288] T^3和 T^4各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；

[0289] q1、r1 和 s1 每次出现时独立地为 0 或 1；以及

[0290] m 为 1 至 700,000 的整数。

[0291] 在其他实施方案中，m 为 1 至 150,000 整数。

[0292] 在其他实例中，可通过炔、胺、烃基甲硅烷基 - 保护的炔、叠氮化物、腈、硫醇、烯、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶或硫杂丙环官能团与互补的点击反应基团之间的反应形成点击官能团。

[0293] 在上述固体支撑物的其他实施方案中，E 亚基位于聚合物中的末端位置处。

[0294] 在其他实施方案中，亚基每次出现时独立地具有下列结构 (VI)：

[0295]



(VI)

[0296] 其中：

[0297] L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物；

[0298] RP 为反应产物；

[0299] L^4为任选的连接物；以及

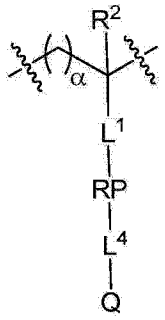
[0300] Q 表示固体基底外表面。

[0301] 在一些实施方案中，L^4至多 100 个原子长度。

[0302] 在其他实施方案中，E 亚基的每一种具有上述结构 (VI)。

[0303] 在上述固体支撑物的其他实施方案中，E 亚基每次出现时独立地具有下列结构 (VII)：

[0304]



(VII)

[0305] 其中：

[0306] L^1为任选的至多 100 个原子长度的连接物；

[0307] RP 为反应产物；

[0308] L^4为任选的连接物；

[0309] R^2为 H 或烃基；以及

[0310] Q 表示固体基底外表面。

[0311] 在其他实施方案中，E 亚基的每一种具有上述结构 (VII)。

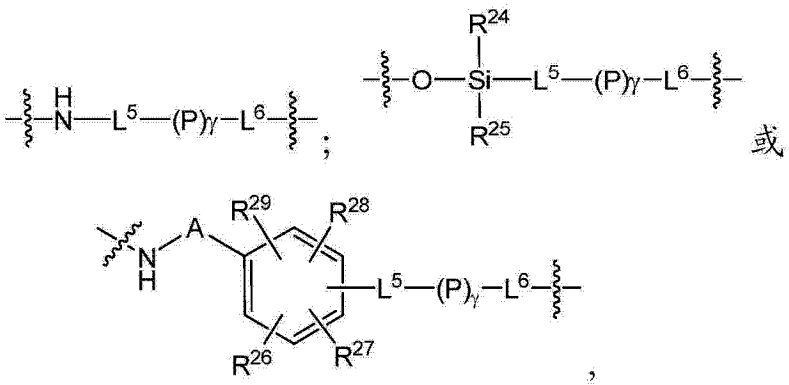
[0312] 在上述固体支撑物的另外其他的实施方案中，其中 L^1包含亚烃基、酯、酶或二硫代部分，或其组合。在其他实施方案中 L^1不存在。

[0313] 在一些实施方案中，α 为 1。在其他实施方案中，R^2为 H。

[0314] 在上述固体支撑物的另外其他的实施方案中 L^4包含硅－氧键、亚烃基链、聚合物或其组合。例如，在一些实施方案中聚合物为聚乙二醇。在一些方面，聚乙二醇包含 1 至 50,000（例如，10 至 50,000）个单体亚基。在其他实施方案中聚乙二醇包含 1 至 90 个单体亚基。例如，在其他实施方案中聚乙二醇包含 55 至 90 个单体亚基。

[0315] 在上述固体支撑物的一些实施方案中，L^4具有下列结构中的一种：

[0316]



[0317] 其中：

[0318] L^5和 L^6各自独立地为包含亚烃基、烯化氧、酰亚胺、醚、酯或酰胺部分或其组合的任选的连接物；

[0319] R^{24}和 R^{25}各自独立地为 H、羟基、烃基、烃氧基或 -OQ，其中 Q 为固体基底外表面；

[0320] R^{26}、R^{27}、R^{28}和 R^{29}各自独立地为 H、烃基、卤素、腈、硝基或铵；

[0321] P 表示聚合物亚基；

[0322] A 为直接键或 $-S(O)_2-$；以及

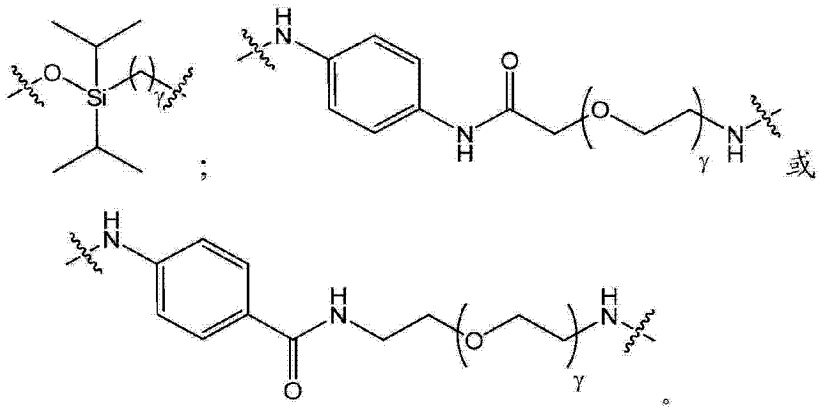
[0323] γ 为 1 至 2000 的整数，

[0324] 其中 L^4 通过末端氮原子或氧原子与固体基底结合。

[0325] 在上述的某些实施方案中，P 为 $-CH_2-$ 或 $-OCH_2CH_2-$。

[0326] 在其他实施方案中，L^4 具有下列结构中的一种：

[0327]

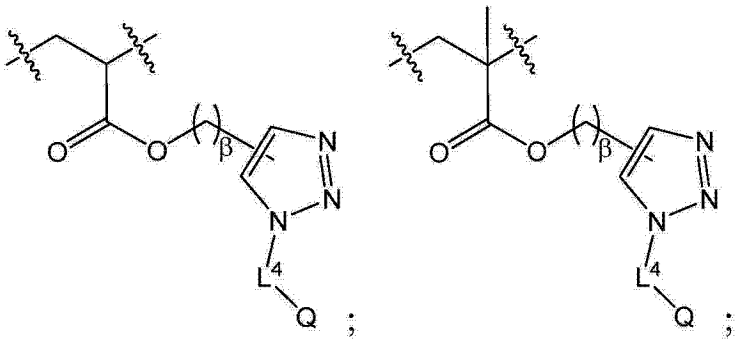


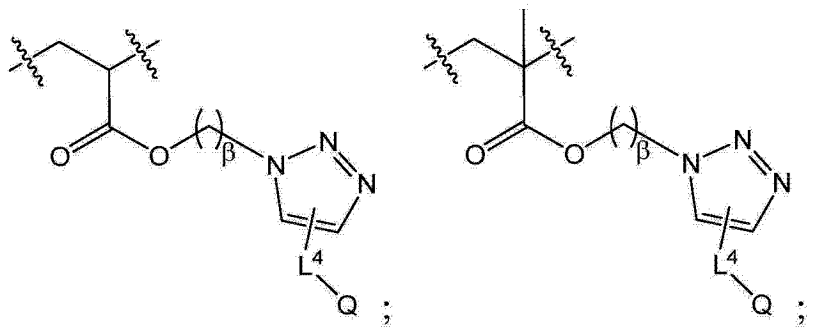
。

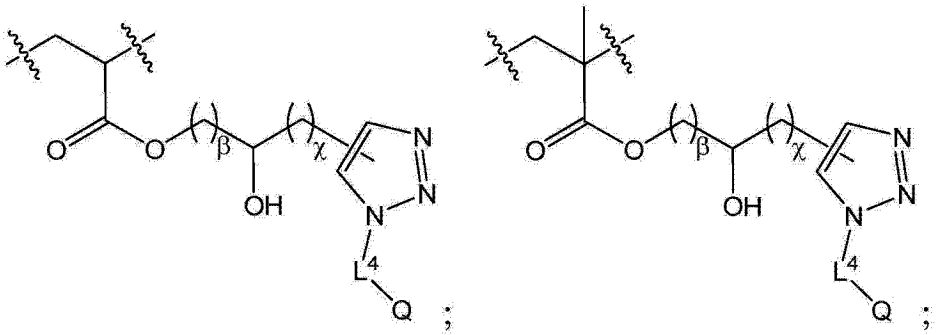
[0328] 在某些实施方案中，γ 为 1 至 90，例如为 55 至 90。在其他实施方案中，L^4 不存在。

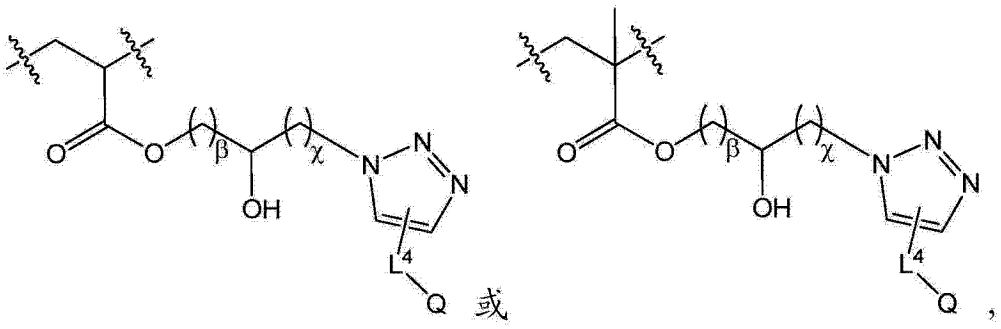
[0329] 在上述固体支撑物的一些实施方案中，点击官能团为三唑。例如，在一些实施方案中 E 亚基每次出现时独立地具有下列结构中的一种：

[0330]









[0331] 其中：

[0332] β 和 x 各自独立地为 1 至 5 的整数；

[0333] L^4为任选的连接物；以及

[0334] Q 表示固体基底。

[0335] 在其他实施方案中，每一种 E 亚基具有上述结构中的一种。

[0336] 在其他实施方案中，至少一种 E 亚基位于共价结合至 T^4的末端位置处。例如，在一些实施方案中 T^4为 H。

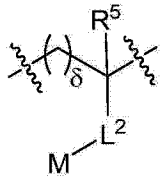
[0337] 在某些实施方案中，L^4包含一个或多个聚乙二醇重复单元。

[0338] 在上述固体支撑物的其他实施方案中，B 亚基为如在上述所描述的聚合物的任何一个实施方案中对 B 亚基所定义的。在上述固体支撑物的一些其他实施方案中，D 亚基为

在上述所描述的聚合物的任何一个实施方案中对 C 亚基所定义的。

[0339] 在某些实施方案中，至少一种 D 亚基包含与捕获探针的共价键。例如，在一些实例中至少一种 D 亚基具有下列结构 (VIII)：

[0340]



(VIII)

[0341] 其中：

[0342] M 为捕获探针；

[0343] R^5为氢或烃基；

[0344] L^2为任选的至多 100 个原子长度的连接物；以及

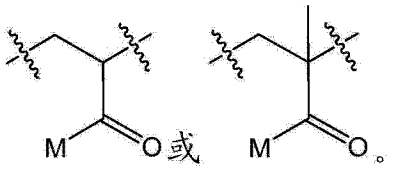
[0345] δ 为 0 至 10 的整数。

[0346] 在其他实施方案中，D 亚基的每一种具有上述结构 (VIII)。

[0347] 在一些实施方案中，L^2包含亚烃基、酯、羰基、烯化氧、酰胺、酰亚胺、醚或二硫代部分，或其组合。在其他实施方案中，δ 为 1。在另外其他的实施方案中，R^5为 H。

[0348] 在上述固体支撑物的其他实施方案中，至少一种 D 亚基具有下列结构中的一种：

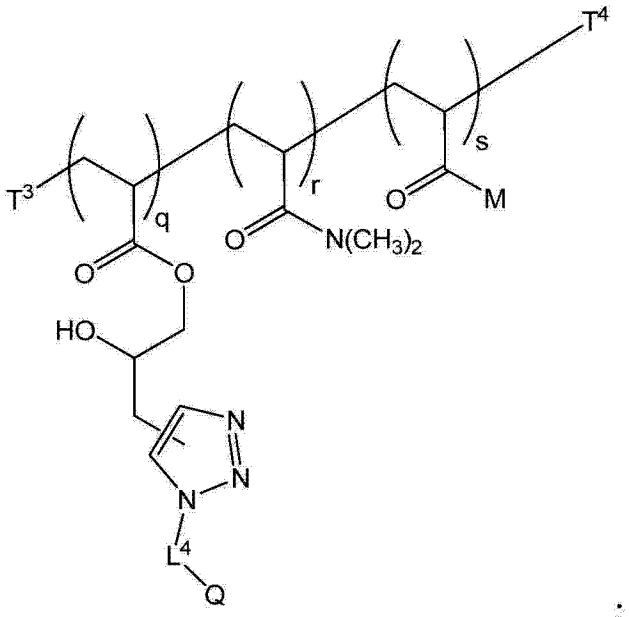
[0349]



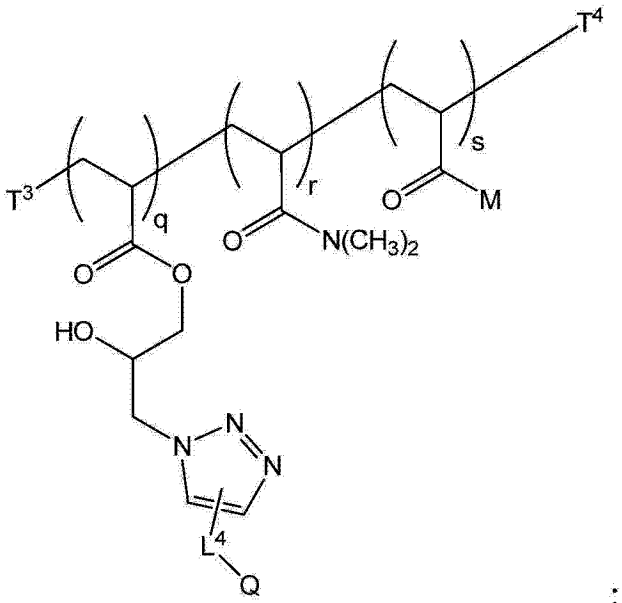
[0350] 在其他实施方案中，每一种 D 亚基具有上述结构中的一种。

[0351] 在上述固体支撑物的另外其他的实施方案中，固体支撑物的表面具有下列结构中的一种：

[0352]

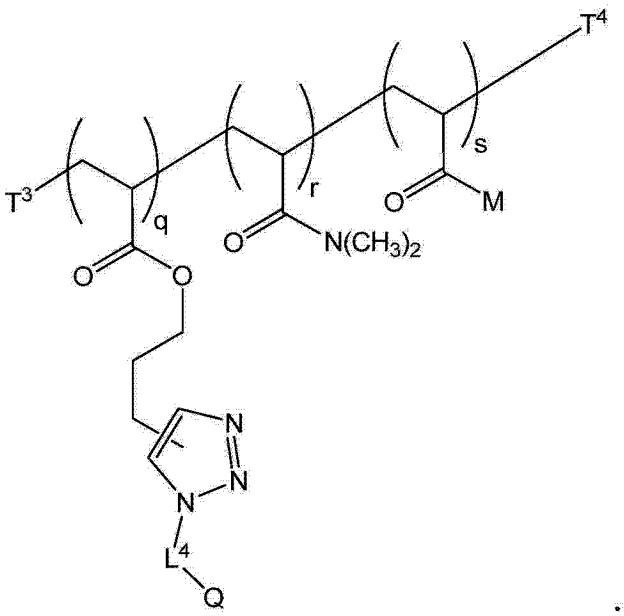

T4
T3
q
r
s
O
M
O
N(CH3)2
O
O
HO
N
N
N
L4
Q

;

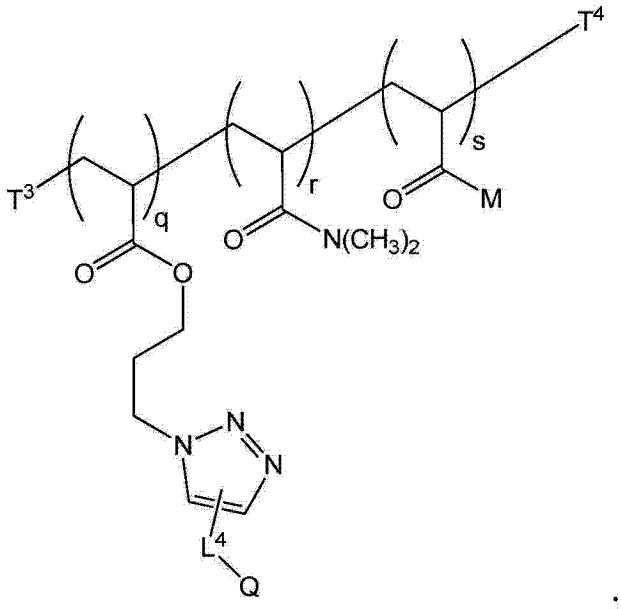

T4
T3
q
r
s
O
M
O
N(CH3)2
O
O
HO
N
N
N
L4
Q

;

[0353]

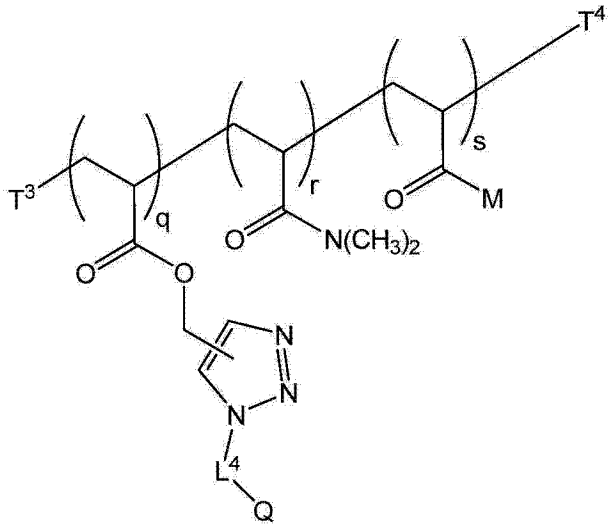


;

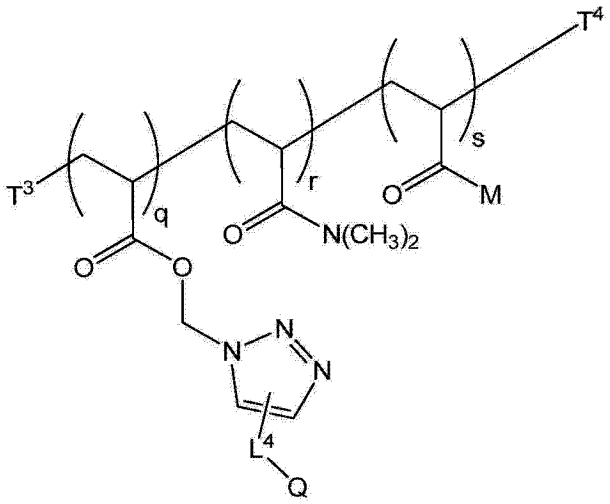


;

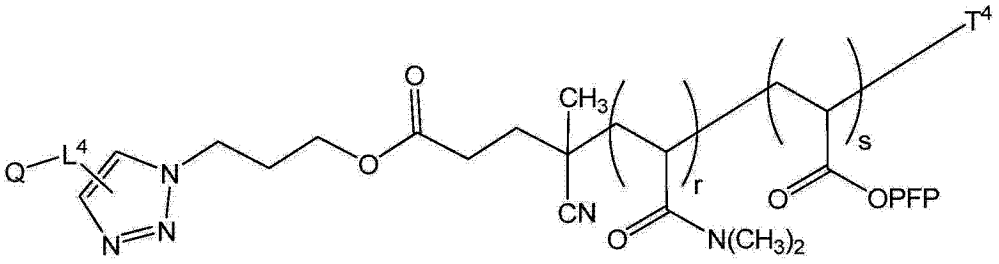
[0354]



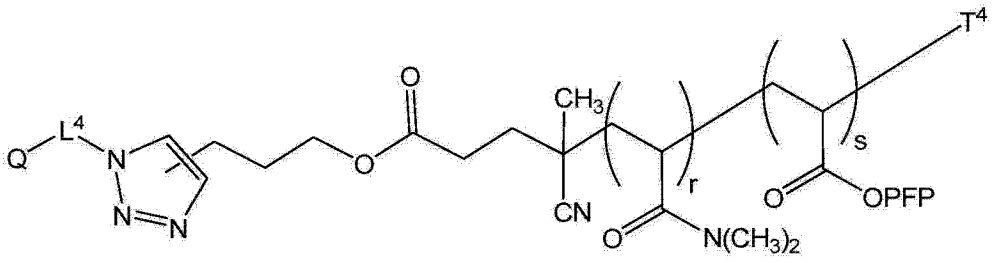
;



;



或



,

[0355] 其中：

[0356] B 亚基、D 亚基和 E 亚基在聚合物中存在至少一次；

[0357] T^3和 T^4各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；

[0358] q、r 和 s 各自独立地为 1 至 350,000 的整数；

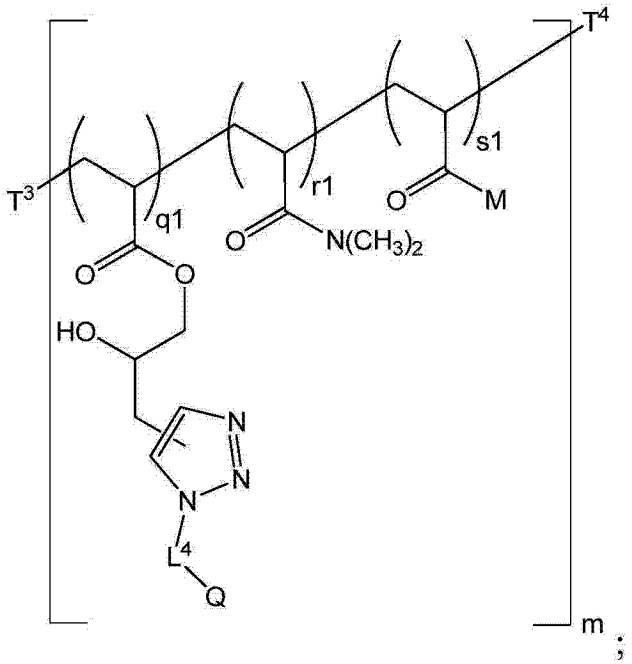
[0359] L^4为任选的连接物；

[0360] M 每次出现时独立地表示捕获探针；以及

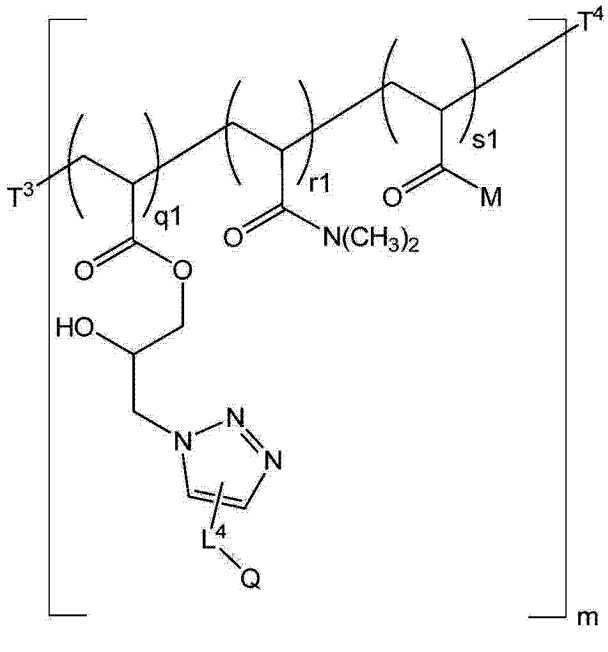
[0361] Q 表示固体基底外表面。

[0362] 在上述固体支撑物的一些其他实施方案中，固体支撑物的表面具有下列结构中的一种：

[0363]

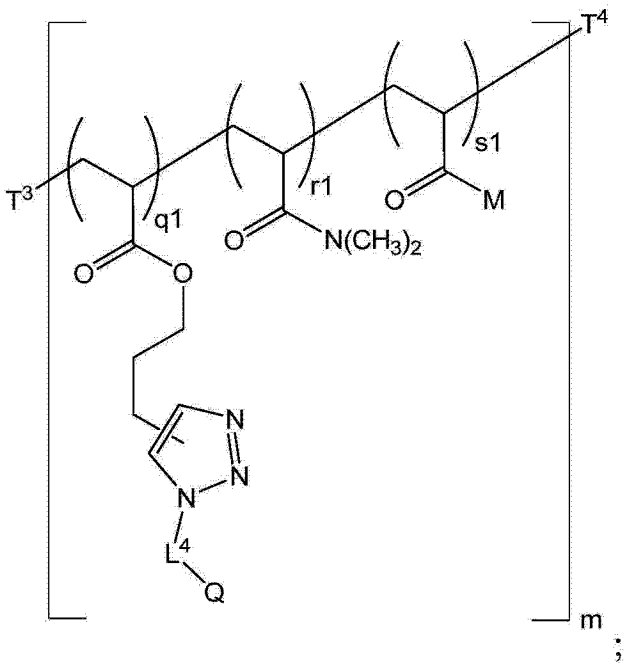


；

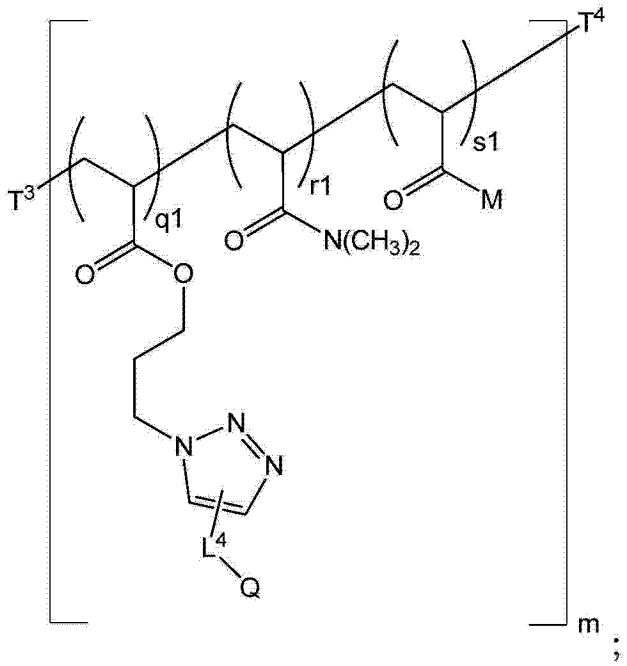


；

[0364]

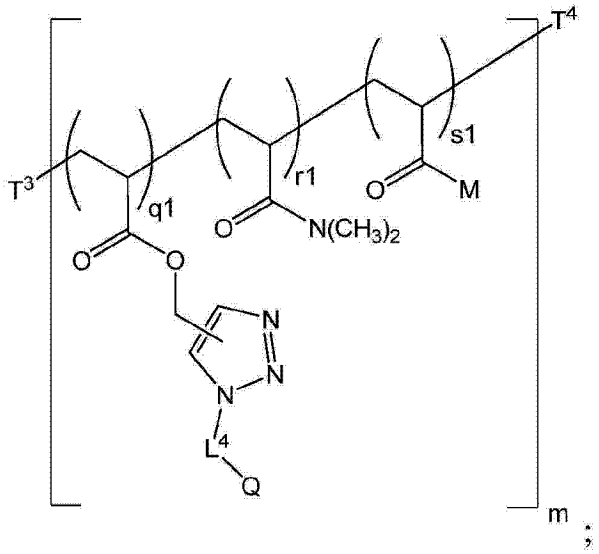

T4
s1
T3
r1
q1
O
M
O
N(CH3)2
O
O
N
N
N
L4
Q
m

;

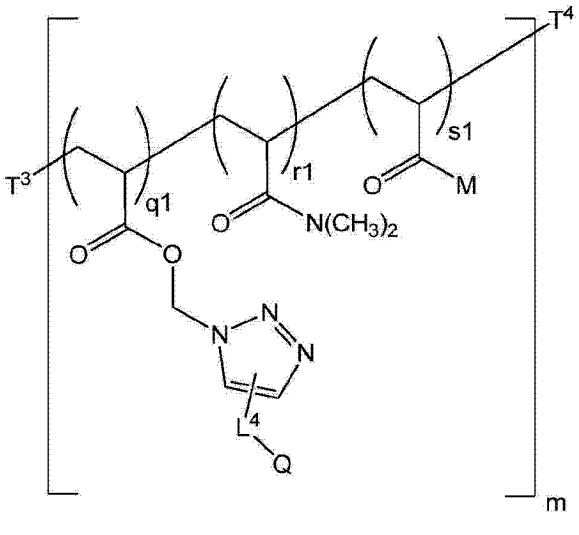

T4
s1
T3
r1
q1
O
M
O
N(CH3)2
O
O
N
N
N
L4
Q
m

;

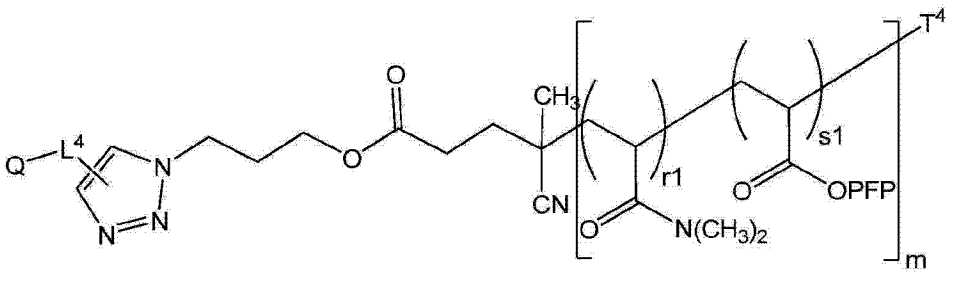
[0365]



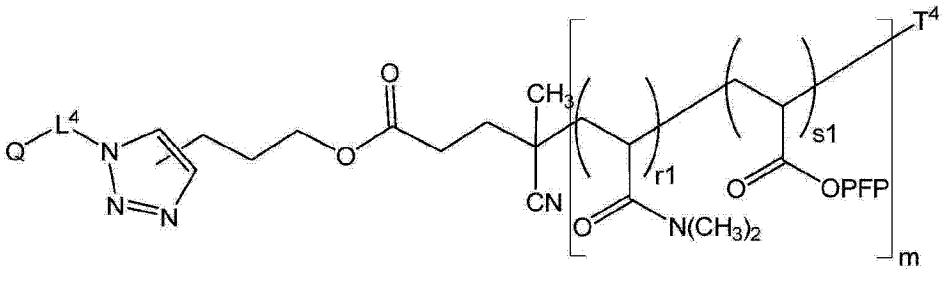
;



;



或



,

[0366] 其中：

[0367] B 亚基、D 亚基和 E 亚基在聚合物中存在至少一次；

[0368] T^3和 T^4各自独立地不存在或为选自于 H、烃基和引发剂残基的聚合物末端基团；

[0369] q1、r1 和 s1 每次出现时独立地为 0 或 1；

[0370] L^4为任选的连接物；

[0371] M 每次出现时独立表示捕获探针

[0372] Q 表示固体基底外表面；以及

[0373] m 为 1 至 150,000 的整数。

[0374] 在上述的某些实施方案中，L^4如在上述实施方案的任何一种中所定义的。

[0375] 在上述固体支撑物的其他实施方案中，捕获探针通过氮原子与 D 亚基共价结合。在一些方面捕获探针为肽、蛋白质、碳水化合物、多核苷酸、寡核苷酸或多肽。例如，在一些实施方案中捕获探针为多核苷酸，例如 DNA。

[0376] 可控制固体支撑物的水接触角（例如，通过控制 B 亚基的数目和类型）以使其能够与溶解在溶剂（例如水性溶剂）中的分析物分子发生界面反应。在这方面，通常调整水接触角以提高溶解的分析物与固体支撑物的反应性表面（也就是，具有固定于其上的聚合物的表面）之间的接触。在一些实施方案中，固体支撑物的水接触角为约 50° 至 90°，例如为约 50° 至 70°。在一些实施方案中水接触角为约 55° 至 65°，在其他实施方案中水接触角为约 60° 至 65°，甚至其他的实施方案在其他实施方案中水接触角为约 80° 至 90°。水接触角的测定方法为本领域所熟知。

[0377] 因此，在一些实施方案中，在聚合物中至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%或至少 99%的亚基为 B 亚基。

[0378] 在其他实施方案中，B 亚基、D 亚基和 E 亚基的摩尔分数可发生改变。例如 B 亚基、D 亚基和 E 亚基的每一种的摩尔分数可从约 0.1 摩尔%至约 99.8 摩尔%改变。在一些典型的实施方案中，B 亚基、D 亚基和 E 亚基总数的总摩尔百分数为 100%。

[0379] 在某些实施方案中，E 亚基的摩尔百分数为约 1%至约 30%，例如约 15%至约 25%。在其他实施方案中，B 亚基的摩尔百分数为约 20%至约 60%，例如约 35%至约 45%。在其他实施方案中，D 亚基的摩尔百分数为约 20%至约 60%，例如约 35%至约 45%。在其他进一步的实施方案中，E 亚基的摩尔百分数为约 15%至约 25%，B 亚基的摩尔百分数为约 35%至约 45%以及 D 亚基的摩尔百分数为约 35%至约 45%。在另外其他的实施方案中，E 亚基的摩尔百分数为约 20%，B 亚基的摩尔百分数为约 40%以及 D 亚基的摩尔百分数为约 40%。

[0380] 在某些实施方案中，聚合物只包含一种 E 亚基。例如，在一些实施方案中 E 亚基位于聚合物的末端。

[0381] 不限制本发明实际使用的固体基底的类型。通常固体基底可为适于固定所公开的聚合物和/或适于活化的类型以便可将该聚合物固定于其上。本发明范围内的固体基底包括但不限于，光学透明的和不透明的聚合物。在某些实施方案中还包括二维基底、珠、颗粒、多孔基质和多孔整料形式的固体基底。

[0382] 在一些实施方案中，固体基底包含有机聚合物。例如，在一些实施方案中固体支撑物包含聚（苯乙烯）、聚（碳酸酯）、聚（醚砜）、聚（酮）、聚（脂族醚）、聚（芳基醚）、聚（酰胺）、聚（酰亚胺）、聚（酯）、聚（丙烯酸酯）、聚（甲基丙烯酸酯）、聚（烯烃）、聚（环

烯烃）、聚（乙烯醇）或其共聚物、卤化衍生物或交联衍生物。在某些实施方案中，该卤化衍生物为卤化聚（芳基醚）、卤化聚（烯烃）或卤化聚（环烯烃）。在一些具体的实施方案中，固体基底包含聚（环烯烃）。

[0383] 在另外其他的实施方案中，固体基底包含氧化物。例如，在一些实施方案中固体基底包含硅、熔融二氧化硅、玻璃、石英、氧化铟锡、二氧化钛、氧化铝或其组合。

[0384] 包含有机聚合物的、具有包含氧化层的外表面的固体基底也包括在本发明的范围内。

[0385] 本发明的某些实施方案包括固体支撑物在分析测定中的用途。通常此类测定包括光学分析步骤，例如荧光测定。因此，在一些实施方案中固体基底基本上为光学透明的。在其他实施方案中，固体基底基本上在约 400nm 和约 800nm 之间为光学透明的。在另外其他的实施方案中，固体基底为至少约 90％光学透明的。

[0386] 本发明的其他某些实施方案涉及固体支撑物在分析阵列－类型测定中的用途。因此，一些实施方案提供了固体支撑物，其中该固体支撑物包含不同位置的系统阵列，每个不同位置独立地包含缀合至其上的至少一种聚合物。例如，在一些实施方案中每个不同位置独立地包含缀合至其上的多种聚合物。在更具体的实施方案中，在每个不同位置处的至少一种聚合物包含通过 D 亚基共价结合至其上的捕获探针，以及在其他实施方案中每个不同位置包含结合至其上的至少一种捕获探针，其中该捕获探针在结构上不同于在每一个其他不同位置处结合的至少一种捕获探针。在进一步的实施方案中，每个不同位置包含多种结合至其上的在结构上不同的分析物分子。

[0387] 在上述固体支撑物的多种实施方案中，捕获探针为肽、蛋白质、碳水化合物、多核苷酸、寡核苷酸、寡肽或多肽。在具体的实施方案中，捕获探针为多核苷酸，例如 DNA。在多种实施方案中，多核苷酸或 DNA 包含与分析物多核苷酸或 DNA 分子的序列互补的序列。

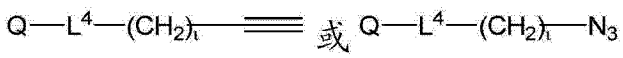
[0388] C. 活化的固体基底

[0389] 在另一方面，本发明涉及具有活化的外表面的固体基底。固体基底可用于许多固体－支撑的应用。在一些实施方案中，固体基底包含共价结合至固体基底外表面的叠氮化物或炔部分。例如此类固体基底可用于制备包含固定于其上的聚合物和／或捕获探针的固体支撑物的方法中。在具体的实施方案中，固体基底可通过点击反应将所公开的聚合物共价连接于固体支撑物。

[0390] 因此，在某些实施方案中本发明涉及包含外表面的固体基底，其中固体基底包含与外表面共价结合的叠氮化物或炔部分。

[0391] 在一些实施方案中，固体基底具有下列结构中的一种：

[0392]



[0393] 其中：

[0394] Q 表示固体基底外表面；

[0395] L^4为任选的连接物；

[0396] 以及 ι 为 0 至 10 的整数。

[0397] 本发明的发明人发现可选择 L^4连接物部分从而优化固体基底的水接触角，以与在不同极性的溶剂中的聚合物进行界面反应。因此，在某些具体的实施方案中，L^4存在。固体

基底的水接触角为约 50° 至 90°，例如约 50° 至 70°。在一些实施方案中水接触角的范围为 55° 至 65°。在某些实施方案中水接触角为 60° 至 65°。在某些其他实施方案中水接触角为 80° 至 90°。

[0398] 在一些具体的实施方案中，L^4包含聚乙二醇聚合物，并且在某些这些实施方案中该聚乙二醇聚合物包含 1-90 个乙二醇亚基，例如 55-90 个乙二醇亚基。

[0399] 在一些其他实施方案中，L^4为在上述包含固于其上的聚合物的固体基底的上述任何一个实施方案中所定义的。而且，没有具体限制所用的固体基底的类型（例如，聚合物、氧化物等）。在某些实施方案中，固体支撑物的组合物为在上述固体支撑物的任何一个实施方案中所描述的，该固体支撑物包含固定于固体基底上的聚合物。在一些其他实施方案中，ι 为 1、2 或 3。

[0400] 在一些其他实施方案中，本发明涉及包含外表面的固体基底，其中该固体基底包含与外表面共价结合的氨基部分。在某些实施方案中，固体支撑物的组合物为在上述固体支撑物的任何一个实施方案中所描述的，该固体支撑物包含固定于胺化的固体基底上的含酯或含吖内酯的正交聚合物。该正交聚合物包含用于随后的生物缀合的叠氮化物或炔部分。

[0401] D. 方法

[0402] 本发明的某些实施方案涉及方法。此类方法包括但不限于制备本文所描述的聚合物、活化的固体基底和固体支撑物的方法。还提供了固体支撑物在分析测定中的使用方法。例如，固体支撑物可用在检测多种分析物（例如病毒、细菌、疟原虫属、真菌、以及金属和未知的生物 - 战争材料、生物 - 危害材料和化学战争材料）的测定中。

[0403] 用于分析多种分析物的固体支撑物的使用方法对本领域技术人员来说是显而易见的。例如在第 61/463,580、61/561,198、1/684,104 和 61/600,569 号临时美国专利申请，第 13/399,872 号美国专利申请和第 2012/0214686 号美国公开中描述了此类方法，其全部公开内容为了所有目的在此通过引用整体并入本文中。图 2 中示意性地描述了使用所公开的固体支撑物的示例性方法。

[0404] 如图 2A 中所描述，在该方法的一个实施方案中分析物探针包含段 A 和段 B。A 段任选地包含淬灭剂部分，该淬灭剂可位于 A 段的 3’端处或位于 A 段中任何其他位点。A 段与靶分析物序列（例如，病原体 DNA 等）的至少一部分互补。分析物探针还包含段 B（“翼”）。该翼包含荧光团和与结合至固体支撑物的捕获探针的序列的至少一部分互补的序列。任选地，可选择分析物探针的序列从而 A 段和翼具有至少一些互补性以便将淬灭剂和荧光团带至紧密临近，从而降低了与未结合的分析物探针有关的荧光信号和增加了测定的整体灵敏性。

[0405] 测定条件通常包括具有对不同靶分析物特异的独特序列的多种分析物探针。在 PCR 条件下，和在互补（或至少部分互补）靶分析物存在的情况下，翼从分析物探针上切割。然后将切割的翼杂交至与翼互补（或至少部分互补）的固体支撑物 - 结合的捕获探针上。在与捕获探针结合的位置处荧光信号的存在（或增加）表明靶分析物序列存在。

[0406] 图 2B 描述了替代实施方案。在这个典型的实施方案中，翼包含淬灭剂并且支撑物结合的捕获探针包含荧光团。再次地，可分别改变淬灭剂或荧光团在翼或捕获探针上的确切位置。在 PCR 条件下在靶分析物序列存在的情况下，翼从探针上切割。然后将该翼与捕

获探针杂交从而使捕获探针上的荧光团淬灭。因此，在与捕获探针结合的位置处荧光不存在（或降低）表明靶分析物序列存在。

[0407] 然而图 2C 中提供了另一示例性方法。在此，探针包含与靶分析物序列至少部分互补的序列并且不包含可切割的翼。在这个实施方案中探针包含淬灭剂并且支撑物－结合的捕获探针包含荧光团。使探针与捕获探针杂交，导致在与捕获探针结合的位置处产生淬灭的信号。然后使固体支撑物经受 PCR 条件。在靶分析物序列存在的情况下，将探针淬灭剂切割下来并且捕获探针的荧光信号增加。

[0408] 因此，在一实施方案中，本发明通常涉及测定靶分析物分子存在或不存在的方法，该方法包括：

[0409] a) 提供如本文所描述的固体支撑物，其中 D 亚基每次出现时独立地包含共价结合于其上的捕获探针；

[0410] b) 使分析物探针或其片段与固体支撑物接触；以及

[0411] c) 检测由捕获探针与分析物探针相互作用产生的信号存在或不存在。

[0412] 在其他相关的实施方案中，本发明提供了检测靶核酸的方法，该方法包括：

[0413] A) 提供包括本文所描述的至少一种固体支撑物的检测室，该固体支撑物包含捕获探针的阵列；

[0414] B) 将样品装载入检测室中，该样品包含待检测的靶核酸的一个或多个拷贝；

[0415] C) 使扩增引物和探针与一个或多个拷贝杂交；

[0416] D) 在依赖扩增引物的扩增反应中扩增一个或多个靶核酸拷贝的至少一部分，其中该扩增反应导致切割探针和释放第一探针片段；

[0417] E) 使第一探针片段与高效率阵列杂交；以及，

[0418] F) 检测由第一探针片段结合至阵列产生的信号，从而检测靶核酸。

[0419] 在某些实施方案中，在降低邻近阵列的背景信号的条件下进行检测步骤。

[0420] 在其他实施方案中，该方法包括分析多种靶核酸序列的样品，该方法包括：

[0421] A) 使样品与第一多个经标记的探针接触，该第一多个经标记的探针中的每一个包含：第一部分，其与第一组靶核酸序列中感兴趣的不同靶序列互补，和第二部分，其与高效率探针阵列上不同的捕获探针互补，该高效率探针阵列包含如本文所描述的固体支撑物，其中该第二部分具有连接至其上的标记且不与感兴趣的靶序列互补；

[0422] B) 在依赖扩增引物的扩增反应中扩增样品中存在的第一组靶核酸序列中的任何靶序列，其中该扩增反应导致切割与靶序列杂交的经标记的探针和释放具有标记的经标记的探针的第二部分；

[0423] C) 使所释放的经标记的探针的第二部分与高效率阵列杂交；

[0424] D) 检测经标记的探针的第二部分与高效率阵列中捕获探针的结合；以及

[0425] E) 从与高效率阵列杂交的经标记的探针的第二部分鉴定样品中的存在的靶序列。

[0426] 在另外其他的实施方案中，本发明提供了检测样品中靶核酸序列存在的方法，该方法包括：

[0427] A) 在存在第一经标记的探针的情况下，所述第一经标记的探针包含与第一靶核酸序列互补的第一部分和不与第一靶核酸序列互补的第二经标记的部分，用具有核酸酶活性的聚合酶在样品上进行扩增反应，从而当靶核酸序列进行扩增时使第二部分从第一部分切

割；

[0428] B) 使第二经标记的部分杂交至与第二部分互补的捕获探针；该捕获探针与本文所描述的固体支撑物共价结合；以及

[0429] C) 检测与基底上捕获探针杂交的第二经标记的部分的存在。

[0430] 上述方法的另外其他实施方案包括检测样品中的靶核酸序列的方法，该方法包括：

[0431] A) 在存在包含第一探针的试剂的情况下，所述第一探针包含与靶核酸序列互补的第一部分和不与第一靶核酸序列互补的第二部分，该第二部分包含在第一位置处与该第二部分偶联的第一淬灭剂部分，用具有核酸酶活性的聚合酶在样品上进行扩增反应，从而当靶核酸序列进行扩增时，使第二部分作为第一探针片段从第一部分切割；

[0432] B) 使第一探针片段与固定在本文所描述的固体支撑物上的捕获探针杂交，其中该捕获探针包含荧光团，其通过第一淬灭剂部分至少部分被淬灭，该荧光团在捕获探针上与第二位置偶联，从而通过探针片段与捕获探针杂交，该荧光团被淬灭剂至少部分地淬灭；以及

[0433] C) 基于捕获探针上荧光团的猝灭检测靶序列的存在。

[0434] 在另一实施方案中，本发明涉及检测样品中至少第一靶核酸序列存在的方法，该方法包括：

[0435] A) 在本文所描述的固体支撑物存在的情况下使样品经受能够扩增靶核酸序列的扩增反应，其中固体支撑物包含至少第一组核酸探针，该第一组核酸探针包含捕获探针和与捕获探针的至少一部分以及靶核酸序列互补的靶特异性核酸探针，该捕获探针包含与其连接的荧光团，该靶特异性核酸探针包含与其连接的淬灭剂，从而当使靶特异性探针与捕获探针杂交时，该淬灭剂淬灭荧光团的荧光；以及

[0436] B) 在聚合酶链式反应的一个或多个周期之后检测样品的荧光，荧光增加指示靶核酸序列的存在。

[0437] 本发明还提供了包括本文所描述的固体支撑物和固体基底的设备和消耗品。在一实施方案中，本发明提供了核酸检测设备，该核酸检测设备包括：

[0438] A) 检测室，该检测室包括在室的至少一个表面上的至少一种高效率核酸检测阵列，该核酸检测阵列包含本文所描述的固体支撑物，其中将该室配置为对阵列检测的信号降低信号背景；

[0439] B) 热调节模块，其与检测室可操作地偶联，在设备操作期间该模块调节室内的温度；以及，

[0440] C) 光学系统，其检测在设备操作期间由阵列产生的信号。

[0441] 在其他实施方案中，本发明提供了核酸检测消耗品，该核酸检测消耗品包括：在深度上少于约 500 μm 的薄的室，该室包括光学透明的窗，该窗包括设置在该窗内表面的高效率捕获核酸阵列，该室额外包括与该室流体地偶联的至少一个试剂递送口，其中将消耗品配置为允许液体在室内热循环，其中高效率捕获核酸阵列包括本文所描述的固体支撑物。

[0442] 在某些实施方案中，靶分析物分子为 DNA 序列，该 DNA 序列具有表明病原体（例如病毒、细菌、疟原虫属或真菌）存在的序列。

[0443] 在一些实施方案中，分析物探针为翼。在一些其他实施方案中，分析物探针包含淬

灭剂。在一些其他实施方案中，分析物探针包含荧光团。在另外其他的实施方案中，捕获探针包含荧光团。在另外其他的实施方案中，探针包含寡核苷酸。

[0444] 固体支撑物可为本文所描述的固体支撑物中的任何一种。进一步地，在某些实施方案中，捕获探针为多核苷酸，且在其他实施方案中靶分析物分子为多核苷酸。在另外其他的实施方案中，通过聚合酶链式反应来制备靶分析物分子。

[0445] 在一些其他实施方案中，信号为荧光信号。例如，在一些实施方案中，该荧光信号是由于靶分析物分子与捕获探针的特异性杂交而产生。

[0446] 在其他相关的实施方案中，本发明提供了检测样品中的分析物的方法。该方法包括：使分析物与本发明的固体支撑物接触以允许通过本发明的固体支撑物的捕获探针捕获分析物，和检测分析物的捕获。在某些实施方案中，分析物为生物分子，例如多肽、核酸、碳水化合物、脂质或其混合物。在其他实施方案中，分析物为有机分子例如药物、药物候选物、辅因子或代谢物。在另一实施方案中，分析物为无机分子，例如金属络合物或辅因子。在一个典型的实施方案中，分析物为核酸，其为经标记的探针。在另一典型的实施方案中，本发明提供了反应性表面，其共价地固定蛋白质、酶、抗体、抗原、激素、碳水化合物、糖缀合物或合成产生的分析物靶例如合成产生的表位（其可在随后的步骤中用于捕获和检测分析物）。

[0447] 在多种其他的实施方案中，本发明提供了用本发明的固体支撑物检测靶核酸的方法。该方法包括使可检测的经标记的核酸探针片段与固定在本发明的固体支撑物的聚合物上的互补序列的核酸结合。示例性方法包括：

[0448] A) 使扩增引物和可检测的经标记的探针与靶核酸杂交；

[0449] B) 在依赖引物的扩增反应中扩增靶核酸的至少一部分，其中该扩增反应导致切割经标记的探针和释放经标记的探针片段；以及

[0450] C) 使经标记的探针片段与固定的测定组分杂交，其中所述组分为与所述经标记的探针片段至少部分互补的核酸，从而检测所述核酸。

[0451] 分析物的检测可通过任何本领域公认的方法或设备来完成。在某些实施方案中，通过由固定在固体支撑物上的分析物或探针产生的荧光信号来检测分析物。在示例性实施方案中，本发明的固体支撑物为核酸阵列，并且信号由荧光标记的核酸产生，该荧光标记的核酸与固定在固体支撑物的聚合物上的测定组分杂交。在多种实施方案中，固定的测定组分为具有与荧光标记的核酸的序列至少部分互补的序列的核酸。在其中分析物被荧光标记的选择的实施方案中，通过荧光检测器例如 CCD 阵列来进行检测。在某些实施方案中该方法涉及通过将样品施加到固体支撑物的一个或多个可寻址的位置并检测在一个或多个可寻址的位置处捕获的分析物，来图谱表征样品中某一类分析物（例如，生物分子，例如，核酸）。用于实施本发明的方法的实例包括在第 61/561,198 号临时美国申请和第 13/399,872 号美国申请中所描述的内容，其全部公开内容为了所有目的在此通过引用整体并入本文中。

[0452] 在一些实施方案中，本发明的固体支撑物用于分离和检测测定混合物中的分析物。具体地，本发明固体支撑物用于进行基本上任何形式的测定，包括但不限于聚合酶链式反应 (PCR)、色谱法捕获、免疫测定、竞争性测定、DNA 或 RNA 结合测定、荧光原位杂交 (FISH)、蛋白质和核酸图谱表征测定、三明治测定等。下列讨论集中于本发明的固体支撑物

实施示例性测定的用途。此焦点仅仅为了清楚的说明而非意欲定义或限制本发明的范围。本领域技术人员应明白，本发明的方法可广泛应用于对检测分析物的存在和 / 或量的任何测定技术。

[0453] 在多种实施方案中，本发明提供了使用本发明的固体支撑物来检测靶核酸的方法。该方法包括使可检测的经标记的核酸探针片段与互补序列的核酸结合，该互补序列的核酸固定在本发明的固体支撑物的反应性聚合物上。示例性方法包括 ：

[0454] A) 使扩增引物和可检测的经标记的探针与靶核酸杂交 ；

[0455] B) 在依赖引物的扩增反应中扩增靶核酸的至少一部分，其中扩增反应导致切割经标记的探针和释放经标记的探针片段 ；以及

[0456] C) 使经标记的探针片段杂交至固定的测定组分，其中所述组分为与所述经标记的探针片段至少部分互补的核酸，从而检测所述核酸。

[0457] 样品可来自于任何来源，且可以为生物样品，例如来自于一个有机体或相同或不同物种的一组有机体的样品。生物样品可以为体液的样品，例如血液样品、血清样品、淋巴液样品、骨髓样品、腹水、胸膜液、盆腔洗液、眼内液、尿、精液、痰或唾液。生物样品还可以为皮肤、鼻、咽喉或生殖器拭子的提取物、或排泄物的提取物。生物样品还可以为器官或组织的样品，包括肿瘤。生物样品还可以为细胞培养物的样品，包括原核细胞和真核细胞两者的细胞系和原代培养物。

[0458] 样品可来自于环境，例如来自于水体或土壤，或来自于食物、饮料，或水源、工业来源、工作场所区域、公共区域或生活区域。样品可以为提取物，例如土壤或食物样品的液态提取物。样品可以为从例如工具、衣物、人工制品或其他材料的物品中由洗涤或浸泡或悬浮拭子而得的溶液。样品还包括用于鉴定生物战试剂的样品，例如已知或未知来源的粉末或液体的样品。

[0459] 样品可为未处理的或处理过的样品 ；处理过程可涉及增加样品中组分的纯度、浓度或可得性的步骤，以促进样品的分析。作为非限制性实例，处理过程可包括减少样品的体积、去除或分离样品的组分、溶解样品或一个或多个样品组分、或破坏、改性、暴露、释放或隔离样品组分的步骤。此类过程的非限制性实例为离心、沉淀、过滤、均质化、细胞裂解、抗体结合、细胞分离等。例如，在本发明的一些优选实施方案中，样品为例如通过去除红细胞、通过浓缩、通过选择一个或多个细胞或病毒类型（例如，白细胞或病原性细胞）或通过细胞裂解等至少部分被处理的血液样品。

[0460] 示例性样品包括至少部分纯化的核酸分子的溶液。核酸分子可来自于单种来源或多种来源，并且可包含 DNA、RNA 或两者。例如，核酸分子的溶液可为此类样品，使该样品经受下列步骤中的任何一步 ：细胞裂解、浓缩、萃取、沉淀、核酸选择（例如，多聚腺苷酸 RNA 选择或包含 Alu 元件的 DNA 序列的选择）、或用一个或多个酶进行处理。该样品还可为包含合成的核酸分子的溶液。

[0461] 在示例性实施方案中，当本发明的固体支撑物用于检测和 / 或表征核酸时，本发明的固体支撑物为具有不同序列的多个核酸的核酸阵列，该核酸在固体支撑物的已知位置处与表面 - 结合的聚合物共价结合。在多种实施方案中，固体支撑物为反应容器的组分，在该反应容器中在包含在测定混合物中的靶核酸样品上进行 PCR。在示例性方法中，使一个或多个核酸引物和可检测的经标记的核酸探针与靶核酸杂交。在 PCR 模板延伸期间，探针被

切割，产生探针片段。该探针片段从靶核酸上释放并被表面结合的聚合物上的固定的分析物组分（其为核酸）捕获。探针序列通过其在阵列上的结合位置来进行确定。

[0462] 在多种实施方案中，为了检测测定混合物中的一个或多个种类，将本发明的固体支撑物用作多重测定的部件。本发明的固体支撑物具体用于进行多重－类型分析和测定。在示例性多重分析中，用两种或更多种探针检测两个或更多个不同种类（或一个或多个种类的区域），其中每一种探针用不同的荧光团进行标记。本发明的固体支撑物允许多重测定的设计，其中多于一种的可检测的经标记的探针结构可用于测定。使用本发明的固体支撑物的多种不同的多重测定对本领域的技术人员来说是显而易见的。在一种示例性测定中，至少两种不同荧光团的每一个用于发出核酸探针片段与表面固定的核酸杂交的信号。

[0463] 用于实施本发明的方法的示例性经标记的探针为核酸探针。有用的核酸探针包括可在多种 DNA 扩增／定量策略中被用作检测试剂组分的那些核酸探针，其中该 DNA 扩增／定量策略包括，例如 5'－核酸酶测定、链置换扩增 (SDA)、基于核酸序列的扩增 (NASBA)、滚环扩增 (RCA) 以及在溶液相或固相（例如，阵列）测定中靶的直接检测。而且，固体支撑物和寡聚物可用于基本上任何形式的探针中，包括例如，选自于分子信标、Scorpion 探针™、Sunrise 探针™、构象辅助探针、点亮探针、入侵探针和 TaqMan™探针的形式。参见，例如，Cardullo，R.，等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,85:8790-8794(1988)；Dexter,D.L.,J.Chem.Physics,21:836-850(1953)；Hochstrasser,R.A.，等，Biophysical Chemistry,45:133-141(1992)；Selvin,P.,Methods in Enzymology,246:300-334(1995)；Steinberg，I.，Ann.Rev.Biochem.,40:83-114(1971)；Stryer，L.，Ann.Rev.Biochem.，47:819-846(1978)；Wang，G.，等，Tetrahedron Letters,31:6493-6496(1990)；Wang，Y.，等，Anal.Chem.,67:1197-1203(1995)；Debouck,C.，等，Supplement to Nature Genetics，21:48-50(1999)；Rehman,F.N.，等，Nucleic Acids Research,27:649-655(1999)；Cooper，J.P.，等，Biochemistry,29:9261-9268(1990)；Gibson，E.M.，等，Genome Methods，6:995-1001(1996)；Hochstrasser,R.A.，等，Biophysical Chemistry,45:133-141(1992)；Holland,P.M.，等，Proc Natl.Acad.Sci USA,88:7276-7289(1991)；Lee,L.G.，等，Nucleic Acids Rsch.,21:3761-3766(1993)；Livak,K.J.，等，PCR Methods and Applications,Cold Spring Harbor Press(1995)；Vamosi，G.，等，Biophysical Journal,71:972-994(1996)；Wittwer，C.T.，等，Biotechniques,22:176-181(1997)；Wittwer，C.T.，等，Biotechniques,22:130-38(1997)；Giesendorf，B.A.J.，等，Clinical Chemistry，44:482-486(1998)；Kostrikis，L.G.，等，Science,279:1228-1229(1998)；Matsuo，T.，Biochemica et Biophysica Acta,1379:178-184(1998)；Piatek，A.S.，等，Nature Biotechnology,16:359-363(1998)；Schofield，P.，等，Appl.Environ.Microbiology，63:1143-1147(1997)；Tyagi S.，等，Nature Biotechnology,16:49-53(1998)；Tyagi，S.，等，Nature Biotechnology,14:303-308(1996)；Nazarenko，I.A.，等，Nucleic Acids Research,25:2516-2521(1997)；Uehara，H.，等，Biotechniques,26:552-558(1999)；D.Whitcombe，等，Nature Biotechnology,17:804-807(1999)；Lyamichev，V.，等，Nature Biotechnology,17:292(1999)；Daubendiek，等，Nature Biotechnology，15:273-277(1997)；Lizardi,P.M.，等，Nature Genetics,19:225-232(1998)；Walker,G.，等，Nucleic Acids Res.,20:1691-1696(1992)；Walker，G.T.，等，Clinical Chemistry，

42:9-13(1996);以及 Compton,J.,Nature,350:91-92(1991),其公开内容为了所有目的各自通过引用整体并入本文。

[0464] 在多种实施方案中,本发明提供了检测靶核酸序列中的多态性的方法。多态性是指在群体中出现两种或更多种遗传上确定的可选择的序列或等位基因。多态性标记物或位点为出现分歧的基因座。示例性标记物具有至少两种等位基因,其各自以大于所选择群体的 1%,且更优选地大于所选择群体的 10%或 20%的频率出现。多态性基因座可以小到如一个碱基对。多态性标记物包括限制性片段长度多态性、可变数目串联重复序列(VNTR)、高变区、小卫星、二核苷酸重复、三核苷酸重复、四核苷酸重复、简单序列重复和插入元件例如 Alu。第一鉴定的等位基因形式被任意指定为参照形式并且其他等位基因形式被指定为可选择的或不同的等位基因。在所选择的群体中最经常出现的等位基因形式有时会称为野生型形式。二倍体有机体对于等位基因形式可以为纯合的或杂合的。双等位基因的多态性具有两种形式。三等位基因的多态性具有三种形式。

[0465] 在示例性实施方案中,本发明的固体支撑物用于检测单核苷酸多态性。单核苷酸多态性出现在由单核苷酸占据的多态性位点处,其为在等位基因序列之间变异的位点。该位点通常在等位基因的高度保守的序列(例如,在低于群体的 1/100 或 1/1000 成员中变化的序列)之前或之后。单核苷酸多态性发生通常是由于在多态性位点处一个核苷酸被另一个核苷酸的取代。转换为一个嘌呤被另一个嘌呤替代或一个嘧啶被另一个嘧啶替代。颠换为嘌呤被嘧啶替代,反之亦然。单核苷酸多态性发生还可由相对于参照等位基因删除核苷酸或插入核苷酸引起。

[0466] 在检测多态性的实施方案中,多态性核酸结合至固体支撑物的可寻址的位置处。在具体位置处出现可检测信号指示在靶核酸序列中多态性存在。

[0467] 在示例性实施方案中,将探针用荧光团部分作可检测标记。对于为具体的探针选择适当的荧光团在文献中可获得大量的实际指导,如下列引用内容所例证的 :Pesce 等,Eds.,FLUORESCENCE SPECTROSCOPY(Marcel Dekker,New York,1971);White 等,FLUORESCENCE ANALYSIS:A PRACTICAL APPROACH(Marcel Dekker,New York,1970) 等。对于选择荧光团文献还提供了详尽的荧光和发色分子系列以及其相关的光学性能的参考内容(参见,例如,Berlman,HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES,2nd Edition(Academic Press,New York,1971);Griffiths,COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES(Academic Press,New York,1976);Bishop,Ed.,INDICATORS(Pergamon Press,Oxford,1972);Haugland,HANDBOOK OF FLUORESCENCE PROBES AND RESEARCH CHEMICALS(Molecular Probes,Eugene,1992)Pringsheim,FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE(Interscience Publishers,New York,1949) 等。进一步地,在文献中对于通过常见的反应基团(其可加入到核酸中)共价连接的衍生荧光团分子有大量的指导,如下列引用内容所例证 :Haugland(supra);Ullman 等,第 3,996,345 号美国专利;Khanna 等,第 4,351,760 号美国专利。因此,对具体的应用选择能量交换对,和使该对的成员与探针分子(例如,核酸、肽或其他聚合物)缀合完全在本领域技术人员的能力内。

[0468] 鉴于有关使小分子与核酸缀合的文献的完善的正文,使供体 / 受体对与核酸连接的许多其他方法对本领域技术人员来说是显而易见的。例如,在固相合成结束后,通过被亚磷酰胺部分衍生化的染料,罗丹明和荧光素染料可方便地与核酸的 5'- 羟基连接(参见,例

如 Woo 等，第 5,231,191 号美国专利；以及 Hobbs，Jr.，第 4,997,928 号美国专利）。

[0469] 更具体地，对于将基团连接至核酸的 5’- 或 3’- 端有许多连接物部分和方法学，如下列引用内容所例证：Eckstein，编者，Nucleic acids and Analogues:A Practical Approach(IRL Press,Oxford,1991)；Zuckerman 等，Nucleic Acids Research，15:5305-5321(1987)（核酸上的 3’- 硫醇基团）；Sharma 等，Nucleic Acids Research，19:3019(1991)(3’- 巯基）；Giusti 等，PCR Methods and Applications,2:223-227(1993) and Fung 等，第 4,757,141 号美国专利（通过可从 P.E.Biosystems,CA 获得的 Aminolink TM II,5’- 磷氨基基团）Stabinsky，第 4,739,044 号美国专利 (3- 氨基烃基磷酰基基团）；Agrawal 等，Tetrahedron Letters,31:1543-1546(1990)（通过亚磷酰胺键的连接）；Sproat 等，Nucleic Acids Research,15:4837(1987)(5- 巯基基团）；Nelson 等，Nucleic Acids Research,17:7187-7194(1989)(3’- 氨基基团）等。

[0470] 检测荧光标记的手段为本领域技术人员所熟知。因此，例如，可通过用适当波长的光激发荧光团并检测所得的荧光来检测荧光标记。利用感光胶片、通过利用电子检测器例如电荷偶联固体支撑物 (CCD) 或光电倍增管等可视觉上检测荧光。相似地，通过对酶提供适当的底物并检测所得的反应产物可检测酶促标记。

[0471] 尽管通过引用内容例证了带荧光标记的核酸的检测，但是本发明的固体支撑物还用于分析物分子的检测。当用结合基团将聚合物官能化时，固体支撑物会捕获与特定基团结合的表面分析物。可将未结合的物质洗掉，并且分析物可用许多方式来进行检测，这些方式包括例如，气相离子光谱测定法、光学方法、电化学方法、原子力显微术和无线电频率方法。示例性光学方法包括，例如，荧光、发光、化学发光、吸光度、反射度、透光度、双折射或屈光指数的检测（例如，表面等离子共振现象、椭圆光度法、石英晶体微天平、共振反射镜方法、光栅耦合器波导方法（例如，波长 - 询问光学传感器 (“WIOS”) 或干涉量度法））。光学方法包括显微镜术（共聚焦和非共聚焦两种），成像方法和非成像方法。多种形式的免疫测定（例如，ELISA) 对在固相上捕获的分析物的检测是普遍方法。电化学方法包括伏安法和电流测定法。无线电频率方法包括多极共振分光术或干涉量度法。光学方法包括显微镜术（共聚焦和非共聚焦两种），成像方法和非成像方法。多种形式的免疫测定（例如，ELISA) 对在固相上捕获的分析物的检测是普遍方法。电化学方法包括伏安法和电流测定法。无线电频率方法包括多极共振分光术。

[0472] 本领域技术人员凭经验可确定有利于本发明的寡聚物与靶核酸分子之间杂交的条件，其可包括最佳孵育温度、盐浓度、寡核苷酸类似物探针的长度和碱基组成以及样品的寡聚物和核酸分子的浓度。优选地，杂交在存在至少 1 毫摩尔镁离子和 pH 为 6.0 以上的情况下进行。在一些实施方案中，可能必需或期望在杂交之前处理样品以使得样品的核酸分子成为单链的。此类处理的实例包括但不限于，用碱处理（优选地随后进行中和）、在高温下孵育或用核酸酶处理。

[0473] 此外，因为与核酸杂交的盐依赖性主要是由杂交寡核苷酸类似物的主链的电荷密度确定的，增加本发明的 HypNA-pPNA 寡聚物或 SerNA-pPNA 寡聚物中的 pPNA 单体的比率可增加杂交的盐依赖性。这可用于本发明的方法中以获利，其中在一些方面其可期望能够通过改变盐的条件从而增加杂交的严格度，例如，或通过降低盐浓度而释放杂交的核酸。在本发明的其他方面，可期望本发明的寡核苷酸类似物在极低浓度的盐中对核酸具有高亲和力

结合。在这种情况下，本发明的寡核苷酸类似物中的 HypNA 比 pPNA 单体保持接近 1:1 的比率是有利的。

[0474] 本发明的寡聚物在与靶核酸分子结合中的高度特异性允许从业者选择杂交条件，其可有利于辨别核酸序列和靶核酸分子，该核酸序列包含与一个或多个寡聚物的至少一部分完全互补的序列段，该靶核酸分子包含在基本上互补性序列中包含少量非互补性碱基的序列段。例如，可选择杂交或洗涤温度来允许在本发明的寡聚物与沿着序列段完全互补的靶核酸分子之间产生稳定的杂交物，但是会促进在本发明的寡聚物与不完全互补（在互补序列段包括含有 1 或 2 个碱基错配）的靶核酸分子之间的杂交物的解离。选择杂交和洗涤的温度至少部分可取决于其他条件，例如盐浓度、寡聚物和靶核酸分子的浓度、寡聚物与靶核酸分子的相对比例、待杂交的寡聚物的长度、寡聚物和靶核酸分子的碱基组成、寡核苷酸类似物分子的单体组成等。此外，当选择有利于完全互补分子的杂交物稳定的条件和不利于在寡聚物与由一个或多个碱基错配的靶核酸分子之间的杂交物稳定的条件时，还可考虑额外的条件，当需要时，所改变的条件包括但不限于，待杂交的寡核苷酸类似物的长度，寡聚物和靶核酸分子之间互补性序列段的长度，在互补性序列段内的非互补碱基数目，错配碱基的同一性，邻近错配碱基的碱基的同一性，和任何错配碱基在互补性段的相对位置。核酸杂交领域的技术人员能够确定在使用本发明的寡聚物用于与靶核酸分子杂交中的有利的杂交和洗涤条件，其取决于特定应用。“有利的条件”可以是对寡聚物与靶核酸分子（其至少部分基本上互补，包括含有一个或多个错配的靶核酸分子）之间的稳定的杂交物有利的条件。

[0475] “有利的条件”可以是对寡聚物和（至少部分地）完全互补的靶核酸分子之间的稳定的杂交物有利的条件，和不利于不完全互补的分子之间的杂交物或使其不稳定的条件。

[0476] 利用例如本文所公开的方法，可确定本发明寡聚物与不同序列的靶核酸分子杂交的熔融温度并且可将其用于确定对于指定应用的有利条件。还可能通过例如使靶核酸分子与连接至固体支撑物的寡聚物杂交和检测杂交复合物凭经验确定有利的杂交条件。

[0477] 通过寡聚物探针与固体支撑物的直接或间接连接，可将与固体支撑物或本发明的寡聚物探针结合的靶核酸分子与调查群体的未结合的核酸分子便利地和有效地分离。可在高严格度下洗涤固体支撑物以去除未与寡聚物探针结合的核酸分子。然而，寡聚物探针与固体支撑物的连接并不是本发明的需求。例如，在一些应用中通过经过基质的离心分离，或通过相分离或通过一些任选地可借助于合并于寡聚物探针中的化学基团的其他形式的分离（例如，差别沉淀）（参见，例如，2000 年 5 月 9 日提交的第 6,060,242 号美国专利，Nie 等），可将结合和未结合的核酸分子分离。

[0478] 在示例性实施方案中，将本发明固体支撑物使用在实时 PCR 测定中，例如在第 13/399,872 号共同拥有的、共同待决的美国专利申请中所描述的。

[0479] 在本发明的其他方法中，本发明涉及制备具有与其结合的探针分子的固体支撑物的方法，该方法包括使包含与固体支撑物外表面共价结合的叠氮化物或炔部分（如上文所描述的）的固体支撑物与上文所描述的包含 A 亚基、B 亚基和 C 亚基的聚合物相接触。

[0480] 在其他实施方案中，该方法还包括使 Cu(I) 催化剂与固体支撑物和聚合物接触。进一步的实施方案包括使具有胺官能团的探针分子与包含与其结合的聚合物的固体支撑物接触以制备包含与其结合的探针分子的固体支撑物。此类方法在许多应用中具有实用

性，例如 DNA 微阵列的制备等。

[0481] 通过引用以不至于与本文说明书相矛盾的程度将本文说明书中所引用的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开以其整体并入本文。

[0482] 从上述内容中应明白，尽管为了示例说明的目的描述了本发明的具体实施方案，但是可在不偏离本发明的精神和范围的情况下进行各种改变。因此，本发明除受所附权利要求限制外不受限制。

[0483] 为了示例说明的目的但不是为了限制，提供了下列实施例。

实施例

[0484] 实施例 1

[0485] Boc-NH-PEG57- 乙酰 -(4- 叠氮基) 酰基苯胺的合成

[0486] 将 4- 叠氮基苯胺盐酸盐 (51mg,300 μmol, Sigma-Aldrich) 溶解在水 (10mL) 和 1N NaOH(10mL) 中，然后萃取到 EtOAc(3×20mL) 中。用水、然后用饱和 NaCl 洗涤有机相，然后经 Na_2SO_4进行干燥。蒸发产生琥珀油形式的叠氮基苯胺的游离碱。将玻璃器皿全部包裹在箔材中以使其暴露于室内光线最小化。在分离瓶 (经烘箱干燥) 中放入平均分子量 2800 的 Boc- 氨基 -PEG57- 乙酸 NHS 酯 (280mg,100 μmol, Laysan Bio, Arab, AL) 与无水 DMF(250 μL) 和 TEA(27 μL,200 μmol)。向其加入在少量 DMF 中的叠氮基苯胺。用 Ar 吹扫该瓶，然后用箔材密封覆盖，并摇振过夜。通过 TLC(DCM/MeOH/TEA,80:20:1) 观测到单独的 UV- 活性产物 (Rf = 0.25) 和未反应的叠氮基苯胺 (Rf = 0.88)。将反应混合物用 EtOAc(5mL) 稀释并且通过向涡旋己烷逐滴加入来沉淀出产物以及将产物留在 -20C 的冰箱过夜。将沉淀物收集在玻璃料上，用己烷洗涤，然后将其再次溶解在 EtOAc 中并如前一样再次沉淀出。收集之后，将产物经 MeOH 再次干燥直到恒重 (189mg,65％)。将米黄色、吸湿性的固体密封并储存在黑暗中直至使用。1H-NMR(400MHz, DMSO-d6) δ :9.36(s, 1H),7.69(d,2H),7.08(d,2H),6.62(dd,1H),4.07(s,2H),3.4-3.6(m,230H),2.91(dd,2H), 1.37(s,9H) ;13C-NMR δ :172.24,172.17,168.80,156.11,136.19,134.73,121.71,119.91, 73.18,51.87,40.08,28.78。

[0487] 实施例 2

[0488] Boc-NH-PEG44- 乙酰 -(4- 叠氮基) 酰基苯胺的合成

[0489] 将 4- 叠氮基苯胺盐酸盐 (100mg,600mol, Sigma-Aldrich) 溶解在水 (20mL) 和 1N NaOH(20mL) 中，然后萃取到 EtOAc(3×40mL)。萃取物如上述进行处理以产生游离碱。在分离瓶 (经烘箱干燥) 中放入平均分子量为 2000 的 Boc- 氨基 -PEG44- 乙酸 NHS 酯 (400mg,200 μmol, Laysan Bio, Arab, AL) 和无水 DMF(1000 μL) 和 TEA(55 μL,400 μmol)。向其加入在少量 DMF 中的叠氮基苯胺。将该瓶用 Ar 吹扫，密封、覆盖并摇振过夜。通过 TLC(DCM/MeOH/TEA,80:20:1) 观察到单独的 UV- 活性产物 (Rf = 0.38) 和未反应的叠氮基苯胺 (Rf = 0.88)。用 EtOAc(10mL) 稀释反应混合物并且通过向涡旋戊烷逐滴加入来沉淀出产物以及将产物留在 -20C 冰箱过夜。将沉淀物收集在玻璃料上，用己烷洗涤，然后将其再次溶解在 EtOAc 中并且如前一样再次沉淀出。在收集后，产物经 MeOH 进行再次干燥直至恒重 (272mg,65％)。将米黄色、吸湿性的固体密封并储存在黑暗中直至使用。

1H-NMR(DMSO-d6) δ:9.69(s,1H),7.69(d,2H),7.08(d,2H),6.74(dd,1H),4.07(s,2H),3.53(s,2H),3.46-3.52(m,178H),3.05(dd,2H),1.37(s,9H)。

[0490] 实施例 3

[0491] N-(4- 叠氮基苯甲酰基) 聚烯丙基胺的合成

[0492] 该过程是从 Sugawara 等,Macromolecules 27,7809-14,(1994) 改进而来。制备 $KHCO_3$(0.28g,2.8mmol) 的水 (42mL) 溶液。向其加入分子量为 120-200K 的聚烯丙基胺盐酸盐 (Alfa Aesar 0.69g,～ 9.4mmol 胺),4- 叠氮基苯甲酸 (TCI,0.38g,2.8mmol) 和 DMF(14mL)。在冰浴中搅拌并冷却该混合物。然后逐滴缓慢加入 EDC(0.59g,3.1mmol) 在 DMF(1mL) 和水 (0.5mL) 的混合物中的溶液。将反应混合物搅拌至室温过夜,并屏蔽环境光线。过夜,溶液的 pH 为 6.7。将溶液转移至大的透析管 (Snakeskin MWCO7000,Pierce) 并在水 (14L) 中透析 24 小时。换水 2 次,总透析时间为 72 小时。透析液在微量离心管中冷冻并冻干 (Speedvac) 以产生 0.70g 叠氮基苯甲酰基聚合物。1H-NMR(D2O) δ:7.87(s,2H),7.03(d,2H),3.01(br s,8.8H),1.96(br s,4.4H),1.48(br s,4.4H)。基于芳香族质子对脂肪族质子 (聚合物主链) 的比率,叠氮基苯甲酰基取代基为约 1 个 / 每 4.4 个胺,或 23%。

[0493] 实施例 4

[0494] 载玻片的表面预处理

[0495] 将玻璃显微镜载玻片 (1”×3”×1mm) 在包含 0.5wt% SDS 溶液的玻璃染色罐中超声处理 20 分钟,并用 DI 水充分冲洗。随后将其在 29% NH_4OH、30% H_2O_2和 DI 水 (以 1:1:5v/v 比率) 的混合物中超声处理 20 分钟,并用 DI 水充分冲洗。然后将载玻片在 38% HCl、30% H_2O_2和 DI 水 (以 1:1:6v/v 比率) 的混合物中超声处理 20 分钟,并用 DI 水充分冲洗。将预处理的载玻片储存在加盖的罐中的 DI 水中。在使用之前,将载玻片从其水储存中取出,用氩气吹干,并在 110℃下烘烤 5 分钟。该预处理的载玻片表现出水接触角 <10° 。

[0496] 实施例 5

[0497] 用 3- 氨丙基二异丙基乙氧基硅烷进行载玻片硅烷化

[0498] 将 5 个预处理的载玻片浸入螺纹 - 加盖的聚丙烯染色管中的无水 EtOH(30mL)、3-氨丙基二异丙基乙氧基硅烷 (500μL) 和三乙基胺 (TEA,20L) 的混合物中。将该管在轨道式震荡器上轻轻涡旋 2-3 小时。将载玻片从反应混合物中取出,用大量 95% EtOH 冲洗,用氩气吹干,并在 110℃烘箱中退火 5 分钟。甲硅烷基化的玻璃载玻片表现出 55.8° ±1.8° 的水接触角,并且其在制备后立即使用。

[0499] 实施例 6

[0500] 制备包含一个或多个叠氮化物或炔亚基以及 N,N- 二甲基丙烯酰胺和五氟苯基丙烯酸酯亚基的聚合物的常规过程

[0501] 在使用之前,将亚基分别在 58-60℃ /3.5mm Hg 和 42-43℃ /5 托下通过真空蒸馏进行纯化。向玻璃安瓿中的包含含有叠氮化物或炔的亚基 (根据所需聚合物的摩尔比),DMA(991.3mg,10.0mmol),PFPA(238.11mg,1.0mmol),2,2’- 偶氮二 (2,4- 二甲基戊腈) (1.0mg) 和 ACN(3.0mL) 的混合物中鼓入超纯氩气 1 分钟。然后将安瓿密封并放入 55℃油浴中 22 小时。破坏密封,在减压下去除溶剂,并将残余物溶解在最低量的 THF 中。将 THF 溶液在恒定搅拌条件下逐滴加入到 10 倍体积的正戊烷中。将沉淀的聚合物离心并弃去上清。将聚合物在戊烷 (40mL) 中研磨,过滤,并在 40℃下真空干燥。

[0502] 该常规过程适用于制备具有炔或叠氮化物亚基、DMA 和 PFPA 的多种共聚物。改变亚基的比率以得到不同比率的聚合物。

[0503] 实施例 7

[0504] 聚合物通过点击化学在固体基底上表面固定的常规过程

[0505] 使根据实施例 6 制备的聚合物在包含 Cu(I) 的溶液中与外表面上包含炔或叠氮化物部分（取决于聚合物包含炔还是叠氮化物）的固体基底接触。去除溶剂和剩余的反应物，例如通过洗涤，以得到包含通过三唑部分共价连接的聚合物的固体支撑物。水接触角约为 50° 至 70° 。

[0506] 因为聚合物通过炔或叠氮化物官能团连接于固体基底，所以活化的酯可用于以正交方式缀合至捕获探针。

[0507] 实施例 8

[0508] 聚合物通过活化的酯在固体基底上表面固定的常规过程

[0509] 在包含 ACN(30mL) 的聚丙烯载玻片染色管中加入 TEA(150 μL) 和如实施例 6 中所述制备的聚合物。向该溶液中浸入 4 个氨基甲硅烷基化的显微镜载玻片并轻轻翻滚 4-16 小时。将其取出，用大量乙腈冲洗，并用氩气吹干。水接触角为约 50° 至 70° 。

[0510] 因为聚合物通过活化的酯连接于固体基底，所以炔或叠氮化物官能团可用于通过点击化学缀合至捕获探针。

[0511] 实施例 9

[0512] 制备包含炔或叠氮化物、N,N- 二甲基丙烯酰胺和 2- 乙烯基 -4,4'- 二甲基吖内酯亚基的聚合物

[0513] 将 2- 乙烯基 -4,4' - 二甲基吖内酯 (VAL，Polysciences，Inc.) 在 26-27℃ /600 毫托下通过真空蒸馏进行纯化。将在 ACN(30mL) 中的再蒸馏的 DMA(4.80g,48.5mmol)、VAL(0.74g,5.39mmol)、炔或叠氮化物亚基（根据所需聚合物的摩尔比）和 AIBN(15.9mg,0.097mmol) 的混合物放入 150-mL 14/20 三颈瓶中，该三颈瓶配有水冷冷凝器、与超纯 Ar 连接的 20cm 19- 量规 SS 采血针和与矿物油鼓泡器连接的 19 量规 SS 排气针。将氩气鼓入通过溶液 20 分钟，然后将该瓶浸入 71℃油浴中恒定搅拌 3-4 小时。在减压 60℃下去除溶剂。将残余物在 50℃真空下干燥 2-3 小时以产生包覆在瓶壁上的玻璃状聚合物。然后将聚合物再次溶解在甲基乙基酮 (15mL) 中。在恒定搅拌下逐滴加入石油醚直至溶液变成浑浊。然后将该浑浊悬浮物在剧烈搅拌下逐滴加入到过量石油醚 (200mL) 中。弃去所得的上清并将残余的聚合物在新鲜石油醚 (200mL) 中研磨 10 分钟。将沉淀的聚合物过滤，用石油醚冲洗，并真空干燥。通过调整单体亚基的比率以相似的方式可制备出包含不同比率的亚基的聚合物。

[0514] 实施例 10

[0515] 叠氮基苯甲酰基 -(10mol％)- 聚（烯丙胺）从溶液中通过 UV 接枝到 COC 载玻片上，并且聚合物随后表面固定于其上

[0516] 通过将包含约 10mol％ 4- 叠氮基苯甲酰基基团的 N- 叠氮基苯甲酰基 - 聚（烯丙胺）(4.0mg) 溶解至 DI 水 (180 μL) 中，制备接枝溶液。用 95％ EtOH 充分冲洗 COC 载玻片 (1”×3”×1mm) 并用 Ar 吹干。在 UV- 接枝之前干燥的 COC 载玻片表现出水接触角大于 85° 。将等份的聚合物溶液 (90 μL) 转移至 COC 载玻片的中心，并且通过在其顶部放置石

英载玻片 (1”×3”×1mm) 使聚合物溶液扩展以覆盖整个 COC 载玻片。总共制备 2 个样品用于 UV 接枝。将三明治组件放置在 365nm UV 光源 (BondWang,Electro-Lite Corp.,10mW/cm2) 下方 5cm 处并暴露于 UV 辐照 15 分钟。将三明治组件浸入到 DI 水中并分离 COC 载玻片以及用 DI 水充分冲洗。然后载玻片在 0.5N HCl(30mL) 中翻滚 60 分钟。将 0.5N HCl 进行一次替换并进行额外的 60min 翻滚,然后其都用 DI 进行冲洗并用 Ar 吹干。接触角为 31.7° ±3.7° 。

[0517] 向聚丙烯染色管中的无水乙腈 (30mL) 中加入 TEA(150μL) 和实施例 6 制备的聚合物。将 2 个经洗涤的和干燥的 UV- 接枝的 COC 载玻片浸入该溶液中并轻轻翻滚 4-16 小时,然后取出,用乙腈充分冲洗,并用氩气吹干。

[0518] 所得的表面固定的聚合物包含可用于通过点击化学缀合至捕获探针的炔或叠氮化物部分。可利用类似过程将聚合物固定在其中表面包含叠氮化物或炔而不是胺的固体基底上。

[0519] 可将该过程应用于多种叠氮基苯甲酰基 - 聚 (烯丙胺) 组合物中用于随后在 COC 或 COP 表面上 UV- 接枝,所述组合物具有一系列 4- 叠氮基苯甲酰基取代基水平。

[0520] 实施例 11

[0521] Boc- 氨基 -PEG_{57}- 乙酰 -(4- 叠氮基) 酰基苯胺的干燥膜通过 UV 在 COP 载玻片上接枝、代表性聚合物的氨基基团的去保护以及随后的表面固定

[0522] 通过将 Boc- 氨基 -PEG_{57}- 乙酰 -(4- 叠氮基) 酰基苯胺 (20.1mg) 溶解在 DI 水 (200μL) 中来制备接枝溶液。用 95% EtOH 充分冲洗 COP 载玻片 (1”×3”×1mm) 并用 Ar 吹干。干燥的载玻片表现出大于 90° 的水接触角。通过在开放空气中电晕放电处理载玻片的一侧,使载玻片在电晕处理机 (Electro-Technic Products,Inc.,Model BD-20) 下方 0.5cm 距离处通过 7 次。电晕处理的表面表现出 40.0° ±1.9° 的水接触角。将等份的接枝溶液 (100μL) 放置到电晕处理的表面的中心并用不锈钢抹刀将其扩展至覆盖整个表面。接枝溶液均匀地覆盖表面并在黑暗的箱中在环境温度下过夜蒸发之后干燥形成薄膜。然后将载玻片干燥膜朝上放置在 365nm UV 光源 (BondWang,Electro-Lite Corp.,10mW/cm2) 下方 5cm 处并暴露于 UV 辐照 15 分钟。用乙腈充分冲洗该被 UV- 辐照的表面并用氩气吹干以产生水接触角为 57.1° ±1.6° 的接枝表面。为了去保护接枝的氨基基团,将载玻片浸入 5% 三氟乙酸的 MeOH 液中并翻滚 60 分钟。然后用大量 MeOH 冲洗载玻片并用 Ar 吹干以产生水接触角为 61.9° ±3.7° 的胺表面。

[0523] 随后将载玻片浸入包含实施例 6 制备的聚合物和 TEA(150μL) 在 ACN(30mL) 中的溶液。将载玻片翻滚 60 分钟,用大量乙腈冲洗,并用氩气吹干以产生水接触角为 53° 至 70° 的表面。

[0524] 所得的表面固定的聚合物包含可用于通过点击化学缀合至捕获探针的炔或叠氮化物部分。利用类似过程可将聚合物固定在其中表面包含叠氮化物或炔而不是胺的固体基底上。

[0525] 实施例 12

[0526] 100Å SiO_2溅射表面的氨基甲硅烷化和代表性聚合物随后的固定

[0527] 通过等离子体刻蚀并随后在 80℃下用上腭溅射 SiO_2(Hionix,Inc.,San Jose,CA)

来处理 COC 或 COP 载玻片的一面。沉积的 SiO_2 的平均厚度为 100Å 并且水接触角为小于 10° 。将二氧化硅-喷溅的 COC 和 COP 载玻片浸入 3-氨丙基二异丙基乙氧基硅烷 (250 μL) 和 TEA(20 μL) 在无水 EtOH(30mL) 中的溶液。将载玻片轻轻翻滚 2 小时，用 EtOH 充分冲洗，并用氩气吹干，对于 COC 和 COP 载玻片分别产生 58.2° ±1.4° 和 55.9° ±2.4° 的水接触角。

[0528] 将氨基甲硅烷基化的 COC 或 COP 载玻片单独地浸入包含三乙基胺 (150 μL) 的乙腈 (30mL) 中。向已浸入的 COC 或 COP 载玻片上加入实施例 6 制备的聚合物 (对于 COC 为 28.6mg，或对于 COP 为 23.7mg)。将 COC 或 COP 载玻片翻滚过夜，然后用大量乙腈冲洗并用氩气吹干。确定水接触角。

[0529] 实施例 13

[0530] 代表性聚合物在 COC 表面上不用交联剂而由 UV- 引发的界面聚合

[0531] 通过如前所述的真空蒸馏将 N,N- 二甲基丙烯酰胺 (DMA)、五氟苯基丙烯酸酯 (PFPA) 和包含炔或叠氮化物的亚基进行纯化。通过将 DMA(800mg,8.07mmol)、PFPA(68.0mg,0.286mmol)、叠氮化物或炔亚基 (取决于所需聚合物组合物可改变摩尔比) 和二苯甲酮 (31.8mg,0.175mmol) 溶解在乙腈 (1.0mL) 中来制备单体的溶液。将等份的单体溶液 (150 μL) 放置在 COC 载玻片的中心并通过在单体溶液顶部放置 PTFE 载玻片 (1”×3”×1mm) 使其扩展以覆盖整个 COC 载玻片。然后将三明治组件倒置，COC 载玻片朝上，并将其放置在 365nm UV 光源 (BondWang，Electro-Lite Corp.，10mW/cm2) 下方 5cm 处并暴露于 UV 辐照 15 分钟。然后将 PTFE 载玻片剥离并用乙腈充分冲洗 COC 载玻片，然后用氩气吹干以产生具有水接触角为 50° 至 70° 的接枝表面。通常该过程可用于制备具有多种单体摩尔比的 DMA 和 PFPA 的接枝共聚物。

[0532] 实施例 14

[0533] 代表性聚合物在 COC 表面上用交联剂由 UV- 引发的界面聚合

[0534] 应用实施例 13 的常规过程。通过将 DMA(794.4mg,8.01mmol)、PFPA(668mg,0.281mmol)、亚甲基-双-丙烯酰胺 (MBA,40.0mg,0.259mmol)、炔或叠氮化物单体 (摩尔比取决于所需聚合物) 和二苯甲酮 (32.0mg,0.176mmol) 溶解在 ACN(10.0mL) 中来制备单体溶液。将等份的单体溶液 (50 μL) 施用到 COC 载玻片的中心，然后如上所述通过放置 PTFE 载玻片使其扩展以覆盖整个 COC 载玻片。将该三明治组件倒置并用 UV 辐照 (如上所述)。通常该过程可用于其他聚合物。

[0535] 实施例 15

[0536] 寡核苷酸阵列和设备的制备

[0537] 在 384- 孔板中制备 20 μM 胺改性的寡核苷酸在 50mM 磷酸钠 (pH8.5) 中的点样溶液。然后通过阵列定位器 (Array-it SpotBoT^3)，选用所需的点尺寸的合适点样针，将寡核苷酸以所需的模式点样到如上所制备的固体支撑物 (包含可用于生物缀合的活化的酯) 上。每片载玻片上点样两个阵列，位于载玻片长度的 1/4 和 3/4 点处，和相对于载玻片宽度居中。点样之后，将载玻片在 75％相对湿度下孵育 4-18 小时，然后用 DI 水流冲洗并用氩气吹干。

[0538] 还以类似的方式，除了使用包含可用于缀合的叠氮化物或炔的固体支撑物和在适当的点击条件 (例如，在 Cu(I) 存在的情况下) 下进行点样之外，进行包含叠氮化物或炔官

能性的寡核苷酸的点样。

[0539] 在干燥之后，将载玻片切成两半，导致得到两片 1”×1.5”芯片，每一片上带有居中的点样阵列。组装小型的单室设备，点样载玻片在单室设备中形成底部。将适当尺寸的预先切好的双面 PSA 衬垫放置在载玻片上，留下阵列 - 点样部分连同在其周围的固定尺寸的大致圆形区域暴露。在衬垫的顶部放置带有两个预钻好的填充口的聚碳酸酯盖子。为了在热循环期间确保适当的粘附，将所得组件在室温下进行层压。

[0540] 在管中预混合包含引物和探针混合物、缓冲液、酶和靶 DNA 的多重 PCR 溶液然后将其加入到上述的室中。典型的反应室体积为 25-40 μL。在加入 PCR 反应溶液后，用光学透明膜密封在芯片的聚碳酸酯盖子中的口。

[0541] 在定制的热循环装置中测试填充有 PCR 反应溶液的设备，其允许在热循环过程中通过落射荧光 (epifluoresence) 显微镜用数码相机对表面进行成像。对于切割的荧光 DNA- 翼（和对于全长探针）来说，当冷却至低于它们的杂交温度 (Tm) 时其典型的杂交时间低于 2 分钟。通过测量与捕获探针阵列杂交的切割的翼（或全长探针）的荧光强度来表征表面。以这种方式，在缓冲液中在典型的热循环条件下测量表面稳定性。还可以在设备中用通常包含以下的运行进行 PCR ：在 95℃下活化所需时间，40 个从 95℃至 60℃的热循环周期 ：在 95℃下 15 秒停留时间和在 60℃下 60 秒停留时间。在某些选择的周期，将该室冷却至探针的 T_m之下，允许在 60℃延伸步骤后杂交。

[0542] 利用自动图像分析软件来定位阵列的点和通过测量像素强度来对信号进行定量。将实际点区域外部的平均像素强度从点内部的平均像素强度减去，产生点区域的减去背景的像素强度。在热循环期间监控这些强度，用于对捕获探针特异性的切割的 DNA- 翼的检测。

[0543] 通过引用以不至于与本文说明矛盾的程度将本说明书中涉及的和 / 或所附的应用数据页中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开，包括 2012 年 10 月 12 日提交的第 61/713,329 号美国申请，以其整体并入本文。

[0544] 从上述内容中应明白，尽管为了示例说明的目的描述了本发明的具体实施方案，但是在不偏离本发明的精神和范围的情况下可进行各种改变。因此，本发明除受所附权利要求限制外不受限制。

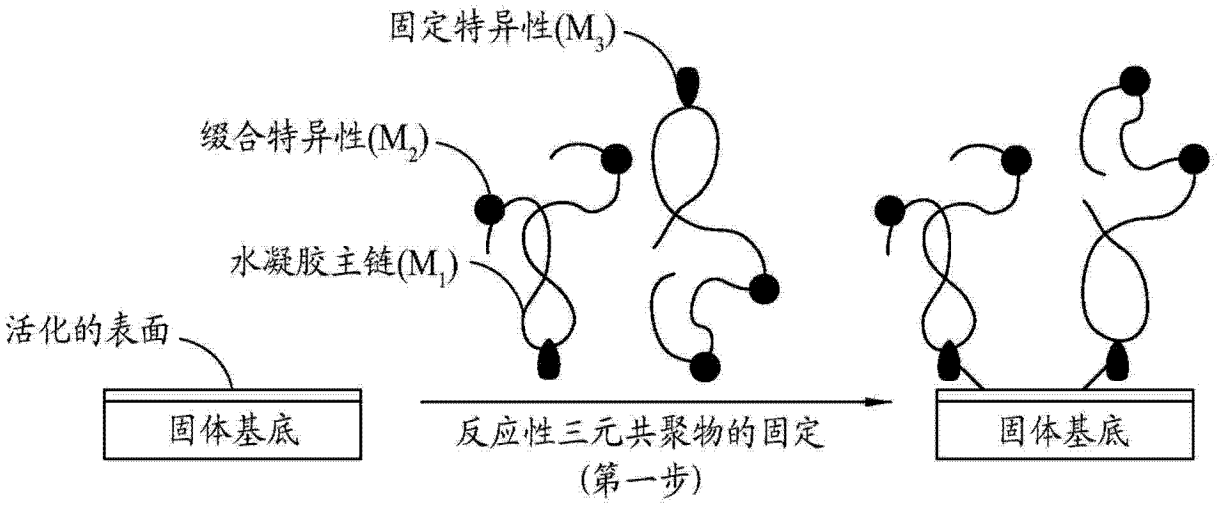


图 1

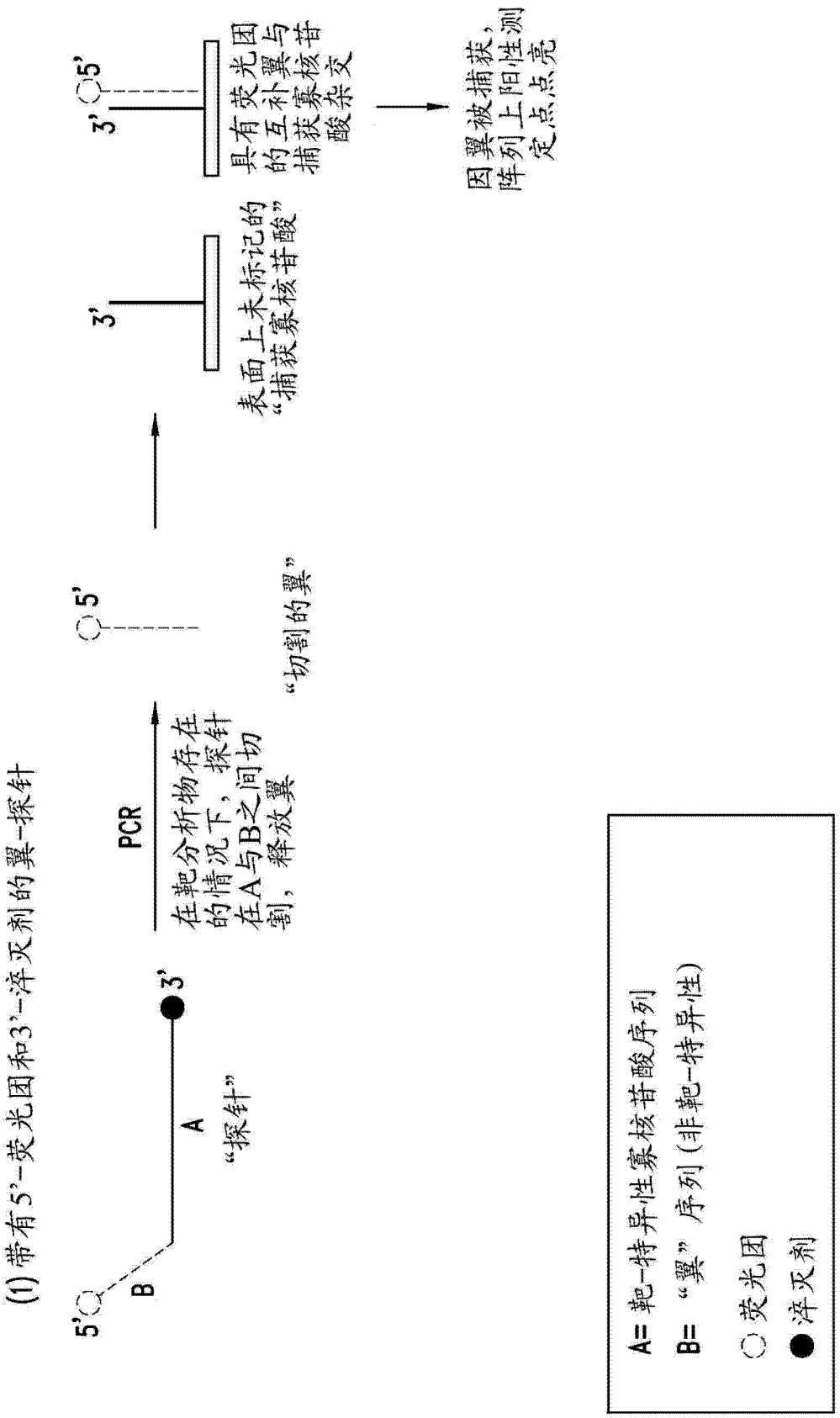

(1) 带有5'-荧光团和3'-淬灭剂的翼-探针
5'
B
A
3'
"探针"
PCR
在靶分析物存在的情况下，探针在A与B之间切割，释放翼
"切割的翼"
5'
3'
表面上未标记的"捕获寡核苷酸"
3'
5'
具有荧光团的互补寡核苷酸杂交
因翼被捕获，阵列上阳性测定点点亮
A= 靶-特异性寡核苷酸序列
B= "翼"序列(非靶-特异性)
荧光团
淬灭剂

图 2A

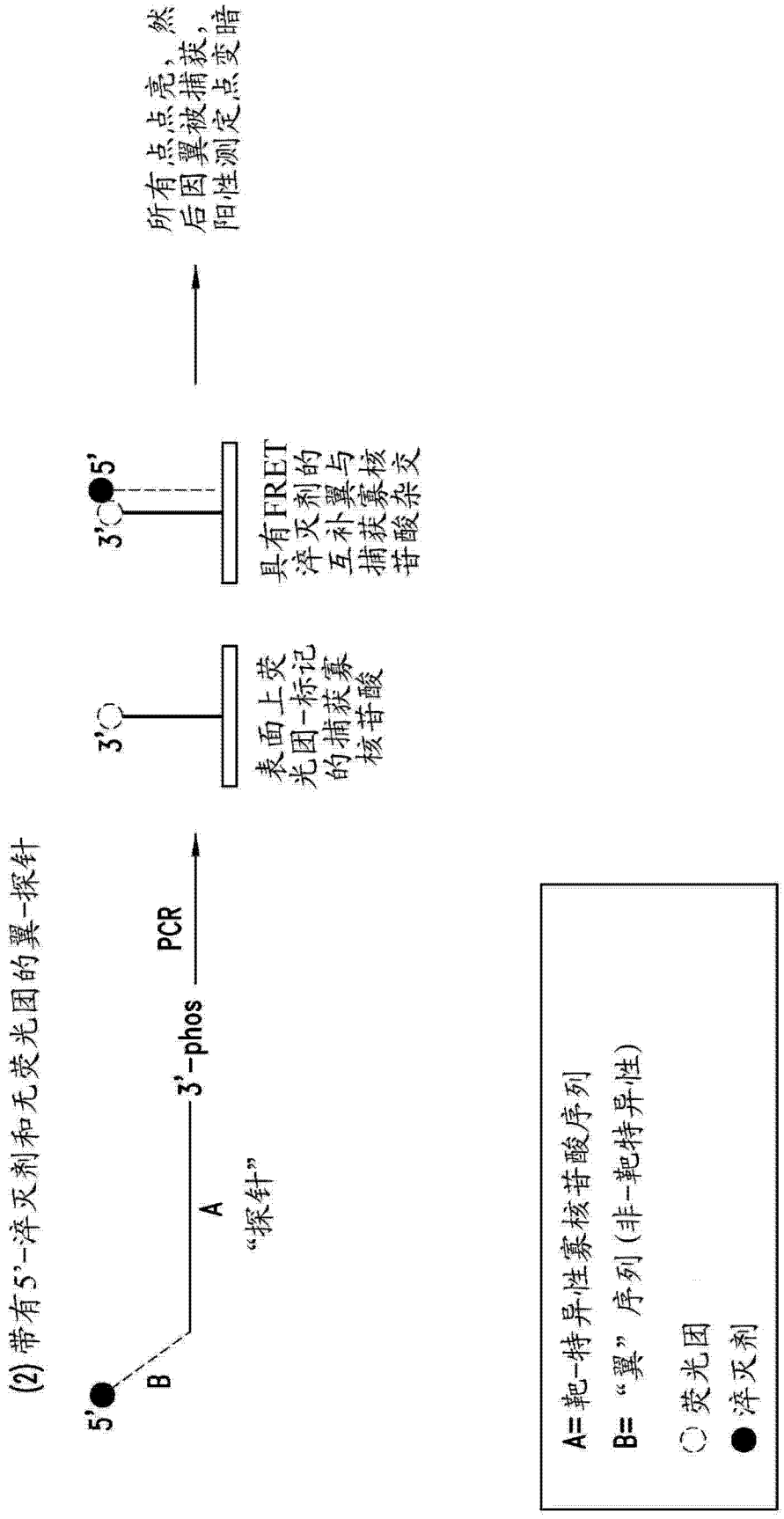

(2) 带有5'-淬灭剂和无荧光团的翼-探针
5'
B
3'-phos
PCR
A
"探针"
3'
表面上荧光团-标记的捕获寡核苷酸
3'
5'
具有FRET淬灭剂的互补翼与捕获寡核苷酸杂交
所有点点亮，然后因翼被捕获，阳性测定点变暗
A=靶-特异性寡核苷酸序列
B= "翼" 序列(非-靶特异性)
荧光团
淬灭剂

图 2B

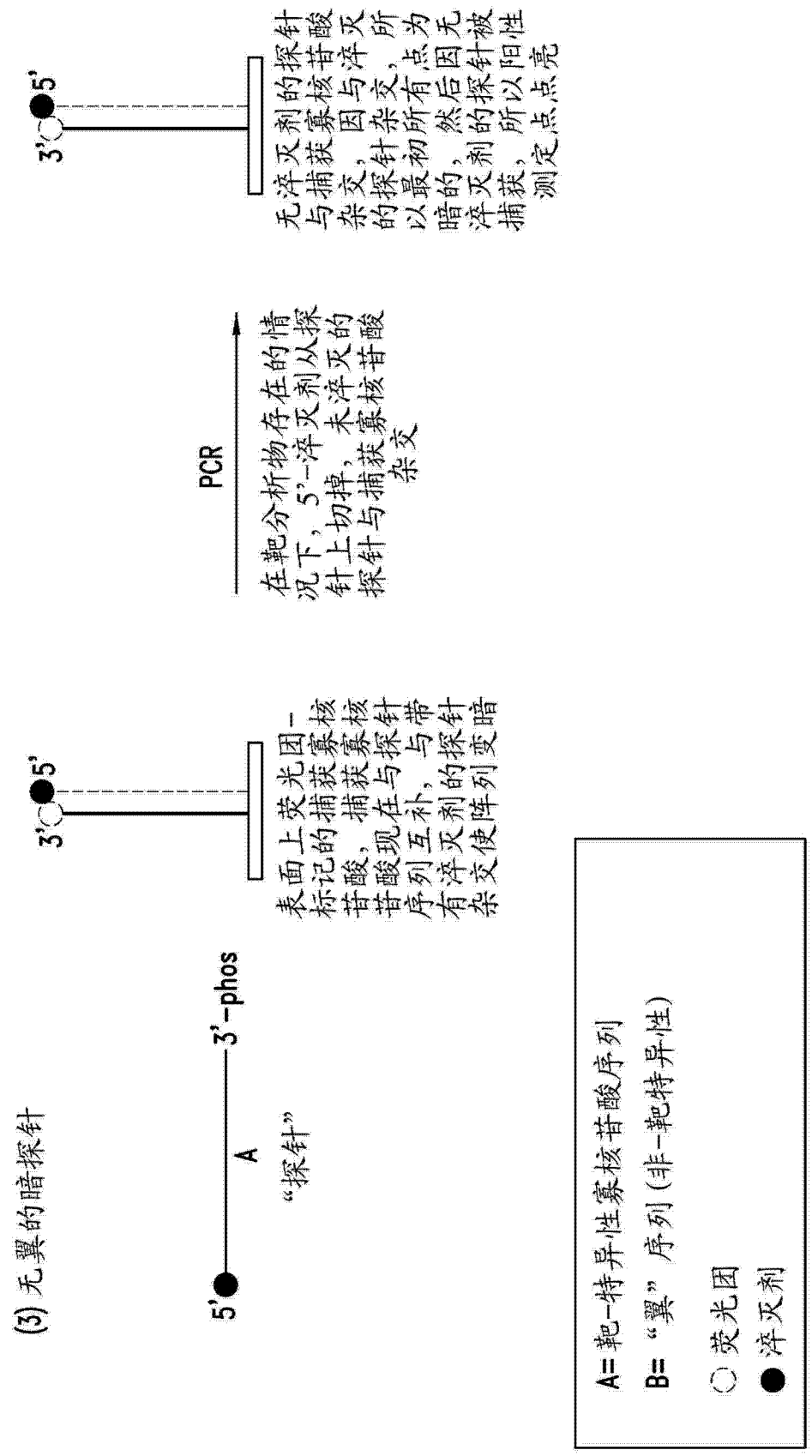

(3) 无翼的暗探针
5'
3'-phos
A
"探针"
3'
5'
表面上荧光团-标记的捕获寡核苷酸，捕获寡核苷酸现在与探针序列互补，与带有淬灭剂的探针杂交使阵列变暗
PCR
在靶分析物存在的情况下，5'-淬灭剂从探针上切掉，未淬灭的探针与捕获寡核苷酸杂交
3'
5'
无淬灭剂的探针与捕获寡核苷酸杂交，因与淬灭的探针杂交，所以最初所有点为暗的，然后因无淬灭剂的探针被捕获，所以阳性测定点亮
A= 靶-特异性寡核苷酸序列
B= "翼" 序列 (非-靶特异性)
荧光团
淬灭剂

图 2C