



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96195707.7

[43]公开日 1998年8月26日

[11] 公开号 CN 1191575A

[22]申请日 96.4.30

[30]优先权

[32]95.5.22 [33]US[31]08 / 445,751

[32]96.4.26 [33]US[31]08 / 639,363

[86]国际申请 PCT / US96 / 06116 96.4.30

[87]国际公布 WO96 / 37630 英 96.11.28

[85]进入国家阶段日期 98.1.21

[71]申请人 斯里国际

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 J·A·蒙福尔特 C·H·贝克尔

T·A·沙勒尔 D·J·波拉尔特

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

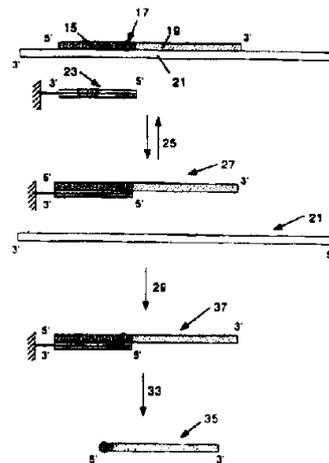
代理人 卢新华 杨九昌

权利要求书 6 页 说明书 66 页 附图页数 24 页

[54]发明名称 使用可裂解引物寡核苷酸大小测定

[57]摘要

本发明提供了修饰的寡核苷酸引物，设计该引物是为了掺入可裂解部分以便从所述引物的上游(5')部分可释放引物(3')部分(与延伸产物相连的)。在可裂解位点进行选择性裂解后，释放出含约5个或更少碱基对之引物序列的引物延伸产物，以便比含完整引物的延伸产物更好地进行每个片段的大小测定并提供更有用的序列资料。



## 权 利 要 求 书

1.一种确定引物延伸产物大小的方法,包括:

(a) 将引物与靶核酸杂交,其中所述引物(i)与所述靶核酸互补;(ii)具有含有引物 5'末端的第一区,和(iii)具有含有引物 3'末端的第二区,其中所述 3'末端可作为酶促延伸的引发位点,而所述第二区含有一可裂解位点,

(b)酶促延伸引物以产生由引物和延伸片段组成的混合物;

(c)在可裂解位点裂解以释放延伸片段;和

(d)用质谱确定延伸片段的大小,其中相对于产物(b)的阅读长度,延伸片段的阅读长度有所增加。

2.权利要求 1 的方法,其中所述靶核酸是被固定的。

3.权利要求 2 的方法,其中在所述延伸前所述靶核酸被固定。

4.权利要求 2 的方法,其中在所述裂解前固定所述靶核酸。

5.权利要求 1 的方法,其中所述可裂解位点是能够阻断 5'向 3'酶促消化的核苷酸,而其中通过用具有 5'向 3'外切核酸酶活性的酶消化引物第一区来完成所述裂解。

6.权利要求 1 的方法,其中所述可裂解位点位于所述引物 3'末端的约 5 个核苷酸处或在约 5 个核苷酸内。

7.权利要求 6 的方法,其中所述引物的第二区也是含有可裂解位点的单核苷酸。

8.权利要求 7 的方法,其中所述第二区是核糖核苷酸。

9.权利要求 1 的方法,其中所述可裂解位点选自二烷氧基硅烷、3'-(S)-硫代磷酸酯、5'-(S)-硫代磷酸酯、3'-(N)-氨基磷酸酯、5'-(N)-氨基磷酸酯、尿嘧啶和核糖。

10.权利要求 1 的方法,其中用于步骤(b)中引物延伸的酶是 DNA 聚合酶。

11.权利要求 1 的方法,其中用于步骤(b)中引物延伸的酶是连接酶。

12.权利要求 4 的方法,其中还包括在所述裂解步骤前,从所述固定靶核酸中分离(b)的产物。

13.权利要求 1 的方法,其中所述大小测定法是飞行时间质谱。

14.权利要求 1 的方法,其中所述延伸是在含(i)固定化连接位点和(ii)



可释放位点，其中所述延伸片段包含所述固定化连接位点和所述可释放位点。

15. 权利要求 14 的方法，还包括在所述大小测定前，在固定化连接位点固定所述延伸片段和在所述可释放位点释放所述延伸片段。

5 16. 一种确定引物延伸产物大小的方法，包括：

(a) 将引物与靶核酸杂交，其中所述引物(i)与所述靶核酸互补；(ii) 具有含引物 5' 末端，及固定连接位点的第一区和(iii)具有含有引物 3' 末端的第二区，其中所述 3' 末端可作为酶促延伸的引发位点，而所述第二区含有一可裂解位点，

10 (b) 酶促延伸引物以产生由引物和延伸片段组成的混合物；

(c) 在可裂解位点裂解以释放延伸片段，其中在所述裂解前，在所述固定化连接位点固定所述引物；和

(d) 用质谱确定延伸片段的大小，其中相对于产物(b)的阅读长度，延伸片段的阅读长度有所增加。

15 17. 权利要求 16 的方法，其中所述可裂解位点位于所述引物 3' 末端的约 5 个核苷酸处或在约 5 个核苷酸内。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述引物的第二区是也含有可裂解位点的单核苷酸。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述第二区是核糖核苷酸。

20 20. 权利要求 16 的方法，其中所述可裂解位点选自二烷氧基硅烷、3' -(S)-硫代磷酸酯、5' -(S)-硫代磷酸酯、3' -(N)-氨基磷酸酯、5' -(N)-氨基磷酸酯、尿嘧啶和核糖。

21. 权利要求 16 的方法，其中用于步骤(b)中引物延伸的酶是 DNA 聚合酶。

25 22. 权利要求 16 的方法，其中用于步骤(b)中引物延伸的酶是连接酶。

23. 权利要求 16 的方法，其中还包括在所述裂解步骤前洗涤已被固定的产物。

24. 权利要求 16 的方法，其中所述大小测定是通过基质辅助激光解吸离子化质谱来完成的。

30 25. 权利要求 24 的方法，其中所述大小测定是通过飞行时间质谱。

26. 权利要求 24 的方法，其中在所述大小测定前，将所述延伸片段包埋在化学基质中。



27.权利要求 16 的方法,其中将所述引物通过连接在键合于固体支持物上的间隔臂的固定化连接位点上而固定在固体支持物上。

28.权利要求 27 的方法,其中所述间隔臂的长为 6 或更多个原子。

29.权利要求 16 的方法,其中所述固定化连接位点在引物的碱基或糖上作为取代基。

30.权利要求 16 的方法,其中所述固定化连接位点是生物素或地高辛配基。

31.权利要求 16 的方法,其中将所述引物固定在选自玻璃、硅、聚苯乙烯、铝、钢、铁、铜、镍、银和金的固体支持物上。

32.权利要求 16 的方法,其中引物的固定化连接位点是由一系列与中介寡核苷酸互补的碱基组成,其中通过固定化连接位点与结合于固体支持物上的中介寡核苷酸的特异性杂交来固定所述引物。

33.一种确定引物延伸产物大小的方法,包括:

(a) 在促进引物与核酸杂交的条件下,将第一和第二引物与靶核酸组合,产生引物/核酸复合物,

其中所述第一引物(i)有 5' 末端和 3' 末端(ii)与所述靶核酸互补; (iii)具有含有第一引物 5' 末端的第一区,和(iv)具有含有第一引物 3' 末端的第二区,其中所述 3' 末端可作为酶促延伸的引发位点,而所述第二区含有一可裂解位点,

而其中所述第二引物 ( i ) 有 5' 末端和 3' 末端(ii)与所述靶核酸同源, (iii)具有含有第二引物 3' 末端的一个片段,和(iv)具有含有第二引物 5' 末端和固定化连接位点的第二片段,

(b)在 DNA 聚合酶和脱氧核苷三磷酸的存在下,将引物/核酸复合物转变成双链片段,

(c)通过连续重复下列步骤扩增含引物的片段: (i)将所述双链片段变性以产生单链片段, (ii)将所述单链片段于所述第一和第二引物杂交以形成链/引物复合物, (iii) 在 DNA 聚合酶和脱氧核苷三磷酸的存在下,由链/引物复合物产生扩增产物,和(iv)重复步骤(i)-(iii)直到得到所需的扩增程度,

(d)经所述固定化连接位点固定含第二引物的扩增产物,

(e)除去未被固定的扩增片段,

(f)在可裂解位点裂解所述扩增产物以得到含双链产物的混合物,



(g)将双链产物变性以释放延伸片段, 和

(h)用质谱确定延伸片段的大小, 其中相对于扩增的链-引物复合物(c)的阅读长度, 延伸片段的阅读长度有所增加。

34.一种确定引物延伸产物大小的方法, 包括:

5 (a) 在促进引物与核酸杂交的条件下, 将第一和第二引物与靶核酸组合, 产生引物/核酸复合物, 其中所述第一引物(i)与所述靶核酸互补; (ii)具有含有引物 5'末端的第一区, 和固定化连接位点, 和(iii)具有含有引物 3'末端的第二区, 其中所述 3'末端可作为酶促延伸的引发位点, 而所述第二区含有一可裂解位点, 而其中所述第二引物与所述靶核酸同源,

10 (b)在 DNA 聚合酶和脱氧核苷三磷酸的存在下, 将引物/核酸复合物转变成双链片段,

(c)通过连续重复下列步骤扩增含引物的片段: (i)将所述双链片段变性以产生单链片段, (ii)将所述单链片段与所述第一和第二引物杂交以形成链/引物复合物, (iii)在 DNA 聚合酶和脱氧核苷三磷酸的存在下, 由链/引物复合物产生双链扩增片段, 和(iv)重复步骤(i)-(iii)直到得到所需的扩增程度,

(d)将扩增片段变性以产生包含第一引物和延伸片段组成之产物的混合物,

20 (e)用所述固定化连接位点固定含第一引物的扩增片段, 然后除去未固定的扩增片段,

(f)在可裂解位点裂解所述第一引物以释放延伸片段; 和

(g)用质谱测定延伸片段的大小, 其中相对于(d)产物的阅读长度, 延伸片段的阅读长度有所增加。

35.一种确定靶 DNA 序列的 DNA 序列的方法, 包括:

25 (a)将引物与靶 DNA 杂交, 其中所述引物(i)与所述靶 DNA 互补; (ii)具有含有引物 5'末端和固定化连接位点的第一区, 和(iii)具有含有引物 3'末端的第二区, 其中 3'末端可作为酶促延伸的引发位点, 而所述第二区含有可裂解位点,

30 (b)在 4 种双脱氧核苷酸中的第一种存在的条件下, 用酶延伸引物以产生引物延伸产物的混合物, 每种产物包含引物和延伸片段;

(c)在可裂解位点裂解以释放延伸片段, 其中在所述裂解前, 在所述固定化连接位点固定引物;



(d)用质谱测定延伸片段大小，其中相对于(b)产物的阅读长度，延伸片段的阅读长度有所增加，

(e)用四种不同的双脱氧核苷酸中的第二、第三和第四种重复步骤(a)到(d)，和

5 (f)通过比较从四个延伸反应中得到的延伸片段的大小，来确定所述靶 DNA 的 DNA 序列。

36.一种确定靶 DNA 序列的 DNA 序列的方法，包括

(a)将引物与靶 DNA 杂交，其中所述引物(i)与所述靶 DNA 互补；(ii)具有含有引物 5' 末端和固定化连接位点的第一区，和(iii)具有含有引物  
10 3' 末端的第二区，其中 3' 末端可作为酶促延伸的引发位点，而所述第二区含有可裂解位点，

(b)在 4 种不同的双脱氧核苷酸 $\alpha$ -硫代三磷酸酯类似物(dNTP $\alpha$ S)中的第一种的存在下，用酶延伸引物以产生含有硫代磷酸酯键引物延伸产物的混合物；

15 (c)用在硫代磷酸酯键特异性裂解的试剂处理引物延伸产物，

其中所述处理是在产生限制裂解的条件下完成的，产生一组引物延伸降解产物，

(d)洗涤引物延伸降解产物，其中在所述洗涤前，在所述固定结合位点固定所述引物延伸降解产物，每种固定的引物延伸降解产物含有引物  
20 和延伸片段，其中所述洗涤可有效除去未被固定的片段，

(e)在可裂解位点裂解以释放延伸片段，

(f)用质谱测定延伸片段，其中相对于其相应引物延伸降解产物的阅读长度，任何给定延伸片段的阅读长度有所增加，

(g)用四种不同的 dNTP  $\alpha$  S<sub>s</sub> 中的第二、第三和第四种重复步骤(a)到

25 (f)，和

(h)通过比较从四种延伸反应中得到的延伸片段的大小，来确定所述靶 DNA 的 DNA 序列。

37.权利要求 36 的方法，其中步骤(c)的试剂选自外切核酸酶、2-碘代乙醇和 2,3-环氧-1-丙醇。

30 38.一种确定靶 DNA 序列的单碱基指纹的方法，包括：

(a)将引物与靶 DNA 杂交，其中所述引物(i)与所述靶 DNA 互补；(ii)具有含有引物 5' 末端和固定化连接位点的第一区，和(iii)具有含有引物



3'末端的第二区,其中3'末端可作为酶促延伸的引发位点,而所述第二区含有可裂解位点,

(b)在对应于单一碱基的双脱氧核苷三磷酸的存在下,用酶延伸引物以产生引物延伸产物的混合物,每种产物含有引物和延伸片段;

5 (c)在可裂解位点裂解以释放延伸片段,其中在所述裂解前,在所述固定化连接位点固定引物;

(d)用质谱测定延伸片段,其中相对于(b)的相应引物延伸产物的阅读长度,延伸片段的阅读长度有所增加,且

(e)通过比较延伸片段的大小,来确定所述靶DNA中单碱基的位置。

10 39.一种确定靶DNA序列的腺嘌呤指纹的方法,包括:

(a)将引物与DNA靶杂交,其中所述引物(i)与所述靶DNA互补;(ii)具有含有引物5'末端和固定化连接位点的第一区,和(iii)具有含有引物3'末端的第二区,其中3'末端可作为酶促延伸的引发位点,而所述第二区含有可裂解位点,

15 (b)在存在脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)和脱氧尿苷三磷酸(dUTP)的条件下,用酶延伸引物以产生引物延伸产物的混合物,所述产物在对应于所述靶中dATP的位置上含有dUTP,每种产物含有引物和延伸片段;

20 (c)用尿嘧啶DNA糖基化酶处理引物延伸产物一般在dUTP的位置特异性地片段化,得到一组引物延伸降解产物,

(d)洗涤引物延伸降解产物,其中在所述洗涤前,在所述固定化连接位点固定引物延伸降解产物,各固定的引物延伸降解产物含有引物和延伸片段,而且所述洗涤可有效地除去未被固定的片段,

25 (e)在可裂解位点裂解以释放延伸片段,

(f)用质谱测定延伸片段大小,其中相对于其相应引物延伸降解产物的阅读长度,任何给定延伸片段的阅读长度有所增加,

(g)通过比较释放的延伸片段的大小,确定腺嘌呤在所述靶DNA中的位置。

30

# 说明书

## 使用可裂解引物的寡核苷酸大小测定

### 发明领域

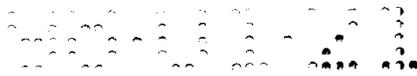
- 5 本发明涉及含可裂解引物的寡核苷酸组合物，以及使用所述引物的诊断和分析方法。

### 参考文献

- Agrawal, S., and Goodchild, J., 四面体通讯 28:3539-3542(1987).  
Ausubel, F.M., *et al.*, 分子生物学中的现有方法, John Wiley and  
10 Sons, Inc., Media PA(1988).  
Bannwarth, W., 等, DNA 5:413(1986).  
Bannwarth, W., *Chimia* 41:302(1987).  
Bannwarth, W., 瑞士化学学报 71:1517-1527(1988).  
Bischoff, R., 等, 分析生物化学 164:336-344(1987).  
15 Collins, S.J., 等., 科学 225:72(1984).  
Cormier, J., 等, 核酸研究 16:4583-4594(1988).  
Corey, E.J., and Snider, B.B., 美国化学会志 94:2549-2550(1972).  
Cosstick, R. 等., 化学会志化学通讯 992(1988).  
Cosstick, R., 等., 四面体通讯 30(35):4693-4696(1989).  
20 Daley, G.Q., 等., 美国国家科学院院报 85:9312-9316(1988).  
Dattagupta, N., 美国专利号 4,818,681(1989).  
Erlich, H.A., PCR 技术, Stockton, New York(1989).  
Fodor, S.P.A., 等., 科学 251:767-773(1991).  
Gale, R.P., 等., 美国国家科学院院报 81:5648(1984).  
25 Ghosh, S., 等., 核酸研究 15:5353-5372(1987).  
Gingeras, T., 等., 核酸研究 15:5373-5390(1987).  
Glazer, A., 等., 自然 359:859-861(1992).  
Goldkorn, T., 等., 核酸研究 14(22):9171-9191(1986).  
Green, N.M., 蛋白质化学进展(Avidin, Ed.) Academic Press, New York,  
30 NY, U.S.A., p.29, 85-133(1975).  
Gromova, E.S., 生物有机化学 13:269(1987).



- Gyllensten, U.B., 生物技术 7:700(1989).
- Hasa, T., 等化学通讯 601(1976).
- Hegner, M., 等., FEBS 通讯 336:452-456(1993a).
- Hegner, M., 等., 表面科学 291:39-46(1993b).
- 5 Hillenkamp, R., 质谱学进展 11A:354-361(1988).
- Hobbs, J.B., 有机磷化学 21:201-321(1990).
- Innis, M.A., *et al.*, PCR 方法, Academic Press, San Diego(1990).
- Khrapko, K., *et al.*, DNA 序列 1:375-388(1991).
- Koole, L.H., *et al.*, *Proc.K.Ned. Akad Wet.* B91:205-209(1988).
- 10 Kremsky, J., *et al.*, 核酸研究 15:2891-2909(1987).
- Kusukawa, N., *et al.*, 生物技术 9:66(1990).
- Longo, M.C., *et al.*, 基因 93:125(1990).
- Mag, M., *et al.*, 核酸研究 19(7):1437-1441(1991).
- Maniatis, T., *et al.*, 分子克隆: 实验室手册 Cold Spring Harbor
- 15 Laboratory (1982).
- Maskos, U., *et al.*, 核酸研究 20(7):1679-1684(1992).
- McBride, L.J., *et al.*, 四面体通讯 24:245(1983).
- Miller, P.S., *et al.*, 美国化学会志 93:6657-6665(1971).
- Moody, H.M., *et al.*, 核酸研究 12:4769-4782(1989).
- 20 Mullis, K.B., *et al.*, 美国专利号 4,683,195, issued 28 July 1987.
- Mullis, K.B., 美国专利号 4,683,202, issued 28 July 1987.
- Nadji, S., *et al.*, 美国化学会志 114:9299-9269(1992).
- Nakamaye, K.I., *et al.*, 核酸研究 16:9947-9959(1988).
- Nelson, R.W., *et al.*, 科学 246:1585-1587(1989).
- 25 Ogilvie, K., *et al.*, 四面体通讯 26:4159-4162(1986).
- Olsen, D., *et al.*, 酶学方法 218:79-92(1993).
- Olsen, G.J., *et al.*, 核酸研究 20:2199(1992).
- Primings, *et al.*, 酶学方法 65:561-580(1980).
- Saha.A., *et al.*, 有机化学杂志 58:7827-7831(1993).
- 30 Sanger, F., 分子生物学杂志 94:441-448(1975).
- Saiki, R.K., *et al.*, 美国国家科学院院报, 86:6230-6234(1989).
- Schmidt.T.M., *et al.* 酶学方法 235:205-222(1994).



- Seliger, H., *et al.*, 核苷核苷酸 6:483-484(1987).  
Southern, *et al.*, 基因组学 13:1008-1017(1992).  
Sproat, B.S., *et al.*, 核酸研究 15:4837(1987).  
Szczylik, C., *et al.*, 科学 253:562-565(1991).  
5 Szybalski, W., 基因 40:169-173(1985).  
Tomasz. J., *et al.*, 四面体通讯 22:3905-3908(1981).  
Townsend, L.B., *et al.*, Eds, 核酸化学: 改进的和新的合成过程、方法和  
技术 John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 337(1986).  
Van Ness, J. *et al.*, 核酸研究 19:3345-3350(1991).  
10 Wu, K.J., *et al.*, 质谱学快报 7:142-146(1993).  
Watson, J.D., *et al.*, 重组 DNA 第二版 Scientific American, Inc, Chapter  
27(1992).  
Yamamoto, I., *et al.*, 化学会志, Perkin Trans. 1 1:306(1980).  
Youngquist, R.S., *et al.*, 质谱学快报 8:77-81(1994).  
15 Zhang, Y., *et al.*, 核酸研究 19:3929-3933(1991).

### 发明背景

DNA, 主要的遗传物质, 是由两条缠绕在一起的多核苷酸链组成的  
复杂分子, 每个核苷酸含有一个脱氧核糖单位, 一个磷酸基和一个含氮  
20 杂环碱基。两条多核苷酸链经互补碱基对之间的氢键作用而结合在一  
起。

正常人有 23 对染色体, 共含有约 100,000 个基因。人染色体中所含  
DNA 的长度总共约 33 亿个碱基对, 一个基因通常含有约 30,000 个碱基  
对。

25 由于在人和非人基因组中尚有大量遗传信息未被收集到, 因此正在  
尽力开发新的更迅速的方法以完成 DNA 检测、大小测定、定量分析、测  
序和包括人疾病基因作图的基因鉴定。尽管自动化已经提高了这些过程  
的效率, 但仍需要开发更迅速更廉价的方法以进行有效的基因组规模的  
DNA 分析。

30 典型的寡核苷酸大小测定和序列分析最早是由 Sanger 和 Coulson 利  
用酶促方法, 或由 Maxam 和 Gilbert 利用化学降解而完成的。Sanger 法  
使用酶促链延伸并结合终止双脱氧前体以产生随机终止的 DNA 片段。

Maxam 和 Gilbert 技术是利用在 DNA 靶完成的 4 种不同的碱基特异性反应以产生 4 组放射性标记的片段。这两种技术都利用凝胶电泳分离不同长度的所得 DNA 片段。

5 在常规 DNA 分析中，用放射性同位素标记 DNA 片段。在测序凝胶上分离后，通过它们在附于凝胶的胶片上产生的图谱肉眼观察片段。已经描述了其它 DNA 分析方法，它们不使用放射性同位素。此种方法的一个实例是使用荧光团或荧光标记。通常，用化学 DNA 合成技术将 4 种各有不同的吸收和发射谱的荧光团与 DNA 引物相连。分别在 4 种酶促测序反应中使用带有不同荧光标记的引物。

10 在另一种基于 4 种染料荧光的检测方法中，在酶促延伸后，将染料与链末端碱基类似物化学相连。用该方法不需合成不同的染料引物。

还开发了单功能和多功能嵌入化合物作为高敏感性荧光检测的试剂 (Glazer 等, 1992)。这些平面芳香族荧光团 (如 3,8 - 二氨基 - 5 - 乙基 - 6 - 苯基菲啶(ethidium)均二聚体、噻唑橙均二聚体、  
15 聚体) 插入到双链 DNA 的相邻碱基对之间。

通过体外 DNA 扩增方法，即聚合酶链反应 (PCR) 的发展，对于 DNA 分析有很大的帮助。PCR 提供了从很小的，小到一个拷贝的靶 DNA 序列扩增并直接得到序列信息的能力。

20 通常，通过将靶双链 DNA 混合物放在于变性、退火和合成温度之间循环的热循环仪中，来完成 PCR 扩增，所述混合物含有脱氧核苷三磷酸、缓冲液，两种引物 (一种是磷酸标记的) 和 DNA 聚合酶 (如耐热的 Taq 聚合酶)。引物的选择确定了所要扩增的区域。在循环的第一阶段，将温度升高以便将双链 DNA 分开，形成用于扩增的单链模板。然后降低温度以产生 DNA 聚合酶的引发模板。在第三阶段，升高温度以促进 Taq  
25 酶促的 DNA 合成，解链、引物退火循环，合成的循环过程大约重复 30-60 个循环之多。尽管上述常规检测、大小测定和测序方法可提供有用的信息，但繁琐且昂贵。许多常用的技术都有多个处理步骤。此外，大部分常用的片段分析、凝胶电泳方法多是相对费时的方法。

### 发明概述

30 本发明提供了寡核苷酸组合物，所述组合物含有带有 5' 末端和 3' 末端的修饰引物以及至少一个选择性可裂解位点。优选地，所述可裂解位点位于离所述引物的 3' 末端有 5 个核苷酸或少于 5 个核苷酸的距离。

带有 5' 末端和 3' 末端的修饰的寡核苷酸引物由两个独立的核苷酸区组成。第一区含有 5' 末端，第二区含有引物的 3' 末端，所述 3' 末端可作为通常经聚合酶或连接酶酶促延伸的引发位点。第二区还含有连接第一和第二引物区的可裂解位点。在优选的实施方案中，引物的第一区含有至少 3 个核苷酸。第一引物区根据需要还可含有一个或多个二级可裂解位点，这些位点位于引物的 5' 末端和第二区可裂解位点之间（例如，以便将第一区裂解成较小的片段）。对于含二级可裂解位点的修饰引物，最下游处的可裂解位点应可接近 100% 地被裂解，以避免形成有额外碱基的二级或掩蔽（shadow）产物。

10 在本发明的一个实施方案中，可裂解位点位于离所述引物的 3' 末端有 5 个核苷酸或少于 5 个核苷酸的距离。在另一实施方案中，第二引物区由还含有可裂解位点的单核苷酸，如一个核糖核苷酸组成。另外第二区也可只由可裂解位点组成。

15 在所述修饰引物组合物中所含的可裂解位点包括可化学裂解的基团，如二烷氧硅烷、3'-(S)-硫代磷酸酯、5'-(S)-硫代磷酸酯、3'-(N)-氨基磷酸酯、5'-(N)-氨基磷酸酯、和核糖。

其它可裂解位点包括用酶如核酸酶可裂解的核苷酸。在一实施方案中，所述修饰引物组合物中的可裂解位点是被掺入以取代胸腺嘧啶的尿嘧啶，通过用尿嘧啶 DNA-糖基化酶处理，然后用碱处理。可点特异性切割该尿嘧啶，在另一实施方案中，所述可裂解位点是限制性核酸内切酶可裂解位点，所述识别序列位于第一引物区（如所述可裂解位点的上游）。在优选的实施方案中，限制性内切酶可裂解位点位于或离所述引物的 3' 末端有约 5 个核苷酸或少于 5 个核苷酸的距离。还可以用如 II 型限制酶定位可裂解位点或切割位点在延伸产物内。用于裂解本发明修饰引物的限制性核酸内切酶包括 II 型限制性核酸内切酶如 BpmI, BsgI, BseRI, BsmFI 和 FokI。包含 BpmI 或 BsgI 识别位点的修饰引物含有 (i) 分别含识别位点 5'-CTGGAG-3' 或 5'-GTGCAG-3' 的第一区，和 (ii) 在第二引物区，位于所述识别序列最后一个核苷酸下游 16 个碱基处的是可裂解位点。分别含 BseRI 或 BsmFI 识别位点，如 5'-GAGGAG-3' 或 5'-GGGAC-3' 的修饰引物含有位于所述识别序列最后一个核苷酸下游 10 个碱基处的可裂解位点，而含 FokI 识别位点（如 5'-GGATG-3'）的引物所述识别序列最后一个核苷酸下游 9 个碱基处有可裂解位点。

在另一实施方案中，可裂解位点是限制性核酸内切酶可裂解位点，识别序列位于第一引物区（即，裂解位点的上游），第一引物区含有 5' 发夹（自身互补的双链）结构域。5' 发夹结构域包含限制酶的双链识别位点。第二（单链）引物区含有(i)可裂解位点（即，限制性核酸内切酶切割位点），和(ii)由与单链靶互补的核苷酸，由此作为酶促延伸的引发位点。在酶促延伸引物后，用适宜的 IIS 型限制性核酸内切酶处理，然后变性以释放单链延伸片段，从而裂解所述产物。

在另一实施方案中，可裂解位点是一个核苷酸或系列核苷酸，所述核苷酸能够阻断或终止用具有 5' 向 3' 外切核酸酶活性的酶，如 T7 Gene 6 外切核酸酶所进行的 5' 向 3' 的酶促消化。阻断核苷酸包括肽核酸和含一个硫代磷酸酯或硼代（borano）磷酸酯基团的核苷酸。在含阻断核苷酸的修饰引物作为可裂解位点的引物延伸反应中，在引物延伸反应后，所得的产物由下列成分组成(i)含阻断核苷酸的修饰引物，和(ii)用核酸酶如具有 5' 向 3' 外切核酸酶活性的外切核酸酶处理的延伸片段。核酸酶处理通常会消化引物的第一区以产生由可裂解位点下游核苷酸（即 3'）组成的延伸片段。优选阻断基团不抑制引物的酶促延伸。

修饰的引物还可包含固定连结位点以结合到固体支持物上。所述固定连接位点可位于可裂解位点的上游（5'）或下游（即 3'）。在一实施方案中，固定连接位点位于修饰引物的 5' 末端或可裂解位点的 5'（即可裂解位点的上游）。在另一实施方案中，固定连接位点位于修饰引物的 3' 末端或可裂解位点的 3'（即可裂解位点的下游）。另外，所述固定连接位点可包含在因酶促延伸反应而产生的延伸片段内，或可包含在靶核酸内。

对于含固定连接位点的修饰引物，通过固体支持物和引物固定连接位点之间的共价或非共价键，将引物连接到固体支持物上以得到固定的修饰的寡核苷酸组分。用于本发明的固体支持物包括玻璃、硅、聚苯乙烯、纤维素、特富龙、聚苯乙烯二乙烯基苯，铝、钢、铁、铜、镍、银和金。

在一实施方案中，将引物经间隔臂与固体支持物相连，典型的间隔臂长度为 6 个或更多的原子。

在另一实施方案中，修饰的引物在第一引物区中含有固定化连接位点，所述第一区包括与中介寡核苷酸互补的系列碱基。通过固定化连接

位点与结合于固相支持物的中介寡核苷酸特异性杂交，也可固定修饰引物。所述中介寡核苷酸可与全部修饰引物或部分修饰引物序列互补。中介核苷酸通常由6个或更多的碱基组成，优选多于8个碱基。另外，中介寡核苷酸还可与靶核酸（模板）分子内的区域同源。

5        在一实施方案中，本发明的修饰引物是具有磷酸二酯核苷酸间键的寡核苷酸，如DNA或RNA。在另一实施方案中，修饰的引物是由其它骨架结构组成的寡核苷酸类似物，所述骨架结构含有核苷酸间键如磷酸甲酯、磷酸三酯、硫代磷酸酯、肽等。用于本发明的引物应能够以序列特异性的方式与靶序列进行氢键键合。

10        本发明还提供了确定用本发明的修饰引物所得到的引物延伸产物之大小的方法。用该方法，首先将本发明的修饰引物与靶核酸分子（如DNA或RNA）接触以完成所述引物与单链靶的杂交。所述修饰引物与靶互补并含有包含引物5'末端的第一区，和含引物3'末端的第二区，3'末端能够作为酶促延伸的引发位点。引物的第二区含有一可裂解位点。

15        在确定引物延伸产物大小的过程中，通过酶促方式，通常是通过聚合酶或连接酶的作用可延伸引物以产生含由引物和一个或多个延伸片段组成的产物。在可裂解位点裂解所得的产物，通过一些适宜分析技术中的任何方法，优选质谱法来确定所得延伸片段的大小。根据本发明，延伸产物的质量降低，相对于由修饰引物和延伸片段组成的产物的阅读长度，延伸片段的阅读长度增加。

20        在确定延伸产物大小的优选实施方案中，通过与固体支持物相连来固定修饰引物（第一或第二区）或模板。可通过共价或非共价键进行固定。举证性的非共价键包括配体-蛋白质相互作用和碱基特异性氢键键合。通过与固体支持物相连也可固定来自酶促延伸反应的延伸片段，然后  
25        在大小测定或测序前从支持物上释放出来。在后一种实施方案中，通常在存在核苷酸的情况下完成酶促延伸，所述核苷酸含有(i)固定连接位点和(ii)可释放位点，如举证性的核苷酸即生物素化的二硫键-双脱氧核苷酸。在酶促延伸后，将延伸产物固定、变性并在可裂解位点进行裂解，使延伸片段固定到固体支持物上。释放的引物（可裂解位点的上游部  
30        分）、模板和其它混合物组分通常通过洗涤除去，然后在可释放位点裂解固定的延伸片段以释放用于大小测定的延伸片段。

在所述方法的一个实施方案中，经固定连接位点与中介寡核苷酸连

于固体支持物的（固相结合中介寡核苷酸，SPBIO）的特异性杂交来固定修饰引物。在一具体实施方案中，固定连接位点位于第一引物区并由与中介寡核苷酸互补的系列碱基组成。另外，如果已知延伸产物的部分序列，固定连接位点可包含在延伸片段的区域内。

5       在另一实施方案中，SPBIO与靶核酸分子同源，导致SPBIO与所述靶之间同修饰引物的杂交竞争。在酶促延伸后，将产物（由引物和延伸片段组成）通过杂交SPBIO与固体支持物相连。为了促进SPBIO与产物的杂交，通过(i)引物和延伸产物的相互作用将靶选择性消化；或(ii)减少靶分子的量来减少靶分子的量。模板特异性消化可以是化学或酶促的。

10       在所述方法的一个相关实施方案中，通过与SPBIO杂交固定修饰引物，其中第一引物区含有与SPBIO互补的第一部分，而所述第一区的下游或3'是与靶分子而不是SPBIO互补的第一引物区的第二部分。修饰引物第一区的第一部分通常由与SPBIO互补的至少6个或更多的核苷酸组成。

15       另外，通过用靶核酸完成酶促延伸可间接固定修饰引物，所述靶核酸与固体支持物相连。在引物延伸前或其后可固定靶分子。

任选地，在于裂解位点裂解之前将含固定化的和非固定化的物质的反应混合物洗涤，以便在对延伸片段进行大小测定之前方便地将固定化的和非固定化的物质相分离。

20       根据固定的性质，在酶促延伸前或后，可将引物固定在固定连接位点。通常当所述固定连接位点包含在第一引物区内时，在所选的裂解条件下保持固定连接的完整以便以固定形式保留显著部分的修饰引物的核苷酸（如组成第一引物区的那些）。根据本发明方法，相对于由引物和延伸片段组成的产物的阅读长度，该延伸片段的阅读长度增加。

25       在本发明的一个实施方案中，用质谱确定延伸片段的大小，所述片段通常含源自修饰寡核苷酸引物的不超过约5个的核苷酸。所述大小测定可使用基质辅助的激光解吸离子化质谱，而且更具体地说，可用飞行时间质谱法完成。

大小测定方法还可与靶核酸的扩增相结合使用。

30       在本发明该方面的一个实施方案中，在可有效促进引物与核酸杂交以产生引物/核酸复合物的条件下，将第一和第二引物与靶核酸结合。引物之一（如第一引物）与靶核酸互补，而且具有含引物5'末端和一固定



连接位点的第一区。所述第一引物还含有含引物 3'末端的第二区，所述 3'末端可作为酶促延伸的引发位点。第一引物的第二区还含有可裂解位点。第二引物与靶核酸同源。

5 在存在适宜聚合酶和所有 4 种脱氧核苷酸三磷酸酯 ( dNTPs ) 或其修饰物的条件下，将引物/核酸复合物转变成双链片段。通过连续重复下列步骤可扩增大量的含引物片段：(i)变性双链片段以产生单链片段，(ii)将单链与引物杂交以形成链/引物复合物，(iii)在存在聚合酶和所有 4 种 dNTPs 的条件下，从链/引物复合物产生双链片段，和(iv)重复(i)到(iii)的步骤直到达到所需程度的扩增。

10 然后将扩增的片段变性以得到包含由第一引物和延伸片段组成之产物的混合物。在本发明该方面的实施方案中，将含第一引物的扩增片段固定在固定连接位点，然后通常通过洗涤除去未固定的扩增片段。然后在可裂解位点，从固定的产物中裂解第一引物，从而从支持物上释放出延伸片段。

15 在另一实施方案中，可在变性前固定扩增片段。通常，在于可裂解位点进行裂解前固定所述扩增片段以便释放并随后在没有其它物质（如引物、反应试剂、过量 dNTPs）的条件下分析因所述裂解而产生的延伸片段。

20 然后通过质谱确定延伸片段的大小。相对于由第一引物和延伸片段组成的产物的阅读长度，该延伸片段的阅读长度增加。

大小测定方法的另一实施方案提供了第一和第二引物，引物之一，即第一引物含有可裂解位点，而另一引物，即第二引物含有用于结合到固体支持物上的固定连接位点。第二引物由 5'末端和 3'末端组成，并与靶核酸同源，而且包括含第二引物 3'末端的第一片段，和含引物 5'末端  
25 以及固定连接位点的第二片段。

将这些第一和第二引物与靶核酸结合以产生引物/核酸复合物，然后在存在聚合酶和脱氧核苷-三磷酸酯的条件下，转变成双链片段。用高浓度靶核酸可产生足量的引物延伸产物，以完成大小测定方法，或可将所述大小测定方法与扩增的不同轮次结合。在得到所需量的产物后，通过  
30 在固定连接位点连接，可固定含第二引物的延伸产物。然后在可裂解位点裂解延伸产物以产生包含双链产物的混合物。优选通过洗涤除去未固定的裂解片段，然后将双链产物变性以释放延伸片段，并经质谱测定大

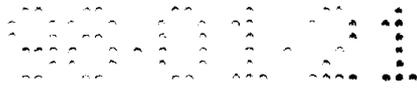
小，延伸片段的量降低，但相对于引物/核酸双链片段的阅读长度，延伸片段的阅读长度增加。在可裂解位点裂解前或后均可进行延伸产物的固定。

5 应理解，第一引物的可裂解位点和第二引物的固定连接位点包含上述的类型。

在一实施方案中，第一引物在第一引物区含有 II 型限制酶识别位点，可裂解位点在第二引物区，而第二引物含有用于连接到固体支持物上的固定连接位点。通过加入识别第一引物区中所含识别位点的限制核酸内切酶，来完成在可裂解位点的裂解，以提供(i)第一引物第一区的释放片段和(ii)变性前固定以释放所需的延伸片段的双链产物。

10 在相关方面，本发明提供了测序方法，该方法利用本发明的修饰引物以便通过质谱确定靶分子的序列。在本发明该方面的一个实施方案中，通过将本发明修饰的可固定引物与靶核酸如 DNA 或 RNA 杂交，然后，在存在 4 种不同双脱氧核苷酸中的一种（链终止子）的条件下酶促延伸引物以得到引物延伸产物的混合物，从而确定靶核酸的序列。引物延伸产物各含有引物和延伸片段。将延伸产物变性、固定，然后洗涤以除去反应中未固定的物质。在上述实施方案中，可在酶促延伸前或之后进行固定，但通常是在于可裂解位点裂解前完成固定。随后固定并除去未固定的部分，将引物延伸产物裂解以释放延伸片段。用质谱对延伸片段进行大小测定，然后用剩下的 3 种不同双脱氧核苷酸每一种重复上述步骤。通过比较从 4 种不同延伸反应得到的延伸片段的大小来确定所述靶的序列。在上述方法的改进中，用一种链终止核苷酸以上，最多所有 4 种（如，dTTP、ddTTP、dATP、ddATP、dCTP、ddCTP、dGTP 和 ddGTP）组成的混合物完成单个引物延伸反应。然后用质量数据和 4 种碱基的已知质量值分析所得的反应混合物，所述混合物含有最多为所有 4 种的碱基特异性终止产物。任选地，可以用质量修饰的核苷酸以提高产物混合物的分辨率。用本发明的修饰引物与其它不使用双脱氧核苷酸的测序方法结合，也可以完成测序。

25 在一个所述的实施方案中，首先通过将引物与靶 DNA 杂交来确定靶核酸，如 DNA 或 RNA 的序列，所述引物(i)与靶 DNA 互补；(ii)有含引物 5'末端的第一区和固定结合位点，和(iii)有含引物 3'末端的第二区和可裂解位点。所述引物的 3'末端还可作为酶促延伸的引发位点。



然后，在 4 种不同脱氧核苷酸 $\alpha$ -硫代三磷酸类似物（dNTP $\alpha$ S）之一存在的条件下，用酶延伸所述引物以得到含硫代磷酸键的引物延伸产物混合物。用可在所述硫代磷酸酯位置特异性裂解的试剂处理含硫代磷酸酯的延伸产物。促进硫代磷酸酯特异性裂解的适宜试剂包括 3'或 5'外切核酸酶、2-碘代乙醇和 2,3-环氧-1-丙醇。通常在产生硫代磷酸键限制裂解的条件下，完成延伸产物的处理，以得到一组引物延伸降解产物。另外，用有限量的 $\alpha$ -硫代三磷酸类似物和相应的常规三磷酸脱氧核苷(dNTP)来完成引物延伸反应。然后，在有效裂解掺入到延伸产物中的所有硫代磷酸基团（完全裂解）的条件下，用上述硫代磷酸选择性试剂处理所得的延伸产物。

将引物延伸降解产物固定在固定结合位点以得到固定的引物延伸降解产物（即 5'末端的含引物特异性嵌套片段），每种产物均含有引物和延伸片段。在本发明该方面的另外的实施方案中，可在下列情况下完成固定：i)酶促延伸前，ii)酶促延伸后，iii)用硫代磷酸酯特异性裂解试剂处理含硫代磷酸的引物延伸产物前，或iii)所述处理后。

固定后，洗涤引物延伸降解产物以除去未固定的产物。在可裂解位点的裂解可释放延伸片段，然后用质谱进行大小测定。用本发明该方面的所述测序方法，相对于其引物延伸降解产物的阅读长度，任何给定延伸片段的阅读长度均会增加。

然后用 4 种不同 dNTP $\alpha$ S 类似物中的第二、三和第四种重复杂交、酶促延伸、用硫代磷酸酯裂解试剂处理、固定、洗涤、裂解以及大小测定步骤，以便通过比较从 4 种延伸反应中得到的延伸产物的大小来确定靶 DNA 的序列。如果需要，可在存在 2-4 种不同 dNTP $\alpha$ S 类似物的条件下完成杂交、酶促裂解、用硫代磷酸酯裂解试剂处理、固定、洗涤以及裂解，然后用质谱对所得的片段进行大小测定。

根据另一方面，提供了利用本发明修饰引物的指纹法以得到靶寡核苷酸的指纹。

在参照附图和实施例阅读了下列详细描述后，本发明的这些和其它目的和特征将是更显而易见的。

## 附图概述

图 1A-1W 是用于本发明寡核苷酸组成的天然磷酸二酯核苷酸的键合和举证性核苷间可裂解位点；



图 2A-2M 包括用于固定修饰寡核苷酸引物第一区的一些举证性固定结合键;

图 3A 和 3B 说明修饰寡核苷酸引物样品的飞行时间质谱, 所述引物含有在选择性裂解前后, 从 3-羟基吡啶甲酸的固体基质上解吸下来的可裂解核糖;

图 4 在 10-位含可裂解核糖的固定的 18-聚体可裂解产物的飞行时间质谱;

图 5A-5E 说明根据本发明, 固定可裂解引物的 4 个不同实施方案; 图 6A 和 6B 说明用本发明的可固定、可裂解引物, 确定靶 DNA 分子序列的举证性方法;

图 7A 和 7B 说明适于用本发明的修饰引物检测的两种不同遗传病的不同单基因突变位点。

图 8 说明修饰引物经第一引物区与靶分子和结合中间寡核苷酸的固定相 SPBIO 的竞争性杂交而进行固定;

图 9 说明经与 SPBIO 杂交来固定修饰引物, 所述修饰引物含有由与 SPBIO 互补的第一部分和与靶分子互补, 但不与 SPBIO 互补的下游第二部分组成的第一引物区;

图 10 说明酶促延伸产物 (由修饰引物和延伸片段组成) 经碱基配对与结合于固体支持物上的靶分子相互作用而进行固定;

图 11 说明酶促延伸产物的序列特异性裂解, 所述修饰引物在第一引物区含有限制识别位点, 在第二引物区含有可裂解位点;

图 12 说明用第一和第二修饰引物, 本发明的举证性大小测定法, 其中所述第一引物含有酶可裂解位点, 第二引物含有固定结合位点;

图 13 是用含 5-硫醇胸苷可裂解位点的引物和 10 倍过量的引物, 从延伸反应得到的引物延伸产物的 MALDI 飞行时间质谱。引物延伸产物通过与互补生物素化中介寡核苷酸的杂交来固定, 所述中间寡核苷酸与链霉亲和素包被珠结合, 然后在化学裂解后释放以进行随后的大小分析;

图 14A 和 14B 是 MALDI 飞行时间质谱, 说明本发明方法在用碱基特异性消化检测寡核苷酸之间单个碱基取代 (点突变) 中的应用; 和

图 15A 和 15B 是引物延伸产物的 MALDI 飞行时间质谱, 其中使用 (i) 本发明的可裂解引物 (图 15B) 对 (ii) 全长引物 (图 15A), 说明分辨率和所得谱阅读长度方面的差异。



图 16 说明酶促延伸产物的序列特异性裂解，其中修饰引物在第一引物区含有 IIS 型限制酶识别位点，由 5' 发夹型（自我互补的双链）结构域组成，并在第二引物区含有可裂解位点。

### 发明详述

#### 5 I 定义

本文所用的下列术语由所说明的意义：

就在单链寡核苷酸内的位置而言，特定位置的“上游”位置位于该位置的 5'，而“下游”位置是指该点的 3'。

“固定化结合位点”或 IAS 是可存在于寡核苷酸引物内的位点，该位点用于结合直接通过间隔基臂或与固体支持物结合的中介寡核苷酸的特异性杂交来结合固体支持物。固定化结合位点可位于可裂解位点的上游（即 5'）或下游（即 3'），并在与固体支持物结合前进行化学修饰。另外，可将所述固定结合位点包含在产生于酶促延伸反应的延伸片段内，或可包含在靶核酸内。所述固定结合位点可以是用于与固体支持物共价键合的选择性官能基团，如在图 2A-2K 和图 2M 中所列的那些代表性官能基团。固定结合位点可以是配体如生物素以便经与固体支持物的高亲和性非共价作用而进行结合。此外，固定结合位点可以由与中介寡核苷酸互补的系列碱基组成。例如通过固定结合位点与中介寡核苷酸（与固体支持物结合的）的特异性杂交来完成修饰引物的固定。中介寡核苷酸也可作为模板。固定结合位点可通过化学或酶学方法与固体支持物相结合。在将固定结合位点与固体支持物相连后，所产生的固定键是在裂解可裂解位点的条件下，能保持稳定并既不会抑制碱基对杂交，也不会阻断引物从其 3' 末端的延伸能力的键。

如果在典型的杂交和洗涤条件下，如 Maniatis 等 p320-328 和 382-389 中所描述的，它们能够彼此特异杂交而不与其他多核苷酸特异性杂交，则认为两种核酸片断“可选择性杂交的”。

如果它们能够在下列情况下特异性彼此杂交，则认为两种核酸片段是“互补的” (i) 在典型杂交和洗涤条件下，如 Maniatis 等 p320-328 和 382-389 中所描述的，或(ii) 用降低的严谨洗涤条以便最多约 25-30% 的碱基错配，如：2 × SSC，0.1% SDS，室温两次，每次 30 分钟；然后 2 × SSC，0.1% SDS，37 °C，一次，30 分钟；然后 2 × SSC 室温，两次，每次 10 分钟。



料的区域)。

阅读长度通常是方法依赖性的(即所用检测方法的功能)。在某些分析方法中,大小分辨率有上限,如最多为 100 个核苷酸。本发明的一个优点是:当用所述方法分析产物时,可提高来自引物延伸产物的有关靶 DNA 序列的新或有用资料的数量。

例如,用本发明的修饰引物,可以按如下确定一举证性延伸片的阅读长度。首先将由 18 个核苷酸组成的与靶 DNA 互补并在核苷酸 17 和 18 之间含可裂解键(如可裂解位点是在离引物 3' 末端的一个核苷酸以内)的修饰引物与靶链退火,酶促(如用聚合酶或连接酶)延伸,所得的引物延伸产物(待固定)在可裂解位点裂解以得到只含有来自引物的一个核苷酸的延伸片段。在对延伸产物进行大小测定的过程中,阅读长度等于所检测的核苷酸总数( $X$ )减去衍生于引物第二区的一个核苷酸,或  $X - 1$ 。

相反,于可裂解位点裂解前,由引物和相同延伸片段组成的产物的阅读长度为  $X - 18$ ,其中 18 等于引物中的碱基数。因此,增加用本发明修饰引物得到的引物延伸产物的新或有用的测序或大小资料的数量。

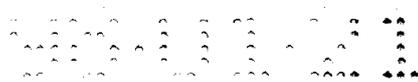
## II 寡核苷酸组成; 修饰引物的合成

### A. 修饰引物的特征

本发明的寡核苷酸引物(i)经设计以不阻断引物从其 3' 端延伸之能力的方式任选地与固体支持物相连,和(ii)掺入一可裂解部分以便与延伸片段相连的引物的 3' 部分可从引物上游部分,即 5' 到可裂解位点处释放出。引物的上游部分在本文指第一引物区,通常包含引物中的大部分核苷酸,从而于可裂解位点裂解后,可使引物延伸产物的新片段资料的数量达到最大。

本发明的修饰引物优选含有将引物与固体支持物相连的固定连接位点。对于含内部固定连接位点(即引物本身内所含位点)的修饰引物,固定连接位点或 IAS 通常与可裂解位点有至少 3 个核苷酸的间隔。可裂解位点选择性裂解后,引物片段的大部分仍固定在固体支持物上。如图 15A 和 15B 中所说明的,这样可以释放含有约 5 个或更少引物序列之碱基对的引物延伸产物,以扩大有用的大小分析范围(如增加阅读长度)。

图 15A 和 15B 是引物延伸反应产物的质谱,说明了按照本发明(图 15B)裂解的引物延伸片段的片段信息与未裂解的全长引物延伸片段(图



15A) 的片段信息之间的差异。在实施例 8 中详细描述了引物延伸反应和引物的裂解。应用于测序, 修饰的引物中可比含完整引物的延伸产物提供更有用的有关每个片段的序列资料。

5 本发明的寡核苷酸组成中用作引物或探针的举证性寡核苷酸序列的长度通常为约 8 到 30 个核苷酸, 优选约 10 到 25 个核苷酸。基于靶分子的已知序列, 通常, 寡核苷酸序列与所研究靶序列的上游(相对于 5' 末端)位点互补。根据所用的序列分析方法, 寡核苷酸序列还可在可释放的引物片段(如第二区)中含有标记, 如放射性或荧光标记。

10 本发明的有 5' 和 3' 末端的修饰引物通常由两个独立的核苷酸区组成。在本发明的一个方案中, 如图 5A, 这两个区通过可裂解位点, 由 X 表示, 相连。在图中杂环碱基, 腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶通常用符号“B”表示。含引物 5' 末端的第一区含有固定连接位点, “I”, 用于与固体支持物相连。在图 5A 所示的实施方案中, 修饰引物是固定形式。如图所示按照需要, 还可通过间隔臂将固定位点与引物的 5' 末端分开。  
15 用于本发明的间隔臂一般为 6 个或更多的原子长。

在第一区中的核苷酸数是可以变化的, 但通常至少约 3 个核苷酸。优选的实施方案, 第一引物区含有修饰引物的大部分核苷酸(如, 通常约 3-20 个核苷酸)。如所示, 可裂解键“X”是连接第一区和第二区的 3'-5'-核苷酸间可裂解位点。含引物 3' 末端的第二区由可行的尽量少的核苷酸组成, 尽管根据所用的引物, 核苷酸数量是可以改变的。第二区  
20 优选含有 0 到 5 个核苷酸, 而修饰引物的核苷酸总数约 8 到 30 个, 优选 10 到 25 个核苷酸。修饰引物的 3' 末端作为酶促延伸的引发位点。

图 5B 说明了本发明的另一实施方案中生物素分子与修饰引物的 5' 末端相连。生物素通过延伸间隔臂与引物的 5' 末端相连, 所述间隔臂用来降低空间位阻。生物素是用于本发明的举证性固定连接位点, 生物素  
25 是一种相对小的 维生素分子, 以高亲和性与亲和素和链霉亲和素结合。可从商业途径购买生物素化的引物, 或通过本领域常用的方法合成, 通常是利用含适于偶联的之活泼基团的官能基化生物素试剂。如上述图 5A 所示, 核苷酸间可裂解键将修饰引物的两个区分开。第二区含适用于  
30 酶促延伸的 3' 末端, 在固定于固体支持物之前或后均可进行酶促延伸。

图 5C 说明酶促延伸前, 在亲和素官能基化的固体支持物上获得图 5B 的修饰引物。在本发明的该实施方案中, 通过亲和素和生物素之间的



高亲和性的相互作用以“I”表示，固定修饰引物。

5 图 5D 说明本发明的另一实施方案，其中修饰引物通过固定结合位点与固体支持物相连，所述位点为一个杂环碱基上的取代基。如图 5D 所示，固定位点是尿嘧啶 5 位取代的氨基（Dattagupta,1989），更具体地说，是 5-烯丙基氨基取代基。在与固体支持物相连前，所述氨基可以是  
10 被保护形式的（如三氟乙酰氨基）。如所说明的，是通过酰胺键，固定到固体支持物上，尽管下文更详细描述的使用许多固定结合键。氨基残基与固体支持物的偶联通常是通过活化的支持物，如 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）酯官能化的支持物来进行的。

10 在图 5D 所示的实施方案中，固定引物为分支的或“T”-构型。如在上述实施方案中，修饰引物含有由“X”表示的可裂解键分开的两个区。第一区含有引物的 5' 末端和上述的固定连接位点。就图 5D 所示的“T”型引物的设计而言，通常含有修饰引物和序列特异性靶结合所需的大部分核苷酸位于“中心”脱氧核糖的 5' 端，如箭头所示。第二区含  
15 有作为酶促延伸引发位点的引物的 3' 末端。在所述的举证性修饰引物中，与靶 DNA 杂交，酶促延伸，然后变性及洗涤，选择性裂解可裂解位点“X”后，释放修饰引物的第二区和延伸产物（如延伸片段），而含序列特异性靶结合所需的大部分核苷酸的第一区仍保持固定的。

20 图 5E 说明含末端裂解位点，用(X)表示，的举证性修饰引物。在本发明的该实施方案中，可裂解键用核糖部分代表，尽管可使用许多可裂解位点。如所示，修饰引物是固定形式的，而且包含可裂解位点 5' 的固定连接位点。第一区含有固定连接位点和引物的大部分，但不包括核糖。核糖，或者说，可裂解位点，代表第二引物区，并也可作为酶促延伸的引发位点。

25 本发明的其他可裂解位点包括可用酶如核酸酶或糖基化酶。图 11 说明举证性的可裂解引物，所述引物在第一区含有限制降解的核苷酸性识别位点，在第二引物区含有可裂解位点。如图 11 中所示，引物 75 含有两个区，第一个是含限制性核酸内切酶识别序列 73 的 5' 区，第二个区是在识别序列下游或 3' 端的含可裂解位点 77 的 76。限制性核酸内切酶可  
30 裂解的位点优选位于距引物 3' 末端的约 5 个核苷酸或少于 5 个核苷酸处。

用于裂解本发明修饰引物的代表性限制性核酸内切酶包括 BpmI、



BspI、BseRI、BsmFI和FokI，所有这些酶均可交错切割。包含BpmI或BseRI识别位点的修饰引物含有(i)分别含识别序列5'-CTGGAG-3'或5'-GTGCAG-3'的第一区，和(ii)在第二引物区，位于所述识别序列最后一个核苷酸下游16个碱基处的是可裂解位点。分别含BseRI或BsmFI识别位点，如5'-GAGGAG-3'或5'-GGGAC-3'的修饰引物含有位于所述识别序列最后一个核苷酸下游10个碱基处的可裂解位点，而含FokI识别序列（如5'-GGATG-3'）的引物含有距所述识别序列最后一个核苷酸下游9个碱基处的可裂解位点。

现在回到图11，引物的第一区含有两个独立的结构域。第一结构域73，由可被上述限制性核酸内切酶识别的一系列碱基组成。第一引物区的第二结构域，76，在限制性核酸内切酶识别序列的3'端，含有与靶DNA分子81互补的核苷酸，所述靶DNA作为引物酶促延伸的模板。第一引物区73的第一结构域可按照需要与靶分子杂交。

引物延伸反应形成引物延伸产物79（如下文更详细描述）后，将双链产物变性85，然后将与第一引物区内的第一73和第二76结构域互补的寡核苷酸加到反应混合物中，优选过量。通常，互补寡核苷酸83含有约15-25个核苷酸，足以被限制性核酸内切酶识别并在可裂解位点进行裂解。优选限制性核酸内切酶可裂解位点在或靠近引物的3'末端。

然后将反应混合物冷却并退火86。由于存在过量的互补寡核苷酸83，如在87说明的，有利于引物延伸产物与互补寡核苷酸杂交。接着将限制性内切酶加到混合物中，如89所示，一促进在可裂解位点的裂解，从而释放延伸片段91，与可裂解位点3'的互补寡核苷酸小片段93，和可裂解位点5'的大引物/互补寡核苷酸片段95。

上述类型的引物还可含有可裂解位点下游的固定结合位点（IAS），以便能够固定延伸片段。IAS的导入不应影响(i)模板与修饰引物的序列特异性结合，(ii)引物与互补寡核苷酸83的序列特异性结合，(iii)引物的酶促延伸，或(iv)限制酶的切割能力。通常在释放延伸产物并随后进行大小测定和/或序列分析前，将其固定并洗涤以除去反应产物（盐、酶、核苷酸片段、试剂）。其它方法包括(i)用含固定连接位点的引物或延伸片段，在酶促延伸引物和双链产物变性后，通过在固定连接位点的结合来获得单链引物延伸产物，然后除去模板并按上述加入互补寡核苷酸83，或(ii)用经修饰的含固定连接位点的模板以便在酶促延伸前

或后，加入寡核苷酸 83 前，获得模板。

在图 16 中说明了图 11 中所列可裂解引物的变体，其中第一引物区在发夹内含有广泛的限制性识别位点（Szybalski）。就图 16 而言，可裂解位点 127 是 II 型限制性核酸内切酶的可裂解位点，其中双链酶识别序列 129 位于第一引物区内（即可裂解位点的上游），第一引物区含有 5'发夹型（自我互补的双链）结构域。5'发夹结构域 131 包含限制酶的双链识别位点 129。第二（单链）引物区包含(i)可裂解位点（即限制性核酸内切酶切割位点），和(ii)由与单链靶 133 互补的核苷酸组成，因此可作为酶促延伸的引发位点。在引物的酶促延伸后（如 135 所示），通过用适宜的 II 型限制性核酸内切酶处理来裂解 139 产物 137，释放片段 141 和 143，然后变性以释放用于随后分析，即质谱的单链延伸片段。如图中 145 所说明的，根据需要，可将模板在该过程的任何阶段与固体支持物相连。

在某些情况下，可裂解位点是能够阻断或终止具有 5'到 3'外切核酸酶活性的酶如 T7 基因 6 外切核酸酶、ExoVIII、RecJ 和脾磷酸二酯酶 II 的 5'到 3'酶促消化的核苷酸。所述“阻断”核苷酸包括含下文将详述的硫代磷酸酯、硼代-磷酸或肽基团的核苷酸。在利用含阻断核苷酸作为可裂解位点的修饰引物所进行的引物延伸反应中，引物延伸反应后，所得的产物其组成为(i)含阻断核苷酸的修饰引物，和(ii)延伸片段，用核酸酶如具有 5'到 3'外切核酸酶活性的外切核酸酶处理的。核酸酶处理通常会导致引物第一区的消化以产生由可裂解位点下游（即 3'）核苷酸组成的延伸片段。

在上述所有的举证性实施方案中，可裂解位点的裂解会释放新合成的引物延伸产物，所述产物含有极少的或不含有在原修饰引物中存在的核苷酸碱基。

### B 可裂解位点的导入

通常用下列合成方法之一将可裂解位点（由修饰核苷酸组成的）导入寡核苷酸探针。根据待导入的可裂解位点的选择，首先制备功能基化的核苷酸或修饰核苷酸二聚体，然后在引物合成过程中选择性地导入正在延长的寡核苷酸片段中。含可裂解位点的引物可通过溶液合成，优选利用使用 DNA 合成仪的自动固相合成条件来制备。

在形成修饰二聚体的过程中，将两个适宜的保护核苷酸彼此相连一

形成修饰的 3'-5'-核苷酸间键合。然后在合成过程中，将含可裂解位点的二聚体（或其保护形式）掺入到寡核苷酸引物中以形成含可裂解位点的修饰寡核苷酸。在选择条件下，可裂解位点可被化学裂解，但在标准固相 DNA 合成、固体支持物连接、引物延伸和杂交条件下该位点是稳定的。

另外，在单核苷酸上进行官能化，以引入在与第二核苷酸分子反应后或在引物合成过程中可形成可裂解位点的活性基团。

尽管官能基化也可发生在核苷酸的碱基或糖上，但通常进行的修饰则使寡核苷酸引物含有特异性可裂解位点，用该位点代替所得聚合物的磷酸二酯键。优选的修饰或导入可裂解位点的非核苷酸间位置包括胸腺嘧啶的 C(5)和胞嘧啶的 N(4)，因为对这两个碱基位点很容易进行化学操作而不需防止碱基配对。

在图 1B-1W 中列举了许多适用于本发明寡核苷酸组成的举证性核苷酸间可裂解位点。图 1A 是说明未修饰的，天然 3',5'-磷酸二酯键。用于本发明的可裂解位点或键可在寡核苷酸序列内的特定位置，优选距引物 3'末端的约 5 个核苷酸处或以内，并在不裂解固定连接位点的条件下可被选择性裂解。在一优选实施方案中，可裂解位点位于引物的 3'末端。可裂解键还应是化学作用可及的。

用于本发明的化学可裂解的核苷酸间键包括但不限于下列分别在图 1B-1W 中说明的各键：二烷氧基硅烷，图 1B； $\beta$ -氰基醚，图 1C；5'-脱氧-5'-氨基甲酸酯，图 1D；3'-脱氧-3'-氨基甲酸酯，图 1E；脲，图 1F；2'-氰基-3',5'-磷酸二酯，图 1G；3'-(S)-硫代磷酸酯，图 1H；5'-(S)-硫代磷酸酯，图 1.I；3'-(N)-氨基磷酸酯，图 1.J；5'-(N)-氨基磷酸酯，图 1K； $\alpha$ -氨基酰胺，图 1L；连二醇，图 1M；核糖核苷插入基，图 1N；2'-氨基-3',5'-磷酸二酯，图 1O；烯丙基亚砷，图 1P；酯，图 1Q；硅醚，图 1R；二硫代乙缩醛，图 1S；5'-硫代-缩甲醛，图 1T； $\alpha$ -羟基-甲基-磷酸二酰胺，图 1U；乙缩醛，图 1V；3'-硫代-缩甲醛，图 1W。其他化学可裂解的键包括甲基磷酸酯和磷酸三酯。适于非化学裂解方法如光解或热解的可裂解键包括硝基苄基醚(NBE)，cis-syn 胸苷二聚体(Nadji 等，1992)，和环己烯。

用本领域专业人员已知的标准核酸化学法（Hobbs, 1990; Townsend, 等，1986）合成图 1B-1W 中所说明的含可裂解键的核



核苷二聚体。另外，人们可直接合成含 5'-或 3'-反应基团（或其保护形式）的修饰核苷以用于标准固相合成，从而导入所需的可裂解键。2'-官能基化核苷通常从相应的核糖核苷起始物来制备。通过将适宜的保护核苷与 5'-(2-氟基烯丙基)功能基化的 3'-亚磷酰胺反应，可形成如图 1C 所示的核苷酸间  $\beta$ -氟基醚键。用碱处理后的  $\beta$ -消除反应实现了选择性裂解，在存在  $\beta$ -氟基取代基的情况下反应可以得到促进。含 3'-(O)-氨基甲酸酯核苷酸间键的核苷二聚体可通过相应 3'-酰氯与 5'-氨基-修饰核苷之间反应的许多合成方法中的任何一种来制备。或者，制备 3'-修饰的异氰酸核苷，随后与适宜保护核苷的 5'-羟基反应。含 5'-(O)-氨基甲酸酯可裂解键的二核苷由咪唑氨基甲酸酯前体制备。

用亚磷酰胺试剂代替常规亚磷酰胺，通过基于固体支持物的合成方法制备含甲基磷酸酯键的寡核苷酸（Agrawal and Gookchild, 1987）。在碱性条件下，磷酸三酯键不太稳定，但用温和的反应条件或更不稳定的胺保护基（Miller 等 1971）可将所述可裂解基团导入到寡核苷酸骨架中。在苯甲基磺酰氯存在的情况下，用甲醇或乙醇酯化核苷酸间磷酸基团（Moody, 等, 1989）；也可用甲磺酸甲酯作为甲基化试剂（Koole, 等, 1987）。

优选用于修饰寡核苷酸组成的可裂解位点包括二烷氧基硅烷，核糖，3'-和 5'-氨基磷酸酯和 3'-和 5'-硫代磷酸酯。

在本发明的优选一个实施方案中，修饰寡核苷酸引物中所含的可裂解位点是二烷氧基硅烷（Ogilvie, 等, 1986；Seliger 等, 1987；Cormier 等, 1988）。实施例 1A 中描述了含二烷氧基硅烷核苷酸间键的引物的合成。尽管实施例 1A 中描述了二异丙基硅连接的二核苷，在硅上用作取代基的烷基不限于异丙基，还可以是直链或支链烷基。此外，在硅上的两个烷基可以上相同的，如在二异丙基硅烷基的情况下，或者也可以是不同的。从 Petrarch Systems, Bertram, PA 可得到各种二烷基甲硅烷化试剂。

实施例 1A 所示的合成路线中，首先制备活泼的 3'-O-甲硅烷，醚中间体，然后形成含 3'-5'-二异丙基甲硅烷基的核苷间连接的核苷二聚体。通过将 5'-(O)-二甲氧基三苯甲基(DMT)-保护的核苷，如 5'-(O)-二甲氧基三苯甲基-胸苷或 N-保护的核苷 N6-苯甲酰基-2'-脱氧-5'-(O)-DMT-腺苷、N4-苯甲酰基-2'-脱氧-5'-(O)-DMT-胞苷或 N2-异丁酰基

( isobutryl )-2'-脱氧-5'-(O)-DMT-鸟苷与 O-保护的硅烷试剂反应来形成 3'-甲硅烷基三氟甲基磺酸酯中间体。

5 在实施例 1A 中, 在有立体位阻的碱基的存在下, 用活泼的硅烷, 二(三氟甲-磺酰基)二异丙基硅烷处理保护的核苷以促使形成所需的 3'-(O)-二异丙基甲硅烷基三氟甲基磺酸酯中间体。体积庞大的碱如三-取代的吡啶试剂有助于防止形成不需要的对称的核苷二聚体, 所述二聚体是通过非反应的核苷与三氟甲基磺酸酯中间体 缩合而形成的 ( Saha, 等, 1993 )。

10 导入所需的 3'-O-甲硅烷基醚后, 将 3'-(O)二异丙基甲硅烷基三氟甲基磺酸盐中间体 与未保护的核苷反应以形成所需的核苷二聚体, 所述二聚体含有 3'(O),5'(O)-二烷氧基硅烷可裂解位点。保护的二聚体可进一步官能基化, 例如将 3'-羟基转变成相应的 2-氟基乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺以用于利用标准亚磷酰胺化学的自动固相合成, 从而得到所需的引物序列。二烷氧基硅烷位点的选择性断裂受氟离子处理影响 ( Corey and 15 Snider, 1972 )。

可用于本发明的另一优选的择性裂解官能团是硫代磷酸酯。分别在实施例 1B 和 1C 中描述了含 3'(S)-硫代磷酸酯或 5'(S)-硫代磷酸酯核苷酸间键的引物的制备。根据本发明的修饰寡核苷酸组成, 硫代磷酸酯核苷酸间键可在温和的氧化条件下被选择性裂解 ( Cosstick 等, 1989 )。

20 实施例 1B 中所描述的含 3'(S)-硫代磷酸酯可裂解位点的引物的合成方法中, 首先用碱处理将被保护的 3'-硫代的核苷起始物如 5-O-MMT-3'-S-苯甲酰基-3'-胸苷 ( Cosstick 等, 1988 ) 去保护形成去苯甲酰基的硫醇, 然后通过 2-氟基乙基-N,N-二异丙基氨基亚磷单氯化物 ( phosphoromonochloridite ) 反应转变成相应的活泼硫代亚磷酰胺。活泼 25 硫代亚磷酰胺与第二核苷分子结合以形成相应的硫代亚磷酸二聚体, 然后氧化磷中心以形成全保护的 3'(S)-硫代磷酸酯连接的二聚体。

30 为了促进硫代亚磷酰胺与第二个核苷分子如 3'-O-乙酰胸苷的偶联, 并防止不需要的自身缩合副反应, 可使用酸性活化剂 5-(对-硝基苯基)四唑。用适宜的氧化剂如四丁铵过硫酸氢钾或高碘酸四丁铵氧化硫代亚磷酸酯二聚体以形成 3'-乙酰基, 含 ( P-(O)-2-氟乙基-全保护的二聚体, 其中包含所需核苷酸间键的保护形式。实施例 1B 所述的标准条件下很容易完成脱保护。如上所述, 利用标准的固相亚磷酰胺化学, 可以很容易



地将含 3'-(S)硫代磷酸酯可裂解键的核苷二聚体掺入到寡核苷酸引物中。

另外，人们可在固相合成过程中直接利用活泼硫代亚磷酰胺，将所需的 3'-(S)硫代磷酸酯导入到寡核苷酸引物中。对于在控制孔玻璃上进行固相合成以导入含 3'-(S)硫代亚磷酰胺的官能化核苷，是在引入硫代核苷的反应步骤中，将溶解在用 5-(对-硝基苯)四唑饱和的乙腈中的硫代-修饰的核苷注射到含固体支持物的柱子中，通过三苯甲基阳离子的释放来监测偶联效率。

根据本发明制备了上述固定化的、可裂解引物并完成所需的杂交和引物延伸反应后，用温和的氧化剂如硝酸银水溶液处理来裂解硫代磷酸酯核苷酸间位点。

用与上述 3'-(S)硫代磷酸酯稍有不同方式，制备相应的 5'-(S)硫代磷酸酯，在实施例 1(C)中有详细描述。该方法利用了关键的 5-硫代-修饰的核苷中间体以便在固相寡核苷酸合成过程中掺入所需的 5'-(S)硫代磷酸酯可裂解键 (Mag 等, 1991; Sproat 等, 1987)。

首先通过用甲苯磺酰氯处理来制备胸苷的 5'-甲苯磺酸酯，然后将 5'-甲苯磺酸酯转变成 5'-(S-三苯甲基)-巯基-5'-脱氧胸苷，从而合成了含保护的 5'-硫代基团的核苷结构单元。通过用 5 倍过量的三苯甲硫醇钠 (用氢氧化钠将三苯甲硫醇去质子化就地制备的) 处理，将 5'-甲苯磺酰基-胸苷转变成 5'-(S-三苯甲基)-巯基-5'-脱氧胸苷。在上述合成步骤中，将硫原子引入到核苷的 5'位，形成所需的关键中间体的 S-三苯甲基前体。然后在四唑存在的下，用 2-氰基乙氧基-二-(N,N-二异丙基氨基)膦在 3'位进行亚磷酸化，形成所需官能基化核苷，5'-(S-三苯甲基)-巯基-5'-脱氧胸苷-3'-O-(2-氰基乙基-二-N,N-二异丙基氨基)亚磷酸酯。

通过首先将 5-(S)-保护的核苷中间体与去保护的与聚合物结合的寡核苷酸偶联，用标准固相亚磷酰胺化学法将其引入到寡核苷酸引物中。然后用碘水将亚磷酸酯键氧化，硝酸银裂解 S--三苯甲基并用二硫苏糖醇还原形成活泼的硫醇。然后将硫醇与 2'-脱氧核苷-3'-亚磷酰胺偶联，随后氧化硫代亚磷酸键以形成所需的 5'-硫代磷酸酯可裂解位点。

也可以通过用硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)或氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液处理来选择性裂解硫代磷酸酯位点。

在本发明修饰寡核苷酸组成中可用作可裂解位点的另一功能基团是



氨基磷酸酯。化学上可用标准固相 DNA 合成法 (Bannwarth, 1988) 制备带有氨基磷酸酯核苷酸间键的寡核苷酸。在实施例 1D 中描述了制备含 5'(N)-氨基磷酸酯核苷酸间键的引物。在实施例 1D 所述的合成方法中, 5'-氨基修饰的核苷可以从市场购买或通过将 5'-羟基转变成相应的叠氮化物, 然后在钼/炭催化剂上还原(Yamamoto 等, 1980)来合成。

然后通过用 4-甲氧基三苯甲基氯处理来保护 5'-氨基, 然后与二(二异丙基胺)四唑化物 (tetrazolide) 和(2-氰基乙氧基)二(二异丙基氨基)磷反应以形成相应的 3'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺-官能基化核苷。再利用亚磷酰胺标准固相 DNA 合成法将含 5'-保护氨基的活泼核苷选择性地导入到寡核苷酸片段中, 以形成所需的 5'-氨基磷酸酯键。在温和的酸性条件下, 例如通过用 80% 乙酸处理来选择性地裂解氨基磷酸酯键。磷酰胺键在核糖系列中比在脱氧核糖系列中更不稳定(Tomasz 等, 1981)。

用于本发明寡核苷酸组成中的可裂解位点的另一官能基团是核糖。在实施例 3 - 5 中描述了含可裂解核糖的修饰引物。在利用标准的亚磷酰胺化学法的自动固相合成中, 将含适宜的 O-保护基的核糖选择性地导入到正在延长的寡聚物片段中。如实施例 3 和 5 中所述, 通过用稀释的氢氧化铵处理来完成选择性裂解。

### C. 连接到固体支持物上

根据本发明的一方面, 寡核苷酸引物(i)可经设计以便以不阻断引物从其 3'末端延伸能力的方式结合到固体支持物上, 和(ii)掺入可裂解部分以便可从按需要固定的 5'部分释放出引物的 3'部分(与延伸产物相连)。

优选设计本发明的寡核苷酸引物以通过一间隔臂直接地, 或通过与其连于固体支持物 (SPBIO) 上的中介寡核苷酸的特异性杂交而与固体支持物相结合。在可裂解位点的上游(即其 5'端)或下游(即其 3'端)均可进行固定。

经(i)包含在由酶促延伸反应所得的核酸延伸片段内, 或(ii)包含在靶核酸内的结合位点, 也可与固相相结合。

固定结合位点可以是用于共价结合于固体支持物上的选择官能基团, 如在图 2A-2K 和图 2M 中所列的那些代表性官能基团。固定结合位点也可是配体, 如生物素, 以便经与固体支持物的高亲和力的非共价相互作用而进行结合。而且, 如图 8 和 9 所示, 固定结合位点也可由一系

列与连于固体支持物上的中间寡核苷酸互补的碱基组成。

5 现就图 8 而言,上述含可裂解位点 17 的引物 15(i)在靶可与引物稳定退火的条件下,与单链靶 DNA 序列 21 杂交,和(ii)被酶促延伸以形成延伸片段 19。然后将延伸产物与结合了固体支持物 23 的中介寡核苷酸接触。中介寡核苷酸与全长引物或至少引物第一区互补。

在图 8 所说明的实施方案中,中介寡核苷酸序列与靶分子 21 的至少一部分同源,以便中介寡核苷酸和靶竞争与引物的重叠区杂交。在延伸产物序列已知的情况下,可设计使中介寡核苷酸序列与延伸片段的一部分互补,而不是与引物或含引物和延伸片段的区域互补。

10 在用该方法进行固定时,为了有利于引物延伸产物与中介寡核苷酸杂交,优选降低靶分子相对于中间寡核苷酸的浓度。由于模板能够与全长的延伸产物杂交延伸产物与模板的杂交是有利的热动力。可通过许多方法来降低靶核酸的浓度,所述方法包括特异的化学或酶促消化,它们能使引物延伸产物稳定。

15 通过许多方法中的任何一种均可完成模板的选择性消化,所述方法包括:(i)含脱氧尿苷的模板的使用;(ii)利用 RNA 模板来提供 DNA 延伸产物;(iii)用含修饰核苷间键的模板的使用;或(iv)模板的核酸外切酶促消化。下文将就每一项作更详细的描述。

20 在所用的第一种方法中,用核酸片段作为模板用于引物延伸反应,已经对所述核酸片段进行位点选择性修饰(Longo等,1990),使之含脱氧尿苷以代替脱氧胸苷。酶促延伸后,用尿嘧啶 DNA 糖基化酶(Amersham Life Sciences,Arlington Heights,IL)处理含模板的反应混合物,以便在含脱氧尿嘧啶的修饰位点将模板分子裂解成片段。尿嘧啶 DNA 糖基化酶通过裂解尿嘧啶碱基和糖磷酸酯骨架之间的 N-糖苷键,从含 dU  
25 的 DNA 中切割脱氧尿苷。

在第二种方法中,用 RNA 模板提供 DNA 延伸产物。然后用 RNase 如 RNaseA 通过消化选择性地除去模板。

30 另外,如上述(iii)所述,使用含修饰核苷间键如氨基磷酸酯或硫代磷酸酯的模板分子。引物延伸后,通过在修饰键位置进行化学促裂解来消化模板。模板-修饰的核苷间键和模板-消化试剂的选择取决于引物中可裂解位点的类型。通常在保持引物可裂解位点完整的条件下,完成模板的消化。可以用缩水甘油或碘代乙醇(Olsen)来裂解硫代磷酸酯键(5'-(O)-

P(S)O<sub>2</sub>),而通常在温和的酸性条件下,如用 80 % 乙酸处理来选择性裂解磷酸胺键。

利用核酸外切酶促的模板消化(如上述(iv)所述)过程中,修饰引物延伸产物以含有前述的适宜抗核酸外切酶的阻断基团。用 3'-5'特异性或 5'-3'特异性外切核酸酶进行处理后,由于存在阻断基团,所以“被保护的”延伸产物仍是完整的。在利用 3'-5'外切核酸酶(如蛇毒磷酸二酯酶或外切核酸酶 III)的过程中,将适宜的阻断基团放在延伸产物的 3'末端以防止酶促降解。

也可降低模板与固体-结合的中介寡核苷酸的相对浓度,例如(i)用有限量的模板完成循环合成过程(如循环测序或链取代扩增),或(ii)将大大过量(如 10 倍到 100 倍)的中介寡核苷酸加到反应混合物中。

现在回到图 8,在有利于引物延伸产物与固相结合中介寡核苷酸杂交的条件下,通过与固相结合中介寡核苷酸 23 的杂交,来固定 25 引物延伸产物以形成捕获的产物 27 和游离物(即单链模板)。固相结合中介寡核苷酸的 5'末端可终止于修饰引物可裂解位点前或后。在按照上述固定后,通过洗涤 29 来除去过量的反应产物以提供纯化的固定产物 31。裂解 33 固定产物以释放延伸片段 35 以便进行随后的分析。

根据本发明,在实施例 6 中描述了通过与固相结合中介寡核苷酸杂交来固定可裂解的延伸引物。

总之,含 5'-(S)-胸苷可裂解基的修饰 M13 的反向引物(SEQ ID NO: 12)(i)与单链靶杂交,和(ii)存在双脱氧胸苷的条件下,进行酶促延伸以产生一组双脱氧胸苷终止的延伸片段,引物与模板的比例为 8:1。然后将单链延伸产物与中介寡核苷酸(SEQ ID NO: 13)退火并在 3'模板生物素化,所述中介寡核苷酸与 M13 反向引物互补。然后加入链霉亲和素-包被的磁珠来固定延伸产物-中介寡核苷酸杂交物,洗涤并通过硝酸银促裂解 5'-(S)胸苷可裂解基团释放延伸产物。如图 13 所示,用 MALDI 飞行时间质谱法来分析延伸片段。如所见到的,可以以良好的分辨率检测到阅读长度为至少约 33 个碱基对的延伸片段。

如图 9 所示,在上述方法的改变中,设计引物 39 以含有位于第一引物区内的固定结合位点 38,所述第一引物区由一系列与结合于固体支持物的中介寡核苷酸互补的碱基组成。但是,在该实施方案中,中介寡核苷酸与模板分子 45 没有同源性,故它们不会彼此竞争与引物进行杂交。

如图 9 所示，在酶促延伸形成延伸片段 43 后，通过与固相结合的中介寡核苷酸 37 的特异性杂交来固定引物。引物、模板和中介寡核苷酸的这种设计可以使引物与模板和中介寡核苷酸同时进行非竞争性杂交。洗涤所示固相结合的延伸产物，除去 47 模板以得到纯化的固定产物 49，然后  
5 在可裂解位点 41 裂解 51 以释放延伸片段 53 以用于如上述图 8 所示的随后的大小和/或序列分析。

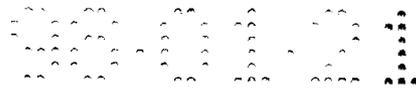
另外，如图 10 所示，本发明的引物可通过与固定的靶核酸杂交，与固相结合。在使用该方法的过程中，靶分子 61 既作为引物 55 酶促延伸的模板，又作为引物固相结合的中间体。在引物的酶促延伸之前或后，  
10 可将模板与固相结合以形成延伸的引物片段 59。如所述，固定引物延伸产物便于除去过量的酶、盐等 63，以得到纯化的固定引物延伸产物 65。在分析前，将延伸引物从模板上 67 变性，释放到溶液中。在可裂解位点 57 的裂解可促进延伸片段 71 和由第一引物区组成的片段 69 的释放。根据引物的设计和产物分析模式，引物片段 69 的存在对随后的产物分析有  
15 不利的影响。在这些情况下，可以用如上所述用于除去模板的方法来除去片段 69。在用质谱分析延伸片段大小的情况下，在某些情况下，可选择片段 69 的质量数，以避免其在所得的质谱中干扰产物峰，并也可用之作为内标。

将固定结合位点与固体支持物结合后，所产生的固定键通常在用于  
20 裂解可裂解位点的条件下仍能保持稳定，并不抑制碱基对杂交或破坏引物从其 3' 末端延伸的能力。

在本发明的修饰引物中，固定结合位点通常与可裂解位点至少有 3 个核苷酸的间隔。在优选实施方案中，选择性地裂解可裂解位点后，引物片段的大部分仍固定在固体支持物上。这使得可以释放通常含约引物  
25 序列的约 5 个或更少碱基对的引物延伸产物，以提供比含完整引物的延伸产物更有用的每个片段的序列资料。

例如本发明的修饰引物可用于检测遗传病，其野生型和突变等位基因的核苷酸序列均是已知。用于该目的的修饰引物有 5' 和 3' 末端，并含有约 8 - 30 个与已知突变位点上游的基因序列互补的碱基对。优选引物  
30 的 3' 末端与已知突变区至少有约 10 个碱基对的互补，以确定在突变区任一侧的序列资料。

根据本发明的一个方面，修饰引物还含有(i)用于结合固体支持物的



固定位点和(ii)一个可裂解位点。根据本发明，一种引物设计是其中固定位点位于可裂解位点的 5'，而所述可裂解位点位于引物 3'末端数的约 5 个碱基对处或以内。

5 然后用该修饰引物作为探针以辨别含所研究的突变序列的 DNA 的存在与否。所述引物(i)在突变和正常序列均与引物稳定退火的条件下，与未知的单链靶 DNA 序列杂交，和(ii)可以被酶促延伸。在链延伸前或后均可进行引物固定。链延伸后，通过选择性裂解可裂解键而释放了固定引物延伸产物后，分析引物延伸产物以确定跨已知突变区的序列并鉴定遗传病（如果存在的话）。

10 在图 6A 和 6B 中列出了含 20 个脱氧核苷酸残基的举证性修饰引物，该引物具有特异检测一种已知遗传病的能力。如所说明的，修饰引物含有包含固定结合位点“ I ”的第一区，固定结合位点在可裂解位点“ X ”的 5'末端并由 16 个核苷酸残基组成。第二区含有引物的 3'末端，含有 4 个核苷酸 (C-T-G-C)。可裂解键 X 连接第一和第二区。

15 在本发明该方面的说明中，首先将图 6A（上部）所示并具有 SEQ ID NO: 2 所示序列的修饰引物与图 6A 所示的具有 SEQ ID NO: 3 所示序列的单链 DNA 靶杂交。通常，杂交介质含有(i)来自人或其他生物源的变性的、未知的（靶） DNA，(ii)修饰的探针，和(iii)退火缓冲液，如 5X “ SEQUENASE ” 缓冲液（ 200 mM Tris-HCl,pH7.5,100mM MgCl<sub>2</sub>,250  
20 mMNaCl ）（美国生物化学公司， Cleveland， OH ）。通过将上述混合物加热到 65 °C 2 分钟，然后使混合物在约 30 分钟的时间内缓慢冷却到室温来完成退火（ Maniatis 等， 1982； Ausubel,等， 1989 ）。

杂交后，用脱氧核苷酸在单链模板上延伸修饰引物，然后用 DNA 聚合酶（如，“ SEQUENASE ” 聚合酶。 Version 1.0 或 2.0 ），经双脱氧  
25 核苷随机终止以进行 DNA 合成（ Primings， 等 1980； Sanger,1975 ）。如图 6A 中所说明的，从修饰引物的 3'末端开始延伸。从靶上将修饰延伸产物变性，通常是用热或化学变性剂如甲酰胺来得到引物延伸产物和靶 DNA 的混合物。（参见例如“用 T7 DNA 聚合酶进行 DNA 测序的方法” Version 1.0 或 2.0，第 4 版，美国生物化学，或“ CIRCUMVENT 热  
30 循环双脱氧 DNA 测序试剂盒说明手册”， New England Biolabs,Inc.,Beverly MA ）。

如图 6B 所示，然后在固定结合位点将引物延伸产物与固体支持物相

连接，尽管按照需要可在酶促延伸和/或变性前完成固定。通过固定延伸的引物，在一系列的洗涤步骤中，很容易除去在溶液中游离的靶 DNA 链，以及过量试剂、离子、酶等。通常在室温用大量的洗涤溶液（如 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA; 或纯水）洗涤固体底物。

5 然后将含固定的引物延伸片段并无杂质的固体颗粒放到可有效地选择性裂解可裂解位点的条件下，在选择性裂解的同时，如图 6B 所示，具有 SEQ ID NO: 4 序列的第一引物区仍与固体支持物相连。如在图 6B 中的特定实施方案所说明的，选择性裂解可释放仅含原修饰引物的 4 个核苷酸的引物延伸产物。含释放的延伸片段的上清液适用于随后的分析。

10 固定过程简化了用于随后分析的引物延伸产物的纯化。如上所述，不需要的酶、盐、试剂和测序靶可在进行延伸产物的选择性裂解前，被洗掉。

15 在固定本发明修饰引物的过程中，在引入可裂解位点前或后均可将引物的第一区与固体支持物相连。本领域常用的许多方法均可用于将寡核苷酸固定在固体支持物上（Saiki, 等, 1989；Zhang 等, 1991；Kremshy 等, 1987；Van Ness 等, 1991；Ghosh 等, 1987；Gingers 等, 1987；Khrapko 等, 1991）。用于本发明的固体支持物包括纤维素、硝酸纤维、尼龙膜、控制的孔玻璃珠、丙烯酰胺凝胶、聚苯乙烯、活化的葡聚糖、抗生物素蛋白/抗生蛋白链黄连素-包被的聚苯乙烯珠、琼脂糖功能基化塑料、玻璃、硅、铝、钢、铁、铜、镍、银和金。

20 有些底物可能需要在连接寡核苷酸前进行官能基化。可能需要所述表面修饰的固体底物包括铝、钢、铁、铜、镍、金和硅。在一种方法中，通过与偶联试剂如锆铝酸锆反应来将固体底物官能基化。

25 铝酸锆通常含有氧和羟基桥，其特征在于有很高的热和水解稳定性。由于其高度的金属性，所述化合物与金属表面如上述金属固体支持物特别容易进行反应。从市场上可以购买到含各种有机官能基团的双功能铝酸锆（如“MANCHEM”铝酸锆, Rh ne-Poulenc Latex & Specialty Polymers, Cranbury, NJ）。

30 在与固体支持物连接后，寡核苷酸，通常是 DNA 应与固体支持物有效地偶联。此外，固定的 DNA 应在固定后是稳定的，而且易于碱基杂交并可进行其他潜在的衍生反应。在用于选择性裂解本发明修饰寡核苷酸



组成中的可裂解位点的条件下，固定结合位点应是稳定的。

通过各种固定结合官能团，可将寡核苷酸与固体支持物相偶联。用于本发明的固定结合位点包括在图 2A-2M 中所说明的那些。通过支持物上活泼位点与寡核苷酸内的活泼位点之间的反应或经连接臂或间隔分子，而将支持物与寡核苷酸相连。

尽管满足上述标准的任何适宜官能团均可用于寡核苷酸与支持物的结合，但优选的键包括二硫键（图 2G），氨基甲酸酯（图 2B），脞（图 2J），酯（图 2C， 2I 和 2K，其中 Y 等于氧），(N)-官能化的硫脲（图 2D），官能化的马来酰亚胺（图 2A，其中 Y 等于硫、氧或氮），链霉亲合素或亲和素/生物素（图 2L），硫化汞（图 2E），硫化金（图 2M），酰胺（图 2C， 2I 和 2K，其中 Y 等于氮），硫酯（图 2C， 2I 和 2K，其中 Y 等于硫）。其他适用于结合固体支持物的功能团包括偶氮、醚和氨基。

固定结合位点可(i)修饰引物骨架上的一取代基（如在末端 5'-羟基位置的衍生），(ii)是修饰引物上的一个碱基或糖上的一个取代基，(iii)位于引物的第一区，所述第一区由与固相结合中介寡核苷酸互补的一系列碱基组成，(iv)在从酶促延伸反应产生的核酸延伸片段中或(v)被包含在靶核酸内。

在图 8 和 9 中说明了经引物与固相结合中介寡核苷酸（SPBIO）之间的碱基配对相互作用而形成的固定。在图 10 中说明了通过与固相结合的模板间的碱基配对相互作用来间接固定引物延伸产物。

用于结合寡核苷酸的固体支持物包括官能基化支持物如可从 Pierce(Rockford,IL)得到的 1,1'-羧基二咪唑活化的支持物或可从 Chiron 公司(Emeryville,CA)购买到的官能化的支持物。用于本发明的固体支持物包括基质物质如 6% 交联的琼脂糖，三丙烯酰 GF-2000（一种亲水基质）和 TSK HW-65F，所有均可用 1,1'-羧基二咪唑（Pierce）活化。固定通常是通过氨基修饰的寡核苷酸上的游离氨基与固体支持物上的活泼的咪唑氨基甲酸酯反应来完成的。咪唑基的取代导致在寡核苷酸和支持物之间形成如图 2B 所示的稳定的 N-烷基氨基甲酸酯键。偶联通常是在 pH 为 9 - 11 的范围内完成的，但 pH 9.5-10 是优选的。与 pH 敏感性物质的偶联可在 pH 为 8.5 左右的缓冲液中完成。

利用如修饰的核苷亚磷酸酰胺氨基修饰基-dT(Glen Research，

5 Sterling VA) (含有对碱不稳定的三氟乙酰基保护的伯胺, 所述伯胺通过 10 个原子的间隔基臂与胸腺嘧啶相连), 亚磷酰胺 5'-氨基修饰基 C6(Glen Research, Sterling VA)(含有对酸不稳定的单甲氧基三苯甲基保护的伯氨基), 或 N-三氟乙酰基-6-氨基己基-2-氰基乙基 N',N'-异丙基亚磷酰胺 (Applied Biosystems,Foster City ,CA ),通过标准固相 DNA 合成法可以合成与固体支持物连接的氨基修饰的寡核苷酸。尽管常用亚磷酰胺化学法制备含氨基的寡核苷酸, 但也可使用任何其他方法来得到含伯胺的寡核苷酸。

10 很容易将氨基修饰的寡核苷酸转变成 5'为氨基以外的相应硫醇或羧基终止的衍生物, 以用于固定或间隔基结合反应。通过与琥珀酸酐反应, 可将氨基修饰的寡核苷酸转变成相应的羧基衍生物(Bischoff 等, 1987)。如果需要, 在与固体支持物结合前, 在活化剂如水溶性碳化二亚胺存在的条件下, 羧基衍生的引物可与双官能化连接物臂如 1,6-二氨基己烷完成偶联反应。

15 通过用二硫双(琥珀酰亚胺丙酸酯)处理功能基化寡核苷酸的去保护 5'氨基, 然后通过二硫苏糖醇对巯基去保护 ( Bischoff, 等, 1987 ) 可制备硫醇修饰的寡核苷酸。

20 利用环氧化物的开环反应 ( Maskos 等, 1992 ), 也可将含游离氨基、巯基和羟基的寡核苷酸与支持物偶联。一种所述的举证性环氧化物活化的固体支持物可从 Pierce(Rockford,IL)得到, 含有 1,4-丁二醇二甘油醚活化的琼脂糖。根据待固定分子的稳定性, 偶联反应通常是在 pH 为 7.5-13 的范围内完成的。在用上述 Pierce 支持物完成的固定反应中, 所得的固定寡核苷酸通过 13-原子的亲水间隔臂与固体支持物隔开。

25 在另一固定方法中, 可将修饰寡核苷酸上的醛基与固体基质上如图 2J 所述的酰肼基偶联。首先将寡核苷酸上的一级羟基氧化成相应的醛, 通常是用温和的氧化剂如高碘酸钠。然后将寡核苷酸与含酰肼的基质如 Pierce's CarboLink<sup>TM</sup> Hydrazide 偶联。在中性 pH 下完成偶联反应。

30 此外, 用与官能基化基质如 Pierce's 固定的对氯苯甲酸汞 (图 2E) 偶联的硫醇衍生的寡核苷酸来完成固定反应。支持物是含 1,2-乙二胺间隔基的交联琼脂糖, 通过汞和硫原子之间的亲和结合来进行偶联。类似地, 如图 2M 所示, 可通过将 5'-硫醇化引物固定到金表面来进行固定 ( Hegner 等, 1993a )。用该方法, 将修饰引物经硫醇键化学吸附到金

表面(如固体支持物)上。以前已描述了多晶金表面的制备( Hegner 等, 1993b )。

也可用同或异双功能交联剂如 Pierce's Sulfo-SMCC 完成官能基化。用于本发明的交联剂通常含有约 3 - 20 埃长的间隔臂。用于偶联寡核苷酸和固体支持物的交联剂通常含有用于定靶活泼伯胺、巯基、羰基和羧基的官能基。用于与伯胺反应的交联剂通常含有末端酰胺酯基团或 N-羧基琥珀酰亚胺酯。举证性的交联剂如 Pierce's Sulfo-SMCC 在一端含有一活泼的羧基以便与胺衍生的固体支持物如己胺衍生的聚苯乙烯珠偶联。交联剂分子的另一端含有易与含有亲核基团如羟基、硫或氨基的寡核苷酸反应的活泼马来酰亚胺分子。用于与巯基反应的交联剂通常含有末端的马来酰亚胺基团、烷基或芳基卤、 $\alpha$ -卤代酰基或吡啶二硫化物, 可从 Pierce(Rockford,IL)得到各种化学交联剂。

另外,可以用包被的平板(如从 Pierce 得到的那些)来固定修饰的寡核苷酸。用于固定本发明寡核苷酸的举证性平板包括活化的平板如 Pierce's Reacti-Bind<sup>TM</sup> 马来酰亚胺激活的聚苯乙烯平板和 Reacti-Bind<sup>TM</sup> 链霉亲和素包被的聚苯乙烯平板。通过寡核苷酸的游离氨基与活泼酸酐之间的反应形成稳定的酰胺键(图 2H), 而将含伯胺基的寡核苷酸通过共价结合固定在前一种平板上。后一种平板对于生物素化寡核苷酸的亲和结合是有效的。也可以用金包被的平板来结合硫醇衍生的引物。

按照实施例 2A 和图 2L 中的描述制备用于固定到链霉亲和素或亲和素包被的固体支持物上的生物素化寡核苷酸。从市场上可以得到各种生物素化试剂(如 Pierce), 这些试剂都已被官能基化, 以便与含伯胺、巯基或碳水化合物基团的分子如修饰的寡核苷酸反应。

现在回到实施例 2A, 用生物素或含间隔臂的生物素修饰形式如 NHS-SS-生物素( Pierce )或 NHS-LC-生物素( Pierce )、在生物素和末端 N-羧基琥珀酰亚胺活化的羰基间含 11 个碳原子间隔臂的生物素衍生物处理氨基修饰的引物。然后通过链霉亲和素包被的支持物结合来固定生物素化的引物。由于非共价的生物素/亲和素之间强的相互作用, 固定的引物不可逆地结合。于固体支持物上这是用于本发明的一种优选固定结合, 原因是所得的复合物不会受极端 pH、有机溶剂和其它变性剂的影响( Green,1975 )。另一种亲和素(链霉亲和素)-生物素固定方法是在修饰引物中掺入地高辛配基分子( Sigma,St.,Louis,MO ), 然后用抗

-地高辛配基抗体捕获。

也可用酶学方法将寡核苷酸与固体支持物相连 ( Goldkorn,等, 1986 )。在一举证性的实施方案中, 用 3'末端转移酶, 将 poly(dA)尾加到双链 DNA 的 3'末端。然后将有(dA)尾的 DNA 与寡(dT)-纤维素杂交。

5 为了将 DNA 共价连接到固体支持物上, 首先用 DNA 聚合酶的 Klenow 片段处理杂交的样品, 然后用 T4 DNA 连接酶处理。通过加热及充分洗涤, 将未连接的 DNA 链与固定的链分开。该方法得到 5'末端与固体支持物共价相连的 ssDNA。

10 也可将本发明的修饰引物固定到金表面上。在使用该方法的固定过程中, 5'末端用以硫羟基终止的连接基团修饰的寡核苷酸高亲和性地化学吸附到金表面上 ( Hengner,等, 1993a )。将用市售试剂 (Pierce,Rokford,IL)通过后固相合成修饰得到的硫羟化引物, 在酶促延伸之前或之后, 固定到金薄层上。内裂解和蒸发后, 将金薄层放在样品层用于质谱直接分析。或者, 在分析前, 将所得的延伸片段转移到另一表  
15 面上。

### III. 使用固定的可裂解寡核苷酸组分的反应

#### A. 杂交和延伸

20 用于确定靶寡核苷酸链序列的方法常常涉及用本发明修饰可裂解引物的 Sanger 型测序法。可在酶促延伸之前或之后, 将修饰引物固定在固体支持物上。

用 Sanger DNA 测序法, 将 4 种碱基的双脱氧核苷加到反应混合物中。由于具有正常的 5'三磷酸酯基, 所以通过例如, 大肠杆菌 DNA 聚合酶就可将双脱氧核苷掺到 DNA 中。一旦掺入到正在延长的 DNA 链中后, 双脱氧核苷(ddNTP)的三磷酸酯无法再与下一个将要进入的 dNTP 形成磷酸二酯键, 因此, 使 DNA 链的延长终止。  
25

用 Sanger 法的典型 DNA 测序反应按如下进行。反应包括待测序的靶 DNA 链、含本发明可裂解位点的修饰引物, 并与靶链的末端互补; 仔细控制一种特定双脱氧核苷与其正常脱氧核苷酸配对物的比例和另外三种三磷酸脱氧核苷的比例。在此过程中对是否固定修饰引物没有限制。  
30 (根据试验条件, 可在酶促延伸反应前或后进行固定)。

加入 DNA 聚合酶, 从引物开始正常的聚合。在掺入 ddNTP 后, 链的延长停止。产生了一系列不同的链, 其长度取决于相对于 DNA 末端的



特定碱基的位置。靶链通常分做 4 种 DNA 聚合酶反应，每种都含有 4 种 ddNTP 中的一种和本发明的修饰引物。然后按照上述完成延伸反应。

通常用 DNA 测序试剂盒如“SEQUENASE” Version 1.0 或 2.0 T7 DNA 聚合酶（美国生物化学公司，Cleveland OH）完成 Sanger 型 DNA 测序。“SEQUENASE” Version 1.0 试剂盒使用衍生于噬菌体 T7 DNA 聚合酶的化学修饰的 DNA 聚合酶，其中将天然 T7 DNA 聚合酶的高 3'-5' 外切核酸酶活性失活。

在用美国生物化学公司的“SEQUENASE”试剂盒的过程中，首先将双链模板变性（如果使用双链模板的话），然后通过 65 °C 加热 2 分钟，将引物与靶杂交或退火。通过用氢氧化钠处理使超螺旋质粒 DNA 变性，并中和、进行乙醇沉淀以将引物退火进行测序。

制备含不同 ddNTP 的终止混合物以用于终止反应。退火的 DNA 混合物随机标记，将标记的反应混合物加到 4 种终止试管中。在本发明中，完成延伸反应以产生从几乎 0 到数百个碱基对长的产物。根据需要，在分析所得样品前，加入终止溶液（含甲酰胺、EDTA、溴酚兰和二甲苯青 FF）以终止反应。

对于不在酶促延伸前，未将引物固定到固体支持物上的反应来说，按照上述 IIB 中所述完成固定。

然后洗涤固定的延伸引物以除去过量的酶、离子、盐和其他杂质。在一实施方案中，将延伸引物固定到微滴定板孔的表面。固定到固体支持物上有利于产物的纯化，并利于随后在可裂解位点通过裂解引物来进行分离并保留在上清液中。

另外，脱氧核苷 $\alpha$ -硫代三磷酸，dNTP $\alpha$ Ss（可从美国生物化学公司，Cleveland OH 得到），然后进行有限的外切核酸酶促碱基特异性消化，如用外切核酸酶 III（新英格兰生物实验室，Beverly, MA）或蛇毒磷酸二酯酶（Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany）（Olsen, D., 等，1993），也可完成 DNA 测序。用化学试剂如 2-碘代乙醇或 2,3-环氧-1-丙醇（Nakamaye 等，1988）也可在掺入的硫代磷酸基团位置特异性裂解 DNA 片段。

简言之，按照如下，用经掺入了硫代磷酸核苷的本发明修饰引物可进行靶 DNA 序列的测序。靶 DNA 序列和上述修饰引物杂交，然后在存在一种脱氧核苷 $\alpha$ -硫代三磷酸（dNTP $\alpha$ S）的条件下，酶促延伸引物以

得到含硫代磷酸键的引物延伸产物混合物。在产生嵌套碱基特异性引物延伸降解产物的条件下，用有下列特性的试剂处理引物延伸产物，(i)在硫代磷酸键处可进行特异性裂解，如 2-碘代乙醇或 2,3-环氧-1-丙醇或 (ii) 从硫代磷酸键的下游消化 DNA，如 3'-5'外切核酸酶。

5 按照需要，在固定结合位点固定引物延伸降解产物以产生固定的引物延伸降解产物，每种产物均含有引物和延伸片段。另外，可在 i)酶促延伸前， ii)酶促延伸后，或 iii)用硫代磷酸酯特异性裂解试剂处理含硫代磷酸酯的引物延伸产物前，完成固定。

10 固定后，洗涤引物延伸降解产物以除去未固定的物质。在可裂解位点进行裂解会释放出延伸片段，然后用质谱进行大小测定。相对于其相应引物延伸降解产物的阅读长度，用本发明该方面的测序方法，可增加任何给定延伸片段的阅读长度。

15 然后用第二、第三和第四种不同的 dNTP $\alpha$ S 类似物重复杂交、酶促延伸、用硫代磷酸酯裂解试剂处理、固定、洗涤、裂解和大小测定步骤以便通过比较从 4 种延伸反应得到的延伸片段的大小来确定靶 DNA 的序列。

20 还可用本文描述的方法和修饰引物得到靶寡核苷酸的指纹。如本文所述的，指纹法指确定靶寡核苷酸链中不超过 2 个不同碱基之位置的方法，与测序法相反，测序法指确定靶核酸的完整核苷酸序列（以及，在基因外显子的情况下，所编码的相应氨基酸序列），包括在靶链或其互补链中各核苷酸的识别和定位。DNA 或 RNA 指纹法(需要较少的试剂)可提供迅速有效的测序替代方法，并有许多不同的应用，如鉴定某个体基因组标本中的一种或多种感染性因子，筛选 cDNA 文库，从人或非人基因组中筛选基因以检测突变、多态性，并用于法医应用。确定寡核苷酸延伸片段（用本发明的修饰引物产生的）的单或 2-碱基指纹的一种优选方法是质谱。

30 在确定靶寡核苷酸的指纹中，产生碱基特异性的嵌套片段组以用于随后的分析，所述片段组含有衍生于靶分子的、碱基特异性终止的片段，如本文所提到的，嵌套组的定义是生物聚合物（如 DNA、RNA、肽或碳水化合物）的混合物，所述混合物的所有组分都有一样的末端，并从单一聚合序列生产的。例如通过利用 Sanger 法的碱基特异性链终止，或下述的选择性化学裂解可以生产碱基特异性的嵌套片段组。在需扩增靶

分子的情况下，用许多常规方法中的任何一种，如 PCR、SPA（单引物扩增），NASBA（核酸序列为基础的扩增），TMA（转录介导的扩增）和 SDA（链取代扩增）均可完成扩增。

5 在使用大小分级分离装置进行产物分析的指纹法中，如质谱法，所得的单碱基指纹通常可提供靶序列中有关其他碱基的间接资料。例如，在质谱中，对应于两个峰的质量差（ $\Delta m$ ）也可说明插入碱基的组成（下文将描述）。

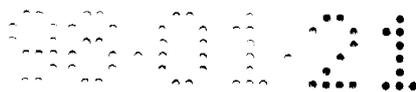
10 为了确定靶寡核苷酸的单碱基指纹，如胸苷指纹，按照上述方法产生胸苷特异性的嵌套片段组。常规纯化并用大小分级分离法，如质谱分析所得的片段家族，所述家族含有许多胸苷终止的核苷酸片段。为了提高质谱的分辨性能，可使用质量修饰的核苷酸。所得的质谱含有许多峰，每个峰对应于产物混合物中特定胸苷终止片段的质量。不同胸苷终止片段之间的差异与不同组合核苷酸的计算质量相关，优选借助含可修饰引物、可裂解位点的引物 3' 部分和不同的核苷酸分子量的计算机程序，  
15 以鉴定已知相应位置之间插入的核苷酸组成。

如所说明的，在考虑两者给定片段峰之间的质量差时，举证性的质量差为 1276 个质量单位特别对应于下列碱基组成：（2G）+ A + T。因此单碱基指纹可用于(i)鉴定靶序列内特定碱基的位置，和(ii)确定靶序列特定区域内的碱基组成。

20 为了进行应用需要更详细地说明，生产并分析第二碱基特异性嵌套组以按照上述产生第二指纹。根据所用的方法和所需的相应试剂，可在单个反应容器或在不同反应中生产不同碱基特异性嵌套组。可分开或作为混合物分析不同碱基特异性嵌套组（如腺苷终止的片段和胞苷终止的片段）。

25 在实施例 7 中说明了用于检测点突变的单碱基指纹的用途。总而言之，用双脱氧胞嘧啶三磷酸确定了相对于 3' 末端（从引发区后上游开始计数），仅在位置 16 和 19 有差异的两个不同单链 DNA 靶（SEQ ID NO：14 和 SEQ ID NO：15）的胞嘧啶指纹，其间得到胞嘧啶终止的核苷酸片段族，然后用质谱分析所得的反应产物混合物（图 14A，14B）。计算对应于各质谱选择峰之间的精确质量，表明在位置 16 和 19 存在两个  
30 单核苷酸取代（点突变）。

在另一种方法中，通过修饰的 DNA 或 RNA 分子以便在对应于特定



碱基的位置含有可选择性裂解的基团（如 dUTP 或氨基官能基化的核苷三磷酸），选择性裂解从而产生碱基特异性的嵌套片段。然后用尿嘧啶 DNA 糖基化酶处理所得的尿苷修饰的寡核苷酸，以形成一组片段，优选捕获到固相上的嵌套组。同样，用酸处理裂解 5'氨基修饰的靶分子。

5 优选上述指纹法使用本发明的可裂解引物以从引物延伸片段中除去大部分引物。通过减少分析物片段的质量，将产物的分布移到有较高精确度和分辨率的质谱区。另外，通过引入一些质量修饰官能团中的任何一种（如用 5'-溴尿苷代替胸苷，或利用固定结合位点，间隔基，或上述的其他核苷酸间键）以增加不同核苷酸之间的质量差异。

10 在第二种指纹法中，用限制性内切核酸酶产生非随机性的片段图谱，例如可利于检测突变。

在本发明的其他实施方案中，用聚合酶链反应或 PCR（Mullis,1987; Mullis 等, 1987; Kusakawa 等, 1990; Gyllensten,1989）扩增待测序或进行指纹鉴定的靶 DNA。总而言之，通常通过热循环含有目的靶  
15 DNA、脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)、反应缓冲液、两种引物和延伸酶如 Taq DNA 聚合酶（美国生物化学公司，Cleveland OH）的混合物来完成 PCR 扩增（Erlich,1989;Innis,1990）。一次典型 PCR 包括 94 °C 变性 5 分钟，然后在 94 °C 15 秒，在退火温度保持 15 秒，在 72 °C 1 分钟进行 30 次循环。

20 热循环后，将样品保持于 4 °C，直到从热循环仪中取出。尽管大多数靶序列在 60 °C 进行良好的扩增，但退火温度范围为约 55 °C 到 65 °C。扩增后，按照上述与本发明的修饰引物杂交，进行产物的酶促延伸和测序。

图 12 说明用本发明的修饰引物进行模板分子的 PCR 扩增。

25 替代用双脱氧链终止子的方法是，将 PCR 结合 dUTP 掺入，以便通过用尿嘧啶 DNA 糖基化酶处理而产生在 dUTP 掺入位点终止的嵌套片段。也可将 PCR 与上述硫代磷酸法结合使用。

根据本发明，可用第一和第二引物完成扩增，其中引物之一，即第一引物 95 含有可裂解位点 99，而另一引物，即第二引物 105 含有用于  
30 与固体支持物结合的固定结合位点。第二引物由 5'和 3'末端组成，与靶核酸同源，并包含含有第二引物 3'末端的第一片段和含引物 5'末端以及固定结合位点的第二片段。



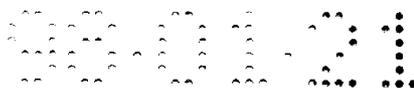
将所述第一和第二引物与靶核酸 103 结合使用以产生引物/核酸复合物，然后如 107 所说明的，在存在聚合酶和脱氧核苷三磷酸的条件下，转变成双链片段 109。用过量的靶核酸以产生足量的引物延伸产物来完成大小测定方法，或另外，与各轮扩增相结合。在得到所需量的产物 109 后，通过在固定结合位点结合来固定 117 含第二引物的延伸产物，该步骤可在于可裂解位点裂解前或之后进行。然后在可裂解位点裂解 111 延伸产物以产生包含双链产物 115 的混合物。优选通过洗涤 119 除去未固定的裂解片段，然后将纯化的双链产物 121 变性 123 以释放延伸片段 125，用质谱进行大小测定，其中相对于引物/核酸双链片的阅读长度，延伸片的阅读长度增加。

正如需要理解的，第一引物的可裂解位点和第二的固定结合位点包括上述的那些类型。

在图 12 中说明的举证性实施方案中，第一引物 95 在第一引物区 101 含有限制酶识别位点 97，在第二引物区含有可裂解位点 99，第二引物含有用于与固体支持物结合的固定结合位点。通过加入对第一引物区所含的识别位点有选择性的限制内切核酸酶，来完成在可裂解位点的裂解，以得到(i)含第一引物第一区的释放片段和(ii)双链产物，在变性释放所需的延伸片段前，该产物是固定的。如图 12 中所说明的，限制内切核酸酶促裂解会释放双链产物 115，包含引物第一区的短双链片段 113。

## B. 裂解

按照 IIA 节和实施例 1 A-D 与实施例 3 中的描述，完成在可选择性裂解位点的裂解。就本发明的该方面而言，通过用氟离子处理来裂解核苷间甲硅烷基如三烷基甲硅烷基醚和二烷氧基硅烷。用于本发明的碱性裂解位点包括 $\beta$ -氰醚，5'-脱氧-5'-氨基甲酸酯，3'-脱氧-3'-氨基甲酸酯，脲，2'-氨基-3',5'-磷酸二酯，2'-氨基-3',5'-磷酸二酯，酯和核糖。通过用硝酸银或氯化汞处理可裂解含硫的核苷酸间键如 3'-(S)-硫代磷酸酯和 5'-(S)-硫代磷酸酯。用于本发明的酸可裂解位点包括 3'-(N)-氨基磷酸酯，5'-(N)-氨基磷酸酯，二硫代乙缩醛，乙缩醛和膦酸二酰胺。通过用异硫氰酸酯处理可裂解核苷间 $\alpha$  氨基酰胺键，用钛裂解 2'-氨基-3',5'-磷酸二酯-O-邻-苄基核苷间键。用高碘酸盐处理可裂解连二醇键。可热裂解基团包括烯丙基亚砷和环己烯，而光不稳定的键包括硝基苄基醚和胸苷二聚体。



所用的裂解条件使固定结合位点保持稳定，以使大部分引物仍固定在固体支持物上。优选可裂解位点的裂解得到含有引物序列的 5 个或更少的碱基对引物延伸产物。这使在进行随后的分析后，可最大程度地得到序列资料。

## 5 C. 分析

可用大量大小分级分离装置中的任何一种确定靶寡核苷酸片段的序列。用于本发明的大小分级分离法包括凝胶电泳如聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳，毛细电泳，质谱和 HPLC。

10 在使用凝胶电泳进行大小测定和分析的方法中，通常用放射性同位素或荧光团标记 DNA 片段，然后分别用放射自显影或荧光检测观察。

本发明的修饰引物的特殊优越之处在于当其用于产生用目前难以分辨只有一个核苷酸长度差异的约 100 个碱基对以上的序列的技术如质谱来分辨的寡核苷酸大小的寡核苷酸片段。

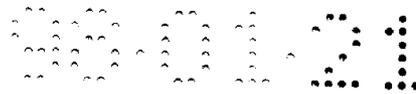
15 用本发明的修饰寡核苷酸组成对寡核苷酸进行分析的一种优选方法是质谱，特别是基质辅助激光解吸电离（MALDI）质谱，优选在飞行时间（TOF）质谱仪（Wu 等，1993）上完成。MALDI 质谱是迅速有效的寡核苷酸测序方法。

20 可用 MALDI-TOF 质谱得到未成片段的含混合碱基寡核苷酸的质谱，所述寡核苷酸含有 100 个以上的碱基对。此外，目前可得到至少约 40 个碱基对的序列的质谱分辨率。

在该方法中，使用脉冲紫外激光将吸附在固体基质上的寡核苷酸解吸下来，这样得到游离的、完整的带电寡聚体。用飞行时间质谱仪完成质量分析。通常单电荷的分子离子最多，而片段离子则很少。

25 在制备用于分析的样品，是将分析物与在激光波长有共振吸附的分子基质混合。用于该用途的固体基体物质包括 3-羟基吡啶甲酸（Wu 等，1993）， $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸（Youngquist 等，1994），烟酸（Hillenkamp, 1988），及冰（Nelson 等，1989），优选的物质是 3-羟基吡啶甲酸。

30 实施例 4 和 5 详细描述了本发明修饰寡核苷酸组合物的 MALDI-TOF 质谱分析。实施例 8，结合图 15A 和 15B 说明了由本发明的裂解的引物延伸片段（图 15B）与未裂解的全引物延伸片段（图 15A）得到的片段资料方面的差异。



如在实施例 3 中所描述的，通过氢氧化铵处理来选择性地裂解合成的 17 聚体 DNA 探针，该探针在 7 位含有一可裂解的核糖。在氢氧化铵处理前（图 3A）和后（图 3B），完整的混合碱基引物的质谱表明选择性裂解了核糖键。如在图 3A 中所示，观察到完整 17 聚体的两个可测量大小的峰，对应于二质子化分子离子  $[M+2H]^{2+}$  和质子化分子离子  $[M+H]^+$ 。氢氧化铵处理后，如图 3B 中所说明的，很容易找到并鉴定对应于预期裂解产物 7-聚体、10-聚体和完整 17-聚体的峰。

相似的，如在实施例 5 中所述的，对 10 位含有核糖，生物素化 18-聚体进行质谱分析，所述 18-聚体捕获在链霉亲和素包被的珠上。表面键合后，洗涤固定的引物，然后用氢氧化铵处理以便在核糖位点选择性地裂解所述的固定引物。图 4 说明了选择性裂解固定引物内的核糖位点而得到的 8-聚体的质谱。

#### IV. 实用性

##### A. 基因组测序

可将本发明的方法用于鸟枪法测序分析和“定向步行”（“directed walk”）。在鸟枪法中，选择 DNA 的随机序列，然后在未知靶上用所述随机序列引发。该方法使用大量的引物以增加与未知靶序列成功杂交的可能性。在该方法的实施方案中，使用多孔试验方式，每个孔含有不同的引物，将相同的底物（如靶 DNA 分子）在杂交条件下加到各孔中。孔中的引物是本发明修饰引物，通过固定结合位点将其固定到孔表面。完成引物延伸，只有孔中引物和底物之间存在互补序列。才能在孔中形成延伸产物检测各孔是否存在延伸产物。然后将延伸产物测序，在产生延伸产物之引物的已知序列基础上组成任何给定靶 DNA 分子的序列和来自延伸产物序列的碱基序列（即延伸产物序列的排列）重叠。在使用本发明的修饰引物的过程中，延伸片段的序列资料量最大，超过了用常规引物的相似技术所得到的，原因在于在片段分析前裂解并除去了大部分引物（如增加的阅读长度）。此外，当与质谱分析结合时，该方法在短时间内快速并提供大量的资料。

在相关方法中，可将本发明用于以基因作图和鉴定为目的的 cDNA 插入片段的测序或指纹短片段阅读。这些短阅读片段鉴定各特有的插入片段，并将其称为表达序列标记（EST）或表达的指纹标记（EFT）。在制备 cDNA 文库的过程中，首先将 mRNA 的 cDNA 拷贝插入到标准克



5 隆载体如 pBlueScript 中。设计本发明的修饰引物以便与 pBlueScript 载体序列杂交，所述杂交载体序列的 3' 末端与 cDNA 插入片段紧邻。然后完成引物延伸和测序或指纹反应，阅读到插入片段中，鉴定其序列或指纹。为了鉴定特有长度的序列，延伸片段的最小阅读长度通常为 30 个碱基，

10 在另一实施方案中，制成固定的可裂解引物的列阵（Fodor 等，1991；Southern 等 1992）。在本发明的该方面，所述列阵由可裂解键例如是光可裂解键（如骨架硝基苄基）的本发明修饰引物和通过修饰引物的固定位点而与支持基质相连的引物组成。在该实施方案中，靶 DNA 分子与引物杂交，完成引物延伸反应，然后裂解不同序列的引物，确定是否存在延伸产物。当检测到延伸产物时，按照上述确定其序列。

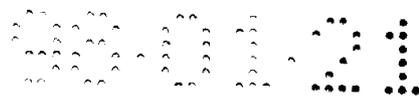
在定向步行方法中，用已知的 DNA 序列作为引物序列，因此在离开已知区的两个方向上都提供了测序的起始点。然后用每个新鉴定的序列指导合成新引物以便继续进行序列步行。

## 15 B. 诊断

可以得到许多合成的寡核苷酸或可以很容易地合成与靶核酸序列（如 RNA 或 DNA）互补的寡核苷酸，然后用其作为探针检测是否存在特定的细菌、真菌、寄生虫等。

20 可以用本发明的寡核苷酸组成例如检测存在对应于下列靶的特异性 DNA 或 RNA 序列或指纹(i)疱疹病毒如巨细胞病毒（CMT），E-B 病毒和单纯性疱疹病毒；(ii)肝炎病毒如甲、乙、庚和丁型肝炎；(iii)乳头瘤病毒如人乳头瘤病毒 6、11、16、18 和 33；(iv)反转录病毒如人免疫缺陷性病毒 I（HIVI）、HIVII，人 T 细胞成淋巴细胞病毒（HTLV I），HTLV II；(v)动物病毒如猪微小病毒和猪肺炎支原体，微小病毒如微小病毒 B19；(vi)微小 RNA 病毒如鼻病毒（肠道病毒）和鼻病毒 HRV2-14；(vii)细菌如鸟分支杆菌、结核分支杆菌、沙眼衣原体、大肠杆菌、链球菌和葡萄球菌；和(viii)寄生虫如锥虫属、弓形体属和疟原虫。

30 将含有引物序列、与来自特定微生物之核酸可特异性杂交的序列的本发明修饰引物与样品中的核酸杂交。如上述完成引物延伸反应并分离延伸产物。延伸产物的存在表明在样品中存在来自微生物的核酸。本发明的修饰引物和小测定方法提供了快速高效的筛选方法，所述方法可用质谱筛选特定的靶序列或指纹。



在相关的实施方案中，可以用本发明的修饰引物通过直接测序或指纹法来鉴定病原体。在一种所述方法中，鉴定了基因组 DNA 的特定区域，所述区域含有在大部分病原体中共同存在的片段（如保守区），这些片段与含有各病原体之特有序列（如可变区）的区域相邻。一种所述  
5 举证性序列是来自 DNA，即转录成细菌 16S 核糖体 RNA 或 16S rRNA(Olsen,G.J.等 1992)。所有的 16S 样 rRNA 均含有相同的核心结构。已经鉴定了在可获得的 90 % 细菌中保守的 16S rRNA 的核苷酸(Schmidt 等, 1994)。

按照如下完成使用 rRNA 的病原体鉴定。根据本发明，构建一个引物以便与 16S rRNA 共有序列的选定区域如 16S rRNA 中的 1047-1065 杂  
10 交，其中 i)引物含有序列 5'-ACGACANCCATGCANCACC-3'(SEQ ID NO:9),和 ii)读到高变区如序列 995-1046 中。在用质谱分析了引物延伸片段后，通过确定高变区的序列或指纹，可特定地鉴定出可能存在的单个病原体，所需的阅读长度至少为 20 个碱基，优选至少 40 个碱基。

另外，不选择与高变区相邻的保守区，可产生一系列的特有引物，  
15 这些引物与所选病原体的高变或特有区杂交。酶促延伸这些引物可得到高变区相邻片段的序列或指纹信息。这种方法也可特异性地鉴定在混合种群中存在的各病原体。用这种方法，人们可靶向各靶病原体中的不同高变区。这种方法优选用于鉴定与其他病毒或细菌没有什么保守性的  
20 病。

除鉴定来自所述微生物样品中核酸的存在外，本发明还可以鉴定样品中的特定序列或指纹。例如通过指纹法或测序法可鉴定 HIV 或锥虫特定变体或鉴定是否存在引起抗生素抗性的基因。

还可将修饰引物用于诊断方法中，其中因序列改变如缺失、插入、  
25 点突变而使突变序列与野生型序列不同。用这种方法可评估许多潜在的靶位点，包括选自长度（如 BCR/ABL）以及序列（如；镰刀形细胞贫血）有所改变的 DNA 的靶位点。本发明的大小测定方法特别适用于前一种应用（如改变长度的靶位点）。按照标准方法，将修饰引物与靶核酸杂交，可以适当调节杂交条件以使修饰引物与靶区杂交。

用本发明的修饰引物可检测的举证性遗传病包括镰刀形细胞贫血和  
30  $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶缺陷(Watson 等, 1992)。如在图 7A 中所说明的，镰形细胞贫血产生于血红蛋白 $\beta$ -球蛋白链 6 位上的谷氨酸残基（由 GAG 编码



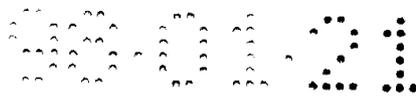
的)变成缬氨酸残基(由GTG编码的)的突变。该碱基改变(A到T)破坏了许多限制酶包括MstII的识别序列。如图7A中所说明的,检测该疾病的修饰引物通常含有一可裂解位点,位于离引物末端的约2个核苷酸处,优选位于已知突变位点上游的约10-20个核苷酸处。

- 5 还可使用本发明的修饰引物检测 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶缺陷。这种疾病的特征在于不能抑制弹性蛋白酶的生产,弹性蛋白酶是破坏肺的弹性纤维,使患者患有肺气肿。已经克隆了 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶的基因并示于图7B中,突变基因,由SEQ ID NO: 7表示的其片段对应于单个碱基改变,这种改变导致SEQ ID NO: 8所说明的残基342上的氨基酸取代(谷氨酰胺到赖氨酸)。图7B(顶)所示的部分野生型 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶基因示于SEQ ID NO: 5。SEQ ID NO: 6列出了具有野生型 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶基因分个体生产的蛋白质片段。已经鉴定了对应于基因突变的、并已用本发明的修饰引物检测的其他疾病包括Duchenne肌肉营养不良、X因子缺陷、血友病和苯丙酮尿。用于检测所述疾病的修饰引物通常含有靠近引物末端的可裂解位点,其中所述引物末端在已知突变位点的上游(如在40-聚体中检测的突变位点的约20个碱基对以内)。
- 10
- 15

在实施例7提供了用本文所述方法所进行的点突变检测,并在图14A和14B中有进一步说明。

- 另一诊断实施例是检测BCR-ABL转录本,该转录本是在大部分慢性髓细胞性白血病(CML)患者和 $Ph^+$ 急性淋巴细胞白血病患者中发现的,而且认为对于保持白血病表型是必需的(Szczylik等,1991;Gale等,Cdeng,1984;Daley等)。BCR-ABL转录是原癌基因ABL(染色体9)易位到裂点簇区(BCR X 染色体22)的结果,这样形成了BCR-ABL杂种基因。在该实施方案中,本发明的修饰引物在裂点区前有其3'末端,然后引物延伸跨过裂点区(如果存在的话)或继续通过正常转录区(如果不存在裂点的话)。所述引物延伸产物的序列是在任何核酸样品中是否存在裂点融合的诊断指标。
- 20
- 25

- 还可将修饰引物用于DNA扩增反应(如Mullis;Mullis等)以便通过大小测定或测序检测样品中是否存在特定的序列或制备用于测序反应的DNA。在本发明的该实施方案中,扩增后可将含固定位点的修饰引物与固体支持物相连(如生物素和地高辛配基)是很有意义的。可捕获扩增的产物,裂解修饰引物,然后分离所得的扩增产物。
- 30



具体地说，可以用本发明方法通过 PCR 产物的大小测定鉴定病原体。总之，首先选择引物以便与待检靶病原体所特有的序列杂交。选择引物以用于多个位置（如其中可能存在数种不同的病原体）以产生不同大小的 PCR 产物，而每个大小均分别与特定病原体的特有 PCR 产物相关。

确定三种不同病原体（如铜绿假单胞菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌）的所述试验是通过将上述病原体的各修饰引物加到含 DNA 分析物的样品中以产生大小分别为 65、70 和 75 个碱基对的 PCR 扩增产物而完成的。

通过在可裂解位点（在修饰引物中）裂解将 PCR 产物的大小减小到 20 - 25 个核苷酸。这会将相应的峰移到质谱仪更容易分辨的范围，并允许更多的 PCR 产物复合。

按照本发明的方法检测裂解的扩增产物，用质谱进行大小测定。下列实施例是为了说明，而不以任何方式限制本发明的范围。

#### 材料和方法

保护的核苷酸 H-磷酸酯如 Bz-DMT-脱氧腺苷 H-磷酸酯，iBu-DMT-脱氧鸟苷 H-磷酸酯，全保护的脱氧核苷亚磷酰胺，保护的脱氧核苷二酯和三酯，核苷酸二聚体和固体支持物均可 Sigma 化学公司(St.Louis,MO) 购买。二(三氟甲磺酰基)二异丙基硅烷可从 Petrarch Systems Inc.(Bertram,PA)购买。亚磷酰胺可从 Applied Biosystems(Foster City,CA) 购买。标准化学试剂和溶剂可从 Aldrich 化学公司购买(St.Louis,MO)。

#### 实施例 1

##### 制备含 3'-5'-可裂解键的寡核苷酸

按如下制备含 3'-5'-核苷间可裂解键的核苷二聚体。

##### A. 3'-5'-二烷氧基硅烷核苷间可裂解键

3'-O-官能化核苷中间体，3'-O-(二异丙基甲硅烷基)-2'-脱氧核苷三氟甲基磺酸酯(1)首先通过在惰性气体下，将二(三氟甲磺酰基)二异丙基硅烷(1 mmol)加到等摩尔的立体位阻碱，2,6-二-叔-丁基-4-甲基吡啶（溶解在无水乙腈中）来制备。所得的溶液在冷却浴中冷却到 -40 °C，在 10 分钟内，向其中加入 5'-(O)-保护的核苷、5'-(二甲氧基三苯甲基)-2'-脱氧核苷(0.9 mmol)2,6-二-叔-丁基-4-甲基吡啶(0.25 mmol)的二甲基甲酰胺溶液。所得反应混合物在 -40 °C 搅拌 1 小时，然后加热到室温。从水中沉淀



来分离得到 3'-O-二异丙基甲硅烷基 三氟甲基磺酸酯, 产率通常为 90 - 100 %。不需分离, 优选将反应中间体 直接与未保护的核苷反应以形成所需的二聚体。

5 用上述过程形成保护的核苷 5'-(O)-二甲氧基三苯甲基-胸苷、N6-苯甲酰基-2'-脱氧-5'-(O)-DMT-腺苷、N4-苯甲酰基-2'-脱氧-5'-(O)-DMT-胞苷及 N2-异丁基-2'-脱氧-5'-(O)-二甲氧基三苯甲基-鸟苷的 3'-甲硅烷基衍生物, 同时伴有少量不需要的 3',3'对称二聚体的形成。

10 室温搅拌(1)和核苷的混合物搅拌约 1 小时, 使中间体 (1)与核苷, 如胸苷反应。将反应混合物逐滴滴加到下的冰/水混合物中来分离偶联的二聚体。过滤混合物得到白色固体, 干燥并通过在硅胶上的柱色谱纯化 (洗脱剂: 乙酸乙酯/己烷梯度)。可分得保护的二聚体 5'-(O)-DMT-3'-(O)-(5'-(O)-核苷基二异丙基甲硅烷基)胸苷(2), 产率通常为 50-75%。

然后将所得的二聚体功能基化以用于自动固相合成, 从而形成含二烷氧基硅烷可裂解键的引物。

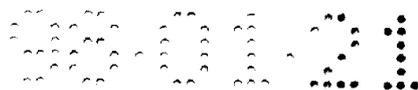
15 将 5'-DMT 二聚体溶解在四氢呋喃中, 室温通氮气下, 将所得溶液逐滴滴加到搅拌的溶液中, 从而将二聚体如上述(2)转变成相应的 3'-(2-氟基乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺), 所述搅拌的溶液为含 4-DMAP-(4-二甲基氨基吡啶), 二异丙基乙胺和氯化 2-氟基乙基-N,N-二异丙基亚磷酰胺的 THF 溶液。将反应混合物搅拌 2 小时, 加到乙酸乙酯中, 用盐水洗涤, 20 然后在硫酸镁上干燥。以 1: 1 的乙酸乙酯/己烷为洗脱剂, 在硅胶柱色谱上纯化粗产物。

然后将亚磷酰胺功能基化的二聚体用于使用程序化 DNA 合成仪的自动固相合成以形成含 3'-5'-二异丙基甲硅烷基醚可裂解键的寡核苷酸引物。

25 裂解: 用含上述二烷氧基硅烷核苷酸间键的固定引物完成所需的杂交和延伸反应后, 通过用氟离子(Green,1975)处理来选择性地裂解甲硅烷基-醚(Si-O)以释放延伸产物, 所述延伸产物通常含有不多于约 5 个的来自修饰引物分子的核苷酸。

### B. 3'(S)-硫代磷酸核苷间键

30 按下述方法制备官能化的 5'-(O)-单甲氧基三苯甲基-3'-(S)-硫代亚磷酰胺。按照 Cosstick 等(Cosstick 等, 1988)的方法, 制备 3'-S-官能基化起始物, 5'-(O)-单甲氧基三苯甲基-3'-(S)-苯甲酰-胸苷(3)。10N 氢氧化



钠处理溶解在氩气饱和的 5 °C 的 5'-(O)-单甲氧基三苯甲基-3'-(S)-苯甲酰-胸苷乙醇溶液完成脱苯甲酰基化。将所得溶液搅拌约 1 小时。在硅胶柱色谱上纯化产物 5'-O-MMT-3'-硫代胸苷(4)。然后在标准条件(McBride 等,1983)下,通过与氩气 2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基磷-氯化物反应将 5'-O-MMT-3'-硫代胸苷(4)转变成相应的硫代亚磷酰胺。3'-(S)-亚磷酰胺(5)可用于与第二个核苷偶联以形成含可裂解硫代磷酸酯位点的二聚体或用于自动固相合成以制备含硫代磷酸酯核苷间键的寡核苷酸。

按照如下完成硫代磷酸酯二聚体的化学合成。在 20 分钟内将 3'-(O)-乙酰胸苷的乙腈溶液滴加到 3'-(S)-亚磷酰胺(5)的 5-(4-硝基苯基)四唑饱和的乙腈溶液中。四唑活化剂的使用降低在两个硫代亚磷酰胺分子之间发生自缩合反应的可能性。通过用 2,6-二甲基吡啶猝冷反应混合物,然后加入氧化剂如二氯甲烷中的 TBA 高碘酸来原位氧化所得的硫代亚磷酸盐二聚体(6)。用叔丁胺、80% 含水乙酸、然后用浓缩的氨水处理而将全保护的硫代磷酸酯二聚体(7)脱保护,得到 3-(S)-硫代磷酸酯连接的胸苷二聚体(8)。

用 DNA 合成仪,在控制孔玻璃上进行固相合成来形成含 3'-(S)-硫代磷酸酯可裂解键的寡核苷酸探针。用标准固相亚磷酰胺方法,按照所需的引物产物来调整完成固相反应循环的方法和反应条件。官能基化四唑试剂 5-(对硝基苯)四唑的存在下,用按照上述制备的官能基化 3'-(S)-亚磷酰胺核苷(5)将 3'-(S)-硫代磷酸酯部分引入到寡核苷酸引物中。

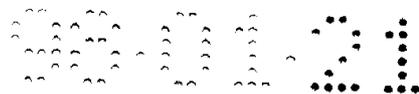
裂解:完成杂交、延伸和含 3'-(S)-硫代磷酸酯核苷酸间键的固定修饰引物的洗涤后,用硝酸银水溶液处理来选择性裂解磷-硫键。

### C. 5'(S)-硫代磷酸酯核苷间键

按照下述首先合成衍生的亚磷酰胺,5'-(S)-三苯甲基-脱氧胸苷-3'-(O)-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酸盐,来合成含 5'-硫代磷酸酯核苷间键的寡核苷酸。

通过将胸苷与一当量的吡啶中的对甲苯磺酰氯反应来制备 5'-(O)-对甲苯磺酰胸苷(9)。室温搅拌反应混合物 3 小时后,在冰上冷却,然后加入水猝冷。溶解在乙酸乙酯中后,用碳酸氢钠和盐水连续洗涤,在硫酸钠上干燥溶液,然后真空下除去溶剂。从乙酸乙酯/甲醇中很容易重结晶得到所需的 5'-甲苯磺酸酯产物(9),而在 3'-OH 位不需要保护基。

然后将 5'-甲苯磺酸酯转变成相应的 5'-(S)-三苯甲基-脱氧胸苷(10)。



将 5'-(O)-甲苯磺酰基胸苷的乙醇溶液加到反应烧瓶中,所述烧瓶中含有 5 倍摩尔过量的 7.0M 氢氧化钠和三苯甲基硫醇(会在原位产生相应的活泼硫醇盐)的乙醇溶液。在惰性气体下,反应混合物回流 8 小时,过滤取出残留的固体,溶解在乙酸乙酯中,洗涤溶液干燥,然后在真空中蒸发。

5 用甲醇/二氯甲烷梯度,在硅胶色谱上纯化粗产物。

所需的活泼核苷氨基磷酸酯,即 5'-(S)-三苯甲基-脱氧胸苷-3'-(O)-(2-氰基乙基-N,N-二异丙基氨基)亚磷酸盐(11)是通过如下过程制备的:将保护的核苷,即 5'-(S)-三苯甲基-脱氧胸苷(10)在干燥乙腈/二氯甲烷(1:1)中的溶液用等摩尔量的四唑处理,随后加入 1.5 摩尔过量的 2-氰基乙基-二  
10 -(N,N-二异丙基氨基)膦。反应混合物室温搅拌约 1 小时,随后加入丁醇骤冷。用乙酸乙酯稀释溶液,洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤并蒸发至干。将粗产物通过快速色谱进行纯化。

将所需 5'-(S)-硫代磷酸酯可裂解位点插入到寡核苷酸探针中是通过标准的固相亚磷酰胺化学法完成的。

15 D. 5'-(N)-氨基磷酸酯核苷间键

按照如下方法制备含 5'-(N)-氨基磷酸酯核苷间键的寡核苷酸片段。按照 Hasa 等(Hasa 等,1976)的方法,用叠氮化钠和三苯基膦的四溴化碳溶液处理胸苷,使之转变成相应的 5'-叠氮化物-(12)。然后在 Pd/C 催化剂上氢化将 5'-叠氮脱氧胸苷(12)还原形成相应的 5'-氨基衍生物(13)。

20 通过下述方法制备相应的 5'-N-保护的核苷:将(13)(25mmol)溶解在无水吡啶(150ml)中,向其中加入 4-DMAP(17mmol)、三乙胺(17mmol)、4-甲氧基-三苯甲基氯化物(60mmol),所得反应混合物室温下搅拌 2 小时。向反应瓶中加入甲醇,然后将所得的反应混合物加入饱和碳酸氢钠溶液中。用氯仿提取并用无水硫酸钠干燥有机提取液。将有机层蒸干并  
25 将所得粗品通过硅胶柱色谱纯化得到 5'-氨基-5'-脱氧-5'-(N)-(4-甲氧基三苯甲基)胸苷(13)。(用 3% 二氯乙酸的 1,2-二氯乙烷溶液处理除去 N-MeOTr 保护基)。

按照下述方法合成所需的功能基化的核苷, 5'-氨基-5'-脱氧-5'-(N)-(4-甲氧基三苯甲基)胸苷-3'-(2-氰基乙基)-N,N-二异丙基亚磷酰胺(14),  
30 该核苷含有适于插入寡核苷酸片段中的活泼亚磷酰胺部分。

将 5'-氨基保护胸苷(13)(4mmol)溶解在无水二氯甲烷(60ml)中,向其中加入干燥的二(二异丙基铵)四唑化物(tetrarolide)(3mmol)和(2-氰基



乙氧基)二(异丙基氨基)膦(8mmol)。混合物在室温搅拌 1 小时，倒入饱和的碳酸氢钠溶液中，然后用氯仿提取数次。将合并的有机提取液用盐水漂洗，干燥并蒸发至干。将残余粗品溶解在最小量的二氯甲烷中并加入戊烷使之沉淀出，以得到非对映异构体产物的混合物， 14。

5 然后将官能基化的核苷 14 选择性地导入寡核苷酸片段中以形成含有 5'-(N)-氨基磷酸酯可裂解位点的寡核苷酸。胸苷衍生物 14 的 5'-氨基氮是形成氨基磷酸酯键的反应中心。在标准循环中将修饰的核苷 14 引入按下述方法在固体支持物上合成的延长中的 DNA 片段中。在特定位点插入氨基磷酸酯基团以形成所需的含选择性可裂解位点的核苷酸片段。

10 按照下述方法形成下列修饰的举证序列： d(T-T-C-A-T-G-C-A-A-)(氨基磷酸酯)-T-C-C-G-G-A-T-G)(SEQ ID NO:1)。从六聚体序列 d(C-C-G-A-T-G)(Gromova,1987) 开始逐步合成 DNA 片段。用标准方法 (Bannwarth 等,1986; Bannwarth,1987)在控制孔玻璃固体支持物上合成六聚体。关键中间体 14 的导入是在标准循环中完成的，反应时间稍加长以  
15 偶联 14 并脱除 4-甲氧基三苯甲基保护基。在脱除 14 的 5'-MeOTr 保护基后，用标准的亚磷酰胺作为结构单元继续合成以形成所需的 16 聚体序列。

用浓氨水在 56 °C 过夜处理支持物以便使 16 聚体产物。从固体支持物上裂解下来。除去支持物后，真空蒸除氨。将残余物溶解在水/二氧六  
20 环中，然后加入 THF 形成沉淀。然后将所得的 16 聚体通过凝胶电泳或 HPLC 纯化。

在温和的酸性条件下完成氨基磷酸酯核苷酸间键的选择性化学裂解以形成相应的磷酸酯和氨基功能基化的片段。用 80%乙酸在室温处理 2 - 6 小时，可以选择性地裂解核苷酸间氨基磷酸酯键，而同时未修饰的  
25 DNA 片段部分仍保持完整。

## 实施例 2

### 与固体支持物结合

#### A. 链霉亲和素亲和固定

通过与官能基化的固体支持物结合来固定上述实施例 1 中含可裂解  
30 位点的修饰的引物。在某些情况下，含可裂解位点的引物按如下修饰。

为了将寡核苷酸引物与链霉亲和素包被的支持物相连，通常使用生物素化的引物。按照如下完成生物素化。



按照实施例 1，稍加改变来制备含可裂解位点的引物：合成引物，使之含有用于生物素化的活泼氨基位点。用标准 DNA 合成仪如 Applide Biosystems 393 DNA/RNA 合成仪，在固相合成过程中导入氨基。

5 为了选择性地导入内氨基官能团，在 DNA 合成循环中的适宜时期，加入修饰的核苷亚磷酸胺氨基修饰物 dT，该修饰物含有碱不稳定的三氟乙酰基保护的伯胺，所述伯胺通过 10 个原子的间隔臂连于胸腺嘧啶上。在完成寡核苷酸合成后，用标准方法从支持物上裂解引物。通过用新鲜、浓缩的氢氧化铵 40 °C 15-17 小时处理来除去剩余的碱保护的基团和三氟乙酰氨基保护基。通过旋转蒸发干燥溶液，将残余物再溶解在 200 μl 水  
10 中。

将氨基修饰的引物（约 0.25 μmol）与 NHS-LC-生物素 (Pierce, Rockford, IL) 反应，后者在生物素基团和 N-羧基琥珀酰亚胺活化的羧基之间有 11 个碳原子的间隔基。将 50 mM NHS-LC-生物素的 DMF 溶液等份在 1.5 小时内，pH9 下加到引物溶液中，所述引物溶液含有 0.1 M  
15 碳酸氢钠/碳酸钠缓冲液中。溶液保持室温过夜，然后用反相 HPLC 纯化生物素化的引物。

然后按照 Dynabeads M-280 技术手册：磁性 DNA 技术 6，Dynal Inc. 中所述，通过与链霉亲和素偶联的磁珠 (Dynabeads M-280, Dynal Inc., Great Neck, NY) 结合来固定生物素化的引物。在除去上清液和洗涤的步骤中，  
20 利用钕-铁-硼磁体来固定磁珠，

### B. 经硫脲键固定

按照上述实施例 1 和 2A 所述制备含可裂解键的 5'-氨基修饰的寡核苷酸引物。

25 通过两步过程活化的玻璃载片用以偶联氨基官能基化的寡核苷酸。首先通过与氨基丙基三甲氧基硅烷反应将玻璃表面官能基化以形成氨基衍生的表面。为了进行氨基官能基化，将干净的载片在 1% 的 3-氨基丙基三甲氧基硅烷的 95% 丙酮/水溶液中浸 2 分钟。然后用丙酮将该载片洗涤数次（每次 5 分钟），并于 110 °C 干燥 45 分钟。

30 氨基衍生后，用过量的对亚苯基二异硫氰酸盐处理玻璃载片以便将氨基转变成适宜与氨基官能基化寡核苷酸偶联的氨基活泼的苯基异硫氰酸酯基团。用 0.2% 1,4-亚苯基二硫氰酸酯的 10 % 吡啶/DMF 溶液将氨基衍生的玻璃平板处理 2 小时，然后用甲醇和丙酮洗涤。



将 2mM 氨基修饰引物的碳酸钠/碳酸氢钠溶液 ( 2ml ) 直接用于活化的玻璃平板表面, 所得载片在含最小量水的有盖培养皿中 37 °C 保温约 2 小时。用 1% 氢氧化铵、水依次洗涤含硫脲连接引物的平板, 然后在室温下空气干燥。

### 5 C. 经 Hg-S 亲和结合固定

按照上述制备氨基修饰的寡核苷酸引物。将 5.0 A<sub>260</sub> 单位的含氨基引物溶解在 1.0 ml 0.2 摩尔 4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪乙磺酸(pH7.7)中, 使之与 1.6ml 10 mM 的二硫代双琥珀酰亚胺基丙酸酯基在干燥乙腈中的溶液 20 °C 反应 1 小时, 从而完成 5'-氨基向硫醇的转变。再将 10 ml 10 mM 二硫代双琥珀酰亚胺基丙酸酯基的乙腈溶液加入反应容器中, 并将所得混合物再搅拌 1 小时。加入二硫苏糖醇(3.5 ml 在 0.2 M Tris 缓冲液中的 20mM 溶液), 37 °C 搅拌 1 小时。真空下浓缩硫醇衍生的引物溶液, 浓缩物用反相 HPLC 纯化, 然后冻干。

在合成硫醇修饰的寡核苷酸引物的另一种方法中, 用  $\beta$ -氨基乙基-亚磷酰胺 C6-硫醇修饰物(Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 利用 6-巯基-己醇来酯化寡核苷酸引物的 5'-磷酸酯。

通过将溶解在 140  $\mu$ l 1.0 M 氯化钠 10 M 乙二胺四乙酸二钠盐 ( EDTA ) 和 50 mM Tris HCl(pH8)中的硫醇衍生的引物(0.25A<sub>260</sub> 单位), 与 50  $\mu$ l 对氯汞苯甲酸衍生的琼脂糖 20 °C 混合 3 分钟, 而将硫醇衍生的引物固定在对氯汞苯甲酸衍生的琼脂糖上。

### 实施例 3

#### 含可裂解核糖之合成 DNA 探针的选择性裂解

通过用氢氧化铵处理来选择性裂解含可裂解核糖的合成 DNA 探针。制备含有序列: 5'-AAA TAC ATC 核糖 GCT TGA AC-3'(SEQ ID NO:10)的 17 聚体, 在 7 位含有一可裂解核糖。室温用 3 % 氢氧化铵水溶液将修饰引物处理 15 分钟(pH10)以选择性地裂解核糖部分。

### 实施例 4

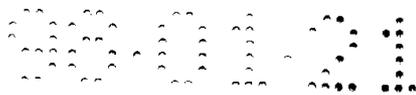
#### 质谱分析含核糖的 DNA 探针选择性裂解产物

用基体辅助激光解吸电离结合飞行时间 ( TOF ) 质谱分析实施例 3 的裂解产物。

用于分析样品片段的试验装置由激发光源、样品控制器和 TOF 质谱仪组成。用于解吸的激发光源是 Nd:YAG 激光发生器(DCR-1 型,



- Spectra-Physics, Mountain View, CA), 和 355nm 下操作的 35-ps 脉冲 Nd:YAG 激光发生器(PY610C-10 型, Continuum, Santa Clara, CA)。前者为空间滤波的 5 ns 脉冲(3 次 355nm, 4 次 266nm)两种激光发生器均以 10Hz 的重复频率、5nm 的脉冲宽度操作。用 250 nm 焦聚的石英透镜将
- 5 入射角为  $45^\circ$  的解析激光束聚焦在样品上, 形成约  $100 \times 150\mu\text{m}$  的椭圆形斑。将 Glan-激光偏振器(Newport Corporation, Fountain Valley, CA)固定在光路旋转台上以便连续减弱, 从而使偏振的 Nd:YAG 激光能量密度从  $1\text{mJ}/\text{cm}^2$  到  $100 \text{mJ}/\text{cm}^2$  以下均可调。发现解吸的最佳能量密度为 2 到  $20 \text{mJ}/\text{cm}^2$ 。
- 10 按照如下制备样品。将寡核苷酸片段室温下溶解在去离子水中, 浓度的  $50\mu\text{mol}/\text{l}$  新鲜制备 3-羟基吡啶甲酸(3-HPA)的 50%水/乙腈饱和溶液, 将两种溶液混合以得到含 3HPA 和分析物摩尔比为约 10000: 1 的样品溶液。将  $2\mu\text{l}$  的样品溶液吸到样品台上, 散成直径为 2mm 的大小。样品插入真空系统之前, 缓慢吹氮气干燥。
- 15 将含光滑的银箔或刨光硅片组成的样品台固定在样品控制器上, 样品控制器有 3 个平移和一个旋转自由度。实验在室温下进行。用 300 升/秒的涡轮分子泵将样品区抽真空。用深冷抽气泵将移动和检测区抽真空, 额定泵速为 1500 升/秒。室中的基础压力为  $3 \times 10^{-9}$  Torr, 在约 5 分钟的加样时间内, 正常工作压力为  $5 \times 10^{-8}$  Torr。
- 20 在解吸过程中产生的离子通过 28 kV 的电压偏转样品垂直于样品表面抽入到飞行时间质谱仪中, 移动和抽入电势为零。样品 - 抽提器距离为 5 mm, 用离样品约 5 cm 的单透镜将离子聚焦。检测线性和反射 TOF 质谱几何形状。为了进行反射 TOF - MS, 用两个台式静电反射器, 有效移动路径为 2.0m。使用双微通道平板检测仪。由于真空室的空间限制, 将检测仪放在静电偏转器旁边。将偏转电压施加到水平偏转板上,
- 25 弯曲光束路径以便将离子引入用于检测线性几何形状的检测器。线性几何形状的总飞行距离是 1 m。4 度的弯曲足以阻断离子产生区和检测器之间的视线以防止在离子化区中产生的能量中性流进入检测器。对于反射 TOF 测量, 光束在反方向弯曲。为了避免在以较高激光能量完成的实
- 30 验中, 因很丰富的离子化基体分子而引起的检测器饱和, 通过  $200 \text{V}/\text{cm}$  的脉冲电场, 使低质量的基体离子偏离检测器。
- 放大微通道平板的输出信号, 然后用 10-50 ns/通道的时间分辨率数



字化，通常累加 100 个以上的激光脉冲。通过分析各种已知物质如低质量的碱、同位素分辨的 fullerenes、短杆菌肽 S 的混合物、牛胰岛素、马心脏细胞色素 C 和马心脏肌红蛋白来进行质量校准。

在图 3A 和 3B 中说明了得到的飞行时间质谱。图 3A 是在用氢氧化铵处理前，含可裂解核糖键的混合碱基 17 聚体的的合成引物的质谱。对  
5 应于双质子化分子离子 $[m+2H]^{2+}$ 和质子化分子离子 $[m+H]^+$ ，观察到完整 17 聚体的两个大峰。

如在图 3B 中所示的，氢氧化铵处理后，分析得到的寡聚物片段。如在质谱中所说明的，很容易观察到(并可确定)对应于预期裂解产物 7 聚  
10 体、10 聚体和完整 17 聚体的峰。

#### 实施例 5

##### 捕获并选择性裂解在 10 位含有可裂解核糖的生物素化引物

将在 10 位含核糖的生物素化 18 聚体，5'-生物素-ATCTTCCTG-核  
糖 -GCAAACCTCA-3', SEQ ID NO:11(Keystone Laboratories, Inc., Menlo  
15 Park, CA)捕获在链霉亲和素包被的珠(DynaBeads M-280, Dynal, Inc., Great Neck, NY)上。表面结合后，洗涤固定的引物，然后上述按照实施例 3 所述，用氢氧化铵处理以便在核糖位点选择性地裂解固定的引物。

在捕获前和选择性裂解后，对含有生物素结合位点和可裂解核糖位点的修饰引物进行分析。如上述实施例 4 所述用 MALDI 和 TOF 质谱分  
20 析样品。图 4 说明选择性裂解固定引物内的核糖位点而产生的 8 聚体的质谱。

#### 实施例 6

##### 通过与中介的固相结合的寡核苷酸杂交来固定可裂解的延伸引物

将含有 5'-(S)-胸苷(离 3'末端 5 个核苷酸)的修饰 M13 反向引物(本  
25 文用 SEQ ID NO: 12 表示)在含退火缓冲液的杂交介质中与单链靶分子杂交(SEQ ID NO: 14)，所述退火缓冲液为 10 x "Thermosequenase" 缓冲液(260mM Tris-HCl, pH9.5, 65 mM MgCl<sub>2</sub>)(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL)。通过加热到 65 °C 2 分钟，然后使混合物在约 30 分钟的时间内缓慢冷却到室温来完成退火反应(Maniatis 等，  
30 1982; Ausubel, 等, 1989)。

杂交后，在脱氧核苷和双脱氧核苷混合物的存在下，用 DNA 聚合酶(“Thermosequenase” DNA 聚合酶)延伸修饰引物以得到一组寡核苷



酸片段，所述片段对应于靶内腺嘌呤的位置（即反应产物内的胸苷）。用标准循环测序法及引物与模板的比例为 8：1 进行反应。由于所用的引物-模板比，所得的引物延伸产物主要（89%）是单链形式。

引物延伸后，将与 M13 反向引物互补，并在 3' 末端生物素化的中介寡核苷酸（SEQ ID NO：13）加到混合物中，用标准热/冷退火方法与引物退火，所述方法为：95 °C 2 分 30 秒；在 95 °C 15 秒 25 个循环，45 °C 20 秒，55 °C 10 秒，70 °C 20 秒，95 °C 30 秒 5 个循环，70 °C 20 秒，然后以每秒 0.1 °C 的速度从 95 °C 1 分钟冷却到 70 °C，随后将样品保持在 4 °C。然后将链霉亲和素包被的磁珠(MPG-Steptavidin,CPG,Inc.,Lincoln Park ,NJ)加到混合物中以捕获生物素化中介寡核苷酸/延伸的引物杂交物。用多步骤洗涤方法洗涤固定的产物以除去酶、三磷酸酯和盐。然后用硝酸银(5 μL,0.02 mM,Aldrich,Milwaukee,WI)和 DTT 处理样品以便将延伸片段释放到溶液中。该溶液(i)是从固相结合的中介寡核苷酸-第一引物区复合物中分离的，(ii)与 3-吡啶甲酸混合，(iii)在硅板上干燥，和(iv)按照上述实施例 4 所述，用 MALDI TOF 质谱分析。在图 13 中列出了释放的延伸片段。

如图 13 所示，该方法可以检测阅读长度至少为约 33 个碱基对的寡核苷酸延伸片段，而且分辨率很好。

### 实施例 7

#### 用单碱基指纹法检测点突变

在引物延伸反应中，使用两个 DNA 模板末端，一个是合成的 73 聚体（本文用 SEQ ID NO：14 表示），含有与野生型 M13 质粒相同的序列，对应于模板“16-C/19-G”，另一个是突变体质粒（部分包括在本文的 SEQ ID NO：15 中），称为模板“16-A/19-T”。模板的序列仅在碱基位置 16 和 19 有所不同，这是相对于 3' 末端而言（从引发区末端的上游开始数），如 SEQ ID NO：14 所示，第一个模板在位置 16 有一个胞嘧啶，在位置 19 有一个鸟嘌呤，而对应于 SEQ ID NO：15 的第二个模板，在位置 16 和 19 分别含有腺嘌呤和胸腺嘧啶。

用具有 SEQ ID NO：16 所示序列的引物，在存在 ddC 的条件下，将各模板进行酶促延伸。然后按照上述和图 14A（对应于从模板 16-C/19-G，衍生的反应产物，SEQ ID NO：17）和图 14B（对应于从模板 16-A/19-T 衍生的反应产物，SEQ ID NO：18）中所示，用 MALDI TOF



质谱分析所得的产物混合物，所述混合物含有以 ddC 终止的、衍生自亲本模板的寡核苷酸片段。

5 如从反应产物质谱所看到的，计算对应于各质谱中选择峰之间差异的精确质量值，可以确定在 5'末端的 16 和 19 位，存在两个单核苷酸取代。如图 14A - 14B 中所示，峰-峰差异的质量测量值用大标志表示，而实际/理论质量值用小标志表示。用模板 16-C/19-G(质量峰 b-质量峰 a=618.9)对模板 16-A/19-T(质量峰 f-质量峰 e=593)的差异( $\Delta m$  值表示)表示 G 到 T 的碱基取代。观察到的等于 25(618.9 减 593.4)的质量差异与鸟嘌呤(MW = 151)和胸腺嘧啶(MW = 126)之间的质量差一致。用相似的方法确定因位置 19C 到 A 的突变而产生的单碱基取代(如  $\Delta m_{d-b}$  对  $\Delta m_{g-f}$ )。10 在对应于模板 16-A/19-T 的质谱中缺乏位置 19 的峰进一步证实了位置 19 的单碱基取代(图 14B)。

### 实施例 8

#### 用可裂解对全长引物比较引物延伸反应

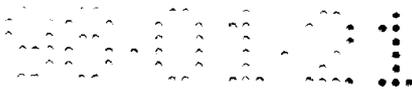
15 按照上述实施例 6 的方法，将含 5'-生物素基团和位于距引物 3'末端 5 个核苷酸处的硫醇-胸苷的修饰 M13 反向引物 (SEQ ID NO: 16) 与单链靶分子 (SEQ ID NO: 14) 杂交，然后在存在脱氧核苷酸和双脱氧-T 混合物的条件下酶促延伸以得到一组对应于靶内腺嘌呤位置的寡核苷酸片段。ddT 延伸反应后，将生物素化的引物/延伸产物捕获 (固定) 20 在链霉亲和素包被的磁珠上。然后对珠-固定引物/延伸产物进行一系列的洗涤以除去模板、酶、三磷酸和多余的盐。将含有固定的引物/延伸产物的链霉亲和素包被的磁珠分到 2 个试管中。用硝酸银和 DTT 处理第一个试管中的内含物以在距引物 5'末端 5 个核苷酸处的硫醇-胸苷裂解引物，然后将延伸片段释放到溶液中。将第二个试管中的内含物煮沸以破坏生 25 物素/链霉亲和素键，并将全长引物/延伸产物释放到溶液中。然后将两个样品分别与 3-羟基吡啶甲酸混合、干燥并按照上述用 MALDI TOF 质谱分析。

在图 15A (全长引物 - 延伸片段) 和图 15B (裂解的引物 - 延伸片段) 中列出了所得的质谱。如可见到的，按照本发明方法，裂解引物 - 30 延伸片段样品 (图 15B) 的分辨率和阅读长度都优于全长引物 - 煮沸/释放样品的 (图 15A)。集中在未裂解引物样品 (图 15A) 碱基 15 附近的宽峰可归因于引物的二聚合作用，而且当样品含有大量引物时发生



的一种假象。从图 15B 中可以看出，引物的裂解消除了这种人工现象。

尽管参考具体的方法和实施方案对本发明进行了描述，但应理解在不偏离本发明的情况下可以进行各种修饰和改变。



## 序列表

### (1) 一般资料:

(i) 申请人: SRI INTERNATIONAL

(ii) 题目: 用可裂解引物测定寡核苷酸大小

5 (iii) 序列数目: 18

(iv) 相关地址:

(A) 收件人: Dehlinger & Associates

(B) 街道: P.O.Box 60850

(C) 城市: Palo Alto

10 (D) 州: CA

(E) 国家: 美国

(F) 邮政编码: 94306

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

15 (B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) 当前的申请资料:

(A) 申请号: 未知

20 (B) 申请日: 1996年4月30日

(C) 分类号:

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: US 08/445,751

(B) 申请日: 1995年5月22日

25 (C) 申请号: 未定(文档号 8255-0015.30)

(D) 申请日: 1996年4月26日

(viii) 代理人/代理资料:

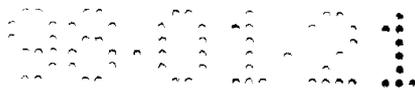
(A) 姓名: Evans, Susan T.

(B) 登记号: 38443

30 (C) 文献/文档号: 8255-0015.30

(ix) 通信资料:

(A) 电话: 415 - 324 - 0880



(B)电传: 415 - 324 - 0960

( 2 ) SEQ ID NO: 1 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 16 个碱基对

5 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 有

10 (iv)反义: 无

(vi)来源:

(c)单个分离物: 带有氨基磷酸酯键的举证性 16 聚体

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

15 (B)位置 9..10

(C)其他资料: /注 = “序列在 9 和 10 核苷酸之间含有氨基磷酸酯键”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1

TTCATGCAAT CCGATG

20

( 2 ) SEQ ID NO: 2 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

(B)类型: 核酸

25 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 有

(iv)反义: 无

30 (vi)来源:

(c)单个分离物: 固定的可裂解 20 聚体引物

(ix)特征:



(A)名称/关键词: misc\_特征

(B)位置 16..17

(C)其他资料: /注 = “引物含有包含一固定结合位点、在 16 和 17 核苷酸之间的可裂解位点 “x” 的第一区”

5 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 2

ACTCCTGTGG AGAACTCTGC

20

( 2 ) SEQ ID NO: 3 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 20 个碱基对

10 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 有

15 (iv)反义: 无

(vi)来源:

(c)单个分离物: 单链靶, 与 SEQ ID NO: 2 互补

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3

GCAGAGTTCT CCACAGGAGT

20

20 ( 2 ) SEQ ID NO: 4 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 16 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

25 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 有

(iv)反义: 无

(vi)来源:

30 (c)单个分离物: 选择性; 裂解后的固定引物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:

ACTCCTGTGG AGAACT

16



( 2 ) SEQ ID NO: 5 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 19 个碱基对

(B)类型: 核酸

5 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 有

(iv)反义: 无

10 (vi)来源:

(c)单个分离物:  $\alpha$  抗胰蛋白酶基因的一部分, 位置 333-352 (野生型)

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:

ACCATCGACG AGAAAGGGA

19

15 ( 2 ) SEQ ID NO: 6 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 7 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型: 单链

20 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 蛋白质

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

25 (c)单个分离物: 由 $\alpha 1$  抗胰蛋白酶基因 (野生型) 表达的片段

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6:

Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr

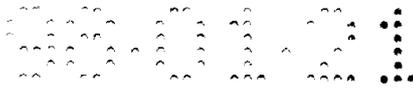
1 5

( 2 ) SEQ ID NO: 7 的资料;

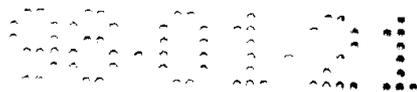
30 (I)序列特征:

(A)长度: 19 个碱基对

(B)类型: 核酸



- (C)链型: 单链  
(D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA (基因组)  
(iii)假设: 无
- 5 (iv)反义: 无  
(vi)来源:  
(c)单个分离物: (野生型)的一部分/点突变  
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:  
ACCATCGACA AGAAAGGGA
- 10 (2) SEQ ID NO: 8的资料;  
(I)序列特征:  
(A)长度: 7个氨基酸  
(B)类型: 氨基酸  
(C)链型: 单链  
15 (D)拓扑结构: 线性  
(ii)分子类型: 蛋白质  
(iii)假设: 无  
(iv)反义: 无  
(vi)来源:  
20 (c)单个分离物: 由突变 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶基因表达的产物的一部分  
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:  
Thr Ile Asp Lys Lys Gly Thr  
1 5
- (2) SEQ ID NO: 9的资料;
- 25 (I)序列特征:  
(A)长度: 19个碱基对  
(B)类型: 核酸  
(C)链型: 单链  
(D)拓扑结构: 线性
- 30 (ii)分子类型: DNA (基因组)  
(iii)假设: 有  
(iv)反义: 无



(vi)来源:

(c)单个分离物: 16S rRNA 中保守区 1047 - 1065 的引物

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

5 (B)位置 7..8

(C)其他资料: /注 = “引物含有在位置 7 和 15 以 1: 1 混合掺入的 dT 和 dG”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9:

ACGACATCCA TGCATCACC

19

10 ( 2 ) SEQ ID NO: 10 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 17 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

15 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

20 (c)单个分离物: 17 聚体野生型/可裂解核糖位点

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

(B)位置 9..10

25 (C)其他资料: /注 = “探针在距 5' 末端的位置 10 (距 3' 末端的位置 7) 含一可裂解核糖”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 10:

AAATACATCG CTTGAAC

17

( 2 ) SEQ ID NO: 11 的资料;

(I)序列特征:

30 (A)长度: 18 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链



- (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA (基因组)
- (iii)假设: 无
- (iv)反义: 无
- 5 (vi)来源:
- (c)单个分离物: 在位置 10 含有核糖的生物素化的 18 聚体
- (ix)特征:
- (A)名称/关键词: misc\_特征
- (B)位置 7..8
- 10 (C)其他资料: /注 = “18 聚体在 5' 末端被生物素化, 并在距 5' 末端的位置 10 含有一核糖”
- (xi)序列描述: SEQ ID NO: 11:
- ATCTTCCTGG CAAACTCA 18
- ( 2 ) SEQ ID NO: 12 的资料;
- 15 (I)序列特征:
- (A)长度: 22 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单链
- (D)拓扑结构: 线性
- 20 (ii)分子类型: DNA (基因组)
- (iii)假设: 无
- (iv)反义: 无
- (vi)来源:
- (c)单个分离物: 修饰的 M13 反引物/5'-(S)胸苷
- 25 (ix)特征:
- (A)名称/关键词: misc\_特征
- (B)位置 17..18
- (C)其他资料: /注 = “反引物在位置 18 含有 5'-(S)胸苷”
- (xi)序列描述: SEQ ID NO: 12:
- 30 CACACAGGAA ACAGCTATGA CC 22
- ( 2 ) SEQ ID NO: 13 的资料;
- (I)序列特征:



(A)长度: 17 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

5 (ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

(c)单个分离物: 与 M13 反引物互补的 3'-生物素中介寡核苷酸

10 (ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

(B)位置 16..17

(C)其他资料: /注 = “在 3'末端生物素化中介寡核苷酸”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 13:

15 TAGCTGTTTC CTGTGTG

17

( 2 ) SEQ ID NO: 14 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 73 个碱基对

(B)类型: 核酸

20 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

25 (vi)来源:

(c)单个分离物: 73 聚体 (野生型) /与野生型 M13 质粒相同的序

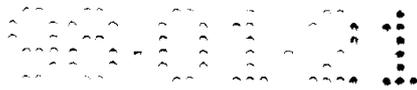
列

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

30 (B)位置 51..68

(C)其他资料: /注 = “引发区对应于核苷酸 51-68; 所需的 C 和 G 分别在位置 35 和 32”



(xi)序列描述: SEQ ID NO: 14:

CAGCTTTTGT TCCCTTTAGT GAGGGTTAAT TGCGCGCTTG  
GCGTAATCAT GGTCATAGCT 60  
GTTTCCTGTG TGA 73

5 (2) SEQ ID NO: 15 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 73 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

10 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

15 (c)单个分离物: 突变体质粒、模板 “16-A/19-T”

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

(B)位置 51..68

20 (C)其他资料:/注 = “引发区对应于核苷酸 51-68; 突变位置在 35(A)  
和 32(T)”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 15:

CAGCTTTTGT TCCCTTTAGT GAGGGTTAAT TTCGAGCTTG  
GCGTAATCAT GGTCATAGCT 60  
GTTTCCTGTG TGA 73

25

(2) SEQ ID NO: 16 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 18 个碱基对

30 (B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性



(ii)分子类型: DNA (基因组)

(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

5 (c)单个分离物: 5'生物素化 M13 反向引物, 在位置 14 含有 5'(S)T

(ix)特征:

(A)名称/关键词: misc\_特征

(B)位置 13..14

(C)其他资料:/注 = “引物在 5'末端被生物素化并在位置..含有 5'(S)

10 - T”

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 16:

CAGGAAACAG CTATGACC

18

(2) SEQ ID NO: 17 的资料;

(I)序列特征:

15 (A)长度: 45 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)

20 (iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

(c)单个分离物: 来自模板 “16-C/19-G” 的延伸产物

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 17:

25 ATGATTACGC CAAGCGCGCA ATTAACCCTC ACTAAAGGGA ACAA 45

(2) SEQ ID NO: 18 的资料;

(I)序列特征:

(A)长度: 45 个碱基对

(B)类型: 核酸

30 (C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA (基因组)



(iii)假设: 无

(iv)反义: 无

(vi)来源:

(c)单个分离物: 来自模板 16-A/19-T 的延伸产物

5 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 18:

ATGATTACGC CAAGCTCGAA ATTAACCCTC ACTAAAGGGA ACAAA 45

说明书附图

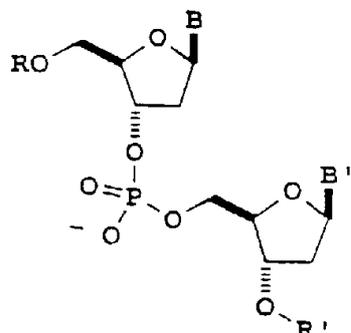


图 1 A

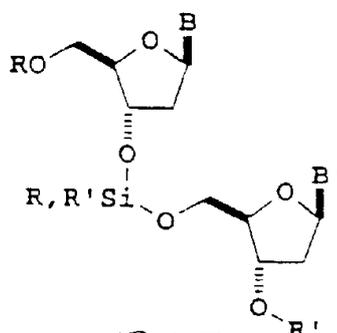


图 1 B

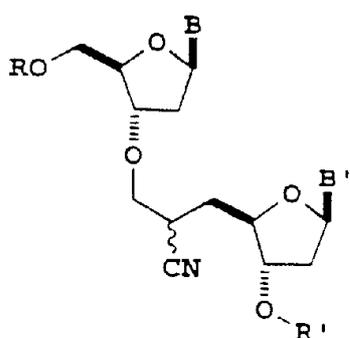


图 1 C

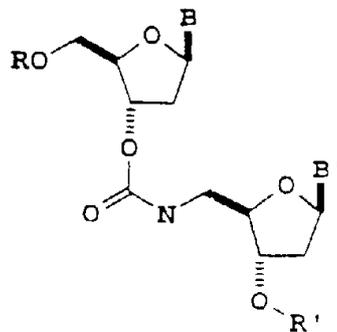


图 1 D

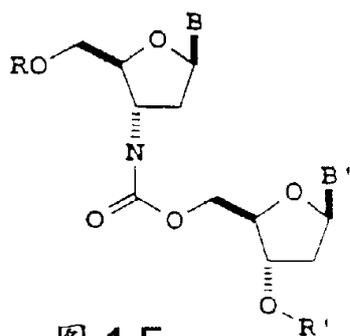


图 1 E

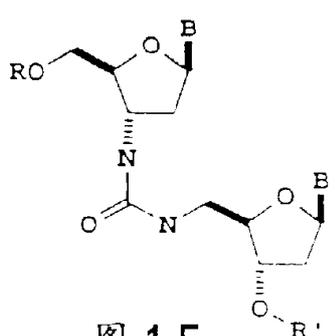


图 1 F

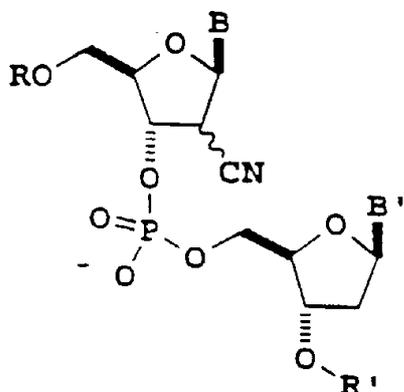


图 1 G

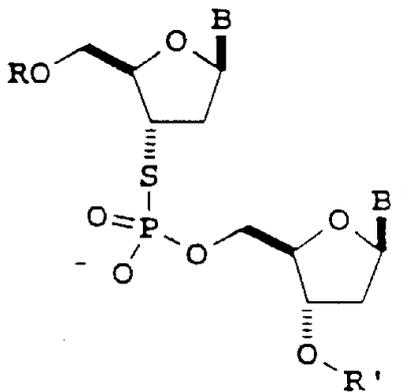


图 1 H

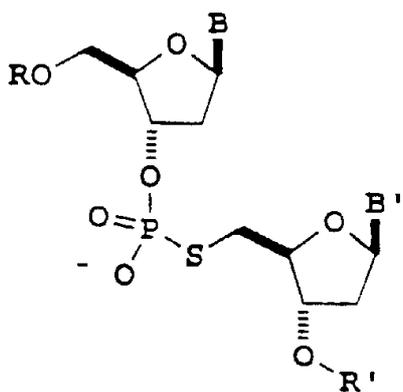


图 1 I

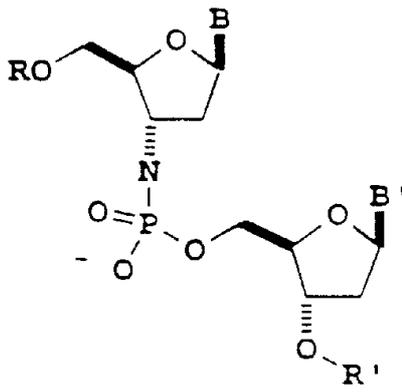


图 1 J

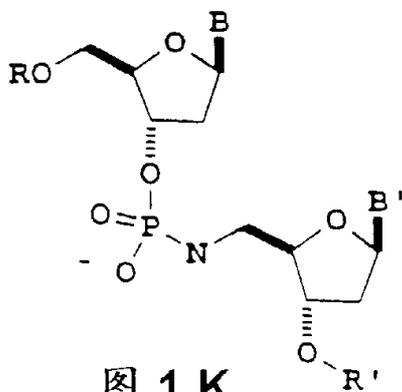


图 1 K

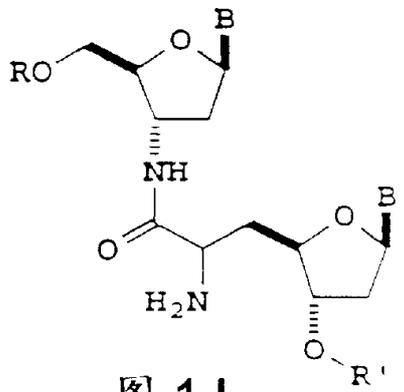
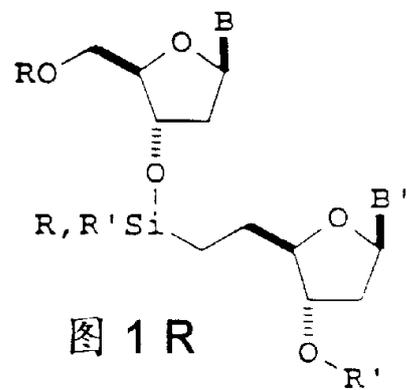
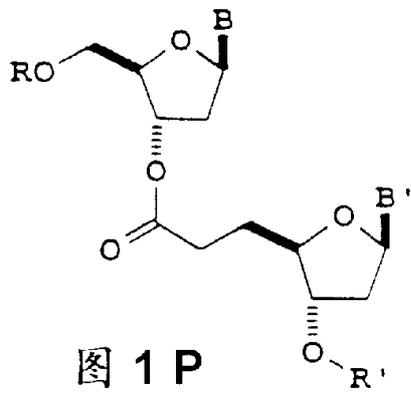
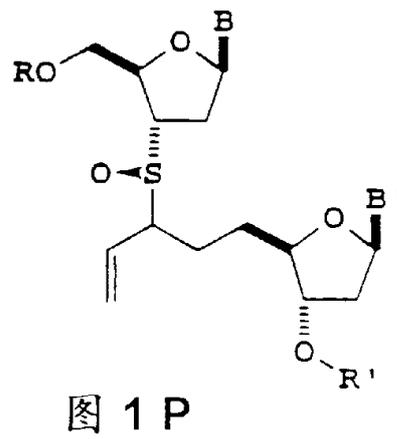
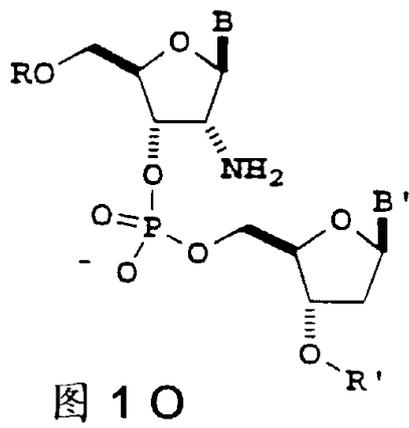
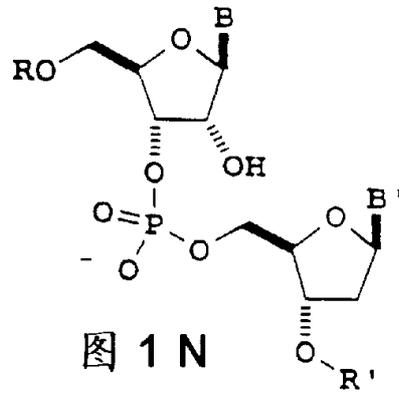
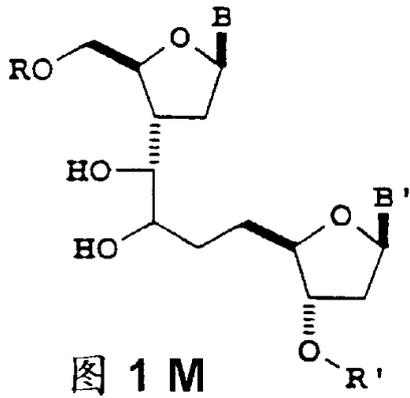


图 1 L

# 图 1



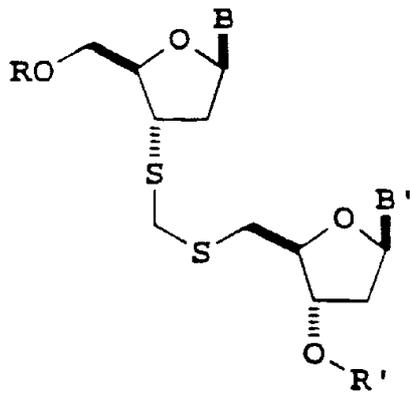


图 1 S

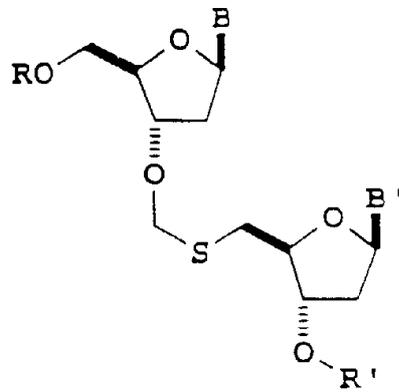


图 1 T

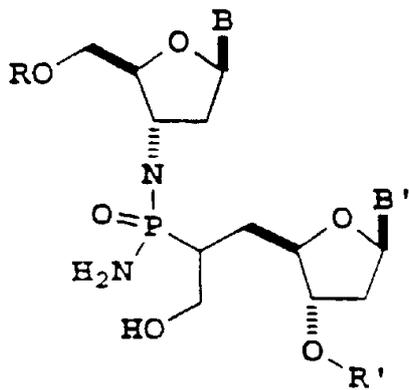


图 1 U

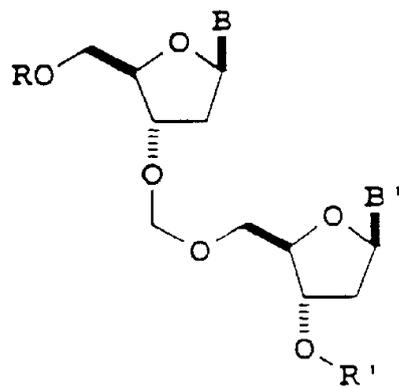


图 1 V

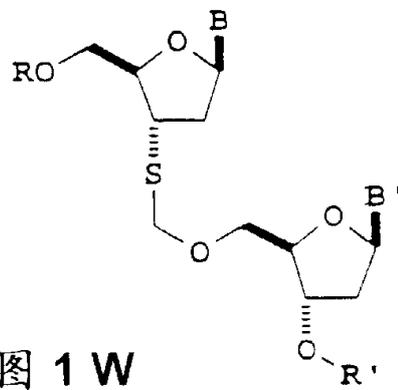


图 1 W

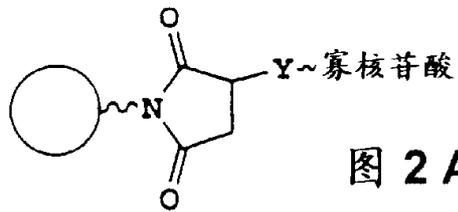


图 2 A

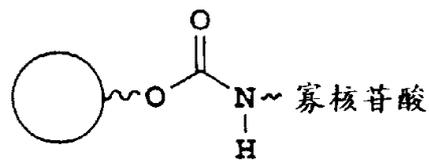


图 2 B

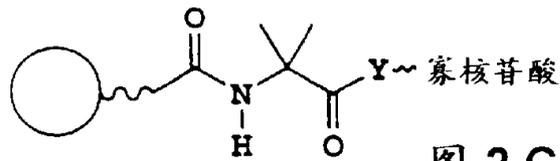


图 2 C

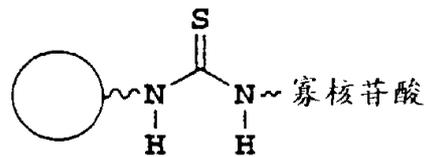


图 2 D

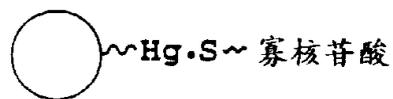


图 2 E

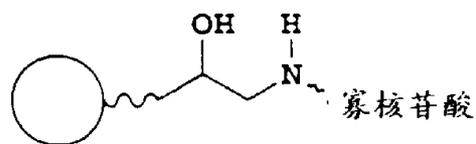


图 2 F

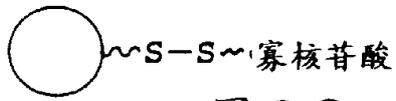


图 2 G

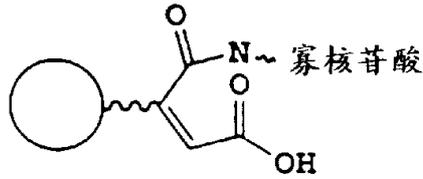


图 2 H

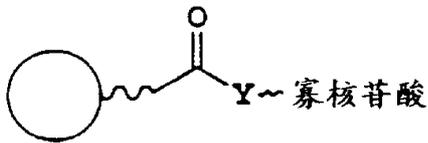


图 2 I

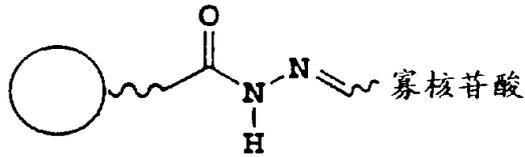


图 2 J

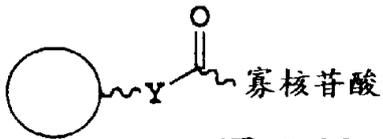


图 2 K

Biotin ~~~~ 链霉亲和素

图 2 L

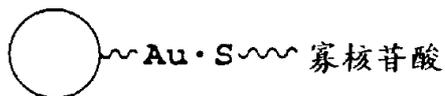


图 2 M

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99

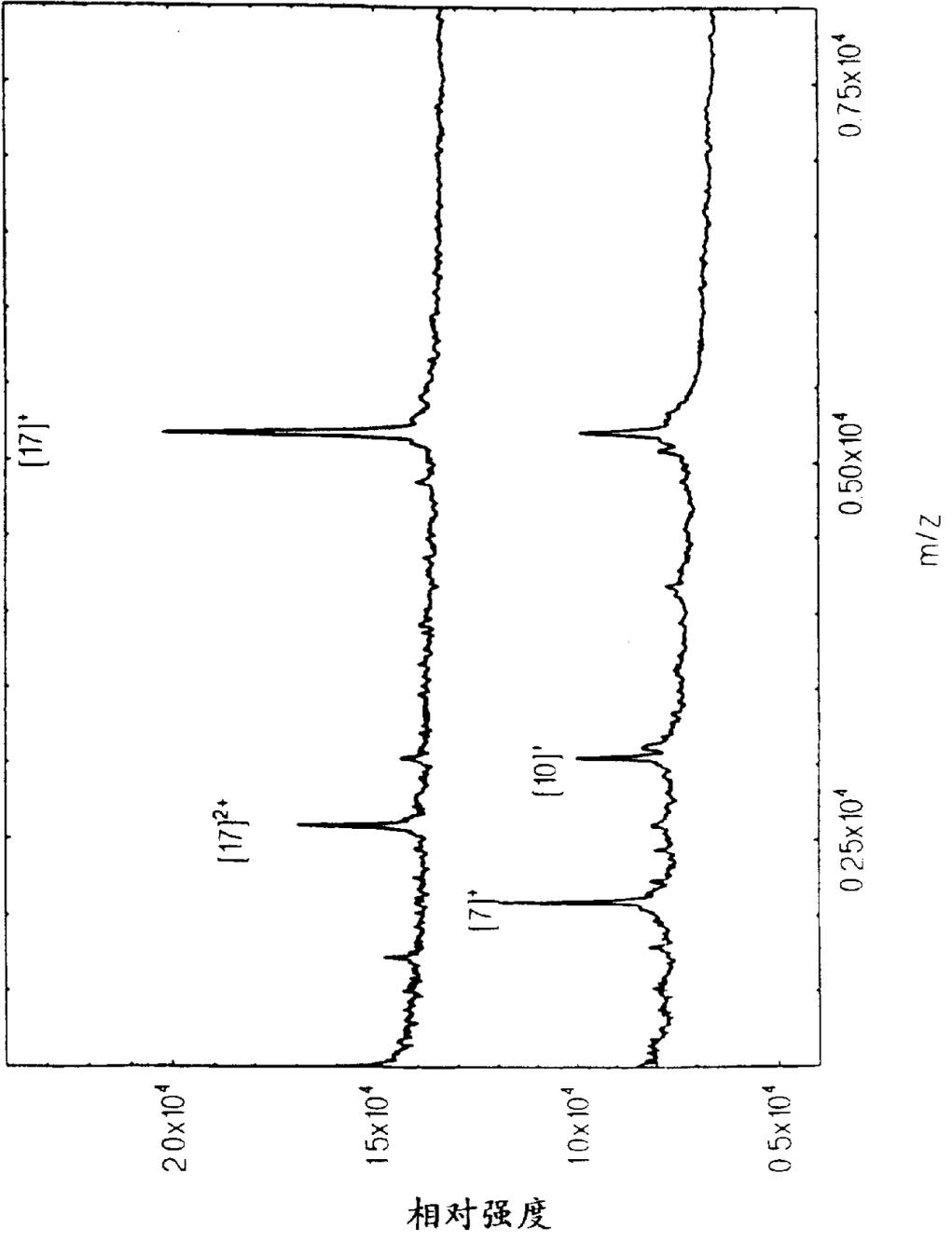


图 3 A

图 3 B

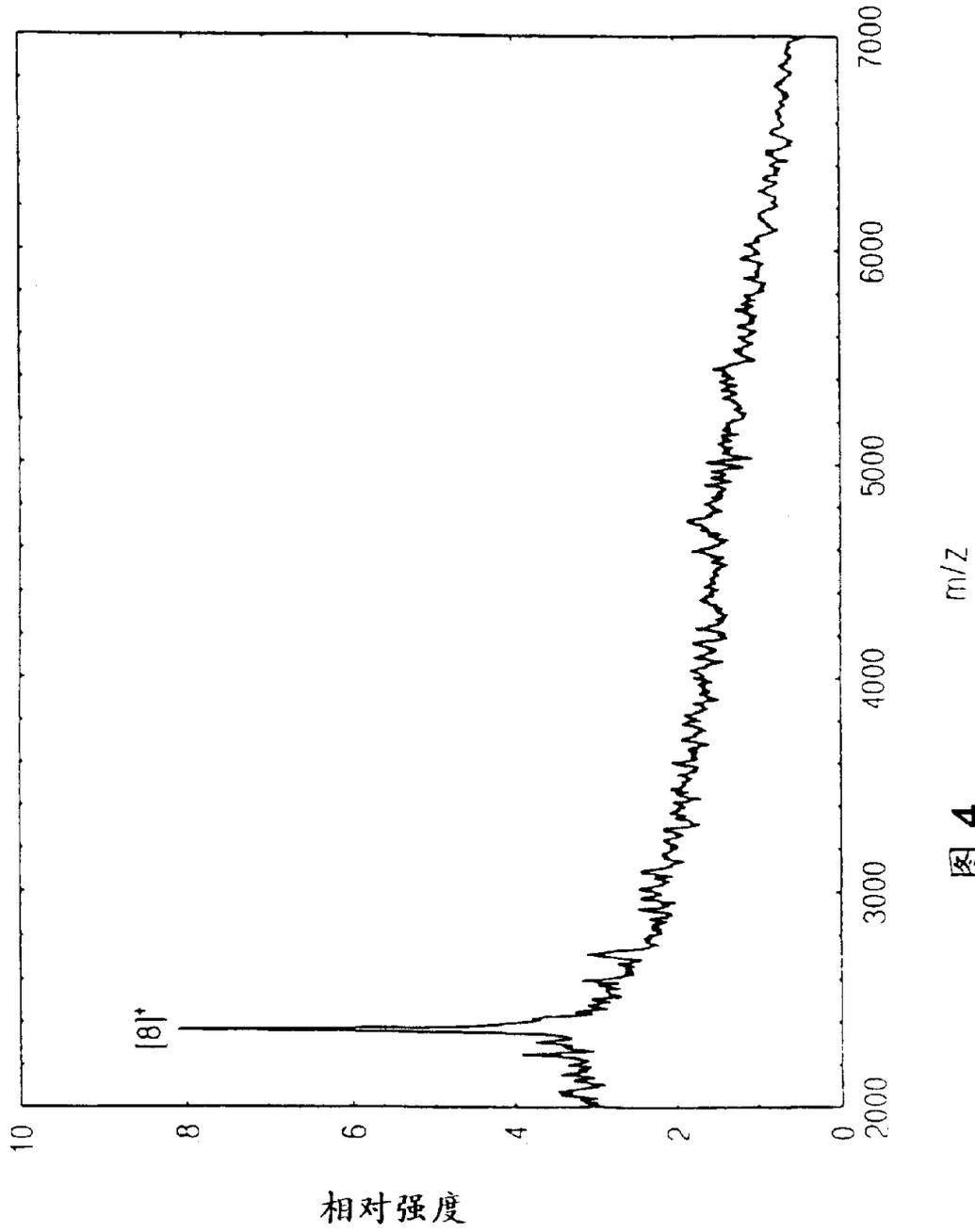


图 4

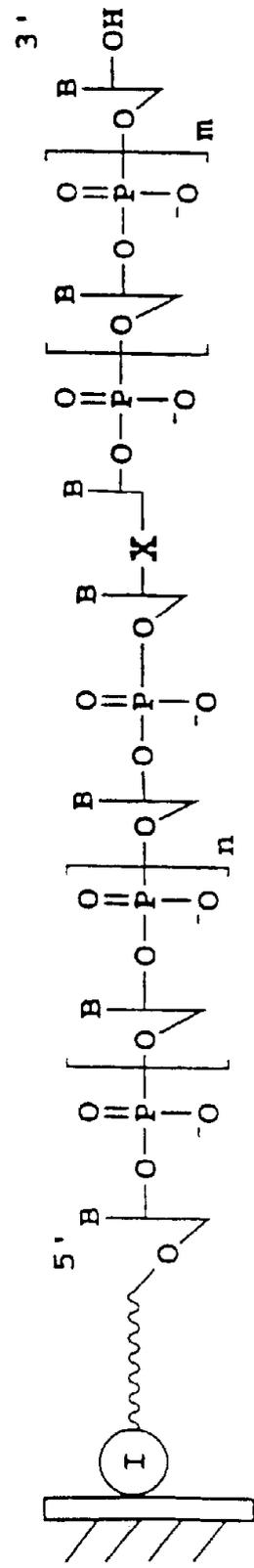
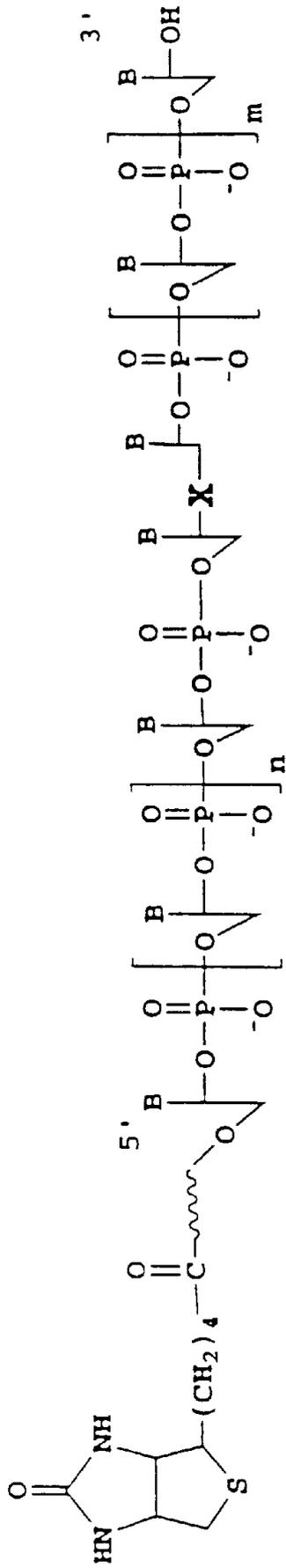


图 5 A



捕获

图 5 B

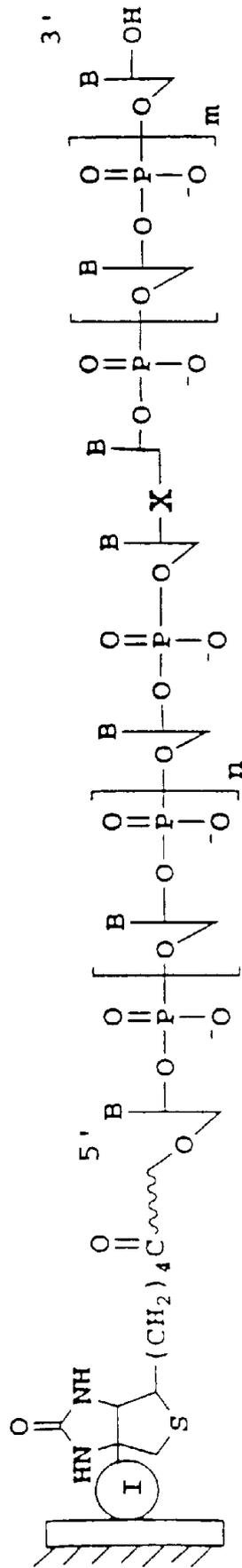


图 5 C

第 5 章 磷酸酯类化合物  
5.1 磷酸酯类化合物的分类  
5.2 磷酸酯类化合物的性质  
5.3 磷酸酯类化合物的用途

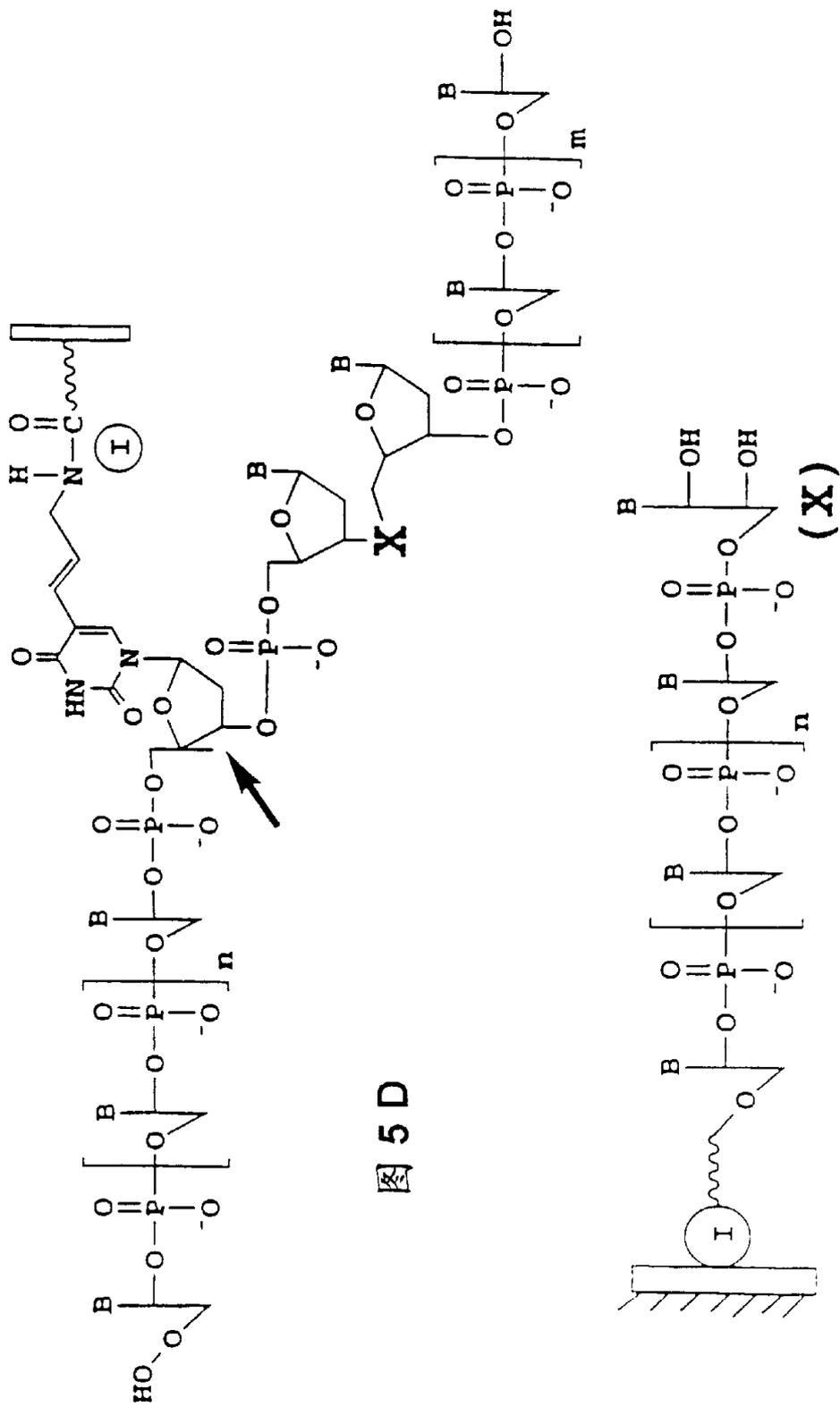


图 5 E

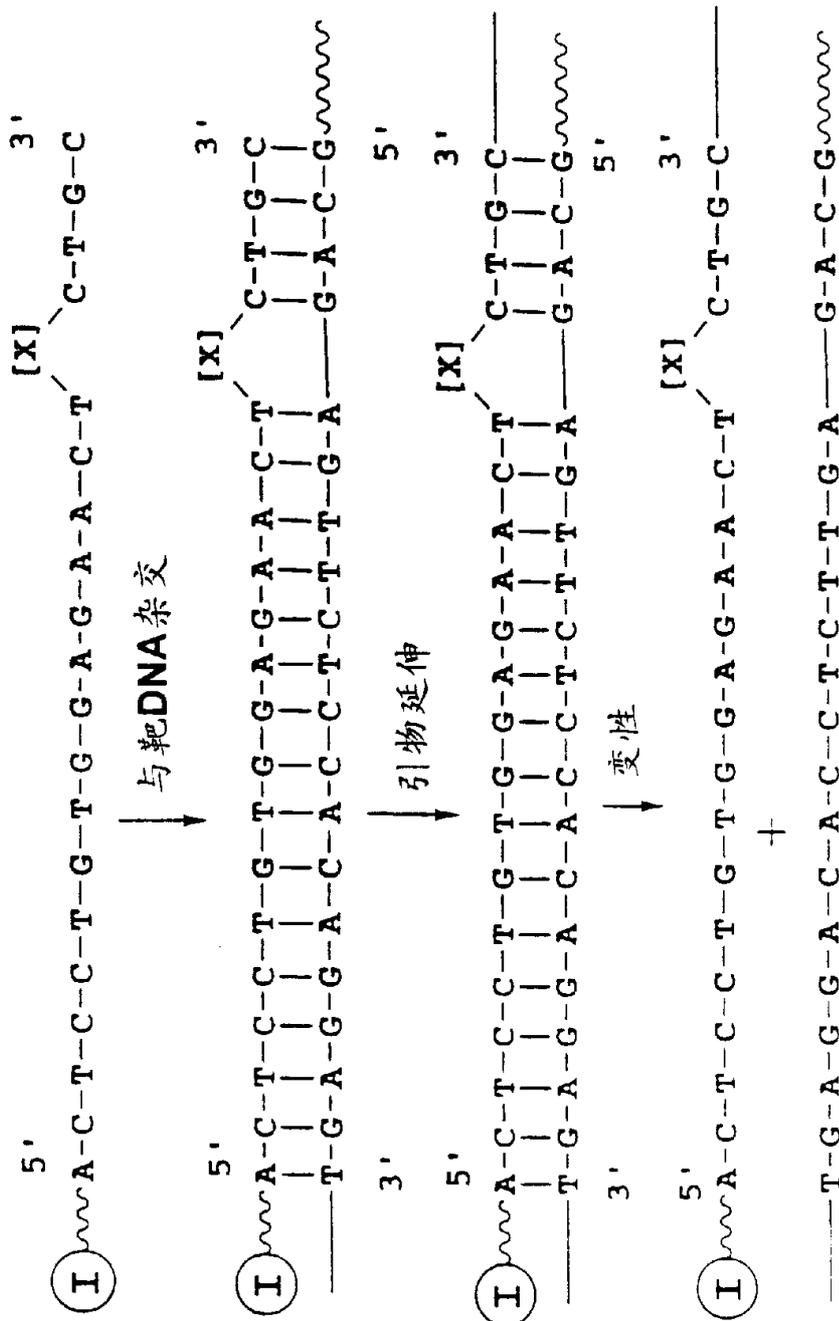


图 6 A

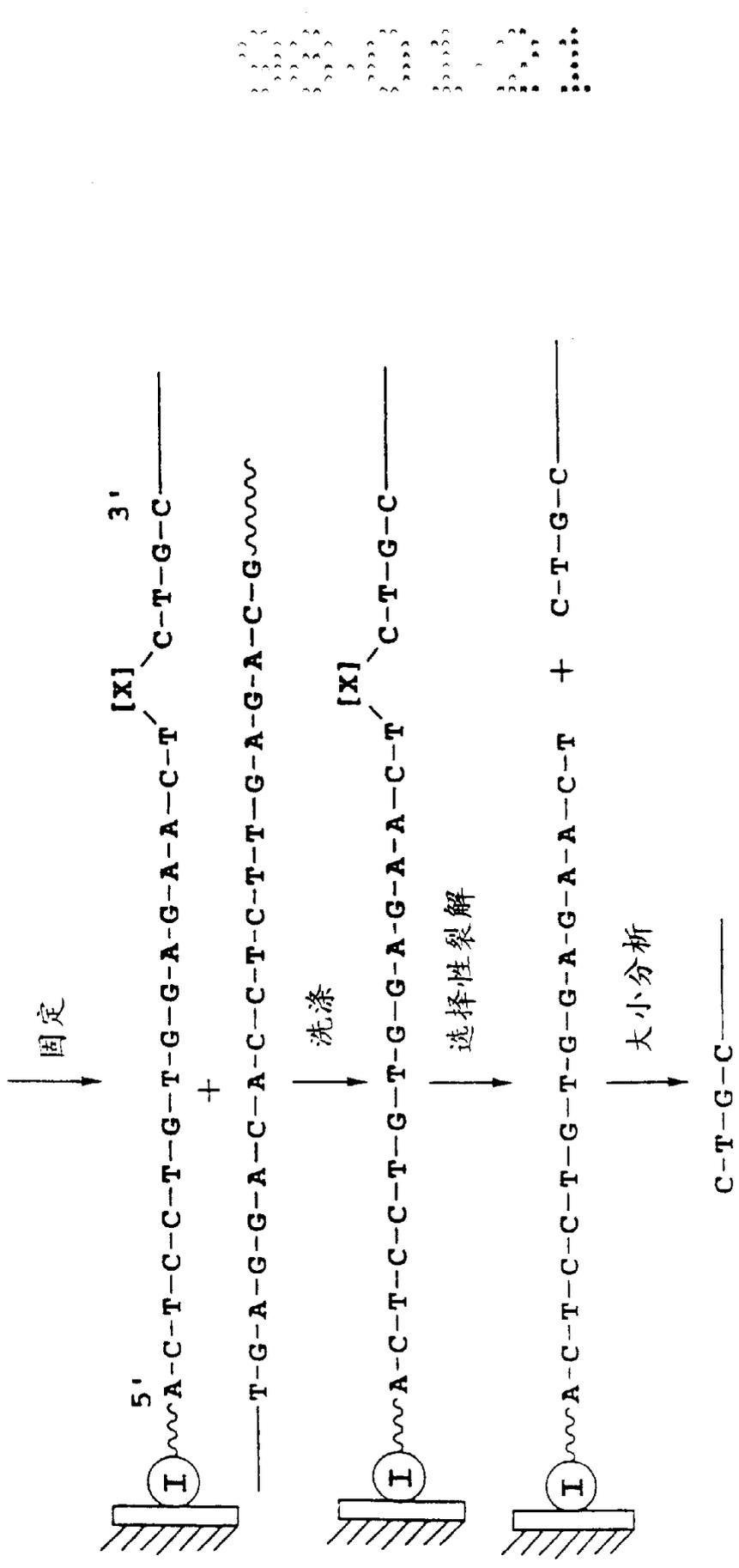


图 6 B

血红蛋白 的类型	氨基酸序列和DNA 核苷酸序列
A	-Pro-Glu-Glu -CCT-GAG-GAG-
B	-Pro-Val-Glu -CCT-GTG-GAG-

图 7 A

条件	氨基酸序列和DNA 核苷酸序列
正常	342 -Thr-Ile-Asp-Glu-Lys-Gly-Thr- -ACC-ATC-GAC-GAG-AAA-GGG-A...
$\alpha_1$ -抗胰蛋白 酶缺陷型	-Thr-Ile-Asp-Lys-Lys-Gly-Thr- -ACC-ATC-GAC-AAG-AAA-GGG-A...

图 7 B

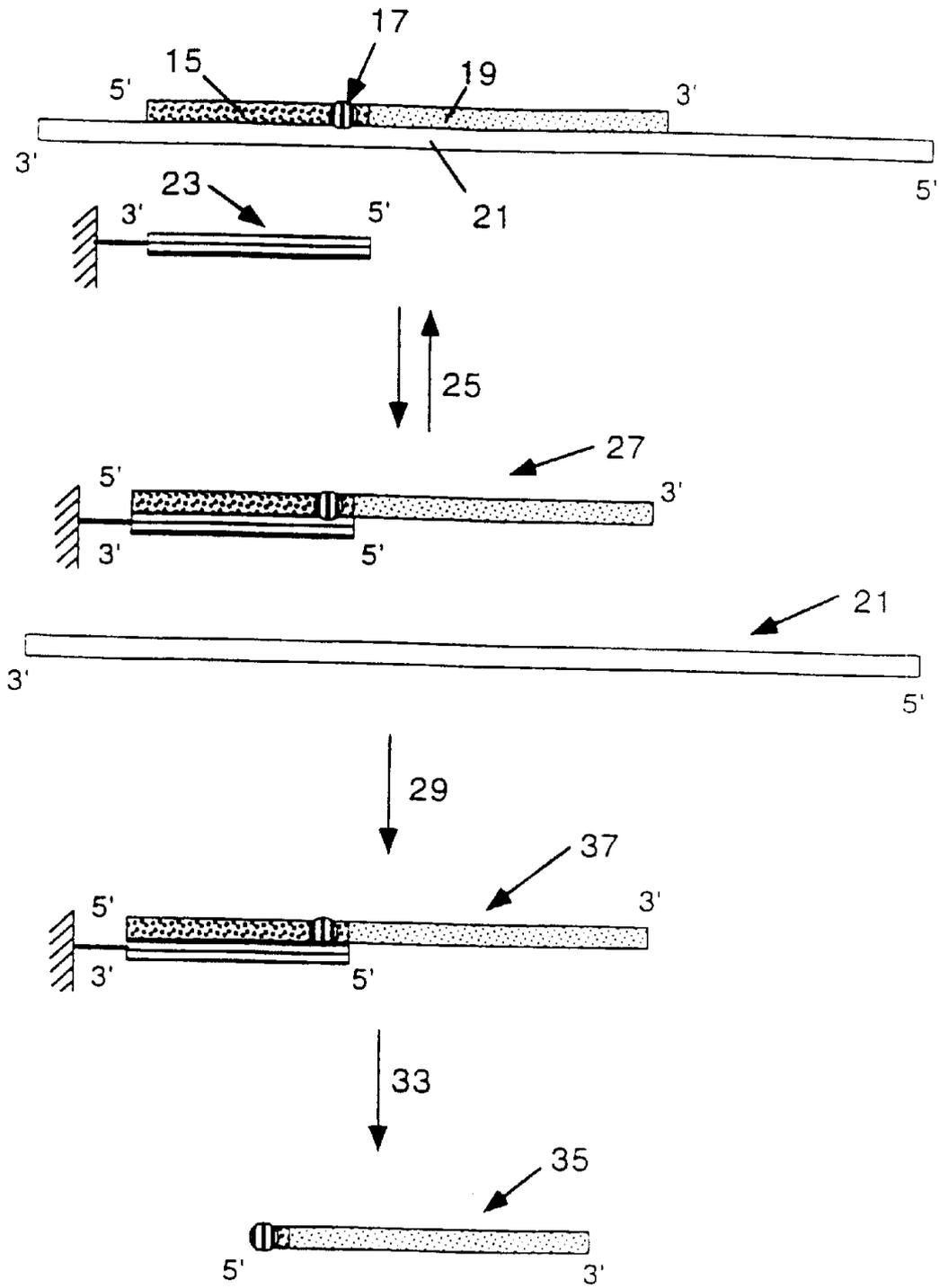


图 8

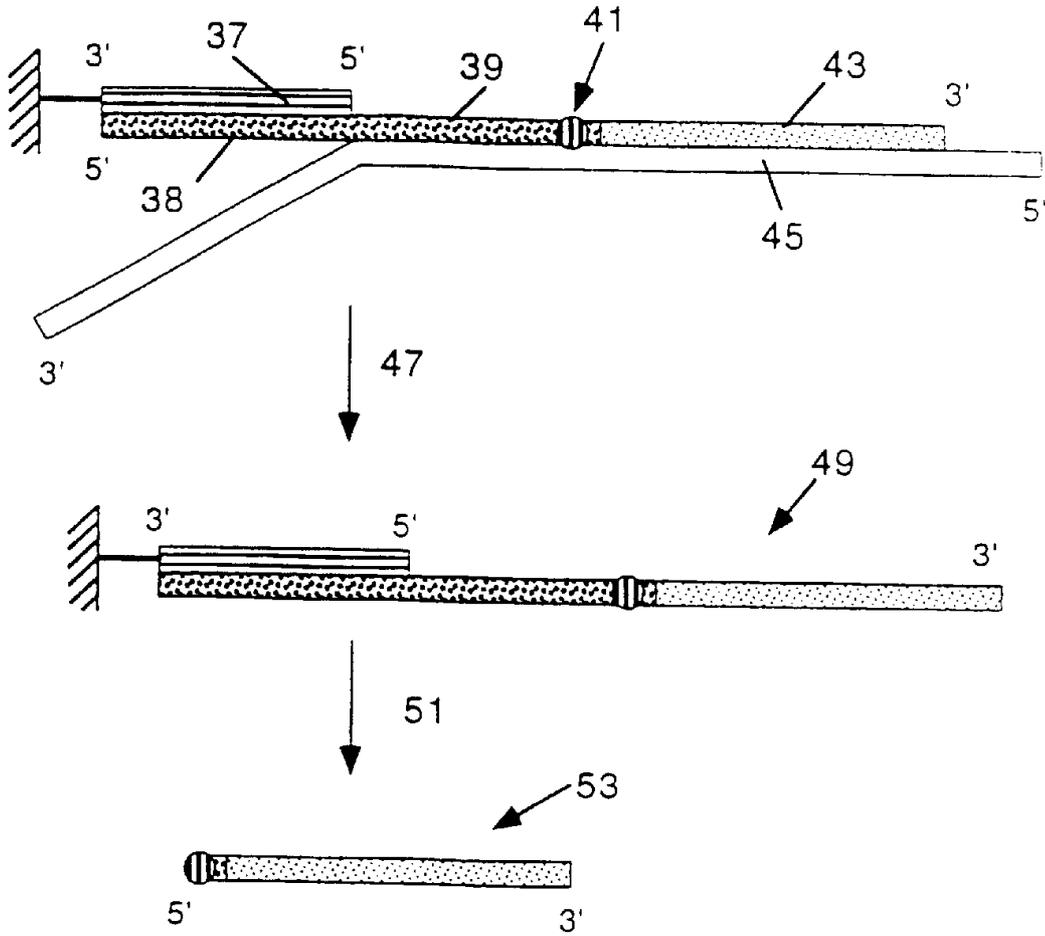


图 9

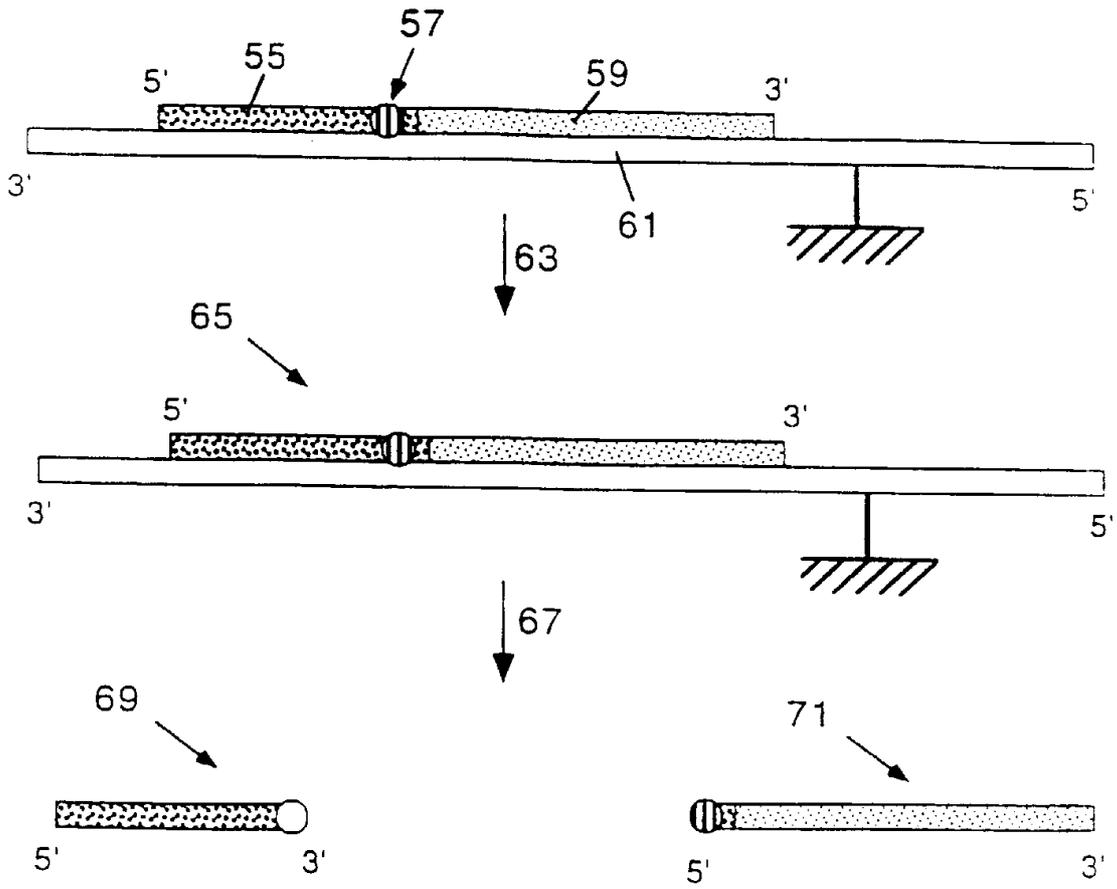


图 10

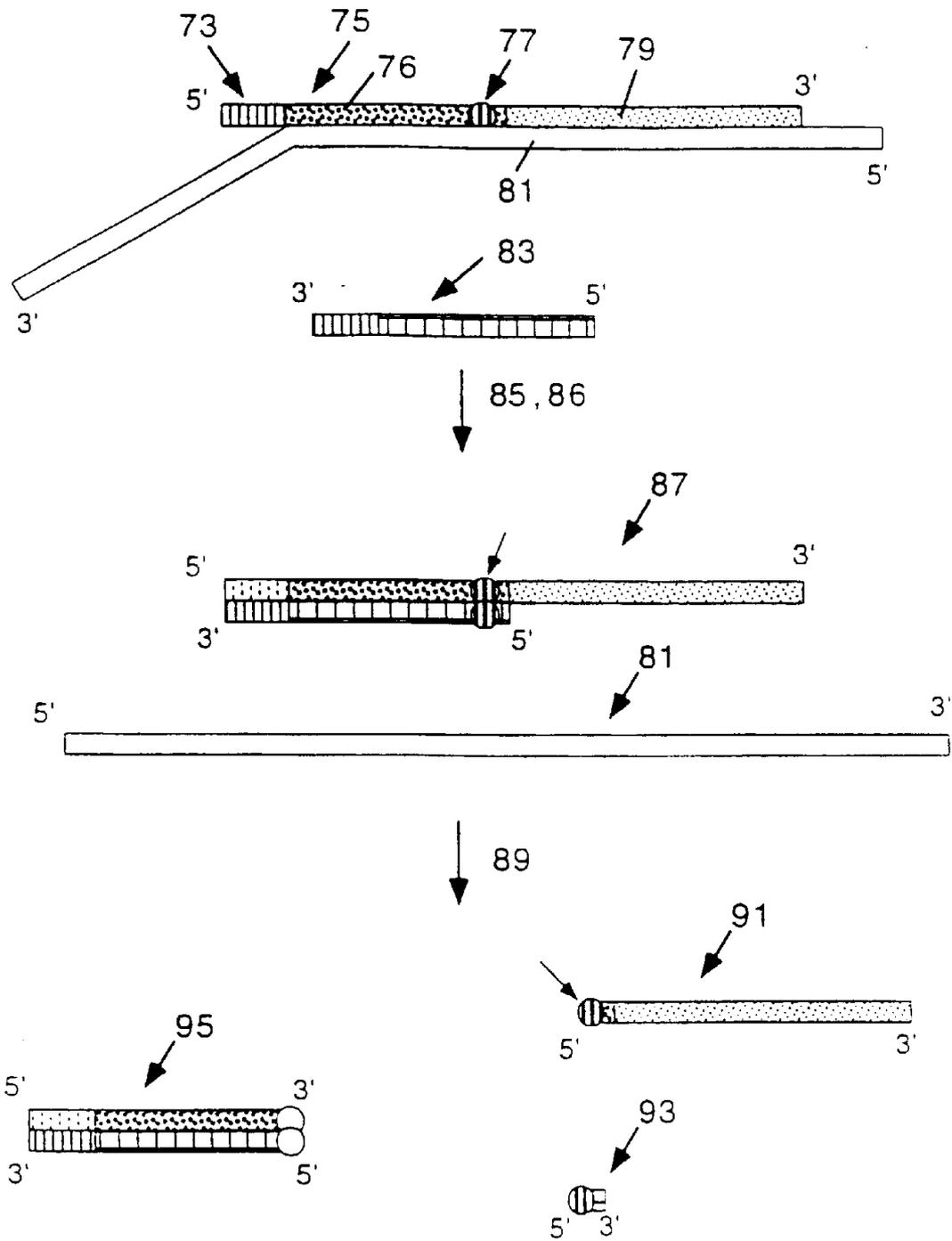


图 11

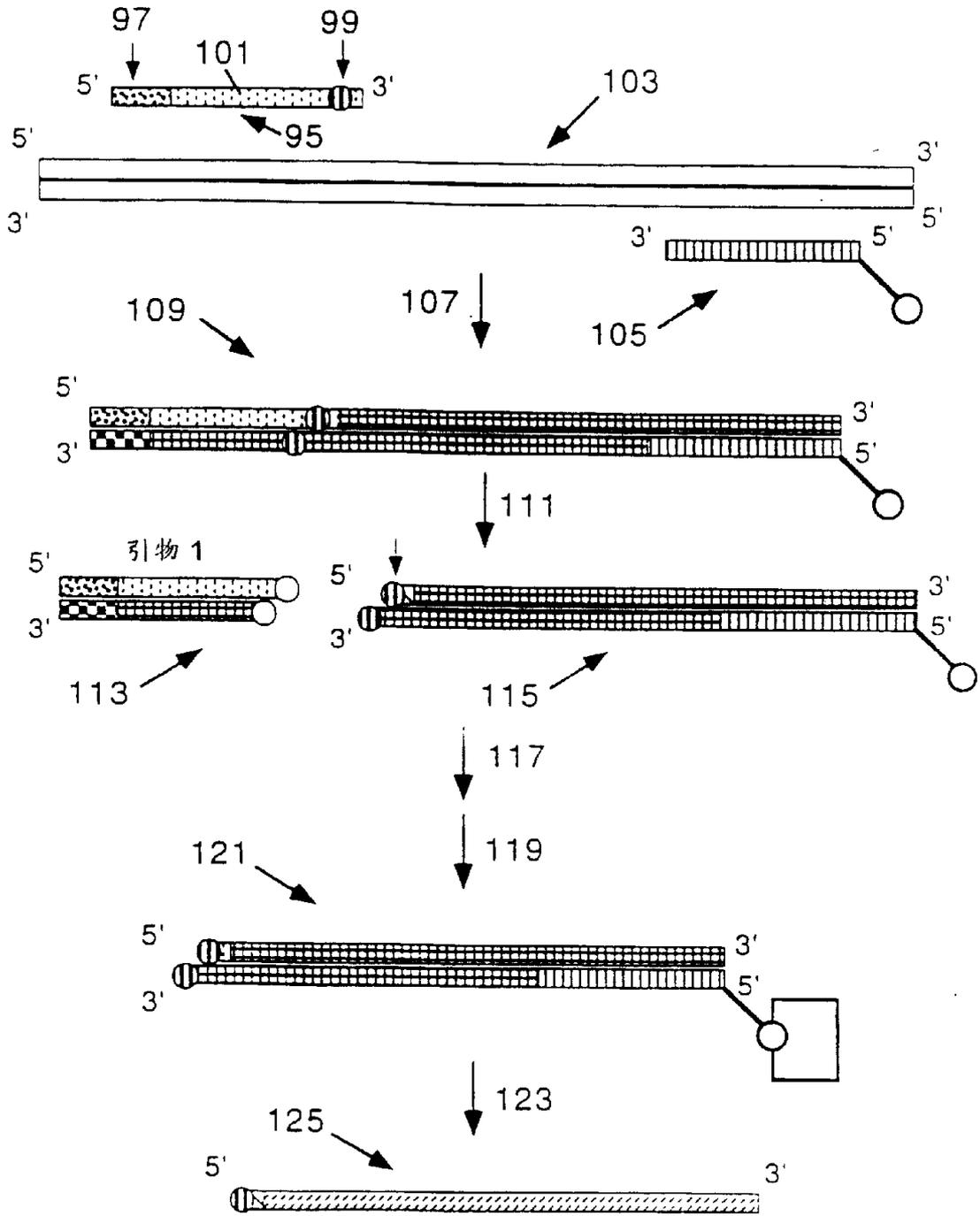


图 12

333333  
 222222  
 111111  
 000000

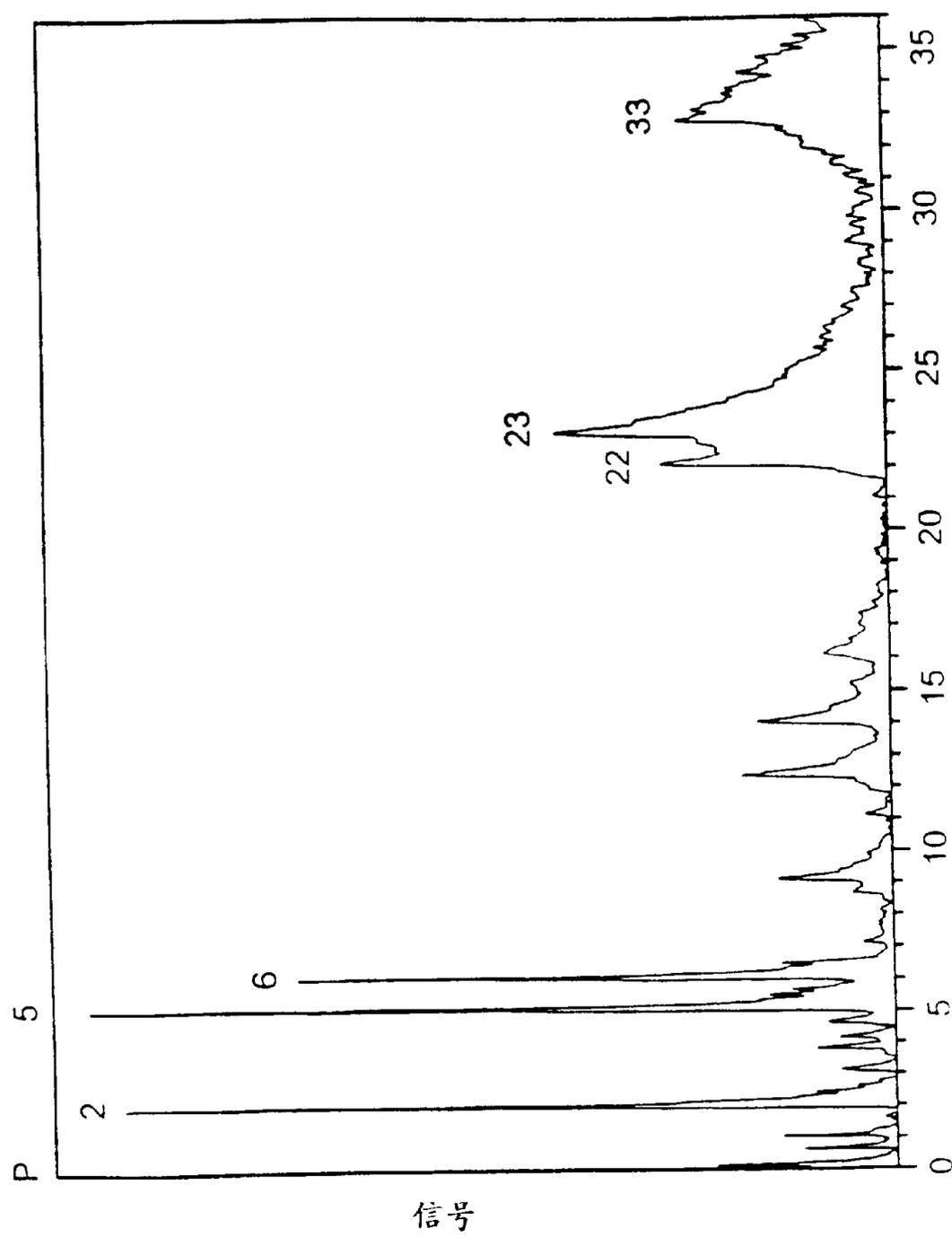


图 13 Base Past Primer

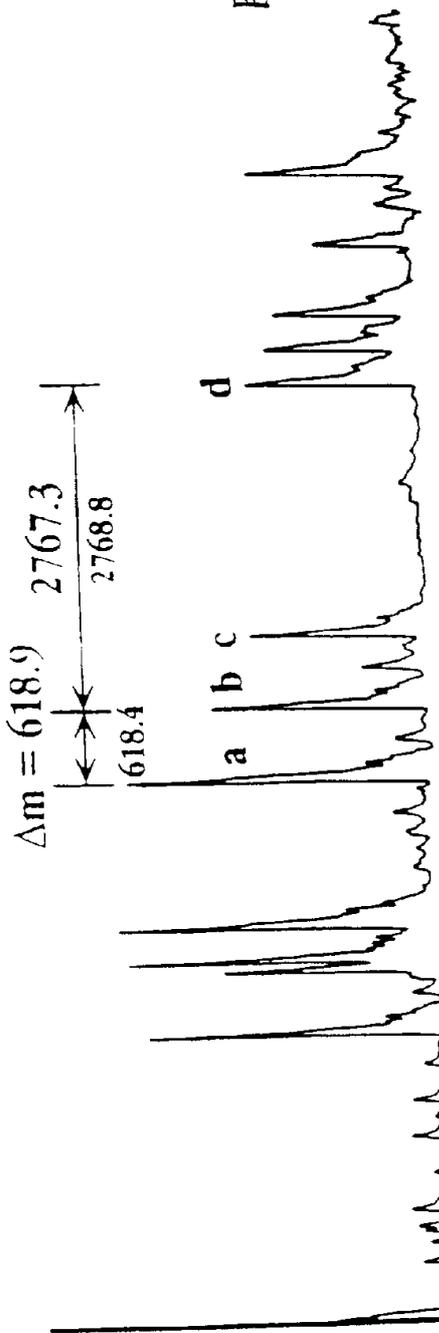


图 14 A

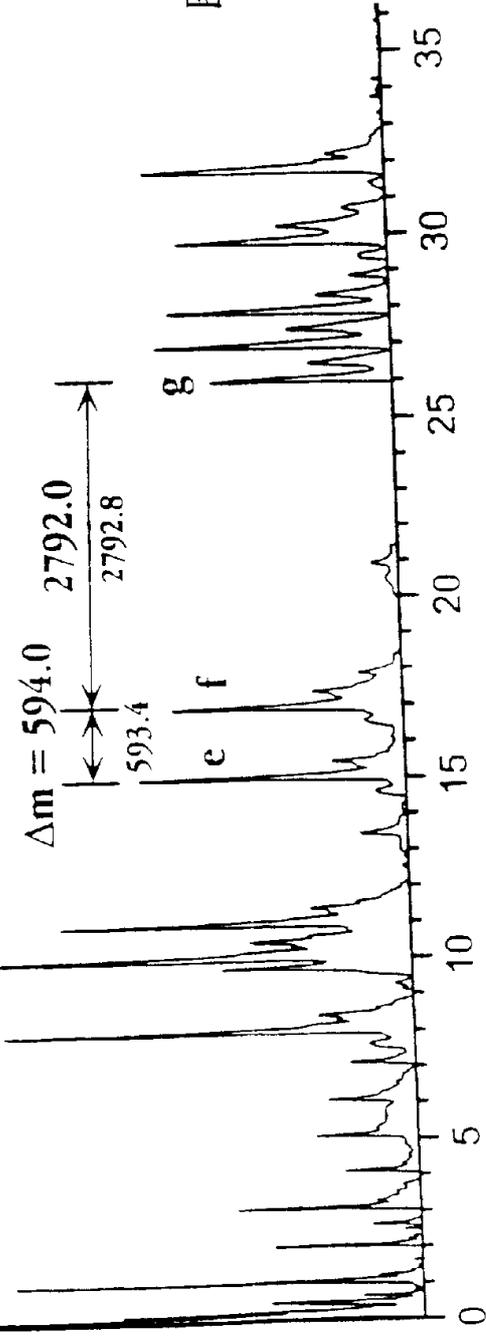
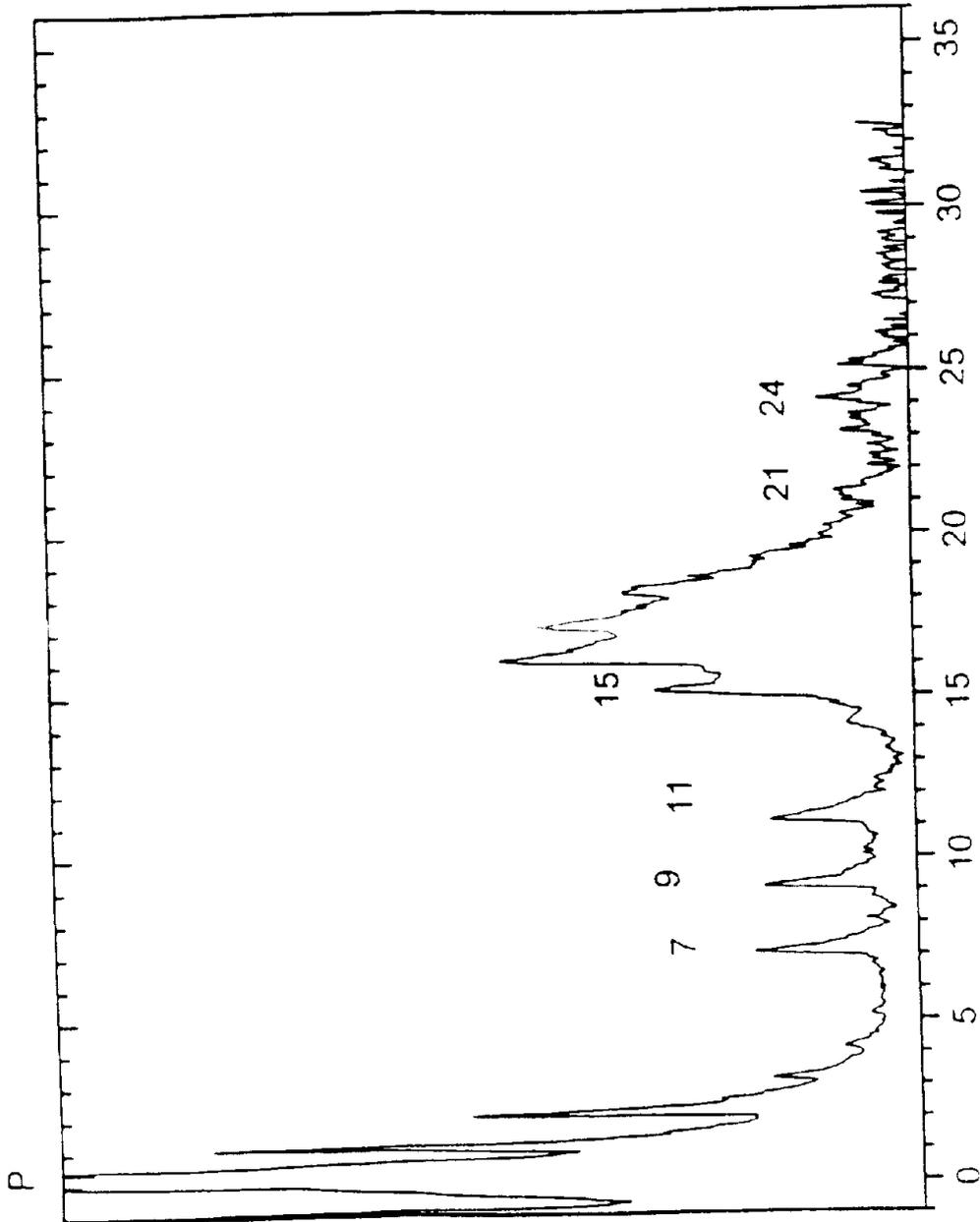


图 14 B

Base Past Primer



信号

Base Past Primer

图 15 A

1. 信号  
2. 信号  
3. 信号  
4. 信号  
5. 信号  
6. 信号  
7. 信号  
8. 信号  
9. 信号  
10. 信号  
11. 信号  
12. 信号  
13. 信号  
14. 信号  
15. 信号  
16. 信号  
17. 信号  
18. 信号  
19. 信号  
20. 信号  
21. 信号  
22. 信号  
23. 信号  
24. 信号  
25. 信号  
26. 信号  
27. 信号  
28. 信号  
29. 信号  
30. 信号  
31. 信号  
32. 信号  
33. 信号  
34. 信号  
35. 信号

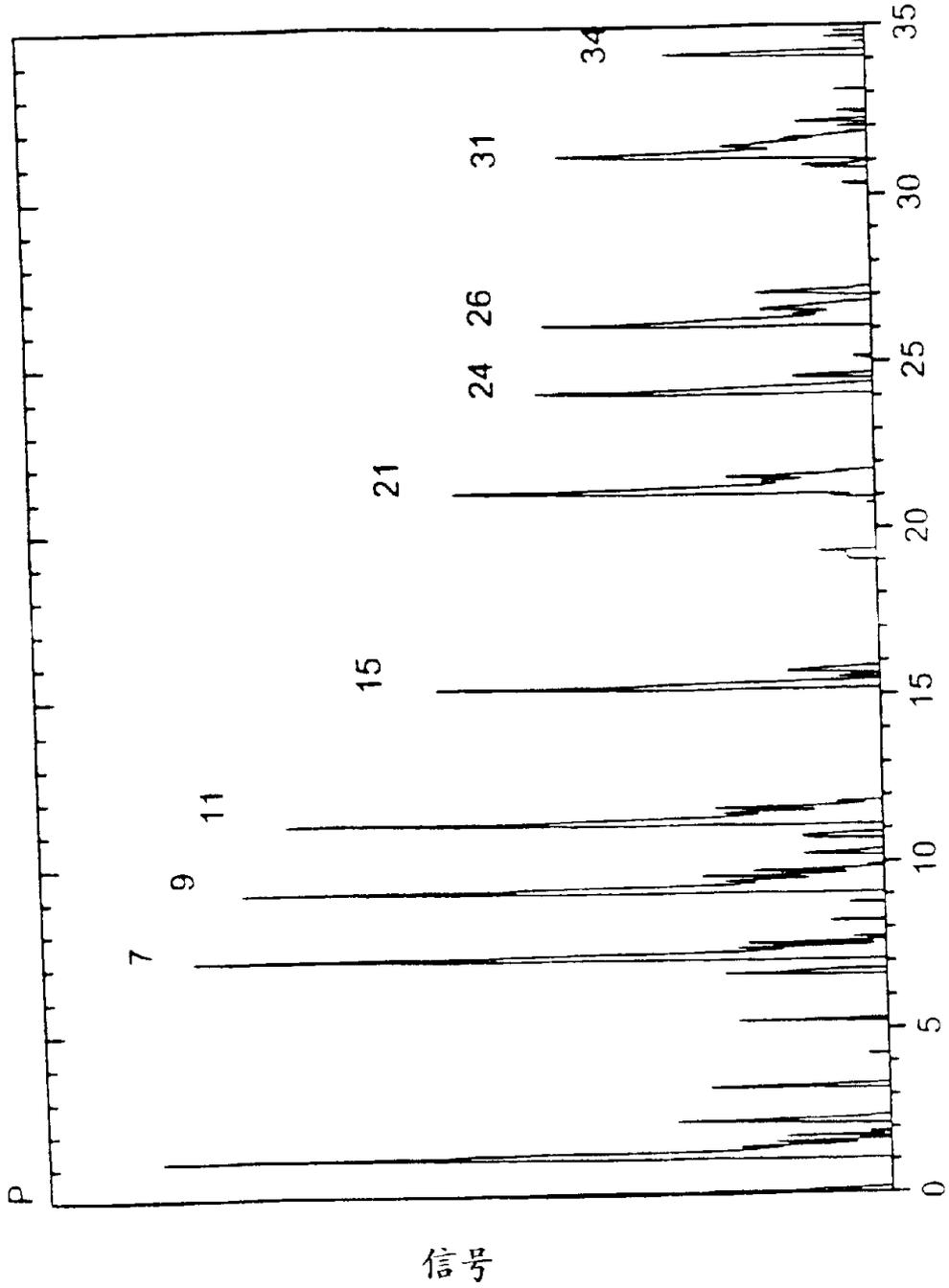


图 15 B Base Past Primer

信号

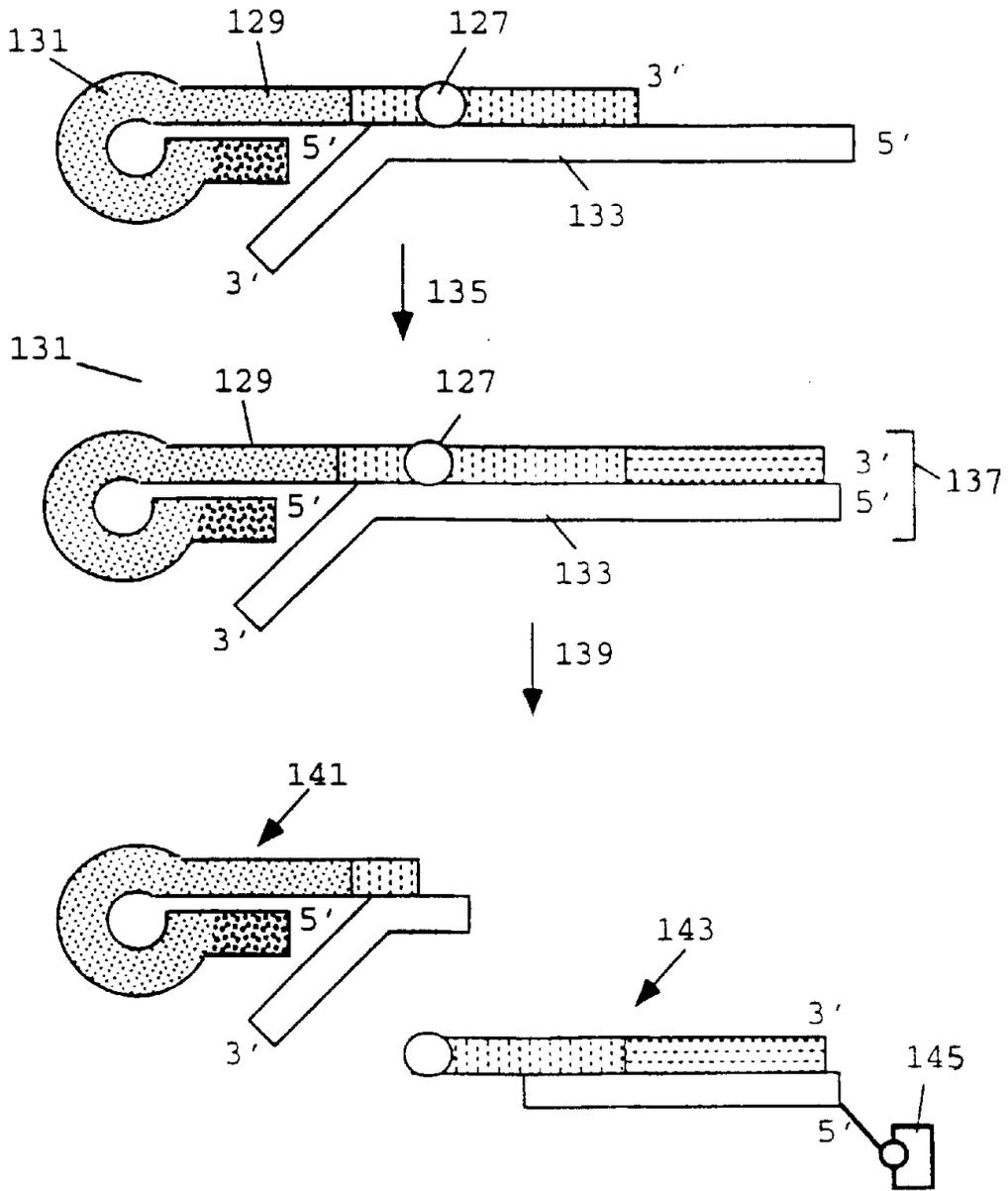


图 16