(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 6 月 6 日 (06.06.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/105421 A1

(51) 国际专利分类号:
C07H 19/073 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
C07H 19/173 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/118259

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 29 日 (29.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201711239701.0 2017年11月30日 (30.11.2017) CN

(71) 申请人: 深圳市瀚海基因生物科技有限公司(DIRECT GENOMICS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。

(72) 发明人: 刘斌(LIU, Bin); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。 赵陆洋(ZHAO, Luyang); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。 陈予想(CHEN, Yuxiang); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。 杨波(YANG, Bo); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。 简杰(JIAN, Jie); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。 陈方(CHEN, Fang); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。 颜钦(YAN, Qin); 中国广东省深圳市罗湖区清水河街道清水河一路116号深业进元大厦2座5楼、6楼, Guangdong 518000 (CN)。

(74) 代理人: 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) (TSINGYIHUA INTELLECTUAL PROPERTY LLC); 中国北京市海淀区清华园清华大学照澜院商业楼301室, Beijing 100084 (CN)。

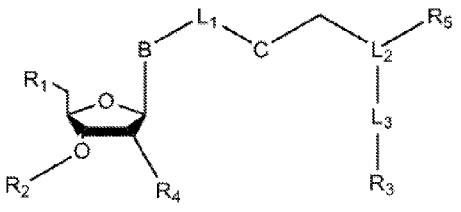
(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** NUCLEOSIDE ANALOGUE, PREPARATION METHOD AND APPLICATION

(54) **发明名称:** 核苷类似物、制备方法及应用



(I)

(57) **Abstract:** The present invention relates to a nucleoside analogue having the structure of the following formula, a method for preparing the nucleoside analogue, and an application of the nucleoside analogue in nucleic acid sequencing, etc.

(57) **摘要:** 涉及一种具有式(I)结构的核苷酸类似物，该核苷酸类似物的制备方法及其在核酸序列测定等方面的应用。

WO 2019/105421 A1

核苷类似物、制备方法及应用

优先权信息

本申请请求 2017 年 11 月 30 日向中国国家知识产权局提交的、专利申请号为 201711239701.0 的专利申请的优先权和权益，并且通过参照将其全文并入此处。

技术领域

本发明涉及化合物领域，具体地，本发明涉及核苷类似物、核苷类似物的制备方法和应用。

背景技术

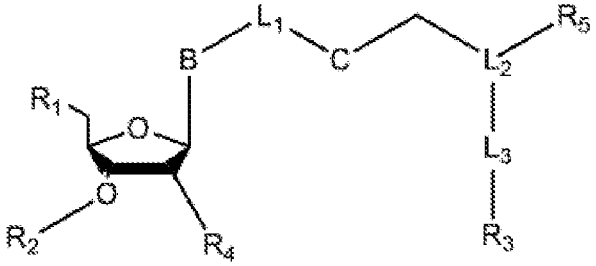
DNA 测序是一种生物研究和药物研究的基本手段。对核酸分子进行序列测定，可以采用边合成边测序（SBS）或者边连接边测序（SBL）等方式。

目前市面上的 SBS 核酸测序平台，包括二代和三代测序平台，多数利用 DNA 聚合酶、基于碱基互补配对原则将核苷酸类似物加到模板上（碱基延伸），检测核苷酸类似物结合上模板之后发出的信号或者带来的物理化学信号方面的改变，以实现核酸序列的测定。

获得具有稳定结构、稳定可检测信号、反应效率高以及能有效抑制下一个位置核苷酸结合到模板的核苷酸类似物，一直是待解决或有待改进的难题。

发明内容

在本发明的第一方面，提出了一种化合物，其具有式（I）所示结构式：



式（I），

其中，L_1、L_2、L_3 分别独立地为共价键或共价连接基团；B 为碱基或者碱基衍生物；R_1 为-OH 或者磷酸基团；R_2 为 H 或者可切割基团；R_3 为可检测基团或靶向基团；R_5 为聚合酶反应抑制基团；R_4 为 H 或-OR_6，其中 R_6 为 H 或可切割基团；C 为可切割基团或者可切割键。

试验测试发现，上述化合物（又可称为可逆终止基-可检测标记核苷酸或者核苷酸类似物），应用在测序过程中，在测序的每个循环（cycle）过程中，该核苷酸类似物通过酶的作用连接在新合成的链上（与模板链互补）的 3’端，与模板链的碱基配对，并且这些核苷酸类似物含有抑制基团或者相关结构，能够阻止下一个碱基、核苷酸或者核苷酸类似物连接上去，从而阻止了在一个 cycle 中的一次反应中同一模板链上发生多个碱基配对的情况，能有效地应用于核酸序列测定。该化合物适用于多种测序平台，例如包括但不限于用于 Illumina 公司的 HiSeq/MiSeq/NextSeq/ NovaSeq 平台，华大基因的 BGISEQ50/500，ThermoFisher 公司的 Ion Torrent 平台和 PacBio 公司的 Sequel 平台。

一般地，对于带有可检测基团/标记是荧光分子的化合物，应用该化合物进行碱基延伸和/或 PCR 和/或测序时，对于利用成像系统进行信号采集的测序平台，例如对延伸产物进行图像采集，荧光分子/延伸产物/模板-引物复合物在图像上表现为亮斑。任何影响荧光分子的发光行为的因素，直接影响该化合物的应用结果。

在设计上述化合物结构时，发明人发现，对于分子内淬灭即同一个 dNTP 分子里的碱基的还原电势对该分子中的荧光分子的发光行为产生的影响，化合物中的的碱基和荧光染料之间的距离越远，越不发生分子内淬灭；而对于分子间淬灭即一个 dNTP 分子中的荧光分子受别的 dNTP 分子、核酸链等的影响产生的淬灭，主要与 dNTP 分子自由度有关，该 dNTP 分子的自由度主要由该 dNTP 分子中的碱基和荧光分子之间的连接结构（linker）的刚柔性和长度决定，总体上，linker 越短刚性越强、自由度越小，分子间的淬灭越小。

发明人设计的上述结构的化合物，平衡考虑以及验证了分子内和分子间淬灭，特别适合用于边合成边测序平台。

在本发明的第二方面，提出了一种 dNTP 类似物。根据本发明的实施例，所称的 dNTP 类似物选自下列的至少之一：dATP 类似物，dATP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，B 为碱基 A；dCTP 类似物，dCTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，B 为碱基 C；dGTP 类似物，dGTP 类似

物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，B 为碱基 G；和 dTTP 类似物，dTTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，B 为碱基 T。

在一些示例中，该 dNTP 类似物包括 dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物中的一种、两种、三种或者全部四种。

在本发明的第三方面，提出了一种 NTP 类似物。根据本发明的实施例，该 NTP 类似物选自下列的至少之一：ATP 类似物，CTP 类似物，GTP 类似物，和 UTP 类似物，所称的 ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物和 UTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 U。

在一些示例中，该 NTP 类似物包括 ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物和 UTP 类似物中的一种、两种、三种或者全部四种。

在本发明的第四方面，提出了一种 dNTP 类似物混合物。根据本发明的实施例，该 dNTP 类似物混合物包括 dATP 类似物，dCTP 类似物，dGTP 类似物，和 dTTP 类似物，所称的 dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 T，并且所称的 dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物中的至少三种分别具有不同的可检测基团或者靶向基团。在本发明的第五方面，提出了一种 dNTP 类似物混合物。根据本发明的实施例，该 dNTP 类似物混合物，包括下述任意两种核苷酸类似物的组合：dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物，所称的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 T，其中，组合中两种核苷酸类似物具有不同的可检测基团或者靶向基团。

在本发明的第六方面，提出了一种 NTP 类似物混合物。根据本发明的实施例，该 NTP 类似物混合物包括 ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物为前面任一实施例中的化合物和 UTP 类似物，所称的 ATP、CTP、GTP 和 UTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 U，其中，组合中三种核苷酸类似物具有不同的可检测基团或者靶向基团。在本发明的第七方面，提出了一种 NTP 类似物混合物。根据本发明的实施例，该 NTP 类似物混合物包括下述任意两种核苷酸类似物的组合：ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物为前面任一实施例中的化合物和 UTP 类似物，所称的 ATP、CTP、GTP 和 UTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 U，其中，组合中两种核苷酸类似物具有不同的可检测基团。

在本发明的第八方面，提出了前面任一实施例中的 dNTP 类似物、NTP 类似物、dNTP 类似物混合物或者 NTP 类似物混合物在核酸测序或者可控聚合酶链式反应或者碱基延伸反应中的用途。

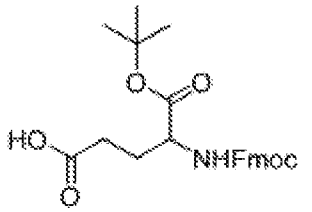
在本发明的第九方面，提出了一种用于核酸测序或者可控链式聚合酶反应的试剂盒。根据本发明的实施例，该试剂盒包括：前面任一实施例中的 dNTP 类似物、NTP 类似物、dNTP 类似物混合物或者前面的 NTP 类似物混合物。该试剂盒能够用于 DNA 和/或 RNA 核酸序列测定。

在本发明的第十方面，提出了一种测定核酸序列的方法。根据本发明的实施例，该方法包括：（a）将第一核酸模板-引物复合物、一种或多种核苷酸类似物以及 DNA 聚合酶的混合物置于适于碱基延伸的条件下，使核苷酸类似物结合到第一核酸模板-引物复合物上，获得延伸产物；核苷酸类似物选自前面任一实施例中的 dNTP 类似物、NTP 类似物、dNTP 类似物混合物或者 NTP 类似物混合物。该方法利用具有上述结构特点的核苷酸类似物，能够有效地将生化变化转化为稳定的光电信号并采集，实现核酸模板碱基序列的有效和准确测定。

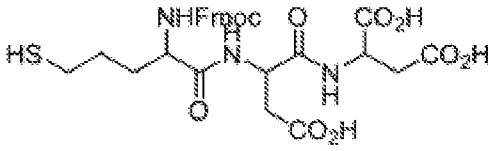
在本发明的第十一方面，提出了一种延伸引物的方法。根据本发明的实施例，该方法包括将聚合酶、核酸模板-引物复合物以及一种或多种核苷酸类似物置于反应容器内，使核苷酸类似物结合到核酸模板-引物复合物上，从而获得延伸产物；核苷酸类似物选自前面任一结构式如式（I）的化合物。该方法能准确、有效地延伸引物。

在本发明的第十二方面，提出了一种反应混合物。根据本发明的实施例，该反应混合物包含待测模板、与待测模板链的至少一部分配对的引物，DNA 聚合酶和前面任一实施例中的 dNTP 类似物、NTP 类似物、dNTP 类似物混合物或者 NTP 类似物混合物。

在本发明的第十三方面，提出了一种制备上述任一示例中结构式如式（I）的化合物的方法。根据本发明的实施例，包括：利用二硫二吡啶和巯基丙酸合成 SPDP；利用

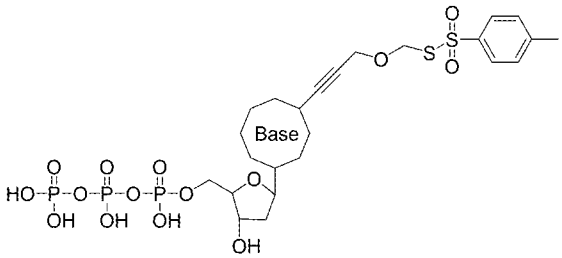


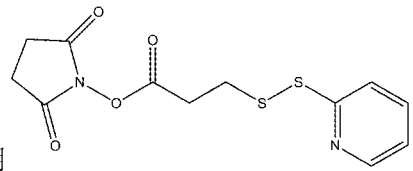
（10-2）



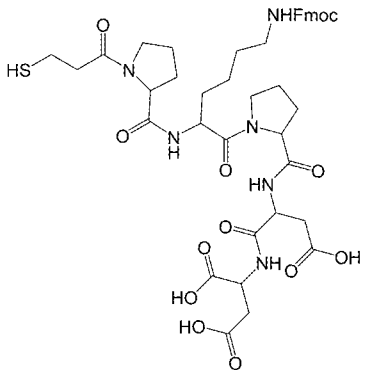
和氯代甲酸乙酯合成第一连接结构，第一连接结构为 （10-7）；连接 dNTP 和 SPDP，获得 dNTP-SPDP；利用所称的第一连接结构和 dNTP-SPDP，合成目标化合物。

在本发明的第十四方面，提出了一种制备前面任一示例中结构式如式（I）的化合物的方法。根据本发明的实施例，包括：合成 dNTP-MPSSK，dNTP-MPSSK 的结构如下所示：





（11-7）；利用 （31-4）



和六肽合成第二连接结构，第二连接结构为 （11-10），所称的六肽为 H-Pro-Lys(Fmoc)-Pro-Asp-Asp-OH；混合第二连接结构和 dNTP-MPSSK，以制得化合物。

附图说明

图 1 为本发明实施例的 SPDP 的核磁图谱；

图 2 为本发明实施例的延伸产物检测结果图；

图 3 为本发明实施例的延伸后产物检测结果图；

图 4 为本发明实施例的化合物应用在测序后得到读段的读长分布示意图；

图 5 为本发明实施例的两种荧光标记的核苷酸类似物进行测序验证获得的读段的读长分布示意图；

图 6 为本发明实施例的包含加帽步骤的核苷酸类似物应用于碱基延伸/测序的流程图；

图 7 为本发明实施例的无需加帽的带有虚拟阻断基团的核苷酸类似物配对的流程图；

图 8 为本发明实施例的无需加帽的带有虚拟阻断基团的核苷酸类似物配对的流程图；

图 9 为本发明实施例的虚拟阻断的碱基靶向配对的流程图；

图 10 为本发明实施例的双色虚拟阻断的核苷酸类似物应用于 SBS 测序的流程图；

图 11 为本发明实施例的双色虚拟阻断 Capless 核苷酸类似物应用于 SBS 测序的流程图；

图 12 为本发明实施例的双色测序方法流程图；

图 13 为本发明实施例的四色测序方法流程图。

具体实施方式

下面详细描述本发明的实施例，所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

实施例中的试剂、检测仪器等，如无特殊说明，本领域技术人员可自己配制、制备或者通过市售途径获取。

本文中，除非另有说明，“Base”和“B”等同，都指碱基，碱基包括 A、T、C、G、U 及其衍生物。

所称的“可控链式聚合酶反应”指可以控制使反应连续进行或不连续进行的聚合酶链式反应，例如基于边合成测序原理的核酸序列测定反应。

除非另外说明，本文所使用的所有科技术语为与所属领域技术人员的通常理解相同的含义。涉及的所有专利和公开出版物通过引用方式整体并入本申请。在所结合的科技文献、专利文献和类似材料的一

篇或多篇与本申请不同或相矛盾的情况下（包括但不限于所定义的术语、术语应用、所描述的技术等），以本申请为准。

除非另外说明，应当应用本文所使用得下列定义。化学元素与元素周期表CAS版，和《化学和物理手册》，第75版，1994一致。此外，有机化学一般原理可参考"Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, 和"March's Advanced Organic Chemistry" by Michael B. Smith and Jerry March, John Wiley & Sons, New York: 2007中的描述，其全部内容通过引用并入本文。

除非另有说明或者上下文中有明显的冲突，本文所使用的冠词"一"、"一个（种）"和"所述"旨在包括"至少一个"或"一个或多个"。

所称"任选取代的"与"取代或非取代的"可以交换使用。一般而言，术语"取代的"表示所给结构中的一个或多个氢原子被具体取代基所取代。除非其他方面表明，一个任选的取代基团可以在基团各个可取代的位置进行取代。当所给出的结构式中不只一个位置能被选自具体基团的一个或多个取代基所取代，那么取代基可以相同或不同地在各个位置取代。

本文中，所采用的描述方式"各…独立地为"与"…各自独立地为"和"…独立地为"可以互换，均应做广义理解，其既可以是指在不同基团中，相同符号之间所表达的具体选项之间互相不影响，也可以表示在相同的基团中，相同符号之间所表达的具体选项之间互相不影响。

本文中，说明化合物的取代基时按照基团种类和/或范围进行表述。包括这些基团种类和范围的各个成员的每一个独立的次级组合。例如，术语"C_{1-6}烷基"特别指独立公开的甲基、乙基、C_3烷基、C_4烷基、C_5烷基和C_6烷基。

本文中的连接取代基。当该结构清楚地需要连接基团时，针对该基团所列举的马库什变量应理解为连接基团。例如，如果该结构需要连接基团并且针对该变量的马库什基团定义列举了"烷基"或"芳基"，则应该理解，该"烷基"或"芳基"分别代表连接的亚烷基基团或亚芳基基团。

本文使用的术语"烷基"或"烷基基团"，表示含有 1 至 20 个碳原子，饱和的直链或支链一价烃基基团，其中，所述烷基基团可以任选地被一个或多个本发明描述的取代基所取代。除非另外详细说明，烷基基团含有 1-20 个碳原子。在一实施方案中，烷基基团含有 1-12 个碳原子；在另一实施方案中，烷基基团含有 1-6 个碳原子；在又一实施方案中，烷基基团含有 1-4 个碳原子；还在一实施方案中，烷基基团含有 1-3 个碳原子。

术语"烷基"其本身或做为取代基的一部分是指（除特别说明）一条直的 C 链，或带有支链的 C 链，其可以是完全饱和，也可以是单或多个不饱和的键并且包括指定碳的一价，二价和多价基团，在这里，烷指不饱和碳链，饱和基团是指，但不限于，甲基，乙基，正丙基，异丙基，正丁基，叔丁基，异丁基，（环已基）甲基，正戊基或其同分异构体，正已基或其同分异构体，正庚基或其同分异构体，正辛基或其同分异构体，在这里不饱和基团是指，但不限于，乙烯基，2-丙烯基，巴豆基，2-异戊烯基，2-（丁二烯基），2,3-戊二烯基，3-（1,4-戊二烯基），戊基，1-丙炔基，3-丙炔基。

术语"烷基烯"其本身或作为取代基是从烷基和饱和烷基衍生基团，其指的是，但不限于，1 到 24 个碳原子（如-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-)碳链的不饱和烷基衍生物，优先 1 到 10 个碳原子的碳链。

术语"杂烷基"其本身或作为取代基一部分是指一条直链或者带有支链的链，并且其至少包含 1 个碳原子和一个杂原子（如：O，N，P，Si 与 S），在这里优选 N 与 S。在这里，杂烷基不是一个环状基团。实例包括，但不限于，-CH_2-CH_2-O-CH_3, -CH_2-CH_2-NH-CH_3, -CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3, -CH_2-S-CH_2-CH_3, -S(O)-CH_3, -CH_2-CH_2-S(O)-CH_3,-CH=CH-N(CH_3),-O-CH_3,-O-CH_2-CH_3与-CN。对于含有 2 个杂原子的结构，其实例包含，-CH_2-NH-OCH_3,-CH_3-O-Si(CH_3)$_3$。在这里杂烷也包含三键或双键基团。

术语"杂烷基烯"其本身或作为取代基一部分是从烷基和饱和烷基的衍生基团。其实例包含但不限-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-与-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-链的不饱和衍生物，对于杂烷烯，杂原子可以占据链末端中的一个或两个（如，亚烷基氧基，亚烷基二氧基，亚完基氨基，亚烷基二氨基）。

术语"环烷基"和"环杂烷基"其本身或作为取代基一部分，其是烷基和杂烷基的环状形式，这里指的不是芳香基，对于环烷基实例包含但不限于环丙基，环丁基，环戊基，环己基，1-环己烯基，3-环已烯基，环庚基；对于环杂烷基实例包含但不限于 1-（1，2，5，6-四氢吡啶基），1-哌啶基，2-哌啶基，3-哌啶基，4-吗啉基，3-吗啉基，2-四氢呋喃基，3-四氢呋喃基等。

术语"酰基"是指-C(O)R,其中 R 是取代基，可能是烷基，环烷基，杂烷基等。

术语"芳香基"是不饱和的基，芳香基等，术语"芳杂环基"是指杂环中含有一个杂原子（如：O，N，P，Si 与 S）。对于芳香杂烷基，实例包含但不限于苯基，萘基，咪唑基，嘧啶基等。

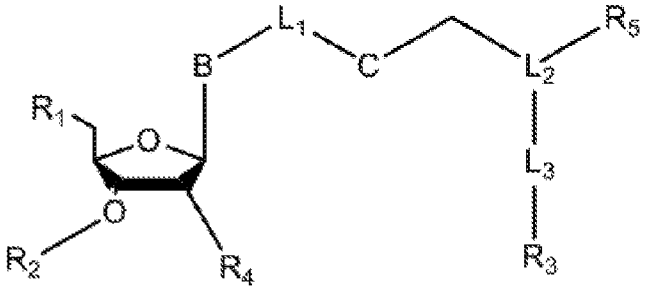
术语"可检测标记"或"可检测基团"是指能特异性释放信号或特异性识别的基团（如荧光染料，可检测染料）。在有些实例中，a）四种染料，ROX，Alexa532，Cy5，IF700 分别标记 A，T，G，C；b)一种染料 Cy5 标记 A，T，C，G，然后根据加料时间不同，实现 A，T，G，C 的区分。

对于术语“聚合酶”是指能使 DNA 聚合反应发生的任何天然的或非天然的酶或催化剂。在一些实例中，聚合酶是 9 °NN 聚合酶或者它的变种，E.Coli DNA 聚合酶 I，Bacteriophage T4 DNA 聚合酶，Sequenas 酶，Taq DNA 聚合酶，Bacillus stearothermophilus DNA 聚合酶，Bst 2.0 DNA 聚合酶， phi29 DNA 聚合酶， T7 DNA 聚合酶。

对于术语“核苷酸”或“核苷酸类似物”是指核苷-5'-聚磷酸化合物，或其相关类似物，核苷酸的碱基包含 A，T，G，C，U 或其类似物，其含的磷酸个数为 2，3，4，5，6，7，8 或更多个磷酸。核苷酸可能在碱基位置和/或磷酸位置被改性。对于测序方法，在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基 3'端的抑制基团且带荧光标记，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，A，T，G，C 四种荧光碱基带一种荧光基团 ATTO647N, 分四次加入。

化合物、化合物组合

在一些实施例中，提出了一种化合物，其具有式（I）所示结构式：



式（I），其中，L_1、L_2、L_3 分别独立地为共价键或共价连接基团；B 为碱基或者碱基衍生物；R_1 为-OH 或者磷酸基团；R_2 为 H 或者可切割基团；R_3 为可检测基团或靶向基团；R_5 为聚合酶反应抑制基团；R_4 为 H 或-OR_6，其中 R_6 为 H 或可切割基团；C 为可切割基团或者可切割键。

所称的“靶向基团”包括能够与特定的基团或化合物发生反应的基团/结构/化合物，进而能够提供可检测信号，发生反应包括通过偶联、特异性结合和/或点击化学反应等。例如为生物素基，可以与带有链霉亲和素（链霉素，SA）的可检测基团结合，例如为叠氮，可以与带有 DBCO 的可检测基团例如 DBCO-荧光染料发生点击化学反应，进而可以为特定位置的反应是否实现提供可检测信号，例如核酸序列测定反应。

试验测试发现，上述化合物（又可称为可逆终止基-可检测标记核苷酸或者核苷酸类似物），应用在测序过程中，在测序的每个循环（cycle）过程中，该核苷酸类似物通过酶的作用连接在新合成的链上（与模板链互补）的 3’端，与模板链的碱基配对，并且这些核苷酸类似物含有抑制基团或者相关结构，能够阻止下一个碱基、核苷酸或者核苷酸类似物连接上去，从而阻止了在一个 cycle 中的一次反应中同一模板链上发生多个碱基配对的情况，能有效地应用于核酸序列测定。

上述核苷酸类似物（即式（I）所示化合物）适用于多种测序平台，例如包括但不限于用于 Illumina 公司的 HiSeq/MiSeq/NextSeq/ NovaSeq 平台，华大基因的 BGISEQ50/500，ThermoFisher 公司的 Ion Torrent 平台和 PacBio 公司的 Sequel 平台。

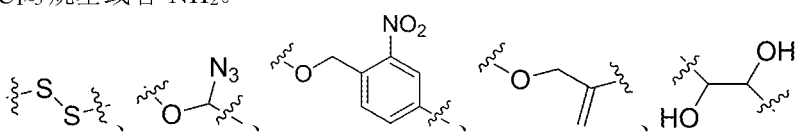
根据本发明的实施例，所称的磷酸基团为单磷酸基团、双磷酸基团、三磷酸基团或多聚磷酸基团。

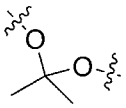
根据本发明的实施例，B 为胞嘧啶或其衍生物、胸腺嘧啶或其衍生物、腺嘌呤或其衍生物、鸟嘌呤或其衍生物、次黄嘌呤或其衍生物、脱氮腺嘌呤或其衍生物、脱氮鸟嘌呤或其衍生物、脱氮次黄嘌呤或其衍生物、7-甲基鸟嘌呤或其衍生物、5，6-二氢尿嘧啶或其衍生物、5-甲基胞嘧啶或其衍生物或 5-羟甲基胞嘧啶或其衍生物。

根据本发明的实施例，B 为二价胞嘧啶或其衍生物、二价鸟嘧啶及其衍生物、二甲腺嘧啶或其衍生物、二价胸腺嘧啶或其衍生物、二价尿嘧啶或其衍生物、二价次黄嘌呤或其衍生物、二价黄嘌呤或其衍生物、二价脱氮腺嘌呤或其衍生物、二价脱氮鸟嘌呤或其衍生物、二价脱氮次黄嘌呤或其衍生物、二价 7-甲基鸟嘌呤或其衍生物、二价 5，6-二氢尿嘧啶或其衍生物、二价 5-甲基胞嘧啶或者衍生物或二价 5-羟甲基胞嘧啶或其衍生物。

根据本发明的实施例，R_6 为 H、任选取代的烷基或胺基。

根据本发明的实施例，R_6 为 H、$C_{1\sim5}$ 烷基或者-NH_2。

根据本发明的实施例，R_2 选自 H、

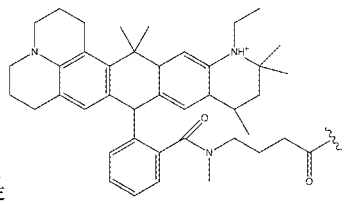
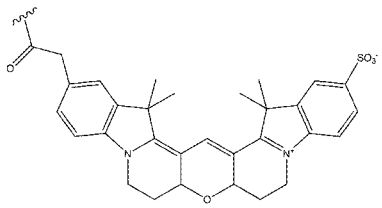
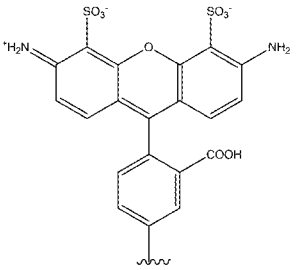
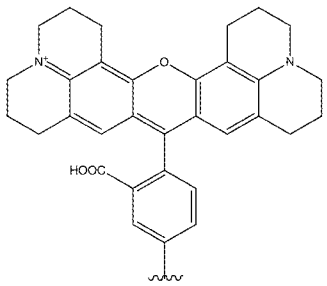
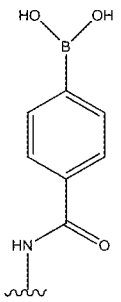
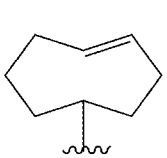
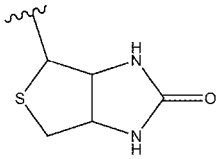
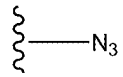
和  中的至少之一。

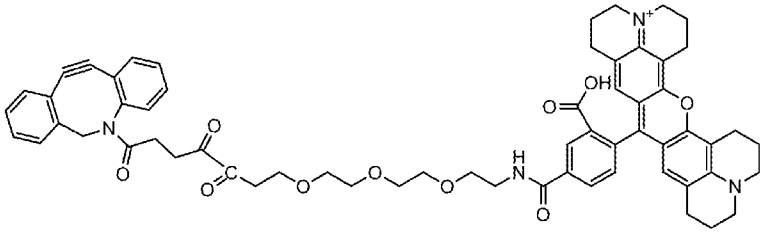
“可检测基团”包括但不限于 Cy2 基团，Cy3 基团，Cy5 基团，Cy7 基团，Hoechst33258 基团，Hoechst33342 基团，Hoechst34580 基团，PO-PRO-1 基团，PO-PRO-1-DNA 基团,POPO-1 基团,DAPI-DNA 基团，DAPI 基团，SYTO 45-DNA 基团，Alexa Fluor@350 基团，Alexa Fluor@450 基团，Alexa Fluor@430 基团，Alexa Fluor@488 基团，Alexa Fluor@532 基团，Alexa Fluor@546 基团，Alexa Fluor@555 基团，Alexa Fluor@568 基团，Alexa Fluor@594 基团，Alexa Fluor@610 基团，Alexa Fluor@633 基团，Alexa Fluor@635 基团，Alexa Fluor@635 基团，Alexa Fluor@647 基团，Alexa Fluor@660 基团，Alexa Fluor@680 基团，Alexa Fluor@700 基团，Alexa Fluor@750 基团，Alexa Fluor@790 基团，APC,APC-Seta-750,AsRed2,ATTO390,ATTO425,ATTO430LS,ATTO465,ATTO488,ATTO490LS,ATTO495,ATTO514,ATTO520，ATTO532, ATTO550, ATTO565，ATTO590，ATTO594，ATTO645,ATTO680 的荧光基团。

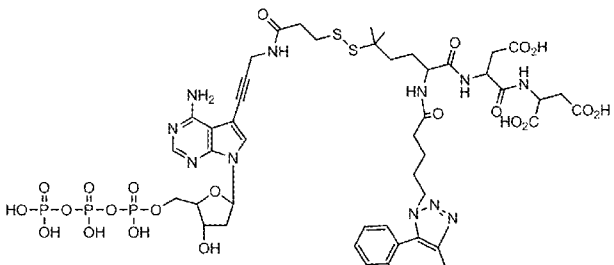
在一些实例中，R_3 是可检测基团，在一些实例中，R_3 是荧光染料。在一些实例中，R3 是靶向基团，在一些实例中 R3 是点击化学反应基团，在一些实例中 R_3 是叠氮基，在一些实例中 R3 是生物素基。

在一些实例中，R_3 是荧光染料，在一些实例中，R3 是 Alexa Fluor@350 基团，Alexa Fluor@450 基团，Alexa Fluor@430 基团，Alexa Fluor@488 基团，Alexa Fluor@532 基团，Alexa Fluor@546 基团，Alexa Fluor@555 基团，Alexa Fluor@568 基团，Alexa Fluor@594 基团，Alexa Fluor@610 基团，Alexa Fluor@633 基团，Alexa Fluor@635 基团，Alexa Fluor@635 基团，Alexa Fluor@647 基团，Alexa Fluor@660 基团，Alexa Fluor@680 基团，Alexa Fluor@700 基团，Alexa Fluor@750 基团，Alexa Fluor@790 基团。

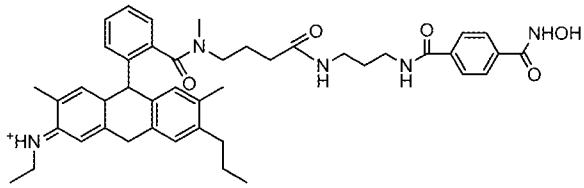
在一些实例中，R_3 是 FAMTM 基团，TETTM 基团，JOETM 基团，VICTM 基团，HEXTM 基团，NEDTM 基团，PET 基团，ROXTM 基团，TAMRATM 基团，TETTM 基团，Texas Red 基团，Rhodamine 6G（R6G)基团，Cy5 基团。

在一些实例中，R_3 是 、、、、（该式中的 B 为硼元素）、、、。

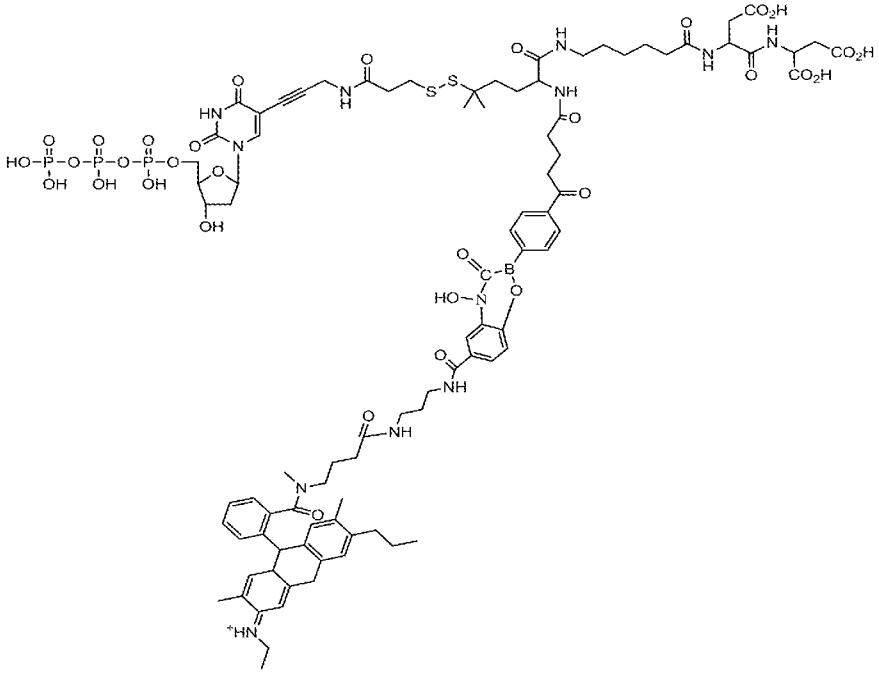
以下示例可以或者容易与靶向基团结合（偶联或特异性结合）的可检测基团或化合物。ROX 标记的 Dibenzocyclooctyne （DBCO）（ROX-DBCO 或者 DBCO-ROX）、ROX-DBCO 与带靶向基团为叠氮的



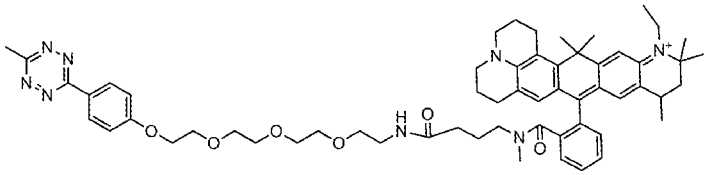
dATP 类似物结合后的结构 、ATTO Rho6G 标记的 SHA（ATTO Rho6G-SHA 或者 SHA-ATTO Rho6G）



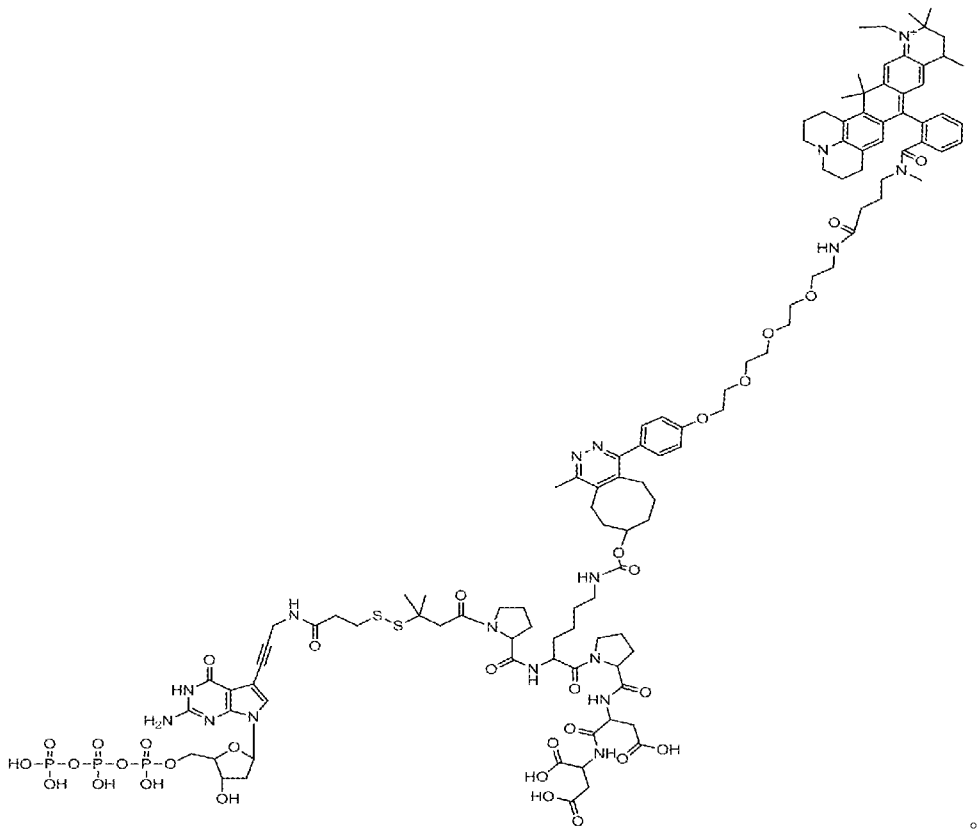
、ATTO Rho6G-SHA 与 dTTP 类似物结合后的结构



、ATTO647N 标记的四嗪



（ATTO647N-四嗪或者四嗪-ATTO647N）、ATTO647N-四嗪与 dGTP 类似物结合后的结构：



在一些实例中，R_3是 ATTO390 基团，ATTO425 基团，ATTO430LS 基团, ATTO465 基团，ATTO 488 基团, ATTO490LS 基团,ATTO495 基团， ATTO514 基团,ATTO520 基团,ATTO532 基团,ATTO550 基团,ATTO565 基团,ATTO590 基团， ATTO594 基团,ATTO610 基团,ATTO620 基团,ATTO633 基团,ATTO635 基团,ATTO647 基团,ATTO647 基团,ATTO647N 基团,ATTO655 基团,ATTO665 基团,ATTO700 基团,ATTO725 基团,ATTO740 基团,ATTO680 基团,ATTOOxa12 基团,ATTORho3B 基团,ATTO Rho6G 基团,ATTO Rho11 基团,ATTO Rho12 基团,ATTO Rho13 基团,ATTO Rho14 基团,ATTO Rho101 基团,ATTO Thio12 基团。

在一些实例中，R_3是 BO-PRO-1 基团,BO-PRO-3 基团,BOBO-1 基团,BOBO-3 基团,BODIPY630 650-X 基团, BODIPY650/665-X 基团,BODIPY FL 基团,BODIPYR6G 基团,BODIPY TMR-X 基团,BODIPY TR-X 基团,BODIPY TR-X pH7.0 基团,BODIPYTR-X-phallacidin 基团,BODIPY-DiMe 基团,BODIPY-Phenyl 基团,BODIPY-TMSCC 基团,C3-Indocyanine 基团,C3-Oxacyanine 基团,C3-Thiacyanine-Dye(EtOH) 基团,C3-Thiacyanine-Dye(PrOH) 基团,C5-Indocyanine 基团,C5-Oxacyanine 基团,C5-Thiacyanine 基团,C7-Indocyanine 基团,C7-Oxacyanine 基团,C454T,C-Phycyanin 基团,Calcein 基团,Calcein-red-orang 基团, Calcium-Crimson 基团, Calcium Green-1 基团, Calcium Orange 基团。

在一些实例中，R_3是 CF450M 基团,CF405S 基团,CF488A 基团,CF543 基团,CF555 基团,CFP,基团 CFSE 基团,CF350 基团,CF485 基团,Chlorophyll-A 基团,Chlorophyll-B 基团,Chromeo488 基团,Chromeo494 基团,Chromeo505 基团,Chromeo546 基团,Chromeo642 基团,Cryptolight CF1 基团,Cryptolight CF2 基团,Cryptolight CF3 基团,Cryptolight CF4 基团,Cryptolight CF5 基团,Cryptolight CF6 基团, Crystal Violet 基团, Cumarin153 基团,Cy2 基团,Cy3 基团,Cy3.5 基团,Cy3B 基团,Cy5ET 基团,Cy5 基团,Cy5.5 基团，Cy7 基团,DAPI 基团。

在一些实例中，R_3是 DsRed-Express 基团,DsRed-Express2 基团,DsRed-Express T1 基团,DY350XL 基团,DY-480 基团,DY-480XL Megastokes 基团,DY485 基团,DY485XL Megastokes 基团,DY490 基团,DY490XL Megastokes 基团,DY-500 基团,DY-500XLMegastokes 基团,DY-520 基团,DY520 Megastokes 基团,DY-547 基团,DY549P1 基团,DY-554 基团,DY-555 基团,DY-557 基团,DY-590 基团,DY-615 基团,DY-630 基团,DY-631 基团,DY-633 基团,DY-635 基团,DY-636 基团,DY-647 基团,DY-649P1 基团,DY-650 基团,DY651 基团,DY-656 基团,DY-673 基团,DY-675 基团,DY-676 基团,DY-680 基团,DY-681 基团,DY-700 基团,DY-701 基团,DY-730 基团,DY-731 基团,DY-750 基团,DY-751 基团,DY-776 基团,DY-782 基团,Dye-28 基团,Dye-33 基团,Dye-45 基团,Dye-304 基团,Dye-1041 基团。

在一些实例中，R_3是 Dylight488 基团，Dylight594 基团，Dylight633 基团，Dylight649 基团，Dylight680

基团，Hilyte Fluor488 基团，Hilyte Fluor555 基团，Hilyte Fluor647 基团，Hilyte Fluor680 基团，Hilyte Fluor750 基团，HiLyte Plus555 基团，HiLyte Plus647 基团，HiLyte Plus750 基团，Hoechst33258 基团，Hoechst33342 基团。

在一些实例中，R_3 是 PromoFluor-350 基团，PromoFluor-405 基团，PromoFluor-415 基团，PromoFluor-488 基团，PromoFluor-488 Premium 基团，PromoFluor-488LS 基团，PromoFluor-500LSS 基团，PromoFluor-505 基团，PromoFluor-555 基团，PromoFluor-590 基团，PromoFluor-510LSS 基团，PromoFluor-514LSS 基团，PromoFluor-520LSS 基团，PromoFluor-532 基团，PromoFluor-546 基团，PromoFluor-610 基团，PromoFluor-633 基团，PromoFluor-647 基团，PromoFluor-670 基团，PromoFluor-680 基团，PromoFluor-700 基团，PromoFluor-750 基团，PromoFluor-770 基团，PromoFluor-780 基团，PromoFluor-840 基团。

在一些实例中，R_3 是 QD525 基团，QD565 基团，QD585 基团，QD605 基团，QD655 基团，QD705 基团，QD800 基团，QD903 基团，QDpbS950 基团，QDot525 基团，QDot545 基团，QDot565 基团，QDot585 基团，QDot605 基团，QDot625 基团，QDot655 基团，QDot705 基团，QDot800 基团，QpyMe2 基团，QSY7 基团，QSY9 基团，QSY21 基团，QSY35 基团，Rhodamine700 perchlorate 基团，Rhodamine 基团，Rhodamine6G 基团，Rhodamine101 基团，Rhodamine123 基团，RhodamineB 基团，RhodamineGreen 基团，Rhodamine pH-Probe585-7.0 基团，Rhodamine pH-Probe585-7.5 基团，Rhodamine phalloidin 基团，Rhodamine Red-X 基团，Rhodamine Tag pH-Probe 585-7.0 基团。

在一些实例中，R_3 是 SYBR Green 基团，SYPRO Ruby 基团，SYTO9 基团，SYTO11 基团，SYTO13 基团，SYTO16 基团，SYTO17 基团，SYTO45 基团，SYTO59 基团，SYTO60 基团，SYTO61 基团，SYTO62 基团，SYTO82 基团，SYTORNASelect 基团，SYTOX Blue 基团，SYTOX Green 基团，SYTOX Orange 基团，SYTOX Red 基团，Texas red 基团，Texas redDHPE 基团，Texas red-X 基团。

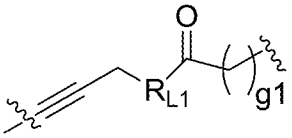
在一些实施例中，L_1 是 L_1^A-L_1^B-L_1^C-L_1^D-L_1^E，其中 L_1^A，L_1^B，L_1^C，L_1^D，L_1^E 是独立的一个键，或取代或非取代的烷基烯，或取代或非取代杂烷基烯，或取代或非取代环烷基烯，或取代或非取代异环烷基烯，或取代或非取代芳基烯，总之，在这里 L_1^A，L_1^B，L_1^C，L_1^D，L_1^E，至少有一个不是一个键。或 L_1 是 L_1^A-L_1^B-L_1^C-L_1^D-L_1^E

其中 L_1^A，L_1^B，L_1^C，L_1^D，L_1^E 是一个独立的键，或取代或非取代 C_{1-8} 烷基烯，或取代或非取代 2 到 8 元杂烷基烯，或取代或非取代 C_{3-8} 环烷基烯，或取代或非取代 3 到 8 元异环烷基烯，或取代或非取代 C_{6-8} 芳基烯。总之，在这里 L_1^A，L_1^B，L_1^C，L_1^D，L_1^E，至少有一个不是一个键。

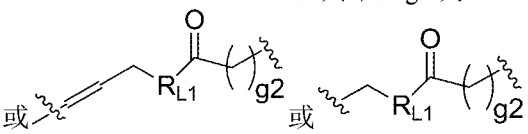
在一些实施例中，L_2 是 L_2^A-L_2^B-L_2^C-L_2^D，其中 L_2^A，L_2^B，L_2^C，L_2^D 是一个独立的键，或取代或非取代的烷基，或取代或非取代杂烷基烯，或取代或非取代环烷基，或取代或非取代异环烷基，或取代或非取代芳基，总之，在这里 L_2^A，L_2^B，L_2^C，L_2^D，至少有一个不是一个键。

在一些实施例中，L_3 是 L_3^A-L_3^B-L_3^C-L_3^D 或 $L_3^AL_3^BL_3^CL_3^D$，其中 L_3^A，L_3^B，L_3^C，L_3^D 是一个独立的键，或取代或非取代的烷基，或取代或非取代杂烷基烯，或取代或非取代环烷基，或取代或非取代异环烷基，或取代或非取代芳基，总之，在这里 L_3^A，L_3^B，L_3^C，L_3^D，至少有一个不是一个键。

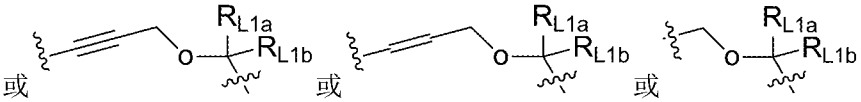
在一些实施例中，L_1 可选择如下结构：



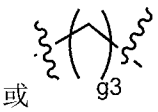
，其中，g1 为 0~10 之间的整数，R_{L1} 为 NH 或 O；g1 优选 1，4。



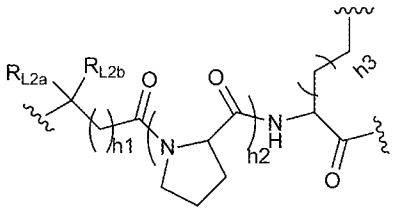
或 或，其中 g2 为 0,1,2,3,4 或 5，R_{L1} 为 NH 或 O；g2 优选 1，4。

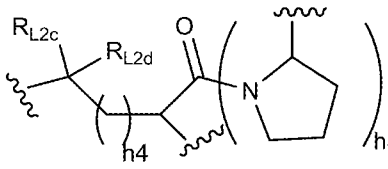
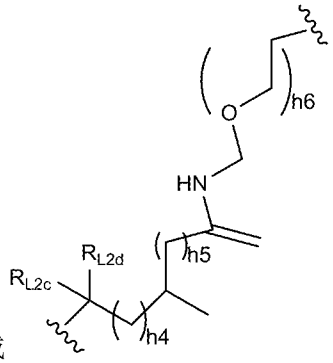


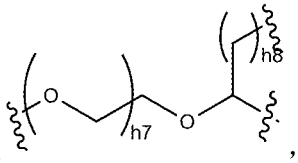
或 或 或 ，其中，R_{L1a}，R_{L1b} 分别独立为 H、-CH3、-CX3、-CHX2、-CH2X、-CN、-Ph、C_{1-6} 烷基、2 到 6 元烷基或 3 到 6 环烷基，其中 X 为 Cl，Br，I。



或 其中，g3 为 0，1，2，3，4，优先 1，2。

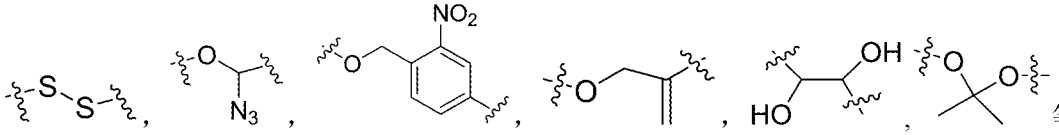
在一些实施例中，L_2 可以选择但不限于的结构如下：，其中 R_{L2a}、R_{L2b} 分别独立地为 H、C_{1-5} 烷基链、3-6 元环烷基或苯基，优选 H，甲基、乙基、5-6 元环烷基或苯基；其中 h1、h2、h3 分别独立地为 0-6 之间的整数，优选为 0、1 或 2；

或或，其中 R_{L2c}、R_{L2d} 分别独立地为 H 或 C_{1-6} 烷基链，h4、h5、h6 分别独立地为 0，1，2，3，4，5 或 6，其中 h4 优选为 0、1 或 2，h5 优选为 5 或 6，h6 优选为 4、5 或 6。

或，其中，h7、h8 分别独立地为 1、2、3、4、5 或 6，优选 1、2 或 3。

术语“切除键”或切除基团是指这个键或基团能分解（分离，水解，稳定的键断裂）长单独的一价或二价键。造成切除键或切除基团可能是由于各种外部刺激（如，酶，亲核试剂，还原试剂，光照射，氧试剂，酸试剂等的刺激），通常在这些刺激元素（如 TCEP,THPP,激光照射，Pd（0）等）的存在下，切除键或切除基团发生断裂。

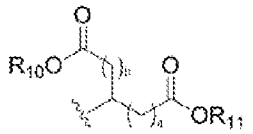
在一些实施例中，所称的可切割基团或可切割键可以选择如下：

等。

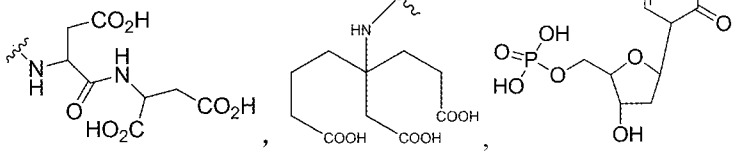
术语“光切除键”或“光切除基团”(例如，邻硝基苄基）能在光照刺激的条件下，发生连接键断裂。

术语“抑制基团” （inhibition）是指能虚拟阻断碱基 3'端的基团或者共价键，如通过分子的空间位阻和/或电荷的作用等阻断碱基 3'端，例如在一定的条件下，inhibition 与锰离子作用，使得没有游离的锰离子作用在聚合配对的过程中。

“抑制基团”包括但不限于一个带电荷的基团（如，带一个正电荷基团，一个带负电荷基团，或者一个同时带正负电荷基团）。或者包括 2 个或者多个带电荷的基团带电荷的基团可以从下面基团中选择，



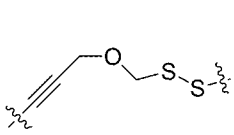
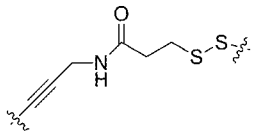
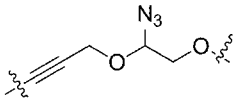
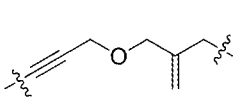
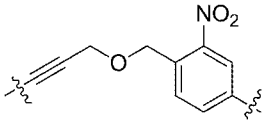
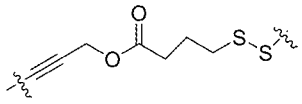
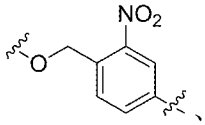
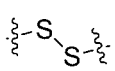
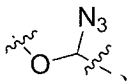
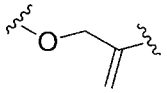
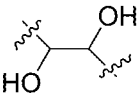
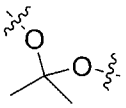
-COOH，$-PO_4$，$-SO_4$, $-SO_3$,$-SO_2$。其中优先以下结构，其中，各 R_{10} 与和 R_{11} 分别独立地为 H 或者 C_{1-6} 烷基，各 a,和 b 分别独立地的为 0 或者 1-5 的整数，各 a 和 b 分别独立地为 1 或 2。

在一些应用实例中，R_5 是。

根据本发明的实施例，C 为含有选自下列至少之一的基团：任选取代的乙炔基、任选取代的二硫键、任选取代的酰胺烷基、任选取代的芳基、任选取代的烷氧基、任选取代的叠氮基、任选取代的直链或支

链烷基。

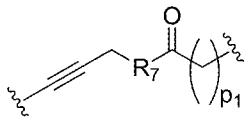
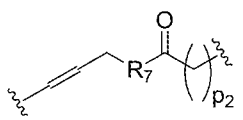
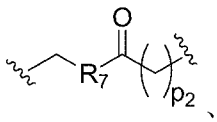
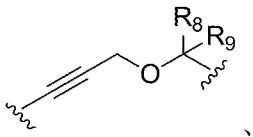
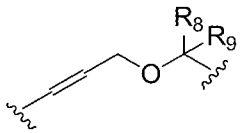
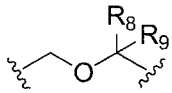
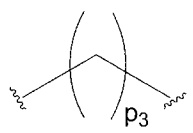
根据本发明的实施例，C 为含有选自下列至少之一的基团：任选被羟基取代的乙炔基、二硫键、酰胺基团、亚烷氧基、芳基、叠氮基团、直链或者支链亚烷基。

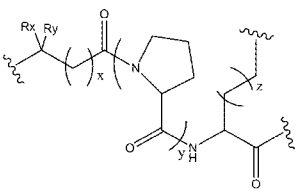
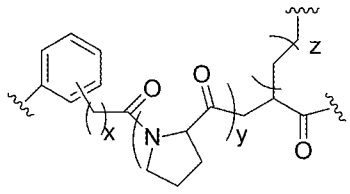
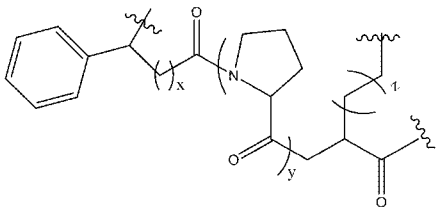
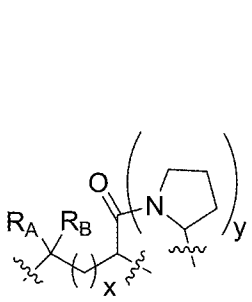
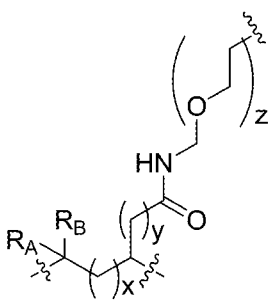
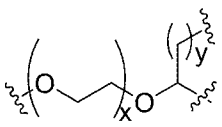
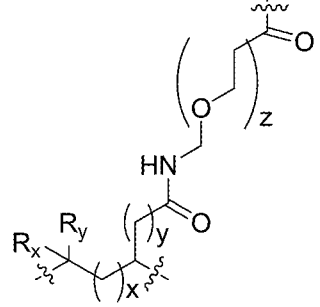
根据本发明的实施例，C 选自下列至少之一：、、、、、、、、、、和。

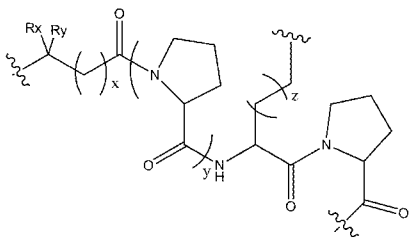
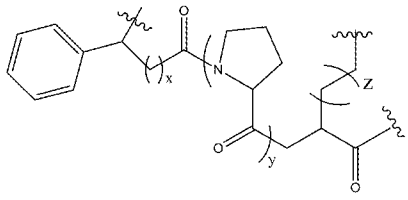
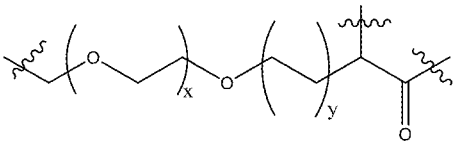
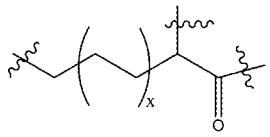
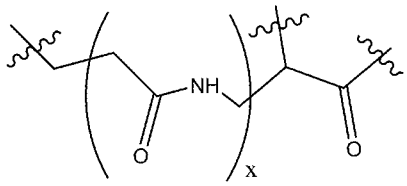
根据本发明的实施例，L_1、L_2 和 L_3 分别独立地选自独立的键，任选取代的烷基，任选取代的烷基烯基，任选取代的杂烷基烯，任选取代的环烷基，任选取代的异环烷基以及任选取代的芳基烯的至少之一。

根据本发明的实施例，L_1、L_2 和 L_3 分别独立地选自独立的键、任选取代的 C_{1-8} 烷基，任选取代的 C_{1-8} 烷基烯，任选取代的 C_{2-8} 杂烷基烯，任选取代的 C_{3-8} 环烷基烯，任选取代的 C_{3-8} 异环烷基烯，或任选取代的 C_{6-8} 芳基烯。

根据本发明的实施例，L_1 选自独立的键、任选取代的 C1～C3 烷基和任选取代的 C1-C3 烷基烯中的至少之一。

根据本发明的实施例，L_1 包括选自下列的至少之一：、、、、、、，其中，各 R_7 独立为酰胺键或 O，各 p_1 独立为 0、1~10 之间的整数，优选地，各 p_1 独立为 1、4；各 p_2 独立为 0、1~5 之间的整数，优选地，各 p_2 独立为 1、4；各 R_8，R_9 分别独立地选自 H、$-CH_3$、$-CX_3$、$-CHX_2$、$-CH_2X$、-CN、-Ph、C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基中的至少一种，其中 X 为 Cl、Br、I；各 p_3 独立为 0、1~4 之间的整数。根据本发明的实施例，各 p_3 独立为 1、2。

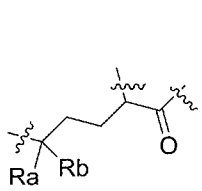
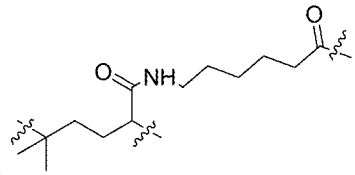
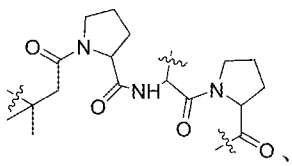
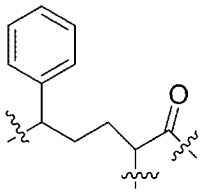
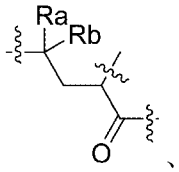
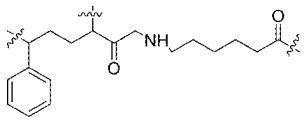
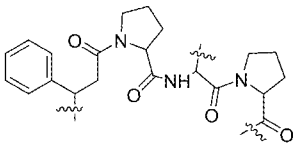
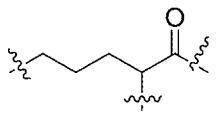
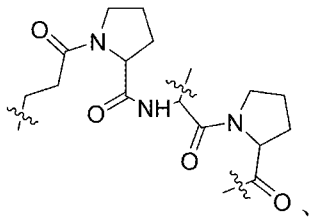
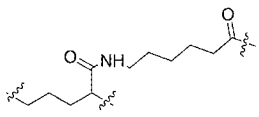
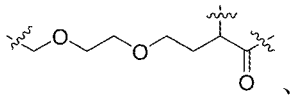
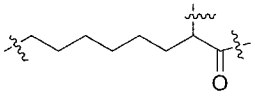
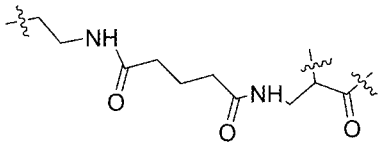
根据本发明的实施例，L_2 包括选自下列的至少之一：、、、、、、、

，其中，各 Rx、Ry、R_A、R_B 独立为 H、$C_{1\sim6}$ 烷基链、$C_{3\text{-}10}$ 环烷基、$C_{5\text{-}10}$ 芳基，各 x、y、z 独立为 0 或者 1～6 的整数。

根据本发明的实施例，各 Rx、Ry 独立为 H、$C_{3\text{-}5}$ 环烷基、$C_{5\text{-}6}$ 环烷基、苯基。

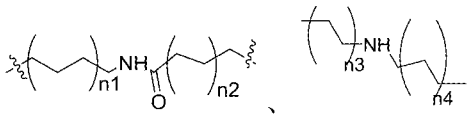
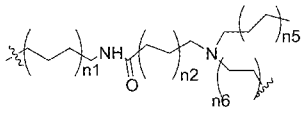
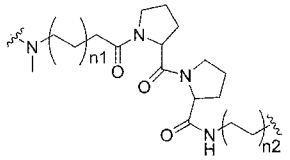
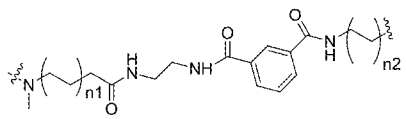
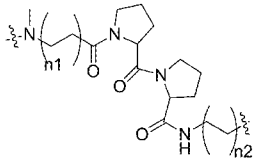
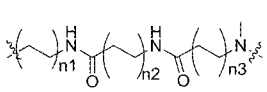
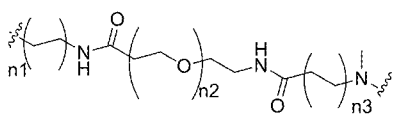
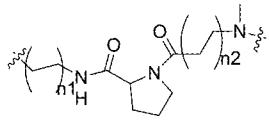
根据本发明的实施例，L_2 为选自如下结构的一种：

，

其中，各 Ra 与 Rb 分别独立地为 H、取代或非取代的烷基、取代或非取代杂烷基烯、取代或非取代环烷基、取代或非取代异环烷基、取代或非取代芳基。

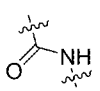
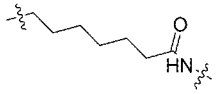
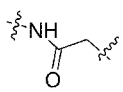
根据本发明的实施例，L_3 选自以下结构的一种：

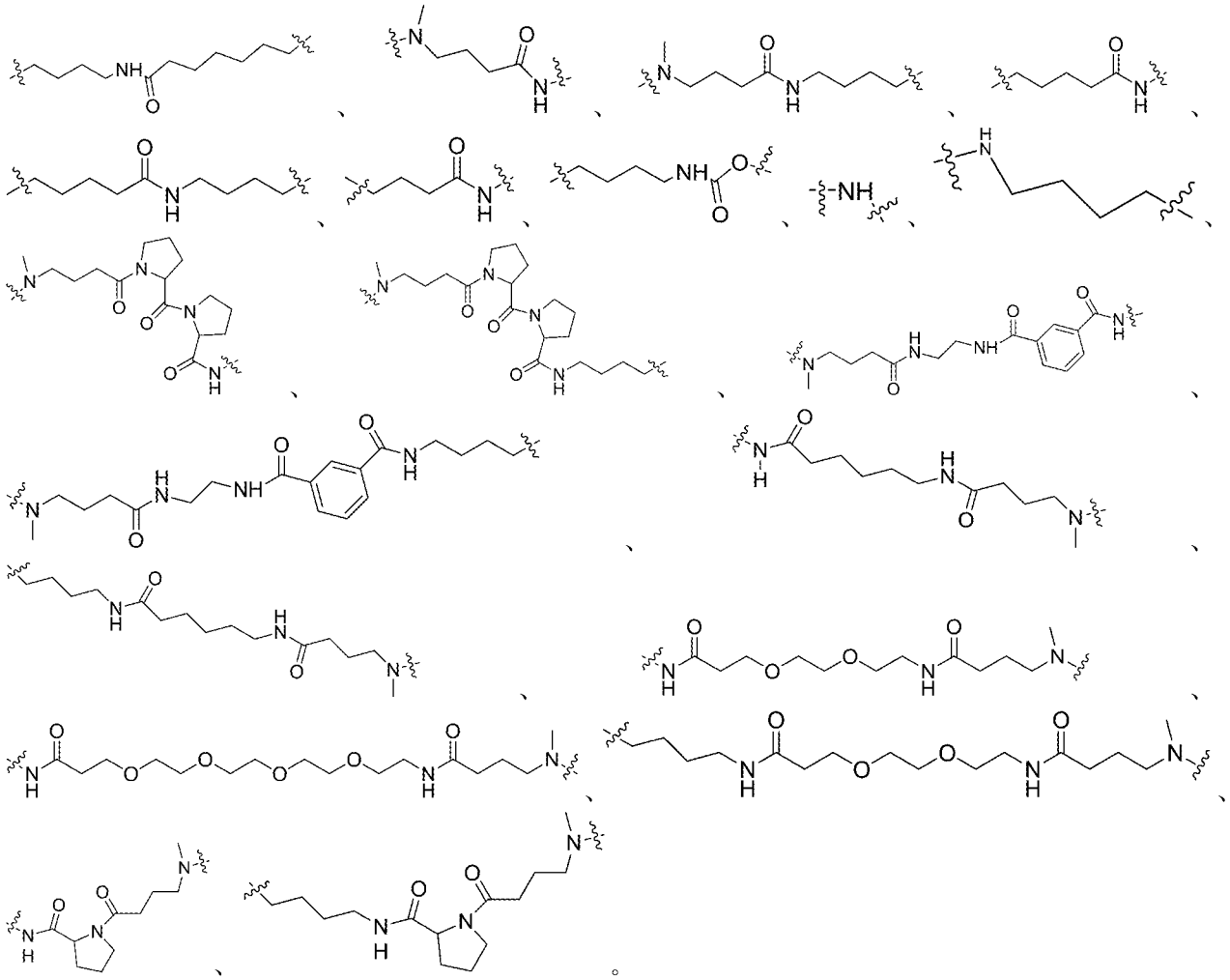









，

其中，n1，n2，n3，n4，n5，n6 分别独立地为 0 或者 1～7 的整数。

根据本发明的实施例，L_3 具有选自以下结构的一种：

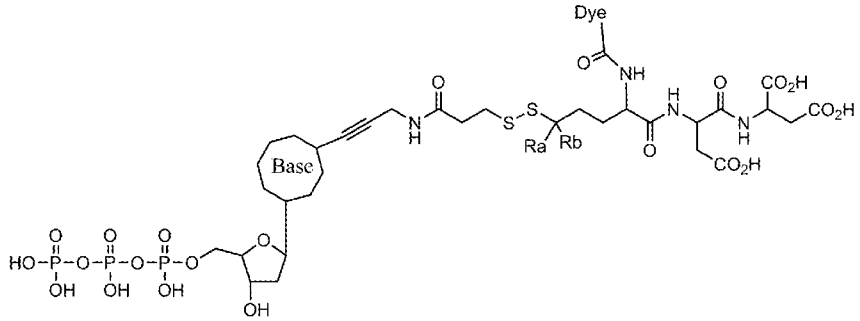






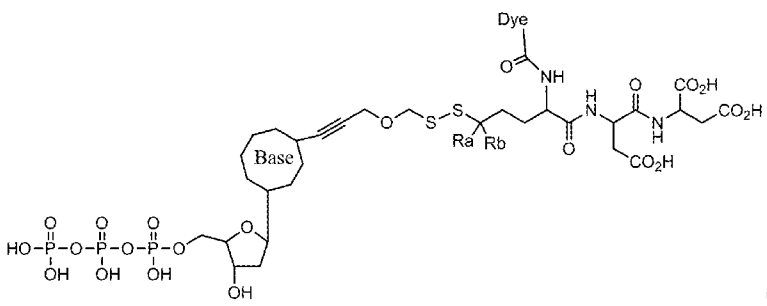
根据本发明的实施例，R_3选自染料、点击化学反应基团、叠氮基和生物素基中的的至少一种。

根据本发明的实施例，R_5包括至少一个带电荷的基团，带电荷的基团包括-COOH、$-PO_4$、$-SO_4$、$-SO_3$、$-SO_2$。

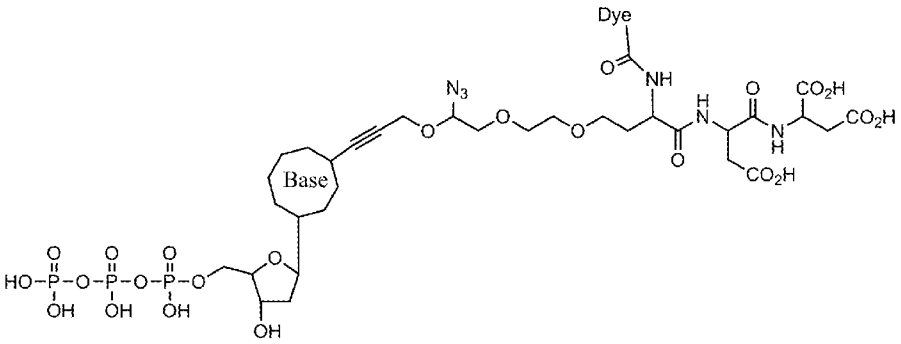
根据本发明的实施例，所称的化合物具有下列结构至少之一：



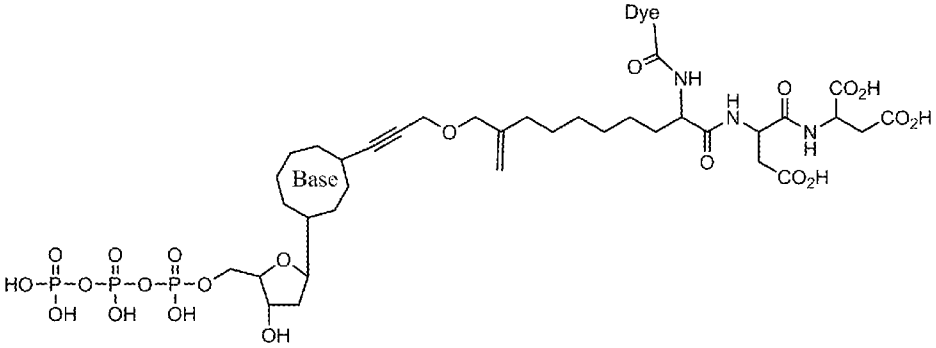
(1)、



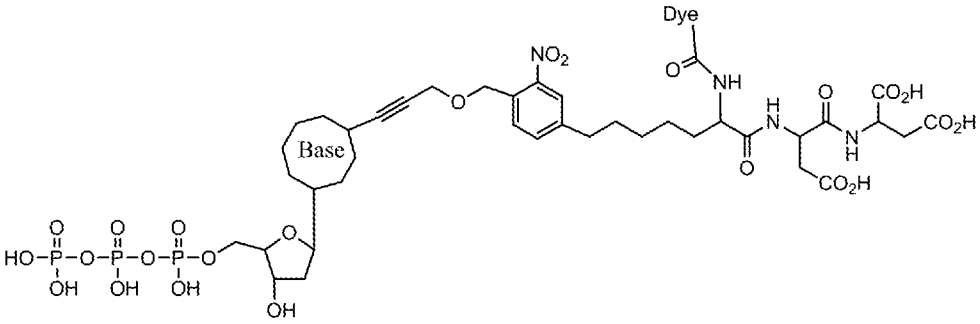
(2)、



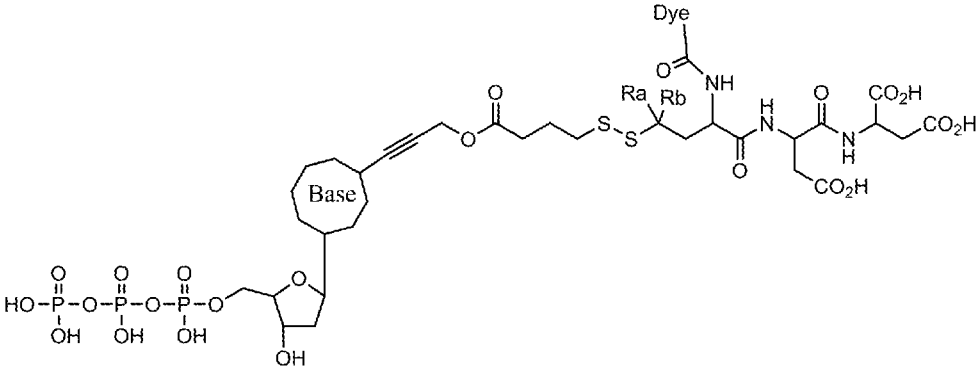
(35)、



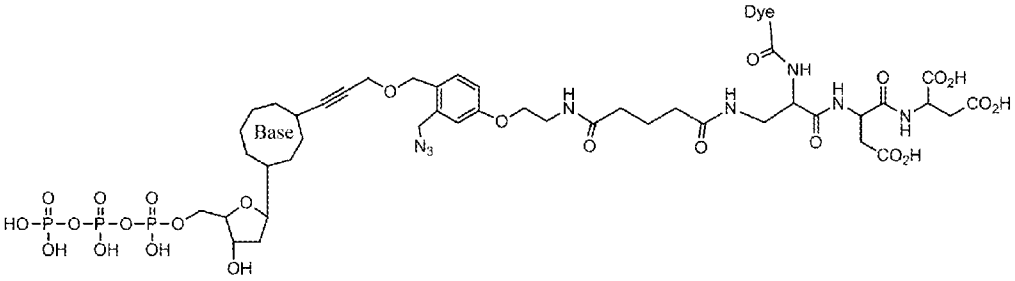
(36)



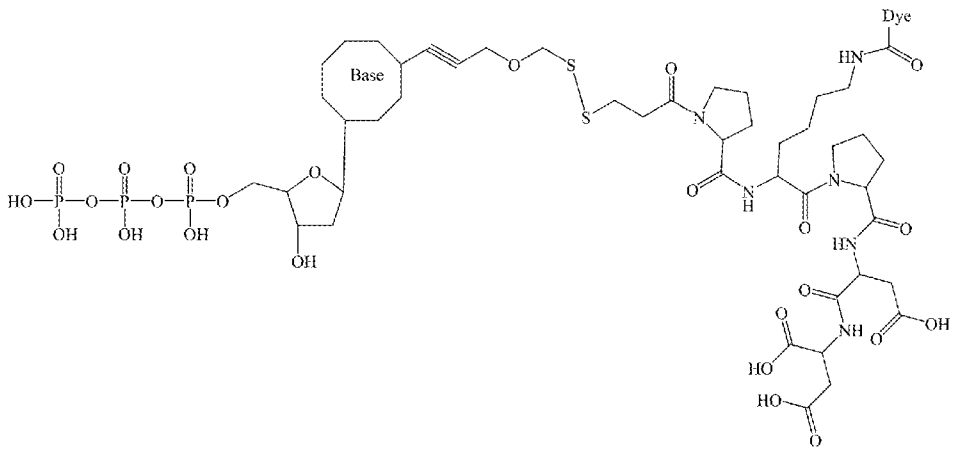
(37)、



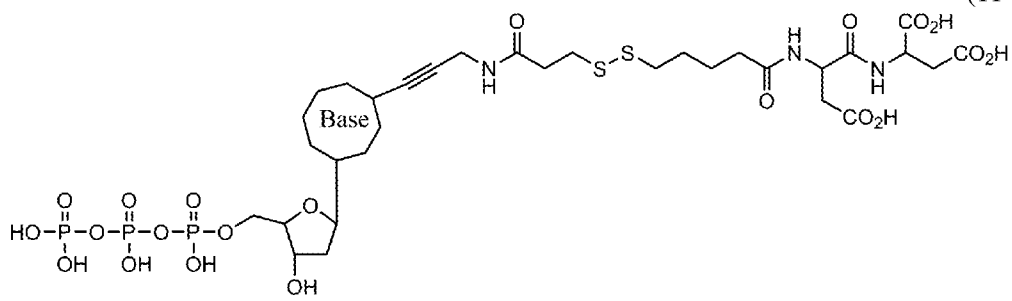
(38)、



(39)、

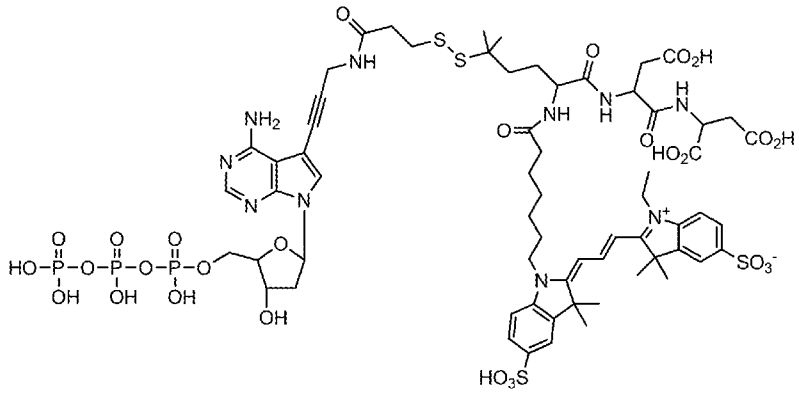


(11-13),

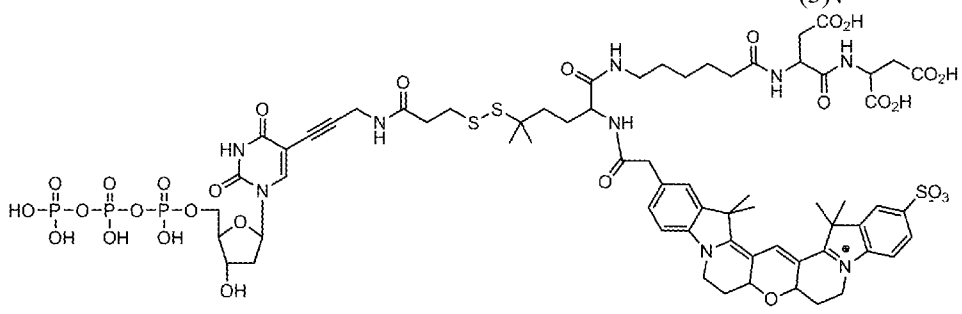


（93），其中，各 Ra 与 Rb 分别独立地选自 H、任选取代的烷基、任选取代的杂烷基烯、任选取代的环烷基、任选取代的异环烷基和任选取代的芳基中的至少一种。根据本发明的实施例，各 Ra 与 Rb 分别独立地为 H、C_{1-6} 烷基、3-6 个原子的杂烷基、C_{2-6} 烯基、3-6 个原子的杂烯基、C_{3-6} 环烷基、3-6 个原子组成的杂环基、苯基、5-6 个原子组成的杂芳基，其中，各 C_{1-6} 烷基、3-6 个原子的杂烷基、C_{2-6} 烯基、3-6 个原子的杂烯基、C_{3-6} 环烷基、3-6 个原子组成的杂环基、苯基和 5-6 个原子组成的杂芳基独立地未被取代或被 1、2 或 3 个卤素、C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、CN、NO_2 取代。

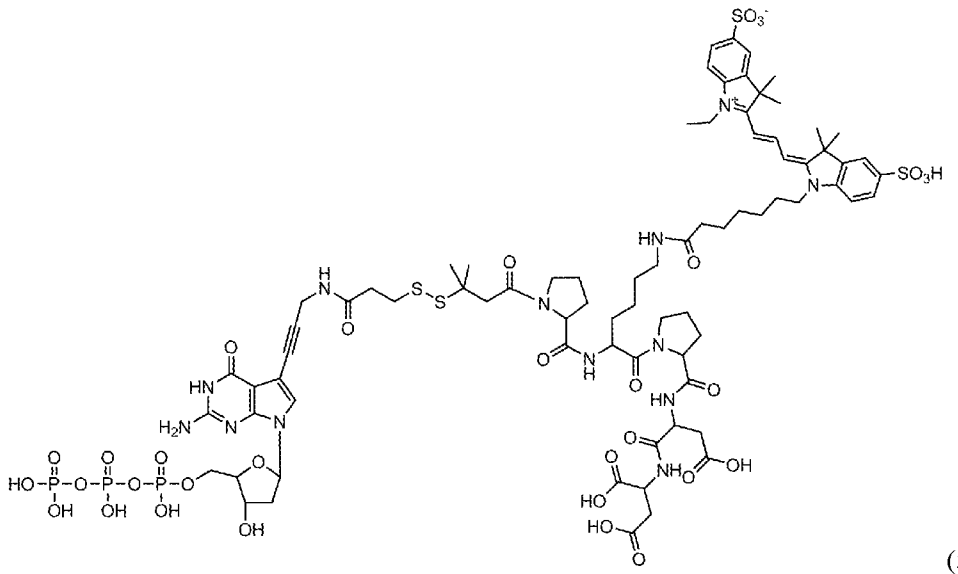
根据本发明的实施例，其具有下列结构至少之一：



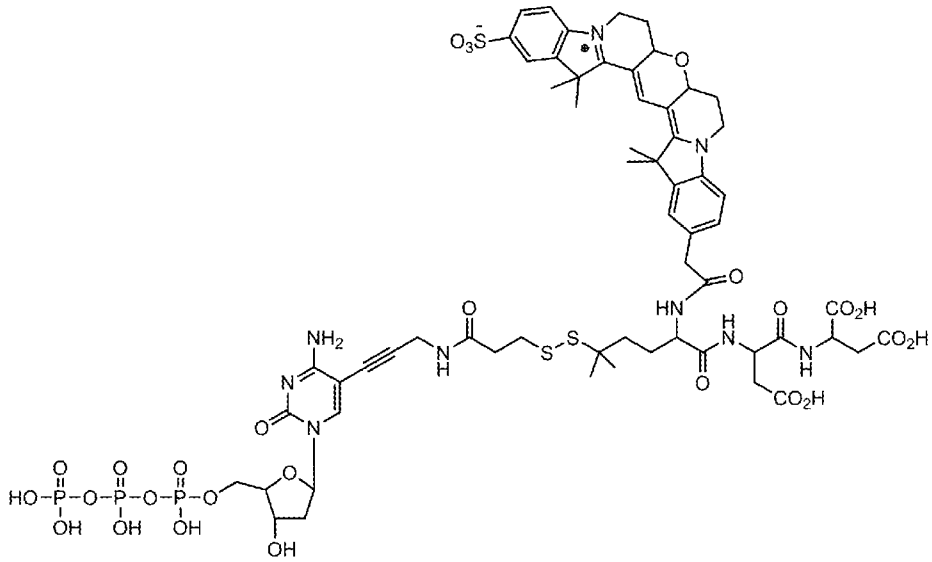
(3)、



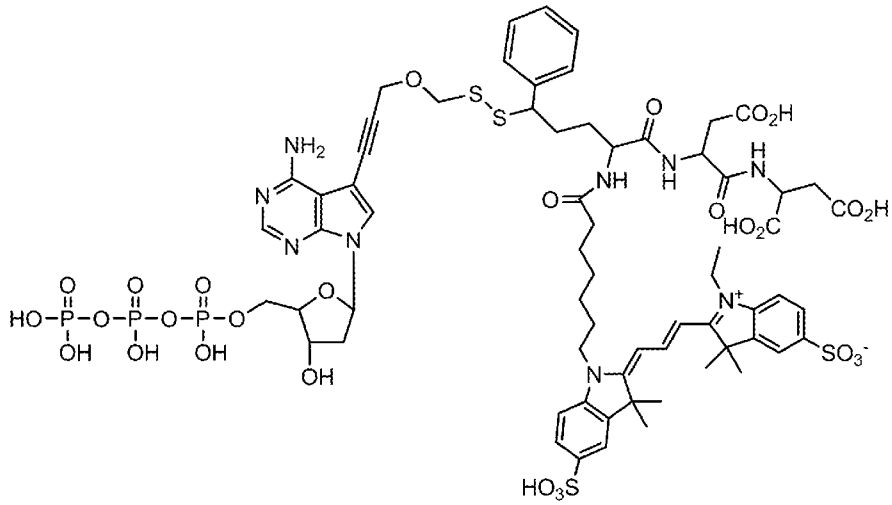
（4）、



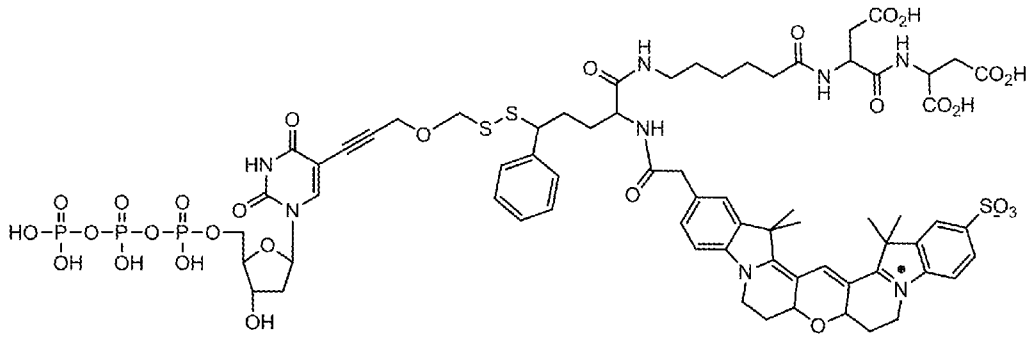
(5)、



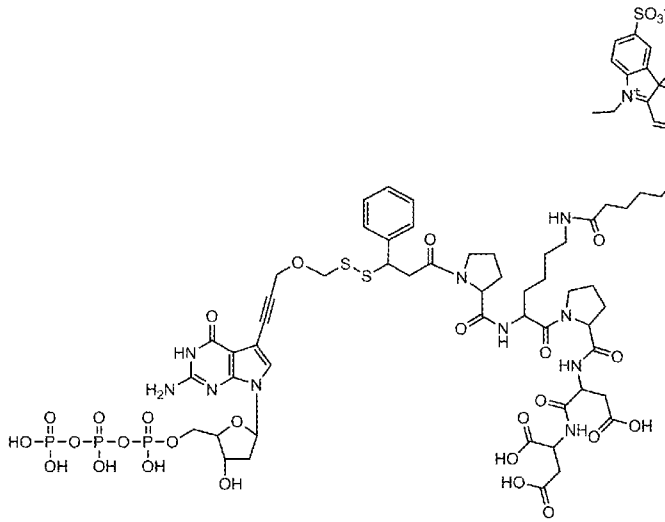
(6)、



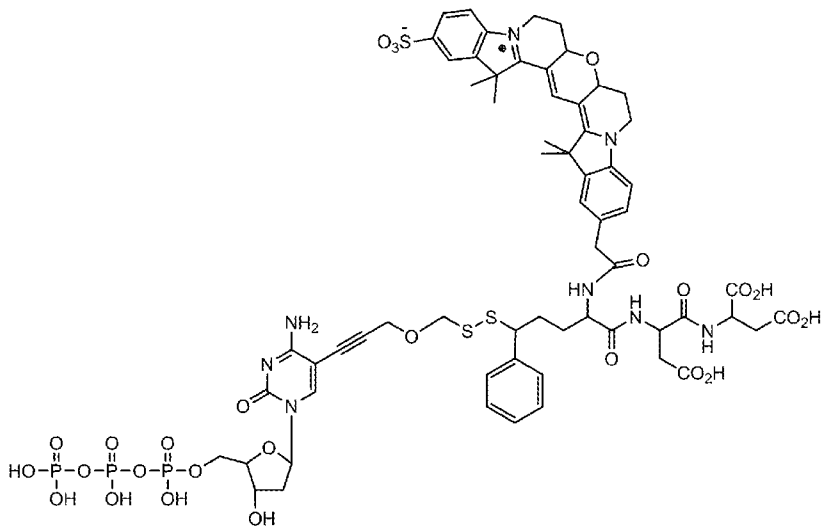
（7）、



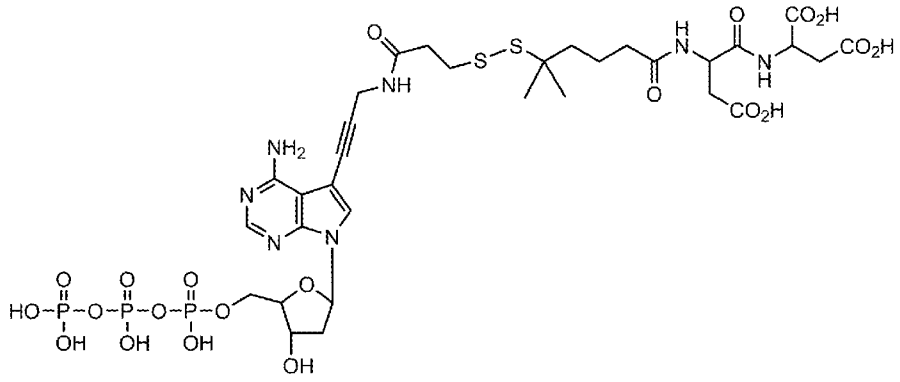
（8）、



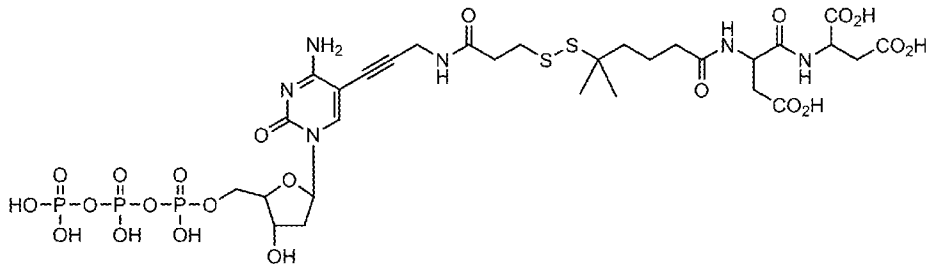
（9）、



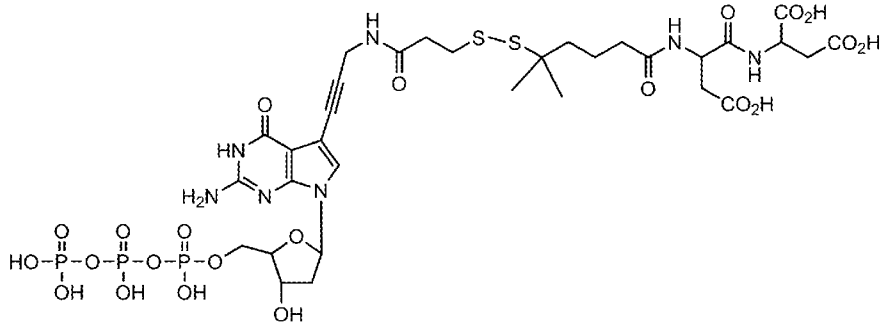
（10）、



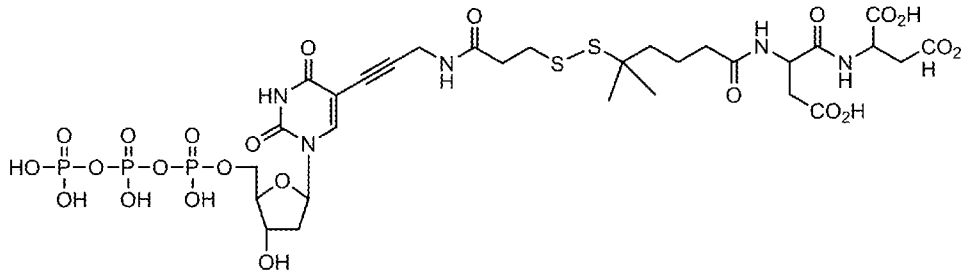
（11）、



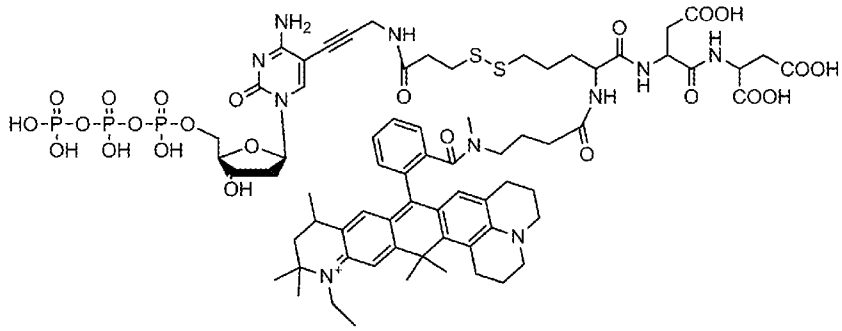
（12）、



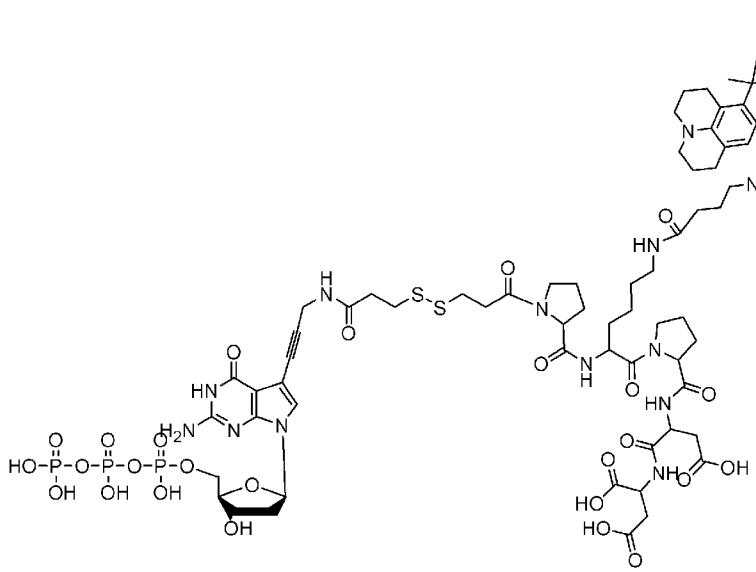
（13）、



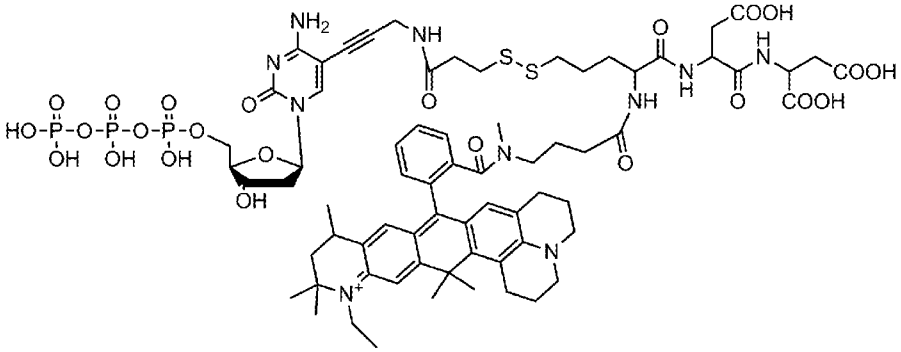
（14）、



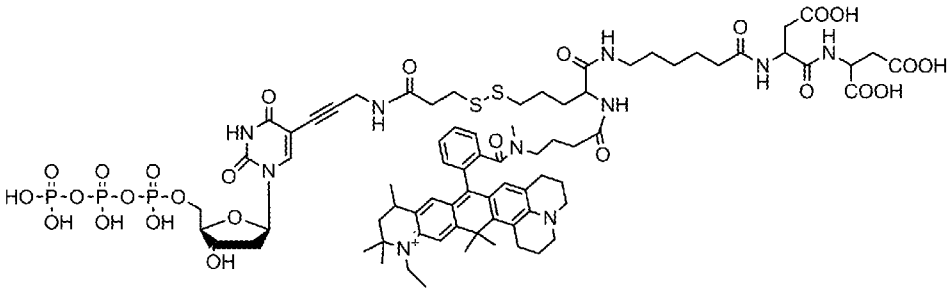
（15）、



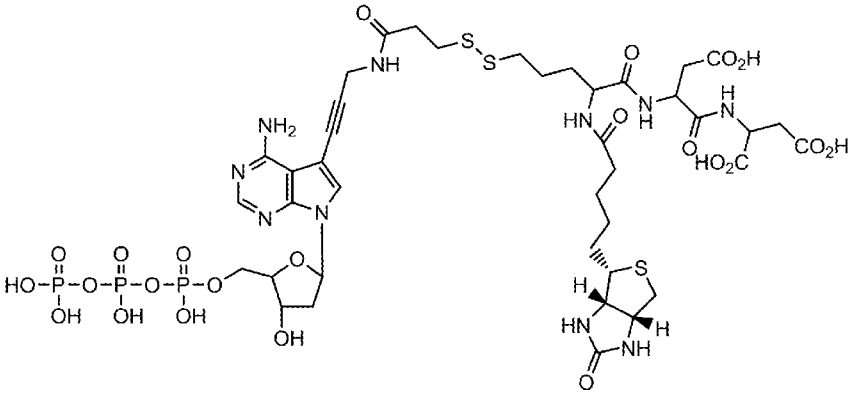
（16）、



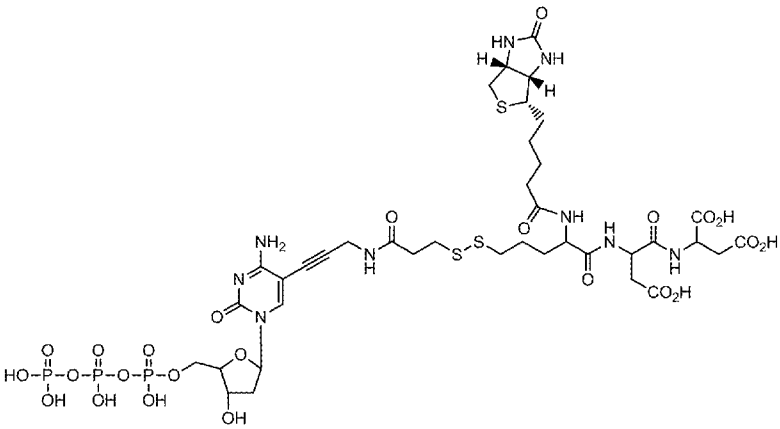
（17）、



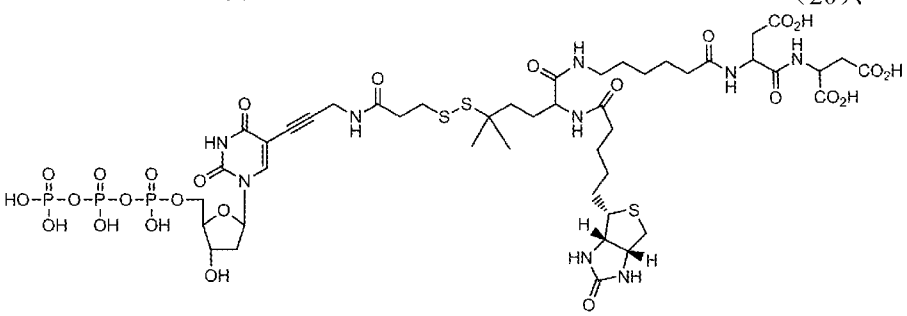
（18）、



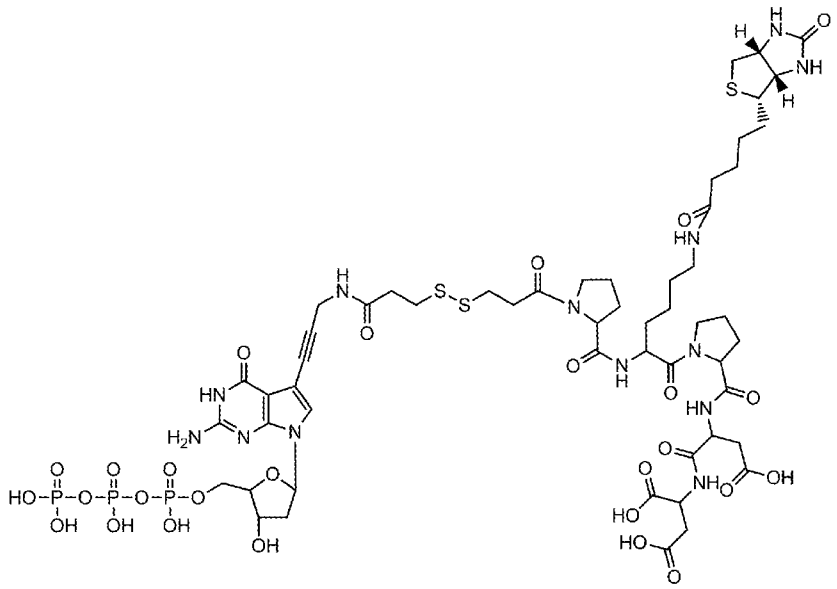
（19）、



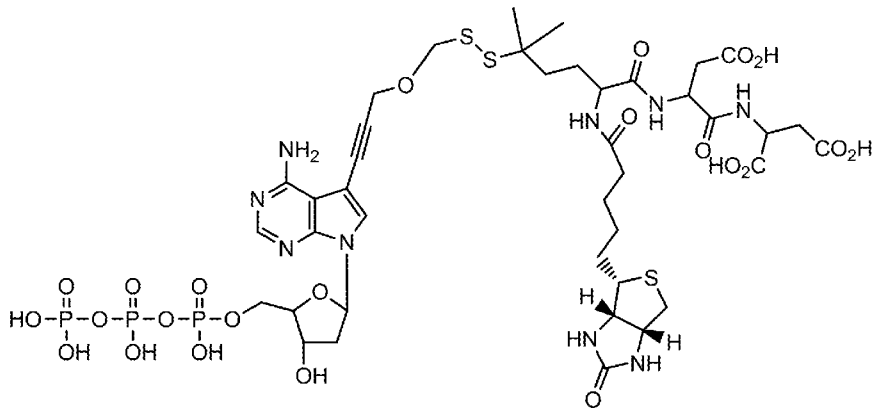
（20）、



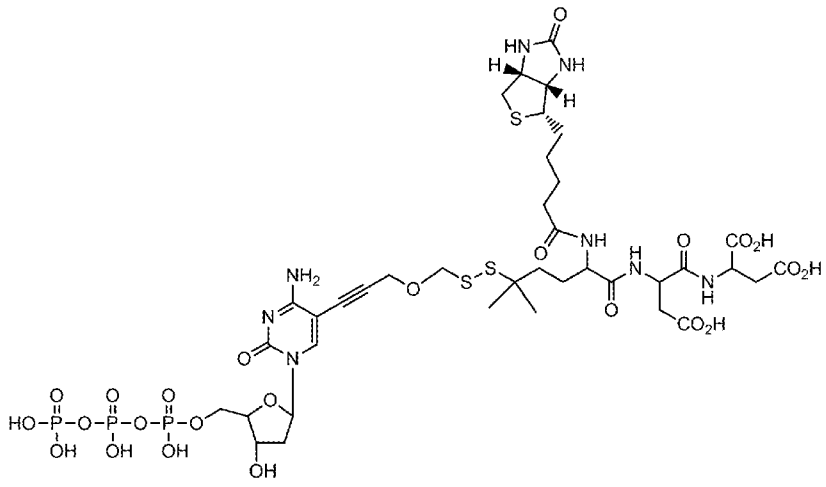
（21）、



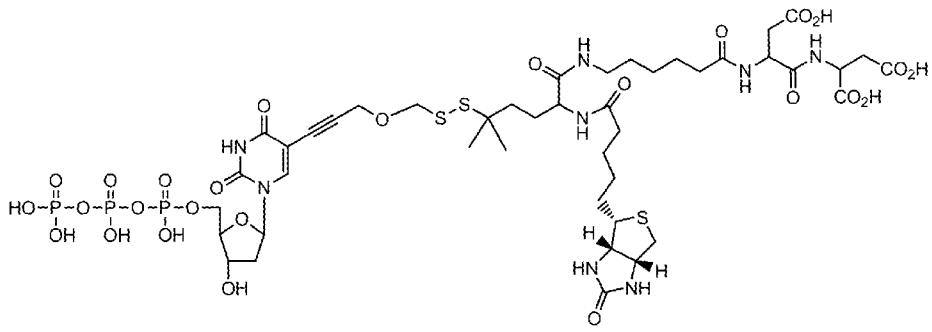
（22）、



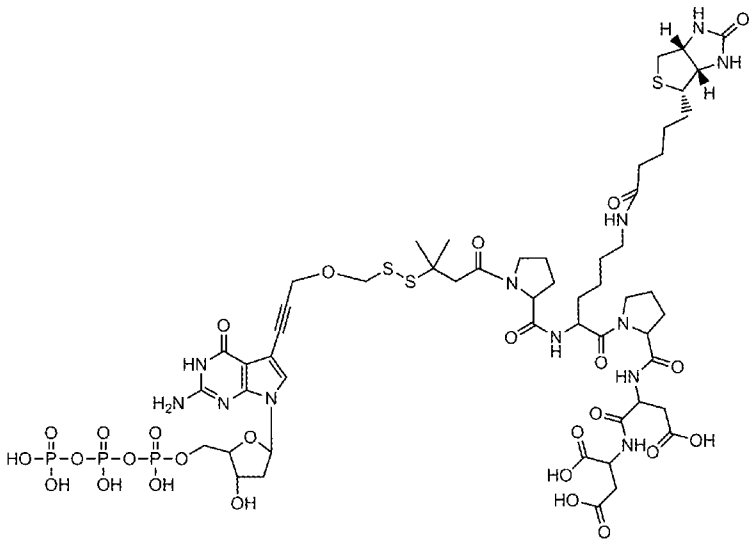
（23）、



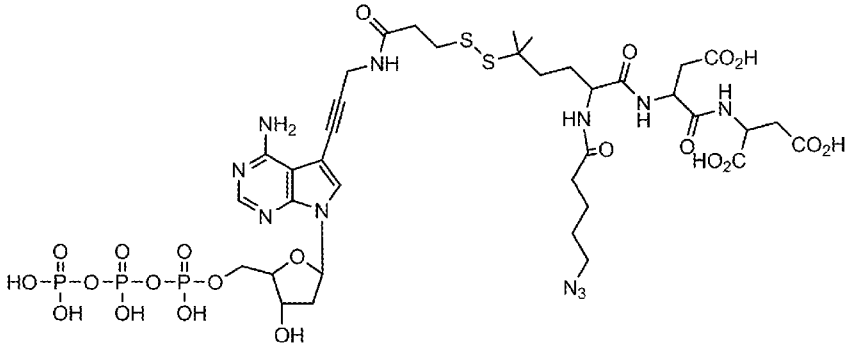
（24）、



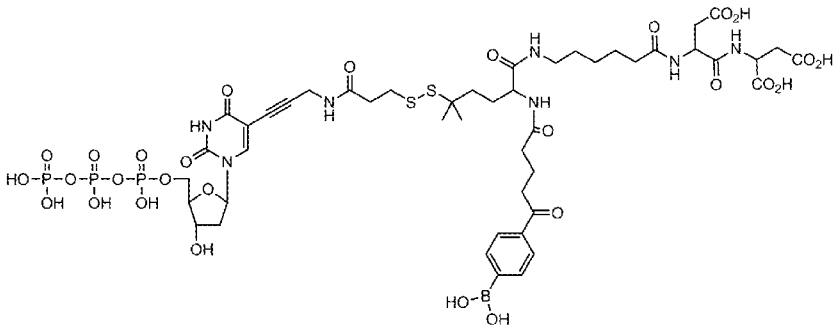
（25）、



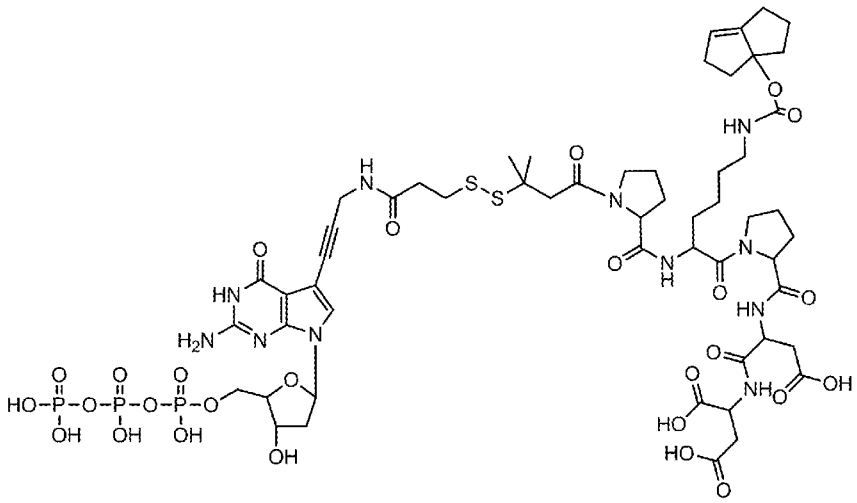
（26）、



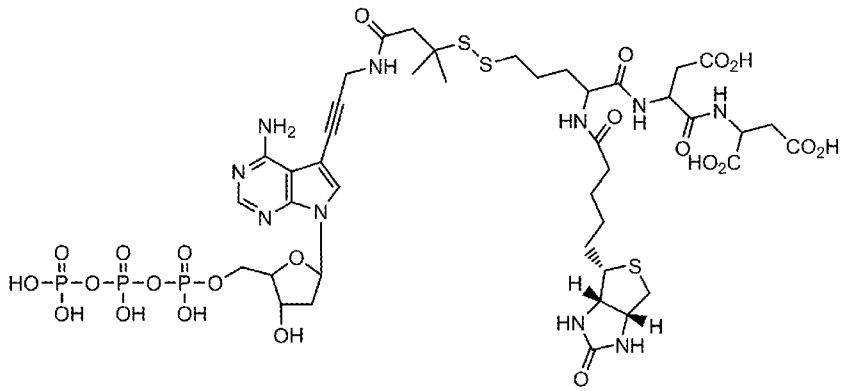
（27）、



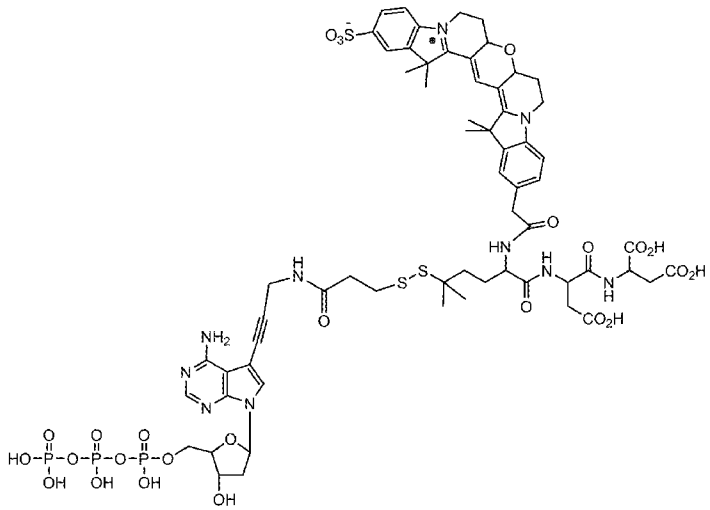
（28；该化合物中的 B 为硼原子）、



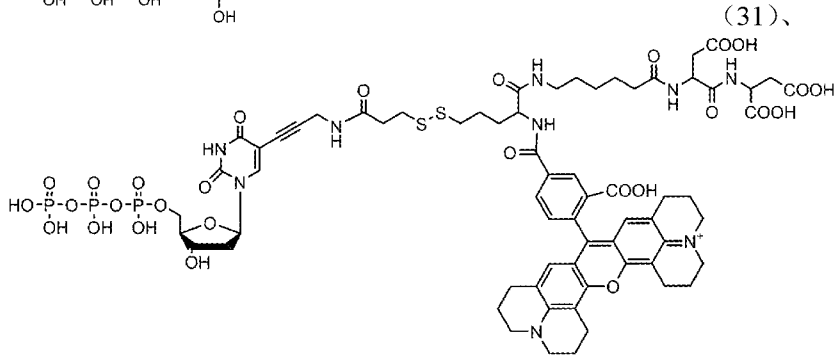
（29）、



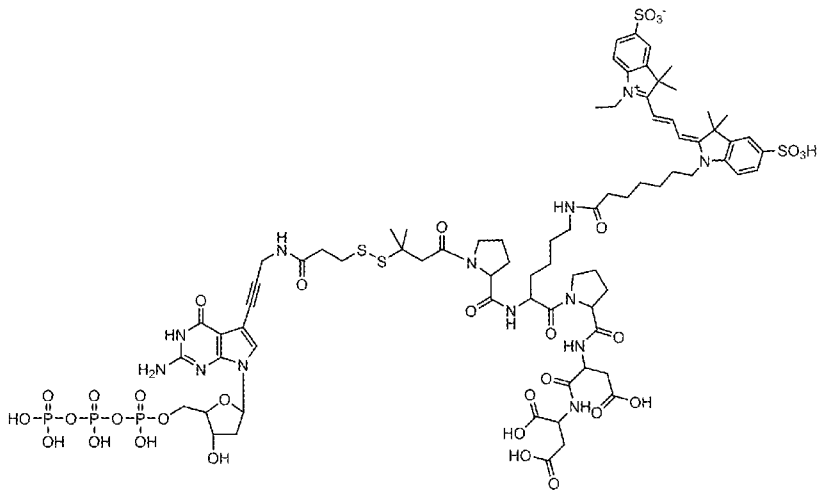
（30）、



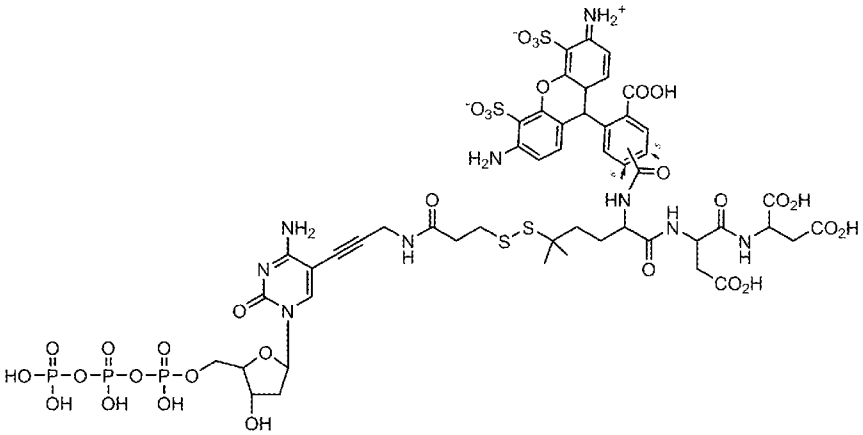
（31）、



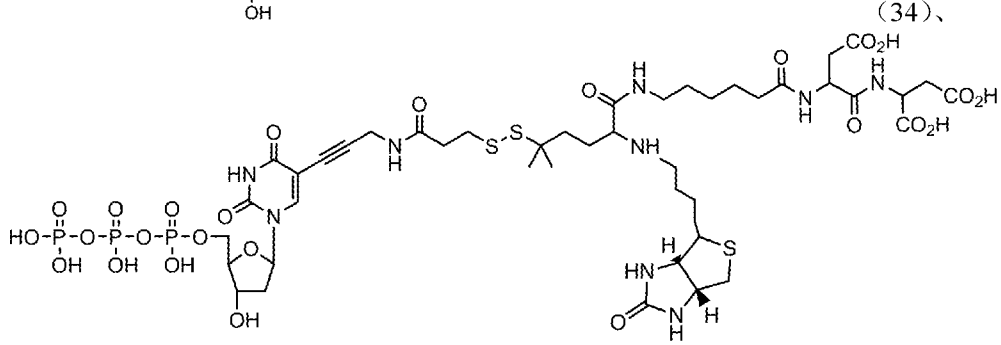
（32）、



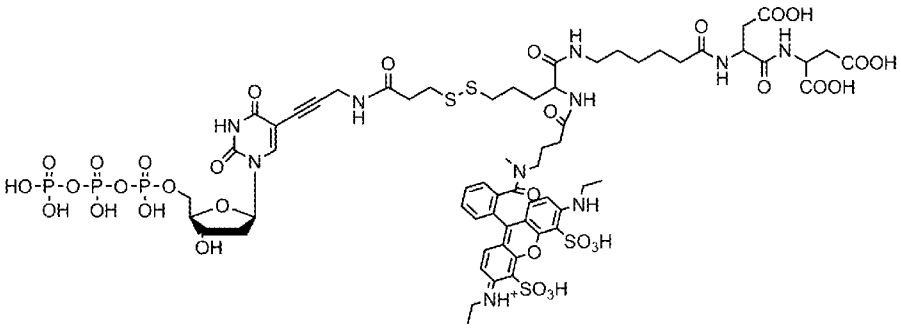
（33）、



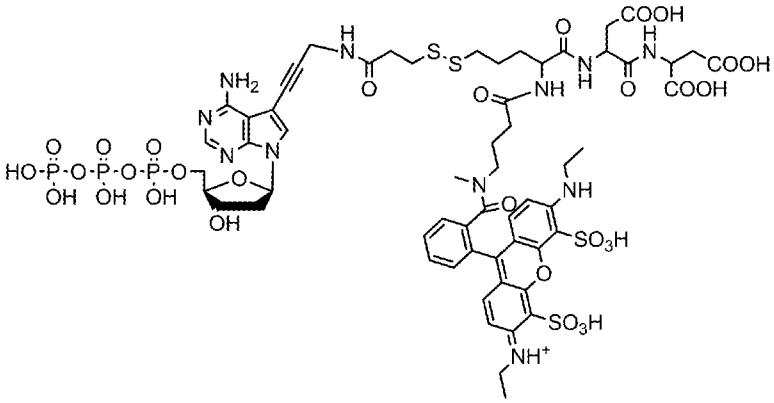
(34)、



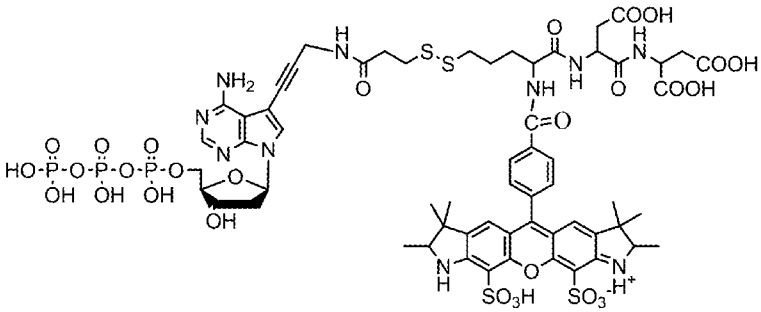
(40)、



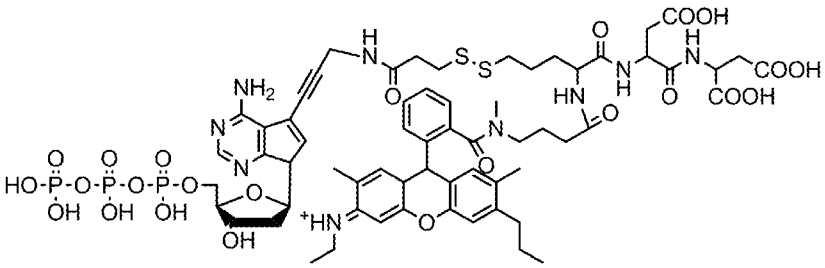
(41)、



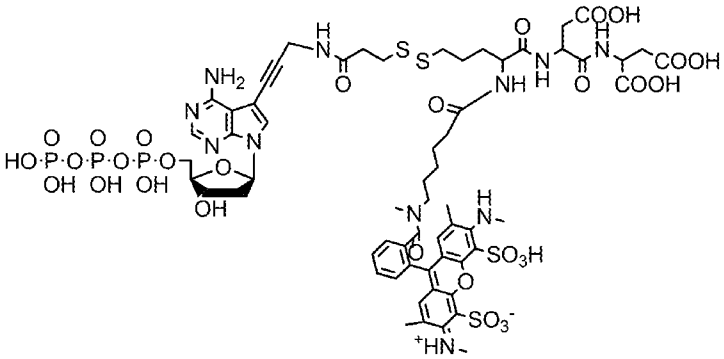
(42)、



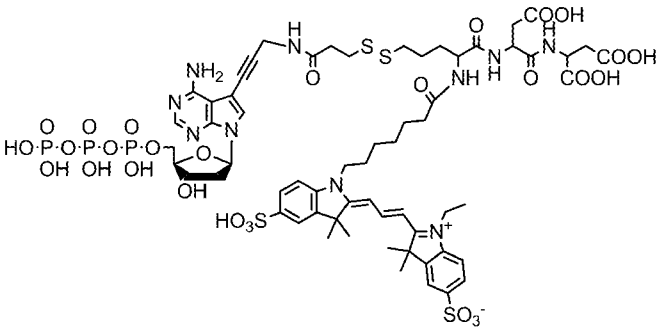
(43)、



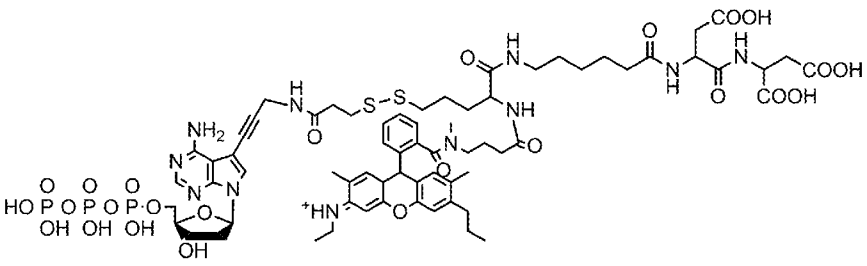
（44）、



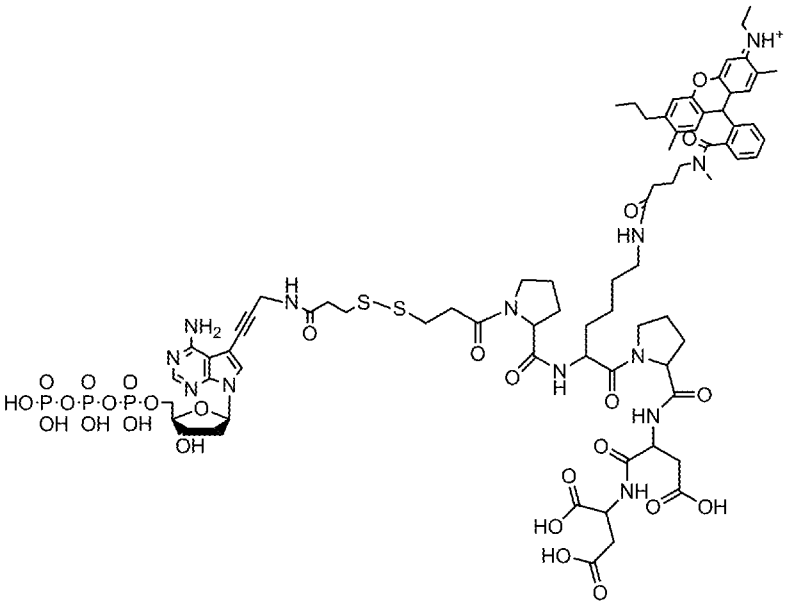
（45）、



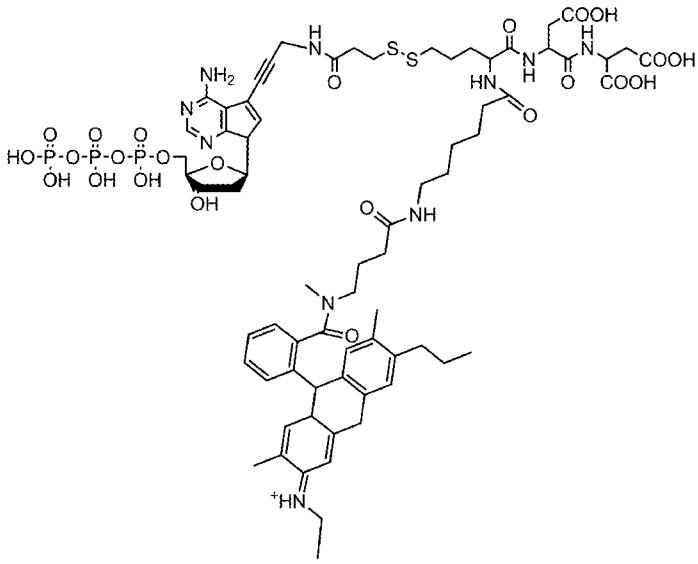
（46）、



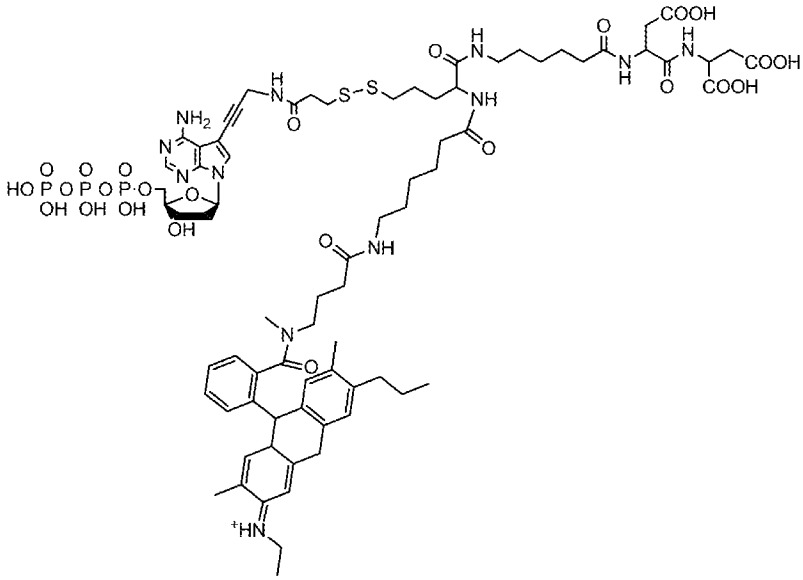
（47）、



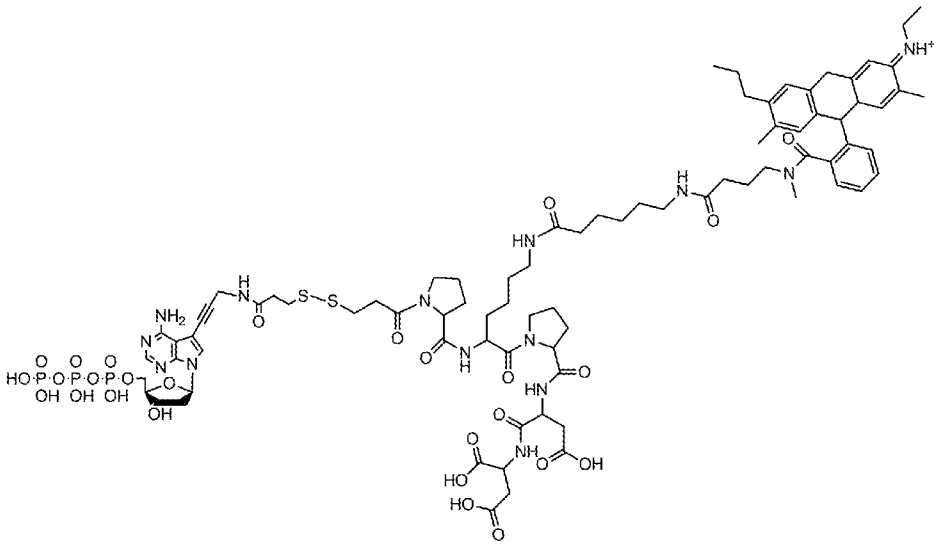
（48）、



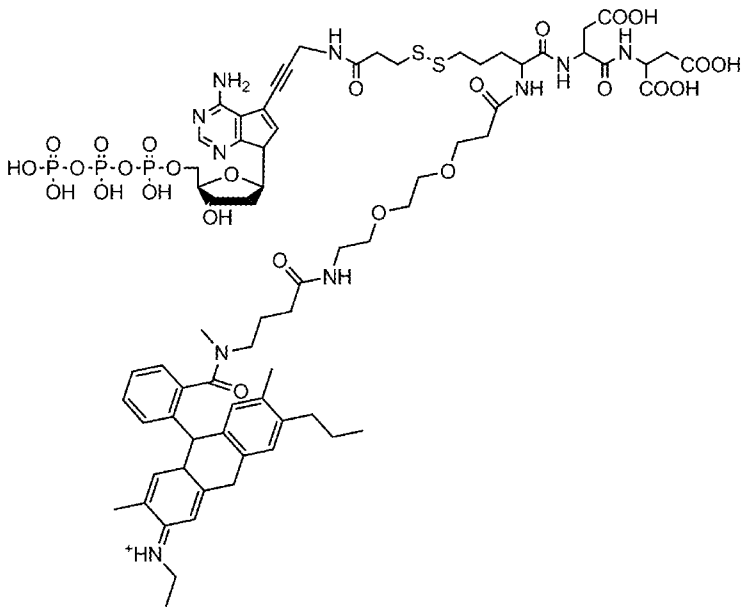
（49）、



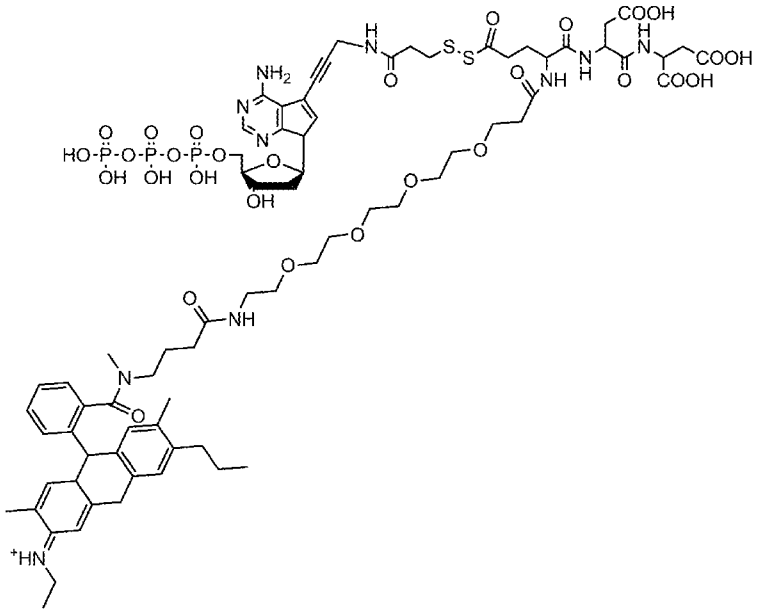
（50）、



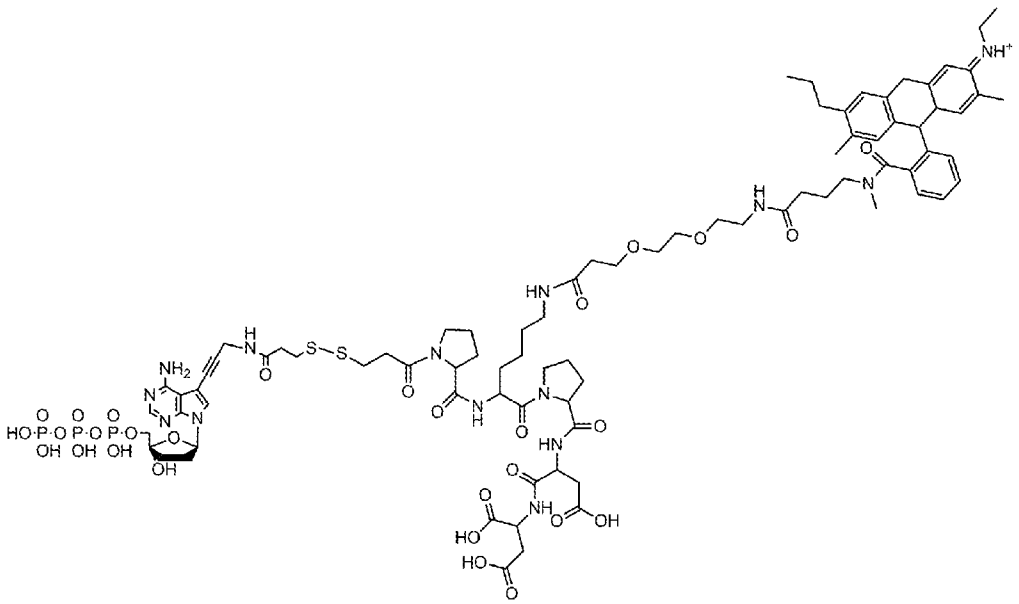
（51）、



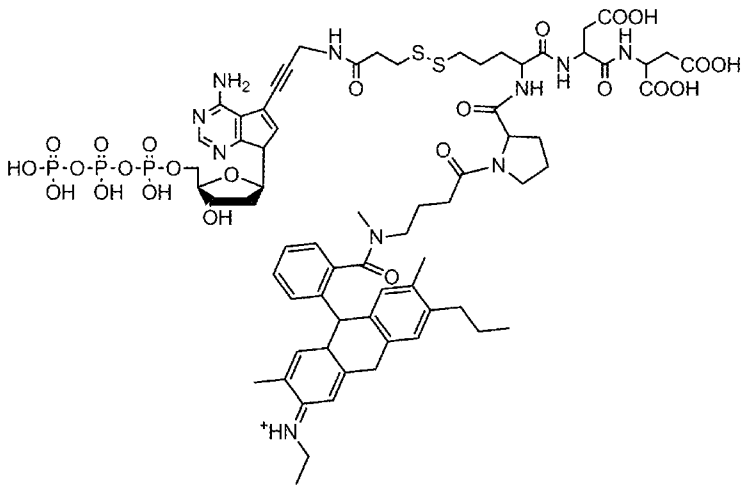
（52）、



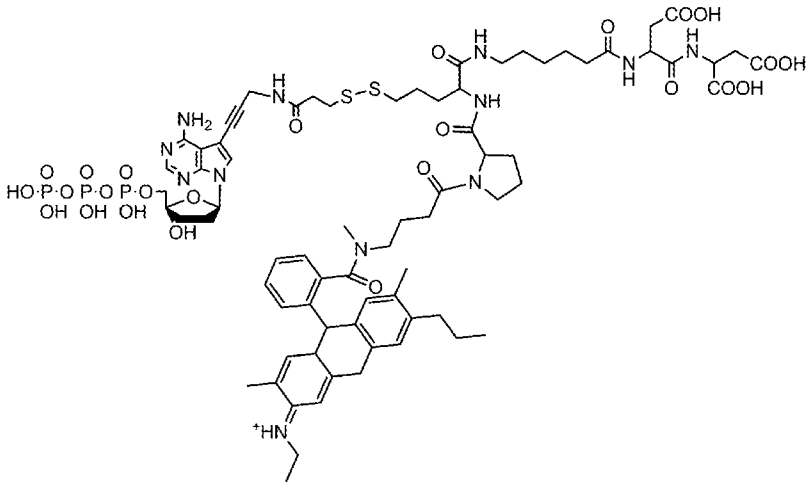
（53）、



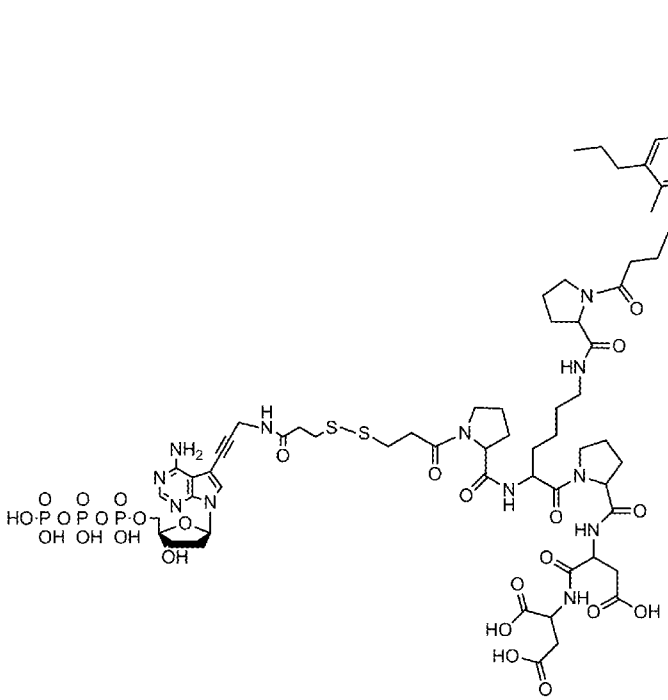
（54）、



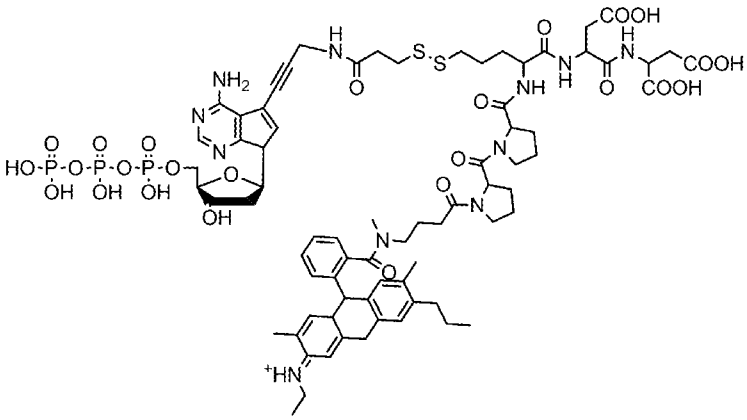
(55)、



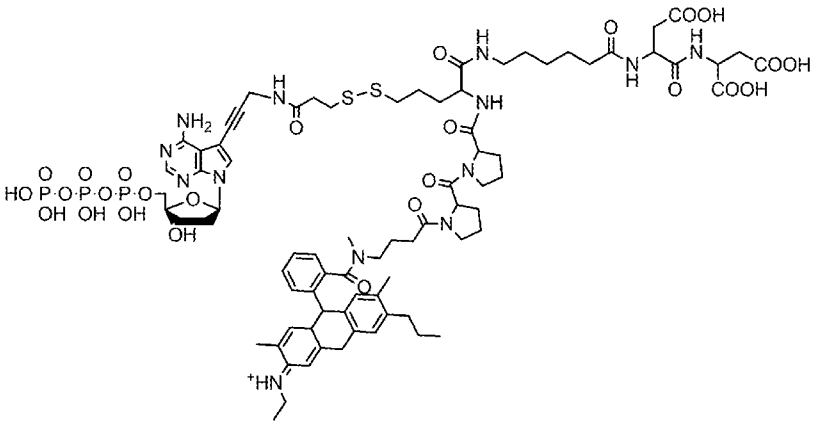
(56)、



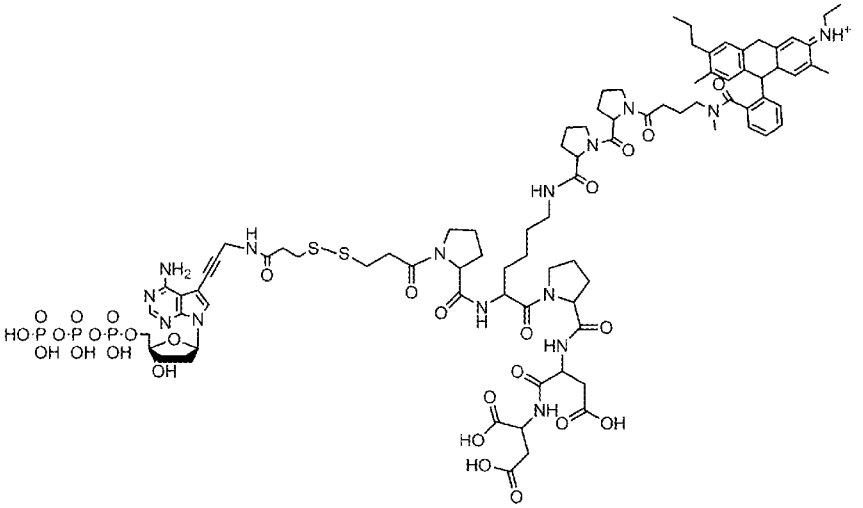
(57)、



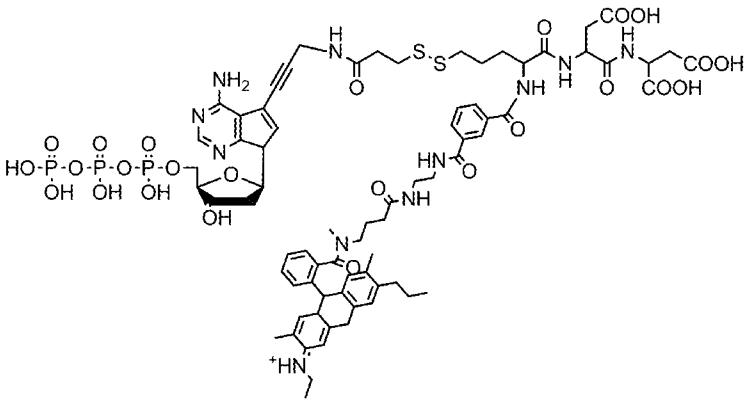
（58）、



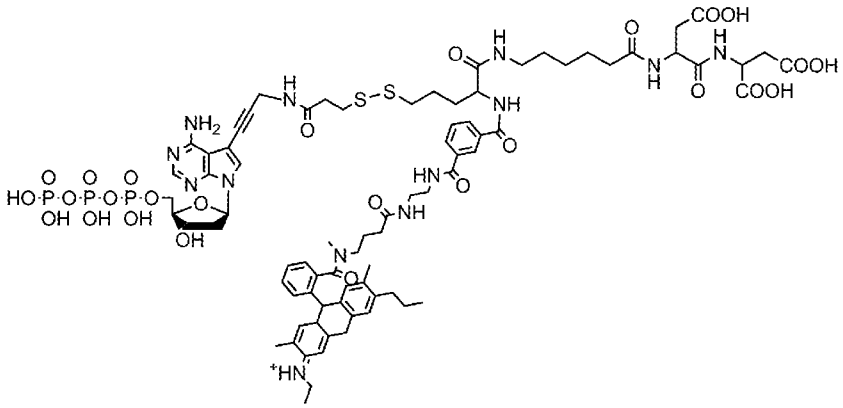
（59）、

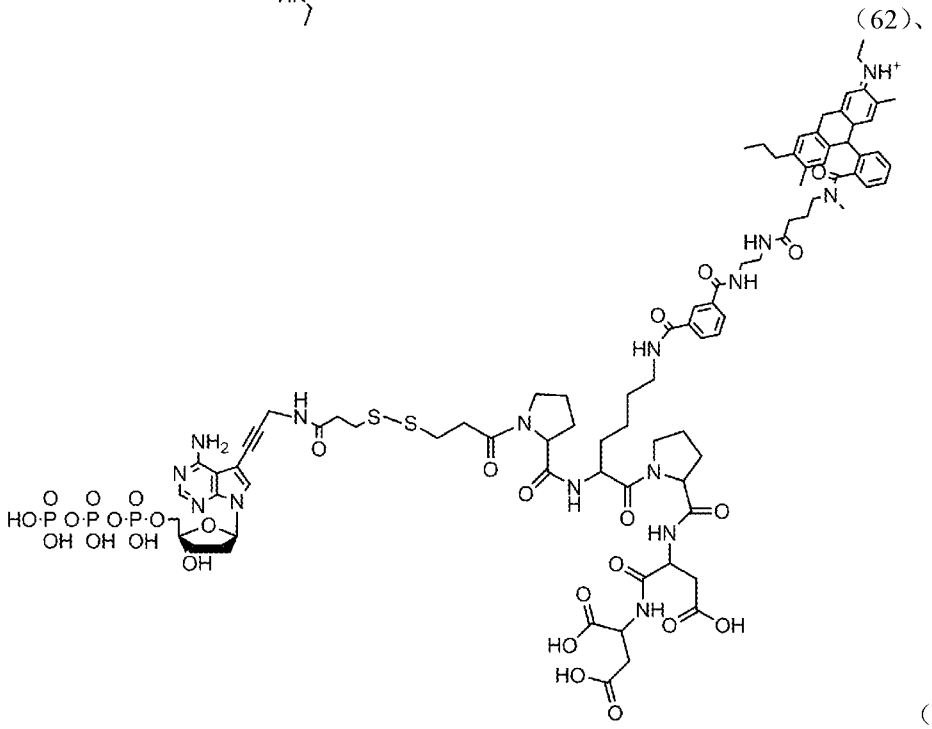


（60）、

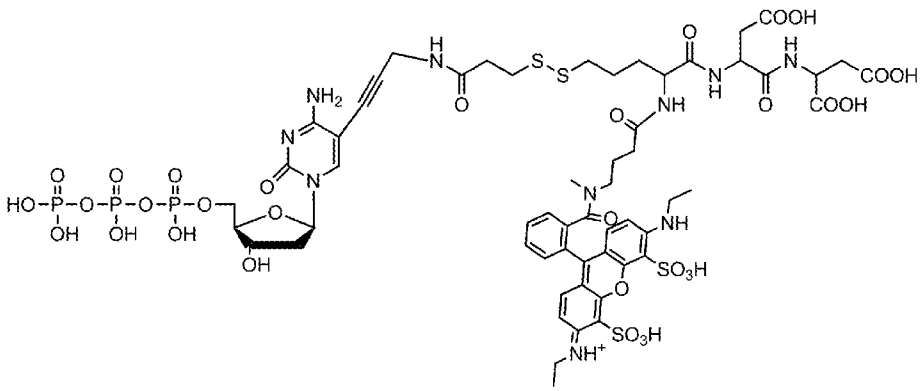


（61）、

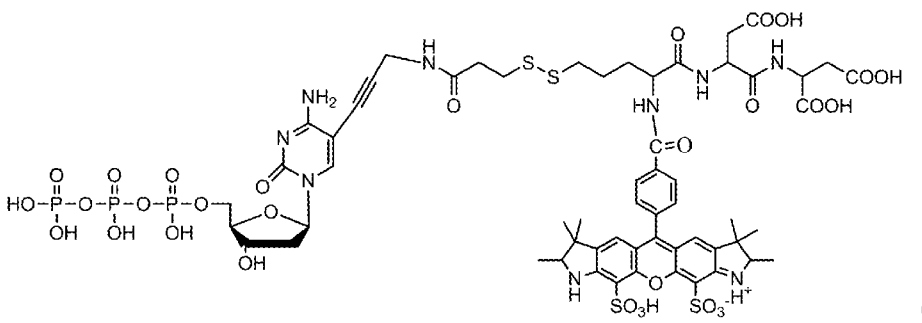




（62）、

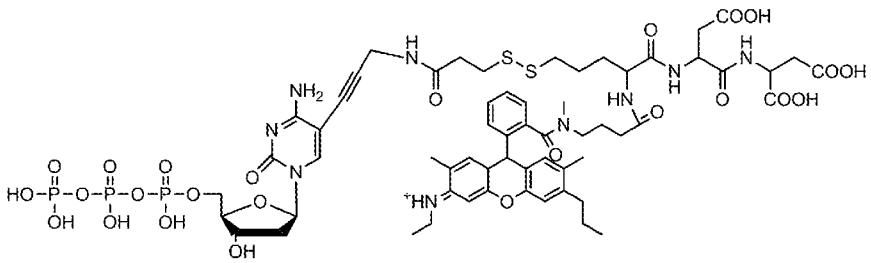


（63）、

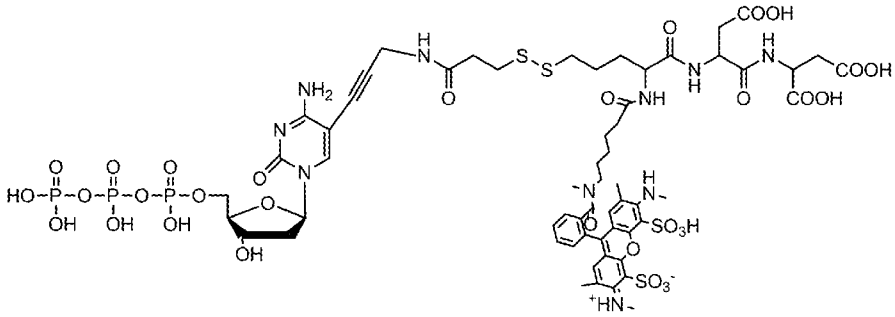


（64）、

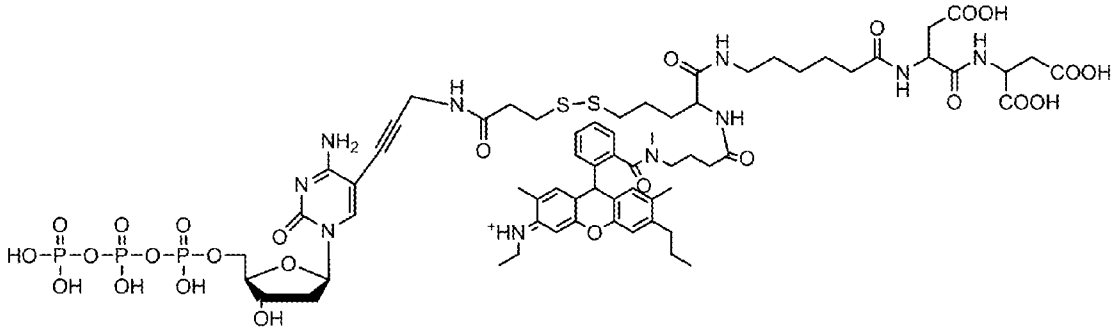
（65）、



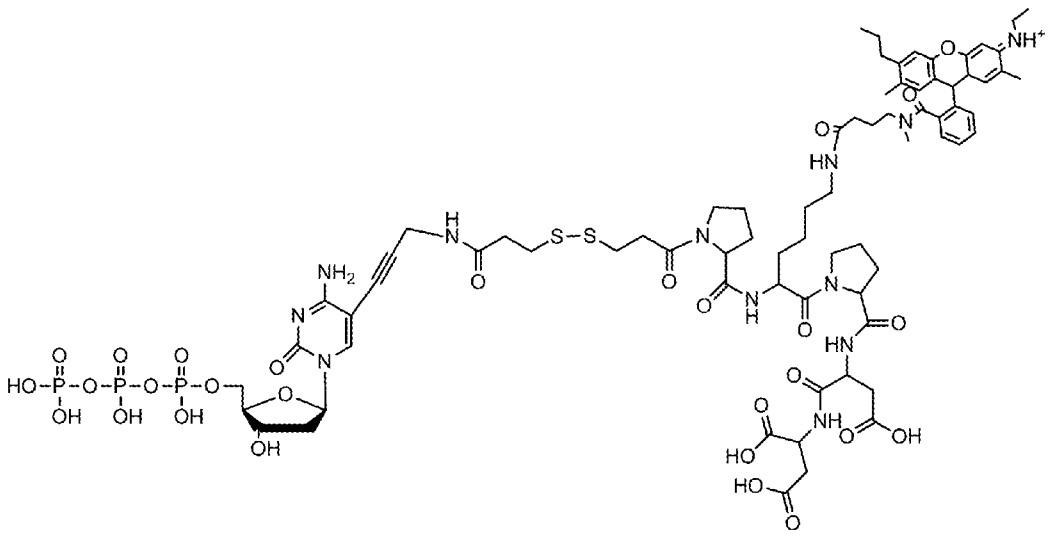
(66)、



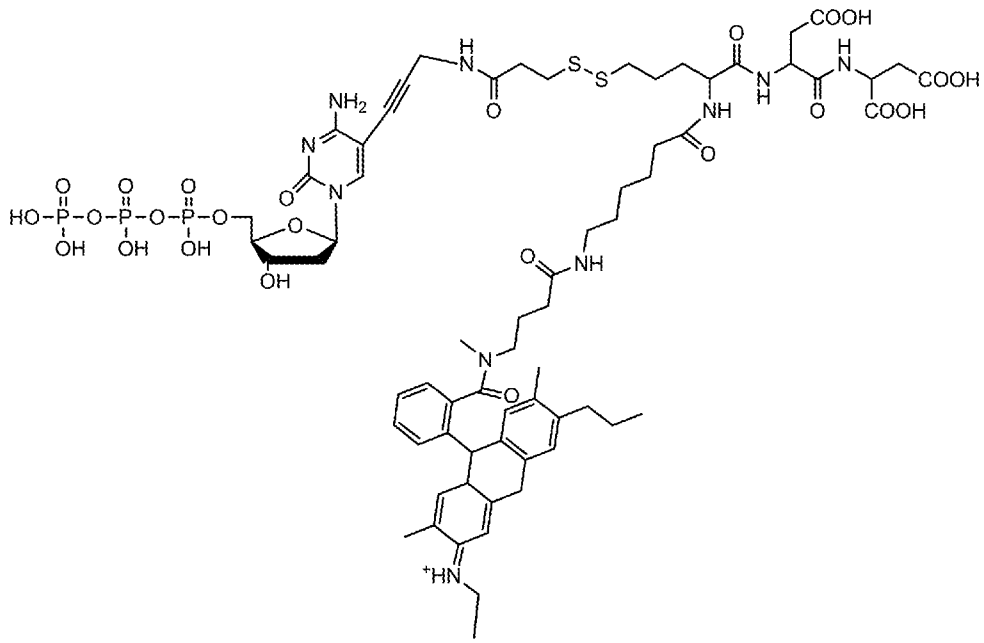
(67)、



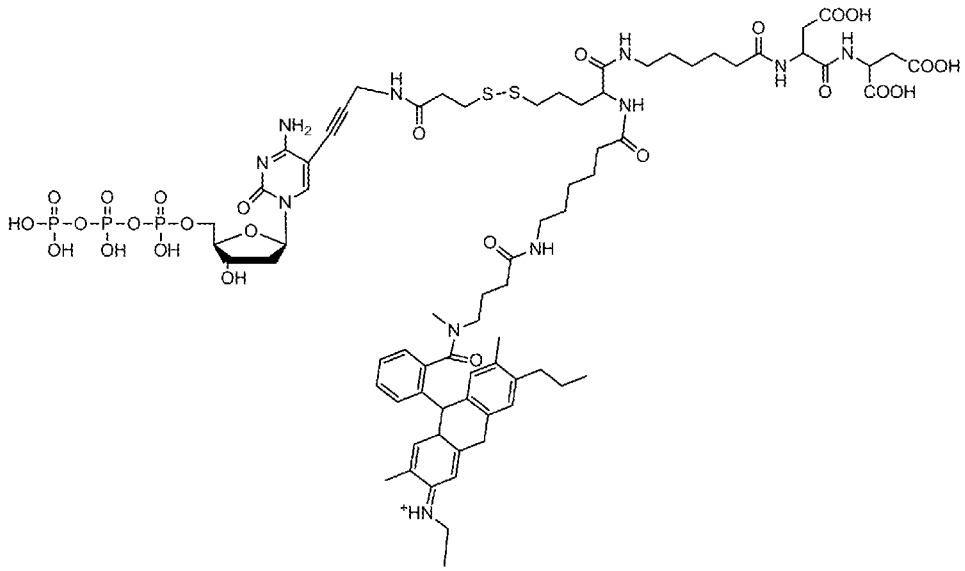
(68)、



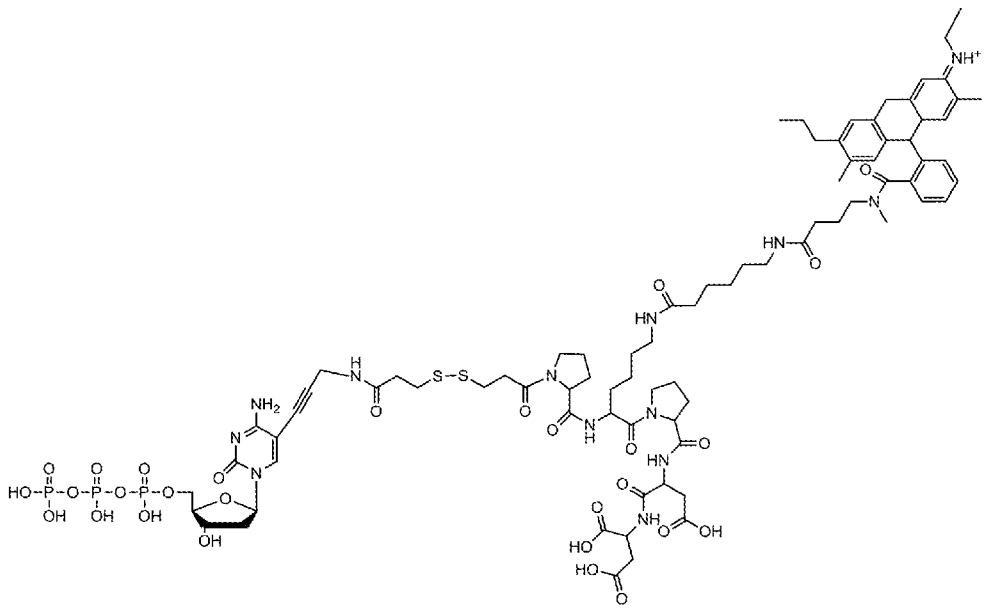
(69)、



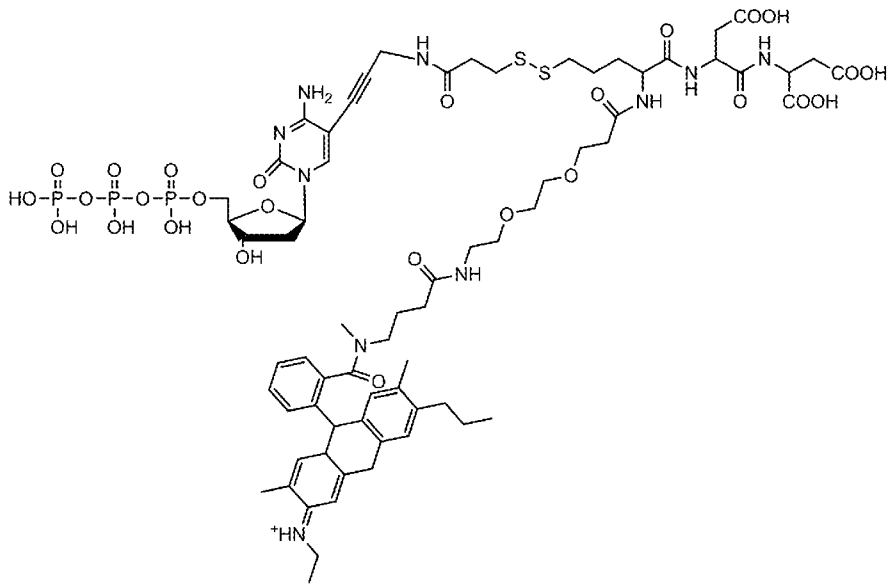
（70）、



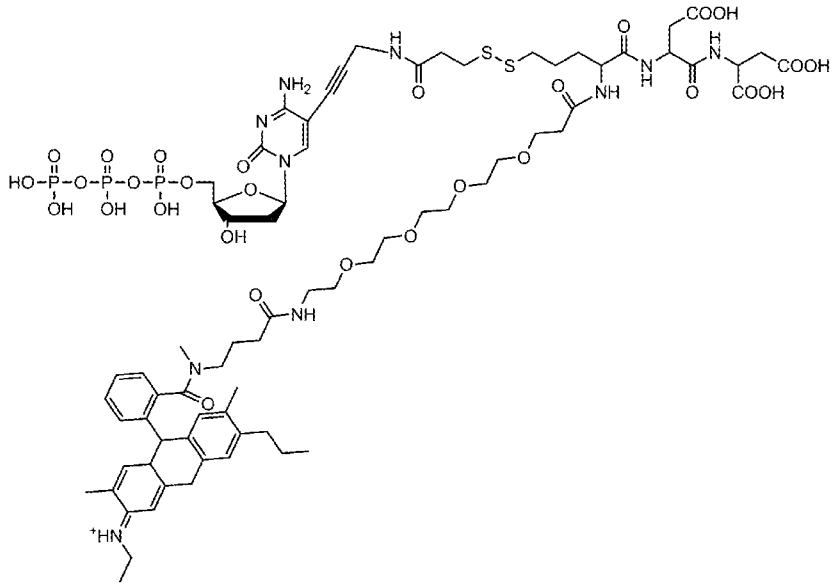
（71）、



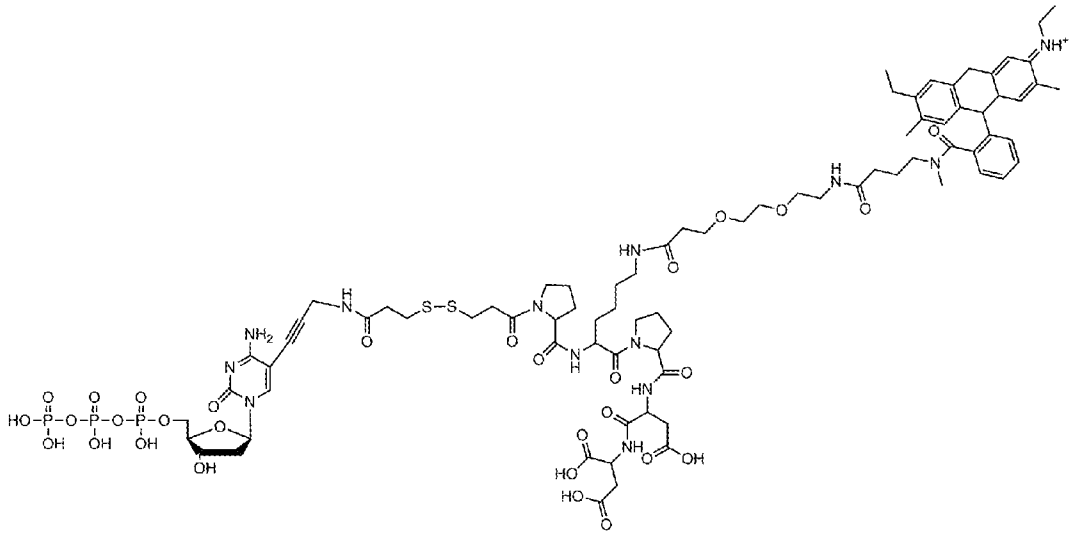
（72）、



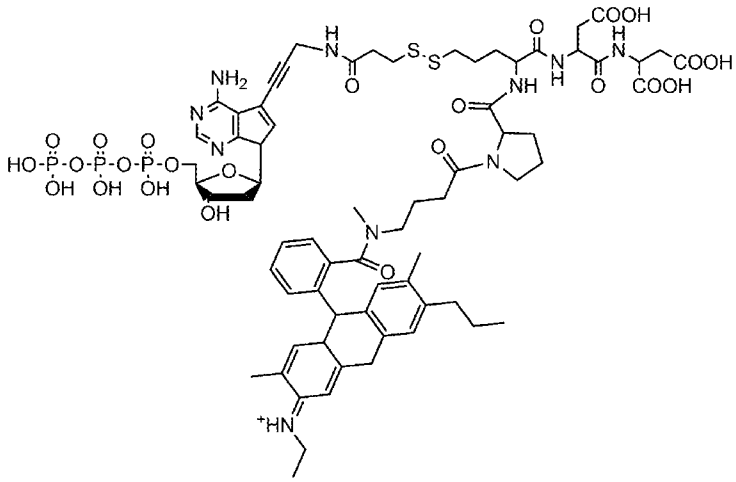
（73）、



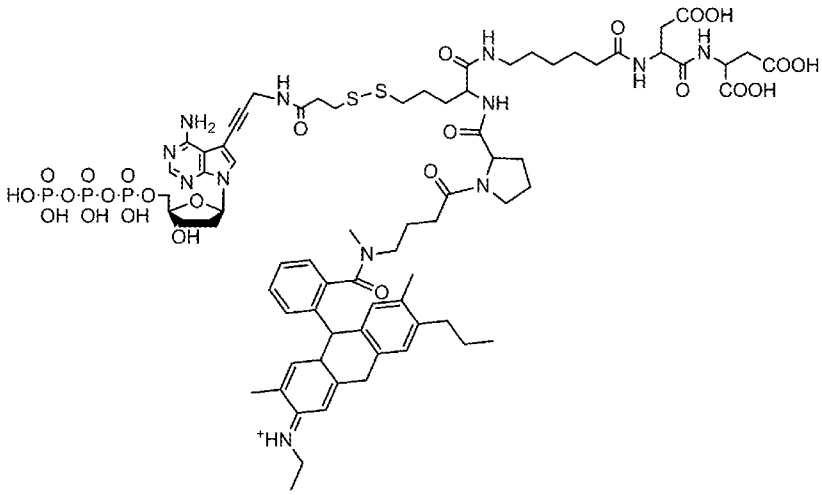
（74）、



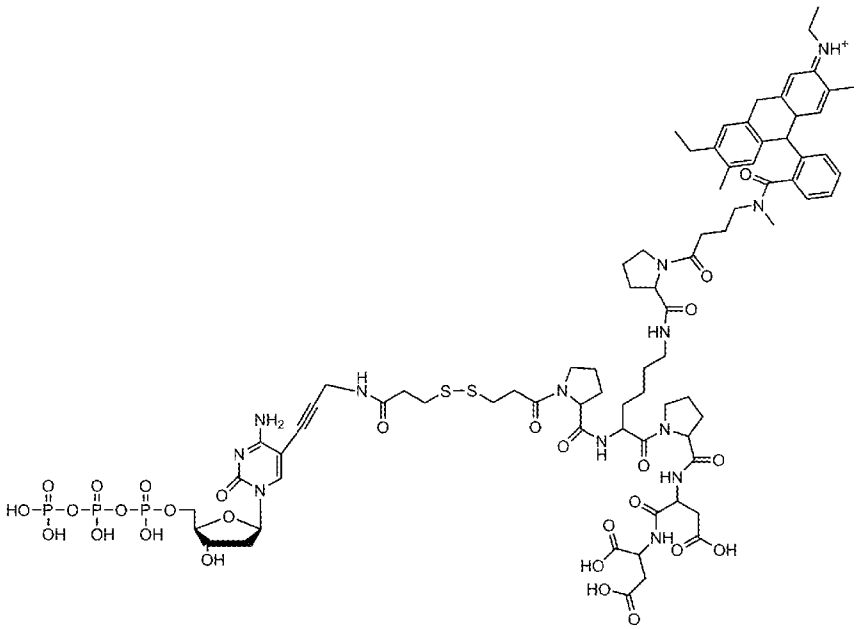
（75）、



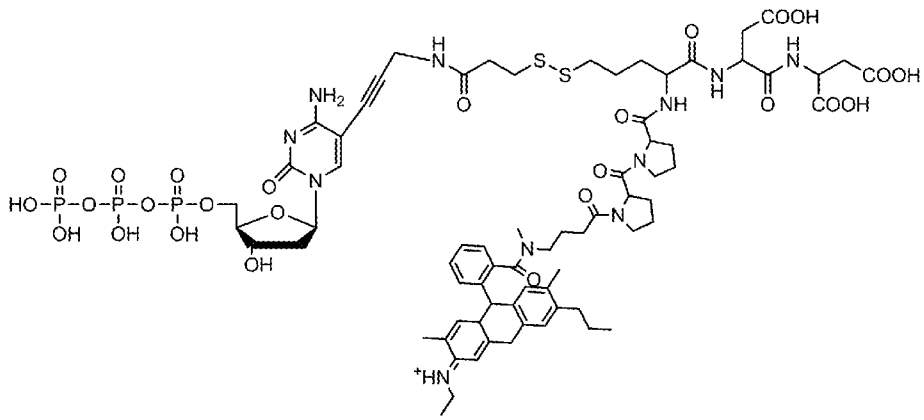
（76）、



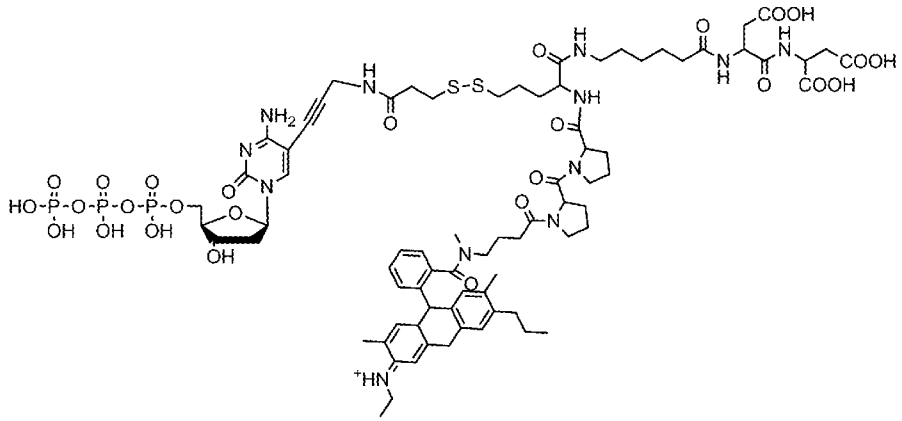
（77），



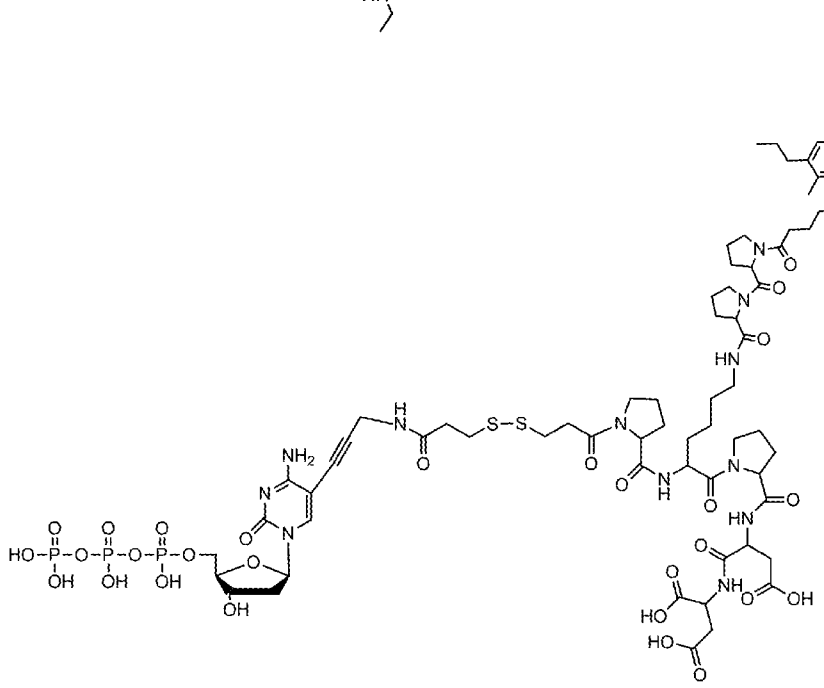
（78）、



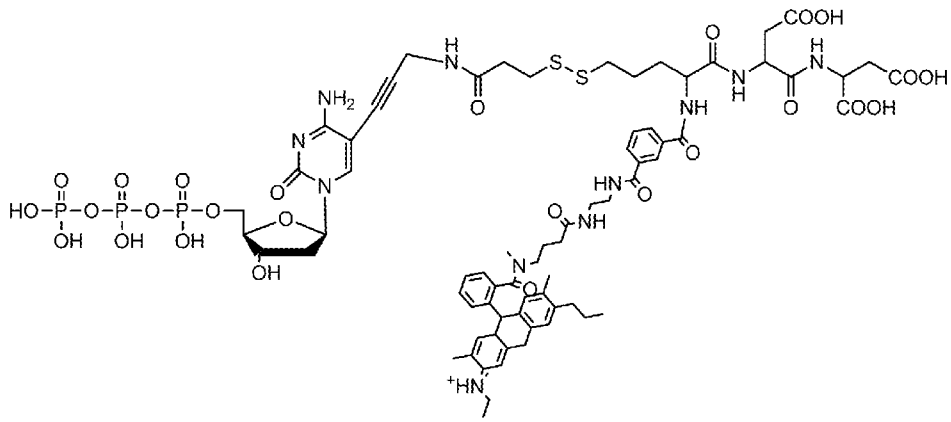
(79)、



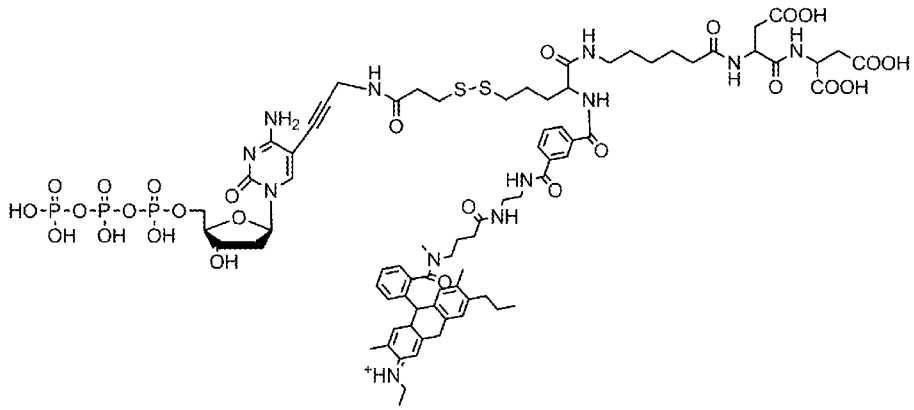
(80)、



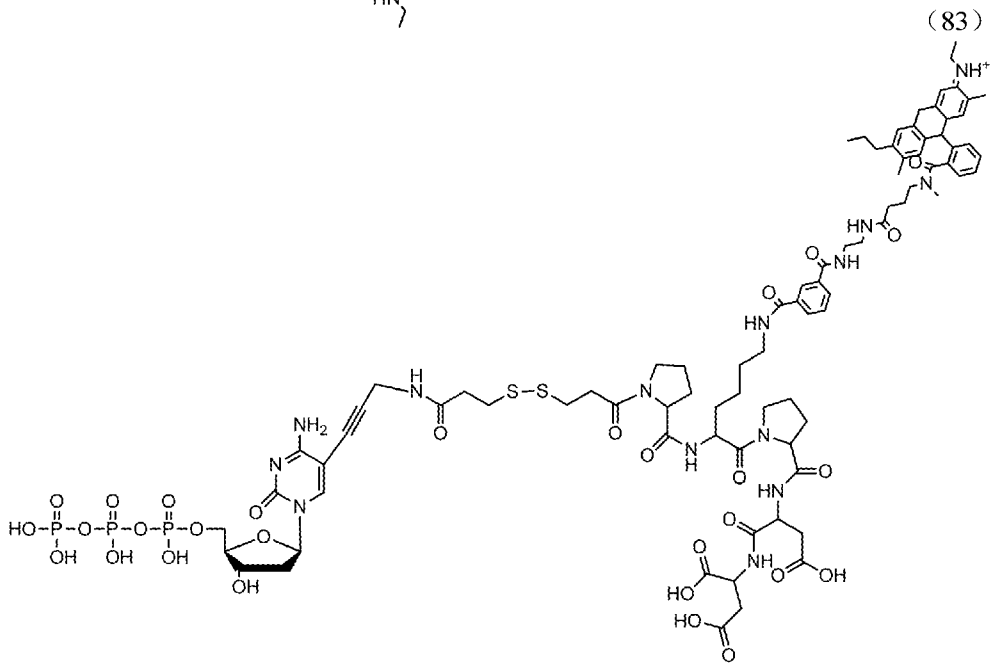
(81)、



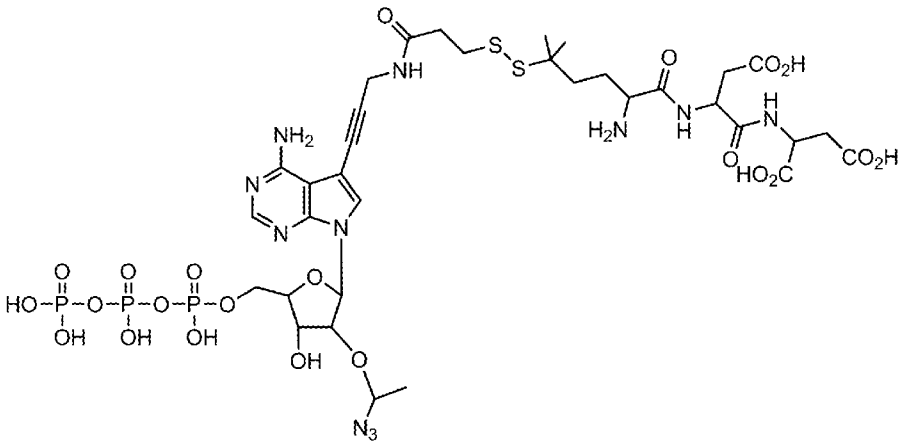
（82）、



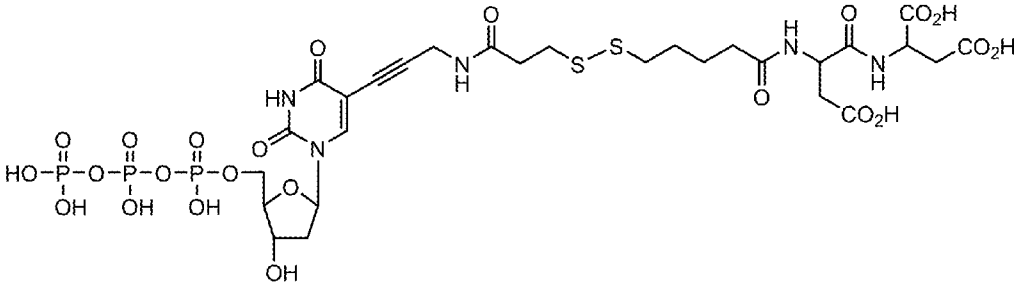
（83）



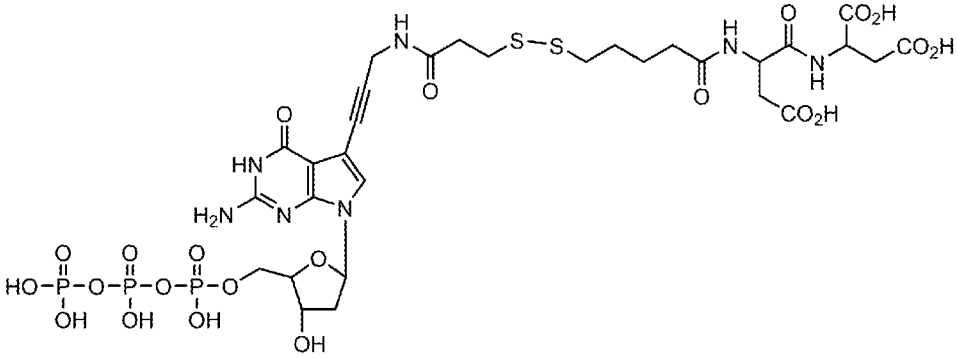
（84）、



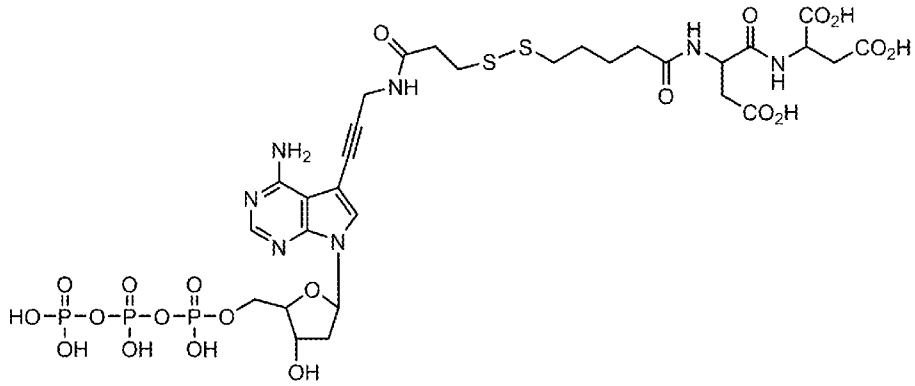
(85)、



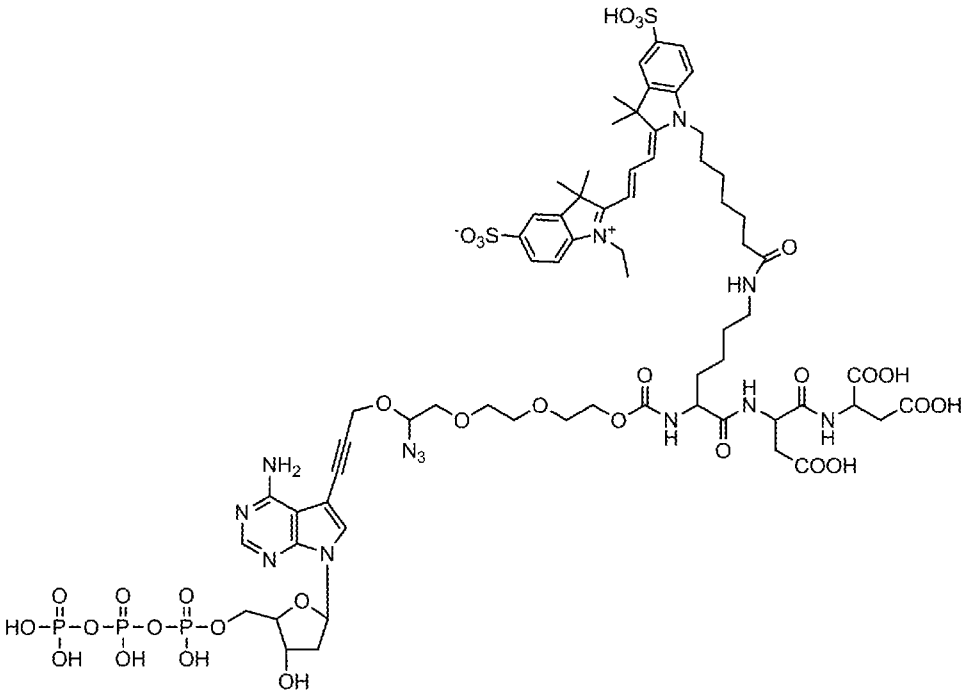
(86)、



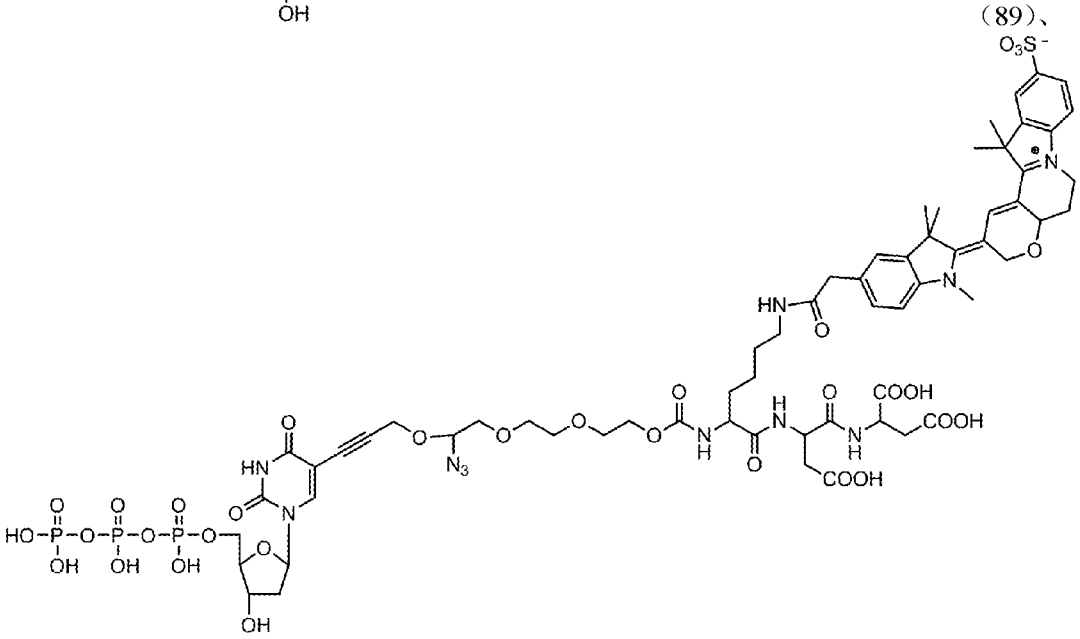
(87)、



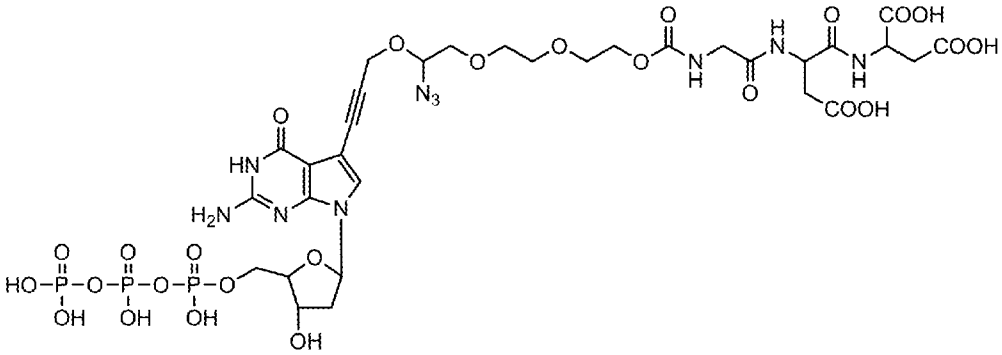
(88)、



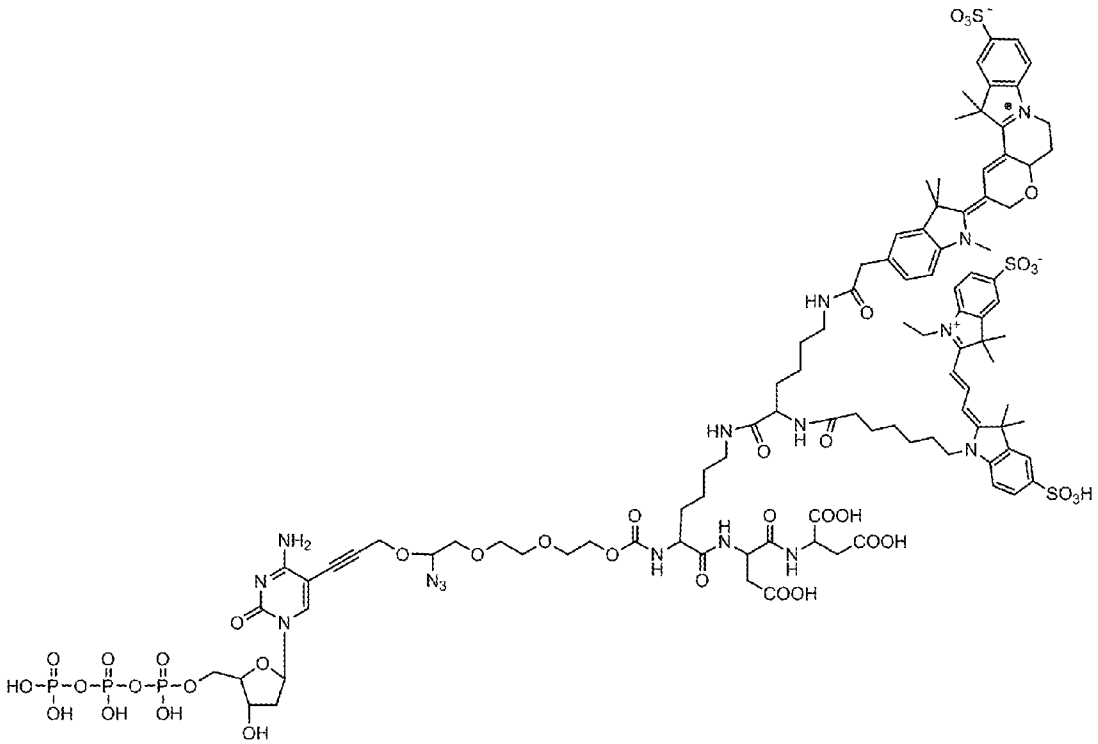
(89)、



(90)、



(91)、



（92）。

根据本发明的实施例，提供一种 dNTP 类似物，该 dNTP 类似物包括选自下列的至少之一：dATP 类似物、dCTP、dGTP 和 dTTP 类似物，该四种核苷酸类似物选自上述任一实施例中的化合物，各自的 B 为碱基 A、C、G 和 T。

根据本发明的实施例，提出了一种 NTP 类似物。根据本发明的实施例，该 NTP 类似物选自下列的至少之一：ATP 类似物，CTP 类似物，GTP 类似物，和 UTP 类似物，所称的 ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物和 UTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 U。

根据本发明的实施例，提出了一种 dNTP 类似物混合物。根该 dNTP 类似物混合物包括 dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物，所称的 dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 T，并且所称的 dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物中的至少三种分别具有不同的可检测基团或者靶向基团。

根据本发明的实施例，该 dNTP 类似物混合物，包括下述任意两种核苷酸类似物的组合：dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物，所称的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 T，其中，组合中两种核苷酸类似物具有不同的可检测基团或者靶向基团。

根据本发明的实施例，提出了一种 NTP 类似物混合物。该 NTP 类似物混合物包括 ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物为前面的化合物和 UTP 类似物，所称的 ATP、CTP、GTP 和 UTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 U，其中，组合中三种核苷酸类似物具有不同的可检测基团或者靶向基团。根据本发明的实施例，提出了一种 NTP 类似物混合物。该 NTP 类似物混合物，包括下述任意两种核苷酸类似物的组合：ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物为前面的化合物和 UTP 类似物，所称的 ATP、CTP、GTP 和 UTP 类似物为前面所示的结构式如式（I）的化合物，各自的 B 分别为碱基 A、C、G 和 U，，其中，组合中两种核苷酸类似物具有不同的可检测基团。

根据本发明的实施例，提出了前面任一实施例中的 dNTP 类似物、NTP 类似物、dNTP 类似物混合物或者 NTP 类似物混合物在核酸测序或者可控聚合酶链式反应或者碱基延伸反应中的用途。

根据本发明的实施例，提出了一种用于核酸测序或者可控链式聚合酶反应的试剂盒。该试剂盒包括：前面任一实施例中的 dNTP 类似物、NTP 类似物、dNTP 类似物混合物或者、NTP 类似物混合物。该试剂盒能用于 DNA 和/或 RNA 序列测定。

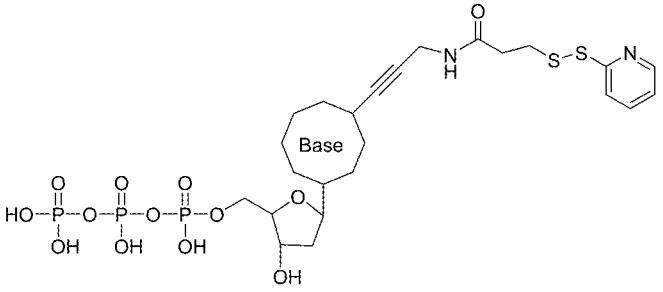
根据本发明的实施例，该试剂盒进一步包括：切断试剂，所称的切断试剂可作用于可切割基团或者可切割键；和/或 DNA 聚合酶。

化合物制备

根据本发明的实施例，提供一种制备前面任一实施例中的核苷酸类似物的方法，该方法包括：利用

二硫二吡啶和巯基丙酸合成 SPDP；利用式（10-2）所示化合物和氯代甲酸乙酯合成第一连接结构，第一连接结构为式（10-7）所示化合物；连接 dNTP 和 SPDP，获得 dNTP-SPDP；利用第一连接结构和 dNTP-SPDP，合成化合物。

具体地，dNTP-SPDP 可通过式（31-4）所示化合物与 dNTP 发生缩合反应获得，进一步地，将 dNTP-SPDP 与式（10-7）的化合物发生交换反应，以便获得目标化合物，



（dNTP-SPDP）。在一些示例中，dNTP 为 dATP，该 dATP 可以购买或自己合成获得。在一个示例中，dATP 可通过如下步骤获得：1）将式（10-51）所示化合物和三氟乙酰丙炔胺发生偶联反应，以便获得式（10-52）所示化合物；2）将式（10-52）所示化合物和焦磷酸盐发生成取代反应，以获得该 dATP。

式（31-4）所示化合物可定制购买，也可通过如下步骤获得的：二硫二吡啶和巯基丙酸发生交换反应，之后再与 NBS 发生酯化反应。

式（10-7）所示化合物的化合物可商业购买，也可通过将式（10-6）所示的化合物与 NH_2OH 发生酯交换反应而获得。

式（10-6）所示的化合物可商业购买，也可通过如下方式获得的：a）将式（10-4）所示的化合物与 NHS 发生缩合反应，以便得到式（10-5）所示的化合物；b）将式（10-5）所示化合物与 H-Asp-Asp-OH 发生酯交换反应，以便得到式（10-6）所示的化合物。

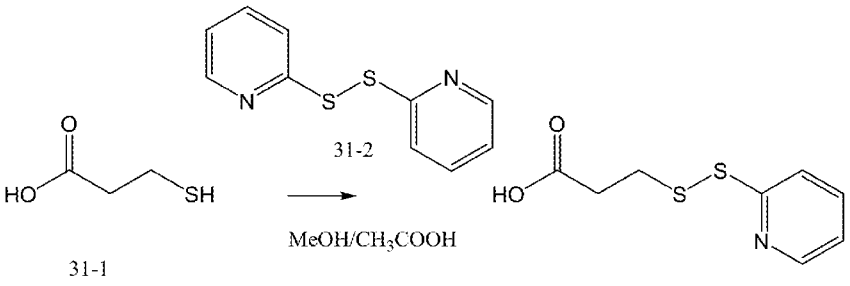
式（10-4）所示的化合物可商业购买，也可通过将式（10-3）所示的化合物与三氟乙酸发生酯水解反应获得的。

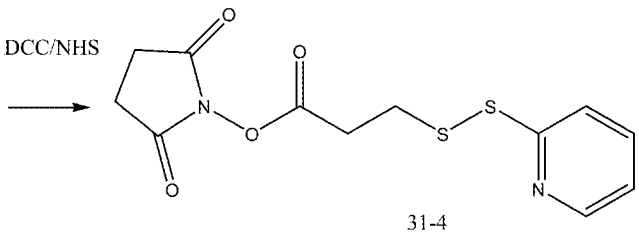
式（10-3）所示的化合物可商业购买，也可通过将式（10-2）所示的化合物与 MsCl 发生酯化反应，之后再与 $KSCOCH_3$ 发生酯交换反应获得的。

式（10-2）所示的化合物可商业购买，也可通过将式（10-1）所示的化合物与氯代甲酸乙酯发生酯交换反应，之后再与 $NaBH_4$ 发生还原反应获得的。

进一步具体说明如下：合成式（I）所示化合物的方法，以下（1）-（3）无先后顺序要求：

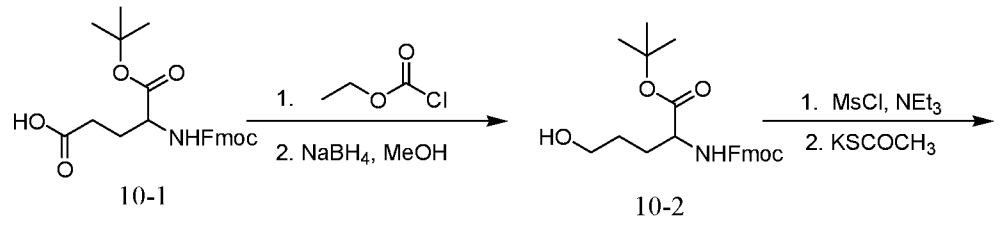
（1）SPDP 的合成



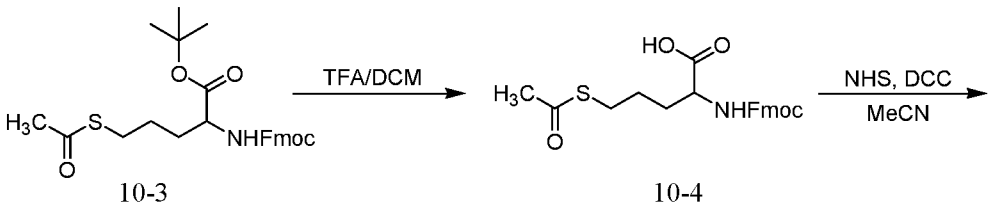


二硫二吡啶溶于 30ml 的乙醇中,加入 300ul 的乙酸，向混合溶液中逐滴加入 636mg 的巯基丙酸（溶于 15ml 的乙醇），30min 内滴完，室温下搅拌过夜，旋干，过硅胶柱，（EA/HX=2/3-1/1）产物旋干，NHS 活化，过硅胶柱（EA/HX=1/4-1/2），得到产物为白色固体。SPDP 的核磁图谱(H 谱）见图 1。

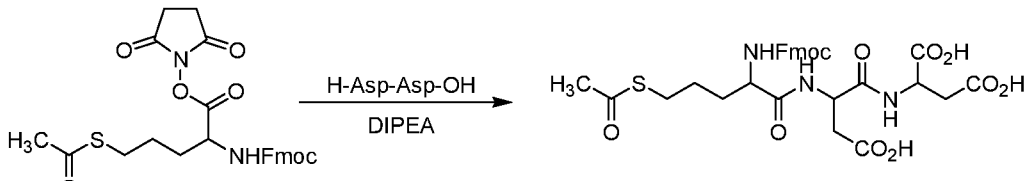
（2）碱基和 R_3 之间的结构（V_1-linker）的合成



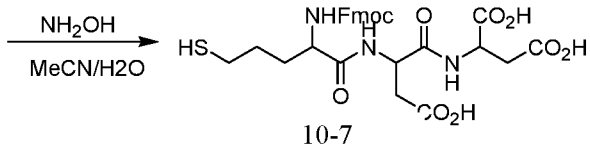
10-1 10-2



10-3 10-4



10-5 10-6



10-7

化合物 10-2 1.02g 化合物 10-1（2.35mmol）溶于 12mL THF 中，在 0°C 时，0.4mL 三乙胺与 0.3mL 的氯代甲酸乙酯加入体系中，在 Ar 的氛围下，搅拌 10 分钟，0.27g 的 $NaBH_4$(7.1mmol)分多次加入，搅拌的过程中，23mL 的乙醇在 10 分钟内慢慢加入，在常温下，搅拌至反应到达室温，再加入 10% HCl(10mL)酸化。将有机相用真空拉干。上柱纯化，得到 0.97g 化合物 10-2。

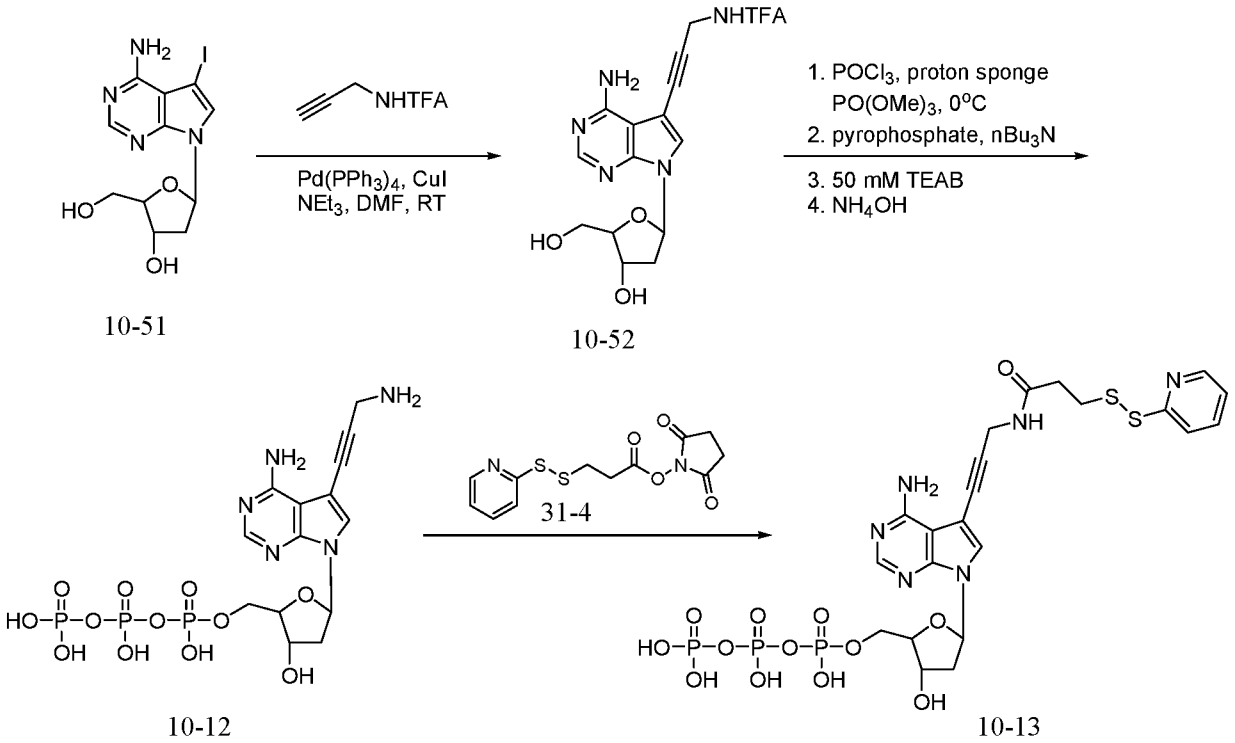
化合物 10-3 0.97g 化合物 10-2（2.35mmol）溶于 9mLCH_2Cl_2 中，加入 0.7mL 三乙胺（5.0mmol)将反应体系冷却至 0°C。0.28mL MsCl（3.6mmol)在 15min 中慢慢的滴入。用 TLC 板检测至起始原料消失后，反应物用（2*25mL）的水清洗，用无水 Na_2SO_4 干燥。拉干成固体。将 0.54g 的 $KSCOCH_3$（4.7mmol）加入以上固体的乙腈（6mL）中，在室温下，反应 12 小时。用 5%-20%EtOAc/正己烷的体系，过柱纯化。得到 0.57g 褐色油状固体化合物 10-3。

化合物 10-4 0.29g 化合物 10-3（0.61mmol)溶于 2mLCH_2Cl_2 中,向这个体系中，加入 2mL 的三氟乙酸，在常温下，反应 30min，然后用（2*20mL）的饱和食盐水洗涤，有机层用无水 Na_2SO_4 干燥，得到化合物 10-4（0.22g ,88%产率）。

化合物 10-6 将化合物 10-4(0.22g,0.53mmol) 溶于 3mL 乙腈中，DCC（0.12g，0.58mmol），NHS(0.07g,0.63mmol)加入到反应体系中，在常温下，搅拌 1 个小时，过滤完反应生成的白色固体 DCU 后，加入 H-Asp-Asp-OH(0.13g，0.52mmol)，其 2.4mL(0.25M) K_2HPO_4 与 1mL 乙腈的混合液溶解它，再加入 0.15mL DIPEA 保证其 pH 在 8 左右。用 HPLC 纯化，拿到化合物 10-6（0.25g，75%产率）。

化合物 10-7 0.023mg 化合物 10-6 溶于 0.5mL 50%MeCN/H_2O 混合液中，用 0.5mL 的 1M NH_2OH 处理此混合液，此反应在室温下搅拌 10min 后，洋浦 HPLC 进行纯化，拿到化合物 10-7。

（3）化合物 dATP-SPDP 的合成



10-51 10-52

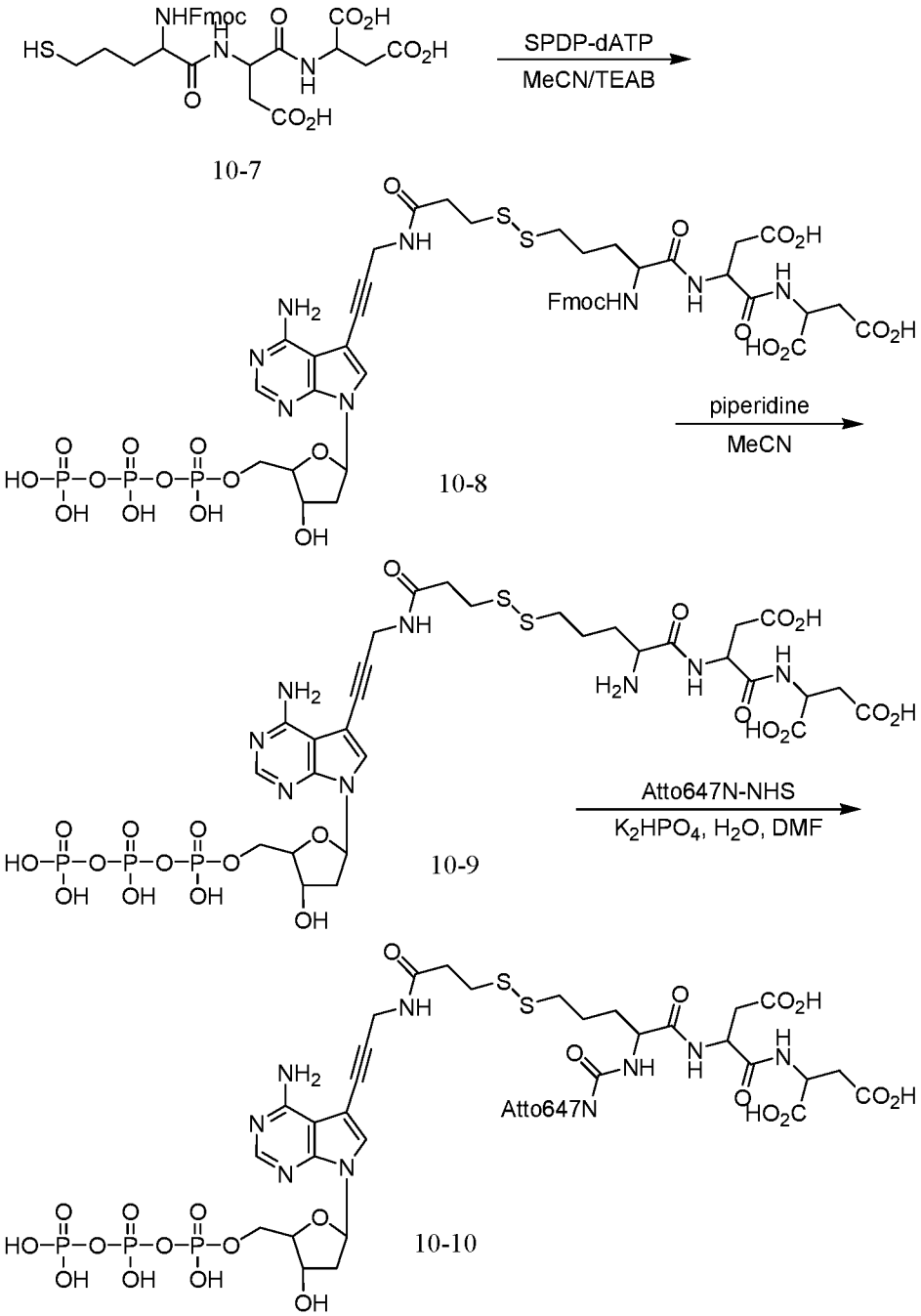
10-12 10-13

化合物 10-52 在 1 L 的三口烧瓶中，依次加入化合物 10-51(70 g)、DMF (700 mL)、三氟乙酰丙炔胺 (21.5 g)，TEA(35.8 g)、$Pd(PPh_3)_4$ (13.7 g)、CuI (4.6 g)，使用氮气置换反应体系三次，在 35 ℃，氮气保护中搅拌反应 3-4 h，TLC 监控反应，展开剂（EA:Hex=1:1）。将反应液倒入 1.2 L 水中，再使用 EA(500 mL*2)萃取，合并油层，油层用饱和氯化铵水溶液洗涤 500 mL*2，再用饱和氯化钠水溶液 (500 mL*2) 洗涤，油层使用无水硫酸钠干燥，旋干得到 99 g 深褐色固体。粗品采用 DCM 300 mL，再缓慢加入 Hex200 mL，于 0 ℃ 静置过夜重结晶，过滤得到淡黄色固体产品，用 (EA/Hex=1/5, v/v) 的混合溶剂（100 mL）洗涤淋洗固体，35 ℃ 真空干燥固体，合并母液，继续重结晶，最终得到淡黄色固体产品 43.6 g，摩尔产率为 60%。

化合物 10-12 将化合物 10-52（500 mg）与 Proton sponge（431 mg）混合于 100 mL 圆底烧瓶中并使用无水乙腈（10 mL）完全溶解，然后在旋转蒸发仪上除去乙腈，重复操作 3 次，将所得混合物放置于高真空油泵上抽过夜。次日，在混合物中加入磁力搅拌子，使用 $PO(OMe)_3$（10 mL）溶解，然后将混合液在高真空油泵上抽 5 分钟，使用三通换氩气，重复操作 3 次。接着将其放置于冰水浴中搅拌 5-10 分钟，将 $POCl_3$（0.14 mL）在 1 分钟左右加入到反应体系中，然后维持在冰水浴中将反应搅拌 3 个小时。在 100 mL 圆底烧瓶中将$(Bu_3N)_2PPi$（1383 mg）溶解于无水 DMF（10 mL），加入磁力搅拌子并将其在高真空油泵上抽 5 分钟，使用三通换氩气，重复 3 次。接着加入 Bu3N（1.17 mL）并将其放置于冰水浴中搅拌 5-10 分钟，将步骤 2 中的混合液在 2-3 分钟内滴加到步骤 3 准备好的反应液中（可使用少量 $PO(OMe)_3$ 清洗瓶子，并将清洗液滴加到步骤 3 准备好的反应液中）。滴加完毕后将反应体系保持在冰水浴中搅拌 2 个小时.反应完毕后在冰水浴中将配好的 TEAB（1 mol，10 mL）加入到反应体系中，接着搅拌 1 个小时。将使用去离子水浸泡的 DEAE 树脂装入闪式层析柱中（约 10 cm 长）。将反应液使用去离子水稀释（120 mL），然后将其转移到装有树脂的闪式层析柱中。依次用 300mL 去离子水，TEAB 溶液（浓度分别为 0.1 M，0.2 M，0.4 M，0.6 M，0.8 M，1M，每一种浓度 300mL）淋洗，采用 UV 监测馏分，0.4M 开始有产物出来。在 27 ℃ 下使用旋转蒸发仪除去 TEAB 缓冲液和水。往旋干得到的混合物中加入磁力搅拌子以及浓氨水（100 mL），搅拌 24 小时后，在 27 ℃ 下使用旋转蒸发仪除去氨水。

化合物 10-13 将 SPDP（0.5mL，0.1M 在无水 DMF，1.25eq）加入到化合物 10-12 的水溶液中，将 pH 调到 8.5 左右，反应 10min，用 HPLC 进行纯化（buffer A 0.1M TEAB, Buffer B 乙腈），化合物 10-13 的质谱 M/Z=739.15。

（4）化合物 dATP-V_1-S-S-ATTO647N 的合成



。

化合物 10-8　将化合物 10-7 的 HPLC 组分与化合物 13 的 HPLC 组分加入在一起，在常温下，搅拌 15 分钟，浓缩，然后 HPLC 纯化（buffer A 0.1M TEAB, Buffer B 乙腈），得到化合物 10-8，

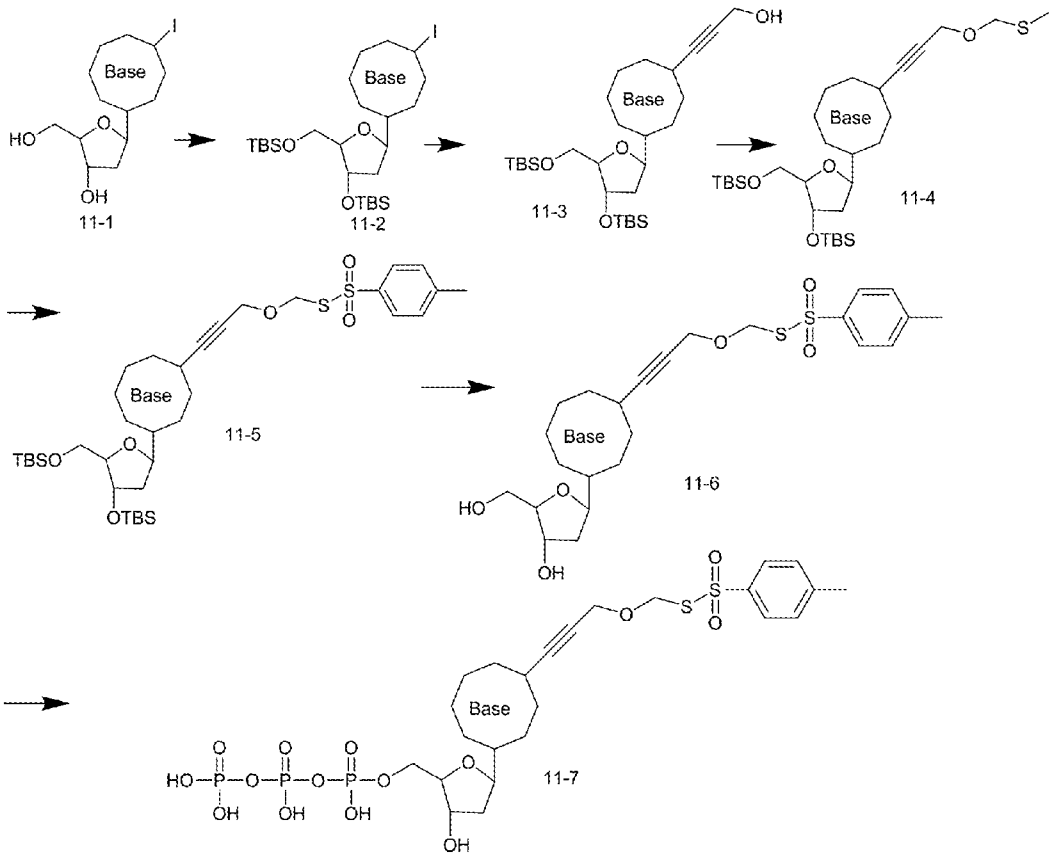
化合物 10-9　将化合物 10-8（约 16umol）用 2mL 20%piperidine/MeCN 和 1mL 20%piperdine/MeCN 处理 15 分钟，除去 Fmoc 保护基，再将反应上 HPLC 纯化（buffer A 0.1M TEAB, Buffer B 乙腈），得到化合物 10-9 的 HPLC 组分。

化合物 10-10　将 ATTO647N-NHS(0.36mL,36umol,0.1M 在无水 DMF 中)加入到化合物 10-9（17.6mL）的水和 DMF 的混合溶液中，用 HPLC 检测，待原料反应完了之后，HPLC 纯化 buffer A 0.1M TEAB，Buffer B 乙腈），得到化合物 10-10。

根据本发明的实施例，提供另一种制备前面任一实施例中的核苷酸类似物的方法，该方法包括：合成 dNTP-MPSSK；利用式（31-4）所示化合物和六肽合成第二连接结构，第二连接结构为式（11-10）所示的化合物，所称的六肽为 H-Pro-Lys(Fmoc)-Pro-Asp-Asp-OH；混合第二连接结构和 dNTP-MPSSK，以制得目标化合物。

以下具体示例该另一制备方法，以下（1）和（2）无先后顺序要求：

（1）dNTP-MPSSK 的合成



化合物 11-2　在氮气保护下，将化合物 11-1(10.2 g, 29.2 mmol, 1.0 eq)溶解在吡啶(80 mL)中，将 TBSCl(9.8 g, 35.1 mmol, 2.2 eq) 溶解在吡啶(30 mL)中，在冰水浴中 0℃滴加(控制 0℃反应副产物双保护的明显会少)。滴加完毕后，在 20℃下搅拌 12 小时。TLC 跟踪监测反应。反应结束后，加入 100mL 水淬灭反应。在旋转蒸发仪上 45℃除去吡啶，大约旋蒸至 80mL,将混合液倒入 800mL 水中，有白色固体析出，抽滤，用正己烷/乙酸乙酯(50mL, V 正己烷: V 乙酸乙酯=8 :1)淋洗 3 次，50℃鼓风 10 小时烘干得到白色固体化合物 11-2 (10.8 g, 80%)。

化合物 11-3　在 1 L 的三口烧瓶中，依次加入 2(10.8 g)、DMF (200mL)、炔丙醇(21.5 g)，TEA(35.8 g)、$Pd(PPh_3)_4$ (13.7 g)、CuI (4.6 g)，使用氮气置换反应体系三次，在 35 ℃，氮气保护中搅拌反应 3-4 h，TLC 监控反应，展开剂（EA:Hex=1:1）。将反应液倒入 1.2 L 水中，再使用 EA(500 mL*2)萃取，合并油层，油层用饱和氯化铵水溶液洗涤 500 mL*2，再用饱和氯化钠水溶液 (500 mL*2) 洗涤，油层使用无水硫酸钠干燥，旋干得到 99 g 深褐色固体。粗品采用 DCM 300 mL，再缓慢加入 Hex200 mL，于 0 ℃ 静置过夜重结晶，过滤得到淡黄色固体产品，用 (EA/Hex=1/5, v/v) 的混合溶剂（100 mL）洗涤淋洗固体，35 ℃ 真空干燥固体，合并母液，继续重结晶，最终得到淡黄色固体产品 12.6 g 化合物 11-3，

化合物 11-4　将化合物 11-3(10.8 g, 23.1 mmol, 1.0 eq)溶于 60mLDMSO 中，依次加入 30mL 醋酸和 60mL 醋酸酐。混合物在 25℃搅拌 12 小时。TLC 跟踪监测反应。反应结束后，加入 50mL 水淬灭反应，用 40 mL×2 EtOAc 萃取，合并有机相用 50 mL×2 水洗两遍，用饱和 $NaHCO_3$ 溶液洗涤有机相至 pH 为 7 左右。分离有机相，饱和 NaCl 溶液(100 mL)洗涤，无水 Na_2SO_4 干燥，38℃旋蒸除去溶剂，得到黄色油状粗产品化合物 11-4。

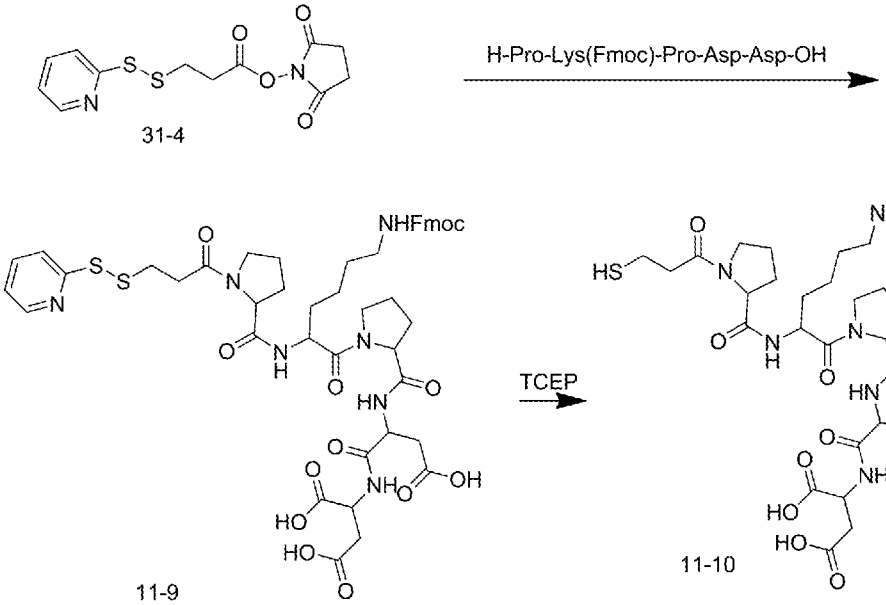
化合物 11-5　将化合物 11-4（0.48mmol）溶于 5mL DCM 中，加入环已烷（2.88mmol），SO_2Cl（0.96mmol）在室温下搅拌 1 个小时，有 TLC 对反应体系进行检测，拉干体系，在 4mL 的 DMF 中溶解，加入 p-$MePhSO_2SK$（1.44ml）在常温下反应一个小时，反应液用 EA 萃取，用饱和食盐水洗涤，过柱，得到化合物 11-5。

化合物 11-6　将化合物 11-5(7.39 mmol, 1.0 eq)溶解于 40mL 四氢呋喃中，加入三乙胺三氢氟酸盐 (7.14g, 44.4 mmol, 6 eq)，25℃搅拌反应 12 小时。TLC 跟踪监测反应。25℃旋蒸除去溶剂。加入 25mL 乙酸乙酯和 15mL 水，分离有机相，水相继续用 EtOAc (10mL×3)萃取三次，直至水相中没有产品。合并有机相，38℃旋蒸除去溶剂得粗品 4g。粗产品过柱，依次用 DCM，DCM: MeOH（100:1 /90:1/80:1/60:1/50:1/40:1/30:1/20:1)分离得到棕黄色固体化合物 11-6 (2.0g, 63%)。

化合物 11-7　化合物 11-6（500 mg）与质子海绵（Proton sponge）（431 mg）混合于 100 mL 圆底烧瓶中并使用无水乙腈（10 mL）完全溶解，然后在旋转蒸发仪上除去乙腈，重复操作 3 次，将所得混合

物放置于高真空油泵上抽过夜。次日，在混合物中加入磁力搅拌子，使用 $PO(OMe)_3$（10 mL）溶解，然后将混合液在高真空油泵上抽 5 分钟，使用三通换氩气，重复操作 3 次。接着将其放置于冰水浴中搅拌 5-10 分钟，将 $POCl_3$（0.14 mL）在 1 分钟左右加入到反应体系中，然后维持在冰水浴中将反应搅拌 3 个小时。在 100 mL 圆底烧瓶中将$(Bu_3N)_2PPi$（1383 mg）溶解于无水 DMF（10 mL），加入磁力搅拌子并将其在高真空油泵上抽 5 分钟，使用三通换氩气，重复 3 次。接着加入 Bu3N（1.17 mL）并将其放置于冰水浴中搅拌 5-10 分钟，将步骤 2 中的混合液在 2-3 分钟内滴加到步骤 3 准备好的反应液中（可使用少量 $PO(OMe)_3$ 清洗瓶子，并将清洗液滴加到步骤 3 准备好的反应液中）。滴加完毕后将反应体系保持在冰水浴中搅拌 2 个小时。反应完毕后在冰水浴中将配好的 TEAB（1 mol，10 mL）加入到反应体系中，接着搅拌 1 个小时。将使用去离子水浸泡的 DEAE 树脂装入闪式层析柱中（约 10 cm 长）。将反应液使用去离子水稀释（120 mL），然后将其转移到装有树脂的闪式层析柱中。依次用 300mL 去离子水，TEAB 溶液（浓度分别为 0.1 M，0.2 M，0.4 M，0.6 M，0.8 M，1M，每一种浓度 300mL）淋洗，采用 UV 监测馏分，0.4M 开始有产物出来。在 27 ℃ 下使用旋转蒸发仪除去 TEAB 缓冲液和水。往旋干得到的混合物中加入磁力搅拌子以及浓氨水（100 mL），搅拌 24 小时后，在 27 ℃ 下使用旋转蒸发仪除去氨水，得到化合物 11-7。

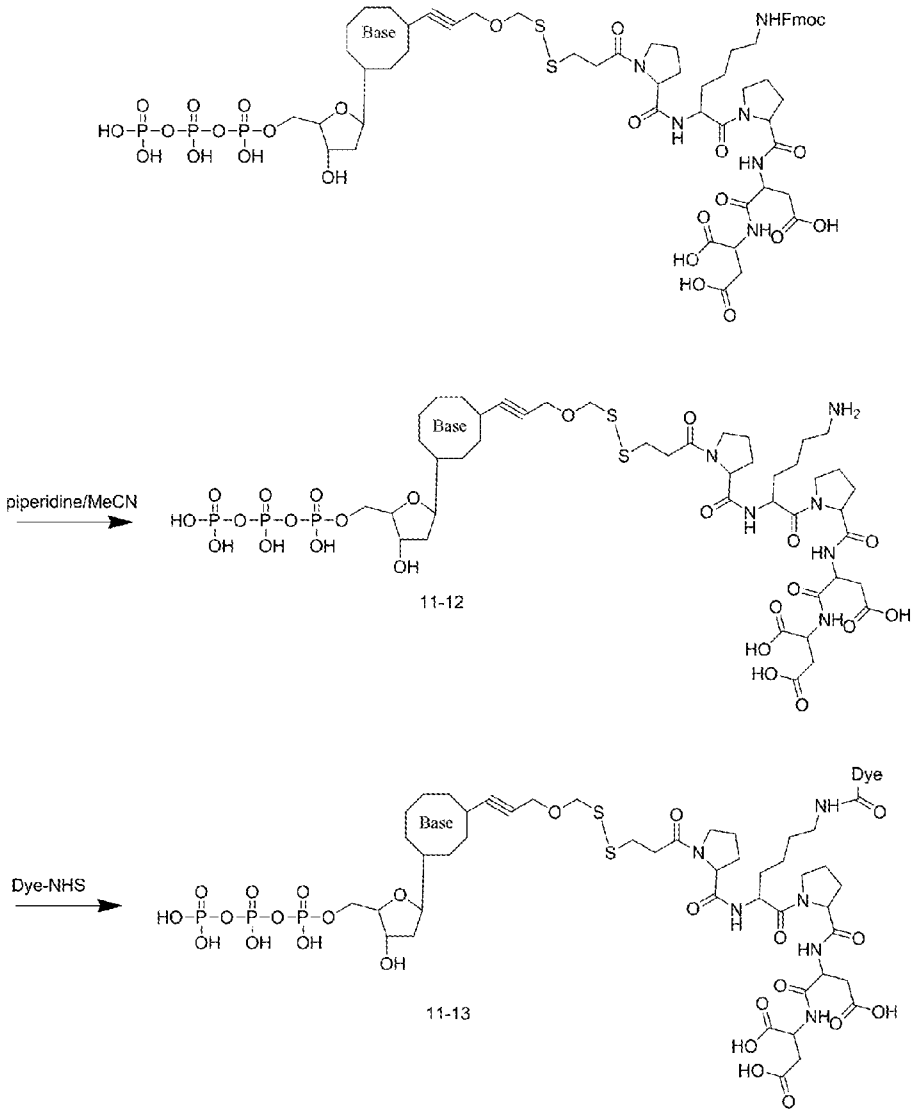
（2）碱基和 R_3 之间的结构（V_3-linker）的合成



化合物 11-9　称取 0.178mg（0.2mmol）六肽溶于 0.1M 的 K_2HPO_4（5ml）中，加入 SPDP 327mg(0.4mmol，4ml 的 DMF)，常温下反应 2h，HPLC 监控反应至六肽完全反应，HPLC 纯化后冻干。化合物 11-9 的质谱，M/Z=1087.3929。

化合物 11-10 0.046mg 化合物 11-9 溶于 0.5mL 50%MeCN/H_2O 混合液中，用 1mL 的 1M NH_2OH 处理此混合液，此反应在室温下搅拌 10min 后，洋浦 HPLC 进行纯化，拿到化合物 10。

（3）dNTP-5-O-S-S-V_3-Dye 的合成



化合物 11-11

将化合物 10 的 HPLC 组分与化合物 7 的 HPLC 组分加入在一起，在常温下，搅拌 15 分钟，浓缩，然后 HPLC 纯化（buffer A 0.1M TEAB, Buffer B 乙腈），得到化合物 11。

化合物 11-12

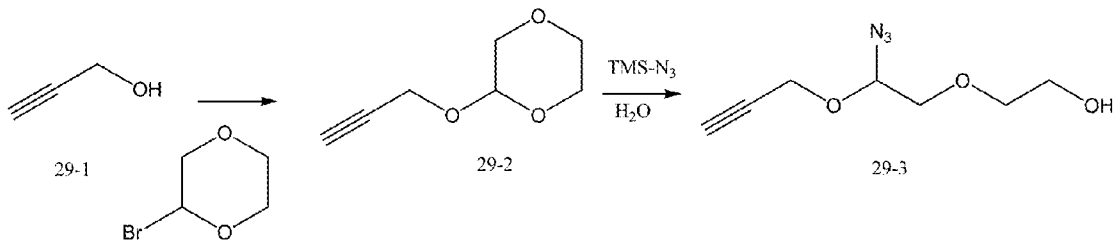
将化合物 11-11（约 16umol）用 2mL 20% piperidine/MeCN 和 1mL 20%piperdine/MeCN 处理 15 分钟，除去 Fmoc 保护基，再将反应上 HPLC 纯化（buffer A 0.1M TEAB, Buffer B 乙腈），得到化合物 11-12 的 HPLC 组分。

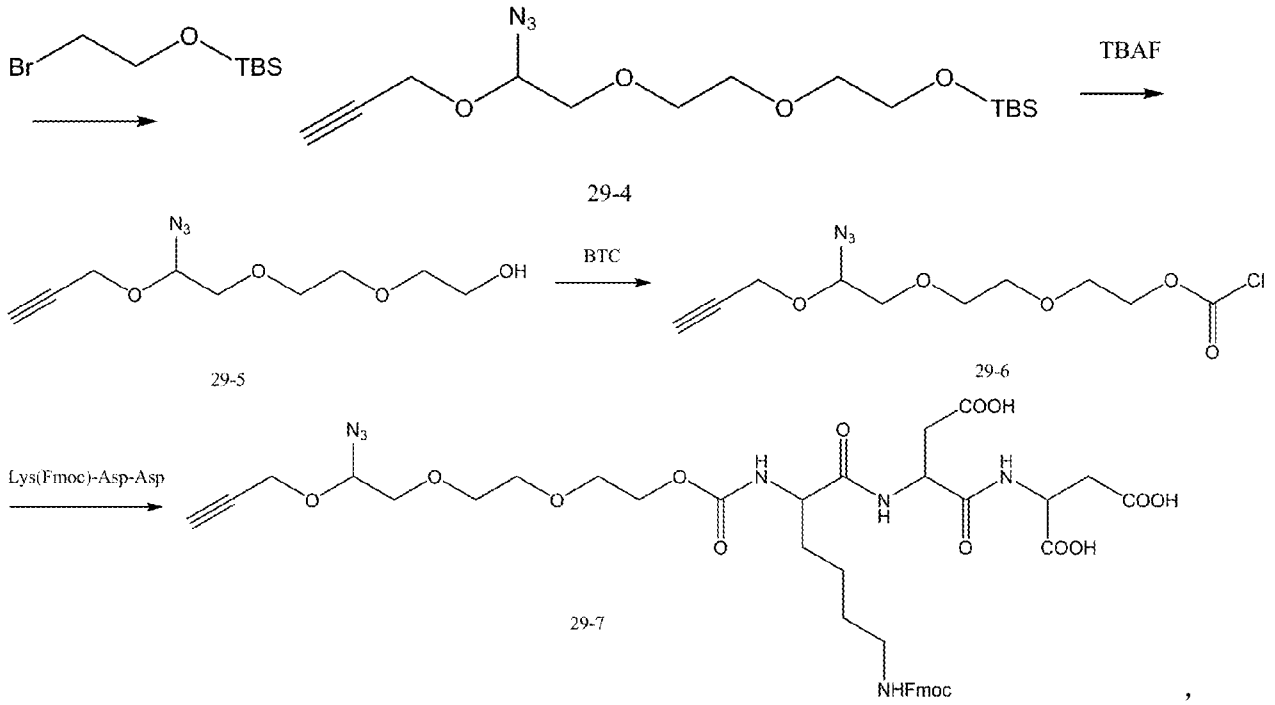
化合物 11-13

将 Dye-NHS(0.36mL,36umol,0.1M 在无水 DMF 中）加入到化合物 11-12（17.6mL）的水和 DMF 的混合溶液中，用 HPLC 检测，待原料反应完了之后，HPLC 纯化（buffer A 0.1M TEAB, Buffer B 乙腈），得到化合物 11-13。

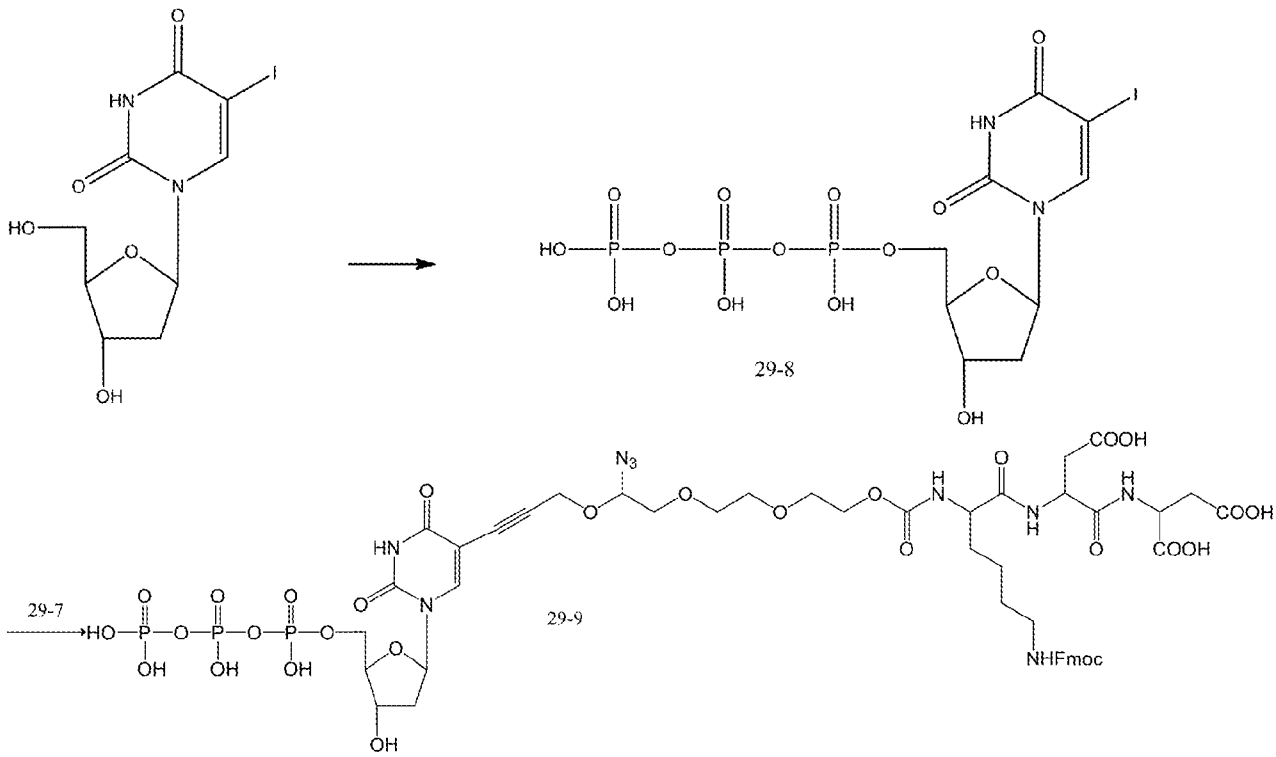
以下示例一种使用时无需加帽的核苷酸类似物（capless 核苷酸类似物）的合成路线，本领域技术人员通过以下示例的合成过程、上述示例具体反应条件的说明以及结合常规知识包括试验手段，能够制备得 capless 核苷酸类似物。所称的无需加帽包括使用该化合物时无需加帽步骤、加入加帽试剂等处理。

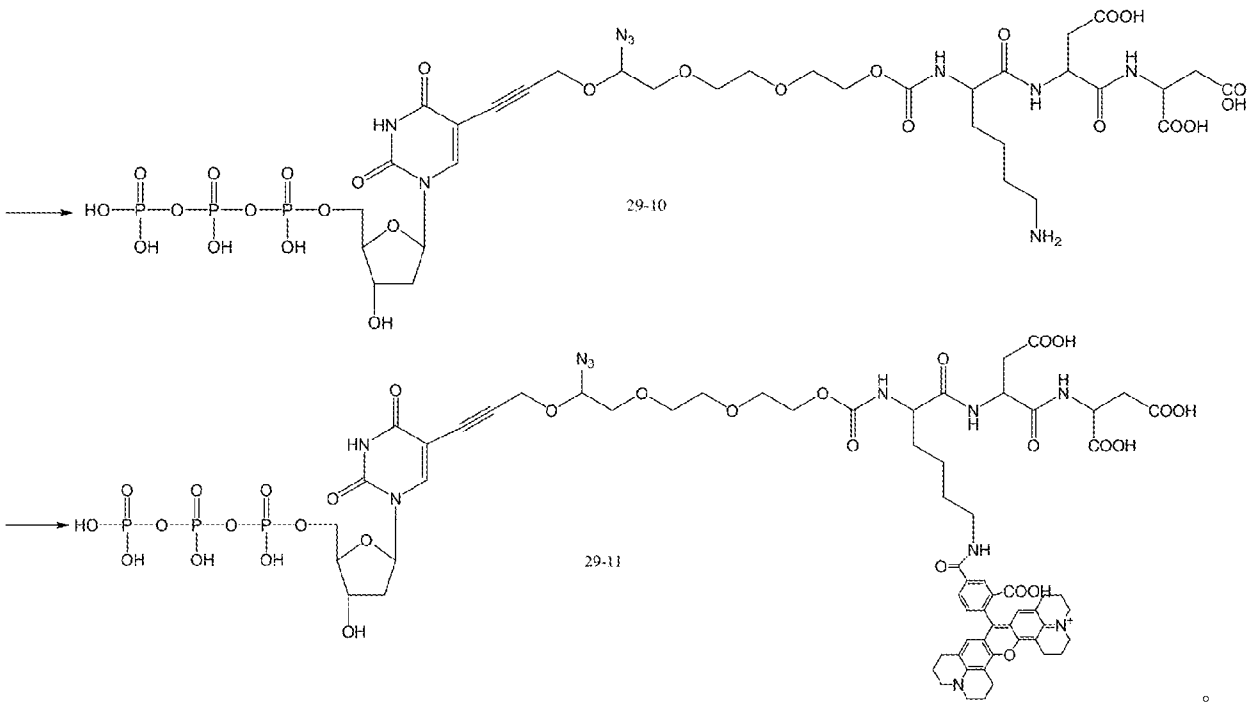
方案 1



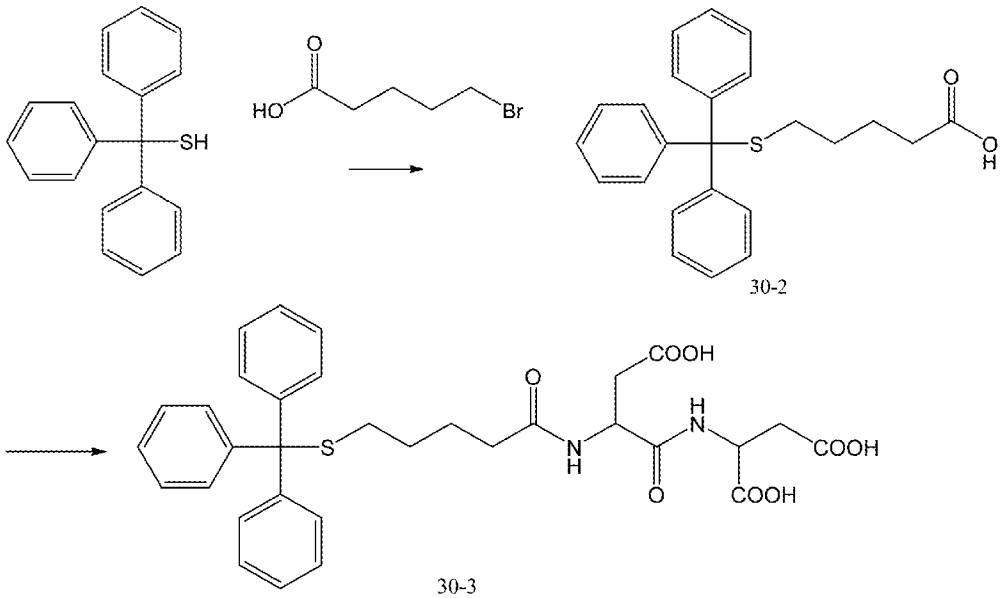


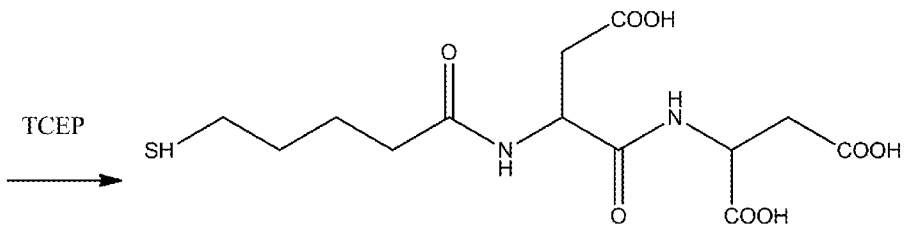
式（29-7）所示化合物可以进一步与碱基及其衍生物、核酸或脱氧核酸及其衍生物进行反应，以便得到式（I）所示化合物，示例如下：





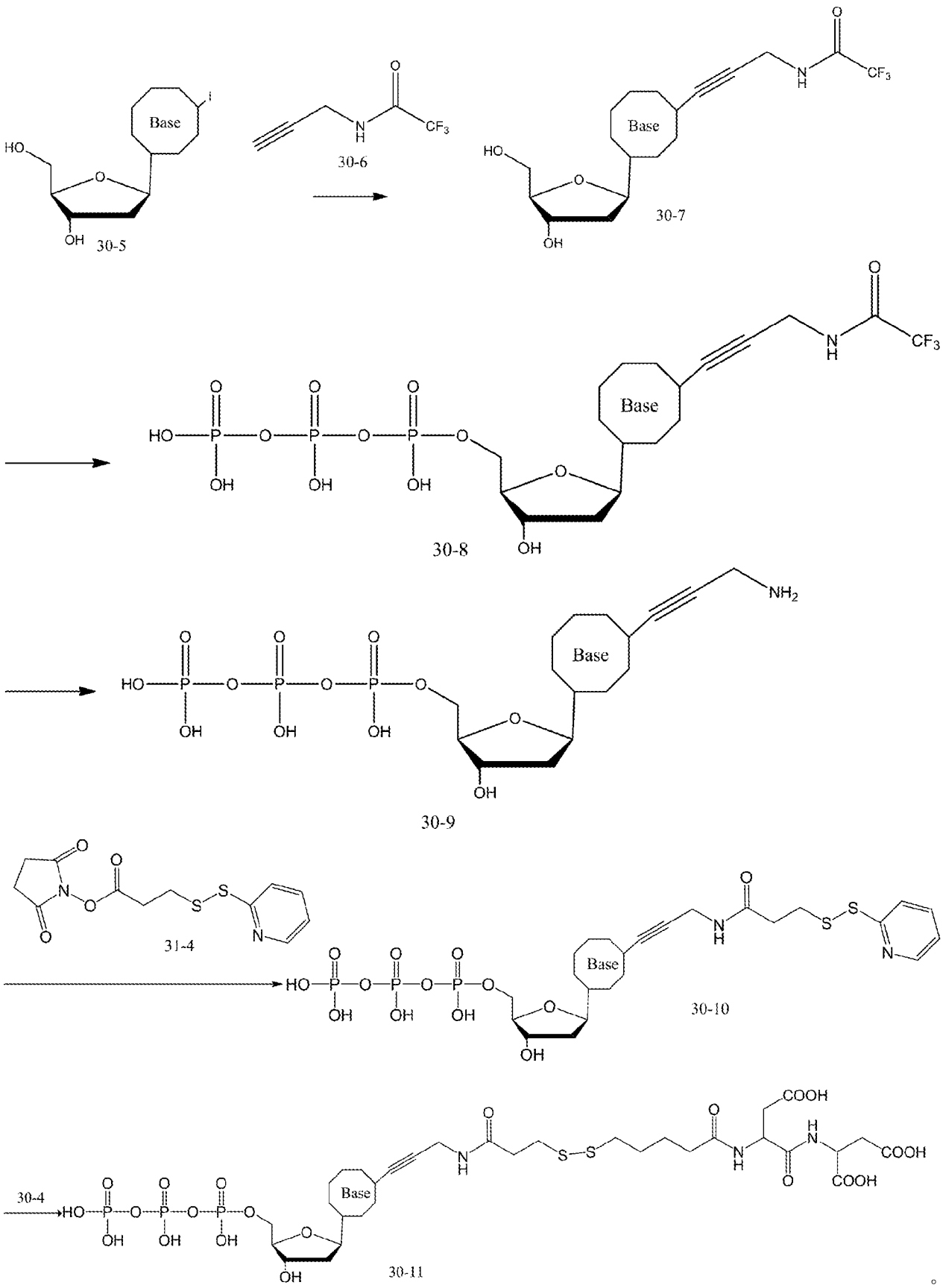
方案 2



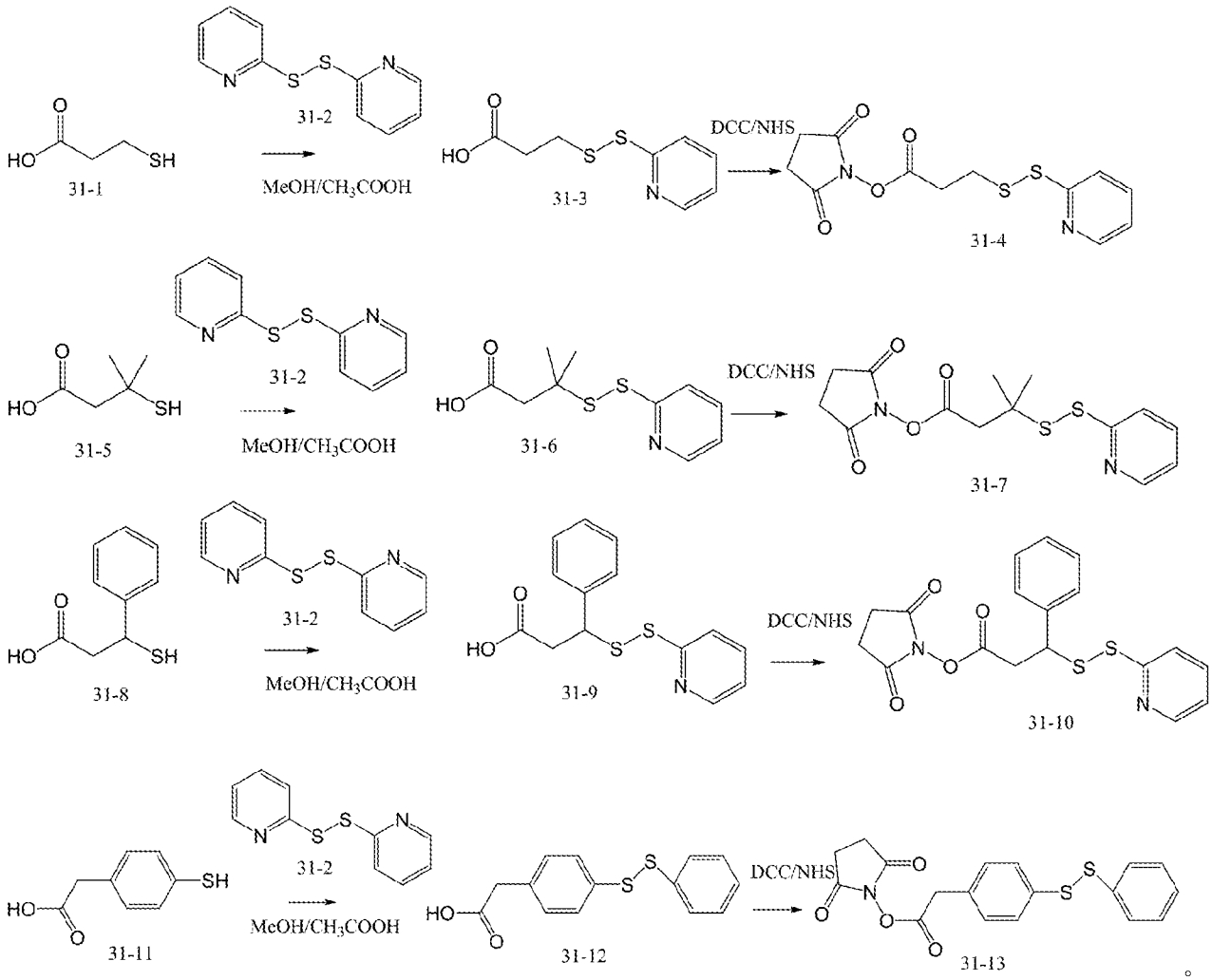


30-4

式（30-4）所示的化合物可以进一步与碱基及其衍生物、核酸或脱氧核酸及其衍生物进行反应，以便得到式（I）所示化合物，示例如下：



方案 3

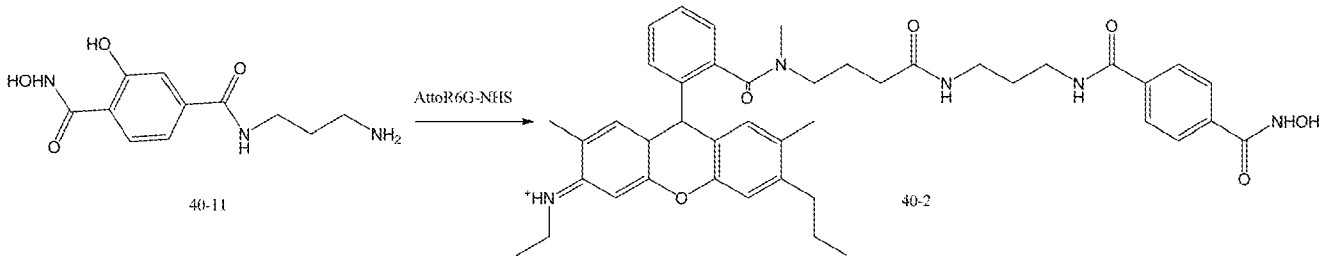


。

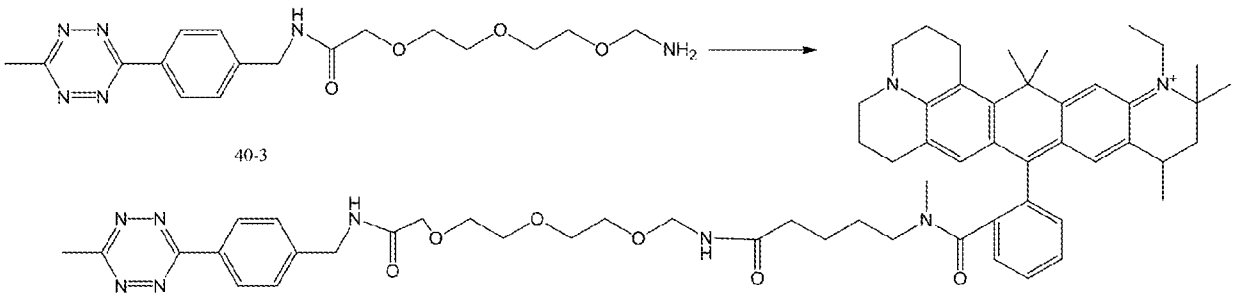
其中，式（31-7）、（31-10）、（31-13）所示的化合物可替换方案 2 中所用到的式（31-4）所示的化合物进行反应，以便获得相应的目标化合物，同时，式（31-7）、（31-10）、（31-13）所示的化合物可替换实施例 2 中所用到的式（31-4）所示的化合物进行碱基和 R_3 之间的结构（V_3-linker）的合成，以便得到相应的 V_3-linker。

以下示例带标记的染料的化合物的合成路线，所带的标记能够与带靶向基团的核苷酸类似物连接/结合。

方案 1



方案 2



40-3

40-4

。

化合物的应用

根据本发明的实施例，提供一种核酸序列测定方法，该方法包括：（a）将第一核酸模板-引物复合物、一种或多种核苷酸类似物以及 DNA 聚合酶的混合物置于适于碱基延伸的条件下，使核苷酸类似物结合到第一核酸模板-引物复合物上，获得延伸产物；核苷酸类似物选自前面的 dNTP 类似物或者前面的 NTP 类似物或者前面的dNTP类似物混合物或者前面的NTP类似物混合物。根据本发明实施例的方法能快速、准确地测定出样本的核酸序列。该方法利用上述任一实施例中的化合物进行碱基延伸，能够实现核酸序列测定。

第一核酸模板-引物复合物可以游离于液相环境中，也可以固定在特定位置。在一些示例中，第一核酸模板-引物复合物连接在固相载体上。例如，固定在芯片上或者微球上。

在一些示例中，该方法还包括：（b）作用于延伸产物上的可切割基团或可切割键，获得第二核酸模板-引物复合物；（c）以第二核酸模板引物复合物替代第一模板-引物复合物，进行（a）和（b）至少一次。

在一些示例中，（a）还包括：检测延伸产物，以获得对应于结合到该第一核酸模板-引物复合物上的核苷酸类似物的信号。

在一些示例中，该方法还包括：基于所称的信号，确定核酸序列。

在一些示例中，使用的核苷酸类似物包含靶向基团，（a）包括加入可检测化合物来获得延伸产物，所称的可检测化合物带有特异性基团能够与该靶向基团特异性结合。在一个具体示例中，使用的核苷酸类似物的 R_3 基团为靶向基团，例如化合物（31），（a）包括：在聚合酶的作用下，使核苷酸类似物结合到模板-引物复合物上，加入 Dibenzocyclooctyne（DBCO）标记的荧光分子，使得延伸产物（结合了核苷酸类似物的模板-引物复合物）带有荧光分子标记，以能够产生可检测信号。

在一个示例中，步骤（b）切割的作用位点为上述任一核苷酸类似物中的 C 基团位置，例如对结构式（3）的化合物，该化合物在溶液中可能通过 L2-R5 的空间折叠、电荷等使该化合物的碱基 3’-OH 不暴露/难以结合核苷酸等（虚拟抑制），其 C 基团包含二硫键，通过切断二硫键，能够使碱基的 3’-OH 暴露出来，能够结合下一个核苷酸。

根据本发明的实施例，该方法包括将聚合酶、核酸模板-引物复合物以及一种或多种核苷酸类似物置于反应容器内，使核苷酸类似物结合到核酸模板-引物复合物上，从而获得延伸产物；核苷酸类似物选自前面的化合物。根据本发明实施例的方法能准确、快速地延伸引物。根据本发明的实施例，提供一种混合物，该混合物包含待测模板、与待测模板链的至少一部分配对的引物，DNA 聚合酶和前面的 dNTP 类似物或者前面的 NTP 类似物或者前面的 dNTP 类似物混合物或者前面的 NTP 类似物混合物。所称的与待测模板链的至少一部分配对的引物与待测模板可以是结合状态也可以是独立状态。

根据本发明的实施例，模板、引物聚合酶以及前面的 dNTP 类似物或者前面的 NTP 类似物或者前面的 dNTP 类似物混合物或者前面的 NTP 类似物混合物在缓冲液中。

在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基 3'端的抑制基团且带荧光标记，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，G，A 荧光碱基带 ATTO647N，C，T 荧光碱基带 Cy3B，G 与 T 组合，A 与 C 组合，分 2 次加入。

在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基 3'端的抑制基团且带荧光标记，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，G 碱基不带荧光染料，A 碱基带 ATTO647N, C 碱基带 Cy3B，T 碱基同时带 ATTO647N 与 Cy3B。将 A，T，G，C 四种碱基混合，一次加入。

在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基 3'端的抑制基团且带荧光标记，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，G 碱基带 ATTO647N/Cy5,A 碱基带 Texred/ROX，T 碱基接 Alex Fluor 488，C 碱基接 Cy3/ATTO532，将 A，T，G，C 四种碱基混合，一次加入。

在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基3'端的抑制基团且带荧光标记，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，A，T，G，C碱基接生物素，ATTO647N接链酶素，A，T，G，C分四次加入，每一次加入碱基，接着加入ATTO647N-链霉素。

在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基3'端的抑制基团，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，A碱基带叠氮基，ROX 接Dibenzocyclooctyne,T碱基带PBA，ATTO Rho6G接SHA，G碱基带TCO基，ATTO647N接四嗪，C碱基接生物素基，Alexa Flour 488接链霉素基，将A，T，G，C四种碱基混合，一次加入，接下来将ROX-Dibenzocyclooctyne，ATTO Rho6G-SHA，ATTO647N-四嗪，Alexa Flour488-链霉素混合加入。以利用叠氮基和Dibenzocyclooctyne的靶向配对、PBA与SHA的靶向配对、TCO基和四嗪的靶向配对、生物素基与链霉素基的靶向配对，来获取信号实现碱基识别，实现测序。

在一些实例中，核苷酸类似物的应用方法如下，该核苷酸类似物包含能够虚拟阻断碱基3'端的抑制基团，其应用于二代或三代（单分子）边合成边测序（SBS）中，G，A碱基接生物素基，ATTO647N接链霉素，C，T碱基接PBA，ATTORho6G接SHA，将G与T组合，A与C组合，分2次加入碱基，紧接着每次碱基组合的加入，加入ATTO647N-链霉素，ATTO Rho6G-SHA混合液。以利用PBA与SHA的靶向配对、生物素基与链霉素基的靶向配对以及每轮反应包含两次反应来获取信号实现碱基识别，实现测序，定义一轮反应包括四种碱基的一次延伸。

利用上述实施例制备包含V_3-linker的dNTP-5-O-S-S-V_3-Atto532，例如具体化合物（11-13）所示的化合物，其中Dye为Atto532，为验证碱基延伸反应的能力，在溶液中进行碱基延伸反应并使用毛细管电泳的方法检测（一代测序仪，ABI3100）。

反应过程：将引物（Primer）与待测序列模板杂交——加入反应缓冲液、碱基和酶——进行延伸反应——终止反应过程——将产物加入3100检测。

根据待检测核苷酸类似物，延伸用的模板的第一个碱基为对应待测化合物的互补碱基。Primer上标有荧光，通过测定反应前后primer在毛细管电泳中所迁移的位置，以及荧光信号的强度，进行定量估算反应效率。反应效率 = 对应产物峰面积 /（残留反应物峰面积 + 对应产物峰面积）。图2为该化合物的反应结果。通过计算，在溶液验证的反应条件下其反应效率>90%。

进一步地，为了检测模板为或者包含多聚体（homopolymer）时该核苷酸类似物的表现，将模板链中前三个碱基保持相同，通过添加待测核苷酸类似物，验证连续添加状况，确定该化合物的阻断（block）下一个碱基结合到模板链的能力。图3为该化合物对homopolymer的block作用结果，在实验条件下未发现一次反应中两个或两个以上碱基的延伸，说明该化合物的抑制/终止能力较好。

为验证待测核苷酸类似物在单分子平台上的表现，发明人通过使用人工合成的多靶（20种模板核酸的混合）杂交在测序芯片上，进行性能评估。60轮反应，每轮反应包括以C、T、A、G的顺序添加的四次碱基延伸反应，每次反应包括：碱基延伸、拍照、切除侧链包括染料（作用于可切割基团/键）和清洗。通过数据处理包括图像处理和碱基识别计算芯片上确定的固定链的延伸状况，确定该化合物的反应性能。图4显示利用该化合物进行测序获得的读段的读长分布，可以看出该化合物具有可逆终止的功能，既能在一次反应中有效阻止下一个碱基的结合也能不妨碍下一个碱基在下一次反应中的结合/延伸，能用于实现核酸测序。其中，图2，3的横坐标是碱基大小（base size），纵坐标是fluorescence intensity荧光强度；图4横坐标是读长，纵坐标是比例。

利用上述方法，发明人对其余具体化合物进行测试，包括结构式（41）、（42）、（44）-（52）、（54）-（74）的化合物，结果显示这些化合物单独地都能应用于测序。结构式（41）、（42）、（44）-（52）、（54）-（74）的化合物的反应效率分别为94.5%、96.2%、100.4%、96.4%、83.5%、13.8%、16.8%、68.9%、76.2%、64.0%、80.6%、94.1%、88.9%、80.8%、40.6%、92.1%、86.1%、93.2%、94.6%、87.8%、95.7%、50.2%、103.2%、91.5%、58.6%、107.3%、90.5%、97.1%、98.4%、98.4%、86.0%和93.0%。

发明人还使用两种荧光标记的碱基进行测序验证。一轮反应中包含两次核苷酸类似物混合物的加入，混合物以及可检测标记采用的组合为A-Atto647N和T-AttoRho6g，C-Atto532和G-Atto647N，例如具体化合物（11-13）所示的化合物，根据需要替换碱基为A、T、C、G，通过杂交长度在33nt的合成多靶（模板）进行测序，以AT混合 CG混合的顺序添加76轮，每轮反应后，先使用640nm激光拍照，再使用532nm激光拍照。最终获得的原始读长分布如图5，显示76次反应后获得的读段的读长的主峰为32bp。

以下示例具体化合物应用于单色或多色测序，测序结果与上述示例结果类似（未显示）。

如图6所示，单色测序方法包含：（a）需要要素：i）一组核酸（引物/探针）；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸标记物，其包含以下几部

分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除的-S-S-键，3’端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过-S-S-linker 与碱基相连，例如具有具体化合物（3）所示的结构，其中的碱基为 A，T，G 或 C。

（b）其具体步骤如下，第一步，将待测模板链固定在芯片上，加入 DNA 聚合酶，再分别加 dNTPs-S-S-linker-Dye（A，T，G，C；linker 不限制，例如可以为 V1-linker、V3-linker 等；下同），从而 dNTPs-S-S-linker-Dye（A，T，G，C）与模板链配对；第二步，冲洗完没有配对的荧光分子，检测已经配对的荧光分子；第三步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3’-OH,为下一轮碱基配对做准备；第四步，加入 Cap 试剂，捕获模板上巯基，冲洗多余的 Cap 试剂，进行下一轮碱基添加。然后，反复重复第一，二，三，四到 30 次，100 次，甚至 1000 次。

如图 7 或图 8 所示，单色测序方法包含：（a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸类似物，其包含以下几部分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除的-S-S-键，3’端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过-S-S-linker 与碱基相连，例如具有式（11-13）所示结构的化合物，其中 Base 为 A,T,C 或 G。。

（b）其具体步骤如下，第一步，将待测模板链固定在芯片上，加入 DNA 聚合酶，再分别加 dNTPs-S-S-linker-Dye（A，T，G，C），从而 dNTPs-S-S-linker-Dye（A，T，G，C）与模板链配对；第二步，冲洗完没有配对的荧光分子，检测已经配对的荧光分子；第三步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3’-OH,为下一轮碱基配对做准备；第然后，反复重复第一，二，三，到 30 次，100 次，甚至 1000 次。

如图 9 所示，单色测序方法包含：（a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸类似物，其包含以下几部分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除的-S-S-键，3’端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过-S-S-linker 与碱基相连，例如具有具体化合物（19）所示的结构，以下表示为 dNTPs-S-S-linker-biotin；

（b）其具体步骤如下：第一步，加入 DNA 聚合酶导致 dNTP-5-S-S-biotin 四种中的一种接到待测模板链的一端；第二步，加入 ATTO647N 标记的链霉素，由于链霉素与 biotin 的作用，ATTO647N 会标记连在待测模板链的 dNTPs-S-S-linker-biotin，然后冲洗，拍照；（在这个过程中，不同的碱基都是一样，重复这一步骤。第三步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3’-OH,为下一轮碱基配对做准备；第四步，加入 Cap 试剂，捕获模板上巯基，冲洗多余的 Cap 试剂，进行下一轮碱基添加。然后，反复重复第一，二，三，四步骤 30 次，100 次，甚至 1000 次。cap 试剂可以是包含 I-O=NH 和/或 I-O-OH 结构的化合物或组合物。

如图 10 所示，双色测序方法包含：（a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸类似物，其包含以下几部分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除的-S-S-键，3’端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过-S-S-linker 与碱基相连，例如具有具体化合物（4）所示的结构，以下表示为 dNTP-5-S-S-linker-Dye。

其具体步骤如下：第一步，加入 DNA 聚合酶，dATP-5-S-S-linker-Dye，dTTP-5-S-S-linker-Dye，导致 dNTP-5-S-S-linker-Dye 两种中的一种或两种接到待测模板链的一端,冲洗完没有配对的配对的碱基，激光 1，2 激发，照相；第二步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3’-OH,为下一轮碱基配对做准备，第四步，加入 Cap 试剂对 HS 基进行加帽，第五步，加入 dGTP-5-S-S-linker-Dye，dCTP-5-S-S-linker-Dye 与 DNA 聚合酶，第六步，重复第二-四步；重复以上步骤至少一次、十次、五十次、一百次、一千次。

如图 11 所示，双色测序方法包含：（a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸类似物，其包含以下几部分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除的-S-S-键，3’端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过-S-S-linker 与碱基相连，例如具有具体化合物（7）所示的结构，以下表示为 dNTP-5-O-S-S-linker-Dye。

(b)其具体步骤如下：第一步，加入 DNA 聚合酶，dATP-5-O-S-S-linker-Dye，dTTP-5-O-S-S-linker-Dye，导致该两种 dNTP-5-O-S-S-linker-Dye 中的一种或两种接到待测模板链的一端,冲洗完没有配对的配对的碱基，激光 1，2 激发，照相；第二步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3’-OH,为下一轮碱基配对做准备，第四步，加入 dGTP-5-O-S-S-linker-Dye，dCTP-5-O-S-S-linker-Dye 与 DNA 聚合酶，重复第一，二，三步；重复以上步骤至少一次、十次、五十次、一百次、一千次。

如图 12 所示，双色测序（FRET）方法，该方法利用混合不带可检测标记的核苷酸类似物和带检测标记的核苷酸类似物进行测序，包含：（a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能

杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv)一组带有标记的核苷酸类似物例如为具体化合物式(89)、(90)、(91)和(92)所示的化合物，(89)、(90)和(92)以下以 dNTP-5-O-N_3-V_{10}-Dye 表示，式(91)的化合物为不带可检测标记，以下以 cold dGTP 表示。

(b)其具体步骤如下：第一步，加入 DNA 聚合酶，dATP-5-O-N_3-V_{10}-Cy5,dTTP-5-O-N_3-V_{10}-Cy3b,cold dGTP, dTTP-5-O-N_3-V_{10}-Cy3b（Cy5）导致该 4 种中的至少一种接到待测模板链的一端,冲洗完没有配对的配对的碱基，激光 1，2 激发，照相；第二步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3'-OH,为下一轮碱基配对做准备，第四步，重复第一，二，三步；；重复以上步骤至少一次、十次、五十次、一百次、一千次。

如图 13 所示，四色测序方法包含：(a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸类似标记物，其包含以下几部分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除的-S-S-键，3'端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过-S-S-linker 与碱基相连，例如，可以具有化合物（1）所示的结构，其中，Base 根据需要可以替换为 A，T，C，G，Dye 可以根据需要替换为 Cy3b、Rox、Cy5、Alexa488，以下以 dNTP-5-S-S-linker-Dye 表示，不同的核苷酸类似物的 linker 可以相同也可以不同。

(b)其具体步骤如下：第一步，加入 DNA 聚合酶，dATP-5-S-S-linker-Cy3b，dTTP-5-S-S-linkerRox，dGTP-5-S-S-linker-Cy5 和 dCTP-5-S-S-linker-Alexa488，四种 dNTP-5-S-S-linker-Dye 中的至少一种配对到待测模板链的一端,冲洗完没有配对的配对的碱基；拍照；第三步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3'-OH,为下一轮碱基配对做准备，第三步，加入 Cap 试剂，对 HS 进行 Cap 保护，对下一轮碱基测序做准备；第四步，重复第一，二，三步至少一次、十次、五十次、一百次、一千次。

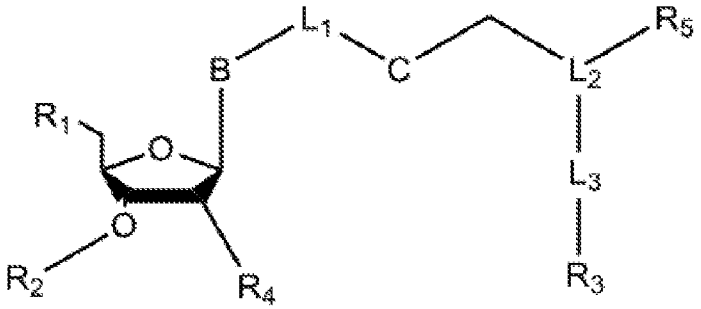
四色测序方法包含：(a）需要要素：i）一组核酸；ii)一种核苷酸聚合酶；iii）一个能杂交核酸或核酸类似物的样品模板链；iv）一组带有标记的核苷酸类似物，其包含以下几部分，碱基，核糖或脱氧核糖环，可切除键/基团，3'端阻断的 inhibition 基团和一个可以检测的标记，在这里标记是通过 linker 与碱基相连，例如，可以具有式（27）所示化合物的结构，以下表示为 dNTP-5-O-S-S-linker-靶向基团，该结构中叠氮基团为被靶向基团，可以根据需要替换成其他的被靶向基团，其中的碱基可以根据需要替换成相应的碱基。

(b)加入四种 dNTP-5-O-S-S-linker-靶向基团，其中的至少一种接到待测模板链的一端，冲洗完没有配对的配对的碱基；第二步，加入 ROX 标记的 Dibenzocyclooctyne、ATTO Rho6G 标记的 SHA、ATTO647N 标记的四嗪和 Alexa488 标记链霉素混合物，使得该混合物靶向结合到待测模板上带靶向基团的核苷酸类似物，冲洗没有结合的带靶向标记的荧光染料，拍照；第三步，加入 TCEP 或 THPP 切除双硫键，从而除去了接在模板链上的荧光基团，裸露 3'-OH，为下一轮碱基配对做准备，第四步，重复第一、二和三步至少一次、十次、五十次、一百次、一千次。在本说明书的描述中，参考术语"一个实施例"、"一些实施例"、"示例"、"具体示例"、或"一些示例"等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中，对上述术语的示意性表述不必须针对的是相同的实施例或示例。而且，描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本发明的限制，本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

1、一种化合物，其具有式（I）所示结构式：



式（I），

其中，L_1、L_2、L_3分别独立地为共价键或共价连接基团；

B为碱基或者碱基衍生物；

R_1为-OH、磷酸基团或者核苷酸；

R_2为H或者可切割基团；

R_3为可检测基团或者靶向基团；

R_5为抑制基团；

R_4为H或-OR_6，其中R_6为H或可切割基团；

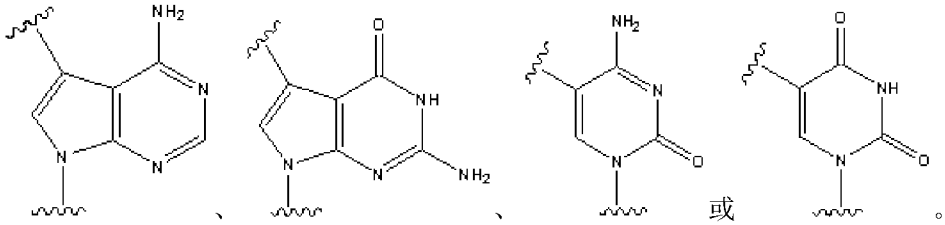
C为可切割基团或者可切割键。

2、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述磷酸基团为单磷酸基团、双磷酸基团、三磷酸基团或多聚磷酸基团。

3、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，B为胞嘧啶或其衍生物、胸腺嘧啶或其衍生物、腺嘌呤或其衍生物、鸟嘌呤或其衍生物、次黄嘌呤或其衍生物、脱氮腺嘌呤或其衍生物、脱氮鸟嘌呤或其衍生物、脱氮次黄嘌呤或其衍生物、7-甲基鸟嘌呤或其衍生物、5，6-二氢尿嘧啶或其衍生物、5-甲基胞嘧啶或其衍生物或5-羟甲基胞嘧啶或其衍生物。

4、根据权利要求1-3任一所述的化合物，其特征在于，B为二价胞嘧啶或其衍生物、二价鸟嘧啶及其衍生物、二甲腺嘧啶或其衍生物、二价胸腺嘧啶或其衍生物、二价尿嘧啶或其衍生物、二价次黄嘌呤或其衍生物、二价黄嘌呤或其衍生物、二价脱氮腺嘌呤或其衍生物、二价脱氮鸟嘌呤或其衍生物、二价脱氮次黄嘌呤或其衍生物、二价7-甲基鸟嘌呤或其衍生物、二价5，6-二氢尿嘧啶或其衍生物、二价5-甲基胞嘧啶或者衍生物或二价5-羟甲基胞嘧啶或其衍生物。

5、根据权利要求1-4任一所述的化合物，其特征在于，B为

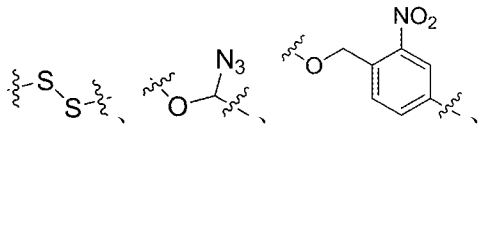


或

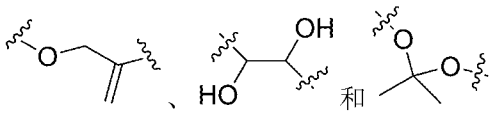
6、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，R_6为H、任选取代的烷基或胺基。

7、根据权利要求6所述的化合物，其特征在于，R_6为H、$C_{1\sim5}$烷基或者-NH_2。

8、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，R_2选自H、



和



中的至少之一。

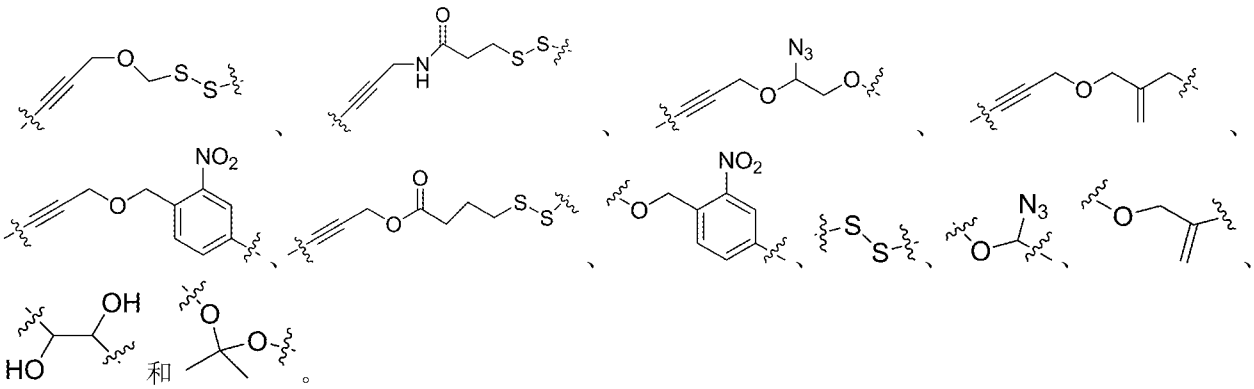
9、根据权利要求1所述的化合物，其特征在于，C为含有选自下列至少之一的基团：

任选取代的乙炔基、任选取代的二硫键、任选取代的酰胺烷基、任选取代的芳基、任选取代的烷氧基、任选取代的叠氮基、任选取代的直链或支链烷基。

10、根据权利要求9所述的化合物，其特征在于，C为含有选自下列至少之一的基团：

任选被羟基取代的乙炔基、二硫键、酰胺基团、亚烷氧基、芳基、叠氮基团、直链或者支链亚烷基。

11、根据权利要求10所述的化合物，其特征在于，C选自下列至少之一：



和 。

12、根据权利要求 1-10 任一项所述的化合物，其特征在于，L_1、L_2 和 L_3 分别独立地选自独立的键，任选取代的烷基，任选取代的烷基烯基，任选取代的杂烷基烯，任选取代的环烷基，任选取代的异环烷基以及任选取代的芳基烯的至少之一。

13、根据权利要求 1-10 任一项所述的化合物，其特征在于，L_1、L_2 和 L_3 分别独立地选自独立的键、任选取代的 C_{1-8} 烷基，任选取代的 C_{1-8} 烷基烯，任选取代的 C_{2-8} 杂烷基烯，任选取代的 C_{3-8} 环烷基烯，任选取代的 C_{3-8} 异环烷基烯，或任选取代的 C_{6-8} 芳基烯。

14、根据权利要求 1-10 任一项所述的化合物，其特征在于，L_1 选自独立的键、任选取代的 C1～C3 烷基和任选取代的 C1-C3 烷基烯中的至少之一。

15、根据权利要求 1-10 任一项所述的化合物，其特征在于，L_1 为 L_1^A-L_1^B-L_1^C-L_1^D-L_1^E，L_2 为 L_2^A-L_2^B-L_2^C-L_2^D-L_2^E 和/或 L_3 为 L_3^A-L_3^B-L_3^C-L_3^D-L_3^E，其中，

L_1^A、L_1^B、L_1^C、L_1^D、L_1^E、L_2^A、L_2^B、L_2^C、L_2^D、L_2^E、L_3^A、L_3^B、L_3^C、L_3^D 和 L_3^E 分别独立地选自独立的键，取代或非取代的烷基烯，取代或非取代杂烷基烯，取代或非取代环烷基烯，取代或非取代异环烷基烯，取代或非取代芳基烯，

L_1^A、L_1^B、L_1^C、L_1^D 和 L_1^E 中至少有一个不是独立的键，

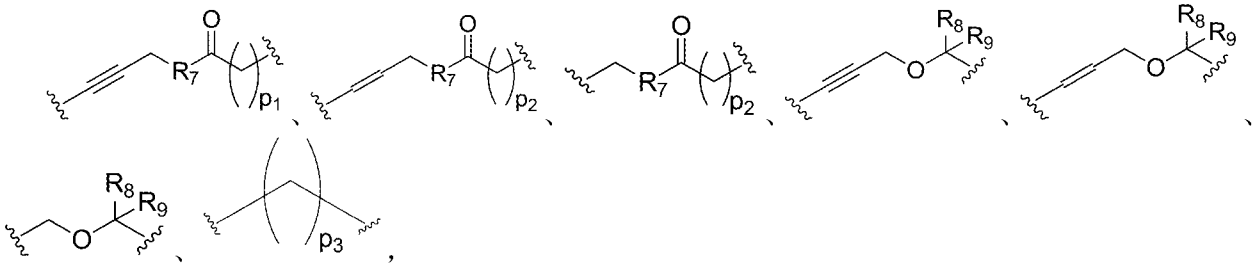
L_2^A、L_2^B、L_2^C、L_2^D 和 L_2^E 中至少有一个不是独立的键，

L_3^A、L_3^B、L_3^C、L_3^D 和 L_3^E 中至少有一个不是独立的键。

16、根据权利要求 15 所述的化合物，其特征在于，

各 L_1^A、L_1^B、L_1^C、L_1^D、L_1^E、L_2^A、L_2^B、L_2^C、L_2^D、L_2^E、L_3^A、L_3^B、L_3^C、L_3^D 和 L_3^E 分别独立地选自独立的键、C_{2-6} 烷基烯、2-6 个原子组成的杂烷基烯、C_{3-6} 环烷基烯、2-6 个原子组成的杂环烷基烯，C_{6-10} 芳基烯，其中，各 C_{2-6} 烷基烯、2-6 个原子组成的杂烷基烯、C_{3-6} 环烷基烯、2-6 个原子组成的杂环烷基烯，C_{6-10} 芳基烯独立地未被取代或被 1、2、3、4、5 个 C_{1-6} 烷基、卤素、硝基、C_{1-6} 卤代烷基取代。

17、根据权利要求 1-16 任一项所述的化合物，其特征在于，L_1 包括选自下列的至少之一：



其中，各 R_7 独立为酰胺键或 O，

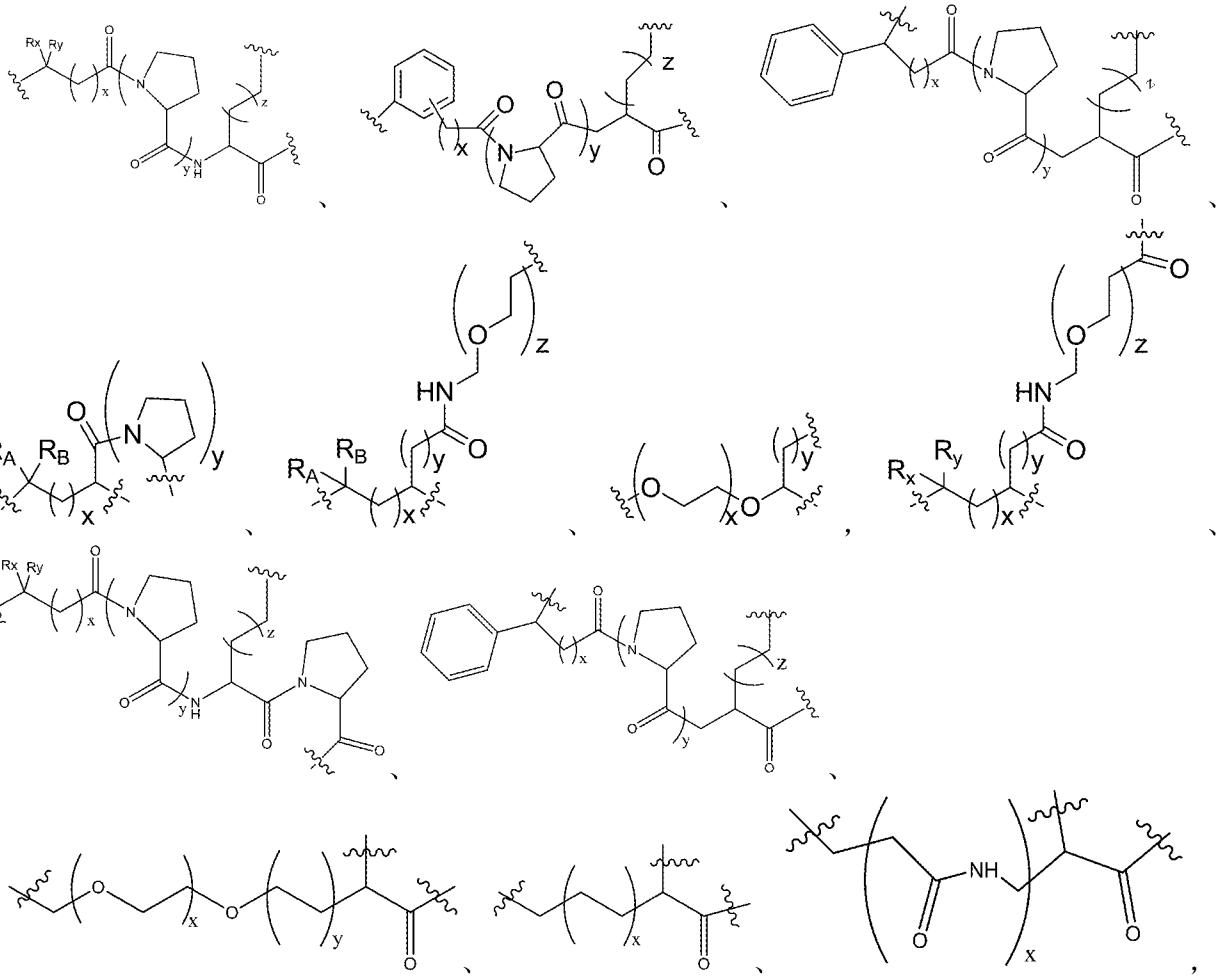
各 p_1 独立为 0、1~10 之间的整数，优选地，各 p_1 独立为 1、4；

各 p_2 独立为 0、1~5 之间的整数，优选地，各 p_2 独立为 1、4；

各 R_8，R_9 分别独立地选自 H、$-CH_3$、$-CX_3$、$-CHX_2$、$-CH_2X$、-CN、-Ph、C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烷基和 C_{3-6} 环烷基中的至少一种，其中 X 为 Cl、Br、I；

各 p_3 独立为 0、1~4 之间的整数，优选地，各 p_3 独立为 1、2。

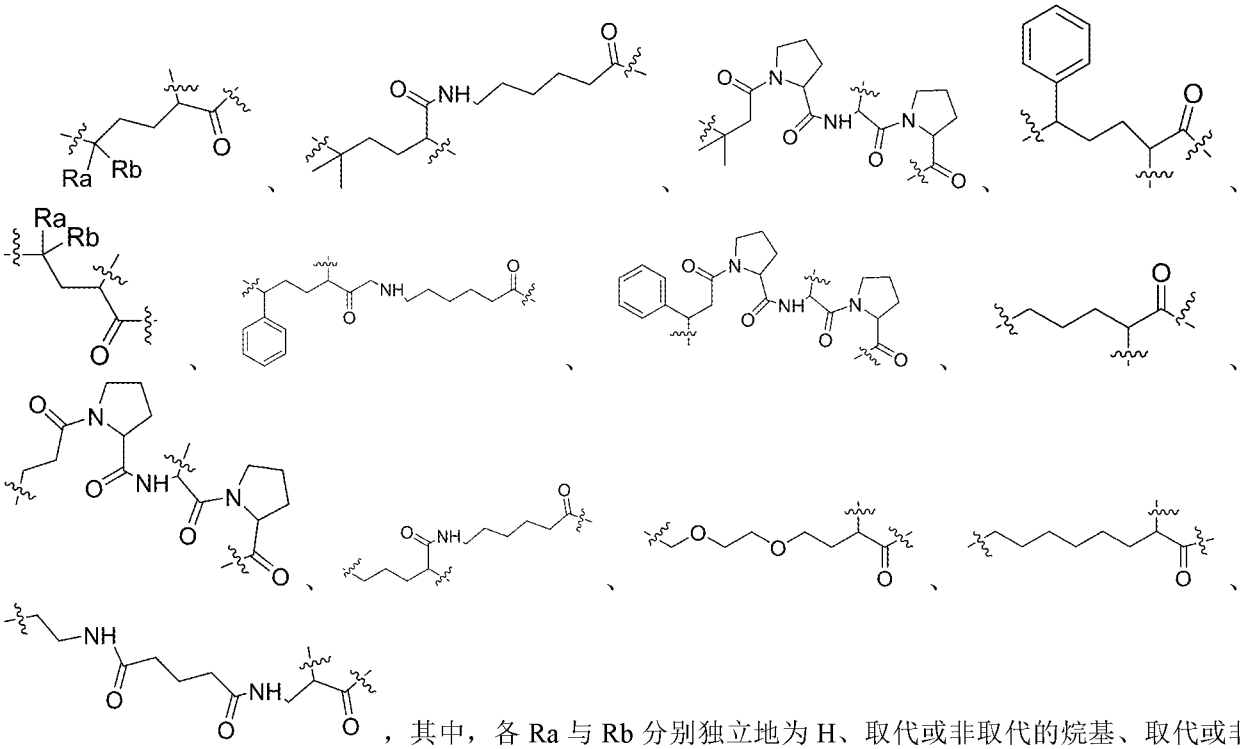
18、根据权利要求 1-17 任一项所述的化合物，L_2 包括选自下列的至少之一：



其中，各 Rx、Ry、R_A、R_B 独立为 H、$C_{1\sim6}$ 烷基链、$C_{3\text{-}10}$ 环烷基、$C_{5\text{-}10}$ 芳基，各 x、y、z 独立为 0 或者 1～6 的整数，

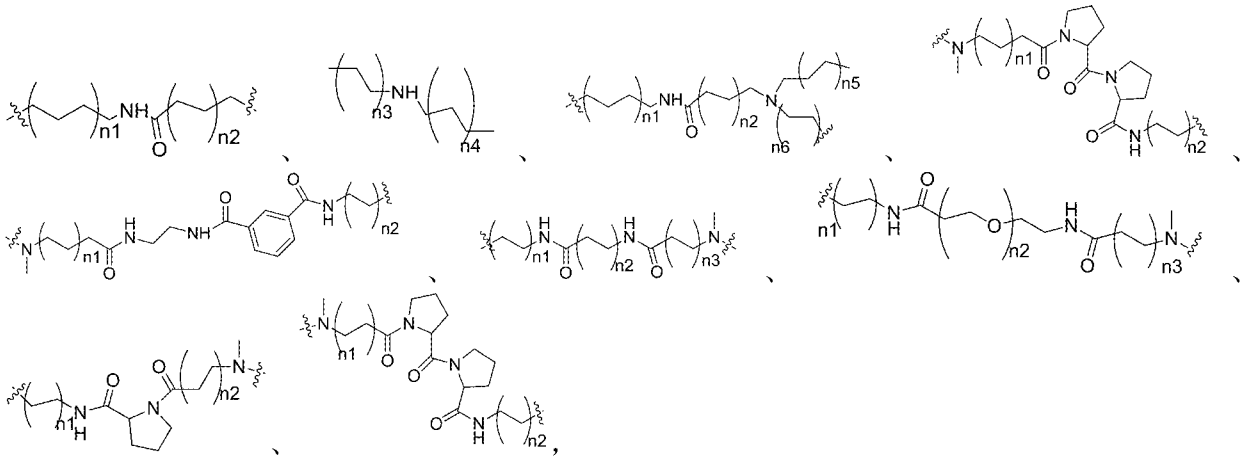
优选地，各 Rx、Ry 独立为 H、$C_{3\text{-}5}$ 环烷基、$C_{5\text{-}6}$ 环烷基、苯基。

19、根据权利要求 1-17 任一项所述的化合物，其特征在于，L_2 为选自如下结构的一种：



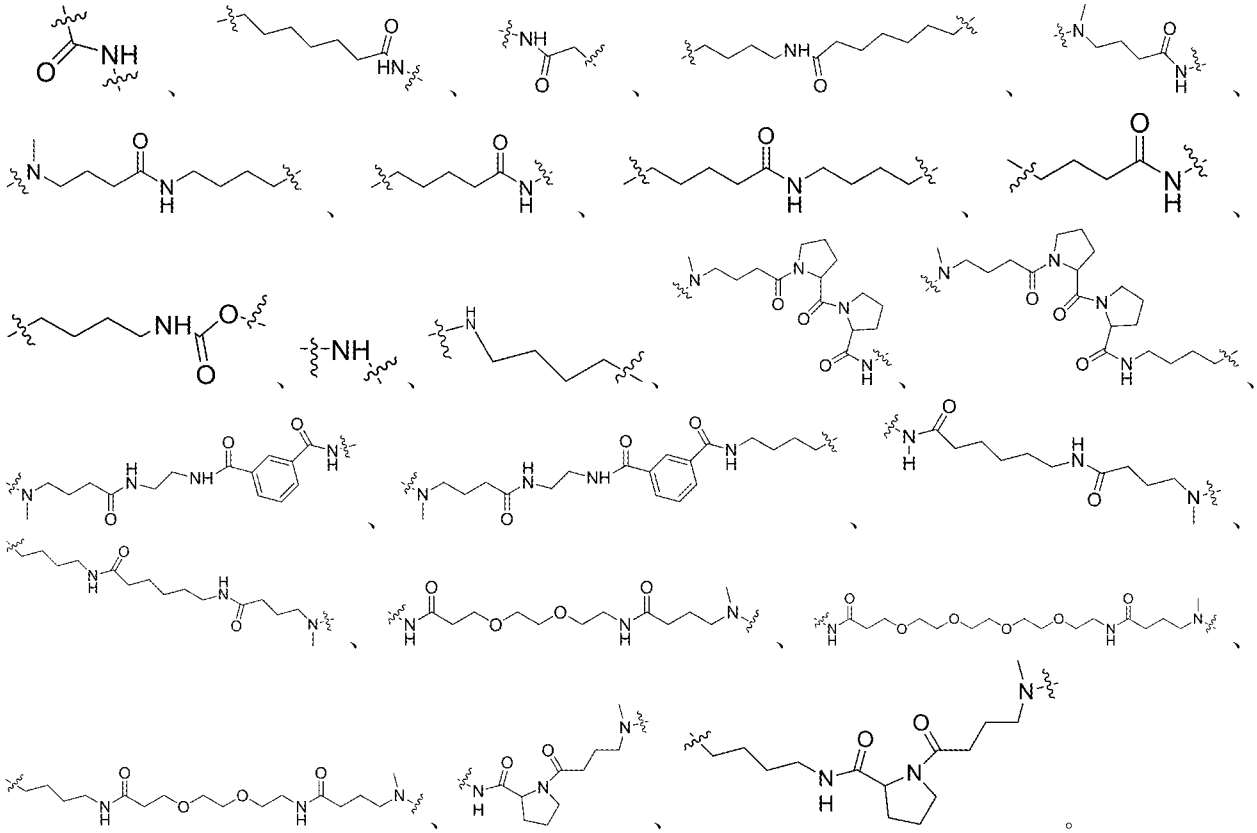
，其中，各 Ra 与 Rb 分别独立地为 H、取代或非取代的烷基、取代或非取代杂烷基烯、取代或非取代环烷基、取代或非取代异环烷基、取代或非取代芳基。

20、根据权利要求 1-19 任一项所述的化合物，其特征在于，L_3 选自以下结构的一种：：



其中，n1，n2，n3，n4，n5，n6 分别独立地为 0 或者 1～7 的整数。

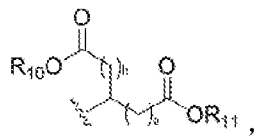
21、根据权利要求 1-20 任一项所述的化合物，其特征在于，L_3 具有选自以下结构的一种：



22、根据权利要求 1-21 任一项所述的化合物，其特征在于，R_3 选自染料、点击化学反应基团、叠氮基和生物素基中的的至少一种。

23、根据权利要求 1-22 任一项所述的化合物，其特征在于，R_5 包括至少一个带电荷的基团，所述带电荷的基团包括-COOH、-PO_4、-SO_4、-SO_3、-SO_2。

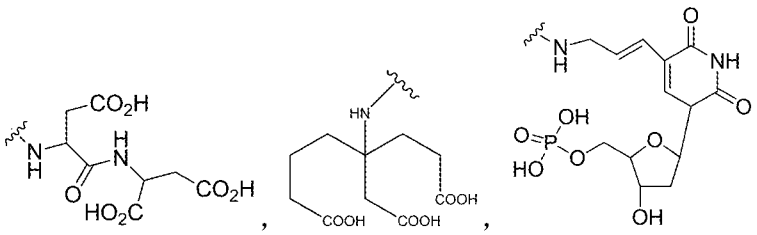
24、根据权利要求 1-23 任一项所述的化合物，其特征在于，R_5 具有选自如下基团中的一种结构：



其中，各 R_{10} 和 R_{11} 独立为 H 或者 C_{1-6} 烷基，各 a 和 b 独立地为 0 或者 1-5 的整数；

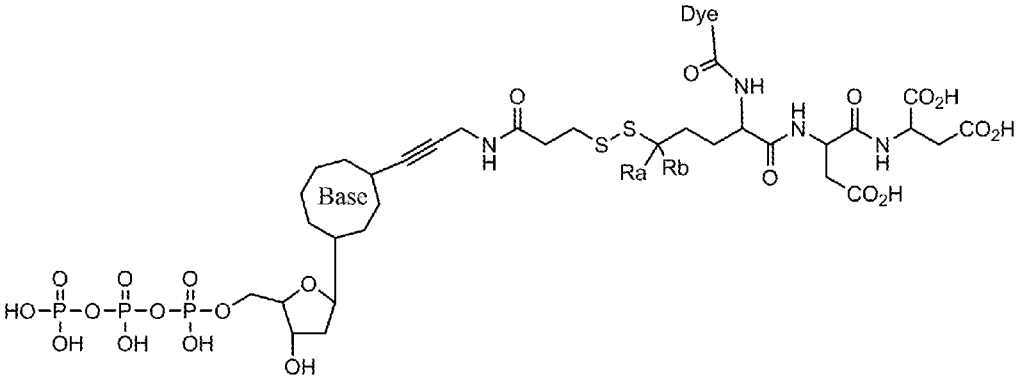
优选地，各 a 和 b 分别独立地为 1 或 2。

25、根据权利要求 1-24 任一项所述的化合物，其特征在于，R_5 包括选自如下基团中的一种：

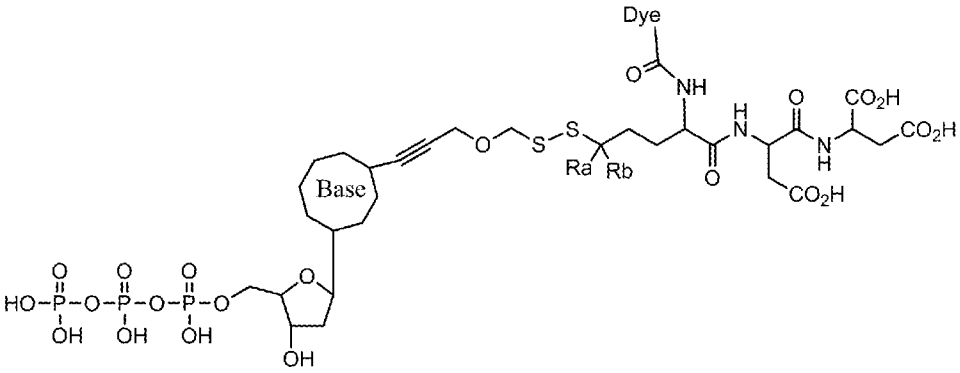


，，。

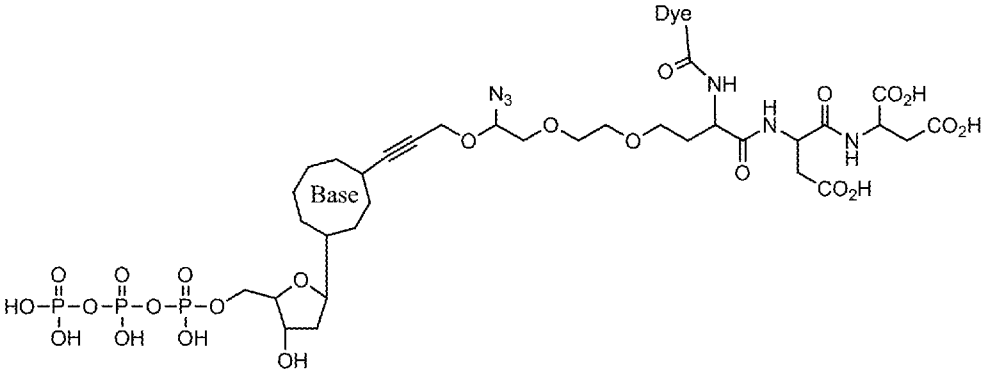
26、根据权利要求 1-25 任一项所述的化合物，其特征在于，其具有下列结构至少之一：



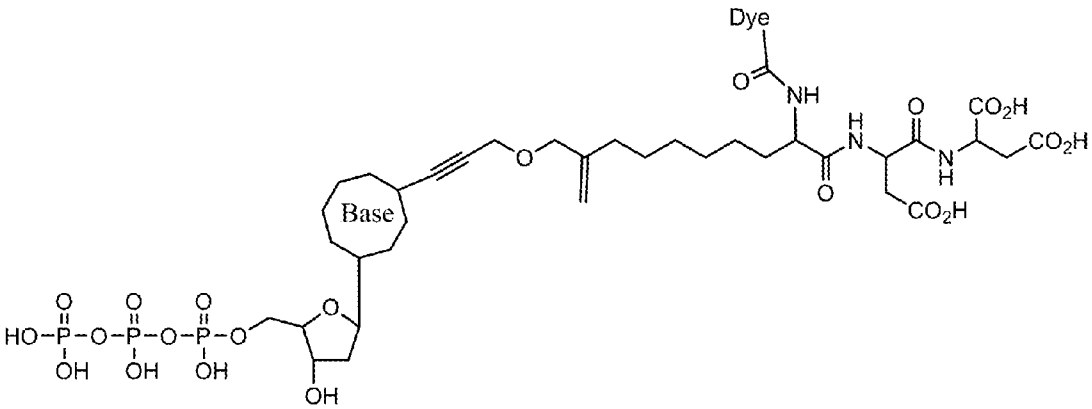
(1)、



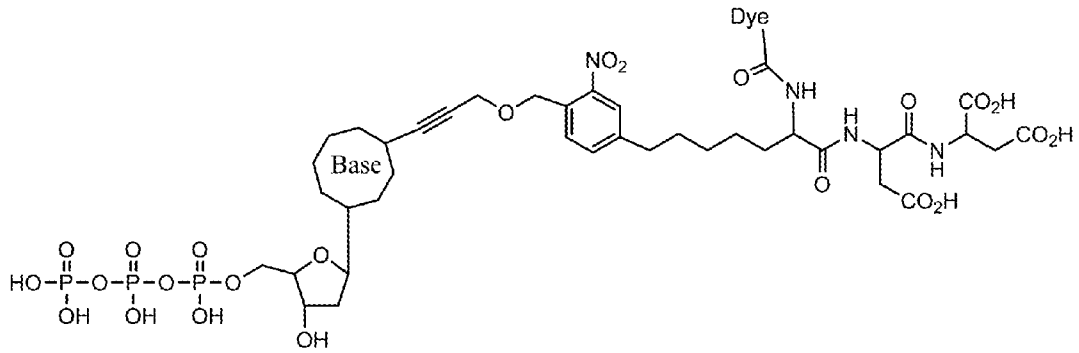
(2)、



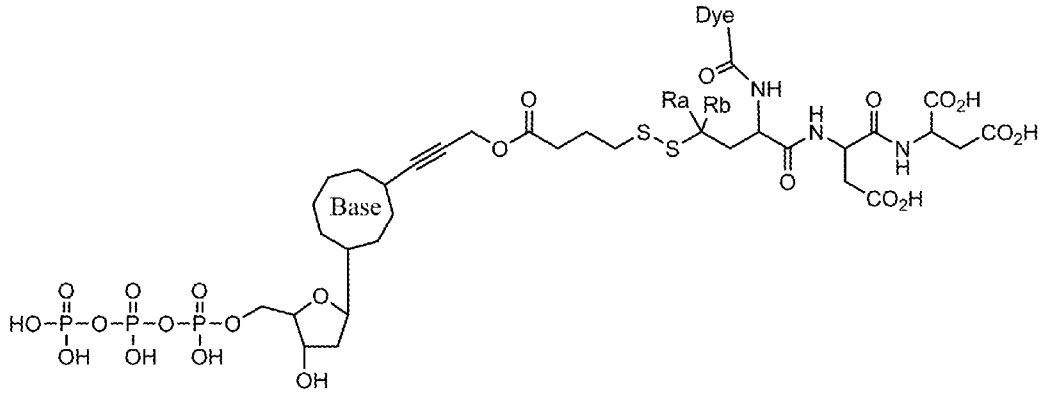
(35)、



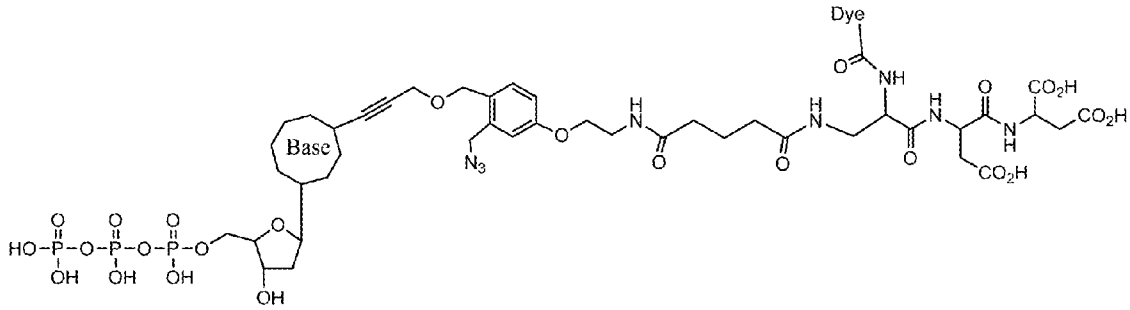
(36)、



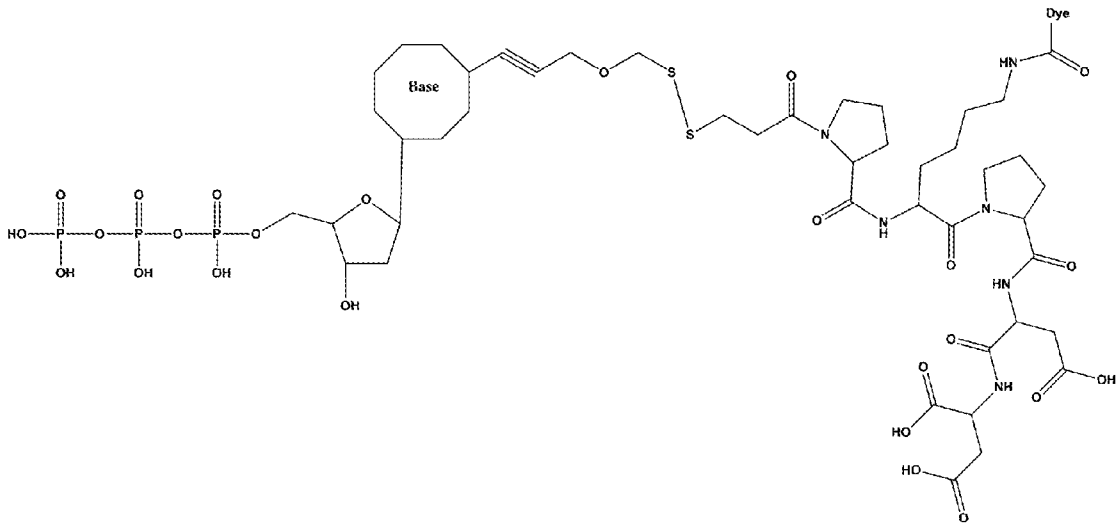
(37)、



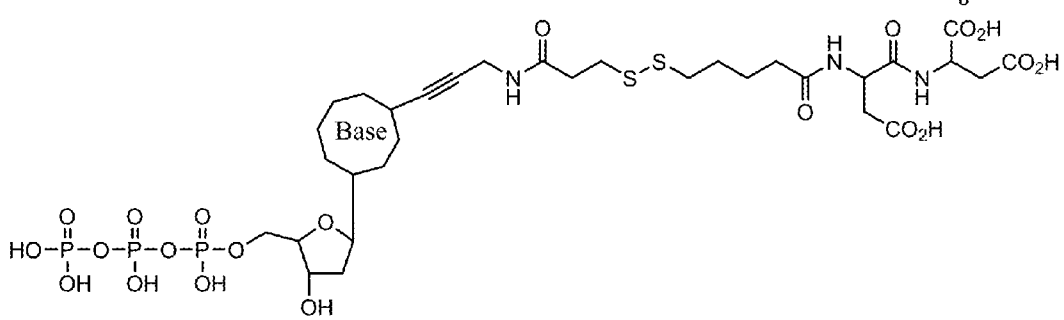
(38)、



(39)、



(11-13)，

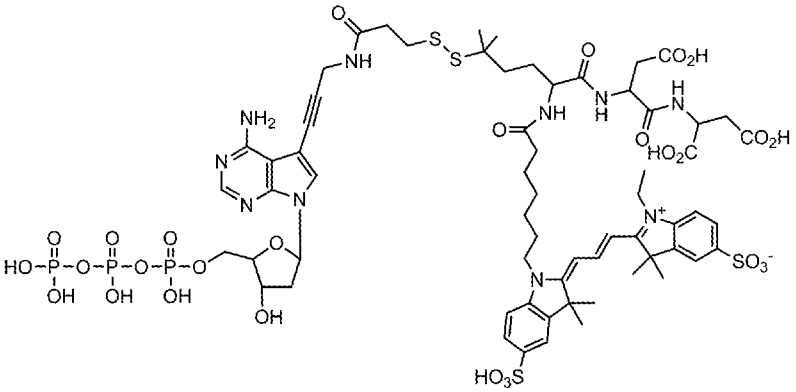


(93)，

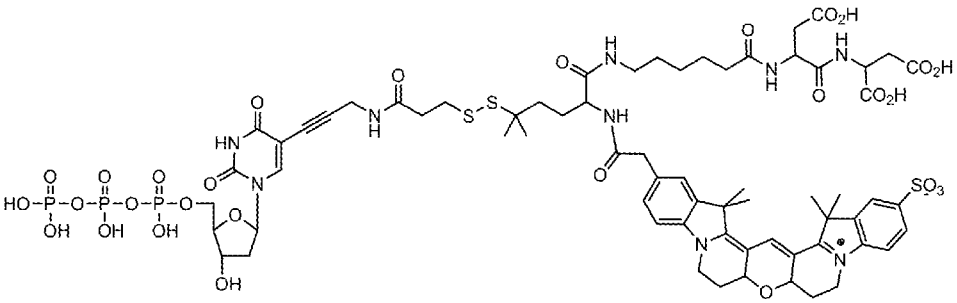
其中，各 Ra 与 Rb 分别独立地选自 H、任选取代的烷基、任选取代的杂烷基烯、任选取代的环烷基、任选取代的异环烷基和任选取代的芳基中的至少一种；

优选地，各 Ra 与 Rb 分别独立地为 H、C_{1-6} 烷基、3-6 个原子的杂烷基、C_{2-6} 烯基、3-6 个原子的杂烯基、C_{3-6} 环烷基、3-6 个原子组成的杂环基、苯基、5-6 个原子组成的杂芳基，其中，各 C_{1-6} 烷基、3-6 个原子的杂烷基、C_{2-6} 烯基、3-6 个原子的杂烯基、C_{3-6} 环烷基、3-6 个原子组成的杂环基、苯基和 5-6 个原子组成的杂芳基独立地未被取代或被 1、2 或 3 个卤素、C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、CN、NO_2 取代。

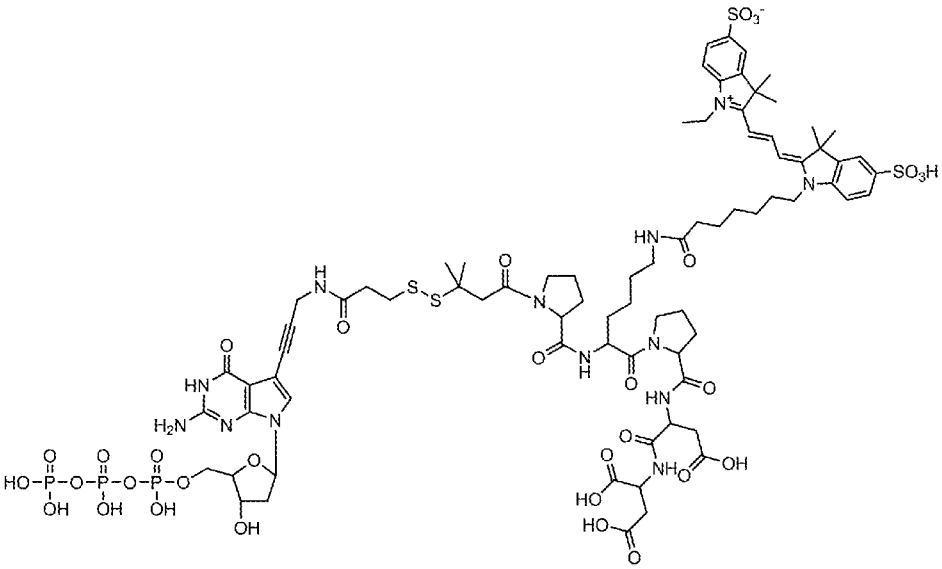
27、根据权利要求 1-26 任一项所述的化合物，其特征在于，其具有下列结构至少之一：



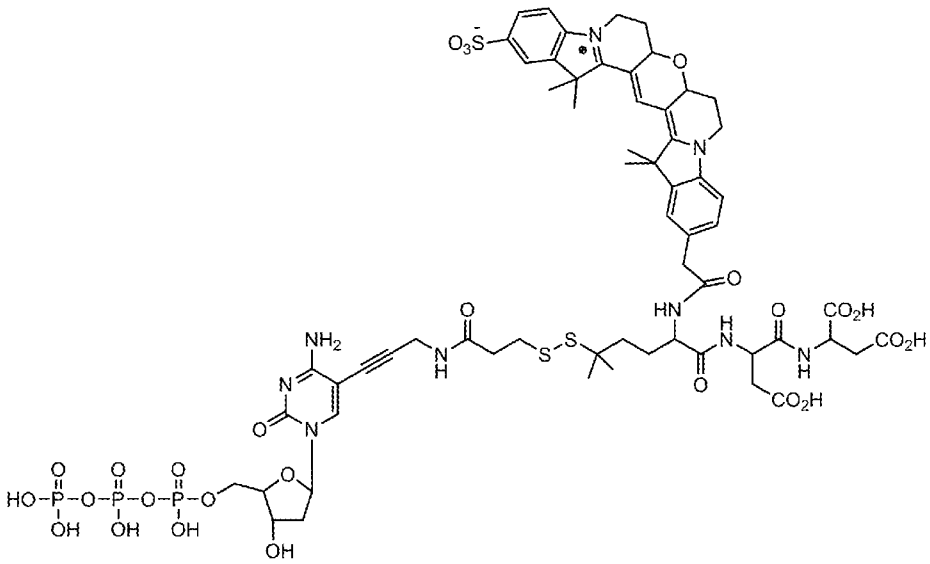
(3)、



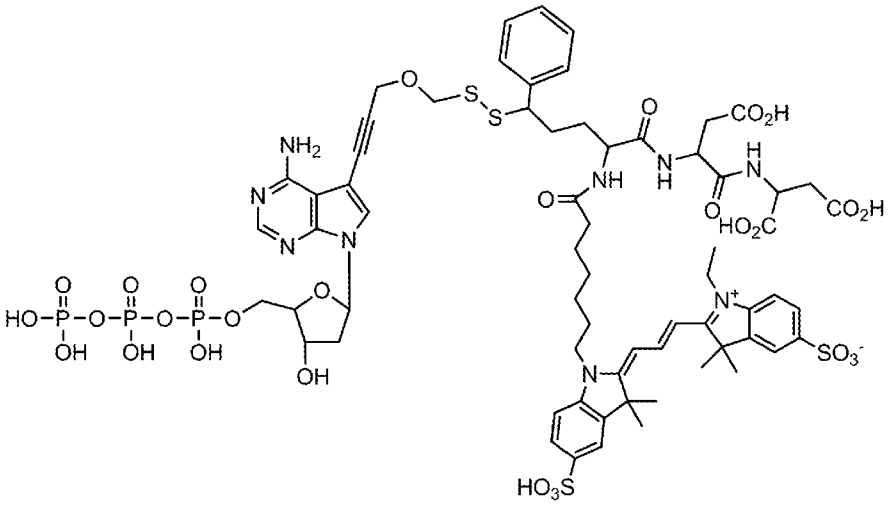
(4)、



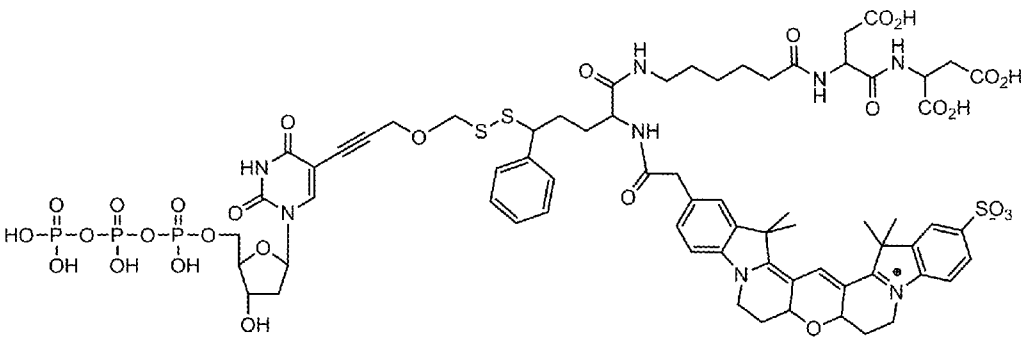
(5)、



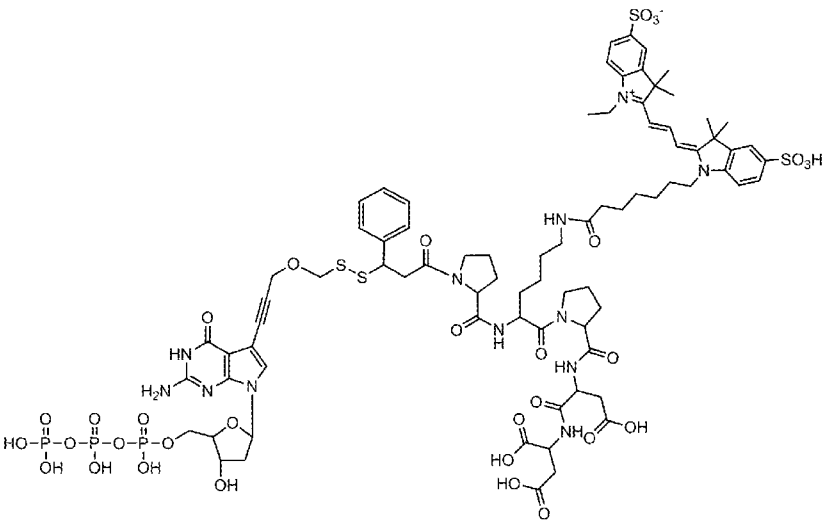
(6)、



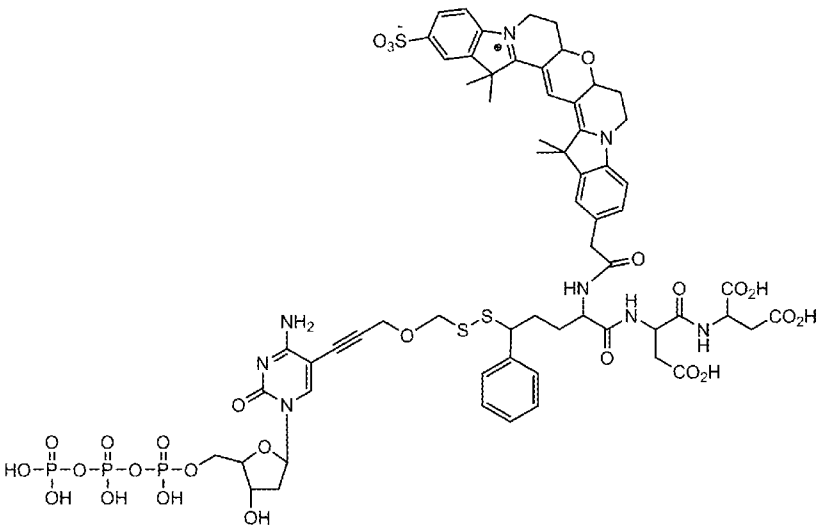
(7)、



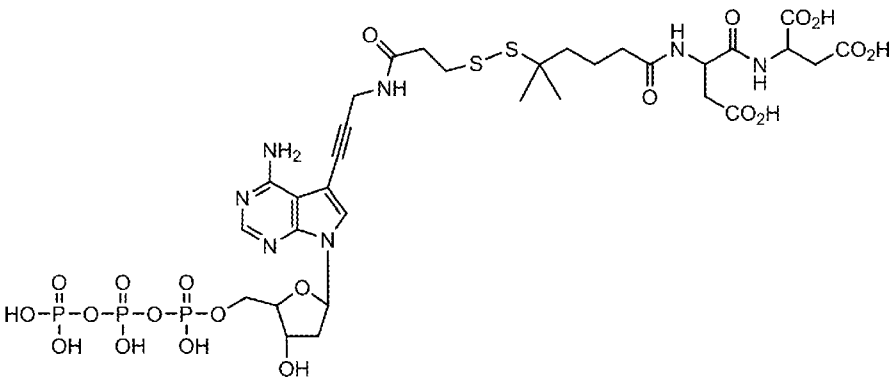
(8)、



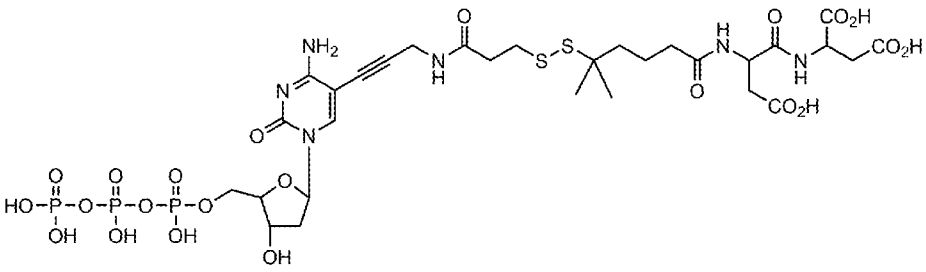
(9)、



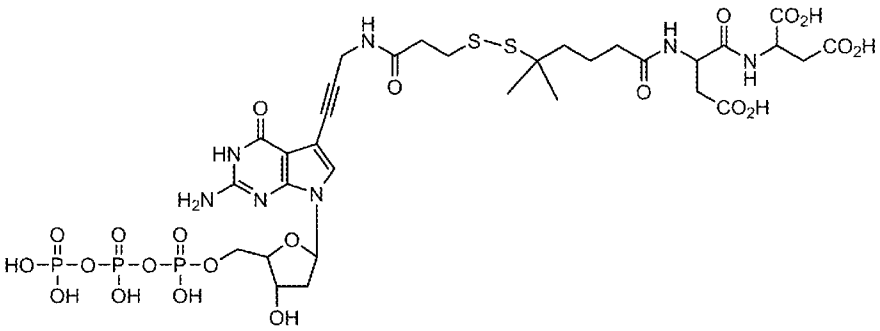
(10)、



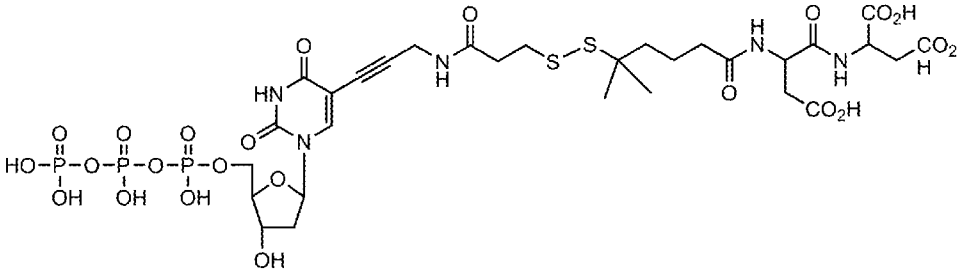
(11)、



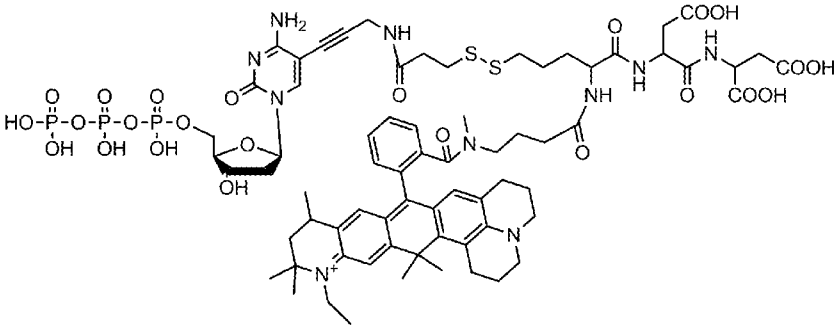
(12)、



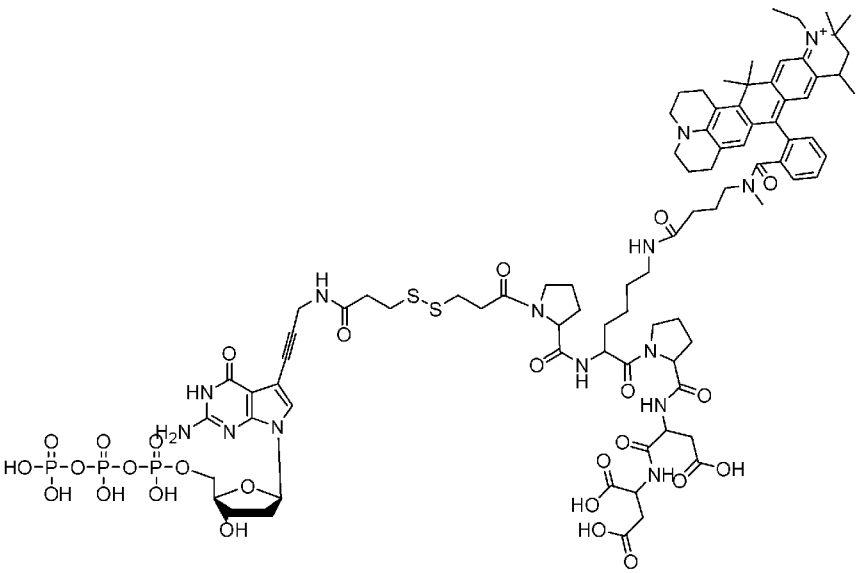
（13）、



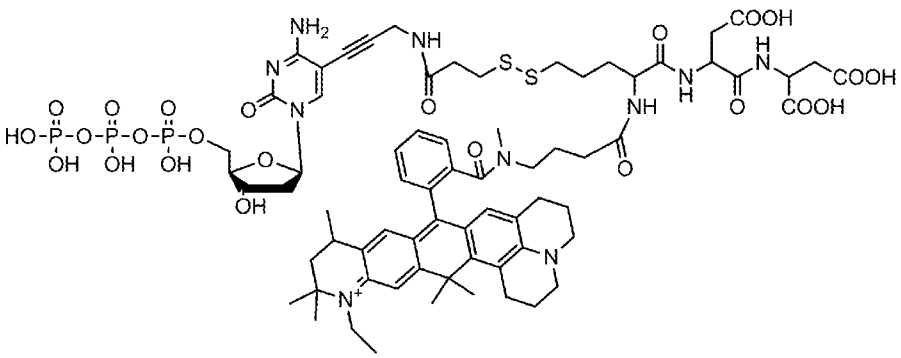
（14）、



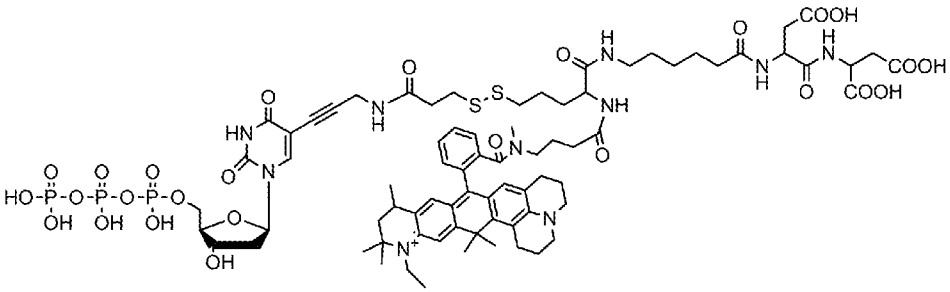
（15）、



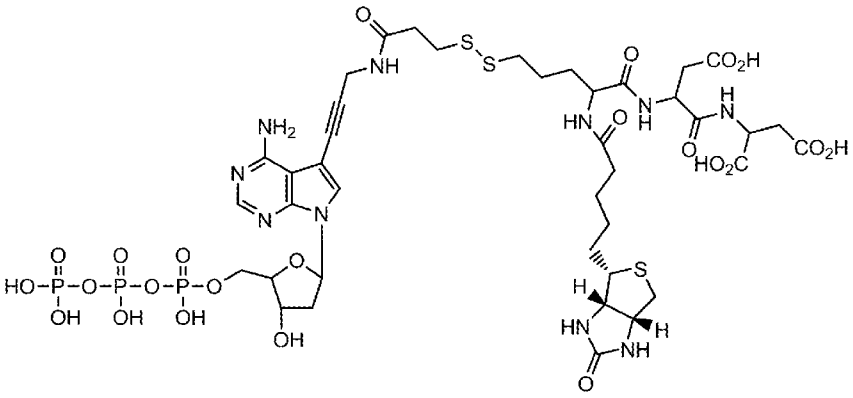
（16）、



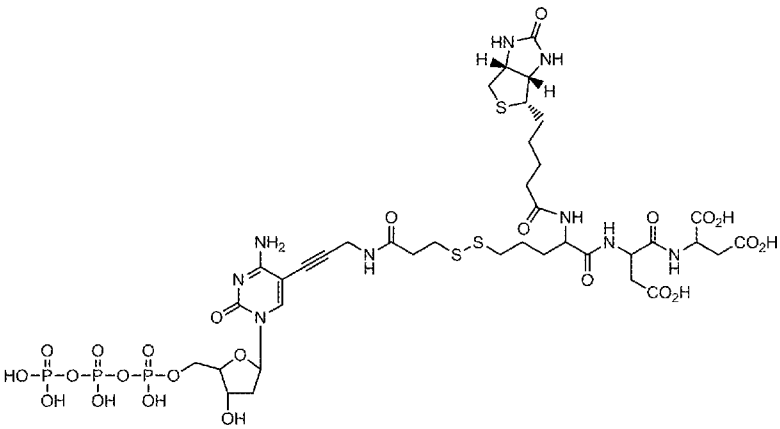
（17）、



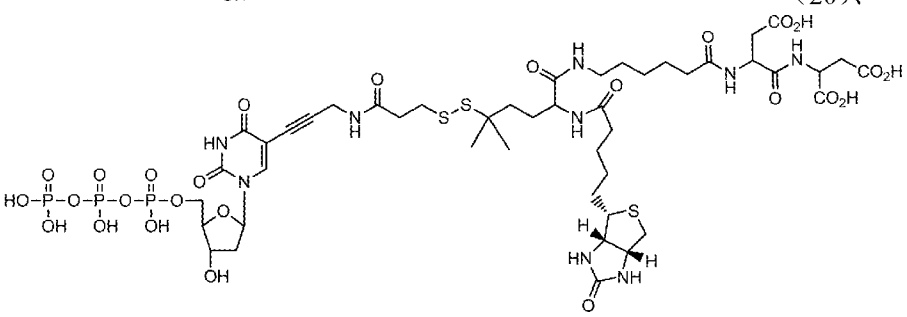
（18）、



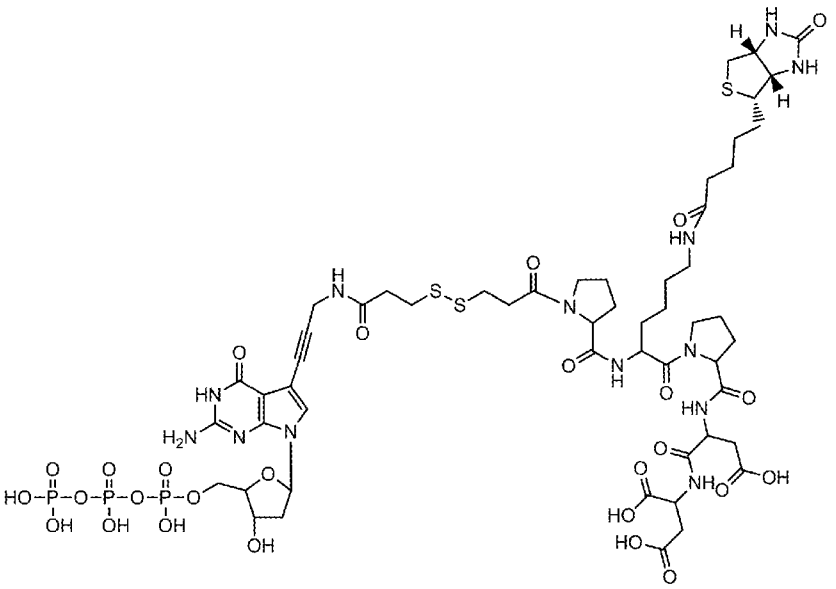
（19）、



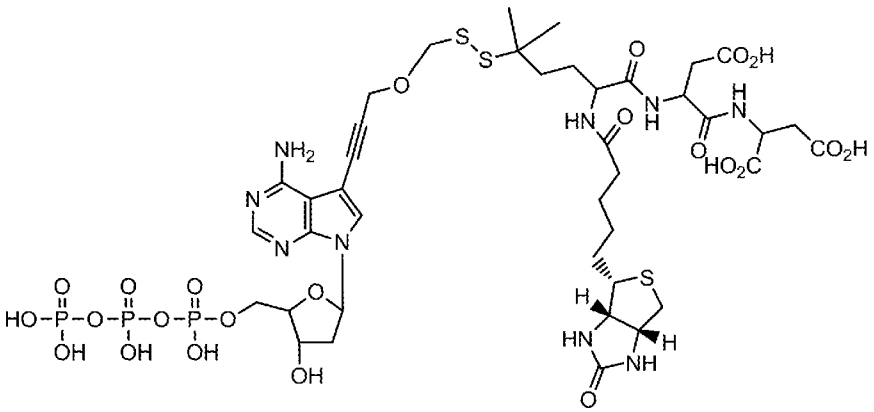
（20）、



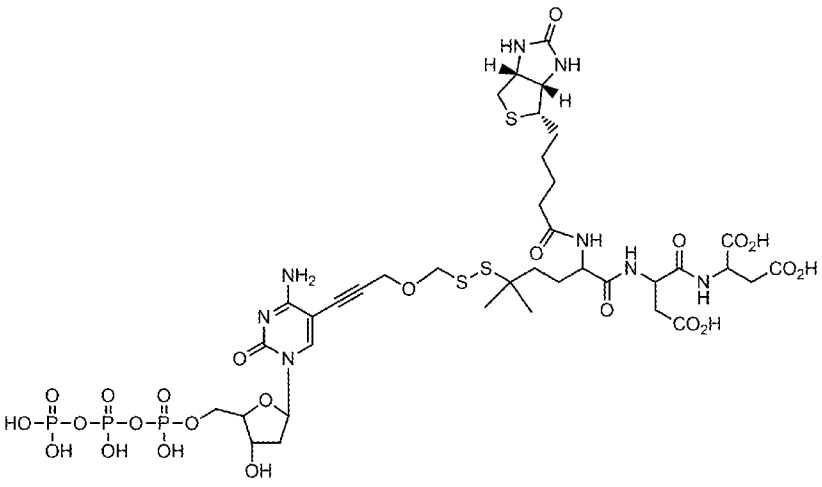
（21）、



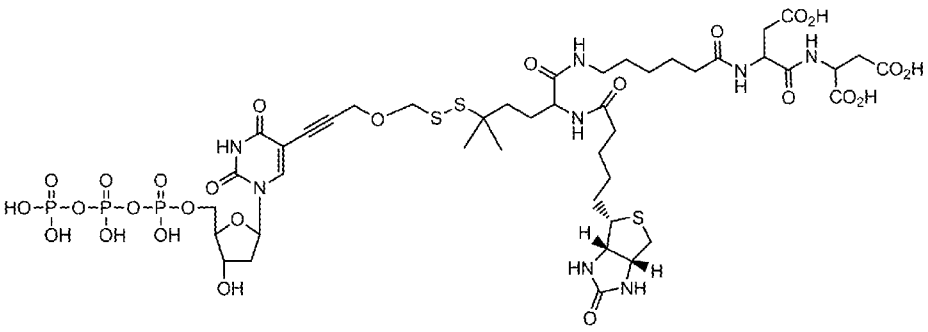
（22）、



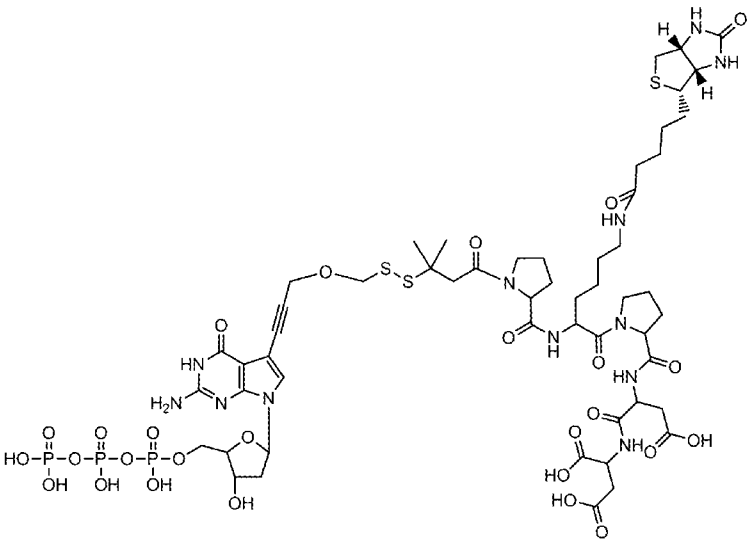
（23）、



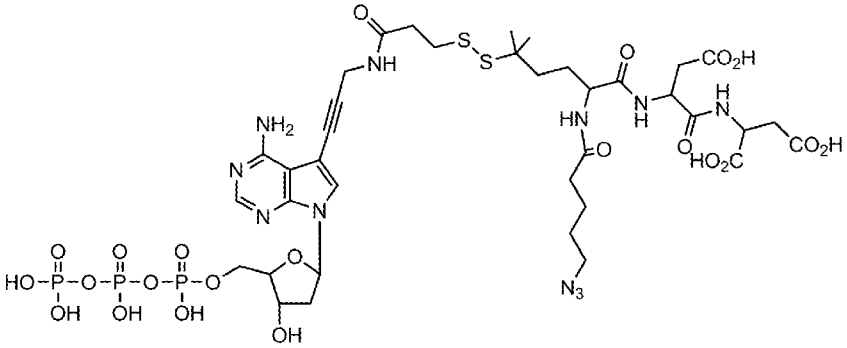
（24）、



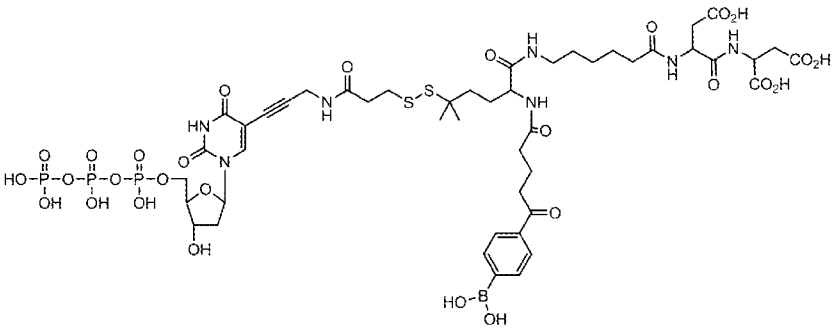
（25）、



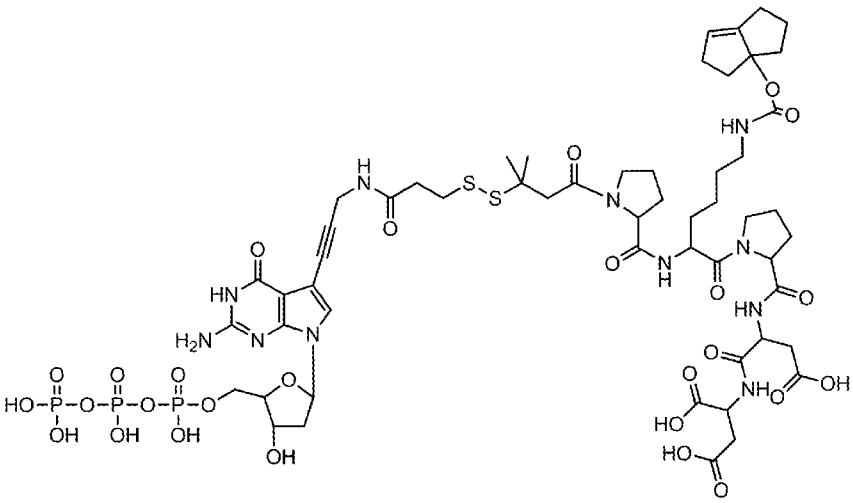
（26）、



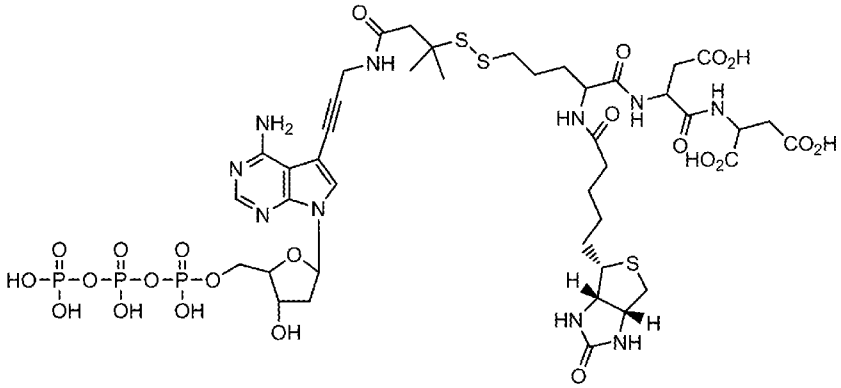
（27）、



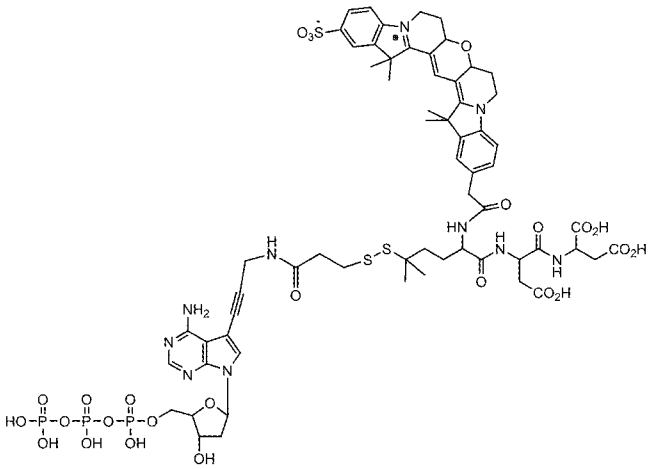
（28，该化合物中的 B 为硼原子）



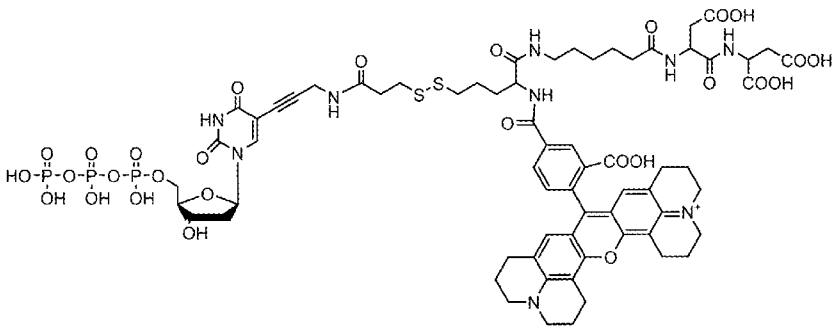
（29）、



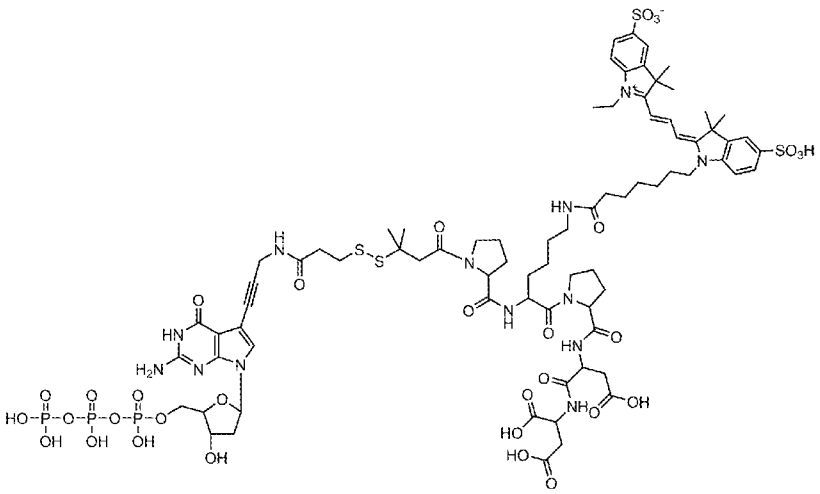
(30)、



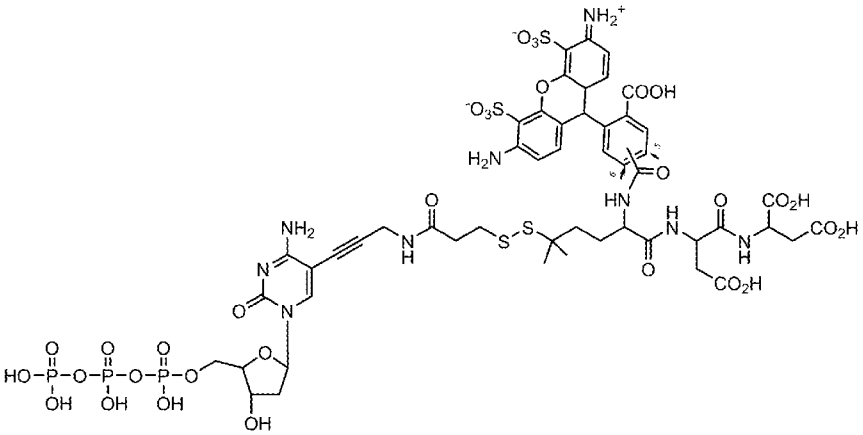
(31)、



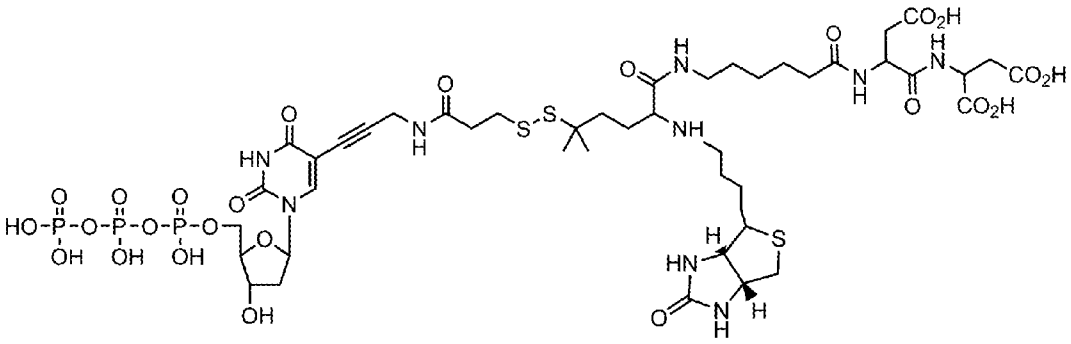
(32)、



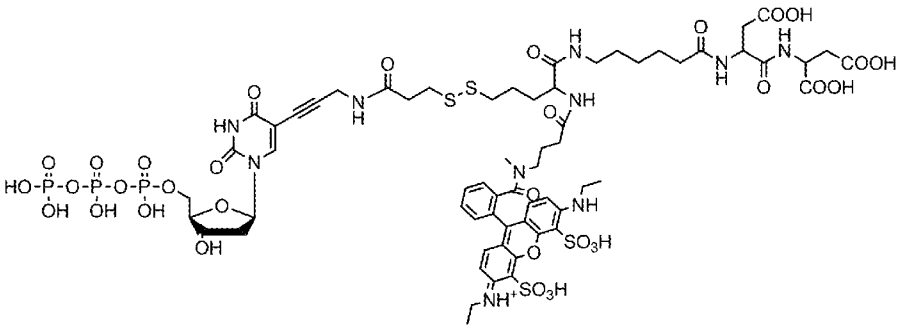
(33)、



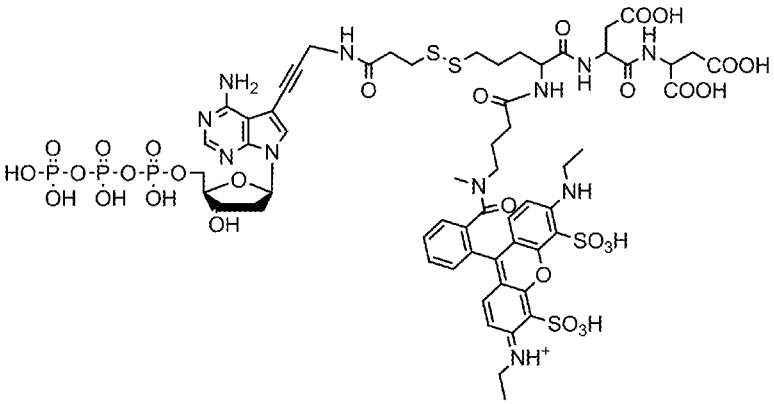
(34)、



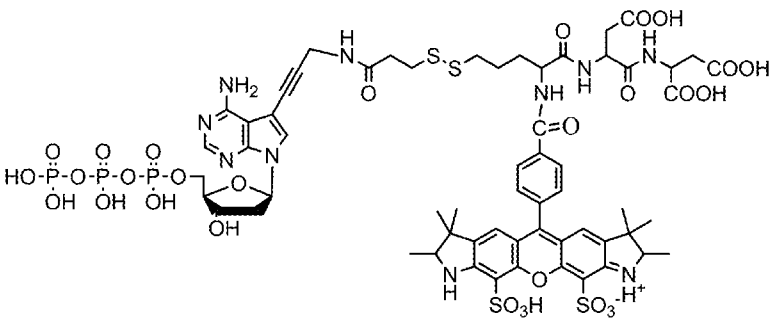
(40)、



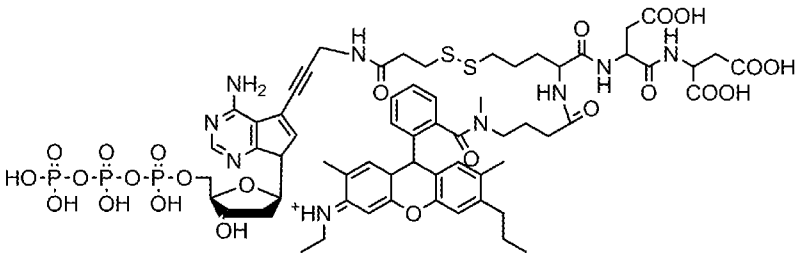
(41)、



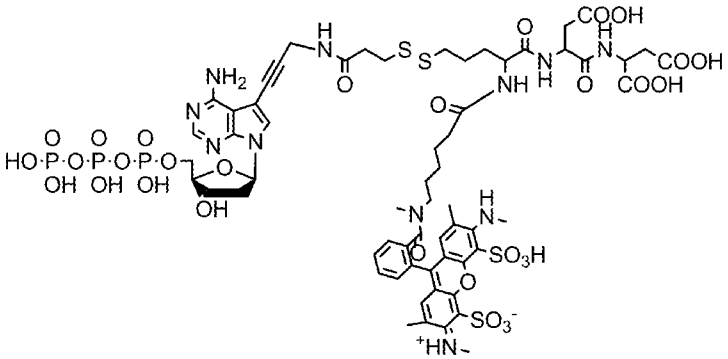
(42)、



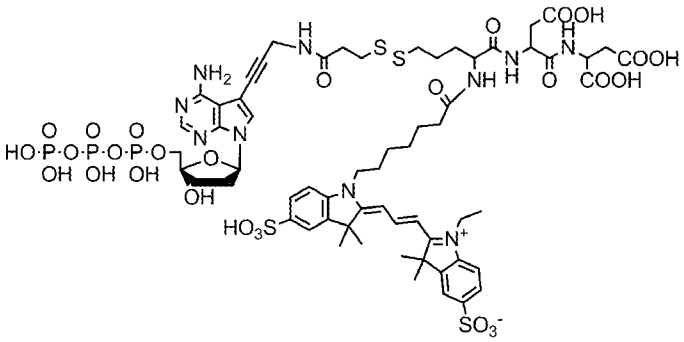
(43)、



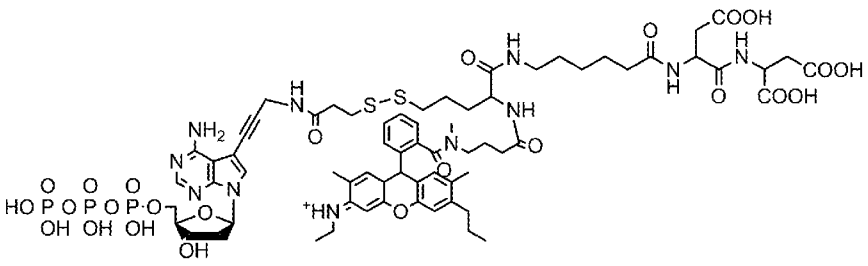
(44)、



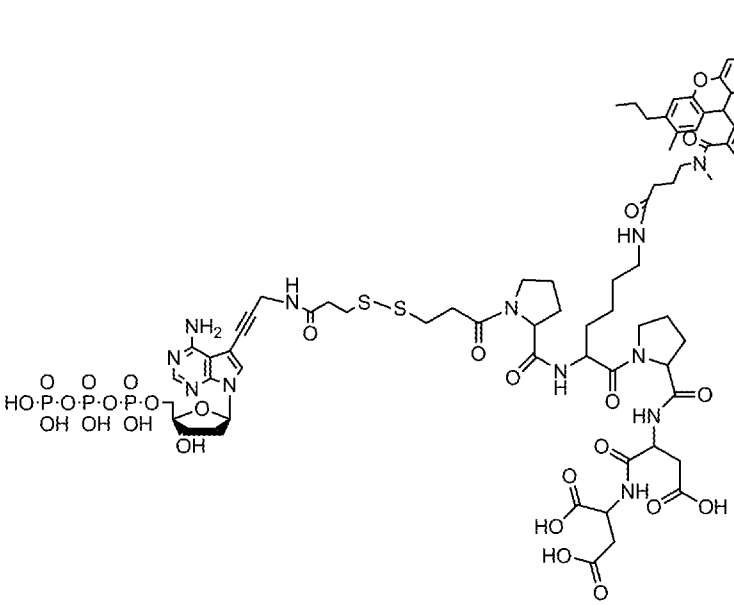
(45)、



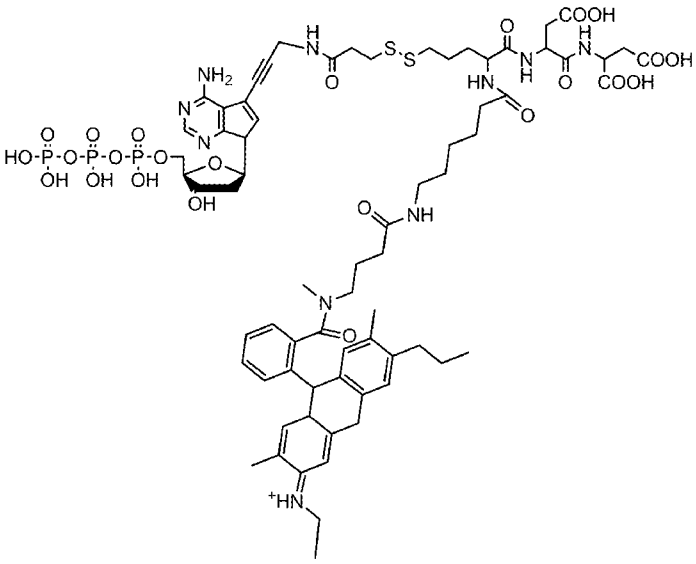
(46)、



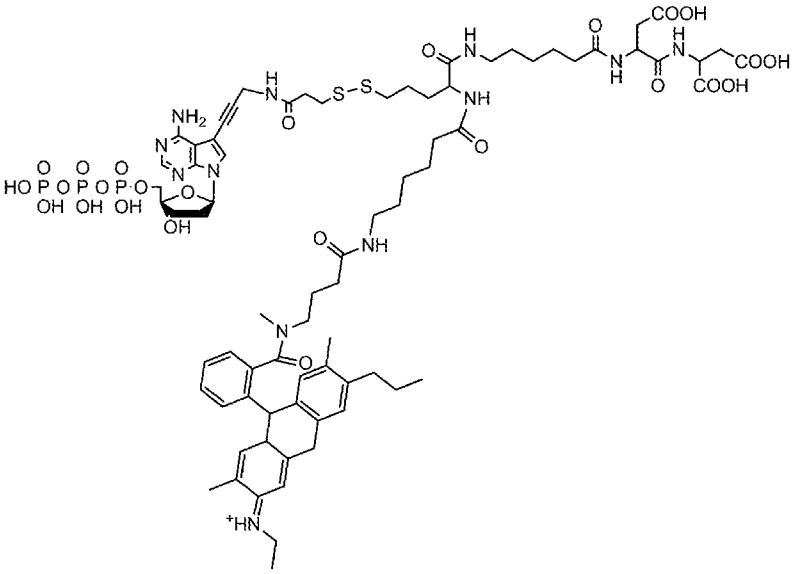
(47)、



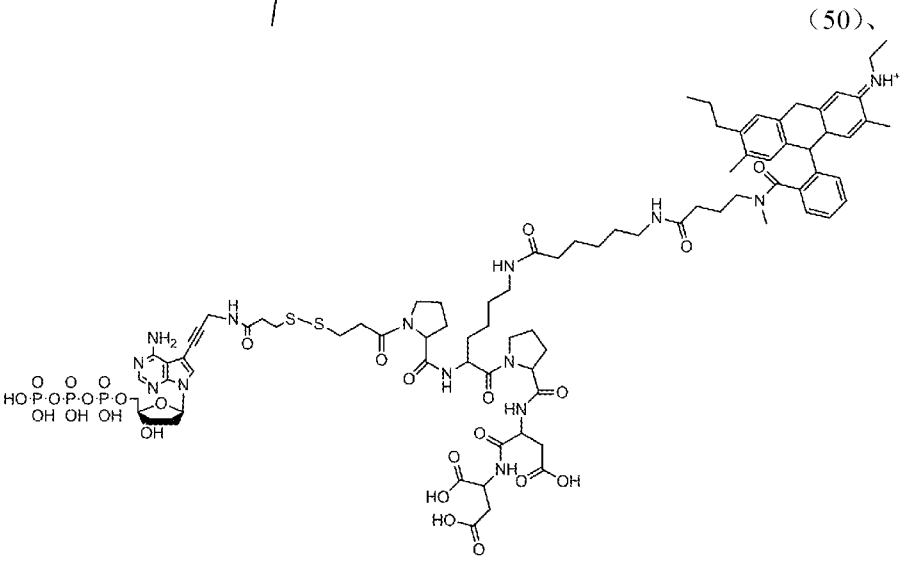
(48)、



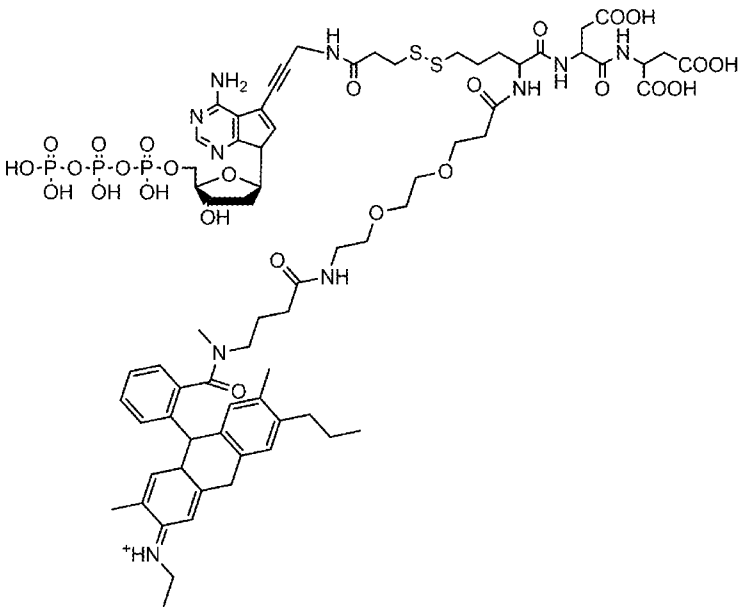
（49）、



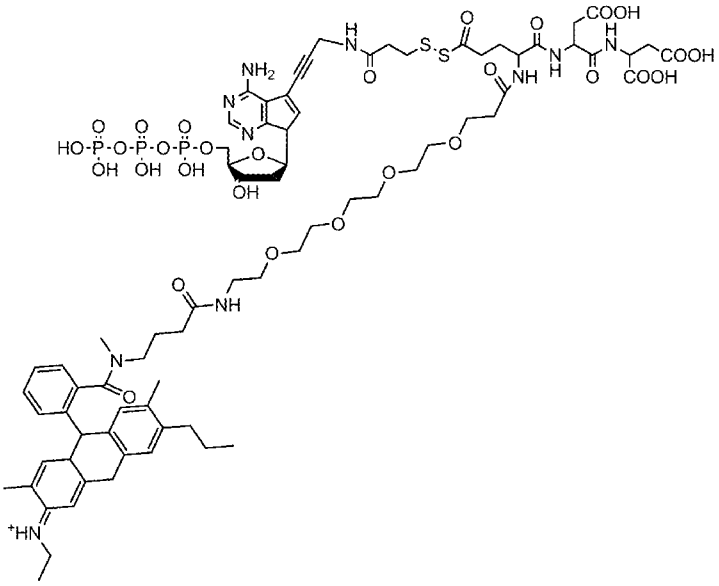
（50）、



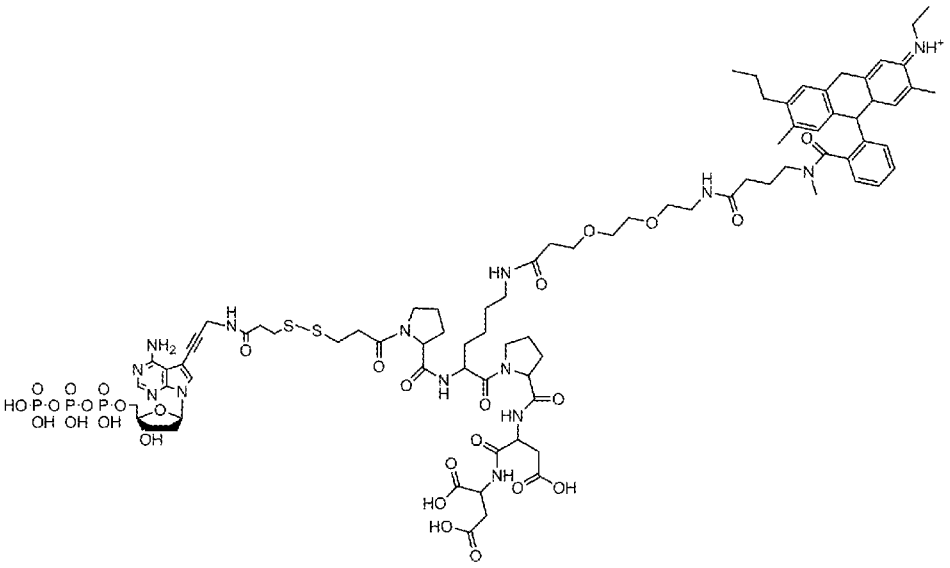
（51）、



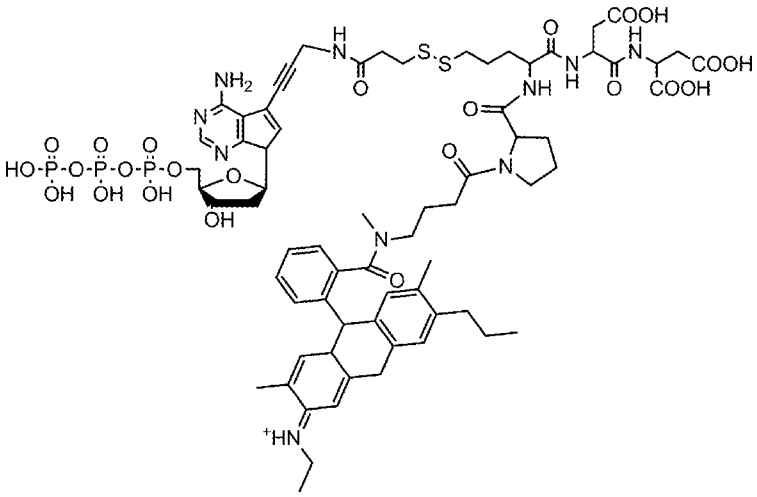
（52）、



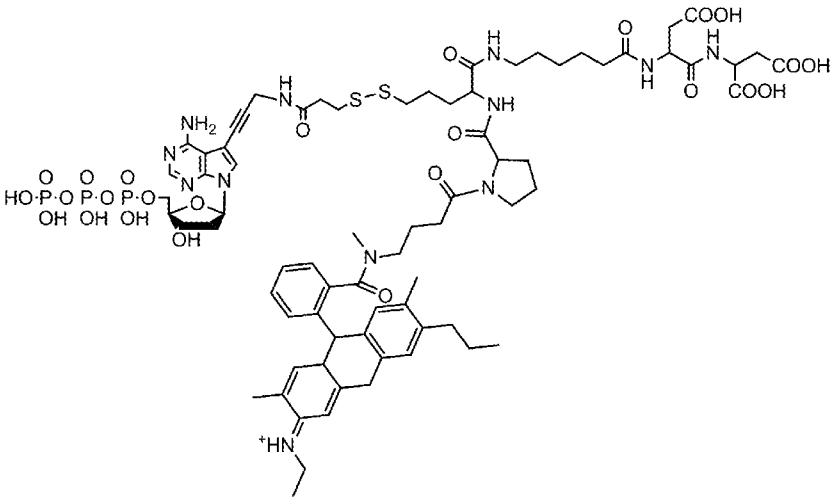
（53）、



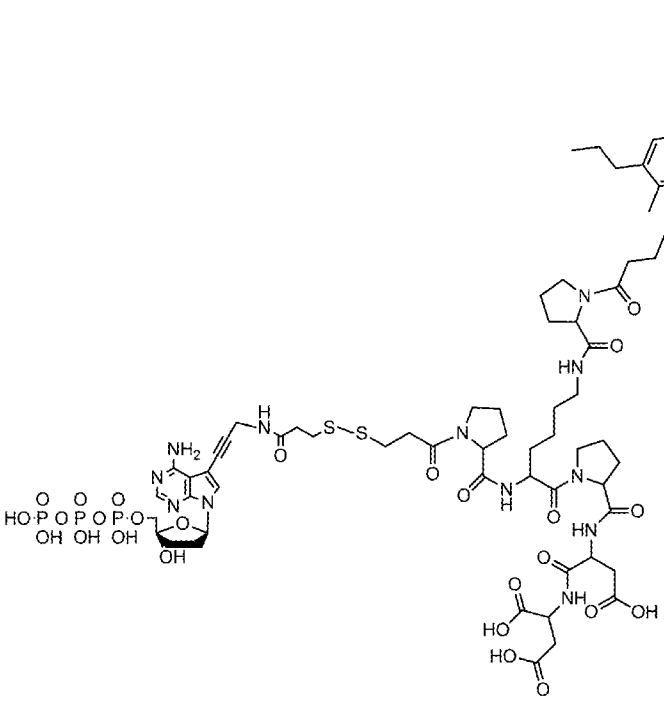
（54）、



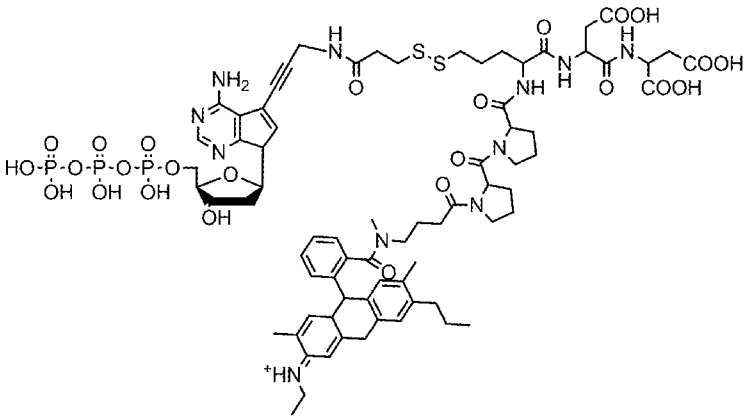
(55)、



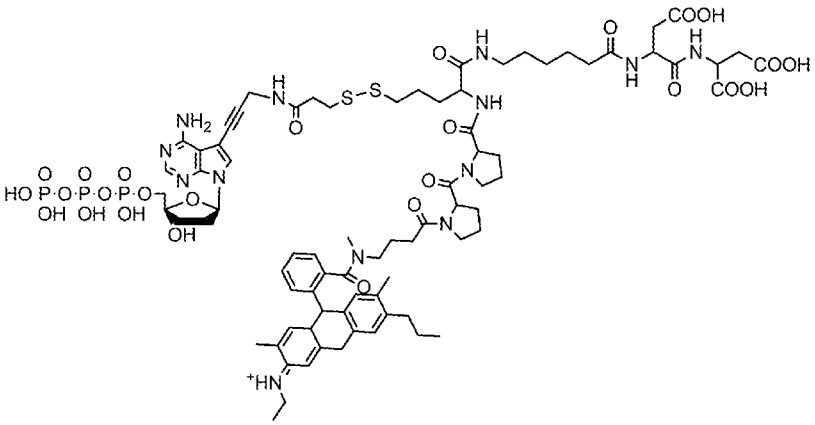
(56)、



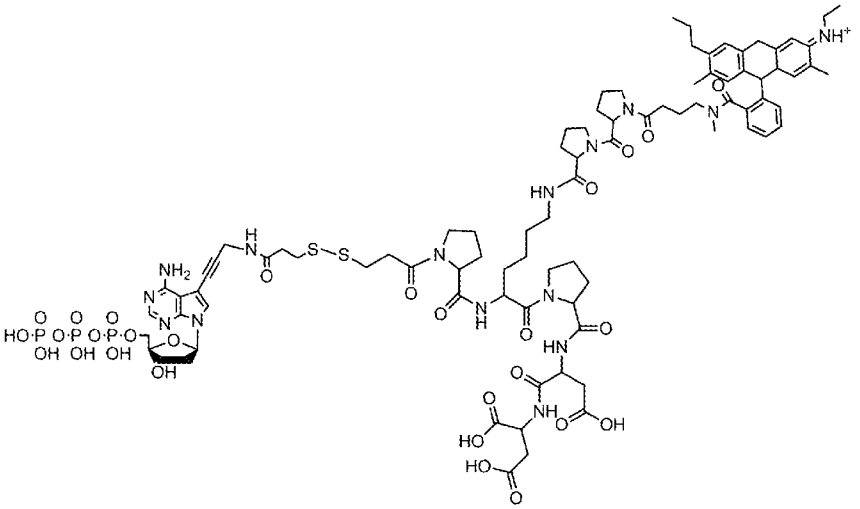
(57)、



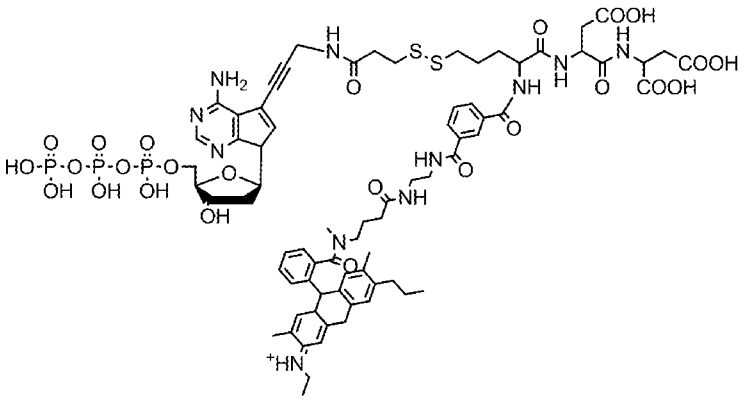
(58)、



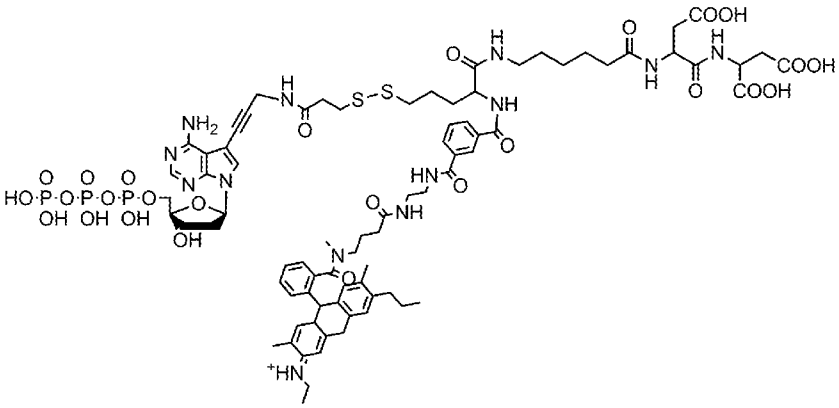
(59)、



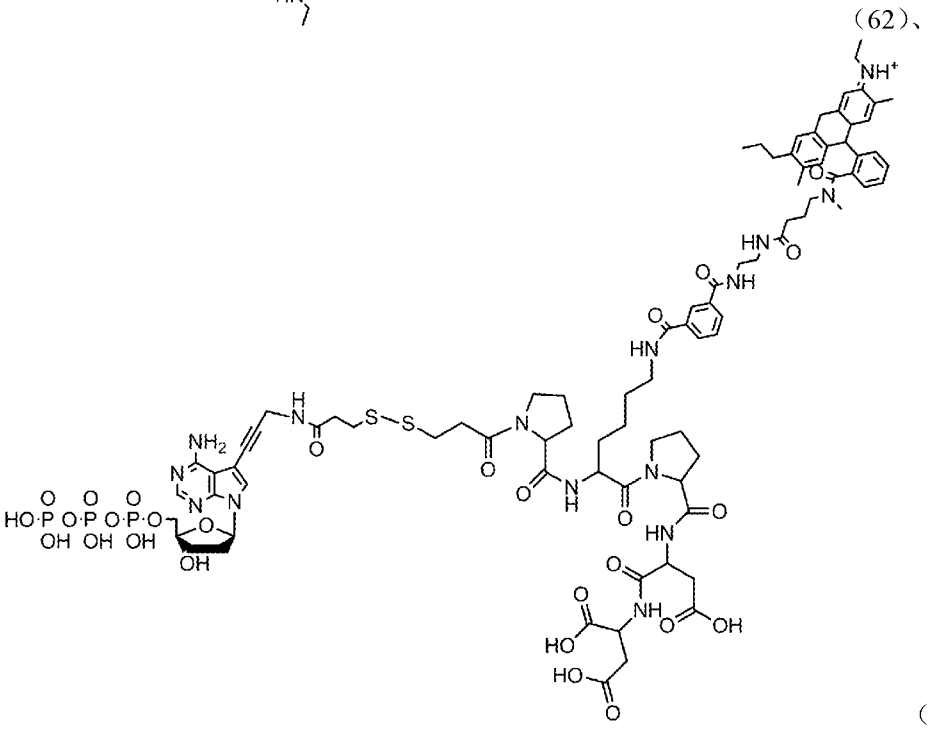
(60)、



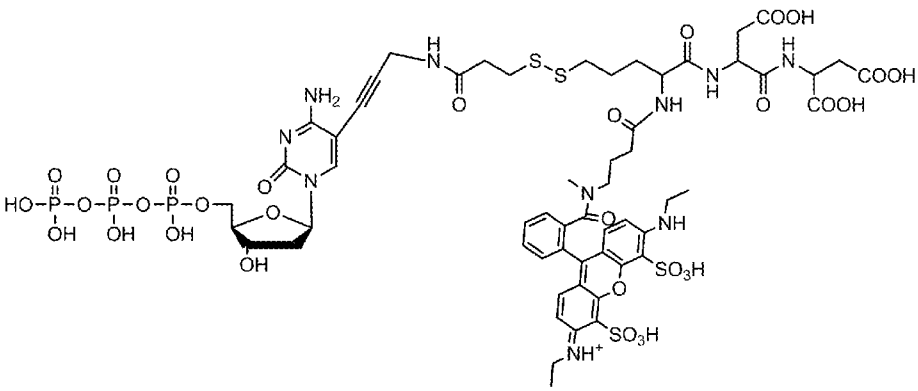
(61)、



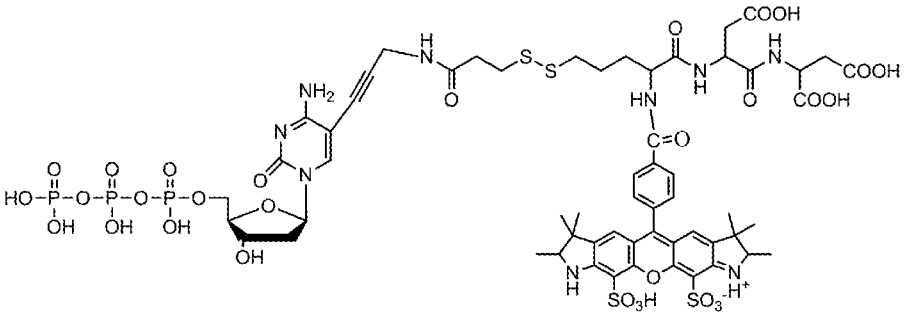
（62）、



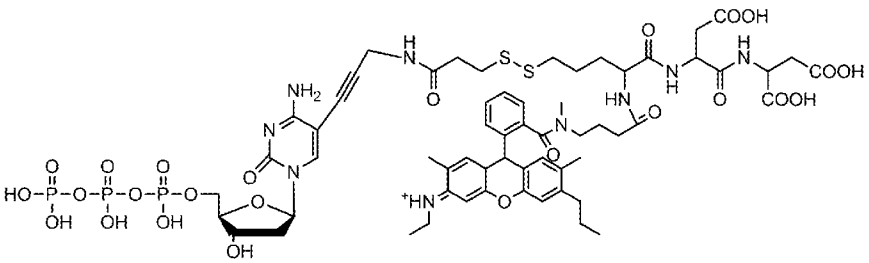
（63）、



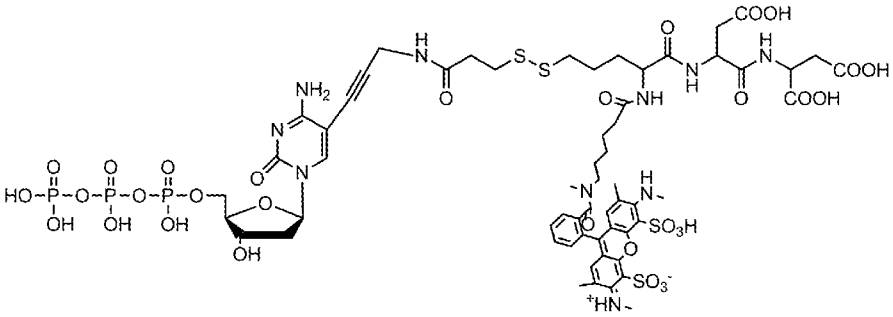
（64）、



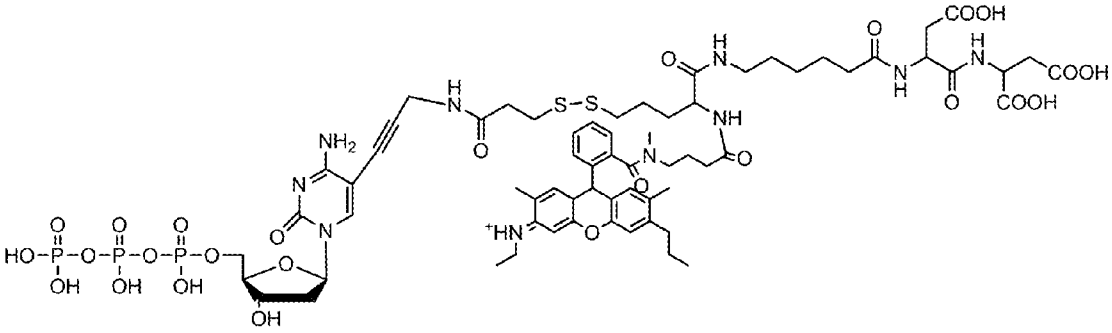
（65）、



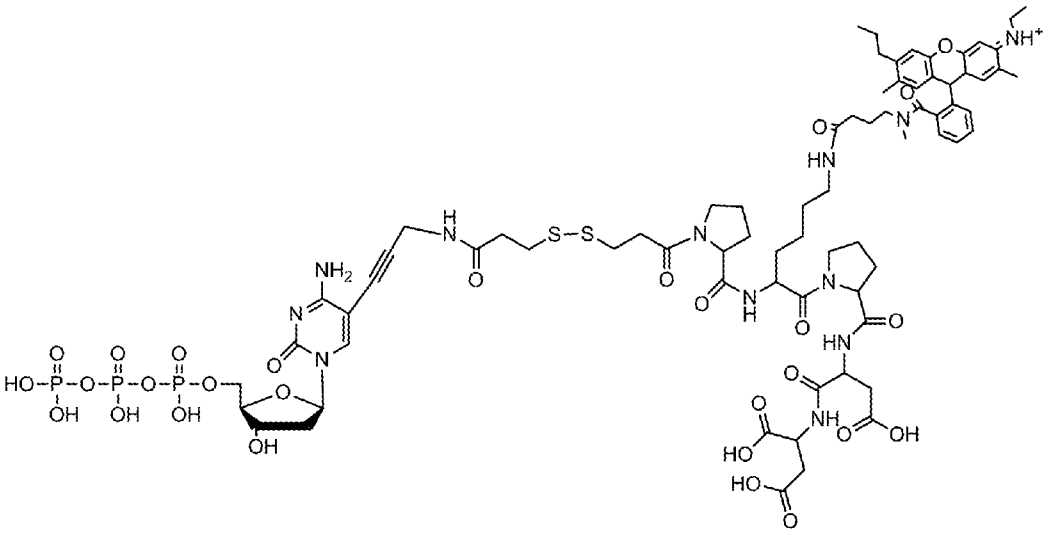
(66)、



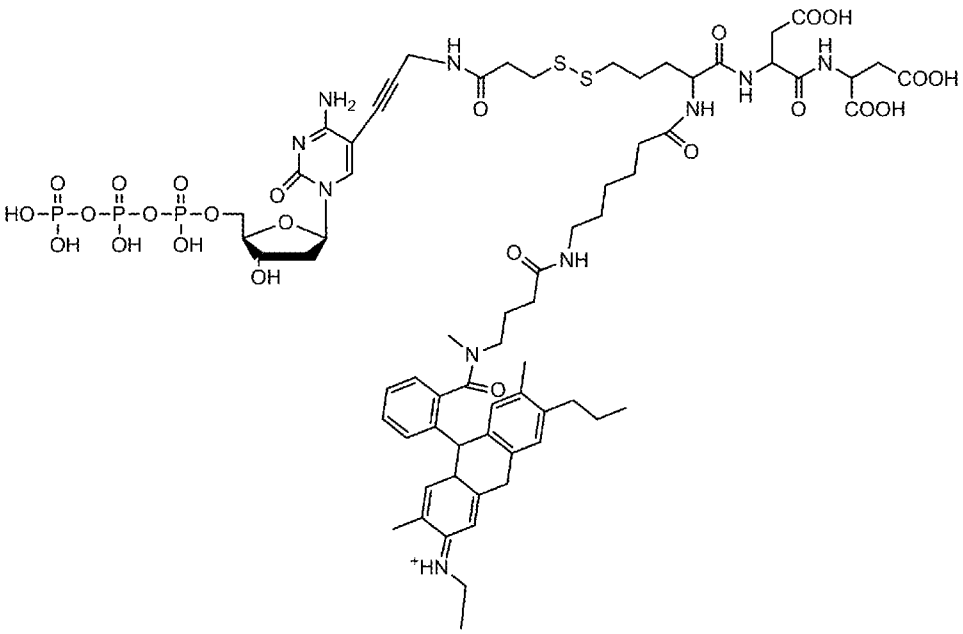
(67)、



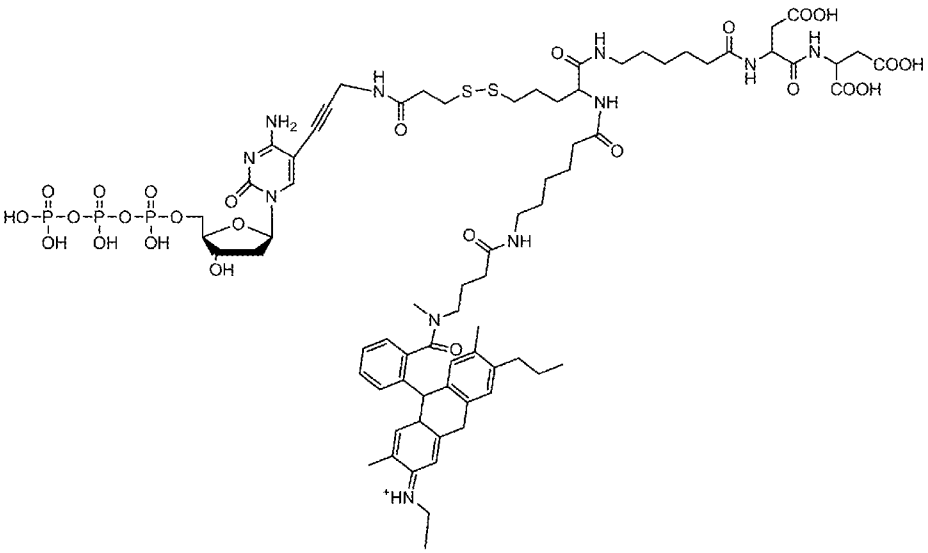
(68)、



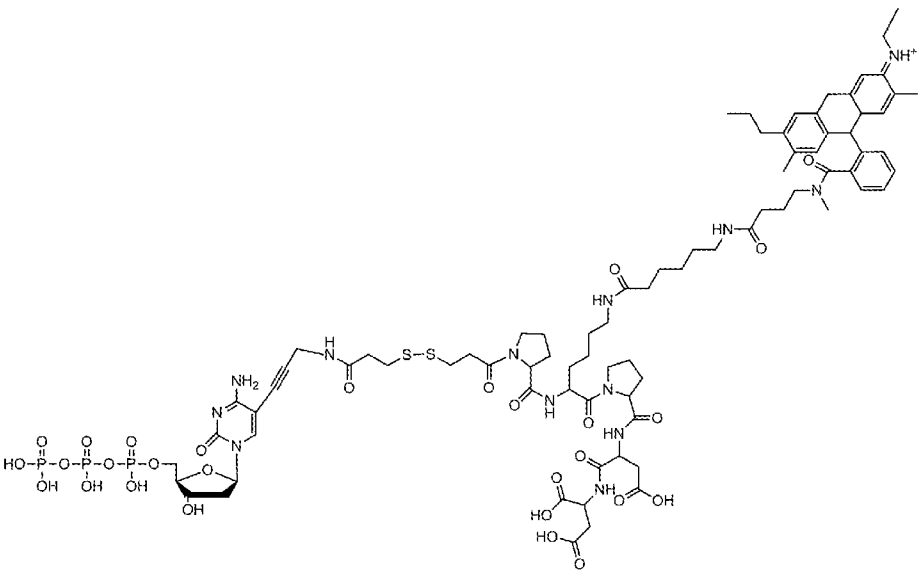
(69)、



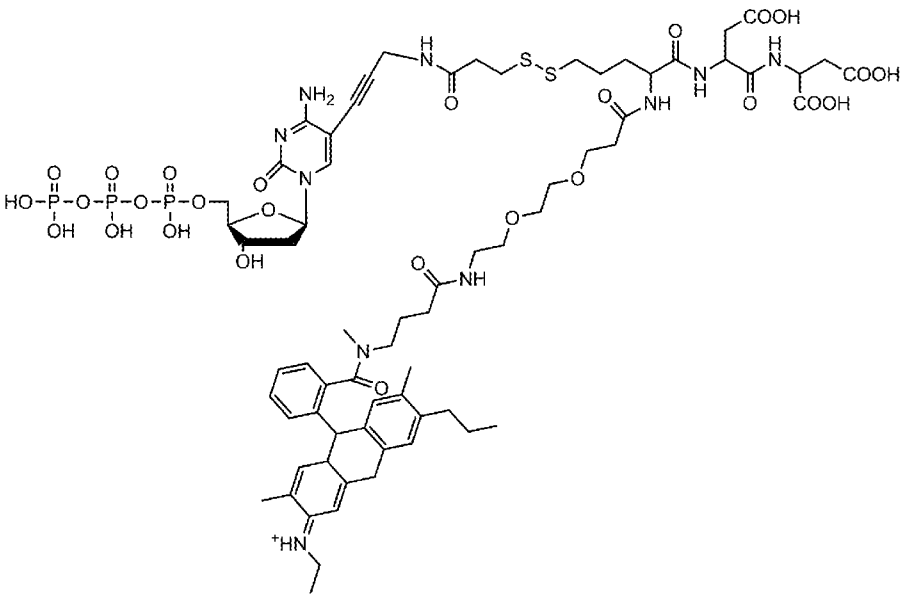
（70）、



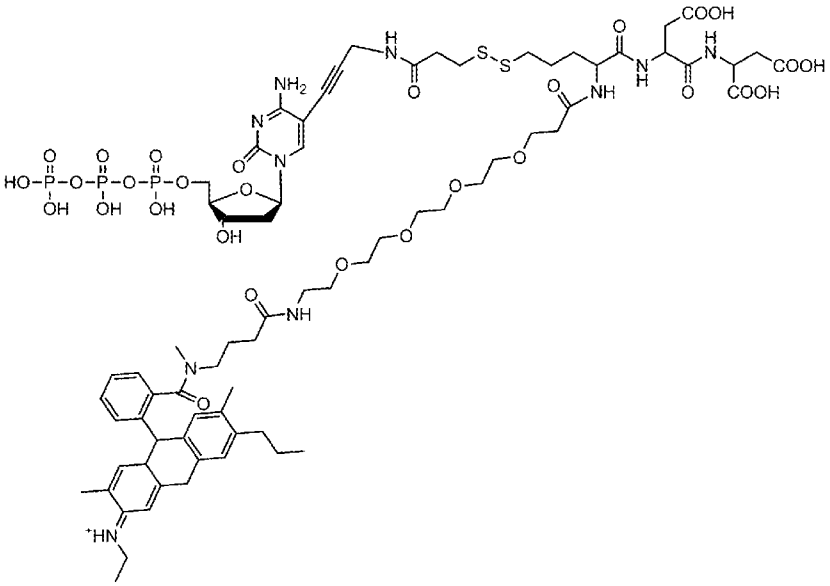
（71）、



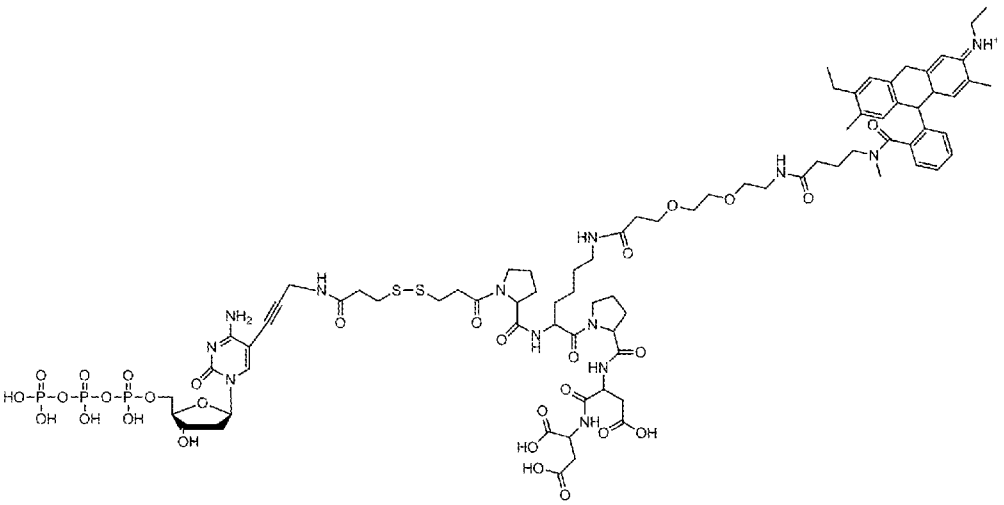
（72）、



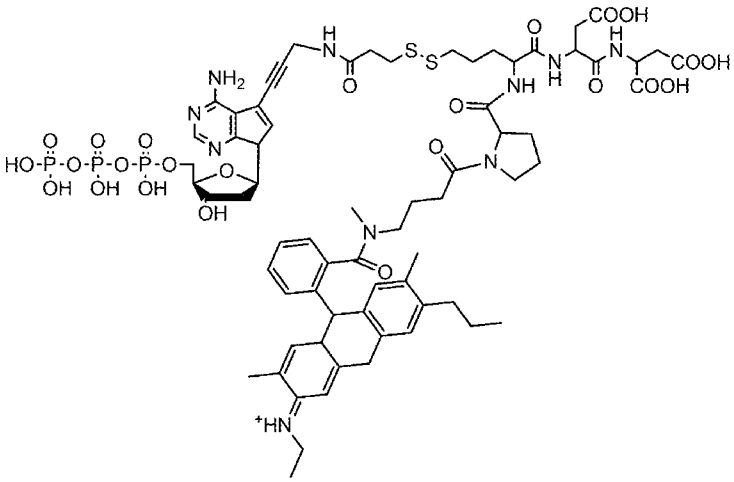
（73）、



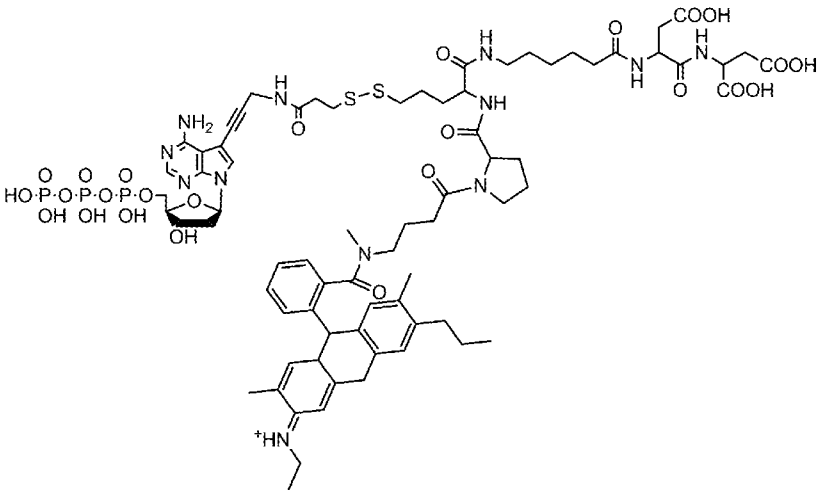
（74）、



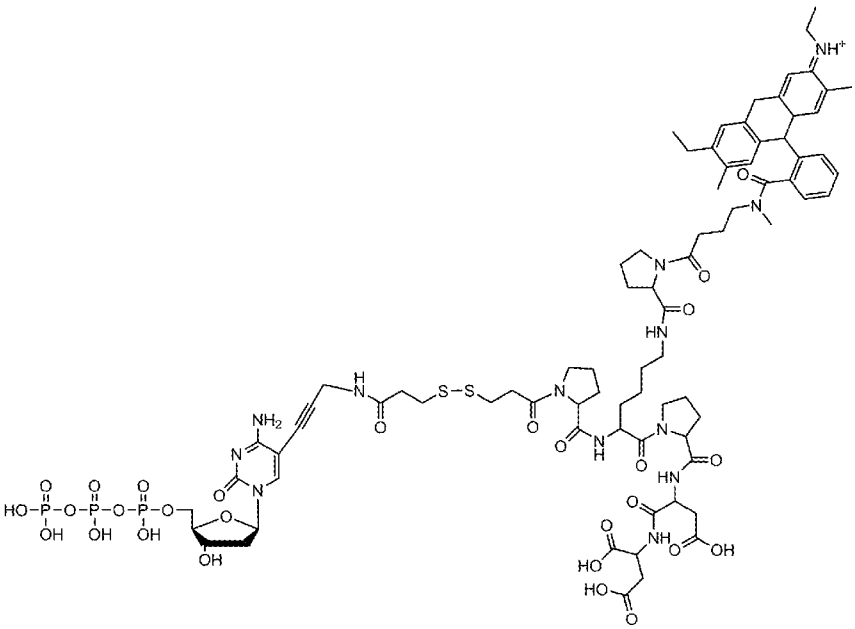
（75）、



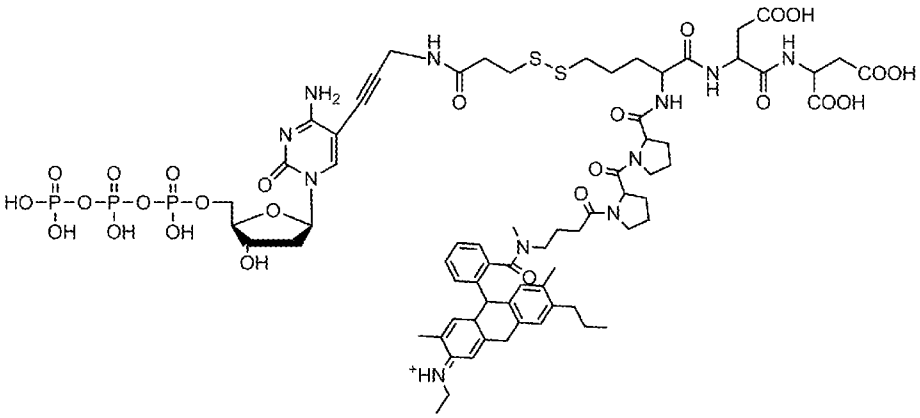
（76）、



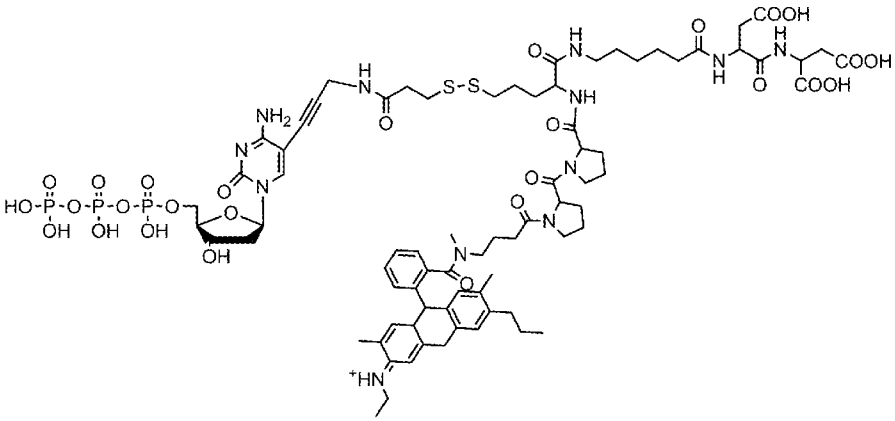
（77），



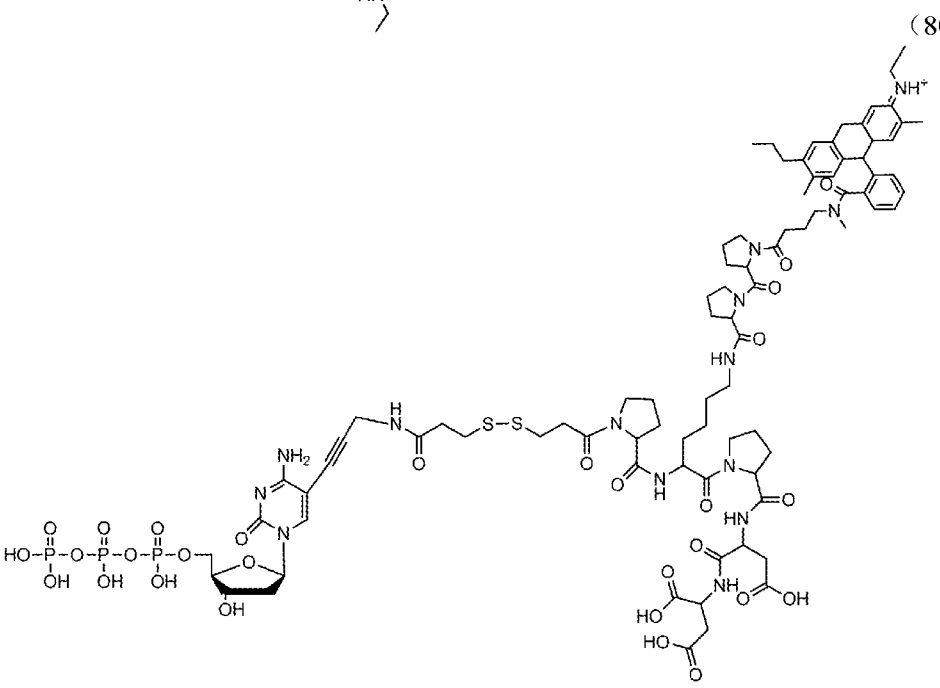
（78）、



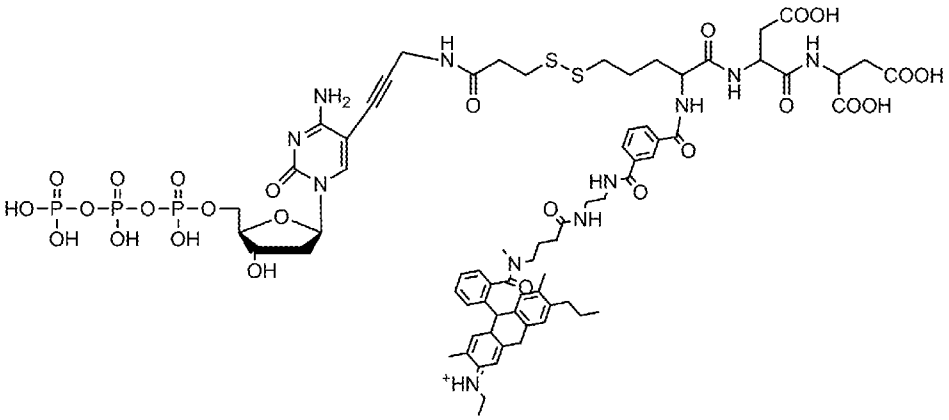
（79）、



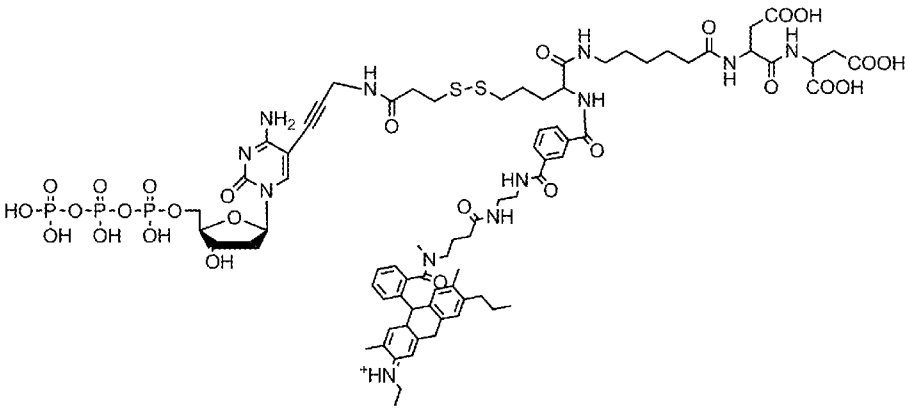
（80）、



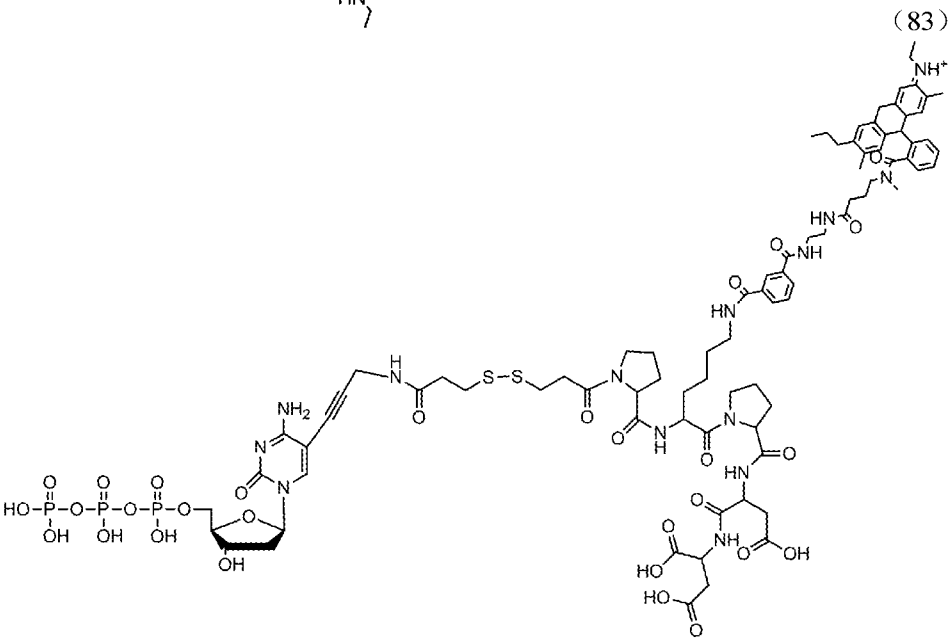
（81）、



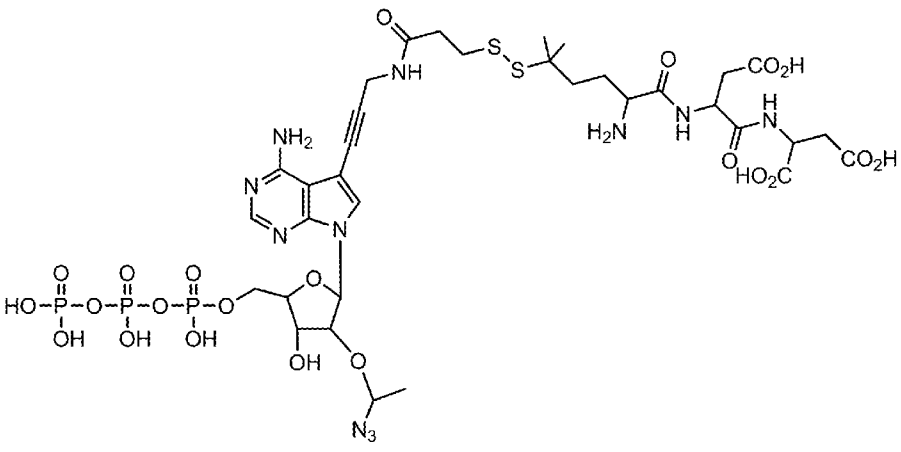
（82）、



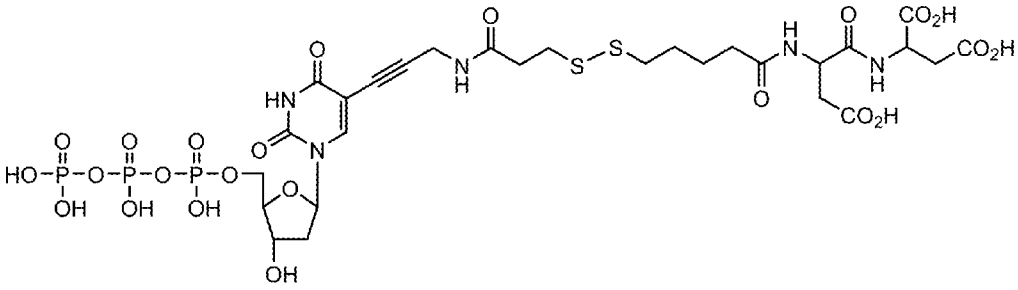
（83）



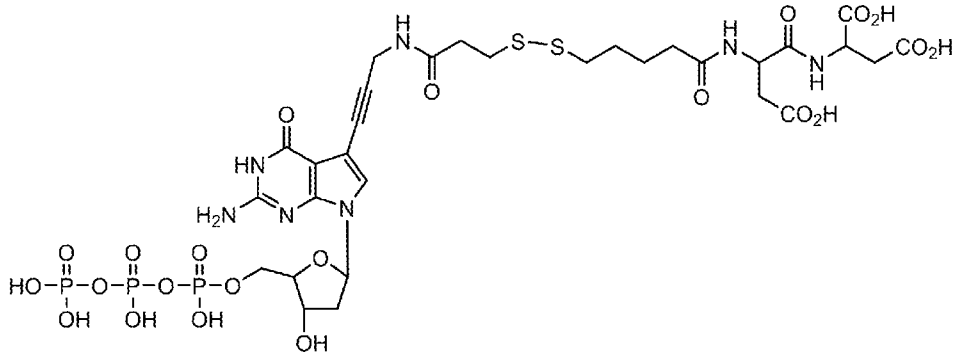
（84）、



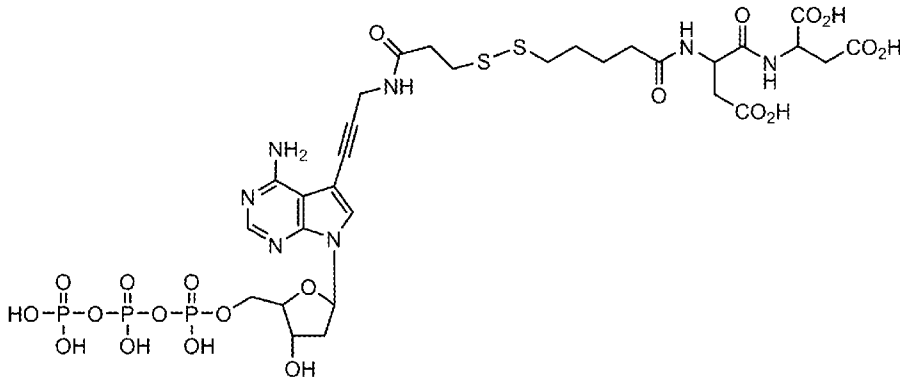
（85）、



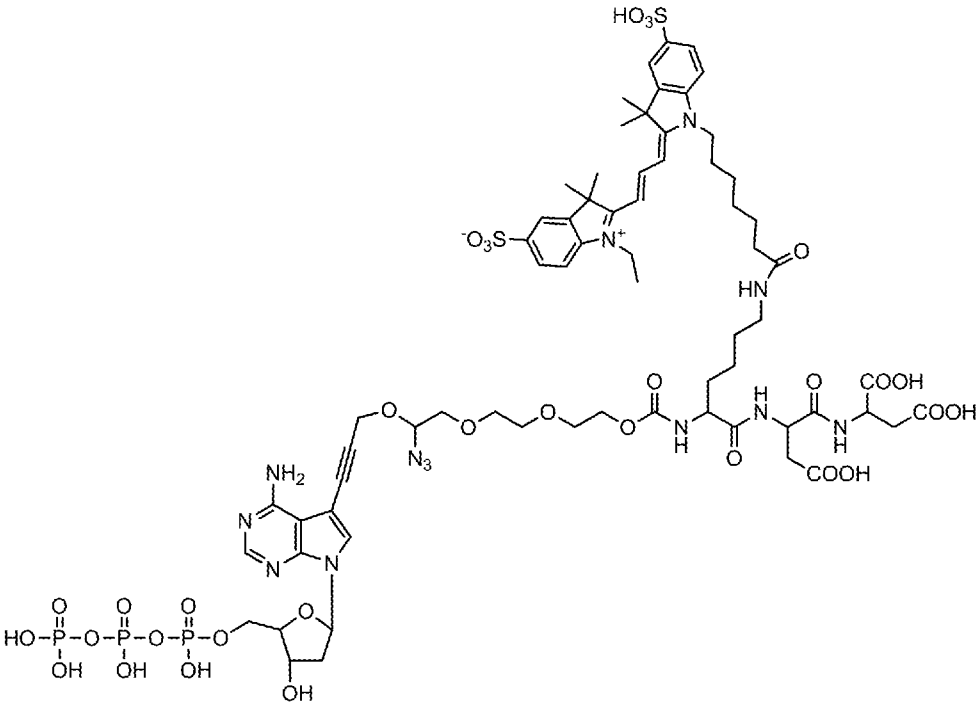
(86)、



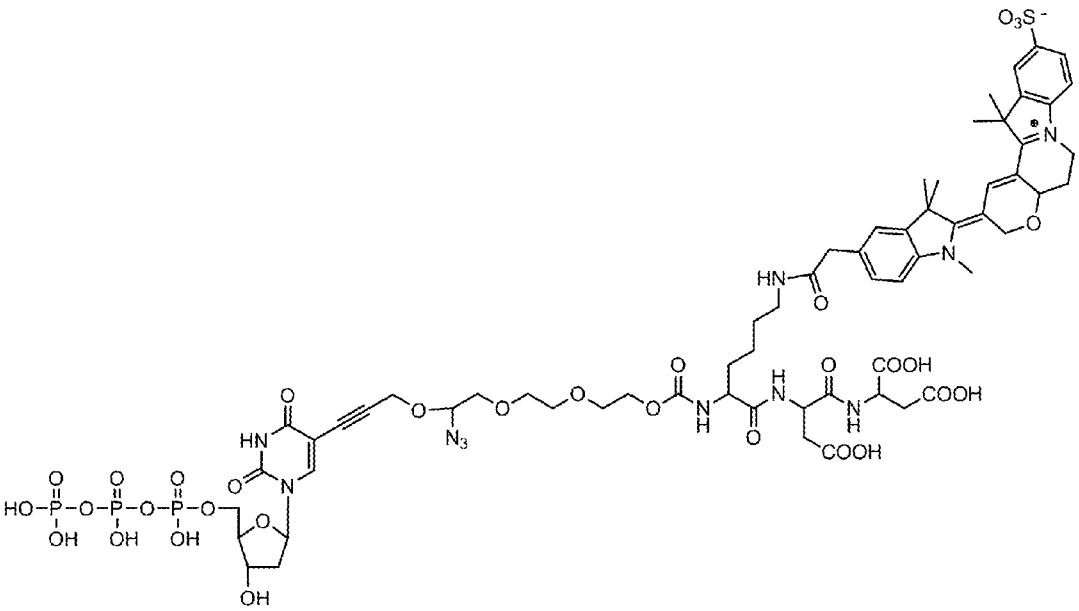
(87)、



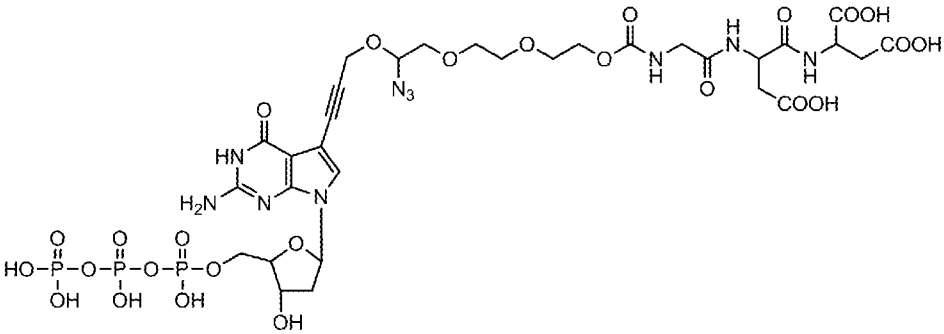
(88)、



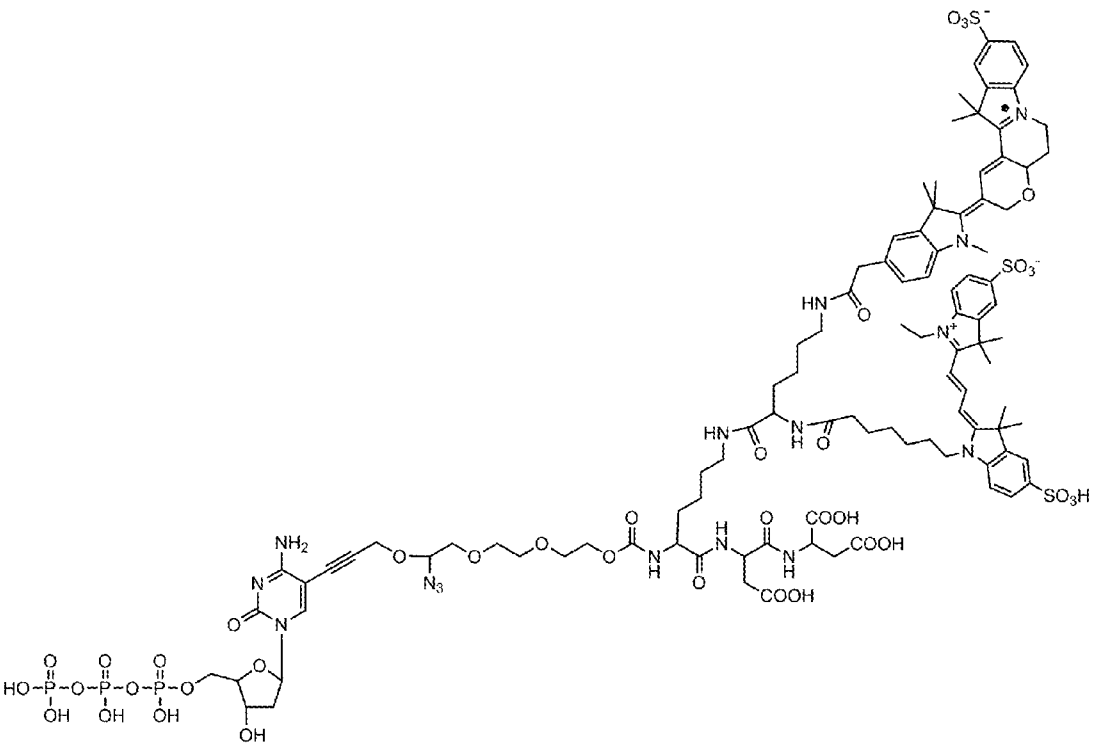
(89)、



（90）、



（91）、



（92）。

28、一种 dNTP 类似物，其特征在于，包括选自下列的至少之一：

dATP 类似物，所述 dATP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 A；

dCTP 类似物，所述 dCTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 C；

dGTP 类似物，所述 dGTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 G；和

dTTP 类似物，所述 dTTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 T。

29、一种 NTP 类似物，其特征在于，包括选自下列的至少之一：

ATP 类似物，所述 ATP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 A；

CTP 类似物，所述 CTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 C；

GTP 类似物，所述 GTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 G；和

UTP 类似物，所述 UTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 U。

30、一种 dNTP 类似物混合物，其特征在于，包括：

dATP 类似物，所述 dATP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 A；

dCTP 类似物，所述 dCTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 C；

dGTP 类似物，所述 dGTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 G；和

dTTP 类似物，所述 dTTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物， B 为碱基 T，

其中，dATP 类似物、dCTP 类似物、dGTP 类似物和 dTTP 类似物中的至少三种分别具有不同的可检测基团。

31、一种 dNTP 类似物混合物，其特征在于，包括下述任意两种核苷酸类似物的组合：

dATP 类似物，所述 dATP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 A；

dCTP 类似物，所述 dCTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 C；

dGTP 类似物，所述 dGTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物， B 为碱基 G；和

dTTP 类似物，所述 dTTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 T，

其中，组合中两种核苷酸类似物具有不同的可检测基团。

32、一种 NTP 类似物混合物，其特征在于，包括：

ATP 类似物，所述 ATP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 A；

CTP 类似物，所述 CTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 C；

GTP 类似物，所述 GTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 G；和

UTP 类似物，所述 UTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 U，

其中，ATP 类似物、CTP 类似物、GTP 类似物和 UTP 类似物中的至少三种分别具有不同的可检测基团。

33、一种 NTP 类似物混合物，其特征在于，包括下述任意两种核苷酸类似物的组合：

ATP 类似物，所述 ATP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 A；

CTP 类似物，所述 CTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 C；

GTP 类似物，所述 GTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 G；和

UTP 类似物，所述 UTP 类似物为权利要求 1～27 中任一项所述的化合物，B 为碱基 U，

其中，组合中两种核苷酸类似物具有不同的可检测基团。

34、权利要求 28 所述的 dNTP 类似物或者权利要求 29 所述的 NTP 类似物或者权利要求 30 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 31 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 32 所述的 NTP 类似物混合物或者权利要求 33 所述的 NTP 类似物混合物在核酸测序或者可控聚合酶链式反应或者碱基延伸反应中的用途。

35、一种用于核酸测序或者可控链式聚合酶反应的试剂盒，包括：

权利要求 28 所述的 dNTP 类似物或者权利要求 29 所述的 NTP 类似物或者权利要求 30 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 31 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 32 所述的 NTP 类似物混合物或者权利要求 33 所述的 NTP 类似物混合物。

36、根据权利要求 35 所述的试剂盒，其特征在于，进一步包括：

切断试剂，所述切断试剂可作用于可切割基团或者可切割键；和/或

DNA 聚合酶。

37、根据权利要求 36 所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括切断试剂，所述切断试剂为 TCEP/THPP。

38、一种测定核酸序列的方法，其特征在于，包括：

（a）将第一核酸模板-引物复合物、一种或多种核苷酸类似物以及 DNA 聚合酶的混合物置于适于碱基延伸的条件下，使所述核苷酸类似物结合到所述第一核酸模板-引物复合物上，获得延伸产物；

所述核苷酸类似物选自权利要求 28 所述的 dNTP 类似物或者权利要求 29 所述的 NTP 类似物或者权利要求 30 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 31 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 32 所述的 NTP 类似物混合物或者权利要求 33 所述的 NTP 类似物混合物。

39、根据权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述第一核酸模板-引物复合物连接在固相载体上。

40、根据权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述第一核酸模板-引物复合物固定在芯片上或者

微球上。

41、根据权利要求 38 所述的方法，其特征在于，进一步包括：

（b）作用于所述延伸产物上的可切割基团或可切割键，获得第二核酸模板-引物复合物；

（c）以所述第二核酸模板引物复合物替代所述第一模板-引物复合物，进行（a）和（b）至少一次。

42、根据权利要求 38-41 任一所述的方法，其特征在于，（a）还包括：

检测所述延伸产物，以获得对应于结合到该第一核酸模板-引物复合物上的核苷酸类似物的信号。

43、根据权利要求 42 所述的方法，其特征在于，进一步包括：

基于所述信号，确定所述核酸序列。

44、根据权利要求 38 所述的方法，其特征在于，所述核苷酸类似物包含靶向基团，（a）包括加入可检测化合物来获得所述延伸产物，所述可检测化合物带有特异性基团能够与所述靶向基团特异性结合。

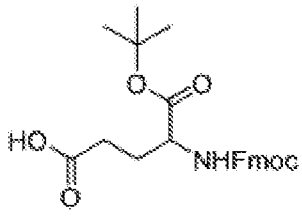
45、一种延伸引物的方法，其特征在于，包括将聚合酶、核酸模板-引物复合物以及一种或多种核苷酸类似物置于反应容器内，使所述核苷酸类似物结合到所述核酸模板-引物复合物上，从而获得延伸产物；所述核苷酸类似物选自权利要求 1 至 27 任一项所述的化合物。

46、一种反应混合物，其特征在于，包含待测模板、与待测模板链的至少一部分配对的引物，DNA 聚合酶和权利要求 28 所述的 dNTP 类似物或者权利要求 29 所述的 NTP 类似物或者权利要求 30 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 31 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 32 所述的 NTP 类似物混合物或者权利要求 33 所述的 NTP 类似物混合物。

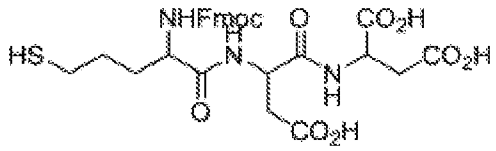
47、根据权利要求 46 所述的反应混合物，其特征在于，所述模板、引物聚合酶以及权利要求 28 所述的 dNTP 类似物或者权利要求 29 所述的 NTP 类似物或者权利要求 30 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 31 所述的 dNTP 类似物混合物或者权利要求 32 所述的 NTP 类似物混合物或者权利要求 33 所述的 NTP 类似物混合物在缓冲液中。

48、一种制备权利要求 1-27 任一项所述化合物的方法，其特征在于，包括：

利用二硫二吡啶和巯基丙酸合成 SPDP；



利用 （10-2）和氯代甲酸乙酯合成第一连接结构，所述第一连接结构为



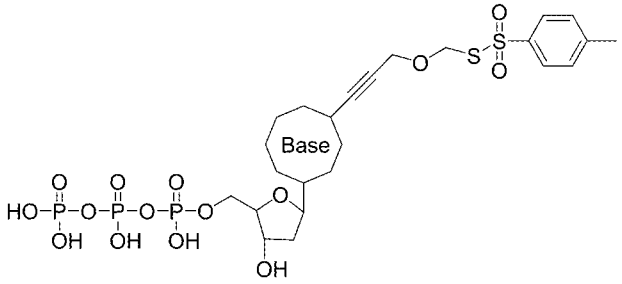
（10-7）；

连接 dNTP 和所述 SPDP，获得 dNTP-SPDP；

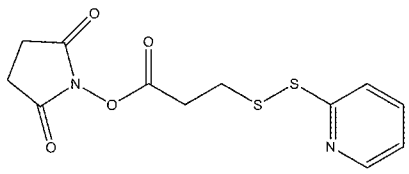
利用所述第一连接结构和所述 dNTP-SPDP，合成所述化合物。

49、一种制备权利要求 1-27 任一项所述化合物的方法，其特征在于，包括：

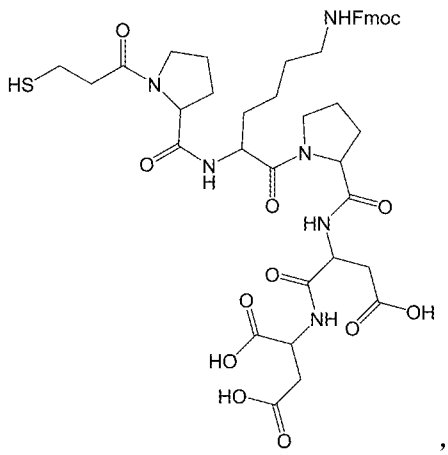
合成 dNTP-MPSSK，所述 dNTP-MPSSK 的结构如下所示：



；



利用 和六肽合成第二连接结构，所述第二连接结构为



，所述六肽为H-Pro-Lys(Fmoc)-Pro-Asp-Asp-OH；

混合所述第二连接结构和所述 dNTP-MPSSK，以制得所述化合物。

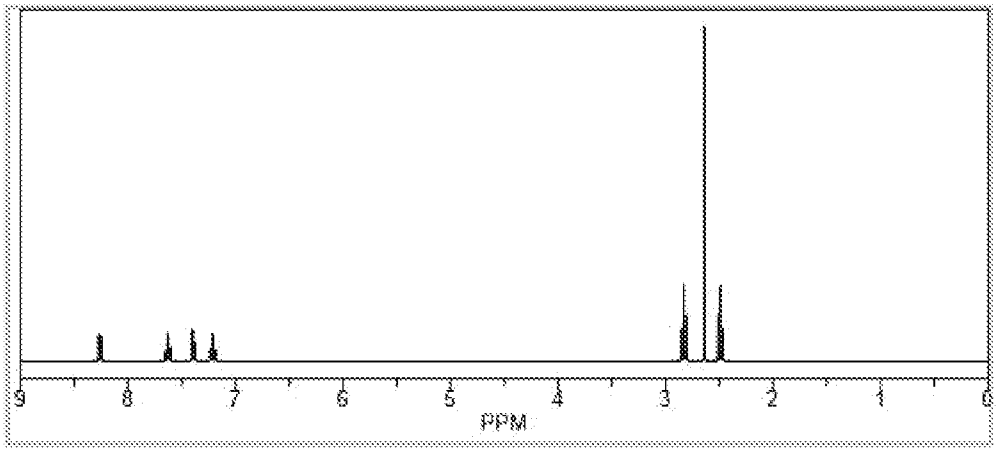
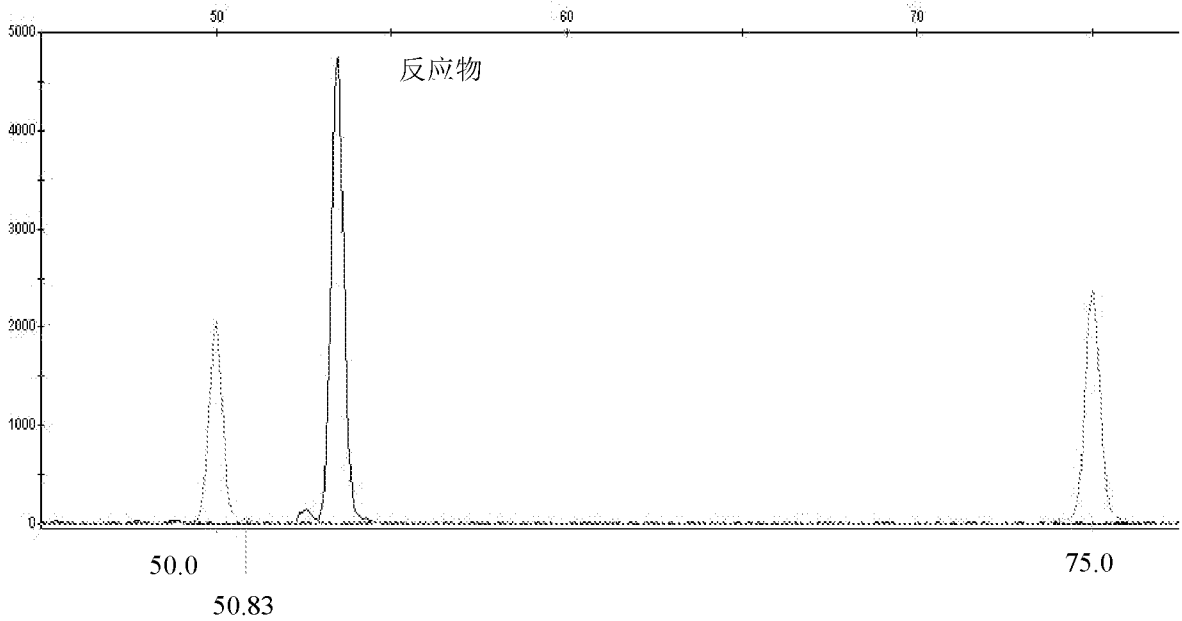

9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
ppm

图 1


50
60
70
5000
4000
3000
2000
1000
0
反应物
50.0
50.83
75.0

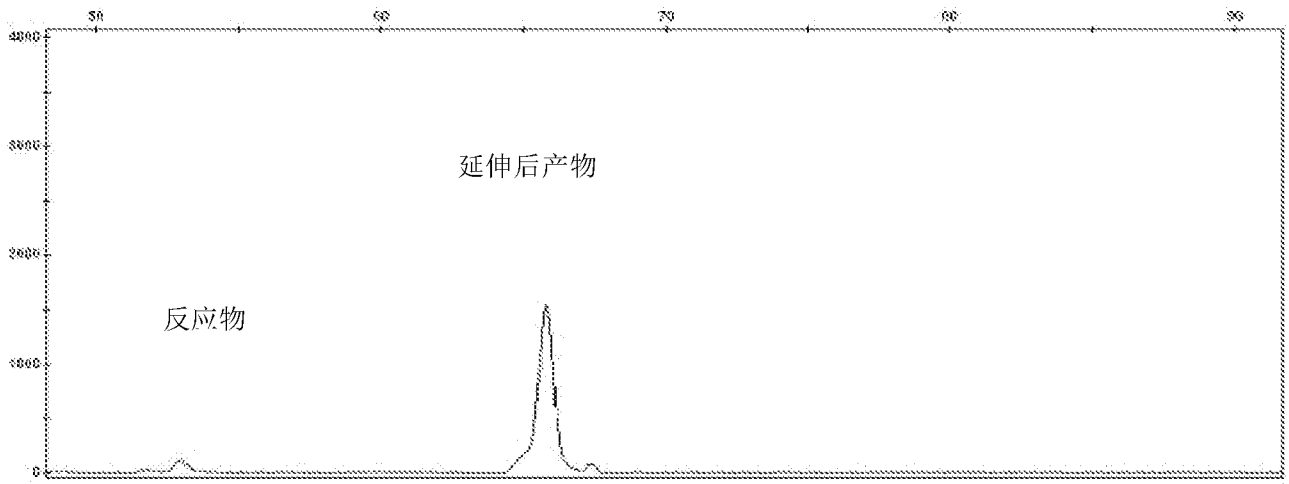

延伸后产物
反应物

图 2

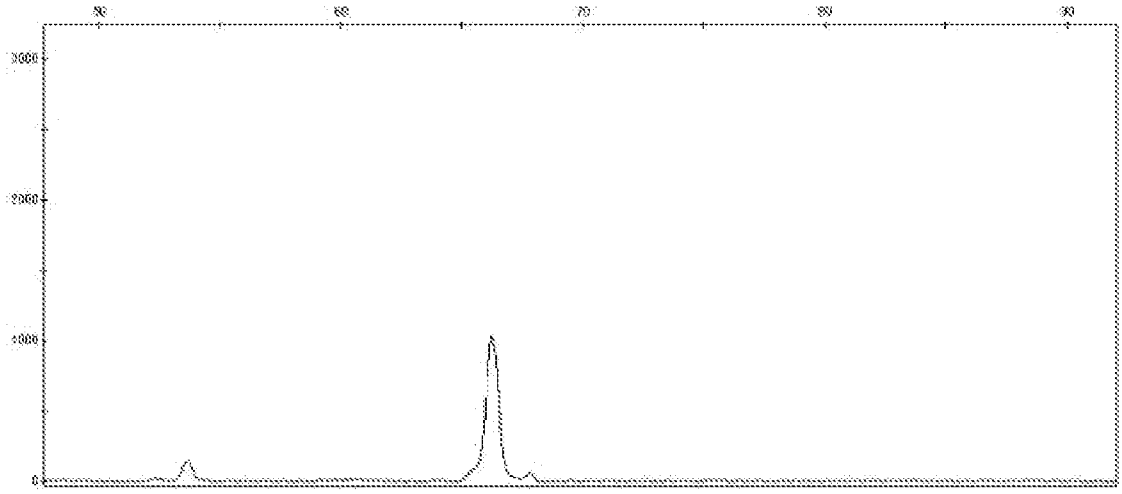


图 3

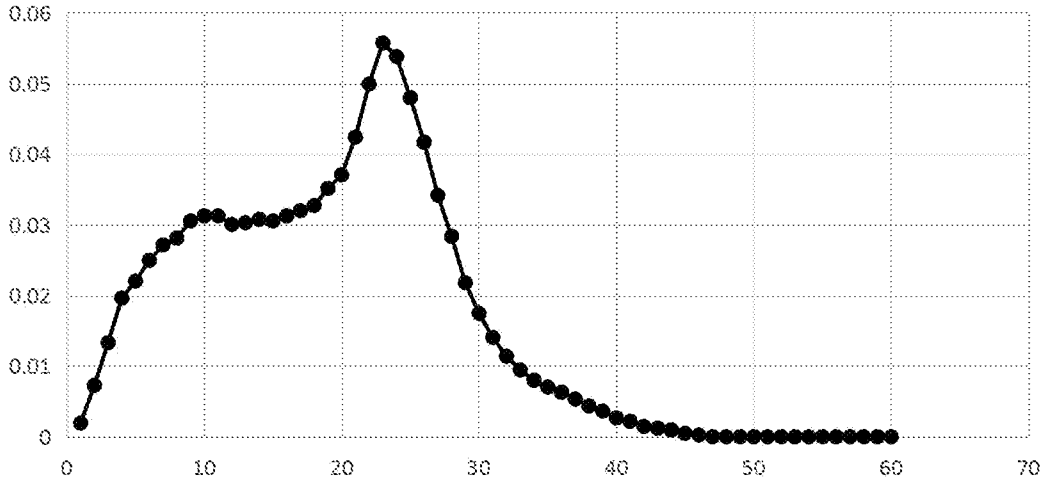


图 4

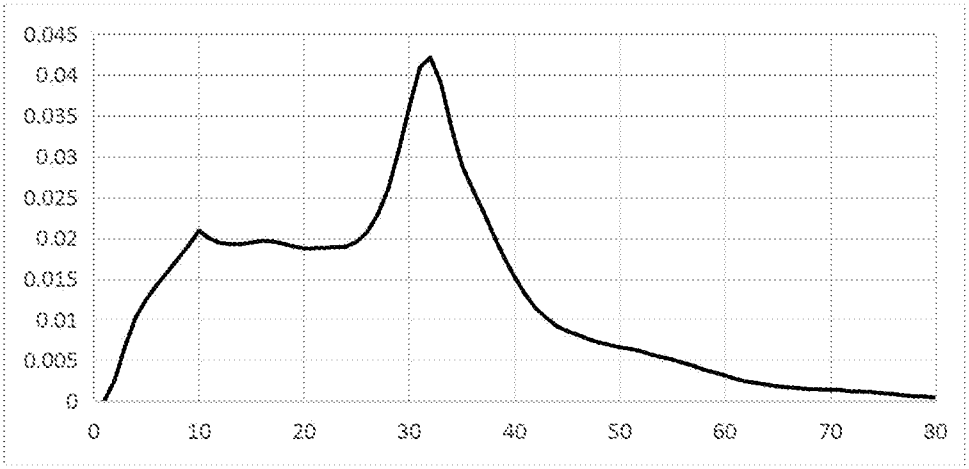

0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80

图 5

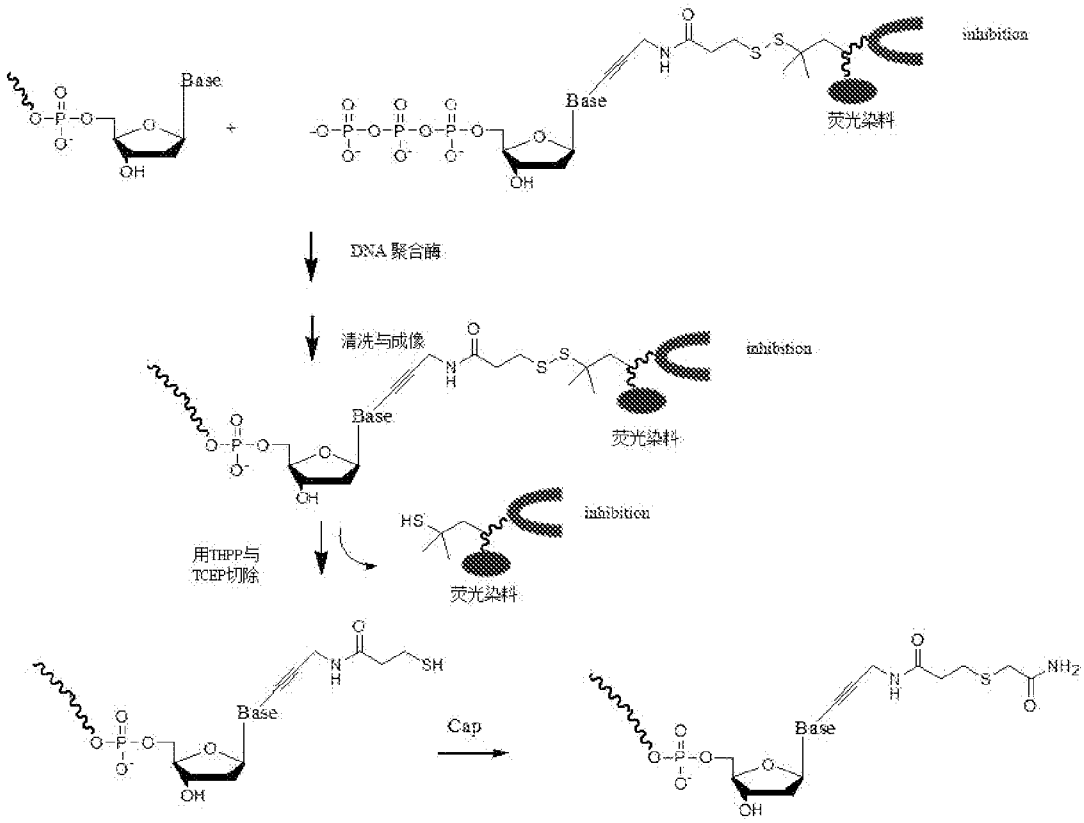

Base
OH
Base
荧光染料
inhibition
DNA 聚合酶
清洗与成像
inhibition
Base
荧光染料
OH
inhibition
HS
用THPP与
TCEP切除
荧光染料
Base
SH
OH
Cap
Base
NH2
OH

图 6

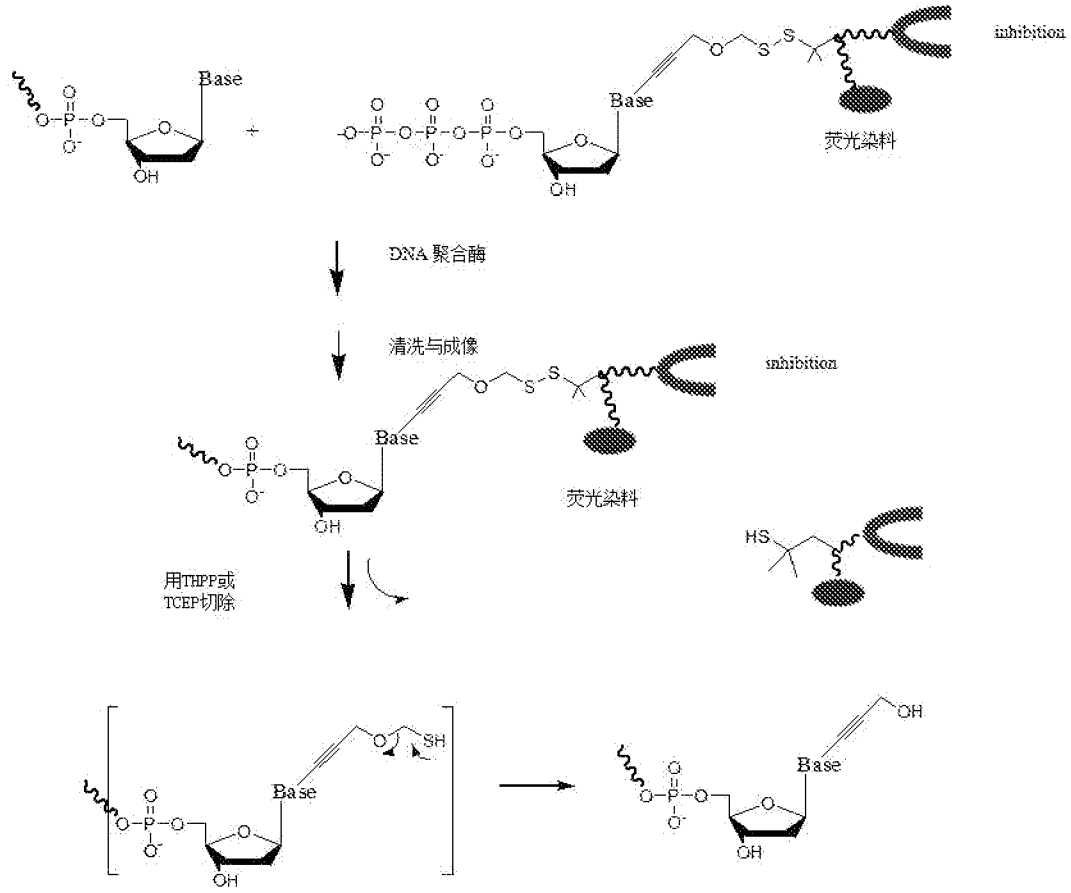

Base
OH
inhibition
荧光染料
DNA 聚合酶
清洗与成像
用THPP或
TCEP切除
HS
SH

图 7

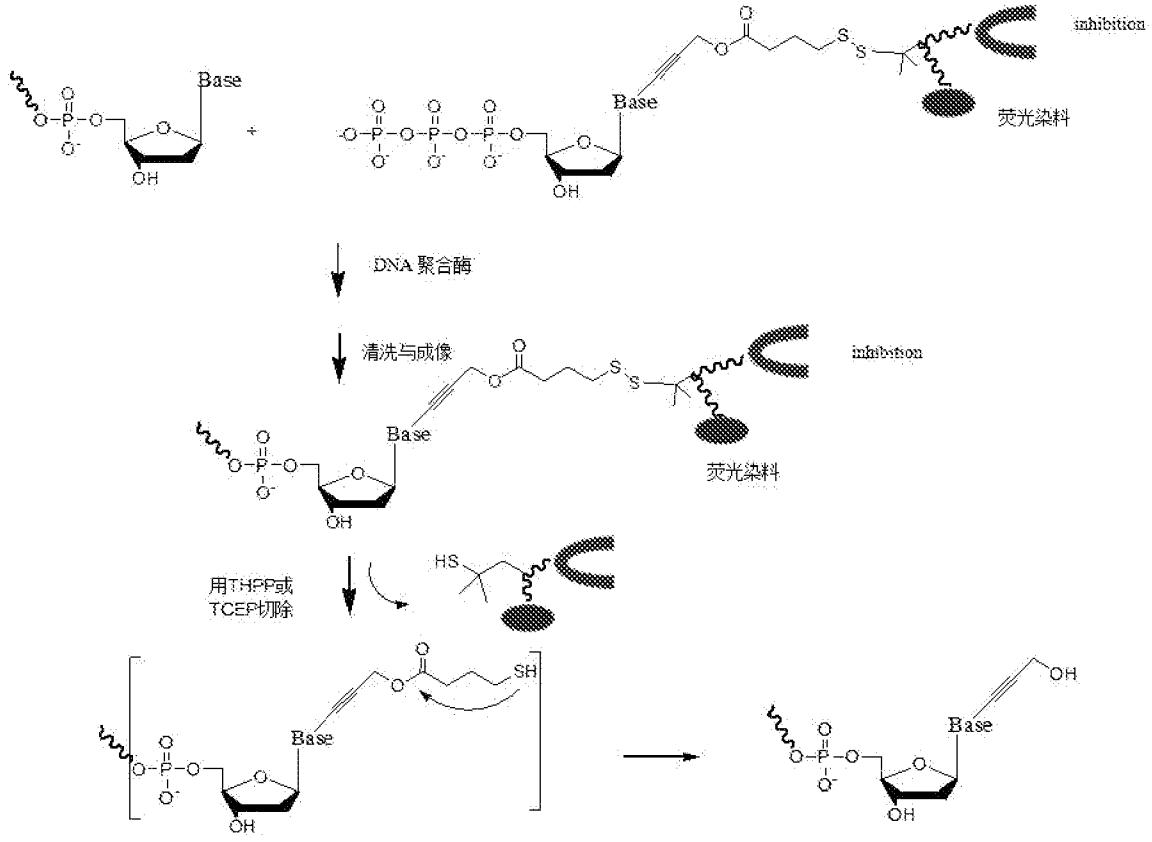

Base
OH
inhibition
荧光染料
DNA 聚合酶
清洗与成像
用THPP或
TCEP切除
HS
SH

图 8

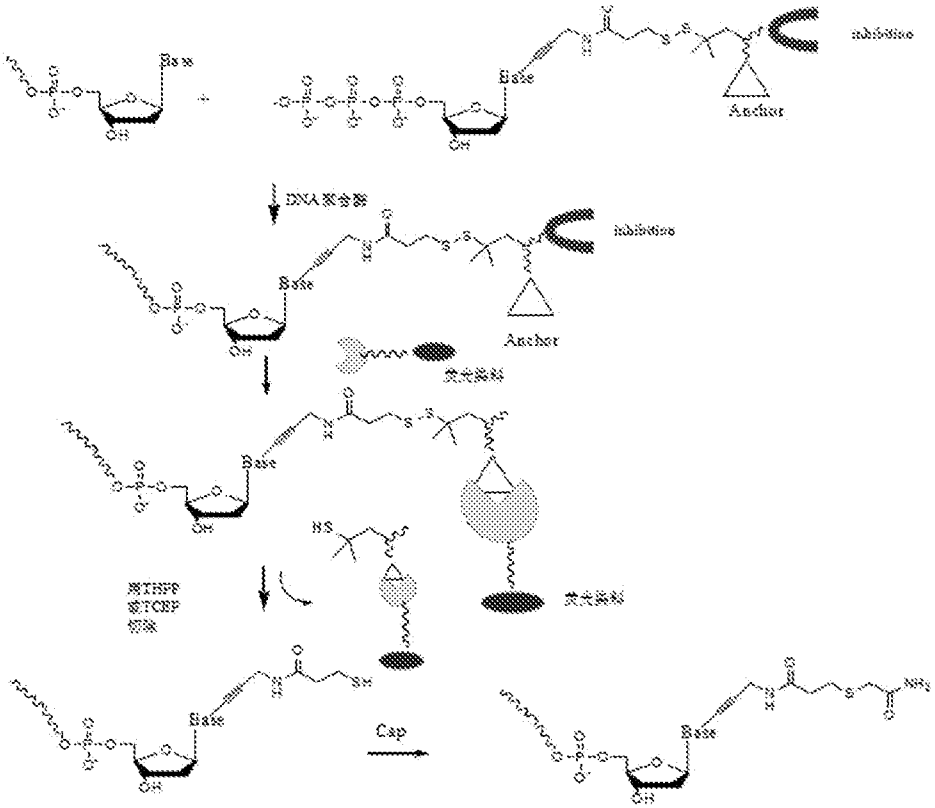

Base
OH
Base
Anchor
inhibitor
DNA聚合酶
inhibitor
Base
Anchor
荧光基团
Base
OH
HS
荧光基团
TCEP
Base
Cap
Base

图 9

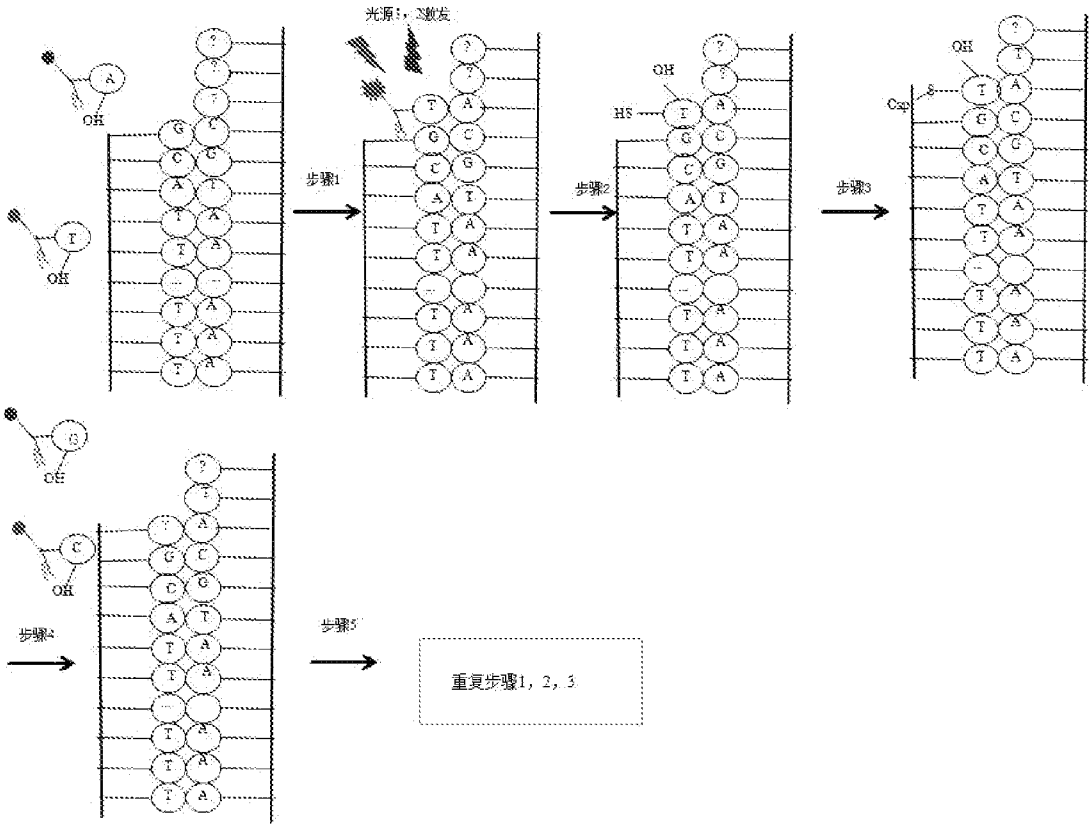

光源1，λ激发
步骤1
步骤2
步骤3
步骤4
步骤5
重复步骤1，2，3

图 10

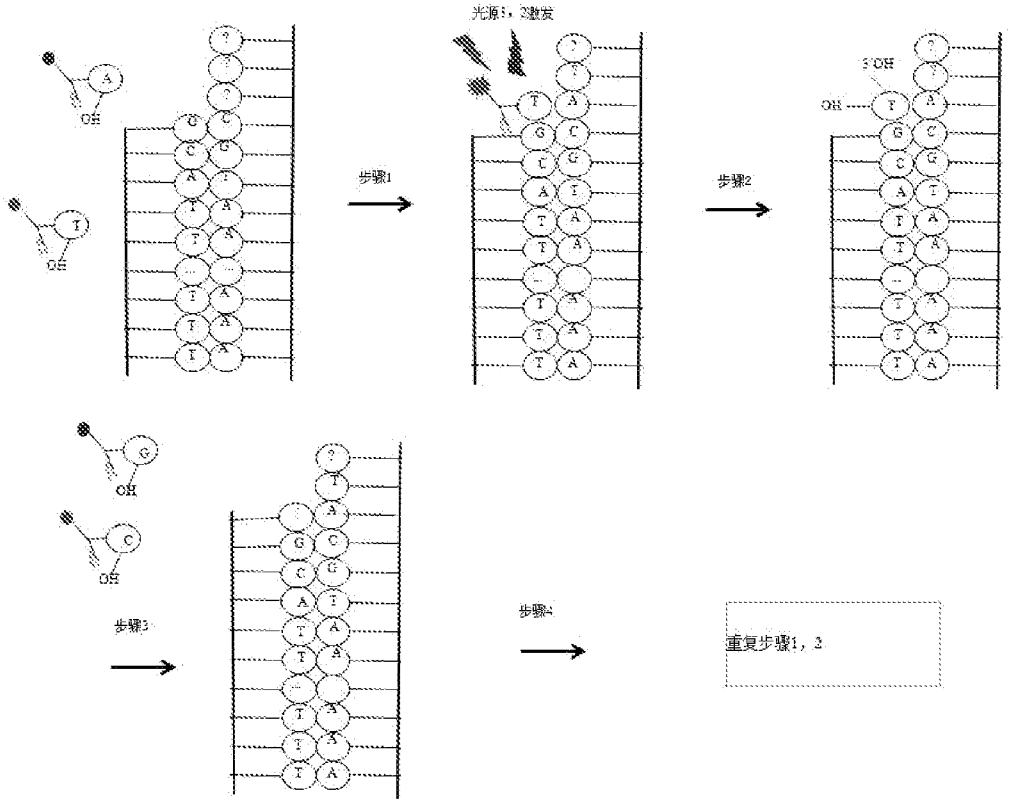


图 11

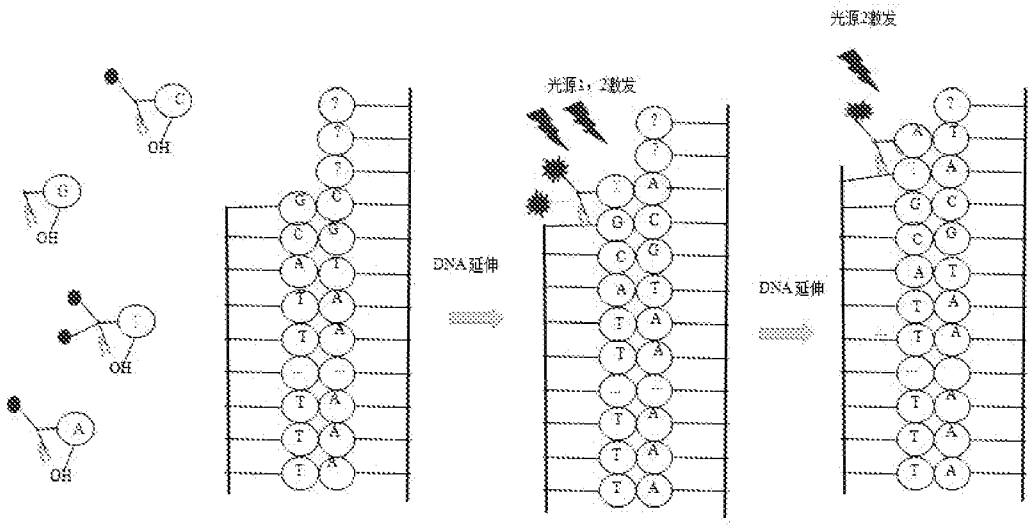


图 12

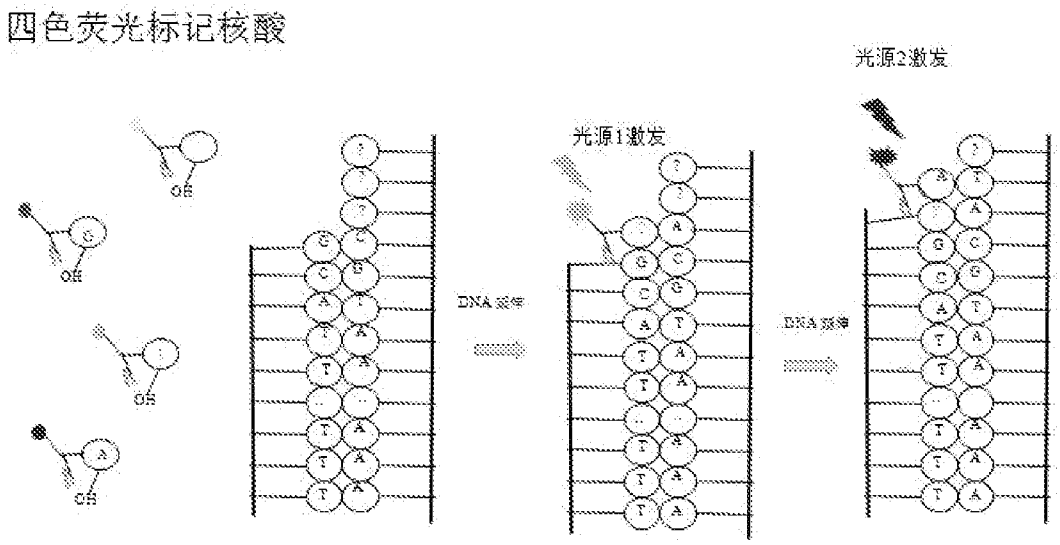


图 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/118259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 19/073(2006.01)i; C07H 19/173(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H;C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, REGISTRY (STN), CAPLUS (STN); 刘斌, 瀚海基因, 核苷酸, 碱基, 嘧啶, 嘌呤, 炔基, 磷酸, 测序, 序列测定, nucleotide, base, pyrimidinyl, putine, alkynyl, phosphate, sequenc+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009124254 A1 (HELICOS BIOSCIENCES CORP.) 08 October 2009 (2009-10-08) description, pages 9, 15-18, 34, 41-42, 49-50, 53, 57-59, 63-74, 78-79, 83-84 and 86-87	1-49
X	WO 2007062160 A2 (SIDDIQI, S.M. ET AL.) 31 May 2007 (2007-05-31) description, paragraphs 21-86	1-49
X	WO 2008144544 A1 (HELICOS BIOSCIENCES CORP.) 27 November 2008 (2008-11-27) description, pages 6-9	1-49

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 February 2019	**27 February 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **National Intellectual Property Administration, PRC** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2018/118259

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☑ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

[1] The compounds involved in claims 1-25 cover a large amount of known compounds in the prior art, and claims 28-49 substantially refer to any one of claims 1-25, so it is difficult for the examiner to make a search exhausting the prior art with regard to the scope of the current claims. A search is carried out, in this report, based on the scope reasonably summarized according to claims 26 and 27.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/118259

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2009124254	A1	08 October 2009	None			
WO	2007062160	A2	31 May 2007	CA	2630814	A1	31 May 2007
				US	2007117104	A1	24 May 2007
				WO	2007062160	A3	22 November 2007
				JP	2009516749	A	23 April 2009
				EP	1973926	A2	01 October 2008
				US	2007190546	A1	16 August 2007
				WO	2007062160	A8	14 February 2008
WO	2008144544	A1	27 November 2008	US	2010203541	A1	12 August 2010
				US	2008286837	A1	20 November 2008
				US	7678894	B2	16 March 2010
				US	7956171	B2	07 June 2011
				EP	2160474	A4	11 December 2013
				EP	2160474	A1	10 March 2010

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2018/118259

A. 主题的分类

C07H 19/073(2006.01)i; C07H 19/173(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07H;C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

WPI, EPODOC, CNPAT, REGISTRY(STN), CAPLUS(STN); 刘斌，瀚海基因，核苷酸，碱基，嘧啶，嘌呤，炔基，磷酸，测序，序列测定，nucleotide, base, pyrimidinyl, putine, alkynyl, phosphate, sequenc+

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2009124254 A1 (HELICOS BIOSCIENCES CORP) 2009年 10月 8日 (2009-10-08) 说明书第9、15-18、34、41-42、49-50、53、57-59、63-74、78-79、83-84、86-87页	1-49
X	WO 2007062160 A2 (SIDDIQI SUHAIB M等) 2007年 5月 31日 (2007-05-31) 说明书第21-86段	1-49
X	WO 2008144544 A1 (HELICOS BIOSCIENCES CORP) 2008年 11月 27日 (2008-11-27) 说明书第6-9页	1-49

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 2月 12日	2019年 2月 27日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	郭晓赟
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-010-53962336

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2018/118259

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☑ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

[1] 权利要求1-25涉及的化合物涵盖了现有技术中大量的已知化合物，权利要求28-49实质上引用了权利要求1-25中任一项，审查员难以针对目前的权利要求范围进行穷尽现有技术的检索。本报告基于根据权利要求26和27合理概括后的范围进行检索。

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2018/118259

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2009124254	A1	2009年 10月 8日	无			
WO	2007062160	A2	2007年 5月 31日	CA	2630814	A1	2007年 5月 31日
				US	2007117104	A1	2007年 5月 24日
				WO	2007062160	A3	2007年 11月 22日
				JP	2009516749	A	2009年 4月 23日
				EP	1973926	A2	2008年 10月 1日
				US	2007190546	A1	2007年 8月 16日
				WO	2007062160	A8	2008年 2月 14日
WO	2008144544	A1	2008年 11月 27日	US	2010203541	A1	2010年 8月 12日
				US	2008286837	A1	2008年 11月 20日
				US	7678894	B2	2010年 3月 16日
				US	7956171	B2	2011年 6月 7日
				EP	2160474	A4	2013年 12月 11日
				EP	2160474	A1	2010年 3月 10日