



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101321878 B

(45) 授权公告日 2013. 03. 27

(21) 申请号 200680045298. 1

EP 1067134 A2, 2001. 01. 10, 见全文.

(22) 申请日 2006. 10. 05

KHANNA P. L. . 4", 5"-dimethox

(30) 优先权数据

60/724, 202 2005. 10. 05 US

y-6-carboxyfluorescein: a novel
dipole-coupled fluorescence energy

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 06. 02

transfer acceptor useful for
fluorescence immunoassay.. 《analytical
biochemistry》. 1980, 第 108 卷 156-161.

(86) PCT申请的申请数据

审查员 吴希哲

PCT/EP2006/009646 2006. 10. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02007/039301 EN 2007. 04. 12

(73) 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 S · G · 威尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 刘冬 李连涛

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005164316 A1, 2005. 07. 28, 见全文.

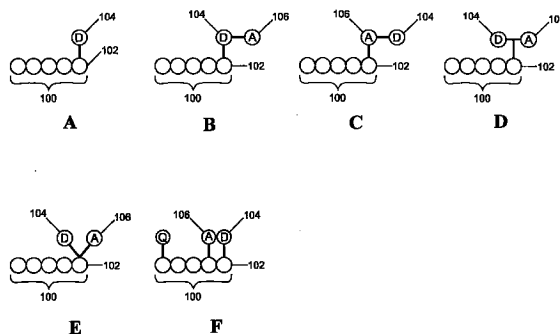
权利要求书 3 页 说明书 51 页 附图 59 页

(54) 发明名称

非荧光能量转移

(57) 摘要

本发明主要涉及非荧光能量在供体部分和接纳体部分之间的转移。在某些实施方案中, 本发明提供包括基本上非荧光供体部分的生物分子。相对于涉及常规荧光供体部分的应用, 涉及这些供体部分的过程通常需要背景荧光减低。除了包括这些生物分子的使用的反应混合物和方法外, 本发明还提供相关的试剂盒和系统。



1. 一种包含至少一个寡核苷酸或至少一个多核苷酸和至少一个基本上非荧光供体部分的生物分子,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4',5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素或 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素中的一种或多种,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线,其中该基本上非荧光供体部分和该接纳体部分的峰值可见光吸收相差 100nm 或更大。

2. 权利要求 1 的生物分子,其中所述生物分子包含接纳体部分。

3. 权利要求 1 或 2 的生物分子,其中所述基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过至少一个接头部分相互连接。

4. 权利要求 1-3 中任一项的生物分子,其中所述基本上非荧光供体部分和 / 或接纳体部分通过至少一个接头部分与生物分子连接。

5. 权利要求 4 的生物分子,其中所述寡核苷酸包含引物核酸或探针核酸。

6. 权利要求 4 的生物分子,其中所述探针核酸包含杂交探针、5'- 核酸酶探针或发夹探针。

7. 一种包含至少一种核苷酸、至少一种引物核酸和 / 或至少第一探针核酸的反应混合物,其中所述核苷酸、引物核酸或第一探针核酸中的一个或多个包含至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4',5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素或 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素中的一种或多种,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。

8. 权利要求 7 的反应混合物,其中所述核苷酸、引物核酸或第一探针核酸包含接纳体部分。

9. 一种包含至少第一核酸合成试剂的反应混合物,该第一生物聚合物合成试剂包含至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4',5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素或 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素中的一种或多种,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。

10. 权利要求 9 的反应混合物,其中所述第一核酸合成试剂包含接纳体部分,所述基本上非荧光供体部分和接纳体部分通过至少一个接头部分相互连接。

11. 一种检测靶标核酸的方法,所述方法包括:

(a) 使至少一个探针核酸结合到靶标核酸,其中该探针核酸包含至少一个基本上非荧光供体部分和至少一个接纳体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4',5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素或 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素中的一种或多种,该接纳体部分接受从该基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量,并响应所接受的非荧光能量而发射光线;和

(b) 检测从该接纳体部分发射的光线,从而检测出靶标核酸。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述方法包括在进行 (b) 之前和 / 或进行 (b) 的过程中

扩增所述靶标核酸的至少亚序列。

13. 权利要求 11 的方法,其中所述基本上非荧光供体部分和接纳体部分通过至少一个接头部分相互连接。

14. 权利要求 11 的方法,其中所述探针核酸包含核酸和杂交探针、5'-核酸酶探针或发夹探针。

15. 一种检测靶标核酸的方法,所述方法包括:

(a) 提供至少第一和第二探针核酸,其中第一探针核酸包含至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5'-二甲氧基-6-羧基荧光素、4',5'-二甲氧基-5-羧基荧光素、6-羧基-氨基五氯荧光素或 5-羧基-氨基五氯荧光素中的一种或多种,且其中第二探针核酸子包含至少一个接纳体部分;

(b) 使第一和第二探针核酸与靶标核酸结合,使得该接纳体部分接受从该基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量,并响应所接受的非荧光能量而发射光线;和

(c) 检测从该接纳体部分发射的光线,从而检测出靶标核酸。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述方法包括在进行(c)之前和/或进行(c)的过程中扩增所述靶标核酸的至少亚序列。

17. 权利要求 15 的方法,其中所述第一和/或第二探针核酸包含核酸和杂交探针、5'-核酸酶探针或发夹探针。

18. 一种进行亲近测定的方法,所述方法包括:

(a) 提供至少第一和第二探针核酸,其中第一探针核酸包含至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5'-二甲氧基-6-羧基荧光素、4',5'-二甲氧基-5-羧基荧光素、6-羧基-氨基五氯荧光素或 5-羧基-氨基五氯荧光素中的一种或多种,且其中第二探针核酸包含至少一个接纳体部分;

(b) 将第一和第二探针核酸置于相对而言的第一位置,其中在该第一位置处第一和第二探针核酸相互间足够接近,使得该接纳体部分接受从该基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量,并响应所接受的非荧光能量而发射光线;

(c) 将第一和第二探针核酸移动到相对而言的至少第二位置;和

(d) 在第一和第二探针核酸被移动到第二位置之前、之后和/或与此同时,监测从该接纳体部分发射出的光线,从而进行该亲近测定。

19. 一种延伸引物核酸的方法,所述方法包括将靶标核酸与

(a) 至少一个可延伸核苷酸和/或至少一个终止核苷酸,

(b) 至少一个催化核苷酸掺入的生物催化剂;和

(c) 至少一个至少部分上与该靶标核酸的至少亚序列互补的引物核酸,

在催化核苷酸掺入的生物催化剂能通过将可延伸核苷酸和/或终止核苷酸掺入在被延伸引物核酸的末端来延伸引物核酸以产生至少一个被延伸引物核酸的条件下进行温育,其中该引物核酸、可延伸核苷酸和/或终止核苷酸包含至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5'-二甲氧基-6-羧基荧光素、4',5'-二甲氧基-5-羧基荧光素、6-羧基-氨基五氯荧光素或 5-羧基-氨基五氯荧光素中的一种或多种,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线,从而延伸引

物核酸。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述引物核酸、可延伸核苷酸和 / 或终止核苷酸包含接纳体部分。

21. 一种包含至少第一生物分子的试剂盒,所述第一生物分子包含至少一个寡核苷酸或至少一个多核苷酸和至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4',5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素或 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素中的一种或多种,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。

22. 一种装置,所述装置包括:

(a) 至少一个容器和 / 或固相载体,该容器和 / 或固相载体包含至少一个生物分子,该生物分子包含至少一个寡核苷酸或至少一个多核苷酸和至少一个基本上非荧光供体部分,其中所述基本上非荧光供体部分包括 4',5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4',5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素或 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素中的一种或多种,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线;

(b) 至少一个辐射源,该辐射源设置成能将电磁辐射对准供体部分;

(c) 至少一个检测器件,该检测器件设置成能检测在接纳体部分与基本上非荧光供体部分足够接近时从接纳体部分发射出的光线。

非荧光能量转移

[0001] 发明领域

[0002] 本发明涉及分子生物学和生物分子化学的领域。在某些实施方案中,提供了涉及非荧光能量转移的试剂和测定。

[0003] 发明背景

[0004] 用以获得关于生物分子如核酸和蛋白质的信息的技术,在许多不同的学科中得到应用,包括医学科学的各个分支。许多这些技术包括使用荧光标记 (label) 来产生可检测信号。例如,已开发的一类荧光染料包括能量转移荧光染料。一般来说,涉及这些染料能量转移过程包括相同或不同生物分子中的供体部分 (donor moiety) 和接纳体部分 (acceptor moiety) 之间的偶极-偶极共振相互作用。在这些过程中,当将供体部分和接纳体部分定位成足够接近且相互间取向适当时,从供体部分发射的能量就被接纳体部分吸收。当这一被吸收能量造成接纳体部分发出荧光时,就产生可检测信号。

[0005] 通常采用能量转移荧光染料的示例性核酸分析方法包括基于杂交的测定,如核酸扩增程序(例如聚合酶链反应 (PCR)、链置换扩增 (SDA)、基于核酸序列的扩展 (NASBA) 和连接酶链反应 (LCR))、基于高密度核酸阵列的方法、单核苷酸多态性 (SNP) 分析和核酸测序技术。进一步说,还已知有多种可采用能量转移来实现检测的用以测定其它类型的生物分子的方法。例如,蛋白质可用不同的技术来检测和定量,包括 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、毛细管电泳、酶测定、基于细胞的测定以及多种免疫学技术如蛋白质印迹法和 ELISA。

[0006] 另外,还开发出了几种涉及用荧光染料检测样品中的多个成分的诊断和分析测定法,包括例如流式细胞术 (Lanier 等, (1984) "Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8, and Leu-11 cell surface antigen expression (用三色免疫荧光和流式细胞术分析鉴定的人淋巴细胞亚群: Leu-2、Leu-3、Leu-7、Leu-8 和 Leu-11 细胞表面抗原表达的相关性)", *J. Immunol.* 132:151-156) 和染色体分析 (Gray 等, (1979) "High resolution chromosome analysis: one and two parameter flow cytometry (高分辨率染色体分析: 一或两参数流式细胞术)", *Chromosoma* 73:9-27) 以及许多上述测定法。对于这些测定法,需要同时采用一套的两种或多种可光谱拆分 (spectrally resolvable) 荧光染料,以便能同时检测样品中的一种以上的靶标物质。使用多种染料同时检测样品中的多个成分,能减少对样品中的各个成分依次进行检测所需的时间。在多基因座 DNA 探针测定的情况下,多种可光谱拆分荧光染料的使用能减少所需的反应管的数量,从而简化实验方案,有利于针对具体应用的试剂盒的制造。例如在自动 DNA 测序的情况下,多种可光谱拆分荧光染料的使用使得可以分析单一泳道中的所有四种碱基,从而比单一颜色方法增加了通量 (throughput),消除了泳道间电泳迁移率差异所致的不确定性。

[0007] 在各种多重检测方法 (multiplex detection method) 当中,使用 5' 核酸酶探针、分子信标、FRET 探针或杂交探针的多重 PCR 检测通常包括将猝灭或未猝灭的荧光探针进行集中 (pooling),例如以改进相对于在给定反应中采用单一探针的方案的测定通量。举例

而言,多重测定法通常作为诊断程序的一部分用来检测获自患者的样品中的多种基因型标志(marker)或病原体。在这些测定形式中,随着反应混合物中探针数量的增加,来自集中的探针的总体基线或背景荧光也累积增加。当任何单一探针的量增加时,在几乎所有测定系统中这一基线荧光也会增加。基线荧光通常会例如通过降低给定测定的检测灵敏度和动态范围而对该测定的性能产生不利影响。因此,基线荧光实际上限制了特定测定中一次可采用的荧光探针的总数和/或给定探针的量。

[0008]

发明概述

[0009] 本发明提供涉及非荧光能量转移的生物分子和其它试剂。例如,某些包含本文所述的基本上非荧光供体部分的生物分子,可用来实现靶标生物分子的检测。使用这些供体部分进行这种检测有多个优点,其中一个相对于采用荧光供体部分的方法而言背景荧光减少。本发明除提供反应混合物和多个方法外,还提供相关的试剂盒和系统。

[0010] 在一个方面,本发明提供包含至少一个基本上非荧光供体部分的生物分子,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分或报道部分(例如荧光染料)与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。生物分子通常包含至少一个核苷、至少一个氨基酸、至少一个糖和/或至少一个脂质。在某些实施方案中,生物分子包含接纳体部分和/或至少一个猝灭剂部分(quencher moiety)。在一些实施方案中,基本上非荧光供体部分和/或接纳体部分通过至少一个接头部分(linker moiety)连接到生物分子。

[0011] 本文所述的生物分子包括许多不同的实施方案。举例而言,在某些实施方案中,生物分子包含生物聚合物合成试剂(例如亚磷酰胺)。在一些实施方案中,生物分子包含生物聚合物。在这些实施方案中,生物聚合物的不同单体单元任选包含基本上非荧光供体部分和接纳体部分。在某些这些实施方案中,生物聚合物的不同单体单元同时包含基本上非荧光供体部分和接纳体部分。任选地,基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过至少一个接头部分相互连接。进一步举例而言,在某些实施方案中,生物分子包含至少一个寡核苷酸或至少一个多核苷酸。寡核苷酸通常包含引物核酸或探针核酸(例如杂交探针、5'-核酸酶探针和发夹探针)。在一些实施方案中,生物分子包含至少一个肽、至少一个多肽、至少一个蛋白质、至少一个酶、至少一个激素或至少一个免疫球蛋白。

[0012] 在另一个方面,本发明提供包括至少一个核苷酸(例如可延伸核苷酸和/或终止核苷酸)、至少一个引物核苷酸和/或至少第一探针核酸(例如杂交探针、5'-核酸酶探针和发夹探针)的反应混合物,其中该核苷酸、引物核酸或第一探针核酸中的一个或多个包含至少一个基本上非荧光供体部分,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。在一些实施方案中,该核苷酸、引物核酸或第一探针核酸包含接纳体部分(例如荧光染料)。任选地,该核苷酸、引物核酸或第一探针核酸包含至少一个猝灭剂部分。在某些实施方案中,基本上非荧光供体部分和/或接纳体部分通过至少一个接头部分连接到该核苷酸、引物核酸或第一探针核酸。在一些实施方案中,反应混合物还包括至少一个催化核苷酸掺入的生物催化剂。任选地,基本上非荧光供体部分通过至少一个接头部分连接到该核苷酸、引物核酸或第一探针核酸。在某些实施方案中,反应混合物包括至少第二探针核酸(例如在一些实施方案中任选用作杂交探针),该第二探针核酸包含接纳体部分。

在一些这些实施方案中,第二探针核酸还包含至少一个猝灭剂部分。举例而言,这一反应混合物可用于执行各种实时 PCR 监测方案或核酸测序程序,以及用于许多其它可能的应用。

[0013] 在另一个方面,本发明提供包含至少第一生物聚合物合成试剂的反应混合物,该第一生物聚合物合成试剂包含至少一个基本上非荧光供体部分的生物分子,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。在一些实施方案中,基本上非荧光供体部分通过至少一个接头部分连接到第一生物聚合物合成试剂。在某些实施方案中,第一生物聚合物合成试剂包含接纳体部分,该基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过至少一个接头部分相互连接。在其它实施方案中,第一生物聚合物合成试剂包含接纳体部分,该基本上非荧光供体部分和接纳体部分通过至少一个接头部分相互连接。任选地,固相载体 (solid support) 包含第一生物聚合物合成试剂。在一些实施方案中,反应混合物包括至少第二生物聚合物合成试剂,该第二生物聚合物合成试剂包含接纳体部分和 / 或至少一个猝灭剂部分。进一步举例而言,在某些实施方案中,第一生物聚合物合成试剂包含多肽合成试剂,而在其它实施方案中,第一生物聚合物合成试剂包含核酸合成试剂 (例如亚磷酰胺)。这一反应混合物任选用于例如生物聚合物的合成和 / 或标记。

[0014] 在另一个方面,本发明提供一种检测靶标生物分子的方法。该方法包括 (a) 将至少一个探针生物分子 (例如免疫球蛋白) 结合到靶标生物分子,其中该探针生物分子包含至少一个基本上非荧光供体部分和至少一个接纳体部分 (例如荧光染料),该接纳体部分接受从该基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量,并响应所接受的非荧光能量而发射光线。另外,该方法还包括 (b) 检测从该接纳体部分发射出的光线,从而检测出靶标生物分子。在一些实施方案中,靶标生物分子包含靶标核酸,因此该方法包括在进行 (b) 之前和 / 或在进行 (b) 的过程中扩增至少靶标核酸的亚序列。通常,探针生物分子包含生物聚合物。在某些实施方案中,生物聚合物的不同单体单元包含基本上非荧光供体部分和接纳体部分。生物聚合物的不同单体单元任选同时包含基本上非荧光供体部分和接纳体部分,该基本上非荧光供体部分和接纳体部分通常通过至少一个接头部分相互连接或者不通过至少一个接头部分相互连接。进一步举例而言,在某些实施方案中,探针 (例如杂交探针、5' - 核酸酶探针和发夹探针) 和 / 或靶标生物分子包含核酸。在这些实施方案中, (a) 通常包括将探针和靶标生物分子进行杂交。

[0015] 在另一个方面,本发明提供另一种检测靶标生物分子的方法。该方法包括 (a) 提供至少第一和第二探针生物分子,其中第一探针生物分子包含至少一个基本上非荧光供体部分,且其中第二探针生物分子包含至少一个接纳体部分 (例如荧光染料)。该方法还包括 (b) 将第一和第二探针生物分子结合到靶标生物分子,使得该接纳体部分接受从该基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量,并响应所接受的非荧光能量而发射光线。另外,该方法还包括 (c) 检测从该接纳体部分发射出的光线,从而检测出靶标生物分子。在一些实施方案中,第一探针生物分子上的基本上非荧光供体部分是 4- 二甲基氨基苯基偶氮苯基 -4' - 异硫氰酸酯 (DABITC) 之外的异硫氰酸酯。在某些实施方案中,靶标生物分子包含靶标核酸,该方法包括在进行 (c) 之前和 / 或在进行 (c) 的过程中扩增至少靶标核酸的亚序列。在某些实施方案中,第一和 / 或第二探针生物分子包含免疫球蛋白。在某些实施方案中,第一探针生物分子、第二探针生物分子和 / 或靶标生物分子包含核酸。在这些实施方

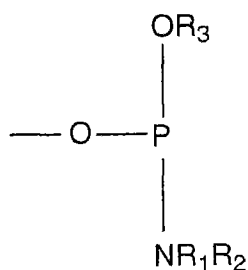
案中,第一和 / 或第二探针生物分子通常包含杂交探针、5'-核酸酶探针和发夹探针。在这些实施方案中,(b) 包括将第一探针生物分子、第二探针生物分子和靶标生物分子进行杂交。

[0016] 在另一个方面,本发明提供进行亲近测定(例如脂质混合测定)的方法。该方法包括(a) 提供至少第一和第二探针生物分子,其中第一探针生物分子包含至少一个基本上非荧光供体部分,且其中第二探针生物分子包含至少一个接纳体部分。该方法还包括(b) 将第一和第二探针生物分子置于相对而言的(relative to one another) 第一位置,在该第一位置处第一和第二探针生物分子相互间足够接近,使得该接纳体部分接受从该基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量,并响应所接受的非荧光能量而发射光线。另外,该方法还包括(c) 将第一和第二探针生物分子移动到相对而言的至少第二位置,和(d) 在第一和第二探针生物分子被移动到第二位置之前、之后和 / 或之同时监测从该接纳体部分发射出的光线,从而进行该亲近测定。通常,第一和 / 或第二探针生物分子包含寡核苷酸、免疫球蛋白或脂质。

[0017] 在另一个方面,本发明提供延伸引物核酸的方法。该方法包括将靶标核酸与(a) 至少一个可延伸核苷酸和 / 或至少一个终止核苷酸、(b) 至少一个催化核苷酸掺入的生物催化剂和(c) 至少一个与靶标核酸的至少亚序列至少部分互补的引物核酸,在催化核苷酸掺入的生物催化剂能通过将可延伸核苷酸和 / 或终止核苷酸掺入在被延伸引物核酸的末端来延伸引物核酸以产生至少一个被延伸引物核酸的条件下进行温育,其中该引物核酸、可延伸核苷酸和 / 或终止核苷酸包含至少一个基本上非荧光供体部分,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线,从而延伸引物核酸。在某些实施方案中,有多个被延伸引物核酸得以产生,该方法包括鉴定被延伸引物核酸中的终止核苷酸,由此从被鉴定的终止核苷酸可确定靶标核酸的碱基序列的至少一部分。在一些实施方案中,引物核酸、可延伸核苷酸和 / 或终止核苷酸包含接纳体部分。在某些实施方案中,基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过至少一个接头部分相互连接,而在其它实施方案中,基本上非荧光供体部分和接纳体部分通过至少一个接头部分相互连接。

[0018] 在另一个方面,本发明提供产生亚磷酰胺的方法。该方法包括(a) 将至少一个基本上非荧光供体部分连接到包含至少一个保护基的化合物。该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。该方法还包括(b) 连接包含以下化学式的基团:

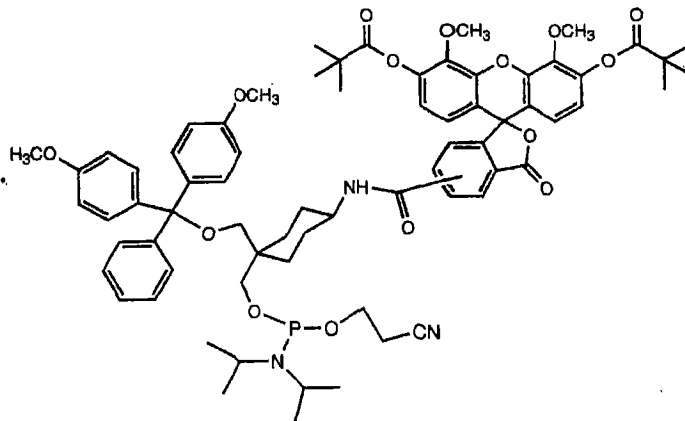
[0019]



[0020] 其中 R_1 和 R_2 为独立选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬

基和庚基的烷基基团； R_3 为 $(CH_2)_2CN$ 或 CH_3 ，从而产生亚磷酰胺。示例性的保护基选自例如三苯甲基 (trityl)、一甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、菊芋糖基 (levuliny1)、苄基甲氧基羰基和二苯甲氧基羰基 (benzhydryloxycarbonyl)。在一些实施方案中，亚磷酰胺包含以下化学式：

[0021]



[0022] 在另一个方面，本发明提供一种商业方法，该法包括 (a) 接收来自客户的订购至少第一生物分子的订购单，该第一生物分子包含至少一个基本上非荧光供体部分，该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分，使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。另外，该商业方法还包括 (b) 按照该订购单将第一生物分子供应给客户。

[0023] 在另一个方面，本发明提供包括至少第一生物分子的试剂盒，该第一生物分子包含至少一个基本上非荧光供体部分，该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分，使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。在一些实施方案中，固相载体包含第一生物分子。在某些实施方案中，第一生物分子包含接纳体部分。在一些这些实施方案中，基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过至少一个接头部分相互连接，而在其它实施方案中，基本上非荧光供体部分和接纳体部分通过至少一个接头部分相互连接。在某些实施方案中，试剂盒包括第二生物分子，该第二生物分子包含接纳体部分。任选地，试剂盒包括例如缓冲液、盐、金属离子、催化核苷酸掺入的生物催化剂、焦磷酸酶、甘油、二甲亚砜和 / 或 poly rA 中的一个或多个。通常，试剂盒包括至少一个供包装至少第一生物分子的容器。

[0024] 试剂盒包括多个实施方案，可用来执行许多不同的应用。例如在一些实施方案中，第一生物分子包含免疫球蛋白，试剂盒包括有关将免疫球蛋白结合到靶标表位并检测免疫球蛋白与靶标表位的结合的说明。任选地，第一生物分子包含脂质，试剂盒包括有关用脂质进行亲近测定的说明。在某些实施方案中，第一生物分子包含引物核酸，试剂盒包括有关延伸引物核酸的说明。在一些实施方案中，第一生物分子包含可延伸核苷酸和 / 或终止核苷酸。在某些实施方案中，第一生物分子包含第一生物聚合物合成试剂，试剂盒包括有关第一生物聚合物合成试剂合成生物聚合物的说明。在一些这些实施方案中，第一生物聚合物合成试剂包含多肽合成试剂。任选地，试剂盒包括至少第二生物聚合物合成试剂。在一些实施方案中，第二生物聚合物合成试剂包含接纳体部分。在某些实施方案中，第一生物聚合物合成试剂包含核酸合成试剂（例如亚磷酰胺）。在一些实施方案中，第一生物分子包含

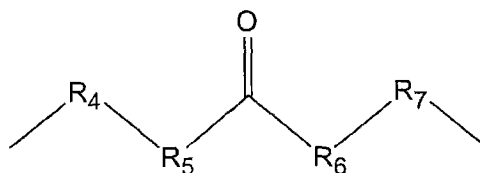
至少第一探针核酸。举例而言,第一探针核酸任选包含杂交探针、5'-核酸酶探针或发夹探针。在一些这些实施方案中,试剂盒包括包含至少第二探针核酸,该第二探针核酸包含接纳体部分。在某些实施方案中,这一第二探针核酸作为杂交探针与第一探针核酸一起用于执行各种杂交探针测定。

[0025] 在另一个方面,本发明提供包括 (a) 至少一个容器和 / 或固相载体的系统,该容器和 / 或固相载体包含至少一个生物分子,该生物分子包含至少一个基本上非荧光供体部分,该基本上非荧光供体部分在至少一个接纳体部分与其足够接近时能够将非荧光能量转移到该接纳体部分,使得该接纳体部分响应所接受的非荧光能量而发射光线。该系统还包括 (b) 至少一个辐射源,该辐射源设置成能将电磁辐射对准供体部分。另外,该系统还包括 (c) 至少一个检测器件,该检测器件设置成能检测在接纳体部分与基本上非荧光供体部分足够接近时从接纳体部分发射出的光线。通常,该系统包括至少一个可操作性地 (operably) 连接到检测器件的逻辑器件,该逻辑器件包含一个或多个用以对所检测到的来自接纳体部分的光发射进行比例调整 (scale) 的指令集。在一些实施方案中,该系统包括 (d) 至少一个热调节器,该热调节器能与容器和 / 或固相载体形成热传送 (thermally communicate),以调节接近容器和 / 或固相载体处的温度,和 / 或 (e) 至少一个流体转移器件,该流体转移器件能将流体转移到和 / 或移出容器和 / 或固相载体。

[0026] 本文描述的各生物分子、反应混合物、方法、试剂盒和系统中的基本上非荧光供体部分包括多个实施方案。例如在一些实施方案中,基本上 (substantially) 非荧光供体部分包括 4',5'-二甲氧基-6-羧基荧光素、4',5'-二甲氧基-5-羧基荧光素、6-羧基-氨基五氯荧光素或 5-羧基-氨基五氯荧光素中的一种或多种。在某些实施方案中,基本上非荧光供体部分和接纳体部分的峰值可见光吸收相差约 100nm 或更大。通常,6-羧基荧光素部分和基本上非荧光供体部分在基本上相同的浓度下,来自前者的可检测绝对荧光发射与来自后者的可检测绝对荧光发射之比为约 1000 : 1 或更大。在某些实施方案中,基本上非荧光供体部分是羧基荧光素、1,2-二苯乙烯-2,2'-二磺酸或异硫氰酸酯。在其它实施方案中,基本上非荧光供体部分是 4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'异硫氰酸酯 (DABITC) 之外的异硫氰酸酯。

[0027] 在一些实施方案中,本文所述的基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过接头部分相互连接。在其它实施方案中,本文所述的基本上非荧光供体部分和接纳体部分通过接头部分相互连接。在一些这些实施方案中,接头部分缺乏以下结构:

[0028]



[0029] 其中 R_4 为连接到基本上非荧光供体部分的 C_{1-5} 烷基; R_5 选自 NH、S 和 O; R_6 选自烯烃、二烯、炔烃和具有至少一个不饱和键的五元或六元环或者与羰基碳连接的稠环结构; R_7 包含将接头部分连接到接纳体部分的官能团。

[0030]

附图简述

[0031]

图 1A-F 示出了本发明一些试剂的某些代表性实施方案。

- [0032] 图 2 示出了在根据本发明一个实施方案的 5' - 核酸酶反应中所进行的某些步骤。
- [0033] 图 3 示出了在根据本发明一个实施方案的涉及发夹探针的测定中所进行的一些步骤。
- [0034] 图 4 示出了在根据本发明一个实施方案的涉及杂交探针的测定中所进行的某些步骤。
- [0035] 图 5 示出了在根据本发明一个实施方案的涉及标记引物的测定中所进行的某些步骤。
- [0036] 图 6 示出了在根据本发明某些实施方案的涉及标记蛋白质的测定中所进行的一些步骤。
- [0037] 图 7 示出了在根据本发明一个实施方案的脂质混合测定中所进行的一些步骤。
- [0038] 图 8 这一框图显示了在根据本发明一个实施方案的商业方法中所进行的某些步骤。
- [0039] 图 9 这一框图显示了用以进行亲近测定的代表性系统。
- [0040] 图 10 是从标记上 6- 羧基荧光素 (或 6-FAM)、4' , 5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素 (或 5-DmF) 或 4' , 5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素 (或 6-DmF) 的寡核苷酸获得的重叠光谱的曲线图。
- [0041] 图 11 是图 10 所示坐标图的细节摘选图, 显示了从标记上 5-DmF 或 6-DmF 的寡核苷酸的激发和发射扫描获得的重叠光谱。
- [0042] 图 12 示出了根据本发明一个实施方案的 5- 和 6-DmF-DMT-CX- 接头 - 亚磷酰胺合成方案中的某些步骤。
- [0043] 图 13 是显示 5-DmF 和 6-DmF 的检测的高效液相层析 (HPLC) 迹线。
- [0044] 图 14 是显示新戊酰 5-DmF 和新戊酰 6-DmF 的检测的 HPLC 迹线。
- [0045] 图 15 是显示新戊酰化 (pivalated) DmF+CX- 接头的检测的 HPLC 迹线。
- [0046] 图 16 是显示 DmF-CX- 接头的检测的 HPLC 迹线。
- [0047] 图 17 是显示 DmF-CX- 接头 - 亚磷酰胺的检测的 HPLC 迹线。
- [0048] 图 18 是显示 DmF-CX- 接头 - 亚磷酰胺的检测的 HPLC 迹线。
- [0049] 图 19 是显示 DmF-CX- 接头 - 亚磷酰胺的检测的 ^{31}P NMR 谱。
- [0050] 图 20 示出了根据本发明一个实施方案的将 5-DmF 异构体和 6-DmF 异构体相互分离的纯化方案中的某些步骤。
- [0051] 图 21 是显示 5-DmF 的检测的层析图。
- [0052] 图 22 是显示 6-DmF 的检测的层析图。
- [0053] 图 23 示出了根据本发明一个实施方案的 6-DmF-DMT-CX- 接头 - 亚磷酰胺合成方案中的某些步骤。
- [0054] 图 24 是显示新戊酰化 6-DmF 的检测的 HPLC 迹线。
- [0055] 图 25 是显示 6-DmF-CX- 接头的检测的 HPLC 迹线。
- [0056] 图 26 是显示 6-DmF-CX- 接头 - 亚磷酰胺的检测的 HPLC 迹线。
- [0057] 图 27 示出了根据本发明一个实施方案的 5-DmF-DMT-CX- 接头 - 亚磷酰胺合成方案中的某些步骤。
- [0058] 图 28 是显示新戊酰化 5-DmF 的检测的 HPLC 迹线。

- [0059] 图 29 是显示 5-DmF-CX- 接头的检测的 HPLC 迹线。
- [0060] 图 30 是从包括标记上 6-FAM、5-DmF 或 6-DmF 的供体探针的多个杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。
- [0061] 图 31 是已对被检测荧光激发扫描进行了归一化的图 30 所示重叠光谱的曲线图。
- [0062] 图 32 是从包括标记上 6-FAM、5-DmF 或 6-DmF 的供体探针或者缺乏供体探针的多个杂交探针测定的发射扫描获得的重叠光谱的曲线图。
- [0063] 图 33 是从包括标记上 6-FAM 的供体探针的解链曲线分析获得的重叠光谱的曲线图。
- [0064] 图 34 是从包括标记上 5-DmF 的供体探针的解链曲线分析获得的重叠光谱的曲线图。
- [0065] 图 35 是从包括标记上 6-FAM 的供体探针的动态 PCR 分析 (kineticPCR analysis) 获得的重叠光谱的曲线图。
- [0066] 图 36 是从包括标记上 5-DmF 的供体探针的动态 PCR 分析获得的重叠光谱的曲线图。
- [0067] 图 37A 示出了根据本发明一个实施方案的 5' - 核酸酶探针。
- [0068] 图 37B 示出了缺乏基本上非荧光供体部分的 5' - 核酸酶探针。
- [0069] 图 38 是从其中使用 5' - 核酸酶探针来监测反应的 PCR 分析获得的重叠光谱的曲线图。
- [0070] 图 39 是已对被检测荧光进行了归一化的图 38 所示重叠光谱的曲线图。
- [0071] 图 40 示出了代表性杂交探针对中的各种供体部分和接纳体部分。
- [0072] 图 41A 是从标记上 LC-Red 610 的杂交探针的发射扫描获得的光谱的曲线图。
- [0073] 图 41B 是从标记上 JA-270 的杂交探针的发射扫描获得的光谱的曲线图。
- [0074] 图 41C 是从标记上 CY5 的杂交探针的发射扫描获得的光谱的曲线图。
- [0075] 图 41D 是从标记上 CY5.5 的杂交探针的发射扫描获得的光谱的曲线图。
- [0076] 图 42A 是从标记上 FAM 或 DmF 的杂交探针的发射扫描 (绝对荧光) 获得的重叠光谱的曲线图。
- [0077] 图 42B 是从 42A 所示发射扫描获得的某些重叠光谱的曲线图, 其中已对荧光发射进行了比例调整。
- [0078] 图 43A 是从涉及标记上 LC-Red 610 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。
- [0079] 图 43B 是从涉及标记上 LC-Red 610 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的发射扫描 (绝对荧光) 获得的重叠光谱的曲线图。
- [0080] 图 43C 是从 43B 所示发射扫描获得的重叠光谱的曲线图, 其中已对荧光发射进行了比例调整。
- [0081] 图 44A 是从涉及标记上 JA-270 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。
- [0082] 图 44B 是从涉及标记上 JA-270 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的发射扫描 (绝对荧光) 获得的重叠光谱的曲线图。
- [0083] 图 44C 是从 44B 所示发射扫描获得的重叠光谱的曲线图, 其中已对荧光发射进行

了比例调整。

[0084] 图 45A 是从涉及标记上 CY5 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。

[0085] 图 45B 是从涉及标记上 CY5 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的发射扫描（绝对荧光）获得的重叠光谱的曲线图。

[0086] 图 45C 是从 45B 所示发射扫描获得的重叠光谱的曲线图，其中已对荧光发射进行了比例调整。

[0087] 图 46A 是从涉及标记上 CY5.5 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。

[0088] 图 46B 是从涉及标记上 CY5.5 的接纳体探针和标记上 FAM 或 DmF 的供体探针的杂交探针测定的发射扫描（绝对荧光）获得的重叠光谱的曲线图。

[0089] 图 46C 是从 46B 所示发射扫描获得的重叠光谱的曲线图，其中已对荧光发射进行了比例调整。

[0090] 图 47A 是从涉及标记上 LC-Red 610 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。

[0091] 图 47B 是从涉及标记上 LC-Red 610 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的杂交探针测定的发射扫描（绝对荧光）获得的重叠光谱的曲线图。

[0092] 图 48A 是从涉及标记上 CY3.5 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描获得的重叠光谱的曲线图。

[0093] 图 48B 是从涉及标记上 CY3.5 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的杂交探针测定的发射扫描（绝对荧光）获得的重叠光谱的曲线图。

[0094] 发明详述

[0095] I. 定义

[0096] 在详细描述本发明前，要认识到的是本发明并不限于具体的生物分子、方法、反应混合物、组合物、试剂盒或系统，他们是可以改变的。本说明和所附权利要求书中用到的单数形式的名词也包括复数含义，除非上下文另有清楚规定。因此，例如“生物分子”一词包括两个或多个生物分子的组合。还应认识到，本文所用的术语目的只在于描述具体的实施方案，并不意在限制本发明。此外，除非另有定义，否则本文所用的所有技术和科学术语其含义与本发明所属技术领域普通技术人员通常理解的含义相同。在对本发明进行描述和提出权利要求时，以下术语及其语法变化形式将按下述定义进行使用。

[0097] “5′-核酸酶探针”指在被切割时能够产生可检测信号变化的标记寡核苷酸。举例而言，在某些实施方案中，5′-核酸酶探针包含三个标记部分，在其中一个标记从寡核苷酸切割或以其它方式分离后会发射强度增加的辐射。例如在一些这些实施方案中，5′-核酸酶探针在其 5′ 末端标记上猝灭剂部分，在靠近其 3′ 末端处标记上成一对的接纳体部分和基本上非荧光供体部分。在某些实施方案中，5′-核酸酶探针在这些末端位置之外的一个或多个位置有标记，或者除了这些末端位置之外还在一个或多个位置有标记。当探针是完整的时候，能量转移通常出现在标记部分之间，使得猝灭剂部分至少部分上猝灭来自接纳体部分的荧光发射。在例如聚合酶链式反应的延伸步骤中，结合到模板核酸的 5′-核酸酶探针被例如 Taq 聚合酶的 5′-3′ 核酸酶活性切割，或者被别的具有这一活性的聚合酶切

割,使得来自接纳体部分的荧光发射不再被猝灭。在其它示例性的实施方案中,5'-核酸酶探针只包括接纳体部分和基本非荧光供体部分。当这些探针中的所述部分被切割而相互分离时,通常出现来自接纳体部分的荧光发射降低。进一步举例而言,在某些实施方案中,5'-核酸酶探针包括自身互补性区域,使得探针在选定的条件下能够形成发夹结构。在这些实施方案中,5'-核酸酶探针在本文中也称为“发夹探针”。可适应于与本文所述基本上非荧光供体部分一起使用的示例性5'-核酸酶探针,在例如以下文献中也有描述:Gelfand等的美国专利5,210,015,标题“HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM USING THE NUCLEASE ACTIVITY OF A NUCLEIC ACID POLYMERASE(使用核酸聚合酶的核酸酶活性的同源测定系统)”,1993年5月11日授权;Higuchi的美国专利5,994,056,标题“HOMOGENEOUS METHODS FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTION(核酸扩增和检测的同源方法)”,1999年11月30日授权;和Higuchi的美国专利6,171,785,标题“METHODS AND DEVICES FOR HOMOGENEOUS NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTION(同源核酸扩增和检测的方法和装置)”,2001年1月9日授权。

[0098] “接纳体部分”或“接纳体”指能够接受或吸收从能量源转移来的能量的部分。在一些实施方案中,接纳体部分在接受了足量的转移能量时还能够发射能量(例如光和/或热)。在这些实施方案中,接纳体也称为“报道部分”或者称为“报道分子”。举例而言,某些接纳体部分在接受了足量的从本文所述基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量时会作出响应而发出荧光。示例性的接纳体部分包括但不限于各种荧光团如LightCycler®-Red 610(LC-Red 610)、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、JA-270、CY5、CY5.5等等。

[0099] “烷基基团”指直链、支链或环状的饱和烃部分,包括所有位置异构体,如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基、己基、辛基、壬基、庚基、1-甲基乙基、1-甲基丙基、2-甲基丙基、1-甲基丁基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、1-乙基丙基、1,2-二甲基丙基、1-甲基戊基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基、2-乙基丁基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1-乙基-1-甲基丙基、1-乙基-2-甲基丙基、正己基、环己基、正庚基、正辛基、2-乙基己基、正壬基和正癸基。烷基基团通常包含约1-20个碳原子,更通常包含约2-15个碳原子。烷基基团可以被取代或未被取代。

[0100] “氨基酸”指能被掺入到肽、多肽或蛋白质中的任何单体单元。本文所用的术语“氨基酸”包括以下20种天然或遗传编码的 α -氨基酸:丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。这20种天然氨基酸的结构在例如Stryer等, *Biochemistry*, 第5版, Freeman and Company(2002)中有显示。另外的氨基酸如硒半胱氨酸和吡咯赖氨酸也可进行遗传编码(Stadtman(1996)“Selenocysteine(硒半胱氨酸)”, *Annu Rev Biochem.* 65:83-100 和 Ibba 等, (2002)“Genetic code: introducing pyrrolysine(遗传密码:介绍吡咯赖氨酸)”, *Curr Biol.* 12(13):R464-R466)。术语“氨基酸”还包括非天然氨基酸、修饰氨基酸(例如具有修饰的侧链和/或骨架)和氨基酸类似物。参见例如Zhang等, (2004)“Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells(5-羟色氨酸向哺乳动物细胞蛋白质中的选择性掺入)”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(24):8882-8887,

Anderson 等, (2004) “An expanded genetic code with a functional quadruplet codon(具有功能性四倍密码子的扩展遗传秘密)”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101(20): 7566-7571, Ikeda 等, (2003) “Synthesis of a novel histidineanalogue and its efficient incorporation into a protein in vivo(新型组氨酸类似物的合成及其向体内蛋白质的有效掺入)”, Protein Eng. Des. Sel. 16(9): 699-706, Chin 等, (2003) “An Expanded Eukaryotic Genetic Code(扩展的真核生物遗传密码)”, Science 301(5635): 964-967, James 等, (2001) “Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues(含有光可异构化苯基偶氮苯丙氨酸残基的核糖核酸酶 S 突变体的动力学表征)”, Protein Eng. Des. Sel. 14(12): 983-991, Kohrer 等, (2001) “Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins(琥珀和赭石抑制 tRNA 向哺乳动物细胞中的输入: 氨基酸类似物向蛋白质的位点特异性插入的一般方法)”, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98(25): 14310-14315, Bacher 等, (2001) “Selection and Characterization of Escherichia coli Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue(能够在对大肠杆菌有毒性的色氨酸类似物上生长的大肠杆菌突变体的选择和表征)”, J. Bacteriol. 183(18): 5414-5425, Hamano-Takaku 等, (2000) “A Mutant Escherichia coli Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine(突变大肠杆菌酪氨酰-tRNA 合成酶利用非天然氨基酸重氮酪氨酸比利用酪氨酸更有效)”, J. Biol. Chem. 275(51): 40324-40328 和 Budisa 等, (2001) “Proteins with β -(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids(具有作为替代发色团和药物活性氨基酸的 β -(噻吩并吡咯基丙)氨酸的蛋白质)”, Protein Sci. 10(7): 1281-1292。

[0101] 进一步举例而言, 氨基酸通常是包括取代或未被取代的氨基基团、取代或未被取代的羧基基团和一个或多个侧链或侧基或者任何这些基团的类似物的有机酸。示例性的侧链包括例如巯基、硒基、磺酰基、烷基、芳基、酰基、酮基、叠氨基、羟基、肼、氰基、卤代基、酰肼、烯基、炔基、醚、硼酸(基)(borate)、硼酸(基)(boronate)、磷酸(基)(phospho)、膦酸(基)(phosphono)、膦、杂环基、烯酮、亚胺、醛、酯、硫代酸、羟胺或者任何这些基团的组合。其它代表性氨基酸包括但不限于包含光可活化的交联剂的氨基酸、金属结合性氨基酸、自旋标记氨基酸、荧光氨基酸、含金属氨基酸、具有新型官能团的氨基酸、能与其它分子发生共价或非共价相互作用的氨基酸、光笼化(photocaged)和/或光可异构化的(photoisomerizable)氨基酸、放射性氨基酸、包含生物素或生物素类似物的氨基酸、糖基化氨基酸、其它碳水化合物修饰氨基酸、包含聚乙二醇或聚醚的氨基酸、重原子取代的氨基酸、化学可切割和/或光可切割的氨基酸、含有碳连接糖(carbon-linked sugar)的氨基酸、氧化还原活性氨基酸、含有氨基硫代酸的氨基酸和包含一个或多个毒性部分的氨基酸。

[0102] 术语“扩增”在生物分子的情形中指任何能导致某生物分子或一批生物分子或它们的亚序列的拷贝数增加的过程。如应用于核酸, 扩增指产生多个拷贝的多核苷酸或多核苷酸的一部分, 通常是从少量的多核苷酸(例如单个多核苷酸分子)产生, 其中扩增产物或扩增子通常是可检测的。多核苷酸的扩增涵盖多个化学和酶促过程。在聚合酶链式反应

(PCR) 或连接酶链式反应 (LCR) 过程中从一个或少数几个拷贝的靶标或模板 DNA 分子产生多个 DNA 拷贝,这是扩增的形式。扩增并不限于起始分子的严格复制。例如,用 RT-PCR 从样品中有限数量的 RNA 产生多个 cDNA 分子,这是扩增的形式。此外,在转录的过程中从单个 DNA 分子产生多个 RNA 分子,这也是扩增的形式。

[0103] 术语“连接”或“结合”指两个或多个物质相互间发生共价和 / 或非共价缔合的过程,即使该过程只是短暂的。例如在某些实施方案中,作为产生亚磷酰胺的方法的一部分,将基本上非荧光供体部分连接到化合物。进一步举例而言,在一些本文所述的过程中,探针生物分子结合靶标生物分子而实现这些靶标的检测。

[0104] “生物分子”指为生物体所产生和 / 或使用的有机分子,和 / 或被用来分析生物或其成分的有机分子。示例性的生物分子包括核酸、核苷酸、氨基酸、多肽、肽、肽片段、糖、脂肪酸、类固醇、脂质和这些生物分子的组合 (例如糖蛋白、核糖核蛋白或脂蛋白)。

[0105] “生物聚合物”指包括至少两个相互连接的单体单元的生物分子。

[0106] “生物聚合物合成试剂”指可用来合成生物聚合物或其成分的化合物。举例而言,在某些实施方案中,生物聚合物合成试剂是可用来合成寡核苷酸或其它核酸的“核酸合成试剂”,如亚磷酰胺或其它试剂。任选采用的示例性寡核苷酸合成技术包括磷酰基氯化物 (phosphorylchloridate) 方法 (Michelson 等, (1955) J. Chem. Soc. 2632)、磷酸二酯偶联方法 (Khorana 等, (1956) Chem. & Ind. London 1523)、磷酸三酯方法 (Letsinger 等, (1969) J. Am. Chem. Soc. 91 (12) :3360-3365)、亚磷酸三酯方法 (Letsinger 等, (1975) J. Am. Chem. Soc. 97 :3278-3279 和 Letsinger 等, (1976) J. Am. Chem. Soc. 98 :3655-3661) 和亚磷酰胺方法 (Beaucage 等, (1981) Tetrahedron Lett. 22 :1859-1862 和 McBride 等, (1983) Tetrahedron Lett. 24 :245-248)。进一步举例而言,生物聚合物合成试剂还包括可用来合成肽或其它蛋白质的“多肽合成试剂”(例如 t-Boc/Fmoc 试剂)。参见例如 Chan 等 (编辑), Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach Oxford University Press (2000) 和 Jones, Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press (2002)。生物聚合物还可利用本领域技术人员公知的许多其它方法合成,如通过化学连接法合成 (参见例如 Hackeng 等, (1999) “Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology (通过天然化学连接的蛋白质合成: 通过使用直接了当的方法扩展范围)”, PNAS 96 (18) :10068-10073)。

[0107] “补体”在核酸的情形中指能以反向平行结合 (antiparallel association) 方式与某核酸的至少亚序列进行组合或者能与该亚序列进行杂交的核酸或其区段。反向平行结合可以是在分子内,例如以核酸当中的发夹环的形式,或者是在分子间,如当两个或多个单链核酸相互杂交时。某些在天然核酸中不常见的碱基可包括在本文所指的核酸中,它们包括例如次黄嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤等等。互补性不需要是完美的;例如稳定的双链体或三链体可含有错配碱基对或未配对碱基。也就是说,当核酸只是“部分互补”时,反向平行结合无论是在分子内还是在分子间,在某些条件下都可出现。核酸化学领域的技术人员能通过对多个变量的经验判断确定例如双链体或三链体稳定性,所述变量如互补性区域的长度、互补性区域中的碱基组成和序列、离子强度、解链温度 (T_m) 和错配碱基对的发生率。

[0108] “表位”指抗原上能被免疫球蛋白或 T 细胞受体识别和结合的位点。

[0109] “可延伸核苷酸”指例如在催化核苷酸掺入的生物催化剂所催化的反应中,一旦其

被掺入到核苷酸聚合物中时至少一个其它核苷酸可加入或共价键合到其上的核苷酸。可延伸核苷酸的实例包括脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸、可延伸核苷酸通常通过在其糖部分的 3' 位置加入别的核苷酸进行延伸。

[0110] 术语“延伸”在核酸的情形中指一个或多个核苷酸加入或以其它方式掺入到给定核酸中的过程。

[0111] “被延伸引物核酸”指已加入了或以其它方式掺入了（例如共价结合了）一个或多个另外的核苷酸的引物核酸。

[0112] “荧光染料”指能够吸收来自能量源的能量并响应该被吸收能量而发射光线的化合物。在一些实施方案中,某些荧光染料在本文所述的生物分子中充当接纳体部分。

[0113] “发夹探针”指可用来实现靶标核酸检测的寡核苷酸,其包括至少一个自身互补性区域,使得探针在选定的条件下能够形成发夹或环结构。通常,发夹探针包括一个或多个标记部分。在一个示例性的实施方案中,接纳体部分和基本上非荧光供体部分在发夹探针中相互间定位成使得这些部分之间的能量转移基本上只在探针为发夹构象时才能出现。在其它实施方案中,发夹探针除包括接纳体部分和基本上非荧光供体部分外,还包括猝灭剂部分。在一些这些实施方案中,这些部分在探针中定位成使得猝灭剂部分至少部分上猝灭当探针为发夹构象时由接纳体部分和基本上非荧光供体部分之间的能量转移所产生的本来可检测的信号。相反,当这些实施方案中的探针不为发夹构象时,由接纳体部分和基本上非荧光供体部分之间的能量转移所产生的信号通常是可检测的。因此,在一些这些实施方案中发夹探针的作用类似于分子信标。发夹探针在某些实施方案中还可充当 5'-核酸酶探针或杂交探针。

[0114] “激素”指生物所产生的、能在其在生物的产生部位之外的部位对生物产生特异性作用的生物分子。激素通常由多细胞生物的内分泌系统产生,一般对细胞活性施加刺激性或抑制性作用。激素也可体外合成。

[0115] “杂交探针”指包括至少一个可用来实现靶标核酸检测的标记部分的寡核苷酸。在一些实施方案中,杂交探针成对起作用。例如在一些这些实施方案中,该杂交探针对中的第一杂交探针在其 3'-末端处或接近其 3'-末端处包括至少一个基本上非荧光供体部分,而第二杂交探针在其 5'-末端处或接近其 5'-末端处包括至少一个接纳体部分（例如 LC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、JA-270、CY5 或 CY5.5）。探针通常设计成使得当两个探针都与靶标核酸或模板核酸杂交时（例如在 PCR 过程中）,第一杂交探针会结合第二杂交探针的 5-末端或上游,使它们足够接近以便在基本上非荧光供体部分和接纳体部分之间出现能量转移,从而产生可检测的信号。通常,第二杂交探针在其 3'-末端上还包括磷酸（基）或其它基团,以防止它在 PCR 过程中发生延伸。在某些实施方案中,杂交探针对在一个探针的 5'-末端处或接近 5'-末端处包括基本上非荧光供体部分,在另一个探针的 3'-末端处或接近 3'-末端处包括接纳体部分。在另一步示例性实施方案中,杂交探针对中的一个杂交探针包括至少一个基本上非荧光供体部分和至少一个接纳体部分,而另一个杂交探针则包含至少一个猝灭剂部分。在这个实施方案中,这些部分在两个探针上定位成使得当两个探针都与靶标核酸杂交时,猝灭剂部分会猝灭从接纳体部分发射出的荧光。

[0116] 在一个多核苷酸与另一个多核苷酸（通常是反向平行多核苷酸）的碱基配对相

互作用中,核酸会发生“杂交”或“退火”,导致形成通常被称为杂交复合物的双链体或其它更高级结构。反向平行多核苷酸之间的一级相互作用通常是遵照 Watson/Crick 和 / 或 Hoogsteen 型相互作用的碱基特异性相互作用,例如 A/T 和 G/C。并不要求两个多核苷酸在其整个长度上具有 100% 互补性来实现杂交。在一些方面,杂交复合物可从分子内相互作用形成,或者可从分子间相互作用形成。杂交因多种得到充分表征的力而产生,包括氢键合、溶剂排斥和碱基堆积。有关核酸杂交的详尽指南可见于 Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, 第 I 部分第 2 章,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays (杂交原理和核酸探针测定策略概述)”, Elsevier (1993)。

[0117] “免疫球蛋白”或“抗体”指基本上由至少一个免疫球蛋白基因或至少一个免疫球蛋白基因的片段所编码的,能参与与配体的特异性结合的多肽。该术语包括天然形式以及片段和衍生物。在本文所用该术语的范围内的片段包括通过用各种肽酶消化产生的片段如 Fab、Fab' 和 F(ab)'₂ 片段,通过化学离解产生的片段,通过化学切割产生的片段以及以重组方式或别的人工方式设计出的片段,只要该片段仍然能够特异性结合靶标分子。例如通过噬菌体展示所产生的典型重组片段,包括单链 Fab 片段和 scFv (“单链可变区”) 片段。在该术语范围内的衍生物包括在序列上已作修饰、但仍然能够特异性结合靶标分子的抗体 (或其片段),这些抗体包括种间嵌合和人源化抗体。本文所用的抗体或免疫球蛋白可通过任何已知的技术产生,包括得自天然 B 淋巴细胞、杂交瘤、重组表达系统或噬菌体展示的细胞培养物的收获物。

[0118] “接头部分”或“接头”指能将某化合物、某取代基或某部分共价连接或非共价连接 (例如离子连接) 到例如固相载体、另一化合物、另一基团或另一部分的化学部分。例如,接头任选将标记 (例如基本上非荧光供体部分、接纳体部分) 连接到生物分子。接头通常是双功能化学部分,在某些实施方案中它们包含可切割连接,该可切割连接能被例如热、酶、化学试剂和 / 或电磁辐射所切割,以从例如固相载体或另一化合物释放出物质或化合物。精心选择接头可让切割在与化合物和测定方法的稳定性相配的适当条件下进行。一般来说,接头除了例如将化学部分 (例如基本上非荧光供体部分和接纳体部分) 连接在一起或者使这些部分之间保持一定的最小距离或其它空间关系之外,并没有特异性的生物活性。但是,可将接头的成分选定成能影响被连接的化学部分的一些性质,如三维构象、净电荷和 / 或疏水性。有关接头分子的另外的描述见于例如 Lyttle 等, (1996) Nucleic Acids Res. 24 (14) :2793, Shchepino 等, (2001) Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids 20 :369, Doronina et al (2001) Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids 20 :1007, Trawick 等, (2001) Bioconjugate Chem. 12 :900, Olejnik 等, (1998) Methods in Enzymology 291 :135, Pljevaljcic 等, (2003) J. Am. Chem. Soc. 125 (12) :3486, Ward, et. al., 美国专利 4,711,955, Stavrianopoulos, 美国专利 4,707,352 和 Stavrianopoulos, 美国专利 4,707,440。

[0119] “脂质”指包含脂肪酸、固醇和 / 或类异戊二烯化合物的水不溶性生物分子。示例性的脂质基团包括脂肪酸 (例如油酸、棕榈酸和硬脂酸)、中性脂肪 (例如椰子油和牛油)、磷脂 (例如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇)、鞘脂 (例如神经鞘磷脂)、糖酯 (例如脑苷脂和神经节苷脂)、类固醇 (例如胆固醇) 和萜 (例如精油和类胡

胡萝卜素)。在例如 Vance 等, Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 第 4 版, Elsevier Science (2002) 中也对脂质进行了描述。

[0120] “脂质混合测定”指涉及检测当将脂质相互组合或集中时脂质的一种或多种性质的测定。举例而言, 一些这些测定涉及将包含各标记部分的各个膜融合在一起, 所述标记部分如本文所述的基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分。脂质混合测定在例如以下文献中也有描述: Blumenthal 等, (2002) “Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion (病毒膜融合研究中的荧光脂质探针)”, ChemPhys Lipids 116:39-55, Hoekstra 等, (1993) “Lipid mixing assays to determine fusion in liposome systems (用以测定脂质体系统中的融合的脂质溶液测定)”, Methods Enzymol 220:15-32, Hoekstra (1990) “Fluorescence assays to monitor membrane fusion: potential application in biliary lipid secretion and vesicle interactions (用以监测膜融合的荧光测定: 在胆汁脂质分泌和囊泡相互作用中的潜在应用)”, Hepatology 12:61S-66S, Stegmann 等, (1989) “Protein-mediated membrane fusion (蛋白质介导的膜融合)”, Annu Rev Biophys Chem 18:187-211, Hoekstra 等, (1984) “Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes (测量生物膜之间的融合的动力学的荧光方法)”, Biochemistry 23:5675-5681, Struck 等, (1981) “Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion (共振能量转移用于监测膜融合的目的)”, Biochemistry 20:4093-4099 和 Stegmann 等, (1993) “Evaluation of viral membrane fusion assays. Comparison of the octadecylrhodamine dequenching assay with the pyrene excimer assay (病毒膜融合测定的评估。八癸基罗丹明去猝灭测定与芘激态分子测定的比较)”, Biochemistry 32:11330-11337。

[0121] “单体单元”或“单体”指能进行聚合的化学化合物。示例性的单体单元包括能聚合形成核酸的核苷酸、能聚合形成蛋白质的氨基酸和能聚合形成多糖的单糖。

[0122] “混合物”指两种或多种不同成分的组合。“反应混合物”指包含能参与和 / 或促进给定的反应或测定的分子的混合物。举例而言, 扩增反应混合物通常包括含有进行扩增反应所需的试剂的溶液, 且通常含有在合适缓冲液中的引物、催化核苷酸掺入的生物催化剂、dNTP 和二价金属阳离子。反应混合物如含有进行反应所需的所有试剂则称为完全反应混合物, 如只含有所需试剂的子集 (subset) 则称为不完全反应混合物。本领域技术人员会认识到各反应成分常规上是作为单独溶液储藏的, 每种溶液含有总成分的子集, 其原因是为了方便、储藏稳定性起见, 或者是为了可以根据应用情况对成分浓度进行调整, 他们还会认识到, 在反应前可将各反应成分进行组合产生出完全反应混合物。此外, 本领域技术人员会认识到, 各反应成分是单独包装进行市售的, 且有用的市售试剂盒可含有各反应或测定成分的任何子集, 该子集包括本发明的生物分子。

[0123] “部分 (moiety)”或“基团 (group)”指将某物如分子划分成的各份子 (portion) 中的一份子 (例如官能团或取代基)。例如, 本发明的生物分子包括至少一个基本上非荧光供体部分。

[0124] 术语“监测”在给定的过程、反应或测定的情形中指对该过程、反应或测定或者它们的组成部分 (component) 的一个或多个方面或性质进行定期或连续的观察、检测、试验

和 / 或定量。举例而言,在某些基于 PCR 的测定中,在各反应循环过程中定期或连续检测从接纳体部分发射出的光线的强度。监测过程通常至少部分是自动的。

[0125] “非荧光供体部分”指能够将一种或多种形式的激发能量转移、发射或供给到一个或多个接纳体部分的部分,但该能量不是可检测荧光形式的能量。“基本上非荧光供体部分”指能够将一种或多种形式的激发能量转移、发射或供给到一个或多个接纳体部分的部分,但大体上或几乎没有从供体发射出可检测的荧光。例如,荧光部分和基本上非荧光供体部分在大体上相同的浓度下,来自前者的可检测绝对荧光发射与来自后者的可检测绝对荧光发射之比通常为约 500 : 1 或更大,更通常为约 1000 : 1 或更大,甚至更通常为约 1500 : 1 或更大(例如约 2000 : 1、约 2500 : 1、约 3000 : 1、约 3500 : 1、约 4000 : 1、约 4500 : 1 或约 5000 : 1)。示例性的基本上非荧光供体部分包括 4', 5' - 二甲氧基 -6- 羧基荧光素、4', 5' - 二甲氧基 -5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素和 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素。非荧光供体部分和基本上非荧光供体部分在从另一能量源(例如光源和 / 或热源)吸收足量的能量时通常会作出响应而发射非荧光激发能量。另外,接纳体部分通常能够吸收从这些供体部分发射出的激发能量并作出响应而发出荧光。

[0126] 术语“非荧光能量”指被发射荧光形式的能量之外的能量。

[0127] 术语“核酸”或“多核苷酸”指可被对应于核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)聚合物或它们的类似物的聚合物。这包括核苷酸的聚合物如 RNA 和 DNA 及它们的修饰形式、肽核酸(PNA)和锁核酸(LNATM)。在某些实施方案中,核酸可以是包含多种单体类型,例如同时包含 RNA 亚单位和 DNA 亚单位的聚合物。核酸可以是或者可以包括例如染色体或染色体区段、载体(例如表达载体)、表达盒、裸 DNA 或 RNA 聚合物、聚合酶链式反应(PCR)的产物、寡核苷酸、探针和引物。核酸可以是例如单链核酸、双链核酸或三链核酸,且并不限于任何具体的长度。除非另外指明,否则具体的核酸序列除了包含或编码任何明确指明的序列外,还任选包含或编码互补序列。

[0128] 核酸并不限于具有天然多核苷酸序列或结构、天然骨架和 / 或天然核苷酸间连键的分子。例如,含有一个或多个碳环糖的核酸也被包括在这个定义内(Jenkins 等, (1995) Chem. Soc. Rev. 第 169-176 页)。进一步举例而言,尽管核酸通常会含有磷酸二酯键,但在一些情况下也包括具有替代(alternate)骨架的核酸类似物。这些骨架包括但不限于磷酰胺连键(Beaucage 等, (1993) Tetrahedron 49(10):1925 及其中的参考文献; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35 :3800 ; Sprinzl 等, (1977) Eur. J. Biochem. 81 : 579 ; Letsinger 等, (1986) Nucl. Acids Res. 14 :3487 ; Sawai 等, (1984) Chem. Lett. 805 ; Letsinger 等, (1988) J. Am. Chem. Soc. 110 :4470 和 Pauwels 等, (1986) Chemica Scripta 26 :1419)、硫代磷酸酯连键(Mag 等, (1991) Nucleic Acids Res. 19 :1437 和美国专利 5,644,048)、二硫代磷酸酯连键(Briu 等, (1989) J. Am. Chem. Soc. 111 :2321)、O- 甲基氨基磷酸酯(phosphoramidite)连键(Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992)) 和肽核酸骨架和连键(Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114 :1895 ; Meier 等, (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31 :1008 ; Nielsen (1993) Nature 365 :566 和 Carlsson 等, (1996) Nature 380 :207)。其它类似核酸包括具有带正电荷骨架的核酸(Denpcy 等, (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :6097)、具有非离子骨架的核酸(美国专利 5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141 和 4,469,863 ;

Angew(1991)Chem. Intl. Ed. English 30 :423 ;Letsinger 等, (1988) J. Am. Chem. Soc. 110 : 4470 ;Letsinger 等, (1994) Nucleoside & Nucleotide 13 :1597 ;ASCSymposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in AntisenseResearch”, Y. S. Sanghvi 和 P. Dan Cook(编辑), 第2和第3章 ;Mesmaeker 等, (1994) Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4 : 395 ;Jeffs 等, (1994) J. Biomolecular NMR 34 :17 ;Tetrahedron Lett. 37 :743(1996)) 和具有非核糖骨架的核酸, 这些具有非核糖骨架的核酸包括美国专利 5, 235, 033 和 5, 034, 506 及 ASC Symposium Series 580, CarbohydrateModifications in Antisense Research, Y. S. Sanghvi 和 P. Dan Cook(编辑), 第6和第7章中所述的那些具有非核糖骨架的核酸。在例如 Rawls, C & E News, 1997 年 6 月 2 日, 第 35 页中也描述了几种核酸类似物。可进行核糖-磷酸骨架的修饰, 以促进另外的部分如标记部分的加入, 或者改变这种分子在生理环境中的稳定性和半寿期。

[0129] 除了核酸中通常存在的天然杂环碱基(例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)外, 核酸类似物还包括具有非天然杂环碱基或其它修饰碱基的核酸。举例而言, 某些用于核苷酸中充当解链温度 (T_m) 修饰剂的碱基任选包括在内。例如, 这些碱基中的一些包括 7-脱氮嘌呤(例如 7-脱氮嘌呤或 7-脱氮腺嘌呤)、吡唑并 [3,4-d] 嘧啶和丙炔基-dN(例如丙炔基-dU 或丙炔基-dC)。参见例如 Seela 的美国专利 5, 990, 303, 标题“SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINENUCLEOTIDES(7-脱氮-2'-脱氧鸟苷核苷酸的合成)”, 1999 年 11 月 23 日授权。其它代表性的杂环碱基包括例如次黄嘌呤、黄嘌呤; 2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤的 8-氮杂衍生物; 腺嘌呤、鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、2-氨基-6-氯嘌呤、次黄嘌呤、肌苷和黄嘌呤的 7-脱氮-8-氮杂衍生物; 6-氮杂胞嘧啶; 5-氟胞嘧啶; 5-氯胞嘧啶; 5-碘胞嘧啶; 5-溴胞嘧啶; 5-甲基胞嘧啶; 5-丙炔基胞嘧啶; 5-溴乙烯基尿嘧啶; 5-氟尿嘧啶; 5-氯尿嘧啶; 5-碘尿嘧啶; 5-溴尿嘧啶; 5-三氟甲基尿嘧啶; 5-甲氧基甲基尿嘧啶; 5-乙炔基尿嘧啶和 5-丙炔基尿嘧啶。在例如 Seela 等, (1991) Helv. Chim. Acta 74 :1790、Grein 等, (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4 :971-976 和 Seela 等, (1999) Helv. Chim. Acta 82 :1640 中还描述了许多非天然碱基。

[0130] 修饰碱基和核苷酸的另外的实例还描述于例如以下文献中: Froehler 等的美国专利 5, 484, 908, 标题“OLIGONUCLEOTIDESCONTAINING 5-PROPYNYL PYRIMIDINES(含有 5-丙炔基嘧啶的寡核苷酸)”, 1999 年 1 月 16 日授权; Froehler 等的美国专利 5, 645, 985, 标题“ENHANCED TRIPLE-HELIX AND DOUBLE-HELIXFORMATION WITH OLIGOMERS CONTAINING MODIFIEDPYRIMIDINES(具有含修饰嘧啶的寡聚物的增强型三螺旋和双螺旋结构)”, 1997 年 7 月 8 日授权; Froehler 等的美国专利 5, 830, 653, 标题“METHODS OF USING OLIGOMERS CONTAINING MODIFIEDPYRIMIDINES(使用含有修饰嘧啶的寡聚物的方法)”, 1998 年 11 月 3 日授权; Kochkine 等的美国专利 6, 639, 059, 标题“SYNTHESIS OF[2. 2. 1]BICYCLO NUCLEOSIDES([2. 2. 1] 双环核苷的合成)”, 2003 年 10 月 28 日授权; Skouv 的美国专利 6, 303, 315, 标题“ONE STEPSAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDSIN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES(复杂生物样品中的核酸的一步样品制备和检测)”, 2001 年 10 月 16 日授权和 Kochkine 等的美国专利申请公开号 2003/0092905, 标题“SYNTHESIS OF[2. 2. 1]BICYCLONUCLEOSIDES([2. 2. 1] 双环核苷的合成)”, 2003 年 5 月 15 日公布。

[0131] “核苷”指包含共价连接到糖部分（例如核糖）、糖部分的衍生物或糖部分的功能等同物（例如类似物如碳环（carbocyclic ring）的碱基或碱性基团（例如包含至少一个碳环（homocyclic ring）、至少一个杂环和 / 或至少一个芳基基团）的核酸成分。例如，当核苷包括糖部分时，碱基通常连接到该糖部分的 1'-位置。如前所述，碱基可以是天然碱基（例如嘌呤碱基如腺嘌呤（A）或鸟嘌呤（G），嘧啶碱基如胸腺嘧啶（T）、胞嘧啶（C）或尿嘧啶（U）），或者是非天然碱基（例如 7-脱氮嘌呤碱基、吡唑并 [3,4-d] 嘧啶碱基或炔基 -dN 碱基）。示例性的核苷包括核糖核苷、脱氧核糖核苷、双脱氧核糖核苷和碳环核苷。

[0132] “核苷酸”指核苷的酯，例如核苷的磷酸酯。举例而言，核苷酸可包括 1、2、3 个或多个共价连接到核苷糖部分的 5' 位置的磷酸基团。

[0133] “催化核苷酸掺入的生物催化剂”指能催化核苷酸向核酸中的掺入的催化剂。催化核苷酸掺入的生物催化剂通常是酶。“酶”是基于蛋白质和 / 或核酸的催化剂，能起到减少涉及其它化合物或“底物”的化学反应的活化能的作用。“催化核苷酸掺入的酶”指例如在核酸扩增过程中能催化核苷酸向核酸中的掺入的酶。示例性的催化核苷酸掺入的酶包括例如聚合酶、末端转移酶、反转录酶、端粒酶、多核苷酸磷酸化酶和连接酶。“热稳定酶”指对热稳定、抗热和当经受高温达选定的一段时间时仍保持足够的催化活性的酶。例如，热温度聚合酶当经受高温达实现双链核酸的变性所需的时间时在能让引物发生杂交的温度下，仍保持足够的活性来实现随后的引物延伸反应。核酸变性所需的加热条件是本领域技术人员公知的，在以下专利中有例示：Mullis 的美国专利 4,683,202，标题“PROCESS FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES（扩增核酸序列的方法）”，1987 年 7 月 28 日授权和 Mullis 等的美国专利 4,683,195，标题“PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING, AND/OR-CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES（扩增、检测和 / 或克隆核酸序列的方法）”，1987 年 7 月 28 日授权。进一步举例而言，“热稳定聚合酶”指适用于温度循环反应如聚合酶链式反应（“PCR”）的酶。对于热稳定聚合酶，酶活性指以适当的方式催化各核苷酸的组合形成与模板核酸互补的引物延伸产物。

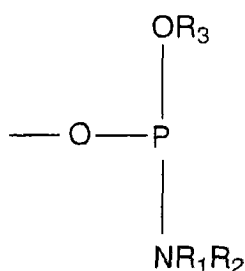
[0134] “寡核苷酸”指包括至少两个核酸单体单元（例如核苷酸）、通常包括三个以上单体单元、更通常包括十个以上单体单元的核酸。寡核苷酸的准确大小通常取决于多个因素，这些因素包括寡核苷酸的最终功能或用途。通常，核苷单体通过磷酸二酯键或其类似物键，所述类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯氨基硫代磷酸酯（phosphoroanilothioate）、苯胺基磷酸酯（phosphoranilidate）、氨基磷酸酯和磷酸甲酯，如果缔合反荷离子如 H^+ 、 NH_4^+ 和 Na^+ 存在的话还包括这些反荷离子。寡核苷酸任选通过任何合适的方法制备，这些方法包括但不限于现有或天然序列的分离、DNA 复制或扩增、反转录、适当序列的克隆和限制酶切消化，或者是通过诸如以下的方法进行直接化学合成：磷酸三酯方法，Narang 等，(1979) *Meth. Enzymol.* 68 :90-99；磷酸二酯方法，Brown 等，(1979) *Meth. Enzymol.* 68 :109-151；二乙基亚磷酰胺方法，Beaucage 等，(1981) *Tetrahedron Lett.* 22 :1859-1862；三酯方法，Matteucci 等，(1981) *J. Am. Chem. Soc.* 103 :3185-3191；自动合成方法；或者固相杂体方法，Caruthers 等的美国专利 4,458,066，标题“PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES（制备多核苷酸的方法）”，1984 年 7 月 3 日授权；或者本领域技术人员公知的其它方法。

[0135] 术语“峰值可见光吸收”指这样的波长，在该波长处分子能最有效地吸收电磁波

频谱的可见光区域或光学区域中的能量。电磁波频谱的可见光区域或光学区域通常包括从大约 700 纳米 (nm) 至大约 400nm 范围内的波长。例如在一些实施方案中,当基本上非荧光供体部分和接纳体部分的峰值可见光吸收相差约 100nm 或更多时,从基本上非荧光供体部分到接纳体部分的非荧光能量转移最为有效。取决于所研究的具体分子,峰值可见光吸收可对应于该分子在电磁波频谱的可见光区域的总体最大吸光度 (global absorbance maximum) 或局部最大吸光度 (local absorbance maximum)。

[0136] “亚磷酰胺”指包括包含有以下化学式的基团的化合物:

[0137]



[0138] 其中 R_1 和 R_2 为独立选自甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基和庚基的烷基基团; R_3 为 $(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ 或 CH_3 。例如在某些实施方案中,亚磷酰胺是常用于寡核苷酸合成程序的核苷-3'-亚磷酰胺单体。在一些这些实施方案中,这些亚磷酰胺单体在 5' 羟基位置有保护基保护。通常在碱基的环外胺上也连接有不同的保护基。另外,单体的磷原子任选用与以上所示化学式相符的 β -氰基乙基 (R_3) 基团和二异丙胺 (NR_1R_2) 基团或其它基团保护。亚磷酰胺和寡核苷酸合成在例如 Beaucage 等, (1992) “Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach”, Tetrahedron 48: 2223-2311 中也有描述。

[0139] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互用,是指氨基酸的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然氨基酸的类似物、衍生物或模拟物的氨基酸聚合酶,和适用于天然氨基酸聚合物。例如,多肽可例如通过加入碳水化合物残基形成糖蛋白、通过加入脂质部分形成脂蛋白来进行修饰或衍生化。因此,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”包括糖蛋白和脂蛋白以及非糖蛋白和非脂蛋白。

[0140] “引物核酸”或“引物”是在适当反应条件下使用例如催化核苷酸掺入的生物催化剂如聚合酶时,能与靶标或模板核酸杂交并使链延伸或延长得以发生的核酸。引物核酸通常是天然或合成的寡核苷酸 (例如单链寡脱氧核苷酸)。引物核酸通常包含长度在约 8 至约 100 个核苷酸范围内的杂交区域,不过任选采用其它引物核酸长度。短的引物核酸通常要求较冷的温度来与模板核酸形成足够稳定的杂交复合物。至少部分上与模板核酸的亚序列互补的引物核酸通常足以与模板杂交而使延伸发生。引物核酸如有需要可通过掺入可用例如光谱技术、光化学技术、生化技术、免疫学技术、化学技术或其它技术检测的标记来进行标记。举例而言,有用的标记包括基本上非荧光供体部分、接纳体部分、猝灭剂部分、放射性同位素、电子致密试剂 (electron-densereagent)、酶 (常用于进行 ELISA)、生物素或半抗原和蛋白质,所述半抗原和蛋白质有针对其的抗血清或单克隆抗体可获得。许多这些和其它的标记在本文中有进一步的描述和 / 或另外为本领域所公知。本领域技术人员会认识到,在某些实施方案中,引物核酸也可用作探针核酸。

[0141] “探针生物分子”指能够选择性结合靶标生物分子的标记或未标记生物分子。

[0142] “保护基”指共价或非共价连键到给定化合物,能防止该化合物中的一个或多个位点处发生不需要的化学反应的化学基团。示例性的保护基包括三苯甲基、一甲氧基三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、菊芋糖基、苄基甲氧基羰基和二苯甲氧基羰基。

[0143] 术语“探针核酸”或“探针”指能够在合适的条件下与靶标或模板核酸选择性杂交的标记或未标记寡核苷酸。通常,探针在选定的杂交条件如但不限于严格杂交条件下,足以与核酸样品中所含的特定靶标序列互补而与该靶标序列形成稳定的杂交双链体。用探针在足够严格的杂交条件下进行的杂交测定,能对特定靶标序列进行选择性的检测。术语“杂交区域”指核酸中完全或基本上与靶标序列互补,从而能够与靶标序列杂交的那个区域。为在杂交测定中用来区别序列中的单核苷酸差异,杂交区域的长度通常为约 8 至约 100 个核苷酸。虽然杂交区域通常指整个寡核苷酸,探针还可包括充当例如接头结合位点 (linker binding site) 的另外的核苷酸序列,以提供位点来将探针序列连键到固相载体。本发明的探针通常包括在包含一个或多个标记 (例如基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分) 的核酸中,如 5' - 核酸酶探针、杂交探针、荧光共振能量转移 (FRET) 探针、发夹探针或分子信标,也可用来检测样品中探针和靶标核酸之间的杂交。在一些实施方案中,探针的杂交区域与靶标序列完全互补。但是一般来说,完全互补性不是必要的 (即核酸可以相互间部分互补);稳定的杂交复合物可含有错配碱基或未配对碱基。可能需要对严格条件作出修正,以允许稳定的杂交复合物有一个或多个碱基对错配或未配对碱基。Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Gold Spring Harbor, N. Y. (2001) 提供了有关合适的修正的指导。靶标 / 探针杂交复合物的稳定性取决于多个变量,包括寡核苷酸的长度、寡核苷酸的碱基组成和序列、温度和离子条件。本领域技术人员会认识到,一般来说,给定探针的正确互补序列 (complement) 同样可用作探针。本领域技术人员还会认识到,在某些实施方案中,探针核酸也可用作引物核酸。

[0144] 术语“亲近测定”指这样的测定,在测定中可检测信号的产生至少部分上取决于接纳体部分和供体部分相互间足够接近。例如在某些实施方案中,各生物分子分别包含接纳体部分和供体部分,使得可检测能量发射从接纳体部分产生至少部分上取决于各生物分子的分子间距离。在其它示例性的实施方案中,各生物分子同时包含接纳体部分和供体部分 (例如连接到生物聚合物的相同或不同单体单元),可检测能量发射从接纳体部分产生至少部分上取决于这些部分之间的分子内间距。在一些这些实施方案中,例如随着生物分子发生构象变化,或者随着接纳体部分和供体部分通过酶促过程或其它切割过程在生物分子中相互分开,来自接纳体部分的可检测能量发射会有变化。

[0145] “猝灭剂部分”或“猝灭剂”指能够减少辐射 (例如荧光辐射或发光辐射) 从本应发射出这一辐射的辐射源的可检测发射的部分。猝灭剂通常减少辐射源所发射的可检测辐射达至少 50%, 通常达至少 80%, 更通常达至少 90%。某些猝灭剂可以以其特有的信号的形式再发射从例如荧光染料吸收的能量,因此猝灭剂也可以是接纳体部分。这一现象一般称为荧光共振能量转移或 FRET。或者,猝灭剂可以以光以外的形式如热的形式散发从荧光染料吸收的能量。FRET 应用中常用的分子包括例如荧光素、FAM、JOE、罗丹明、R6G、TAMRA、ROX、DABCYL 和 EDANS。某荧光染料是接纳体还是猝灭剂由其激发光谱和发射光谱以及与其配对的荧光染料来确定。例如, FAM 能最有效地被波长 494nm 的光线激发,并发射 500-650nm

光谱范围内的光线,最大发射波长为 525nm。FAM 是适合例如与作为猝灭剂的 TAMRA 一起使用的供体部分,其最大激发波长为 560nm。示例性的能散发从荧光染料吸收的能量的非荧光猝灭剂或者说暗猝灭剂,包括 Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA) 出售的 Black Hole Quenchers™。Black Hole Quenchers™ 是这样的结构,其包含至少三个选自取代的或未取代的芳基或杂芳基化合物或者它们的组合的原子团(radical),其中至少两个这些残基通过环外重氮键连接(参见例如 Cook 等的国际公开说明 WO 01/86001,标题“DARK QUENCHERS FORDONOR-ACCEPTOR ENERGY TRANSFER(用于供体-接纳体能量转移的暗猝灭剂)”,2001 年 11 月 15 日公布)。示例性的猝灭剂还例如提供于 Horn 等的美国专利 6,465,175,标题“OLIGONUCLEOTIDEPROBES BEARING QUENCHABLE FLUORESCENT LABELS, and METHODS OF USE THEREOF(带有可猝灭荧光标记的寡核苷酸探针及其使用方法)”,2002 年 10 月 15 日授权。

[0146] 生物聚合物的“序列”指该生物聚合物中的单体单元(例如核苷酸、氨基酸和单糖)的顺序和特性(identity)。核酸的序列通常是从 5'-3' 方向阅读,而多肽的序列通常是从分子的氨基末端或 N 末端到羧基末端或 C 末端的方向阅读。

[0147] “固相载体”指能用化学部分如探针进行衍生化或者以别的方式连接到该化学部分的固体材料。示例性的固相载体包括板(plate)、珠(bead)、微珠(microbead)、可控孔度玻璃(CPG)、聚苯乙烯、管子、纤维、须状物(whisker)、梳子、杂交芯片(包括微阵列基材如 GeneChip® 探针阵列(Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA)中所用的基材)、膜、单晶、陶瓷层、自组装单层和金属表面。

[0148] 本文所用的术语“严格”或“严格条件”表示低离子强度和高温的杂交条件,这是本领域公知的。参见例如 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 等(编辑), J. Wiley & Sons Inc., New York, 1997); Tijssen (1993), 出处同上。通常,严格条件选定为比指定序列在确定离子强度和 pH 下的热解链温度(T_m) 低约 5-30°C。或者,严格条件选定为比指定序列在确定离子强度和 pH 下的 T_m 低约 5-15°C。 T_m 是与靶标序列互补的探针有 50% 与靶标序列处于杂交平衡(由于靶标序列过量存在,在 T_m 下有 50% 的探针处于杂交平衡)时的温度(在确定的离子强度、pH 和核酸浓度下)。

[0149] “亚序列”、“区段”或“片段”指整个生物聚合物序列中的任何部分(portion)。

[0150] 术语“足够接近”在供体部分和接纳体部分之间的能量转移的情形中,指这些部分相互间的间距和/或定位合适,使得接纳体部分能够接受或吸收从供体部分转移来的能量。举例而言,某些接纳体部分在接受了足量的间距和/或定位合适的基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量时会作出响应而发出荧光。

[0151] “糖”或“碳水化合物”指多羟基醛(醛糖)或多羟基酮(酮糖),或者从它们衍生的化合物或类似物。碳水化合物聚合物(例如寡糖和多糖)包括单糖单位单元。示例性的碳水化合物包括甘油醛、赤藓糖(erythrose)、苏糖、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、阿洛糖、阿卓糖、葡萄糖、甘露糖、古洛糖、艾杜糖、半乳糖、塔罗糖、二羟基丙酮、木酮糖和果糖。糖类类似物如碳环糖也包括在糖的定义中(参见例如 Jenkins 等, (1995) Chem. Soc. Rev. 第 169-176 页)。

[0152] “系统”指一组对象和 / 或装置,它们形成用以完成所需目标的网络。例如在一些实施方案中,本发明的系统包括容器和 / 或固相载体,该容器和 / 或固相载体包括一个或多个包含基本上非荧光供体部分和检测成分的生物分子,该检测成分设置成能检测当接纳体部分与基本上非荧光供体部分足够接近时从接纳体部分发射出的光线,例如作为杂交探针测定的一部分。

[0153] “靶标”指待进行扩增、检测和 / 或以别的方式分析的生物分子或其部分 (portion)。

[0154] “终止核苷酸”指当被掺入到核酸时能防止例如至少一个催化核苷酸掺入的生物催化剂对核酸的进一步延伸的核苷酸。

[0155] 当热能可在各对象之间发生了转移或能够发生转移时,则各对象相互间发生“热传送”。例如在本文所述系统的某些实施方案中,热调节器与容器和 / 或固相载体发生热传送,以调节容器中和 / 或固相载体上的温度。

[0156] II. 引言

[0157] 本发明主要涉及非荧光能量在供体部分和接纳体部分之间的转移。更具体的说,本文所述的基本上非荧光供体部分可用于几乎任何涉及供体部分和接纳体部分之间的能量转移的应用中,所述应用包括许多不同的亲近测定样式 (format)。例如常规的能量转移染料对通常设置成短波长荧光供体部分将吸收的能量传输到较长波长接纳体部分。此外,一般认为供体部分的荧光发射光谱和接纳体部分的荧光吸收光谱必须重叠。与这一常规教导相反,本发明的一个出人意料的结果是,本文所述的供体部分缺乏可测量的 (appreciable) 荧光发射光谱。尽管如此,当将接纳体部分定位成与这些供体部分足够接近时,接纳体部分在吸收了从供体部分转移来的非荧光能量时会作出响应而发射光线。

[0158] 使用常规的荧光供体部分如荧光素的一个共同问题是供体部分本身所发射的背景荧光。这一背景荧光会使得难以辨别向较长波长接纳体部分的能量转移,特别是在包括多个荧光供体探针的使用的多重应用中。具体的说,诸如这些的背景或基线光发射通常会通过例如限制检测的灵敏度和动态范围而负面影响测定的性能,所述灵敏度即该测定区别分析物浓度的小差别的能力,所述动态范围即该测定的从可进行定量测量时的最低浓度 (定量限度或 LOQ) 延伸到校准曲线偏离线性时的浓度 (线性限度, LOL) 的有用范围。因此,使用本文所述的基本上非荧光供体部分有许多优点,其中一个优点是这种类型的背景荧光得到减少或消除,从而改进涉及这些类型的供体部分的测定的性能。由本文所述供体部分所提供的改进的信号 - 噪音比,连同本发明的许多其它特征,在下文提供的实施例中作进一步的说明。

[0159] 本发明提供包括以其价方式或别的方式连接于其上的本文所述基本上非荧光供体部分的生物分子 (例如生物聚合物合成试剂、寡核苷酸、多肽、碳水化合物和脂质),这在下文中将作更详细描述。本发明还提供包括这些生物分子连同用以执行给定过程的其它试剂的各种反应混合物,所述过程如生物聚合物合成、生物聚合物标记、核酸检测,此外还有本文所述的或者另外为本领域技术人员所公知的许多其它过程。本发明还提供了各种方法,这在本文中也有描述。例如在某些实施方案中,本发明提供执行亲近测定的方法和检测靶标生物分子的方法。举例而言,本文所述的生物分子任选在各种应用中用于检测核酸的方法中,所述应用包括基因型分型、诊断、法医以及本领域技术人员公知的许多其它应用。

进一步举例而言,还提供了生物聚合物的测序和 / 或标记方法,以及合成本文所述生物分子的方法。本发明进一步提供某些商业方法。此外,本发明还提供各色各样的试剂盒和系统。在阅悉本说明后,本发明这些的和多个其它的方面和特征将会显而易见。

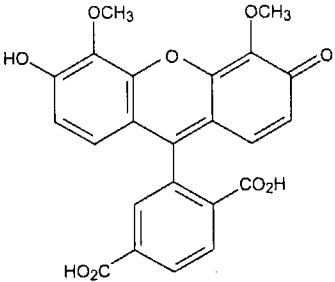
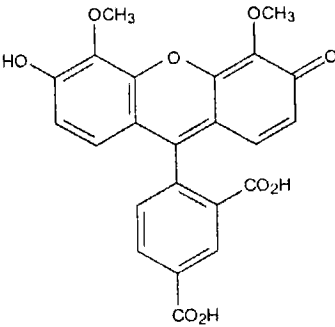
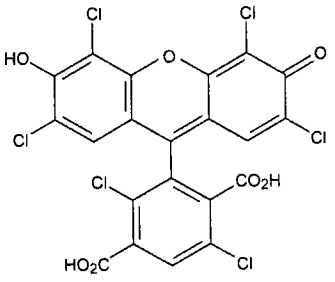
[0160] III. 基本上非荧光供体部分

[0161] 几乎任何能够将非荧光能量转移到接纳体部分而又不会在该过程中发射可测量的荧光的化合物,都可用作基本上非荧光供体部分。因此,本文不试图列出所有任选为此目的而被采用的可能化合物。尽管如此,本文提及了某些具体的基本上非荧光供体部分,以进一步说明本发明的各方面。具体的说,代表性的基本上非荧光供体部分或其前体包括 4', 5' - 二甲氧基 - 6- 羧基荧光素、4', 5' - 二甲氧基 - 5- 羧基荧光素、6- 羧基 - 2', 4, 4', 5', 7, 7' - 六氯荧光素、6- 羧基 - 氨基五氯荧光素、5- 羧基 - 2', 4, 4', 5', 7, 7' - 六氯荧光素和 5- 羧基 - 氨基五氯荧光素。一些这些示例性部分的化学结构在表 I 中示出。

[0162]

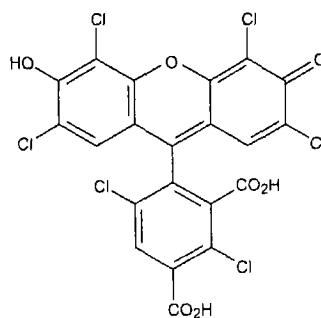
表 I

[0163]

4',5'-二甲氧基-6-羧基荧光素	
4',5'-二甲氧基-5-羧基荧光素	
6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素	

[0164]

5-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素



[0165] 注意,在某些条件下(例如当 HEX 标记寡核苷酸在氨中 55℃ 加热约 24 小时),6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素和 5-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素与生物分子的连接是通过失去至少一个氯离子和加入至少一个氨基基团实现的,因此,当在这些实施方案中与生物分子连接时,这些部分在本文中分别称为“6-羧基-氨基五氯荧光素”和“5-羧基-氨基五氯荧光素”,或者称为“被损坏的 HEX”或“Dam HEX”(例如 5-Dam HEX 或 6-Dam HEX)。此外,对于本文提供的所有分子结构,规定这些分子结构不仅涵盖所给出的确切电子结构,而且还包括它们的所有共振结构和质子化状态。

[0166] 许多基本上非荧光供体部分可容易地用本领域技术人员公知的化学方法合成。任选适用于这些合成方案的各种合成技术是本领域技术人员公知的,在例如以下文献中也有描述:March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 第 5 版, John Wiley & Sons, Inc. (2000), Carey 和 Sundberg, Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanism, 第 4 版, Plenum Publishing Corporation (2000), 以及 Carey 和 Sundberg, Advanced Organic Chemistry, Part B: Reaction and Synthesis, 第 4 版, Plenum Publishing Corporation (2001)。可用于合成基本上非荧光供体部分的化学原料和其它反应成分可容易从多个商业供应商获得,包括例如 Aldrich, Inc. (St Louis, MO, USA)。此外,某些基本上非荧光供体部分是预合成的,可从多个商业供应商如 Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA) 获得。

[0167] IV. 包括基本上非荧光供体部分的试剂

[0168] 本发明还涉及包括本文所述基本上非荧光供体部分的试剂。这些试剂可包括这些供体部分能共价或非共价连接于其上的任何分子或材料。这些分子和材料的实例包括但不限于固相载体(例如膜或可控孔度玻璃)、病毒颗粒、组织、细胞(例如哺乳动物细胞和细菌或其它微生物)、细胞器以及有机和无机单体或聚合物。例如在某些实施方案中,本发明的试剂包括生物分子如脂质、核苷酸、核苷、氨基酸和糖。在一些实施方案中,这些生物分子包括生物聚合物,如肽、蛋白质、多肽、酶、某些激素、免疫球蛋白、多糖、寡糖、多核苷酸或寡核苷酸。

[0169] 本发明的试剂可用于许多不同的过程。例如核苷酸和核苷试剂的代表性用途包括但不限于标记酶促合成所形成的寡核苷酸,例如 PCR 扩增、切口平移反应和 Sanger 型寡核苷酸测序的情形中所用的核苷三磷酸。例如在某些实施方案中,这些试剂是标记上本发明基本上非荧光供体部分的标记核苷(NTP),如胞苷、腺苷、鸟苷和胸苷。这些试剂可用于各种涉及寡核苷酸合成的方法中。在一些实施方案中这些试剂也是标记的核苷酸,所述核苷酸

例如核苷一、二和三磷酸酯。更具体的说,这些试剂包括例如标记上本文所述供体部分的脱氧核苷三磷酸(dNTP)如脱氧腺苷三磷酸、脱氧胞苷三磷酸、脱氧胸苷三磷酸和脱氧鸟苷三磷酸。这些试剂可例如在染料标记寡核苷酸的制备中用作聚合酶底物。这些试剂还包括标记的二脱氧核苷三磷酸(ddNTP)(例如二脱氧腺苷三磷酸、二脱氧鸟苷三磷酸、二脱氧胞苷三磷酸和二脱氧胸苷三磷酸)或其它标记上本发明基本上非荧光供体部分的终止核苷酸。这些试剂可例如用于染料终止测序中。寡核苷酸试剂的用途的实例包括但不限于用作核酸测序引物、PCR引物、杂交探针、发夹探针和5'-核酸酶探针。标记上本文所述基本上非荧光供体部分的多肽的代表性用途包括蛋白质结构和构象研究、受体/配体结合测定和免疫测定。标记上本文所述供体部分的脂质试剂的用途的实例包括脂质分布和运输测定、膜融合测定和膜电位感测分析。另外,标记上本文所述基本上非荧光供体部分的碳水化合物试剂的示例性用途包括受体/配体结合分析和结构分析。使用本发明试剂的方法在下文中作进一步描述。

[0170] 在某些实施方案中,本发明的试剂除包括一个或多个基本上非荧光供体部分外,还包括一个或多个接纳体部分和/或猝灭剂部分。在其它实施方案中,给定的试剂缺乏接纳体部分和/或猝灭剂部分。进一步举例而言,图1A-F示出了本发明试剂的代表性实施方案。更具体的说,在图1A-F中的每个图中,生物聚合物100由单体单元102示意表示。如图1A示出的实施方案所示,生物聚合物100包括连接到单体单元102的基本上非荧光供体部分(D)104。在图1B中,接纳体部分(A)106通过基本上非荧光供体部分(D)104连接到生物聚合物100的单体单元102,而在图1C中,基本上非荧光供体部分(D)104通过接纳体部分(A)106连接到生物聚合物100的单体单元102。图1D显示了基本上非荧光供体部分(D)104和接纳体部分(A)106连接到生物聚合物100的另一种方式。图1E示出了基本上非荧光供体部分(D)104和接纳体部分(A)106分别连接到相同的单体单元102。另外,图1F示出了基本上非荧光供体部分(D)104、接纳体部分(A)106和猝灭剂部分(Q)108分别连接到生物聚合物100的不同单体单元102。应认识到,供体部分、接纳体部分和猝灭剂部分任选共价或非共价连接到试剂和/或相互连接。例如在某些实施方案中,这些部分通过接头部分相互连接和/或连接到试剂的其它成分,而在其它实施方案中,它们不通过接头部分相互连接或连接到试剂的其它成分。还应认识到,供体部分、接纳体部分和猝灭剂部分可通过聚合物分子的骨架或任何其它结构成分连接到该聚合物。

[0171] 接纳体部分和猝灭剂部分

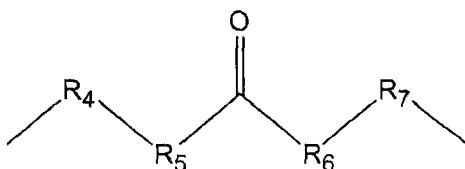
[0172] 本发明试剂的接纳体部分通常能够吸收从基本上非荧光供体部分转移来的激发能量并作出响应而发出荧光。在一些实施方案中,基本上非荧光供体部分和接纳体部分的峰值可见光吸收相差约100nm或更大。可使用的接纳体部分的代表性主要类别包括但不限于咕吨染料、花菁染料、酞菁染料和方酸染料。属这些类别的染料的接纳体部分的实例还描述于例如Lee等的U.S. Pat. 5,800,996,标题“ENERGYTRANSFER DYES WITH ENHANCED FLUORESCENCE(荧光增强的能量转移染料)”,1998年9月1日授权。

[0173] 进一步举例而言,可用于本发明试剂的某些实施方案的接纳体部分的更具体实例,包括但不限于羧基荧光素的异构体(例如5和6羧基)、4,7-二氯荧光素、4,7-二氯罗丹明(Lee等的U.S. Pat. 5,847,162,标题“4,7-DICHLORORHODAMINE DYES(4,7-二氯罗丹明染料)”,1998年12月8日授权)、荧光素、不对称苯并咕吨染料、羧基-HEX的异构体(例

如 5 和 6 羧基)、NAN、CI-FLAN、TET、JOE、VIC、ZOE、罗丹明、羧基罗丹明的异构体(例如 5 和 6 羧基)、羧基 R110 的异构体(例如 5 和 6 羧基)、羧基 R6G 的异构体(例如 5 和 6 羧基)、N,N,N',N'-四甲基羧基罗丹明的异构体(TAMRA)(例如 5 和 6 羧基)、羧基-X-罗丹明(ROX)的异构体(例如 5 和 6 羧基)、LC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、JA-270、CY3、CY3.5、CY5、CY5.5、BODIPY®染料(例如 FL530/550、TR、and TMR)、ALEXA FLUOR®染料(例如 488、532、546、568、594、555、653、647、660 和 680)、其它能量转移染料(例如 BIGDYE™ v1 染料、BIGDYE™ v2 染料和 BIGDYE™ v3 染料)、荧光染料(例如荧光黄)、CASCADE BLUE®和 Oregon Green。合适的接纳体部分的另外实例提供于例如 Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 第 9 版, (2003) 及其更新版本。接纳体部分通常可容易地从多个商业供应商获得, 包括例如 Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)、Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) 和 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)。

[0174] 在某些实施方案中,基本上非荧光供体部分和接纳体部分不通过接头部分相互连接。在其它实施方案中,这些部分通过接头部分相互连接。例如在一些这些实施方案中,接头部分缺乏以下结构:

[0175]



[0176] 其中 R₄ 为连接到基本上非荧光供体部分的 C₁₋₅ 烷基, R₅ 选自 NH、S 和 O, R₆ 选自烯烃、二烯、炔烃和具有至少一个不饱和键的五元或六元环或者与羰基碳连接的稠环结构; R₇ 包含将接头部分连接到接纳体部分的官能团。接头部分在下文在作进一步描述。

[0177] 在一些实施方案中,本发明的试剂还包括一个或多个猝灭剂部分。给定的荧光染料是报道分子(reporter)还是猝灭剂,这个问题通常由其激发光谱和发射光谱以及与其配对的荧光染料来确定。常用作猝灭剂部分的荧光分子包括但不限于例如荧光素、FAM、JOE、罗丹明、R6G、TAMRA、ROX、DABCYL 和 EDANS。许多这些化合物可从上述商业供应商获得。示例性的能散发从荧光染料吸收的能量的非荧光猝灭剂或者说暗猝灭剂,包括可从 Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA) 市售获得的 Black Hole Quenchers™ 或 BHQ™。

[0178] 在某些实施方案中,本发明的试剂还可包括其它标记部分。其它标记部分的实例包括但不限于例如生物素、弱荧光标记(Yin 等, (2003) Appl Environ Microbiol. 69(7):3938, Babendure 等, (2003) Anal. Biochem. 317(1):1 和 Jankowiak 等, (2003) Chem Res Toxicol. 16(3):304)、放射性标记、非荧光标记、比色标记、化学发光标记(Wilson 等, (2003) Analyst. 128(5):480 和 Roda 等, (2003) Luminescence 18(2):72)、Raman 标记、电化学标记、生物发光标记(Kitayama 等, (2003) Photochem Photobiol. 77(3):333, Arakawa 等, (2003) Anal. Biochem. 314(2):206 和 Maeda (2003) J. Pharm. Biomed. Anal. 30(6):1725) 以及例如以下专利申请中描述的 α-甲基-PEG 标记试剂:Bodepudi 等, 美国临时专利申请号 60/428,484, 标题“DETECTABLE LABELED NUCLEOSIDE ANALOGS 和 METHODS OF USE

THEREOF”，2002 年 11 月 22 日提交。

[0179] 接头部分

[0180] 有很多种接头部分可供用以将其它部分（例如基本上非荧光供体部分、接纳体部分和猝灭剂部分）连接到本发明的生物分子和其它试剂，这些接头部分是本领域技术人员熟知的。接头部分通常其结构在空间排列上和电子上适合于连接到给定的生物分子。举例而言，接头部分任选包括例如醚、硫醚、甲酰胺、磺酰胺、尿素、尿烷、肼或其它部分。进一步举例而言，接头部分通常包括约 1 至约 25 个选自例如 C、N、O、P、Si 和 S 的非氢原子，包含例如醚、硫醚、胺、酯、甲酰胺、磺酰胺、酰胺键和芳族键或杂芳族键的几乎任何组合。例如在一些实施方案中，接头部分包含单一碳-碳键和甲酰胺键或硫醚键的组合。接头的线性区段通常含有约 3 至约 15 个非氢原子，但任选采用更长的线性区段。某些这些示例性类型的接头在下文中作进一步描述。

[0181] 进一步举例而言，接头部分的非限制性实例包括取代的（例如官能化的）或未取代的基团。更具体的说，示例性的接头包括咪唑/生物素接头、聚亚甲基基团、亚芳基基团、烷基亚芳基基团、亚芳基烷基基团、芳硫基基团、酰胺烷基基团、炔基烷基基团、烯基烷基基团、烷基基团、烷氧基基团、硫代基基团、氨基烷基基团、吗啉衍生化的磷酸、肽核酸（例如 N-(2-氨基乙基)甘氨酸）和二硫基基团。在一些实施方案中，当互补官能度或与生物分子的连接位点是胺时，接头部分是异硫氰酸酯、磺酰氯、4,6-二氯三嗪胺、琥珀酰亚胺酯或别的活性甲酸酯。任选地，当互补官能度是巯基时，接头部分是马来酰亚胺、卤代乙酰基或碘代乙酰胺。在某些实施方案中，接头部分是从供体部分、接纳体部分或猝灭剂部分上的能与特定生物分子的氨基己基反应的羧基基团形成的活化 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯。某些这些和其它的接头在例如以下专利中有进一步的描述：Haugland 等的，美国专利 6,339,392、Hobbs, Jr. 等的美国专利 5,047,519、Iizuka 等的美国专利 4,711,958、Stavrianopoulos 等的美国专利 5,175,269、Ward 等的美国专利 4,711,955、Engelhardt 等的美国专利 5,241,060、Ward 等的美国专利 5,328,824 和 Khan 等的美国专利公开说明 2002/0151711。有关生物分子标记和接头部分的另外的详细内容提供于例如 Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science(1996) 和 Haugland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, 第 9 版, (2003) 及其更新版本。

[0182] 在某些实施方案中，合适的接头包含光可切割部分如 2-硝基苄基部分、 α -取代的 2-硝基苄基部分（例如 1-(2-硝基苄基)乙基部分）、3,5-二甲氧基苄基部分、硫异羟肟酸、7-硝基吲哚啉部分、9-苯基咕吨基部分、苯偶姻部分、羟基苯甲酰甲基部分和 NHS-ASA 部分。光可切割接头在例如 Olejnik 等的美国专利公开说明 2003/0099972 中有进一步描述。在一些实施方案中，接头包括金属原子如铂原子。这些接头在例如 Houthoff 等的美国专利 5,714,327 中有进一步的描述。有多种不同长度的接头可从多个供应商市售获得，包括例如 Operon Biotechnologies, Inc. (Huntsville, AL, USA)、BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) 和 Molecular BioSciences (Boulder, CO, USA)。

[0183] 在核苷、核苷酸和核酸的情形中，基本上非荧光供体部分、接纳体部分和猝灭剂部分任选例如通过酰胺、酯、硫酯、醚、硫醚、碳-碳或其它类型的共价键连接到例如核苷或核苷酸的碳环、杂环或芳基基团（例如通过嘧啶的 C⁵、胞苷的 N⁴、嘌呤的 N⁷、腺苷的 N⁶、嘌呤的

C⁸ 或本领域公知的别的连接位点)。另外或或者,特定的部分例如通过酰胺、酯、硫酯、醚、硫醚、碳-碳或其它键之类的共价键连接到核苷或核苷酸的糖部分(例如核糖)或其类似物(例如碳环)和/或核苷酸的磷酸基团。共价键通常在这些部分和核苷或核苷酸的亲电子基团和亲核基团之间的反应中形成。在某些实施方案中,基本上非荧光供体部分、接纳体部分和猝灭剂部分与核苷酸直接相互缀合(例如通过单、双、三或芳族碳-碳键,或者通过碳-氮键、氮-氮键、碳-氧键、碳-硫键、磷-氧键和磷-氮键)。

[0184] 在一些实施方案中,接头部分是炔酰胺基或烯酰胺基连键,基本上非荧光供体部分、接纳体部分或猝灭剂部分与核苷酸碱基之间的连键通过使特定的所述部分的活化 NHS 酯与核苷酸的炔基氨基-、炔基乙氧基氨基-或烯基氨基-衍生化的碱基反应来形成。所产生的连键可包括例如炔丙基-1-乙氧基酰胺基(3-(氨基)乙氧基-1-丙炔基)、3-(羧基)氨基-1-丙炔基或 3-氨基-1-丙炔-1-基。

[0185] 进一步举例而言,炔基氨基-衍生化的核苷的合成还描述于例如 Hobbs(1989)“Palladium-catalyzed synthesis of alkynylaminonucleosides. A universal linker for nucleic acids(钯催化的炔基氨基核苷合成。核酸的通用接头)”, J. Org. Chem. 54 :3420-3422。简单的说,炔基氨基-衍生化的核苷是这样形成的:将适当的卤代二脱氧核苷(通常为 5-碘代嘧啶和 7-碘代-7-脱氮嘌呤二脱氧核苷)和 Cu(I) 放入烧瓶中,用氩气吹洗排除空气,加入干 DMF,然后加入炔基胺、三乙胺和 Pd(0)。可将反应混合物搅拌几小时,或者直到薄层层析表明卤代二脱氧核苷被消耗。当使用未保护的炔基胺时,炔基氨基核苷可这样分离:将反应混合物浓缩,用含有氢氧化铵以中和偶联反应中产生的氢卤化物的洗脱溶剂进行硅胶层析。当使用保护的炔基胺时,可将甲醇/二氯甲烷加入到反应混合物中,人那还加入碳酸氢盐形式的强碱性阴离子交换树脂。然后将所得浆液搅拌约 45 分钟,过滤,用另外的甲醇/二氯甲烷清洗树脂。合并的滤液可进行浓缩,用甲醇-二氯甲烷梯度进行快速硅胶层析纯化。三磷酸盐可用本领域技术人员公知的标准技术获得。

[0186] 生物分子制备

[0187] 本发明的生物分子或其它试剂可用任何合适的方法进行制备,包括用合成法产生或从天然来源获得(例如在进行标记前)。例如,标记上基本上非荧光供体部分、接纳体部分和/或猝灭剂部分的寡核苷酸的合成,可用多种已知的寡核苷酸标记技术中的任何一种来完成。举例而言,标记寡核苷酸可例如用 DNA 聚合酶或连接酶进行酶法合成,或者例如用亚磷酰胺方法或亚磷酸三酯方法进行化学合成(Herdewijn, Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Humana Press(2005), Gait(编辑), Oligonucleotide Synthesis, Oxford University Press(1984), Vorbruggen 等, Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, Inc. (2001) 和 Hermanson, Bioconjugate Techniques, Elsevier Science(1996))。标记可用例如标记的核苷三磷酸单体在酶促合成过程中引入,或者用标记的非核苷酸或核苷酸亚磷酰胺在化学合成过程中引入,或者可在合成之后引入。用以合成包括基本上非荧光供体部分的亚磷酰胺的方法还在下文提供的实施例中进行说明。

[0188] 酶促合成标记寡核苷酸的示例性方法包括使模板或靶标核酸变性和使引物与模板退火。通常将脱氧核苷三磷酸(例如 dGTP、dATP、dCTP 和 dTTP)的混合物加入到反应混合

物中,在该反应混合物中其中一种脱氧核苷酸的至少一部分标记上本文所述的基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分。接着,通常将核苷酸掺入性催化剂如聚合酶在该酶有活性的条件下加入到反应混合物中。标记寡核苷酸通过聚合酶链合成过程中标记脱氧核苷酸的掺入而形成。在另选的酶促合成方法中,使用两个引物而不是一个引物,其中一个引物与靶标双链核酸的一条链的一部分互补,另一个引物与该核酸的另一条链的一部分互补。本方法中采用的聚合酶通常是热稳定酶,反应温度通常在变性温度和延伸温度之间循环,以实现通过 PCR 合成靶标核酸的标记互补链 (Edwards 等 (编辑), Real-Time PCR: An Essential Guide, Horizon Scientific Press (2004), Innis 等 (编辑), PCR Strategies, Elsevier Science & Technology Books (1995) 和 Innis 等 (编辑), PCR Protocols, Academic Press (1990)。

[0189] 用化学合成法制备的标记寡核苷酸通常是用亚磷酰胺方法产生,不过也可任选采用其它方法。基于亚磷酰胺的合成常常是生长的寡核苷酸链连接到固相载体上而进行,使得处于液相中的过量试剂能容易地过滤除去。这消除了在各循环之间需要进行其它的纯化步骤。

[0190] 以下简述一个示例性的采用亚磷酰胺方法的固相寡核苷酸合成循环:通常将包括保护的核苷酸单体的固相载体首先用酸(例如三氯乙酸)处理,以除去 5'-羟基保护基,游离出羟基供进行随后的偶联反应。然后通常通过向反应中同时加入保护的亚磷酰胺核苷单体和弱酸(例如四唑)形成活化的中间体。弱酸将亚磷酰胺的氮质子化,形成反应性中间体。核苷向生长的核酸链的加入通常在 30 秒钟内完成。之后,通常进行加帽步骤,以终止任何没有发生核苷加入的寡核苷酸链。加帽可例如用乙酸酐和 1-甲基咪唑进行。然后通过用例如碘作为氧化剂和水作为氧供体进行氧化,将核苷酸间连键从亚磷酸盐转化成更为稳定的磷酸三酯。氧化后,通过用质子酸(例如三氯乙酸或二氯乙酸)除去羟基保护基,重复进行循环,直到链延伸完成。合成后,通常用碱如氢氧化铵或叔丁胺将合成的寡核苷酸从固相载体上切割下来。切割反应还除去任何磷酸保护基(例如氰基乙基)。最后,通过在碱性条件下高温(例如最高达约 55℃)处理寡核苷酸溶液,除去碱的环外胺上的保护基和标记部分上的羟基保护基。

[0191] 有关用以通过亚磷酰胺方法形成寡核苷酸的化学原理的描述还提供于例如 Caruthers 等的美国专利 4,458,066,标题“PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES(制备多核苷酸的方法)”,1984 年 7 月 3 日授权,和 Caruthers 等的美国专利 4,415,732,标题“PHOSPHORAMIDITE COMPOUNDS AND PROCESSES(亚磷酰胺化合物和方法)”,1983 年 11 月 15 日授权。

[0192] 任何亚磷酰胺核苷单体都可标记上本文所述的基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分。在某些实施方案中,如果要标记寡核苷酸的 5'-末端,可在最终缩合步骤过程中使用标记的非核苷酸性亚磷酰胺。如果要标记寡核苷酸的内部位置,在任何的缩合步骤过程中都可使用标记的核苷酸性亚磷酰胺。另外,在合成后,寡核苷酸还可在几乎多个位置进行标记 (Eckstein 等 (编辑), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press (1992), Chu 等, (1983) “Derivatization of unprotected polynucleotides(未保护多核苷酸的衍生化)”, Nucleic Acids Res. 11(18):6513-6529 和 Smith 等的美国专利 5,118,800,标题“Oligonucleotides

possessing a primary aminogroup in the terminal nucleotide(在末端核苷酸具有一级氨基的寡核苷酸)”,1992年6月2日。进一步举例而言,寡核苷酸还可在其磷酸二酯骨架进行标记(Eckstein等,(1992),出处同上)或在3'-末端进行标记(Nelson等,(1992)“Oligonucleotide labeling methods.3.Direct labeling of oligonucleotides employing a novel, non-nucleosidic, 2-aminobutyl-1,3-propanediol backbone(寡核苷酸标记方法.3.采用新型的非核苷2-氨基丁基-1,3-丙二醇骨架进行寡核苷酸的直接标记)”,Nucleic Acids Res. 20(23):6253-6259, Nelson的美国专利 5,401,837,标题“Method for labeling the 3' terminus of a synthetic oligonucleotide using a unique multifunctional controlled pore glass(MF-CPG) reagent in solid phase oligonucleotide synthesis(在固相寡核苷酸合成中用独特的多功能可控孔度玻璃(MF-CPG)试剂标记合成的寡核苷酸的3'末端的方法)”,1995年3月28日授权和 Nelson 的美国专利 5,141,813,标题“Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide synthesis(用于固相寡核苷酸合成的多功能可控孔度玻璃试剂)”,1992年8月25日授权。

[0193] 在某些实施方案中,在本文描述的标记寡核苷酸(例如探针或引物)中包括修饰的核苷酸。举例而言,修饰核苷酸置换向寡核苷酸序列中的引入能例如提高寡核苷酸的解链温度。在一些实施方案中,相比于相应的未修饰寡核苷酸,这甚至在靶标核酸和特定寡核苷酸之间在序列中有一个或多个错配存在的情况下也能产生更高的灵敏度。可置换或加入到寡核苷酸中的示例性修饰核苷酸包括例如 C5-乙基-dC、C5-甲基-dC、C5-乙基-dU、2,6-二氨基嘌呤、C5-丙炔基-dC、C7-丙炔基-dA、C7-丙炔基-dG、C5-炔丙基氨基-dC、C5-炔丙基氨基-dU、C7-炔丙基氨基-dA、C7-炔丙基氨基-dG、7-脱氮-2-脱氧黄苷、吡啶并嘧啶类似物、假-dU、硝基吡咯、硝基咪唑、2'-O-甲基 Ribo-U、2'-O-甲基 Ribo-C、8-氮杂-dA、8-氮杂-dG、7-脱氮-dA、7-脱氮-dG、N4-乙基-dC 和 N6-甲基-dA。进一步举例而言,修饰寡核苷酸的其它实例包括具有一个或多个 LNA™ 单体的寡核苷酸。诸如这些的核苷酸类似物在例如以下专利中也有描述:Kochkine 等的美国专利 6,639,059,标题“SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NUCLEOSIDES([2.2.1] 双环核苷的合成)”,2003年10月28日授权, Skouv 的美国专利 6,303,315,标题“ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES(复杂生物样品中的核酸的一步样品制备和检测)”,2001年10月16日授权和 Kochkine 等的美国专利申请公开号 2003/0092905,标题“SYNTHESIS OF [2.2.1] BICYCLO NUCLEOSIDES([2.2.1] 双环核苷的合成)”,2003年5月15日公布。包含 LNA™ 单体的寡核苷酸可从例如 Exiqon A/S (Vedbæk, DK) 市售获得。另外的寡核苷酸修饰在本文中有提及,包括在上文的定义中提及。

[0194] 进一步举例而言,几乎任何核酸(和事实上任何标记核酸,不管是标准的还是非标准的)都可从多个商业来源中的任何一个定制供货或标准供货,如 The Midland Certified Reagent Company, Inc. (Midland, TX, USA)、Operon Biotechnologies, Inc. (Huntsville, AL, USA)、Proligo LLC (Boulder, CO, USA) 和许多其它商业来源。

[0195] 本发明的试剂还可包括标记上本文所述基本上非荧光供体部分、接纳体部分和/或猝灭剂部分的蛋白质和肽。肽任选用任何公知的技术进行合成和/或标记。例如,制备具有 C 末端醇的肽的方法通常涉及溶液相合成或固相肽合成。固相方法通常采取通过

本领域技术人员公知的合适接头部分将原料共价连接到固相载体（例如聚苯乙烯或聚乙二醇）。基于 Boc/Bzl（叔丁氧基羰基 / 苄基）化学所用的苄基和二苯甲基胺接头以及 Fmoc/tBu（苄氧基羰基 / 叔丁基）方案所用的更为不稳定的烷氧基苄基或 2,4-二甲氧基二苯甲基胺接头的肽合成的 C 末端锚定策略，任选应用于具有游离羧基或羧基酰胺末端的肽的合成。肽合成的各个方面还描述于例如 Merrifield(1963) J. Am. Chem. Soc. 85 : 2149, Larsen 等, (1993) J. Am. Chem. Soc. 115 :6247, Smith 等, (1994) J. Peptide Protein Res. 44 :183, O' Donnell 等, (1996) J. Am. Chem. Soc. 118 :6070, Mitchell et. al. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98 :7357-7362, Matsueda et. al. (1981) Peptides 2 :45-50, Wang(1972) J. Am. Chem. Soc. 95 :1328-1333, Rink(1987) Tet. Let. 28 :3787-3790, Lloyd-Williams 等, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press(1997), Jones, Amino Acid and Peptide Synthesis, 第 2 版, Oxford University Press(2002) 和 Howl, Peptide Synthesis and Applications, Humana Press(2005)。另外,定制的肽和蛋白质也可从各个商业供应商订购,包括例如 Sigma-Genesis Co. (The Woodlands, TX, USA)、Biopeptide Co., LLC(San Diego, CA, USA) 和 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA)。

[0196] 在某些实施方案中,本发明的试剂是包括本文所述基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分的免疫球蛋白或抗体。适用于本发明这些实施方案的抗体可通过常规方法和 / 或遗传工程进行制备和标记。抗体片段可例如从轻链和 / 或重链 (V_H 和 V_L) 的可变区 (包括超可变区), 或者同时从 V_H 区和 V_L 区遗传工程改造获得。例如,本文所用的术语“免疫球蛋白”或“抗体”包括多克隆和单克隆抗体及它们的生物活性片段,其中包括“单价”抗体 (Glennie 等, (1982) Nature 295 :712); Fab 蛋白质,其包括共价或非共价聚集的 Fab' 和 $F(ab')_2$ 片段;单独的轻链或重链,通常是重链和轻链可变区 (V_H 区和 V_L 区), 更通常包括超可变区 (也称 V_H 区和 V_L 区的互补决定区 (CDR)); F_c 蛋白;能够结合超过一个抗原的“杂交”抗体;恒定区-可变区嵌合体;具有不同起源的重链和轻链的“复合”免疫球蛋白;由本领域公知的标准重组技术、诱变技术或其它定向进化技术制备的具有改进的特异性和其它特性的“改变的”抗体。标记的免疫球蛋白可用于多种公知的测定中,包括例如荧光免疫测定。

[0197] 其它示例性的本发明试剂包括包含有本文所述基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分的脂质和碳水化合物。脂质和 / 或碳水化合物化学和合成的各个方面还描述于例如 Tyman (Ed.), Surfactants in Lipid Chemistry:Recent Synthetic, Physical, and Biodegradative Studies, The Royal Society of Chemistry(1992), Gurr 等, Lipid Biochemistry, 第 5 版, Iowa State Press(2001), Min Kuo 等 (编辑), Lipid Biotechnology, Marcel Dekker(2002), Ogura 等 (编辑), Carbohydrates-Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry, VCH Publishers, Inc. (1993), Derek Horton 等 (编辑), Trends in Synthetic Carbohydrate Chemistry, American Chemical Society(1989), Gunstone 等, Lipid Handbook, 第 2 版, CRC Press(1994), Scherz 等, Analytical Chemistry of Carbohydrates, John Wiley & Sons, Inc. (2002), Boons (编辑), Carbohydrate Chemistry, Chapman & Hall(1997), Davis 等, Carbohydrate Chemistry, Oxford University Press(2002)。

[0198] V. 反应混合物

[0199] 本发明还提供许多不同的可用于多种应用的反应混合物。例如在一些实施方案中,反应混合物用于进行同源 (homogeneous) 扩增 / 检测测定 (例如实时 PCR 监测)、核酸测序程序、生物聚合物合成方案 (例如肽合成或寡核苷酸合成) 或生物聚合物标记反应。许多这些应用在下文中作进一步描述,或者在本文中另外提到。

[0200] 在某些实施方案中,本发明的反应混合物包括选定量的核苷酸、引物和 / 或探针。通常,这些核苷酸、引物和 / 或探针中的一种或多种标记上至少一个基本上非荧光供体部分、接纳体部分和 / 或猝灭剂部分。这些反应混合物的核苷酸通常是例如用于核酸扩增反应或核酸测序反应的可延伸核苷酸和 / 或终止核苷酸。几乎任何为本领域技术人员所公知的终止核苷酸都可任选采用。可用于一些实施方案中的一些示例性终止核苷酸还描述于例如 Konrad 等的美国专利 5,273,638,标题“NUCLEOTIDE SEQUENCE DETERMINATION EMPLOYING MATCHED DIDEOXYNUCLEOTIDE TERMINATOR CONCENTRATIONS (采用匹配的 2'-脱氧核苷酸终止子浓度进行核苷酸序列测定)”,1993 年 12 月 28 日授权, Gelfand 等的美国专利申请号 10/879,493,标题“2'-TERMINATOR NUCLEOTIDE-RELATED METHODS AND SYSTEMS (2'-终止核苷酸相关的方法和系统)”,2004 年 6 月 28 日提交,和 Bodepudi 等的美国专利申请号 10/879,494,标题“SYNTHESIS AND COMPOSITIONS OF 2'-TERMINATOR NUCLEOTIDES (2'-终止核苷酸的合成和组成)”,2004 年 6 月 28 日提交。包括在这些反应混合物中的探针通常包括例如杂交探针、5'-核酸酶探针和 / 或发夹探针。

[0201] 另外,反应混合物还通常包括各种可用于进行核酸扩增或检测反应 (例如实时 PCR 监测或 5'-核酸酶测定) 或者核酸测序反应的各种试剂。这些其它试剂的示例性类型包括例如模板或靶标核酸、催化核苷酸掺入的生物催化剂 (例如 DNA 聚合酶)、缓冲剂、盐、扩增子、甘油、金属离子、二甲亚砜 (DMSO) 和 poly rA。核酸扩增和检测以及其它方法也在下文中作进一步描述。

[0202] 反应混合物通常是通过将选定的上述核苷酸、引物和 / 或探针与一定量的足以进行所选定的具体应用的其它试剂组合在一起产生。本领域技术人员由所要执行的选定方法会清楚知道要包括在给定反应混合物中的试剂的量。但是举例而言,引物核酸和可延伸核苷酸 (例如四种 dNTP (dGTP、dCTP、dATP、dTTP)) 各自通常在这些反应混合物中以很大的摩尔过量存在。可用于本发明反应混合物的探针和引物在本文中进行了描述。合适的可延伸和 / 或终止核苷酸可容易地从许多不同的商业供应商获得,包括例如 Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA)、Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) 和 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)。

[0203] 用于本发明反应混合物和其它方面的催化核苷酸掺入的生物催化剂包括酶如聚合酶、末端转移酶、反转录酶、端粒酶和多核苷酸磷酸化酶。例如在某些实施方案中,酶包括 5' -3' 核酸酶活性、3' -5' 外切核酸酶活性和 / 或是热稳定酶。酶任选源自诸如以下的微生物: *Thermus* *antarcticus*、水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*)、*Thermus caldophilus*、喜温栖热菌 (*Thermus chliarophilus*)、丝状栖热菌 (*Thermus filiformis*)、*Thermus flavus*、*Thermus igniterrae*、*Thermus lacteus*、奥飞氏栖热菌 (*Thermus oshimai*)、红色栖热菌 (*Thermus ruber*)、*Thermus rubens*、水管致黑栖热菌 (*Thermus scotoductus*)、斯氏栖热菌 (*Thermus silvanus*)、*Thermus* *species* Z05、*Thermus* *species* sps 17、嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*)、海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)、

Thermotoga 那不勒斯吸热袍菌 (neapolitana)、非洲栖热腔菌 (Thermosipho africanus)、Anaerocellum thermophilum、Bacillus caldovenax 和嗜热脂肪芽孢杆菌 (Bacillus stearothermophilus)。

[0204] 在某些实施方案中,还可向本发明反应混合物加入另外的试剂。举例而言,反应混合物还任选包括例如用于使焦磷酸解作用减至最低的焦磷酸酶(例如热稳定焦磷酸酶)、例如用以防止发生遗留污染的尿嘧啶 N-糖基化酶(UNG)(例如热稳定 UNG)。

[0205] 另外的示例性的本发明反应混合物包括本文所述的生物聚合物合成试剂(例如核酸合成试剂如亚磷酰胺或多肽合成试剂)。这些反应混合物通常用于本文所提及的或者另外为本领域技术人员公知的生物聚合物合成过程。

[0206] 许多可适用于本发明的生物分子和其它试剂的反应混合物还描述于例如 Ausubel 等(编辑) Current Protocols in Molecular Biology, 第 I、II 和 III 卷, (1997) (Ausubel 1), Ausubel 等(编辑), Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 第 5 版, John Wiley & Sons, Inc. (2002) (Ausubel 2), Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, ColdSpring Harbor Laboratory Press (2000) (Sambrook), Berger 和 Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques: Methods in Enzymology, 第 152 卷, Academic Press, Inc. (Berger), Vorbruggen 等, Handbook of Nucleoside Synthesis, Organic Reactions Series, #60, John Wiley & Sons, Inc. (2001), Gait(编辑) Oligonucleotide Synthesis, Oxford University Press (1984), Hames 和 Higgins, Nucleic Acid Hybridization, Practical Approach Series, Oxford University Press (1997) 以及 Hames 和 Higgins(编辑) Transcription and Translation, Practical Approach Series, Oxford University Press (1984)。

[0207] VI. 使用包含基本上非荧光供体部分的生物分子的方法

[0208] 本发明还提供使用本文所述的标记生物分子的方法。例如在一些实施方案中,这些生物分子用来执行涉及靶标核酸或其它生物分子的检测的测定中,该测定例如为了提供有关这些靶标所来自的受试者的诊断信息、遗传信息或其它信息。基本上非荧光供体部分在这些方法中的使用通常导致与采用常规供体部分的程序相比背景荧光减少。因此,这通常会改进用到这些基本上非荧光供体部分的特定测定的性能特性,如灵敏度和动态范围。这些方面在下文提供的实施例中也有说明。

[0209] 本文描述的生物分子任选用于或适用于几乎任何涉及能量的转移以实现分析物检测的应用。与核酸相关的应用类型的实例包括核酸结构和构象的分析、实时 PCR 测定和 SNP 检测 (Myakishev 等, (2001) “High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers (用通用能量转移标记引物通过等位基因特异性 PCR 进行高通量 SNP 基因型分型)”, Genome Res 11: 163-169, Lee 等, (1999) “Seven-color, homogeneous detection of six PCR products (六种 PCR 产物的七色同源检测)”, Biotechniques 27: 342-349, Thelwell 等, (2000) “Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection (蝎引物的作用方式和在突变检测的应用)”, Nucleic Acids Res 28: 3752-3761, Whitcombe 等, (1999) “Detection of PCR products using self-probing amplicons

and fluorescence(用自探测扩增子和荧光进行 PCR 产物的检测)”, Nat Biotechnol 17: 804-807, Heid 等, (1996) “Real time quantitative PCR(实时定量 PCR)”, Genome Res 6:986-994, Nazarenko 等, (1997) “A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer(基于能量转移的 DNA 扩增和检测的密封管模式)”, Nucleic Acids Res 25:2516-2521; 核酸杂交的检测 (Parkhurst 等, (1995) “Kinetic studies by fluorescence resonance energy transfer employing a double-labeled oligonucleotide: hybridization to the oligonucleotide complement and to single-stranded DNA(采用双标记寡核苷酸通过荧光共振能量转移进行动力学研究: 与寡核苷酸互补序列和与单链 DNA 的杂交)”, Biochemistry 34:285-292, Tyagi 等, (1996) “Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization(分子信标: 杂交时会发出荧光的探针)”, Nat Biotechnol 14:303-308, Tyagi 等, (1998) “Multicolor molecular beacons for allele discrimination(用于等位基因辨别的多色分子信标)”, Nat Biotechnol 16:49-53, Sixou 等, (1994) “Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer(FRET)(通过荧光共振能量转移(FRET)检测的胞内寡核苷酸杂交)”, Nucleic Acids Res 22: 662-668 和 Cardullo 等, (1988) “Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer(通过非放射荧光共振能量转移检测核酸杂交)”, Proc Natl Acad Sci USA 85:8790-8794; 用以检测突变的引物延伸测定 (Chen 等, (1997) “Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method(作为同源 DNA 诊断方法的荧光能量转移检测)”, Proc Natl Acad Sci USA 94:10756-10761; 和自动 DNA 测序 (Woolley 等, (1995) “Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips(使用毛细管电泳芯片的超高速 DNA 测序)”, Anal Chem 67:3676-3680, Hung 等, (1998) “Comparison of fluorescence energy transfer primers with different donor-acceptor dye combinations(荧光能量转移引物与不同的供体-接纳体染料组合的比较)”, Anal Biochem 255:32-38 和 Ju 等, (1995) “Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis(用于 DNA 测序和分析的荧光能量转移染料标记引物)”, Proc Natl Acad Sci USA 92:4347-4351)。

[0210] 与蛋白质相关的应用类型的实例包括蛋白质结构和构象的分析 (Xing 等, (1995) “Internal movement in myosin subfragment 1 detected by fluorescence resonance energy transfer(通过荧光共振能量转移检测的肌球蛋白亚片段 1 中的内部运动)”, Biochemistry 34:6475-6487, Luo 等, (1998) “Localization of Cys133 of rabbit skeletal troponin-I with respect to troponin-C by resonance energy transfer(通过共振能量转移将兔骨骼肌钙蛋白-I 的 Cys133 相对于肌钙蛋白-C 进行定位)”, Biophys J 74:3111-3119, Erickson 等, (1995) “Use of resonance energy transfer to determine the proximity of the guanine nucleotide binding site of transducin relative to a conformationally-sensitive site on the gamma subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase(使用共振能量转移测定转导蛋白的鸟嘌呤核苷酸结合位点相对于环 GMP 磷酸二酯酶的 γ 亚单位上的构象敏感位点的接近度)”,

Biochemistry 34:8693-8700 和 Taniguchi 等, (1993) “Reversible changes in the fluorescence energy transfer accompanying formation of reaction intermediates in probe-labeled (Na⁺, K⁺)-ATPase (探针标记 (Na⁺, K⁺)-ATP 酶中的反应中间体的荧光能量转移伴随结构的可逆变化)”, J Biol Chem 268:15588-15594; 蛋白质复合物的空间分布和装配的分析 (Moens 等, (1994) “Determination of the radial coordinate of Cys-374 in F-actin using fluorescence resonance energy transfer spectroscopy: effect of phalloidin polymer assembly (用荧光共振能量转移光谱术测定 F-肌动蛋白中的 Cys-374 的径向坐标: 鬼笔环肽对聚合酶装配的作用)”, Biochemistry 33:13102-13108, Watson 等, (1995) “Macromolecular arrangement in the aminoacyl-tRNA elongation factor Tu.GTP ternary complex. A fluorescence energy transfer study (氨基酰基-tRNA 延伸因子 Tu.GTP 三重复合物中的巨分子排列: 荧光能量转移研究)”, Biochemistry 34:7904-7912, Adair 等, (1994) “Glycophorin A helical transmembrane domains dimerize in phospholipid bilayers: a resonance energy transfer study (血型糖蛋白 A 螺旋跨膜结构域在磷脂双层中二聚化: 共振能量转移研究)”, Biochemistry 33:5539-5544 和 Matyus (1992) “Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions (细胞表面上的荧光共振能量转移测量: 测定蛋白质相互作用的光谱学工具)”, J Photochem Photobiol 12:323-337; 受体/配体相互作用的分析 (Berger 等, (1994) “Complex molecular mechanism for dihydropyridine binding to L-type Ca(2⁺)-channels as revealed by fluorescence resonance energy transfer (荧光共振能量转移揭示的二氢吡啶与 L 型 Ca(2⁺)-通道结合的复杂分子机制)”, Biochemistry 33:11875-11883, Gagne 等, (2002) “Use of fluorescence polarization detection for the measurement of fluopeptideTM binding to G protein-coupled receptors (用应极化检测来测量 fluopeptideTM 与 G 蛋白偶联受体的结合)”, J Recept Signal Transduct Res 22:333-343 和 Poo 等, (1994) “Ligation of CD3 trigger transmembrane proximity between LFA-1 and cortical microfilaments in acytotoxic T cell clone derived from tumor infiltrating lymphocytes: a quantitative resonance energy transfer microscopy study (CD3 的连接触发了 LFA-1 和衍自肿瘤浸润性淋巴细胞的细胞毒性 T 细胞克隆中的皮质微丝之间的膜接近: 定量共振能量转移显微研究)”, J Cell Physiol 159:176-180; 和免疫测定 (Morrison (1988) “Time-resolved detection of energy transfer: theory and application to immunoassays (能量转移的时间分辨检测: 理论和在免疫测定中的应用)”, Anal Biochem 174:101-120 和 Khanna 等, (1980) “4', 5' -Dimethoxy-6-carboxy fluorescein: a novel dipole-dipole coupled fluorescence energy transfer acceptor useful for fluorescence immunoassays (4', 5' -二甲氧基-6-羧基荧光素: 可用于荧光免疫测定的新型偶极-偶极偶联荧光能量转移接纳体)”, Anal Biochem 108:156-161)。

[0211] 与脂质相关的应用类型和其它的应用类型的实例包括脂质分布和运输的分析 (Gutierrez-Merino 等, (1995) “Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes NBD-phosphatidyl choline and rhodamine-phosphatidylethano

lamine in the exofacial leaflet of acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* (荧光脂质探针 NBD- 磷脂酰胆碱和罗丹明 - 磷脂酰乙醇胺在石纹电鳐中富含乙酰胆碱受体的膜的外表面小叶中的优先分布)”, *Biochemistry* 34:4846-4855 和 Wolf 等, (1992) “Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogues by nonradiative fluorescence resonance energy transfer (通过非放射荧光共振能量转移测定荧光脂质类似物的跨双层分布)”, *Biochemistry* 31:2865-2873; 膜融合测定 (Pecher 等, (1998) “Membrane fusion induced by 11-mer anionic and cationic peptides: a structure-function study (11-mer 阴离子和阳离子肽引起的膜融合: 结构 - 功能研究)”, *Biochemistry* 37:2361-2371 和 Partearroyo 等, (1994) “Real-time measurements of chemically-induced membrane fusion in cell monolayers, using a resonance energy transfer method (使用共振能量转移方法实时测量细胞单层中的化学诱导膜融合)”, *Biochim Biophys Acta* 1189:175-180; 膜电势感测测定 (Gonzalez 等, (1995) “Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells (在单细胞中通过荧光共振能量转移进行电压感测)”, *Biophys J* 69:1272-1280; 荧光蛋白酶底物的分析 (Kurth 等, (1998) “Engineering the S1' subsite of trypsin: design of a protease which cleaves between dibasic residues (工程改造胰蛋白酶的 S1' 亚位点: 能在二碱性残基之间切割的蛋白酶的设计)”, *Biochemistry* 37:11434-11440 和 Gulnik 等, (1997) “Design of sensitive fluorogenic substrates for human cathepsin D (人组织蛋白酶用的敏感荧光底物的设计)”, *FEBS Lett* 413:379-384; 环 AMP 指示剂的分析 (Adams 等, (1991) “Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells (单细胞中环 AMP 的荧光比例显像)”, *Nature* 349:694-697) 和锌指示剂的分析 (Godwin 等, (1996) “A Fluorescent Zinc Probe Based on Metal-Induced Peptide Folding (基于金属诱导的肽折叠的荧光锌探针)”, *J Am Chem Soc* 118:6514; 和探测单分子的相互作用的分析 (Ha 等, (1996) “Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor (探测两个单分子之间的相互作用: 单供体和单接纳体之间的荧光共振能量转移)”, *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6264-6268)。

[0212] 进一步举例而言, 可用于或适用于分析在或来自例如本发明反应混合物中的靶标核酸的一般类型核酸分析技术的实例, 包括各种核酸扩增测定。核酸扩增测定在一个共同特征是它们通常被设计成扩增待检测的生物所特有的核酸序列。核酸扩增试验通常比其它核酸分析方法具有更高的灵敏度。这一灵敏度通常归因于这些试验能从少至单一拷贝的靶标核酸产生阳性信号的能力, 而这一灵敏度还可用本文所述的基本上非荧光供体部分进一步改进。任选被用来或适用于检测靶标核酸的扩增方法包括例如各种聚合酶、连接酶或反转录酶介导的扩增方法, 如聚合酶链式反应 (PCR)、连接酶链式反应 (LCR) 和 / 或反转录 PCR (RT-PCR)。有关这些和其它的扩增方法以及这些测定的样品制备的各种方法的更多细节, 可见于多种标准的文本中的任何一种, 包括例如上文提到的 Berger、Sambrook、Ausubel 1 和 2 及 Innis。

[0213] 任选适用于本发明试剂和方法的各种商业核酸扩增测定法, 通常在其扩增方法

及其靶标核酸序列方面有差异。这些商业试验法的实例包括杂交探针测定（例如使用 LightCycler® 系统）及使用聚合酶链式反应 (PCR) 的 AMPLICOR® 和 COBAS AMPLICOR® 测定 (RocheDiagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) ;使用连接酶链式反应 (LCR) 的 LCx® 试验 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) ;使用链置换扩增 (SDA) 的 BDProbeTec™ ET 试验 (Becton, Dickinson 和 Company, Franklin Lakes, N. J., USA) ;和使用转录介导扩增 (TMA) 的 APTIMA™ 测定 (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA)。核酸扩增和检测在下文中作进一步描述。

[0214] 例如在某些实施方案中,将本发明的 5′-核酸酶探针用于各种 5′-核酸酶反应中。许多 5′-核酸酶测定是本领域技术人员公知的。这种反应的实例还描述于例如 Gelfand 等的美国专利 6,214,979,标题“HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM(同源测定系统)”,2001年4月10日授权,Gelfand 等的美国专利 5,804,375,标题“REACTION MIXTURES FOR DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACIDS(用于检测靶标核酸的反应混合物)”,1998年9月8日授权,Gelfand 等的美国专利 5,487,972,标题“NUCLEIC ACID DETECTION BY THE 5′-3′ EXONUCLEASE ACTIVITY OF POLYMERS ACTING ON ADJACENTLY HYBRIDIZED OLIGONUCLEOTIDES(采用作用于邻接杂交的寡核苷酸的核酸聚合物 5′-3′ 外切核酸酶活性进行核酸检测)”,1996年1月30日授权,和 Gelfand 等的美国专利 5,210,015,标题“HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM USING THE NUCLEASE ACTIVITY OF A NUCLEIC ACID POLYMER(使用核苷酸聚合物的核酸酶活性的同源测定系统)”,1993年5月11日授权。

[0215] 简单举例而言,在 5′-核酸酶反应中,使靶标核酸与引物和探针(例如本发明的 5′-核酸酶探针)在该引物和探针能与靶标核酸的某条链杂交的条件下进行接触。还使靶标核酸、引物和探针与具有 5′-3′ 核酸酶活性的核酸聚合酶进行接触。具有 5′-3′ 核酸酶活性的核酸聚合酶能切割与引物下游的靶标核酸杂交的探针。引物的 3′ 末端为聚合酶提供初始结合位点。结合的聚合酶在遇到探针的 5′ 末端时从该探针切割下片段。这个过程还在图 2 中示出。如图所示,在引物 200 的延伸过程中,聚合酶 202 将与靶标或模板 206 退火的 5′-核酸酶探针 204 切割,使基本上非荧光供体部分 (D) 208 和接纳体部分 (A) 210 从 5′-核酸酶探针 204 的其余部分释放下来,该其余部分包括猝灭剂部分 (Q) 212。在切割前,猝灭剂部分 (Q) 212 猝灭来自接纳体部分 (A) 210 的荧光发射,而如图所示,在这一切割过程之后,猝灭剂部分 (Q) 212 不再猝灭来自接纳体部分 (A) 210 的荧光发射。在另一个示例性实施方案中,5′-核酸酶探针只包括基本上非荧光供体部分和接纳体部分。在这些实施方案中,来自接纳体部分的荧光发射的强度通常在切割后会降低,因为供体部分和接纳体部分相互分开了。

[0216] 引物和探针可设计成使得它们在靶标核酸上非常接近的地方发生退火,使得核酸聚合酶与引物的 3′-末端的结合能使其在没有引物延伸情况下与探针的 5′末端发生接触。术语“不依赖于聚合的切割”指的是这个过程。或者,如果引物和探针分别与靶标核酸的相距较远的区域退火,聚合通常会在核酸聚合酶遇到探针的 5′-末端之前发生。随着聚合的继续进行,聚合酶不断地从探针的 5′-末端切割下片段。这一切割继续进行到探针的剩余部分已失稳定至它从模板分子脱离下来的地步为止。术语“依赖于聚合的切割”指的是这个过程。

[0217] 不依赖于聚合的切割的一个优点在于消除了核酸扩增的需要。倘若引物和探针相

邻地结合到核酸,则可进行相续的各轮探针退火和片段切割。因此,可产生出足量的片段,使得在聚合不存在下也可能进行检测。

[0218] 在任一过程中,都提供据认为含有靶标核酸的样品。样品中所含的靶标核酸如有需要可首先反转录成 cDNA,然后用任何合适的变性方法进行变性,包括本领域技术人员公知的物理方法、化学方法或酶学方法。一个示例性的实现链分离的物理方法涉及将核酸加热至完全 (> 99%) 变性。典型的热变性涉及约 85°C 至约 105°C 的温度和约 1 至约 10 分钟的时间。作为变性的替代方案,核酸在样品中可以以单链形式存在,如当样品包含单链 RNA 或 DNA 病毒时。

[0219] 通常将变性的靶标核酸链与引物和探针在能让该引物和探针结合靶标核酸链的杂交条件下进行温育。在一些实施方案中,可用两个引物来扩增靶标核酸。通常对这两个引物进行选定,使得它们沿着靶标核酸的相对位置能使得从一个引物合成的延伸产物当从其模板 (互补序列) 分开时,可充当另一个引物的延伸的模板,以产生确定长度的复制链。

[0220] 由于两条互补链通常比探针或引物长,这两条链具有更多的接触点,因此在给定时间里相互结合的机会更大。因此,通常采用高摩尔过量的探针和引物,以使引物和探针退火超过模板链退火。在多重模式中,在单个反应容器中通常使用多个探针,以同时检测多个靶标核酸。

[0221] 引物通常有足够的长度和互补性,使得它们能在选定条件下选择性结合靶标核酸,以让不依赖于聚合的切割或依赖于聚合的切割进行下去。引物的确切长度和组成要取决于许多因素,包括退火反应的温度、引物的来源和组成、探针退火位点与引物退火位点的接近程度和引物:探针浓度比。例如,取决于靶标序列的复杂程度,引物通常包括约 15-30 个核苷酸,不过它也可含有更多或更少的核苷酸。

[0222] 探针通常先与其互补靶标核酸退火,然后核酸聚合酶再遇到靶标核酸的这个区域,从而让该酶的 5' -3' 核酸酶活性从探针切割片段。为提高探针在聚合酶达到这一杂交区域之前会与靶标核酸退火的可能性,有多种技术可以采用。例如,短的引物通常需要较低的温度就能与核酸形成足够稳定的杂交复合物。因此,可将探针设计成比引物长,使得探针在相对于引物退火的较高温度下优先与靶标核酸退火。进一步举例而言,可将探针的核苷酸组成选择成具有较大的 G/C 含量,并因此比引物具有更大的热稳定性。任选地,可将修饰核苷酸掺入到引物或探针中,以实现相比于只具有未修饰核苷酸的引物或探针更大或更小的热稳定性。示例性的修饰核苷酸在上文作了进一步的描述。还可改变热循环参数,以利用到探针和引物的差异热稳定性。例如,在热循环变性步骤之后,可引入能让探针结合发生但不能让引物结合发生的中间温度。之后,还可进一步降低温度,以让引物退火发生。为使探针结合优先于引物结合,还可采用相比于引物浓度高摩尔过量的探针。这种探针浓度通常比各个引物浓度高约 2 至约 20 倍的范围,通常为约 $0.5-5 \times 10^{-7} \text{M}$ 。

[0223] 引物的模板依赖性延伸通常由催化核苷酸掺入的生物催化剂 (例如聚合酶) 在足量的四种脱氧核糖核苷三磷酸 (dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP) 或类似物的存在下,在另外还包括适当的盐、金属阳离子和缓冲液的反应混合物中催化。反应混合物在上文作了进一步的描述。合适的催化核苷酸掺入的生物催化剂是已知能催化引物和模板依赖性 DNA 合成和具有 5' -3' 核酸酶活性的酶。示例性的这种类型的 DNA 聚合酶包括大肠杆菌 DNA 聚合酶 I、Tth DNA 聚合酶、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合

酶、栖热菌 (*Thermus* sp.) Z05 DNA 聚合酶、海栖热袍菌 (*Thermatoga maritima*) DNA 聚合酶、那不勒斯吸热袍菌 (*Thermatoga neopolitana*) DNA 聚合酶和非洲栖热腔菌 (*Thermosipho africanus*) DNA 聚合酶。用这些 DNA 聚合酶催化 DNA 合成所需的反应条件是本领域公知的。通常,催化核苷酸掺入的生物催化剂能有效地切割探针而释放出标记片段,使得可检测信号得以直接或间接产生。

[0224] 合成的产物通常是包括模板链和引物延伸链的双链体分子。这一合成的副产物是探针片段,其可包括单核苷酸片段、二核苷酸片段和更大核苷酸片段的混合物。变性、探针和引物退火及引物延伸和探针切割的重复循环,导致引物所界定的区域的指数式积累和标记片段的指数式产生。运行足够的循环,以获得可检测量的探针片段,该可检测量通常比背景信号大几个数量级。相对于不减少这些背景信号的测定,本文所述供体部分的使用能有效地减少可检测信号产生前的循环运行次数。

[0225] 在某些实施方案中,PCR 反应作为采用热稳定酶的自动过程来进行。在这个过程中,反应混合物循环进行变性步骤、探针和引物退火步骤及合成步骤,其中切割和置换与引物依赖性模板延伸同时进行。在一些实施方案中,本文所述的方法用系统来进行。这种系统在下文中作更详细的描述。任选地,可采用被设计成与热稳定酶一起使用的热循环仪,如可例如从 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) 市售获得的热循环仪。

[0226] 热稳定聚合酶通常用于自动过程中,该自动过程通过在 PCR 循环中使双链延伸产物暴露于高温(例如约 95°C)而实现它们的变性。例如在 Gelfand 等的美国专利 4,889,818,标题“PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME”,1989 年 12 月 26 日授权中,公开了从 *Thermus aquaticus* 分离的代表性热稳定酶。另外的代表性热稳定聚合酶包括例如从以下热稳定细菌提取的聚合酶:*Thermus flavus*、红色栖热菌 (*Thermus ruber*)、嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*)、脂肪嗜热芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) (其最佳温度比其它所列的稍低)、*Thermus lacteus*、*Thermus rubens*、海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)、那不勒斯吸热袍菌 (*Thermatoga neopolitana*)、非洲栖热腔菌 (*Thermosipho africanus*)、*Thermococcus littoralis* 和 炽热甲烷嗜热菌 (*Methanothermobacter fervidus*)。

[0227] 探针与靶标核酸的杂交可通过选择适当的杂交条件来实现。通常将探针:靶标核酸杂交体的稳定性选定成与测定和洗涤条件相符合,使得稳定的可检测杂交体只在探针和靶标核酸之间形成。对不同测定参数中的一个或多个的操纵,决定着特定杂交测定的确切灵敏度和特异性。

[0228] 更具体的说,核酸(例如 DNA、RNA、PNA 或它们的组合)的互补碱基之间的杂交,会在多种多样的条件下发生,所述条件在温度、盐浓度、静电强度和缓冲液组成方面各不相同。这些条件和它们的应用方法的实例描述于例如 Tiissen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, 第 24 卷, Elsevier Science (1993) 及 Hames 和 Higgins, 出处同上。取决于待杂交的序列的性质及其长度,杂交通常在约 0°C 至约 70°C 之间进行约 1 分钟至约 1 小时的时间。但是,应认识到视反应的条件而定,杂交可在数秒钟或数小时内发生。举例而言,两个 20-mer 序列的混合物的典型杂交条件是,将混合物升温至 68°C,然后冷却至室温 (22°C) 保持 5 分钟,或者在非常低的温度如 2°C。核酸之间的杂交可用缓冲液如 Tris-EDTA (TE)、Tris-HCl 和 HEPES、盐溶液 (e. g. NaCl、KCl、MgCl₂) 或者其它水溶液、试剂和化学物质来促

进。这些试剂的实例包括单链结合蛋白如 Rec A 蛋白、T4 基因 32 蛋白、大肠杆菌单链结合蛋白和核酸大沟和小沟结合蛋白。这种试剂和化学物质的其它实例包括二价离子、多价离子和嵌入物质 (intercalating substance) 如溴化乙锭、放线菌素 D、补骨脂素和当归素。

[0229] 几乎任何可供检测靶标核酸的方法都可用于本发明。常用的方法包括用 5'-核酸酶探针、杂交探针或发夹探针 (例如分子信标) 进行的实时扩增检测, 在例如扩增产物与未掺入的标记进行了电泳分离后对掺入到扩增引物或被扩增核酸本身的标记的检测, 基于杂交的测定 (例如基于阵列的测定) 和 / 或对结合核苷酸的二级试剂 (secondary reagent) 的检测。这些一般方法还描述于例如 Sambrook 及 Ausubel 1 和 2, 出处同上。

[0230] 发夹探针如分子信标是设计来进行靶标核酸的实时检测和定量的寡核苷酸。发夹探针的 5' 和 3' 末端通常包含能赋予探针的可检测特性的标记部分。在示例性的实施方案中, 所述末端之一连接到基本上非荧光供体部分和连接到接纳体部分 (例如荧光染料), 另一末端连接到能够猝灭来自接纳体部分的荧光发射的猝灭剂部分。当发夹探针在溶液中游离存在时, 即不与第二核酸杂交时, 探针的茎区通过互补碱基配对得以稳定化。这一自身互补配对导致产生探针“发夹环”结构, 在该结构中接纳体部分和猝灭剂部分相互接近。在这个构象中, 猝灭剂部分会将接纳体部分猝灭。发夹探针的环通常包含与靶标核酸中的待测序列互补的序列, 使得该环与其在靶标中的互补序列的杂交迫使茎区发生解离, 从而使接纳体部分和猝灭剂部分相互远离开来。这使得接纳体部分不被猝灭, 造成来自发夹探针的荧光增加。

[0231] 进一步举例而言, 图 3 示出了包括基本上非荧光供体部分 (D) 302、接纳体部分 (A) 304 和猝灭剂部分 (Q) 306 的发夹探针 300。如图所示, 当发夹探针 300 游离在溶液中时, 猝灭剂部分 (Q) 306 会猝灭来自接纳体部分 (A) 304 的荧光发射, 而当发夹探针 300 与靶标核酸 308 杂交时则不会。在另一个代表性的实施方案中, 发夹探针只包括基本上非荧光供体部分和接纳体部分。在这些实施方案中, 当探针因其构象变化与靶标核酸杂交时, 来自接纳体部分的荧光的强度通常会降低。

[0232] 有关制备和使用发夹探针的标准方法的细节通常是本领域技术人员公知的, 还描述于例如以下文献中: Leone 等, (1995) “Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA (分子信标探针结合 NASBA 扩增能够进行 RNA 的同源实时检测)”, *Nucleic Acids Res.* 26: 2150-2155, Kostrikis 等, (1998) “Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles (分子信标: 人等位基因的光谱基因型分型)”, *Science* 279: 1228-1229, Fang 等, (1999) “Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies (设计新型分子信标用于表面固定化的 DNA 杂交研究)”, *J. Am. Chem. Soc.* 121: 2921-2922 和 Marras 等, (1999) “Multiplex detection of single-nucleotide variation using molecular beacons (使用分子信标进行单核苷酸变异的多重检测)”, *Genet. Anal. Biomol. Eng.* 14: 151-156。有多个商业供应商生产可适用于本文所述方法的标准和定制发夹探针, 包括 Oswel Research Products Ltd. (UK)、Research Genetics (Invitrogen, Huntsville, AL, USA 的一个部门) 和 Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, USA)。有多种采用发夹探针的试剂盒也可市售获得, 例如 Stratagene (La Jolla, CA, USA) 的 Sentinel™ Molecular Beacon Allelic Discrimination

Kits 以及 Eurogentec SA(比利时)和 Isogen BioscienceBV(荷兰)的各种试剂盒。这些试剂盒也任选适用于本文描述的方法。

[0233] 杂交探针通常成对发挥作用,可用来实现各种类型的实时靶标核酸检测,包括定量、突变检测、解链温度 (T_m) 多路复用技术 (multiplexing) 和比色多路复用技术 (color multiplexing)。某些杂交探针测定的各方面情况还描述于例如 Brega 等, (2004) “Real-time PCR for dihydrofolatereductase gene single-nucleotide polymorphisms in Plasmodium vivaxisolates(用于检测间日疟原虫分离物中的二氢叶酸还原酶基因单核苷酸多态性的实时 PCR)”, Antimicrob Agents Chemother. 48(7) : 2581-2587, Perelle 等, (2004) “A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*(用于检测食品传染嗜热性弯曲杆菌属的 LightCycler 实时 PCR 杂交探针测定)”, Mol Cell Probes. 18(5) : 321-327 和 Whiley 等, (2003) “Detection of *Neisseria Meningitidis* in clinical samples by aduplex real-time PCR targeting the *porA* and *ctrA* genes(通过靶向 *porA* 和 *ctrA* 基因的双重实时 PCR 检测临床样品中的脑膜炎奈瑟菌)”, MolDiagn. 7(3-4) : 141-145。

[0234] 杂交探针测定通常包括将一对标记探针与靶标或模板核酸进行杂交,使它们相互足够接近以使能量转移在各标记部分之间发生。更具体的说,杂交探针对中的一个杂交探针 (“供体探针”) 通常包括至少一个基本上非荧光供体部分 (例如 5- 或 6- 羧基 DmF), 而另一个杂交探针 (“接纳体探针”) 则包括至少一个接纳体部分 (例如 LC-Red 610、LC-Red 640、LC-Red 670、LC-Red 705、JA-270、CY5 或 CY5.5)。进一步举例而言,图 4 示出当具有基本上非荧光供体部分 (D) 402 的供体探针 400 和具有接纳体部分 (A) 406 的接纳体探针 404 游离在溶液中时,非荧光激发能量不从基本上非荧光供体部分 (D) 402 转移到接纳体部分 (A) 406。相反,当供体探针 400 和接纳体探针 404 均与靶标或模板核酸 408 杂交时,接纳体部分 (A) 406 接受了从基本上非荧光供体部分 (D) 402 转移来的非荧光激发能量并作出响应而发出荧光,该 402 是在靶标或模板核酸 408 上与该 406 足够接近。在另一个示例性的实施方案中,杂交探针对中的一个杂交探针同时包括基本上非荧光供体部分和接纳体部分,而另一个杂交探针包括猝灭剂部分。在这个实施方案中,当探针对与靶标核酸杂交时,来自接纳体部分的可检测荧光发射减少,引物猝灭剂部分将荧光猝灭了。杂交探针的接纳体部分所发射的荧光可用各种已知方法检测,包括采用 LightCycler® 系统 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA) 的那些方法。

[0235] 在其它例证性的使用本文所述生物分子的实施方案中,标记引物用以实现实时靶标核酸检测。例如,图 5 示出包括基本上非荧光供体部分 (D) 502、接纳体部分 (A) 504 和猝灭剂部分 (Q) 506 的引物 500。在引物延伸前,引物 500 形成发夹环结构,使得猝灭剂部分 (Q) 506 将接纳体部分 (A) 504 所发射的荧光猝灭掉。引物 500 延伸时 (结合到模板核酸 508),发夹环结构解离并与新形成的互补序列杂交,使接纳体部分 (A) 504 与猝灭剂部分 (Q) 506 分离,使得来自接纳体部分 (A) 504 的荧光发射能被检测。在其它实施方案中,引物只包含基本上非荧光供体部分和接纳体部分。可适用于本发明生物分子的基于引物的实时靶标核酸检测方法还描述于例如 Huang 等, (2004) “Real-time quantitative assay of telomerase activity using the duplex scorpion primer(使用双链蝎引物实时定量测定端粒酶活性)”, Biotechnol Lett. 26(11) : 891-895, Asselbergs 等, (2003) “Rapid

detection of apoptosis through real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction measurement of the small cytoplasmic RNA Y1 (通过小胞质 RNA Y1 的实时反转录酶聚合酶链式反应测量快速检测细胞凋亡)”, AnalBiochem. 318(2):221-229 和 Nuovo 等, (1999) “In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers (使用通用能量转移标记引物进行原位扩增)”, J Histochem Cytochem. 47(3):273-280。

[0236] 本文描述的生物分子的某些实施方案的另一个示例性应用是用于核酸测序。一般来说,核酸测序方案涉及引物核酸的延伸/终止反应。反应混合物中通常包括脱氧核苷三磷酸(dNTP)和聚合酶,它们用以延伸引物。另外,反应混合物中还包括至少一个二脱氧核苷三磷酸(ddNTP)或其它终止核苷酸,其当掺入到延伸的引物上时可防止引物的进一步延伸。在延伸反应终止后,可所形成的不同终止产物进行分离和分析,以确定靶标核酸的碱基序列。

[0237] 核酸测序通常分成以下两类:“染料引物测序”和“染料终止子测序”。在染料引物测序中,将荧光染料(例如成一对的本文所述接纳体部分和基本上非荧光供体部分)掺入到正被延伸的引物上。然后平行运行四个单独的延伸/终止反应,每个延伸反应含有不同的终止核苷酸以终止延伸反应。终止后,通常将反应产物进行凝胶电泳分离并进行分析(Ansorge 等, (1987) Nucleic Acids Res. 15:4593-4602)。

[0238] 在染料引物测序的一个变化方案中,在四个单独的延伸/终止反应中使用不同的引物,每个引物含有不同的可光谱拆分染料。终止后,通常将四个延伸/终止反应的反应产物集中、进行电泳分离并在单一泳道中检测(Smith 等, (1986) Nature 321:674-679)。因此,在这个染料引物测序的变化方案中,通过使用含有一套可光谱拆分染料的引物,可同时检测得自一个以上的延伸/终止反应的产物。

[0239] 在染料终止子测序中,将荧光染料(例如成一对的本文所述接纳体部分和基本上非荧光供体部分)连接到每一种终止核苷酸(例如 2'-终止子或二脱氧核苷三磷酸)。然后进行延伸/终止反应,反应中用脱氧核苷三磷酸来延伸引物,直到标记的终止核苷酸被掺入到延伸的引物中,防止引物的进一步延伸。反应一旦终止,对每一种终止核苷酸的反应产物进行分离和检测。在一个实施方案中,对四种终止核苷酸的每一种进行单独的延伸/终止反应。在另一个实施方案中,进行单一的延伸/终止反应,该反应中含有四种终止核苷酸,每种终止核苷酸标记上不同的本文所述可光谱拆分荧光染料。

[0240] 因此,根据本发明的一个方面,提供了用本发明的一种或多种寡核苷酸试剂进行染料引物测序的方法。根据这个方法,通过将靶标核酸与标记引物在脱氧核苷三磷酸、至少一种终止核苷酸和聚合酶的存在下进行杂交,形成延伸的标记引物的混合物。标记引物包括与正进行测序的靶标核酸序列的一部分互补的寡核苷酸序列,和连接到该寡核苷酸的能转移荧光染料(例如成一对的本文所述接纳体部分和基本上非荧光供体部分)。

[0241] 根据这个示例性的方法,聚合酶以脱氧核苷三磷酸延伸引物,直到掺入了能终止引物的延伸的终止核苷酸。终止后,通常将混合物中的延伸引物进行分离(例如电泳和/或层析分离)。然后通过检测延伸引物来确定靶标核酸的序列。

[0242] 在这个方法的另一个示例性实施方案中,运行四个染料引物测序反应,每个引物测序反应包括不同地进行标记的引物和不同的终止核苷酸(例如 ddATP、ddCTP、ddGTP 和

ddTTP)。运行了四个染料引物测序反应后,可将所得的延伸引物的混合物集中。然后可将混合物中的延伸引物进行分离,并检测来自四种不同地进行标记的引物中的每一种的荧光信号,以确定靶标核酸的序列。

[0243] 根据本发明的另一个实施方案,提供了用一个或多个标记上本发明的能量转移染料(例如成一对的本文所述接纳体部分和基本上非荧光供体部分)的终止核苷酸(例如2'-终止核苷酸或二脱氧核苷三磷酸)进行染料终止子测序的方法。根据这个方法,通过将靶标核酸与引物在脱氧核苷三磷酸、至少一种标记终止核苷酸和聚合酶的存在下进行杂交,形成延伸引物的混合物。在这个方法的一些实施方案中,形成延伸引物的混合物的步骤包括将靶标核酸与四种不同地进行标记的终止核苷酸进行杂交。聚合酶以脱氧核苷三磷酸延伸引物,直到标记终止核苷酸掺入到延伸引物中为止。终止后,通常将混合物中的延伸引物进行分离。然后通过检测来自掺入到延伸引物中的标记终止核苷酸的荧光,确定靶标核酸的序列。

[0244] 本发明生物分子的一个示例性用途包括蛋白质的分析。例如,图6示出了可用来评估对蛋白质切割的响应的测定。如图所示,蛋白质600的某些氨基酸602包括基本上非荧光供体部分(D)604、接纳体部分(A)606或猝灭剂部分(Q)608。在切割(例如通过蛋白酶切割和/或化学切割)之前,猝灭剂部分(Q)608将来自接纳体部分(A)606的荧光发射猝灭,该606接受从基本上非荧光供体部分(D)604转移来的激发能量。在切割之后,猝灭剂部分(Q)608不再猝灭这一荧光,而这一荧光可通过本领域技术人员公知的多种方法进行检测。在这个方法的示例性变化方案中,蛋白质只标记上基本上非荧光供体部分和接纳体部分,使得在切割时从接纳体部分发射出的荧光的强度降低。可适用于本发明生物分子的蛋白酶切割测定的各方面情况还描述于例如Jenny等,(2003)“A critical review of the methods for cleavage of fusionproteins with thrombin and factor Xa(关于用凝血酶和Xa因子切割融合蛋白的方法的评论)”,*Protein Expr Purif.* 31(1):1-11和Funovics等,(2003)“Protease sensors for bioimaging(生物显像用蛋白酶传感器)”,*Anal Bioanal Chem.* 377(6):956-963。

[0245] 其它代表性的可用本发明某些生物分子进行的亲近测定包括基于能量转移的脂质混合测定。举例而言,图7示出了根据本发明一个实施方案的脂质混合测定中进行的某些步骤。如图所示,标记的膜700包括供体脂质702和接纳体脂质706,该702包括基本上非荧光供体部分(D)704,该706包括接纳体部分(A)708。在将标记的膜700与未标记的膜710进行融合之前,接纳体部分(A)708吸收了从基本上非荧光供体部分(D)704转移来的激发能量并作出响应而发出荧光,该704与标记的700中的接纳体部分(A)708足够接近。一旦随着供体脂质702和接纳体脂质706之间的距离增加两膜发生融合,这一荧光即降低。

[0246] 检测这些和其它的亲近测定中来自接纳体部分的荧光的方法是本领域技术人员公知的。某些这些检测方法和相关的包括光电倍增管或电荷耦合装置的使用的系统,在下文中作进一步的描述。

[0247] 在其它代表性的实施方案中,本发明提供开展涉及本文所述生物分子的生意的方法。例如,图8这个框图显示了在根据本发明一个实施方案的商业方法中进行的某些步骤。如步骤800中所示,该方法包括接收来自客户的订购至少一种本文所述生物分子的订购单。另外,该方法还包括按照该订购单将该生物分子供应给客户(步骤802)。例如在一些

实施方案中,商业实体通过客户或其代理人的直接递交,通过邮政或其它递送服务(例如普通邮递员),通过电话通讯,通过电子邮件通讯或别的电子媒体,或者任何其它合适的方法,来接收定购单。在一些实施方案中,所定购和/或供应的生物分子包括在本文所述的试剂盒中。此外,生物分子通过任何合适的方法供应或提供给客户(例如换取某种形式的付款),所述方法包括通过客户或其代理人的直接递交、通过邮政或其它递送服务如普通邮递员。

[0248] VII. 系统

[0249] 本发明还提供用以检测接纳体部分响应从基本上非荧光供体部分转移来的非荧光能量而发出的能量发射的系统。这些系统可用来执行许多不同的测定,包括本文提到的亲近测定。这些系统包括一个或多个至少标记上一个或多个基本上非荧光供体部分的生物分子。在某些实施方案中,生物分子被排列在固相载体上,而在其它实施方案中,它们在一个或多个容器中提供,例如对于在溶液中进行的测定。这些系统还包括辐射源和至少一个检测器或检测器件(例如分光计),该检测器或检测器件能至少检测当接纳体部分与基本上非荧光供体部分足够接近时从接纳体部分发射出的能量。另外,这些系统还任选包括至少一个热调节器(例如热循环装置)和/或至少一个流体转移器件(例如自动移液器),该热调节器可操作性地连接到容器或固相载体,以调节容器中或固相载体上的温度,该流体转移器件能将流体转移到和/或移出容器或固相载体,例如以在容器中或在固相载体上进行一个或多个亲近测定。

[0250] 检测器通常构造成能检测例如在给定测定系统的另一器件中或接近该器件处(例如在容器中和/或固相载体上)所产生的可检测信号。任选用于或适用于本发明的合适信号检测器能检测例如荧光、磷光、放射性、吸光度、折光指数、发光或质量。检测器任选监测来自例如所执行的给定测定步骤的上游和/或下游的一个或多个信号。例如,检测器任选监测在位置上对应于“实时”结果的多个光学信号。检测器或传感器的实例包括光电倍增管、CCD阵列、光学传感器、温度传感器、压力传感器、pH传感器、电导传感器或扫描检测器。任选用于执行本发明方法的更具体的示例性检测器包括例如共振光散射检测器、发射分光镜、荧光分光镜、磷光分光镜、发光分光镜、分光光度计和光度计。检测器在例如以下文献中也有描述:Skoog等,Principles of Instrumental Analysis,第5版,Harcourt Brace College Publishers(1998),Currell,Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality,John Wiley & Sons, Inc. (2000),Sharma等,Introduction to Fluorescence Spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc. (1999),Valeur,Molecular Fluorescence: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Inc. (2002) 和Gore,Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach,第2版,Oxford University Press(2000)。

[0251] 本发明的系统通常还包括可操作性地连接到系统的一个或多个器件(例如检测器、热调节器和/或流体转移器件)以控制各器件的操作的控制器。更具体的说,控制器通常作为单独式或内装式系统器件而包括在系统中,用来例如接收来自检测器的数据,实现和/或调节容器中的温度,实现和/或调节流体流向或流出选定的容器。控制器和/或其它系统器件任选与适当编程的处理器、计算机、数字装置、信息器具或其它逻辑装置(例如按需包括模拟-数字或数字-模拟转换器)偶联,所述处理器、计算机、数字装置、信息器具

或其它逻辑装置的作用是指导这些器件按照预编程的或用户输入的指令进行运作,接收来自这些器件的数据和信息,以及将这一信息解析、操纵和报道给用户。合适的控制器是本领域公知的,可获自多个商业来源。

[0252] 任何控制器或计算机任选包括监视器,其往往是阴极射线管(“CRT”)显示器、平板显示器(例如有源矩阵液晶显示器或液晶显示器)或其它的显示器。计算机线路往往放在箱子中,该箱子包括众多集成电路芯片,如微处理器、存储器、接口电路和其它电路芯片。该箱子还任选包括硬盘驱动器、软盘驱动器、大容量可移动驱动器如可写 CD-ROM 和其它通用的外围组件。输入装置如键盘或鼠标任选为用户提供输入操作。这些器件在下文中作进一步说明。

[0253] 计算机通常包括用以接收用户指令的适当软件,所述指令为向一组参数字段中输入的用户输入的形式(例如在 GUI 中),或者为预编程指令的形式(例如为多种不同的具体操作预编程)。软件然后将这些指令转换成指导一个或多个控制器的操作的适当语言,以执行所需的操作。计算机然后接收来自例如系统中所包括的传感器/检测器的数据并解析该数据,以用户可理解的形式提供,或者使用该数据按照编程程序引发更多的控制器指令,例如以响应从称重仪接收的流体重量数据来控制流体流动调节器。

[0254] 图 9 这个示意图显示了代表性的包括逻辑装置的系统,在该系统中可体现本发明的各个方面。本领域技术人员从本文提供的教导可以认识到,本发明任选在硬件和/或软件中执行。在一些实施方案中,本发明的不同方面在客户端逻辑电路或服务器端逻辑电路中执行。本领域会认识到,本发明或其器件可体现在含有逻辑指令和/或数据的媒体程序组件(media program component)(例如固定媒体组件(fixed mediacomponent)),该逻辑指令和/或数据当装入适当设置的计算机装置时会促使该装置按要求执行。本领域还会认识到,可将含有逻辑指令的固定媒体递送到固定媒体的观测者,以便物理上装入观测者的计算机,或者可将含有逻辑指令的固定媒体贮存在远程服务器上,观测者通过通讯媒介访问该服务器以下载程序组件。

[0255] 更具体的说,图 9 示出了计算机 900,检测器 902(例如分光计如分光荧光计)、流体转移器件 904 和热调节器 908 可操作性地连接到该计算机。任选地,这些器件中的一个或多个通过服务器(图 9 中未显示)可操作性地连接到计算机 900。在操作过程中,流体转移器件 904 通常将反应混合物或其成分转移到多孔容器 906。热调节(例如热循环)通常通过与多孔容器 906 发生热传送的热调节器 908 实现。检测器 902 通常检测在给定的亲近测定在该系统中进行之前、进行过程中和/或进行之后所产生的可检测信号(例如荧光发射)。本领域技术人员会认识到,图 9 中示出的该系统的一个或多个器件任选制作成相互成为一个整体(例如在同一箱体中)。

[0256] VIII. 试剂盒

[0257] 本发明方法中所采用的反应混合物或其成分(例如生物分子)任选包装在试剂盒中。在某些实施方案中,试剂盒中所包括的不同生物分子标记上可光谱拆分的接纳体部分,例如以使用这些试剂盒来执行某些多重复用应用(multiplexing application)。在这些试剂盒的一些实施方案中,只包括一种类型的合适基本上非荧光供体部分,使得只需单一能源来激发不同的接纳体部分中的每一个。

[0258] 另外,试剂盒还可包括用以执行生物聚合物合成、核酸测序反应、核酸扩增或其它

亲近测定的实时监测的适当包装的试剂和材料,如缓冲液、酶、标准品或对照品、盐、金属离子、引物、探针、可延伸核苷酸、终止核苷酸、甘油、二甲亚砜和 / 或 poly rA,以及关于执行具体的过程或测定的说明。在一些这些实施方案中,试剂盒还包括至少一种例如用于使焦磷酸解作用减至最低的焦磷酸酶(例如热稳定焦磷酸酶),和 / 或例如用于需要防止发生遗留污染的应用的尿嘧啶 N-糖基化酶(UNG)及任选的 dUTP。试剂盒各成分如生物分子通常在一个或多个容器中提供。

[0259] 进一步举例而言,本发明的试剂盒包括许多不同的执行多种测定和 / 或合成反应的实施方案。一些这些应用在上文也作了描述。例如在一些实施方案中,试剂盒包括按本文所述进行标记的免疫球蛋白和有关检测免疫球蛋白与靶标表位的结合(作为给定的免疫测定的一部分)的说明。任选地,试剂盒包括标记的脂质和有关使用脂质来进行特定的亲近测定如膜融合测定的说明。在某些实施方案中,试剂盒包括引物和有关例如在核酸测序反应或核酸扩增反应中延伸该引物的说明。在这些实施方案中,引物和 / 或任选包括的可延伸核苷酸、终止核苷酸(例如二脱氧胞苷三磷酸、二脱氧腺苷三磷酸、二脱氧鸟苷三磷酸和二脱氧胸苷三磷酸)和 / 或探针(例如杂交探针、5'-核酸酶探针和发夹探针),通常按本文所述进行标记。在一些其它的示例性实施方案中,试剂盒包括生物聚合物合成试剂(例如多肽合成试剂或核酸合成试剂)和有关用这些试剂合成生物聚合物的说明。

[0260] IX. 实施例

[0261] 应认识到,本文所述的各实施例和实施方案只出于说明的目的,并不意在限制提出权利要求的本发明的范围。还应认识到,本领域技术人员根据本文所述的各实施例和实施方案可想到各种修改或变化方案,这些修改或变化方案也包括在本申请的精神和界限内及所附权利要求书的范围内。

[0262] 实施例 I :检测出的荧光的比较

[0263] 本实施例显示从不同样品中的标记上荧光部分的寡核苷酸和标记上基本上非荧光供体部分的寡核苷酸分别检测出的荧光发射。具体的说,图 10 是从对标记上 6-羧基荧光素(6-FAM)、4',5'-二甲氧基-5-羧基荧光素(5-DmF)或 4',5'-二甲氧基-6-羧基荧光素(6-DmF)的寡核苷酸的激发和发射扫描获得的重叠光谱的坐标图。图 10 中所示坐标图的纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长(nm)。如图所示,在 515nm 处获得的 6-FAM 标记寡核苷酸的激发扫描的曲线以“6-FAM ex”标示,而在 493nm 处获得的 6-FAM 标记寡核苷酸的发射扫描的曲线以“6-FAM em”标示。在 545nm 处获得的 5-DmF 标记寡核苷酸的激发扫描的曲线以“5-DmF ex”标示,而在 520nm 处获得的 5-DmF 标记寡核苷酸的发射扫描的曲线以“5-DmF em”标示。在 545nm 处获得的 6-DmF 标记寡核苷酸的激发扫描的曲线以“6-DmF ex”标示,而在 520nm 处获得的 6-DmF 标记寡核苷酸的发射扫描的曲线以“6-DmF em”标示。进一步举例而言,图 11 是图 10 所示坐标图的细节摘选图,显示了分别从 5-DmF 和 6-DmF 标记寡核苷酸的激发和发射扫描获得的重叠光谱。各个扫描样品的每一个中的标记核苷酸的浓度为 0.15 μ M。

[0264] 实施例 II :生物聚合物合成试剂的合成

[0265] 本实施例描述包含基本上非荧光供体部分的生物聚合物合成试剂的代表性合成途径。具体的说,根据本发明的一个实施方案,在本实施例中描述 5-和 6-二甲氧基荧光素-DMT-CX-接头-亚磷酸胺的合成方案。作为一览图,图 12 图示说明了这个合成方案中

的某些步骤。

[0266] 5-和 6-二甲氧基荧光素 (DmF) 异构体的合成

[0267] DmF 的合成按照以下专利的程序进行:Khanna 等的美国专利 4,318,846,标题“NOVEL ETHER SUBSTITUTED FLUORESCENCE POLYAMINO ACID COMPOUNDS AS FLUORESCERS AND QUENCHERS (作为荧光剂和猝灭剂的新型醚取代荧光素聚氨基酸化合物)”,1982 年 3 月 9 日授权。后处理后,将产物进行柱层析纯化。如图 13 所示(纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟)),纯化的 DmF 的 HPLC 分析显示了由位置异构体产生的两个峰,这是所预期到的。这些位置异构体归属为 5-DmF 和 6-DmF。此外,这些化合物的特性(identity)由质谱数据确证。

[0268] 5-和 6-DmF 异构体的新戊酰化(pivalation)

[0269] 向 DmF (200mg, 0.46mmol) 的吡啶 (5ml) 溶液加入 N,N-二异丙基乙胺 (3.0ml)。然后,将反应混合物在用冰预冷的水浴中冷却 20 分钟。向此反应混合物以滴加方式加入新戊酰氯 (500mg, 4.15mmol)。加入后,将反应混合物在冷却条件下再搅拌 15 分钟。然后移去冷却浴,将反应混合物在室温下搅拌过夜。减压除去溶剂,然后进行柱层析纯化。参见图 14,该图是显示新戊酰 5-DmF 和新戊酰 6-DmF 的检测的 HPLC 迹线(纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟))。这些化合物的特性由质谱分析确证。

[0270] 新戊酰基-5-和-6-DmF-DMT-CX-接头

[0271] 在冷却条件下,向新戊酰基 DmF (220mg) 和 DMT-CX-接头 (195mg, 在 Roche, Penzberg 制备) 于 DMSO (2ml)、二甲基甲酰胺 (3ml) 中的溶液加入 HBTU (3ml)。大约 5 分钟后,加入二异丙基乙胺 (0.4ml),继续在冷却条件下搅拌 3 小时 (0-5°C, 浴温)。如图 15 (纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟)) 所示,在 3 小时后没有观察到原料。将反应混合物中的溶剂 (DMF 和 DMSO) 在高真空下除去。产物进行柱层析纯化(参见图 16 的 HPLC 层析图(纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟))),并由质谱分析进行确证。分离收率为 84% (320mg)。

[0272] 5-和 6-DmF-DMT-CX-接头-亚磷酰胺

[0273] 在室温下向新戊酰基-DmF-DMT-CX-接头 (100mg, 0.095mmol) 的二氯甲烷 (6ml) 溶液加入二异丙基乙胺 (300mg, 0.84mmol), 所得反应混合物在用冰预冷的水中冷却至 5°C (浴温)。向反应混合物加入氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺试剂 (28mg, 0.12mmol), 在 5°C 下继续搅拌。1 小时后,再加入氰基乙基二异丙基氯代亚磷酰胺试剂 (28mg, 0.12mmol), 将反应混合物在 0°C 下再放置 16 小时。图 17 是显示这一 16 小时时间后的产物的检测的 HPLC 迹线。如图 18 (纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟)) 所示,18 小时后的反应混合物 HPLC 分析显示没有原料存在,在 28 分钟出现新的峰。将产物进行快速柱层析纯化(分离收率 100mg, 80%),并由质谱分析和 ³¹P NMR 分析(参见图 19)加以确证。

[0274] 二甲氧基荧光素异构体的层析分离

[0275] 图 20 示出了用以将 5-和 6-二甲氧基荧光素异构体相互分离的纯化方案中的某些步骤。更具体的说,DmF 异构体的分离是用 Biotage C-18 柱和 0.1M TEAA-乙腈作为洗脱缓冲液进行快速柱层析来实现的。图 21 和 22 分别是显示 5-DmF 和 6-DmF 的检测的层析图(纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟))。将对应于 5-DmF 的各流分 and 对应于 6-DmF 的各流分分别集中,然后冻干。这些异构体由 ¹H NMR 数据进行进一步确证

[(5-DmF 的 NMR 数据: δ 8.34 (1H, s, Ar), 8.25 (1H, d, Ar), 7.24 (1H, d, Ar), 6.63 (2H, d, Ar), 6.30 (2H, d, Ar), 3.95 (6H, s, OMe)) 和 6-DmF 的 NMR 数据: δ 8.13 (1H, d, Ar), 7.89 (1H, d, Ar), 7.56 (1H, s, Ar), 6.63 (2H, d, Ar), 6.29 (2H, d, Ar), 3.95 (6H, s, OMe)]。

[0276] 6-二甲氧基荧光素-DMT-CX-接头-亚磷酰胺的合成

[0277] 6-DmF-DMT-CX-接头-亚磷酰胺的合成方法与上述的 5-和 6-DmF-DMT-CX-接头-亚磷酰胺的合成方法相同。具体的说,图 23 示出了这个合成方案中的某些步骤。另外,图 24-26 分别是显示新戊酰化 6-DmF、6-DmF-CX-接头和 6-DmF-CX-接头-亚磷酰胺的检测的 HPLC 迹线(纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟))。

[0278] 5-二甲氧基荧光素-DMT-CX-接头-亚磷酰胺的合成

[0279] 5-DmF-DMT-CX-接头-亚磷酰胺的合成方法与上述的 5-和 6-DmF-DMT-CX-接头-亚磷酰胺的合成方法相同。具体的说,图 27 示出了这个合成方案中的某些步骤。另外,图 28 和 29 分别是显示新戊酰化 5-DmF 和 6-DmF-CX-接头的检测的 HPLC 迹线(纵坐标代表吸光度单位,横坐标代表保留时间(分钟))。

[0280] 实施例 III:杂交探针测定

[0281] 染料二甲氧基荧光素(DmF)的亚磷酰胺按实施例 II 的描述进行合成并在 3'-末端掺入到寡核苷酸。将这一寡核苷酸或供体探针随同标记上 LightCycler® Red 640 (LC-Red 640) 的接纳体探针一起与靶标寡核苷酸杂交。连同对照实验一起进行荧光测量,对照实验中研究的是类似的 6-羧基荧光素(6-FAM)供体探针。结果显示具有 DmF 的供体探针没有可检测荧光。具体的说,当进行激发扫描时,在扫描 400-630nm 的激发波长的同时观察接纳体探针的 LC-Red 640 染料的荧光发射(640nm 处),结果在大约 520nm 处观察到激发峰,该峰与 DmF 染料的最大吸光度相重合。这提示基本上非荧光 DmF 将吸收的光作为非荧光能量转移到 LC-Red 640。对于 DmF 染料的异构体中的一个(即 5-DmF),新激发峰的强度约为 6-FAM 的一半。图 30 显示了从这些激发扫描获得的重叠光谱的曲线,其中坐标图的纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长(nm)。如图所示,涉及 6-FAM 供体探针的扫描的迹线以“6-FAM”标示,而涉及 DmF 供体探针的扫描的迹线以“5-DmF”和“6-DmF”标示。进一步举例而言,图 31 是已对荧光激发扫描进行了归一化的图 30 所示重叠光谱的曲线图(即坐标图的纵坐标代表归一化的荧光,而横坐标代表激发波长(nm))。

[0282] 当进行发射扫描时,没有从 DmF 标记的供体探针获得信号。相反,在对照实验中从 6-FAM 标记检测到巨大的发射。图 32 给出了从这些扫描获得的重叠光谱的曲线图,其中坐标图的纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长(nm)。具体的说,从包括 6-FAM 标记供体探针的杂交探针测定在 493nm 激发波长处获得的发射扫描的迹线,以“6-FAM”标示。从包括 DmF 标记供体探针的测定在 514nm 激发波长处获得的扫描的迹线,以“5-DmF”和“6-DmF”标示。还进行其中反应混合物中没有供体探针的测定,作为阴性对照。从这些对照测定中的一个在 514nm 激发波长处获得的发射扫描的迹线以“对照 1”标示,而从这些对照测定中的另一个在 493nm 激发波长处获得的发射扫描的迹线以“对照 2”标示。

[0283] 实施例 IV:解链曲线分析

[0284] 用包括标记上荧光部分或基本上非荧光部分的供体探针的杂交探针对进行解链曲线分析。更具体的说,一组解链曲线测定包括这样的杂交探针对,其中供体探针在 3'-末端标记上 6-FAM,接纳体探针在 5'-末端标记上 CY5.5。另一组测定则包括这样的杂交探针

对,其中供体探针在 3'-末端标记上 5-DmF,接纳体探针在 5'-末端标记上 CY5.5。在每个测定中使用相同的靶标核酸,拷贝数也相同,即为 100,000 拷贝。图 33 和 34 显示了这些分析所获得的解链曲线,其中坐标图的纵坐标代表原始(raw)荧光,而横坐标代表温度(°C)。包括 6-FAM 供体探针的测定所获得的迹线以“6-FAM”标示,而包括 5-DmF 供体探针的测定所获得的迹线以“5-DmF”标示。还进行其中反应混合物中没有供体探针的阴性对照。如图 33 和 34 所示,每个解链曲线测定重复进行两次。

[0285] 实施例 V:基于杂交探针的实时 PCR 监测

[0286] 还将实施例 IV 中所述的杂交探针对用于监测聚合酶链式反应。具体的说,图 35 和 36 显示了这些分析所获得的生长曲线,其中坐标图的纵坐标代表原始荧光,而横坐标代表循环次数。包括 6-FAM 供体探针的测定所获得的迹线以“6-FAM”标示,而包括 5-DmF 供体探针的测定所获得的迹线以“5-DmF”标示。还进行其中反应混合物中没有供体探针的阴性对照。在每个测定中使用相同的靶标核酸,拷贝数也相同,即为 100,000 拷贝。如图 35 和 36 所示,每个 PCR 重复进行两次。

[0287] 实施例 VI:基于 5'-核酸酶探针的实时 PCR 监测

[0288] 还用在能量转移对中包括基本上非荧光部分或者缺乏这种部分的 5'-核酸酶探针对 PCR 测定进行监测。图 37A 和 37B 示出了这些测定中所用的 5'-核酸酶探针。如图 37A 所示,探针 600(DmF 探针)在核酸的 5'-末端包括猝灭剂部分(Q),即 Black Hole Quencher™ 或 BHQ™(Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA, USA)。另外,探针 600 还包括包含有 DmF(供体部分)和 CY5.5(接纳体部分)的能量转移对(ET 对)。图 37B 所示的探针 602(非-DmF 探针)与探针 600 相同,例外的是在 ET 对中荧光素(FL)代替 DmF 作为供体部分。

[0289] 图 38 提供了包括使用图 37A 和 37B 示出的 5'-核酸酶探针的各个 PCR 测定的生长曲线。图 38 所示的坐标图的纵坐标代表原始荧光,而横坐标代表循环次数。图 39 是已对被检测荧光进行了归一化的图 38 所示生长曲线的曲线图。如图所示,对应于包括 DmF 探针和 100,000 初始拷贝的模板核酸的反应的迹线以“DmF 探针 100K”标示,对应于包括 DmF 探针和 1,000 初始拷贝的模板核酸的反应的迹线以“DmF 探针 1K”标示,对应于包括 DmF 探针和 100 初始拷贝的模板核酸的反应的迹线以“DmF 探针 100”标示。对应于包括非 DmF 探针和 100,000 初始拷贝的模板核酸的反应的迹线以“非 DmF 探针 100K”标示,对应于包括非 DmF 探针和 1,000 初始拷贝的模板核酸的反应的迹线以“非 DmF 探针 1K”标示,对应于包括非 DmF 探针和 100 初始拷贝的模板核酸的反应的迹线以“非 DmF 探针 100”标示。还对两种 5'-核酸酶探针进行了其中反应混合物缺乏模板核酸的阴性对照。对应于这些对照反应的迹线以“DmF 探针和非 DmF 探针对照”标记。如图 38 和 39 所示,每个 PCR 重复进行两次。

[0290] 实施例 VII:另外的杂交探针测定

[0291] 本实施例显示代表性杂交探针对中的供体部分和接纳体部分的各种组合的性能特性。举例而言,图 40 示出了这些杂交探针对的供体部分和接纳体部分。如图所示,供体探针 4000 和接纳体探针 4002 与单链互补序列 4004 杂交。本实施例所用的供体探针包括 FAM、DmF 或 Dam HEX 作为供体部分,而本实施例所用的接纳体探针包括 LC-Red 610、JA-270、CY3.5、CY5 或 CY5.5 作为接纳体部分。

[0292] 图 41A-D 是用本文所述的接纳体探针获得的发射扫描的曲线图(坐标图的纵坐标

代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。具体的说,图 41A 是从标记上 LC-Red 610 的杂交探针获得的发射扫描的曲线图,图 41B 是从标记上 JA-270 的杂交探针获得的发射扫描的曲线图。此外,图 41C 是从标记上 CY5 的杂交探针获得的发射扫描的曲线图,图 41D 是从标记上 CY5.5 的杂交探针获得的发射扫描的曲线图。

[0293] 图 42A 是从标记上 FAM、一个 DmF 分子 (6- 羧基异构体) (DmF) 或两个 DmF 分子 (6- 羧基异构体) (DmFx2) 的杂交探针获得的发射扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。每个迹线的激发波长 (nm) 都有标示 (ex)。图 42B 是图 42A 所示某些发射扫描的重叠曲线图,图中提供了相对荧光发射。

[0294] 图 43A 是涉及标记上 LC610 (最大发射波长 = 604nm) 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。还显示了 FAM、DmF 和 LC-Red 610 的激发峰。每个迹线的发射波长 (nm) 都有标示 (em)。同样如图所示,还获得了在反应混合物中只包括接纳体探针 (仅 LC-Red 610, em = 604) 的阴性对照的扫描。图 43B 是涉及标记上 LC-Red 610 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的这些杂交探针测定的发射扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。对应于每个迹线的激发波长 (nm) 都有标示 (ex)。同样如图所示,在 495nm 激发波长处 (仅 LC-Red 610, ex = 495) 和 515nm 激发波长处 (仅 LC-Red 610, ex = 515) 也获得了在反应混合物中只包括接纳体探针的阴性对照的扫描。图 43C 是图 43B 所示发射扫描的重叠曲线图,图中提供了相对荧光发射。

[0295] 图 44A 是涉及标记上 JA-270 (最大发射波长 = 640nm) 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。还显示了 FAM、DmF 和 JA-270 的激发峰。每个迹线的发射波长 (nm) 都有标示 (em)。同样如图所示,还获得了在反应混合物中只包括接纳体探针 (仅 JA-270, em = 640) 的阴性对照的扫描。图 44B 是涉及标记上 JA-270 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的这些杂交探针测定的发射扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。对应于每个迹线的激发波长 (nm) 都有标示 (ex)。同样如图所示,在 495nm 激发波长处 (仅 JA-270, ex = 495) 和 515nm 激发波长处 (仅 JA-270, ex = 515) 也获得了在反应混合物中只包括接纳体探针的阴性对照的扫描。图 44C 是图 44B 所示发射扫描的重叠曲线图,图中提供了相对荧光发射。

[0296] 图 45A 是涉及标记上 CY5 (最大发射波长 = 663nm) 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。还显示了 FAM、DmF 和 CY5 的激发峰。每个迹线的发射波长 (nm) 都有标示 (em)。同样如图所示,还获得了在反应混合物中只包括接纳体探针 (仅 CY5, em = 663) 的阴性对照的扫描。图 45B 是涉及标记上 CY5 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的这些杂交探针测定的发射扫描的重叠曲线图 (纵坐标代表绝对荧光,而横坐标代表波长 (nm))。对应于每个迹线的激发波长 (nm) 都有标示 (ex)。同样如图所示,在 495nm 激发波长处 (仅 CY5, ex = 495) 和 515nm 激发波长处 (仅 CY5, ex = 515) 也获得了在反应混合物中只包括接纳体探针的阴性对照的扫描。图 45C 是图 45B 所示发射扫描的重叠曲线图,图中提供了相对荧光发射。

[0297] 图 46A 是涉及标记上 CY5.5 (最大发射波长 = 702nm) 的接纳体探针和标记上 FAM、

DmF 或 DmFx2 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描的重叠曲线图（纵坐标代表绝对荧光，而横坐标代表波长（nm））。还显示了 FAM、DmF 和 CY5.5 的激发峰。每个迹线的发射波长（nm）都有标示（em）。同样如图所示，还获得了在反应混合物中只包括接纳体探针（仅 CY5.5, em = 702）的阴性对照的扫描。图 46B 是涉及标记上 CY5.5 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 DmFx2 的供体探针的这些杂交探针测定的发射扫描的重叠曲线图（纵坐标代表绝对荧光，而横坐标代表波长（nm））。对应于每个迹线的激发波长（nm）都有标示（ex）。同样如图所示，在 495nm 激发波长处（仅 CY5.5, ex = 495）和 515nm 激发波长处（仅 CY5.5, ex = 515）也获得了在反应混合物中只包括接纳体探针的阴性对照的扫描。图 46C 是图 46B 所示发射扫描的重叠曲线图，图中提供了相对荧光发射。

[0298] 图 47A 是涉及标记上 LC610（最大发射波长 = 604nm）的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX（即 6-羧基-氨基五氯荧光素）的供体探针的杂交探针测定的激发扫描的重叠曲线图（纵坐标代表绝对荧光，而横坐标代表波长（nm））。每个迹线的发射波长（nm）都有标示（em）。同样如图所示，还获得了在反应混合物中只包括接纳体探针（仅 LC-Red 610, em = 605）的阴性对照的扫描。图 47B 是涉及标记上 LC-Red 610 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的这些杂交探针测定的发射扫描的重叠曲线图（纵坐标代表绝对荧光，而横坐标代表波长（nm））。对应于每个迹线的激发波长（nm）都有标示（ex）。同样如图所示，还获得了在反应混合物中只包括供体探针的阴性对照的扫描如图所示（仅 FAM, ex = 495nm；仅 DmF, ex = 515nm 和仅 Dam HEX, ex = 485nm）。

[0299] 图 48A 是涉及标记上 CY3.5 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的杂交探针测定的激发扫描的重叠曲线图（纵坐标代表绝对荧光，而横坐标代表波长（nm））。每个迹线的发射波长（nm）都有标示（em）。同样如图所示，还获得了在反应混合物中只包括接纳体探针（仅 CY3.5, em = 605）的阴性对照的扫描。图 48B 是涉及标记上 CY3.5 的接纳体探针和标记上 FAM、DmF 或 Dam HEX 的供体探针的这些杂交探针测定的发射扫描的重叠曲线图（纵坐标代表绝对荧光，而横坐标代表波长（nm））。对应于每个迹线的激发波长（nm）都有标示（ex）。同样如图所示，还获得了在反应混合物中只包括供体探针的阴性对照的扫描如图所示（仅 FAM, ex = 495nm；仅 DmF, ex = 515nm 和仅 Dam HEX, ex = 485nm）。

[0300] 前文已出于清楚和便于理解的目的对本发明作了较为详细的描述，本领域技术人员在阅读了本说明后会知道，可不偏离本发明的确切范围作出各种形式上和细节上的变化方案。例如，所有上述技术和器械可按各种不同的组合进行使用。

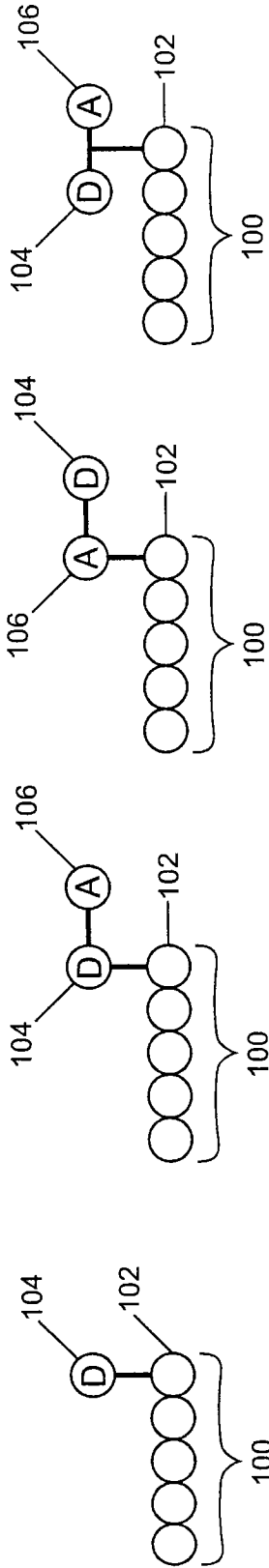


图 1A

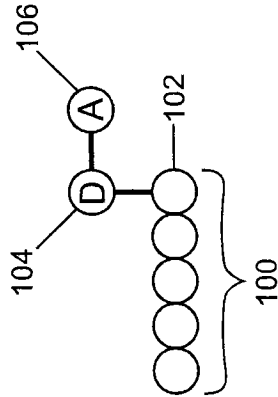


图 1B

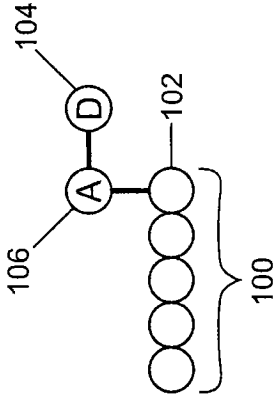


图 1C

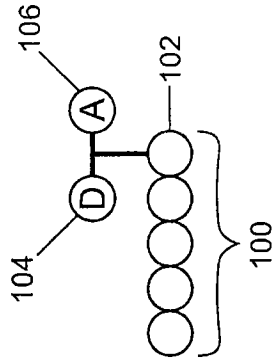


图 1D

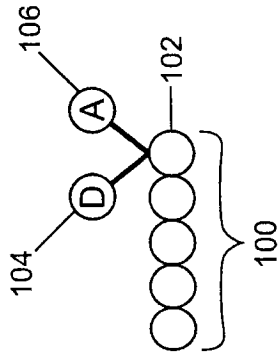


图 1E

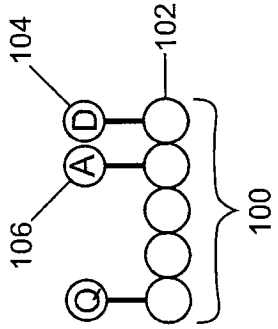


图 1F

图 1

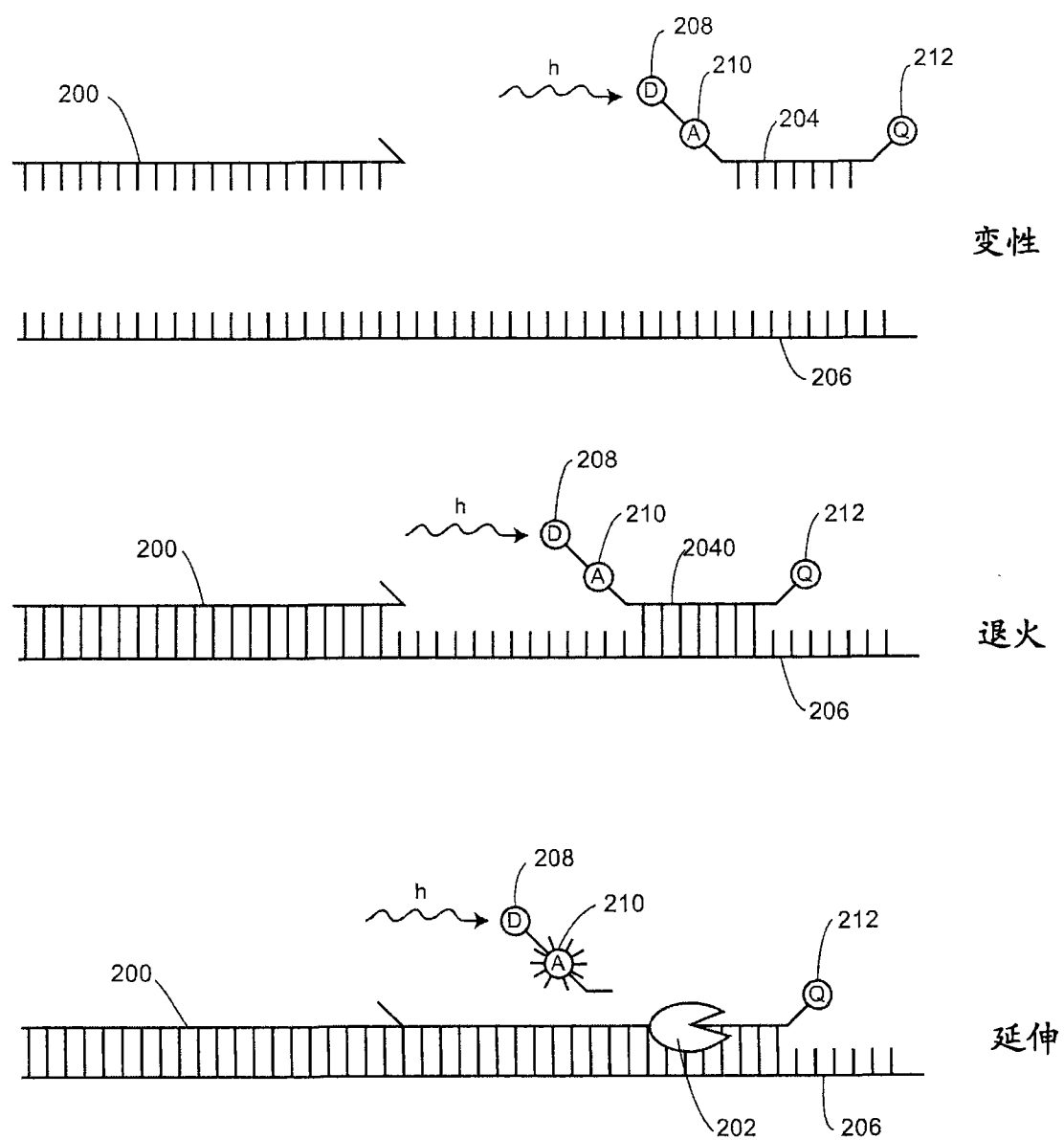


图 2

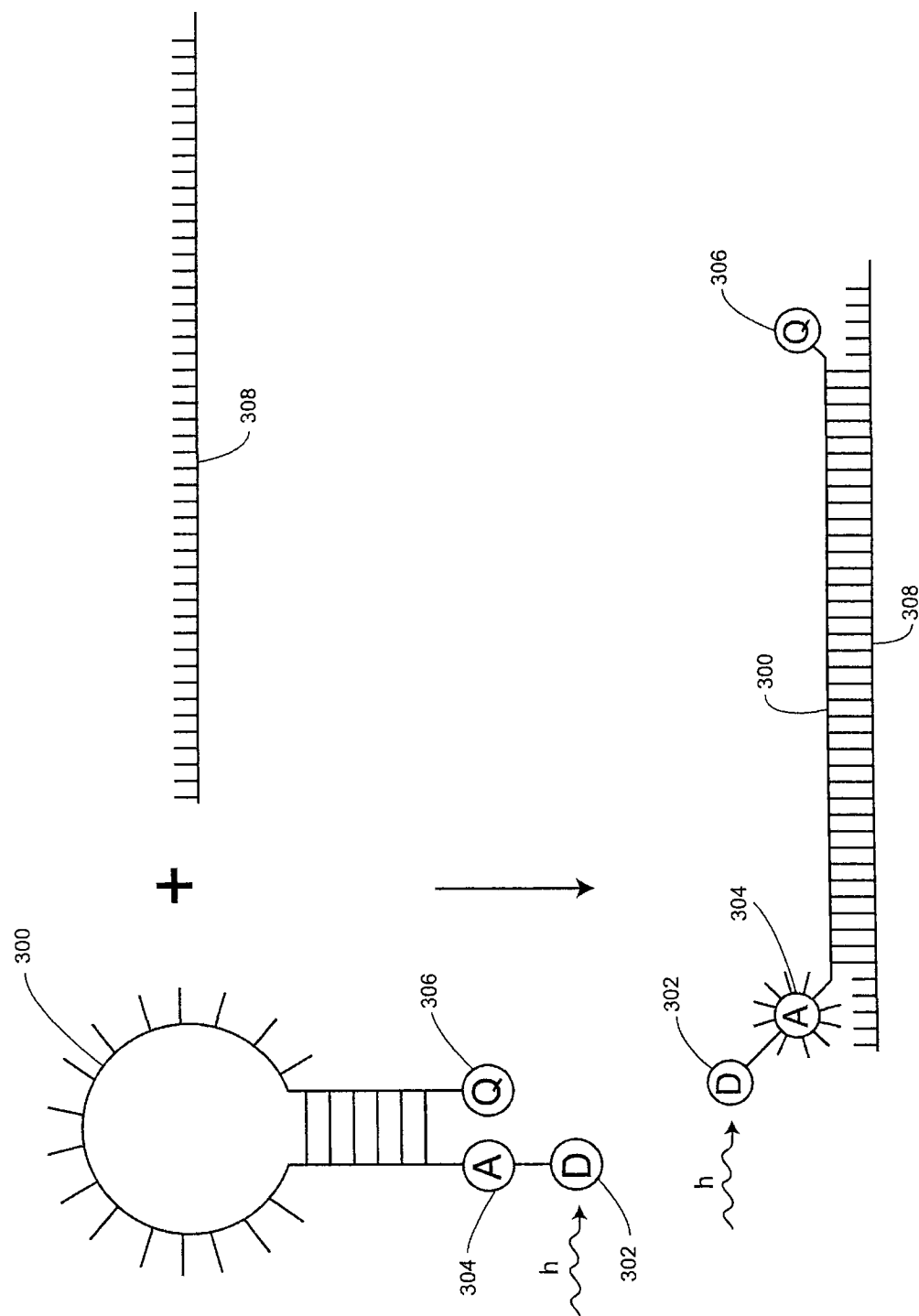


图 3

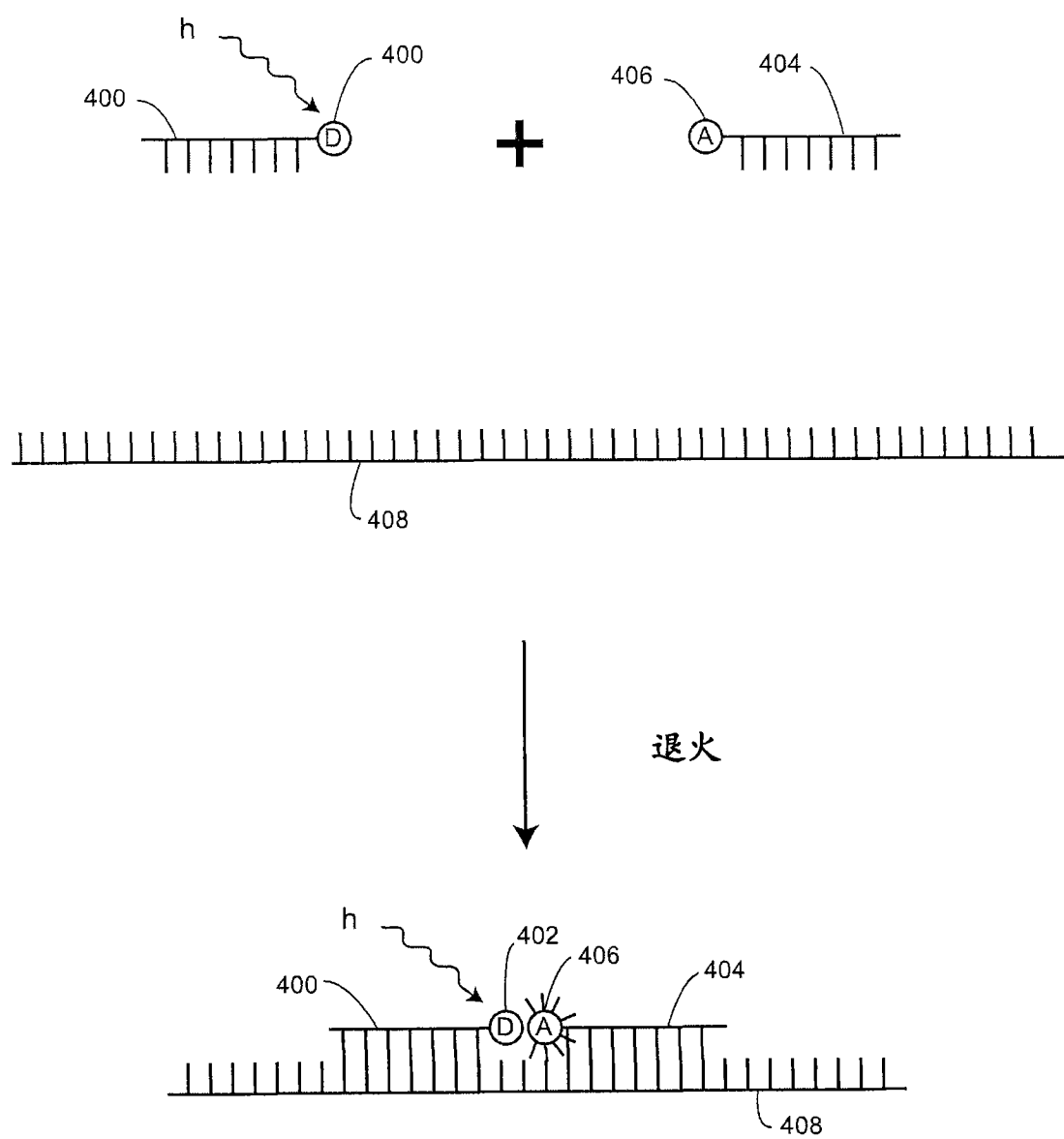


图 4

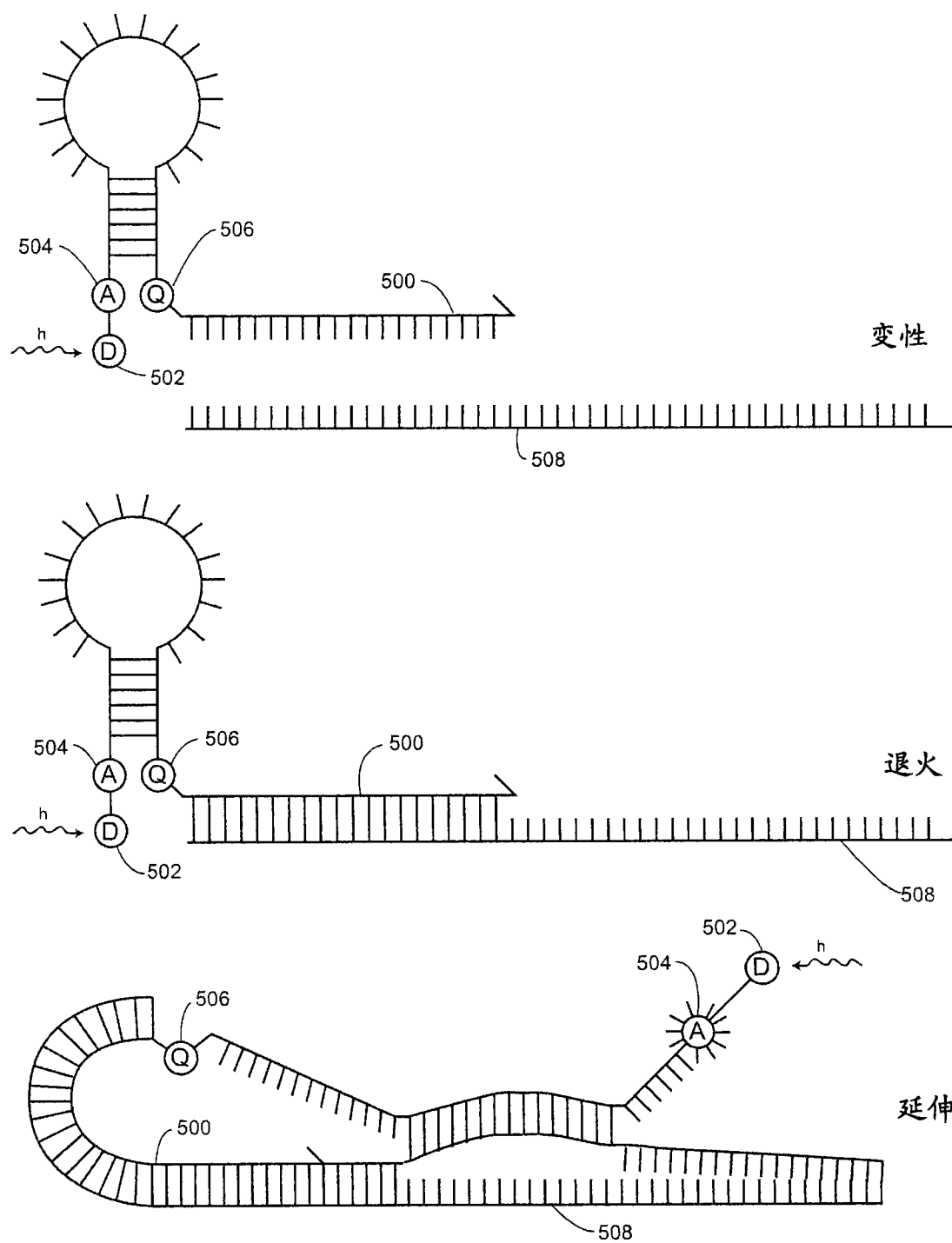


图 5

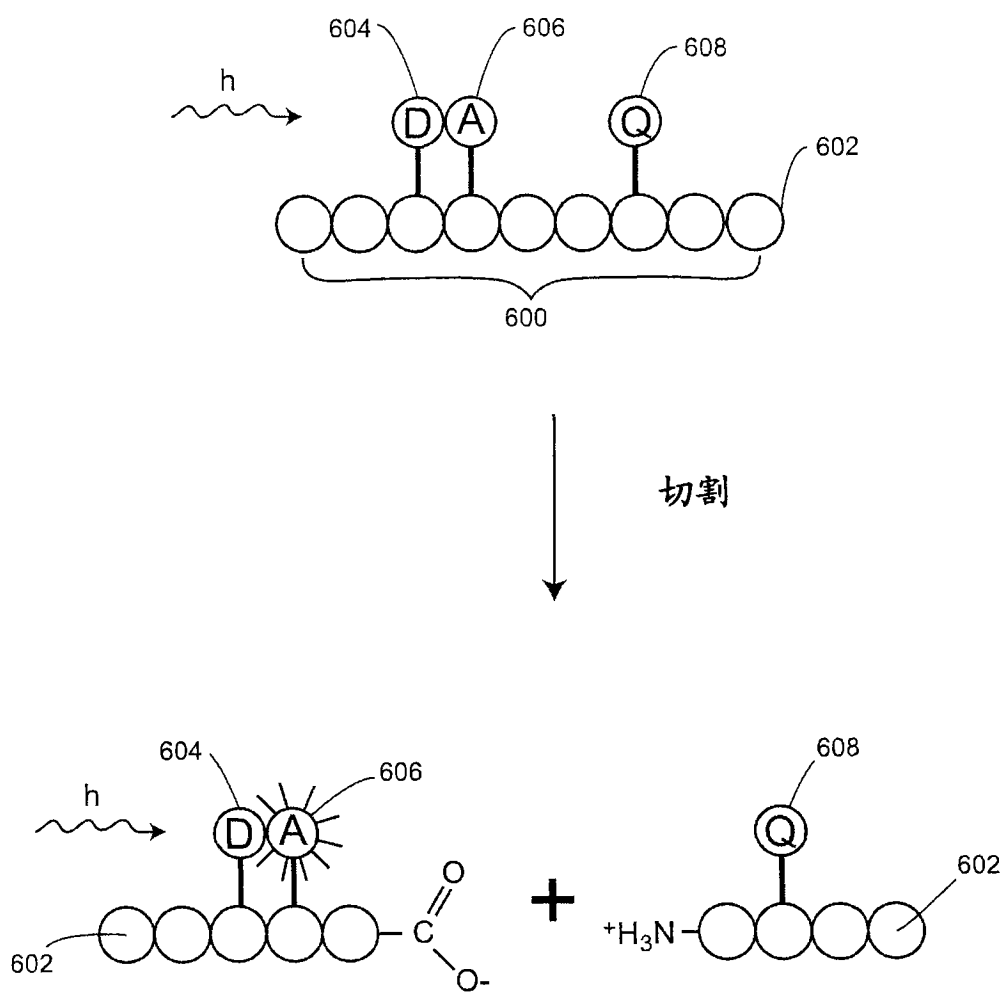


图 6

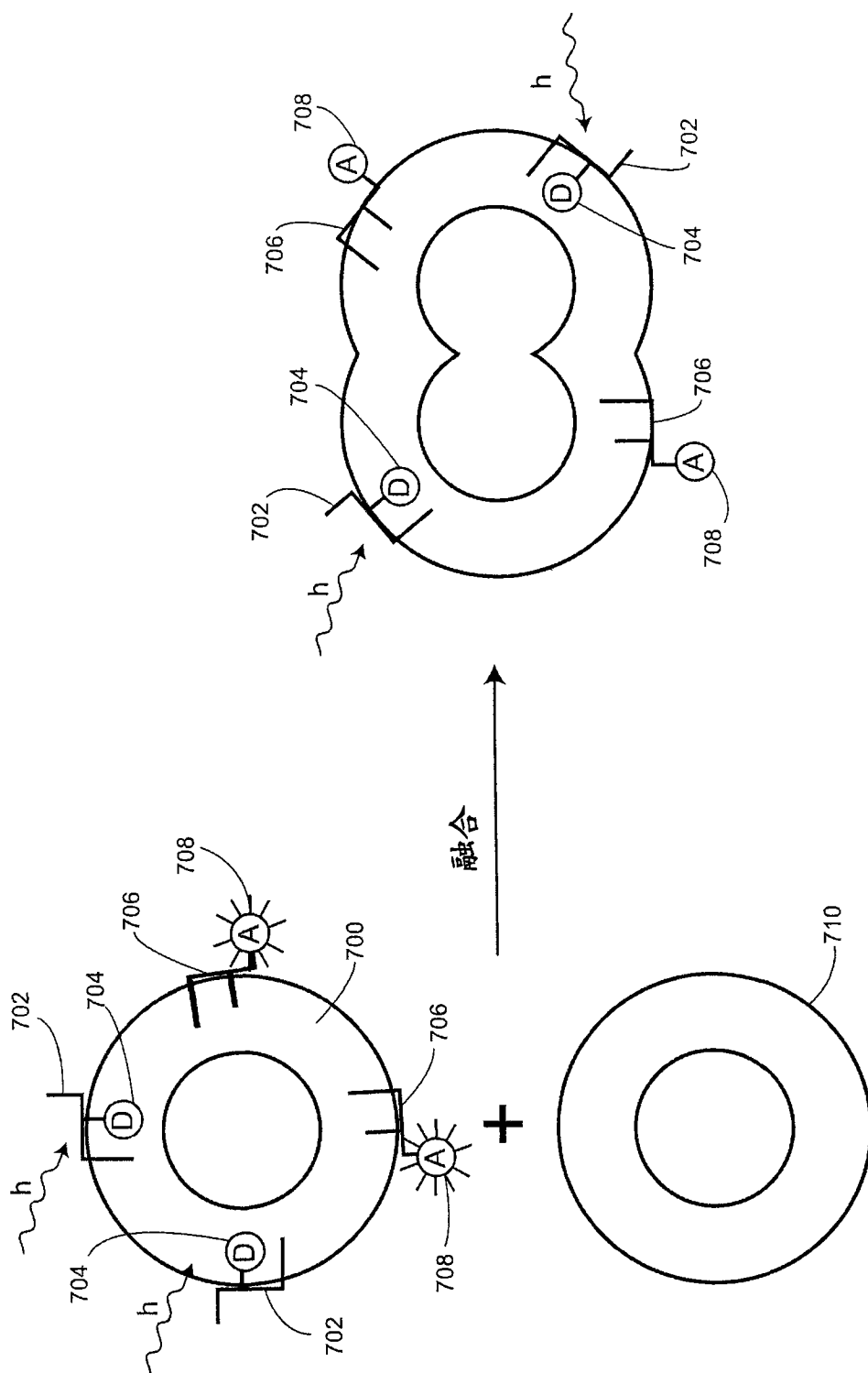


图 7

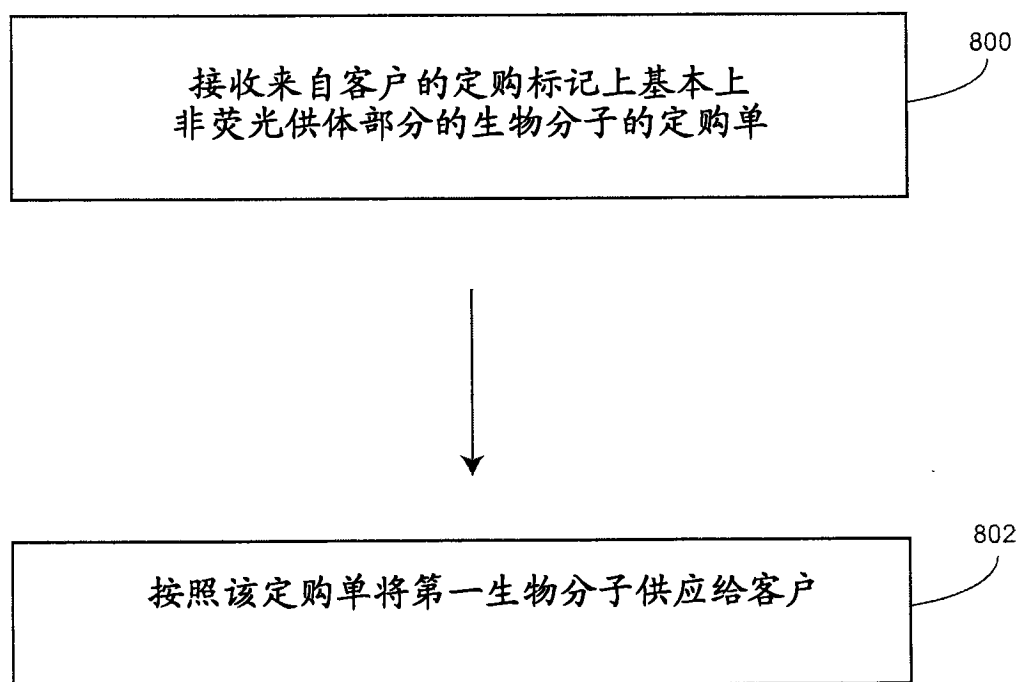


图 8

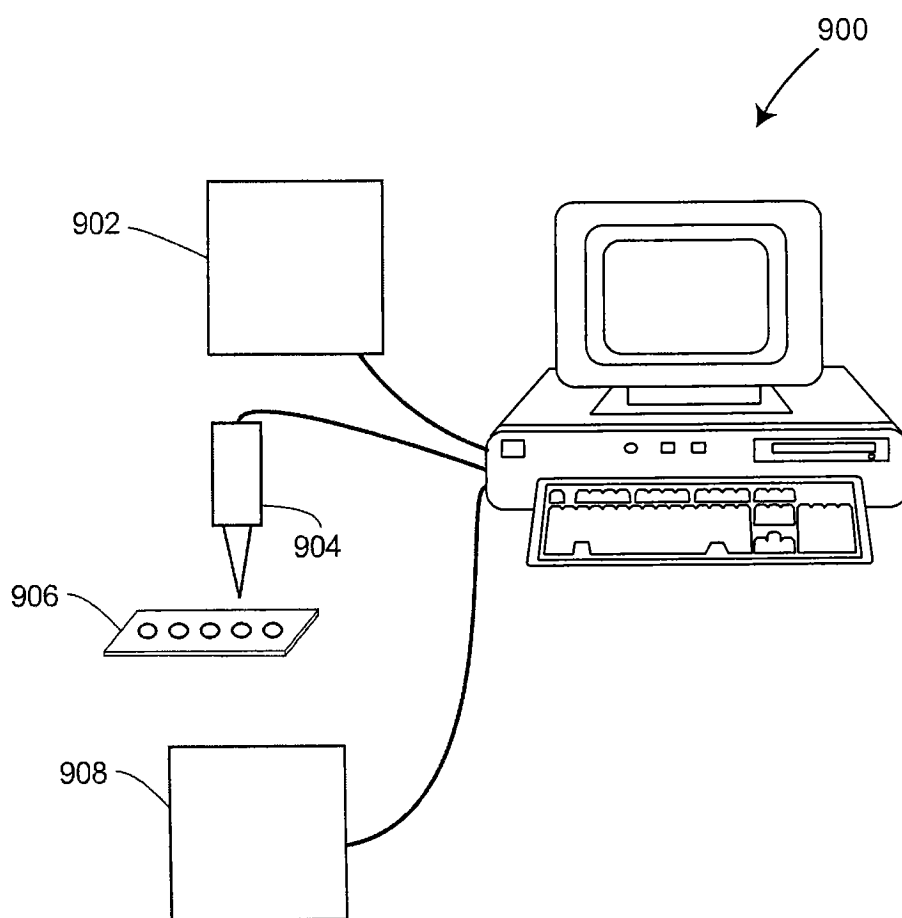


图 9

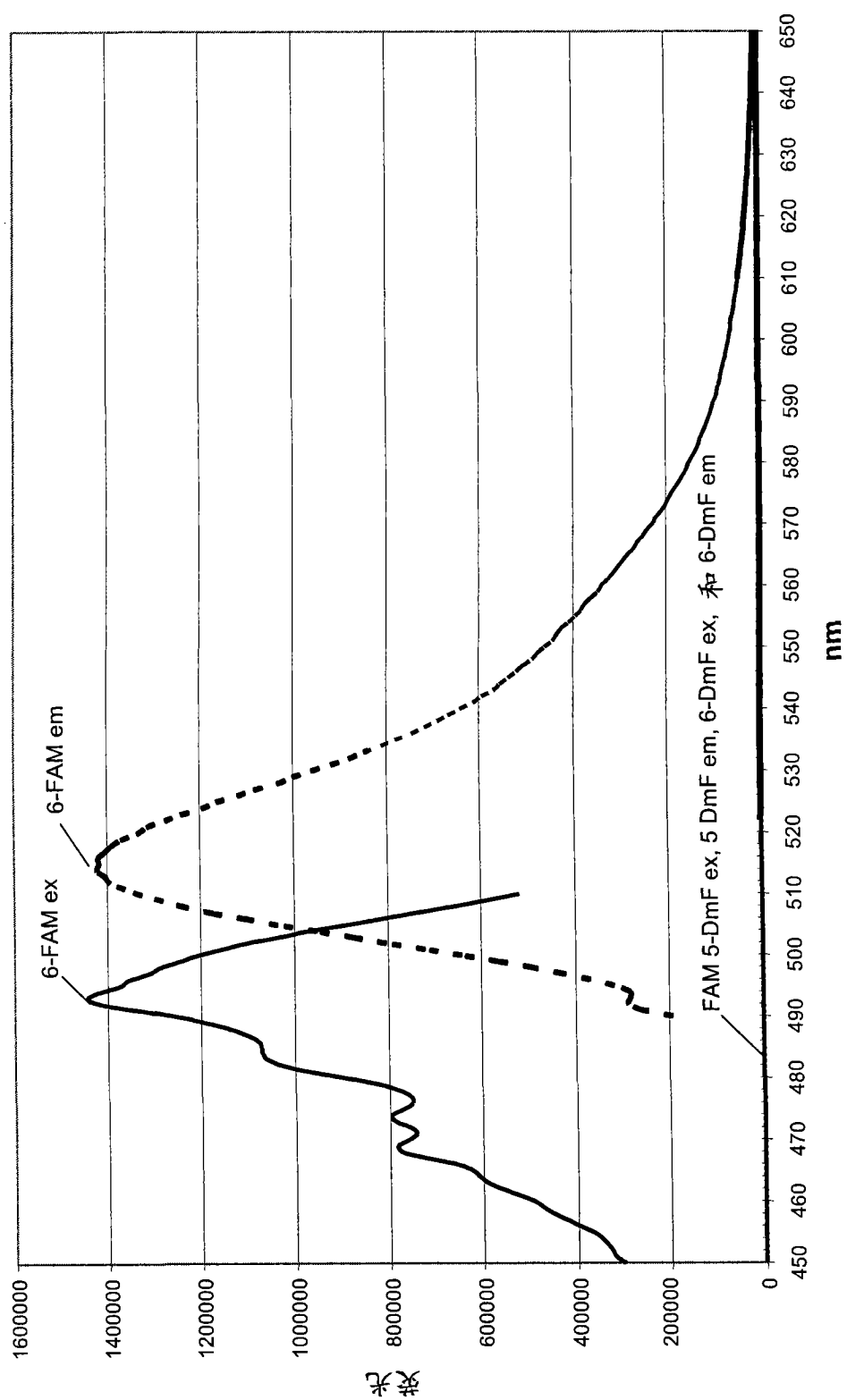


图 10

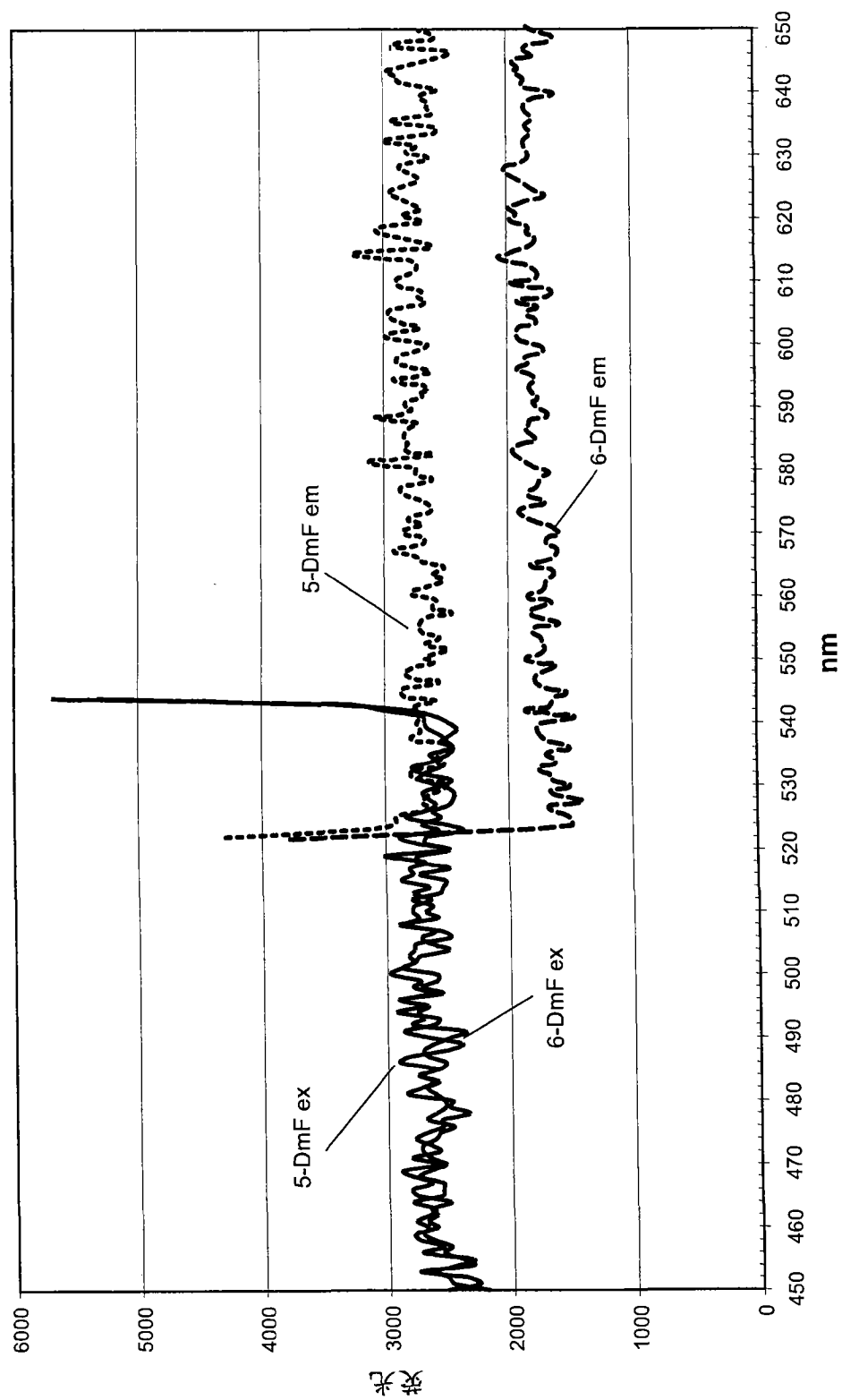


图 11

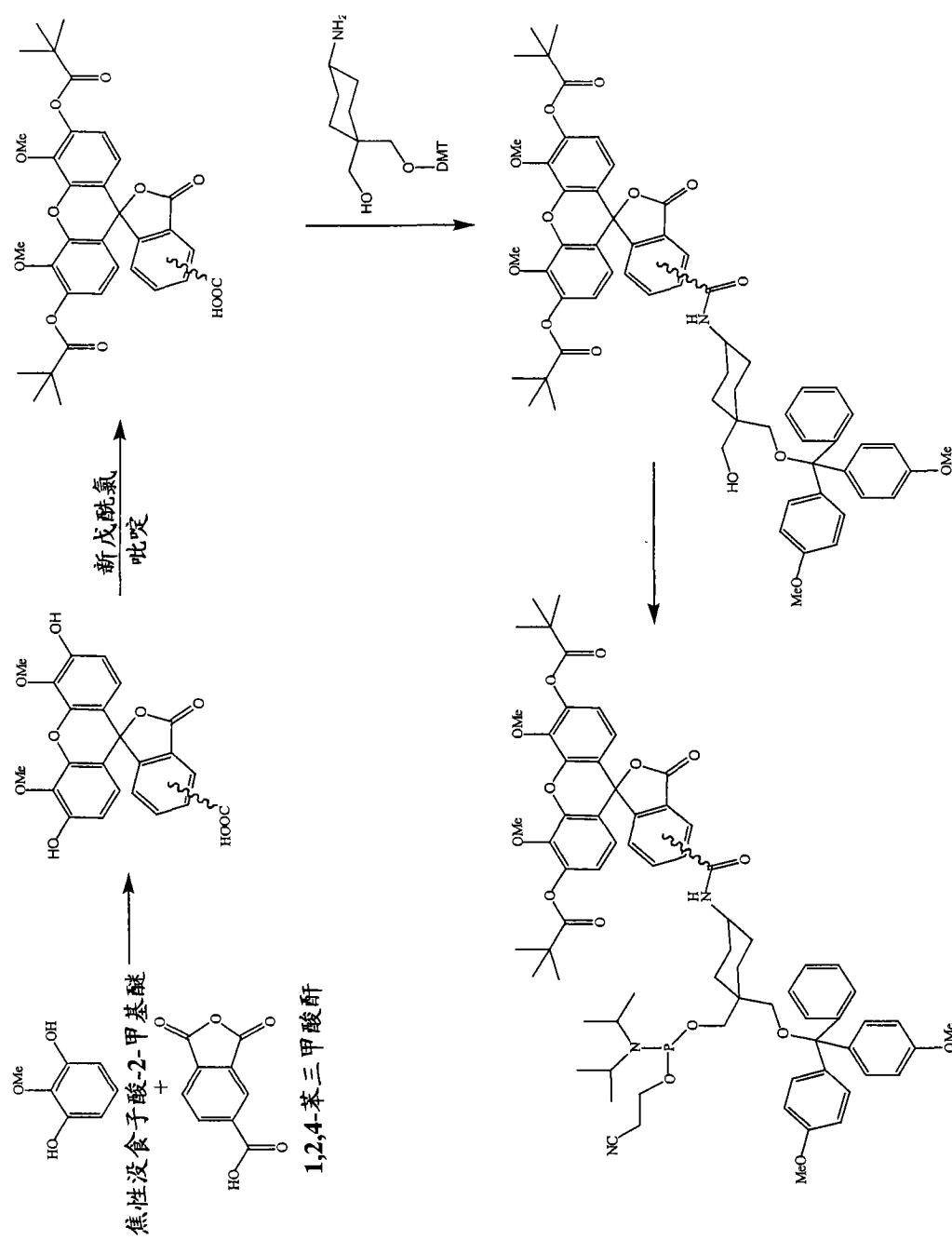


图 12

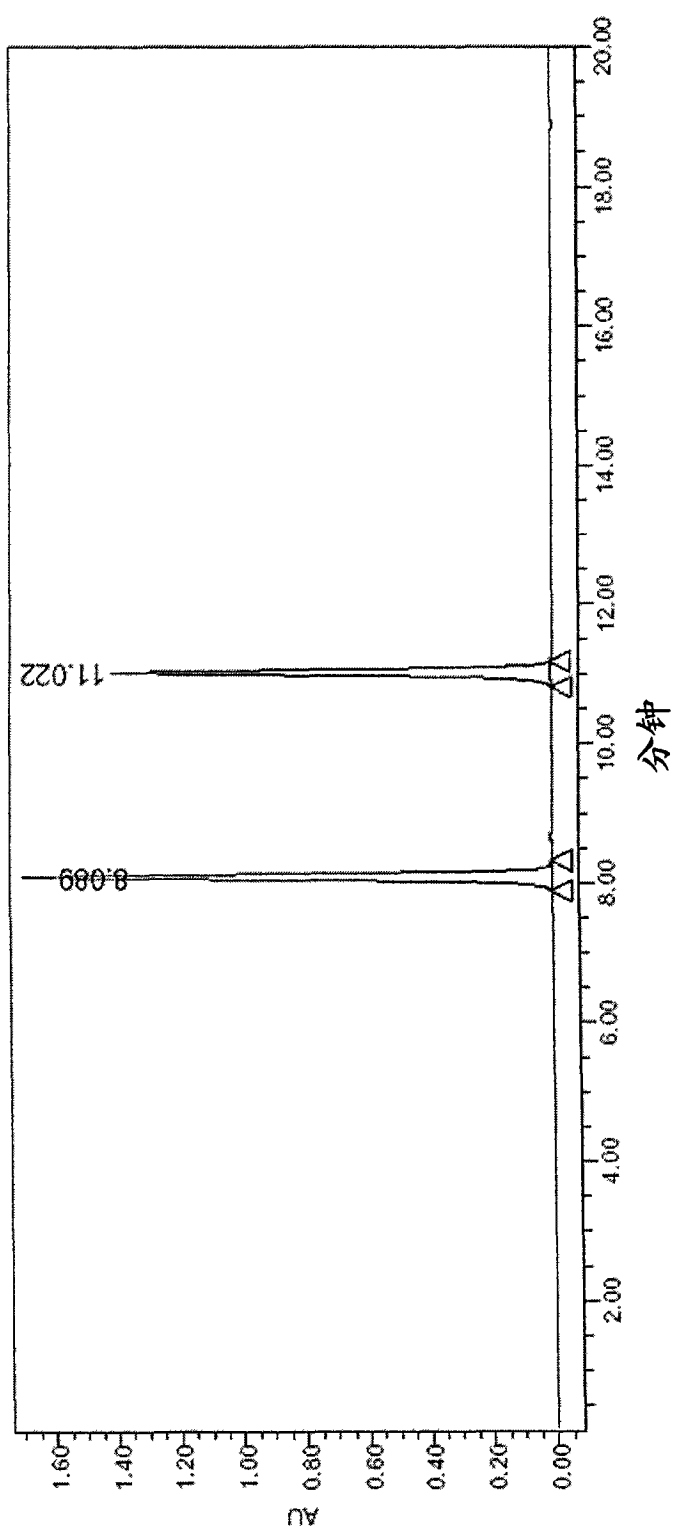


图 13

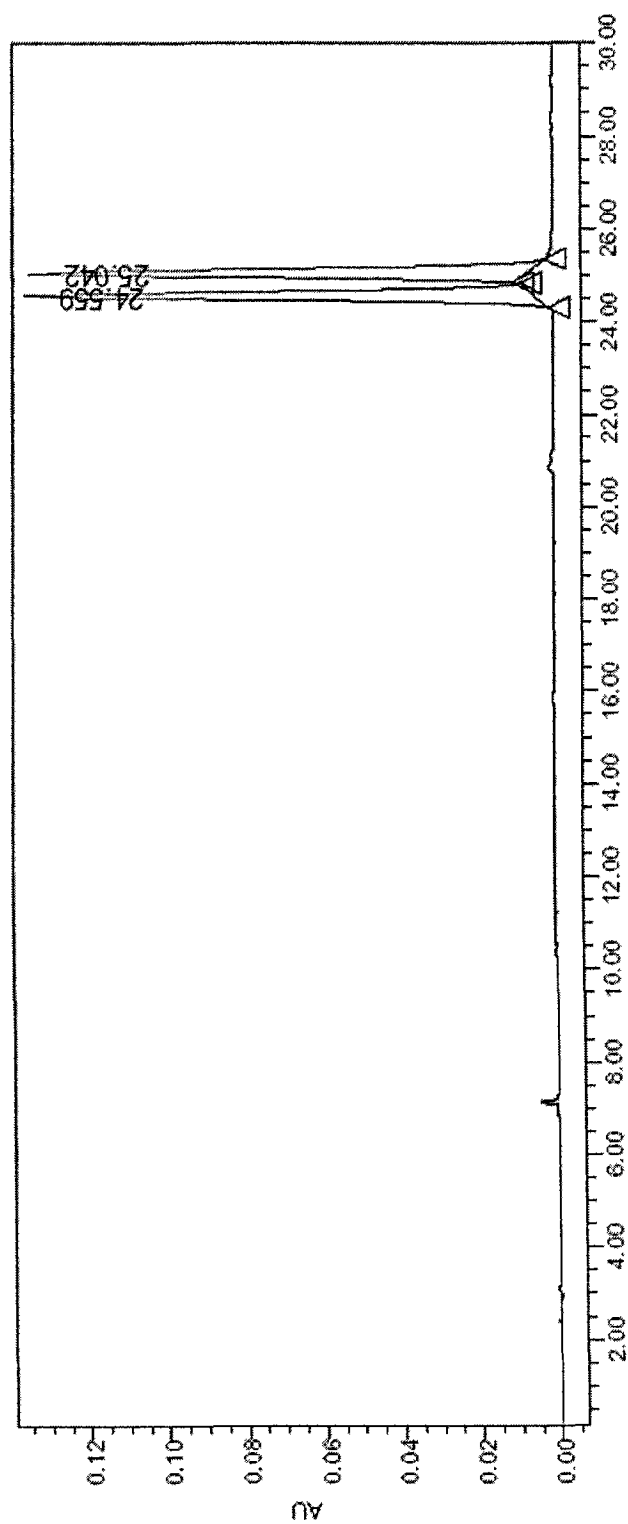


图 14

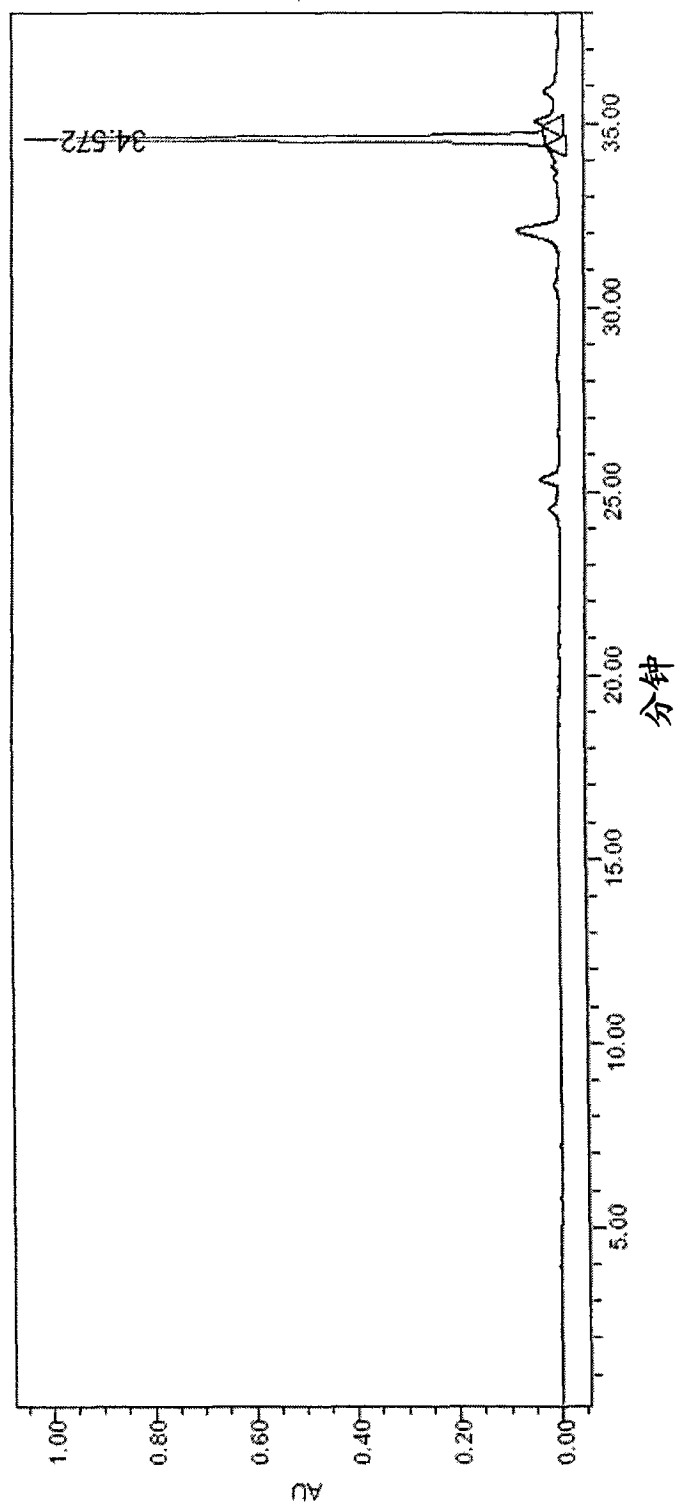


图 15

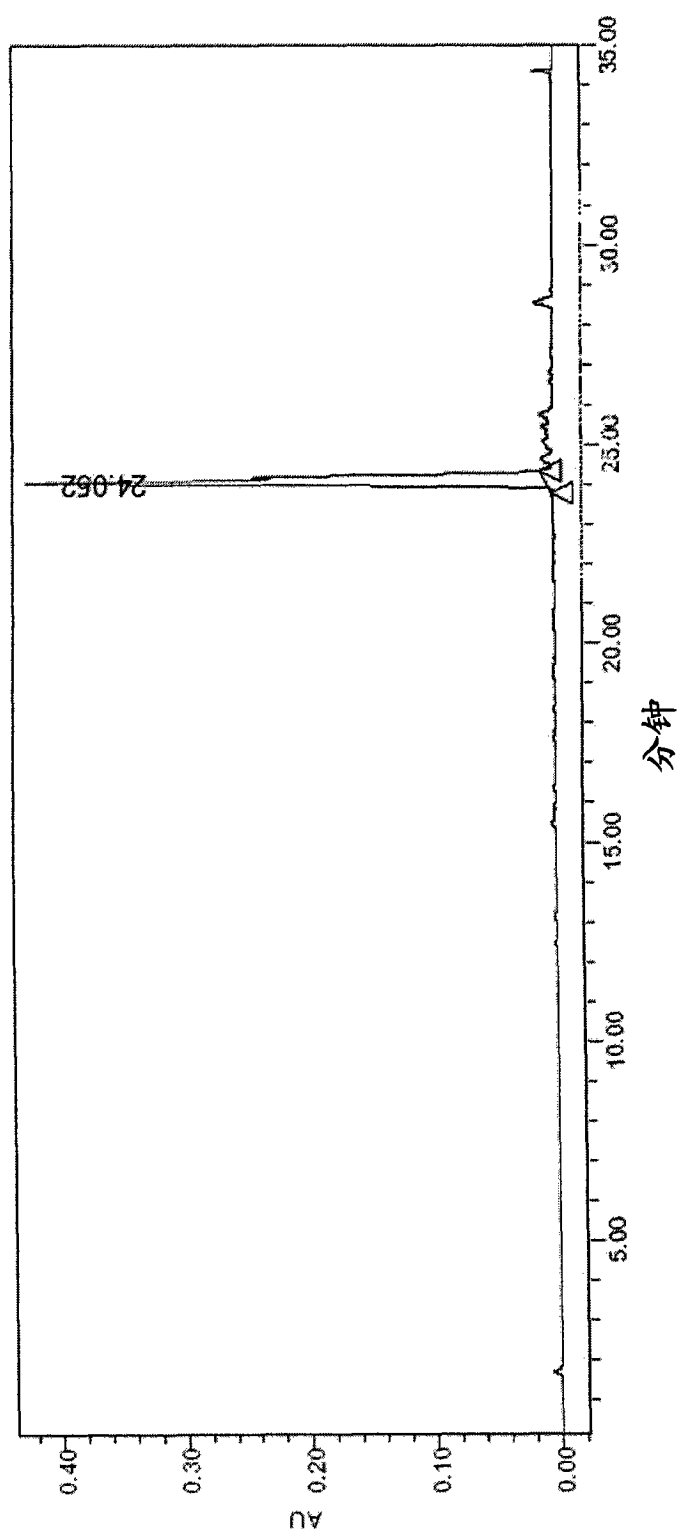


图 16

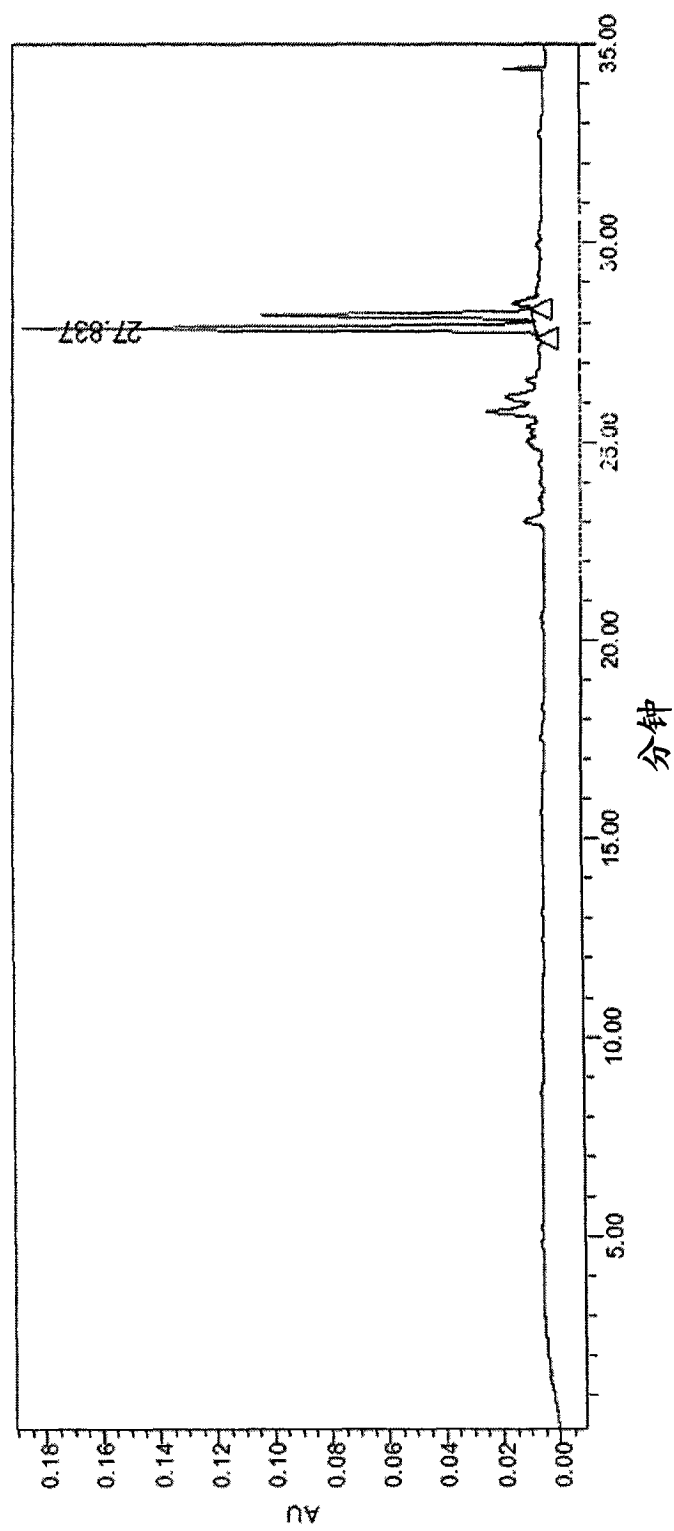


图 17

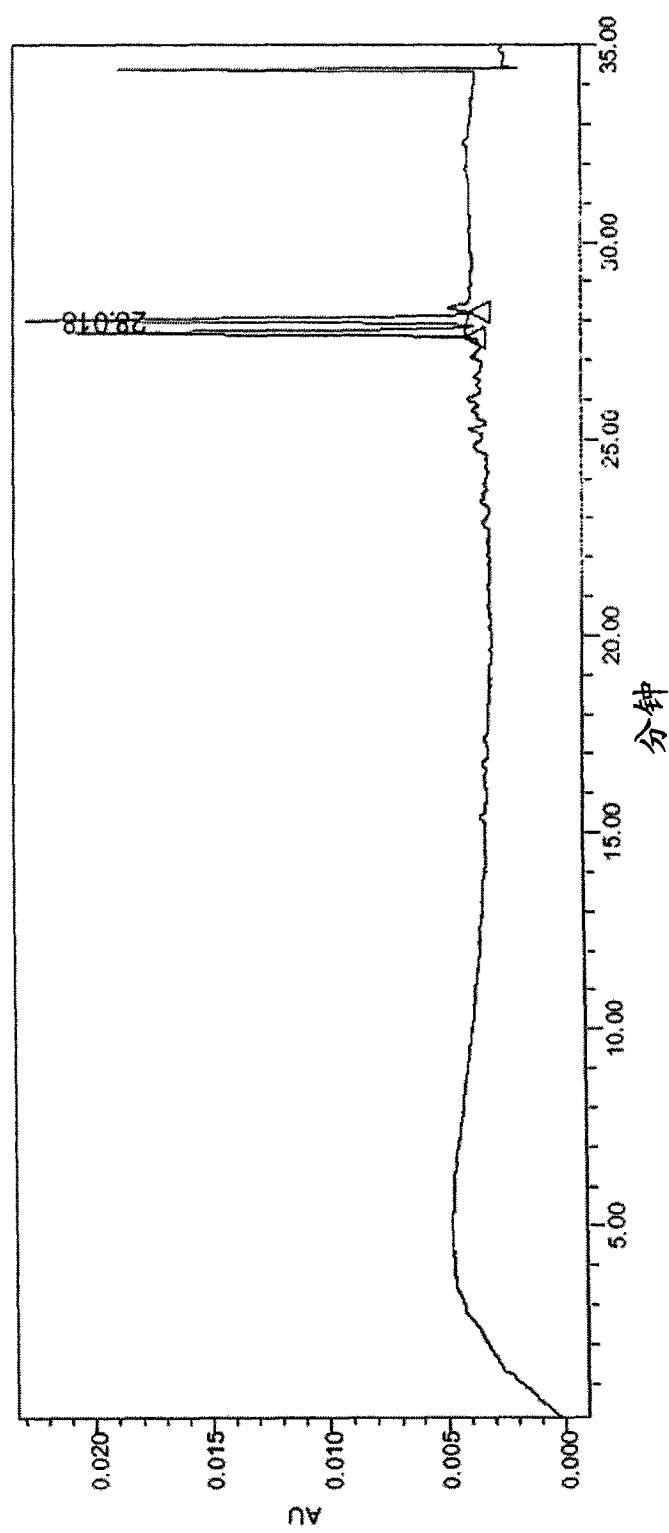


图 18

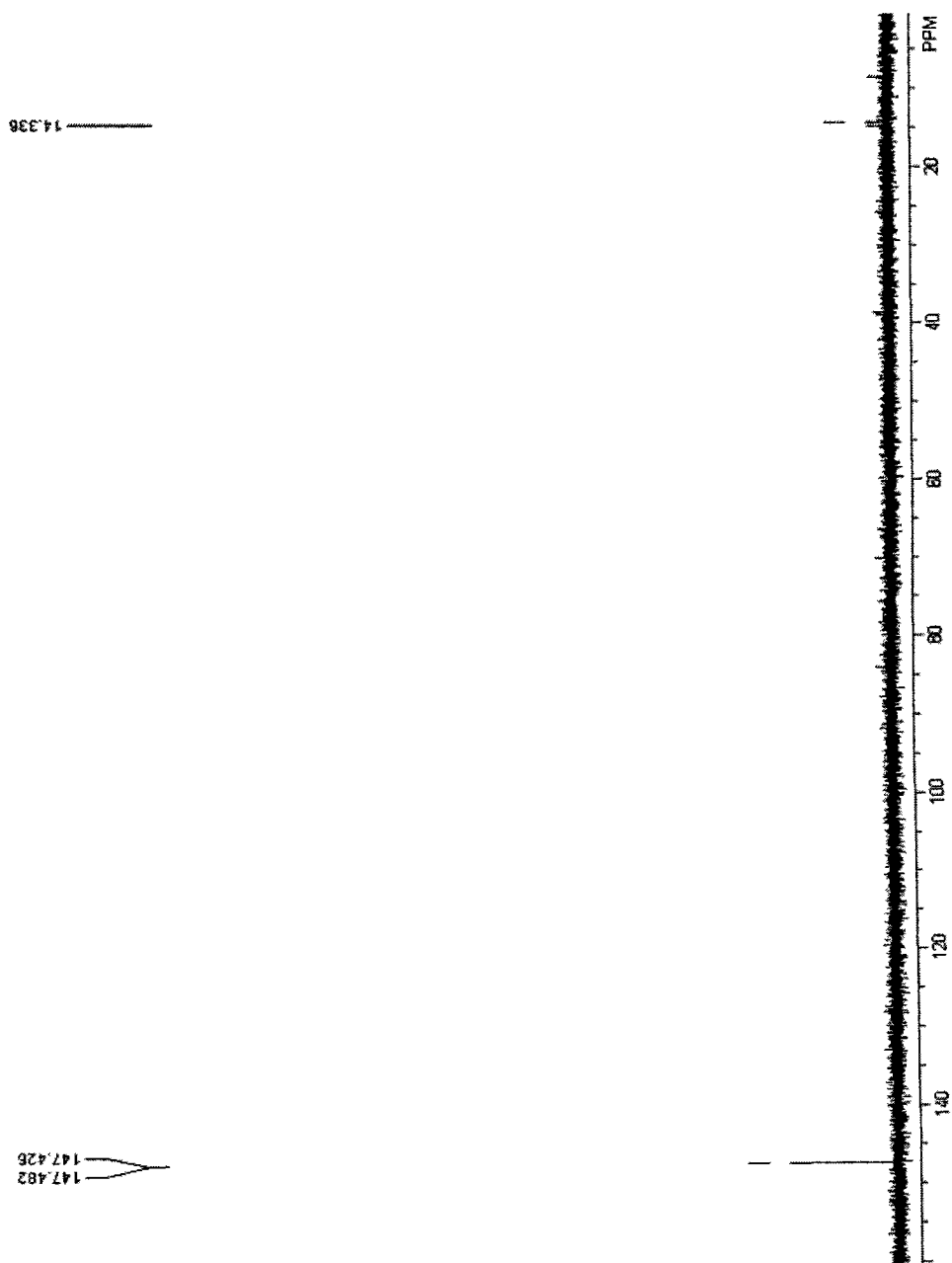


图 19

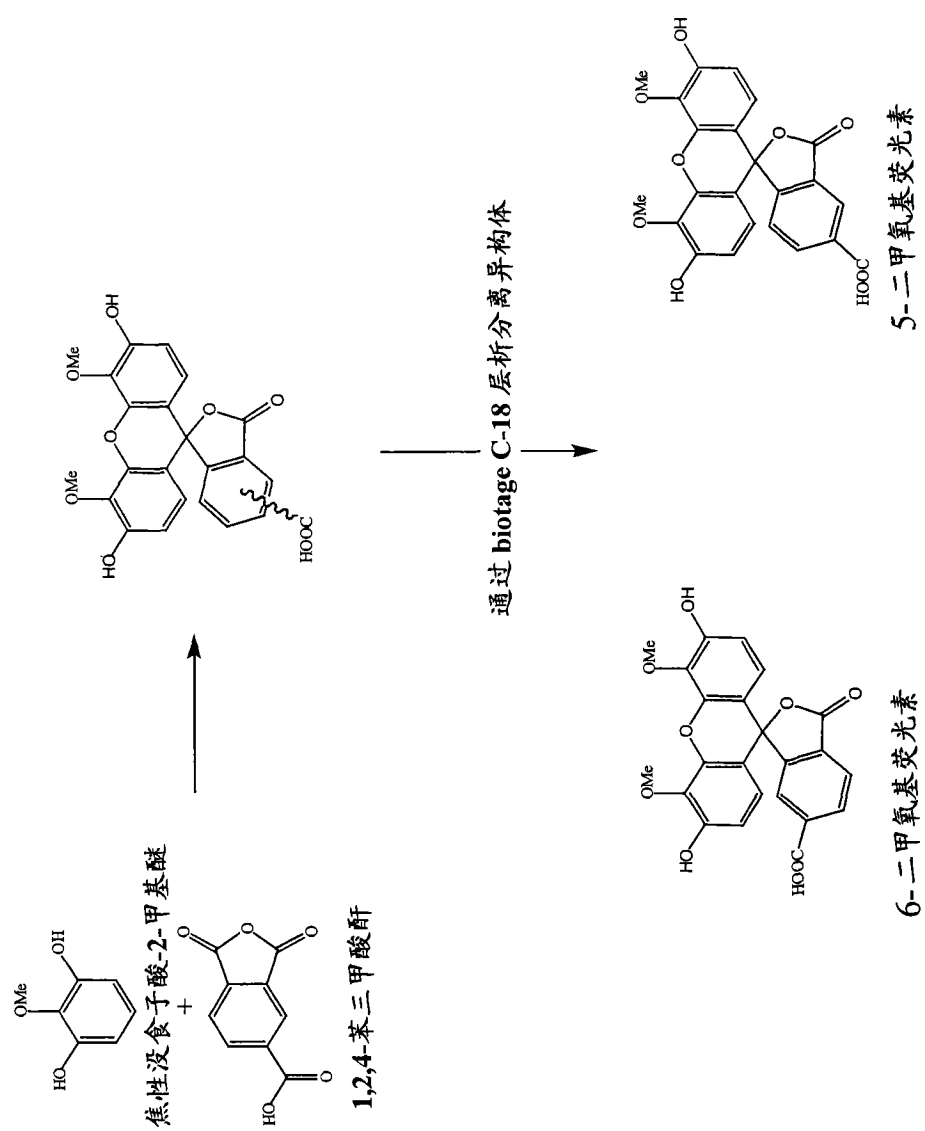


图 20

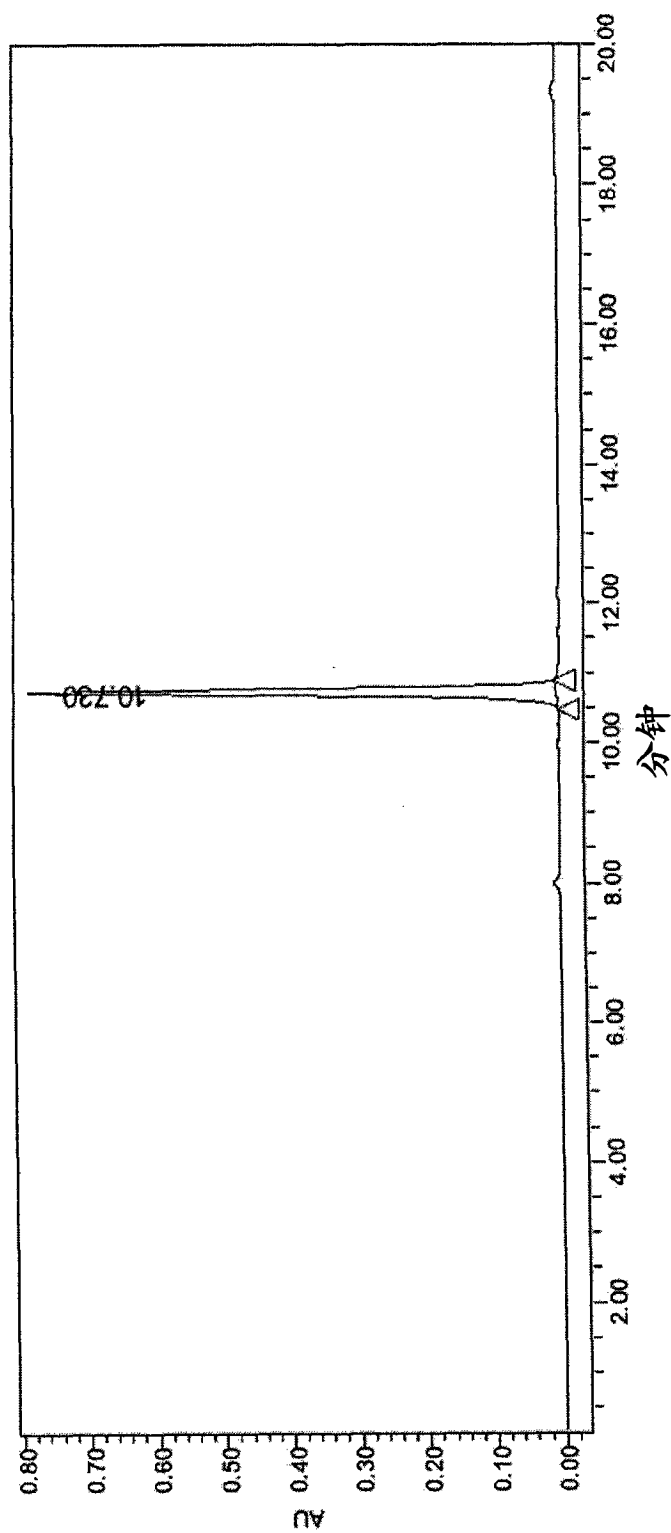
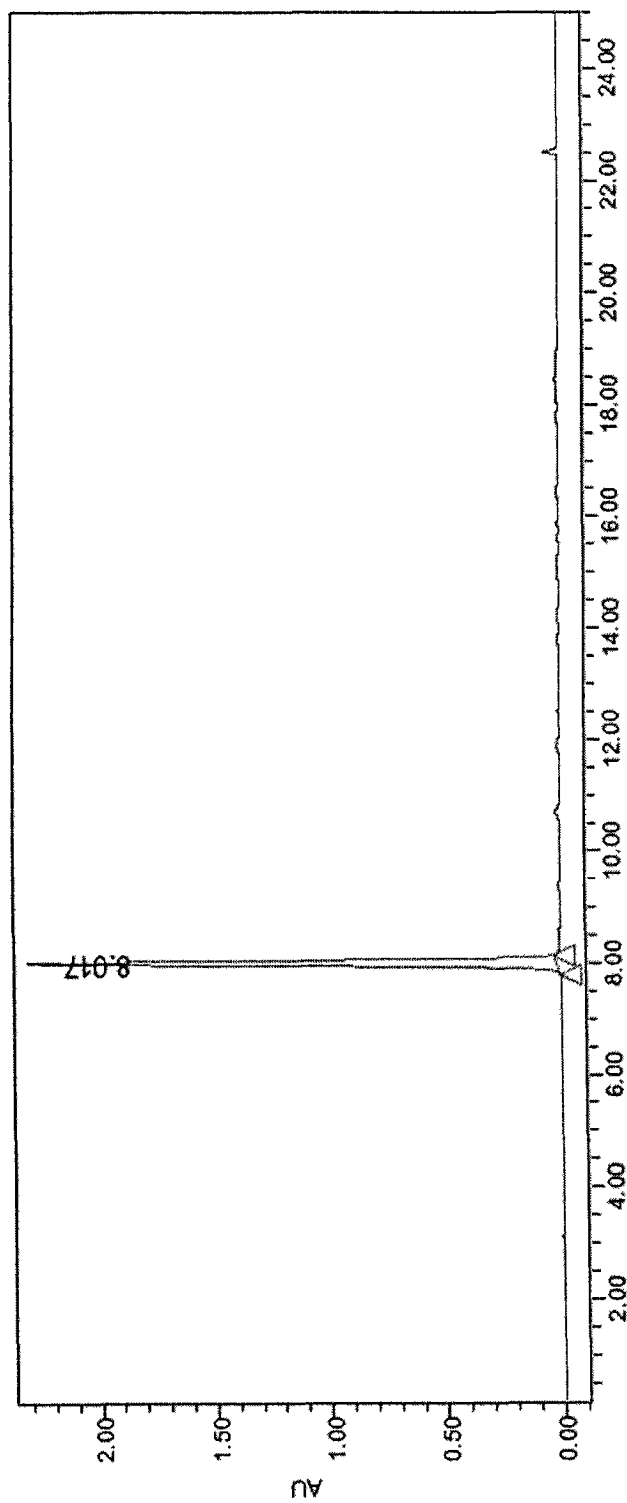


图 21



分钟
图 22

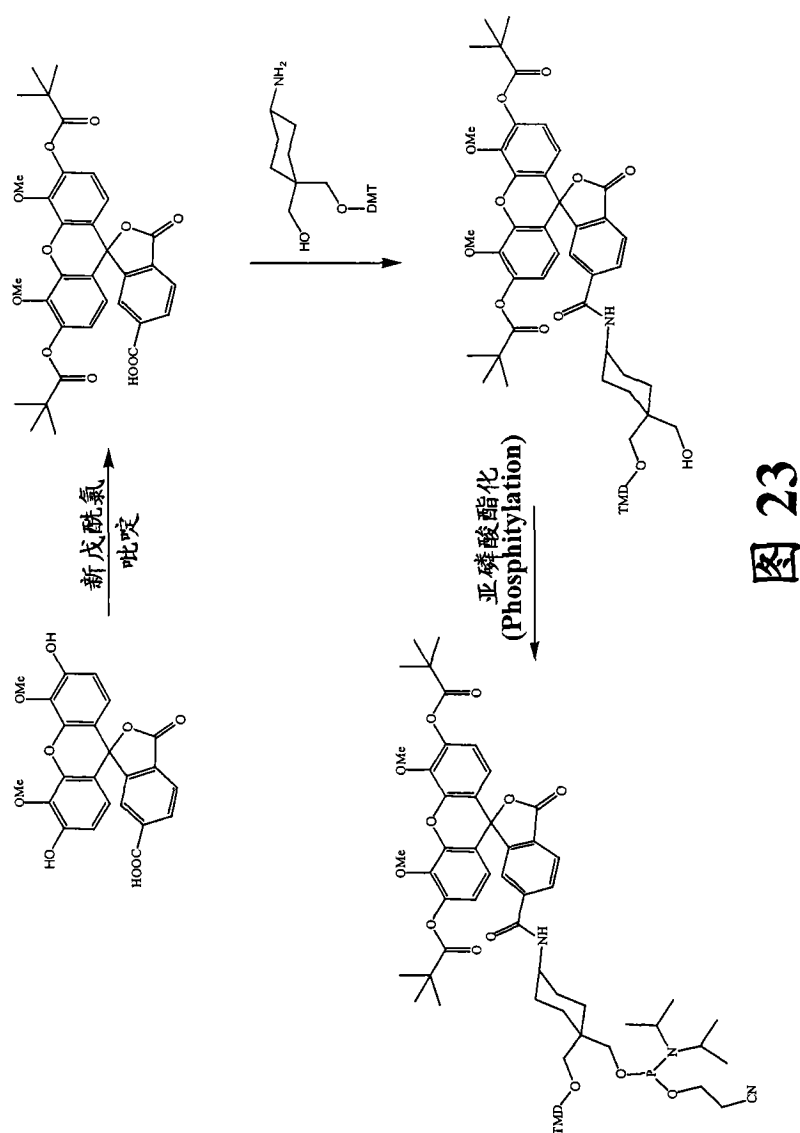


图 23

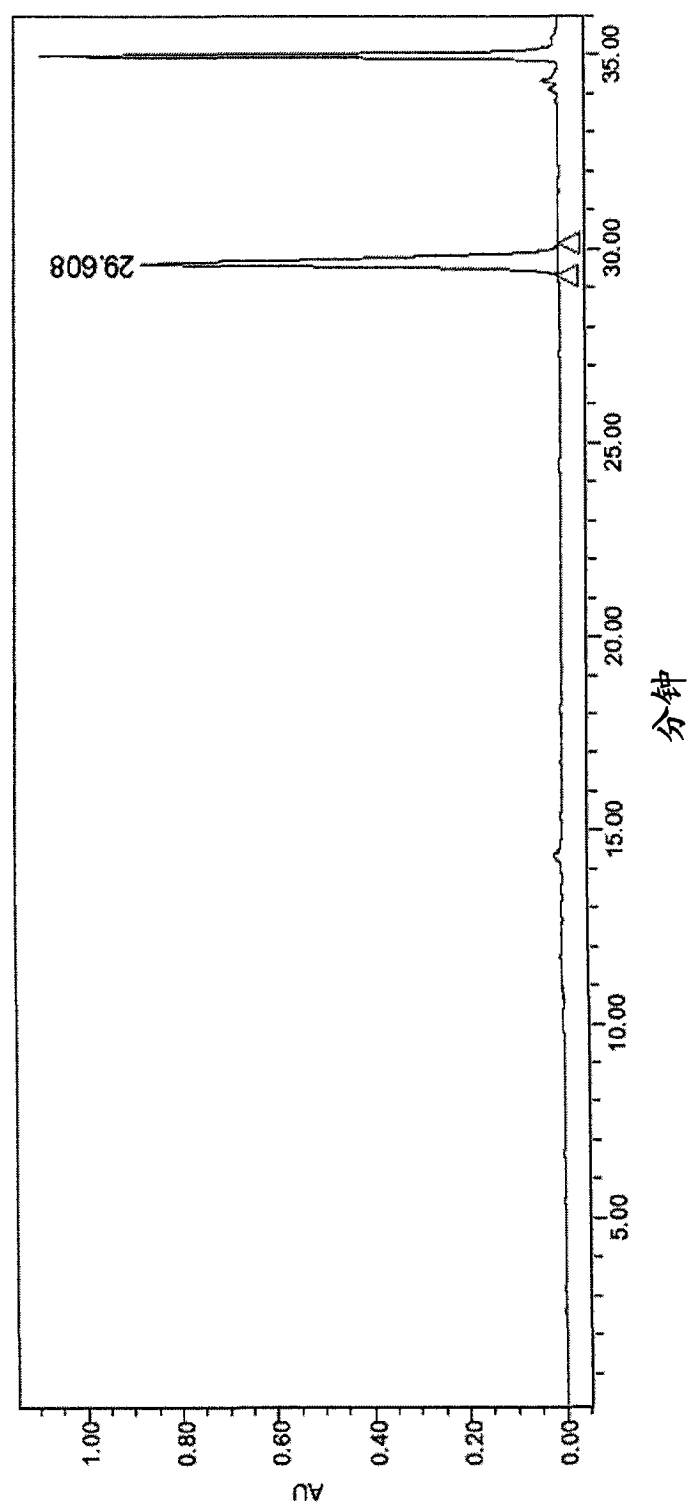


图 24

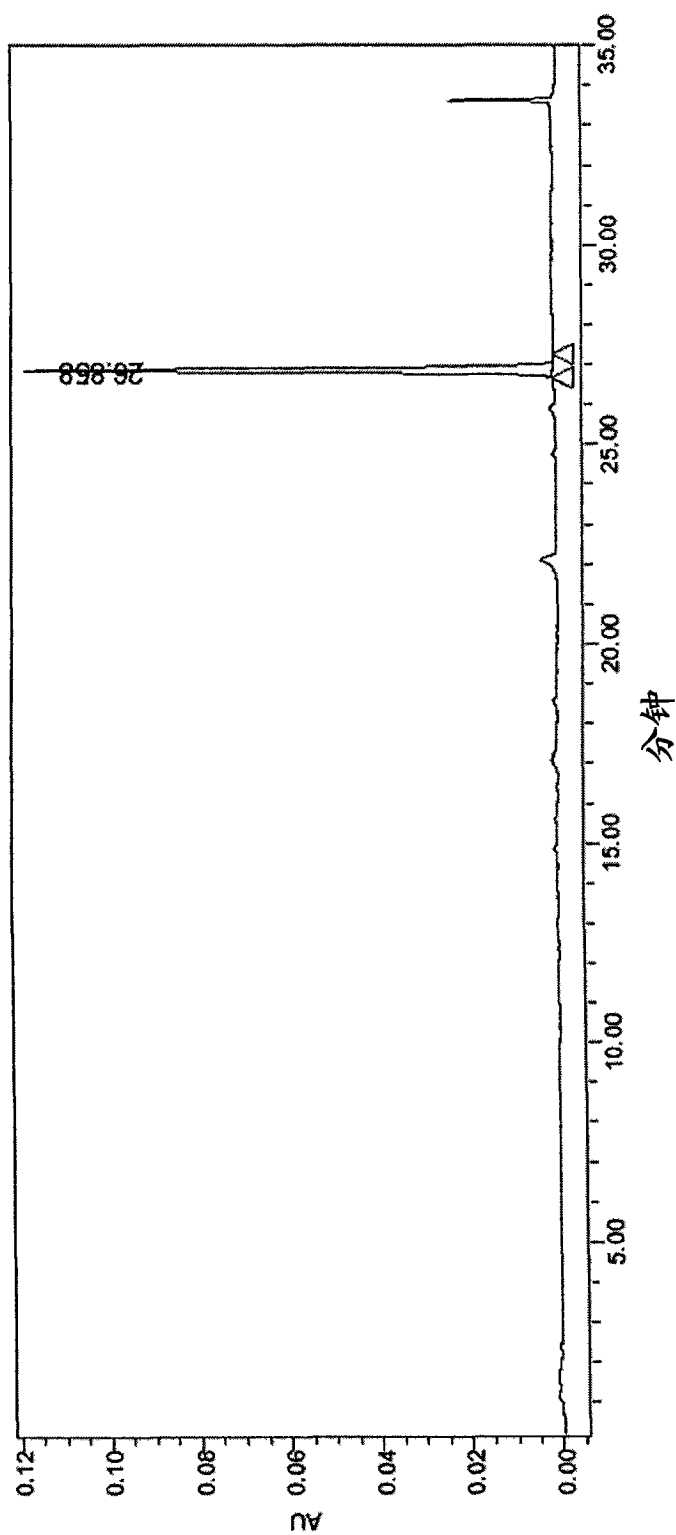


图 25

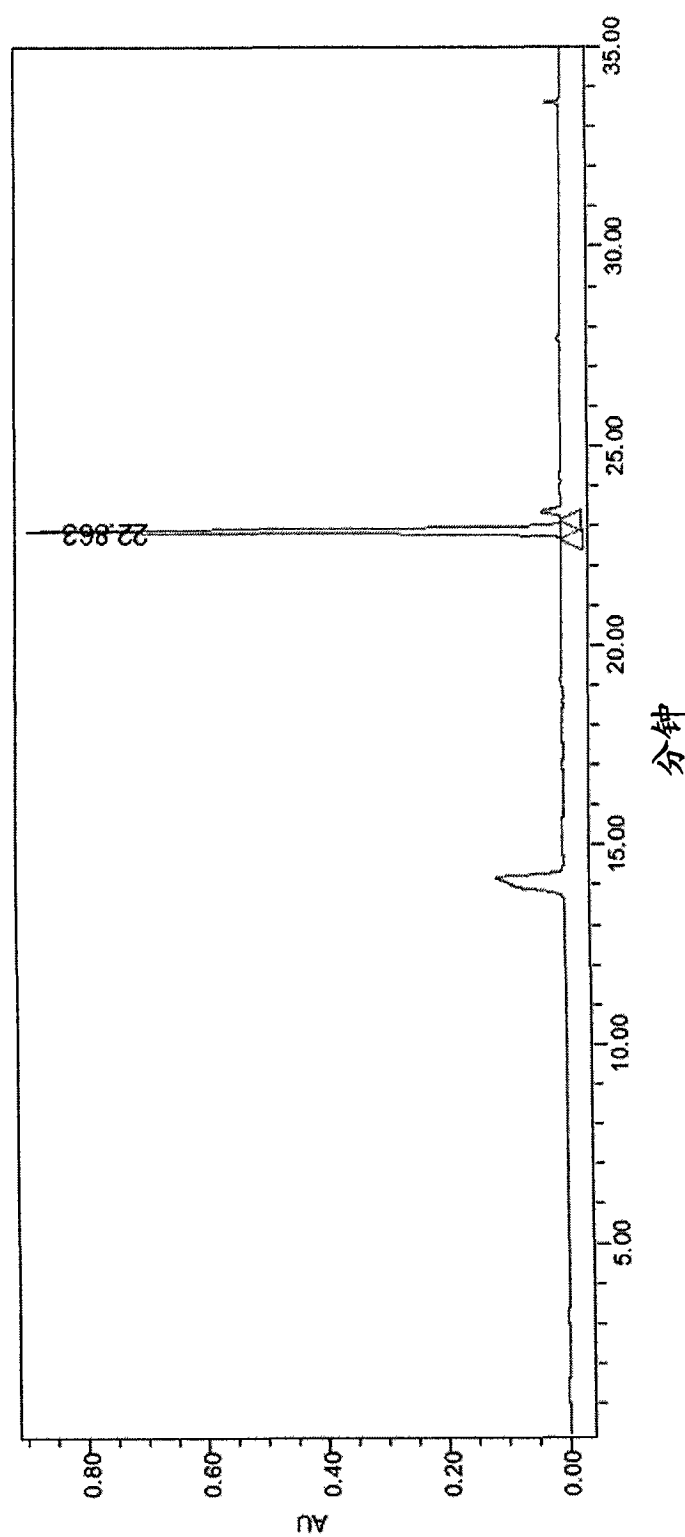


图 26

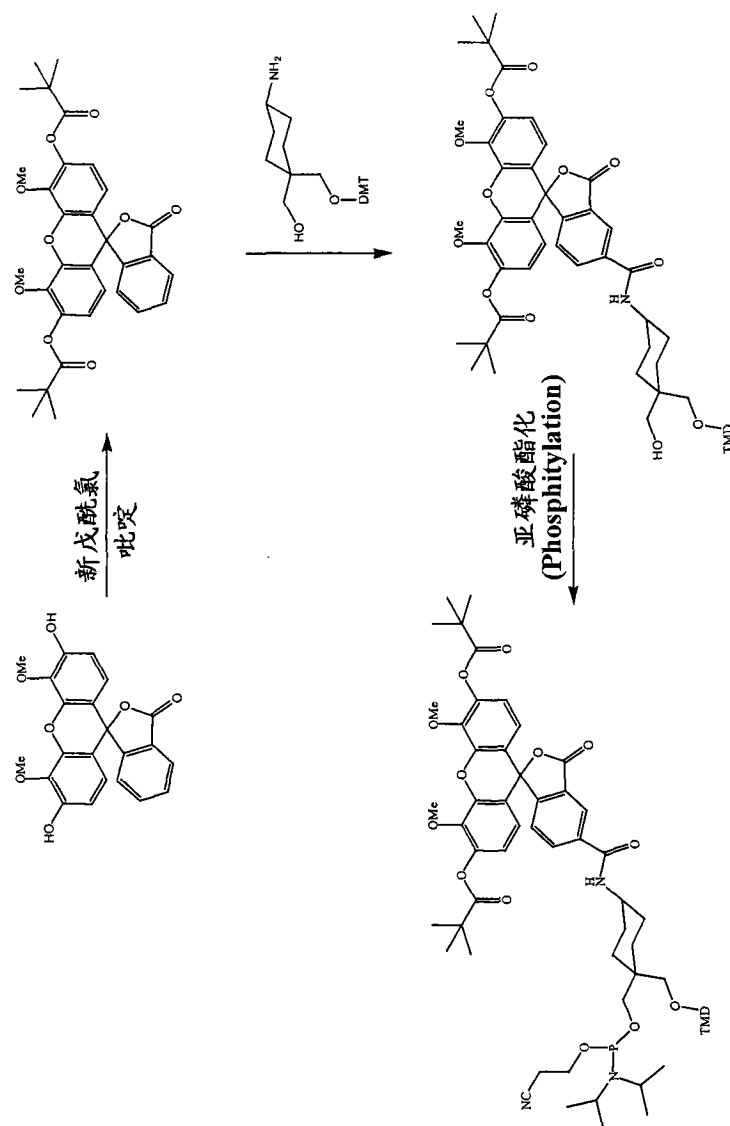


图 27

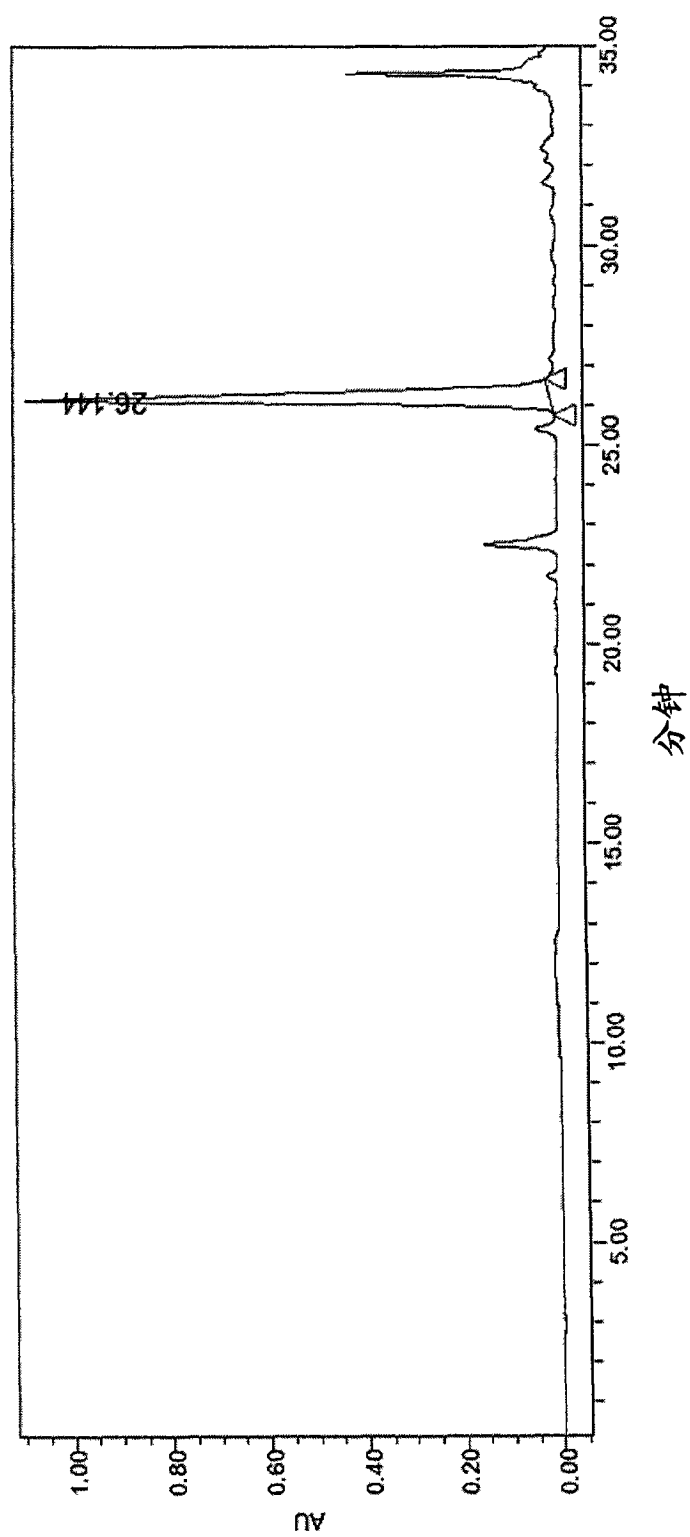


图 28

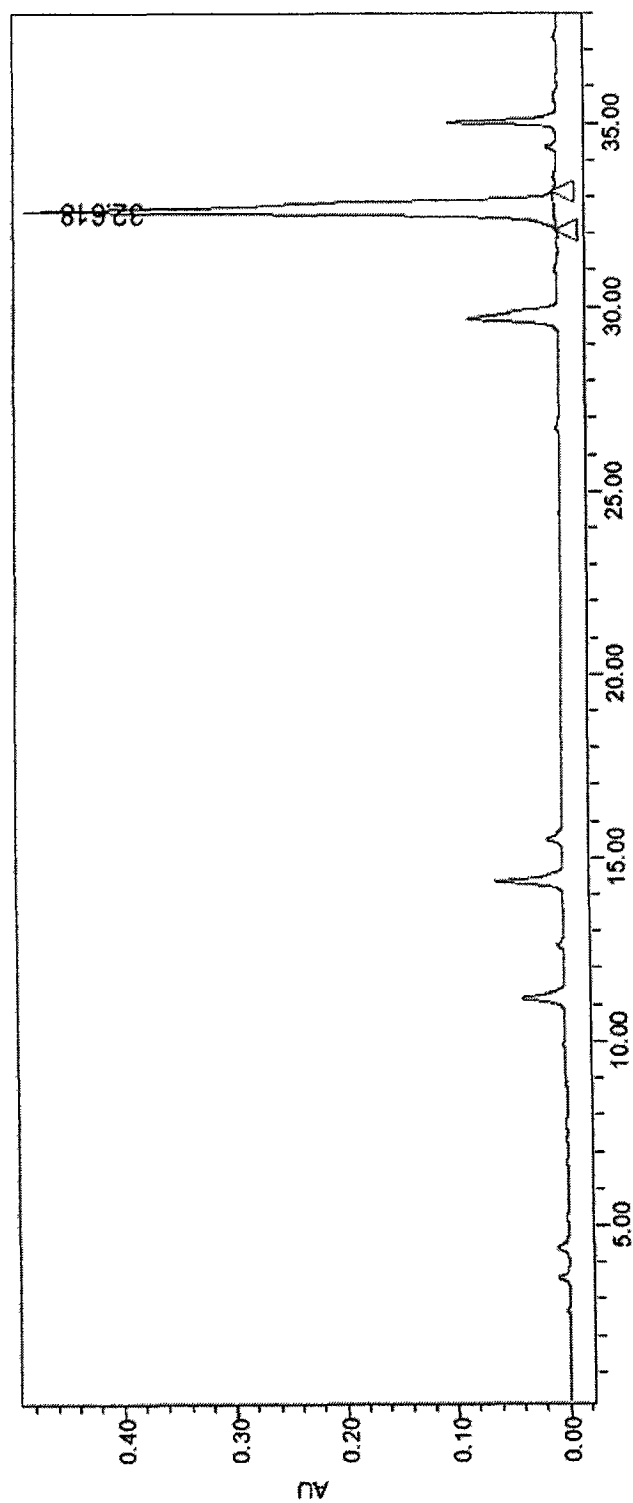


图 29

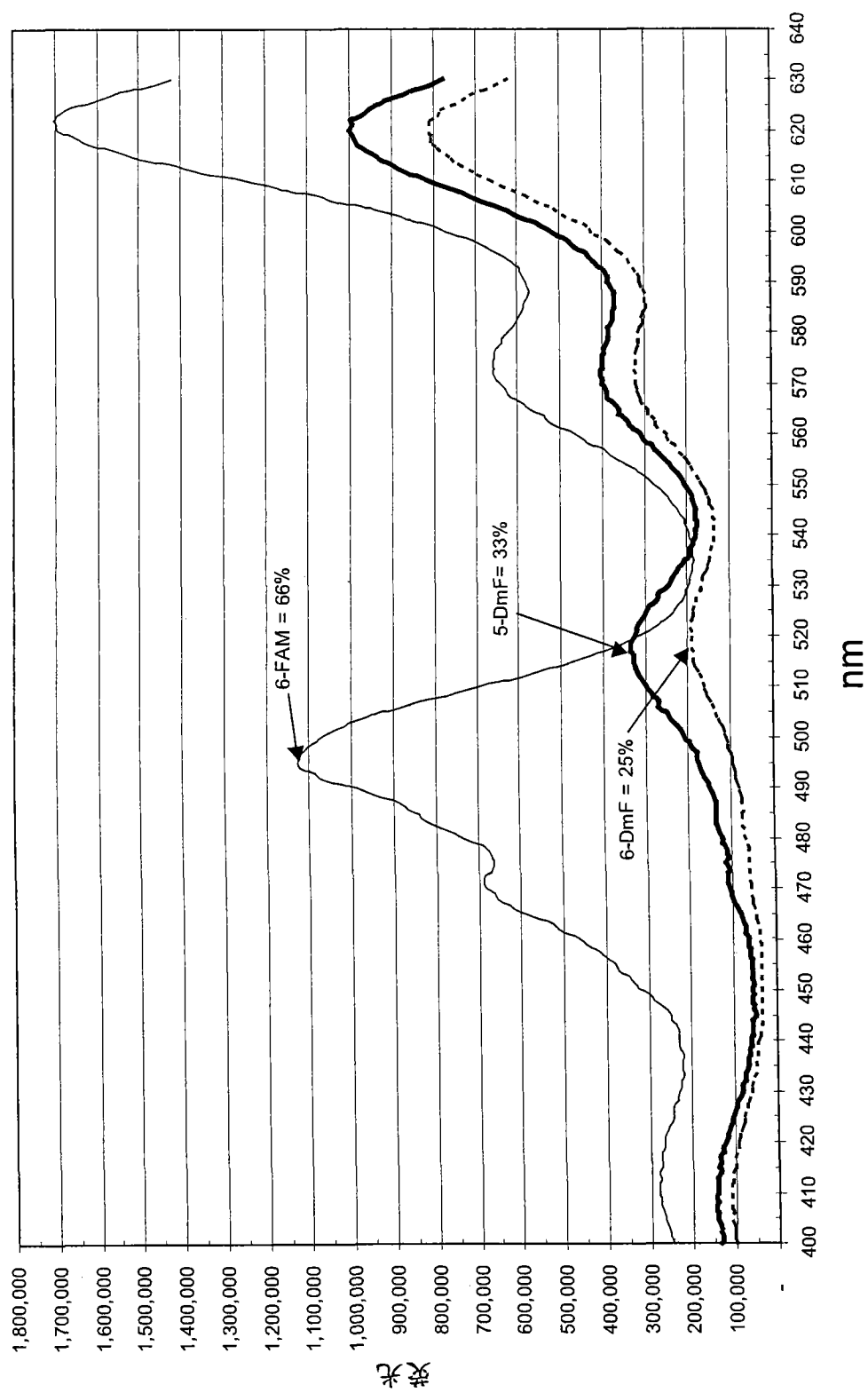


图 30

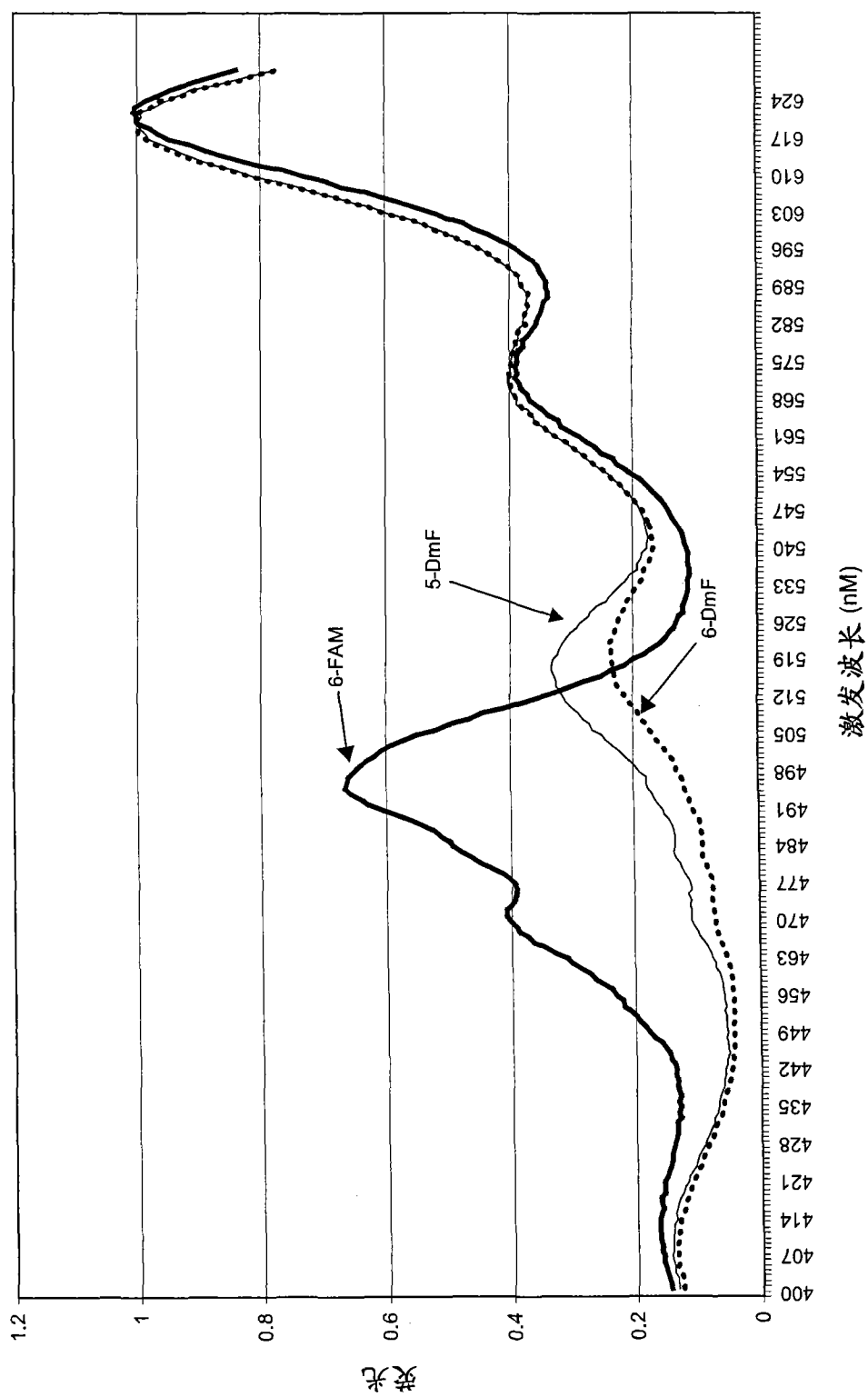
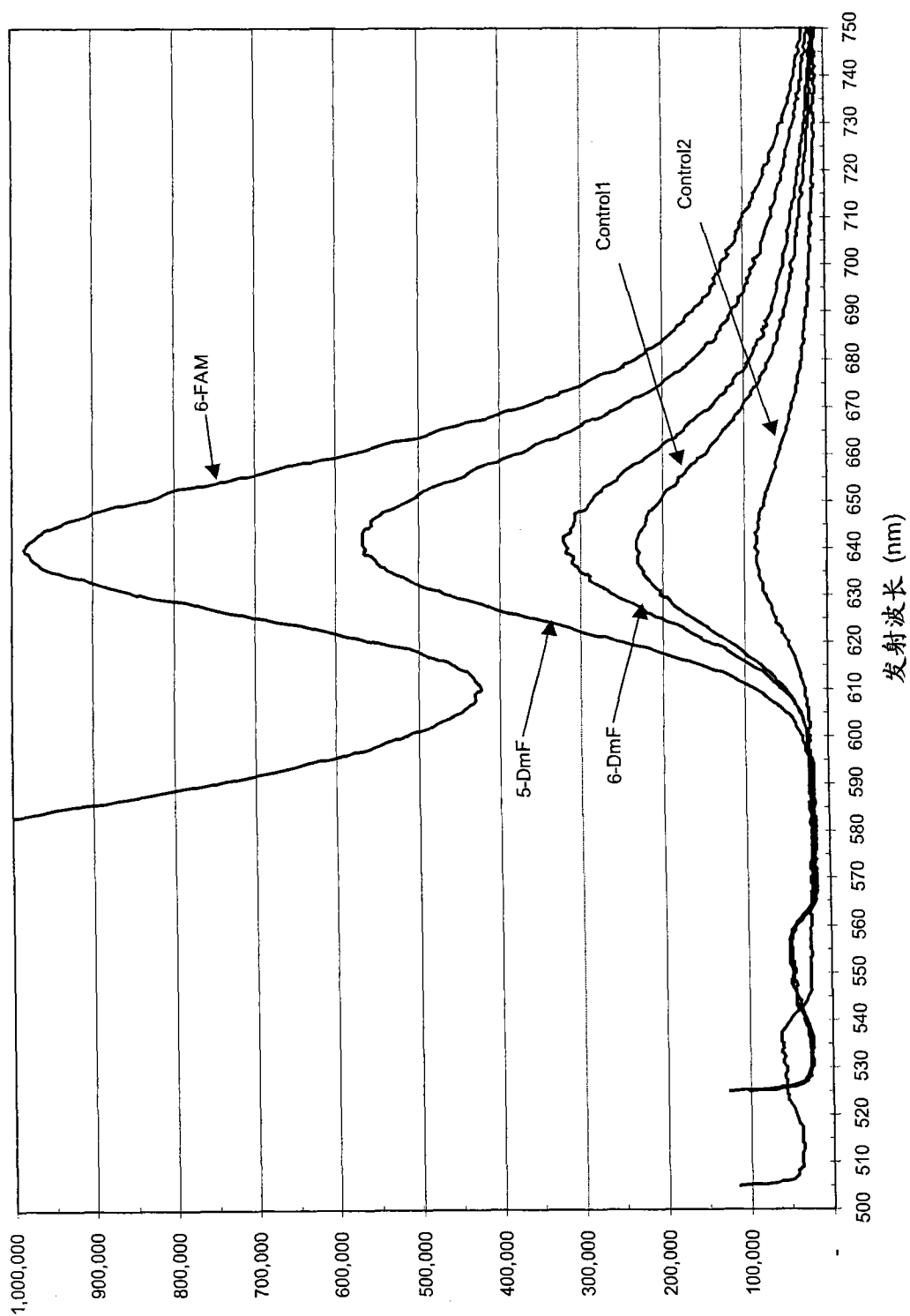


图 31



发射波长 (nm)

图 32

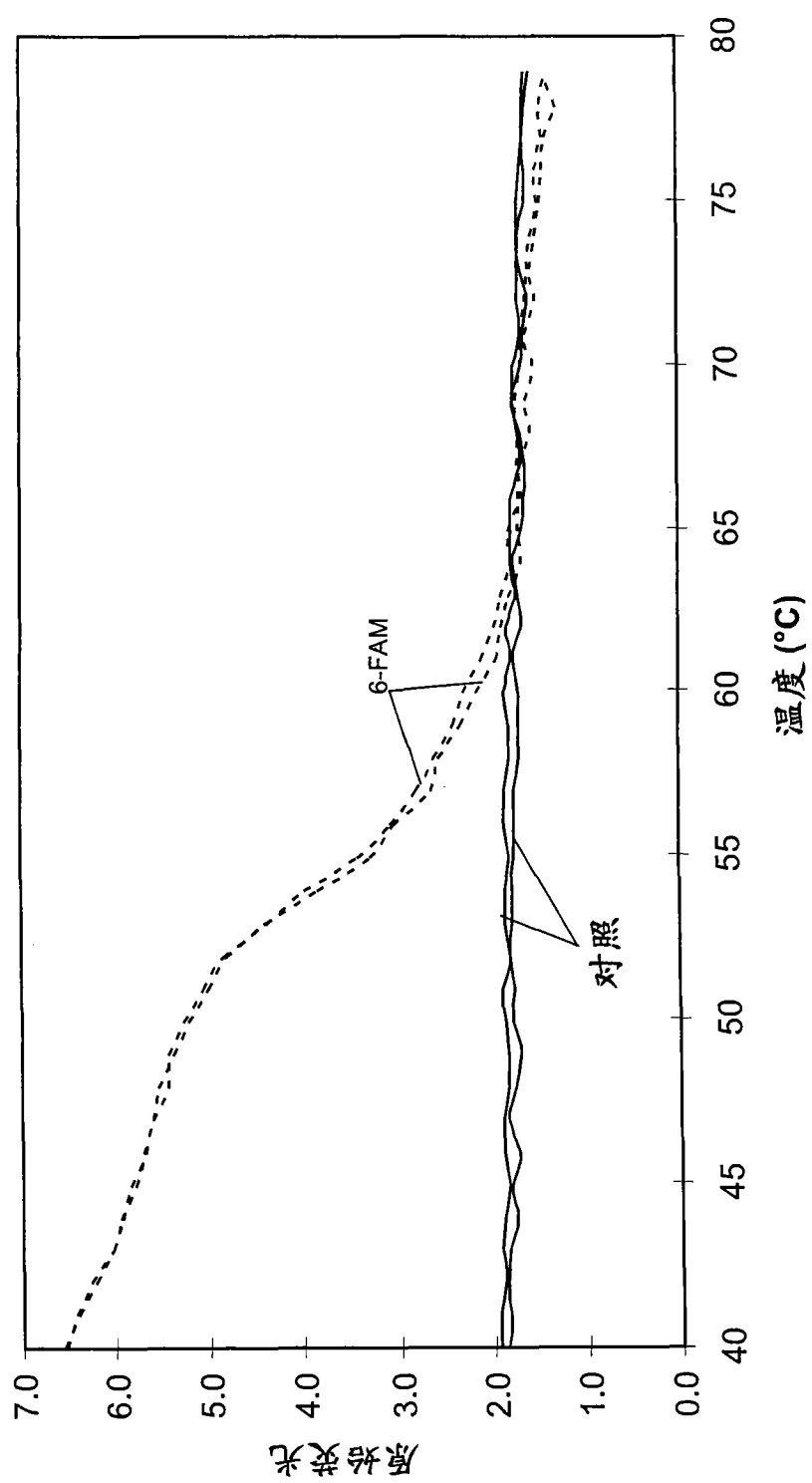


图 33

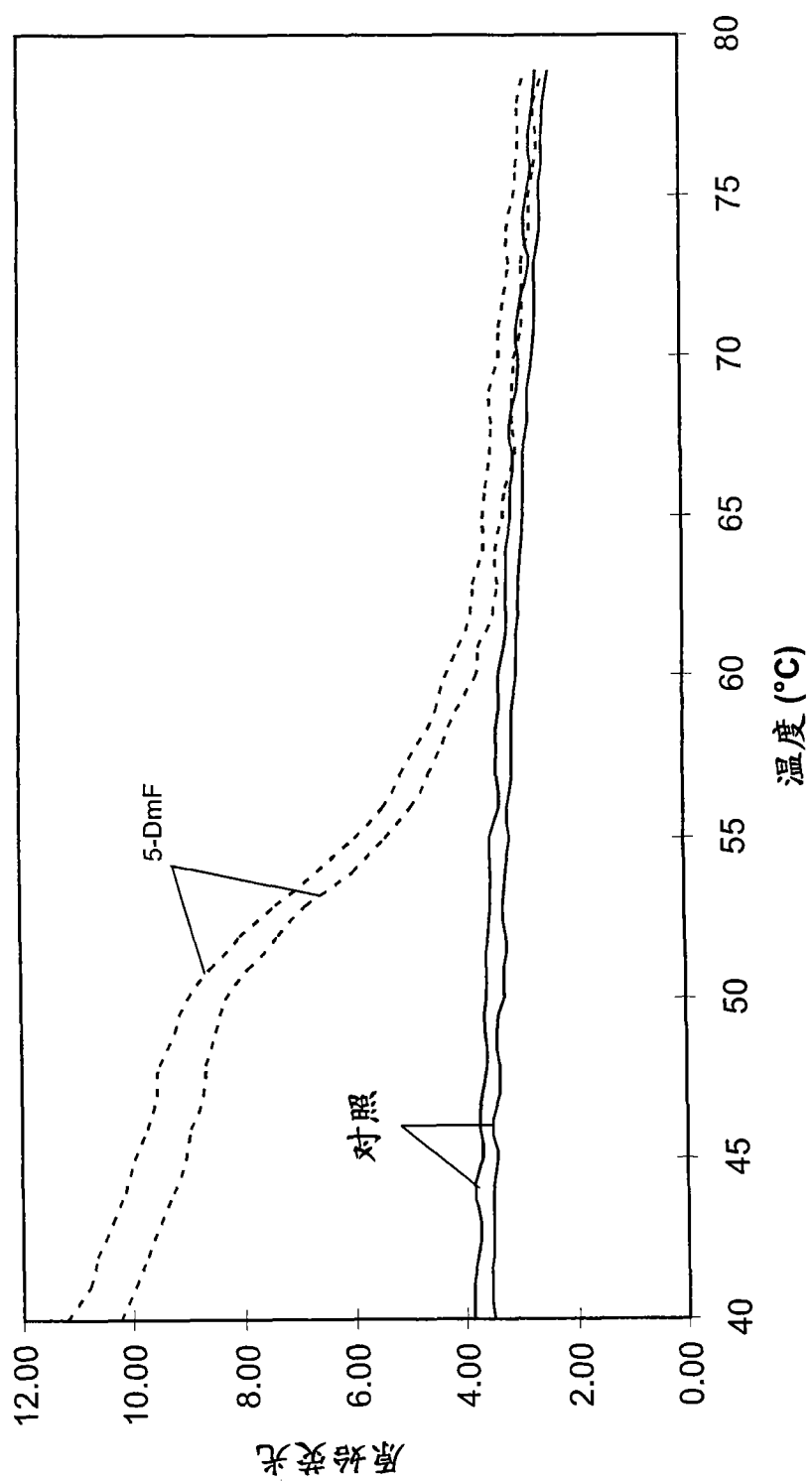


图 34

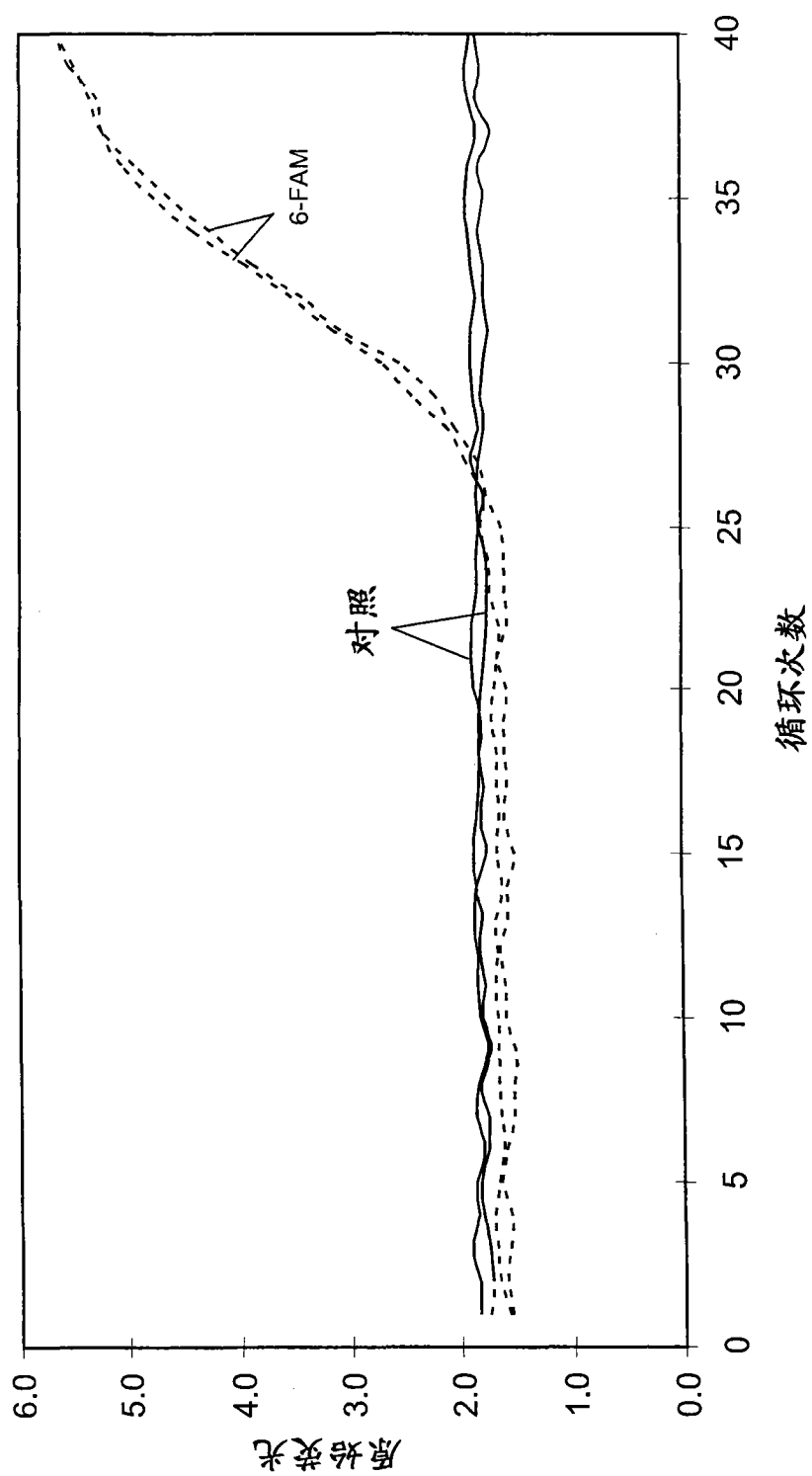


图 35

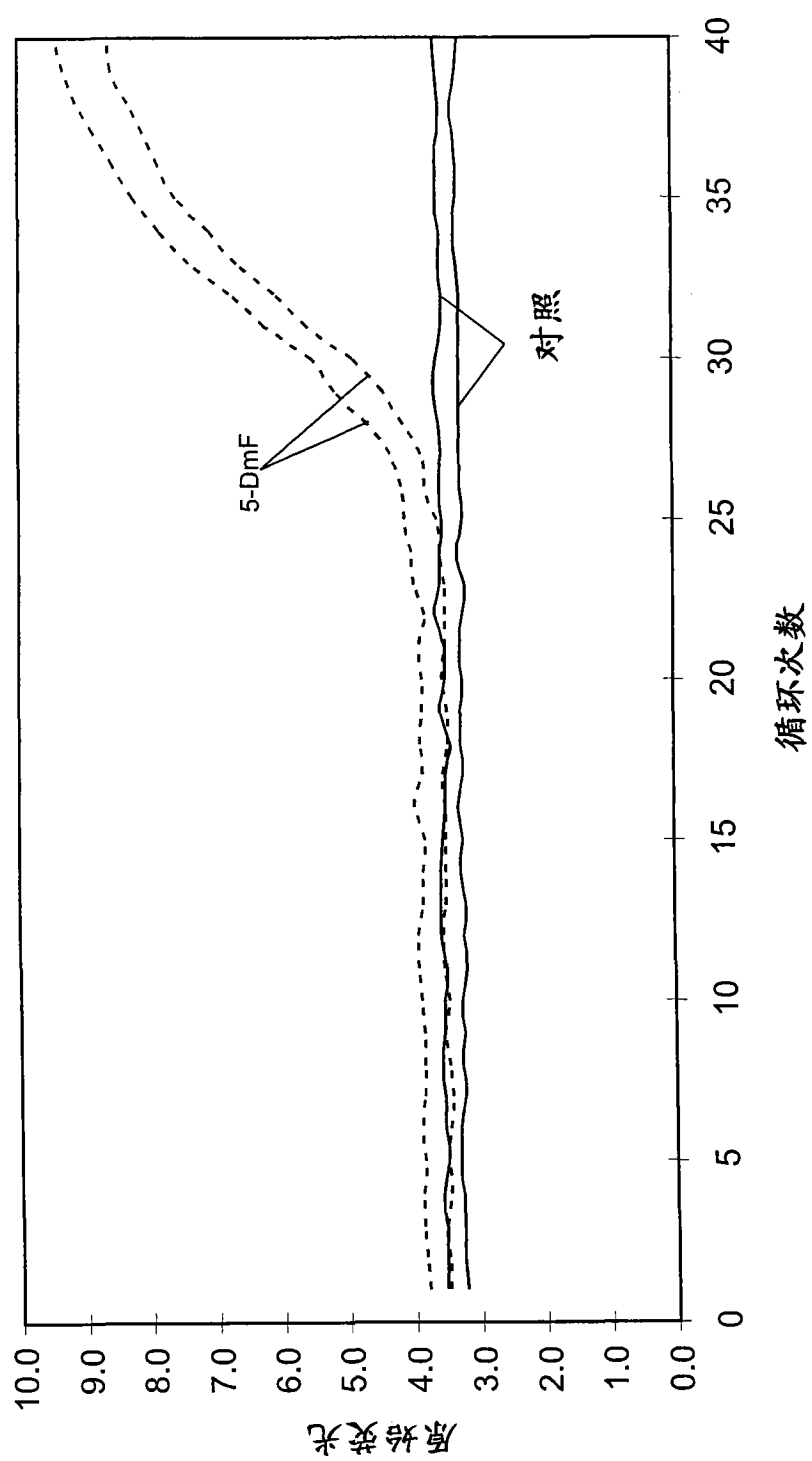


图 36

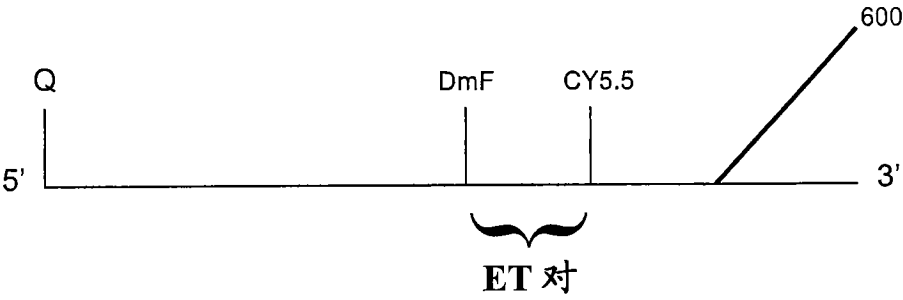


图 37A

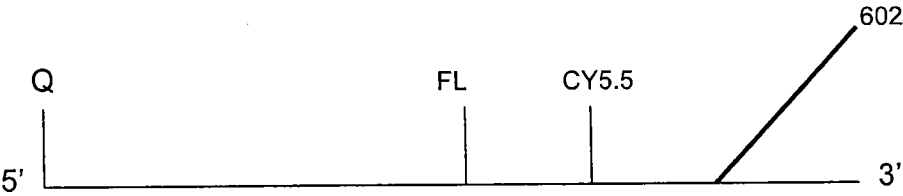


图 37B

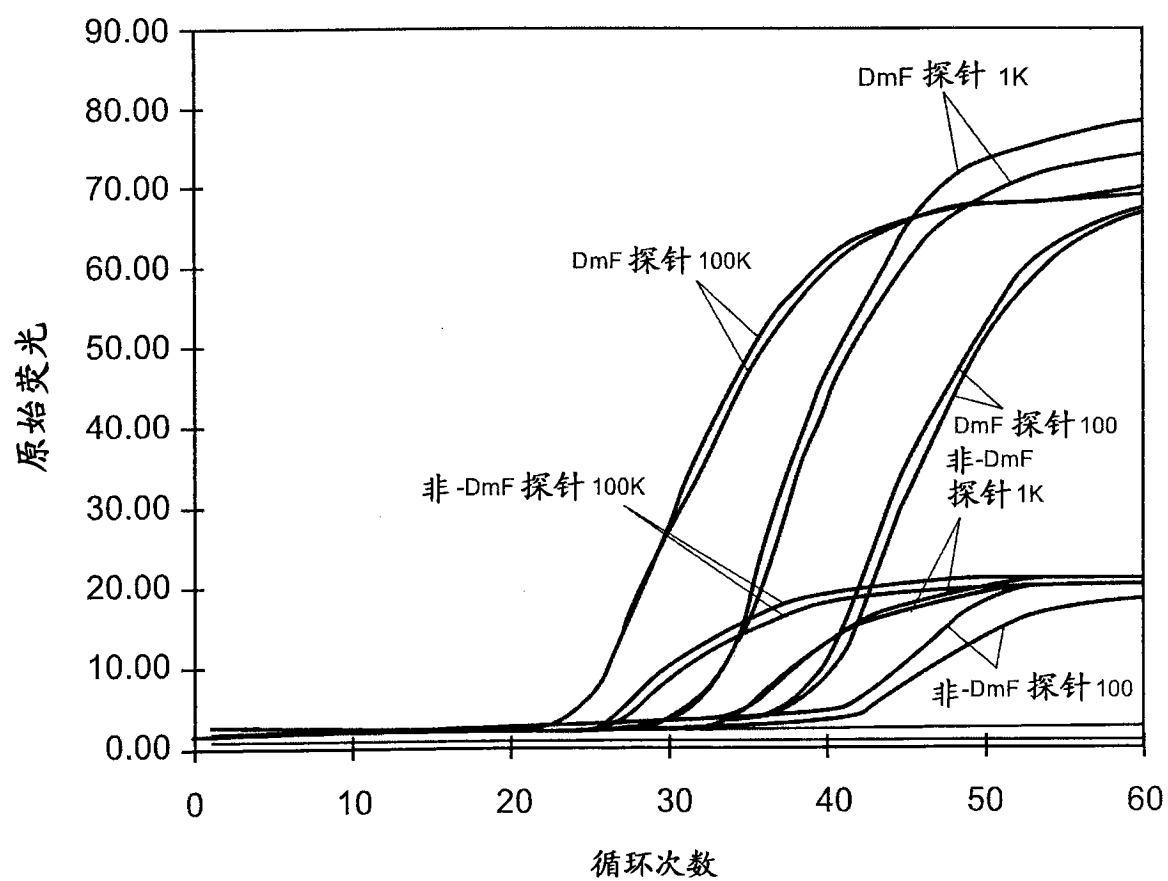


图 38

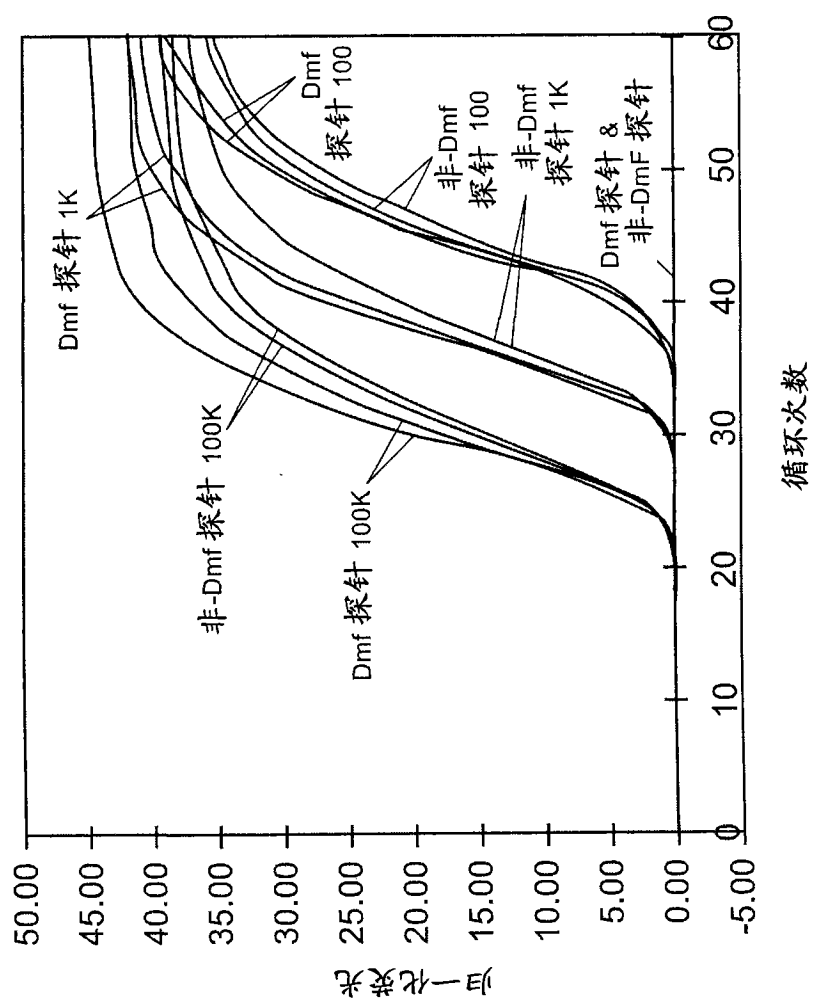


图 39

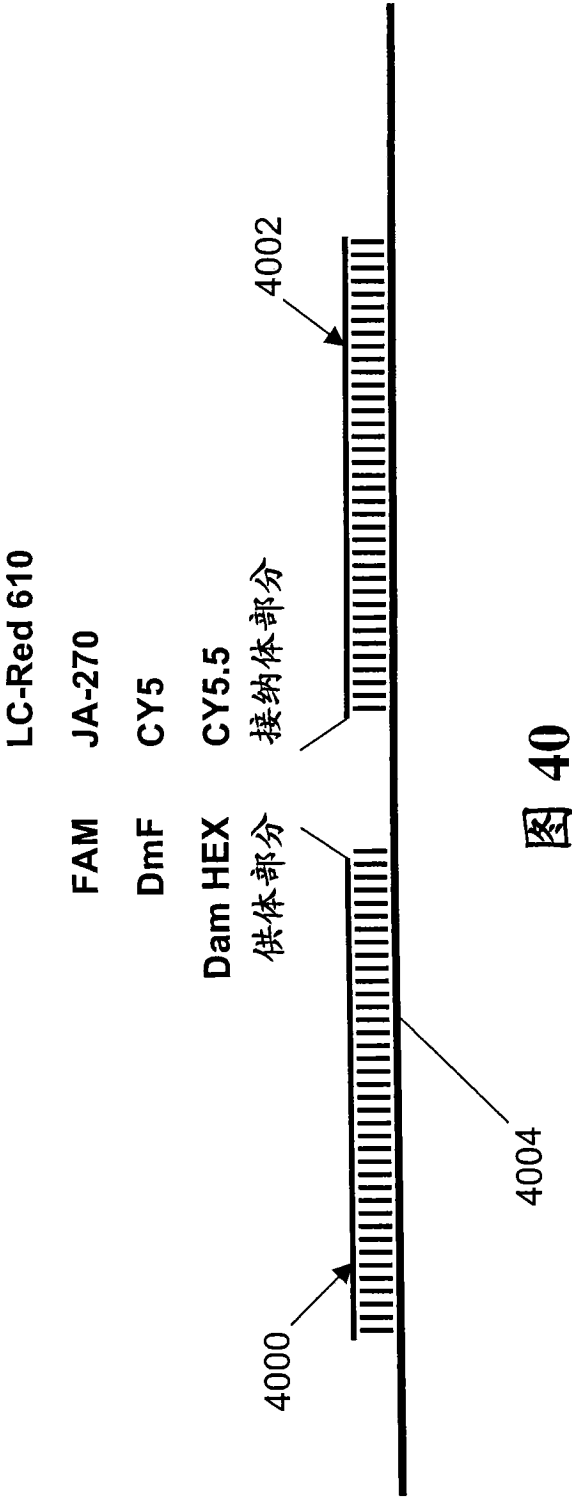


图 40

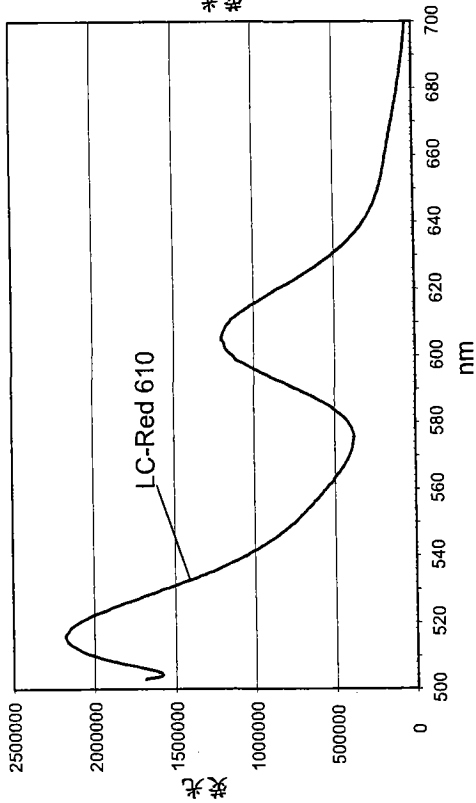


图 41A

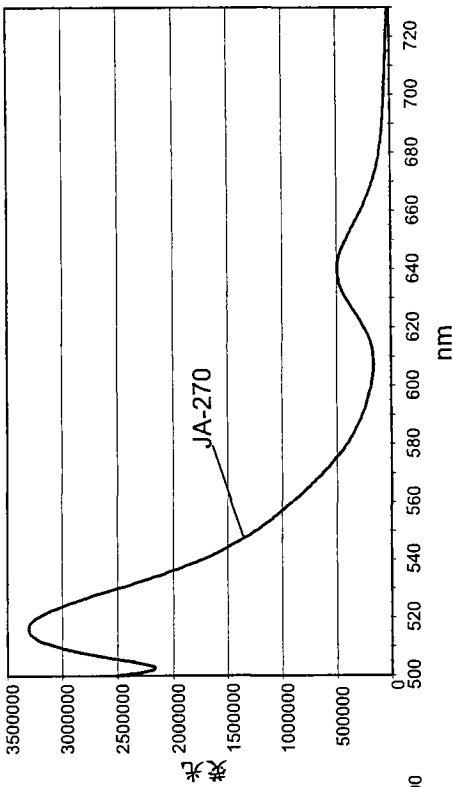


图 41B

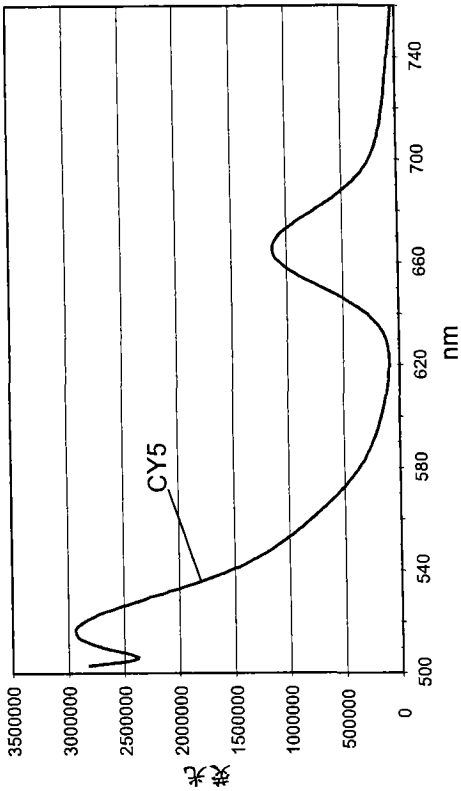


图 41C

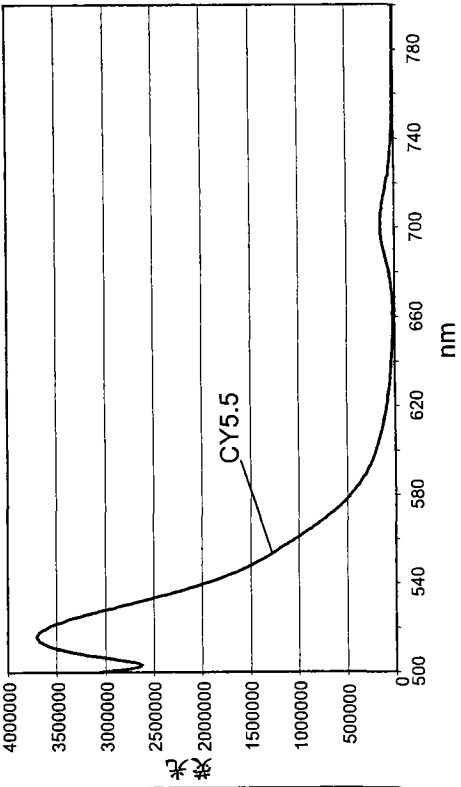


图 41D

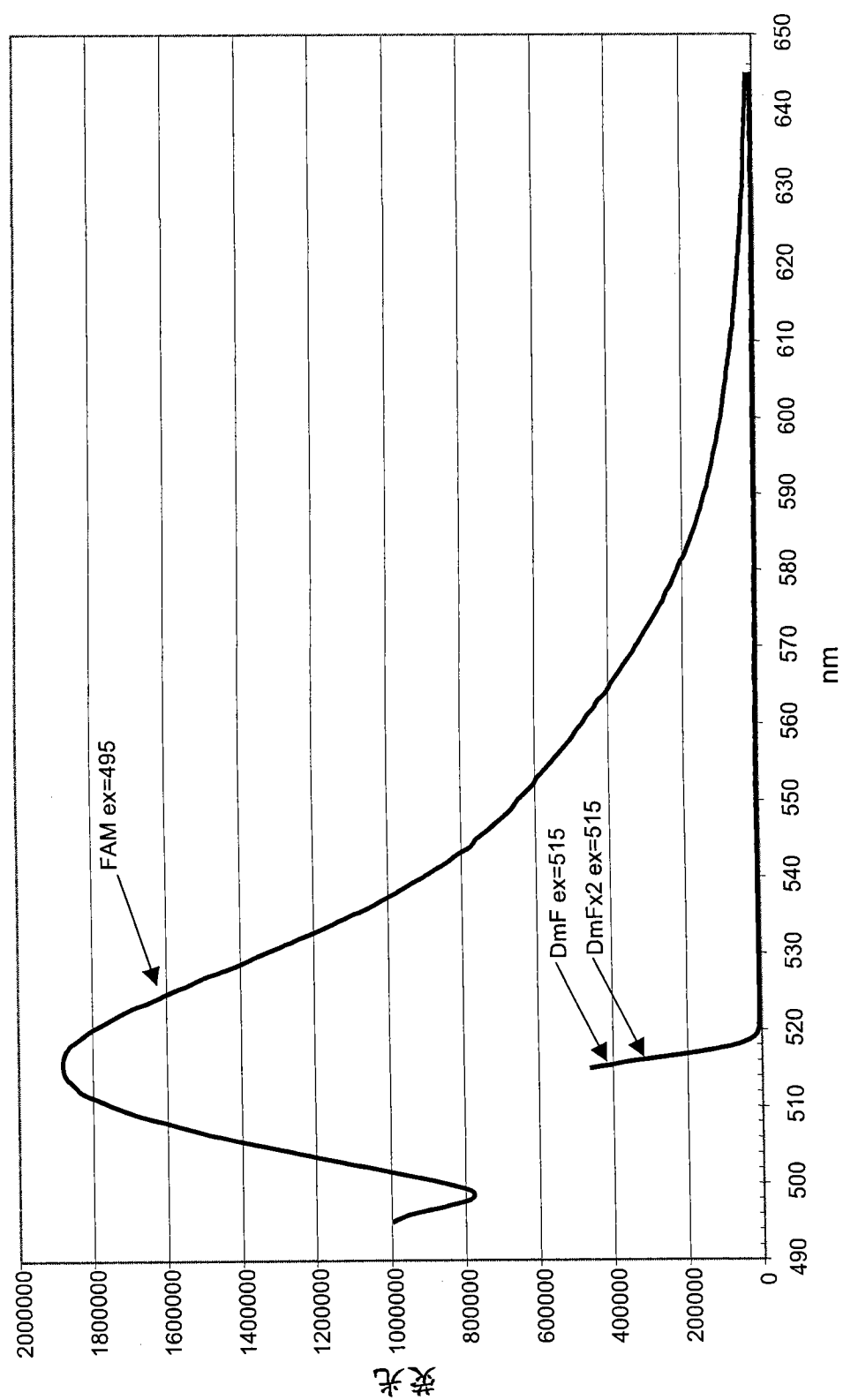


图 42A

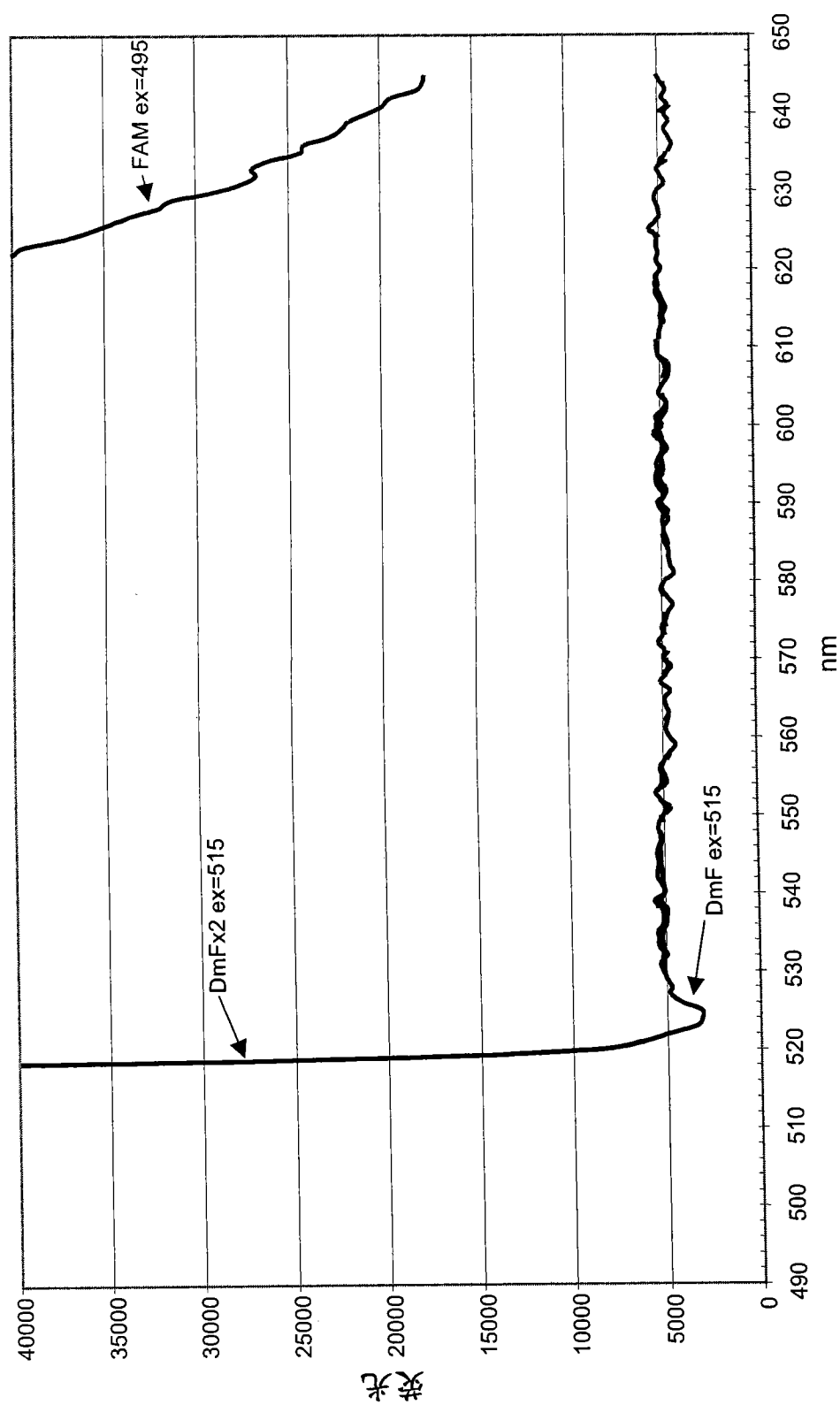


图 42B

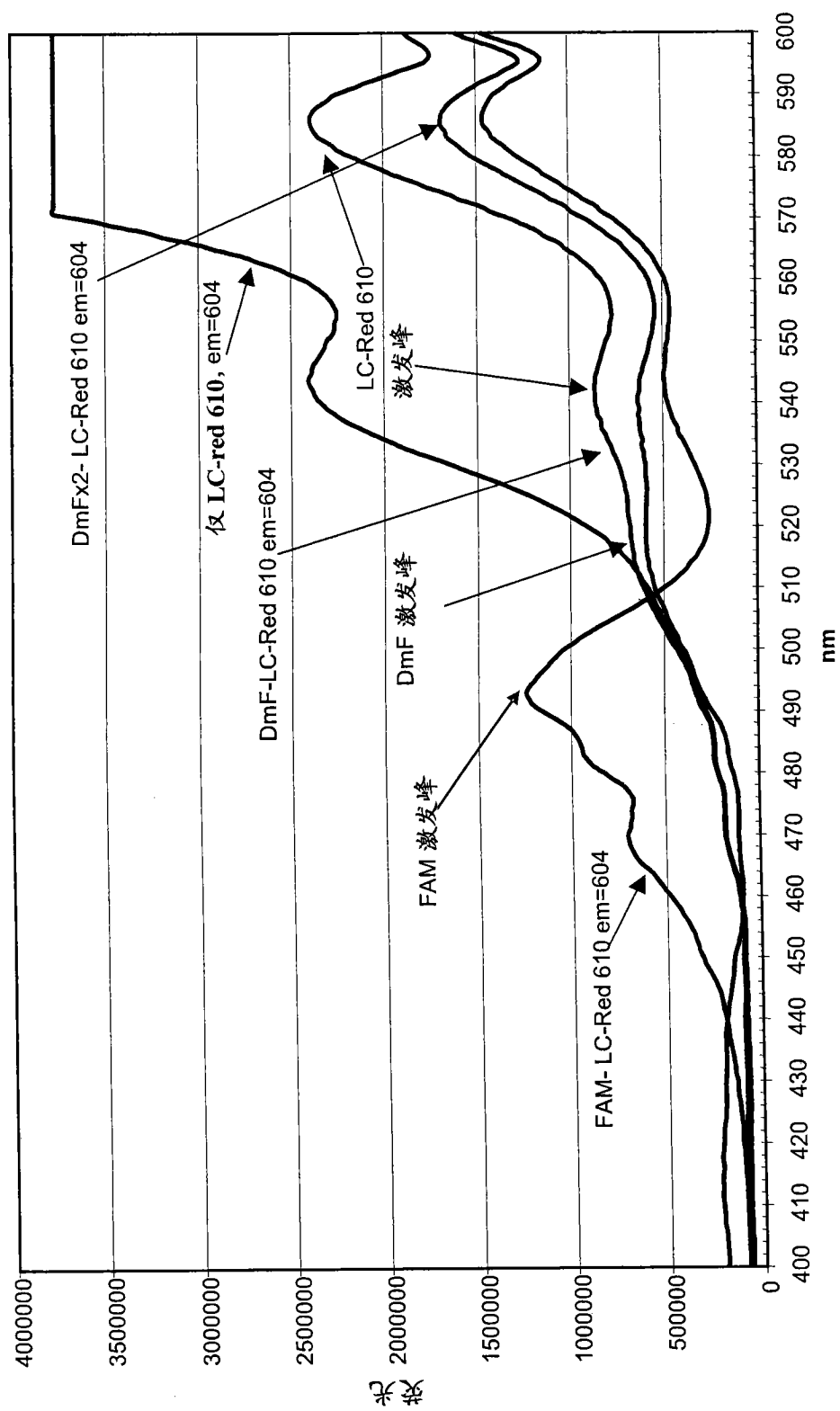


图 43A

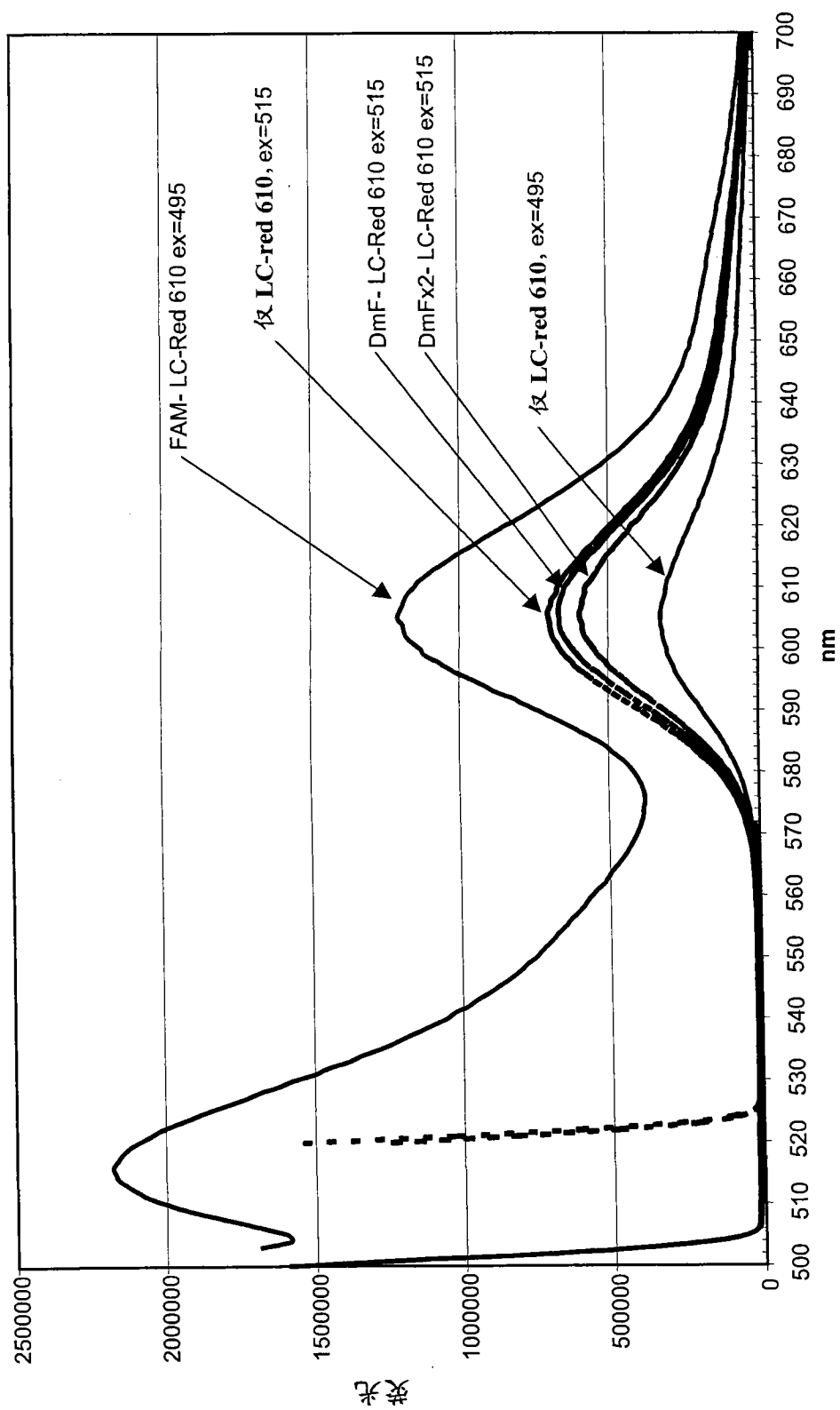


图 43B

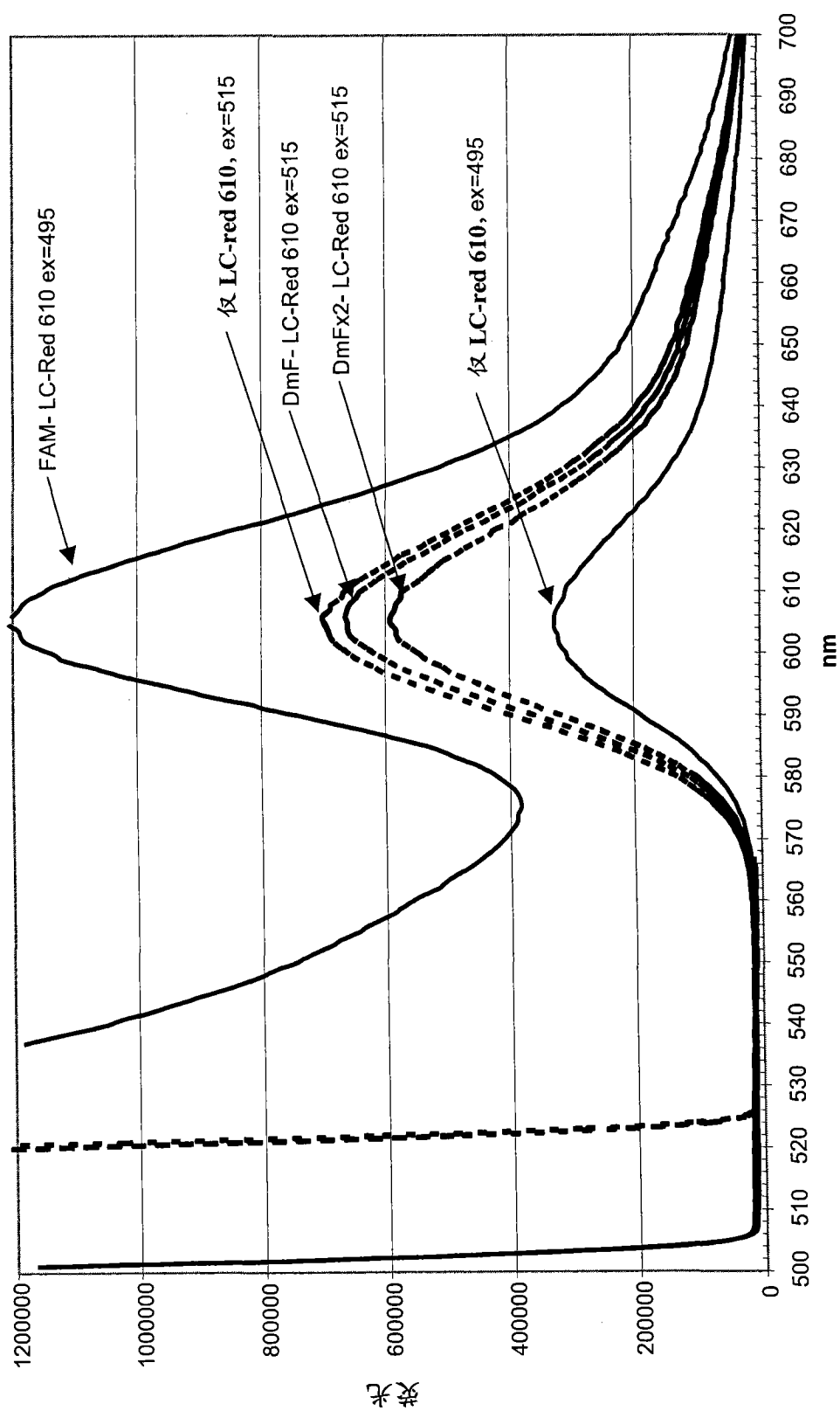


图 43C

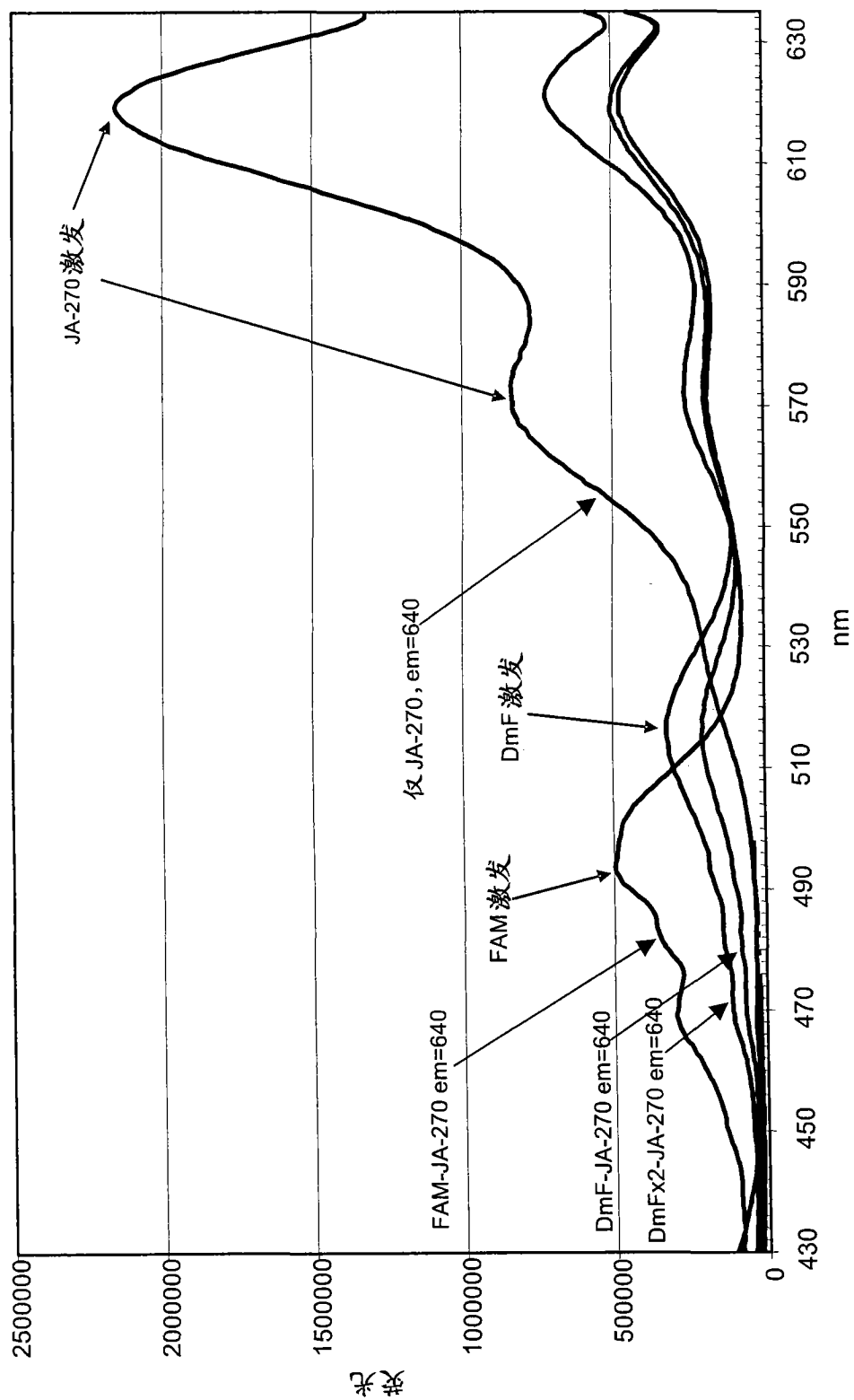


图 44A

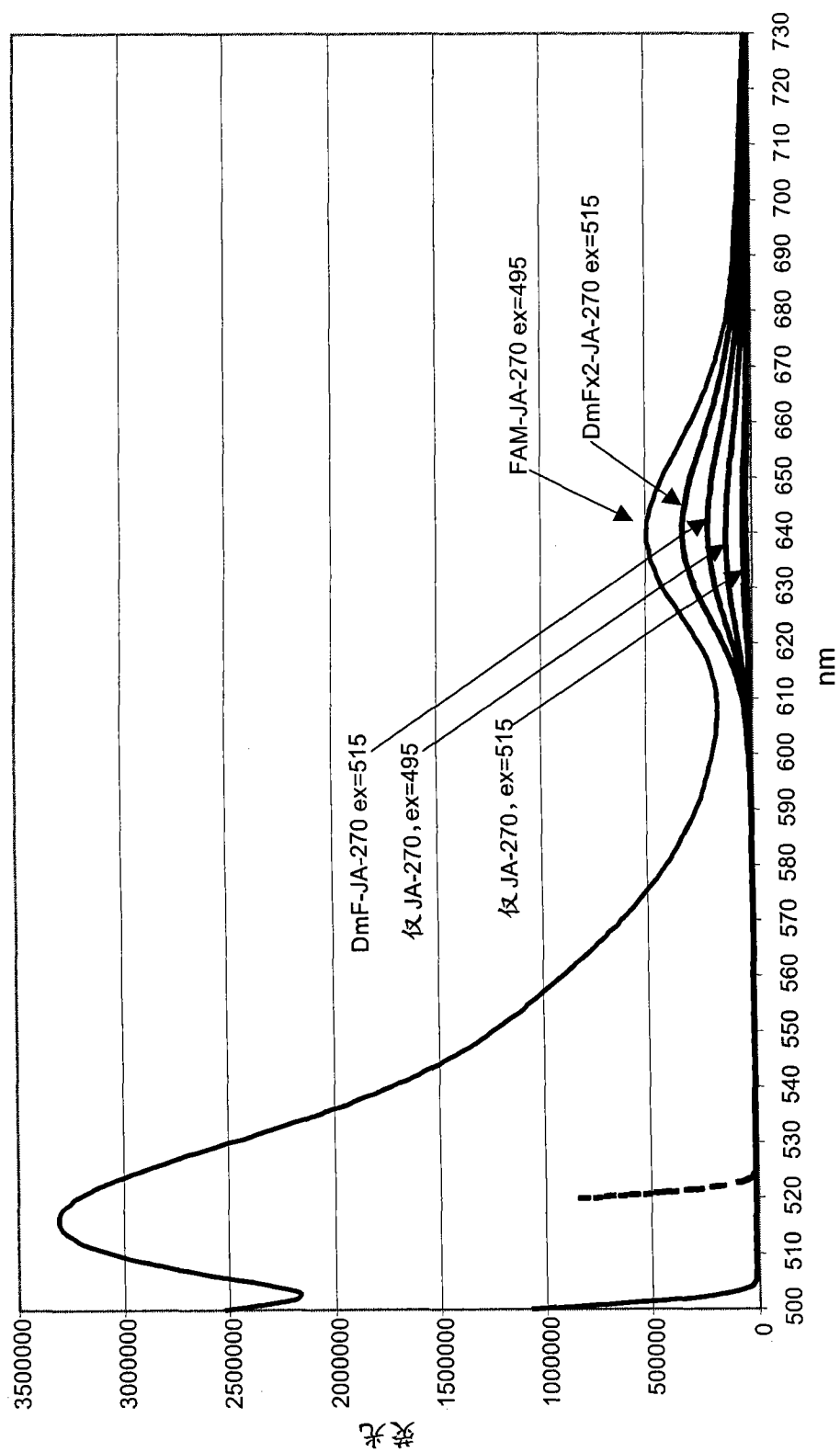
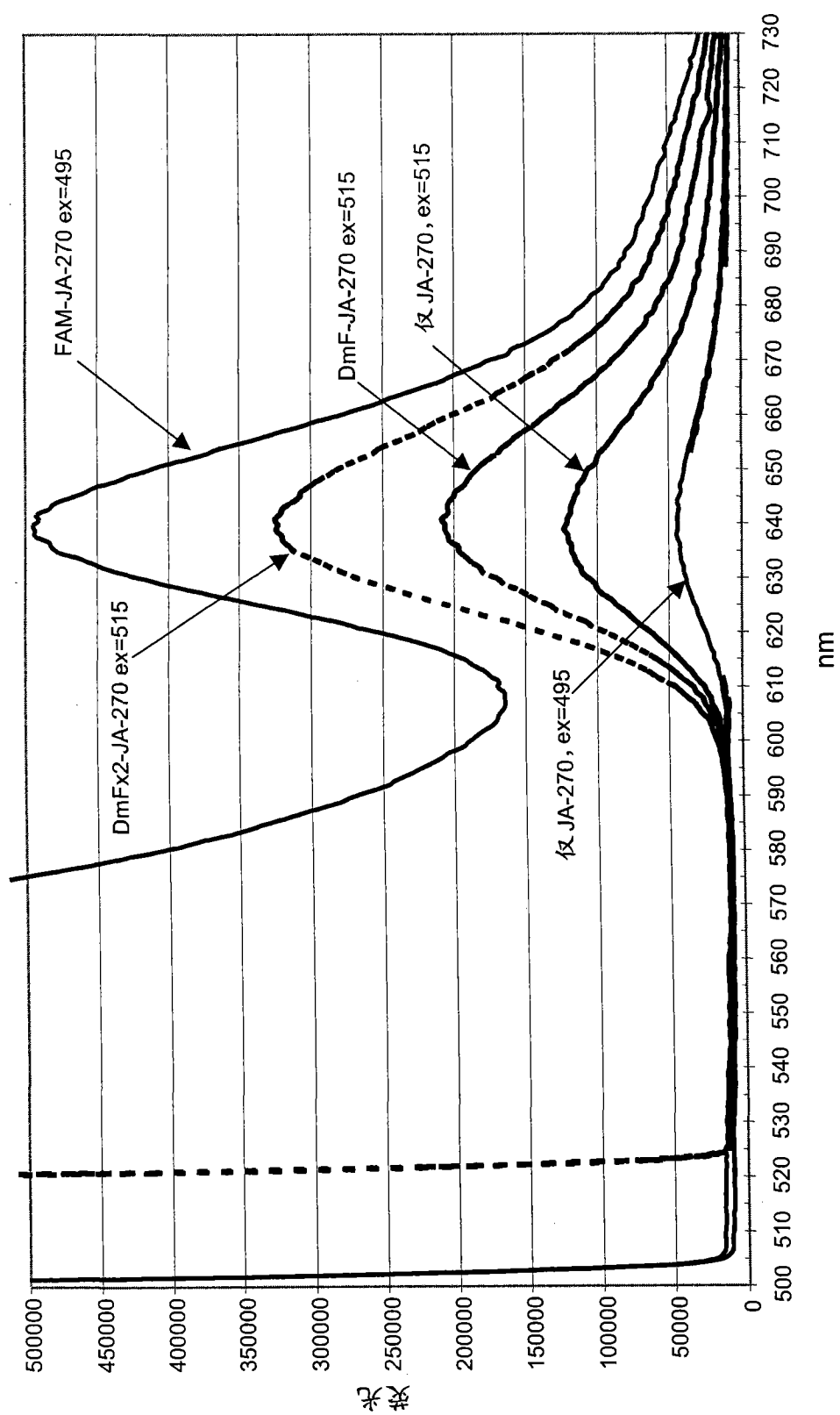


图 44B



nm

图 44C

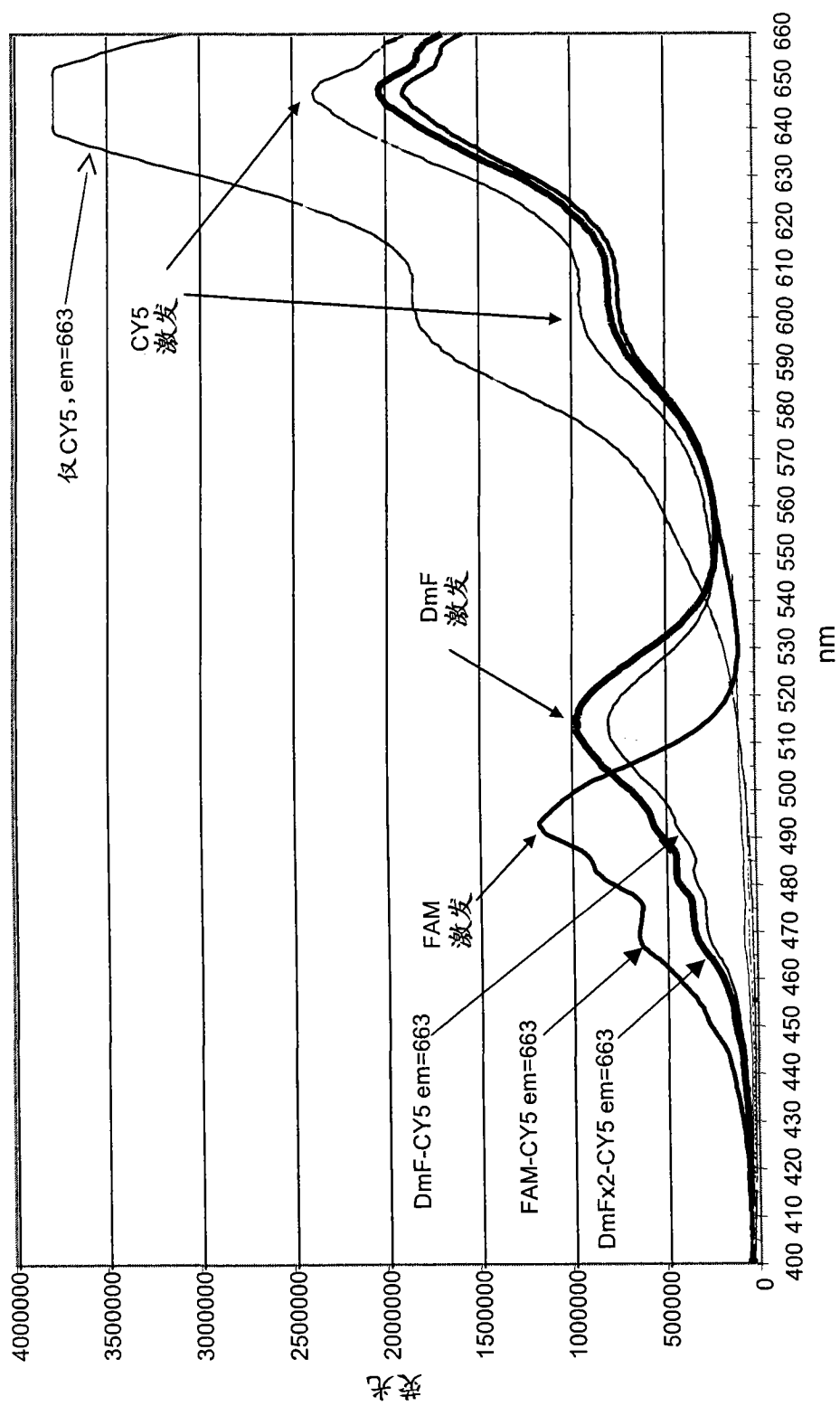


图 45A

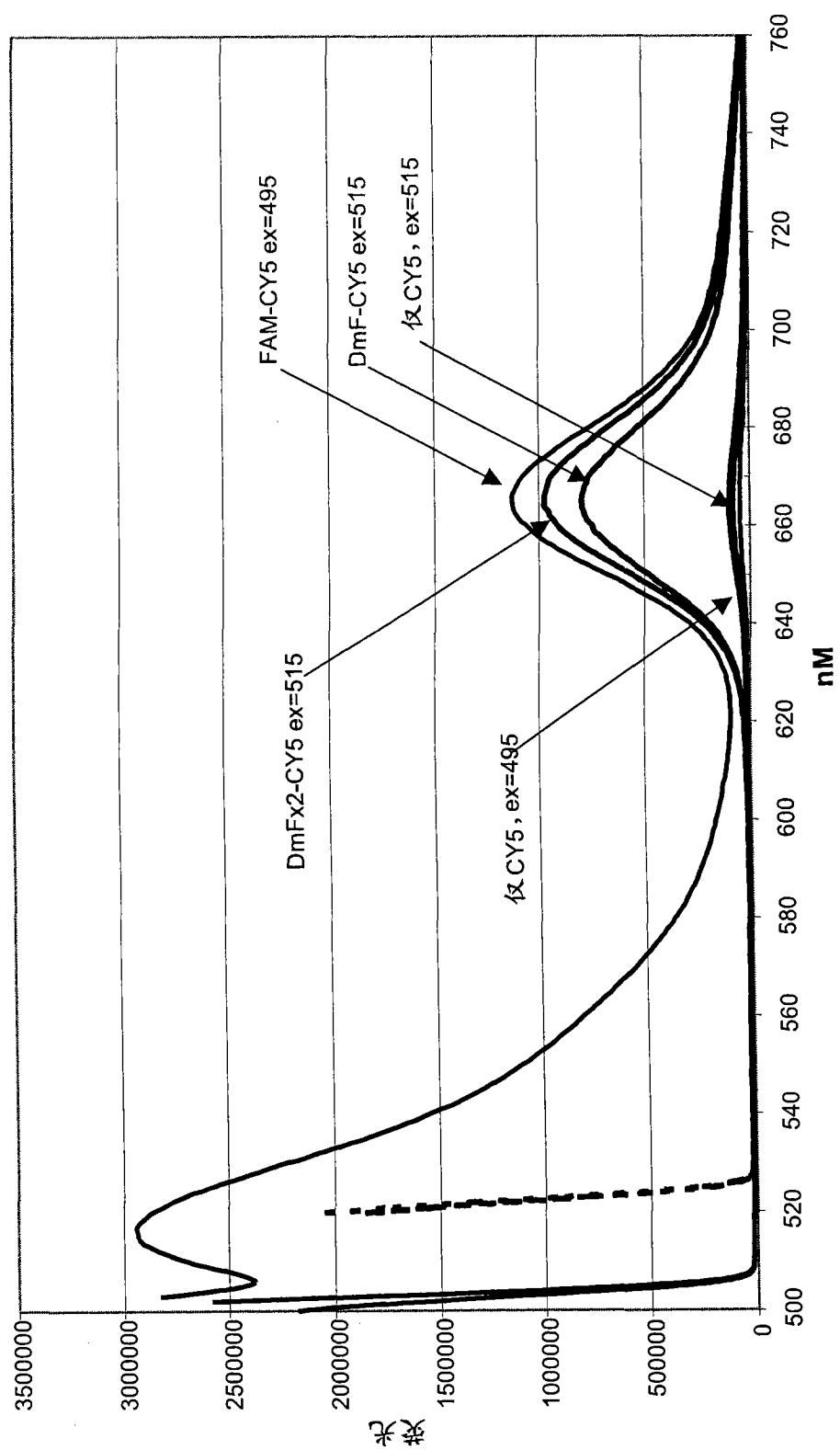


图 45B

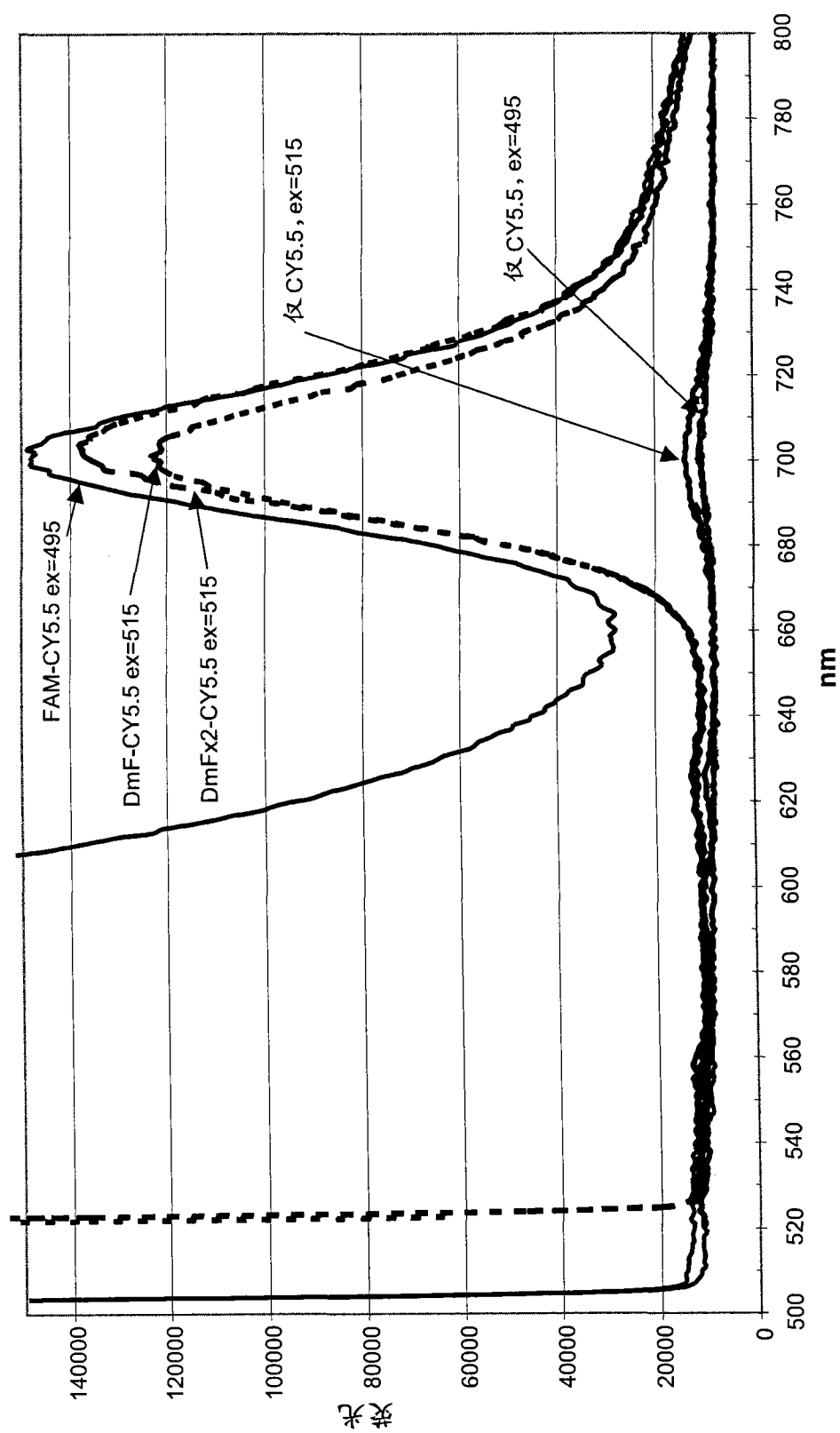


图 45C

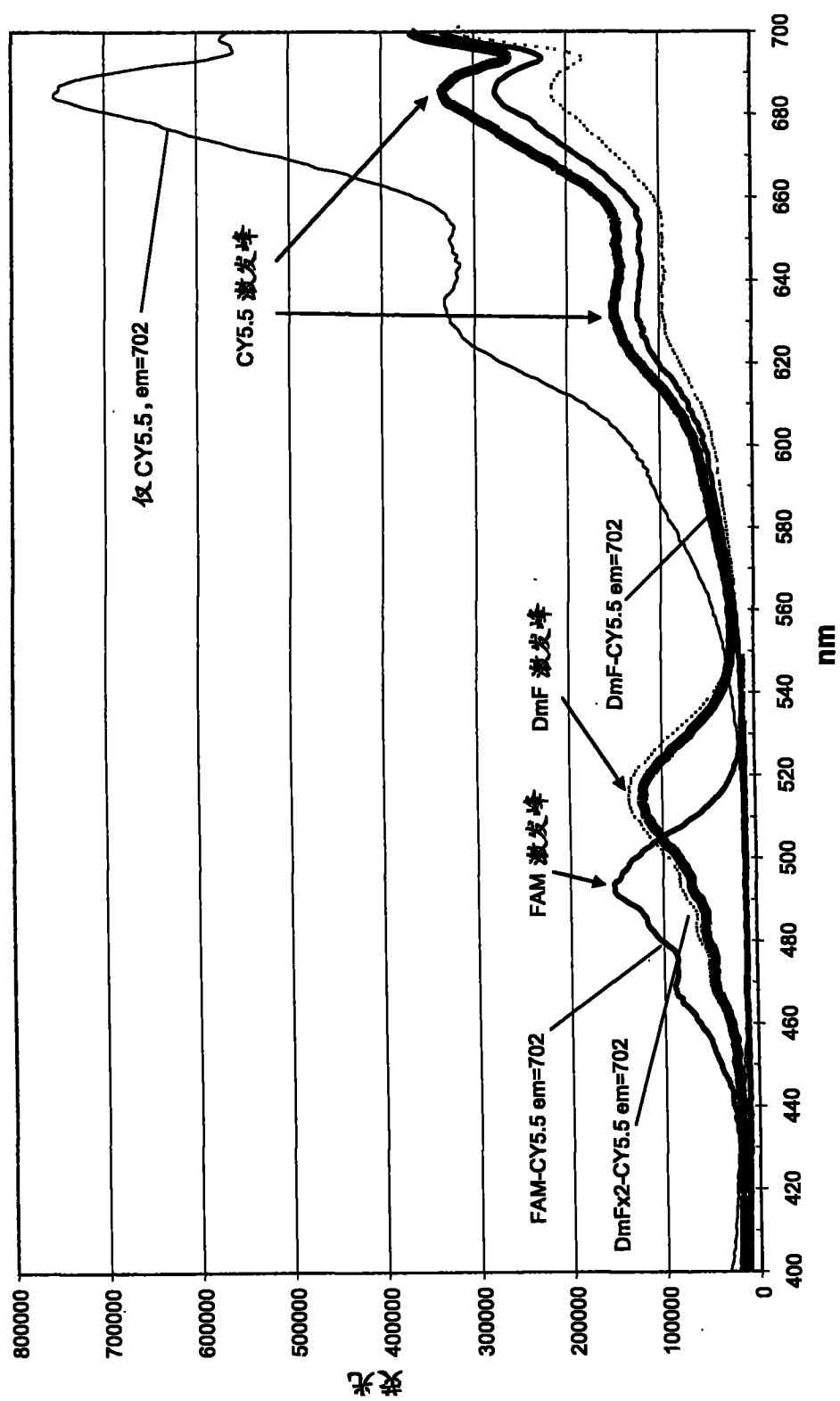


图 46A

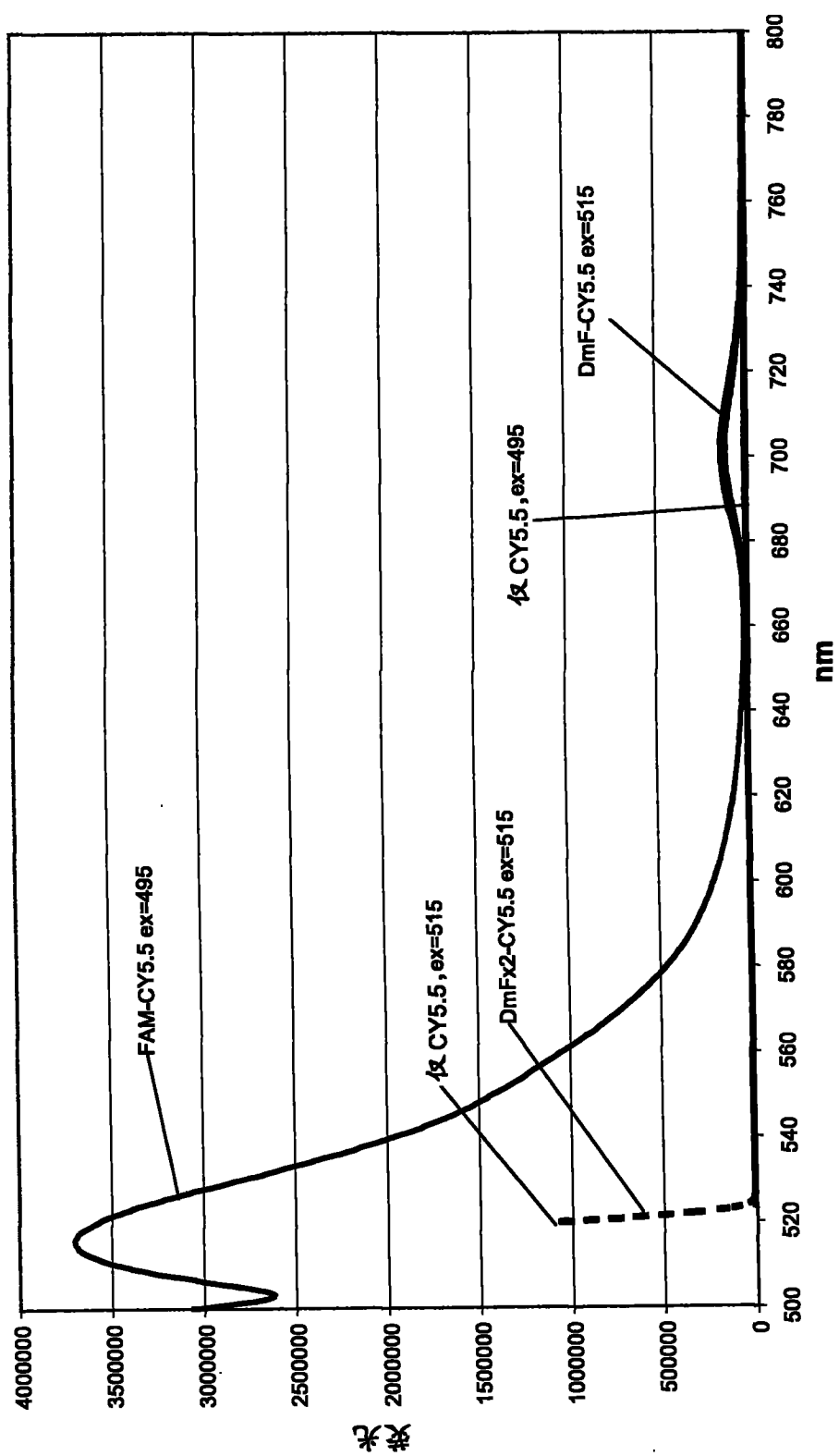


图 46B

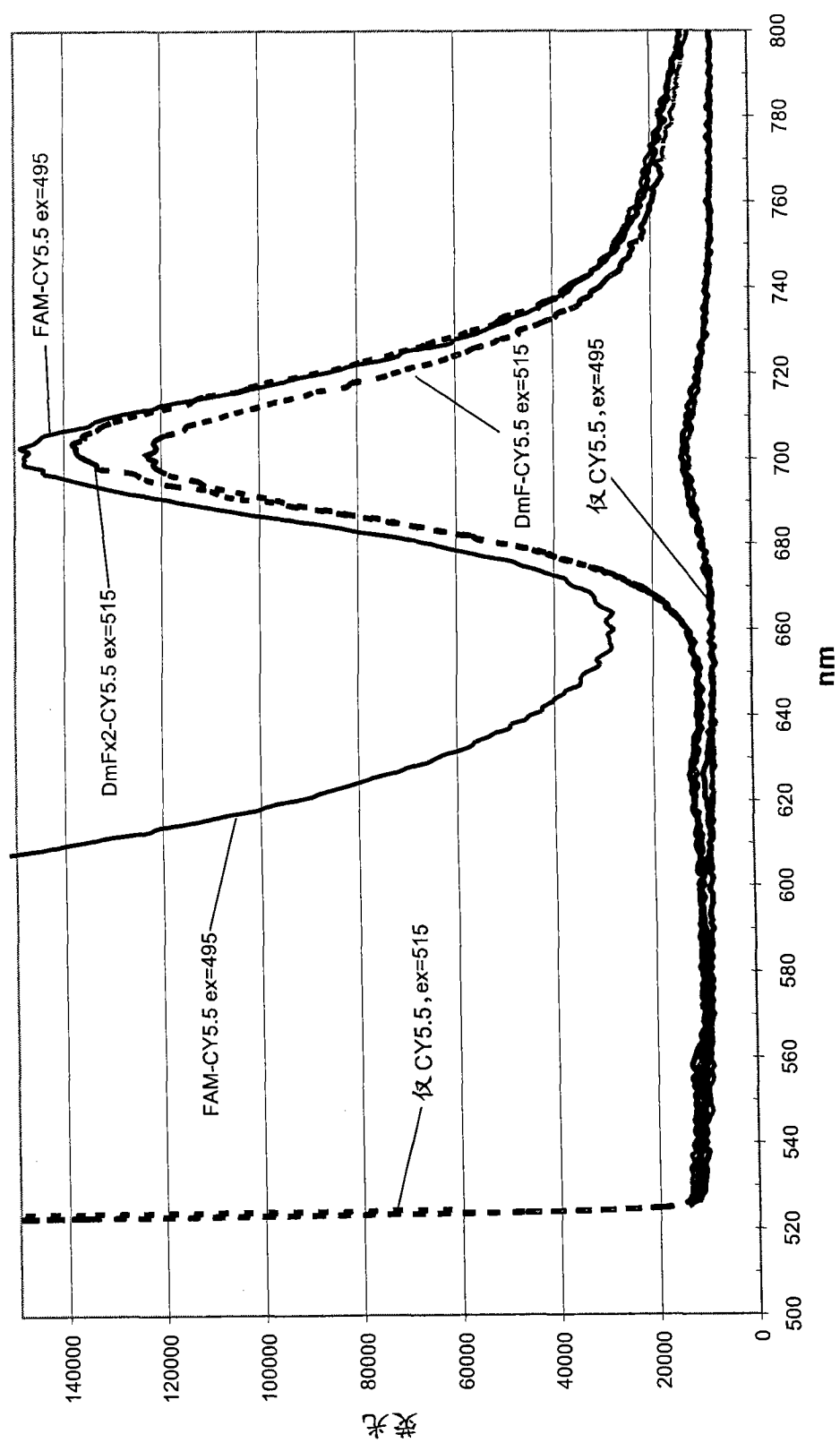


图 46C

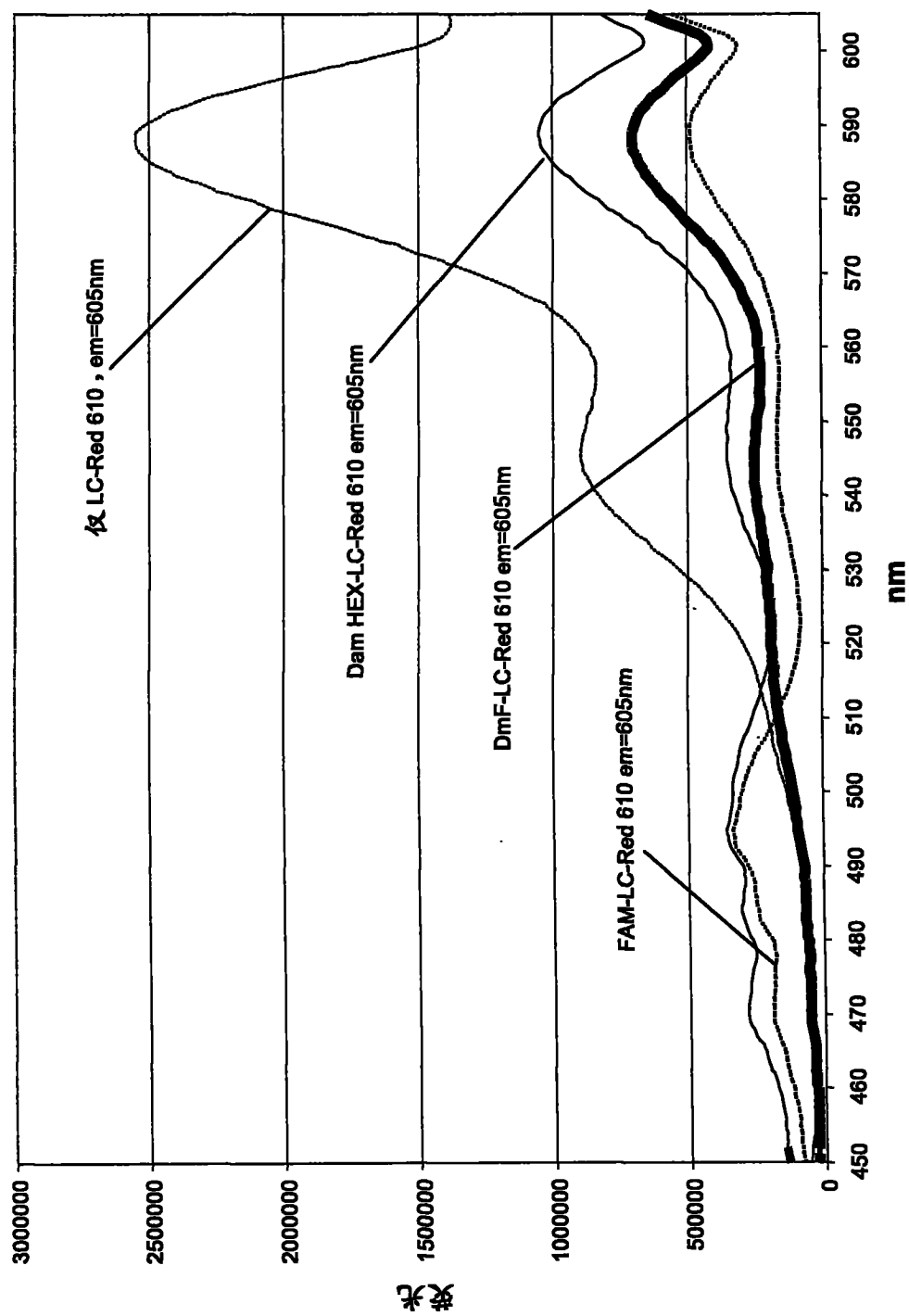


图 47A

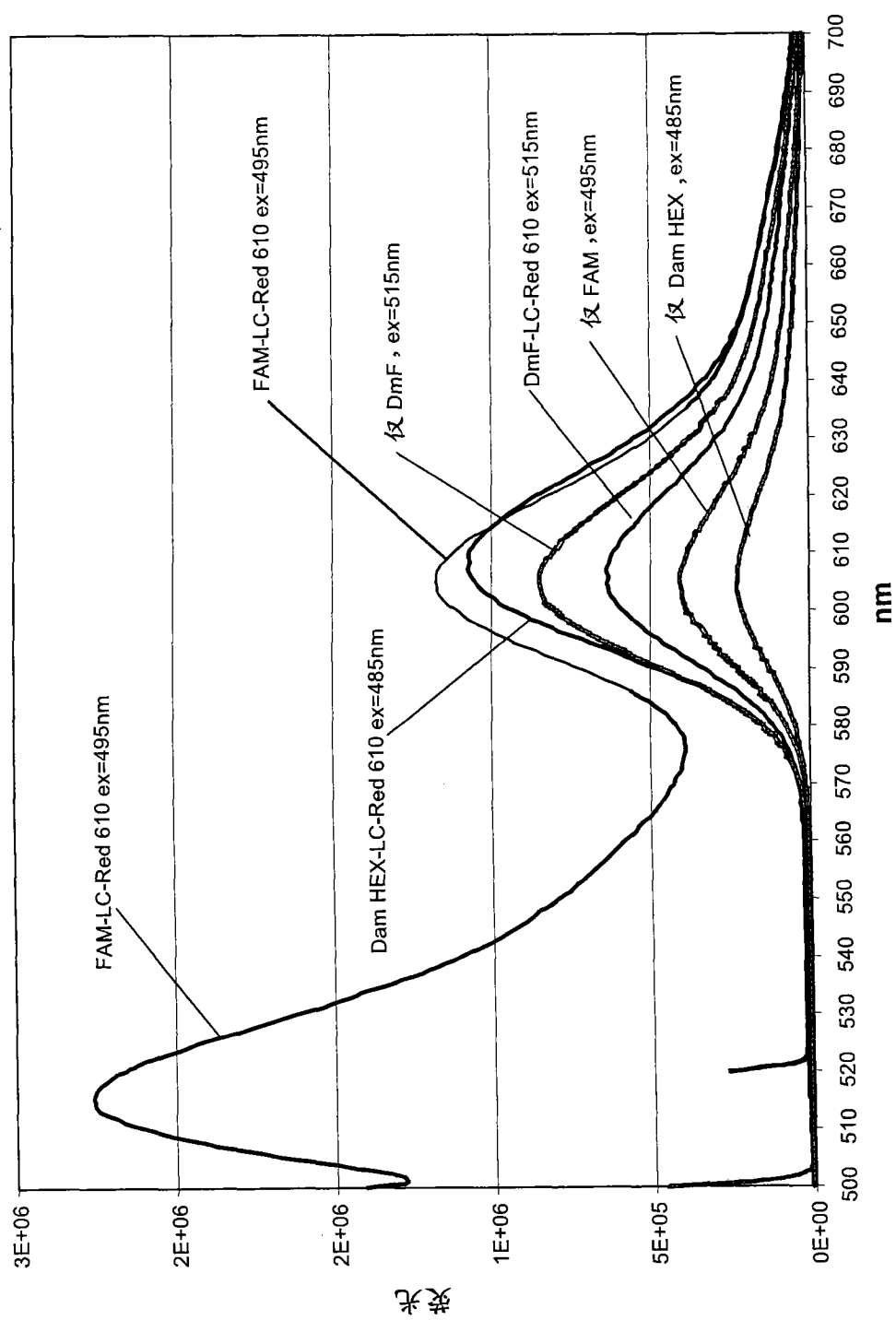


图 47B

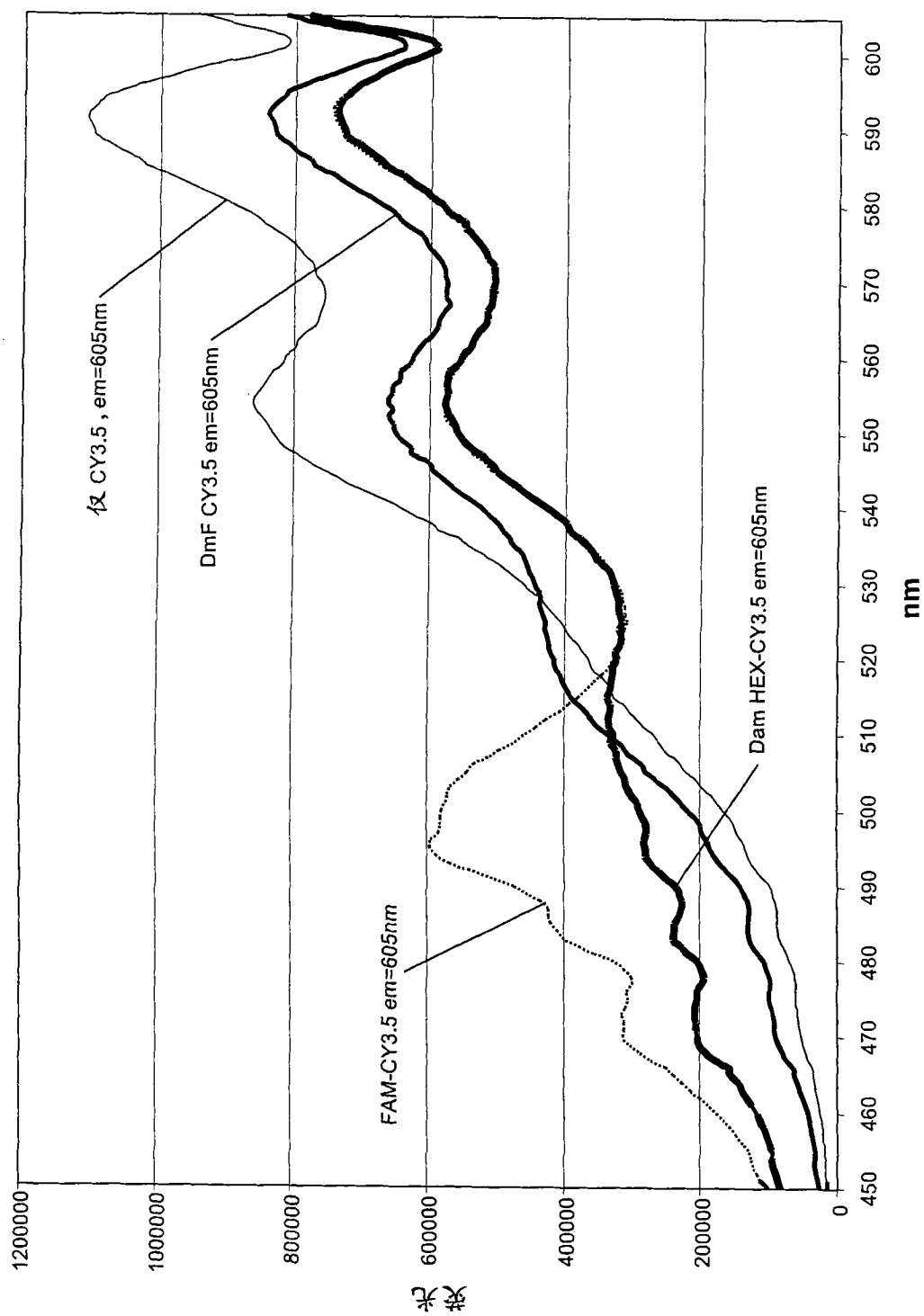


图 48A

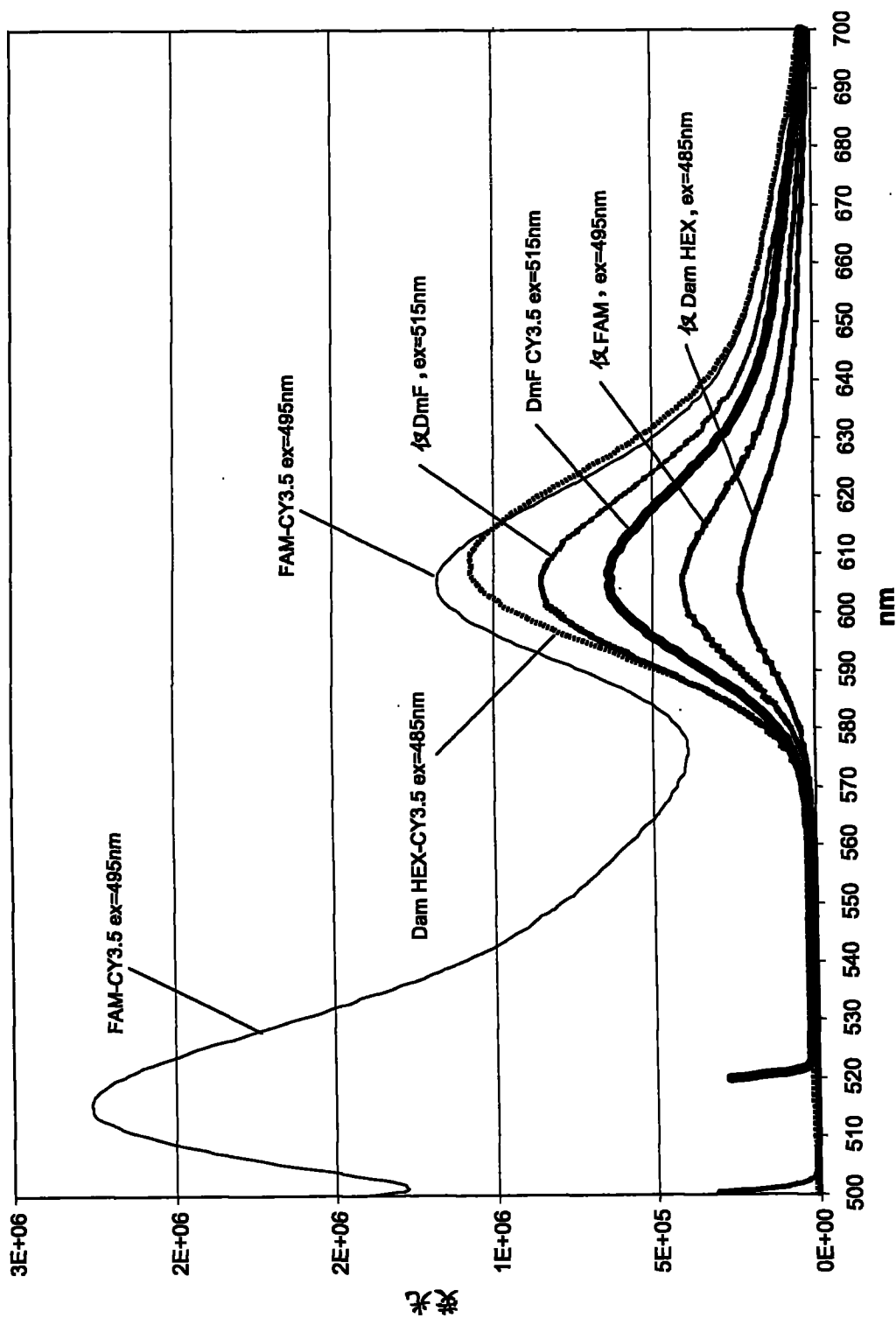


图 48B