



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106715453 B

(45) 授权公告日 2021.04.30

(21) 申请号 201580027278.0

专利权人 吉尼亚科技有限公司

(22) 申请日 2015.03.23

(72) 发明人 卡尔·W·富勒 希夫·库马尔

(65) 同一申请的已公布的文献号

静岳·具 兰德尔·戴维斯

申请公布号 CN 106715453 A

罗杰·陈

(43) 申请公布日 2017.05.24

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

(30) 优先权数据

代理人 张晶 赵爱玲

61/969,628 2014.03.24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2016.11.24

C07H 19/04 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2015/022063 2015.03.23

CN 102119226 A, 2011.07.06

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 刘冬

W02015/148402 EN 2015.10.01

(73) 专利权人 哥伦比亚大学董事会

权利要求书7页 说明书51页

地址 美国纽约

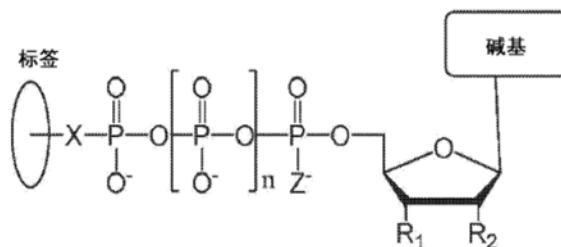
序列表62页 附图37页

(54) 发明名称

用于生产带标签的核苷酸的化学方法

(57) 摘要

本公开提供用于将纳米孔可检测的标签连接至核苷酸的系统和方法。本公开还提供使用所公开的带标签的核苷酸对核酸进行测序的方法。本文提供连接有标签的核苷酸以及用于将标签连接至核苷酸的方法。可通过化学反应例如“click化学”连接标签。在一个方面，本公开提供带标签的核苷酸，其包含 (a) 具有末端磷酸酯的多磷酸酯部分；和 (b) 通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、仲胺、胺、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物共价结合至核苷酸的末端磷酸酯的标签。



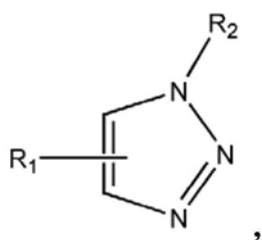
1. 带标签的核苷酸, 其包含在核苷酸的5' 位置处的包括末端磷酸酯的3-6个磷酸酯以及通过共价键共价结合至所述核苷酸的末端磷酸酯的标签, 所述共价键包含三唑、1,2-二噻、二硫化物、仲胺、胺、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物作为所述共价键的一部分, 其中所述标签包含寡核苷酸, 其中

(i) 所述寡核苷酸包含非天然存在的核苷酸间连接;

(ii) 所述寡核苷酸的5' 末端通过所述共价键结合至所述末端磷酸酯, 并且所述寡核苷酸的3' 末端具有保护其免受核酸外切酶降解的甲基膦酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团, 或者所述寡核苷酸的3' 末端通过所述共价键结合至所述末端磷酸酯, 并且所述寡核苷酸的5' 末端具有保护其免受核酸外切酶降解的甲基膦酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团; 或

(iii) 所述寡核苷酸包含至少一个无碱基间隔子(dSp)。

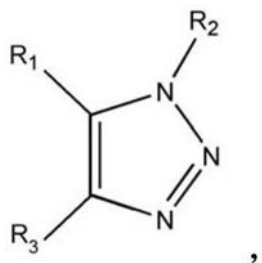
2. 根据权利要求1所述的带标签的核苷酸, 其中所述标签通过共价键共价结合至所述末端磷酸酯, 所述共价键包含具有如下结构的三唑作为所述共价键的一部分:



其中R₁包含所述标签, R₂包含所述核苷酸; 或者

其中R₁包含所述核苷酸, R₂包含所述标签; 或者

所述三唑具有如下结构:



其中R₁和R₃联合形成环状部分; 并且

其中联合的R₁和R₃包含标签, R₂包含核苷酸; 或者

其中联合的R₁和R₃包含核苷酸, R₂包含标签。

3. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸, 其中所述带标签的寡核苷酸包含在核苷酸5' 位置处的4-6个磷酸酯。

4. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸, 其中所述标签还包括肽、聚乙二醇(PEG)、寡糖、肽核酸(PNA)、乙烯聚合物或其任意组合。

5. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸, 其中所述标签的所述寡核苷酸包含至少30个单体单元。

6. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸, 其中所述寡核苷酸包含非天然核苷酸。

7. 根据权利要求6所述的带标签的核苷酸, 其中所述非天然核苷酸包含选自由L-核苷酸, 2', 5' -键、α-D-核苷酸、非天然存在的核苷酸间连接、非天然存在的碱基、非天然存在的

糖部分以及其任意组合组成的组;或者,其中所述非天然核苷酸包含选自硝基吡咯、硝基咪唑、水粉伞素(nebularine)、泽布拉林(zebularine)、苯和苯衍生物组成的组的非天然存在的碱基;或者其中所述非天然核苷酸包含选自磷酸三酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、硼磷酸酯、磷酰胺酯和吗啉基部分的非天然存在的核苷酸间连接。

8. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述寡核苷酸的5'-端通过所述共价键结合至在所述核苷酸的5'位置处的末端磷酸酯。

9. 根据权利要求8所述的带标签的核苷酸,其中所述寡核苷酸包含在其3'末端处的、保护其免受核酸外切酶降解的甲基膦酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团。

10. 根据权利要求9所述的带标签的核苷酸,其中所述其3'末端的化学修饰选自磷酸酯化和与具有末端羟基的C₃-烷基至C₁₂-烷基间隔子的共价结合。

11. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述寡核苷酸的3'端通过所述共价键结合至在所述核苷酸的5'位置处的末端磷酸酯。

12. 根据权利要求11所述的带标签的核苷酸,其中所述寡核苷酸包含在其5'末端处的、保护其免受核酸外切酶降解的甲基膦酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团。

13. 根据权利要求12所述的带标签的核苷酸,其中其5'末端的化学修饰选自磷酸酯化和与C₃-烷基至C₁₂-烷基间隔子的共价结合。

14. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述寡核苷酸包含间隔子部分。

15. 根据权利要求14所述的带标签的核苷酸,其中所述间隔子包含具有至少2个至约12个碳的烷基。

16. 根据权利要求14所述的带标签的核苷酸,其中所述间隔子包含无碱基单元。

17. 根据权利要求14所述的带标签的核苷酸,其中所述间隔子包括选自以下的间隔子: idSp、iSp9、iSp18、iSpC3、iSpC6和iSpC12。

18. 用于对包含权利要求1或2所述的带标签的核苷酸的核酸进行测序的试剂盒。

19. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述标签由以下序列表示:SEQ ID NO.17、18、22-33、42-72、74-82、86-88、90、94-97、或100-105。

20. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述标签由以下序列表示:SEQ ID NO.6、8-16、19-21或34-41。

21. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述标签由以下序列表示:SEQ ID NO.89、91-93或106-108。

22. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述标签由以下序列表示:SEQ ID NO.73、83-85或109。

23. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述带标签的核苷酸选自:dG6P-(T₄-Npy₂)₆-C3、dG6P-(T₄-Neb₂)₆-C3、dT6P-dT₆-C7NH₆-dT₁₈-C3、dT6P-dT₆-Pyrd₆-dT₁₈-C3、dA6P-dT₆-dT₁₈-C3、dG6P-dT₄-精-dT₂₂-C3、dT6P-dT₄-精-dSp₃-dT₁₉-C3、dC6P-dT₄-精-iFlrT-dT₂₁-C3、dG6P-精-dT₃₀-C3、dT6P-Cy3.5-dT₃₀-C3、dT6P-Cy3-Cy3-dT₃₀-C3、dT6P-dT₆-Cy3-dT₂₃-C3、dT6P-dT₁₀-Cy3-dT₁₉-C3、dT6P-发夹块、dA6P-Cy3-T2-Sp18-T₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT4-dSp₈-T₁₈-C3、dT6P-Hex-dT₆-dT₁₈-C3、dA6P-Cy3-dT₄-Sp9-T₂₃-C3、dC6P-Cy3-T-dSp₃-T₂₆-C3、dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C3、dC6P-Cy3-T₇-dSp₃-T₂₀-C3、dC6P-Cy3-T₁₀-dSp₃-T₁₇-C3、dC6P-Cy3-T₄-iFluorT₃-T23-C3、dC6P-Cy3-T₄-iFluorT-T-iFluorT-T₂₃-C3、Bio-精胺-

dT₃₀-C3、dT6P-dT₃₀-Cy3-C3、dG6P-dT₈-精胺-dT₂₀-C3、dA6P-Cy3-T₄-iFluorT-T-iFluorT-T₂₃-C3、dT6P-Cy3-dT₄-Aptamer-dT₂₅-C3、dT6P-Cy3-dT₄-12Hairpin-dT₂₅-C3、dT6P-Cy3-dT₅-dSp₃-dT₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT₆-dSp₃-dT₂₁-C3、dT6P-Cy3-dT₄-dSp₄-dT₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT₄-dSp₅-dT₂₁-C3、dC6P-Cy3-dT₅-SpC12-dT₂₃-C3、dC6P-Cy3-dT₄-SpC6-SpC6-dT₂₄-C3、dC6P-Cy3-dT₄-(SpC3)₃-dT₂₃-C3、dG6P-Cy3-dT₃₀-C3、dT6P-Cy3-dT₂-dSp₈-dT₂₀-C3、dC6P-Cy3-T₃₀-(C3)₄-PO₄、dC6P-Cy3-T₃₀-PO₄、dC6P-Cy3-T₃₀-C₃-NH₂、dG6PaS-Cy3-dT₂-dSp₈-dT₂₀-C3、Rev-P-T₃₀-Cy3-dG6P、Rev-P-T₂₄-dSp₃-T₃-Cy3-dC6P、dT6P-Cy3-dT₄-HP6-dT₂₅-C₃、dA6P-Cy3-dT₄-dI6-dT₂₀-C3、dA6P-Cy3-dT₄-硝基吡啶6-dT₂₀-C3、dA6P-Cy3-dT₄-dC6-dT₂₀-C3、dA6P-Cy3-dT₄-5IU6-dT₂₀-C3、dA6P-Cy3-dT₄-PyrndU6-dT₂₀-C3、dT6P-Cy3-dT₄-(idSP-T)₄-dT₁₈-C₃、dT6P-Cy3-dT₅-(idSP-T)₄-dT₁₇-C3、dT6P-Cy3-dT₄-丙基₆-dT₂₀-C3、dT6P-Cy3-LdT₃₀-C3、dT6P-Cy3-dT₄-L111-dT₂₆-C3、dT6P-Cy3-dT₄-L121-dT₂₆-C3、dT6P-Cy3-dT₄-SpC12-SpC12-dT₂₄-C3、dT6P-Cy3-dT₄-(SpC6)₄-dT₂₅-C3、dT6P-Cy3-dT₄-精胺-dT₂₅-C3、dT6P-Cy3-dT₂-精胺-dT₂₇-C3、dT6P-Cy3-dT₂-精胺-精胺-dT₂₆-C3、dT6P-Cy3-dT₄-PyrndU-TT-PyrndU-dT₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT₄-Tmp₆-dT₂₀-C3、dT6P-Cy3-dT₄-吡咯烷₆-dT₂₀-C3、dT6P-吡咯烷-dT₃₀-C3、dT6P-吡咯烷-吡咯烷-dT₃₀-C3和dT6P-吡咯烷₃-dT₃₀-C3。

24. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述带标签的核苷酸选自:dA6P-T*₃₀-ODD、dT6P-T₆-dSp₈-T₁₆、dC6P-T₆-T*₁₀-T₁₄、dC6P-T₄-dSp₃-T₂₃、dC6P-T₇-dSp₃-T₂₀、dC6P-T₁₀-dSp₃-T₁₇、dC6P-T₁₃-dSp₃-T₁₄、dG6P-T₃₀-C6、dG6P-Cy3-T₃₀-C6、dT6P-T₄-dSp₁₀-T₁₆-C6、dA6P-T₄-Sp18-T₂₂-C3、dA6P-T₄-Sp18₂-T₁₉-C₃、dA6P-T₄-Sp9₂-T₂₂-C₃、dT6P-T₆-dSp₈-T₁₆-C3、dA6P-Cy3-T₃₀-C6、dT6P-Cy3-T₃₀-C6、dC6P-Cy3-T₃₀-C6、dA6P-Cy3-dT*₃₀-ODD、dA6P-T*₃₀、dA6P-Cy3-T*₃₀、dG6P-Cy3-T₃₀-C3、dG6P-Cy3-T₁₅-C3、dG6P-Cy3-T₂₀-C3和dG6P-Cy3-T₂₅-C3。

25. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述带标签的核苷酸选自:dT6P-Cy3-dT₃-(SpC12)₃-dT₂₄-C3、dT6P-Cy3-dT₄-(SpC6)₅-dT₂₃-C3、dT6P-Cy3-dT₅-(SpC6)₄-dT₂₄-C3、dT6P-Cy3-dT₂-(SpC6)₅-dT₂₅-C3、dT6P-SpC3-Cy3-dT₃₀-C3、dT6P-SpC3-SpC3-Cy3-dT₃₀-C3和dT6P-SpC6-Cy3-dT₃₀-C3。

26. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述带标签的核苷酸选自:dT6PCy3-dC₃₀-C3、dT6P-Cy3-LdT₄-dSp₃-LdT₂₃-C3、dT6P-Cy3-LdT₄-dSp₈-LdT₁₈-C3、dT6P-Cy3-LdT₄-dI₆-LdT₂₀-C3和dT6P-Cy3-dT₄(α-dT)₃-dT₂₃-C3。

27. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述标签由SEQ ID NO.6、9和36表示,或者其中所述带标签的核苷酸选自dA6P-T*₃₀-ODD、dC6P-T₆-T*₁₀-T₁₄和dA6P-T*₃₀。

28. 根据权利要求1或2所述的带标签的核苷酸,其中所述标签由SEQ ID NO.16、19-21、24或34表示,或者其中所述带标签的核苷酸选自dT6P-T₄-dSp₁₀-T₁₆-C6、dA6P-T₄-Sp18-T₂₂-C3、dA6P-T₄-Sp18₂-T₁₉-C₃、dA6P-T₄-Sp9₂-T₂₂-C3、dT6P-T₆-dSp₈-T₁₆-C3和dA6P-dT₆-dT₁₈-C3。

29. 用于测定单链核酸的核苷酸序列的方法,其包括:

(a) 使所述单链核酸与核酸聚合酶和至少四种带标签的核苷酸在这样的条件下接触:如果所述带标签的核苷酸之一与单链核酸的核苷酸残基互补,所述核苷酸残基紧挨着与引物的3'末端核苷酸残基杂交的所述单链核酸的5'核苷酸残基,则允许所述核酸聚合酶催化将所述带标签的核苷酸之一并入至所述引物中从而形成核酸延伸产物;其中所述单链DNA

在与膜中的纳米孔接触的电解质溶液中,并且其中所述单链核酸具有与其一部分杂交的所述引物;

其中所述至少四种带标签的核苷酸的每个都包括包含在核苷酸5'位置处的末端磷酸酯的3-6个磷酸酯,为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶或其各自衍生物的碱基,以及通过共价键共价结合至所述核苷酸的末端磷酸酯的标签,所述共价键包含三唑、1,2-二噻、二硫化物、仲胺、胺、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物作为所述共价键的一部分,其中所述标签包含寡核苷酸,其中,

(1) 所述寡核苷酸包含非天然存在的核苷酸间连接;

(2) 所述寡核苷酸的5'末端通过所述共价键结合至所述末端磷酸酯,并且所述寡核苷酸的3'末端具有保护其免受核酸外切酶降解的甲基磷酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团,或者所述寡核苷酸的3'末端通过所述共价键结合至所述末端磷酸酯,并且所述寡核苷酸的5'末端具有保护其免受核酸外切酶降解的甲基磷酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团;或

(3) 所述寡核苷酸包含至少一个无碱基间隔子(dSp),

其中(i)每种带标签的核苷酸中的碱基类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的碱基类型,和(ii)每种带标签的核苷酸的5'位置处的磷酸酯的数目不同于其他三种带标签的核苷酸的5'位置处的磷酸酯的数目,或每种带标签的核苷酸的5'位置处的磷酸酯的数目是相同的,并且每种带标签的核苷酸上的标签的类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的标签类型,其中并入带标签的核苷酸导致释放其上连接有标签的多磷酸酯;

(b) 通过跨过所述膜施加电压并测量因在步骤(a)中产生的其上连接有标签的多磷酸酯进入、定位于和/或移位(translocating)穿过所述纳米孔而产生的穿过所述纳米孔的电子变化来确定在步骤(a)中哪种带标签的核苷酸被并入至所述引物中以形成核酸延伸产物,其中对于每个核苷酸的5'位置处的磷酸酯的不同数目或者对于每种不同类型的标签,所述电子变化视情况而有所不同,从而鉴定所述单链核酸中与所并入的带标签的核苷酸互补的核苷酸残基;以及

(c) 对正被测序的所述单链核酸的每个核苷酸残基重复进行步骤(a)和(b),其中在步骤(a)的每次重复中,如果带标签的核苷酸与单链核酸的核苷酸残基互补,所述核苷酸残基紧挨着与引物的3'末端核苷酸残基杂交的所述单链核酸的5'末端核苷酸残基,则所述带标签的核苷酸被并入至所述核酸延伸产物中,从而测定所述单链核酸的多核苷酸序列。

30. 用于测定单链核酸的核苷酸序列的方法,其包括:

(a) 使所述单链核酸与核酸聚合酶和带标签的核苷酸在这样的条件下接触:如果所述带标签的核苷酸之一与单链核酸的核苷酸残基互补,所述核苷酸残基紧挨着与引物的3'末端核苷酸残基杂交的所述单链核酸的5'末端核苷酸残基,则允许所述核酸聚合酶催化将所述带标签的核苷酸并入至所述引物中从而形成DNA延伸产物;其中所述单链核酸在与膜中的纳米孔接触的电解质溶液中,并且其中所述单链核酸具有与其一部分杂交的所述引物;其中所述带标签的核苷酸包含在核苷酸5'位置处的包含末端磷酸酯的3-6个磷酸酯,为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶或其各自衍生物的碱基,以及通过共价键共价结合至所述核苷酸的末端磷酸酯的标签,所述共价键包含三唑、1,2-二噻、二硫化物(disulfide)、仲胺、胺、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物作为所述共价键的一部分,其中所述标签包含寡核苷酸,其中,

(1) 所述寡核苷酸包含非天然存在的核苷酸间连接；

(2) 所述寡核苷酸的5'末端通过所述共价键结合至所述末端磷酸酯，并且所述寡核苷酸的3'末端具有保护其免受核酸外切酶降解的甲基膦酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团，或者所述寡核苷酸的3'末端通过所述共价键结合至所述末端磷酸酯，并且所述寡核苷酸的5'末端具有保护其免受核酸外切酶降解的甲基膦酸酯、磷酸酯或烷基碳间隔子基团；或

(3) 所述寡核苷酸包含至少一个无碱基间隔子(dSp)，

其中并入带标签的核苷酸导致释放其上连接有标签的多磷酸酯；如果带标签的核苷酸没有被并入，反复重复与不同的带标签的核苷酸接触直至带标签的核苷酸被并入，条件是(1) 每种带标签的核苷酸中的碱基类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的碱基类型，和(2) 每种带标签的核苷酸的5'位置处的磷酸酯的数目不同于其他三种带标签的核苷酸的5'位置处的磷酸酯的数目，或每种带标签的核苷酸的5'位置处的磷酸酯的数目是相同的，并且每种带标签的核苷酸上的标签的类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的标签类型，

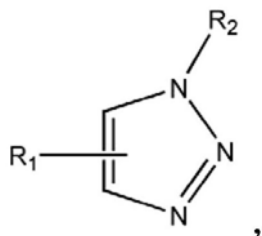
(b) 通过跨过所述膜施加电压并测量因在步骤(a)中产生的其上连接有标签的多磷酸酯进入、定位于和/或移位穿过所述纳米孔而产生的穿过所述纳米孔的电子变化来确定在步骤(a)中带标签的核苷酸是否已被并入至所述引物中以形成核酸延伸产物，其中对于每个在5'位置处的磷酸酯的数目或者对于每种不同类型的标签，所述电子变化视情况而有所不同，从而鉴定所述单链核酸中与所并入的带标签的核苷酸互补的核苷酸残基；以及

(c) 对正被测序的所述单链核酸的每个核苷酸残基重复进行步骤(a)和(b)，其中在步骤(a)的每次重复中，如果带标签的核苷酸与单链核酸的核苷酸残基互补，所述核苷酸残基紧挨着与引物的3'末端核苷酸残基杂交的所述单链核酸的5'末端核苷酸残基，则所述带标签的核苷酸被并入至所述核酸延伸产物中，从而测定所述单链DNA的多核苷酸序列。

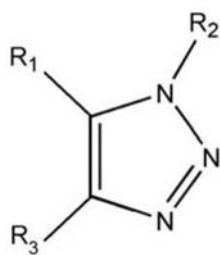
31. 根据权利要求29或30所述的方法，其中每种带标签的核苷酸的在5'位置处的磷酸酯的数目是相同的，每种带标签的核苷酸上标签的类型不同于其他三种带标签的核苷酸上各自的标签类型。

32. 根据权利要求29或30所述的方法，其中每种标签还包括肽、聚乙二醇(PEG)、寡糖、肽核酸(PNA)、乙烯基聚合物或其任意组合。

33. 根据权利要求29或30所述的方法，其中每种标签通过三唑共价结合至所述末端磷酸酯，所述三唑具有以下结构：



其中R₁包含所述标签，R₂包含所述核苷酸；或者
其中R₁包含所述核苷酸，R₂包含所述标签，或者
所述三唑具有以下结构：



其中 R_1 和 R_3 联合形成环状部分；并且

其中联合的 R_1 和 R_3 包含标签， R_2 包含核苷酸；或者

其中联合的 R_1 和 R_3 包含核苷酸， R_2 包含标签。

34. 根据权利要求29或30所述的方法，其中每个核苷酸包含在5'位置处的4至6个磷酸酯。

35. 根据权利要求29或30所述的方法，其中每种标签选自表5所列出的标签，或者其中所述标签由SEQ ID NO. 17、18、22-33、42-72、74-82、86-88、90、94-97或100-105表示，或者其中每种带标签的核苷酸选自dG6P-(T_4 -Npy₂)₆-C3、dG6P-(T_4 -Neb₂)₆-C3、dT6P-dT₆-C7NH₆-dT₁₈-C3、dT6P-dT₆-Pyrd₆-dT₁₈-C3、dA6P-dT₆-dTNH₆-dT₁₈-C3、dG6P-dT₄-精-dT₂₂-C3、dT6P-dT₄-精-dSp₃-dT₁₉-C3、dC6P-dT₄-精-iFlrT-dT₂₁-C3、dG6P-精-dT₃₀-C3、dT6P-Cy3.5-dT₃₀-C3、dT6P-Cy3-Cy3-dT₃₀-C3、dT6P-dT₆-Cy3-dT₂₃-C3、dT6P-dT₁₀-Cy3-dT₁₉-C3、dT6P-发夹块、dA6P-Cy3-T2-Sp18-T₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT4-dSp₈-T₁₈-C3、dT6P-Hex-dT₆-dTc2NH₆-dT₁₈-C3、dA6P-Cy3-dT₄-Sp9-T₂₃-C3、dC6P-Cy3-T-dSp₃-T₂₆-C3、dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C3、dC6P-Cy3-T₇-dSp₃-T₂₀-C3、dC6P-Cy3-T₁₀-dSp₃-T₁₇-C3、dC6P-Cy3-T₄-iFluorT₃-T23-C3、dC6P-Cy3-T₄-iFluorT-T-iFluorT-T₂₃-C3、Bio-精胺-dT₃₀-C3、dT6P-dT₃₀-Cy3-C3、dG6P-dT₈-精胺-dT₂₀-C3、dA6P-Cy3-T₄-iFluorT-T-iFluorT-T₂₃-C3、dT6P-CY3-dT4-Aptamer-dT25-C3、dT6P-Cy3-dT4-12Hairpin-dT25-C3、dT6P-Cy3-dT₅-dSp₃-dT₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT₆-dSp₃-dT₂₁-C3、dT6P-Cy3-dT₄-dSp₄-dT₂₂-C3、dT6P-Cy3-dT₄-dSp₅-dT₂₁-C3、dC6P-Cy3-dT₅-SpC12-dT₂₃-C3、dC6P-Cy3-dT₄-SpC6-SpC6-dT₂₄-C3、dC6P-Cy3-dT₄-(SpC3)₃-dT₂₃-C3、dG6P-Cy3-dT₃₀-C3、dT6P-Cy3-dT₂-dSp₈-dT₂₀-C3、dC6P-Cy3-T₃₀-(C3)₄-PO₄、dC6P-Cy3-T₃₀-PO₄、dC6P-Cy3-T₃₀-C₃-NH₂、dG6PaS-Cy3-dT₂-dSp₈-dT₂₀-C3、Rev-P-T₃₀-Cy3-dG6P、Rev-P-T₂₄-dSp₃-T₃-Cy3-dC6P、dT6P-Cy3-dT₄-HP6-dT₂₅-C₃、dA6P-Cy3-dT4-dI6-dT20-C3、dA6P-Cy3-dT4-硝基吡啶6-dT20-C3、dA6P-Cy3-dT4-dC6-dT20-C3、dA6P-Cy3-dT4-5IU6-dT20-C3、dA6P-Cy3-dT4-PyrndU6-dT20-C3、dT6P-Cy3-dT₄-(idSP-T)₄-dT₁₈-C₃、dT6P-Cy3-dT₅-(idSP-T)₄-dT₁₇-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-丙基₆-dT₂₀-C₃、dT6P-Cy3-LdT₃₀-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-L111-dT₂₆-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-L121-dT₂₆-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-SpC12-SpC12-dT₂₄-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-(SpC6)₄-dT25-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-精胺-dT₂₅-C₃、dT6P-Cy3-dT2-精胺-dT₂₇-C₃、dT6P-Cy3-dT₂-精胺-精胺-dT₂₆-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-Pyrn-dU-TT-Pyrn-dU-dT₂₂-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-Tnp₆-dT₂₀-C₃、dT6P-Cy3-dT₄-吡咯烷₆-dT₂₀-C₃、dT6P-吡咯烷-dT₃₀-C₃、dT6P-吡咯烷-吡咯烷-dT₃₀-C₃和dT6P-吡咯烷₃-dT₃₀-C₃。

36. 根据权利要求29或30所述的方法，其中所述每种带标签的核苷酸选自：dA6P-T*₃₀-ODD、dT6P-T₆-dSp₈-T₁₆、dC6P-T6-T*₁₀-T₁₄、dC6P-T₄-dSp₃-T₂₃、dC6P-T₇-dSp₃-T₂₀、dC6P-T₁₀-dSp₃-T₁₇、dC6P-T₁₃-dSp₃-T₁₄、dG6P-T₃₀-C6、dG6P-Cy3-T₃₀-C6、dT6P-T₄-dSp₁₀-T₁₆-C6、dA6P-T₄-Sp18-T₂₂-C3、dA6P-T₄-Sp18₂-T₁₉-C₃、dA6P-T₄-Sp9₂-T₂₂-C₃、dT6P-T₆-dSp₈-T₁₆-C₃、dA6P-

Cy3-T₃₀-C6、dT6P-Cy3-T₃₀-C6、dC6P-Cy3-T₃₀-C6、dA6P-Cy3-dT*₃₀-ODD、dA6P-T*₃₀、dA6P-Cy3-T*₃₀、dG6P-Cy3-T₃₀-C3、dG6P-Cy3-T₁₅-C3、dG6P-Cy3-T₂₀-C3和dG6P-Cy3-T₂₅-C3。

37. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述每种带标签的核苷酸选自:dT6P-Cy3-dT₃-(SpC12)₃-dT₂₄-C3、dT6P-Cy3-dT₄-(SpC6)₅-dT₂₃-C3、dT6P-Cy3-dT₅-(SpC6)₄-dT₂₄-C3、dT6P-Cy3-dT₂-(SpC6)₅-dT₂₅-C3、dT6P-SpC3-Cy3-dT₃₀-C3、dT6P-SpC3-SpC3-Cy3-dT₃₀-C3和dT6P-SpC6-Cy3-dT₃₀-C3。

38. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述每种带标签的核苷酸选自:dT6PCy3-dC₃₀-C3、dT6P-Cy3-LdT₄-dSp₃-LdT₂₃-C3、dT6P-Cy3-LdT₄-dSp₈-LdT₁₈-C3、dT6P-Cy3-LdT₄-dI₆-LdT₂₀-C3和dT6P-Cy3-dT₄(α-dT)₃-dT₂₃-C3。

39. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述每种带标签的核苷酸选自dA6P-T*30_ODD、dC6P-T6-T*10-T14和dA6P-T*30。

40. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述每种带标签的核苷酸选自dT6P-T₄-dSp₁₀-T₁₆-C6、dA6P-T₄-Sp18-T₂₂-C3、dA6P-T₄-Sp18₂-T₁₉-C₃、dA6P-T₄-Sp9₂-T₂₂-C3、dT6P-T₆-dSp₈-T₁₆-C3和dA6P-dT₆-dT₆-dT₁₈-C3。

41. 根据权利要求29或30所述的方法,其中每种标签由SEQ ID NO.6、8-16、19-21或34-41表示。

42. 根据权利要求29或30所述的方法,其中每种标签由SEQ ID NO.89、91-93或106-108表示。

43. 根据权利要求29或30所述的方法,其中每种标签由SEQ ID NO.73、83-85或109表示。

44. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述标签由SEQ ID NO.6、9和36表示。

45. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述标签由SEQ ID NO.16、19-21、24或34表示。

用于生产带标签的核苷酸的化学方法

[0001] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 要求于2014年3月24日提交的美国临时专利申请第61/969,628号的优先权,其内容通过引用的方式并入本文。

[0002] 本发明在由美国国立卫生研究院给予的第5R01HG007415号基金下、在政府的支持下进行。政府拥有本发明的一些权利。

[0003] 本申请通过引用并入存在于名为“150323_0575_85625_序列表_JAK.txt”的文件中的核苷酸和/或氨基酸序列,该文件大小为52千字节,于2015年3月23日以IBM-PC机器格式生成、具有与MS-Windows的操作系统的兼容性、包含在于2015年3月23日提交的文本文件中作为本申请的一部分。

技术领域

[0004] 本申请涉及带标签的核苷酸组合物、制备和使用所公开的带标签的核苷酸组合物用于对核酸测序的方法,特别是基于纳米孔的测序方法。

[0005] 通过引用的方式并入

[0006] 在本申请说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用的方式并入本文,其并入程度如同明确且单独地指定通过引用的方式并入每个单独的出版物、专利或专利申请。

背景技术

[0007] 核酸测序是测定核酸核苷酸序列的方法。这样的序列信息可有助于诊断和/或治疗个体。例如,个体的核酸序列可以用于鉴定、诊断和潜在地开发用于遗传疾病的疗法。作为另一个实例,对病原体的研究可以得到用于传染性疾病的疗法。由于一些疾病的特征在于具有数百万个核苷酸的链中少至一个核苷酸差异,所以高度准确的测序是必要的。

[0008] 存在可用于对核酸进行测序的方法。然而,这样的方法是昂贵的,并且可能不能在一段时间内以诊断和/或治疗个体所必需的精度提供序列信息。

[0009] 在一些情况下,使单链核酸分子通过纳米孔的核酸测序方法的灵敏度不足。核苷酸碱基(例如腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和/或尿嘧啶(U))可能不能提供彼此之间差别足够大的信号。特别是,嘌呤(即A和G)具有彼此相似的大小、形状和电荷,在一些情况下提供的信号差别不够大。同样,嘧啶(即C,T和U)具有彼此相似的大小、形状和电荷,在一些情况下提供的信号差别不够大。

[0010] Kumar等人(2012)描述了使用纳米孔来区分通过末端5'-磷酸酯(phosphoramidate)与dG核苷酸连接的四种不同长度的PEG-香豆素标签,并且分别证明了通过DNA聚合酶有效且精确地并入这四种PEG-香豆素带标签的dG核苷酸。还参见美国专利申请公开US 2013/0244340 A1和US 2013/0264207 A1。

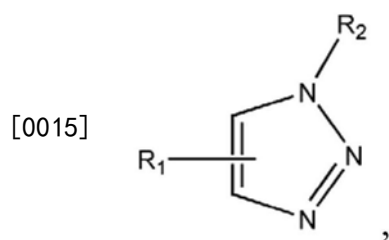
[0011] 在本文中认识到了需要用于核苷酸鉴定和核酸测序的经改进的组合物和方法。

发明内容

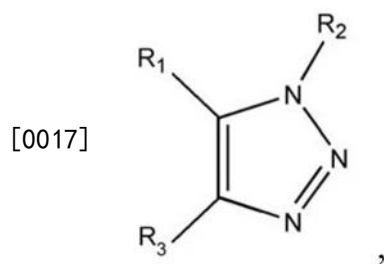
[0012] 本文提供连接有标签的核苷酸和将标签连接至核苷酸的方法。可以通过化学反应连接标签,例如“Click化学反应(click chemistry)”。

[0013] 在一个方面,本发明提供带标签的核苷酸,其包含:(a)具有末端磷酸酯的多磷酸酯部分;和通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、仲胺、脞、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物共价结合至所述核苷酸的、末端磷酸酯的标签。

[0014] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签通过三唑共价结合至所述末端磷酸酯。在一些实施方案中,所述三唑具有如下结构:



[0016] 其中 R_1 包含标签, R_2 包含核苷酸;或者其中 R_1 包含核苷酸, R_2 包含标签。在一些实施方案中,所述三唑具有如下结构:



[0018] 其中 R_1 和 R_3 联合形成环状部分;并且其中联合的 R_1 和 R_3 包含标签, R_2 包含核苷酸;或者其中联合的 R_1 和 R_3 包含核苷酸, R_2 包含标签。在一些实施方案中,所述三唑通过叠氮与炔之间的反应形成。

[0019] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签通过1,2-二噻共价结合至所述末端磷酸酯。在一些实施方案中,1,2-二噻包含二氢吡嗪部分。在一些实施方案中,1,2-二噻或二氢吡嗪部分通过四噻和反式环辛烯之间的反应形成。

[0020] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,多磷酸酯部分在核苷酸的5'位置处。在一些实施方案中,多磷酸酯部分包含至少3个磷酸酯、至少4个磷酸酯、至少5个磷酸酯、至少6个磷酸酯或至少7个磷酸酯。在一些实施方案中,多磷酸酯部分包含4-6个磷酸酯。在一些实施方案中,多磷酸酯部分包含6个磷酸酯。

[0021] 在一些实施方案中,标签和末端磷酸酯之间的共价结合可以包含接头或间隔子(spacer)部分。在一些实施方案中,接头或间隔子部分包含具有至少2个碳至约12个碳的烷基。

[0022] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签包括核苷酸、寡核苷酸、肽、聚乙二醇(PEG)、寡糖、碳水化合物、肽核酸(PNA)、乙烯基聚合物、其他水溶性聚合物或其任意组合。

[0023] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签包含寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸标签包含至少7个单体单元、至少10个单体单元、至少15个单体单元、至少20个单体单元、至少25个单体单元、至少30个单体单元、至少35个单体单元、至少40个单体单元或者

至少50个或更多个单体单元。

[0024] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签包含寡核苷酸,其中寡核苷酸包含非天然核苷酸。在一些实施方案中,非天然核苷酸包含选自L-核苷酸、2',5'-连接(linkage)、 α -D-核苷酸、非天然存在的核苷酸间连接、非天然存在的碱基、非天然存在的糖部分以及其任意组合的组。在一些实施方案中,非天然核苷酸包含选自硝基吡咯、硝基咪唑、nabularine、泽布拉林、苯和苯衍生物的非天然存在的碱基。在一些实施方案中,非天然核苷酸包含选自磷酸三酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯、硼磷酸酯、磷酸酰胺酯和吗啉基部分的非天然存在的核苷酸间连接。

[0025] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签包含寡核苷酸,其中寡核苷酸的5'-端共价结合至多磷酸酯部分的末端磷酸酯。在一些实施方案中,5'端共价结合至末端磷酸酯的寡核苷酸进一步包含其3'末端的化学修饰,所述其3'末端的化学修饰保护其免受核酸外切酶降解。在一些实施方案中,所述其3'末端的化学修饰选自磷酸酯化和与C₃-烷基至C₁₂-烷基间隔子的共价结合。在带标签的核苷酸的其他实施方案中,标签包含寡核苷酸,其中寡核苷酸的3'-端共价结合至多磷酸酯部分的末端磷酸酯。在一些实施方案中,3'端共价结合至末端磷酸酯的寡核苷酸进一步包含其5'末端的化学修饰,所述其5'末端的化学修饰保护其免受核酸外切酶降解。在一些实施方案中,所述其5'末端的化学修饰选自磷酸酯化和与C₃-烷基至C₁₂-烷基间隔子的共价结合。

[0026] 在带标签的核苷酸的一些实施方案中标签包含寡核苷酸,其中寡核苷酸包含接头,所述接头包含花青染料部分。在一些实施方案中,花青染料部分为Cy3部分。

[0027] 在另一方面,本公开提供制备带标签的核苷酸的方法,其包括:(a)提供含有多磷酸酯部分的核苷酸,所述多磷酸酯部分含有末端磷酸酯,其中所述末端磷酸酯与包含第一反应性官能团的接头结合;(b)提供包含第二反应性官能团的标签;和(c)使所述第一反应性官能团与所述第二反应性官能团反应以将所述核苷酸连接至所述标签,其中所述第一反应性官能团选自(i)硫醇、咪唑、胺、炔和二烯烃;所述第二反应性官能团选自(ii)马来酰亚胺、卤代乙酰胺、醛、异硫氰酸酯、异氰酸酯、乙烯基砜、叠氮和四嗪;或者反过来也可以(即所述第一反应性官能团选自(ii),所述第二反应性官能团选自(i))。

[0028] 在一些实施方案中,所述第一反应性官能团不同于所述第二反应性官能团。

[0029] 在一些实施方案中,所述第一反应性官能团选自硫醇、咪唑、胺、炔和二烯烃。

[0030] 在一些实施方案中,所述第二反应性官能团选自马来酰亚胺、卤代乙酰胺、醛、异硫氰酸酯、异氰酸酯、乙烯基砜、叠氮和四嗪。

[0031] 在一些实施方案中,所述第一反应性官能团是炔,所述第二反应性官能团是叠氮。

[0032] 在一些实施方案中,炔是环辛炔。

[0033] 在一些实施方案中,所述第一反应性官能团选自马来酰亚胺、卤代乙酰胺、醛、异硫氰酸酯、异氰酸酯、乙烯基砜、叠氮和四嗪。

[0034] 在一些实施方案中,所述第二反应性官能团选自硫醇、咪唑、胺、炔和二烯烃。

[0035] 在一些实施方案中,所述第一反应性官能团是叠氮,所述第二反应性官能团是炔。

[0036] 在一些实施方案中,炔是环辛炔。

[0037] 在一些实施方案中,通过包含铜、钪、银或其任何组合的非均相催化剂促进反应。

[0038] 在一些实施方案中,不通过非均相催化剂促进反应。

[0039] 在另一方面,本公开提供用于对核酸进行测序的试剂盒,其包含至少一种带标签的核苷酸。

[0040] 在本发明的一些实施方案中,标签选自表4所列出的标签。

[0041] 在本发明的一些实施方案中,带标签的核苷酸选自表4所列出的带标签的核苷酸。

[0042] 在本发明的一些实施方案中,标签选自表5所列出的标签。

[0043] 在本发明的一些实施方案中,标签包含选自表6所列出的化学修饰的化学修饰。

[0044] 在本发明的一些实施方案中,带标签的核苷酸包含在将标签连接至核苷酸的接头中的花青染料部分,并且所述带标签的核苷酸与没有花青染料部分的带标签的核苷酸相比具有改善的聚合酶捕获速率。

[0045] 本公开提供使用本文所公开的带标签的核苷酸测定单链核酸(DNA或RNA)的核苷酸序列的方法。因此,在另一方面,本公开提供测定单链核酸(DNA或RNA)的核苷酸序列的方法,其包括:

[0046] (a) 使所述单链核酸与核酸聚合酶和至少四种带标签的核苷酸在这样的条件下接触:如果所述带标签的核苷酸之一与所述单链核酸中紧挨着所述单链核酸中与引物的3'末端核苷酸残基杂交的5'核苷酸残基的核苷酸残基互补,则允许所述核酸聚合酶催化将所述带标签的核苷酸之一并入至所述引物中从而形成DNA延伸产物;其中所述单链核酸在与膜中的纳米孔接触的电解质溶液中并且其中所述单链核酸具有与其一部分杂交的所述引物,

[0047] 其中所述至少四种带标签的核苷酸中的每一种包含具有末端磷酸酯的多磷酸酯部分;为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶或其各自衍生物的碱基;以及通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、脞、仲胺、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物共价结合至核苷酸末端磷酸酯的标签,

[0048] 其中(i)每种带标签的核苷酸中的碱基类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的碱基类型,和(ii)每种带标签的核苷酸的多磷酸酯部分中磷酸酯的数目不同于其他三种带标签的核苷酸的多磷酸酯部分中磷酸酯的数目,或每种带标签的核苷酸的多磷酸酯部分中磷酸酯的数目是相同的,并且每种带标签的核苷酸上的标签的类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的标签类型,

[0049] 其中并入带标签的核苷酸导致释放其上连接有标签的多磷酸酯;

[0050] (b) 通过跨过所述膜施加电压并测量因在步骤(a)中产生的其上连接有标签的多磷酸酯进入、定位于和/或移位穿过所述纳米孔而产生的穿过所述纳米孔的电子变化来确定在步骤(a)中哪种带标签的核苷酸被并入至所述引物中以形成延伸产物,其中对于多磷酸酯部分中每个不同的磷酸酯数目或者对于每种不同类型的标签,所述电子变化视情况而有所不同,从而鉴定所述单链核酸中与所并入的带标签的核苷酸互补的核苷酸残基;以及

[0051] (c) 对正被测序的所述单链核酸的每个核苷酸残基重复进行步骤(a)和(b),其中在步骤(a)的每次重复中,如果带标签的核苷酸与所述单链核酸中紧挨着所述单链核酸中与由上一步骤(a)重复所得到的核酸延伸产物的3'末端核苷酸残基杂交的5'核苷酸残基互补,则所述带标签的核苷酸被并入至所述核酸延伸产物中,从而测定所述单链核酸的多核苷酸序列。

[0052] 在所述方法的另一方面,本公开提供用于测定单链核酸(DNA或RNA)的核苷酸序列的方法,其包括:

[0053] (a) 使所述单链核酸与核酸聚合酶和带标签的核苷酸在这样的条件下接触：如果所述带标签的核苷酸与所述单链核酸中紧挨着所述单链核酸中与引物的3'末端核苷酸残基杂交的5'核苷酸残基的核苷酸残基互补，则允许所述核酸聚合酶催化将所述带标签的核苷酸并入至所述引物中从而形成核酸延伸产物；其中所述单链核酸在与膜中的纳米孔接触的电解质溶液中并且其中所述单链核酸具有与其一部分杂交的所述引物，其中所述带标签的核苷酸包含具有末端磷酸酯的多磷酸酯部分；为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶或尿嘧啶或其各自衍生物的碱基；以及通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、仲胺、胺、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加成物共价结合至核苷酸末端磷酸酯的标签，

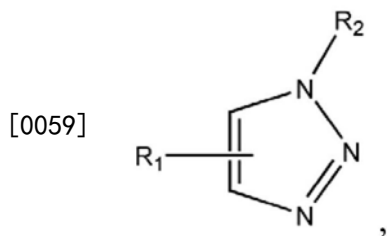
[0054] 其中并入带标签的核苷酸导致释放其上连接有标签的多磷酸酯；如果带标签的核苷酸没有被并入，反复地重复与不同的带标签的核苷酸接触直至带标签的核苷酸被并入，条件是(1)每种带标签的核苷酸中的碱基类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的碱基类型，和(2)每种带标签的核苷酸的多磷酸酯部分中磷酸酯的数目不同于其他三种带标签的核苷酸多磷酸酯部分中磷酸酯的数目或每种带标签的核苷酸的多磷酸酯部分中磷酸酯的数目是相同的，并且每种带标签的核苷酸上的标签的类型不同于其他三种带标签的核苷酸各自的标签类型；

[0055] (b) 通过跨过所述膜施加电压并测量因在步骤(a)中产生的其上连接有标签的多磷酸酯进入、位于和/或移动穿过所述纳米孔而产生的通过所述纳米孔的电子变化来确定在步骤(a)中哪种带标签的核苷酸被并入至所述引物中以形成核酸延伸产物，其中对于不同的n值或者对于每种不同类型的标签，所述电子变化视情况而有所不同，从而鉴定所述单链核酸中与所并入的带标签的核苷酸互补的核苷酸残基；以及

[0056] (c) 对正被测序的所述单链核酸的每个核苷酸残基重复进行步骤(a)和(b)，其中在步骤(a)的每次重复中，如果带标签的核苷酸与所述单链核酸中紧挨着所述单链核酸中与由上次步骤(a)重复所得到的核酸延伸产物的3'末端核苷酸残基杂交的5'核苷酸残基的核苷酸残基互补，则所述带标签的核苷酸被并入至所述核酸延伸产物中，从而测定所述单链核酸的多核苷酸序列。

[0057] 在所述方法的一些实施方案中，每个多磷酸酯部分包含至少3个磷酸酯、至少4个磷酸酯、至少5个磷酸酯、至少6个磷酸酯、至少7个磷酸酯，或者在一些实施方案中至少8个磷酸酯。在一些实施方案中，多磷酸酯部分包含4-6个磷酸酯。在一些实施方案中，多磷酸酯部分包含6个磷酸酯。

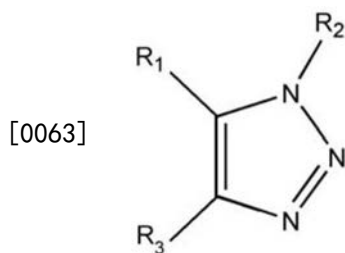
[0058] 在所述方法的一些实施方案中，每个标签通过三唑共价结合至末端磷酸酯。在一些实施方案中，每个三唑具有以下结构：



[0060] 其中R₁包含标签，R₂包含核苷酸；或者

[0061] 其中R₁包含核苷酸，R₂包含标签。

[0062] 在所述方法的一些实施方案中，每个三唑具有以下结构：



[0064] 其中 R_1 和 R_3 联合形成环状部分；并且

[0065] 其中联合的 R_1 和 R_3 包含标签， R_2 包含核苷酸；或者

[0066] 其中联合的 R_1 和 R_3 包含核苷酸， R_2 包含标签。

[0067] 在所述方法的一些实施方案中，每个三唑通过叠氮与炔之间的反应形成。

[0068] 在所述方法的一些实施方案中，每个标签通过1,2-二噻共价结合至末端磷酸酯。

[0069] 在一些实施方案中，每个标签包含核苷酸、寡核苷酸、肽、聚乙二醇 (PEG)、寡糖、碳水化合物、肽核酸 (PNA)、乙烯基聚合物、其他水溶性聚合物或其任意组合。

[0070] 在一些实施方案中，每种标签包含选自表6所列出的化学修饰的化学修饰。

[0071] 在一些实施方案中，每种带标签的核苷酸选自表4所列出的带标签的核苷酸。

[0072] 在一些实施方案中，每种带标签的核苷酸包含在将标签连接至核苷酸的接头中的花青染料部分，所述带标签的核苷酸与没有花青染料部分的带标签的核苷酸相比，具有改进的聚合酶捕获速率。

[0073] 在一些实施方案中，所述四种带标签的核苷酸为dA6P-Cy3- T_4 -F1dT-T-F1dT- T_{23} -C3、dT6P-Cy3- T_2 -dSp₈- T_{20} -C3、dG6P-Cy3- T_{30} -C6和dC6P-Cy3- T_4 -dSp₃- T_{23} -C3。

[0074] 根据以下具体描述，本公开的其他方面和优点对本领域技术人员而言将变得更加显而易见。其中仅示出和描述了本公开的示例性实施方案。应认识到，本公开能够为其他实施方案和不同的实施方案，能够不背离本公开的情况下在各种明显的方面改变它们的若干细节。因此，附图和说明书应被认为是示例性的而不是限制性的。

附图说明

[0075] 在所附的权利要求中具体阐述本发明的新特征。通过参考以下详细说明和附图（也称为“图”）将更好地理解本发明的特征和优点，所述详细说明列出了其中利用本发明的原理的示例性实施例，在附图中：

[0076] 图1示出了被连接至核苷酸的末端磷酸酯的标签；

[0077] 图2示出了交替标签位置；

[0078] 图3示出了带标签的核苷酸的实例；

[0079] 图4示出了带标签的核苷酸的实例；

[0080] 图5示出了带标签的核苷酸的结构。标签505被连接至末端磷酸酯；

[0081] 图6示出了能够通过点击化学反应连接在一起的核苷酸（左）和标签（右）；

[0082] 图7示出了四个经切割的标签的单元电流读数的示例；

[0083] 图8示意性地示出了本文所述的测序方法的操作；

[0084] 图9A、图9B和图9C示出了纳米孔检测器的实例，其中图9A具有设置在电极上的纳米孔，图9B具有插入在孔上方的膜中的纳米孔，图9C具有在突出电极上方的纳米孔；

- [0085] 图10示出了用于对核酸进行测序的方法；
- [0086] 图11示出了标签通过纳米孔而产生的信号的实例；
- [0087] 图12示出了包含纳米孔的示例性芯片装置；
- [0088] 图13示出了纳米孔检测器阵列；
- [0089] 图14示出了被配置为控制测序器的计算系统；
- [0090] 图15示出了可检测的TAG-多磷酸酯和可检测的TAG；
- [0091] 图16示出了合成香豆素-PEG-dG4P带标签的核苷酸的实例；
- [0092] 图17示出了通过MALDI-TOF MS表征释放的标签的实例；
- [0093] 图18示出了单元电流读数的直方图；
- [0094] 图19示出了对于4种不同的标签所测量到的以微微安培 (pico-amps) 计的电流相对于所测量到的以秒计的时间的关系图；
- [0095] 图20示出了缀合反应的实例；
- [0096] 图21A、图21B和图21C示出了可用于制备本公开的带标签的核苷酸的示例性点击化学反应,其中图21A示出了叠氮修饰的A化合物和炔修饰的B化合物之间的点击反应,用于产生具有三唑共价结合的A-B缀合物,其中图21B示出了叠氮修饰的A化合物和环辛炔修饰的B化合物之间的点击反应(例如,如在不铜的点击反应中),用于产生具有三唑共价结合的A-B缀合物,其中图21C示出了四嗪-修饰的A化合物和反式-环辛烯-修饰的B化合物之间的点击反应(例如,IEDDA点击反应),用于产生具有以二氢哒嗪互变异构形式的1,2-二嗪共价结合的A-B缀合物。
- [0097] 图22示出了dA6P-N₃和DBCO-Cy3之间点击反应的结果；
- [0098] 图23示出了MALDI-TOF MS谱,其表明叠氮-核苷酸到产物DBCO-Cy3-dT6P的转化；
- [0099] 图24示出了dT6P-N₃和己炔基-Cy3-T₂₅寡核苷酸之间的点击反应,用于形成dT6P-Cy3-T₂₅标签；
- [0100] 图25示出了合成2'-脱氧腺苷-5'-六磷酸酯以及使用点击化学将标签连接至末端磷酸酯的实例；
- [0101] 图26示出了dT6P-N₃和寡聚-炔之间的点击反应的实例；
- [0102] 图27示出了标签与核苷酸的硫醇(二硫键)结合的实例；
- [0103] 图28示出了标签-核苷酸dT6P-Cy3-T₂₅的质谱和延伸反应；
- [0104] 图29示出了可利用亚酰胺化学反应(amidite)并入至寡核苷酸中的单体的实例。
- [0105] 图30示出了使用叠氮-炔点击化学反应制备的四种不同的带标签的核苷酸,它们包含四种不同的寡核苷酸-Cy3标签。
- [0106] 图31示出了(A)来自使用包含不同寡核苷酸-Cy3标签的四种不同的带标签的核苷酸的DNA聚合酶延伸反应的样品的变性凝胶图像,所述DNA聚合酶延伸反应使用Bst2.0DNA聚合酶进行;和(B)用于反应的四种不同的寡核苷酸-Cy3带标签的核苷酸的MALDI-TOF MS分析。
- [0107] 图32示出了可以用于本公开的寡核苷酸标签中的示例性L-核苷酸。
- [0108] 图33示出了可以用于本公开的寡核苷酸标签中的示例性α-D-核苷、β-D-核苷和2'5-连接的核苷酸。
- [0109] 图34示出了可以用于本公开的寡核苷酸标签中的示例性非天然核苷酸间连接和

非天然糖。

[0110] 图35示出了SDS-PAGE凝胶图像,该图像显示的结果表明寡核苷酸标签的3'-化学修饰可以保护标签免受Phi29聚合酶的核酸外切酶降解。

[0111] 图36示出了使用纳米孔阵列芯片、引物(SEQ ID NO:121)和四种不同的寡核苷酸带标签的核苷酸(dT-Tag1是dT6P-Cy3-dT₂-dSp₈-dT₂₀-C3;dC-Tag2是dC6P-Cy3-dT₄-dSp₃-dT₂₃-C3;dG-Tag3是dG6P-Cy3-dT₃₀-C6;dA-Tag4是dA6P-Cy3-dT₄-FIdT-dT-FIdT-dT₂₃-C3)对DNA模板(SEQ ID NO:123)的一部分进行测序时在略微不同的条件下所测量到的对应于标签捕获事件的电流水平迹线。(A)和(B)所使用的条件均为:150mM KCl,20mM HEPES,pH 7.5缓冲液;孔反侧的3.0mM SrCl₂;施用并维持160mV电位。孔顺侧(cis side)的条件不同:(A)顺侧上0.1mM MnCl₂;(B)顺侧上3.0mM MgCl₂+0.7mM SrCl₂。

[0112] 图37示出了通过合成如上所示的双发夹模板的12碱基均聚区使用纳米孔阵列芯片和寡核苷酸带标签的核苷酸进行单分子实时电子测序时,在略微不同的条件下所测量到的对应标签捕获事件的电流水平迹线。所使用的条件是孔顺侧150mM KCl,3.0mM MgCl₂,孔反侧(trans side)3.0mM SrCl₂,施加并维持100mV电位。带标签的核苷酸如图36所示。

[0113] 图38示出了将引物(SEQ ID NO:124)连接至纳米孔,加入模板(SEQ ID NO:125)、带标签的核苷酸和DNA聚合酶用于DNA测序。如图所示,带标签的“A”核苷酸结合到聚合酶活性位点,其标签被置于适当位置(positioned)以进入纳米孔用于通过电流阻断进行检测。

具体实施方式

[0114] 虽然本文已经示出和描述了本发明的各种实施方案,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,这样的实施方案仅仅是以举例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员可以想到许多变化、改变和替换。应当理解,可以采用本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案。

[0115] 如本文所用的术语“纳米孔”通常是指在膜中形成或以其他方式提供的孔、沟道(channel)或通道(passage)。膜可以是有机膜例如脂质双层,或合成膜例如由聚合物材料形成的膜。纳米孔可以邻近或接近传感电路设置,例如互补金属氧化物半导体(CMOS)或场效应晶体管(FET)电路。纳米孔可以具有大约0.1纳米(nm)至约1000nm的特征宽度或直径。一些纳米孔是蛋白。 α -溶血素是蛋白纳米孔的一个实例。

[0116] 如本文所用的术语“核酸”通常是指包含一个或多个核苷酸子单元(subunits)的分子。核苷酸可以包括选自腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)的一个或多个子单元。在一些实例中,核酸是脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其衍生物。核酸可以是单链或双链的。

[0117] 如本文所用的术语“标签”通常是指使得能够检测或鉴定与标签结合的分子复合物的原子或分子。标签可以提供可检测的信号例如静电信号、电化学信号和/或光学(光)信号。

[0118] 如本文所用的术语“核苷酸”是指核苷-5'-多磷酸酯化合物或核苷-5'-多磷酸酯的结构类似物,其能够用作核酸聚合酶的底物或抑制剂以延伸增长的核酸链。示例性核苷酸包括但不限于核苷-5'-三磷酸酯(例如dATP、dCTP、dGTP、dTTP和dUTP);长度方向上具有4个或更多个磷酸酯的5'-多磷酸酯链(例如5'-四磷酸酯、5'-五磷酸酯、5'-六磷酸酯、5'-七

磷酸酯、5'-八磷酸酯)的核苷(例如dA、dC、dG、dT和dU),以及可以具有修饰的碱基部分(例如,取代的嘌呤或嘧啶碱基)、修饰的糖(例如O-烷基化糖)和/或修饰的多磷酸酯部分(例如包含硫代磷酸酯、亚甲基和/或磷酸酯之间的其他桥的多磷酸酯)的核苷-5'-三磷酸酯结构类似物。

[0119] 如本文所用的术语“带标签的核苷酸”是指具有连接至多磷酸酯部分、碱基部分或糖部分的纳米孔可检测的标签的任何核苷-5'-多磷酸酯。纳米孔可检测的标签包括能够进入纳米孔、位于纳米孔、被纳米孔捕获、移动通过和/或穿过(traverse)纳米孔并因此产生可检测的通过孔的电流变化的任何分子基团或部分(例如接头、寡聚物、聚合物)。示例性的纳米孔可检测的标签包括但不限于天然或合成聚合物例如聚乙二醇、寡核苷酸、多肽、碳水化合物、肽核酸聚合物、锁核酸聚合物,它们中的任一者可可选地用能够产生可检测的孔电流变化的任何化学基团例如染料部分或荧光团进行修饰或与能够产生可检测的孔电流变化的任何化学基团例如染料部分或荧光团连接。

[0120] 如本文所用的术语“寡核苷酸”是指核苷酸单体单元的寡聚物,其中寡聚物可选地包含非核苷酸单体单元和/或在寡聚体的内部和/或外部位置处连接的其他化学基团。寡聚物可以是天然或合成的,可以包括天然存在的寡核苷酸,或含有具有非天然存在(或修饰的)碱基、糖部分、磷酸二酯类似键(phosphodiester-analog linkages)和/或替代单体单元手性结构和异构结构(例如5'-至-2'连接、L-核苷、 α -端基异构体核苷)的核苷的寡聚物。在本公开的组合物和方法中用作纳米孔可检测的标签的示例性寡核苷酸包括表4所示的寡核苷酸标签结构。

[0121] 如本文所用的术语“核苷酸类似物”是指在结构上类似于核苷-5'-三磷酸酯并且能够用作核酸聚合酶的底物或抑制剂以延伸正在增长的核酸链的化合物。核苷酸类似物可以具有修饰的碱基部分,例如取代的嘌呤或嘧啶碱基、修饰的糖例如O-烷基化糖和/或修饰的多磷酸酯部分,例如包含硫代磷酸酯、亚甲基和/或磷酸酯之间的其他桥的多磷酸酯部分。其可在多磷酸酯链中具有多于三个磷酸酯,并且其可以在任何碱基、糖或多磷酸酯部分上被可检测地标签化。

[0122] 本文描述了使用纳米孔对核酸进行测序的方法、装置和系统。所述方法可以例如在通过核酸聚合酶将核苷酸并入至与模板核酸链互补的增长链中时精确地检测单个核苷酸并入事件。酶(例如DNA聚合酶)可以将核苷酸并入至增长的多核苷酸链,其中所添加的核苷酸与杂交至增长链的相应模板核酸链互补。这些核苷酸并入事件包括捕获核苷酸,读取孔中的相关标签,从核苷酸释放标签,然后释放的标签通过纳米孔。以这种方式,可以鉴定所并入的碱基(即A、C、G、T或U),原因是首先读取唯一标签,然后从每种类型的核苷酸(即A、C、G、T或U)释放该标签。

[0123] 可以借助于纳米孔实时地(即,当它们发生时)或在测序反应之后通过分析纳米孔数据来检测核苷酸并入事件。在一些情况下,连接或邻近纳米孔的酶(例如,DNA聚合酶)可以促进核酸分子源源不断地通过或接近纳米孔,并且将互补核苷酸的标签定位在纳米孔中用于检测。因此,与酶结合的互补的带标签的核苷酸(在标签释放之前)可以导致标签定位在纳米孔的孔中,然后可以通过穿过纳米孔的电流水平变化来检测标签。或者可以在释放后当一种或多种标签分子(本文中也称为“标签”)流过或邻近纳米孔时检测标签。在一些情况下,连接到或邻近纳米孔的酶可有助于检测在并入一个或多个核苷酸时释放的标签或其

他副产物。参见例如美国专利第8,889,348号;美国专利申请公开US 2013/0264207A1;以及PCT国际申请公开PCT/US13/35630和PCT/US13/35635,它们各自通过引用的方式整体并入本文。

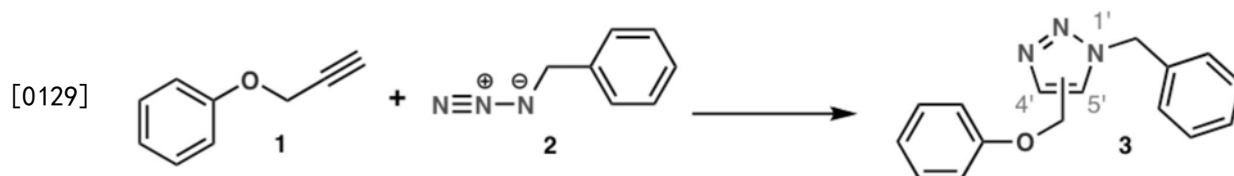
[0124] 本文所描述的方法可以是单分子方法。也就是说,检测的信号由单个分子产生(即,单个核苷酸并入),而不是由多个克隆分子产生。该方法可以不需要DNA扩增。

[0125] 核苷酸并入事件可以发生自包含多种核苷酸(例如脱氧核糖核苷三磷酸酯(dNTP,其中N是腺苷(A)、胞苷(C)、胸苷(T)、鸟苷(G)或尿苷(U),或其衍生物)的混合物。或者核苷酸并入事件不一定发生自包含单一类型核苷酸(例如,dATP)的溶液。核苷酸并入事件不一定发生自多种核苷酸的交替溶液(例如dATP,然后是dCTP,然后是dGTP,然后是dTTP,然后是dATP)。此外,如本公开全文所述,核苷酸并入事件也可以发生自带标签的核苷酸的混合物,其中带标签的核苷酸可包含长度方向上具有4个或更多个磷酸酯的5'-多磷酸酯链(例如,5'-四磷酸酯、5'-五磷酸酯、5'-六磷酸酯、5'-七磷酸酯、5'-八磷酸酯),并且在标签中包含其他化学部分。

[0126] 化学缀合方法例如“点击化学”

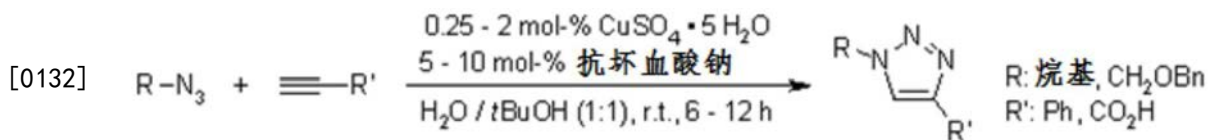
[0127] 本文描述了使用化学缀合将标签连接至核苷酸的方法。在一些实施方案中,使用“点击化学”反应或“点击反应(click reaction)”将标签连接至核苷酸。点击反应是特定化学基团对(例如叠氮与炔(或环辛炔),或四嗪与反式环辛烯)之间的快速不可逆反应。用于点击反应的特定化学基团对提供了共价连接,所述共价连接包含特定化学基团例如三唑或1,2-二嗪(或其互变异构体,二氢哒嗪)作为共价连接的一部分。图21示出了一般反应方案,其举例说明了用于制备本公开的带标签的核苷酸缀合物的三个示例性点击反应。下文进一步描述了这三个示例性反应。

[0128] 叠氮和炔之间的示例性点击反应是叠氮-炔Huisgen环加成反应。叠氮-炔Huisgen环加成反应是具有叠氮基团的化合物和具有末端或内部炔基的化合物之间的1,3-偶极环加成反应,其产生具有1,2,3-三唑共价连接的产物化合物。示例性的叠氮-炔Huisgen点击反应遵循图21A的一般方案,并在下面的方案中得到进一步详述。



[0130] 在上述示例性的叠氮-炔环加成反应方案中(例如,在98°C下、在18小时内进行),化合物2的叠氮基团与化合物1的炔基反应,得到产物组合物3,其为1,4-三唑与1,5-三唑加合物(adduct)的混合物。

[0131] 铜催化的叠氮-炔环加成反应也提供与共价三唑连接结合的点击反应产物,却可以以 10^7 倍和 10^8 倍于未经催化的1,3-偶极环加成反应的巨大速率加速进行。此外,这种Cu催化的点击反应可以在宽的温度范围内发生、对水性条件不敏感、pH范围为约4至约12、可以耐受宽范围的官能团并且可以在合适条件下产生单一的异构体。参见例如Himo等人(2005),其通过引用的方式整体并入本文。Cu催化的化学反应遵循图21A所示的用于缀合两种化合物(A和B)的一般方案,并在下面的方案中得到进一步详述。



[0133] 由于其对水性条件的耐受性, Cu-催化的叠氮-炔点击反应已经被用于生物分子的共价缀合。例如参见Wang等人(2003)和Presolski等人(2011)。这种Cu-催化的叠氮-炔点击反应也可以用于根据本公开的方法将标签连接至核苷酸, 并提供在标签和核苷酸之间的共价连接中包含三唑的带标签的核苷酸。

[0134] 还开发了无铜点击反应, 其使用叠氮-修饰的化合物和环辛炔-修饰的化合物(例如, 用二苄基-环辛炔“DBCO”改性)之间的环加成反应以产生两种化合物的产物缀合物, 所述产物缀合物包括共价三唑连接。例如, 参见Jewett和Bertozzi(2010)。使用无Cu叠氮-环辛炔点击反应以用三唑缀合两种化合物A和B的一般方案描述于图21B中。在一些实施方案中, 这种无Cu的点击反应可以用于根据本公开的方法将标签连接至核苷酸, 并提供标签和核苷酸之间的共价连接中包含三唑的带标签的核苷酸。

[0135] 可用于提供本公开的带标签的核苷酸的另一种点击化学反应是逆电子需求狄尔斯-阿尔德(inverse-electron demand Diels-Alder, IEDDA)反应。例如, 参见Reiner等人(2014)和美国专利申请公开2013/0266512A1和2013/0085271 A1。IEDDA点击反应使用四嗪-修饰的化合物和反式-环辛烯修饰的化合物之间的快速不可逆反应, 以提供缀合物产物, 所述缀合物产物包含共价1,2-二嗪键, 或更具体地, 1,2-二嗪的互变异构等价物, 二氢哒嗪。使用四嗪和反式环辛烯之间的IEDDA点击反应以用1,2-二嗪(二氢哒嗪互变异构体)基团缀合两种化合物A和B的一般方案描述于图21C中。因此, 在一些实施方案中, 这种IEDDA点击反应也可以用于根据本公开的方法将标签连接至核苷酸, 并提供在标签和核苷酸的共价连接之间中含有1,2-二嗪(二氢哒嗪互变异构体)的带标签的核苷酸。

[0136] 核苷酸多磷酸酯与标签的连接也可以通过形成二硫化物(形成容易切割的连接)、形成酰胺、形成酯、通过烷基化(例如, 使用取代的碘乙酰胺试剂)或使用醛和胺或肼形成加合物来实现。许多缀合化学反应可以在Hermanson(2008年5月2日)中找到, 其通过引用的方式整体并入本文。

[0137] 带标签的核苷酸

[0138] 在一些情况下, 带标签的核苷酸包括在聚合酶催化的核苷酸并入事件期间与核苷分离的标签(或标记)。标签可以被连接至核苷酸的5'-磷酸酯或5'-多磷酸酯链上。在一些情况下, 标签不包含荧光团。标签可以由纳米孔检测并且通过其电荷、形状、大小或其任意组合来鉴定(例如, 与其他标签不同)。标签的实例包括各种聚合物。每种类型的核苷酸(即A、C、G、T、U)通常包含可被独特识别的标签。

[0139] 本公开的标签可以是可以使用静电、电化学和/或光学方法检测的分子。在一些实例中, 标签可以提供给定核酸分子(例如, A、C、G、T、U)独一无二的电子信号。

[0140] 标签可以位于核苷酸的任何合适的位置上。图1示出了潜在的带标签的核苷酸, 其中R₁可以是OH, R₂可以是H(即脱氧核糖核苷酸)或OH(即核糖核苷酸), 但是可接受R₁和R₂的其他选择。在图1中, X是任何合适的接头。在一些情况下, 接头是可切割的。接头的实例包括但不限于O、NH、S或CH₂。接头还可以含有例如O、N、S或P原子。如在美国专利申请第13/994, 431号(其在上文中通过引用的方式整体并入本文)中所讨论的, 接头也可以是可直接或间

接检测的部分,例如氨基酸、肽、蛋白、碳水化合物、不同长度和分子量的PEG、有机或无机染料、荧光染料和发荧光的染料、药物、寡核苷酸、质量标签、化学发光标签,并且可以包含正电荷或负电荷。

[0141] 在一些实施方案中,合适的接头包含荧光花青染料(或“CyDye”),例如Cy3和Cy3.5。在这样的实施方案中,接头中的CyDye部分可以用于提供可用于检测带标签的核苷酸的另外的(additional)部分,或者CyDye部分不能被检测到,只是简单地提供另外的结构,所述另外的结构增强检测与接头连接的标签部分的能力。实际上,在寡核苷酸标签的接头部分中存在CyDye部分可以增强纳米孔对带标签的核苷酸的捕获和检测。实施例15表明了当与连接至纳米孔的DNA聚合酶结合时,接头部分中具有Cy3部分的寡核苷酸标签如何增强纳米孔对带标签的核苷酸的捕获和检测。因此,在一些实施方案中,本公开提供带标签的核苷酸,其中标签包含CyDye部分,在一些实施方案中,CyDye部分为Cy3。在带标签的核苷酸的一些实施方案中,标签包含寡核苷酸和接头,接头进一步包含CyDye部分。

[0142] Z位上合适化学基团的实例包括O、S或 BH_3 。碱基可以是适于并入核酸的任何碱基,包括腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶或其衍生物。通用碱基(即能够与A、C、T、G和U中多于一种碱基配对的碱基)在一些情况下也是可接受的(例如,2'-脱氧肌苷衍生物、硝基咪唑衍生物)。

[0143] 磷酸酯数(n)是任何合适的整数值(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多)(例如使得核苷酸可以被聚合酶并入至核酸分子中的磷酸酯数)。在一些情况下,所有类型的带标签的核苷酸具有相同的磷酸酯数,但这不是必需的。在一些应用中,每种类型的核苷酸的标签是不同的,磷酸酯数不一定用于区分各种标签。然而,在一些情况下,一种以上类型的核苷酸(例如,A、C、T、G或U)可以具有相同的标签,并且将一个核苷酸与另一个核苷酸区分开的能力至少部分地由磷酸酯数决定(在各种类型的核苷酸具有不同n值的情况下)。在一些实施方案中,n的值为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。

[0144] 下面描述合适的标签。在一些情况下,标签具有相对于其余核苷酸上的电荷符号相反的电荷。当连接上标签时,整个化合物上的电荷可以是中性的。标签的释放可产生两个分子,带电荷的标签和带电荷的核苷酸。在一些情况下带电荷的标签进入纳米孔从而被检测到。

[0145] 合适的带标签的核苷酸的更多实例示于图2中。标签可以被连接至糖部分、碱基部分、多磷酸酯部分或其任何组合。参考图2,Y是标签,X是接头(在一些情况下是可切割的)。此外, R_1 如果存在则通常为-OH、 $-OCH_2N_3$ 或-O-2-硝基苄基, R_2 如果存在则通常为-H或-OH。而且,Z通常是O、S或 BH_3 ,n是任意的整数,包括1、2、3、4、5、6或7。在一些情况下,A是O、S、 CH_2 、CHF、CFF或NH。

[0146] 继续参考图2,可以使用一组4种不同的带标签的核苷酸,其中带标签的核苷酸上每种类型的碱基通常不同于其他三种带标签的核苷酸上各自的碱基类型,每种带标签的核苷酸上的标签类型通常不同于其他三种带标签的核苷酸上各自的标签类型。合适的碱基包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶或胸腺嘧啶或其各自的衍生物。在一些情况下,碱基是7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤或5-甲基胞嘧啶中的一种,或者是非天然存在的碱基例如硝基吡咯、硝基咪唑、水粉伞素、泽布拉林、苯或其衍生物(例如参见图29)。

[0147] 在 R_1 是-O- CH_2N_3 的情况下,核苷酸可以用于进一步包括处理所并入的带标签的核

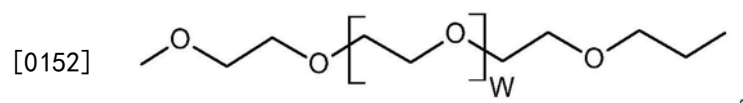
苷酸以便除去-CH₂N₃并得到连接至3'位置的OH基团从而允许并入其他带标签的核苷酸的方法。

[0148] 在R₁是-O-2-硝基苄基的情况下,带标签的核苷酸可以用于进一步包括处理所并入的带标签的核苷酸以便除去-2-硝基苄基并得到连接至3'位置的OH基团从而允许并入其他带标签的核苷酸的方法。

[0149] 标签可以是能够在纳米孔中检测或借助纳米孔检测的任何化学基团。在一些情况下,标签包含乙二醇、氨基酸、碳水化合物、肽、染料、化学发光化合物、单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸、寡核苷酸(长度大于6-mer)、多核苷酸、脂肪酸、芳香酸、醇、硫醇基、氰基、硝基、烷基、烯基、炔基、叠氨基或其组合中的一种或多种。

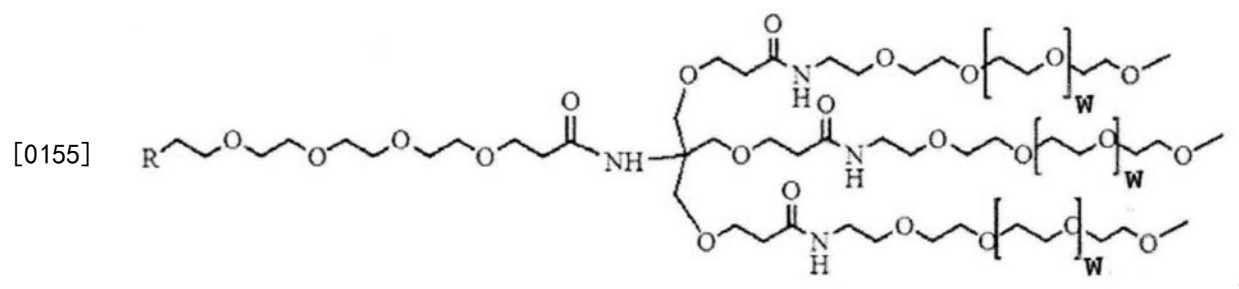
[0150] 还预期标签进一步包含适当数目的赖氨酸或精氨酸以平衡化合物中的磷酸酯数。

[0151] 在一些情况下,标签是聚合物。聚乙二醇(PEG)是聚合物的实例,其具有如下结构:



[0153] 可以使用任意的乙二醇单元数(W)。在一些情况下,W是在0和100之间的整数。在一些情况下,每种类型的核苷酸的乙二醇单元数是不同的。在一个实施方案中,四种类型的核苷酸包含具有16、20、24或36个乙二醇单元的标签。在一些情况下,标签进一步包含另外的可识别部分,例如基于香豆素的染料。在一些情况下,聚合物是带电荷的。在一些情况下,聚合物是不带电荷的并且在高浓度的盐(例如,3-4M)中检测标签。在一些情况下,聚合物是包含核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸的寡核苷酸。此外,聚合物可以是包含氨基酸亚单元(subunits)的多肽。

[0154] 在一些情况下,标签包含多个PEG链。在实例中,标签具有如下结构:



[0156] 其中R是NH₂、OH、COOH、CHO、SH或N₃,W是0至100的整数。例如参见美国专利申请第13/994,431号,其在上文中通过引用的方式整体并入本文。

[0157] 如上所述,在一些实施方案中,带标签的核苷酸的标签本身可以包含寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸标签可以包含天然存在的碱基(例如A、C、G、T)、非天然存在的(或修饰的)核苷碱基或其混合物。一些示例性的非天然存在的(或修饰的)碱基示于图29中,包括但不限于硝基吡咯、硝基吡啶、水粉伞素,泽布拉林和苯,以及其衍生物。在一些实施方案中,寡核苷酸标签可以包含天然存在的磷酸二酯核苷酸间连接,或可以具有非天然存在的核苷酸间连接,例如磷酸三酯、硫代磷酸酯、甲基磷酸酯或硼磷酸酯。在一些情况下,核苷酸间连接是吗啉代部分。

[0158] 如下文所进一步描述的,寡核苷酸标签可以由纳米孔检测,因为它们在孔中的存在导致与纳米孔相连的传感器中可检测的电流变化。然而,寡核苷酸不必杂交。实际上,寡

核苷酸标签与模板序列的杂交可在提供纳米孔测序所必需的适当的电流阻断信号方面产生问题。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸标签可以包含具有一个或多个非天然碱基(例如,上文所述的碱基)或非天然糖部分(在下文进一步描述)的核苷酸。这种非天然存在的碱基和糖部分不与天然核苷酸形成氢键,因此不与正在被测序的核酸模板杂交。

[0159] 另外,在一些实施方案中,寡核苷酸标签可以包含L-核苷酸(而不是D-核苷酸)。可用于本公开的寡核苷酸标签的示例性L-核苷在图32A中示出。L-核酸通常不识别单链的天然DNA和RNA(例如参见Asseline等人(1991)和Garbesi等人(1993))。预期寡核苷酸标签可以这样的比例包含所有L-核苷酸或L-核苷酸与D-核苷酸的混合物,以使得它们不与正在被测序的核酸模板杂交。因此,本公开提供带标签的核苷酸,其包含:(a)具有末端磷酸酯的核苷酸多磷酸酯部分;和(b)寡核苷酸标签,其包含通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、酰胺、脞、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加合物直接或用另外的接头部分共价结合至末端磷酸酯的L-核苷酸。

[0160] 天然存在的核苷相对于核糖和核酸碱基的1'-位置具有 β -D构型。在另一个实施方案中,寡核苷酸标签可以包含 α -D-核苷(图33A)。寡核苷酸标签可以以一定比例包含所有的 α -D-核苷酸和 β -D-核苷酸或者 α -D-核苷酸与 β -D-核苷酸的混合物,使得它们不与正在被测序的核酸模板杂交(图33B)。因此,本公开提供带标签的核苷酸,其包含:(a)具有末端磷酸酯的核苷酸多磷酸酯部分;和(b)寡核苷酸标签,其包含通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、酰胺、脞、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加合物直接或用另外的接头部分共价结合至核苷酸的末端磷酸酯的 α -D-核苷酸。

[0161] 在另一个实施方案中,本公开提供包含如Kim等人(2005)、Sefah等人(2014)和Romesberg等人(J. Am. Chem. Soc. (美国化学杂志) 2014和Nucleic Acids Research (核酸研究) 2014)所述的非天然合成核苷的寡核苷酸标签。在这些出版物中描述的非天然合成核苷不与天然存在的核苷(腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、脱氮嘌呤或其衍生物)形成H-键,因此不与天然核酸模板杂交。包含这种非天然合成核苷的寡核苷酸标签可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,并且可以包含所有非天然核苷或其与一些天然存在的核苷的混合物。

[0162] 在另一方面,本公开提供带标签的核苷酸,其中标签包含寡核苷酸,所述寡核苷酸具有至少一个在标签中一对核苷酸之间的2',5'-连接(linkage)(而不是天然存在的3',5'-连接)的寡核苷酸。图33B示出了2',5'-连接的寡核苷酸和3',5'-连接的寡核苷酸的比较图。这种2',5'-连接的寡核苷酸选择性地与互补RNA结合,但不与DNA模板结合(Bhan等人(1997))。因此,包含2',5'-连接的寡核苷酸的寡核苷酸标签不会结合正在被测序的核酸模板。预期寡核苷酸标签可仅包含2',5'-连接的核苷酸或可包含2',5'-连接的核苷酸和3',5'-连接的核苷酸的混合物。因此,本公开提供寡核苷酸标签,其包含:(a)具有末端磷酸酯的核苷酸多磷酸酯部分;和(b)包含1-100个2',5'-连接的核苷酸单元的链的标签,所述标签通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、酰胺、脞、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加合物直接或用另外的接头部分共价结合至核苷酸的末端磷酸酯。

[0163] 在另一方面,本公开提供带标签的核苷酸,其中标签包含具有至少一个修饰的糖和/或磷酸酯部分的寡核苷酸。可用于本公开的寡核苷酸标签的示例性的修饰的糖和/或磷酸酯部分描述于图34中。预期寡核苷酸标签可仅包含修饰的糖和/或磷酸酯部分或者可包

含修饰的糖和/或磷酸酯部分与天然存在的(例如核糖)核苷酸的混合物。因此,本公开提供寡核苷酸标签,其包含:(a)具有末端磷酸酯的核苷酸多磷酸酯部分;和(b)包含含有修饰的糖和/或磷酸酯部分的1-100个核苷酸单元的链的标签,所述通过三唑、1,2-二噻、二硫化物、酰胺、脲、硫代乙酰胺或马来酰亚胺-硫加合物直接或用另外的接头部分共价结合至核苷酸的末端磷酸酯。

[0164] 在本公开提供的带标签的核苷酸的实施方案中,预期天然或合成的寡核苷酸标签可以通过其5'端或3'端直接或经由接头部分共价结合至核苷酸的末端磷酸酯。在一些实施方案中,寡核苷酸标签通过其5'端直接或经由接头部分共价结合至核苷酸的末端磷酸酯。在这些实施方案中,预期修饰寡核苷酸标签另一端的3'-羟基,以保护寡核苷酸免受潜在的外切核酸酶降解。在一些实施方案中,通过化学修饰保护寡核苷酸标签3'-羟基末端免受外切核酸酶活性的攻击。3'-羟基末端的示例性化学修饰可以包括磷酸酯化或与具有末端羟基的C₃-烷基至C₁₂-烷基间隔子的共价结合。

[0165] 在一些实例中,标签选自分子(dCp)_m、(dGp)_m、(dAp)_m和(dTp)_m或(dCp)、(dGp)、(dAp)和(dTp)中一个或多个单元的组。图3和图4示出了与核苷酸连接的这些分子。在此,“m”独立地是0-100的整数,其中当m是0时,dNPP的末端磷酸酯与结构左手侧示出的核苷的3' O原子键合。在一些情况下,对于每种类型的碱基,n值是不同的。

[0166] 在一些情况下,标签是取代或未取代的烃基,例如烷基、烯基、炔基,具有3000道尔顿以下的质量。

[0167] 如本文所用的术语“烷基”包括具有指定数目碳原子的支链和直链饱和脂族烃基,可以是未取代的或取代的。如本文所用,“烯基”是指含有至少1个碳碳双键的直链或支链非芳族烃基,可存在最多可能数量的非芳族碳-碳双键,并且可以是未取代的或取代的。术语“炔基”是指含有至少1个碳碳三键的直链或支链烃基,可存在最多可能数量的非芳族碳-碳三键,并且可以是未取代的或取代的。术语“取代的”是指如上所述的官能团例如烷基或烃基,其中其内包含的至少一个与氢原子所成的键被与非氢原子或非碳原子所成的键替代,只要保持正常价态并且取代得到的是稳定的化合物。被取代的基团还包括其中一个或多个与碳或氢原子所成的键被一个或多个与杂原子所成的键(包括双键或三键)替代。

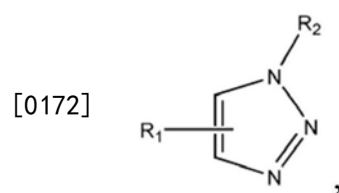
[0168] 图5示出了具有与末端磷酸酯连接的标签505的核苷。如此处所示,碱基可以是任何碱基(例如A、T、G、C、U或其衍生物),R可以是任何化学基团(例如H、OH),n可以是任何整数(例如,0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大),X可以是任何化学基团(例如O、NH、S),Y可以是与X共价键合并与标签连接的任何官能团。标签的实例包括但不限于任意大小(例如,具有2-100个碱基、5-50个碱基或2-40个碱基)的寡核苷酸。在一些情况下,寡核苷酸标签具有作为均聚物或杂聚物的硝基吡咯、硝基吡啶、水粉伞素、泽布拉林、苯或其衍生物。在一些情况下,标签具有磷酸三酯、磷酸二酯、磷酸酰胺酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯或硼磷酸酯核苷酸间连接。在一些情况下,核苷酸间连接是吗啉代部分。

[0169] 在一些实施方案中,使用叠氮-炔Huisgen环加成反应(也称为“点击化学反应”)将标签连接至核苷酸。例如,图6示出了使用点击化学反应使具有与末端磷酸酯连接的带有6碳间隔子和反应性叠氮基团的6磷酸酯的核苷酸(左侧)与具有6碳间隔子和反应性炔基的标签反应。如本文别处所述,图21A、21B和21C示出了用于缀合两种化合物(A和B)的三个示例性点击化学反应。可以改变这三个示例性点击反应中的任一个以使其适用于将标签缀合

至核苷酸从而制备本公开的带标签的核苷酸。在实施例中提供了使用这样的点击反应的具体说明。

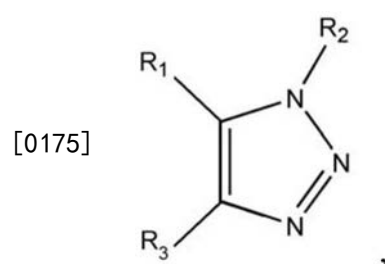
[0170] 在一个方面,通过提供包含含有末端磷酸酯的多磷酸酯尾的核苷酸来形成带标签的核苷酸。核苷酸的末端磷酸酯可以共价连接至烷烃或与叠氮类似的接头。可以使用“点击”反应使标签共价结合至核苷酸末端磷酸酯-叠氮上以形成三唑。可以通过叠氮和炔之间的反应形成三唑。在一些实施方案中,多磷酸酯尾包含至少3个磷酸酯、至少4个磷酸酯、至少5个磷酸酯、至少6个磷酸酯或至少7个磷酸酯。在一些实施方案中,多磷酸酯部分包含4至6个磷酸酯。在一些实施方案中,多磷酸酯部分包含至少6个磷酸酯。标签可以包含核苷酸、寡核苷酸、聚乙二醇(PEG)、寡糖、碳水化合物、肽核酸(PNA)、乙烯基聚合物、其他水溶性聚合物、肽或其任何组合。

[0171] 在一些情况下,三唑具有以下结构:



[0173] 其中 R_1 包含标签, R_2 包含核苷酸;或者其中 R_1 包含核苷酸, R_2 包含标签。

[0174] 在一些情况下,三唑具有如下结构:



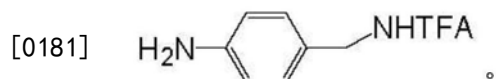
[0176] 其中 R_1 和 R_3 联合形成环状部分;并且其中联合的 R_1 和 R_3 包含标签, R_2 包含核苷酸;或者其中联合的 R_1 和 R_3 包含核苷酸, R_2 包含标签。

[0177] 本文还提供制备带标签的核苷酸的方法,其包括提供包含多磷酸酯尾的核苷酸,其中多磷酸酯尾包含末端磷酸酯。末端磷酸酯可以包含叠氮基团或炔基。该方法包括提供包含叠氮基团或炔基的标签分子,其中核苷酸和标签分子并不是都包含叠氮基团,并且其中核苷酸和标签分子并不是都包含炔基。该方法还可包括使叠氮基团与炔基反应以将核苷酸连接至标签分子。在一些情况下,通过包含铜、钪、银的盐或其任何组合的催化剂促进反应。

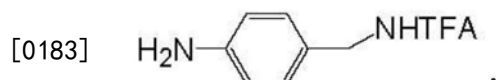
[0178] 在一些情况下,反应不需要催化剂。当炔是环辛炔(例如,二苄基环辛炔)时,可不需要催化剂。

[0179] 在一些情况下,可以如下将标签连接至末端磷酸酯:(a)使核苷三磷酸酯与二环己基碳二亚胺/二甲基甲酰胺在允许产生环状三偏磷酸酯的条件下接触;(b)使由操作(a)得到的产物与亲核试剂接触以形成-OH或-NH₂官能化(functionalized)的化合物;和(c)使操作(b)的产物与其上连接有-COR基团的标签在允许标签与末端磷酸酯间接键合的条件下反应,从而形成带标签的核苷酸。

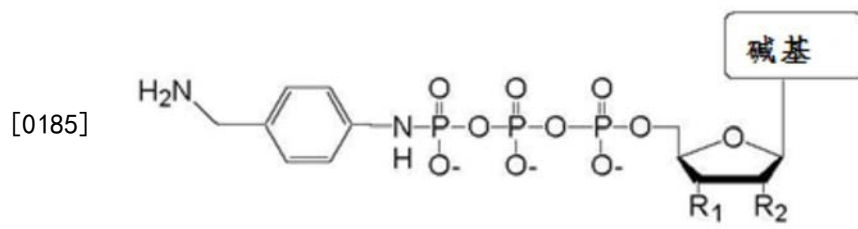
[0180] 在一些情况下,亲核试剂为H₂N-R-OH、H₂N-R-NH₂、R' S-R-OH、R' S-R-NH₂或



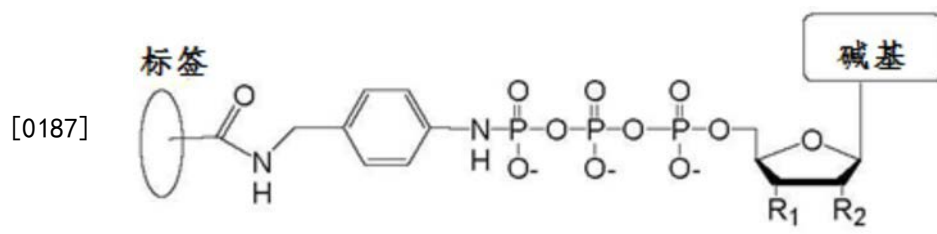
[0182] 在一些情况下,该方法包括在操作b)中使由操作a)得到的产物与具有如下结构的化合物接触:



[0184] 随后或同时使产物与 NH_4OH 接触以形成具有如下结构的化合物:



[0186] 然后,可将操作b)的产物与其上连接有-COR基团的标签在允许标签与末端磷酸酯间接键合的条件下反应,从而形成具有如下结构的带标签的核苷酸:



[0188] 其中 R_1 是OH,其中 R_2 是H或OH,其中碱基是腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、7-脱氮嘌呤或5-甲基嘧啶。

[0189] 核苷酸多磷酸酯与标签的连接还可以通过形成二硫化物(形成容易切割的连接)、形成酰胺、形成酯;通过烷基化(例如,使用取代的碘乙酰胺试剂)或使用醛以及胺或肼形成加合物来实现。许多共轭化学反应可以在Hermanson (2008)中找到,其通过引用的方式整体并入本文。

[0190] 末端磷酸酯或寡核苷酸标签上的反应性基团以及可与所述反应性基团发生反应的基团的具体实例提供于表1中。它们可与其发生反应的这些反应性基团可存在于接头或标签上。

[0191] 表1:可能的反应性取代基以及可与其反应的官能团

	反应性基团	官能团
	琥珀酰亚胺酯	伯氨基、仲氨基
	酐和酸酐	氨基和羟基
	羧基	氨基、羟基、硫醇
	醛、异硫氰酸酯和异氰酸酯	氨基
[0192]	乙烯基砷和二氯三嗪	氨基
	卤代乙酰胺	硫醇(thiols)、咪唑
	马来酰亚胺	硫醇、羟基、氨基
	硫醇	硫醇、马来酰亚胺、卤代乙酰胺
	亚磷酰胺、活性磷酸酯基团	羟基、氨基、硫醇基(thiol group)
	叠氮	炔
	四嗪	二烯

[0193] 本公开的另一方面提供了借助邻近传感电极的膜中的纳米孔对核酸样品进行测序的方法。该方法包括将具有通过三唑连接至末端磷酸酯的标签的带标签的核苷酸提供到包含纳米孔的反应室中,其中带标签的核苷酸中的单个带标签的核苷酸包含可借助纳米孔检测的、与核苷酸结合的标签。聚合反应在聚合酶的帮助下进行,从而将带标签的核苷酸中的单个带标签的核苷酸并入与来自核酸样品的单链核酸分子互补的增长链中。使用纳米孔,在允许标签进入并变得定位在邻近孔中的聚合酶活性下形成复合物时和/或在聚合酶将单个带标签的核苷酸并入至增长链之后,检测与单个带标签的核苷酸相连的标签,其中当已经从核苷酸切割下标签时,借助于纳米孔检测标签。图7示出了使用点击化学反应连接的四种不同标签的单元电流(cell current)读数。可单独解析四种不同的标签,并使其对应A残基、T残基、G残基和C残基。

[0194] 用于分子传感和/或鉴定的方法

[0195] 本公开提供用于分子传感和/或鉴定的方法。这样的方法可以用于检测各种类型的生物物质,例如核酸、蛋白质和抗体。在一些实施方案中,将用于分子鉴定的方法用于对核酸分子进行测序。

[0196] 在一个实例中,用于对核酸进行测序的方法包括获取具有待测序核酸的生物样品,从生物样品中提取或以其他方式分离出核酸样品,在一些情况下制备用于测序的核酸样品。

[0197] 图8示意性地示出了用于对核酸样品进行测序的方法。该方法包括从生物样品(例如,组织样品、流体样品)分离核酸分子,制备用于测序的核酸样品。在一些情况下,从细胞提取核酸样品。用于提取核酸的一些示例性技术是使用溶菌酶、超声处理、萃取、高压或其任何组合。在一些情况下,核酸是无细胞核酸,不需要从细胞中提取。

[0198] 在一些情况下,可以通过包括从核酸样品中去除蛋白、细胞壁碎片和其他组分的

方法来制备用于测序的核酸样品。有许多商业产品可用于实现这一点,例如旋转柱 (spin columns)。也可以使用乙醇沉淀和离心。

[0199] 核酸样品可以被分割(或断裂)成多个片段,这有利于核酸测序,例如借助于包含在阵列中的多个纳米孔的装置。然而,使待测序的核酸分子断裂不是必需的。

[0200] 在一些情况下,测定长序列(即,可能不需要“鸟枪法测序”方法)。可以测定任何合适长度的核酸序列。例如,可以对至少约400个、约500个、约600个、约700个、约800个、约800个、约1000个、约1500个、约2000个、约2500个、约3000个、约3500个、约4000个、约6000个、约7000个、约8000个、约9000个、约10000个、约20000个、约40000个、约60000个、约80000或约100000个碱基进行测序。在一些情况下,可以对至少400个、至少500个、至少600个、至少700个、至少800个、至少800个、至少1000个、至少1500个、至少2000个、至少2500个、至少3000个、至少3500个、至少4000个、至少4500个、至少5000个、至少6000个、至少7000个、至少8000个、至少9000个、至少10000个、至少20000个、至少40000个、至少60000个、至少100000个碱基进行测序。在一些情况下,被测序的碱基是连续的。在一些情况下,可以在测序之前分割核酸样品。

[0201] 标签可以以任何方式释放。标签可以在核苷酸被并入至多核苷酸链期间或之后释放。在一些情况下,标签被连接至核苷酸的多磷酸酯部分(例如如图15),并且核苷酸并入核酸分子导致释放其上连接有标签的多磷酸酯(例如,使其与核苷酸的其余部分和增长的核酸链分开)。可以通过至少一种聚合酶催化并入,所述聚合酶可以被连接至纳米孔。在一些情况下,至少一种磷酸酯酶也与孔连接。磷酸酯酶可从释放的多磷酸酯标签切割磷酸酯。在一些情况下,放置磷酸酯酶以使聚合酶的多磷酸酯产物在标签进入孔之前与磷酸酯酶相互作用。

[0202] 在一些情况下,标签不被连接至多磷酸酯(例如参见图2)。在这些情况下,标签通过可切割的接头(X)连接。用于产生可切割加帽和/或可切割连接的核苷酸的方法公开于美国专利第6,664,079号中,其通过引用的方式整体并入本文。接头不必是可切割的。

[0203] 接头可以是任何合适的接头,可以以任何合适的方式切割。接头可以是可光切割的 (photocleavable)。在一个实施方案中,UV光用于光化学切割可光化学切割的接头和部分。在一个实施方案中,可光切割的接头是2-硝基苄基部分。

[0204] 可以用TCEP(三(2-羧基乙基)膦)处理 $-\text{CH}_2\text{N}_3$ 基团以便将其从核苷酸的3'-O原子上除去从而产生3' OH基团。

[0205] 在一些情况下,聚合酶从包含多种不同碱基(例如A、C、G、T和/或U)的带标签的核苷酸池中得到核苷酸。还可以使聚合酶单独且连续地与包含不同碱基的各种类型的带标签的核苷酸接触。在这种情况下,每种类型的核苷酸可以不必具有独特的标签,因为在任何给定的反应期间仅存在一种核苷酸。

[0206] 图15示出了在一些实施方案中将带标签的核苷酸并入至核酸分子中(例如使用聚合酶来延伸与模板碱基配对的引物)可以释放可检测的TAG-多磷酸酯。在一些情况下,TAG-多磷酸酯在其通过纳米孔时被检测。

[0207] 在一些情况下,所述方法基于多磷酸酯中包含的磷酸酯数目(例如,即使当TAG相同时)区分核苷酸。然而,每种类型的核苷酸可以具有独特的标签。

[0208] 参考图15,在使标签进入和/或通过纳米孔并测量离子电流之前,可以用磷酸酯酶

(例如碱性磷酸酯酶)处理TAG-多磷酸酯化合物。

[0209] 标签可在它们从核苷酸释放后流过纳米孔。在一些情况下,施加电压以将标签定位在纳米孔中并拉动标签通过纳米孔。至少约85%、至少90%、至少95%、至少99%、至少99.9或至少99.99%的所释放的标签可以进入、定位在纳米孔中和/或移动(translocate)通过纳米孔。

[0210] 在一些情况下,标签在检测标签的纳米孔中停留一段时间。在一些情况下,施加电压以将标签拉入纳米孔、检测标签或其任何组合。可以在核苷酸并入事件发生时释放标签。

[0211] 在一些实施方案中,当标签仍然与带标签的核苷酸连接时,而不是当标签随后从核苷酸释放并通过纳米孔通道时,监测和检测纳米孔电流变化事件。在这样的实施方案中,当带标签的核苷酸在聚合酶活性位点处与其互补模板核苷酸以三元复合物的形式存在时,即在核苷酸并入和磷酸基转移之前检测标签。在这样的实施方案中,在三元复合物形成期间标签的长“尾部”变得定位在邻近纳米孔的孔中(或被邻近纳米孔“捕获”),导致通过纳米孔的电流水平的变化(即,电流阻断事件)。可通过使用聚合酶和使核苷酸并入速率减慢以致于慢于纳米孔处的标签捕获和电流阻断测量速率的反应条件(例如pH、金属盐等),促进在三元复合物中连接有标签时进行的标签检测。另外,将聚合酶适当地共价拴系(tethering)至纳米孔可导致在微秒级的快速标签捕获。

[0212] 可以在纳米孔中(至少部分地)检测标签,这归因于标签的电荷。在一些情况下,标签化合物是交替带电的化合物,其具有第一净电荷并且在化学、物理或生物反应后具有不同的第二净电荷。在一些情况下,标签上电荷的量值与化合物其余部分上电荷的量值相同。在一个实施方案中,标签具有正电荷,除去标签会改变化合物的电荷。

[0213] 在一些情况下,当标签进入、定位于、移动通过(passes into)和/或通过纳米孔时,可以产生电子变化。在一些情况下,电子变化是电流幅度的变化、纳米孔的电导变化或其任何组合。

[0214] 纳米孔可以是生物纳米孔或合成纳米孔或杂交纳米孔。还预期孔是蛋白质,例如其中孔是 α -溶血素蛋白。合成纳米孔的实例是固态孔或石墨烯。

[0215] 在一些情况下,聚合酶和/或磷酸酯酶被连接至纳米孔。可以使用用于制备融合蛋白或蛋白缀合物的多种技术。融合蛋白或二硫化物交联是用于与蛋白质纳米孔连接的方法的实例。在固态纳米孔的情况下,与纳米孔附近的表面的连接可以通过生物素-链霉亲和素连接。在一个实例中,DNA聚合酶通过用氨基官能化的烷基硫醇自组装单层改性的金表面连接至固体表面,其中氨基被修饰成NHS酯用于与DNA聚合酶上的氨基连接。该方法可在任何合适的温度下进行。在一些实施方案中,温度在4℃和10℃之间。在一些实施方案中,温度是环境温度。该方法可以在任何合适的溶液和/或缓冲液中进行。在一些情况下,缓冲液是用20mM HEPES缓冲至pH 7.0至8.0的300mM KCl。在一些实施方案中,缓冲液不包含二价阳离子。在一些情况下,该方法不受二价阳离子存在的影响。

[0216] 在另一个实施方案中,“SpyCatcher”方法可用于将聚合酶连接到纳米孔蛋白。在这种方法中,化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)纤连蛋白结合蛋白FbaB胶原粘附结构域(CnaB2)的两个片段彼此识别,随后一个片段(即“SpyCatcher”)中的赖氨酸的 ϵ -氨基与另一个片段(即“SpyTag”)中的天冬氨酸的羧基侧基之间形成肽键。例如,参见Zakeri和Howarth(2010). JACS 132:4526-7。因此,在一些实施方案中,可以通过将SpyTag连接到孔

蛋白单体(例如 α -溶血素)的天冬氨酸残基,将SpyCatcher连接至DNA聚合酶的N末端(例如Phi29或Bst2.0DNA聚合酶)并允许经由SpyTag和SpyCatcher形成共价肽连接。将DNA聚合酶连接到纳米孔。

[0217] 在另一个实施方案中,可以使用如美国临时申请第62/130,326中所述的逆电子需求狄尔斯-阿尔德(IEDDA)反应制备聚合酶和纳米孔蛋白的共价缀合物,该申请通过引用的方式并入本文。在这样的实施方案中,通过将含有反式-环辛烯(TCO)基团的接头连接至纳米孔形成蛋白单体(例如 α -溶血素)并将含有6-甲基-四嗪(6-Me-TZ)基团的接头连接至聚合酶(例如,Bst2.0DNA聚合酶)来制备缀合物。在温和水性条件下进行混合时,6-Me-TZ修饰的聚合酶和TCO修饰的纳米孔快速(1h)且几乎定量地形成共价连接,所述共价连接提供可用于纳米孔传感应用的聚合酶与纳米孔蛋白的缀合物。

[0218] 在一些情况下,可以在不同的施加电压下测量电流。为了实现这一点,可以向电极施加所需的电位,并且随后可以在整个测量过程中保持所施加的电位。在一个实施方案中,如本文所述,运算放大器积分器拓扑(op-amp integrator topology)可用于该目的。积分器通过电容反馈保持电极处的电压电位。

[0219] 可将电压电位“ $V_{\text{液体}}$ ”施加至为芯片上的所有单元提供共用电位(例如,350mV)的室。积分器电路可以将电极(其在电学上是积分电容器的顶板)初始化至大于公共液体电位的电位。例如,450mV的偏压可以在电极和液体之间产生100mV的正电势。该正的电压电势可以使电流从电极流至液体室接触处(contact)。在这种情况下,载体是:(a) K^+ 离子,其从双层的电极(反)侧穿过孔流至双层的液体容器(顺)侧,(b)反侧上的氯(Cl^-)离子,其根据以下电化学反应与银电极反应: $Ag + Cl^- \rightarrow AgCl + e^-$ 。

[0220] 在一些情况下, K^+ 流出封闭的单元(cell)(从双层的反侧至顺侧),同时 Cl^- 被转化为氯化银。双层的电极侧可因电流流动而变成脱盐的。在一些情况下,银/氯化银液体海绵状材料或基质可以用作容器以提供反向反应中的 Cl^- 离子,所述反向反应发生在电室接触处以完成电路。

[0221] 在一些情况下,电子最终流至积分电容器的顶侧,产生被测量的电流。电化学反应将银转化为氯化银,只要有可用的待转化的银,电流将继续流动。在一些情况下,有限的银供应导致电流依赖的电极寿命。在一些实施方案中,使用未被耗尽的电极材料(例如铂)。

[0222] 用于分子传感和/或鉴定的装置和系统

[0223] 本公开提供用于分子传感和/或鉴定的系统。这样的系统可以用于检测各种类型的生物物质例如核酸、蛋白质和抗体。在一些实施方案中,用于分子传感和/或鉴定的系统可用于对核酸分子进行测序。

[0224] 用于对核酸进行测序的系统可以包括在膜中形成或以其他方式嵌入的纳米孔,其邻近传感电路(例如集成电路)的传感电极放置。集成电路可以是专用集成电路(ASIC)。在一些实例中,集成电路是场效应晶体管或互补金属氧化物半导体(CMOS)。传感电路可以位于具有纳米孔的芯片或其他装置中,或者位于芯片或装置之外例如以芯片外配置的方式。半导体可以是任何半导体,包括但不限于IV族(例如硅)和III-V族半导体(例如砷化镓)。

[0225] 在一些情况下,当核酸或标签流过或邻近纳米孔时,传感电路检测与核酸或标签相关的电信号。核酸可以是更大链的亚单元。标签可以是核苷酸并入事件或带标签的核苷酸与纳米孔或邻近纳米孔的物质之间的其他相互作用的副产物,例如可以抓住带标签的

核苷酸使得标签进入或变得定位在孔中然后在将核苷酸并入至核酸延伸产物后从核苷酸切割带标签的酶。可将检测到的信号收集并存储在存储器位置,随后用于构建核酸序列。可以处理所收集的信号以解释所检测到的信号中的任何异常,例如误差。

[0226] 图9示出了可以根据美国专利申请公开2011/0193570 A1、2013/0244340 A1和US 2013/0264207 A1中(各自通过引用的方式整体并入本文)所描述的方法制备的具有温度控制的纳米孔检测器(或传感器)的实例。参考图9A,纳米孔检测器包括与导电溶液(例如盐溶液) 907接触的顶部电极901。底部导电电极902靠近(near)、邻近(adjacent)或接近(in proximity to)插入在膜905中的纳米孔906。在一些情况下,底部导电电极902嵌入在半导体903中,其中在半导体衬底904中嵌入电路。半导体903的表面可被处理为疏水的。被检测的样品通过纳米孔906中的孔。半导体芯片传感器放置在组件(package) 908中,并且组件(package) 908转而又位于温度控制元件909的附近。温度控制元件909可以是热电加热装置和/或冷却装置(例如Peltier装置)。多个纳米孔检测器可以形成纳米孔阵列。

[0227] 参考图9B,其中相同的编号表示相同的元件,膜905可以设置在孔(well) 910上方,其中传感器902形成孔表面的一部分。图9C示出了其中电极902从经处理的半导体表面903突出的实例。

[0228] 在一些示例中,膜905在底部导电电极902上形成,而不在半导体903上形成。在这种情况下,膜905可以与底部导电电极902形成耦合相互作用。然而,在一些情况下,膜905在底部导电电极902和半导体903上形成。作为替代方案,膜905可以在半导体903上形成而不在底部导电电极902上形成,但是可以在底部导电电极902上方延伸。

[0229] 在一些情况下,纳米孔可以通过电检测而用于间接地对核酸分子进行测序。间接测序可以是其中增长链中并入的核苷酸不穿过纳米孔的任何方法。核酸分子可以在与纳米孔的任何合适距离内通过和/或靠近纳米孔通过,在一些情况下,在这样的距离内以使得在纳米孔中检测从核苷酸并入事件中释放的标签。

[0230] 核苷酸并入事件的副产物可以由纳米孔检测。“核苷酸并入事件”是核苷酸并入至增长的多核苷酸链中。副产物可以与给定类型的核苷酸的并入相关。核苷酸并入事件通常由酶(例如DNA聚合酶)催化,并利用碱基对与模板分子之间的相互作用,以在可用的核苷酸中选择用于在每个位置并入的核苷酸。

[0231] 可以使用带标签的核苷酸对核酸样品进行测序。在一些实例中,用于对核酸分子进行测序的方法包括(a) 并入(例如聚合)带标签的核苷酸,其中在并入后释放与单个核苷酸相连的标签,和(b) 在并入过程中,标签连接并结合在核苷酸-酶复合物中时或在释放标签时,在纳米孔的帮助下检测标签。在一些情况下,所述方法进一步包括引导单个核苷酸上连接的或由其释放的标签通过纳米孔。可以通过任何合适的技术引导释放的或连接的标签,在一些情况下借助于酶(或分子马达)和/或跨过孔(across the pore)的电压差。或者,在不使用酶的情况下,可引导释放的或连接的标签穿过纳米孔。例如,如本文所述,可以通过跨过纳米孔的电压差引导标签。

[0232] 在一些情况下,副产物穿过纳米孔和/或在纳米孔中产生可检测的信号。释放的标签是副产品的实例。在一些情况下,副产物是质子(即,pH变化)。在其他情况下,副产物是磷酸酯(例如,在核苷酸并入事件期间释放的磷酸酯)。例如,每种不同类型的核苷酸可以包含不同的磷酸酯数,检测释放的磷酸酯使得人们能够确定所并入的核苷酸的身份。

[0233] 该方法的实例在图10中示出。在这里,核酸链1000穿过或靠近(但不穿过,如1001处的箭头所示)纳米孔1002。酶1003(例如DNA聚合酶)通过使用第一核酸分子作为模板1000一次并入一个核苷酸(即,酶催化核苷酸并入事件)来延伸增长的核酸链。

[0234] 酶1003可被连接至纳米孔1002。将酶连接至纳米孔的合适方法包括交联,例如形成分子内二硫键或通过另一共价缀合反应例如如美国临时申请第62/130,326中所述的逆电子需求狄尔斯-阿尔德(IEDDA)反应,所述申请通过引用的方式并入本文。纳米孔和酶也可以是由单个多肽链编码的融合蛋白。用于产生融合蛋白的方法是本领域已知的,包括将酶编码序列与纳米孔编码序列在框内相邻地融合(两者之间没有终止密码子)并且从单个启动子表达该融合序列。在一些情况下,也可将磷酸酯酶连接至纳米孔。

[0235] 通常,用于本公开的方法的聚合酶可包括具有5'→3'DNA聚合酶活性和强的链置换活性但缺乏5'→3'核酸外切酶活性的任何天然存在或非天然存在的酶。在一些情况下,DNA聚合酶是9°N聚合酶或其变体、大肠杆菌(E.Coli)DNA聚合酶I、噬菌体T4DNA聚合酶、测序酶、Taq DNA聚合酶、来自嗜热脂肪芽孢杆菌(Bacillus stearothermophilus)的DNA聚合酶、Bst 2.0 DNA聚合酶、9°N聚合酶(外切(exo-))A485L/Y409V、Phi29 DNA聚合酶(ϕ 29DNA聚合酶)、T7 DNA聚合酶、DNA聚合酶II、DNA聚合酶III全酶、DNA聚合酶IV、DNA聚合酶V或Vent_RDNA聚合酶。

[0236] 通常,聚合酶需要引物链的存在,所述引物链与模板DNA链杂交,模板DNA被酶延伸从而被测序。因此,在本公开的纳米孔装置的另一种可能的结构中,引物链被连接至孔蛋白,模板DNA链与连接的引物链杂交,聚合酶与模板引物杂交体结合,从而非共价结合至纳米孔装置。这样的实施方案在图38中示出。互补的带标签的核苷酸所连接的标签被静电场梯度吸引到纳米孔的内腔,确保其可以通过监测孔中的电流检测和鉴定。

[0237] 可以使用带标签的核苷酸对核酸样品进行测序。在一些实例中,用于对核酸分子进行测序的方法包括(a)聚合带标签的核苷酸,其中在聚合时释放与单个核苷酸连接的标签,和(b)借助于纳米孔检测所释放的标签。

[0238] 在一些情况下,所述方法进一步包括引导从单个核苷酸释放的标签穿过纳米孔。可以通过任何合适的技术引导所释放的标签,在一些情况下借助于酶(或分子马达)。或者,可在不使用酶的情况下引导所释放的标签穿过纳米孔。例如,如本文所述,可以跨过纳米孔的电压差引导标签。

[0239] 继续参考图10,酶从连接有标签(标号1005处的空心圆圈)的核苷酸池(标号1005处的实心圆圈)获取核苷酸。每种类型的核苷酸连接有不同的标签,使得当标签被释放并穿过纳米孔1006时,可以基于在纳米孔中产生的信号将它们彼此区分开。

[0240] 图11示出了当不同标签穿过纳米孔时由它们产生的不同信号的实例。检测到四个不同的信号强度(1101、1102、1103和1104)。这些信号强度对应四种不同的标签。例如,通过并入腺苷(A)所释放的标签可以产生具有振幅1101的信号。通过并入胞嘧啶(C)所释放的标签可以产生具有更高振幅的信号1103。通过并入鸟嘌呤(G)所释放的标签可以产生具有更高振幅的信号1104。通过并入胸腺嘧啶(T)所释放的标签可以产生具有更高振幅的信号1102。没有标签穿过纳米孔期间的信号缺失由1105表示。

[0241] 核苷酸并入事件的速率通常慢于(或等于)在核苷酸并入事件期间所释放的标签分子穿过纳米孔和/或被纳米孔检测的速率。通常,核苷酸并入事件的速率不大于在核苷酸

并入事件期间所释放的标签分子穿过纳米孔和/或被纳米孔检测的速率(即,不这样的话核苷酸并入事件不能够被精确地和/或以正确的顺序检测到)。

[0242] 本公开提供用于分子鉴定和/或传感的各种装置。图12是可以用于对核酸进行测序和/或检测本文所述的标签的纳米孔装置100(或传感器)的示意图。含纳米孔的脂质双层的特征可在于电阻和电容。纳米孔装置100包括在导电固体基质106的脂质双层相容表面104上形成的脂质双层102,其中可以通过脂质双层不相容表面105隔离脂质双层相容表面104,可以通过绝缘材料107电隔离导电固体基质106,其中脂质双层102可以被形成在脂质双层不相容表面105上的无定形脂质103包围。可以将单个纳米孔结构108嵌入脂质双层102,该纳米孔结构108具有大得足以使表征的标签和/或小离子(例如 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^-) 在脂质双层102的两侧之间穿过纳米孔110。水分子层114可以被吸附在脂质双层相容表面104上并夹在脂质双层102和脂质双层相容表面104之间。吸附在亲水脂质双层相容表面104上的水性膜114可以促进脂质分子的排序(ordering)并有利于在脂质双层相容表面104上形成脂质双层。可以在脂质双层102上方提供样品室116,其含有核酸分子112和带标签的核苷酸的溶液。该溶液可以是包含电解质、缓冲至最佳离子浓度并保持在最佳pH以保持纳米孔110打开的水性溶液。该装置包括耦合到可变电压源120的一对电极118(包括负电极(node) 118a和正电极118b),可变电压源120用于跨过脂质双层提供电刺激(例如,电压偏压)并用于感测脂质双层中的电特性(例如,电阻、电容和离子电流)。正电极118b的表面是脂质双层相容表面104或形成脂质双层相容表面104的一部分。导电固体基底106可以耦合至电极118之一或形成电极118之一的一部分。装置100还可以包括电路122,其用于控制电刺激并用于处理所检测到的信号。在一些实施例中,可变电压源120作为电路122的一部分被包括在内。电路122可以包括放大器、积分器、噪声滤波器、反馈控制逻辑和/或各种其他部件。电路122可以是集成在硅衬底128内的集成电路,可以进一步被耦合至与存储器126耦合的计算机处理器124。

[0243] 脂质双层相容表面104可以由适于离子转导和气体形成以促进脂质双层形成的各种材料形成。在一些实施方案中,可以使用导电或半导电的亲水材料,因为它们可以允许更好地检测脂双层电特性的变化。实例材料包括Ag-AgCl、Au、Pt或掺杂的硅或其他半导体材料。在一些情况下,电极不是牺牲电极。

[0244] 脂质双层不相容表面105可以由不适合于脂质双层形成的各种材料形成,它们通常是疏水性的。在一些实施方案中,优选非导电疏水性材料,因为它除了将脂质双层区域彼此分隔开之外,还使脂质双层区域电绝缘。示例性的脂质双层不相容材料包括例如氮化硅(例如, Si_3N_4) 和特氟隆(Teflon)。

[0245] 在一个实例中,纳米孔装置100可以是 α 溶血素(α HL)纳米孔装置,其具有嵌入二植烷酰磷脂酰胆碱(DPhPC)脂质双层102中的单个 α 溶血素(α HL)蛋白108,所述二植烷酰磷脂酰胆碱(DPhPC)脂质双层102在铝材料106上涂覆的脂质双层相容性Pt表面104上形成。脂质双层相容性Pt表面104通过脂质双层不相容的氮化硅表面105隔开,铝材料106通过氮化硅材料107电绝缘。铝106被耦合至电路122,电路122在硅衬底128中集成。芯片上或从盖板128向下延伸的银-氯化银电极接触含有核酸分子的水性溶液。

[0246] α HL纳米孔是七个单独肽的组装体。 α HL纳米孔的入口或前厅(vestible)的直径为约26埃,其宽得足以容纳dsDNA分子的一部分。从前厅开始, α HL纳米孔首先变宽,然后变窄

至直径约15埃的桶状物(barrel),所述桶状物宽得足够允许单个ssDNA分子(或释放的标签)通过,但宽度不足以允许dsDNA分子通过。

[0247] 除了DPhPC之外,纳米孔装置的脂质双层可以由基于各种考虑(例如所使用的纳米孔的类型;被表征的分子的类型;以及所形成的脂质双层的各种物理特性、化学特性和/或电特性例如所形成的脂质双层的稳定性和渗透性、电阻以及电容)而选择的各种其他合适的两亲性材料组装而成。示例性的两亲性材料包括各种磷脂例如棕榈酰-油酰-磷脂酰-胆碱(POPC)和二油酰-磷脂酰-甲酯(DOPME)、二植烷酰磷脂酰胆碱(DPhPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰肌醇和鞘磷脂。

[0248] 除了上文所示的 α HL纳米孔之外,纳米孔还可以是各种其他类型的纳米孔。实例包括 γ -溶血素、杀白细胞素、蜂毒肽和各种其他天然存在的、修饰的、天然纳米孔和合成纳米孔。可以基于分析物分子的各种特性(例如分析物分子相对于纳米孔孔径的尺寸)来选择合适的纳米孔。例如,具有约15埃的限制性孔径的 α HL纳米孔。

[0249] 图13示出了可在纳米孔检测器阵列上对多个核酸分子进行测序。在此,每个纳米孔位置(例如1301)包含纳米孔,在一些情况下纳米孔被连接至聚合酶和/或磷酸酯酶。如本文别处所述,在每个阵列位置处通常还存在传感器。

[0250] 在一些实例中,提供被连接至核酸聚合酶的纳米孔的阵列,带标签的核苷酸用聚合酶聚合。在聚合期间,标签被释放并由纳米孔检测。纳米孔阵列可以具有任何合适数量的纳米孔。在一些情况下,阵列包含约200个、约400个、约600个、约800个、约1000个、约1500个、约2000个、约3000个、约4000个、约5000个、约10000个、约15000个、约20000个、约40000个、约60000个、约80000个、约100000个、约200000个、约400000个、约600000个、约800000个、约1000000个纳米孔。在一些情况下,阵列包含至少200个、至少400个、至少600个、至少800个、至少1000个、至少1500个、至少2000个、至少3000个、至少4000个、至少5000个、至少10000,至少15000个、至少20000个、至少40000个、至少60000个、至少80000个、至少100000个、至少200000个、至少400000个、至少600000个、至少800000个、至少1000000个纳米孔。

[0251] 在一些情况下,单个标签在并入单个核苷酸时释放并由纳米孔检测。在其他情况下,在并入多个核苷酸时释放多个标签。邻近纳米孔的纳米孔传感器可以检测个体所释放的标签或多个释放的标签。可以检测和处理与多个释放的标签相关的一个或多个信号,以获得平均信号。

[0252] 可通过传感器随时间变化检测标签。随时间检测的标签可以用于例如借助于计算机系统(例如参见图14)来确定核酸样品的核酸序列,所述计算机系统被编程以记录传感器数据并由数据生成序列信息。

[0253] 基于纳米孔的测序芯片可以包含配置为阵列的大量自主操作单元或可单独寻址的单元。例如,具有一百万个单元的阵列可以由1000行单元乘以1000列单元构成。例如,该阵列能够通过测量核苷酸并入事件时所释放的标签通过纳米孔时的电导差异来对核酸分子进行平行测序。此外,该电路配置允许测定孔-分子复合物的电导特性,该特性在区分特定标签方面是非常有价值的。

[0254] 集成的纳米孔/双层电子单元(cell)结构可以施加适当的电压以便执行电流测量。例如,为了正确地执行,可能需要同时(a)控制电极电压电位和(b)监测电极电流。

[0255] 此外,可能有必要彼此独立地控制单元(cell)。可能需要独立控制单元以管理可

能处于不同物理状态的大量单元。精确控制施加到电极的分段线性电压波形刺激可用于单元物理状态的转变。

[0256] 为了减小电路尺寸和复杂性,提供用于施加两个单独电压的逻辑可能就足够了。这允许应用两个独立分组的单元和相应的状态转变刺激。状态转变本质上是随机的,具有相对低的出现概率。因此,能够维持(assert)适当的控制电压并且随后执行测量以确定是否发生所需的状态转变,这可能是非常有用的。例如,可以向单元施加适当的电压,然后测量电流以确定是否已经形成孔。将单元分成两组:(a)具有孔形式但不再需要施加电压的那些,对这些单元施加0V偏压,以便实现空操作(NOP)-也就是保持在相同的状态,和(b)没有形成的孔的那些。对这些单元再次施加孔形成电压。

[0257] 可以通过将可允许的施加电压限制为两种电压并分批地反复使单元在物理状态之间转变来实现大幅简化和电路尺寸的减小。例如,可以通过限制可允许的施加电压来实现减少至少1.1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50或100倍。

[0258] 计算机控制系统

[0259] 本公开的核酸测序系统和方法可以借助于计算机系统来控制。图14示出了包括被耦合到核酸测序系统1402的计算机系统1401的系统1400。计算机系统1401可以是一个或多个服务器。计算机系统1401可以被编程以控制样品制备和处理以及由测序系统1402进行的核酸测序。测序系统1402可以是如本文别处所述的基于纳米孔的测序仪(或检测器)。

[0260] 计算机系统可以被编程以实现本发明的方法。计算机系统1401包括中央处理单元(CPU,本文中也称为“处理器”)1405,其可以是单核或多核处理器或用于平行处理的多个处理器。计算机系统1401还包括存储器1410(例如随机存取存储器、只读存储器、闪存);电子存储单元1415(例如硬盘);用于与一个或多个其他系统进行通信的通信接口1420(例如网络适配器);以及外围设备1425例如高速缓存、其他存储器、数据存储和/或电子显示适配器。存储器1410、存储单元1415、接口1420和外围设备1425通过诸如母板的通信总线(实线)与CPU 1405进行通信。存储单元1415可以是用于存储数据的数据存储单元(或数据存储库)。计算机系统1401可以借助于通信接口1420可操作地耦合至计算机网络(“网络”)。网络可以是因特网(Internet)、内联网(internet)和/或外联网(extranet),或者与互联网进行通信的内联网和/或外联网。网络可以包括一个或多个计算机服务器,其可以实现分布式计算。

[0261] 可以通过存储在计算机系统1401的电子存储位置上(例如在存储器1410上或电子存储单元1415上)的机器(或计算机处理器)可执行代码(或软件)来实现本发明的方法。在使用期间,代码可由处理器1405执行。在一些情况下,可从存储单元1415检索代码并将其存储在存储器1410上以供处理器1405随时访问。在一些情况下,可排除电子存储单元1415,将机器可执行指令存储在存储器1410上。

[0262] 代码可以被预编译和配置为与具有适于执行代码的处理器一起使用,或者其可以在运行期间被编译。代码可以以编程语言的形式提供,所选择的编程语言使得代码能够以预编译或者随时编译(as-compiled)的方式执行。

[0263] 计算机系统1401可以适于存储用户的概要(profile)信息例如姓名、物理地址、电子邮件地址、电话号码、即时消息(IM)句柄、教育信息、工作信息、社交喜好和/或反感事物,以及用户或其他用户潜在相关的其他信息。这样的概要信息可以存储在计算机系统1401的

存储单元1415上。

[0264] 本文提供的系统和方法的多个方面例如计算机系统1401可以体现在编程中。技术的各个方面可以被认为是通常为承载或体现在某类型的机器可读介质中的机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据形式的“产品”或“制品”。机器可执行代码可以存储在电子存储单元,例如存储器(例如ROM、RAM)或硬盘上。“存储”类型介质可以包括计算机或处理器等中可以提供随时用于软件编程的非暂时性存储的任何或所有有形存储器,或其相关模块,例如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等。软件的全部或部分有时可以通过因特网或各种其他电信网络进行传送。例如,这样的传送可以允许将软件从一个计算机或处理器加载到另一个计算机或处理器中,例如从管理服务器或主计算机加载到应用服务器的计算机平台中。因此,可以承载软件元件的另一类型的介质包括光波、电波和电磁波,例如通过有线和光学陆线网络以及通过各种空中链路跨越本地设备之间的物理接口使用。承载这种波的物理元件例如有线或无线链路、光学链路等也可以被认为是承载软件的介质。如本文所用,除非限于非瞬时的有形“存储”介质,诸如计算机或机器“可读介质”的术语是指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0265] 因此,机器可读介质例如计算机可执行代码可以采用许多形式,包括但不限于有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质包括例如光盘或磁盘如任何计算机中的任何存储设备,例如可用于实现附图中所示的数据库等。易失性存储介质包括动态存储器例如这种计算机平台的主存储器。有形传输介质包括同轴电缆;铜线和光纤,包括包含计算机系统内的总线的线。载波传输介质可以采用电信号或电磁信号,或者声波或光波的形式,例如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间产生的那些。因此,计算机可读介质的通常形式包括例如:软盘(floppy disk)、软性盘(flexible disk)、硬盘、磁带、任何其他磁介质、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡纸磁带、具有孔图案的任何其他物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储器芯片或盒、传输数据或指令的载波、传输这种载波的电缆或链路,或计算机可以从其读取编程代码和/或数据的任何其他介质。这些形式的计算机可读介质中的许多可以参与将一个或多个指令的一个或多个序列携带到处理器以供执行。

[0266] 虽然本文已经示出和描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员来说显而易见的是,这样的实施方案仅以示例的方式提供。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员会想到许多变化、改变和替换。应当理解,在实施本发明时可以采用本文所述的本发明实施方案的各种替代方案。目的是以下权利要求限定本发明的范围并由此涵盖这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

[0267] 实施例

[0268] 实施例1—香豆素-PEG-dG4P带标签的核苷酸的合成

[0269] 在本实施例中,通过使用150×4.6mm柱(Supelco)的反相HPLC纯化核苷酸,流动相:A,8.6mM Et₃N/100mM 1,1,1,3,3,3-六氟-2-丙醇的水溶液(pH8.1);B,甲醇。如下进行洗脱:100%A等度洗脱10分钟,接着用0-50%B线性梯度洗脱20分钟,然后再用50%B洗脱30分钟。

[0270] 如图16中的方案所示,香豆素-PEG_n-dG4P的合成包括三个合成操作:A、B和C。

[0271] A. 2'-脱氧鸟苷-5'-四磷酸酯(dG4P)和dG4P-NH₂的合成:首先,从2'-dGTP开始进

行2'-dG4P的合成。通过使用1.5mmol (5当量) 三丁胺的无水吡啶 (5ml) 溶液将300 μ mol的2'-dGTP (三乙基铵盐) 转化成三丁基铵盐。将所得溶液浓缩至干燥, 并与5ml无水DMF ($\times 2$) 共蒸发。将dGTP (三丁基铵盐) 溶于5ml无水DMF中, 加入1.5mmol 1,1-羰基二咪唑。将反应搅拌6小时, 之后加入12 μ l甲醇并继续搅拌30分钟。向该溶液中加入1.5mmol磷酸 (三丁基铵盐, 在DMF中), 将反应混合物在室温下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释, 并使用0.1M至1M TEAB的梯度 (pH 7.5) 在Sephadex-A25柱上纯化。在梯度结束时洗脱dG4P。将合适的级分合并, 并通过反相HPLC进一步纯化, 得到175 μ mol的纯四磷酸酯 (dG4P)。³¹P-NMR: δ , -10.7 (d, 1P, α -P), -11.32 (d, 1P, δ -P), -23.23 (dd, 2P, β , γ -P); ESI-MS (-ve模式): 计算值, 587.2; 实测值, 585.9 (M-2)。

[0272] 向在2ml水和3.5ml 0.2M 1-甲基咪唑-HCl (pH 6) 中的80 μ mol dG4P中加入154mg EDAC和260mg二氨基庚烷。所得溶液用浓HCl将pH调节至6, 在室温下搅拌过夜。将该溶液用水稀释, 通过Sephadex-A25离子交换色谱纯化, 然后通过反相HPLC纯化, 得到 $\sim 20\mu$ mol dG4P-NH₂。这通过ESI-MS数据 (-ve模式) 得到证实: 计算值, 699.1; 实测值 (698.1, M-1)。

[0273] B. 香豆素-PEG-酸和NHS酯的合成: 使市售的氨基-dPEG-酸 (氨基-d (PEG) 16, 20, 24, 36-酸; Quanta Biodesign) 与6-甲氧基香豆素-NHS酯反应以提供相应的香豆素-(PEG)_n-酸。将氨基-PEG-酸 (1当量) 溶解在碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (pH 8.6) 中, 然后加入香豆素-NHS (1当量) 的DMF溶液, 将反应混合物搅拌过夜。通过使用CH₂Cl₂-MeOH (5-15%) 混合物的硅胶色谱纯化香豆素-PEG酸, 并合并适当的级分。通过¹H NMR和MALDI-TOF MS分析来分析这些化合物。结果示于表2。

[0274] 表2: MALDI-TOF MS数据:

[0275]		香豆素 -PEG16-酸	香豆素 -PEG20-酸	香豆素 -PEG24-酸	香豆素 -PEG36-酸
	预期 MW	996	1,172	1,348	1,877
	测定 MW*	1,016	1,192	1,368	1,899

[0276] *测定值的差异归因于钠盐的存在。

[0277] 香豆素-PEG-酸通过与在无水DMF中的1.5当量二琥珀酰亚胺碳酸酯 (DSC) 和2当量三乙胺反应2小时而转化成相应NHS酯。所得的NHS酯在硅胶板上移动略微高于所述酸, 通过使用CH₂Cl₂-MeOH (5-15%) 混合物的硅胶色谱纯化所得的NHS酯, 并将其用于下一操作。

[0278] 将操作A产物和操作B产物结合以形成香豆素-PEG_n-dG4P: 将来自上述操作A) 的dG4P-庚基-NH₂溶解在0.1M碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (pH 8.6) 中, 向该搅拌的溶液中加入香豆素-PEG-NHS化合物 (在DMF中)。将所得混合物在室温下搅拌过夜, 然后在硅胶柱 (15-25% MeOH的CH₂Cl₂溶液以除去未反应的香豆素-酸或香豆素-NHS, 然后6:4:1异丙醇/NH₄OH/H₂O) 上纯化。将所得的溶液通过反相HPLC进一步纯化两次, 得到纯的香豆素-PEG-dG4P。通过MALDI-TOF MS上的分析确认结构。香豆素-PEG16-dG4P: 保留时间, 31.7分钟; 香豆素-PEG20-dG4P: 保留时间, 32.2分钟; 香豆素-PEG24-dG4P: 保留时间, 33.0分钟; 香豆素-PEG36-dG4P: 保留时间, 34.3分钟。结果示于表3。

[0279] 表3: MALDI-TOF MS数据:

[0280]		香豆素 -PEG16-dG4P	香豆素 -PEG20-dG4P	香豆素 -PEG24-dG4P	香豆素 -PEG36-dG4P
	预期 MW	1,673	1,850	2,025	2,554
	测定 MW	1,682	1,858	2,036	2,569

[0281] 实施例2—通过MALDI-TOF MS表征释放的标签

[0282] 在HPLC纯化后,通过MALDI-TOF-MS分析来确认所预期的香豆素-PEG-NH₂分子(图17)。MALDI-TOF-MS结果表明,通过酸水解产生的香豆素-PEG-NH₂标签与碱性磷酸酯酶处理后在聚合酶反应期间产生的释放的标签相同。

[0283] 参考图17,如MALDI-TOF-MS分析所示,通过产生香豆素-PEG16-NH₂的香豆素-PEG16-dG4P酸水解、产生香豆素-PEG20-NH₂的香豆素-PEG20-dG4P酸水解、产生香豆素-PEG24-NH₂的香豆素-PEG24-dG4P酸水解和产生香豆素-PEG36-NH₂的香豆素-PEG36-dG4P酸水解产生的香豆素-PEG-NH₂标签,与用碱性磷酸酯酶处理后在聚合酶延伸反应中产生的相应的释放标签相同。示出了四个单独获得的MS光谱的合成图像。右侧示出了香豆素-PEG-NH₂标签的结构。

[0284] 实施例3—寡核苷酸标签的检测

[0285] 纳米孔阵列装置(例如参见图12)用于检测4种不同标签的4种不同电流水平。如图18所示,可将每种标签与其他三种标签中的任一种区分开(即,直方图示出了图中用相应标签标记的四个不同的峰)。每个标签是长度约30个碱基的“T”的寡核苷酸均聚物,在3'末端生物素化,具有潜在修饰链中的两个区域。在每个30碱基长的分子中,修饰的区域是从3'端开始的碱基位置11、12和13以及位置17、18和19。如本文所用,“x”是无碱基位点(无碱基),“T”是胸腺嘧啶。四种标签为:

[0286] (a) “伪标签-XXX_XXX”具有序列:链霉亲和素-生物素-10T-xxx-3T-xxx-11T (SEQ ID NO.1),

[0287] (b) “伪标签-TTT_XXX”具有序列:链霉亲和素-生物素-10T-TTT-3T-xxx-11T (SEQ ID NO.2),

[0288] (c) “30T”标签具有序列:链霉亲和素-生物素-30T (SEQ ID NO.3),

[0289] (d) “伪标签-iFluorT”具有序列:链霉亲和素-生物素-10T-TTT-3T-T-iFluorT-T-11T,其中18位的T用荧光素标记 (SEQ ID NO.4)。

[0290] 结果是对阵列中的一个孔随时间从溶液捕获多个标签分子。检测条件为1M KCl,其用20mM HEPES缓冲,室温下pH7.5。当施加电压时,每个分子被捕获并保持在孔中。将施加的电压增加到+160mV,捕获新分子;将电压降低到0V以下,标签分子从孔中脱落。然后重复该循环。样品混合物中同时有四种不同的标签。

[0291] 如图18所示,在应用160mV期间看到的清晰条带在直方图中变得连在一起或略微模糊,因为也绘制了缓降(ramp down)期间的电流。尽管如此,也可以看到每种标签的不同的、可重复的捕获条带。

[0292] 如图19所示,曲线图的水平轴是时间(以秒计),垂直轴是电流(以微微安培(pA)计)。未示出施加的电压波形。施加的电压波形开始低于0V,迅速增加到+160mV保持大约2.3秒。然后电压缓降到0V以下。电流读数随着电压而变化,在施加的电压为+160mV时所捕获的

分子的电流是平的,然后随着电压缓降而缓慢下降。

[0293] 实施例4—缀合反应的实例

[0294] 缀合反应的实例示于图20中。如图所示,(i)胺与NHS酯反应形成酰胺,(ii)胺与酰基卤反应形成酰胺,(iii)胺或氧基-胺与酮反应形成肟,(iv)胺与醛反应通过还原形成希夫碱基和甲基氨基,和(v)肼与醛反应形成酰肼。如图所示,硫醇与硫醇、马来酰亚胺或卤代乙酰胺反应。

[0295] 实施例5—点击化学的实例

[0296] 使用具有包含叠氮、炔、烯烃和四嗪的部分的化合物的点击化学的实例示于图21中。如图所示,可以进行缀合以提供三唑或1,2-二嗪(二氢哒嗪互变异构体)连接。含叠氮的分子A与含炔的分子B反应形成通过三唑缀合的A与B的缀合物。而且,含叠氮的分子A可以与含环辛炔的分子B反应,形成通过与环辛基部分稠合的三唑缀合的A与B的缀合物。或者,含四嗪的分子A与含反式-环辛烯的分子B反应形成通过二氢哒嗪缀合的A与B的缀合物。

[0297] 实施例6—带标签的核苷酸的实例

[0298] 表4示出了合成的可用作聚合酶底物的带标签的核苷酸的实例。表4中所示的所有示例性的带标签的核苷酸可以使用叠氮-炔或叠氮-环辛炔“点击”反应由5'-叠氮基-六磷酸酯-核苷酸(“dN6P-N3”)和炔标签合成(例如参见图21)。下文实施例7-11中提供了对用于叠氮-炔和叠氮-环辛炔点击反应合成的试剂和条件的进一步描述。

[0299] 表4包括许多包含天然或非天然寡核苷酸的标签结构。这些寡核苷酸标签以5'至3'方向显示,通过亚磷酰胺合成制备,并且可商购自定制寡核苷酸供应商例如Integrated DNA Technologies(Coralville,Iowa,USA)或TriLink Biotechnologies(San Diego,California,USA)或Glen Research(Sterling,Virginia,USA)。存在已被公开且可以从定制寡核苷酸供应商商购的数百个非标准亚磷酰胺单体单元“构造块(building blocks)”,它们可以容易地并入至用作标签的定制合成寡核苷酸中。许多这样的非标准单体单元归类为间隔子(例如“iSp”)、染料(例如“iCy3”)和接头(例如“己炔基”)。使用众所周知的寡核苷酸合成命名法来描述表4中所有的寡核苷酸标签结构以示出非标准单体单元(例如参见www.idtdna.com上的Integrated DNA Technologies(集成DNA技术)以获得关于常用寡核苷酸命名法的其他细节)。例如,非标准单体单元被正斜线“/”围住,单元之间的星号“*”表示硫代磷酸酯二酯连接。因此,“/5'己炔基//iSpC3//iCy3/T”表示5'-己炔-磷酸酯-二羟丙烷-磷酸酯-花青3(染料)-磷酸酯-胸苷-3'(OH)。表4中包括其他选定的缩写的关键字。

[0300] 表4

[0302]

dA6P-T ₄ -Sp18-T ₂₂ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT/iSp18/TTTT TTTT TTTT TTTT TT/3SpC3/	19
dA6P-T ₄ -Sp18 ₂ -T ₁₉ -C ₃	/5 己 炔 基 /TTTT/iSp18//iSp18/TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	20
dA6P-T ₄ -Sp9 ₂ -T ₂₂ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT/iSp9//iSp9/TTTT TTTT TTTT TTTT TT/3SpC3/	21
dT6P-dT ₆ -C7NH ₆ -dT ₁₈ -C3	/5 己 炔 基 /TTTTTT/iUniAmM//iUniAmM//iUniAmM//iUniAmM//iUniAmM//iUniAmM/TTTT TTTT TTTT TTT/3SpC3/	22
dT6P-dT ₆ -Pyrd ₆ -dT ₁₈ -C3	/5 己 炔 基 /TTTTTT/X//X//X//X//X//X/TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	23
dA6P-dT ₆ -dT ₁₈ -C3	/5 己 炔 基 /TTTTTT/iAmMC6T//iAmMC6T//iAmMC6T//iAmMC6T//iAmMC6T//iAmMC6T/TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	24
dG6P-dT ₄ -精-dT ₂₂ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT/精胺(Spermine)/TTTT TTTT TTTT TTTT TT/3SpC3/	25
dT6P-dT ₄ -精-dSp ₃ -dT ₁₉ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT/精胺//idSp//idSp//idSp/TT TTTT TTTT TTTT TT/3SpC3/	26
dC6P-dT ₄ -精-iFlrT-dT ₂₁ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT/精胺//iFluorT/TTTT TTTT TTTT TTTT TT/3SpC3/	27
dG6P-精-dT ₃₀ -C3	/5 己 炔 基 //精胺 /TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	28
dT6P-Cy3.5-dT ₃₀ -C3	/5 己 炔 基 /iCy3.5/TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	29
dT6P-Cy3-Cy3-dT ₃₀ -C3	/5 己 炔 基 /iCy3//iCy3/TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	30
dT6P-dT ₆ -Cy3-dT ₂₃ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT T/iCy3/TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTT/3SpC3/	31
dT6P-dT ₁₀ -Cy3-dT ₁₉ -C3	/5 己 炔 基 /TTTT TTTT/iCy3/TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	32
dT6P-发夹块(Hairpin Block)	/5 己 炔 基 /TT TTC GGC GCG TAA GCG CCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3SpC3/	33
dC6P-Cy3	DBCO-Cy3	-
dG6P-Cy3	DBCO-Cy3	-

[0304]

dC6P-Cy3-T ₄ -dSp ₃ -T ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/idSp//idSp//idSp/TTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	47
dC6P-Cy3-T ₇ -dSp ₃ -T ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTTT TT/idSp//idSp//idSp/TTTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	48
dC6P-Cy3-T ₁₀ -dSp ₃ -T ₁₇ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTTT TTTT/idSp//idSp//idSp/TTTTT TTTT TTTT TT/3SpC3/	49
dC6P-Cy3-T ₄ -iFluorT ₃ -T ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/iFluorT//iFluorT//iFluorT/TTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	50
dC6P-Cy3-T ₄ -iFluorT-T-iFluorT-T ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/iFluorT/T/iFluorT/TTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	51
Bio-精胺-dT ₃₀ -C ₃	/5 己 炔 基 // 精 胺 /TTTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	52
dT6P-dT ₃₀ -Cy3-C ₃	/5 己 炔 基 /TTTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/iCy3//3SpC3/	53
dG6P-dT ₈ - 精 胺 -dT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 /TTTTT TTT/ 精 胺 /TTTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	54
dA6P-Cy3-T ₄ -iFluorT-T-iFluorT-T ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/iFluorT/T/iFluorT/TTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	51
dT6P-CY3-dT ₄ - 适 配 体-dT ₂₅ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TGG TTG GTG TGG TTG GTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3SpC3/	55
dT6P-Cy3-dT ₄ -12发夹-dT ₂₅ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TCC GGC GCG GCG CGT AAG CGC CGC GCC GGT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	56
dT6P-Cy3-dT ₅ -dSp ₃ -dT ₂₂ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TT/idSp//idSp//idSp/T TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	57
dT6P-Cy3-dT ₆ -dSp ₃ -dT ₂₁ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TTT /idSp//idSp//idSp/TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	58
dT6P-Cy3-dT ₄ -dSp ₄ -dT ₂₂ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/idSp//idSp//idSp//idSp/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3SpC3/	59
dT6P-Cy3-dT ₄ -dSp ₅ -dT ₂₁ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/idSp//idSp//idSp//idSp//idSp/T TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT/3SpC3/	60

[0305]

dC6P-Cy3-dT ₅ -SpC12-dT ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TT /iSpC12/TTTTT TTTT TTTT TTTT TTT/3SpC3/	61
dC6P-Cy3-dT ₄ -SpC6-SpC6-dT ₂₄ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/iSpC6//iSpC6/T TTTT TTTT TTTT TTTT TTT/3SpC3/	62
dC6P-Cy3-dT ₄ -(SpC3) ₃ -dT ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/iSpC3//iSpC3//iSpC3/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	63
dG6P-Cy3-dT ₃₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/3SpC3/	64
dT6P-Cy3-dT ₂ -dSp ₈ -dT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TT/idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp/TTT TTT TTT TTT TTT TT/3SpC3/	65
dC6P-Cy3-T ₃₀ -(C ₃) ₄ -PO ₄	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /iSpC3//iSpC3//iSpC3//iSpC3//3Phos/	66
dC6P-Cy3-T ₃₀ -PO ₄	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3Phos/	67
dC6P-Cy3-T ₃₀ -C ₃ -NH ₂	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3丙胺/	68
dG6PαS-Cy3-dT ₂ -dSp ₈ -dT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TT/idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp/TTT TTT TTT TTT TTT TT/3SpC3/	69
Rev-P-T ₃₀ -Cy3-dG6P	/5Phos/TTTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT/iCy3//3'-丙胺/+ 炔丙基-丙酰胺	70
Rev-P-T ₂₄ -dSp ₃ -T ₃ -Cy3-dC6P	/5Phos/TTTTT TTTT TTTT TTTT TTTT /idSp//idSp//idSp/TTT/iCy3//3'-丙胺/+ 炔丙基-丙酰胺	71
dT6P-Cy3-dT ₄ -HP6-dT ₂₅ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TT TTC GGC GCG TAA GCG CCG TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3SpC3/	72
dT6P-Cy3-dC ₃₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC/3SpC3/	73
dA6P-Cy3-dT ₄ -dI6-dT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI/TT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	74
dA6P-Cy3-dT ₄ -硝基嘌呤6-dT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/i5NitInd//i5NitInd//i5NitInd//i5NitInd//i5NitInd//i5NitInd/TT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	75

[0306]

dA6P-Cy3-dT4-dC6-dT20-C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT CCCCCC TTTT TTTT TTTT TTTTT/3SpC3/	76
dA6P-Cy3-dT4-5IU6-dT20-C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/i5I-dU//i5I-dU//i5I-dU//i5I-dU//i5BI-dU//i5I-dU/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	77
dA6P-Cy3-dT4-PyrndU6-dT20-C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/i5 茺 -dU/_6TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	78
dT6P-Cy3-dT4-(idSP-T) ₄ -dT ₁₈ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/idSp/T/idSp/T/idSp/T/idSp/TTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	79
dT6P-Cy3-dT ₅ -(idSP-T) ₄ -dT ₁₇ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTTT/idSp/T/idSp/T/idSp/T/idSp/TT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	80
dT6P-Cy3-dT ₄ - 丙 基 -dT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/iSpC3//iSpC3//iSpC3//iSpC3//iSpC3//iSpC3//iSpC3/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT /3SpC3/	81
dT6P-Cy3-LdT ₃₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/(_LdT) ₃₀ /3SpC3/	82
dT6P-Cy3-LdT ₄ -dSp ₃ -LdT ₂₃ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/(_LdT)4/idSp//idSp//idSp/(_LdT) ₂₃ /3SpC3/	83
dT6P-Cy3-LdT ₄ -dSp ₈ -LdT ₁₈ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/(_LdT)4/idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp//idSp/(_LdT) ₁₈ /3SpC3/	84
dT6P-Cy3-LdT ₄ -dI ₆ -LdT ₂₀ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/(_LdT)4/ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI//ideoxyI/(_LdT) ₂₀ /3SpC3/	85
dT6P-Cy3-dT ₄ -L111-dT ₂₆ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT GGG T GGG T GGG T GGG TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3SpC3/	86
dT6P-Cy3-dT ₄ -L121-dT ₂₆ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT GGG T GGG TT GGG T GGG TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/3SpC3/	87
dT6P-Cy3-dT ₄ -SpC12-SpC12-dT ₂₄ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT /iSpC12//iSpC12/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTT/3SpC3/	88
dT6P-Cy3-dT ₃ -(SpC12) ₃ -dT ₂₄ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT /iSpC12//iSpC12//iSpC12/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTT/3SpC3/	89
dT6P-Cy3-dT ₄ -(SpC6) ₄ -dT ₂₅ -C ₃	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/dSpC6//dSpC6//dSpC6//dSpC6/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	90

[0307]

dT6P-Cy3-dT ₄ -(SpC6) 5-dT ₂₃ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/dSpC6//dSpC6//dSpC6//dSpC6//dSpC6/TTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	91
dT6P-Cy3-dT5-(SpC6) 4-dT ₂₄ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/dSpC6//dSpC6//dSpC6//dSpC6/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTT/3SpC3/	92
dT6P-Cy3-dT ₂ -(SpC6) 5-dT ₂₅ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TT/dSpC6//dSpC6//dSpC6//dSpC6//dSpC6/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	93
dT6P-Cy3-dT ₄ - 精 胺 -dT ₂₅ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/精胺/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	94
dT6P-Cy3-dT ₂ - 精 胺 -dT ₂₇ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TT/精胺/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TT/3SpC3/	95
dT6P-Cy3-dT ₂ - 精 胺 - 精胺-dT ₂₆ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TT/精胺//精胺/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT T/3SpC3/	96
dT6P-Cy3-dT ₄ -Pyrn-d U-TT-Pyrn-dU-dT ₂₂ -C 3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTT T/i5 莈 -dU/TT/i5 莈 -dU/ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3SpC3/	97
dT6P-(A ₁₅ Dab) ₄ -Arg ₅ - OH	肽Pra-(A ₁₅ Dab) ₄ -Arg ₅ -OH [肽Pra-(SEQ ID NO:98) ₄ -(SEQ ID NO:99)-OH]	98,99
dT6P-(A ₇ U A ₇ Dab) ₄ -Arg ₅ -OH	肽Pra-(A ₇ U A ₇ Dab) ₄ -Arg ₅ -OH [肽Pra-(SEQ ID NO:100) ₄ -(SEQ ID NO:99)-OH]	100,99
dT6P-Cy3-dT ₄ -Tmp ₆ -d T ₂₀ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT/dT(mp)//dT(mp)//dT(mp)//dT(mp)//dT(mp)//dT(mp) /TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT/ {丙基-}/	101
dT6P-Cy3-dT ₄ -吡咯烷 6-dT ₂₀ -C3	/5 己 炔 基 //iCy3/TTTT / {吡咯烷} ₆ /TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	102
dT6P-吡咯烷-dT ₃₀ -C3	/5 己 炔 基 // {吡咯烷}/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT /3SpC3/	103
dT6P-吡咯烷-吡咯烷 -dT ₃₀ -C3	/5 己 炔 基 // {吡咯烷} // {吡咯烷}/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT /3SpC3/	104
dT6P-吡咯烷 ₃ -dT ₃₀ -C3	/5 己 炔 基 // {吡咯烷} // {吡咯烷} // {吡咯烷}/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT /3SpC3/	105
dT6P-SpC3-Cy3-dT ₃₀ - C3	/5 己 炔 基 //iSpC3//iCy3/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	106

	dT6P-SpC3-SpC3-Cy3 -dT ₃₀ -C3	/5 己炔基//iSpC3//iSpC3//iCy3/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3SpC3/	107
	dT6P-SpC6-Cy3-dT ₃₀ - C3	/5 己炔基//iSpC6//iCy3/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT /3SpC3/	108
	dT6P-Cy3-dT ₄ (α -dT) ₃ -dT ₂₃ -C3p	/5 己炔基//iCy3/TTTT/ α -dT// α -dT// α -dT/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTT/3SpC3/	109
[0308]	<u>选定的缩写</u> “DBCO”=二苄基环辛炔 “*”=硫代磷酸酯二酯 “ODD”=仅在序列中奇数连接处(at odd-numbered linkages)的硫代磷酸酯 “idSp”=呋喃亚酰胺(furan amidite)(无碱基亚酰胺) “3C6”=3'-己醇 “Npy”=3-硝基吡咯 “3SpC3”=3'-丙醇 “Neb”=水粉伞素(nebularine) “iSp18”=18 原子长度的聚乙二醇 “iSp9”=9 原子长度的聚乙二醇 “UniAmM”=庚胺亚酰胺 “Pyrd”=吡咯烷亚酰胺 “iAmMC6T”=氨基己基 dT 烟酰胺 “iFluorT”=荧光素 dT 亚酰胺 “iAmMC2T”=氨基乙基 dT 亚酰胺 “iSpC12”=十二烷基亚酰胺 “iSpC6”=己基亚酰胺 “iSpC3”=丙基亚酰胺 “dG6PaS”= α -硫代 dG6P 的 Sp 异构体 “Rev”=寡核苷酸标签具有 5'-磷酸酯并在其 3'-末端具有炔基 “HP6”=发夹结构 “ideoxyI”=2'-脱氧肌苷 “i5NitInd”=5-硝基吲哚 “i5I-dU”=5-碘脱氧尿苷 “i5 苾-dU”=5-苾-脱氧尿苷 “LdT”=胸苷的 L 异构体 “L111”=G-四层(quadraplex)结构		
	“L121”=G-四层(quadraplex)结构 “Pra”=炔丙基甘氨酸 “Dab”=二氨基丁酸 “U”= β -丙氨酸(在肽标签的上下文中) “dT(mp)”=胸苷甲基膦酸酯 “{pyrrolidine}”=吡咯烷亚酰胺 “ α -dT”=胸苷的 α 端基异构体		
[0309]			

[0310] 实施例7—dT6P-DBC0-Cy3的合成

[0311] 图22示出了dA6P-N₃和DBC0-Cy3之间的点击反应的结果。在该实施例中,将dT6P-N₃(500nmol, 100μl H₂O)和DBC0-Cy3(700nmol, 100μl DMF)混合在一起并在室温下搅拌2小时。图23示出了表明叠氮-核苷酸向产物DBC0-Cy3-dT6P转化的MALDI-TOF质谱。产物通过MALDI-TOF质谱和单碱基延伸反应表征。根据MALDI-TOF,分子量为1933道尔顿。

[0312] 实施例8—dT6P-Cy3-dT₂₅的合成

[0313] 图24示出了用于形成带标签的核苷酸dT6P-Cy3-T₂₅的5'-叠氮基-六磷酸酯-核苷酸dT6P-N₃和5'-炔基-寡核苷酸标签5'-己炔基-Cy3-T₂₅之间的点击反应。将dT6P-N₃(750nmol)溶液加入到5'-己炔基-Cy3-T₂₅寡核苷酸(获自TriLink, 500nmol, 在200μl水中), 随后加入溴化铜(50μl, 0.1M, 在3:1DMSO/t-BuOH溶液中)和TBTA(100μl, 0.1M, 在3:1DMSO/t-BuOH溶液中)。将反应混合物在40℃下搅拌16小时。通过HPLC使用0.1M TEAC缓冲液(pH 7.5)和乙腈梯度进行纯化。带标签的核苷酸产物dT6P-Cy3-T₂₅通过MALDI-TOF质谱和单碱基延伸反应来表征。MALDI-TOF表明质量为9179道尔顿。

[0314] 实施例9—2'-脱氧胸苷-5'-六磷酸酯-叠氮(dT6P-N₃)的合成

[0315] Fmoc-6-氨基己基三磷酸酯的合成:将Fmoc-6-氨基己醇(1g, 2.94mmol)与无水乙腈(2×20ml)共蒸发, 然后溶于三乙基磷酸酯(10ml)中。一旦冷却, 将磷酰氯(550μl, 5.88mmol)加入到该溶液中, 并搅拌2小时。向反应混合物中加入三丁基铵焦磷酸盐(5当量, 15mmol, 0.5M的无水DMF溶液)并搅拌20分钟。将溶液用0.1M三乙基碳酸氢铵缓冲液(200ml, pH7.5)淬灭并调节至pH~7。

[0316] 将该溶液加载到Sephadex A-25柱上, 并使用0.1M至1.0M TEAB缓冲液(pH 7.0)梯度纯化。将适当的级分合并, 并在HPLC上进一步纯化, 得到纯三磷酸酯,³¹P-NMR(D₂O) δ-10.5(d, 2P), -22.84(t, 1P)。

[0317] dT6P-NH₂的合成:将Fmoc-氨基己基三磷酸酯(200mg, 0.35mmol)与无水乙腈(2×10ml)共蒸发, 然后溶于无水DMF(3ml)中。加入羰基二咪唑(CDI)(4当量, 1.4mmol), 在室温下搅拌4小时。加入甲醇(6当量, 85ml)再搅拌30分钟。向其中加入2'-脱氧胸苷-5'-三磷酸酯(dTTP, 三乙基铵盐或三丁基铵盐, 0.4mmol)在DMF和MgCl₂(10当量, 3.5mmol)中的溶液。将反应混合物搅拌18小时, 然后加入10%三乙胺水溶液(25ml)以水解Fmoc基团。将反应混合物再搅拌16小时, 过滤出沉淀的固体, 并用乙醚萃取溶液。将水层浓缩, 并使用0.1M TEAC缓冲液(pH7.5)和乙腈梯度在HPLC上纯化。产物通过³¹P NMR和质谱数据表征。³¹P-NMR: d-10.63(bs, 1P), -11.65(bs, 1P), -23.35(bm, 4P)。

[0318] dT6P-N₃的合成:将制备的dT6P-NH₂(10μmol)溶于在200μl DMF中的0.1M碳酸氢盐-碳酸盐缓冲液(500μl, pH8.7)和叠氮丁酸-NHS(25μmol)。将反应混合物搅拌过夜。使用0.1M TEAC缓冲液(pH 7.5)和乙腈梯度通过HPLC纯化反应混合物。

[0319] 实施例10—2'-脱氧腺苷-5'-六磷酸酯的合成和使用点击化学反应将标签连接至末端磷酸酯

[0320] 该实施例说明了使用炔基-叠氮基环加成点击反应制备带标签的核苷酸的一般合成方案。图25示出了2'-脱氧腺苷-5'-六磷酸酯("dA6P")的合成和使用叠氮基-炔基点击化学反应将标签连接至末端磷酸酯上。沿着反应箭头从头到尾, 试剂包括(i) POCl₃和焦磷酸盐, (ii) CDI和DMF, (iii) dATP, (iv) 三乙胺和叠氮-丁酸酯NHS, 和(v) TAG-炔。

[0321] 如图25所示,带标签的核苷酸的合成,以带标签的dATP (25) 为例,以磷酸酯三乙酯作为溶剂,从6-Fmoc-氨基己醇 (29) 开始,其与磷酰氯 (POCl_3) 和焦磷酸盐在 0°C 下反应以形成6-氨基己基三磷酸酯 (30)。6-氨基己基三磷酸酯被N,N-羰基二咪唑 (CDI) 活化,形成化合物 (31),其与dATP反应以获得相应的氨基己基-dA6P (32)。然后,修饰的dA6P与叠氮-丁酸-NHS反应,得到含有叠氮基的衍生物 (33)。最后,叠氮衍生物和己炔衍生的标签 (TAG-炔) 反应,以通过炔-叠氮环加成点击反应获得靶向带标签的核苷酸TAG-dA6P (25)。

[0322] 实施例11—dT6P-N₃和低聚炔之间的点击反应

[0323] 图26示出了5'-叠氮-六磷酸酯-核苷酸、dT6P-N₃和5'-炔-寡核苷酸标签5'-Hexyn-Cy3-T₂₅之间的点击反应的实例。反应从dT6P-N₃开始,在CuBr/TBTA和DMSO的存在下向其加入5'-Hexyn-Cy3-T₂₅以形成dT6P-Cy3-T₂₅。

[0324] 实施例12—硫醇-硫醇 (S-S) 结合的实施例

[0325] 图27示出了标签与核苷酸硫醇 (二硫键) 结合的实例。

[0326] 实施例13—使用带标签的核苷酸的DNA聚合酶引物延伸反应

[0327] 图28示出了使用带标签的核苷酸六磷酸酯的DNA聚合酶延伸反应的实例。使用模板-环 (template-loop) 引物进行延伸反应,其中模板上的下一个互补碱基是A、G、C或T,允许通过单个互补核苷酸碱基延伸。每个延伸反应在热循环仪中进行:在20 μl 反应中在 65°C 下进行25分钟,20 μl 反应由3 μM 模板-环引物、2单位的Therminator γ DNA聚合酶或Bst2.0DNA聚合酶 (New England Biolabs) 和15 μM 寡核苷酸带标签的dN6P核苷酸之一组成。DNA延伸产物用乙醇沉淀,通过C18ZipTip柱 (Millipore) 纯化,通过MALDI-TOF MS分析表征。如图28所示,在添加来自dT6P-Cy3-T₂₅带标签的核苷酸 (分子量8270) 的下一个核苷酸TMP的情况下,引物 (分子量7983) 100%延伸。MALDI-TOF MS上的其他两个峰是完整的带标签核苷酸 (分子量8837) 和从延伸反应释放的产物 (分子量9142)。图29显示了可使用亚酰胺并入至寡核苷酸中的单体的实例。

[0328] 实施例14—5'-寡核苷酸-Cy3-带标签的核苷酸的合成和表征

[0329] 该实施例示出了四种不同的标签的合成,所述四种不同的标签包含与Cy3部分5'-连接并与四种不同的核苷酸六磷酸酯的末端磷酸酯共价结合的寡核苷酸,以及在聚合酶延伸反应中这些带标签的核苷酸的表征。

[0330] 在该实施例中制备和表征的四种带标签的2'-脱氧-5'-六磷酸酯核苷酸是:dA6P-Cy3-T₄-F1dT-T-F1dT-T₂₃-C₃、dT6P-Cy3-T₂-dSp₈-T₂₀-C₃、dG6P-Cy3-T₃₀-C₆和dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃。如图30所示,每种寡核苷酸标签约30个碱基长度,包含dT核苷酸单元以及间隔子和修饰碱基的混合物。将寡核苷酸标签中的这些差异设计成可在纳米孔中的收缩位点 (constriction site) 处产生尺寸和电荷差异,从而在施加到纳米孔的电压下提供独特的电流阻断特性。例如,无碱基dSp₃和dSp₈间隔子残基具有比ssDNA中的核苷酸更小的直径,F1dT-T-F1dT标签中胸苷上的连接的荧光素具有更大的直径。

[0331] 寡核苷酸-Cy3-带标签的核苷酸的合成

[0332] 按照图25所示的一般反应方案,将6-Fmoc-氨基己醇 (29.1g, 2.94mmol) 与无水乙腈 (2 \times 20ml) 共蒸发,然后溶于磷酸酯三乙酯 (10ml) 中。向经冷却和搅拌的溶液中加入新蒸馏的氧氯化磷 (550 μl , 5.88mmol), 将混合物在 0°C 下搅拌2小时。加入三丁基铵焦磷酸盐 (5当量, 15mmol, 0.5M无水DMF溶液) 和三丁胺 (15mmol), 将混合物搅拌20分钟。溶液用0.1M三

乙基碳酸氢铵缓冲液 (TEAB, 200ml, pH7.5) 淬灭并调节至 pH~7。将该溶液加载到 Sephadex A-25 柱上, 用 0.1M 至 1.0M TEAB 缓冲液 7.0) 梯度洗脱。将适当的级分合并, 并通过使用 SUPELCOSIL™ LC-18-T (Supelco) 3 μ M, 15cm \times 4.6mm 的反相 HPLC 进一步纯化。流动相: A, 8.6mM Et₃N, 100mM HFIP, pH 8.1; B, 100% 甲醇。在 40 分钟内从 100%A/0%B 开始至 0%A/100%B。纯三磷酸酯 ³¹P-NMR (D₂O) δ : -7.68 (d, 1P), -10.5 (d, 1P), -22.65 (t, 1P)。将产生的 Fmoc-氨基己基三磷酸酯 (30, 200mg, 0.35mmol) 与无水乙腈 (2 \times 10ml) 共蒸发, 然后溶于无水 DMF (3ml) 中。加入 CDI (4 当量, 1.4mmol), 将溶液在室温下搅拌 4 小时。加入甲醇 (6 当量, 85 μ l), 并再搅拌 30 分钟。向上述产物 (31) 中加入所需的 2'-脱氧核苷-5'-三磷酸酯 (dNTP, 三丁基铵盐, 0.5mmol) 在 DMF 和 MgCl₂ (10 当量, 3.5mmol) 中的溶液。将反应混合物搅拌 18 小时, 然后加入 10% 三乙胺水溶液 (25ml) 以水解 Fmoc 基团, 得到 dN6P-NH₂ (32)。将反应混合物再搅拌 16 小时, 过滤出沉淀的固体, 用乙醚萃取溶液。将水层浓缩并在反相 HPLC 上纯化。

[0333] 产物 dN6P-NH₂ 通过 ³¹P-NMR 表征: δ -10.63 (bs, 1P), -11.65 (bs, 1P), -23.35 (bm, 4P)。MALDI-TOF MS 数据 (未示出): dA6P-NH₂ (31); 832.02 (计算值 829), dT6P-NH₂ (未示出); 825.97 (计算值 820), dG6P-NH₂ (未示出); 848.33 (计算值 845), dC6P-NH₂ (未示出); 826.08 (计算值 828.0)。

[0334] 通过将 32 溶解在 200 μ l DMF 中的 0.1M 碳酸氢盐-碳酸盐缓冲液 (500 μ l, pH8.7) 和叠氮丁酸-NHS (25 μ mol) 中制备 dN6P-NH² (32, 10 μ mol) 的叠氮 (33)。将反应混合物搅拌过夜, 并使用 0.1M TEAA 缓冲液 (pH 7.5) 和乙腈梯度通过 HPLC 纯化。MALDI-TOF MS 数据 (未示出): dA6P-N₃ (33); 963.75 (以 Na⁺ 盐计算为 963.3), dT6P-N₃; 934.58 (计算值 932.3), dG6P-N₃; 960.27 (计算值 957.4), dC6P-N₃; 919.09 (计算值 917.4)。

[0335] 向 5'-己炔基-修饰的寡核苷酸标签 (获自 TriLink, 500nmol, 在 200 μ l H₂O 中) 中加入 dN6P-N₃ (33) (750nmol) 溶液, 随后加入溴化铜 (50 μ l, 在 3:1 DMSO/t-BuOH 中的 0.1M 溶液) 和 TBTA (100 μ l, 在 3:1 DMSO/t-BuOH 中的 0.1M 溶液)。将反应混合物在 40 $^{\circ}$ C 下搅拌 16 小时, 然后使用 0.1M TEAA 缓冲液 (pH7.5) 和乙腈梯度进行 HPLC 纯化, 并且通过 MALDI-TOF MS 和延伸反应表征寡核苷酸带标签的核苷酸 (参见图 30, (25) - (28))。MALDI-TOF MS 数据 (图 31B): dA6P-Cy3-T₄-F1dT-T-F1dT-T₂₃-C₃ (25): 11834 (计算值 11835); dT6P-Cy3-T₂-dSp₈-T₂₀-C₃ (26): 9806 (计算值 9808); dG6P-Cy3-T₃₀-C₆ (27): 10825 (计算值 10826); 以及 dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃ (28): 10418 (计算值 10413)。

[0336] 对于样品 (25、26、27、28、32 和 33), 在粒径 3.0 μ m 的 SUPELCOSIL™ LC-C18-T (Supelco), 15cm \times 4.6mm 如下执行 HPLC 方法: 在室温和 1ml/min 的流速下, 在 4 分钟内用 100%A/0%B, 然后线性梯度变化至 70%A/30%B 持续 30 分钟, 最后 0%A 和 100%B 持续 45 分钟。(流动相: A, 0.1M TEAA; B, 100% ACN)。

[0337] DNA 聚合酶延伸反应

[0338] 用这四种寡核苷酸 dN6P 作为底物筛选聚合酶延伸反应活性鉴定出了可在室温下快速和精确地进行引物延伸的 Bst2.0DNA 聚合酶 (Bst2.0DNAP)。此外, Bst2.0DNAP 具有缺少 3' 至 5' 核酸外切酶活性的额外优点。

[0339] 使用这四钟寡核苷酸-Cy3 带标签的核苷酸、Bst2.0DNAP 和 "SimpleBell" 引物-环模板 DNA (5'-GCG CTC GAG ATC TCC TCG TAA GAG GAG ATC TCG AGC GCA CTG ACT GAC TGA CCT CAG CTG CAC GTA AGT GCA GCT GAG GTC AG-3') (SEQ ID NO:110) 进行 DNA 聚合

酶延伸反应。在20μL反应中,每个反应在65℃下进行30分钟,20μL反应由1.5μM模板-环-引物、1×等温扩增缓冲液(20mM Tris-HCl、10mM (NH₄)₂SO₄、50mM KCl、2mM MgSO₄、0.1% Tween[®] 20,pH 8.8,在25℃)、4单位Bst2.0DNAP、2.25μM天然dNTP或3.75μM寡核苷酸带标签的核苷酸、存在或不存在的1mM MnSO₄组成。将DNA延伸产物在95℃下变性5分钟,然后快速冷却至4℃。变性的延伸产物在15%TBE-Urea Precast Gels(尿素预制凝胶)(Bio-Rad)中在250mV下分离25分钟。

[0340] 结果

[0341] 在变性凝胶上分离DNA聚合酶延伸产物,凝胶图像示于图31A。泳道1显示仅使用引物-环模板DNA的阴性对照,泳道2是添加四种天然dNTP后的阳性对照,泳道3是使用四种寡核苷酸-Cy3带标签的核苷酸的延伸反应。泳道2和3的相似的延伸结果证明,可以仅使用带标签的核苷酸和Bst2.0DNAP将引物-环-模板成功地延伸48个碱基。泳道3中观察到较低的条带证明了反应过程中寡核苷酸标签的释放。

[0342] 纯化寡核苷酸带标签的dN6P,并通过MALDI-TOF MS进行测量,并且它们的分子量观测值与其各自计算值有关(参见图31B)。

[0343] 结果证明Bst2.0聚合酶能够用四种寡核苷酸带标签的核苷酸六磷酸酯底物进行完全延伸反应,所述四种寡核苷酸带标签的核苷酸六磷酸酯底物通过产生在标签和末端磷酸酯之间共价结合的三唑的叠氮-炔点击反应来合成。

[0344] 实施例15—具有3'-修饰的寡核苷酸标签的外切核酸酶保护

[0345] 本实施例说明了如何通过对3'-羟基进行化学修饰来保护本公开实施方案中用于带标签核苷酸的寡核苷酸标签免受核酸外切酶活性的攻击。简而言之,制备具有不同3'-修饰的寡核苷酸,然后将其与Phi29DNA聚合酶(其具有显著的外切核酸酶活性)孵育,通过SDS-PAGE和HPLC分析孵育的样品以检测寡核苷酸的核酸外切酶降解。

[0346] 材料和方法:使用标准寡核苷酸合成技术制备如下表5所示的具有5'-生物素和各种3'-化学修饰的dT核苷酸的寡核苷酸链。

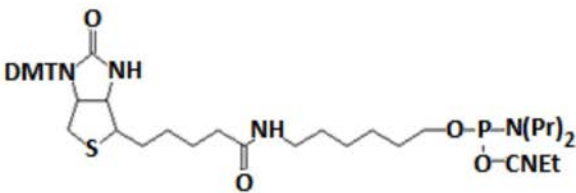
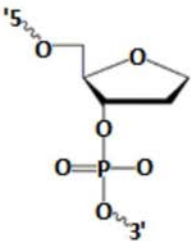


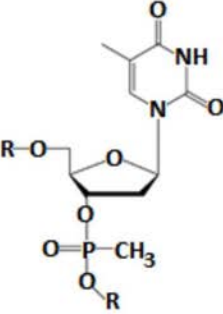
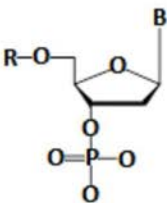
[0347] 表5

[0348]	标签简称	标签结构	序列编号
	T ₃₀	/5Biosg/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T	108
	dSp	/5Biosg/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3dSp/	109
	Phos	/5Biosg/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3Phos/	110
	C3	/5Biosg/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3SpC3/	111
	C6	/5Biosg/TT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/3SpC6/	112
	dSpC3	/5Biosg/TTTTTTTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT T/dSp//3SpC3/	113
	Tmp	/5Biosg/TTT TTT TTT TmpTmpTmp TTT TmpTmpTmp TTT TTT TTT TTT	114

[0349] 表5中寡核苷酸标签所列出的各种化学修饰描述于下表6中。

[0350] 表6

[0351]

缩写	化学修饰
/Biosg/	
/dSp/	
/SpC3/	
/SpC6/	
/Tmp/	
/Phos/	

[0352] 如下制备寡核苷酸/核酸外切酶反应样品：将1 μ L寡核苷酸（浓度200 μ M）、5单位Phi29DNA聚合酶（New England Biolabs,Ipswich,MA,USA）和1 μ L10 \times Phi29反应缓冲液（New England Biolabs,Ipswich,MA,USA）（50mM Tris-HCl,pH 7.5,10mM MgCl₂,10mM (NH₄)₂SO₄和4mM DTT）合并于10 μ L体积的缓冲液中。将该反应样品在37 $^{\circ}$ C下孵育15分钟。通过加入5 μ L PAGE加载染料（50%甘油,50mM EDTA,0.01%溴酚蓝）终止反应。将终止的反应样品的3 μ L等分试样加载到含有50%尿素并用TBE（MiniPROTEAN,Bio-Rad;Hercules,CA,USA）缓冲的15%聚丙烯酰胺凝胶上。使用Sybr Gold（Thermo-Fisher;USA）染色寡核苷酸产物,并在300nm UV照射下拍照。通过反应样品的HPLC分析确认PAGE结果。

[0353] 结果

[0354] 如图35所示,在这些条件下利用外切核酸酶活性完全降解没有3' 修饰的T30寡核苷酸反应样品。具有未修饰的3' -末端和内部甲基-磷酸酯（“Tmp”）连接的T30寡核苷酸也被降解,但仅从未修饰的3' -末端降解至第一个Tmp连接。另一方面,具有具有磷酸酯或烷基碳

间隔子基团(例如SpC3、SpC6或dSp)的3'-修饰的寡核苷酸保持完整,表明它们对Phi29DNA聚合酶的外切核酸酶活性的有耐受性。

[0355] 实施例15—包含CyDye部分的寡核苷酸标签具有改善的被与纳米孔连接的聚合酶捕获的速率

[0356] 该实施例表明了寡核苷酸带标签的核苷酸用于检测与 α -溶血素纳米孔连接的聚合酶对核苷酸的捕获的用途。此外,该实施例表明在寡核苷酸标签和核苷酸之间的接头中包含花青染料(“CyDye”)部分导致聚合酶-纳米孔复合物的捕获速率明显提高。

[0357] 蛋白 α -溶血素在脂质双层的存在下自装配以形成七聚体纳米孔。如本文别处所讨论和提及的,这些纳米孔可以被在孔附近共价连接的DNA聚合酶(具有杂交的DNA引物和模板)修饰。纳米孔可以插入脂质双层中,脂质双层被固定于含电极的孔的上方,所述孔在CMOS微芯片上制造,并且可以在聚合酶活性位点处结合带标签的核苷酸时检测穿过纳米孔的电流水平变化。

[0358] 为了实施本实施例中描述的实验,制备具有在七聚体 α -溶血素孔的七个单体中的每一个单体的C末端附近展示的单个生物素部分的纳米孔。然后加入链霉亲和素(其具有四个生物素结合位点)和生物素化的发夹BioSingleBell C引物/模板DNA(5'-AGA GGA GAT CTC GAG CGC ACT GAC TGC GTG ACC TCA GCT GCA CGT AAG TGC AGC TGA GGT CAC-3')(SEQ ID NO:118)。链霉亲和素的存在允许形成具有一个或多个在孔附近连接的发夹引物/模板分子的强结合复合物。纯化该纳米孔复合物以除去过量的BioSingleBell C DNA引物/模板,然后加入DNA聚合酶并使其与引物/模板结合至少30分钟。将所得DNA聚合酶/纳米孔/DNA复合物暴露于Genia芯片上的脂质双层以形成孔。连接的发夹DNA分子不干扰流过孔的离子电流,因为它们暴露的3'末端是双链,不能进入孔。

[0359] 本实施例中使用的两种带标签的核苷酸示于下表7中。

[0360] 表7

[0361]	带标签的核苷酸的名称	标签结构(包括炔)	SEQ ID NO:
	dG6P-dT ₃₀ -C6	/5 己炔基 /TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3C6/	14
	dG6P-Cy3-dT ₃₀ -C6	/5 己炔基 //iCy3/TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT TTTTT/3C6/	15

[0362] 使用如本文别处所公开的炔/叠氮环加成点击化学反应,由2'-脱氧鸟苷六磷酸酯核苷酸(“dG6P”)制备所包括的两种带标签的核苷酸。简言之,dG6P通过其末端磷酸酯与5'-己炔基-寡聚-dT₃₀或5'-己炔基-Cy3-寡聚-dT₃₀共价结合。两种标签均在dT₃₀的3'-末端被己醇间隔子(由缩写“3C6”表示)修饰。

[0363] 将带标签的核苷酸(1 μ M)、聚合酶、引物模板和Sr²⁺(3mM)的混合物加入到上述纯化的纳米孔复合物中,并洗去任何多余的孔。在存在Sr²⁺的这些条件下,带标签的核苷酸与引物模板一起结合聚合酶活性位点,将其寡核苷酸标签呈递给孔,但不经历在催化金属离子的存在下会发生的催化聚合至引物模板链。因为通过孔的离子电流突然下降(平均持续约300-600毫秒),所以容易观察到这些非催化结合事件。

[0364] 结果

[0365] 当接头中具有Cy3的含寡核苷酸标签的带标签核苷酸被添加到纳米孔阵列芯片时,以约每分钟46件的速率检测到离子电流从约12pA降低至约5pA的电流水平变化或“电流阻断”事件。每个电流阻断时间表明Cy3-dT₃₀-C6标签在纳米孔中被捕获。当随后将在接头中缺少Cy3部分的dG6P-dT₃₀-C6带标签的核苷酸添加到相同的纳米孔阵列芯片时,指示标签捕获的阻断事件的速率基本上降低到每分钟约13件。作为对照,随后将dG6P-Cy3-dT₃₀-C6带标签的核苷酸返还至纳米孔阵列,指示标签捕获的阻塞事件的速率增加回到接近初始水平。

[0366] 还进行了相反的实验,以接头中缺少Cy3的dG6P-dT₃₀-C6带标签的核苷酸开始,然后变成具有Cy3的dG6P-Cy3-dT₃₀-C6带标签的核苷酸,最后回到dG6P-dT₃₀-C6。如所预期的,如果Cy3部分增加标签捕获的速率,则纳米孔中的核苷酸捕获的增益(gain)、数目和速率仅在使用dG6P-Cy3-dT₃₀-C6带标签的核苷酸时增加,在使用不含Cy3的带标签核苷酸时减少。

[0367] 表8总结了结果并且示出了使用这些带有和不带有存在于接头中的Cy3的带标签的核苷酸进行的纳米孔捕获实验的捕获速率、停留时间和等待时间的比较。

[0368] 表8

[0369]

测量	dG6P-dT ₃₀ -C6	dG6P-Cy3-dT ₃₀ -C6
平均每分钟捕获	12.8	46
捕获时间%	7.3	41
停留时间(毫秒)	342	535
等待时间(秒)	2.1	0.4
所测量的孔的总数	118	82

[0370] 如上所述,在Cy3部分作为寡核苷酸标签的一部分存在的情况下,平均当前阻断事件速率(作为平均每分钟捕获)增加了近4倍。同样,捕获时间百分比也增加接近6倍。另一方面,对应于标签在纳米孔中花费的时间的停留时间仅略微增加约1.5倍,这也是有利的,因为它表明Cy3部分的存在不引起纳米孔释放标签的速率的显著变化。

[0371] 实施例16—通过在纳米孔-聚合酶缀合物处的电流阻断信号差异鉴定四种不同的带标签的核苷酸

[0372] 本实施例示出了使用纳米孔阵列芯片基于每种带标签的核苷酸在与纳米孔缀合的Bst2.0DNA聚合酶活性位点处结合互补引物-模板DNA链时各自提供的不同电流阻断信号来鉴定四种不同的带标签的核苷酸的用途。在该实施例中使用的四种不同的带标签的核苷酸为:dT6P-Cy3-T₂-dSp₈-T₂₀-C₃、dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃、dG6P-Cy3-T₃₀-C₆和dA6P-Cy3-T₄-F1dT-T-F1dT-T₂₃-C₃。使用反式-环辛烯(TCO)和6-甲基-四嗪(6-Me-TZ)试剂和IEDDA点击反应制备Bst 2.0-α-HL纳米孔缀合物,并将其插入如美国临时申请第62/130,326号所述的膜中。

[0373] 简言之,Bst2.0DNA聚合酶-纳米孔缀合物结合带标签的核苷酸以在聚合酶活性位点中与自引模板(self-priming template)形成复合物。同时,在施加的电压下,标签部分的“尾部”会位于相邻α-溶血素纳米孔的孔中。标签位于纳米孔中导致与开放纳米孔电流相比电流减少(或“电流阻断”)。例如,发现当被与纳米孔缀合的Bst2.0聚合酶捕获时,dG6P-Cy3-T₃₀-C6带标签的核苷酸产生从约15pA开孔电流到约7pA的始终如一的电流阻断,电流阻断的持续时间在毫秒范围内。

[0374] 制备纳米孔-聚合酶缀合物的一般方法包括制备 α -溶血素(“ α -HL”)的七聚体复合物的步骤,其中七个单体单元中的一个 α -HL-C46突变体。 α -HL-C46在位置46上天然存在的赖氨酸被半胱氨酸取代,并且具有N末端6-His标签用于纯化。在该 α -HL-C46突变体单体单元中半胱氨酸的存在允许单个TCO-马来酰亚胺连接试剂(连接试剂)与复合体连接。然后,该TCO-基团可以通过IEDDA点击反应与修饰的DNA聚合酶上的TZ-基团缀合。在该实施例中,用6-Me-TZ-马来酰亚胺试剂修饰DNA聚合酶Bst 2.0中的单个天然存在的半胱氨酸残基。然后使该6-Me-TZ-Bst 2.0加合物与TCO- α -HL加合物以10:1的比例合并,以提供具有聚合酶Bst 2.0酶的 α -HL七聚体缀合物。用马来酰亚胺连接试剂修饰 α -HL-C46的材料和方法以及形成包含 α -HL-C46的七聚体的 α -溶血素孔也描述于例如Valeva等人(2001)以及其中引用的参考文献中。

[0375] 6:1 α -HL: α -HL-C46孔的制备:使用标准蛋白工程技术制备金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) α -HL的K46C(在46位上的赖氨酸被半胱氨酸取代),其具有6-His标签。(例如参见Valeva等人(2001)和Palmer等人(1993))。如“PrepEase”His标记的蛋白纯化试剂盒(USB-Affymetrix;USA)的实验方案所述纯化 α -HL-C46,并将其交换至pH 7.2、具有1mM三羧基乙基-膦(TCEP)的1 \times PBS中,蛋白浓度为1.0mg/mL。将纯化的 α -HL-C46在脂质的存在下与野生型 α -HL混合按如下形成七聚体。

[0376] 为了获得天然 α -HL单体与 α -HL-C46突变体单体的最佳6:1比例,将11:1的比例用于寡聚化。在40 $^{\circ}$ C下,将脂质(1,2-二植烷酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱,粉末,Avanti Polar Lipids)加入至50mM tris,200mM NaCl,pH 8.0中至终浓度为5mg/mL,维持30分钟。将5%辛基- β -葡萄糖苷(β -OG)加入到小泡(pop vesicles)中以溶解蛋白,通过变得澄清来评估。然后使用100K MWC0过滤器浓缩样品,并以24000RPM旋转30分钟使沉淀的蛋白质沉淀。在用30mM β OG,75mM KCl,20mM HEPES(pH 7.5)平衡尺寸排阻柱后,在低压下加载500 μ L浓缩样品,以从单体中分离七聚体的6:1 α -HL孔复合物。在两个连续的尺寸排阻柱中浓缩至5mL后,将样品加载到Mono S5/50GL柱(GE Healthcare;New Jersey,USA)上。再使用FPLC使6:1 α -HL: α -HL-C46孔与具有不同亚单位化学计量(例如,7:0,5:2)的孔分离。流动相由以下组成:A,运行缓冲液:20mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES),0.1% Tween[®]20,pH 5;B,洗脱缓冲液:2M NaCl,20mM MES,0.1% Tween[®]20,pH 5。如下进行纯化:100%A等度洗脱21分钟;然后用0-100%B的线性梯度洗脱,20分钟;然后再用100%B等度洗脱2分钟。流速为1ml/min。首先洗脱出纯的天然7:0 α -HL孔,洗脱6:1 α -HL: α -HL-C46孔复合体的保留时间为约24.5分钟至约25.5分钟。

[0377] TCO-PEG₃- α -HL试剂的制备:将6:1 α -HL孔复合体的溶液交换至磷酸盐反应缓冲液(100mM磷酸钠,150mM NaCl,pH7.2)中,并使用100K拦截(cut-off)脱盐离心柱浓缩至 \sim 100 μ L体积中约300 μ g 6:1 α -HL孔复合物。在DMSO中制备50mM TCO-PEG₃-马来酰亚胺(Jena Bioscience GmbH,Jena,Germany)储备溶液。将TCO-PEG₃-马来酰亚胺储备溶液加入到如上所述的6:1 α -HL孔溶液中,得到具有100倍摩尔过量的马来酰亚胺试剂的反应混合物。使该混合物在4 $^{\circ}$ C下在旋转下反应过夜。所得的TCO-PEG₃- α -HL试剂在Sephadex G-50上纯化,并用于与如下所述制备的6-Me-TZ-PEG₄-Bst 2.0聚合酶试剂的IEDDA点击反应中。

[0378] 6-Me-TZ-PEG₄-Bst 2.0试剂的制备:使用10K拦截脱盐旋转柱将在磷酸盐反应缓冲液(100mM磷酸钠,150mM NaCl,pH7.2)中的DNA聚合酶Bst 2.0(New England Biolabs,

Massachusetts, USA) 浓缩至约100 μ L体积中的约580 μ g。在DMSO中制备6-Me-TZ-PEG₄-马来酰亚胺(Jena Bioscience GmbH, Jena, 德国)的50mM储备溶液。将6-Me-TZ-PEG₄-马来酰亚胺储备溶液加入到Bst 2.0溶液中,得到具有100倍过量的马来酰亚胺试剂的反应混合物。在4 $^{\circ}$ C下在旋转器上孵育过夜后,加入1M DTT至终浓度为5mM,并在室温下孵育以淬灭反应。所得的6-Me-TZ-PEG₄-Bst2.0试剂在Sephadex G-50上纯化,并用于如下所述的与TCO-PEG₃- α -HL试剂的IEDDA点击反应。

[0379] 6-Me-TZ与TCO缀合物的IEDDA点击反应:使用5:1摩尔过量的6-Me-TZ-PEG₄-Bst 2.0试剂:TCO-PEG₃- α -HL试剂进行TCO-PEG₃- α -HL和6-Me-TZ-PEG₄-Bst 2.0之间的IEDDA点击反应。通常,在混合下将6-Me-TZ-PEG₄-Bst 2.0溶液加入至一定体积的TCO-PEG₃- α -HL溶液,以在1 \times PBS, 5mM EDTA (pH 7.0)中得到所需的5:1摩尔过量。使混合物在室温下在旋转下反应1小时。通过旋转过滤(100K)然后通过Superdex200凝胶过滤柱上纯化从反应混合物制备样品用于SDS-PAGE和Bioanalyzer (Agilent)分析。通过在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟制备热变性样品。利用 α -HL-C46上的His-标签通过使用Ni²⁺柱 (PrepEase组氨酸-带标签的蛋白纯化迷你试剂盒高产量柱; Affymetrix, CA, USA),进一步纯化缀合物。根据制造商的方案运行Ni²⁺柱。在进一步用于制备纳米孔阵列之前,将 α -HL纳米孔-BST 2.0缀合物产物储存于在4 $^{\circ}$ C下的1 \times PBS缓冲液中。

[0380] 264-孔纳米孔阵列微芯片:使用在浅孔(well)内具有264个银电极的阵列(直径5 μ m)的约1 \times 1mm CMOS微芯片(由Genia Technologies, Mountain View, CA, USA制造的芯片)进行纳米孔电流阻断测量。用于制造和使用这种纳米孔阵列微芯片的方法也可见于美国专利申请公开2013/0244340 A1和US 2013/0264207 A1,它们各自通过引用的反式并入本文。使用具有允许与生物试剂和导电盐恒定接触的表面修饰的标准CMOS工艺制造阵列中的每个孔。每个孔可支持其中嵌入纳米孔缀合物的磷脂双层膜,并且可通过计算机接口单独寻址。使用计算机控制的注射泵将所用的所有试剂引入至芯片上方的简单流动池(simple flow cell)中。芯片支持模拟数字转换,并以超过每秒1000点的速率独立报告来自所有电极的电测量结果。可以在阵列中264个可寻址的含纳米孔的膜中的每一个处以至少每毫秒(msec)一次不同步地电流阻断测量,并记录在接口计算机上。

[0381] 芯片上脂质双层的形成:使用1,2-二植烷酰-sn-丙三氧基-3-磷酸胆碱(Avanti Polar Lipids)制备芯片上的磷脂双层膜。将脂质粉末以15mM溶解在癸烷中,然后在芯片的264个孔上涂覆成层。然后通过泵送空气通过孔的顺侧以起始薄化过程,从而将多层脂质膜还原为单个双层。使用0至1000mV的缓降电压(ramping)测试双层形成。典型的单个双层将在300至500mV的施加电压下暂时性打开。

[0382] 在膜中的插入纳米孔-缀合物:在芯片的256个孔上形成脂质双层后,将含有0.05 μ g Bst2.0- α -HL纳米孔缀合物(如上所述)、3 μ M所需“SimpleBell”DNA模板和30 μ M四种带标签核苷酸中的一种或多种的溶液(150mM KCl, 3mM SrCl₂, 20mM Hepes, pH 7.5, 在25 $^{\circ}$ C下)加入至芯片的顺侧。混合物中的Bst2.0- α -HL纳米孔缀合物自发地插入脂质双层中。由于Sr²⁺是本实验中存在的唯一金属离子,所以DNA聚合酶处的三元复合物能够在活性位点处形成,而不并入核苷酸并且不释放5'-磷酸酯-连接的标签。

[0383] SimpleBell DNA模板是83-mer的自引单链,其具有序列5'-GCG CTC GAG ATC TCC TCG TAA GAG GAG ATC TCG AGC GCA CTG ACT GXC TGA CCT CAG CTG CAC GTA AGT GCA

GCT GAG GTC AG-3' (SEQ ID NO:119), 其中模板上的第一个未确定位置 (open position) X 可以是四种碱基A、C、G或T中的任一种。这些纳米孔实验中使用的四种SimpleBell DNA模板的区别仅在于模板上用于与互补核苷酸结合并被聚合酶并入的第一个可用位。

[0384] 纳米孔实验中所使用的四种不同的带标签的核苷酸是dT6P-Cy3-T₂-dSp₈-T₂₀-C₃、dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃、dG6P-Cy3-T₃₀-C₆和dA6P-Cy3-T₄-F1dT-T-F1dT-T₂₃-C₃。(也可参见上文表4)。四种带标签的核苷酸中的每一种具有与寡核苷酸标签连接的Cy3部分, 所述寡核苷酸标签由包含dT核苷酸、氟修饰碱基dT核苷酸 (F1dT)、无碱基间隔子 (dSp) 和3' 外切核酸酶保护基团组成的不同的30-mer序列。

[0385] 纳米孔电流水平测量: 用于插入纳米孔缀合物和DNA模板的相同溶液 (150mM KCl, 3mM SrCl₂, 20mM Hepes, pH7.5, 在25℃下) 也用作电解质溶液用于纳米孔电流阻断测量。在膜和孔两旁放置的两个Ag/AgCl电极之间跨芯片板施加100mV的 (顺侧对反侧 (cis vs. trans)) 电压。绘制在施用跨孔电压时每种不同的带标签的核苷酸的多个电流阻断事件。基于观察到的两种类型的电流阻断事件记录绘图: (1) 阻断幅度I, 作为孔电流I₀的比率, 和 (2) 平均停留时间 (以毫秒计)。将针对每种不同的带标签的核苷酸所观察到的电流阻断事件停留时间的直方图拟合成指数函数 $y = Ae^{-Bx}$, 常数B的倒数用作经计算的平均停留时间。平均停留时间长于10ms、阻断振幅为从0.6至0.2的电流阻断事件被认为表明了与纳米孔缀合的Bst2.0聚合酶对带标签的核苷酸的有效捕获 (即, 带标签的核苷酸在聚合酶活性位点处与互补模板碱基结合, 带标签的核苷酸的“尾部”位于相邻的孔中)。

[0386] 进行实验, 其中在暴露于互补SimpleBell DNA模板的阵列时测量四种不同的带标签核苷酸中每一种的电流阻断水平, 所述互补SimpleBell DNA模板结合阵列上嵌入膜的纳米孔-聚合酶缀合物。针对与每种不同的带标签核苷酸相关的不同的优选电流阻断特征 (signatures), 进行结果分析。

[0387] 另外, 进行“错配”对照实验, 其中只有不与SimpleBell DNA模板互补的带标签的核苷酸被包含在暴露于纳米孔阵列的溶液中。具体地, 在阵列上使用的SimpleBell模板在模板的下一位置上具有腺嘌呤, 应用三种错配带标签的核苷酸: dA6P-Cy3-T₄-F1dT-T-F1dT-T₂₃-C₃、dG6P-Cy3-T₃₀-C₆和dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃。错配实验中使用的条件与上文中检测互补的带标签的核苷酸的电流阻断特征所用的条件相同。

[0388] 结果

[0389] 如下表9所示, 四种不同的寡核苷酸带标签的核苷酸各自表现出不同的阻断振幅和平均停留时间。

[0390] 表9

[0391]

带标签的核苷酸	阻断幅度 (I/I ₀)	平均停留时间 (ms)
dT6P-Cy3-T ₂ -dSp ₈ -T ₂₀ -C ₃	0.5-0.6	16.9
dC6P-Cy3-T ₄ -dSp ₃ -T ₂₃ -C ₃	0.4-0.5	29.7
dG6P-Cy3-T ₃₀ -C ₆	0.3-0.4	28.6
dA6P-Cy3-T ₄ -F1dT-T-F1dT-T ₂₃ -C ₃	0.2-0.3	16.9

[0392] 然而, 对于错配带标签的核苷酸, 纳米孔中的电流水平变化与所测量的互补的带标签的核苷酸的阻断事件明显不同。错配电流水平变化的图显示出非常少的指示电流阻断的大变化, 并且大部分错配“事件”非常接近开孔电流水平。此外, 所测量的电流水平变化的

错配停留时间直方图显示大多数事件短于20毫秒,其相当于互补的带标签的核苷酸的背景信号范围。在检测到的总共1041个错配“事件”中,仅34.9%的错配核苷酸事件在电流阻断的常用范围内,仅19.8%表现出典型的电流阻断停留时间。基于这些结果,由带标签的核苷酸错配所导致的总错误率估计为6.9%。

[0393] 实施例17—使用四种不同的带标签的核苷酸在纳米孔阵列芯片上进行测序

[0394] 本实施例示出了使用纳米孔阵列芯片上的四种不同的带标签的核苷酸来检测DNA模板的序列。所使用的四种不同的带标签的核苷酸(dT6P-Cy3-T₂-dSp₈-T₂₀-C₃、dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃、dG6P-Cy3-T₃₀-C₆和dA6P-Cy3-T₄-F1dT-T-F1dT-T₂₃-C₃)、纳米孔蛋白(α -溶血素)、DNA模板(SimpleBell 83-mer)和纳米孔阵列芯片(即约1×1mm CMOS微芯片,其具有在浅孔中的5 μ m直径银电极的264阵列,由Genia Technologies, Mountain View, CA, USA制造)与实施例16中所使用的相同。然而,在本实施例中使用的DNA聚合酶是Phi29聚合酶,使用inzakeri和Howarth (2010)中所述的SpyCatcher方法连接至 α -溶血素纳米孔。

[0395] 此外,本测序实施例包括存在所有四种不同的带标签的核苷酸和催化性金属离子盐MgCl₂,以使完整的聚合酶反应与将互补的带标签的核苷酸并入延伸的引物链中并释放带标签一同发生。

[0396] α -HL-Phi29缀合物的制备:在该方法中,化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)纤连蛋白结合蛋白FbaB胶原粘附结构域(CnaB2)的两个片段彼此识别,随后一个片段(即“SpyCatcher”)中的赖氨酸的 ϵ -氨基与另一个片段(即“SpyTag”)中的天冬氨酸的羧基侧基之间形成肽键。在本实施例中, SpyTag片段通过短肽接头连接至 α -HL单体的N末端, SpyCatcher片段通过类似的短肽接头连接至Phi29DNA聚合酶的N末端。将具有和不具有SpyTag的 α -HL单体混合以允许组装七聚体纳米孔,通过色谱法纯化仅具有一个SpyTag-修饰的 α -HL单体的那些七聚体纳米孔,得到所需的6:1 α -HL纳米孔。然后将6:1 α -HL纳米孔溶液与SpyCatcher修饰的Phi29DNA聚合酶合并以形成6:1 α -HL-Phi29缀合物。

[0397] 纳米孔阵列芯片的制备:如实施例16所述,在264孔CMOS芯片阵列上制备脂质双层,将6:1 α -HL-Phi29缀合物与在150mM KCl, 3mM SrCl₂, 20mM Hepes (pH 7.5, 在25℃下)的缓冲液中的DNA模板一起插入双层中。在本实施例中,将两种不同的DNA模板用于测序反应。在开始的两个反应中(参见图36A和图36B),模板为实施例16中所用的83-mer自引(self-priming)单链SimpleBell DNA模板(其在指示自引区(self-primed region)开始的X位上具有所选择的A核苷酸):5'-GCG CTC GAG ATC TCC TCG TAA GAG GAG ATC TCG AGC GCA CTG ACT GAC TGA CCT CAG CTG CAC GTA AGT GCA GCT GAG GTC AG-3' (SEQ ID NO:119)。在第三个测序反应中(参见图37),使用具有均聚区的自引单链DNA模板:5'-GCA CAC AAG CTT ACC TTT TGG TAA GCT TGT GTC GAA AAT TTT CCC CTA GTA GAA GCA AGT GTT TTC ACT TGC TTC TAC TAG GGG AAA ATT TT-3' (SEQ ID NO:120)。

[0398] 使用纳米孔阵列芯片的测序:在阵列上的脂质双层膜中插入6:1 α -HL-Phi29缀合物和自引DNA模板后,在膜的顺侧上仅包含SrCl₂金属离子盐的缓冲溶液被替换成包含具有150mM KCl、3mM MgCl₂、3mM SrCl₂、20mM HEPES的缓冲溶液(25℃下pH 7.5)与0.1mM MnCl₂(参见图36A的电流迹线)或3.0mM MgCl₂与0.7mM SrCl₂的混合物(参见图36B的电流迹线)或仅3.0mM MgCl₂(参见图37的电流迹线)的缓冲溶液。在顺侧上存在催化性二价Mn²⁺离子或Mg²⁺离子引发Phi29DNA聚合酶的催化持续合成能力(processivity)。跨孔施加的电位是不

同的。在图36A和图36B的实验中施加并保持160mV的电位,而在图37的实验中施加并保持100mV的电位。膜的顺侧和/或反侧上不同的非催化性 Sr^{2+} 的量也影响聚合酶持续合成能力和所得到的离子电流水平迹线(如图36A、图36B和图37所示)。测量阵列中穿过纳米孔的离子电流水平的变化,持续3-10分钟。

[0399] 结果

[0400] 如图36所示,短暂地观察到低于开放电流水平的四种不同电流水平,表明纳米孔捕获与四种不同的核苷酸各自相连的四种不同标签。在本测序实验期间观察到的存在的所有四种带标签的核苷酸的相对电流水平变化与在仅存在单个标签和非催化性 Sr^{2+} 二价金属离子的情况下纳米孔阵列测量期间所观察到相对电流水平变化一致(例如参见实施例16)。如所预期的,观察到的四种不同的带标签核苷酸的残余电流从最低至最高的排序与使用实施例16的纳米孔阵列芯片观察到的这些带标签的核苷酸的相对残余电流一致:dA6P-Cy3-T₄-Fluor-T-T-Fluor-T₂₃-C₃(约0.15),<dG6P-Cy3-T₃₀-C₆(约0.25),<dC6P-Cy3-T₄-dSp₃-T₂₃-C₃(约0.42),<dT6P-Cy3-T₂-dSp₈-T₂₀-C₃(约0.50)。此外,指示标签捕获事件的电流水平变化的迹线对应于基于自引SimpleBell DNA模板的互补序列并入正确的核苷酸序列,所述自引SimpleBell DNA模板是“Extended Primer”序列,5' ---TCAGTCAGTGCCTCGAGAT ---3' (SEQ ID NO:121),示于图36的顶部。

[0401] 如图37所示,可通过使用纳米孔阵列芯片检测带标签的核苷酸的特征电流水平变化来测序均聚模板区5' ---GGGGAAAATTTT ---3' (SEQ ID NO:122)。电流的短暂(brief)减少表示孔内的标签捕获,标示出了4种标签的不同结构的偏转特性(deflection characteristic)的深度,忽略非常短暂(<2ms)的背景偏转。图37的电流迹线是原始数据输出,没有进行后处理或降噪。

[0402] 根据上文应该理解,虽然已经示出和描述了特定实施方式,但是可以对其进行各种修改并且在本文中也预期进行这些修改。也不希望本发明受到说明书中提供的具体实施例的限制。尽管已经参照前述说明描述了本发明,但是本文中对优选实施方案的描述和说明不意味着应在限制意义上进行解释。此外,应当理解,本发明的所有方面不限于本文所列出的取决于各种条件和变量具体描述、配置或相对比例。对本发明实施方案的形式和细节的各种修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。因此,预期本发明也应涵盖任何这样的修改、变化和等效物。意在由所附权利要求限定本发明的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等效物。

[0403] 参考文献

[0404] Asseline et al.(1991)“Synthesis and physicochemical properties of oligonucleotides built with either alpha-L or beta-L nucleotides units and covalently linked to an acridine derivative(用α-L或β-L核苷酸单元构建且与吖啶衍生物共价连接的寡核苷酸的合成和物理化学性质)”Nucleic Acids Research(核酸研究) 19:4067-4074.

[0405] Sefah et al.(2014)“In vitro selection with artificial expanded genetic information systems(用人工扩展的遗传信息系统进行体外选择)”Proc.Natl.Acad.Sci.USA(美国国家科学院院刊) 111:1449-1454.

[0406] Bhan et al.(1997)“2',5'-Linked oligo-3'-deoxyribonucleoside

phosphorothioate chimeras:thermal stability and antisense inhibition of gene expression(2',5'-连接的寡聚-3'-脱氧核酸硫代磷酸酯嵌合体:热稳定性和反义抑制基因表达)”Nucleic Acids Research(核酸研究),1997,25,3310-3317.

[0407] Kim et al.(2005) “A Series of Nonpolar Thymidine Analogues of Increasing Size:DNA Base Pairing and Stacking Properties(一系列尺寸增加的非极性胸苷类似物:DNA碱基配对和堆积性)”J.Org.Chem(有机化学杂志).70:2048-2053.

[0408] Garbesi et al.(1993) “L-DNAs as potential antimessenger oligonucleotides:a reassessment(作为潜在反信使寡核苷酸的L-DNA:重新评估)”Nucleic Acids Research(核酸研究)21:4159-4165.

[0409] Hermanson, “Bioconjugate Techniques(生物缀合物技术)”,出版于2008年5月2日,ISBN-13:978-0123705013.

[0410] Himo et al.(2005) “Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles.DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates(铜(I)-催化的唑类合成.DFT研究预测史无前例的反应性和中间体),”J.Am.Chem.Soc.(美国化学杂志),127:210-216.

[0411] Jewett和Bertozzi(2010) “Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology(化学生物学中的无铜点击化学反应),”Chem.Soc.Rev(化学综述).39:1272-1279.

[0412] Kumar et al.(2012) “PEG-Labeled Nucleotides and Nanopore Detection for Single Molecule DNA Sequencing by Synthesis(PEG标记的核苷酸和用于通过合成进行单分子DNA的纳米孔检测),”Scientific Reports(科学快报),2:684.

[0413] Palmer et al.(1993) “Staphylococcus aureus α -Toxin:Production of functionally intact,site-specifically modifiable protein by introduction of cysteine at positions 69,130,and 186(金黄色葡萄球菌 α -毒素:通过在位置69、130和186处引入半胱氨酸来产生功能完整且可位点特异性修饰的蛋白)”J.Biol.Chem.(生物化学杂志)268:11959-11962.

[0414] Presolski et al.(2011) “Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation(用于生物缀合的铜催化的叠氮-炔点击化学反应)”Current Protocols in Chemical Biology(化学生物学现代实验方案)3:153-162.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> The Trustees of Columbia University in the City of New York
- [0003] Genia Technologies, Inc.
- [0004] Fuller, Carl
- [0005] Kumar, Shiv
- [0006] Ju, Jingyue
- [0007] Davis, Randall
- [0008] Chen, Roger
- [0009] <120> 用于生产标记的核苷酸的方法
- [0010] <130> 85625-A-PCT
- [0011] <150> US 61/969,628
- [0012] <151> 2014-03-24
- [0013] <160> 125
- [0014] <170> PatentIn version 3.5
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 30
- [0017] <212> DNA
- [0018] <213> 人工序列
- [0019] <220>
- [0020] <223> 合成序列
- [0021] <220>
- [0022] <221> n
- [0023] <222> (1) .. (1)
- [0024] <223> T-生物素-链霉亲和素
- [0025] <220>
- [0026] <221> 混杂特征
- [0027] <222> (11) .. (13)
- [0028] <223> 无碱基位点
- [0029] <220>
- [0030] <221> 混杂特征
- [0031] <222> (17) .. (19)
- [0032] <223> 无碱基位点
- [0033] <400> 1
- [0034] tttttttttt nnnttttnnt tttttttttt 30
- [0035] <210> 2
- [0036] <211> 30
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工序列

[0039] <220>
[0040] <223> 合成寡核苷酸
[0041] <220>
[0042] <221> 混杂特征
[0043] <222> (1) .. (1)
[0044] <223> T-生物素-链霉亲和素
[0045] <220>
[0046] <221> 混杂特征
[0047] <222> (17) .. (19)
[0048] <223> 无碱基位点
[0049] <400> 2
[0050] ttttttttttt ttttttnnnt ttttttttttt 30
[0051] <210> 3
[0052] <211> 30
[0053] <212> DNA
[0054] <213> 人工序列
[0055] <220>
[0056] <223> 合成寡核苷酸
[0057] <220>
[0058] <221> 混杂特征
[0059] <222> (1) .. (1)
[0060] <223> T-生物素-链霉亲和素
[0061] <400> 3
[0062] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0063] <210> 4
[0064] <211> 30
[0065] <212> DNA
[0066] <213> 人工序列
[0067] <220>
[0068] <223> 合成寡核苷酸
[0069] <220>
[0070] <221> 混杂特征
[0071] <222> (1) .. (1)
[0072] <223> T-生物素-链霉亲和素
[0073] <220>
[0074] <221> 混杂特征
[0075] <222> (18) .. (18)
[0076] <223> T-荧光素
[0077] <400> 4

[0078] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0079] <210> 5
[0080] <211> 30
[0081] <212> DNA
[0082] <213> 人工序列
[0083] <220>
[0084] <223> 合成序列
[0085] <220>
[0086] <221> 混杂特征
[0087] <222> (1) .. (1)
[0088] <223> 5'-己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0089] <400> 5
[0090] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0091] <210> 6
[0092] <211> 30
[0093] <212> DNA
[0094] <213> 人工序列
[0095] <220>
[0096] <223> 合成序列
[0097] <220>
[0098] <221> 混杂特征
[0099] <222> (1) .. (1)
[0100] <223> 5'-己炔-磷酸酯-T
[0101] <220>
[0102] <221> 混杂特征
[0103] <222> (1) .. (1)
[0104] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0105] <220>
[0106] <221> 混杂特征
[0107] <222> (3) .. (3)
[0108] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0109] <220>
[0110] <221> 混杂特征
[0111] <222> (5) .. (5)
[0112] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0113] <220>
[0114] <221> 混杂特征
[0115] <222> (7) .. (7)
[0116] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键

[0117]	<220>
[0118]	<221> 混杂特征
[0119]	<222> (9) .. (9)
[0120]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0121]	<220>
[0122]	<221> 混杂特征
[0123]	<222> (11) .. (11)
[0124]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0125]	<220>
[0126]	<221> 混杂特征
[0127]	<222> (13) .. (13)
[0128]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0129]	<220>
[0130]	<221> 混杂特征
[0131]	<222> (15) .. (15)
[0132]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0133]	<220>
[0134]	<221> 混杂特征
[0135]	<222> (17) .. (17)
[0136]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0137]	<220>
[0138]	<221> 混杂特征
[0139]	<222> (19) .. (19)
[0140]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0141]	<220>
[0142]	<221> 混杂特征
[0143]	<222> (21) .. (21)
[0144]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0145]	<220>
[0146]	<221> 混杂特征
[0147]	<222> (23) .. (23)
[0148]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0149]	<220>
[0150]	<221> 混杂特征
[0151]	<222> (25) .. (25)
[0152]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0153]	<220>
[0154]	<221> 混杂特征
[0155]	<222> (27) .. (27)

- [0156] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0157] <220>
[0158] <221> 混杂特征
[0159] <222> (29) .. (29)
[0160] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0161] <400> 6
[0162] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0163] <210> 7
[0164] <211> 30
[0165] <212> DNA
[0166] <213> 人工序列
[0167] <220>
[0168] <223> 合成寡核苷酸
[0169] <220>
[0170] <221> 混杂特征
[0171] <222> (1) .. (1)
[0172] <223> 5'-己炔-磷酸酯-T
[0173] <400> 7
[0174] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0175] <210> 8
[0176] <211> 30
[0177] <212> DNA
[0178] <213> 人工序列
[0179] <220>
[0180] <223> 合成寡核苷酸
[0181] <220>
[0182] <221> 混杂特征
[0183] <222> (1) .. (1)
[0184] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0185] <220>
[0186] <221> 混杂特征
[0187] <222> (7) .. (14)
[0188] <223> 呋喃亚酰胺
[0189] <400> 8
[0190] tttttttnnnn nnnnttttttt ttttttttttt 30
[0191] <210> 9
[0192] <211> 30
[0193] <212> DNA
[0194] <213> 人工序列

[0195] <220>
[0196] <223> 合成寡核苷酸
[0197] <220>
[0198] <221> 混杂特征
[0199] <222> (1) .. (1)
[0200] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0201] <220>
[0202] <221> 混杂特征
[0203] <222> (7) .. (16)
[0204] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0205] <400> 9
[0206] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[0207] <210> 10
[0208] <211> 30
[0209] <212> DNA
[0210] <213> 人工序列
[0211] <220>
[0212] <223> 合成寡核苷酸
[0213] <220>
[0214] <221> 混杂特征
[0215] <222> (1) .. (1)
[0216] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0217] <220>
[0218] <221> 混杂特征
[0219] <222> (4) .. (6)
[0220] <223> 呋喃亚酰胺
[0221] <400> 10
[0222] ttttnntttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[0223] <210> 11
[0224] <211> 30
[0225] <212> DNA
[0226] <213> 人工序列
[0227] <220>
[0228] <223> 合成寡核苷酸
[0229] <220>
[0230] <221> 混杂特征
[0231] <222> (1) .. (1)
[0232] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0233] <220>

[0234] <221> 混杂特征
[0235] <222> (8) .. (10)
[0236] <223> 呋喃亚酰胺
[0237] <400> 11
[0238] ttttttttnnn ttttttttttt ttttttttttt 30
[0239] <210> 12
[0240] <211> 30
[0241] <212> DNA
[0242] <213> 人工序列
[0243] <220>
[0244] <223> 合成寡核苷酸
[0245] <220>
[0246] <221> 混杂特征
[0247] <222> (1) .. (1)
[0248] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0249] <220>
[0250] <221> 混杂特征
[0251] <222> (11) .. (13)
[0252] <223> 呋喃亚酰胺
[0253] <400> 12
[0254] ttttttttttt nnntttttttt ttttttttttt 30
[0255] <210> 13
[0256] <211> 30
[0257] <212> DNA
[0258] <213> 人工序列
[0259] <220>
[0260] <223> 合成寡核苷酸
[0261] <220>
[0262] <221> 混杂特征
[0263] <222> (1) .. (1)
[0264] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0265] <220>
[0266] <221> 混杂特征
[0267] <222> (14) .. (16)
[0268] <223> 呋喃亚酰胺
[0269] <400> 13
[0270] ttttttttttt ttttnnttttt ttttttttttt 30
[0271] <210> 14
[0272] <211> 30

[0273] <212> DNA
[0274] <213> 人工序列
[0275] <220>
[0276] <223> 合成寡核苷酸
[0277] <220>
[0278] <221> 混杂特征
[0279] <222> (1) .. (1)
[0280] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0281] <220>
[0282] <221> 混杂特征
[0283] <222> (30) .. (30)
[0284] <223> 己醇-T
[0285] <400> 14
[0286] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[0287] <210> 15
[0288] <211> 30
[0289] <212> DNA
[0290] <213> 人工序列
[0291] <220>
[0292] <223> 合成寡核苷酸
[0293] <220>
[0294] <221> 混杂特征
[0295] <222> (1) .. (1)
[0296] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0297] <220>
[0298] <221> 混杂特征
[0299] <222> (30) .. (30)
[0300] <223> 己醇
[0301] <400> 15
[0302] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[0303] <210> 16
[0304] <211> 30
[0305] <212> DNA
[0306] <213> 人工序列
[0307] <220>
[0308] <223> 合成寡核苷酸
[0309] <220>
[0310] <221> 混杂特征
[0311] <222> (1) .. (1)

[0312] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0313] <220>
[0314] <221> 混杂特征
[0315] <222> (5) .. (14)
[0316] <223> 呋喃亚酰胺
[0317] <220>
[0318] <221> 混杂特征
[0319] <222> (30) .. (30)
[0320] <223> 己醇-T
[0321] <400> 16
[0322] ttttnnnnnn nnnntttttt tttttttttt 30
[0323] <210> 17
[0324] <211> 30
[0325] <212> DNA
[0326] <213> 人工序列
[0327] <220>
[0328] <223> 合成寡核苷酸
[0329] <220>
[0330] <221> 混杂特征
[0331] <222> (1) .. (1)
[0332] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0333] <220>
[0334] <221> 混杂特征
[0335] <222> (5) .. (6)
[0336] <223> 硝基吡咯
[0337] <220>
[0338] <221> 混杂特征
[0339] <222> (11) .. (12)
[0340] <223> 硝基吡咯
[0341] <220>
[0342] <221> 混杂特征
[0343] <222> (17) .. (18)
[0344] <223> 硝基吡咯
[0345] <220>
[0346] <221> 混杂特征
[0347] <222> (23) .. (24)
[0348] <223> 硝基吡咯
[0349] <220>
[0350] <221> 混杂特征

[0351] <222> (29) .. (29)
[0352] <223> 硝基吡咯
[0353] <220>
[0354] <221> 混杂特征
[0355] <222> (30) .. (30)
[0356] <223> 硝基吡咯-丙醇
[0357] <400> 17
[0358] ttttnntttt nnttttnntt tttnnttttnn 30
[0359] <210> 18
[0360] <211> 30
[0361] <212> DNA
[0362] <213> 人工序列
[0363] <220>
[0364] <223> 合成寡核苷酸
[0365] <220>
[0366] <221> 混杂特征
[0367] <222> (1) .. (1)
[0368] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0369] <220>
[0370] <221> 混杂特征
[0371] <222> (5) .. (6)
[0372] <223> 水粉伞素
[0373] <220>
[0374] <221> 混杂特征
[0375] <222> (11) .. (12)
[0376] <223> 水粉伞素
[0377] <220>
[0378] <221> 混杂特征
[0379] <222> (17) .. (18)
[0380] <223> 水粉伞素
[0381] <220>
[0382] <221> 混杂特征
[0383] <222> (23) .. (24)
[0384] <223> 水粉伞素
[0385] <220>
[0386] <221> 混杂特征
[0387] <222> (29) .. (29)
[0388] <223> 水粉伞素
[0389] <220>

[0390] <221> 混杂特征
[0391] <222> (30) .. (30)
[0392] <223> 水粉伞素-丙醇
[0393] <400> 18
[0394] ttttnttttt nnttttnntt ttnttttttn 30
[0395] <210> 19
[0396] <211> 27
[0397] <212> DNA
[0398] <213> 人工序列
[0399] <220>
[0400] <223> 合成寡核苷酸
[0401] <220>
[0402] <221> 混杂特征
[0403] <222> (1) .. (1)
[0404] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0405] <220>
[0406] <221> 混杂特征
[0407] <222> (5) .. (5)
[0408] <223> 18-原子 PEG
[0409] <220>
[0410] <221> 混杂特征
[0411] <222> (27) .. (27)
[0412] <223> T-丙醇
[0413] <400> 19
[0414] ttttnttttt tttttttttt ttttttt 27
[0415] <210> 20
[0416] <211> 25
[0417] <212> DNA
[0418] <213> 人工序列
[0419] <220>
[0420] <223> 合成寡核苷酸
[0421] <220>
[0422] <221> 混杂特征
[0423] <222> (1) .. (1)
[0424] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0425] <220>
[0426] <221> 混杂特征
[0427] <222> (5) .. (6)
[0428] <223> 18硝基吡咯 PEG-磷酸酯

[0429] <220>
[0430] <221> 混杂特征
[0431] <222> (25) .. (25)
[0432] <223> T-丙醇
[0433] <220>
[0434] <221> 混杂特征
[0435] <222> (28) .. (28)
[0436] <223> 丙醇-T
[0437] <400> 20
[0438] ttttnntttt tttttttttt ttttt 25
[0439] <210> 21
[0440] <211> 28
[0441] <212> DNA
[0442] <213> 人工序列
[0443] <220>
[0444] <223> 合成寡核苷酸
[0445] <220>
[0446] <221> 混杂特征
[0447] <222> (1) .. (1)
[0448] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0449] <220>
[0450] <221> 混杂特征
[0451] <222> (5) .. (6)
[0452] <223> 9-原子 PEG-磷酸酯
[0453] <220>
[0454] <221> 混杂特征
[0455] <222> (28) .. (28)
[0456] <223> T-丙醇
[0457] <400> 21
[0458] ttttnntttt tttttttttt tttttttt 28
[0459] <210> 22
[0460] <211> 30
[0461] <212> DNA
[0462] <213> 人工序列
[0463] <220>
[0464] <223> 合成寡核苷酸
[0465] <220>
[0466] <221> 混杂特征
[0467] <222> (1) .. (1)

[0468] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0469] <220>
[0470] <221> 混杂特征
[0471] <222> (7) .. (12)
[0472] <223> 庚胺亚酰胺
[0473] <220>
[0474] <221> 混杂特征
[0475] <222> (30) .. (30)
[0476] <223> T-丙醇
[0477] <400> 22
[0478] tttttttnnnn nnttttttttt ttttttttttt 30
[0479] <210> 23
[0480] <211> 30
[0481] <212> DNA
[0482] <213> 人工序列
[0483] <220>
[0484] <223> 合成寡核苷酸
[0485] <220>
[0486] <221> 混杂特征
[0487] <222> (1) .. (1)
[0488] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0489] <220>
[0490] <221> 混杂特征
[0491] <222> (7) .. (12)
[0492] <223> 吡咯烷亚酰胺
[0493] <220>
[0494] <221> 混杂特征
[0495] <222> (30) .. (30)
[0496] <223> T-丙醇
[0497] <400> 23
[0498] tttttttnnnn nnttttttttt ttttttttttt 30
[0499] <210> 24
[0500] <211> 30
[0501] <212> DNA
[0502] <213> 人工序列
[0503] <220>
[0504] <223> 合成寡核苷酸
[0505] <220>
[0506] <221> 混杂特征

[0507] <222> (1) .. (1)
[0508] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0509] <220>
[0510] <221> 混杂特征
[0511] <222> (7) .. (12)
[0512] <223> 氨乙基dT亚酰胺
[0513] <220>
[0514] <221> 混杂特征
[0515] <222> (30) .. (30)
[0516] <223> T-丙醇
[0517] <400> 24
[0518] tttttttnnnn nnttttttttt ttttttttttt 30
[0519] <210> 25
[0520] <211> 27
[0521] <212> DNA
[0522] <213> 人工序列
[0523] <220>
[0524] <223> 合成寡核苷酸
[0525] <220>
[0526] <221> 混杂特征
[0527] <222> (1) .. (1)
[0528] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0529] <220>
[0530] <221> 混杂特征
[0531] <222> (5) .. (5)
[0532] <223> 精胺
[0533] <220>
[0534] <221> 混杂特征
[0535] <222> (27) .. (27)
[0536] <223> T-丙醇
[0537] <400> 25
[0538] ttttntttttt ttttttttttt tttttttt 27
[0539] <210> 26
[0540] <211> 27
[0541] <212> DNA
[0542] <213> 人工序列
[0543] <220>
[0544] <223> 合成寡核苷酸
[0545] <220>

[0546] <221> 混杂特征
[0547] <222> (1) .. (1)
[0548] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0549] <220>
[0550] <221> 混杂特征
[0551] <222> (5) .. (5)
[0552] <223> 精胺
[0553] <220>
[0554] <221> 混杂特征
[0555] <222> (6) .. (8)
[0556] <223> 呋喃亚酰胺
[0557] <220>
[0558] <221> 混杂特征
[0559] <222> (27) .. (27)
[0560] <223> T-丙醇
[0561] <400> 26
[0562] ttttnnnntt tttttttttt ttttttt 27
[0563] <210> 27
[0564] <211> 27
[0565] <212> DNA
[0566] <213> 人工序列
[0567] <220>
[0568] <223> 合成寡核苷酸
[0569] <220>
[0570] <221> 混杂特征
[0571] <222> (1) .. (1)
[0572] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0573] <220>
[0574] <221> 混杂特征
[0575] <222> (5) .. (5)
[0576] <223> 精胺
[0577] <220>
[0578] <221> 混杂特征
[0579] <222> (6) .. (6)
[0580] <223> 荧光素dT亚酰胺
[0581] <220>
[0582] <221> 混杂特征
[0583] <222> (27) .. (27)
[0584] <223> T-丙醇

[0585]	<400> 27
[0586]	tttttnntttt tttttttttt ttttttt 27
[0587]	<210> 28
[0588]	<211> 30
[0589]	<212> DNA
[0590]	<213> 人工序列
[0591]	<220>
[0592]	<223> 合成寡核苷酸
[0593]	<220>
[0594]	<221> 混杂特征
[0595]	<222> (1) .. (1)
[0596]	<223> 己炔-磷酸酯-T
[0597]	<220>
[0598]	<221> 混杂特征
[0599]	<222> (30) .. (30)
[0600]	<223> T-丙醇
[0601]	<400> 28
[0602]	ttttttttttt tttttttttt tttttttttt 30
[0603]	<210> 29
[0604]	<211> 30
[0605]	<212> DNA
[0606]	<213> 人工序列
[0607]	<220>
[0608]	<223> 合成寡核苷酸
[0609]	<220>
[0610]	<221> 混杂特征
[0611]	<222> (1) .. (1)
[0612]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3.5-T
[0613]	<220>
[0614]	<221> 混杂特征
[0615]	<222> (30) .. (30)
[0616]	<223> T-丙醇
[0617]	<400> 29
[0618]	ttttttttttt tttttttttt tttttttttt 30
[0619]	<210> 30
[0620]	<211> 30
[0621]	<212> DNA
[0622]	<213> 人工序列
[0623]	<220>

- [0624] <223> 合成寡核苷酸
[0625] <220>
[0626] <221> 混杂特征
[0627] <222> (1) .. (1)
[0628] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-花青-3-磷酸酯-T
[0629] <220>
[0630] <221> 混杂特征
[0631] <222> (30) .. (30)
[0632] <223> T-丙醇
[0633] <400> 30
[0634] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[0635] <210> 31
[0636] <211> 30
[0637] <212> DNA
[0638] <213> 人工序列
[0639] <220>
[0640] <223> 合成寡核苷酸
[0641] <220>
[0642] <221> 混杂特征
[0643] <222> (1) .. (1)
[0644] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0645] <220>
[0646] <221> 混杂特征
[0647] <222> (7) .. (7)
[0648] <223> 花青3.5-磷酸酯
[0649] <220>
[0650] <221> 混杂特征
[0651] <222> (30) .. (30)
[0652] <223> T-丙醇
[0653] <400> 31
[0654] ttttttntttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[0655] <210> 32
[0656] <211> 30
[0657] <212> DNA
[0658] <213> 人工序列
[0659] <220>
[0660] <223> 合成寡核苷酸
[0661] <220>
[0662] <221> 混杂特征

[0663] <222> (1) .. (1)
[0664] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0665] <220>
[0666] <221> 混杂特征
[0667] <222> (11) .. (11)
[0668] <223> 花青3-磷酸酯
[0669] <220>
[0670] <221> 混杂特征
[0671] <222> (30) .. (30)
[0672] <223> T-丙醇
[0673] <400> 32
[0674] ttttttttttt ntttttttttt ttttttttttt 30
[0675] <210> 33
[0676] <211> 45
[0677] <212> DNA
[0678] <213> 人工序列
[0679] <220>
[0680] <223> 合成寡核苷酸
[0681] <220>
[0682] <221> 混杂特征
[0683] <222> (1) .. (1)
[0684] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0685] <220>
[0686] <221> 混杂特征
[0687] <222> (45) .. (45)
[0688] <223> T-丙醇
[0689] <400> 33
[0690] ttttcggcgc gtaagcgccg ttttttttttt ttttttttttt ttttt 45
[0691] <210> 34
[0692] <211> 30
[0693] <212> DNA
[0694] <213> 人工序列
[0695] <220>
[0696] <223> 合成寡核苷酸
[0697] <220>
[0698] <221> 混杂特征
[0699] <222> (1) .. (1)
[0700] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0701] <220>

[0702] <221> 混杂特征
[0703] <222> (7) .. (14)
[0704] <223> 呋喃亚酰胺
[0705] <220>
[0706] <221> 混杂特征
[0707] <222> (30) .. (30)
[0708] <223> T-丙醇
[0709] <400> 34
[0710] tttttttnnnn nnnnttttttt ttttttttttt 30
[0711] <210> 35
[0712] <211> 30
[0713] <212> DNA
[0714] <213> 人工序列
[0715] <220>
[0716] <223> 合成寡核苷酸
[0717] <220>
[0718] <221> 混杂特征
[0719] <222> (1) .. (1)
[0720] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0721] <220>
[0722] <221> 混杂特征
[0723] <222> (1) .. (1)
[0724] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0725] <220>
[0726] <221> 混杂特征
[0727] <222> (3) .. (3)
[0728] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0729] <220>
[0730] <221> 混杂特征
[0731] <222> (5) .. (5)
[0732] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0733] <220>
[0734] <221> 混杂特征
[0735] <222> (7) .. (7)
[0736] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0737] <220>
[0738] <221> 混杂特征
[0739] <222> (9) .. (9)
[0740] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键

[0741]	<220>
[0742]	<221> 混杂特征
[0743]	<222> (11) .. (11)
[0744]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0745]	<220>
[0746]	<221> 混杂特征
[0747]	<222> (13) .. (13)
[0748]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0749]	<220>
[0750]	<221> 混杂特征
[0751]	<222> (15) .. (15)
[0752]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0753]	<220>
[0754]	<221> 混杂特征
[0755]	<222> (17) .. (17)
[0756]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0757]	<220>
[0758]	<221> 混杂特征
[0759]	<222> (19) .. (19)
[0760]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0761]	<220>
[0762]	<221> 混杂特征
[0763]	<222> (21) .. (21)
[0764]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0765]	<220>
[0766]	<221> 混杂特征
[0767]	<222> (23) .. (23)
[0768]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0769]	<220>
[0770]	<221> 混杂特征
[0771]	<222> (25) .. (25)
[0772]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0773]	<220>
[0774]	<221> 混杂特征
[0775]	<222> (27) .. (27)
[0776]	<223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0777]	<220>
[0778]	<221> 混杂特征
[0779]	<222> (29) .. (29)

[0780] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0781] <220>
[0782] <221> 混杂特征
[0783] <222> (30) .. (30)
[0784] <223> T-丙醇
[0785] <400> 35
[0786] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0787] <210> 36
[0788] <211> 30
[0789] <212> DNA
[0790] <213> 人工序列
[0791] <220>
[0792] <223> 合成寡核苷酸
[0793] <220>
[0794] <221> 混杂特征
[0795] <222> (1) .. (1)
[0796] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0797] <220>
[0798] <221> 混杂特征
[0799] <222> (1) .. (29)
[0800] <223> 与后面的T形成硫代磷酸酯二酯键
[0801] <400> 36
[0802] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0803] <210> 37
[0804] <211> 30
[0805] <212> DNA
[0806] <213> 人工序列
[0807] <220>
[0808] <223> 合成寡核苷酸
[0809] <220>
[0810] <221> 混杂特征
[0811] <222> (1) .. (1)
[0812] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0813] <220>
[0814] <221> 混杂特征
[0815] <222> (1) .. (29)
[0816] <223> 与下一个T形成硫代磷酸酯二酯键
[0817] <400> 37
[0818] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30

[0819] <210> 38
[0820] <211> 30
[0821] <212> DNA
[0822] <213> 人工序列
[0823] <220>
[0824] <223> 合成寡核苷酸
[0825] <220>
[0826] <221> 混杂特征
[0827] <222> (1) .. (1)
[0828] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0829] <220>
[0830] <221> 混杂特征
[0831] <222> (30) .. (30)
[0832] <223> T-丙醇
[0833] <400> 38
[0834] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[0835] <210> 39
[0836] <211> 15
[0837] <212> DNA
[0838] <213> 人工序列
[0839] <220>
[0840] <223> 合成寡核苷酸
[0841] <220>
[0842] <221> 混杂特征
[0843] <222> (1) .. (1)
[0844] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0845] <220>
[0846] <221> 混杂特征
[0847] <222> (15) .. (15)
[0848] <223> T-丙醇
[0849] <400> 39
[0850] ttttttttttt tttttt 15
[0851] <210> 40
[0852] <211> 20
[0853] <212> DNA
[0854] <213> 人工序列
[0855] <220>
[0856] <223> 合成寡核苷酸
[0857] <220>

[0858] <221> 混杂特征
[0859] <222> (1) .. (1)
[0860] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0861] <220>
[0862] <221> 混杂特征
[0863] <222> (20) .. (20)
[0864] <223> T-丙醇
[0865] <400> 40
[0866] ttttttttttt ttttttttttt 20
[0867] <210> 41
[0868] <211> 25
[0869] <212> DNA
[0870] <213> 人工序列
[0871] <220>
[0872] <223> 合成寡核苷酸
[0873] <220>
[0874] <221> 混杂特征
[0875] <222> (1) .. (1)
[0876] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0877] <220>
[0878] <221> 混杂特征
[0879] <222> (25) .. (25)
[0880] <223> T-丙醇
[0881] <400> 41
[0882] ttttttttttt ttttttttttt ttttt 25
[0883] <210> 42
[0884] <211> 25
[0885] <212> DNA
[0886] <213> 人工序列
[0887] <220>
[0888] <223> 合成寡核苷酸
[0889] <220>
[0890] <221> 混杂特征
[0891] <222> (1) .. (1)
[0892] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0893] <220>
[0894] <221> 混杂特征
[0895] <222> (3) .. (3)
[0896] <223> 18-原子 PEG-磷酸酯

[0897] <220>
[0898] <221> 混杂特征
[0899] <222> (25) .. (25)
[0900] <223> T-丙醇
[0901] <400> 42
[0902] ttntttttttt tttttttttt ttttt 25
[0903] <210> 43
[0904] <211> 30
[0905] <212> DNA
[0906] <213> 人工序列
[0907] <220>
[0908] <223> 合成寡核苷酸
[0909] <220>
[0910] <221> 混杂特征
[0911] <222> (1) .. (1)
[0912] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0913] <220>
[0914] <221> 混杂特征
[0915] <222> (5) .. (12)
[0916] <223> 呋喃亚酰胺
[0917] <220>
[0918] <221> 混杂特征
[0919] <222> (30) .. (30)
[0920] <223> T-丙醇
[0921] <400> 43
[0922] ttttnnnnnn nntttttttt tttttttttt 30
[0923] <210> 44
[0924] <211> 30
[0925] <212> DNA
[0926] <213> 人工序列
[0927] <220>
[0928] <223> 合成寡核苷酸
[0929] <220>
[0930] <221> 混杂特征
[0931] <222> (1) .. (1)
[0932] <223> 己炔-磷酸酯-T
[0933] <220>
[0934] <221> 混杂特征
[0935] <222> (7) .. (12)

[0936] <223> 氨乙基dT亚酰胺
[0937] <220>
[0938] <221> 混杂特征
[0939] <222> (30) .. (30)
[0940] <223> T-丙醇
[0941] <400> 44
[0942] tttttttnnnn nnttttttttt tttttttttt 30
[0943] <210> 45
[0944] <211> 28
[0945] <212> DNA
[0946] <213> 人工序列
[0947] <220>
[0948] <223> 合成寡核苷酸
[0949] <220>
[0950] <221> 混杂特征
[0951] <222> (1) .. (1)
[0952] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0953] <220>
[0954] <221> 混杂特征
[0955] <222> (5) .. (5)
[0956] <223> 9原子PEG-磷酸酯
[0957] <220>
[0958] <221> 混杂特征
[0959] <222> (25) .. (25)
[0960] <223> T-丙醇
[0961] <400> 45
[0962] ttttnttttt tttttttttt tttttttt 28
[0963] <210> 46
[0964] <211> 30
[0965] <212> DNA
[0966] <213> 人工序列
[0967] <220>
[0968] <223> 合成寡核苷酸
[0969] <220>
[0970] <221> 混杂特征
[0971] <222> (1) .. (1)
[0972] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0973] <220>
[0974] <221> 混杂特征

[0975] <222> (2) .. (4)
[0976] <223> 呋喃亚酰胺
[0977] <220>
[0978] <221> 混杂特征
[0979] <222> (30) .. (30)
[0980] <223> T-丙醇
[0981] <400> 46
[0982] tnnntttttt tttttttttt tttttttttt 30
[0983] <210> 47
[0984] <211> 30
[0985] <212> DNA
[0986] <213> 人工序列
[0987] <220>
[0988] <223> 合成寡核苷酸
[0989] <220>
[0990] <221> 混杂特征
[0991] <222> (1) .. (1)
[0992] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[0993] <220>
[0994] <221> 混杂特征
[0995] <222> (5) .. (7)
[0996] <223> 呋喃亚酰胺
[0997] <220>
[0998] <221> 混杂特征
[0999] <222> (30) .. (30)
[1000] <223> T-丙醇
[1001] <400> 47
[1002] ttttnnnnttt tttttttttt tttttttttt 30
[1003] <210> 48
[1004] <211> 30
[1005] <212> DNA
[1006] <213> 人工序列
[1007] <220>
[1008] <223> 合成寡核苷酸
[1009] <220>
[1010] <221> 混杂特征
[1011] <222> (1) .. (1)
[1012] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1013] <220>

- [1014] <221> 混杂特征
[1015] <222> (8) .. (10)
[1016] <223> 呋喃亚酰胺
[1017] <220>
[1018] <221> 混杂特征
[1019] <222> (30) .. (30)
[1020] <223> T-丙醇
[1021] <400> 48
[1022] ttttttttnnn ttttttttttt ttttttttttt 30
[1023] <210> 49
[1024] <211> 30
[1025] <212> DNA
[1026] <213> 人工序列
[1027] <220>
[1028] <223> 合成寡核苷酸
[1029] <220>
[1030] <221> 混杂特征
[1031] <222> (1) .. (1)
[1032] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1033] <220>
[1034] <221> 混杂特征
[1035] <222> (11) .. (13)
[1036] <223> 呋喃亚酰胺
[1037] <220>
[1038] <221> 混杂特征
[1039] <222> (30) .. (30)
[1040] <223> T-丙醇
[1041] <400> 49
[1042] ttttttttttt nnnttttttttt ttttttttttt 30
[1043] <210> 50
[1044] <211> 30
[1045] <212> DNA
[1046] <213> 人工序列
[1047] <220>
[1048] <223> 合成寡核苷酸
[1049] <220>
[1050] <221> 混杂特征
[1051] <222> (1) .. (1)
[1052] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T

[1053]	<220>
[1054]	<221> 混杂特征
[1055]	<222> (5) .. (7)
[1056]	<223> 荧光素dT亚酰胺
[1057]	<220>
[1058]	<221> 混杂特征
[1059]	<222> (30) .. (30)
[1060]	<223> T-丙醇
[1061]	<400> 50
[1062]	tttttnnnnttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1063]	<210> 51
[1064]	<211> 30
[1065]	<212> DNA
[1066]	<213> 人工序列
[1067]	<220>
[1068]	<223> 合成寡核苷酸
[1069]	<220>
[1070]	<221> 混杂特征
[1071]	<222> (1) .. (1)
[1072]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1073]	<220>
[1074]	<221> 混杂特征
[1075]	<222> (5) .. (5)
[1076]	<223> 荧光素-dT-亚酰胺
[1077]	<220>
[1078]	<221> 混杂特征
[1079]	<222> (7) .. (7)
[1080]	<223> 荧光素-dT-亚酰胺
[1081]	<220>
[1082]	<221> 混杂特征
[1083]	<222> (30) .. (30)
[1084]	<223> T-丙醇
[1085]	<400> 51
[1086]	ttttntntttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1087]	<210> 52
[1088]	<211> 30
[1089]	<212> DNA
[1090]	<213> 人工序列
[1091]	<220>

- [1092] <223> 合成寡核苷酸
- [1093] <220>
- [1094] <221> 混杂特征
- [1095] <222> (1) .. (1)
- [1096] <223> 己炔-磷酸酯-精胺-磷酸酯-T
- [1097] <220>
- [1098] <221> 混杂特征
- [1099] <222> (30) .. (30)
- [1100] <223> T-丙醇
- [1101] <400> 52
- [1102] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
- [1103] <210> 53
- [1104] <211> 30
- [1105] <212> DNA
- [1106] <213> 人工序列
- [1107] <220>
- [1108] <223> 合成寡核苷酸
- [1109] <220>
- [1110] <221> 混杂特征
- [1111] <222> (1) .. (1)
- [1112] <223> 己炔-磷酸酯-T
- [1113] <220>
- [1114] <221> 混杂特征
- [1115] <222> (30) .. (30)
- [1116] <223> T-花青3-磷酸酯-丙醇
- [1117] <400> 53
- [1118] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
- [1119] <210> 54
- [1120] <211> 29
- [1121] <212> DNA
- [1122] <213> 人工序列
- [1123] <220>
- [1124] <223> 合成寡核苷酸
- [1125] <220>
- [1126] <221> 混杂特征
- [1127] <222> (1) .. (1)
- [1128] <223> 己炔-磷酸酯-T
- [1129] <220>
- [1130] <221> 混杂特征

[1131]	<222> (9) .. (9)
[1132]	<223> 精胺
[1133]	<220>
[1134]	<221> 混杂特征
[1135]	<222> (29) .. (29)
[1136]	<223> T-丙醇
[1137]	<400> 54
[1138]	ttttttttnt tttttttttt tttttttttt 29
[1139]	<210> 55
[1140]	<211> 44
[1141]	<212> DNA
[1142]	<213> 人工序列
[1143]	<220>
[1144]	<223> 合成寡核苷酸
[1145]	<220>
[1146]	<221> 混杂特征
[1147]	<222> (1) .. (1)
[1148]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1149]	<220>
[1150]	<221> 混杂特征
[1151]	<222> (44) .. (44)
[1152]	<223> T-丙醇
[1153]	<400> 55
[1154]	ttttggttgg tgtggttgg tttttttttt tttttttttt tttt 44
[1155]	<210> 56
[1156]	<211> 57
[1157]	<212> DNA
[1158]	<213> 人工序列
[1159]	<220>
[1160]	<223> 合成寡核苷酸
[1161]	<220>
[1162]	<221> 混杂特征
[1163]	<222> (1) .. (1)
[1164]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1165]	<220>
[1166]	<221> 混杂特征
[1167]	<222> (57) .. (57)
[1168]	<223> T-丙醇
[1169]	<400> 56

[1170]	ttttccggcg cggcgcgtaa gcgccgcgcc ggtttttttt tttttttttt ttttttt 57
[1171]	<210> 57
[1172]	<211> 30
[1173]	<212> DNA
[1174]	<213> 人工序列
[1175]	<220>
[1176]	<223> 合成寡核苷酸
[1177]	<220>
[1178]	<221> 混杂特征
[1179]	<222> (1) .. (1)
[1180]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1181]	<220>
[1182]	<221> 混杂特征
[1183]	<222> (6) .. (8)
[1184]	<223> 呋喃亚酰胺
[1185]	<220>
[1186]	<221> 混杂特征
[1187]	<222> (30) .. (30)
[1188]	<223> T-丙醇
[1189]	<400> 57
[1190]	tttttnnnntt tttttttttt tttttttttt 30
[1191]	<210> 58
[1192]	<211> 30
[1193]	<212> DNA
[1194]	<213> 人工序列
[1195]	<220>
[1196]	<223> 合成寡核苷酸
[1197]	<220>
[1198]	<221> 混杂特征
[1199]	<222> (1) .. (1)
[1200]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1201]	<220>
[1202]	<221> 混杂特征
[1203]	<222> (7) .. (9)
[1204]	<223> 呋喃亚酰胺
[1205]	<220>
[1206]	<221> 混杂特征
[1207]	<222> (30) .. (30)
[1208]	<223> T-丙醇

[1209]	<400> 58
[1210]	tttttttnnnt tttttttttt tttttttttt 30
[1211]	<210> 59
[1212]	<211> 30
[1213]	<212> DNA
[1214]	<213> 人工序列
[1215]	<220>
[1216]	<223> 合成寡核苷酸
[1217]	<220>
[1218]	<221> 混杂特征
[1219]	<222> (1) .. (1)
[1220]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1221]	<220>
[1222]	<221> 混杂特征
[1223]	<222> (5) .. (8)
[1224]	<223> 呋喃亚酰胺
[1225]	<220>
[1226]	<221> 混杂特征
[1227]	<222> (30) .. (30)
[1228]	<223> T-丙醇
[1229]	<400> 59
[1230]	tttttnnnntt tttttttttt tttttttttt 30
[1231]	<210> 60
[1232]	<211> 30
[1233]	<212> DNA
[1234]	<213> 人工序列
[1235]	<220>
[1236]	<223> 合成寡核苷酸
[1237]	<220>
[1238]	<221> 混杂特征
[1239]	<222> (1) .. (1)
[1240]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1241]	<220>
[1242]	<221> 混杂特征
[1243]	<222> (5) .. (9)
[1244]	<223> 呋喃亚酰胺
[1245]	<220>
[1246]	<221> 混杂特征
[1247]	<222> (30) .. (30)

[1248] <223> T-丙醇
[1249] <400> 60
[1250] ttttnnnnt tttttttttt tttttttttt 30
[1251] <210> 61
[1252] <211> 29
[1253] <212> DNA
[1254] <213> 人工序列
[1255] <220>
[1256] <223> 合成寡核苷酸
[1257] <220>
[1258] <221> 混杂特征
[1259] <222> (1) .. (1)
[1260] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1261] <220>
[1262] <221> 混杂特征
[1263] <222> (6) .. (6)
[1264] <223> 十二烷基亚酰胺-磷酸酯
[1265] <220>
[1266] <221> 混杂特征
[1267] <222> (29) .. (29)
[1268] <223> T-丙醇
[1269] <220>
[1270] <221> 混杂特征
[1271] <222> (30) .. (30)
[1272] <223> T-丙醇
[1273] <400> 61
[1274] ttttntttt tttttttttt tttttttttt 29
[1275] <210> 62
[1276] <211> 30
[1277] <212> DNA
[1278] <213> 人工序列
[1279] <220>
[1280] <223> 合成寡核苷酸
[1281] <220>
[1282] <221> 混杂特征
[1283] <222> (1) .. (1)
[1284] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1285] <220>
[1286] <221> 混杂特征

- [1287] <222> (5) .. (6)
[1288] <223> 己基亚酰胺
[1289] <220>
[1290] <221> 混杂特征
[1291] <222> (30) .. (30)
[1292] <223> T-丙醇
[1293] <400> 62
[1294] ttttnntttt tttttttttt tttttttttt 30
[1295] <210> 63
[1296] <211> 30
[1297] <212> DNA
[1298] <213> 人工序列
[1299] <220>
[1300] <223> 合成寡核苷酸
[1301] <220>
[1302] <221> 混杂特征
[1303] <222> (1) .. (1)
[1304] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1305] <220>
[1306] <221> 混杂特征
[1307] <222> (5) .. (7)
[1308] <223> 丙基亚酰胺
[1309] <220>
[1310] <221> 混杂特征
[1311] <222> (30) .. (30)
[1312] <223> T-丙醇
[1313] <400> 63
[1314] ttttnntttt tttttttttt tttttttttt 30
[1315] <210> 64
[1316] <211> 30
[1317] <212> DNA
[1318] <213> 人工序列
[1319] <220>
[1320] <223> 合成寡核苷酸
[1321] <220>
[1322] <221> 混杂特征
[1323] <222> (1) .. (1)
[1324] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1325] <220>

- [1326] <221> 混杂特征
[1327] <222> (30) .. (30)
[1328] <223> T-丙醇
[1329] <400> 64
[1330] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1331] <210> 65
[1332] <211> 30
[1333] <212> DNA
[1334] <213> 人工序列
[1335] <220>
[1336] <223> 合成寡核苷酸
[1337] <220>
[1338] <221> 混杂特征
[1339] <222> (1) .. (1)
[1340] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1341] <220>
[1342] <221> 混杂特征
[1343] <222> (3) .. (10)
[1344] <223> 呋喃亚酰胺
[1345] <220>
[1346] <221> 混杂特征
[1347] <222> (30) .. (30)
[1348] <223> T-丙醇
[1349] <400> 65
[1350] tttnnnnnnnn ttttttttttt ttttttttttt 30
[1351] <210> 66
[1352] <211> 34
[1353] <212> DNA
[1354] <213> 人工序列
[1355] <220>
[1356] <223> 合成寡核苷酸
[1357] <220>
[1358] <221> 混杂特征
[1359] <222> (1) .. (1)
[1360] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1361] <220>
[1362] <221> 混杂特征
[1363] <222> (31) .. (33)
[1364] <223> 丙基亚酰胺

[1365] <220>
[1366] <221> 混杂特征
[1367] <222> (34) .. (34)
[1368] <223> 丙基亚酰胺-丙醇
[1369] <400> 66
[1370] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt nnnn 34
[1371] <210> 67
[1372] <211> 30
[1373] <212> DNA
[1374] <213> 人工序列
[1375] <220>
[1376] <223> 合成寡核苷酸
[1377] <220>
[1378] <221> 混杂特征
[1379] <222> (1) .. (1)
[1380] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1381] <220>
[1382] <221> 混杂特征
[1383] <222> (30) .. (30)
[1384] <223> T-磷酸酯
[1385] <400> 67
[1386] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1387] <210> 68
[1388] <211> 30
[1389] <212> DNA
[1390] <213> 人工序列
[1391] <220>
[1392] <223> 合成寡核苷酸
[1393] <220>
[1394] <221> 混杂特征
[1395] <222> (1) .. (1)
[1396] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1397] <220>
[1398] <221> 混杂特征
[1399] <222> (30) .. (30)
[1400] <223> T-丙胺
[1401] <400> 68
[1402] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1403] <210> 69

[1404]	<211> 30
[1405]	<212> DNA
[1406]	<213> 人工序列
[1407]	<220>
[1408]	<223> 合成寡核苷酸
[1409]	<220>
[1410]	<221> 混杂特征
[1411]	<222> (1) .. (1)
[1412]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1413]	<220>
[1414]	<221> 混杂特征
[1415]	<222> (3) .. (10)
[1416]	<223> 呋喃亚酰胺
[1417]	<220>
[1418]	<221> 混杂特征
[1419]	<222> (30) .. (30)
[1420]	<223> T-丙醇
[1421]	<400> 69
[1422]	ttnnnnnnnnn ttttttttttt ttttttttttt 30
[1423]	<210> 70
[1424]	<211> 30
[1425]	<212> DNA
[1426]	<213> 人工序列
[1427]	<220>
[1428]	<223> 合成寡核苷酸
[1429]	<220>
[1430]	<221> 混杂特征
[1431]	<222> (1) .. (1)
[1432]	<223> 磷酸酯-T
[1433]	<220>
[1434]	<221> 混杂特征
[1435]	<222> (30) .. (30)
[1436]	<223> T-花青3-磷酸酯-丙胺-磷酸酯-proparyl-丙酰胺
[1437]	<400> 70
[1438]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1439]	<210> 71
[1440]	<211> 30
[1441]	<212> DNA
[1442]	<213> 人工序列

- [1443] <220>
[1444] <223> 合成寡核苷酸
[1445] <220>
[1446] <221> 混杂特征
[1447] <222> (1) .. (1)
[1448] <223> 磷酸酯-T
[1449] <220>
[1450] <221> 混杂特征
[1451] <222> (25) .. (27)
[1452] <223> 呋喃亚酰胺
[1453] <220>
[1454] <221> 混杂特征
[1455] <222> (30) .. (30)
[1456] <223> T-花青3-磷酸酯-丙胺-磷酸酯-proparyl-丙酰胺
[1457] <400> 71
[1458] ttttttttttt ttttttttttt tttttnnttt 30
[1459] <210> 72
[1460] <211> 45
[1461] <212> DNA
[1462] <213> 人工序列
[1463] <220>
[1464] <223> 合成寡核苷酸
[1465] <220>
[1466] <221> 混杂特征
[1467] <222> (1) .. (1)
[1468] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1469] <220>
[1470] <221> 混杂特征
[1471] <222> (45) .. (45)
[1472] <223> T-丙醇
[1473] <400> 72
[1474] ttttcggcgc gtaagcgccg ttttttttttt ttttttttttt ttttt 45
[1475] <210> 73
[1476] <211> 30
[1477] <212> DNA
[1478] <213> 人工序列
[1479] <220>
[1480] <223> 合成寡核苷酸
[1481] <220>

- [1482] <221> 混杂特征
[1483] <222> (1) .. (1)
[1484] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-C
[1485] <220>
[1486] <221> 混杂特征
[1487] <222> (30) .. (30)
[1488] <223> C-丙醇
[1489] <400> 73
[1490] ccccccccccc ccccccccccc ccccccccccc 30
[1491] <210> 74
[1492] <211> 30
[1493] <212> DNA
[1494] <213> 人工序列
[1495] <220>
[1496] <223> 合成寡核苷酸
[1497] <220>
[1498] <221> 混杂特征
[1499] <222> (1) .. (1)
[1500] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1501] <220>
[1502] <221> 混杂特征
[1503] <222> (5) .. (10)
[1504] <223> 2'-脱氧肌苷
[1505] <220>
[1506] <221> 混杂特征
[1507] <222> (30) .. (30)
[1508] <223> T-丙醇
[1509] <400> 74
[1510] ttttnnnnnnn ttttttttttt ttttttttttt 30
[1511] <210> 75
[1512] <211> 30
[1513] <212> DNA
[1514] <213> 人工序列
[1515] <220>
[1516] <223> 合成寡核苷酸
[1517] <220>
[1518] <221> 混杂特征
[1519] <222> (1) .. (1)
[1520] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T

[1521] <220>
[1522] <221> 混杂特征
[1523] <222> (5) .. (10)
[1524] <223> 5-硝基吡啶
[1525] <220>
[1526] <221> 混杂特征
[1527] <222> (30) .. (30)
[1528] <223> T-丙醇
[1529] <400> 75
[1530] ttttnnnnnn tttttttttt tttttttttt 30
[1531] <210> 76
[1532] <211> 30
[1533] <212> DNA
[1534] <213> 人工序列
[1535] <220>
[1536] <223> 合成寡核苷酸
[1537] <220>
[1538] <221> 混杂特征
[1539] <222> (1) .. (1)
[1540] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1541] <220>
[1542] <221> 混杂特征
[1543] <222> (30) .. (30)
[1544] <223> T-丙醇
[1545] <400> 76
[1546] tttccccct tttttttttt tttttttttt 30
[1547] <210> 77
[1548] <211> 30
[1549] <212> DNA
[1550] <213> 人工序列
[1551] <220>
[1552] <223> 合成寡核苷酸
[1553] <220>
[1554] <221> 混杂特征
[1555] <222> (1) .. (1)
[1556] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1557] <220>
[1558] <221> 混杂特征
[1559] <222> (5) .. (10)

[1560] <223> 5-碘代脱氧尿苷
[1561] <220>
[1562] <221> 混杂特征
[1563] <222> (30) .. (30)
[1564] <223> T-丙醇
[1565] <400> 77
[1566] ttttnnnnnn tttttttttt tttttttttt 30
[1567] <210> 78
[1568] <211> 30
[1569] <212> DNA
[1570] <213> 人工序列
[1571] <220>
[1572] <223> 合成寡核苷酸
[1573] <220>
[1574] <221> 混杂特征
[1575] <222> (1) .. (1)
[1576] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1577] <220>
[1578] <221> 混杂特征
[1579] <222> (5) .. (10)
[1580] <223> 5-苾-脱氧鸟苷
[1581] <220>
[1582] <221> 混杂特征
[1583] <222> (30) .. (30)
[1584] <223> T-丙醇
[1585] <400> 78
[1586] ttttnnnnnn tttttttttt tttttttttt 30
[1587] <210> 79
[1588] <211> 29
[1589] <212> DNA
[1590] <213> 人工序列
[1591] <220>
[1592] <223> 合成寡核苷酸
[1593] <220>
[1594] <221> 混杂特征
[1595] <222> (1) .. (1)
[1596] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1597] <220>
[1598] <221> 混杂特征

[1599]	<222> (3) .. (30)
[1600]	<223> T-丙醇
[1601]	<220>
[1602]	<221> 混杂特征
[1603]	<222> (5) .. (5)
[1604]	<223> 呋喃亚酰胺
[1605]	<220>
[1606]	<221> 混杂特征
[1607]	<222> (7) .. (7)
[1608]	<223> 呋喃亚酰胺
[1609]	<220>
[1610]	<221> 混杂特征
[1611]	<222> (9) .. (9)
[1612]	<223> 呋喃亚酰胺
[1613]	<220>
[1614]	<221> 混杂特征
[1615]	<222> (11) .. (11)
[1616]	<223> 呋喃亚酰胺
[1617]	<400> 79
[1618]	ttttntntnt nttttttttt ttttttttt 29
[1619]	<210> 80
[1620]	<211> 29
[1621]	<212> DNA
[1622]	<213> 人工序列
[1623]	<220>
[1624]	<223> 合成寡核苷酸
[1625]	<220>
[1626]	<221> 混杂特征
[1627]	<222> (1) .. (1)
[1628]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1629]	<220>
[1630]	<221> 混杂特征
[1631]	<222> (6) .. (6)
[1632]	<223> 呋喃亚酰胺
[1633]	<220>
[1634]	<221> 混杂特征
[1635]	<222> (8) .. (8)
[1636]	<223> 呋喃亚酰胺
[1637]	<220>

- [1638] <221> 混杂特征
[1639] <222> (10) .. (10)
[1640] <223> 呋喃亚酰胺
[1641] <220>
[1642] <221> 混杂特征
[1643] <222> (12) .. (12)
[1644] <223> 呋喃亚酰胺
[1645] <220>
[1646] <221> 混杂特征
[1647] <222> (30) .. (30)
[1648] <223> T-丙醇
[1649] <400> 80
[1650] ttttntntn tntttttttt ttttttttt 29
[1651] <210> 81
[1652] <211> 30
[1653] <212> DNA
[1654] <213> 人工序列
[1655] <220>
[1656] <223> 合成寡核苷酸
[1657] <220>
[1658] <221> 混杂特征
[1659] <222> (1) .. (1)
[1660] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1661] <220>
[1662] <221> 混杂特征
[1663] <222> (5) .. (10)
[1664] <223> 丙醇
[1665] <220>
[1666] <221> 混杂特征
[1667] <222> (30) .. (30)
[1668] <223> T-丙醇
[1669] <400> 81
[1670] ttttnnnnnn tttttttttt ttttttttt 30
[1671] <210> 82
[1672] <211> 30
[1673] <212> DNA
[1674] <213> 人工序列
[1675] <220>
[1676] <223> 合成寡核苷酸

[1677] <220>
[1678] <221> 混杂特征
[1679] <222> (1) .. (1)
[1680] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T的L异构体
[1681] <220>
[1682] <221> 混杂特征
[1683] <222> (2) .. (29)
[1684] <223> T的L异构体
[1685] <220>
[1686] <221> 混杂特征
[1687] <222> (30) .. (30)
[1688] <223> T的L异构体-丙醇
[1689] <400> 82
[1690] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1691] <210> 83
[1692] <211> 30
[1693] <212> DNA
[1694] <213> 人工序列
[1695] <220>
[1696] <223> 合成寡核苷酸
[1697] <220>
[1698] <221> 混杂特征
[1699] <222> (1) .. (1)
[1700] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T的L异构体
[1701] <220>
[1702] <221> 混杂特征
[1703] <222> (2) .. (4)
[1704] <223> T的L异构体
[1705] <220>
[1706] <221> 混杂特征
[1707] <222> (5) .. (7)
[1708] <223> 呋喃亚酰胺
[1709] <220>
[1710] <221> 混杂特征
[1711] <222> (8) .. (29)
[1712] <223> T的L异构体
[1713] <220>
[1714] <221> 混杂特征
[1715] <222> (30) .. (30)

- [1716] <223> T的L异构体-丙醇
[1717] <400> 83
[1718] ttttnnnnttt tttttttttt tttttttttt 30
[1719] <210> 84
[1720] <211> 30
[1721] <212> DNA
[1722] <213> 人工序列
[1723] <220>
[1724] <223> 合成寡核苷酸
[1725] <220>
[1726] <221> 混杂特征
[1727] <222> (1) .. (1)
[1728] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T的L异构体
[1729] <220>
[1730] <221> 混杂特征
[1731] <222> (2) .. (4)
[1732] <223> T的L异构体
[1733] <220>
[1734] <221> 混杂特征
[1735] <222> (5) .. (12)
[1736] <223> 呋喃亚酰胺
[1737] <220>
[1738] <221> 混杂特征
[1739] <222> (13) .. (29)
[1740] <223> T的L异构体
[1741] <220>
[1742] <221> 混杂特征
[1743] <222> (30) .. (30)
[1744] <223> T的L异构体-丙醇
[1745] <400> 84
[1746] ttttnnnnnn nntttttttt tttttttttt 30
[1747] <210> 85
[1748] <211> 30
[1749] <212> DNA
[1750] <213> 人工序列
[1751] <220>
[1752] <223> 合成寡核苷酸
[1753] <220>
[1754] <221> 混杂特征

- [1755] <222> (1) .. (1)
[1756] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T的L异构体
[1757] <220>
[1758] <221> 混杂特征
[1759] <222> (2) .. (4)
[1760] <223> T的L异构体
[1761] <220>
[1762] <221> 混杂特征
[1763] <222> (5) .. (10)
[1764] <223> 2'-脱氧 I
[1765] <220>
[1766] <221> 混杂特征
[1767] <222> (11) .. (29)
[1768] <223> T的L异构体
[1769] <220>
[1770] <221> 混杂特征
[1771] <222> (30) .. (30)
[1772] <223> T的L异构体-丙醇
[1773] <400> 85
[1774] ttttnnnnnn tttttttttt tttttttttt 30
[1775] <210> 86
[1776] <211> 45
[1777] <212> DNA
[1778] <213> 人工序列
[1779] <220>
[1780] <223> 合成寡核苷酸
[1781] <220>
[1782] <221> 混杂特征
[1783] <222> (1) .. (1)
[1784] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1785] <220>
[1786] <221> 混杂特征
[1787] <222> (45) .. (54)
[1788] <223> T-丙醇
[1789] <400> 86
[1790] ttttgggtgg gtgggtgggt tttttttttt tttttttttt ttttt 45
[1791] <210> 87
[1792] <211> 46
[1793] <212> DNA

- [1794] <213> 人工序列
[1795] <220>
[1796] <223> 合成寡核苷酸
[1797] <220>
[1798] <221> 混杂特征
[1799] <222> (1) .. (1)
[1800] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1801] <220>
[1802] <221> 混杂特征
[1803] <222> (46) .. (46)
[1804] <223> T-丙醇
[1805] <400> 87
[1806] ttttgggtgg gttgggtggg ttttttttttt ttttttttttt ttttttt 46
[1807] <210> 88
[1808] <211> 30
[1809] <212> DNA
[1810] <213> 人工序列
[1811] <220>
[1812] <223> 合成寡核苷酸
[1813] <220>
[1814] <221> 混杂特征
[1815] <222> (1) .. (1)
[1816] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1817] <220>
[1818] <221> 混杂特征
[1819] <222> (5) .. (6)
[1820] <223> 十二烷基亚酰胺
[1821] <220>
[1822] <221> 混杂特征
[1823] <222> (30) .. (30)
[1824] <223> T-丙醇
[1825] <400> 88
[1826] ttttnnttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1827] <210> 89
[1828] <211> 30
[1829] <212> DNA
[1830] <213> 人工序列
[1831] <220>
[1832] <223> 合成寡核苷酸

[1833]	<220>
[1834]	<221> 混杂特征
[1835]	<222> (1) .. (1)
[1836]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1837]	<220>
[1838]	<221> 混杂特征
[1839]	<222> (4) .. (6)
[1840]	<223> 十二烷基亚酰胺
[1841]	<220>
[1842]	<221> 混杂特征
[1843]	<222> (30) .. (30)
[1844]	<223> T-丙醇
[1845]	<400> 89
[1846]	tttnnnntttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[1847]	<210> 90
[1848]	<211> 33
[1849]	<212> DNA
[1850]	<213> 人工序列
[1851]	<220>
[1852]	<223> 合成寡核苷酸
[1853]	<220>
[1854]	<221> 混杂特征
[1855]	<222> (1) .. (1)
[1856]	<223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1857]	<220>
[1858]	<221> 混杂特征
[1859]	<222> (5) .. (8)
[1860]	<223> 己基亚酰胺
[1861]	<220>
[1862]	<221> 混杂特征
[1863]	<222> (33) .. (33)
[1864]	<223> T-丙醇
[1865]	<400> 90
[1866]	tttnnnnttt ttttttttttt ttttttttttt ttt 33
[1867]	<210> 91
[1868]	<211> 32
[1869]	<212> DNA
[1870]	<213> 人工序列
[1871]	<220>

- [1872] <223> 合成寡核苷酸
- [1873] <220>
- [1874] <221> 混杂特征
- [1875] <222> (1) .. (1)
- [1876] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
- [1877] <220>
- [1878] <221> 混杂特征
- [1879] <222> (5) .. (9)
- [1880] <223> 己基亚酰胺
- [1881] <220>
- [1882] <221> 混杂特征
- [1883] <222> (32) .. (32)
- [1884] <223> T-丙醇
- [1885] <400> 91
- [1886] tttttnnnnt tttttttttt tttttttttt tt 32
- [1887] <210> 92
- [1888] <211> 33
- [1889] <212> DNA
- [1890] <213> 人工序列
- [1891] <220>
- [1892] <223> 合成寡核苷酸
- [1893] <220>
- [1894] <221> 混杂特征
- [1895] <222> (1) .. (1)
- [1896] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
- [1897] <220>
- [1898] <221> 混杂特征
- [1899] <222> (6) .. (9)
- [1900] <223> 己基亚酰胺
- [1901] <220>
- [1902] <221> 混杂特征
- [1903] <222> (33) .. (33)
- [1904] <223> T-丙醇
- [1905] <400> 92
- [1906] tttttnnnnt tttttttttt tttttttttt ttt 33
- [1907] <210> 93
- [1908] <211> 32
- [1909] <212> DNA
- [1910] <213> 人工序列

- [1911] <220>
[1912] <223> 合成寡核苷酸
[1913] <220>
[1914] <221> 混杂特征
[1915] <222> (1) .. (1)
[1916] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1917] <220>
[1918] <221> 混杂特征
[1919] <222> (3) .. (7)
[1920] <223> 己基亚酰胺
[1921] <220>
[1922] <221> 混杂特征
[1923] <222> (32) .. (32)
[1924] <223> T-丙醇
[1925] <400> 93
[1926] tttnnnnttt tttttttttt tttttttttt tt 32
[1927] <210> 94
[1928] <211> 30
[1929] <212> DNA
[1930] <213> 人工序列
[1931] <220>
[1932] <223> 合成寡核苷酸
[1933] <220>
[1934] <221> 混杂特征
[1935] <222> (1) .. (1)
[1936] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1937] <220>
[1938] <221> 混杂特征
[1939] <222> (5) .. (5)
[1940] <223> 精胺
[1941] <220>
[1942] <221> 混杂特征
[1943] <222> (30) .. (30)
[1944] <223> T-丙醇
[1945] <400> 94
[1946] ttttnttttt tttttttttt tttttttttt 30
[1947] <210> 95
[1948] <211> 30
[1949] <212> DNA

- [1950] <213> 人工序列
[1951] <220>
[1952] <223> 合成寡核苷酸
[1953] <220>
[1954] <221> 混杂特征
[1955] <222> (1) .. (1)
[1956] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1957] <220>
[1958] <221> 混杂特征
[1959] <222> (3) .. (3)
[1960] <223> 精胺
[1961] <220>
[1962] <221> 混杂特征
[1963] <222> (30) .. (30)
[1964] <223> T-丙醇
[1965] <400> 95
[1966] ttntttttttt tttttttttt tttttttttt 30
[1967] <210> 96
[1968] <211> 30
[1969] <212> DNA
[1970] <213> 人工序列
[1971] <220>
[1972] <223> 合成寡核苷酸
[1973] <220>
[1974] <221> 混杂特征
[1975] <222> (1) .. (1)
[1976] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1977] <220>
[1978] <221> 混杂特征
[1979] <222> (3) .. (4)
[1980] <223> 精胺
[1981] <220>
[1982] <221> 混杂特征
[1983] <222> (30) .. (30)
[1984] <223> T-丙醇
[1985] <400> 96
[1986] ttntttttttt tttttttttt tttttttttt 30
[1987] <210> 97
[1988] <211> 30

[1989] <212> DNA
[1990] <213> 人工序列
[1991] <220>
[1992] <223> 合成寡核苷酸
[1993] <220>
[1994] <221> 混杂特征
[1995] <222> (1) .. (1)
[1996] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[1997] <220>
[1998] <221> 混杂特征
[1999] <222> (5) .. (5)
[2000] <223> 5-苾-脱氧鸟苷
[2001] <220>
[2002] <221> 混杂特征
[2003] <222> (7) .. (7)
[2004] <223> 5-苾-脱氧鸟苷
[2005] <220>
[2006] <221> 混杂特征
[2007] <222> (8) .. (8)
[2008] <223> n是a、c、g或t
[2009] <220>
[2010] <221> 混杂特征
[2011] <222> (30) .. (30)
[2012] <223> T-丙醇
[2013] <400> 97
[2014] ttttnttntt tttttttttt tttttttttt 30
[2015] <210> 98
[2016] <211> 15
[2017] <212> DNA
[2018] <213> 人工序列
[2019] <220>
[2020] <223> 合成寡核苷酸
[2021] <220>
[2022] <221> 混杂特征
[2023] <222> (15) .. (15)
[2024] <223> A-二氨基丙胺基酸
[2025] <400> 98
[2026] aaaaaaaaaa aaaaa 15
[2027] <210> 99

- [2028] <211> 5
[2029] <212> PRT
[2030] <213> 人工序列
[2031] <220>
[2032] <223> 合成肽
[2033] <400> 99
[2034] Arg Arg Arg Arg Arg
[2035] 1 5
[2036] <210> 100
[2037] <211> 15
[2038] <212> DNA
[2039] <213> 人工序列
[2040] <220>
[2041] <223> 合成寡核苷酸
[2042] <220>
[2043] <221> 混杂特征
[2044] <222> (7) .. (7)
[2045] <223> u
[2046] <220>
[2047] <221> 混杂特征
[2048] <222> (8) .. (8)
[2049] <223> n是a, c, g或 t
[2050] <220>
[2051] <221> 混杂特征
[2052] <222> (15) .. (15)
[2053] <223> A-二氨基丙胺基酸
[2054] <400> 100
[2055] aaaaaaanaa aaaaa 15
[2056] <210> 101
[2057] <211> 30
[2058] <212> DNA
[2059] <213> 人工序列
[2060] <220>
[2061] <223> 合成寡核苷酸
[2062] <220>
[2063] <221> 混杂特征
[2064] <222> (1) .. (1)
[2065] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[2066] <220>

[2067] <221> 混杂特征
[2068] <222> (5) .. (10)
[2069] <223> 胸苷甲基磷酸酯
[2070] <220>
[2071] <221> 混杂特征
[2072] <222> (30) .. (30)
[2073] <223> T-丙基
[2074] <400> 101
[2075] ttttnnnnnn tttttttttt tttttttttt 30
[2076] <210> 102
[2077] <211> 30
[2078] <212> DNA
[2079] <213> 人工序列
[2080] <220>
[2081] <223> 合成寡核苷酸
[2082] <220>
[2083] <221> 混杂特征
[2084] <222> (1) .. (1)
[2085] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[2086] <220>
[2087] <221> 混杂特征
[2088] <222> (5) .. (10)
[2089] <223> 吡咯烷
[2090] <220>
[2091] <221> 混杂特征
[2092] <222> (30) .. (30)
[2093] <223> T-丙醇
[2094] <400> 102
[2095] ttttnnnnnt tttttttttt tttttttttt 30
[2096] <210> 103
[2097] <211> 30
[2098] <212> DNA
[2099] <213> 人工序列
[2100] <220>
[2101] <223> 合成寡核苷酸
[2102] <220>
[2103] <221> 混杂特征
[2104] <222> (1) .. (1)
[2105] <223> 己炔-磷酸酯-吡咯烷-磷酸酯-T

[2106]	<220>
[2107]	<221> 混杂特征
[2108]	<222> (30) .. (30)
[2109]	<223> T-丙醇
[2110]	<400> 103
[2111]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2112]	<210> 104
[2113]	<211> 30
[2114]	<212> DNA
[2115]	<213> 人工序列
[2116]	<220>
[2117]	<223> 合成寡核苷酸
[2118]	<220>
[2119]	<221> 混杂特征
[2120]	<222> (1) .. (1)
[2121]	<223> 己炔-磷酸酯-吡咯烷-磷酸酯-吡咯烷-磷酸酯-T
[2122]	<220>
[2123]	<221> 混杂特征
[2124]	<222> (30) .. (30)
[2125]	<223> T-丙醇
[2126]	<400> 104
[2127]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2128]	<210> 105
[2129]	<211> 30
[2130]	<212> DNA
[2131]	<213> 人工序列
[2132]	<220>
[2133]	<223> 合成寡核苷酸
[2134]	<220>
[2135]	<221> 混杂特征
[2136]	<222> (1) .. (1)
[2137]	<223> 己炔-磷酸酯-吡咯烷-磷酸酯-吡咯烷-磷酸酯-吡咯烷-磷酸酯-T
[2138]	<220>
[2139]	<221> 混杂特征
[2140]	<222> (30) .. (30)
[2141]	<223> T-丙醇
[2142]	<400> 105
[2143]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2144]	<210> 106

- [2145] <211> 30
[2146] <212> DNA
[2147] <213> 人工序列
[2148] <220>
[2149] <223> 合成寡核苷酸
[2150] <220>
[2151] <221> 混杂特征
[2152] <222> (1) .. (1)
[2153] <223> 己炔-磷酸酯-丙基 亚酰胺-花青3-磷酸酯-T
[2154] <220>
[2155] <221> 混杂特征
[2156] <222> (30) .. (30)
[2157] <223> T-丙醇
[2158] <400> 106
[2159] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[2160] <210> 107
[2161] <211> 30
[2162] <212> DNA
[2163] <213> 人工序列
[2164] <220>
[2165] <223> 合成寡核苷酸
[2166] <220>
[2167] <221> 混杂特征
[2168] <222> (1) .. (1)
[2169] <223> 己炔-磷酸酯-丙基 亚酰胺--丙基 亚酰胺-花青
[2170] 3-磷酸酯-T
[2171] <220>
[2172] <221> 混杂特征
[2173] <222> (30) .. (30)
[2174] <223> T-丙醇
[2175] <400> 107
[2176] tttttttttttt tttttttttttt tttttttttttt 30
[2177] <210> 108
[2178] <211> 30
[2179] <212> DNA
[2180] <213> 人工序列
[2181] <220>
[2182] <223> 合成寡核苷酸
[2183] <220>

- [2184] <221> 混杂特征
[2185] <222> (1) .. (1)
[2186] <223> 己炔-磷酸酯-己基 亚酰胺-花青3-磷酸酯-T
[2187] <220>
[2188] <221> 混杂特征
[2189] <222> (30) .. (30)
[2190] <223> T-丙醇
[2191] <400> 108
[2192] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2193] <210> 109
[2194] <211> 30
[2195] <212> DNA
[2196] <213> 人工序列
[2197] <220>
[2198] <223> 合成寡核苷酸
[2199] <220>
[2200] <221> 混杂特征
[2201] <222> (1) .. (1)
[2202] <223> 己炔-磷酸酯-花青3-磷酸酯-T
[2203] <220>
[2204] <221> 混杂特征
[2205] <222> (5) .. (7)
[2206] <223> T的 α 端基异构体
[2207] <220>
[2208] <221> 混杂特征
[2209] <222> (30) .. (30)
[2210] <223> T-丙醇
[2211] <400> 109
[2212] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2213] <210> 110
[2214] <211> 83
[2215] <212> DNA
[2216] <213> 人工序列
[2217] <220>
[2218] <223> 合成寡核苷酸
[2219] <400> 110
[2220] gcgctcgaga tctcctcgta agaggagatc tcgagcgcac tgactgactg acctcagctg 60
[2221] cacgtaagtg cagctgaggt cag 83
[2222] <210> 111

[2223]	<211> 30
[2224]	<212> DNA
[2225]	<213> 人工序列
[2226]	<220>
[2227]	<223> 合成寡核苷酸
[2228]	<220>
[2229]	<221> 混杂特征
[2230]	<222> (1) .. (1)
[2231]	<223> 生物素-T
[2232]	<400> 111
[2233]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2234]	<210> 112
[2235]	<211> 30
[2236]	<212> DNA
[2237]	<213> 人工序列
[2238]	<220>
[2239]	<223> 合成寡核苷酸
[2240]	<220>
[2241]	<221> 混杂特征
[2242]	<222> (1) .. (1)
[2243]	<223> 生物素-T
[2244]	<220>
[2245]	<221> 混杂特征
[2246]	<222> (30) .. (30)
[2247]	<223> T-呋喃亚酰胺-呋喃亚酰胺-呋喃亚酰胺
[2248]	<400> 112
[2249]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2250]	<210> 113
[2251]	<211> 33
[2252]	<212> DNA
[2253]	<213> 人工序列
[2254]	<220>
[2255]	<223> 合成寡核苷酸
[2256]	<220>
[2257]	<221> 混杂特征
[2258]	<222> (1) .. (1)
[2259]	<223> 生物素-T
[2260]	<220>
[2261]	<221> 混杂特征

[2262]	<222> (31) .. (33)
[2263]	<223> 任何 nt
[2264]	<220>
[2265]	<221> 混杂特征
[2266]	<222> (31) .. (33)
[2267]	<223> 任何
[2268]	<400> 113
[2269]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt nnn 33
[2270]	<210> 114
[2271]	<211> 30
[2272]	<212> DNA
[2273]	<213> 人工序列
[2274]	<220>
[2275]	<223> 合成寡核苷酸
[2276]	<220>
[2277]	<221> 混杂特征
[2278]	<222> (1) .. (1)
[2279]	<223> 生物素-T
[2280]	<220>
[2281]	<221> 混杂特征
[2282]	<222> (30) .. (30)
[2283]	<223> t-丙醇
[2284]	<400> 114
[2285]	ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2286]	<210> 115
[2287]	<211> 30
[2288]	<212> DNA
[2289]	<213> 人工序列
[2290]	<220>
[2291]	<223> 合成寡核苷酸
[2292]	<220>
[2293]	<221> 混杂特征
[2294]	<222> (1) .. (1)
[2295]	<223> 生物素-T
[2296]	<220>
[2297]	<221> 混杂特征
[2298]	<222> (30) .. (30)
[2299]	<223> T-己醇
[2300]	<400> 115

[2301] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2302] <210> 116
[2303] <211> 30
[2304] <212> DNA
[2305] <213> 人工序列
[2306] <220>
[2307] <223> 合成寡核苷酸
[2308] <220>
[2309] <221> 混杂特征
[2310] <222> (1) .. (1)
[2311] <223> 生物素-T
[2312] <220>
[2313] <221> 混杂特征
[2314] <222> (30) .. (30)
[2315] <223> T-呋喃亚酰胺-丙醇
[2316] <400> 116
[2317] ttttttttttt ttttttttttt ttttttttttt 30
[2318] <210> 117
[2319] <211> 30
[2320] <212> DNA
[2321] <213> 人工序列
[2322] <220>
[2323] <223> 合成寡核苷酸
[2324] <220>
[2325] <221> 混杂特征
[2326] <222> (1) .. (1)
[2327] <223> 生物素-T
[2328] <220>
[2329] <221> 混杂特征
[2330] <222> (10) .. (12)
[2331] <223> 胸苷甲基磷酸酯
[2332] <220>
[2333] <221> 混杂特征
[2334] <222> (16) .. (18)
[2335] <223> 胸苷甲基磷酸酯
[2336] <400> 117
[2337] ttttttttttn nnttttnnntt ttttttttttt 30
[2338] <210> 118
[2339] <211> 63

- [2340] <212> DNA
[2341] <213> 人工序列
[2342] <220>
[2343] <223> 合成寡核苷酸
[2344] <400> 118
[2345] agaggagatc tcgagcgcac tgactgcgtg acctcagctg cacgtaagtg cagctgaggt 60
[2346] cac 63
[2347] <210> 119
[2348] <211> 83
[2349] <212> DNA
[2350] <213> 人工序列
[2351] <220>
[2352] <223> 合成寡核苷酸
[2353] <220>
[2354] <221> 混杂特征
[2355] <222> (47) .. (47)
[2356] <223> 任何nt
[2357] <400> 119
[2358] gcgctcgaga tctcctcgta agaggagatc tcgagcgcac tgactgnctg acctcagctg 60
[2359] cacgtaagtg cagctgaggt cag 83
[2360] <210> 120
[2361] <211> 92
[2362] <212> DNA
[2363] <213> 人工序列
[2364] <220>
[2365] <223> 合成寡核苷酸
[2366] <400> 120
[2367] gcacacaagc ttaccttttg gtaagcttgt gtcgaaaatt ttcccctagt agaagcaagt 60
[2368] gttttcactt gcttctacta ggggaaaatt tt 92
[2369] <210> 121
[2370] <211> 20
[2371] <212> DNA
[2372] <213> 人工序列
[2373] <220>
[2374] <223> 合成寡核苷酸
[2375] <400> 121
[2376] tcagtcagtg cgctcgagat 20
[2377] <210> 122
[2378] <211> 12

[2379] <212> DNA
[2380] <213> 人工序列
[2381] <220>
[2382] <223> 合成寡核苷酸
[2383] <400> 122
[2384] ggggaaaatt tt 12
[2385] <210> 123
[2386] <211> 20
[2387] <212> DNA
[2388] <213> 人工序列
[2389] <220>
[2390] <223> 合成寡核苷酸
[2391] <400> 123
[2392] agtcagtcac gcgagctcta 20
[2393] <210> 124
[2394] <211> 26
[2395] <212> DNA
[2396] <213> 人工序列
[2397] <220>
[2398] <223> 合成寡核苷酸
[2399] <400> 124
[2400] atactgactg actgactgac ctcaga 26
[2401] <210> 125
[2402] <211> 19
[2403] <212> DNA
[2404] <213> 人工序列
[2405] <220>
[2406] <223> 合成寡核苷酸
[2407] <400> 125
[2408] gctctaattct gacctcagt 19

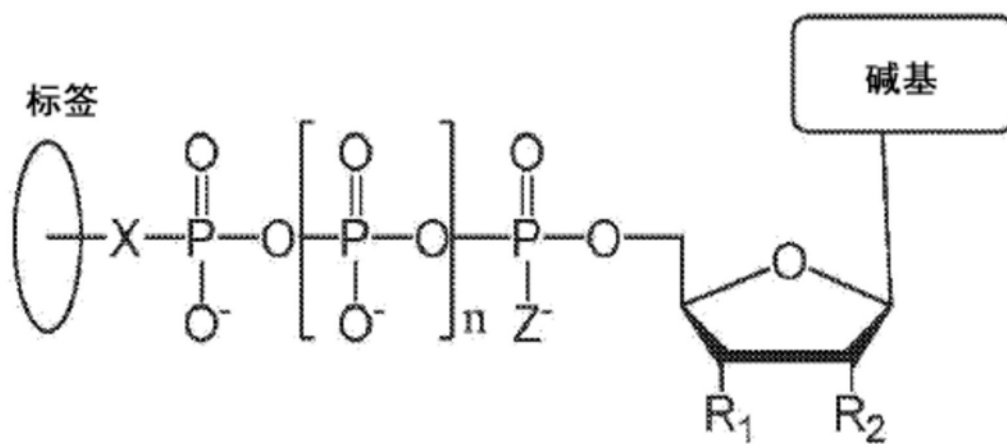


图1

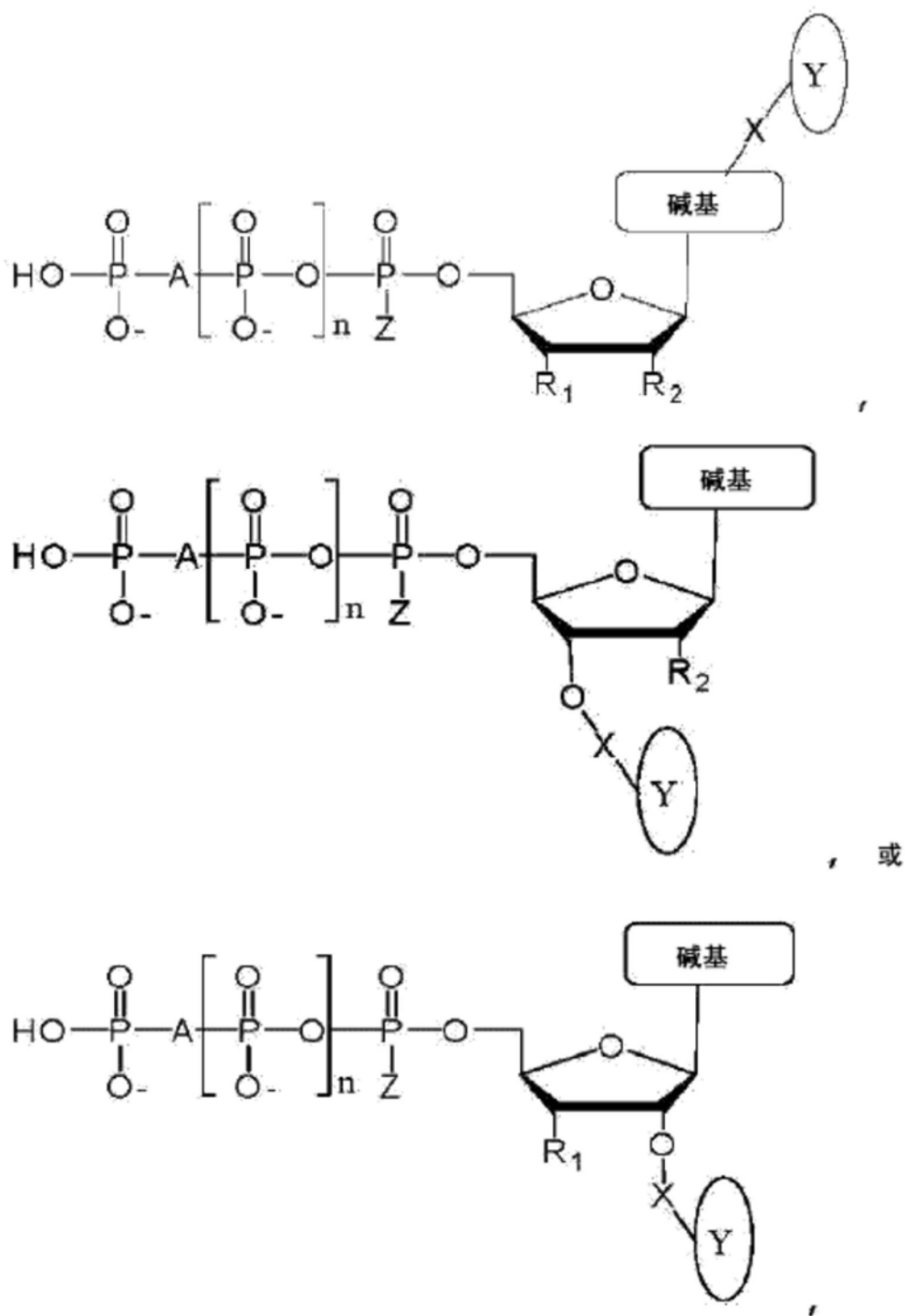


图2

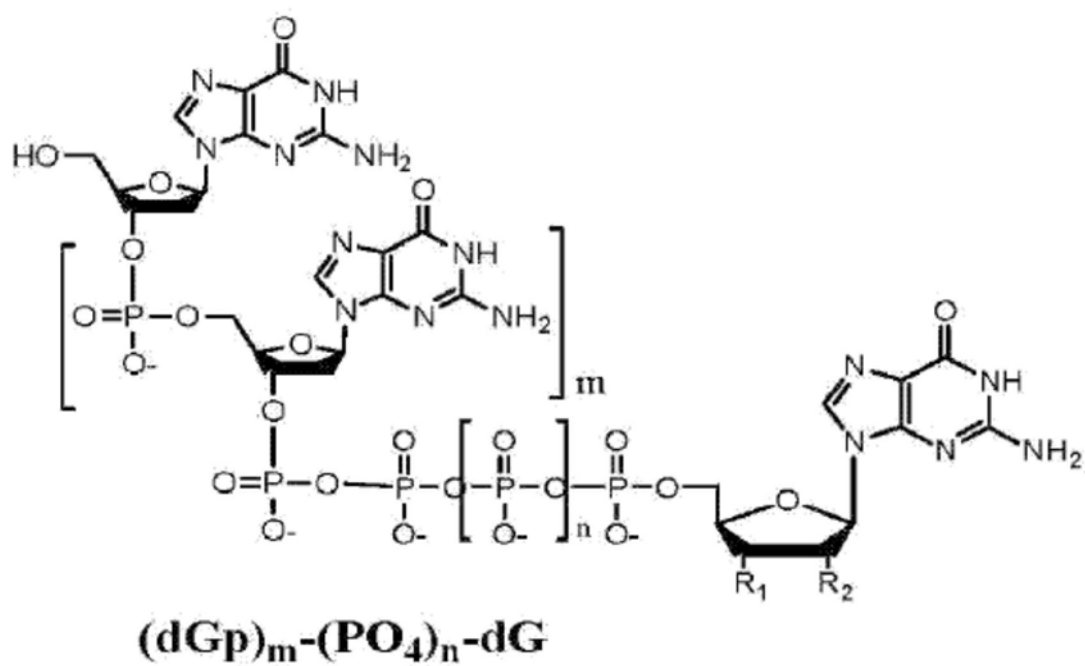
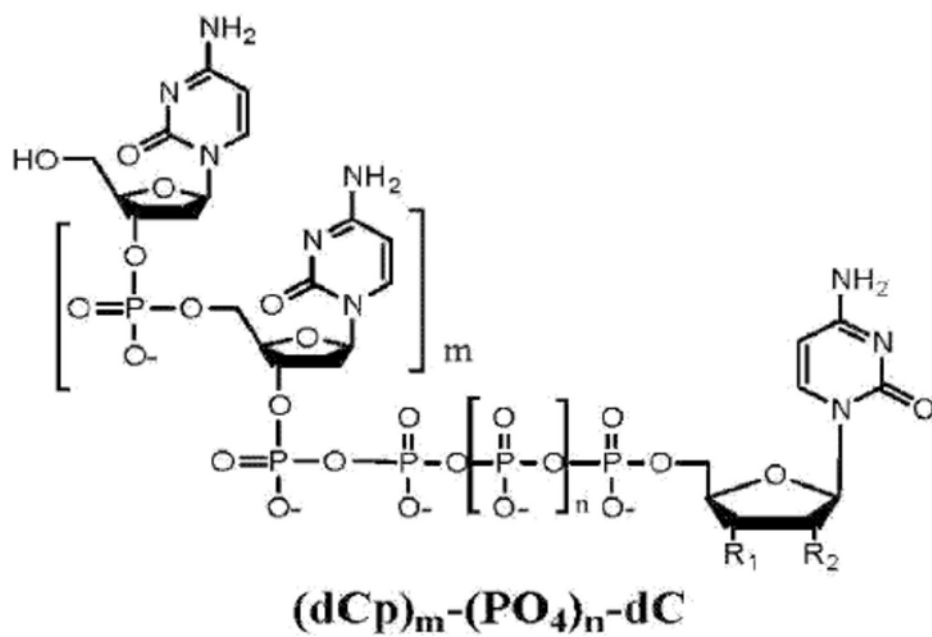
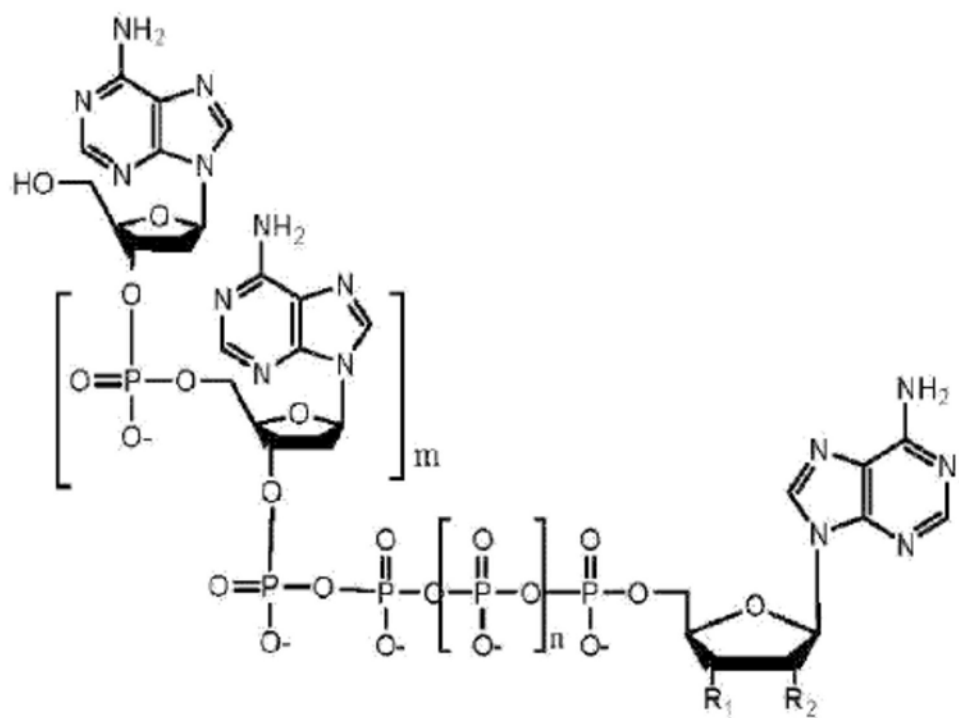
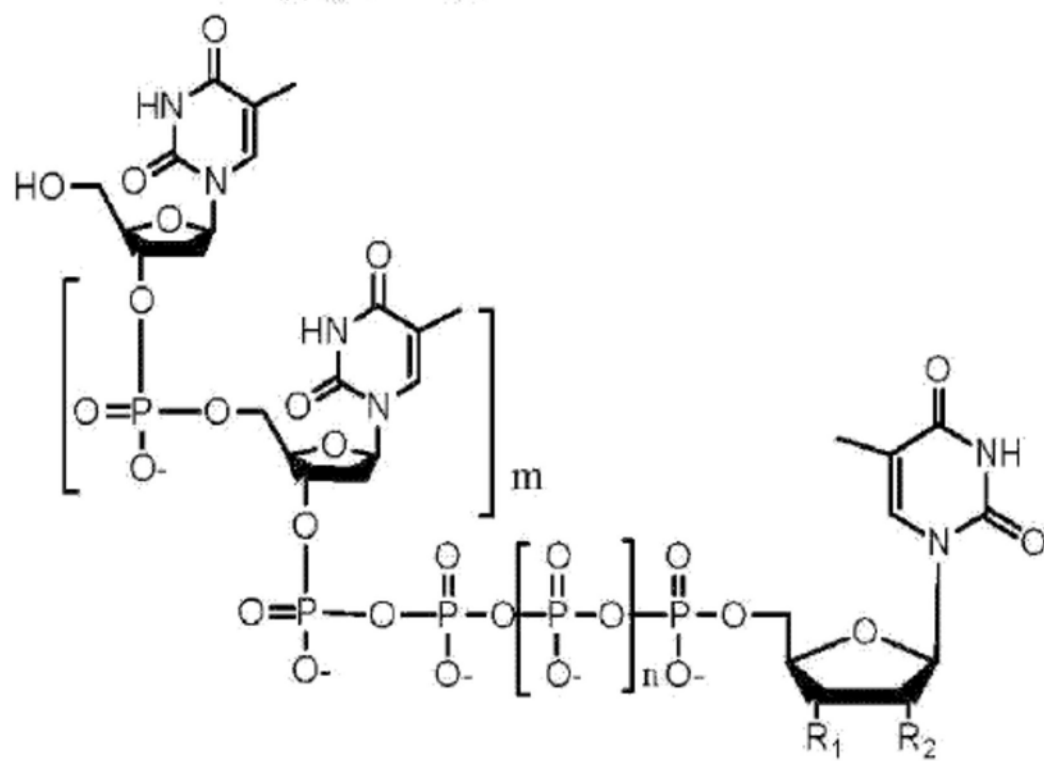


图3



(dAp)_m-(PO₄)_n-dA



(dTp)_m-(PO₄)_n-dT

图4

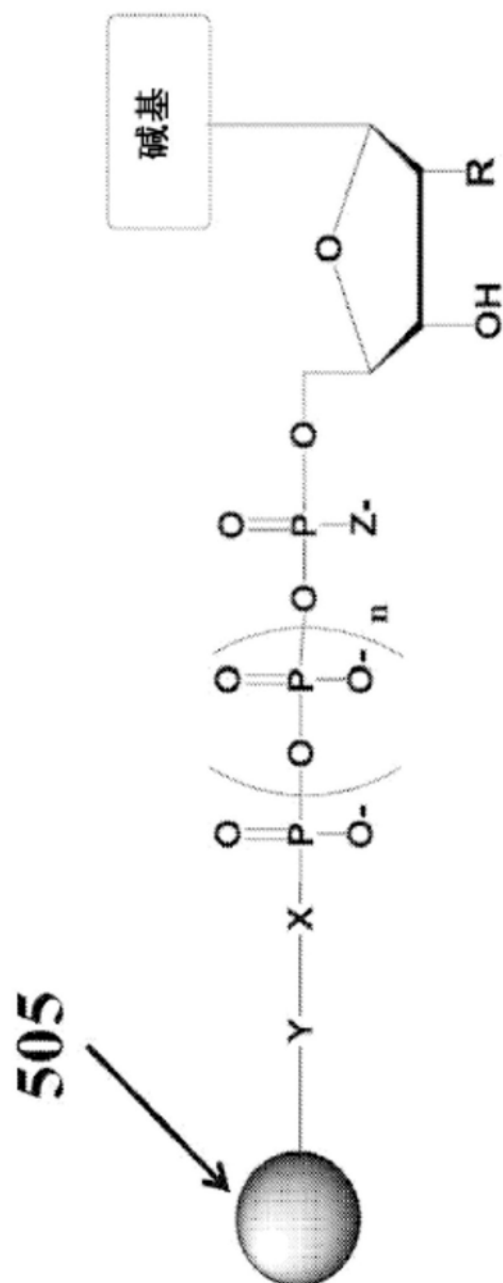


图5



图6

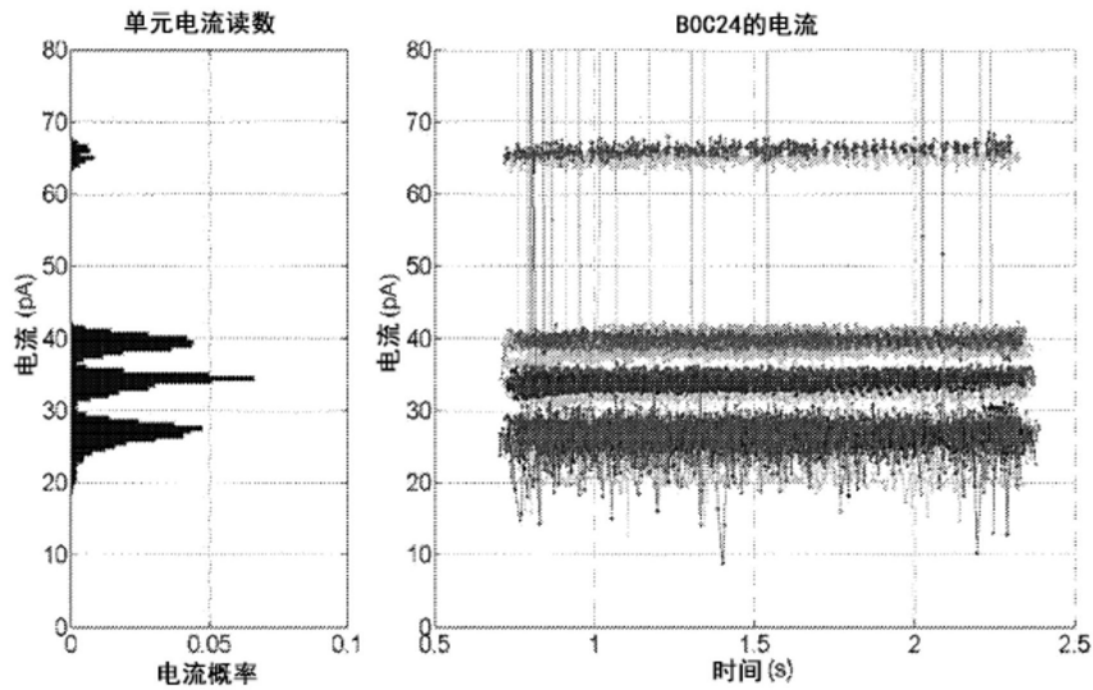


图7

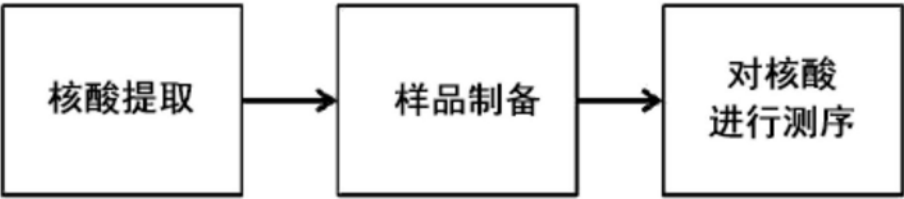


图8

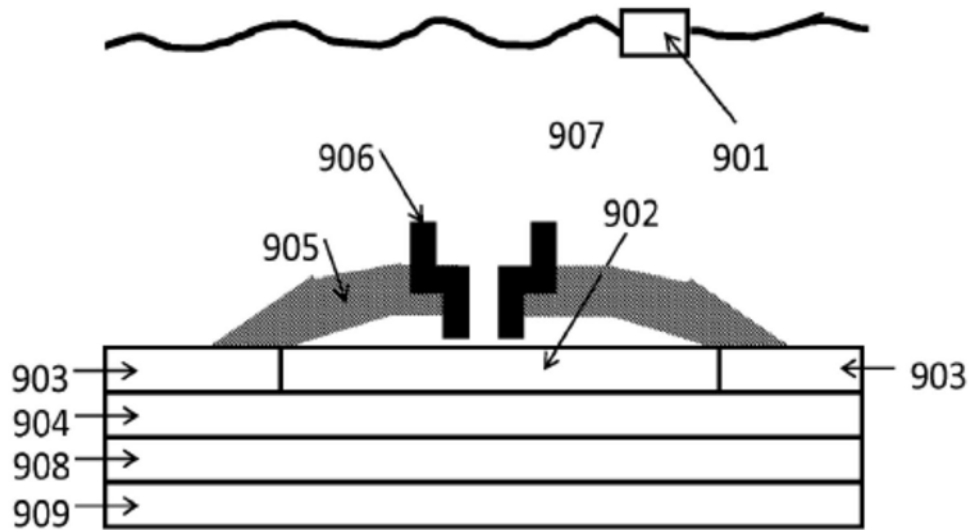


图9A

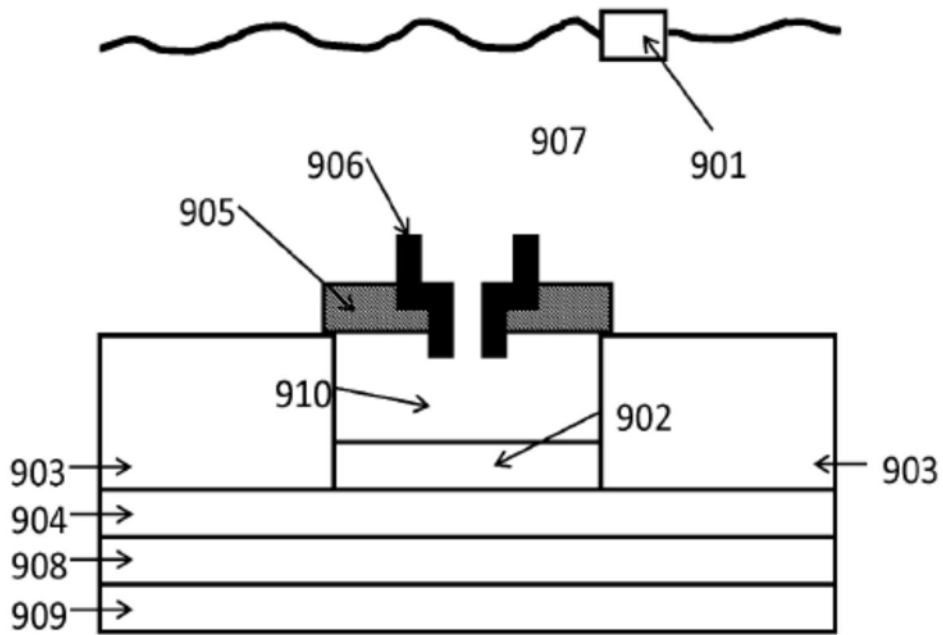


图9B

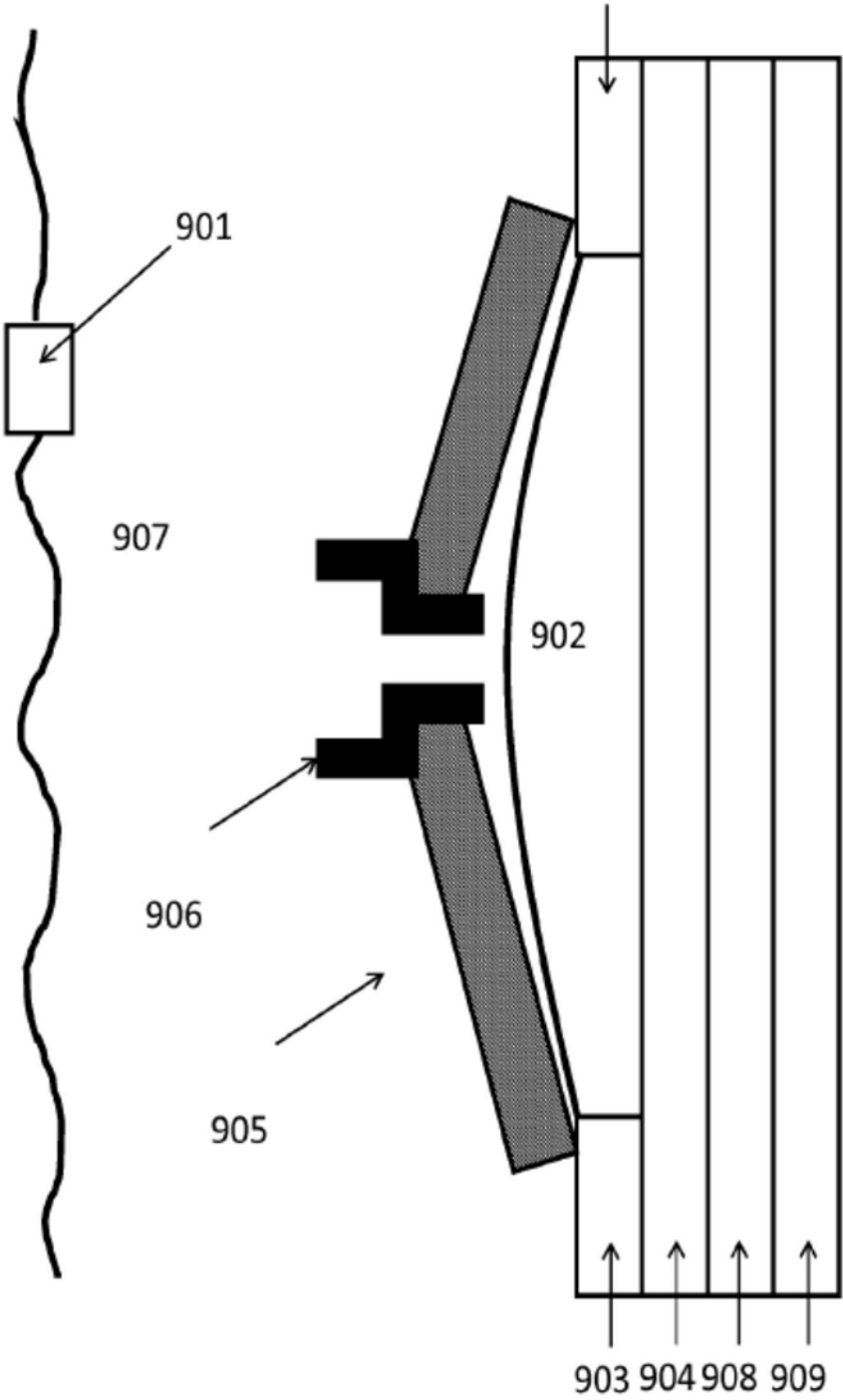


图9C

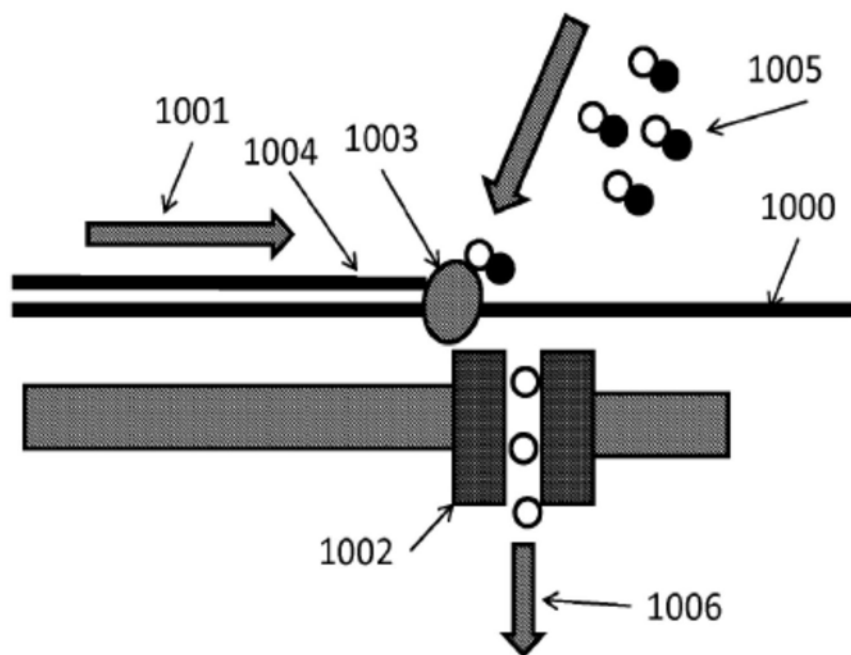


图10

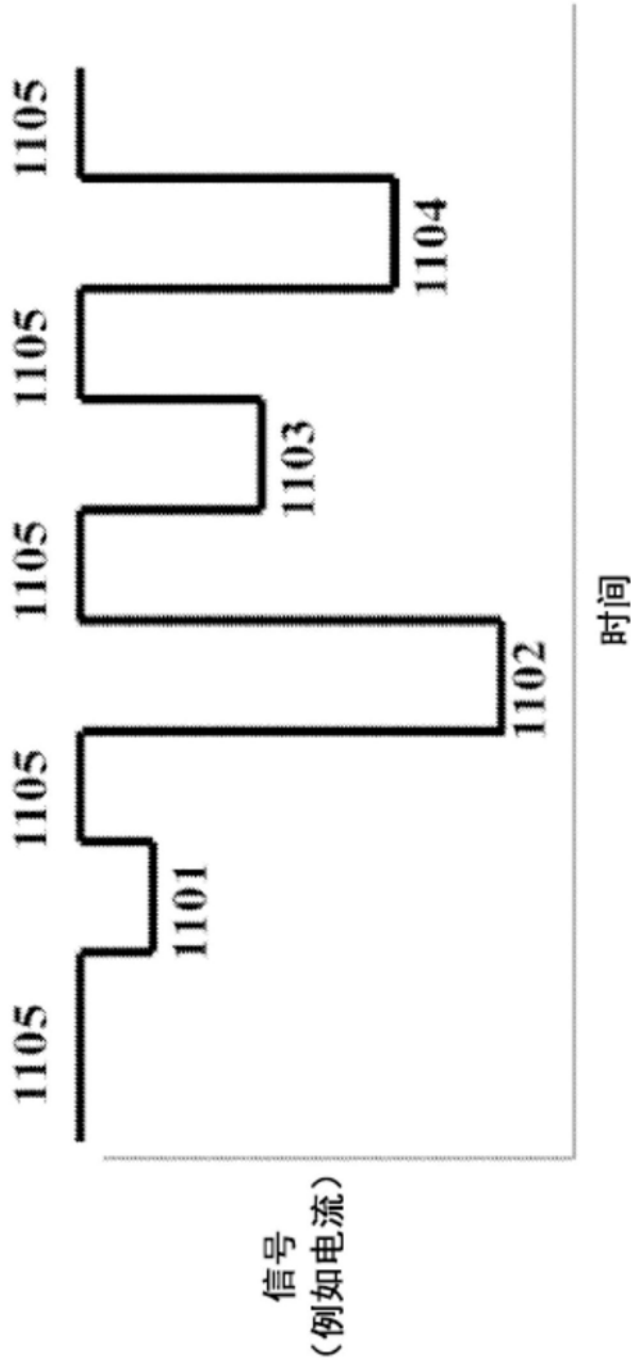


图11

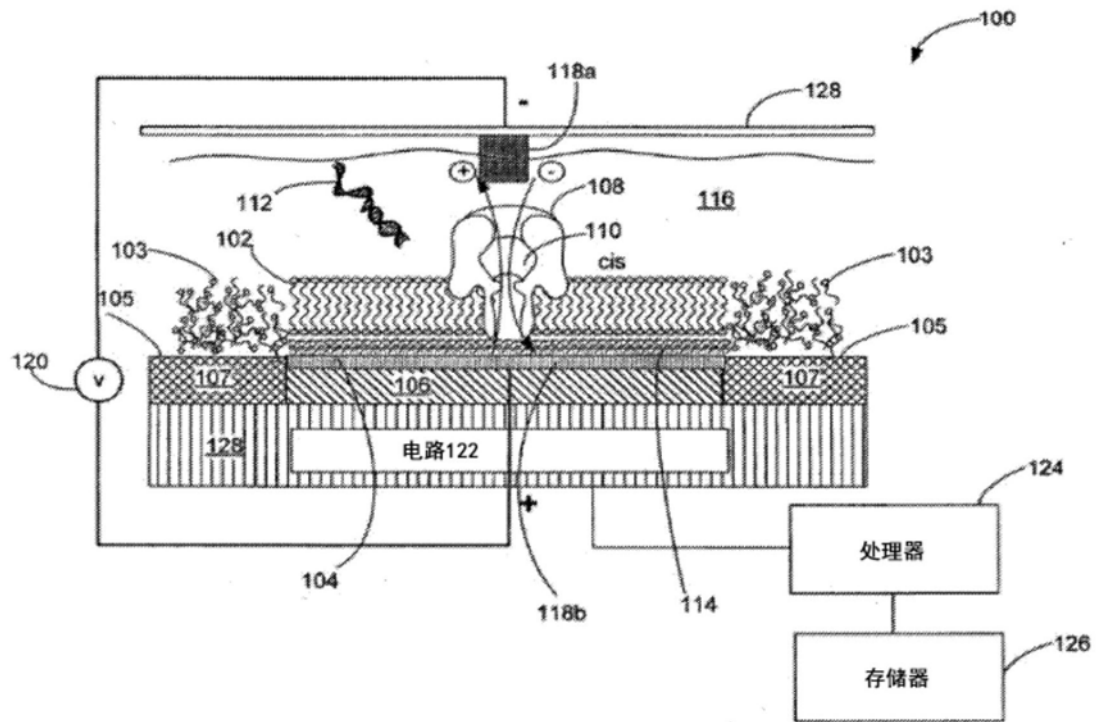


图12

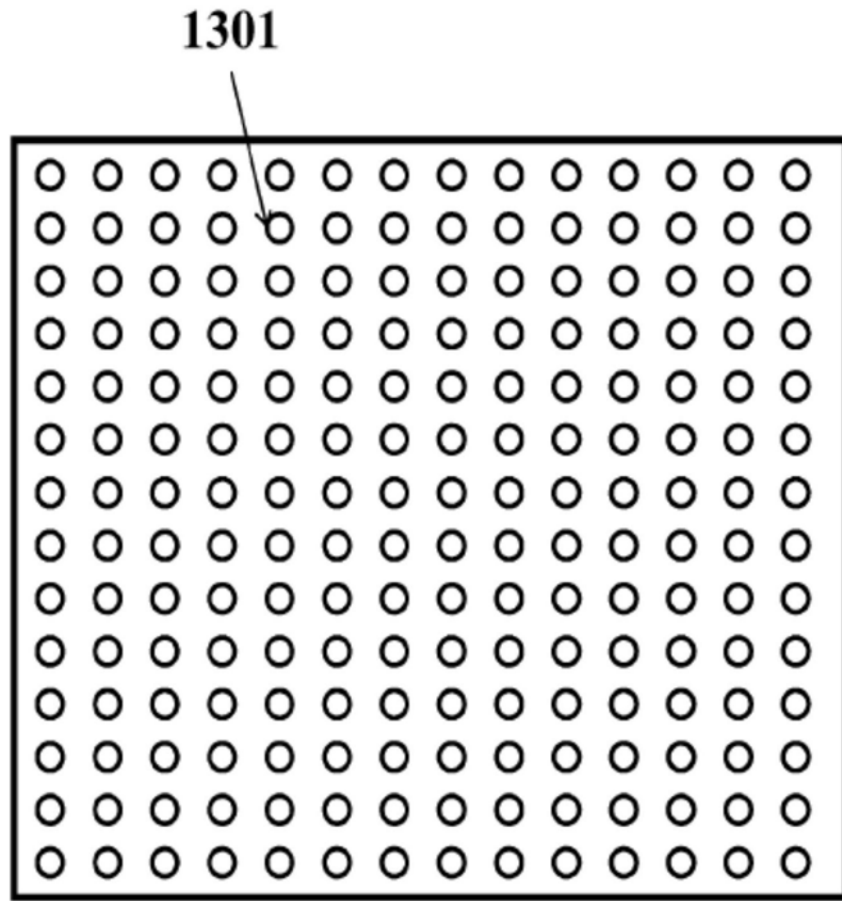


图13

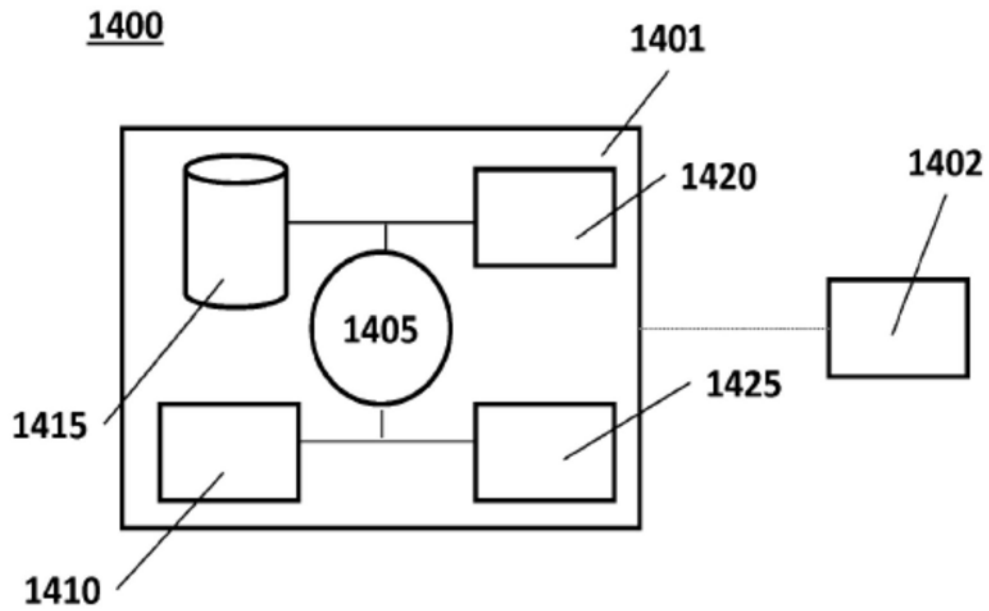


图14

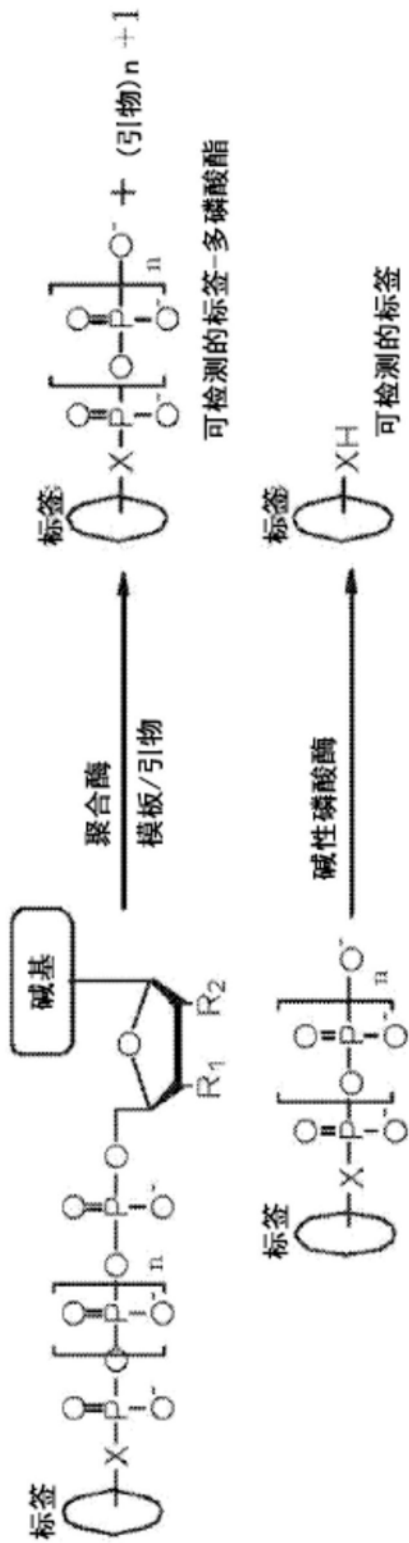


图15

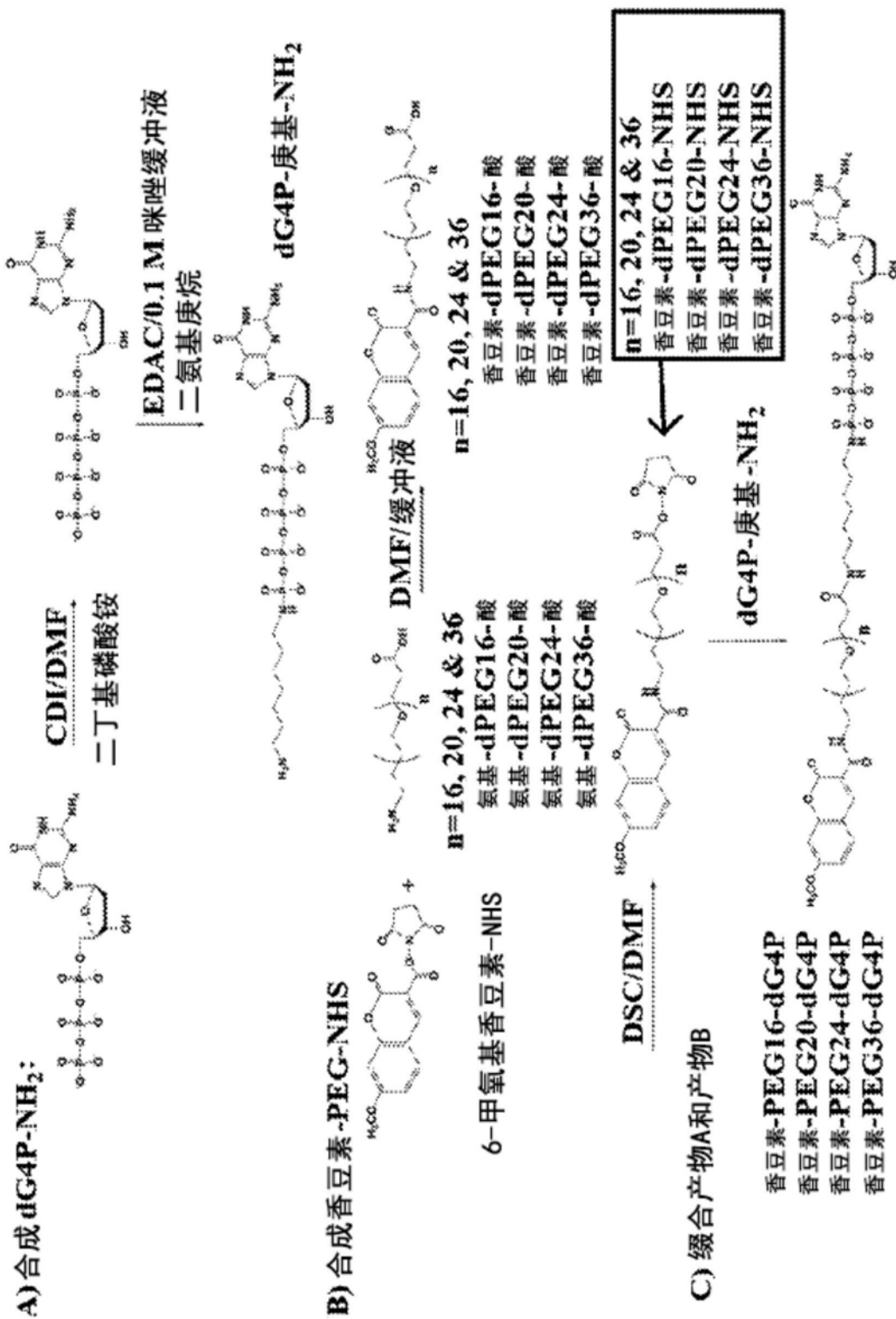


图16

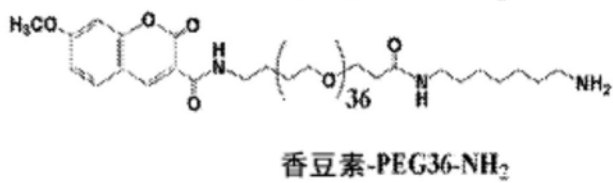
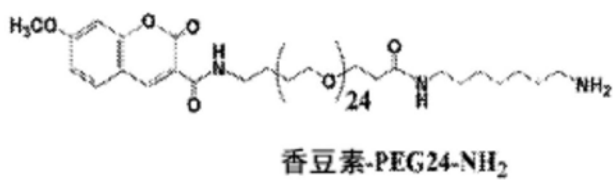
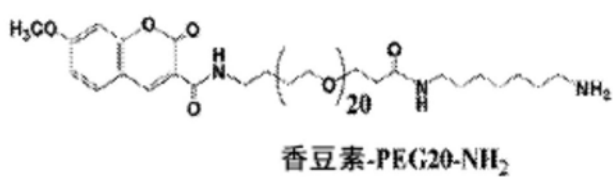
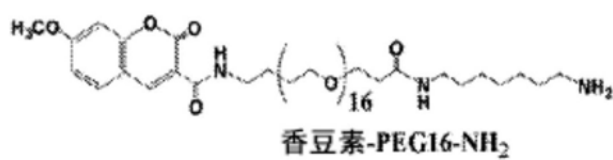
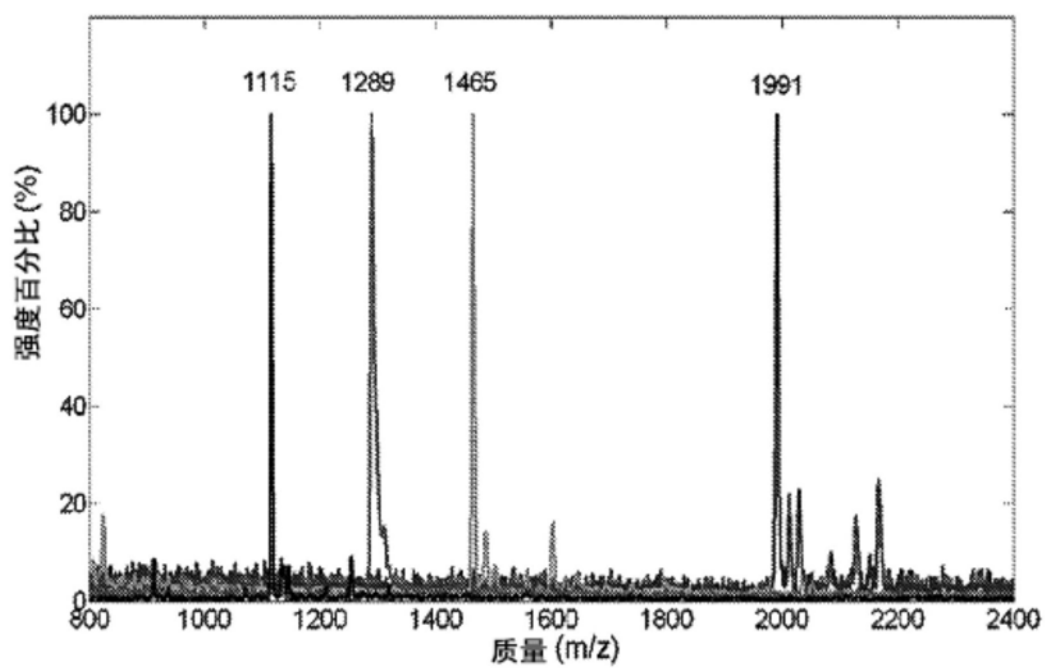


图17

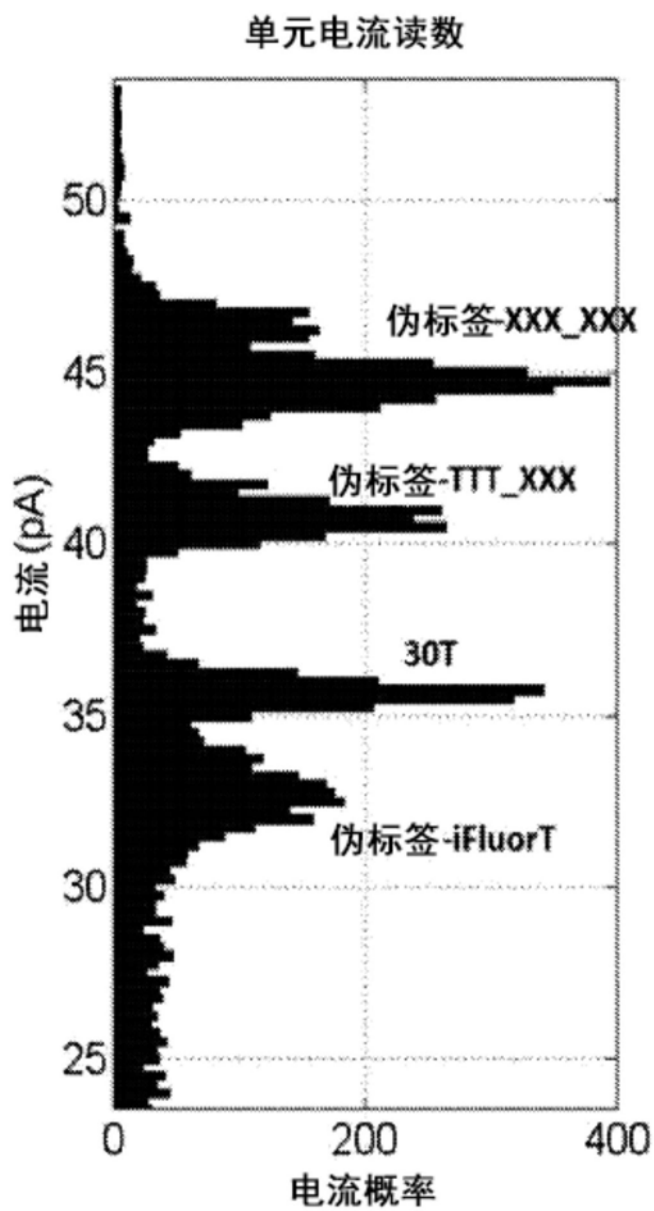


图18

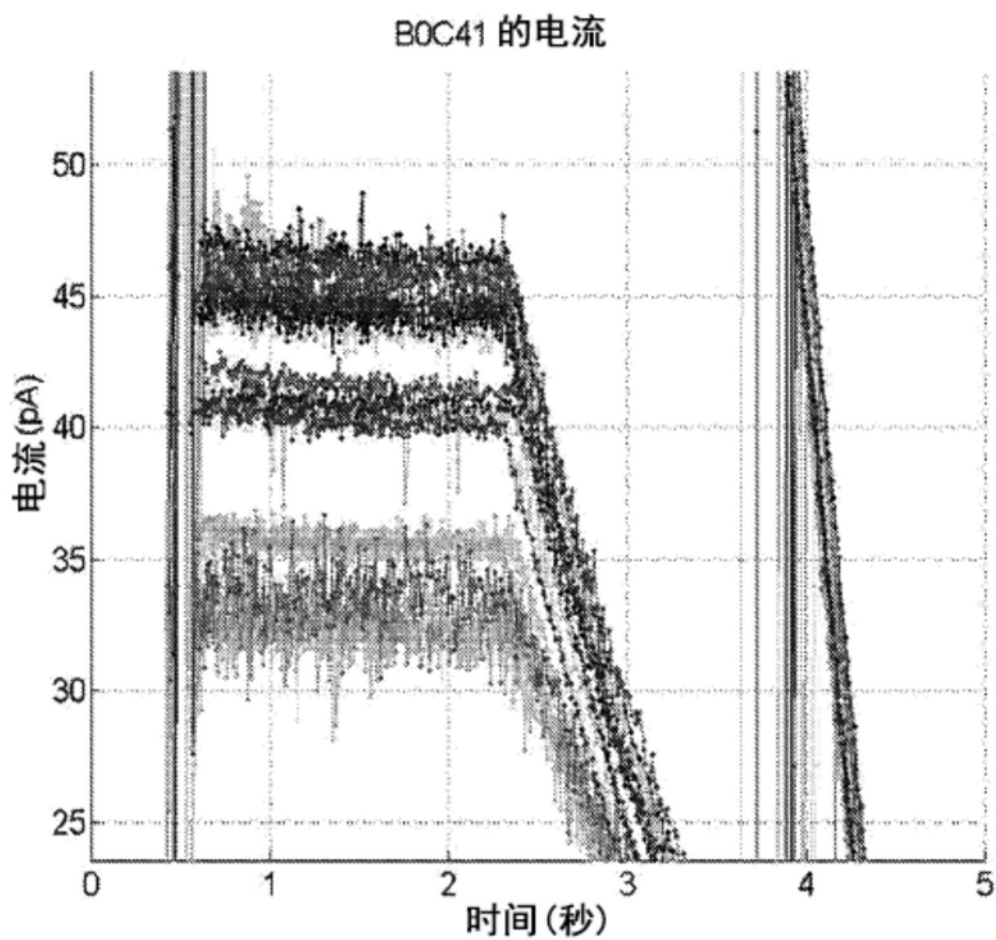


图19

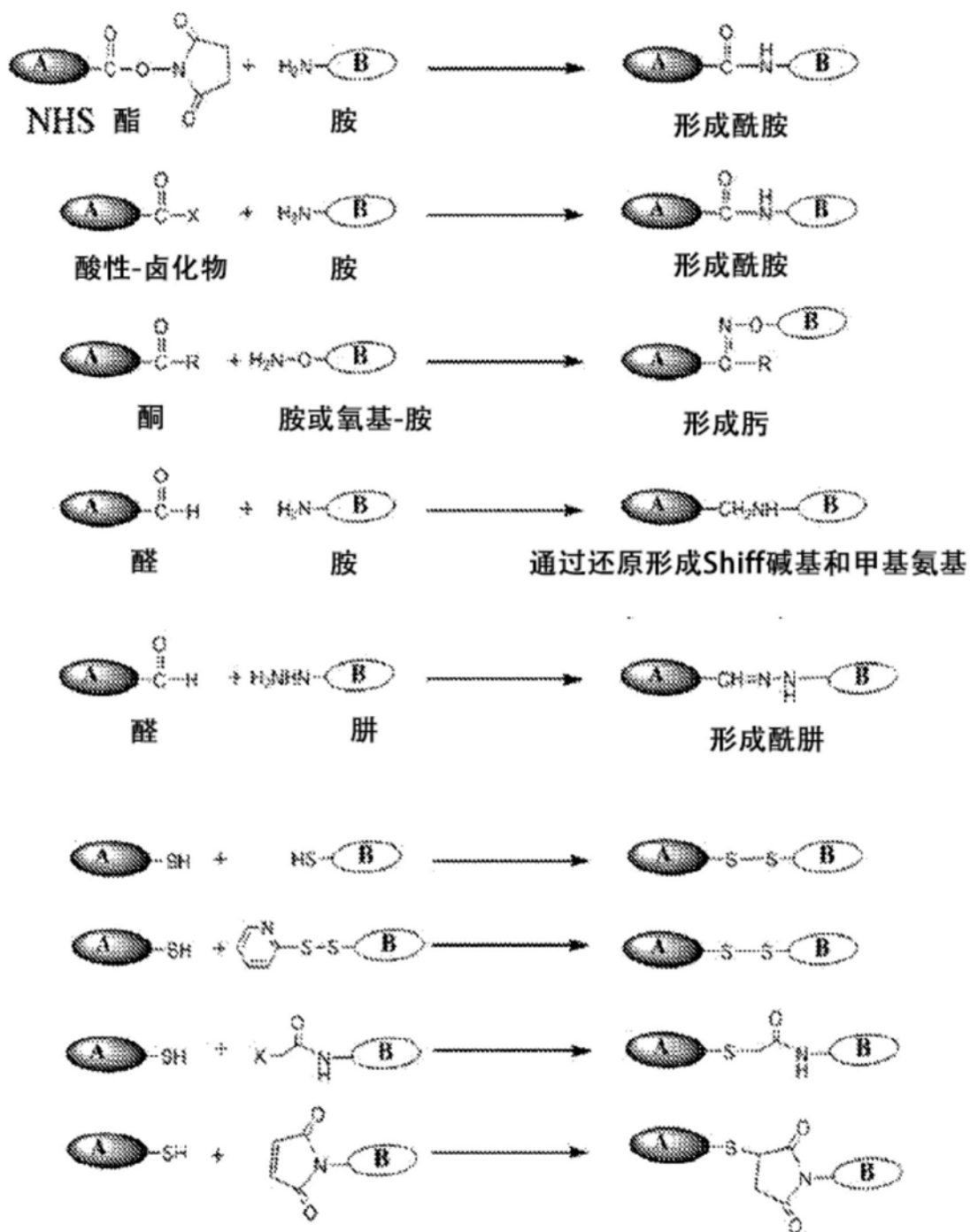


图20

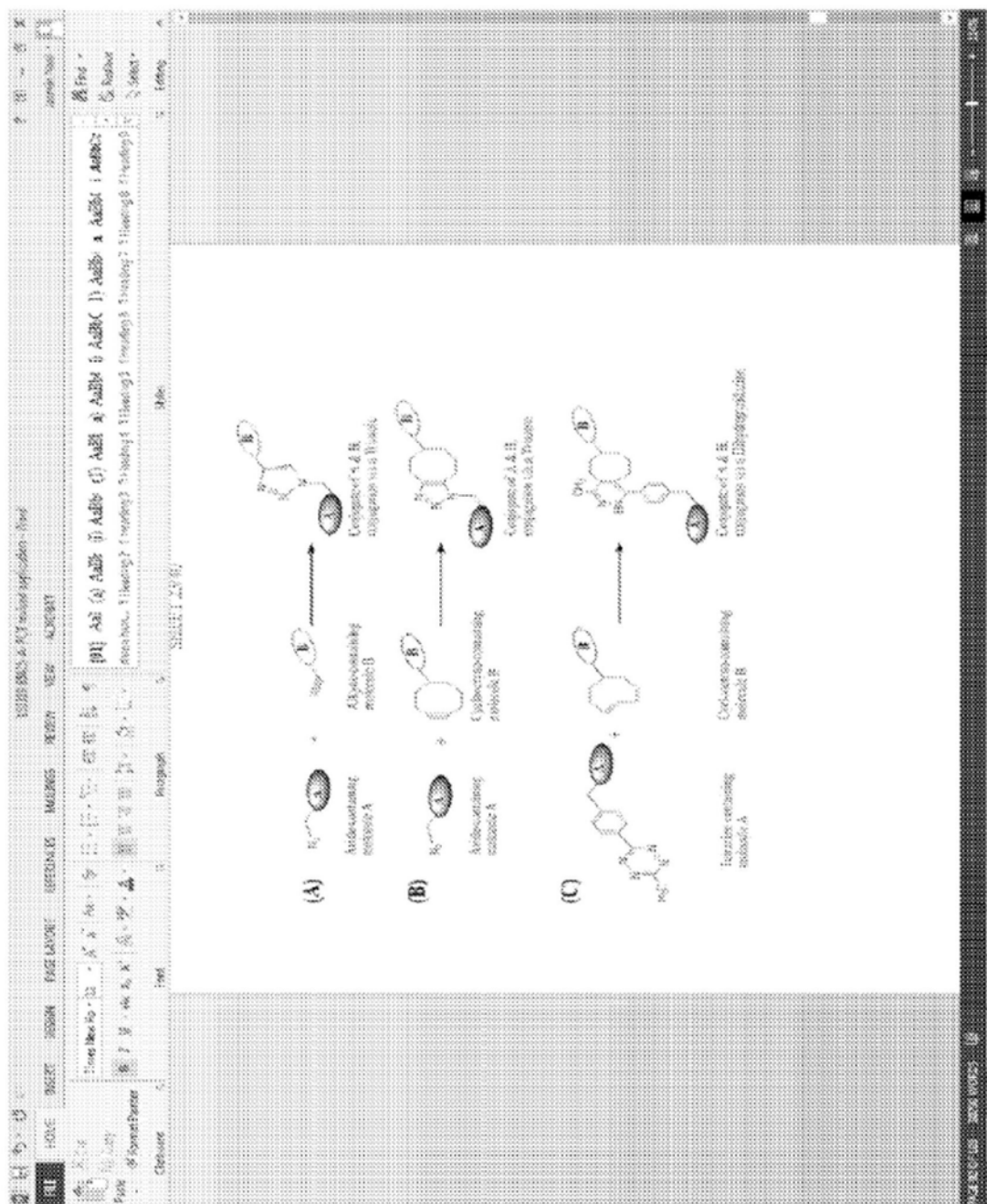


图21

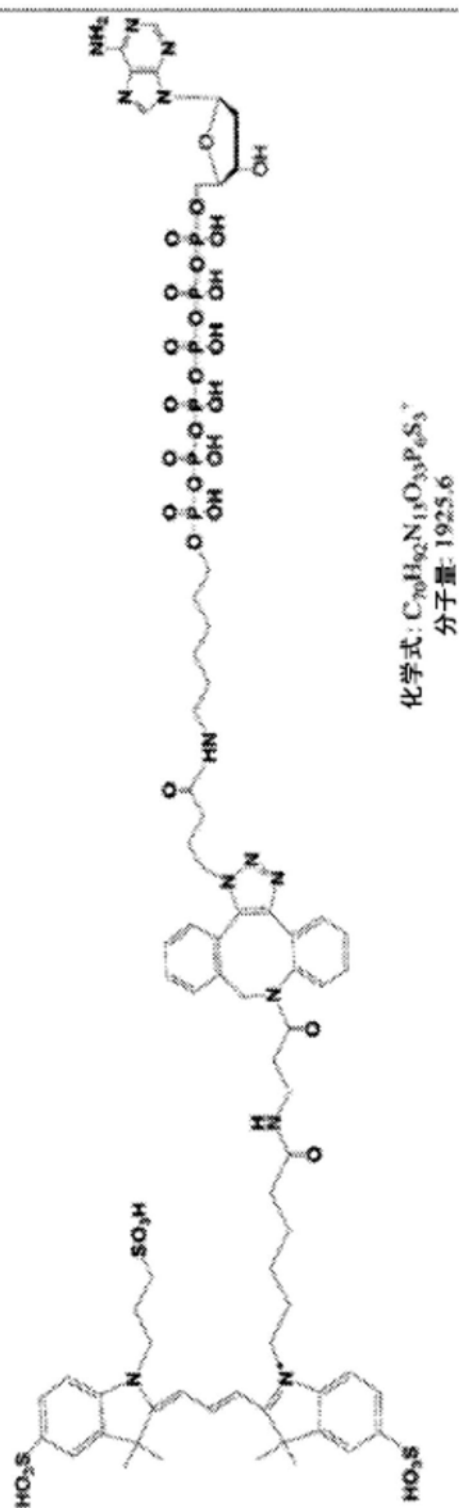


图22

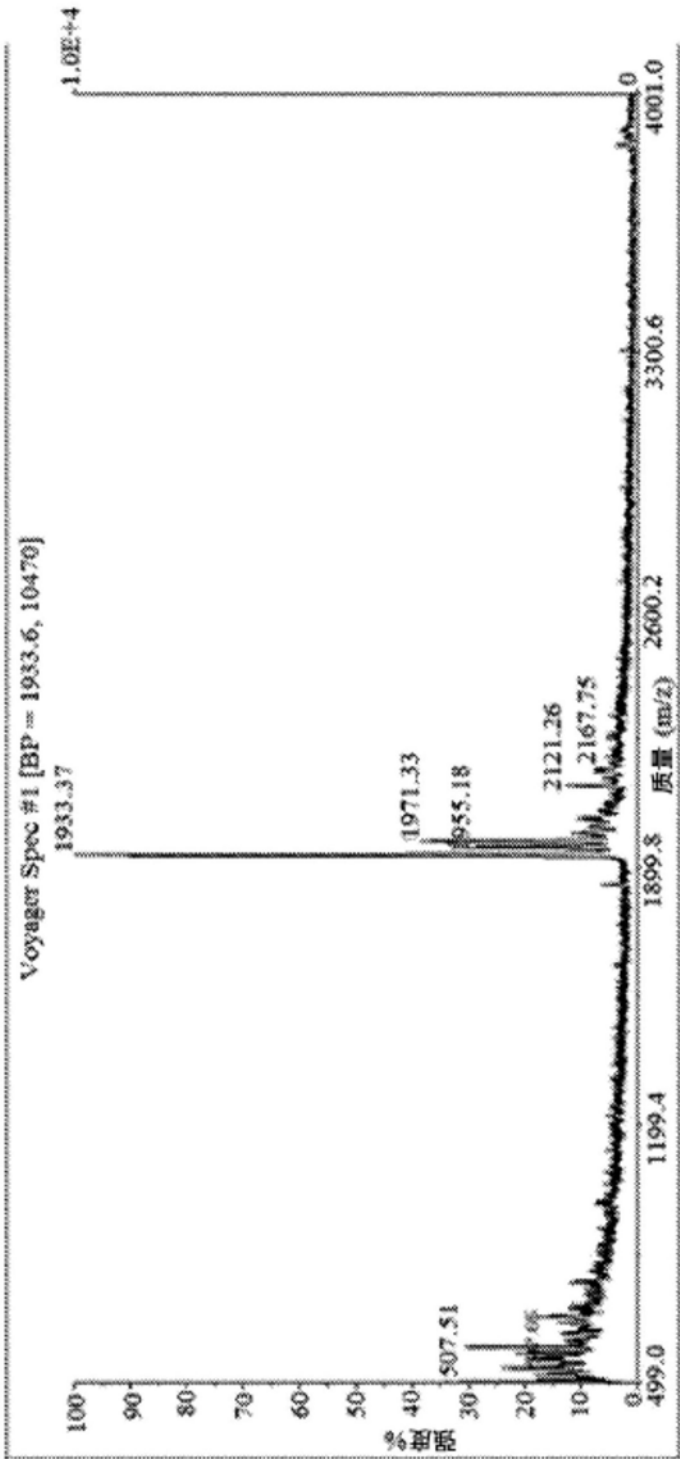


图23

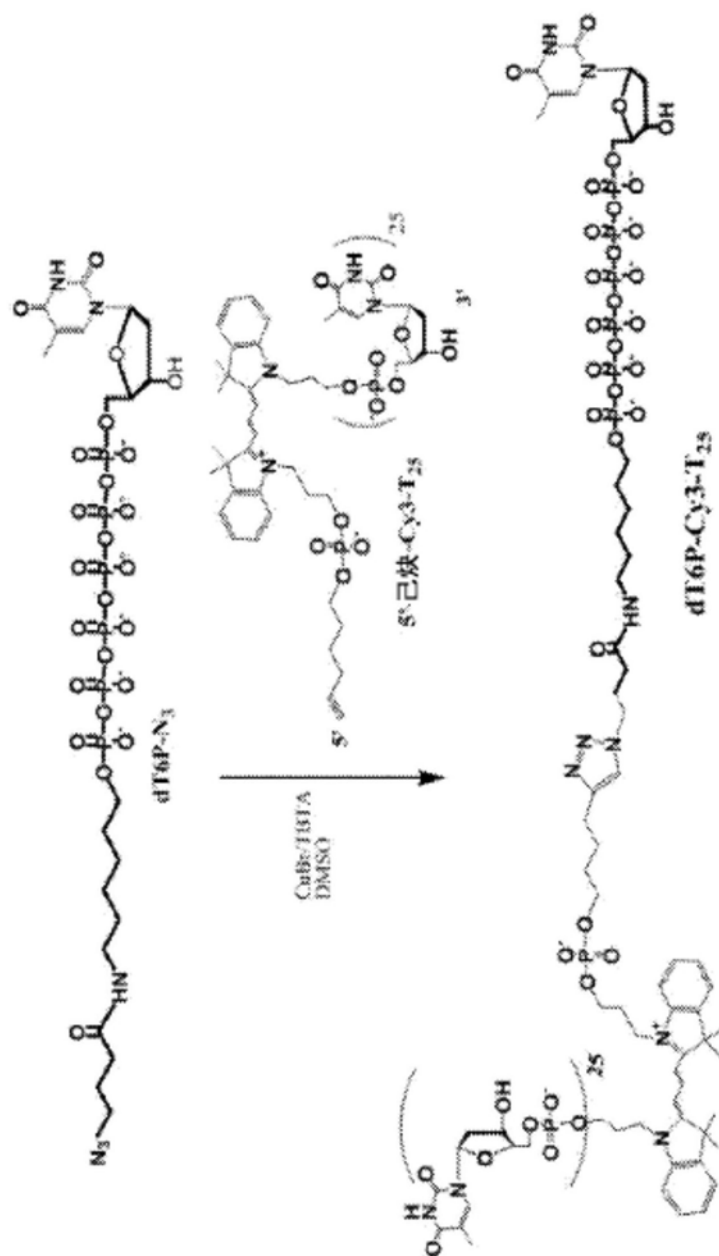


图24

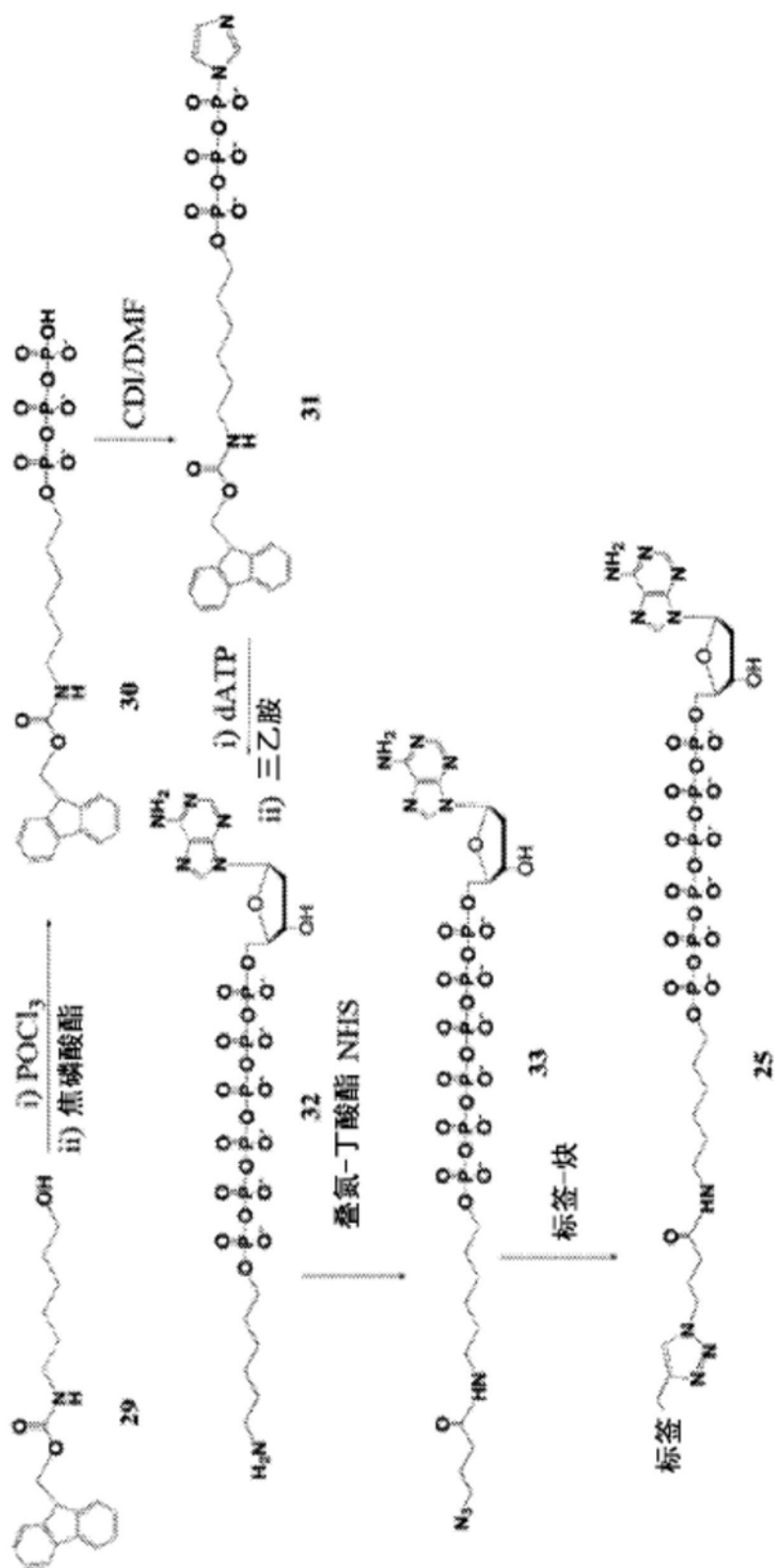


图25

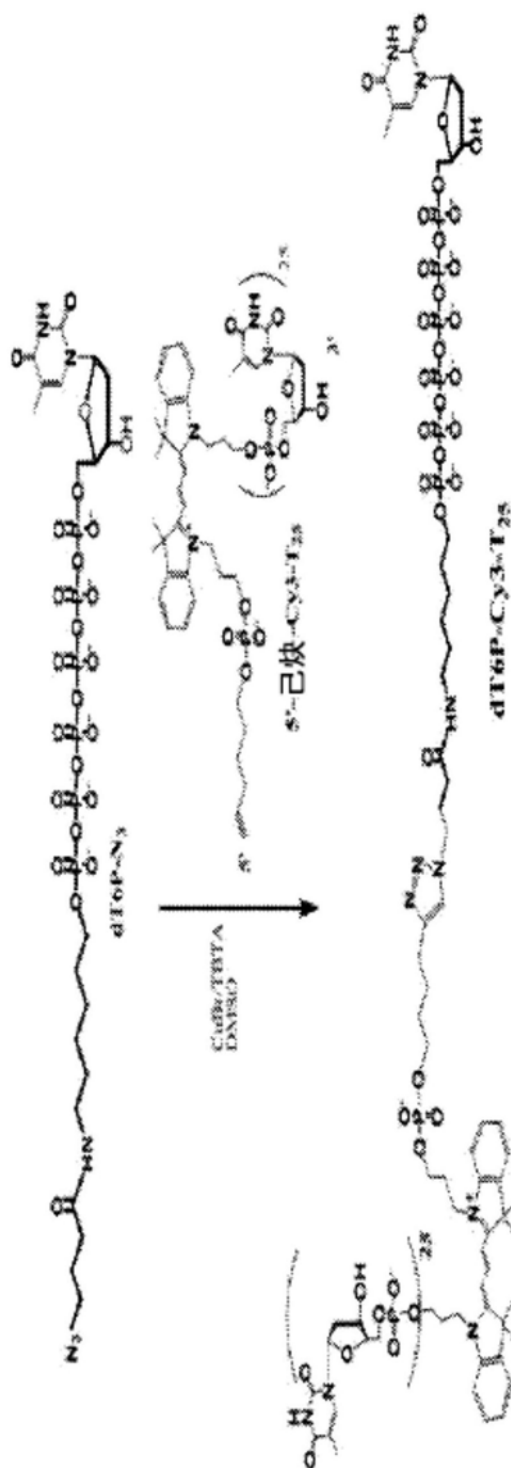


图26

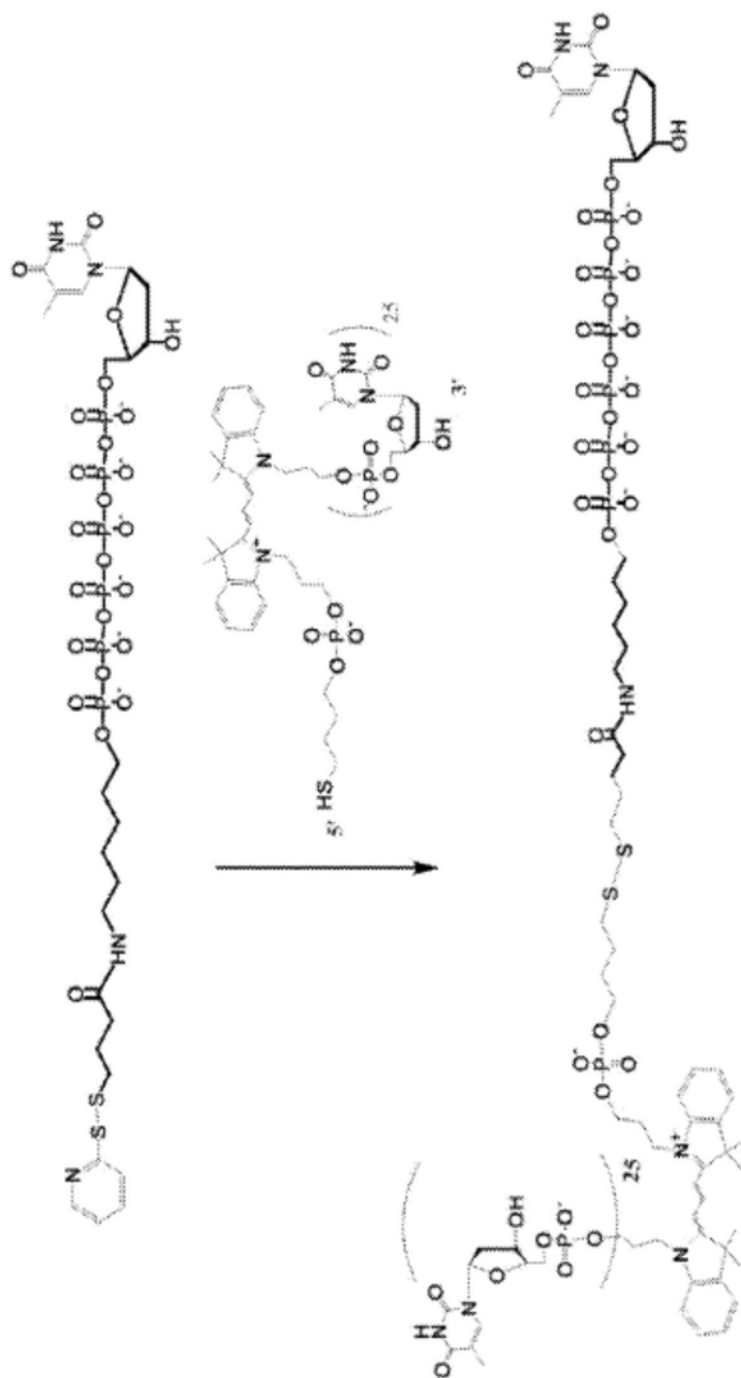


图27

dT6P-Cy3-T₂₅的质谱和延伸反应

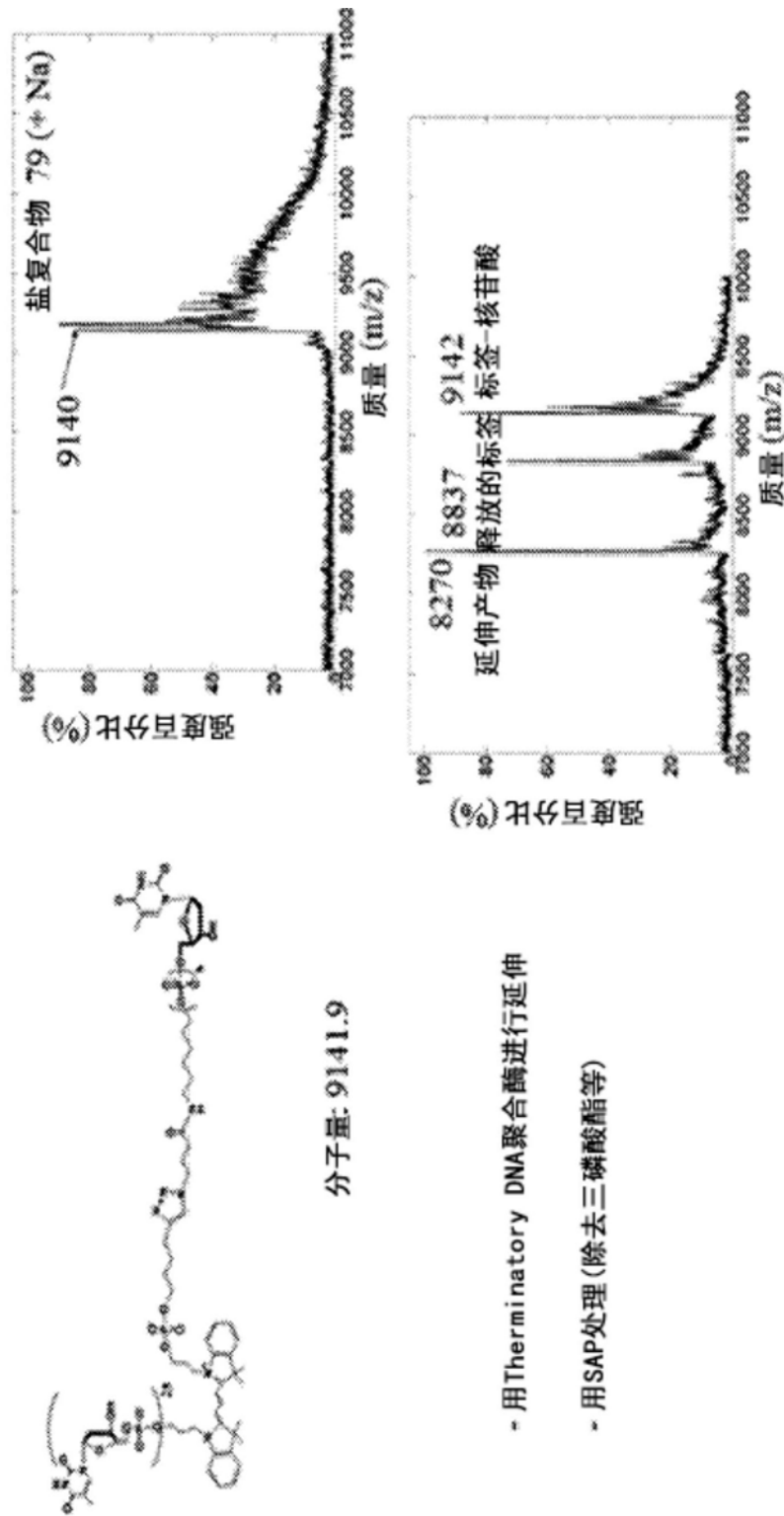


图28

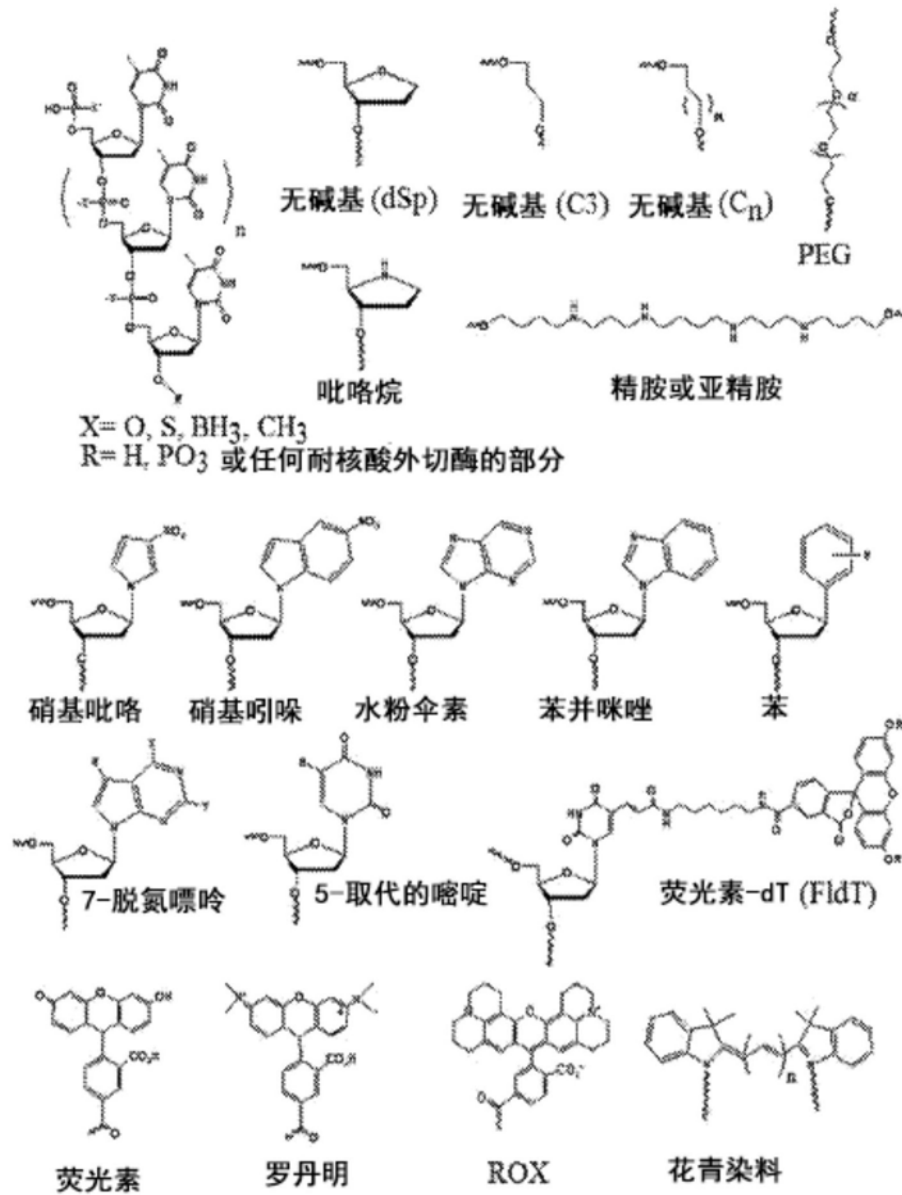


图29

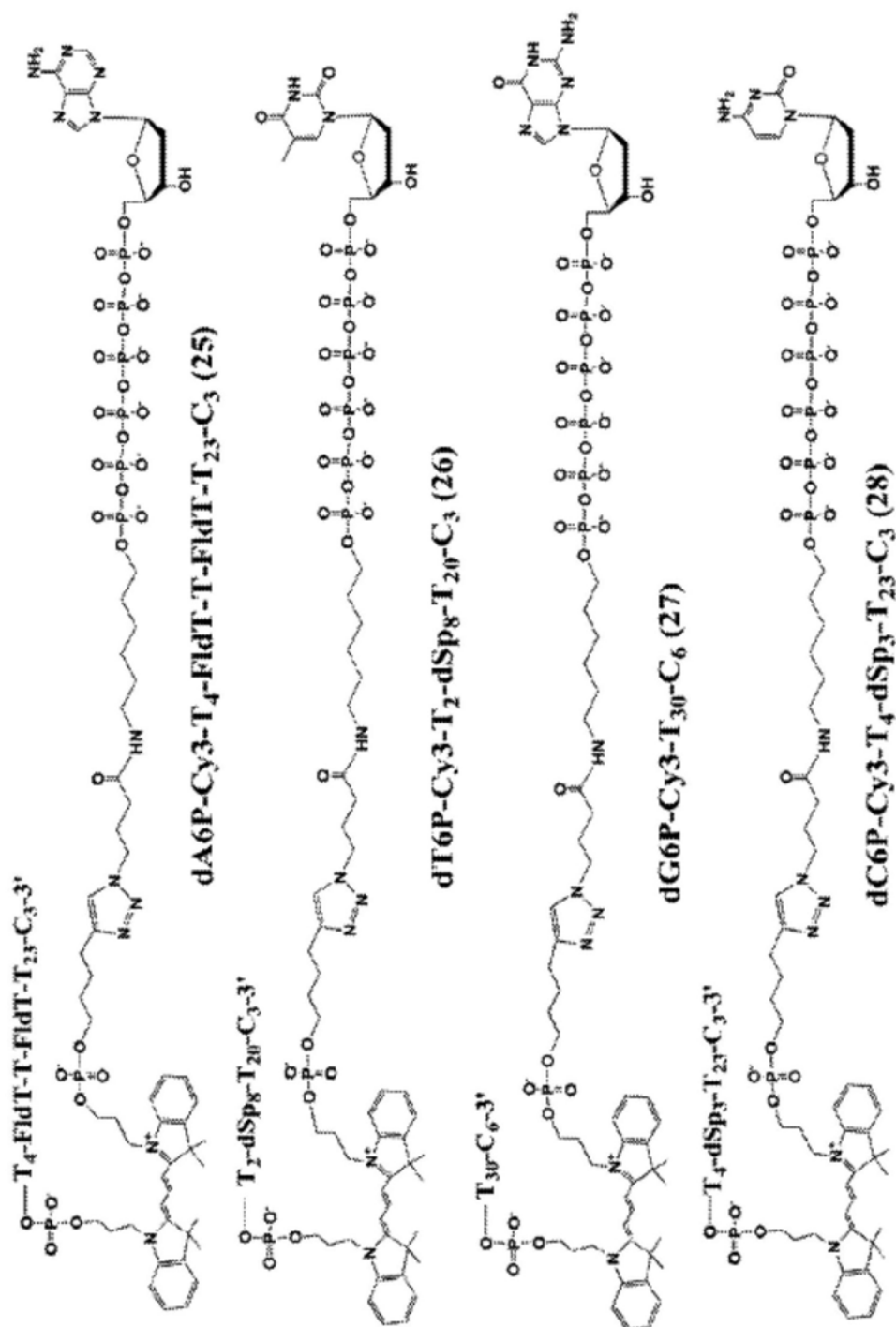


图30

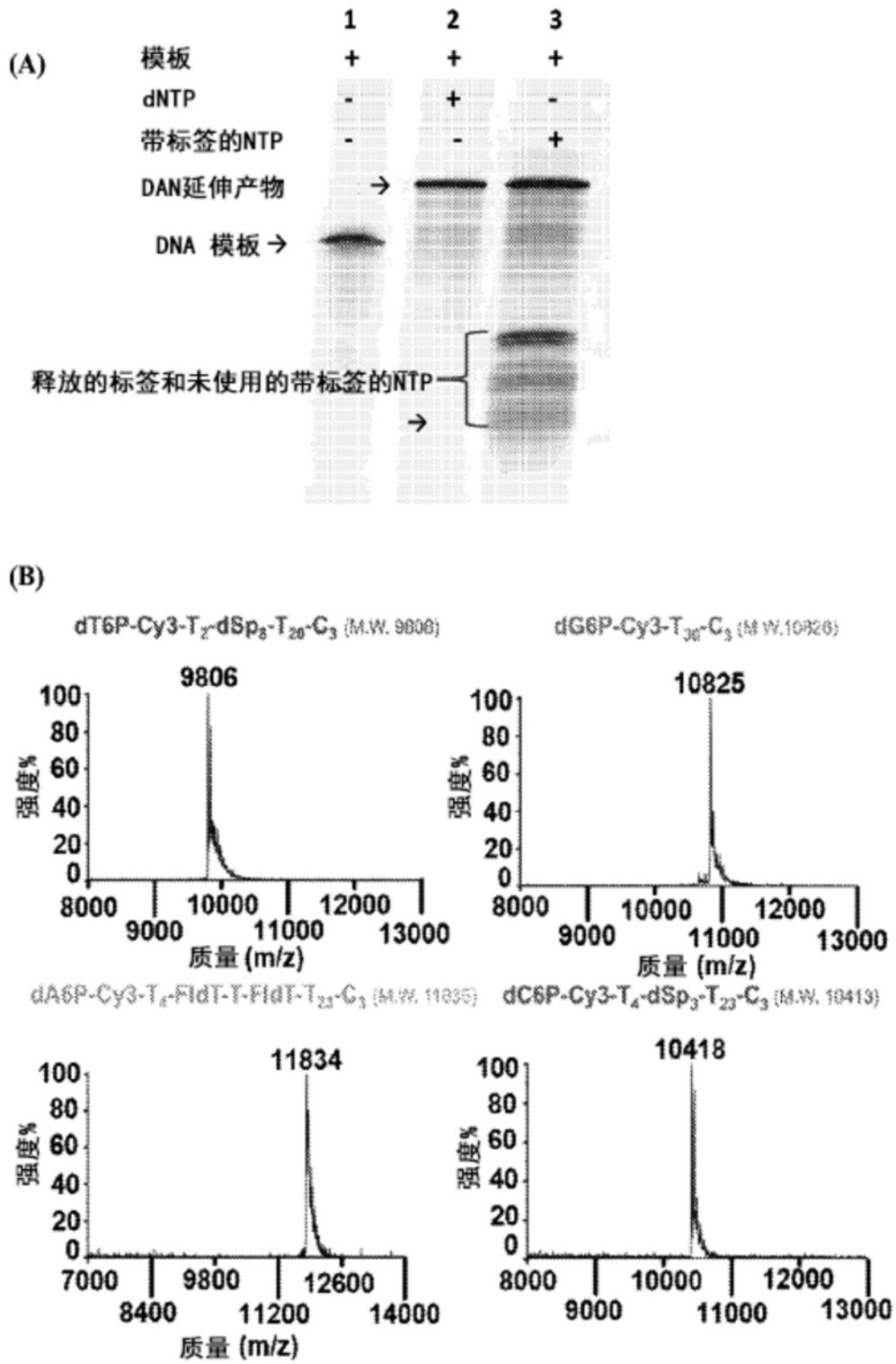


图31

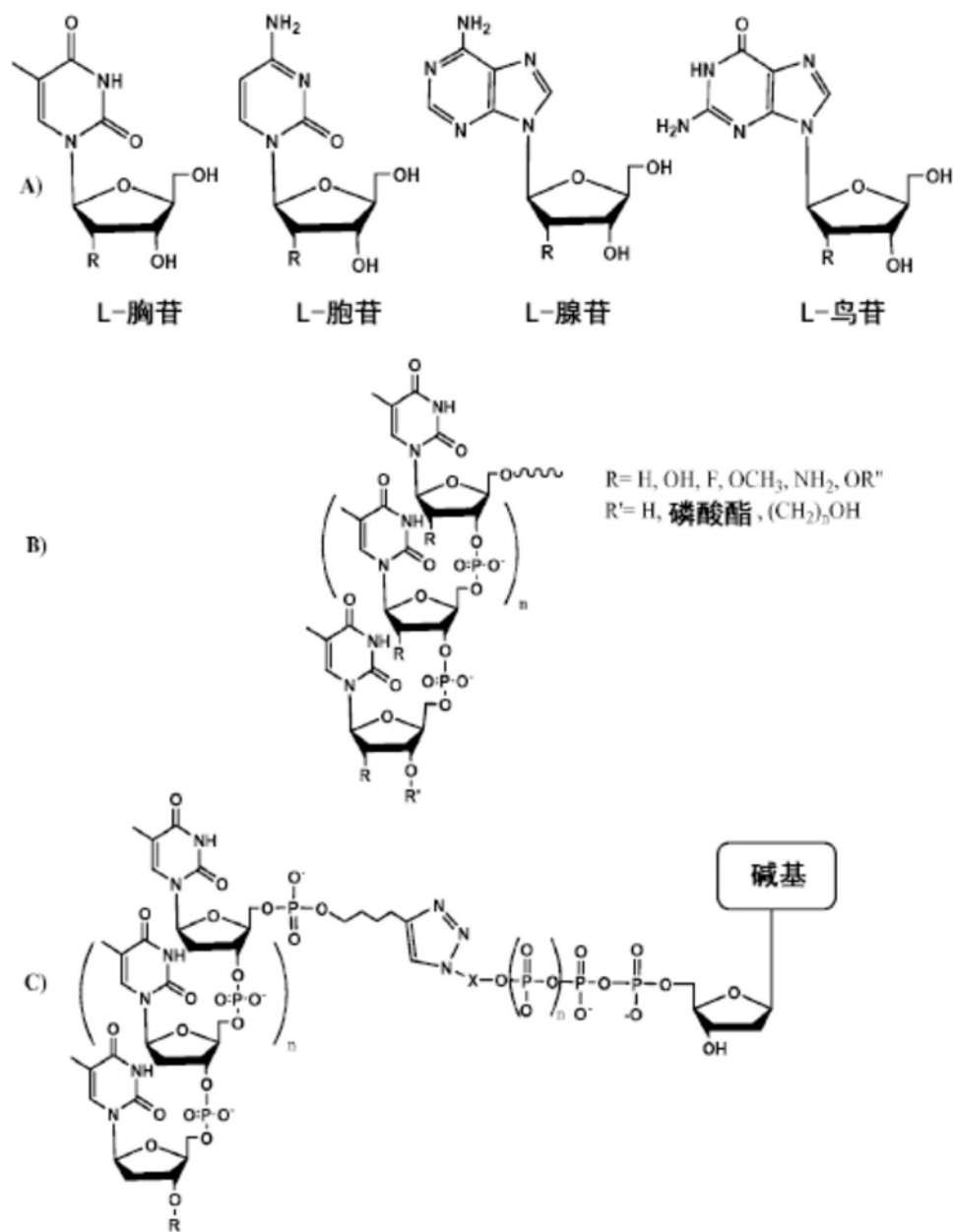
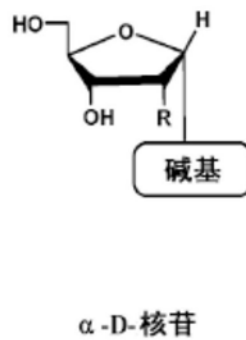
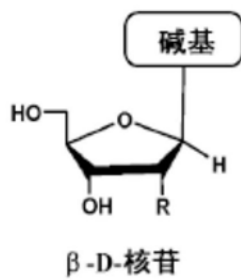


图32

(A)



(B)

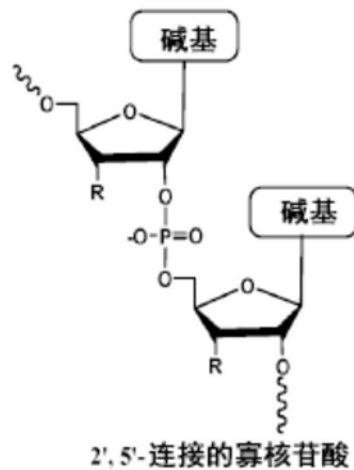
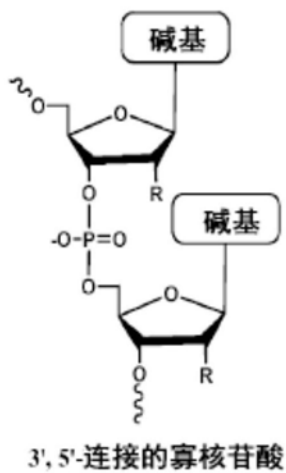


图33

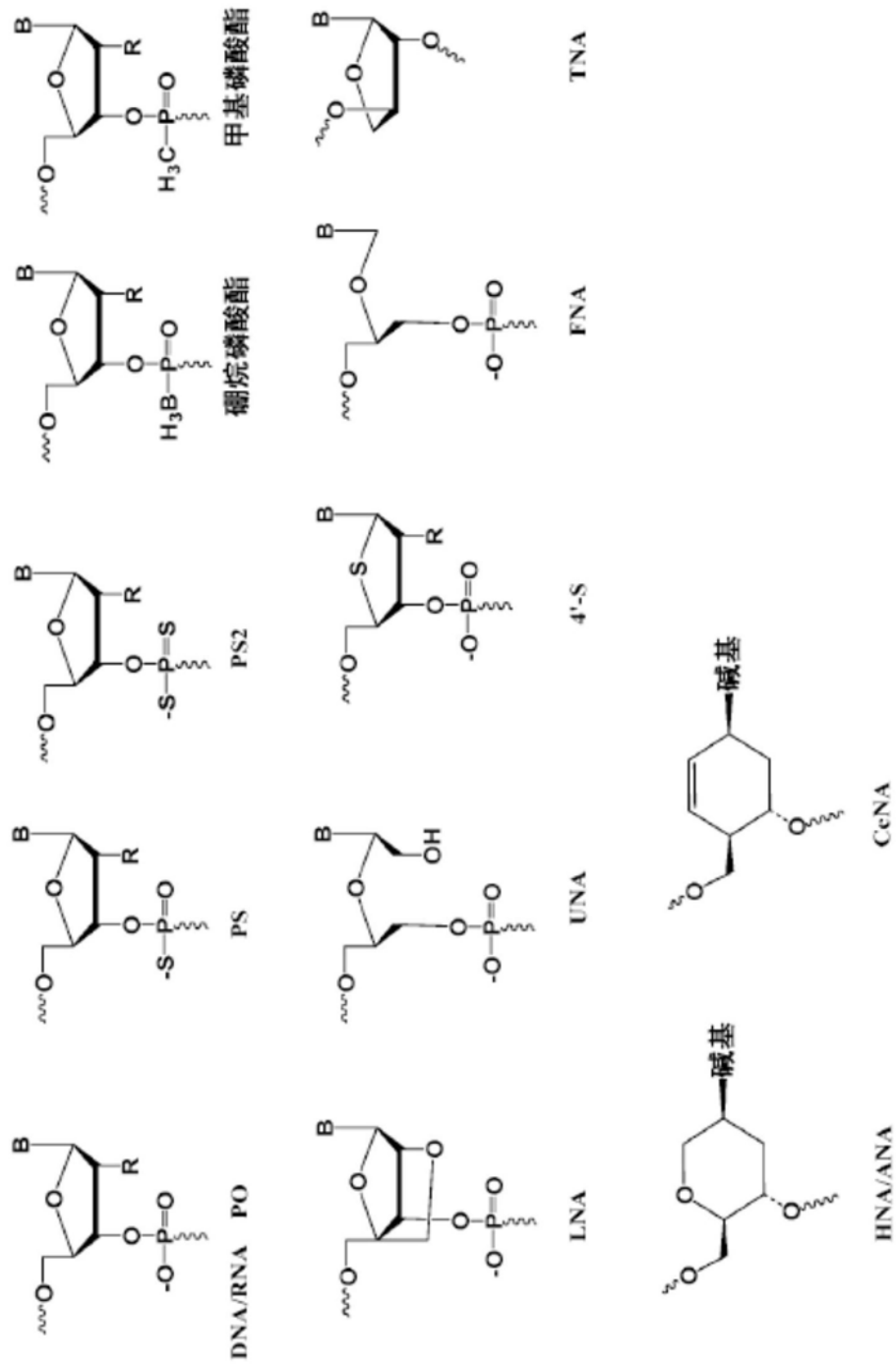


图34

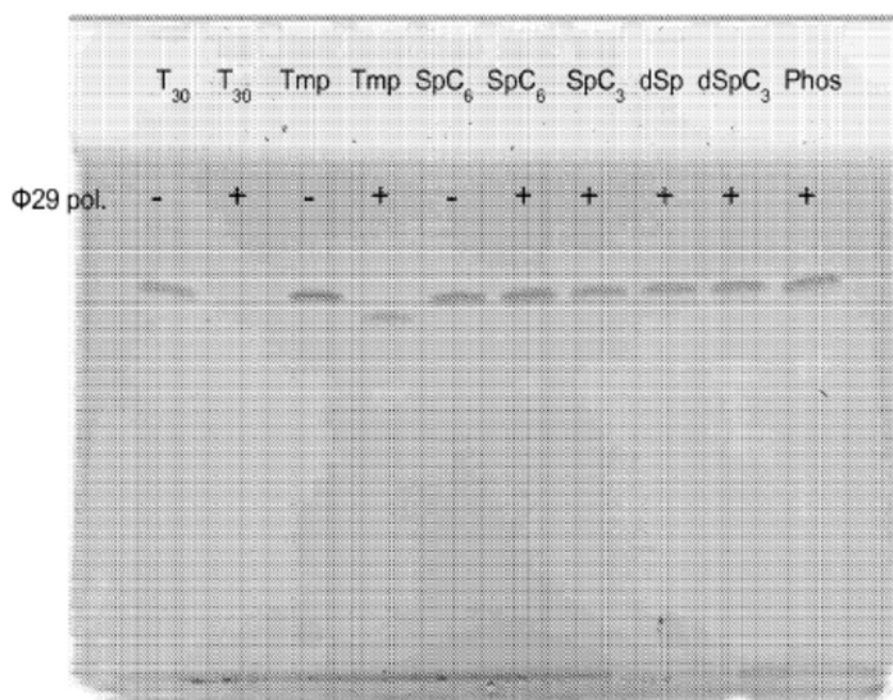
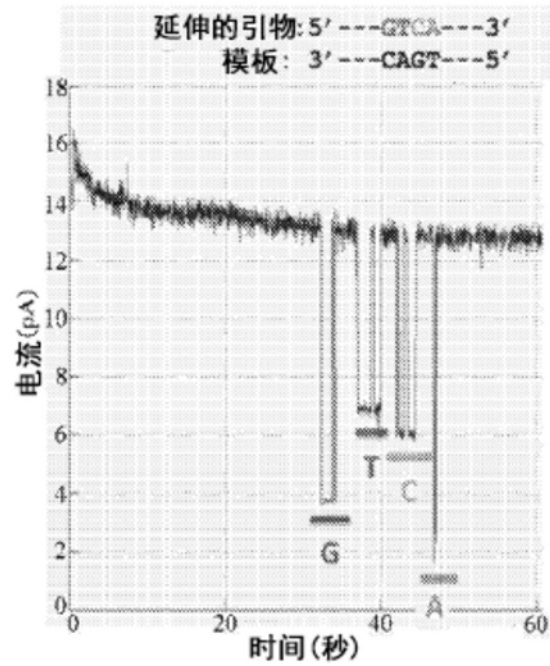


图35

(A)

使用4种不同的纳米标签核苷酸 (dT-标签1、dc-标签2、dG-标签3、dA-标签4)
时的单分子电SBS数据



(B)

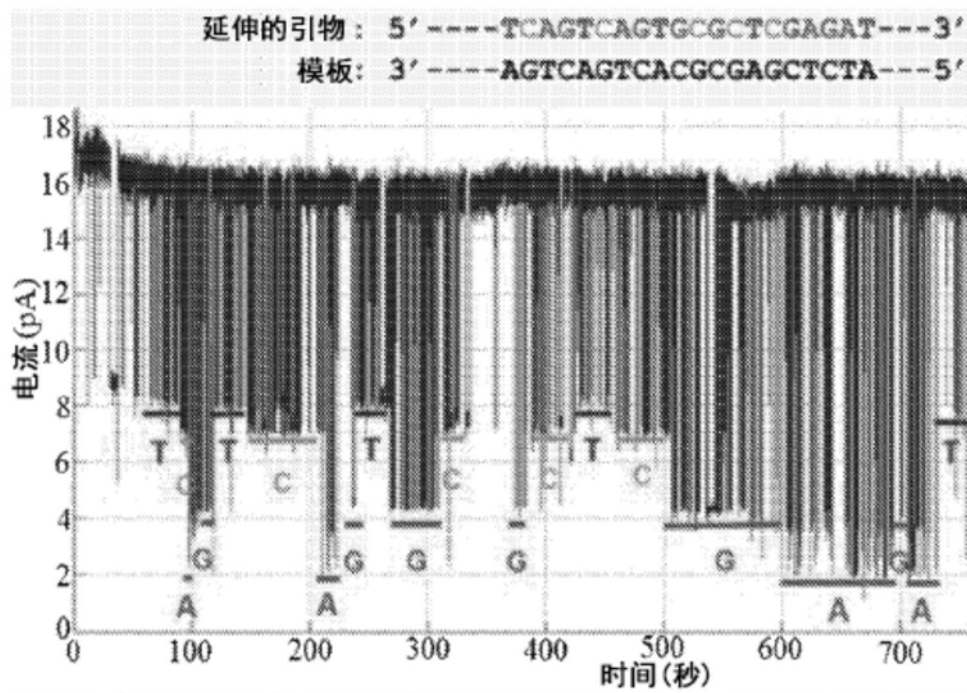


图36

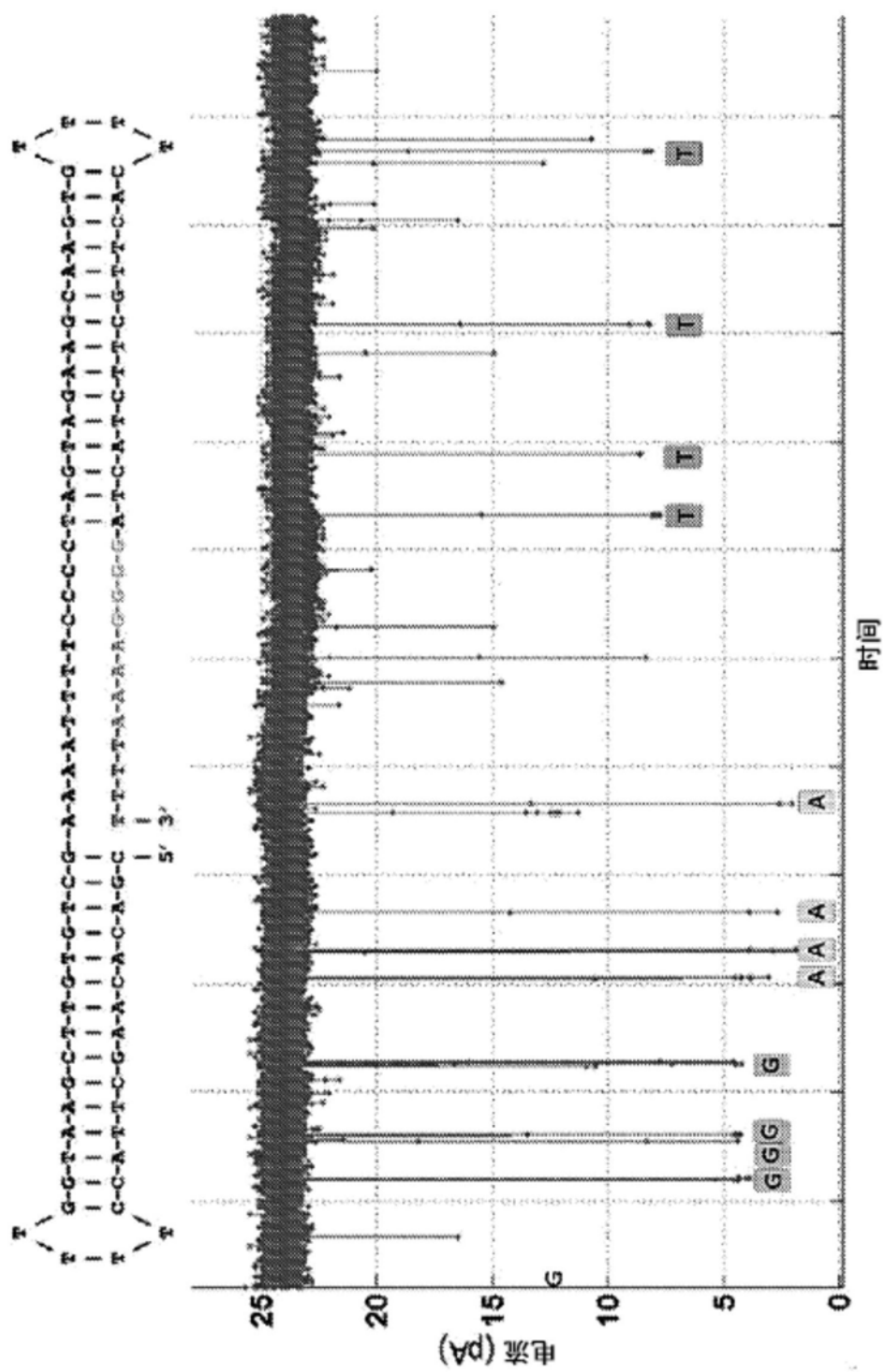


图37

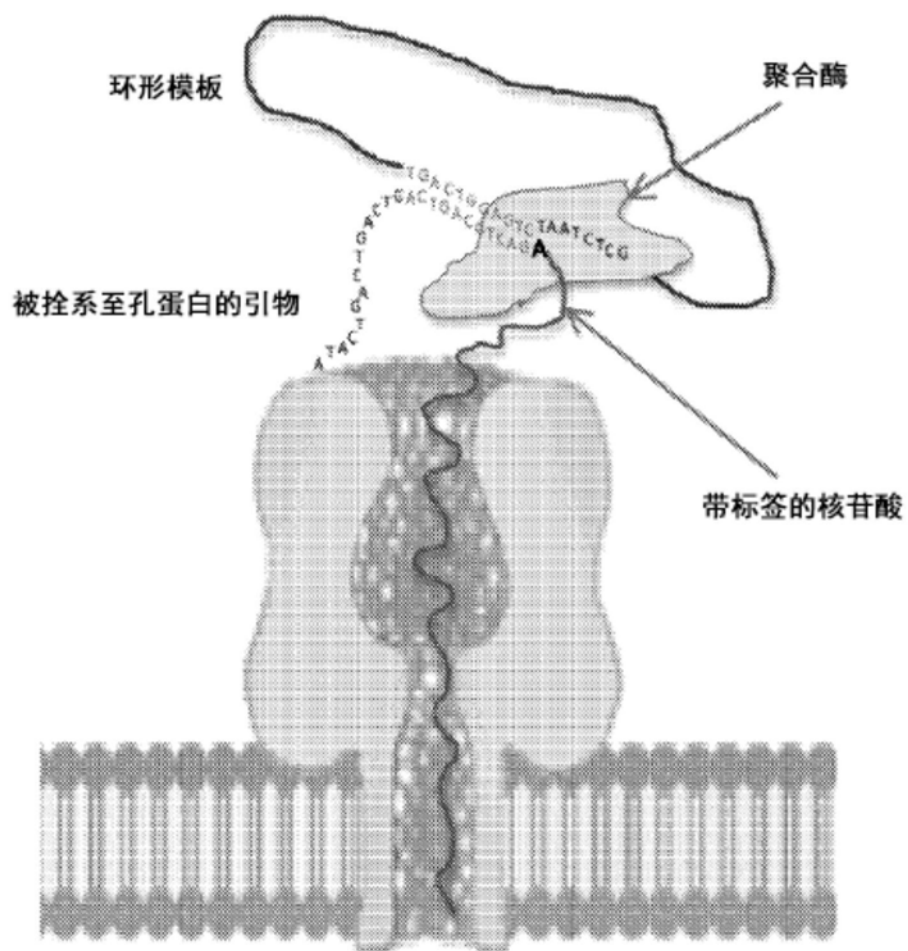


图38