

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680027521.X

[43] 公开日 2008年8月20日

[11] 公开号 CN 101248189A

[22] 申请日 2006.5.26

[21] 申请号 200680027521.X

[30] 优先权

[32] 2005. 5. 26 [33] US [31] 60/685,047

[32] 2005. 7. 21 [33] US [31] 60/701,165

[32] 2005. 8. 31 [33] US [31] 60/713,038

[32] 2005. 10. 7 [33] US [31] 60/724,743

[32] 2006. 1. 13 [33] US [31] 60/758,837

[32] 2006. 3. 27 [33] US [31] 60/786,247

[86] 国际申请 PCT/US2006/020834 2006.5.26

[87] 国际公布 WO2006/128138 英 2006.11.30

[85] 进入国家阶段日期 2008.1.28

[71] 申请人 通信探索公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 詹姆斯·M·库尔

安德鲁·M·斯登

劳伦斯·A·哈夫

芭芭拉·S·福克斯 黄玉梅

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限  
责任公司

代理人 肖善强

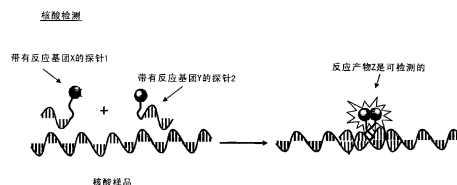
权利要求书9页 说明书65页 序列表20页  
附图38页

[54] 发明名称

通过核酸模板化学生物检测的相关应用

[57] 摘要

本发明提供了用于检测生物靶标(例如核酸和蛋白质)的组合物和方法,所述方法通过核酸模板化学,例如通过产生荧光、化学发光和/或发色信号来实现。



1. 用于检测核苷酸序列的方法，所述方法包括：

(a) 提供(1)第一探针，其包含(i)第一核苷酸序列和(ii)与所述第一寡核苷酸序列连接的第一反应基团，和(2)第二探针，其包含(i)第二寡核苷酸序列和(ii)与所述第二寡核苷酸序列连接的第二反应基团，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列与靶标核苷酸的两个分离区域互补；

(b) 将所述第一探针和所述第二探针与用于测试所述靶标核苷酸序列存在的样品在下述条件下结合，所述条件是这样的：如果所述靶标核苷酸序列存在于样品中，则所述条件下所述第一探针和所述第二探针与靶标核苷酸序列上它们各自的互补区杂交，从而所述第一反应基团和所述第二反应基团开始反应性接近；和

(c)检测所述第一反应基团和所述第二反应基团之间的反应，从而测定靶标核苷酸序列的存在。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团的反应产物包含荧光或发色部分。

3. 权利要求 2 所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团的反应产物包含荧光部分。

4. 权利要求 3 所述的方法，其中所述荧光部分选自由花青染料、半花青染料和香豆素染料组成的组。

5. 权利要求 3 所述的方法，其中所述荧光部分是聚甲炔染料。

6. 权利要求 1 所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应基团的反应是通过将所述第一反应基团和所述第二反应基团化学偶联完成的。

7. 权利要求 2 所述的方法，其中所述荧光或发色部分与所述第一探针和所述第二探针之一或二者共价连接。

8. 权利要求 2 所述的方法，其中所述荧光或发色部分不与所述第一探针或所述第二探针共价连接。

9. 权利要求 1 所述的方法，其中所述第一反应基团和所述第二反应

基团的反应导致辅酶因子的释放。

10. 用于检测靶标核苷酸序列的方法，所述方法包括：

(a) 提供一组探针对，每个探针对包含(1)第一探针，其包含(i)第一核苷酸序列和(ii)与所述第一寡核苷酸序列连接的第一反应基团，和(2)第二探针，其包含(i)第二寡核苷酸序列和(ii)与所述第二寡核苷酸序列连接的相应第二反应基团，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列与靶标核苷酸的两个分离区域互补；

(b) 将所述探针对组与用于测试靶标核苷酸序列存在的样品在下述条件下结合，所述条件是这样的：如果靶标核苷酸序列存在于样品中，则所述条件下所述探针对的每个所述第一探针和所述第二探针与靶标核苷酸序列上它们各自的互补区杂交，从而相应的所述第一反应基团和所述第二反应基团对开始反应性接近；和

(c)检测所述第一反应基团和相应的所述第二反应基团对之间的一个或多个反应，从而测定靶标核苷酸序列的存在。

11. 权利要求 10 所述的方法，其中所述探针对的数量在 2 和 10,000 之间。

12. 权利要求 10 所述的方法，其中所述探针对的数量在 5 和 5,000 之间。

13. 权利要求 10 所述的方法，其中所述探针对的数量在 10 和 1,000 之间。

14. 权利要求 10 所述的方法，其中所述第一反应基团和相应的所述第二反应基团之间的反应对所有探针对来说都是相同的。

15. 权利要求 10 所述的方法，其中所述第一反应基团和相应的所述第二反应基团之间的反应不是对所有探针对来说都相同的。

16. 权利要求 10 所述的方法，其中所述探针对与所述靶标核苷酸序列的杂交是在基本相同的条件下同时发生的。

17. 用于进行核酸模板化学的方法，所述方法包括进行由单一模板核苷酸序列作为模板的多个核酸模板化学反应。

18. 权利要求 17 所述的方法，其中所述多个核酸模板化学反应在基

本相似的情况下发生。

19. 权利要求 17 所述的方法，其中所述多个核酸模板化学反应基本同时发生。

20. 权利要求 17 的方法，其中所述多个核酸模板化学反应是相同的反应。

21. 权利要求 17 的方法，其中所述多个核酸模板化学反应不是相同的反应。

22. 用于检测生物学靶标的方法，所述方法包括：

(a) 提供第一探针，所述第一探针包含(1)对生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团；

(b) 提供第二探针，所述第二探针包含(1)对生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团，其中所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的；

(c) 将所述第一探针与所述第二探针与用于测试生物学靶标存在的样品在下述条件下结合，所述条件下所述第一和第二结合部分与生物学靶标结合；

(d) 允许所述第二寡核苷酸与所述第一寡核苷酸杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近；和

(e) 检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定生物学靶标的存在。

23. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一探针还包含所述第一结合部分和所述第一寡核苷酸序列之间的第一接头。

24. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第二探针还包含所述第二结合部分和所述第二寡核苷酸序列之间的第二接头。

25. 权利要求 22 所述的方法，其中所述生物学靶标是蛋白质。

26. 权利要求 22 所述的方法，其中所述生物学靶标是自身抗体。

27. 权利要求 22 所述的方法，其中所述生物学靶标是细胞。
28. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个是针对所述生物学靶标的抗体。
29. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分均为针对所述生物学靶标的抗体。
30. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个不是针对所述生物学靶标的抗体。
31. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个是与所述生物学靶标结合的适体。
32. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分均为与所述生物学靶标结合的适体。
33. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个是小分子结合物。
34. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分均为小分子结合物。
35. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列包含 6 到 30 个碱基的互补区。
36. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的反应产生荧光部分。
37. 权利要求 22 所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的反应产生化学发光部分或发色部分。
38. 权利要求 22 所述的方法，其中当所述样品中不含所述生物学靶标时，所述第一和第二反应基团之间基本不发生可检测的反应。
39. 用于检测生物学靶标的方法，所述方法包括：
- (a) 提供所述生物学靶标与第一探针的结合复合物，所述第一探针包含(1) 所述第一探针包含(1)对生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，(2) 第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团；
- (b) 将(a)的结合复合物与第二探针接触，所述第二探针包含(1)对生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述

第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团，其中所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的；

(c) 允许所述第二寡核苷酸与所述第一寡核苷酸杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近；和

(d) 检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定生物学靶标的存在。

40. 用于检测生物学靶标存在的方法，所述方法包括：

(a) 第一探针和第二探针与所述生物学靶标结合，其中

(1)所述第一探针包含(i) 对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，(ii)第一寡核苷酸序列，和(iii)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团和

(2) 所述第二探针包含(i)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(ii)第二寡核苷酸序列，和(iii)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团，其中所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团是反应性的；

(b) 允许所述第二寡核苷酸与所述第一寡核苷酸序列杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近；和

(c) 检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定所述生物学靶标的存在。

41. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一探针还包含所述第一结合部分和所述第一寡核苷酸序列之间的第一接头。

42. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第二探针还包含所述第二结合部分和所述第二寡核苷酸序列之间的第二接头。

43. 权利要求 40 所述的方法，其中所述生物学靶标是蛋白质。

44. 权利要求 40 所述的方法，其中所述生物学靶标是自身抗体。

45. 权利要求 40 所述的方法，其中所述生物学靶标是细胞。

46. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少

一个是针对所述生物学靶标的抗体。

47. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分均为针对所述生物学靶标的抗体。

48. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个不是针对所述生物学靶标的抗体。

49. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个是与所述生物学靶标结合的适体。

50. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分均为与所述生物学靶标结合的适体。

51. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分中至少一个是小分子结合物。

52. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分均为小分子结合物。

53. 权利要求 40 所述的方法，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列包含 6 到 30 个碱基的互补区。

54. 用于检测生物学靶标的方法，所述方法包括

(a) 提供第一探针，所述第一探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸压缩码序列，

(b) 提供第二探针，所述第二探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，和(2)第二寡核苷酸压缩码序列，

其中所述第一探针与第一报告子探针杂交，所述第一报告子探针包含(1)与所述第一寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第一报告子寡核苷酸，和(3)第一反应基团；

其中所述第二探针与第二报告子探针杂交，所述第二报告子探针包含(1)与所述第二寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第二报告子寡核苷酸，和(3)第二反应基团；

其中所述第二报告子寡核苷酸能够与所述第一报告子寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的；

(c) 将所述第一和第二探针与用于测试所述生物学靶标存在的样品接触；

(d) 当样品中存在所述生物学靶标时，允许所述第一和第二探针与所述生物学靶标结合，从而所述第二报告子寡核苷酸与所述第一报告子寡核苷酸杂交，使得所述第一和第二反应基团开始反应性接近；和

(e) 检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定所述生物学靶标的存在。

55. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分是抗体。

56. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分是适配体。

57. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二结合部分是小分子结合物。

58. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的报告子化学产生聚甲炔或其衍生物。

59. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的报告子化学产生花青或其衍生物。

60. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的反应为 Wittig 反应。

61. 权利要求 54 所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的反应为羟醛缩合反应。

62. 权利要求 1-61 中任一项所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的反应产生荧光部分。

63. 权利要求 1-61 中任一项所述的方法，其中所述第一和第二反应基团之间的反应产生化学发光部分或生色部分。

64. 权利要求 1-61 中任一项所述的方法，其中所述方法不包括所述第一和/或所述第二寡核苷酸序列的酶连接。

65. 权利要求 1-61 中任一项所述的方法，其中所述方法不包括所述第一和/或所述第二寡核苷酸序列的化学连接。



66. 试剂盒，其包含权利要求 1-65 中任一项所述任何方法的一种或多种探针。

67. 试剂盒，其包含权利要求 1-65 中任一项所述任何方法的两种或更多种探针。

68. 用于检测生物学待分析物的试剂盒，所述试剂盒包含：

(a) 第一探针，其包含(1)对所述生物学待分析物具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团；

(b) 第二探针，其包含(1)对所述生物学待分析物具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团，其中所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。

69. 用于检测生物学待分析物的试剂盒，所述试剂盒包含：

(a) 第一探针，所述第一探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸压缩码序列；

(b) 第二探针，所述第二探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，和(2)第二寡核苷酸压缩码序列，

其中所述第一探针能够与第一报告子探针杂交，所述第一报告子探针包含(1)与所述第一寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸的反压缩码序列，(2)第一报告子寡核苷酸，和(3)第一反应基团；

其中所述第二探针能够第二报告子探针杂交，所述第二报告子探针包含(1)与所述第二寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第二报告子寡核苷酸，和(3)第二反应基团；

其中所述第二报告子寡核苷酸能够与所述第一报告子寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。

70. 权利要求 68 或 69 所述的试剂盒，其中所述待检测的生物学待分析物包含融合蛋白。

71. 权利要求 68 或 69 所述的试剂盒，其中所述待检测的生物学待分析物包含蛋白-蛋白相互作用。

## 通过核酸模板化学生物检测的相关应用

本申请要求 2005 年 5 月 26 日提交的 U.S.专利申请序列号 Nos. 60/685,047; 2005 年 7 月 21 日提交的 60/701,165; 2005 年 8 月 31 日提交的 60/713,038; 2005 年 10 月 7 日提交的 60/724,743; 2006 年 1 月 13 日提交的 60/758,837; 和 2006 年 3 月 27 日提交的 60/786,247 的益处和优先权,就所有目的而言,每件申请的全部公开内容通过引用并入本文。

### 技术领域

一般而言,本发明涉及探针及其在生物检测和诊断学中的用途。更具体地,本发明涉及生物检测和诊断学(例如对核酸和蛋白质的检测)中核酸模板化学的组合物和方法(例如荧光的、化学发光的和发色化合物的合成)。

### 背景技术

荧光和有色化合物已被用于生物學研究和医学领域,以检测生物分子的存在、不存在、状态、数量和组成。使用荧光和有色化合物的测定法可以体外、原位或体内进行。用于检测 DNA 和 RNA 的体外检测法中常用的例子是实时和终点 PCR、DNA 测序和 DNA 微阵列技术。

### 核酸检测

DNA 和 RNA 检测测定法常常需要带有荧光标记的 DNA 探针和/或引物。典型地,这些通过酶合成和/或化学合成产生。体外荧光测定法的其它例子包括 ELISA 测定法,该测定法中用荧光团标记抗体。原位荧光测定法的一个例子是用荧光修饰的抗体来标记整个细胞(活的或死的),使得它们能够(例如使用流式分选器)被检测、成像和分离。最近,有人努力在完整动物中使用荧光作为侵害最小的检测技术。基本上,用近 IR 或 IR 荧

光化合物来标记抗体或其它生物活性分子，随后注射进动物中；使用合适的光照和成像设备检测荧光定位。以这种方式可以发现和监测癌症和其它疾病，而不需要探查手术。前文只是阐述荧光作为生物探测技术的渗透性的若干例子。

典型地，对于多数这些类型的测定法而言，需要通过洗涤步骤去除未结合的探针或抗体以获得足够的信号噪音比和灵敏度。这向测定过程添加了步骤，导致额外的时间和成本（试剂和可能的设备）。DNA/RNA 扩增测定法（如 RT-PCR）不需要洗涤步骤，因为靶标被扩增有效地降低了样品的复杂性，同时提供了大量待分析物用于测定。但是即便是 PCR 也受到一些限制。例如，在单一测定中可以被检测的待分析物数量被限制为四个或更少，并且测定需要昂贵和耗能(power-hungry)的设备，这限制了其在实验性用途（特别是在田间用途）中的可应用性。具有与 PCR 同样的灵敏性和特异性，但是更加强大(robust)和轻便的测定技术会是有利的。在体内成像的情况下，因为注射和之后和成像之前需要一些时间，因此进行“生物学”洗涤步骤，允许生物活性化合物找到其靶标，并允许多余的试剂清除身体。

### 蛋白质检测

蛋白质在许多生物学反应中起中心作用，所述生物学反应基本上由分子间作用和涉及多种蛋白质的分子识别组成。蛋白质鉴定和定量测定中用的常用方法使用双向电泳和质谱法。另一方法使用液相色谱和质谱法。对相互作用检测和蛋白质鉴定而言，也可使用抗体芯片，所述抗体芯片提供点在平表面上的大量抗体。使用电泳的常规方法在分辨率和检测灵敏度方面有问题。

Landegren et al. 的 U.S.专利公开号 No. 20020064779 描述了接近连接（proximity ligation）测定法，其中与待检测靶标结合的两个探针与附着在所述两个结合探针上的两个寡核苷酸的末端酶连接。结合的寡聚体被扩增，以测定靶标分子的存在。Nadeau et al.的 U.S.专利申请公开号 No. 2005/0009050 描述了形成扩增子的类似原理。

Kolman et al 的 U.S.专利申请公开号 No. 20050095627 描述了基于接近性的测定法，其中与两个寡核苷酸连接的两个结合配偶体与靶标结合时形成杂合体——这是部分为双链的 DNA 结构。然后可以用 DNA 聚合酶延伸所述部分为双链的结构，产生可以通过 PCR 被进一步扩增的产物。

人们需要针对上述生物检测方法中许多固有缺陷的、新的荧光和比色法。还需要发现新的荧光化合物。

### 发明内容

本发明部分基于下述发现：核酸模板化学可用于检测生物学靶标，例如核酸、蛋白质、自身抗体、细胞等。本发明部分基于下述发现：荧光、化学发光和发色化合物和产生荧光、化学发光和发色信号的反应可以通过核酸模板化学被合成。这类方法、化合物、化学反应和其它组分适用于检测生物分子，如核酸和蛋白质。使用荧光、化学发光和有色化合物的本发明测定法可以体外、原位或体内进行。

在一个方面，本发明涉及用于检测靶标核苷酸序列的方法。该方法包括(a)提供(1)第一探针，其包含(i)第一寡核苷酸序列和(ii)与所述第一寡核苷酸序列连接的第一反应基团，和(2)第二探针，其包含(i)第二寡核苷酸序列和(ii)与所述第二寡核苷酸序列连接的第二反应基团，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列与靶标核苷酸的两个分离区域互补；(b)将所述第一探针和所述第二探针与将用来测试靶标核苷酸序列的存在的样品在下述条件下结合，所述条件是这样的：如果靶标核苷酸序列存在于样品中，那么在所述条件下，所述第一探针和所述第二探针与靶标核苷酸序列上它们各自的互补区杂交，从而使得所述第一反应基团和所述第二反应基团开始反应性接近；和(c)检测所述第一反应基团和所述第二反应基团之间的反应，从而测定靶标核苷酸序列的存在。

在另一方面，本发明涉及用于检测靶标核苷酸序列的方法。所述方法包括(a)提供一组探针对，每个探针对包含(1)第一探针，其包含(i)第一核苷酸序列和(ii)与所述第一寡核苷酸序列连接的第一反应基团，和(2)第二探针，其包含(i)第二寡核苷酸序列和(ii)与所述第二寡核苷酸序列连接的相应

第二反应基团，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列与靶标核苷酸的两个分离区域互补；(b)将所述探针对组与将用来测试靶标核苷酸序列的存在的样品在下述条件下结合，所述条件是这样的：如果靶标核苷酸序列存在于样品中，那么所述条件下所述探针对的每个所述第一探针和所述第二探针与靶标核苷酸序列上它们各自的互补区杂交，从而使得相应的所述第一反应基团和所述第二反应基团对开始反应性接近；和(c)检测所述第一反应基团和相应的所述第二反应基团对之间的一个或多个反应，从而测定靶标核苷酸序列的存在。

在又一方面，本发明涉及用于进行核酸模板化学的方法。本方法包括例如在基本相似的条件和/或基本同时地进行多重核酸模板化学反应，所述反应以单个模板核苷酸序列作为模板。

在又一方面，本发明提供了用于检测生物学靶标的方法。所述方法包括下述这些。提供第一探针。所述第一探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团。提供第二探针，所述第二探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交。当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是有反应性的。将所述第一探针与所述第二探针与将用来测试生物学靶标存在的样品在下述条件下结合，所述条件下所述第一和第二结合部分与生物学靶标结合。所述第二寡核苷酸被允许与所述第一寡核苷酸杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定生物学靶标的存在。在一个实施方案中，第一和第二反应基团之间的反应产生荧光部分。在另一实施方案中，第一和第二反应基团之间的反应产生化学发光和/或发色部分。

在又一方面，本发明提供了用于检测生物学靶标的方法。所述方法包括下述这些。提供生物学靶标与第一探针的结合复合物。所述第一探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团。将结合复合物

与第二探针接触。所述第二探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交，当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。所述第二寡核苷酸被允许与所述第一寡核苷酸杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定生物学靶标是否存在。

在又一方面，本发明提供了用于检测生物学靶标存在的方法。所述方法包括下述这些。允许第一探针和第二探针与靶标结合。所述第一探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团。所述第二探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。第二寡核苷酸能够与第一寡核苷酸序列杂交。当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。所述第二寡核苷酸被允许与所述第一寡核苷酸杂交，从而使所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定样品中是否存在生物学靶标。在一个实施方案中，第一和第二反应基团之间的反应产生荧光部分。在另一实施方案中，第一和第二反应基团之间的反应产生化学发光和/或发色部分。

在又一方面，本发明提供了用于检测生物学靶标存在的方法。所述方法包括下述这些。提供第一探针，其包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸压缩码序列。提供第二探针，其包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸压缩码。所述第一探针与第一报告子探针杂交，所述第一报告子探针包含(1)与所述第一寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第一报告子寡核苷酸，和(3)第一反应基团。所述第二探针与第二报告子探针杂交，所述第二报告子探针包含(1)与所述第二寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第二报告子寡核苷酸，和(3)第二反应基团。第二报告

子寡核苷酸能够与第一报告子寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。将所述第一和第二探针与用于测试所述生物学靶标存在的样品接触。当样品中存在所述生物学靶标时，允许所述第一和第二探针与所述生物学靶标结合，从而所述第二报告子寡核苷酸与所述第一报告子寡核苷酸杂交，使得所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定样品中是否存在所述生物学靶标。

值得指出的是，本发明的方法不要求对第一和/或第二寡核苷酸序列进行酶连接或化学连接。

在又一方面，本发明提供了用于检测生物学待分析物的试剂盒。所述试剂盒包括第一探针，其包含(1)对所述生物学待分析物具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团；和第二探针，其包含(1)对所述生物学待分析物具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交。当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。

在又一方面，本发明提供了可用于检测生物学待分析物的试剂盒。所述试剂盒包含第一探针，所述第一探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸压缩码序列；和第二探针，所述第二探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，和(2)第二寡核苷酸压缩码序列。所述第一探针能够与第一报告子探针杂交，所述第一报告子探针包含(1)与所述第一寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸的反压缩码序列，(2)第一报告子寡核苷酸，和(3)第一反应基团。所述第二探针能够与第二报告子探针杂交，所述第二报告子探针包含(1)与所述第二寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸的反压缩码序列，(2)第二报告子寡核苷酸，和(3)第二反应基团。所述第二报告子寡核苷酸能够与所述第一报告子寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。



本发明包括提供一种、两种或多种本文所述探针的试剂盒。更具体地，本发明包括提供一种、两种或多种下述探针的试剂盒，所述探针利用核酸模板化学产生可检测的信号，用作检测生物学靶标或靶标（例如一种或多种核酸、一种或多种蛋白质、一种或多种自身抗体和/或一种或多种细胞）存在的手段。

参考下文附图、详述和权利要求书可透彻地理解本发明之前的方面和实施方案。

### 定义

本文使用的术语“DNA 程序化化学”或“DPC”指核酸模板化学，例如对化学反应物进行序列特异性控制，产生特定产物，这通过下文所述来完成：(1)提供一种或多种模板，其具有结合的反应基团；(2)将具有反密码子（例如一种或多种模板的互补序列）的一种或多种转移基团（试剂）与反应基团在允许与模板杂交的条件下接触，和(3)反应基团反应产生产物。例如在一步核酸模板反应中，“模板”和“互补”寡核苷酸的杂交将反应基团装配在一起，随后进行化学反应，产生目的产物。反应物和产物的结构无需与核酸的结构相关，所述核酸包含模板和转移基团寡核苷酸。参阅例如 Liu et al.的 U.S.专利申请公开号 Nos. 2004/0180412 A1 (USSN 10/643,752; Aug. 19, 2003) 和 Liu et al 的 2003/01 13738 A1 (USSN 10/101 ,030; Mar. 19, 2002); Gartner, et al, 2004, Science, vol. 305, pp. 1601-1605; Doyon, et al, 2003, JACS, vol. 125, pp. 12372- 12373, 所有参考文献的全部内容通过引用明确并入本文。还参阅“Turn Over Probes and Use Thereof by Coull et al., 2006 年五月 3 日提交的 PCT 国际申请 PCT/US06/ 16999。

本文使用术语“核酸”、“寡核苷酸”（有时简称为“寡（oligo）”）或“多核苷酸”是指核苷酸的多聚体。多聚体可包括，但不限于天然核苷（即腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷）、核苷类似物（例如 2-氨基腺苷、2-硫胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、7-脱氮腺

苷、7-脱氮鸟苷、8-氧腺苷、8-氧鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤和 2-硫胞苷)、经化学修饰的碱基、经生物学修饰的碱基(例如甲基化的碱基)、插入的碱基、经修饰的糖(例如 2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)或经修饰的磷酸基(例如硫代磷酸酯和 5'-N-亚磷酰胺键)。核酸和寡核苷酸可还包括具有经修饰主链的其它碱基多聚体,如锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、苏糖核酸(TNA)。

在整个说明书,组合物被描述为具有、包括或包含特异组分,或其中方法被描述为具有、包括或包含特异的操作步骤时,也包括下面的情况:本发明的组合物还主要由所述成分组成或由所述成分组成,本发明的方法也主要由所述操作步骤组成或由所述操作步骤组成。此外,应当理解:步骤顺序或进行某些活动的顺序是非关键性的,只要本发明仍可操作即可。另外,可同时进行两个或更多的步骤或行动。

#### 附图概述

可从以下附图进一步理解本发明,其中:

图 1 是对根据本发明的一个实施方案用于检测核酸靶标的方法的图示。

图 2 是对通过基因涂抹(gene painting)检测低拷贝数基因的例子图示。

图 3 是对通过辅因子释放测定法检测核酸靶标的例子图示。

图 4 是对根据本发明的一个实施方案用于检测生物学靶标的方法的图示。

图 5 是对根据本发明的一个实施方案用于检测生物学靶标的方法的图示。

图 6 显示了受浓度、温度和单个碱基对错配的存在或不存在影响的杂交的例子。

图 7 显示了某些解链曲线实验中的示例性寡核苷酸。

图 8 是对根据本发明的一个实施方案用于检测生物学靶标的方法的图示。

图 9 是对根据本发明的一个实施方案用于检测血小板衍生的生长因子 (PDGF) 的方法的图示。

图 10 显示了夹板的(splinted)、压缩码的检测体系的示例性实施方案，其中使用适体作为靶标结合部分。

图 11 显示夹板的(、压缩码的检测体系的示例性实施方案，使用抗体作为靶标结合部分。

图 12 是对根据本发明的一个实施方案用于检测蛋白质靶标的方法的图示。

图 13 显示了聚甲炔染料、花青 (cyanine) 和半花青 (hemicyanine) 的一般结构。

图 14 显示了荧光信号的产生和通过三苯膦(TPP)和叠氮香豆素(AzC)报告化学对生物学靶标进行检测的例子。

图 15 显示了荧光信号的产生和通过 TPP 和 AzC 报告化学对生物学靶标进行检测的例子。

图 16 显示了解链曲线的某些例子，展示了寡核苷酸浓度对  $T_m$  的影响。

图 17 显示了有和没有抗生物素蛋白时，生物素化的寡核苷酸的 DNA 杂交解链曲线的某些例子。

图 18 显示了与抗生物素蛋白结合后互补的生物素化寡核苷酸的  $T_m$  改变的某些例子。

图 19 显示了盐和镁浓度对寡核苷酸+/-生物素的  $T_m$  的影响的某些例子。

图 20 显示了在不同比例的寡核苷酸与抗生物素蛋白之比的情况下，生物素化的寡核苷酸解链温度行为的某些例子。

图 21 显示了存在和不存在抗生物素蛋白时，与生物素-5'5' (+)链寡核苷酸成为双链体的 3'(-)生物素-链寡核苷酸的解链曲线的某些例子。

图 22 显示了有和没有抗生物素蛋白时，富含 AT 的生物素化寡核苷酸二聚体解链曲线的某些例子。

图 23 是对根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的方法的图

示。

图 24 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果的例子。

图 25A 和图 25B 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果（反应混合物中甲酰胺的效应）的例子。

图 26A 和图 26B 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果（反应混合物中甲酰胺的效应）的例子。

图 27 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果（反应混合物中甲酰胺的效应）的例子。

图 28 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果（反应混合物的时程）的例子。

图 29 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果（反应混合物的时程）的例子。

图 30 显示了根据本发明的一个实施方案检测生物学靶标的实验结果（探针比例）的例子。

图 31 显示了通过压缩码检测体系检测 PDGF 的例子。

图 32 显示了针对适体和报告子的比例进行的实验。

图 33 阐述了用于检测 PDGF 的“单片”检测体系的实施方案。

图 34 显示了夹板的、压缩码的检测体系的示例性实施方案，其中使用抗体作为靶标结合部分。

图 35 显示了反应混合物的 MALDI-MS 谱。

图 36 显示了反应混合物的吸收和荧光发射光谱。

图 37 显示了纯化的半花青的吸收和荧光发射光谱。

图 38 显示了化合物的电喷射质量数据。

### 发明详述

就最简单的目的而言，本发明旨在通过核酸模板反应产生可检测的、指示靶标待分析物（例如核酸或蛋白质）的存在的信号。更具体地，本发明提供了令人兴奋的方法来产生荧光、化学发光或发色化合物和信号，并

将这类技术用于生物检测和/或诊断应用中。直接作为核酸模板化学反应结果的（由于化学键的形成或切割，或功能基团的化学转化产生的）有色、荧光或化学发光化合物或前体的产生及检测提供了独特的技术，所述技术可应用于许多领域，包括生物恐怖剂(bioterror agent)检测和疾病诊断。

因此，探针之间的杂交事件之后是由 DNA 模板（寡核苷酸）介导的化学反应，所述 DNA 模板由于接近效应从而显著提高了化学反应的速率，并能够介导大量化学反应。因此，靶标生物分子（例如核酸或蛋白质）的存在导致可检测化学反应的发生。从而，本发明提供了易于使用和高信噪比的生物学靶标检测。

### 核酸检测

图 1 阐述了对核酸的检测的一个实施方案。两个寡核苷酸与 DNA 或 RNA 靶标（待分析物，例如在相信含有生物恐怖剂或其它传染剂的样品中）结合。用化学反应种类 X 和 Y 标记两种探针。杂交后，X 与 Y 反应产生信号的化合物 Z（例如荧光、化学发光或有色化合物）。Z 与两个探针可以共价连接或不连接，不连接时 Z 可以与任一探针连接。Z 形成后可从寡核苷酸释放。

如果荧光团或发色团被释放，其可以从杂交复合物分离并单独分析，或其被检测后可被去除，从而能够进行样品的另一轮查询（例如探针翻转）。如果荧光团或发色团未被释放，也可将其从反应混合物剩余部分分离，例如作为双链结构移动，所述双链结构可通过例如凝胶电泳分析。DNA 或 RNA 靶标上附着于 DNA 探针的荧光团可以附着在固相（例如珠、载玻片（微阵列）表面等）或溶液中（在该情况下反应构成均相测定）。

因此在一个方面，本发明涉及用于检测靶标核苷酸序列的方法。所述方法包括(a)提供(1)第一探针，其包含(i)第一寡核苷酸序列和(ii)与所述第一寡核苷酸序列连接的第一反应基团，和(2)第二探针，其包含(i)第二寡核苷酸序列和(ii)与所述第二寡核苷酸序列连接的第二反应基团，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列与靶标核苷酸的两个分离区域互

补；(b)将所述第一探针和所述第二探针与用于测试靶标核苷酸序列存在的样品在下述条件下结合，所述条件是这样的：如果靶标核苷酸序列存在于样品中，那么所述条件下所述第一探针和所述第二探针与靶标核苷酸序列上它们各自的互补区杂交，从而所述第一反应基团和所述第二反应基团开始反应性接近；和(c)检测所述第一反应基团和所述第二反应基团之间的反应，从而测定靶标核苷酸序列的存在。

图 2 阐述了通过能够检测低拷贝数基因的核酸模板化学检测核酸序列的例子。用一组探针对（例如~400/基因）“涂抹”目的基因。探针对的数量可以在例如 2、5、10 和 1,000、5,000 或 10,000 之间。探针对（第一反应基团和响应的第二反应基团）之间的化学反应在所有探针对中可以相同，也可以不同。产生不同荧光团的不同组探针对可以靶向靶标中不同的序列。

图 2 中阐述的实施方案也可应用于除生物检测外的应用。单个 DNA 模板上发生多重核酸模板反应的原理不局限于产生荧光信号。

因此，在另一方面，本发明涉及用于检测靶标核苷酸序列的方法。所述方法包括 a)提供一组探针对，每个探针对包含(1)第一探针，其包含(i)第一核苷酸序列和(ii)与所述第一寡核苷酸序列连接的第一反应基团，和(2)第二探针，其包含(i)第二寡核苷酸序列和(ii)与所述第二寡核苷酸序列连接的相应第二反应基团，其中所述第一寡核苷酸序列和所述第二寡核苷酸序列与靶标核苷酸的两个分离区域互补；(b)将所述探针对组与用于测试靶标核苷酸序列存在的样品在下述条件下结合，所述条件是这样的：如果靶标核苷酸序列存在于样品中，那么所述条件下所述探针对的每个所述第一探针和所述第二探针与靶标核苷酸序列上它们各自的互补区杂交，从而相应的所述第一反应基团和所述第二反应基团对开始反应性接近；和(c)检测所述第一反应基团和相应的所述第二反应基团对之间的一个或多个反应，从而测定靶标核苷酸序列的存在。

图 3 阐述了另一实施方案的例子，其中间接检测流程涉及核酸模板反应，随后是辅因子释放和后继的可检测反应。

## 蛋白质检测

图 4 和图 5 阐述了用于检测蛋白质靶标的本发明的一个实施方案。

图 4 显示了通过本发明检测蛋白质靶标的一个实施方案。两个探针含有靶标结合部分、互补寡核苷酸，并且分别含有化学反应种类 X 和 Y。杂交后 X 和 Y 反应产生信号（例如荧光）化合物，其与两种探针可共价连接或不共价连接。X 和 Y 的反应产物也可作为未结合的、可溶的化合物被释放进溶液中。蛋白质靶标可以附着在固相（例如珠、载玻片（微阵列）表面等）或溶液中。靶标结合部分可以是例如适体、抗体、抗体片段（即 Fab）、受体蛋白或小分子。

在图 5 中更具体阐述的是使用两种探针的二元探针途径的例子，所述两种探针各带有一个“前荧光团”前体（F1 和 F2）并含有靶标结合部分和被设计为彼此退火的寡核苷酸序列。在该实施方案中，检测在下述条件下进行：不存在靶标时前荧光团寡核苷酸不会彼此退火。这些条件通常被选为：使得不存在靶标时环境温度高于寡核苷酸对的  $T_m$ （从而不存在目的靶标待分析物时寡核苷酸对不会退火）。然而，存在目的靶标时，局部高浓度的寡核苷酸随后提高它们双链复合物的  $T_m$  使得杂交发生，之后发生产信号的核酸模板反应（F1 和 F2 之间的反应）。产信号核酸模板反应由于局部更高的前荧光团浓度而被加速，但是也可被前荧光团基团朝向彼此的接近和定向促进。该信号产生的构型具有能够制造试剂盒的潜力，所述试剂盒用于检测多种生物分子、细胞、表面和用于原位测定法的设计。信号产生不需要酶，均相形式不需要样品加工。

在图 5 中显示了两种寡核苷酸，每种都通过可选的间隔臂与独立的结合物（如图所示的情况下是抗体，但是可以是其它结合物如适体或小分子）连接。每个抗体识别共用靶标待分析物（如蛋白质）上的独立表位。间隔臂可以添加至寡核苷酸和结合物之间的一个或两个寡核苷酸上。在某些情况下，该间隔臂可被要求符合接近的要求以达到所期望的反应性。原则上间隔臂可以是任何合适的基团，例如线性或分支的脂肪族碳链 C3 到 C5、C10、C15、C20、C25、C30、C35、C40 或 C100 基团，1 到 10、15、20、30、50 或 100 个碱基长的 DNA 序列或适当长度的聚乙二醇寡聚

物。

前荧光团可位于“螺旋末端”构型中（图 5 顶部），一个附着于 Oligo5'端，另一附着于 3'端。（可应用其它构型，包括将两个前荧光团置于序列中，或例如使一个寡核苷酸与部分发夹结构（例如 100 埃长）杂交）。在第一个例子中，一个 Oligo5'端附着于间隔臂和靶标结合物，另一个 3'端附着于间隔臂和分离的靶标结合物。可以添加间隔臂（其可由不互补的 DNA 序列组成）或合成间隔臂（如乙二醇寡聚物）以满足接近要求。这类间隔臂可以非常有弹性，其具有下述优点：克服与坚硬间隔可能发生的任何结合位阻。合适的长间隔臂设计可以允许 Oligo5'与它们的结合物（图 5 底部）连接，或 3'也连接，只要寡核苷酸能够以反向平行的构型退火并允许反应基团彼此反应即可。可对每个靶标设计最佳的间隔臂长度。过长的间隔臂应当避免，因为它们可能会降低体系中的特异性或降低的提高了的  $T_m$  效应。

与两种寡核苷酸游离于溶液中相比，限定(tethering)寡核苷酸对所提供的接近效应可影响两个互补寡核苷酸序列退火的动力学。更重要的是，与游离复合物相比，局部高浓度使解链曲线向上移动，即提高复合物的  $T_m$ 。如下文方程所阐述的，在大量 (bulk) 溶液中，已知  $T_m$  取决于总寡核苷酸浓度。Wetmur, Crit. Rev. in Biochem. And Mol. Biol, 26, 227-259 (1991)。

$$T_m = (1000 * \Delta H) / (A + \Delta S + R \ln(C_t / 4) - 273.15 + 16.6 \log Na^+)$$

其中  $\Delta H$  和  $\Delta S$  是螺旋形成的焓和熵， $R$  是摩尔气体常数， $Q$  是寡聚物的总浓度， $Na^+$  是溶液中钠离子的摩尔浓度。

图 6 显示了在 0.1 M 盐中短寡核苷酸范围内  $T_m$  对浓度的斜线具有下述依赖性：根据上述方程，寡核苷酸（图 7 中的序列）浓度每提高 10 倍约 +7° C。因此例如 1000 倍的局部浓度会被预期提高  $T_m$  约 +21° C。

F1 和 F2 的反应产物可作为化学转化的结果从杂交复合物中释放。因此，荧光团或发色团可从杂交复合物分离并独立地分析，或检测后可将荧光团或发色团和退火的寡核苷酸去除，使得能够进行样品的另一轮查询。



一旦形成产物，F1 和 F2 之间的反应可与两个探针共价连接或不共价连接。

因此在一个方面，本发明提供了用于检测生物学靶标的方法。所述方法包括下述这些。提供第一探针。所述第一探针包括(1)对生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团。提供第二探针，其包含(1)对生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交。当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。将所述第一探针与所述第二探针与用于测试生物学靶标存在的样品在下述条件下结合，所述条件下所述第一和第二结合部分与生物学靶标结合。允许所述第二寡核苷酸与所述第一寡核苷酸杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定生物学靶标的存在。在一个实施方案中，所述第一和第二反应基团之间的反应产生荧光部分。在另一实施方案中，所述第一和第二反应基团产生化学发光和/或发色部分。

在另一方面，本发明提供了用于检测生物学靶标的方法。所述方法包括下述这些。提供生物学靶标和第一探针的结合复合物。所述第一探针包括(1)所述第一探针包含(1)对生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团。将结合复合物与第二探针接触。所述第二探针包括(1)对生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团是反应性的。允许所述第二寡核苷酸与所述第一寡核苷酸杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定样品中是否存在生物学靶标。

在又一方面，本发明提供了用于检测生物学靶标存在的方法。所述方法包括下述这些。允许第一探针和第二探针与靶标结合。所述第一探针包

括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团。所述第二探针包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交。当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团是反应性的。允许所述第二寡核苷酸与所述第一寡核苷酸序列杂交，使所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定样品中是否存在所述生物学靶标。在一个实施方案中，所述第一和第二反应基团之间的反应产生荧光部分。在另一实施方案中，所述第一和第二反应基团之间的反应产生化学发光和/或发色部分。

图 8 阐述了本发明的另一实施方案，其使用“压缩码”夹板结构用于基于核酸模板的生物检测。在该实施方案中，与靶标结合部分直接与互补寡核苷酸（其杂交并开始核酸模板反应）连接（可选地通过间隔基团）不同，靶标结合部分与“压缩码”寡核苷酸序列连接。每个相应的报告寡核苷酸具有互补的、“压缩码”序列（除开始核酸模板反应的“报告”序列外）。核酸模板化学反应通过报告寡核苷酸的杂交开始，所述报告寡核苷酸与反应并产生可检测信号的反应基团连接。重要的是探针的每个寡核苷酸序列仅与其目的杂交配偶体互补，不与检测体系中的其它寡核苷酸互补。

所述压缩码结构支持产生信号报告子-寡核苷酸缀合物，所述缀合物会与不同的下游报告寡核苷酸通过反压缩码序列装配。可如下文所述简单地测试与独特的反压缩码连接的不同报告子文库：将化学计量的结合物-压缩码寡核苷酸与其互补压缩码的缀合物与每个独特的压缩码混合。

图 9 是对压缩码夹板结构途径的阐述，其中靶标结合部分是两个适体。在用说明性寡核苷酸序列和报告子化学（例如三苯膦、TPP 和 7-叠氮香豆素、AzC）检测血小板衍生的生长因子(PDGF)的该例子中，通过压缩码序列(NNN.....)与 TPP 报告寡核苷酸上互补的反压缩码序列(N'N'N'.....)的杂交将 TPP 报告寡核苷酸自我装配至 PDGF 适体寡核苷酸上。报告寡核

核苷酸末端是示例性的 10 碱基报告序列和 5'-TPP 基团。带有不同压缩码和反压缩码（成对彼此互补）的独立寡核苷酸对也自我装配，以提供 AzC 报告序列和 3'-AzC 基团。AzC 寡核苷酸与 TPP 寡核苷酸互补并反向平行，使得当 TPP 和 AzC 寡核苷酸彼此退火时，TPP 和 AzC 基团端对端地终止。

图 10 更详细地阐述了用出性寡核苷酸序列和报告化学(TPP 和 AzC)检测 PDGF 的压缩码夹板结构途径。首先，TPP 对在 5'端包括 PDGF 适体，C18 基于聚乙二醇的间隔和 18 个成员的压缩码序列。TPP 报告序列在其 3'端包括互补的反压缩码序列，C18 PEG 间隔，和终止于 5'TPP 基团中的十碱基对报告序列。寡核苷酸的 AzC 对包括通过 C18 PEG 间隔与独立压缩码连接的 3'-适体，和与 5'反压缩码连接的检测寡核苷酸，一个 C18 PEG 间隔和一个终止于 3' AzC 基团中的报告寡核苷酸。

图 11 阐述了相应设计的例子，其中使用抗体代替适体作为靶标结合部分。

“压缩码”途径的一个优点在于下述能力：独立地产生报告寡核苷酸，在维持结合物和核酸模板激活化学二者的活性的条件下将它们装配在一起。

压缩码体系基于两对寡核苷酸，通过独特压缩码和压缩码对的碱基配对将每对结合。“压缩码”是与它们的互补序列特异结合的寡核苷酸序列，它们优选被设计为使得：它们不与已知的基因组序列互补（如果样品可能含有基因组 DNA 的话，则相关），具有相似的  $T_m$  值，缺乏显著的二级结构，不与检测体系中其它的压缩码或反压缩码序列退火。

因此，本发明的另一方面提供了用于检测生物学靶标存在的方法。所述方法包括下述这些。提供第一探针，其包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸压缩码序列。提供第二探针，所述第二探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，和(2)第二寡核苷酸压缩码序列。所述第一探针与第一报告探针杂交，所述第一报告探针包含(1)与所述第一寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第一报告子寡核苷酸，和(3)第一反应基团。所述第二探针与第二报

告子探针杂交，所述第二报告子探针包含(1)与所述第二寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第二报告子寡核苷酸，和(3)第二反应基团。所述第二报告子寡核苷酸能够与所述第一报告子寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。将所述第一和第二探针与用于测试所述生物学靶标存在的样品接触。当样品中存在所述生物学靶标时，允许所述第一和第二探针与所述生物学靶标结合，从而所述第二报告子寡核苷酸与所述第一报告子寡核苷酸杂交，使得所述第一和第二反应基团开始反应性接近。检测所述第一和第二反应基团之间的反应，从而测定样品中是否存在所述生物学靶标。

值得指出的是，本发明的方法不要求对第一和/或第二寡核苷酸序列进行酶连接或化学连接。

最优化压缩码结构设计中可考虑的因素包括例如(1)适体/抗体和压缩码（间隔 1）之间的间隔基团（例如寡核苷酸和/或非碱基基团），用于例如允许杂交配偶体彼此到达，防止任何位阻；(2)压缩码序列的长度，为了与反压缩码序列形成足够稳定的退火而形成复合物；和(3)反压缩码和报告序列之间的间隔基团（间隔 2），用于例如防止任何位阻。

附着在寡核苷酸上的结合物（靶标结合部分）可以是与靶标分子特异结合并允许本发明的设计运作的任何化学部分。例子包括大范围的官能团，例如(1)抗体，例如 IgG、IgM、IgA、IgE、Fab's、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、Dab、Fv 或 ScFv 片段；(2)小分子结合物，例如抑制剂、药物、辅因子；(3)蛋白质检测报告子，反之亦然；(4)DNA、RNA、PNA 适体；(5)用于 DNA 结合的 DNA 序列和调节蛋白；(6)代表蛋白质结合基序的肽；(7)通过噬菌体展示、随机合成、诱变发现的肽；(8)天然结合蛋白质对和复合物；(9)抗原（用于抗体检测）；和(10)独立附着在两个寡核苷酸上的单个多克隆抗体，其可用作不同特异性的两个独立结合物。

与寡核苷酸结合的靶标结合部分可以是针对相同靶标中不同位点的异种类型。例如，两个结合物可以是两个不同的抗体、一个抗体和一个受体、一个抗体和一个小分子结合物、一个受体和一个肽、一个适体和一个

辅因子或任何其它组合。

靶标待分析物可以是任何类型的，只要靶标支持两个（或更多）结合位点即可。两个结合位点可相同或不同。位点相同的情况下，将不会获得用两个不同结合物所获得的特异性提高的好处。可通过一对探针来检测存在于单体形式和同型二聚体或更高聚合作用相的平衡之中的分子，所述探针含有相同的结合物但是不同的互补 DNA 序列。合适的靶标包括蛋白质、细胞表面、抗体、抗原、病毒、细菌、器官表面、膜、细胞器、固定细胞的原位分析、蛋白质复合物。本发明可具体地适用于检测融合蛋白（例如存在 BCR 和 ABL 时为 BCR-ABL）。

图 12 显示了一个实施方案——如何通过核酸模板化学使用荧光团或发色团的合成报告蛋白质或小分子结合测定。在该例子中，五边形所代表的蛋白质结合物（如适体、抗体或小分子结合物）与末端具有反应基团 X 的寡核苷酸（“模板”）缀合。样品与结合物-模板混合，如果存在目的待分析物（用圈代表），则形成复合物。去除多余的结合物-模板，并添加带有反应基团 Y 的探针和与上述模板互补的寡核苷酸。寡核苷酸的杂交使得 X 和 Y 之间的反应起始，从而产生可检测的信号分子（例如荧光团或发色团）。

信号分子（用星号代表）可保持与探针-模板杂交体结合，或可从复合物被释放。待分析物可与固相结合，或可游离于溶液中，只要在添加带有 Y 的探针之前去除多余的结合物-模板即可。

因为模板和探针独特地编码对报告子的合成，并且可以预见到许多不同的报告子，因此可设计多路体系(multiplex system)。例如。可创造具有间隔（例如均匀间隔）发射的一系列荧光团，允许同时检测两种、三种、四种、物种或更多的待分析物。另外，可设计一种体系，其中同时产生有色和荧光化合物。

在探针设计中，一个考虑是带有反应基团的两个报告序列的  $T_m$ 。由于不存在靶标时双链体的  $T_m$  应当低于室温，因此该序列通常应当较短，例如 6-15 个碱基和/或富含 A-T。10 碱基对的典型报告子长度在低盐浓度下可具有 30°C 左右的  $T_m$ 。因此，通常甚至对短序列也需要添加 10% 到 40%

体积/体积的甲酰胺，将温度进一步降低至低于测定温度，或提高测定温度。非常短的报告寡核苷酸可遭受特异性缺乏并对不期望的压缩码序列（当使用这些序列时）显示部分结合。

探针设计中的另一因素是结合部分和报告序列之间包括任何压缩码序列的寡核苷酸的长度。它们必需足够长，使得报告子寡核苷酸能彼此到达并退火。序列可用聚乙二醇(PEG)接头分散，所述接头是弹性的，并可提供针对任何位阻的额外保护。例如，寡核苷酸总长度可在 35 碱基长左右。也可使用含 0、1 广义 2 个 C18 PEG 间隔的寡核苷酸或同聚物束（即 C<sub>10</sub>）。

第三个考虑是使用压缩和反压缩序列时它们的长度（即图 9 和图 34）。除了需要每个压缩码仅与其反压缩码退火而不与任何其它压缩码、反压缩码或报告序列退火外，一个重要的参数是压缩码和反压缩码之间双链体的  $T_m$ 。该  $T_m$  应当显著高于测定中会使用的最高温度，使得报告寡核苷酸保持与结合部分牢固地结合。在实践中，约为报告序列长度两倍的压缩码（即总长度为 15-30 碱基）是想要的，其通常满足这些标准。

关于信号产生的方面，可使用核酸模板化学产生或消除影响光学信号的标签，例如产生或消除荧光、化学发光或发色分子。另外，可对检测反应加以设计，来产生或消除直接或间接产生可检测标签的产物，例如下述这些产物，所述产物催化产生光学标签的反应；抑制产生光学标签的反应；是荧光淬灭剂；是荧光能量转移分子；产生 Ramen 标签；产生电化学发光标签（即 ruthenium bipyridyl）；生产电子自旋标签分子。

另外，可对检测反应加以设计，以包括“无标签”检测。可使用核酸模板化学来产生或消除可通过分子的固有天然性质辨别的分子，例如下述产物，所述产物产生光散射标签或聚集；可通过微量量热法检测；可通过表面等离子共振（即与固定的抗体结合）检测（例如表位）；产生或破坏被抗体识别的表位（即 ELISA）；通过质谱法测量具有可辨别的质量；具有改变的尺寸，可通过光散射、凝胶电泳或尺寸排除色谱辨别；具有改变的疏水性或离子含量，可通过色谱辨别；具有改变的对亲和色谱分离的亲合力。

本发明的另一方面提供了可用于检测生物学待分析物的试剂盒。所述试剂盒包括第一探针，其包括(1)对所述生物学待分析物具有亲合力的第一结合部分，(2)第一寡核苷酸序列，和(3)与所述第一寡核苷酸序列结合的第一反应基团；和第二探针，其包含(1)对所述生物学待分析物具有亲合力的第二结合部分，(2)第二寡核苷酸序列，和(3)与所述第二寡核苷酸序列结合的第二反应基团。所述第二寡核苷酸能够与所述第一寡核苷酸序列杂交。当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。

在又一方面，本发明提供了可用于检测生物学待分析物的试剂盒。所述试剂盒包括第一探针，其包括(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第一结合部分，和(2)第一寡核苷酸压缩码序列；和第二探针，所述第二探针包含(1)对所述生物学靶标具有亲合力的第二结合部分，和(2)第二寡核苷酸压缩码序列。所述第一探针能够与第一报告探针杂交，所述第一报告探针包含(1)与所述第一寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸的反压缩码序列，(2)第一报告子寡核苷酸，和(3)第一反应基团。所述第二探针能够与第二报告探针杂交，所述第二报告探针包含(1)与所述第二寡核苷酸压缩码序列互补的寡核苷酸反压缩码序列，(2)第二报告子寡核苷酸，和(3)第二反应基团。所述第二报告子寡核苷酸能够与所述第一报告子寡核苷酸序列杂交，且当彼此开始反应性接近时，所述第二反应基团对所述第一反应基团来说是反应性的。

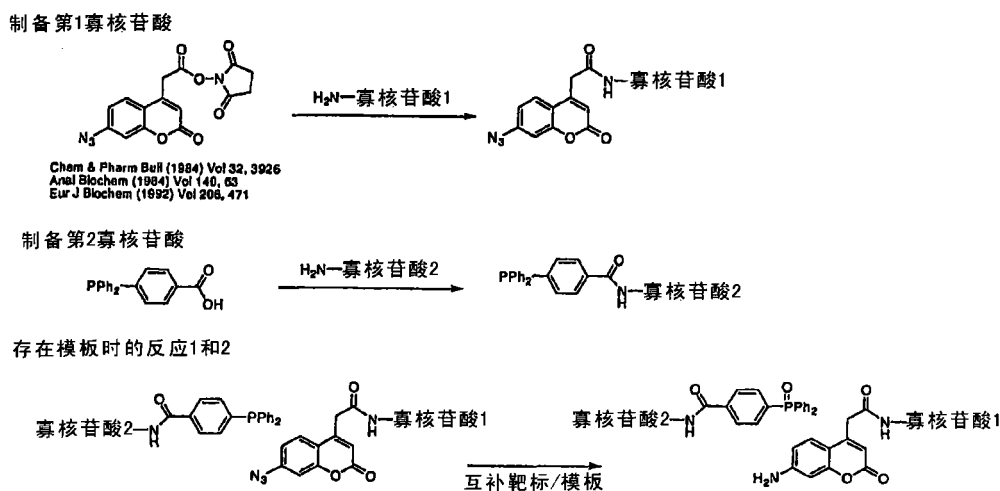
本发明包括下述试剂盒，所述试剂盒提供本文所述的一种、两种或更多探针。更具体地，本发明包括提供一种、两种或更多探针的试剂盒，所述探针利用核酸模板化学用于产生可检测的信号，作为检测生物学靶标（例如核酸和蛋白质）存在的一种手段。

## 报告子化学

### 香豆素

香豆素可用于报告化学中，特别是 7-位上带有供电子取代基的香豆素。下文的流程图阐述了如何使用核酸模板化学完成从 7-叠氮香豆素（已

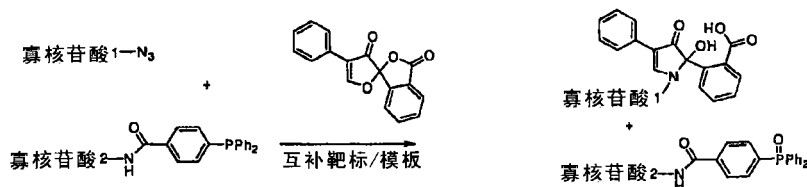
知是非荧光的) 到 7-氨基衍生物 (荧光的) 的还原。



## 荧光胺

在下文中使用磷将叠氮化物还原为胺，可以用得到的胺与游离（未与 DNA 结合）试剂反应，形成荧光的胺衍生物。主要的例子是荧光胺，其本身是非荧光的，但是与伯胺或仲胺反应后产生蓝绿荧光的产物。

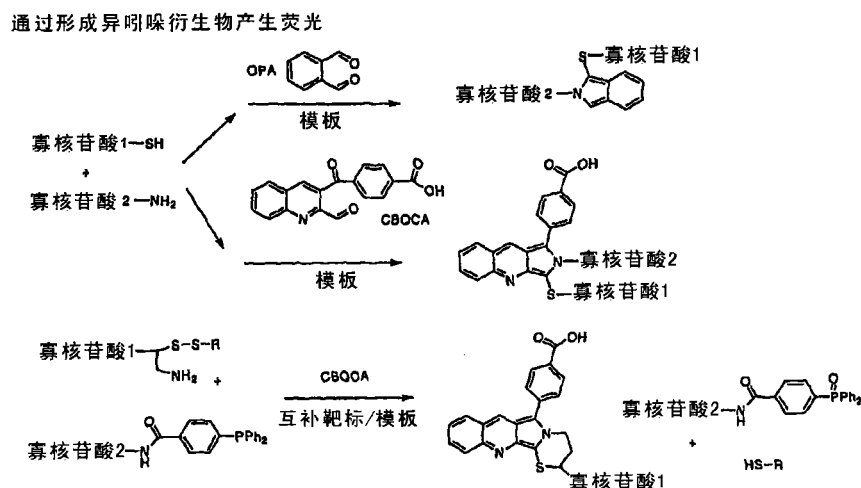
### 用荧光胺标记



## 异吲哚衍生物

也可使用密切接近的两个功能基团与衍生试剂的反应或诱捕。这两个功能基团可以在两个不同的寡核苷酸上并通过杂交事件装配，或它们可均在第一寡核苷酸上，其中第二寡核苷酸被用于将一种或多种基团暴露或转化为可以被衍生的种类。这在下文被阐述用于从 *o*-二醛和酮形成异吲哚，所述 *o*-二醛和酮通常被用作胺检测试剂。3-(4-羧基苯甲酰基)喹啉-2-羧基醛 (CBQCA)-衍生胺的检测限制被报导为在阿托摩尔 (attomole) 的范围内。



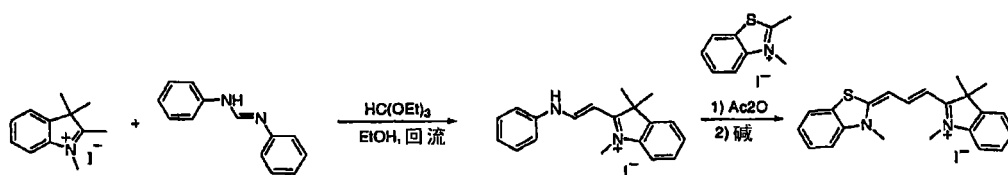


### 聚甲炔染料报告化学

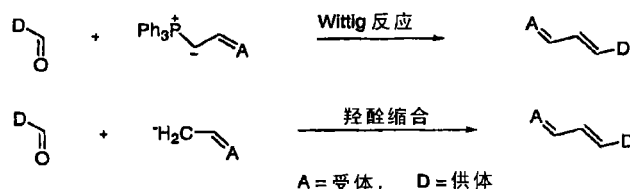
聚甲炔染料特征在于甲川(-CH=)基链和它们聚烯链相反端的电子供体和电子受体 (图 13, Zollinger, *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*, 3rd Edn., Verlag Helvetica Chimica Acta, Postfach, Switzerland, 2003)。用于聚甲炔染料 (如图 13 中所示) 的典型 A 和 D 端包括噻唑、吡咯、吡咯啉、吲哚、1,3,3-三甲基吲哚啉、四唑、嘧啶、吡啶、喹啉和高级融合 N-杂环或任何被取代的苄基环。如果末端均是含 N-原子的杂环, 则化合物称作花青。如果仅一个 N-原子是环体系的部分, 则化合物称作半花青。通过改变聚烯链中乙烯基的数量, 可以将聚甲炔染料的荧光发射波长从近 UV 改变为近 IR。末端基团也可提供用于细调的手段。

聚甲炔染料通常通过亲核和/或亲电取代、之前或之后去质子化来合成 (Raue, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th Edn., UCH, Weinheim 1990, Vol. A1 6, p487.)。下文流程图 1 是合成不对称花青染料的一个例子。2-甲基杂环四价盐与亲电子偶合试剂二苯基甲脒的一种等效物反应, 形成脒或半花青。第二杂环四价盐的分步亲核加成产生不对称的花青染料。N-酰化的半花青可在相对温和的条件下与固相上的第二杂环反应 (Mason, et al., *J. Org. Chem.* 2005, 76, 2939-2949)。

流程图 1: 不对称花青染料的一般合成途径



流程图 2: 通过 Wittig 反应和羟醛缩合产生聚甲炔染料



羟醛缩合已被频繁用于合成半花青染料(Hassner, et al, J. Org. Chem. 1984, 49, 2546-2551 ; Jedrzejewska, et al, Dyes and Pigments 2003, 58, 47-58; Szczepan, et al, Photochem. Photohiol. ScL 2003, 2, 1264-1271)。此处活性氢成分是四价盐, 同时糖基成分在芳环上具有氨基取代基。这种类型的羟醛缩合通常在有催化量碱的无水乙醇回流的条件下进行, 然而, 也已尝试将水性条件用于一些活性醛(碳酸钾稀释溶液, pH 8, 70°C, 24 hr;参考文献: Wang, et al, Dyes and Pigments 2003, 59, 163-172)

通过选择具有最佳化学活性的醛和带有活性氢的四价盐, 可将羟醛缩合用于在核酸模板反应条件下合成半花青染料。DNA 缀合的醛和带有活性氢的四价盐可用于本发明的检测体系中。本文描述的一般途径也可用于将这些前体与其它生物多聚体(如糖、肽和蛋白质)结合。在水性条件下通过羟醛缩合合成聚甲炔染料和通过核酸模板反应产生聚甲炔染料的一般方法是有用的报告化学。

Wittig 反应允许通过醛或酮与内鎓盐(得自磷盐)的反应制备链烯。到目前为止, 几乎没有通过 Wittig 反应合成半花青的文献(Zhmurova, et al., Zhurnal Organicheskoi Khimii, 1975, 11, 2160-2162.)。本文中, 醛和内鎓盐在含有苯的苯酚钠中回流 9 小时。

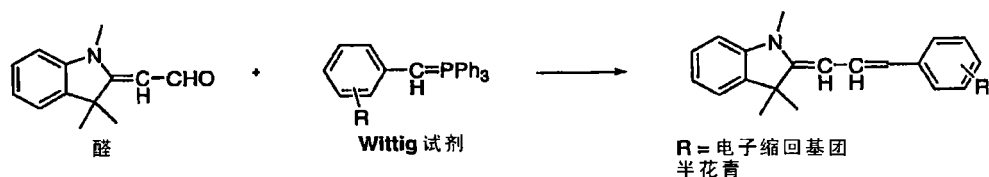
虽然已知 Wittig 试剂能够通过核酸模板化学与醛在温和的碱性条件下反应(Gartner, et al, J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 10304-10306), 但是通过核酸模板 Wittig 试剂前体合成聚甲炔染料的一般策略以及用于合成本文所

述 Wittig 试剂前体的方法是有用的报告化学。

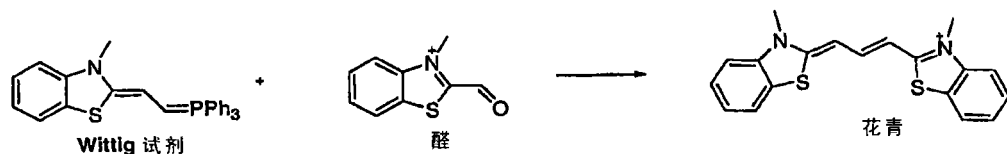
**(i) 通过在水性溶液中的 Wittig 反应合成聚甲炔染料**

通过将 Wittig 反应条件从无水的转变为水性介质，可达到快速反应和高产量用于合成聚甲炔染料。下文的流程图 3 和 4 提供了用于在水性条件下合成花青和半花青的两个独立例子。

流程图 3: 通过在水性条件中的 Wittig 反应合成半花青



流程图 4: 通过在水性条件中的 Wittig 反应合成花青



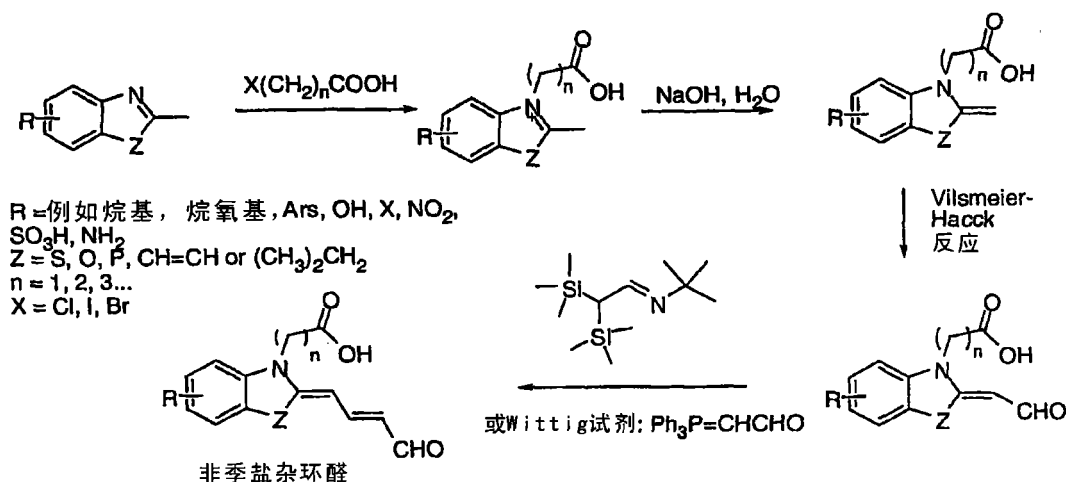
**(ii) 将前体附着到 DNA 上**

可通过酰胺键形成容易地将用于羟醛和 Wittig 反应的前体缀合至 DNA。首先合成酸性杂环或芳香族前体。然后将酸转化为活性 N-羟基琥珀酰亚胺酯，所述酯与带有胺功能团的 DNA 容易地反应。

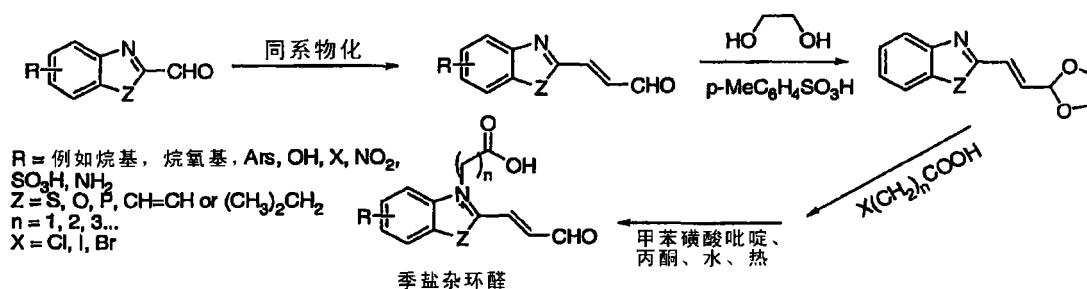
**(iii) 合成用于羟醛缩合和 Wittig 反应的醛前体**

例如，通过季铵化作用（如果涉及含氮的杂环（流程图 5 和流程图 6））或过氧化氢水解氰基（如果涉及氰基取代的芳族醛）将醛前体中的酸性功能团引入。如果需要被广泛缀合的醛，则二硅烷基化的叔丁基乙缩醛亚胺（butylacetaldimine）或 Wittig 试剂可重复地用于醛进入相应  $\alpha, \beta$ -enals 的两碳同系化（Bellassoued, et al., J. Org. Chem. 1993, 58, 2517-2522）。

流程图 5: 合成用于生物多聚体缀合的非季盐杂环醛前体



流程图 6: 合成用于生物多聚体缀合的季盐杂环醛前体

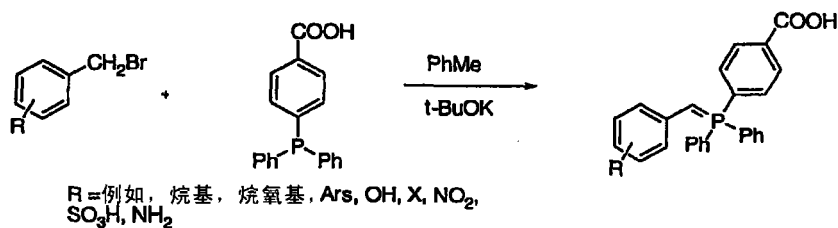


## (iv) 合成用于 Wittig 反应或 Horner 反应的前体

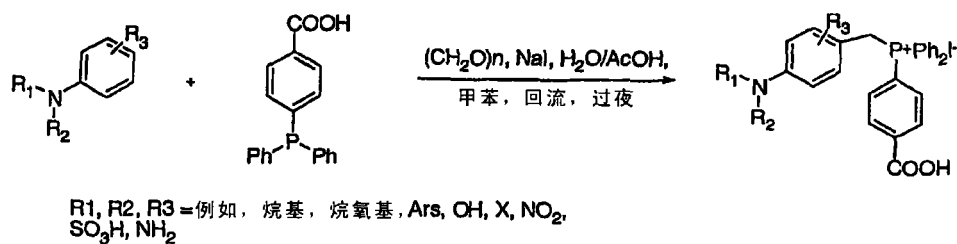
可通过苯基之一将杂环三苯基磷前体便利地连接至 DNA 上。流程图 7 提供了用于合成苄型正磷 (Wittig 试剂) 的一般方法。首先从相应的苄型醇合成反应性卤化物, 然后与 4-(二苯基磷基)苯甲酸反应形成磷盐。为了合成一些特异的氨基取代芳香族磷盐, 使用不分离卤化物试剂的便利的一锅(one-pot)方法 (流程图 8, Porrès, et al, Synthesis 2003, 10, 1541-1544)。然而, 几乎没有挑战是为了合成特异用于花青的 Wittig 试剂。首先, 难以获得杂环磷盐前体。其次, 对这些试剂与醛的反应性几乎一无所知。

流程图 9 描述了用于合成非季盐杂环正磷的一般方法。本文也提出了用于 Horner 反应的备选磷酸盐试剂 (流程图 10)。

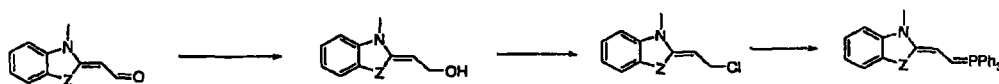
## 流程图 7: 合成苄型正磷



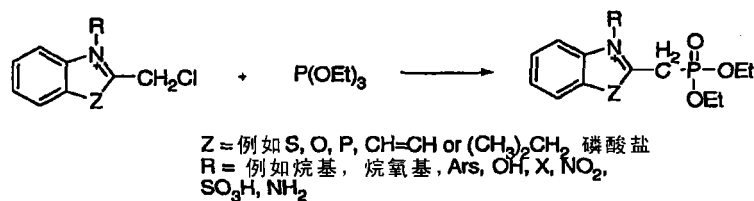
流程图 8: 合成氨基取代的芳香族磷盐



流程图 9: 合成非季盐杂环正磷试剂



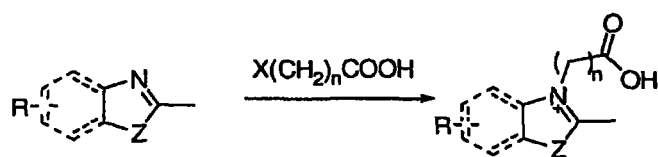
流程图 10: 合成季盐杂环磷酸盐试剂



## (v) 合成带有活性氢的杂环前体用于羟醛缩合

大部分带有活性氢（例如甲基）的杂环前体是可商业获得的。通过 N-季铵化可容易地将酸性功能团引入这些化合物中（流程图 11）。

流程图 11: 合成带有活性氢的杂环前体

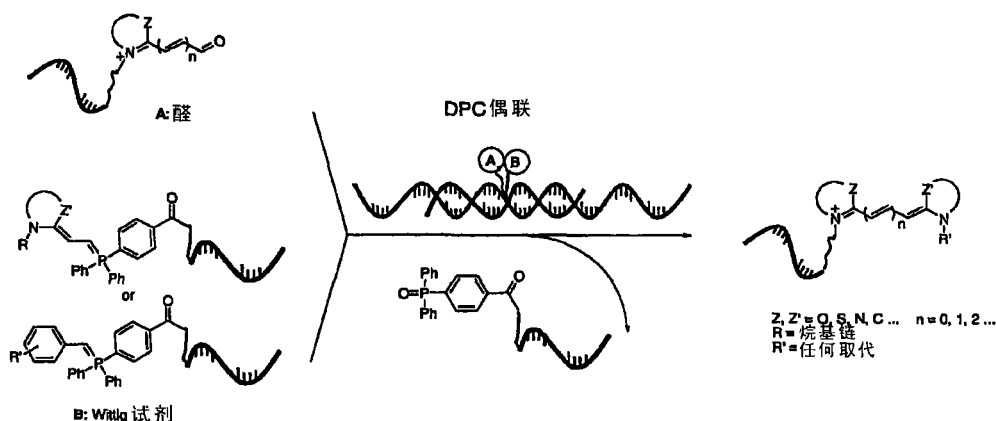


R = 例如烷基, 烷氧基, Ars, OH, X, NO<sub>2</sub>,  
 SO<sub>3</sub>H, NH<sub>2</sub>  
 Z = 例如 S, O, P, CH=CH or (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>  
 n = 1, 2, 3...  
 X = Cl, I, Br

### (vi) 通过核酸模板 Wittig 反应产生聚甲炔

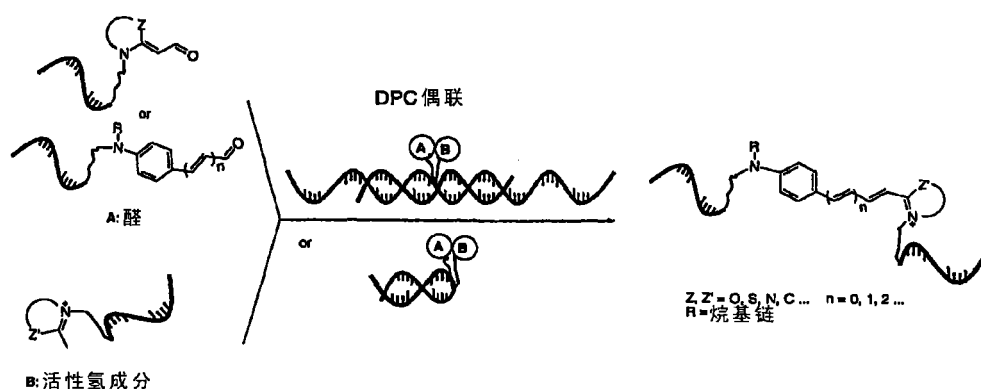
流程图 12 和流程图 13 阐述了通过核酸模板化学（包括 Wittig 反应和羟醛缩合）的聚甲炔染料合成。对于核酸模板 Wittig 反应，用与其它 DNA 链缀合的非荧光磷氧化物产生与荧光聚甲炔染料缀合的单链 DNA。对于羟醛缩合，将聚甲炔染料与两个 DNA 链共价连接。它们提供了有用的报告化学和用于体外和体内生物学体系均相荧光测定法的方法。

#### 流程图 12: 通过核酸模板 Wittig 反应产生聚甲炔染料



典型的末端基团噻唑、吡咯、吡咯啉、吲哚、1,3,3-Wittig 试剂三甲基吲哚啉、四唑、嘧啶、吡啶、喹啉和高级/所用的 N-杂环或任何被取代的苯基环

#### 流程图 13: 通过核酸模板羟醛缩合产生聚甲炔染料



典型的末端基团噻唑、吡咯、吡咯啉、吲哚、1,3,3-Wittig 试剂三甲基吲哚啉、四唑、嘧啶、吡啶、喹啉和高级/所用的 N-杂环或任何被取代的苯基环

可通过核酸模板反应产生多种聚甲炔染料（从近 UV 到近 IR）。因为核酸模板化学是以 Watson-Crick 碱基配对为基础的，所以可通过使用与不同聚甲炔染料前体结合的多 DNA 探针来建立多染料体系。

使用核酸模板化学的用于生物检测的化学反应

#### (i) 偶联反应

反应基团可以是例如亲电体（例如乙酰基、酰胺、酰基氯、酯、腈、亚胺）、亲核体（例如胺、羟基、硫醇）、催化剂（例如有机金属催化剂）或侧链。

#### (ii) 功能基团转化

可使用核酸模板化学影响功能基团转化，所述转化(i)暴露或(ii)互变偶联反应中使用的功能团，(iii)反应基团中存在的功能团互换。

#### (iv) 反应条件

核酸模板化学可以发生在水性或非水性（即有机）溶液中，或一种或多种水性和非水性溶液的混合物中。优选地，优化反应条件，以适应反应基团的性质、所使用的寡核苷酸和样品的检测条件。

#### (iv) 化学反应的种类

可考虑用在核酸模板反应中使用已知的化学反应，例如如 March's Advanced Organic Chemistry, Organic Reactions, Organic Syntheses, 有机

教科书，如 Journal of the American Chemical Society、Journal of Organic Chemistry、Tetrahedron 等的杂志，和 Carruther's Some Modern Methods of Organic Chemistry 中列出的反应。所选择的反应应当与核酸（如 DNA 或 RNA）相符，或与检测环境相符。

用于核酸模板化学的反应包括例如取代反应、碳-碳键形成反应、消除反应、酰化反应和其它反应。用于本发明的脂肪族亲核取代反应的阐述性而非详尽的列表包括，例如  $S_N2$  反应、 $S_N1$  反应、 $S_{Ni}$  反应、烯丙型重排、在脂肪族三角型碳处的亲核取代和在乙烯型碳处的亲核取代。

用氧亲核体的特异脂肪族亲核取代反应包括卤烃类水解、*gem*-二卤化物的水解、1,1,1-三卤化物水解、烷基酯或无机酸的水解、重氮基酮的水解、缩醛和烯醇醚的水解、环氧化物的水解、酰卤水解、酸酐水解、羧酸酯水解、酰胺水解、用烷基卤化物烷基化（Williamson 反应）、环氧化物形成、用无机酯烷基化、用重氮化合物烷基化、醇脱水、酯交换、环氧化物醇解、用镱盐烷基化、甲硅烷羟基化、酰卤醇解、酸酐醇解、羧酸形成酯、羧酸酯醇解（酯交换）、酰胺醇解、羧酸盐烷基化、用醋酸酐切割醚、用重氮化合物烷基化羧酸、用酰卤酰化羧酸、用羧酸酰化羧酸、氧镱盐形成、过氧化物和氢过氧化物的制备、无机酯的制备（例如亚硝酸酯、硝酸酯、磺酸酯）、从胺制备醇以及混合的有机-无机酸酐制备。

使用硫黄亲核体（其趋向于是比其氧类似物更好的亲核体）的特异的脂肪族亲核取代反应包括例如在烷基碳上用 SH 攻击形成硫醇、在烷基碳上用 S 攻击形成硫醚、在酰基碳上用 SH 或 SR 攻击、二硫化物形成、Bunte 盐形成、亚磺酸盐的烷基化和烷基硫氰酸盐的形成。

用氮亲核体的脂肪族亲核取代反应包括，例如胺的烷基化、胺的 N-芳基化、用氨基取代羟基、氨基交换、转酰胺基作用、用重氮化合物烷基化胺、环氧化物的氨基化、氧杂环丁烷的氨基化、氮丙啶的氨基化、烃类的氨基化、异氰化物的形成、通过酰卤将胺酰化、通过酸酐将胺酰化、通过羧酸将胺酰化、通过羧酸酯将胺酰化、通过酰胺将胺酰化、通过其它酸衍生物将酰胺酰化、酰胺和二酰亚胺的 N-烷基化或 N-芳基化、从环氧化物形成氮丙啶、硝基化合物的形成、叠氮化物的形成、异氰酸盐和异硫氰酸



盐的形成以及氮化偶氮基化合物的形成。

用卤素亲核体的脂肪族亲核取代反应包括，例如用烷基碳攻击、卤化物交换、从硫酸和磺酸形成烷基卤化物、从醇形成烷基卤化物、从醚形成烷基卤化物、从环氧化物形成卤代醇、用碘化锂切割羧酸酯、将重氮基酮转化为  $\alpha$ -卤素酮、将胺转化为卤化物、将叔胺转化为氨基氰（von Braun 反应）、从羧酸形成酰卤以及从酸衍生物形成酰卤。

使用氢作为亲核体的脂肪族亲核取代反应，例如烷基卤化物的还原，甲苯磺酸盐、其它磺酸盐和类似化合物的还原，醇的氢解，酯的氢解（Barton-McCombie 反应），羧基酯的还原性切割，C-N 键的还原，脱硫，酰卤的还原，羧酸、酯和酸酐到醛的还原以及酰胺到醛的还原。

尽管某些碳亲核体用于本发明的某些实施方案可能过于亲核和/或碱性，但是使用碳亲核体的脂肪族亲核取代反应包括，例如与甲硅烷偶联，烷基卤化物的偶联（Wurtz 反应），烷基卤化物和磺酸酯与组 I(I A)和 II(II A)有机金属试剂的反应，烷基卤化物和磺酸酯与有机铜酸盐的反应，烷基卤化物和磺酸酯与其它有机金属试剂的反应，与卤化物底物的烯丙型和丙炔型偶联，有机金属试剂与硫酸和磺酸酯、亚砷和砷的偶联，涉及醇的偶联，有机金属试剂与羧酸酯的偶联，有机金属试剂与含酯键化合物的偶联，有机金属试剂与环氧化物的反应，有机金属试剂与氮丙啶的反应，在带有活性氢的碳上烷基化，酮、腈和羧酸酯的烷基化，羧酸盐的烷基化，在位置  $\alpha$  上对杂原子的烷基化（1,3-二噻烷的烷基化），二氢-1,3-噁嗪的烷基化（醛、酮和羧酸的 Meyers 合成），用三烷基硼烷烷基化，在炔基碳上烷基化，制备亚硝酸盐，将烷基卤化物直接转化为醛和酮，将烷基卤化物、醇或烃转化为羧酸及其衍生物，用有机金属化合物将酰卤转化为酮，用有机金属化合物将酸酐、羧酸酯或酰胺转化为酮，酰卤的偶联，在带有活性氢的碳上酰化，通过羧酸酯将羧酸酯酰化（Claisen and Dieckmann 缩合），用羧酸酯将酮和亚硝酸盐酰化，羧酸盐酰化，制备酰腈，和制备重氮基酮，酮脱羧。

涉及在磺酰硫原子上进行亲核攻击的反应也用于本发明，其包括，例如磺酸衍生物水解（通过 OH 攻击），磺酸酯形成（通过 OR 攻击），磺

胺类形成（通过氮攻击），磺酰卤化物形成（通过卤化物攻击），磺酰氯化物的还原（通过氢攻击）以及砷的制备（通过碳攻击）。

芳香族亲电取代反应也可用于核苷酸模板化学。氢交换反应是使用氢作为亲电体的芳香族亲电取代反应的例子。使用氮亲电体的芳香族亲电取代反应包括，例如硝化和硝基脱氢化、亚硝基脱氢化的亚硝化、重氮偶联、直接引入重氮基和氨基化或氨基脱氢化。使用硫亲电体的这类反应包括，例如磺化、硫脱氢化、卤磺化、卤磺脱氢化、硫化和磺酰化。使用卤素亲电体的反应包括例如卤化和卤脱氢化。用碳亲电体的芳香族亲电取代反应包括例如 Friedel-Crafts 烷基化、烷基化、烷基脱氢化、Friedel-Crafts 芳基化（Scholl 反应）、Friedel-Crafts 酰化、用二取代的甲酰胺甲酰化、用氰化锌和 HCl 甲酰化（Gatterman 反应）、用氯仿甲酰化（Reimer-Tiemann 反应）、其它甲酰化、甲酰基脱氢化、用羰基卤化物羧基化、用二氧化碳羧基化（Kolbe-Schmitt 反应）、用异氰酸盐酰胺化、N-烷基氨甲酰基-脱氢化、羟烷基化、羟烷基脱氢化、醛和酮的环化脱水、卤烷基化、卤脱氢化、氨基烷基化、酰胺基烷基化、二烷基氨基烷基化、二烷基氨基脱氢化、硫代烷基化、用腈酰化（Hoesch 反应）、氰化和氰脱氢化。使用氧亲电体的反应包括例如羟基化和羟基脱氢化。

重排反应包括例如 Fries 重排、硝基迁移、亚硝基迁移（Fischer-Hepp 重排）、芳基偶氮基迁移、卤素迁移（Orton 重排）、烷基迁移等。芳香族环上的其它反应包括 Friedel-Crafts 烷基化的逆转、芳族醛的脱羧、芳香族酸的脱羧、Jacobsen 反应、脱氧、脱磺酸基、氢脱磺酸基、脱卤、氢脱卤，和有机金属化合物的水解。

脂肪族亲电取代反应也是有用的。使用  $S_E1$ 、 $S_E2$ （前面）、 $S_E2$ （背面）、 $S_{Ei}$ 、额外消除和环状机制的反应可以用于本发明。用氢作为离去基团的该类型反应包括，例如氢交换（氘核脱氢，氘化物），双键迁移和酮式-烯醇式互变异构化。使用卤素亲电体的反应包括，例如醛和酮的卤化、羧酸和酰卤的卤化以及亚砷和砷的卤化。使用氮亲电体的反应包括，例如脂肪族重氮偶联、在带有活性氢的碳上亚硝基化、直接形成重氮化合物、酰胺转化为  $\alpha$ -叠氮酰胺、在激活的位置直接氨基化和通过氮宾插入。使用

硫或硒亲电体的反应包括，例如亚磺酰化、磺化以及酮与羧酸酯的硒化。带有碳亲电体的反应包括，例如在脂肪族碳上的酰化，醛转化为  $\beta$ -酮酸酯或酮，氰化，氢脱氢化，烃类烷基化，Stork 烯胺反应以及通过卡宾 (carbene) 插入。与金属亲电体的反应包括，例如用有机金属化合物金属化，用金属和强碱金属化，和将烯醇式盐转化为甲硅烷基烯醇醚。使用金属作为离去基团的脂肪族亲电取代反应包括，例如用氢取代金属，有机金属试剂和氧之间的反应，有机金属试剂和过氧化物之间的反应，三烷基硼烷氧化为硼酸盐，Grignard 试剂转化为含硫化合物，卤脱金属化，有机金属化合物转化为胺，有机金属化合物转化为酮、醛、羧酸酯和酰胺，氢脱金属化，用金属金属交换，用金属卤化物金属交换，用有机金属化合物金属交换，还原烷基卤化物，金属脱卤，用来自有机金属化合物的金属取代卤素，脂肪族酸脱羧，切割醇盐，用酰基取代羧基， $\beta$ -酮酸酯和  $\beta$ -二酮的碱性切割，卤仿反应，可烯醇化酮的切割，Haller-Bauer 反应，烃类切割，脱氰化以及氢脱氰化。在氮上的亲电取代反应包括例如重氮化、腈转化为叠氮化物、N-亚硝基化、N-亚硝基脱氢化、胺转化为偶氮化合物、N-卤化、N-卤脱氢化、胺与一氧化碳的反应以及胺与二氧化碳的反应。

芳香族亲核取代反应也可用于本发明。可以使用例如通过  $S_NAr$  机制、 $S_N1$  机制、苯炔机制、 $S_{RN}1$  机制或其它机制进行的反应。使用氧亲核体的芳香族亲核取代反应包括，例如羟基脱卤、磺酸盐的碱熔或 OR 或 Oar 的取代。使用含硫亲核体的反应包括，例如通过 SH 或 SR 取代。使用含氮亲核体的反应包括，例如通过  $NH_2$ 、NHR 或  $NR_2$  取代，和通过氨基取代羟基。使用卤亲核体的反应包括，例如引入卤素。使用卤素作为亲核体的芳香族亲核取代反应包括，例如还原酚类和酚酯和醚以及还原卤素和硝基化合物。使用含碳亲核体的反应包括，例如 Rosenmund-von Braun 反应，有机金属化合物与芳基卤化物、醚和羧酸酯的偶联，在含活性氢的碳上芳基化，芳基底物转化为羧酸、其衍生物、醛和酮以及 Ullmann 反应。使用氢作为离去基团的反应包括，例如烷基化、芳基化和氮杂环的氨基化。使用  $N_2^+$  作为离去基团的反应包括，例如羟基脱重氮化、用含硫基团取代、碘脱重氮化以及 Schiemann 反应。重排反应包括例如 von Richter 重

排、Sommelet-Hauser 重排、芳基羟胺重排和 Smiles 重排。

尽管应当仔细选择核苷酸模板化学中使用的自由基反应以避免核苷酸模板的修饰或切割，但是也可使用涉及三个自由基的反应。根据该限制，自由基取代反应可用于本发明。具体的自由基取代反应包括，例如用卤素取代，在烷基碳上卤化，烯丙型卤化，苄型卤化，醛的卤化，在脂肪族碳上羟基化，在芳香族碳上羟基化，将醛氧化为羧酸，环状醚形成，氢过氧化物形成，过氧化物形成，酰氧基化，酰氧基脱氢化，氯磺酰化，烃类硝化，醛直接转化为酰胺，在烷基碳上酰胺化和氨基化，在易感位置上单一偶联，炔偶联，通过重氮盐将芳香族化合物芳基化，通过重氮盐将激活的烯烃芳基化（Meerwein 芳基化），通过有机钯化合物将烯烃芳基化和烷基化（Heck 反应），通过 vinyltin 化合物将烯烃芳基化和烷基化（Stille 反应），通过过氧化物将芳香族化合物烷基化和芳基化，芳香化合物的光化学芳基化，烷基化，酰化，和氮杂环的烷氧羰基化。其中  $N_2^+$  是离去基团的具体反应包括，例如用氢取代重氮基，用氯或溴取代重氮基，硝基脱重氮基化，用含硫基团取代重氮基，用重氮盐芳基二聚，重氮盐的甲基化，重氮盐的乙烯化，重氮盐的芳基化以及将重氮盐转化为醛、酮或羧酸。使用金属作为离去基团的自由基取代反应，包括例如 Grignard 试剂的偶联、硼烷的偶联和其它有机金属试剂的偶联。用卤素作为离去基团的反应包括在内。使用多种离去基团的其它自由基取代反应包括，例如使用 Raney Nickel 的脱硫、硫化物转化为有机锂化合物、脱羧二聚（Kolbe 反应）、Hunsdiecker 反应、脱羧烯丙基化，和醛与酰卤的脱羰。

涉及碳-碳多重键加成的反应也可用于核苷酸模板化学。可用于加成反应的任何机制包括，例如亲电加成、亲核加成、自由基加成和环状机制。也可使用涉及向缀合体系加成的反应。也可使用向环丙烷环的加成。具体的反应包括，例如异构化，加成卤化氢，双键水合，三键水合，醇加成，羧酸加成， $H_2S$  和硫醇加成，氨和胺加成，酰胺加成，叠氮酸加成，双键和三键的氢化，双键和三键的其它还原，缀合体系的双键和三键的还原，芳环氢化，环丙烷的还原性切割，硼氢化，其它氢金属化，烃类加成，烯烃和/或炔到烯烃和/或炔的加成（例如 pi-阳离子环化反应，氢-链烯基加

成), ene 反应, Michael 反应, 将有机金属化合物加成为不与羰基缀合的双键和三键, 将两个烷基加成为炔, 有机金属化合物 1,4-加成为激活的双键, 硼烷加成为激活的双键, 锡和汞氢化物加成为激活的双键, 激活的双键和三键的酰化, 醇、胺、羧酸酯、醛等的加成, 双键和三键的羰基化, 氢羧基化, 加氢甲酰基化, 醛加成, HCN 加成, 甲硅烷加成, 自由基加成, 自由基环化, 双键和三键的卤化(卤素、卤素加成), 卤素内酯化作用, 卤素内酰胺化作用, 次卤酸和次卤酸盐的加成(卤素、氧加成), 含硫化合物的加成(卤素、硫加成), 卤素和氨基的加成(卤素、氮加成), NOX 和 NO<sub>2</sub>X 的加成(卤素、氮加成), XN<sub>3</sub> 的加成(卤素、氮加成), 烷基卤化物的加成(卤素、碳加成), 酰基卤化物的加成(卤素、碳加成), 羟基化(氧、氧加成)(例如与 OsO<sub>4</sub> 的不对称二羟基化反应), 芳环的二羟基化, 环氧化(氧、氧加成)(例如 Sharpless 不对称环氧化), 二烯的光氧化(氧、氧加成), 羟基亚磺酰化(氧、硫加成), 羟氨基化(氧、氮加成), 二氨基化(氮、氮加成), 氮丙啶形成(氮加成), 氨基亚磺酰化(氮、硫加成), 酰基酰氧基化和酰基酰胺化(氧、碳或氮、碳加成), 1,3-双极加成(氧、氮、碳加成), Diels-Alder 反应, 杂原子 Diels-Alder 反应, 所有碳 3+2 环加成, 烯烃二聚化, 卡宾和卡宾体加成为双键和三键, 炔的三聚化和四聚化, 和其它环加成反应。

除了涉及碳-碳多重键加成的反应外, 碳-杂多重键的加成反应也可用于核苷酸模板化学。示例性的反应包括, 例如水到醛和酮的加成(水合物的形成), 碳-氮双键水解, 脂肪族硝基化合物的水解, 腈水解, 醇和硫醇加成为醛和酮, 醇的还原性烷基化, 醇加成为异氰酸盐, 腈醇解, 黄原酸盐形成, H<sub>2</sub>S 和硫醇加成为羰基化合物, 重亚硫酸盐加成产物的形成, 胺加成为醛和酮, 酰胺加成为醛, 氨或胺的还原性烷基化, Mannich 反应, 胺加成为异氰酸盐, 氨或胺加成为腈, 胺加成为二硫化碳和二氧化碳, 胍衍生物加成为羰基化合物, 脒形成, 醛转化为腈, 从醛和酮形成双-二卤化物, 醛和酮还原为醇, 碳-氮双键还原, 腈还原为胺, 腈还原为醛, Grignard 试剂和有机锂试剂加成为醛和酮, 其它有机金属物加成为醛和酮, 三烷基烯丙基甲硅烷加成为醛和酮, 缀合的烯烃加成为醛(Baylis-

Hillman 反应), Reformatsky 反应, 用有机金属化合物将羧酸盐转化为酮, Grignard 试剂加成为酸衍生物, 有机金属化合物加成为  $\text{CO}_2$  和  $\text{CS}_2$ , 有机金属化合物加成为  $\text{C}=\text{N}$  化合物, 卡宾和重氮烷加成为  $\text{C}=\text{N}$  化合物, Grignard 试剂加成为腈和异氰酸盐, Aldol 反应, Mukaiyama Aldol 反应和相关反应, 羧酸酯或酰胺和醛或酮之间的 Aldol 型反应, Rnoevenagel 反应 (例如 Nef 反应、Favorskii 反应), Peterson 链烯基化反应, 活性氢化合物加成为  $\text{CO}_2$  和  $\text{CS}_2$ , Perkin 反应, Darzens 缩水甘油酸酯缩合, Tollens' 反应, Wittig 反应, Tebbe 链烯基化, Petasis 链烯基化, 备选的链烯基化, Thorpe 反应, Thorpe-Ziegler 反应, 甲硅烷的加成, 羟腈的形成, HCN 加成为  $\text{C}=\text{N}$  和  $\text{C}=\text{N}$  键, Prins 反应, 苯偶姻缩合, 自由基加成为  $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}=\text{S}$ 、 $\text{C}=\text{N}$  化合物, Ritter 反应, 醛和酮的酰化, 醛加成为醛, 异氰酸盐加成为异氰酸盐 (碳二亚胺的形成), 羧酸盐转化为腈, 从醛和酮形成环氧化物, 环硫化物和环砜的形成,  $\beta$ -内酯和氧杂环丁烷的形成 (Paterno-Büchi 反应),  $\beta$ -内酰胺的形成等等。涉及异氰化物加成的反应包括将水加成为异氰化物、Passerini 反应、Ug 反应, 和金属化的醛亚胺形成。

包括  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  消除的消除反应以及挤出 (extrusion) 反应, 可以使用核苷酸模板化学进行, 尽管应当考虑所使用的试剂和条件的强度。优选的消除反应包括通过  $\text{E1}$ 、 $\text{E2}$ 、 $\text{E1cB}$  或  $\text{E2C}$  机制进行的反应。示例性的反应包括, 例如其中从一侧去除氢的反应 (例如醇脱水、将醚切割为烯烃、Chugaev 反应、酯分解、季铵氢氧化物的切割、用强碱切割季铵盐、切割氧化胺、酮-内鎓盐的热解、甲苯-对- sulfonyl 胺的分解、亚砷的切割、氧化硒的切割、乙磺酰 (sulforne) 的切割、酰卤的脱氢卤化、硫酰卤化物的脱氢卤化、硼烷的消除、烯转化为炔、酰卤的脱羰化), 其中离去原子均不是氢的反应 (例如邻位二醇的脱氧、环状硫代羧酸盐的切割、环氧化物转化为环硫化物和烯、Ramberg-Backlund 反应、氮丙啶转化为烯、邻位二卤化物的脱卤、 $\alpha$ -卤素酰卤的脱卤, 和卤素与杂基团的消除), 碎裂反应 (即其中碳是正离去基团或离电体的反应, 例如  $\gamma$ -氨基和  $\gamma$ -羟基卤化物的碎裂、1,3-二醇的碎裂、 $\beta$ -羟基羧酸的脱羧、 $\beta$ -内酯的脱羧、 $\alpha,\beta$ -环氧胺的碎裂、从桥接的二环化合物消除  $\text{CO}$ , 和从桥接的二环化合物消除

CO<sub>2</sub>), 其中形成 C≡N 或 C=N 键的反应(例如醛肟或类似化合物的脱水、酮肟转化为腈、未取代酰胺的脱水, 和 N-烷基甲酰胺到异氰化物的转化), 其中形成 C=O 键的反应(例如 β-羟基烯的热解), 和其中形成 N=N 键的反应(例如消除产生重氮基烯)。挤出反应包括例如从吡唑啉挤出 N<sub>2</sub>、从吡唑挤出 N<sub>2</sub>、从三唑啉挤出 N<sub>2</sub>、挤出 CO、挤出 CO<sub>2</sub>、挤出 SO<sub>2</sub>、Styryl 合成和通过双倍挤出的烯合成。

重排(包括例如亲核重排、亲电重排、质子转移重排和自由基重排)也可使用核苷酸模板化学进行。1,2 重排和非 1,2 重排均可进行。示例性的反应包括例如 R、H 和 Ar 的碳到碳迁移(例如 Wagner-Meerwein 和相关反应、Pinacol 重排、环扩展反应、环收缩反应、醛和酮的酸催化重排、二烯酮-酚重排、Favorskii 重排、Arndt-Eistert 合成、醛同系化和酮同系化), 其它基团的碳到碳迁移(例如卤素、羟基、氨基等的迁移; 硼迁移; 和 Neber 重排), R 和 Ar 的碳到氮迁移(例如 Hofmann 重排、Curtius 重排、Lossen 重排、Schmidt 反应、Beckman 重排、Stieglitz 重排, 和相关重排), R 和 Ar 的碳到氧迁移(例如 Baeyer-Villiger 重排和氢过氧化物重排), 氮到碳、氧到碳和硫到碳迁移(例如 Stevens 重排和 Wittig 重排), 硼到碳迁移(例如硼烷转化为醇(伯醇或其它)、硼烷转化为醛、硼烷转化为羧酸、乙烯硼烷转化为烯、从硼烷和炔化物形成炔、从硼烷和炔化物形成烯, 和从硼烷和炔化物形成酮), 电环重排(例如环丁烯和 1,3-环己二烯重排, 或茛菪类转化为菲), σ 迁移重排(例如氢的(1j)σ 迁移重排、碳的(1j)σ 迁移重排、乙烯环丙烷转化为环戊烯、Cope 重排、Claisen 重排、Fischer 吲哚合成、(2,3)σ 迁移重排, 和联苯胺重排), 其它环状重排(例如烯的易位、二-π-甲烷和相关重排, 和 Hofmann-Löffler 及相关反应), 和非环状重排(例如氢化物移位、Chapman 重排、Wallach 重排和 dyotropic 重排)。

氧化和还原反应也可使用核苷酸模板化学进行。示例性的反应可包括, 例如直接电子转移、氢化物转移、氢原子转移、酯中间产物形成、置换机制或加成-消除机制。示例性的氧化包括例如氢消除(例如六元环芳构化、脱氢产生碳-碳双键、醇氧化或脱氢为醛和酮、酚和芳族胺氧化为醌、

酮氧化切割、醛氧化切割、醇氧化切割、臭氧解、双键和芳环氧化切割、芳香族侧链氧化、氧化脱羧，和双脱羧），涉及用氧置换氢的反应（例如将亚甲基氧化为羰基，将亚甲基氧化为 OH、CO<sub>2</sub>R 或 OR，芳基甲烷氧化，醚氧化为羧酸酯和相关的反应，芳香族烃氧化为醌，胺或硝基化合物氧化为醛、酮或二卤化物，伯醇氧化为羧酸或羧酸酯，烯氧化为醛或酮，胺氧化为亚硝基化合物和羟胺，伯胺、肟、叠氮化物、异氰酸盐或亚硝基化合物氧化为硝基化合物，硫醇和其它含硫化合物氧化为磺酸），向底物加成氧的反应（例如炔氧化为  $\alpha$ -二酮、叔胺氧化为氧化胺、硫酯氧化为亚砷和砷，和羧酸氧化为过氧酸）以及氧化偶联反应（例如涉及碳负离子的偶联、甲硅烷基烯醇醚或烯醇式锂盐的二聚化以及将硫醇氧化为二硫化物）。

示例性的还原反应包括，例如涉及用氢置换氧的反应（例如将羰基还原为醛和酮中的亚甲基、将羧酸还原为醇、将酰胺还原为胺、将羧酸酯还原为醚、将环酞还原为内酯和将酸衍生物还原为醇、将羧酸酯还原为醇、将羧酸和酯还原为烃、完全还原环氧化物、将硝基化合物还原为胺、将硝基化合物还原为羟胺、将亚硝基化合物和羟胺还原为胺、将肟还原为伯胺或氮丙啶、将叠氮化物还原为伯胺、含氮化合物的还原，和将磺酰卤化物和磺酸还原为硫醇），从底物去除氧（例如氧化胺和氧化偶氮化合物的还原、亚砷和砷的还原、氢过氧化物和过氧化物的还原，和脂肪族硝基化合物还原为肟或脞），包括切割的还原（例如胺和酰胺的脱烷基化，偶氮、氧化偶氮和氢化偶氮还原为胺，和二硫化物还原为硫醇），还原性偶联反应（例如醛和酮双分子还原为 1,2-二醇、醛或酮双分子还原为烯、偶姻酯缩合、硝基化合物还原为氧化偶氮化合物，和硝基化合物还原为偶氮化合物），和有机底物既被氧化又被还原的还原（例如 Cannizzaro 反应、Tishchenko 反应、Pummerer 重排，和 Willgerodt 反应）。

下面将详细讨论核酸模板化学的多个方面和一般性方面。额外的信息可见 Liu 等的 U.S.专利申请公开号 Nos. 2004/0180412 A1 (USSN 10/643,752) 和 Liu 等的 2003/0113738 A1 (USSN 10/101,030)。

本文公开的本发明包括的信号产生方法具有大量优点。例如，因为附



着在探针上的反应性部分最初不具有可检测的性质，直到发生杂交事件（或在非核酸靶标的情况下，杂交事件后是结合事件）和后续反应，所以使用探针和根据本发明化学的测定法具有较低背景到无背景，和从而较高的信号-噪声比。这随后提供了具有高灵敏度和广动力范围的测定法的实践优点。因此，这样做的潜力使更小量的待分析物可以使用更简单和成本更低的检测仪器被检测。通过该机制可支持许多不同类型的信号产生（荧光产生、荧光释放、辅因子释放等）。

一个额外重要的实践优点是可将测定法构建为均相的。均相测定法不需要或几乎不需要样品制备，它们也不需要待分析物被固定在固体载体上用于试剂移动、背景还原、溶剂或缓冲液改变和/或检测的目的，这是非均相测定法典型需要的。因为高  $T_m$  双链 DNA 的形成是均相反应，因此将荧光团前体置于寡核苷酸上支持用于靶标结合的整个均相测定法。双链结构自身的形成几乎是瞬时的。

本发明的另一实践优点是探针和试剂可直接加入样品，可监测得到的溶液中信号的产生而不经任何其它操作（例如附着于固体载体、洗涤等）。因此该实验提供可在非实验室装置中进行的非常简单的测定法，不需昂贵或笨重的仪器。

因为获得高  $T_m$  的双链 DNA 通常需要使用两个单独的位点（其位于寡核苷酸上与间隔臂相当的距离）结合物，所以可以获得非常高的结合特异性。

另外，使用两个结合物（其自身通过退火 DNA 结合）应当导致增强的亲和力（亲合力）效应。因此，两个弱结合物应当限制增强的结合亲合力。两个结合物（其均是弱的但是具有不同的特异性（与不同位点结合））应当显示增强的亲合力和特异性。这对低水平检测（仅可获得弱结合物时）来说是高度有利的。

下述实施例含有重要的额外信息、示例和指导，所述信息、例证和指导在本发明的多种实施方案和等价物中可被改变，以适应对本发明的实践。根据以下的实施例可更充分地理解本发明的实践，所述实施例在本文存在仅用于阐述的目的而不应当被解释为以任何方式限制。

## 实施例

### 实施例 1: 通过杂交诱导的叠氮基香豆素还原产生荧光

使用标准亚磷酰胺化学制备五种寡核苷酸 (Glen Research, Sterling VA, USA)。使用 5'-氨基-修饰剂制备带有 5'氨基的寡核苷酸 (Oligo2 和 Oligo6)，使用 3'-氨基-修饰剂 C7 CPG 制备带有 3'氨基的寡核苷酸(Glen Research, Sterling VA, USA)

Oligo 1 5'-GTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGA-S' (SEQ. ID. NO. 19)

Oligo 2 5'-H<sub>2</sub>N-AGCTCCAACCTACCAC-3' (SEQ. ID. NO. 20)

Oligo 4 5'-GTGGTAGTTGGAGCT-NH<sub>2</sub>-3' (SEQ. ID. NO. 21)

Oligo 5 5'-TCTTGCCTACGCCAC-NH<sub>2</sub>-3' (SEQ. ID. NO. 22)

Oligo 6 5'-H<sub>2</sub>N-AGATCCCCTAGCAC-3' (SEQ. ID. NO. 23)

从合成载体上去除 Oligo1、Oligo4 和 Oligo5，并通过反相 HPLC 对其纯化。Oligo2 和 Oligo6 与树脂结合时其氨基被转化为它们的三苯基磷衍生物，对其进行纯化并分离 (Sakurai et al, J. Amer. Chem. Soc. (2005) Vol. 127, ppl 660-1667)，分别得到 Oligo2-TPP 和 Oligo6-TPP。

通过将每个寡核苷酸与 7-叠氮基-4-甲基香豆素-3-醋酸的 N-羟基琥珀酰亚胺酯反应，将带有氨基的 Oligo4 和 Oligo5 转化为它们的叠氮基香豆素衍生物 (分别为 Oligo4- AzC 和 Oligo5-AzC) (Thevenin et al., Eur. J. Biochem (1992) Vol. 206, pp-471-477)。按下文所述来进行反应: 通过向 5 uL 的 N-甲基吗啉中添加 1 uL 的三氟醋酸制备缓冲液，向所述缓冲液中添加 10 uL 含有 6.6 nmol Oligo4 或 Oligo5 的水，随后添加 30 uL 的 0.16 M 香豆素 NHS 酯在二甲基酰胺中的溶液。允许每个反应在室温下进行 2 小时，其中添加 50 uL 的 0.1 M 水性三乙基醋酸铵。将混合物加在 NAP-5 脱盐柱 (Amersham Biosciences, Piscataway NJ USA) 上，并根据制造商说明进行洗脱，通过 RP-HPLC 纯化洗脱液得到 Oligo4-AzC 和 Oligo5-AzC，产量分别为 77% 和 70%。通过 Maldi-ToF 质谱验证产物身份。

为了证明荧光的杂交特异产生，令互补和非互补寡核苷酸 (其带有叠氮基香豆素和三苯基磷部分) 的多种组合在室温下于缓冲液中反应，所述

缓冲液由 30% 水性甲酰胺、50 mM NaCl 和 10 mM 磷酸钠组成，pH 7.2。使用 Victor Multilabel 荧光计 (EG&G Wallach, Turku Finland) 随时间监测反应进展，所述荧光计被设置为在 360 nm 处激发样品和在 455 nm 处监测光发射。

图 14 显示，当 Oligo4-AzC 和 Oligo2-TPP 组合为分别 200 nM 和 400 nM 的终浓度时，观察到荧光的快速增强。在该图中 004 表示 Oligo4-AzC，002 表示 Oligo2-AzC，006 表示 Oligo6-TPP。当将 Oligo6-TPP 取代为 Oligo2-TPP 时，不产生荧光。当 Oligo2-TPP 以其碱基配对能力与 Oligo4-AzC 完全互补时，Oligo6-TPP 并非如此，因为它含有三个错配的核苷酸。该结果支持了下述结论：荧光的产生是由于 Oligo2-TPP 与 Oligo4-AzC 杂交从而促进所产生的杂交物中 TPP 和叠氮香豆素部分之间的反应。Oligo6-TPP 与 Oligo4-AzC 反应的情况下，信号缺乏与这两个寡核苷酸不能形成双链体是一致的，从而反应不能被促进。进行含有每种寡核苷酸的对照反应以排除任何非特异的效应。

涉及三元络合物的额外实验的结果显示于图 15 中。在这些实验中，检测 Oligo1 通过杂交将两个完全互补的寡核苷酸 (Oligo5-AzC 和 Oligo2-TPP) 装配的能力，与其将一个完全互补的寡核苷酸 (Oligo5-AzC) 和一个部分互补的寡核苷酸 (Oligo6-TPP) 装配的能力比较。Oligo1 和 Oligo5-AzC 在 200 nM 终浓度，而 Oligo2-TPP 和 Oligo6-TPP 以 100 nM 的终浓度使用。在图 15 中，001 表示 Oligo1，002 表示 Oligo2-TPP，005 表示 Oligo5-AzC，006 表示 Oligo6-TPP。结果显示只有当存在完全互补的寡核苷酸 (Oligo1、Oligo5-AzC 和 Oligo2-TPP) 组合时，才产生荧光。

### 实施例 2: 基因涂抹(Gene Painting)

基因涂抹是一种序列检测方法，其基于在靶标中多个位点上发展出信号。所述多个位点典型地位于基因序列中，所述基因序列被期望能显示其存在、不存在或数量的基因序列。在相对长的序列 (例如 5,000 个碱基的序列) 中，可以靶向对该序列特异的更小序列，典型地为 40-50 个碱基。这些通过寡核苷酸探针对靶向，每个探针典型地为 10-20 个碱基长。如果

探针长度平均为约 12 个碱基，那么约 400 对探针就能够“涂抹”5,000 个碱基长的序列。每个这些探针对是反应性的对（通过核酸模板化学，如图 1 所示），其从前荧光团前体产生荧光团。产生的总荧光团是所有 400 个荧光团产生的总和。为了检测例如玉米基因组 DNA 的样品中的一个 5,000 个碱基长的特异基因序列，需要制备玉米 DNA 样品，并在合适的离子强度、温度和甲酰胺浓度下将其添加至 400 个寡核苷酸检测探针的混合物中。产生的总荧光被预期为与玉米 DNA 中该基因序列的数量成比例。基于已知的商业荧光仪器计算的检测水平位于所计算的预期荧光产量范围内，所述荧光产量基于核酸模板化学的基因涂抹技术的荧光产量。

### 测定法设计的例子

本发明的一个示例性应用是在遗传工程植物（如玉米）中检测转基因拷贝。靶标基因可以是例如抗除草剂的。所述基因可以以每基因组单个拷贝或多个拷贝存在。典型的应用是测定具体的玉米批次是含有该基因还是不含，并定量每基因组的平均基因拷贝数。

用于根据本发明的该基因的测定法例子首先包括，通过在搅拌机中将玉米均相化来分离约 100  $\mu\text{g}$  或更多的总玉米 DNA。可使用用于提取和纯化植物 DNA 的多种试剂盒中的任何一种来分离玉米 DNA。通过例如将 DNA 通过 hyperdermic 针使其更容易变性为单链来将 DNA 剪切为更小的平均尺寸。然后将 DNA 短暂加热至 100 $^{\circ}\text{C}$  并迅速冷却，使其成为单链。然后添加含有 400 对寡核苷酸探针的反应混合物，每个探针对靶标基因中一个 DNA 序列特异，且每组合有两个 DPC-反应前荧光团。孵育（典型地在适度提高的温度下（37 $^{\circ}\text{C}$ ））后在荧光微量培养板读数器中测量产生的荧光。使用靶标基因数量已知的玉米 DNA 参考样品校准产生的荧光。该实施例中预期的荧光团数量为约 30 飞克分子，其正好在商业可获得的微量培养板读数器的检测限度内。

### 实施例 3：寡核苷酸杂交、浓度和解链温度

制备模型体系（其包括带有十碱基互补区和十碱基单链间隔臂的两个二十成员寡核苷酸），再与六碳间隔臂连接。使用或不使用 5'-生物素

(带有 6-碳间隔臂)合成这些 oligo。如下文所示,互补区标有下划线。第三个 oligo 与(-)链 oligo 相同但是与(+)链有 4 碱基的错配(斜体)。

Oligo 26 (+) 链 5' CTTCGGCCCCAGATATCGT (SEQ. ID. NO. 24)

Oligo 27 (-) 链 3' GTCTATAGCATTCGACATC (SEQ. ID. NO. 25)

Oligo 28 (-) 错配 3' TACTATAGTGTCTCGACATC (SEQ. ID. NO. 26)

通过在 Bio-Rad iCycler 中测量与双链 DNA 结合的 SYBR 荧光来检查所述 10 碱基对寡核苷酸对 (oligo 26+oligo 27) 的解链曲线(Lipsky, et al., *Clinical Chemistry* 47[4], 635-44. 2001)。结合曲线作为解链曲线斜线的第一导数存在,因此最大值表示曲线中的拐点 ( $T_m$ , 或在双链位点的混合种群中为“局部”  $T_m$ )。最高至少 70 °C 时可获得结合曲线,因为抗生物素蛋白最高在该温度和以下仍有生物素结合活性。

为了检查该具体寡核苷酸对对浓度的依赖性,产生从 500 nM 到 20 nM 范围变化的寡核苷酸对的解链曲线(图 16)。(参阅例如 Lipsky, et al., *Clinical Chemistry* 47 [4], 635- 44. 2001)。观察到  $T_m$  以寡核苷酸对浓度(其中 RFU 指出相对的荧光单位)每降低十倍其下降约 100 °C 的速率下降,与图 16 中的预测相似。生物素化的和未生物素化的寡核苷酸的解链曲线几乎是相同的。四碱基的错配对显示几乎没有双链结构。

为了检测(+)和(-)链对蛋白质靶标的结合是否会引起  $T_m$  提高,在存在抗生物素蛋白时孵育这些寡核苷酸的生物素化版本。抗生物素蛋白含有 4 个等价的结合位点,它们位置相对接近,并非常紧密地( $K_a \sim < 10^{-15}M$ )和非协作地与生物素结合。

存在等摩尔浓度的生物素化形式的寡核苷酸#26 和#27 时,可预期约一半的生物素结合位点被寡核苷酸互补对占据,约一半是相同的寡核苷酸(非互补对)。预测在存在抗生物素蛋白时会观察到两个解链曲线峰。一个峰将是任何寡核苷酸对的结果,所述寡核苷酸对均不与抗生物素蛋白结合(游离于溶液中)或两个配偶体中仅一个与抗生物素蛋白结合,所述峰不应显示对  $T_m$  的邻近效应。 $T_m$  显著更高的第二峰将代表均与抗生物素蛋白结合的一对生物素化的 oligo,所述峰应显示邻近效应。

如图 17 所示构建这样的实验。向保持于 60 °C 的存在或不存在的抗生物

素蛋白的溶液中添加寡核苷酸，即所谓的热启动。在“热启动”中，寡核苷酸在恰好高于它们  $T_m$  的温度下在溶液中与生物素结合位点结合，这保证它们是单链的。然后将溶液逐渐降低至  $10^\circ\text{C}$ ，并在上升至  $70^\circ\text{C}$  的过程中进行解链曲线分析。如图 17 所示，存在或不存在抗生物素蛋白时未生物素化的 oligo 对的解链曲线显示  $30\text{-}32^\circ\text{C}$ （此处 RFU 指示相对荧光单位）的  $T_m$ 。然而存在抗生物素蛋白时，产生两个恰好分开的  $T_m$  峰，其  $T_m$  值为  $33^\circ\text{C}$  和  $52^\circ\text{C}$ 。存在抗生物素蛋白时，仅当存在两种互补的生物素化寡核苷酸时观察到升高的温度峰（ $T_m$  上升了约  $20^\circ\text{C}$ ）。 $T_m$  +/- 生物素的差异在更低盐浓度时趋向于最大（图 18），在存在  $10\text{ mM}$  氯化镁时轻微更高（图 19）（此处 RFU 指示相对荧光单位）。发现生物素化寡核苷酸与抗生物素蛋白的最佳摩尔比是约  $3.5:1$ （oligos + 抗生物素蛋白总浓度 =  $0.7\ \mu\text{M}$ ），与抗生物素蛋白拥有四个等价结合位点相一致（图 20）（RFU 指示相对荧光单位）。这是重要的，因为它证明了  $T_m$  效应的发生需要寡核苷酸与抗生物素蛋白相同分子结合。3'生物素化(-)链 oligo 取代为 5'生物素化链寡核苷酸显示  $T_m$  值与两个寡核苷酸链均被 5'生物素化时的先前结果几乎没有差异（图 21）（RFU 指示相对荧光单位）。

如果在室温下添加等摩尔量的两种寡核苷酸，逐渐上升至  $60^\circ\text{C}$ ，然后获得解链曲线，这样构建实验，结果基本相同。在该方法（以及热启动方法）中，需要时可通过添加相对于抗生物素蛋白过量摩尔的每种 oligo。

（然而，如所预测的，oligo 对大量过量增加低  $T_m$  峰的尺寸）。这在形成高  $T_m$  杂交体 DNA 时不是有害的，因为只要 oligo 对以等摩尔量一起被添加，它们就均等地竞争生物素结合位点。如果每次添加一种 oligo，则重要的是添加约  $2:1$  摩尔比的第一 oligo 比抗生物素蛋白，随后添加  $2:1$  比例的第二 oligo。通过后继的加成，添加相对于抗生物素蛋白过量摩尔量的两种 oligo 使得用第一 oligo 占据了抗生物素蛋白的所有结合位点和阻止第二的、互补的 oligo 占据邻近位点，并显示出提高的  $T_m$  效应。这些观察与下述机制相符：邻近的互补 oligo 对与两个邻近的生物素结合位点结合以获得显示提高  $T_m$  峰的杂交物。

还用完全由 A 和 T 组成的 10 碱基自身互补寡核苷酸来构建实验。

(Oligo 31 : 5'-生物素-间隔臂- TTTTTTTTTTTTAATTA) (SEQ. ID. NO. 27)。因为该寡核苷酸在碱基组成上是均相的并完全由 AT 组成，所以其在比上述模型体系更低的  $T_m$  下解链并产生相当尖锐的解链曲线。存在抗生物素蛋白时，其  $T_m$  从 30.5°C 提高到 61.5°C (图 22) (此处 RFU 指示相对荧光单位)。因为该寡核苷酸是自身互补的，所以所有的结合事件而不是只有 1/2 的事件导致互补链。因此只观察到单个提高的  $T_m$  峰。

使用抗生物素抗体而不是抗生物素蛋白作为靶标来重复这些实验。抗生物素抗体含有位于抗体 Fab 部分接近末端的两个生物素结合位点，但是所述结合位点比抗生物素蛋白上的生物素结合位点分开得更多。

#### 实施例 4: 检测蛋白质靶标-适体用作靶标结合物

此处设计示例性的体系，以使用核酸模板叠氮香豆素(AzC)-三苯膦(TPP)化学，借助于适体结合和两个互补 DNA 探针的退火，来检测蛋白质靶标。

#### 材料

人 PDGF-BB 和 PDGF-AA 得自 R&D Systems (分别为 220-BB 和 220-AA) 抗人 PDGF-B 亚基单克隆抗体得自 R&D Systems (MAB2201)。缓冲液包括 Tris/Mg 缓冲液，在 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 - 10 mM MgCl<sub>2</sub>。使用的寡核苷酸如下：

该实施例中使用的寡核苷酸序列

Oligo #/ (SEQ. ID #)	序列 (5'到 3')	5'- Mod' f.	3'- Mod' f.	描述
201 (28)	<u>CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGA</u> <u>TCCTGCCCCCCCCCATATTTAAGC</u>	TPP	none	DPC-适体探针
202 (29)	<u>GCTTAAATATCCCCCCCCCCCCAGGCTACGG</u> <u>CACGTAGAGCATCACCATGATCCTG</u>	无	AZC	DPC-适体探针
203 (30)	<u>GTGGGAATGGTGCCCCCCCCCCCCAGGCTAC</u> <u>GGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG</u>	无	AZC	DPC-适体探针错配
204 (31)	GTGGTAGTTGGAGTCGTGGCGTAGGCAAGA	无	无	靶标
205 (32)	GTGGTAGTTGGAGTCACACGTGGCGTAGGC AAGA	无	无	靶标

206	GTGGTAGTTGGAGCTCACACCACACGTGGC			
(33)	GTAGGCAAGA	无	无	靶标
207	GTGGTAGTTGGAGTCACACACACCACACAC			
(34)	AGTGGCGTAGGCAAGA	无	无	靶标
	GTGGTAGTTGGAGCTCACACCACACCAACC			
208	ACACCACACCACACACACCACACGTGGCGT			
(35)	AGGCAAGA	无	无	靶标
209				
(36)	GTGTGGTGTGGTGTGGTGTG	无	无	splint
210				K-ras 靶标外表面
(37)	GTGGCGTAGGCAAGAGTGGTAGTTGGAGCT	无	无	(outward facing)
211				
(38)	GTGGGAATGGTG	无	TPP	TPP 探针
212				
(39)	AGATCCCAGTAGCAC	TPP	无	TPP 探针
213				
(40)	AGCTCCAACCTACCAC	TPP	无	TPP "错配"
214				
(41)	TCTTGCCTACGCCAC	无	AZC	AZC 探针
215	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGA			
(42)	TCCTG	无	无	适体

## 方法

DPC 反应条件。除非另外说明，每 100 微升反应在 100  $\mu$ l 的总体积内含有 1 xTris/Mg 缓冲液、40 皮摩尔的 TPP 和 AzC 反应探针、40 皮摩尔的靶标寡核苷酸或靶标蛋白质以及，典型地，25-30% v/v 的甲酰胺。在 25°C 于 Wallac Victor 1420 分光光度计中孵育样品，用 355 nm 处激发和 460 nm 处发射来监测荧光的增强。

## 结果：通过适体-DPC 探针检测 PDGF-BB

如图 23 所阐述的，选择直接针对血小板衍生的生长因子(PDGF)B 亚基的适体序列(Fang, et al, Chem. BioChem. 4, 829-34. 2003)。这属于对 PDGF B 亚基( $\sim 10^{-9}$  M)具有强亲和力，对 PDGF A 亚基则降低约十倍的适体家族。(Green, et al, Biochemistry 35, 14413-24. 1996) 合成探针，每个探针含有互补的 10 成员 DNA 序列、 $C_{10}$  间隔序列和相同的 35 成员适体序列。(Oligos #201, #202)。每个序列含有一个 5'-TPP 或 3'-AZC，适体分别连接在 3'或 5'。第二 AzC 探针 oligo #203 与 oligo #202 相同，除了其退火序列与 TPP oligo (#201)完全错配。

如图 24 所示，存在 30% (体积) 甲酰胺时，TPP 和 AzC 探针彼此之间的反应完全取决于 PDGF-BB 和探针互补 DNA 序列的存在。缺少任一探



针，反应失败。

反应的 DNA 依赖性关键取决于相对于测定温度的 DNA 解链温度。存在 0% 甲酰胺时（所计算和观察到的  $T_m > T_{\text{测定}}$ ），反应在存在或不存在靶标蛋白质 PDGF-BB 时发生（图 25A）。事实上，在这些条件下，添加 PDGF-BB 不提高反应速率，而是将反应速率降低约 50%。在 10% 甲酰胺中，PDGF-BB 抑制性较弱（图 25B）。在 20% 甲酰胺中（图 26A），情况完全相反——反应速率立刻较弱，除非存在 PDGF-BB。在 30% 甲酰胺中（图 26B），反应完全取决于 PDGF-BB 的存在。在 40% 甲酰胺中，施用任何反应物集合，反应都非常慢（图 27）。在所有的情况下，错配的探针几乎不产生反应或不产生反应。

用 SYBR Green 监测的使用互补序列的 DNA 解链实验显示：在 Tris/Mg 缓冲液中存在甲酰胺时，序列的  $T_m$  为约 30°C，甲酰胺每提高 10% 则降低约 7°C。用于检测测定法的最佳甲酰胺浓度（30%）中  $T_m$  为 10°C。

在 0% 的甲酰胺中，寡核苷酸可形成至少部分的双链体，甚至在没有 PDGF-BB 时（ $T_m$  轻微高于  $T_{\text{测定}}$ ）。20% 和 30% 甲酰胺中反应的 DNA 靶标依赖性如下解释：不存在蛋白质靶标时，测定法在高于  $T_m$  的温度下构建。除非两个探针与 PDGF-BB 靶标结合提高复合物的  $T_m$ ，否则不发生反应。在 40% 甲酰胺时，任何反应的集合都不发生反应。可能的解释是  $T_m$  被降低得过低使得与 PDGF-BB 结合不能将其提高到  $T_{\text{测定}}$  之上，或甲酰胺抑制 PDGF-BB 与适体结合。更复杂的情况是不存在甲酰胺时添加 PDGF-BB 所观察到的反应速率抑制。因为通过 PDGF-BB 形成的一半双链体是非产出性的（50% 会是同源双链），所以速率的降低很可能是由于 PDGF-BB 结合阻止这些同源双链分离并随后在含有互补对的溶液中重新结合形成异源双链。使用特异性针对异二聚体靶标中不同结合位点的探针对时，不应发生该情况。

通过测量由一系列稀释度的 PDGF-BB 浓度所产生的反应速率来计算测定法的灵敏度（图 28）。根据测定法背景噪音标准差三次计算的值，Wallac 仪器的最小检测水平被估计为：在 100 微升测定体积中 0.8 皮摩尔

处。

还使用 PDGF-AA 作为靶标来确定测定灵敏度。适体单体被预期对 PDGF-AA 具有比 PDGF-BB 低约十倍的亲和力。然而，由于测定涉及形成两个适体二聚体与任何类型 PDGF 的复合物，二聚体的结合亲合力被预期为比单体的亲和力更紧密，且其亲和力应当比靶标 PDGF 的测试浓度（低至约 1 纳摩尔）显著更紧密（ $K_i$  更低）。如图 29 所示，适体 DPC 探针对低浓度或高浓度（0、1.25、2.5、5、10、20 和 40 皮摩尔的 PDGF-AA）的 PDGF-AA 的反应速率和对 PDGF-BB 的反应速率没有明显不同。这与作为二聚体结合并显示提高的亲合力的适体对模型一致。

TPP 对 AzC 探针的比例。为了证实反应机制的模型（图 4，TPP 对 AzC 探针的最佳比例应当是 1:1），图 30 是两种探针总量保持恒定（800 nMoles 探针/反应），而两种探针比例变化的实验。产生最高反应速率的比例为约 1:1，与预期的机制一致。

因此，在该模型体系中，除非适体结合且两个探针中的互补序列彼此退火，否则不产生荧光。

#### 实施例 5 用于生物检测的压缩码架构，所述生物检测使用适体结合物，基于核酸模板化学

图 10 更详细地阐述了示例性的压缩码结构。TPP 对首先在 5'端含有 PDGF 适体、C18 基于聚乙二醇的间隔和 18 成员压缩码序列。TPP 报告子序列在其 3'端含有互补的压缩码序列、C18 PEG 间隔和终止于 5' TPP 集团的十碱基对报告子序列。包含 AzC 探针的寡核苷酸对含有通过 C18 PEG 间隔与独立压缩码连接的 3'适体，和与 5'反压缩码连接的检测寡核苷酸、C18 PEG 间隔和终止于 3' AzC 基团的报告子寡核苷酸（与 TPP 寡核苷酸互补）。

在 35%甲酰胺中和 22°C 下，反应取决于两种报告子、两种适体寡核苷酸和靶标 PDGF-BB 的存在（图 31）。在 22°C 无甲酰胺时，反应不依赖于 PDGF 的存在而进行。这与上述“单片”结构的表现一致，并反映出：在 35%甲酰胺中添加 PDGF 后，产生荧光的机制取决于报告子序列二聚体

在甲酰胺中的提高的热稳定性。22℃不存在甲酰胺时，存在或不存在 PDGF 时报告子寡核苷酸二聚体均是稳定的。

对模型正确性的验证是通过改变 TPP 和 AzC 适体 oligo 的比例来获得的（图 32）。这些实验表明，适体 oligo 的最佳比例预期为 1:1 的比例（即 50% 的 TPP oligo 与 0.4  $\mu$ M 的 PDGF 和适体总浓度）。总报告子寡核苷酸与总适体 oligo 的最佳比例也是 1:1。完全不存在任一种报告子或适体寡核苷酸时不发生 PDGF 依赖性反映。在高于报告子寡核苷酸化学计量浓度的浓度下，不依赖于 PDGF 的信号提高（背景），但是依赖于 PDGF 的信号保持约为恒定。这两种观察均与下述模型一致：对每种适体 oligo、每种报告子 oligo 和 PDGF 而言，复合物以 1:1 的比例装配。

这些实验表明复合物可在溶液中自我装配，使得每个压缩码及其反压缩码以受适体序列或报告子序列的最小干扰彼此退火。

还构建了实验来确定添加的顺序（和从而适体和报告探针的装配）是否重要。与将所有探针作为混合物一起添加相比，如果在添加报告寡核苷酸之前将适体寡核苷酸首先与 PDGF 一起孵育，则将获得轻微更低的反应速率。如果在将两组混合在一起并用 PDGF 孵育之前首先将每对适体寡核苷酸和报告寡核苷酸孵育并允许彼此装配，则获得轻微更高的反应速率。这种情况的原因可能是如果适体探针已经与靶标结合，则压缩码-反压缩码与适体探针退火存在一些位阻。

作为对照，比较一组单片 TPP 和 AzC 探针，它们仅含有压缩序列，不含有压缩码-反压缩码序列（图 33）。除了添加 PDGF 引起的速率增加典型地轻微优于两片体系外，这种单片体系的反应速率与两片体系的相似。

含适体 TPP 和 AzC 探针的序列也是系统改变地，以确定对设计的任何约数。合成含适体 TPP 和 AzC oligo，二者均具有如图 10 中所述的相同序列，但是具有下述改变：(1)省略 C18-PEG 间隔（Oligos 119 & 122）；(2)用序列 C<sub>10</sub>取代 C18-PEG 间隔(oligos 120 & 123)；(3)用序列 C<sub>20</sub>取代 C18-PEG 间隔(oligos 121&124)；(4)省略 C18-PEG 间隔并省略压缩码区域中的 3 个 3'-碱基（长度减为 15 个碱基），(oligos 127 & 129)；和(5)省略

C18-PEG 间隔并省略压缩码区域中的 6 个 3'-碱基（长度减为 12 个碱基），(oligos 128 & 130)。

该实施例中使用的寡核苷酸包括：

Oligo#/ (SEQ. ID NO. 43)	序列 (5'-3')	修饰
106	GGACTCGAGCACCAATAC-X-TATAAATTCG-AZC	X= C18 PEG; AZC = 3'- AzC.
(SEQ. ID NO. 44)		
109	CGAATTTATA-X-CTGACCATCGATGGCAGC	X=C18 PEG, 5'-TPP
(SEQ. ID NO. 45)		
112	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG-X-GCTGCCATCGATGGTCAG	X= C18 PEG
(SEQ. ID NO. 46)		
113	GTATTGGTGCTCGAGTCC-X-CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG	X= C18 PEG
(SEQ. ID NO. 47)		
119	GTATTGGTGCTCGAGTCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG	
(SEQ. ID NO. 48)		
120	GTATTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG	
(SEQ. ID NO. 49)		
121	GTATTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG	
(SEQ. ID NO. 50)		
122	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGGCTGCCATCGATGGTCAG	
(SEQ. ID NO. 51)		
123	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGCCCCCCCCCGCTGCCATCGATGGTCAG	
(SEQ. ID NO. 52)		
124	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGCCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGCCATCGATGGTCAG	
(SEQ. ID NO. 53)		
127	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGGCTGCCATCGATGGT	
(SEQ. ID NO. 54)		
128	CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGGCTGCCATCGAT	
(SEQ. ID NO. 55)		
129	TTGGTGCTCGAGTCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG	
(SEQ. ID NO. 56)		
130	GTGCTCGAGTCCCAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG	

这些改变均不引起体系表现的显著差异。实施方案 4)和 5)也导致报告寡核苷酸中 C18 间隔紧上游的 3 碱基和 6 碱基单链（未退火为压缩码）结

构。

这些实验的结果表明，基于适体的 PDGF 检测体系可被装配，将结合和 DPC 功能分离进两个单独的寡核苷酸。通过选择适当的压缩码序列，图 9 中描述的检测格式自我装配进退火的寡核苷酸对，所述寡核苷酸对会与单片合成的寡核苷酸功能类似。在引入靶标之前，报告和适体寡核苷酸可被单独装配，或所有的片段可以以几乎任何顺序一起添加。该方法可扩展至多于一对退火检测 oligo 的溶液相装配，例如扩展至检测多个靶标。多个靶标的检测可需要使用不同的报告寡核苷酸，所述寡核苷酸产生独立的可辨别信号（例如不同波长的激发光）。

这些结果表明，可使用例如含适体的寡核苷酸有效地设计压缩码报告途径。

尽管使用适体体系的结果表明，简单地通过将压缩码和反压缩码区域退火可形成结合和报告序列之间稳定的复合物，但是应当注意，存在将两种寡核苷酸共价和不可逆地连接在一起的技术，其高度可能维持报告反应基团的活性。例如，可将寡核苷酸在压缩码和反压缩码大部分是双链的温度下成对孵育（用于核酸模板化学的结合物寡核苷酸和反应寡核苷酸），但是序列的剩余部分是单链的。添加嵌入的、可光活化的交联剂（如 Trioxalen）然后紫外照射可不可逆地将两条链交联。类似地，紫外照射可向退火序列独立链之间引入胸苷二聚体。或者，可邻近 3' 和 5' 引入与短靶标（剪接）DNA 互补的序列，然后可用 DNA 酶进行连接。或者剪接寡核苷酸可由 RNA 组成，并在连接后用 RNase H 去除，所述 RNase H 水解与 DNA 退火的 RNA。这可导致将两种寡核苷酸转化为单片单链的 DNA。这些方法可导致在针对特异靶标得检测试剂盒中成本有效地产生寡核苷酸试剂。

用于该实施例的相关参考文献包括 Capaldi, et al., *Nucleic Acid Res.* 28 [7], e21. 2000; Castiglioni, et al., *Appl. and Exper. Microbio.* 2004, 7161-72. 2004; Fang, et al, *Chem.BioChem.* 4, 829-34. 2003; Gerry, et al, *J. Mol. Biol.* 292, 251-62. 1999。

### 实施例 6 用于以 DPC 为基础的生物检测-抗体结合物的压缩码结构

在另一实施方案中，适体序列与非 DNA 结合物如抗体一起放置。对于 PDGF 和其它蛋白质靶标，适体序列与化学活性基团如醛一起放置，并与非 DNA 结合物序列如蛋白质靶标的抗体或受体反应（图 34）。对于结合物和报告寡核苷酸的最佳设计可以通过考虑结合物的尺寸和几何形状和靶标结合位点的尺寸和几何形状来完成。例如可使用更长或更短の間隔臂最佳地跨越靶标上结合位点间的距离，并避免由结合物自身引起的位阻。

根据图 34，合成设计来与 TPP 报告分子杂交的压缩码寡核苷酸，令其含有 5'-氨基。合成设计来与 AzC 报告分子杂交的压缩码寡核苷酸，令其含有 3'-氨基。寡核苷酸和抗-PDGF-BB 抗体之间缀合物的合成由 SoluLink Biosciences (San Diego, CA)进行。

用于抗体和寡核苷酸缀合物的 SoluLink 技术首先需要用琥珀酰亚胺 (succinimidyl) 2-hydrazinonicotinate 丙酮脲修饰抗体的伯胺基，将丙酮脲掺入抗体。用琥珀酰亚胺 (succinimidyl) 4-甲酰苯甲酸盐独立地激活寡核苷酸的伯胺。两个被激活的分子以目的比例（典型地为 6:1）混合并在弱酸 pH 下反应形成稳定的脲键。该化学的细节可从 [www.SoluLink.com](http://www.SoluLink.com) 获得。制备两种缀合物：一种含有与含 AzC 报告寡核苷酸退火的压缩码，另一种含有与含 TPP 报告寡核苷酸退火的压缩码。

在 1.6 x 60 cm 的 Superdex S-200 (Amersham Biosciences)柱上，于 PBS 缓冲液（0.01 M 磷酸钾，pH 7.4-0.138 M 氯化钠）中，通过凝胶层析进一步纯化得自 SoluLink 的抗体-寡核苷酸缀合物。收集在约 0.6 倍柱体积处洗脱的主抗体峰，弃去后来的污染非缀合寡核苷酸洗脱峰。使用 Pierce (Rockford, IL) 30 K 分子量筛截 Slide-A-Lyzer，用 Pierce 浓缩溶液通过反透析对抗体缀合物进行浓缩。使用 Bio-Rad Micro BCA 试剂盒测定蛋白质含量，使用 SYBR Gold DNA 结合染料(Molecular Probes (Eugene, OR))测定寡核苷酸含量。两种缀合物被测定为每个蛋白质分子平均含有约 3 个寡核苷酸。

重组人 PDGF-BB (220-BB)和小鼠单克隆抗-PDGF-BB (MAB220)得自 R&D Systems (Minneapolis MN)。

该研究中使用的序列包括（其中 AzC 指示叠氮香豆素，TPP 指示三苯膦）：

<u>Name</u>	<u>Sequence (5'-3')</u>
TPP 报告子	TPP-(氨基修饰剂 C6)-CGAATTTATA-C18PEG-TCAGCATCGTACCTCAGC (SEQ ID NO.: 9) (SEQ ID NO.: 58)
AzC 报告子	GGACTCGAGCACCAATAC-C18 PEG-TATAAATTCG-(氨基修饰剂 C7)-AzC (SEQ ID NO.: 14) (SEQ ID NO.: 10)
AzC 压缩码	TTGGTGCTCGAGTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-(氨基修饰剂 C7) (SEQ ID NO.: 59)
TPP 压缩码	(氨基修饰剂 C6)-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGAGGTACGATGCTGA (SEQ ID NO.: 60)

另外，5'氨基修饰剂 C6 得自 Glen Research（来自 Glen Research 亚磷酰胺 110-1906）。3'氨基修饰剂 C7 得自 Glen Research（来自 Glen Research CPG 20-2957）。C18 PEG 得自 Glen Research（来自 Glen Research 亚磷酰胺 10-1918）。

#### 抗体-oligo 缀合物与报告寡核苷酸的装配

首先在 10  $\mu\text{l}$  的体积中独立地装配两个抗体-oligo 缀合物与其报告子。每个装配在 0.05 M Tris/HCl pH 8 - 0.01 M 氯化镁中含有 0.5  $\mu\text{M}$ （5 皮摩尔）抗体-寡核苷酸缀合物和 0.15  $\mu\text{M}$ （15 皮摩尔）的互补报告寡核苷酸。在检测反应混合物中使用前每个装配在 4°C 孵育至少 15 分钟。

#### 抗 PDGF-BB DPC 缀合物/报告子与 PDGF-BB 的检测反应

为了构建检测反应，每个反应在 50  $\mu\text{l}$  的体积中可含有：在 0.05 M Tris/HCl pH 8 - 0.01 M 氯化镁-40% 体积/体积甲酰胺中有如上所述制备的 10  $\mu\text{l}$  每种装配缀合物，和可变量的 PDGF-BB。缀合物以 0.2  $\mu\text{M}$  存在于该反应混合物中。样品在黑色微量培养板上在 Wallac Victor Luminometer 中于 25°C 下孵育。可在 355 nm 处激发和 460 nm 处发射来按时间追踪荧光。

典型地，反应可在 25°C 下进行，在反应产物 7-氨基香豆素的最适波长下监测荧光产生。

#### 实施例 7 BCR-ABL 融合蛋白测定的开发和临床显著性

可开发模测定平台，所述平台提供体外和体内在复杂生物学环境中特异检测蛋白质的广泛应用。该平台使用核酸模板化学（或 DNA 程序化化学，“DPC”），其使得原位蛋白质识别能够与从新产生信号偶联。

该途径预期对癌症患者早期诊断和治疗监测具有显著影响。对某些应用而言该途径是有利的，其提供样品均相测定形式以促进注意点(point-of-care)测定法的开发。对其它应用而言，该途径可与例如流式细胞术一起使用，或被改变以适应体内成像。

基于流式细胞术的测定法可以针对 BCR-ABL 融合蛋白建立，以鉴定 CML 患者中对轻微后遗症(MRD)负责的细胞亚群。相同肿瘤中的异质性已被证明是成功药物疗法的主要挑战。即便是在下述这些情况下，原发和激发抗药性和疾病持久性下潜在的不同机制(Deininger, et al Blood, 105, 2640-2653 (2005); Bhatia, et al Blood 101, 4701-4707 (2003); Elrick, et al Blood 105 1862-1866 (2005))迄今已阻止了高的治愈率，所述情况如慢性髓细胞样白血病 CML(Goldman, et al, N Engl J Med 349 1451-1464 (2003); Sawyers, N Engl J Med 340 1330-1340 (1999))，其病因已被解释为位于分子水平(Rowley, Nature 243 290-293 (1973); Lugo, et al, Science 247 1079-1082 (1990))，且特异的靶向(Druker, et al, Nat Med, 2, 561-566 (1996); Deininger, et al, J. Blood, 105, 2640-2653 (2005))引起高的缓和率(Sawyers, et al, Blood, 99, 3530-3539 (2002); Kantarjian, et al, N Engl J Med 346, 645-652, (2002); Talpaz, et al, Blood 99, 1928-1937 (2002))。尽管基于 PCR 的途径用于监测 MRD 非常灵敏(Cortes, et al, Blood 102, 83-86 (2003))，但是它们单独使用时不提供个体患者中关于 MRD 分子基础的信息。本文所述的基于蛋白质的测定法可使得基于特异细胞的方法能够使用多参数流式细胞仪(Irish, et al, Cell 118, 217-228 (2004))在个体患者中定义引起 MRD 的细胞谱（例如流入泵和流出泵的状态(Grossman, et al, Blood 106, 1133-1134 (2005); Thomas, et al., Blood.104 3739-3745 (2004); Mountford, et al., Blood\_104 Abstract 716 (ASH) (2004))、整联蛋白(Bueno-da-Silva, et al., Cell Death Differ. 10, 592-598 (2003))和细胞因子受体(Chu, et al., Blood 103 3167-3174 (2004))、细胞凋亡调剂剂(Aichberger, et al., Blood 106 Abstract 1987 (ASH) (2005); Aichberger, et al, Blood 105, 33003-3311 (2005))和信号途径激活(Jamieson, et al, N Engl J Med 351, 657-667 (2004))。具有这些信息使得能够做出最有见识的临床决策并帮助定义开发新治疗策略的焦点。依此类推，集中于



CML 的该特定目标的结果可以被扩展为鉴定 ALL 和 AML 患者中对 MRD 负责的细胞亚群。该蛋白质测定途径的固有模块性应当促进开发基于流式细胞术的测定法，所述测定法用于 E2A-PBX1、TEL/AML1、MLL/AF4 和 PML/RARa、分别与 ALL 和 AML 结合的 AML-ETO 融合蛋白。

在将标量测量方法扩展到包括在蛋白质的功能相关和/或（病理）生理学环境测量蛋白质的目标中，该途径被设计为允许同源二聚体、异源二聚体和蛋白质-蛋白质相互作用的特定检测，所述同源二聚体、异源二聚体和蛋白质均在存在它们单体相似物时指示着信号转导复合物的装配。因此该途径对鉴定和验证新颖真实的生物标记可能是非常宝贵的，所述生物标记与特定类型的癌症病理生理学机制性地相关联。这可促进临床试验设计，所述设计使得能够对个体患者有最好的治疗。

核酸模板化学及其固有特异性的基本原理可在复杂的生物学环境中被用于在下述条件下的生物检测，所述条件中靶标待分析物的结构和功能完整性被保留。反应基团与待分析物识别元件（例如抗体、适体或小分子）的结合指导化学反应在含有目的待分析物的位点特异地发生。当反应物是非荧光而反应产物是荧光的，然后可获得非常低（“零”）的非特异背景信号时，允许在复杂的环境中测量待分析物而不经特异性或灵敏度的妥协。

如图 4 所示使用探针对。该对的每个成员通过其各自的非互相排斥的识别元件与蛋白质独立地结合。该对的每个成员含有互补的脱氧寡核苷酸区，其被设计为仅在比测定中使用的浓度高得多的浓度下彼此退火。然而，当两种探针与蛋白质同时结合时，它们的有效浓度通过接近被提高，所述接近使得对的成员间能够 DNA 杂交。该蛋白质依赖性的杂交允许附着非荧光反应物进行核酸模板反应，所述反应产生荧光产物。以这种方式，涉及两种独立结合事件的待分析物识别引发了从新产生信号。探针对成员之间的蛋白质依赖性杂交可以用作得到的三元复合物中的亲合力点。在该双重识别测定形式中，每个识别元件（例如抗体、适体或小分子量配体）的固有特异性和亲合力被单独增强，从而促进它们的有效特异性和灵敏度。

初始研究之一使用 PDGF 的同源二聚体 BB 形式作为待分析物，并使用适体作为蛋白质识别元件与互补脱氧寡核苷酸缀合。随后这些与非荧光反应物三苯膦（5'-连接）和 7-叠氮-香豆素（3'-连接）。观察到严格依赖于 PDGF 存在的荧光产生（图 28）。激发和发射谱指示 7-氨基-香豆素——预期的产物。在适体缀合物不限制的条件下提高 PDGF 浓度得到荧光信号成比例提高。最大的信号发生在互补缀合物比例为 1:1 时。另外，荧光产生严格依赖于互补缀合物正确的 Watson-Crick 碱基配对。单个碱基错配的脱氧寡核苷酸的引入不引起依赖于 PDGF 的荧光产生。

这些数据与以下模型一致：缀合物的适体部分与 PDGF 结合通过接近诱导高的有效容积摩尔数。这导致在缀合物互补对之间形成 DNA 双链体，这随后支持核酸模板反应产物形成。这使得非荧光前体能彼此反应产生与待分析物识别直接偶联的信号。可使用未缀合的适体将荧光产生封闭，所述适体与适体-脱氧寡核苷酸缀合物竞争 PDGF 结合。需要过量 25 倍摩尔的未缀合适体与缀合的适体竞争，将信号产生降低 50%。

用于在患有轻微后遗症的 CML 患者中鉴定 BCR-ABL-阳性细胞群体的测定法：应用本发明的一种蛋白质测定法可被用于在细胞环境中测量 BCR-ABL，所述测定法的特征在于双重识别待分析物，引发从新产生信号。使用多重参数的流式细胞仪，该途径可以鉴定对 MRD 负责的细胞群体。这对确定引起 MRD 的细胞谱来说应是关键性的步骤，所述细胞谱引起基于机制确定用于个体患者的最佳治疗过程。

制备抗-BCR 和抗-ABL 脱氧寡核苷酸-抗体 DPC 缀合物。已经基于公开的方案（例如 [www.solulink.com](http://www.solulink.com)）开发出使用异源双功能试剂 succinimidyl 6-hydrazinonicotinate 丙酮脲(SANH)用于将 5'或 3'醛脱氧寡核苷酸与抗体缀合的一般流程。已使用凝胶排阻层析法随后离子交换层析将缀合物纯化，已使用 SYBR Gold 荧光增强定量每抗体分子的寡核苷酸缀合程度。该途径可以应用于商业可获得的多克隆和单克隆抗 BCR 和抗 ABL 抗体。

高质量单克隆抗体设施也可帮助产生对 BCR 和 ABL 的新抗体。分子模型能力可应用于预测表位，所述表位：1)存在于两种临床相关的融合蛋

白亚型 B3/A2 和 B2/A2 中, 2)拓扑学定向使得抗体对能够有利地结合, 3)可能对融合蛋白二聚体化、Gleevec 结合、已知的赋予抗体的突变和可能的底物结合不敏感。

检测经纯化的 BCR-ABL 融合蛋白。产生的探针对可被用于开发测定法, 所述测定法以与上述 PDGF 测定法类似的方式用于 BCR-ABL 融合蛋白。探针对的一个成员会具有抗 BCR 抗体作为其识别元件, 而互补成员会使用抗 ABL 作为其识别元件。BCR-ABL (B3/A2)融合蛋白从 p210(bcr-abl)杆状病毒表达构建体被表达, 所述构建体通过用来自 K562 cDNA 的 bcr-abl 连接片段将 bcr 和 abl cDNA 剪接在一起并将其置于 pDEST8 中产生。全长 BCR 和 ABL 可被用于确保测定对融合蛋白是特异的。使用经纯化的 B3/A2 融合蛋白和来自 B2/A2 和 B3/A2 阳性细胞裂解物的融合蛋白测定检测限度。也可测定来自 BCR-ABL-阴性细胞裂解物的干扰范围。

用于荧磷光产生的反应。本文描述的报告化学可应用于产生荧磷光。优选地所述化学会从相对稳定的基于 DPC 的前体产生激发最大值 > 500nm、发射最大值 > 600nm, 量子产率大于 0.5 的荧磷光, 所述前体自身不具有可看到的荧光。

用于鉴定来自 CML 患者的 BCR-ABL-阳性细胞群体的流式细胞仪测定法

制备抗 BCR 和抗 ABL 脱氧寡核苷酸缀合物, 所述缀合物连接有用于流式细胞仪的标准荧光染料代替核酸模板反应化合物(反应物)。这些可被用作阳性对照用于最优化固定和透化条件以保证并定量(quantitate)检测探针对的细胞内进入。可使用来自人骨髓患者的细胞系。初始条件可以以下述方案为基础, 所述方案使用激活状态特异的激酶抗体(Irish, et al, Cell 118, 217-228 (2004))执行用于研究细胞内信号转导途径的激活(Jamieson, et al, N Engl J Med 351, 657-667 (2004))。根据结果, 设计并制备对流式细胞仪最优化的探针对。

可开发原型基于 DPC 的流式细胞仪测定法。起初可使用包括 K562 细胞的多种来自 B3/A2 和 B2/A2 阳性患者的细胞系。可通过用 BCR-ABL 阴性细胞稀释这些阳性细胞来测定特异性和灵敏度。目的是在存在 1 百万

BCR-ABL-阴性细胞时检测 10-30 BCR-ABL-阳性细胞。一旦达到该目的，可用来自 CML 患者和健康志愿者的样品进一步验证该测定法。可将该测定法的特异性和灵敏度与经验证的方法比较，所述方法使用荧光原位杂交 (FISH) (Schoch, et al., Leukemia 1653-59 (2002))和 DNA/RNA 聚合酶链式反应(PCR) (Elrick, et al, Blood 105 1862-1866 (2005))。因此，可对来自若干患者的样品进行荧光激活细胞分选(FACS)分析。

存在大量的证据，提示对 CML 患者中原发和继发 Gleevec 抗性和疾病持久性负责的一些机制。除了 BCR-ABL 激酶结构域、流入和流出泵、整联蛋白和细胞因子受体中的突变外，已经涉及细胞凋亡调节剂和涉及 MAP 激酶和  $\beta$ -连环蛋白的信号途径。根据这些结果，应当可能通过使用多参数流式细胞术方式的被提议 BCR-ABL 蛋白测定法，在个体患者中建立引起 MRD 的细胞谱。该途径应与癌细胞中增强的磷蛋白网络细胞谱类似。然后可在多种治疗方案之前或响应多种治疗方案，在个体患者之间比较这些引起 MRD 的细胞的“生物标记”。根据阻止治愈的可能机制的多样性，可以证明细胞谱对于确保每个个体患者得到了最合适的药物疗法是非常重要的。Irish, et al, Cell 118, 217-228 (2004); Crossman, et al, Blood 106, 1 133-1 134 (2005); Thomas, et al, Blood 104 3739-3745 (2004); Mountford, et al, Blood 104 Abstract 716 (ASH) (2004); Bueno-da-Silva, et al, Cell Death Differ. 10, 592-598 (2003); Chu, et al, Blood 103 3167-3174 (2004); Aichberger, et al, Blood 106 Abstract 1987 (ASH) (2005); Aichberger, et al, Blood 105, 33003-331 1 (2005); Jamieson, et al, N Engl J Med 351, 657-667 (2004)。

下文将详细讨论核酸模板化学的多种和一般方面。额外的信息可见于 Liu et al 的 U.S.专利申请公开号 Nos. 2004/0180412 A1 (USSN 10/643,752)和 Liu et al.的 2003/01 13738 A1 (USSN 10/101 ,030)。

### 实施例 8 核酸模板产生多种染料

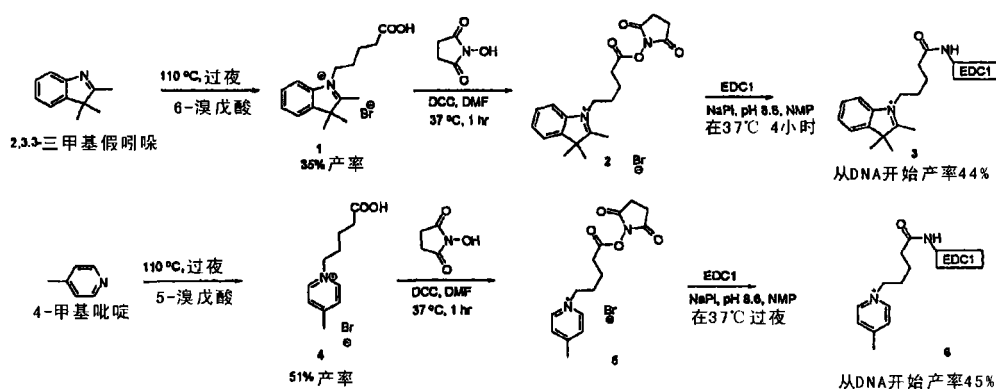
使用标准亚磷酰胺化学来制备三种寡核苷酸，并通过反相 C18 柱(Glen Research, Sterling VA, USA)进行纯化。使用 5'-氨基-修饰剂 5 制备带有 5'-氨基的寡核苷酸 (EDC2 和 EDC3)，使用 3'-氨基修饰剂 C7 CPG (Glen

Research, Sterling VA, USA)制备 3'-氨基(EDC1)。通过 260 nm 处的紫外吸光度测定 DNA 和杂环缀合 DNA 的浓度。来自杂环缀合 DNA 中杂环部分的 260 nm 处紫外吸光度分布是可忽略的, 对其不予考虑。

Oligo#	序列 (5'-3')	SEQ. ID.
EDC1	GTGGT AGTTG GAGCT-NH <sub>2</sub>	(SEQ. ID. NO. 61)
EDC2	H <sub>2</sub> N-AGCTCCA ACTACCAC	(SEQ. ID. NO. 62)
EDC3	H <sub>2</sub> N-AGATCCC ACTAGCAC	(SEQ. ID. NO. 63)

合成用于羟醛缩合的 DNA 缀合杂环前体。流程图 14 提供了合成用于羟醛缩合的 DNA 缀合杂环前体的两个例子。

流程图 14: 合成 DNA 缀合的杂环前体 3 和 6



合成化合物 1: 向 5-溴戊酸 (2.435 g, 13.45 毫摩尔) 中加入 2,3,3-三甲基假吡啶 (2.141 g, 13.45 毫摩尔)。将反应混合物在 110°C 下严格搅拌加热过夜。将获得的暗红色粘性油转移至 Gregar 萃取器并用 EtOAc 萃取过夜。得到浅红固体。将该固体重溶于 30 mL 的 MeOH 中。在减压下去除 MeOH 并用 10 mL 的 EtOAc 处理剩余的残余物。棕色固体被沉淀并过滤。用 2 x 50 mL 的丙酮和 2 x 100 mL 的 EtOAc 洗涤固体。总计获得 1.590 g 的浅棕色固体 (35% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 7.98 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.61 (m, 2H), 4.49 (t, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.30 (t, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.53 (s, 6H)。MALDI-MS (阳性模式): 260.2419。

合成化合物 2: 将化合物 1 (0.1 g, 0.294 毫摩尔)、N-羟基琥珀酰亚

胺 (0.068 g, 0.588 毫摩尔) 和 N, N'-二环己基碳二亚胺(DCC) (0.085 g, 0.411 毫摩尔) 溶解于 1.5 mL 的 DMF 中。将反应混合物在 37°C 下搅拌 1 小时。通过过滤去除沉淀的二环己基脲(DCU)并用 15 mL 醚处理滤出物。用 10 mL 醚将浅橙色固体洗涤三次并在真空下干燥数小时。获得的固体直接用于下一反应。MALDI-MS (阳性模式): 357.1590。

合成化合物 3: 向含有 20 纳摩尔 DNA(EDC1)的 1.5 mL 离心管中加入 41.6  $\mu$ L 的 0.1 M 磷酸钠缓冲液(NaPi), pH 8.6、41.6  $\mu$ L NMP 中的化合物 2(96 mM)和 41.6  $\mu$ L 的 NMP。将管置于摇床中并在 37°C 下摇动 4 小时。使用 Sephadex G-25 通过凝胶过滤将反应混合物脱盐, 然后通过反相 C18 柱纯化。总计获得 8.81 纳摩尔目的产物 (44% 产率)。LC-MS (阴性模式):  $C_{172}H_{221}N_{60}O_{96}P_{15}$  (单同位素) 的计算值: 1024.4070 [M-5H]<sup>5-</sup>; 1280.7473 [M-4H]<sup>4-</sup> 观察值: 1024.3986 [M-5H]<sup>5-</sup>; 1280.7473 [M-4H]<sup>4-</sup>

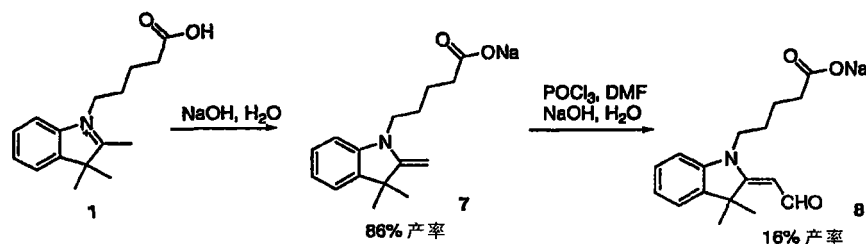
合成化合物 4 (与合成化合物 1 相似的步骤): 将 4-甲基吡啶 (1.245 g, 13.37 毫摩尔) 和 5-溴戊酸 (2.4203 g, 13.37 毫摩尔) 在 110°C 下严格搅拌加热过夜。向粘性油中加入 50 mL 的 EtOAc。将获得的伯更狄 (burgundy) 固体打碎, 并用 EtOAc 和丙酮粗放地洗涤。过滤固体并在真空下干燥, 得到 1.886 g 的白色固体 4 (51% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ ppm: 8.84 (d, 1H), 7.96 (d, 1H), 4.6 (t, 2H), 2.69 (s, 3H), 2.40 (t, 2H), 2.05 (t, 2H), 1.65 (m, 2H)。MALDI-MS (阳性模式): 194.1457。

合成化合物 5: 按照与合成化合物 2 相同的步骤合成化合物 5, 并直接用于 DNA 缀合而不经醚沉淀。MALDI-MS (阳性模式): 291.1605。

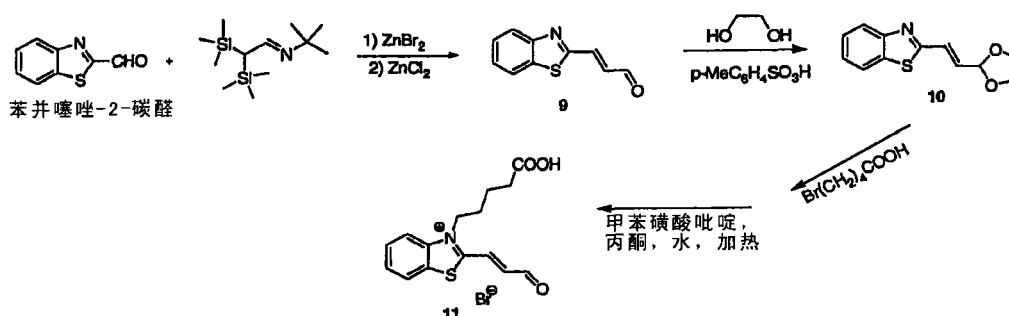
合成化合物 6: 按照 DNA 标记的一般步骤, 将 20 纳摩尔的 DNA(EDC1)与化合物 5 在 37°C 下反应过夜, 得到 9.09 纳摩尔的纯吡啶缀合 DNA6 (45% 产率)。LC-MS (阴性模式):  $C_{168}H_{217}N_{60}O_{96}P_{15}$  (单同位素) 的计算值: 1264.2385 [M-4H]<sup>4-</sup>; 1685.9872 [M-3H]<sup>3-</sup> 观察值: 1264.2313 [M-4H]<sup>4-</sup>; 1685.9871 [M-3H]<sup>3-</sup>

合成用于羟醛缩合和 Wittig 反应的 DNA 缀合醛前体。流程图 15 和流程图 16 显示通过 N-季铵化作用将酸性功能团引入杂环的两个例子。流程图 17 给出将氰基转化为酸性基团用于 DNA 缀合的一个例子。

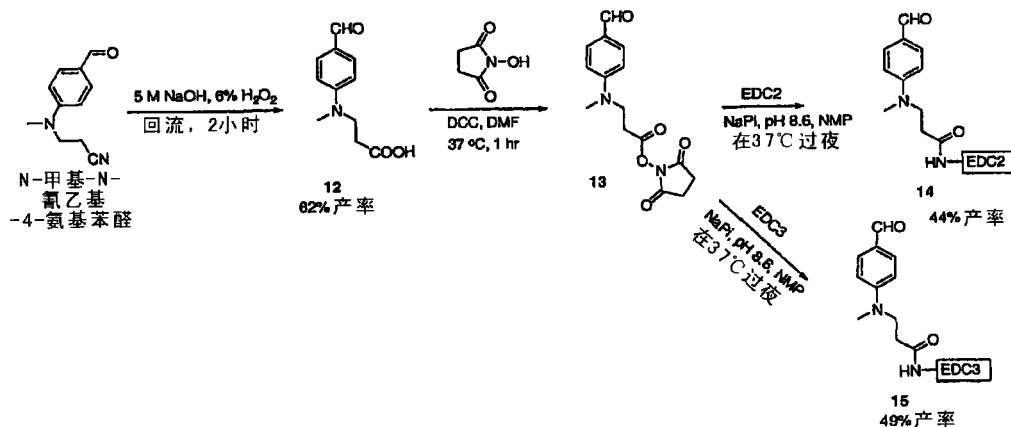
流程图 15: 合成非四元杂环醛用于生物多聚体缀合



流程图 16: 合成四元杂环醛用于生物多聚体缀合



流程图 17: 合成缀合 DNA 的氨基取代芳族醛



合成化合物 7: 将 1 (0.25 g, 0.735 毫摩尔) 和氢氧化钠 (0.039 g, 0.970 毫摩尔) 的混合物溶解于 1.9 mL 水中, 并在室温下有力的搅拌。3 小时后将反应混合物直接上样到 4.3 g 的 RediSep 反相 C18 柱上。先用水洗涤柱去除多余的盐, 然后用乙腈洗脱产物。总共获得 0.178 g 产物 (86% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO)  $\delta_{\text{ppm}}$ : 7.11 (dd, 1H), 7.05 (dt, 1H), 6.66 (dt, 1H),

6.61 (dd, 1H), 3.85 (d, 2H), 3.45 (t, 2H), 1.48 (m, 4H), 1.88 (t, 2H), 1.24 (s, 6H)。 (Wang, et al., *Dyes and Pigments* 2003, 57, 171-179)。

合成化合物 8: 在氩气下, 于带有 PTFE/硅酮隔片的 4 mL 玻璃管中加入 300  $\mu$ L 的无水 DMF。将管及其内含物在冰-盐浴中冷却 10 分钟, 然后加入 84  $\mu$ L 的含磷氯氧化物。再过 10 分钟后, 缓慢加入化合物 7 (0.15 g, 0.533 毫摩尔) 在 300  $\mu$ L DMF 中的溶液。溶液变为粘稠的。将管转移至预热为 35°C 的摇床并再摇 45 分钟。向反应混合物中加入 (小心搅拌) 200 mg 冰, 随后加入 1.2 mL 水中的 450 mg NaOH。将得到的悬浮液快速加热至沸点并允许其冷却至室温。得到的混合物首先用 12 g RediSep 反相 C18 柱在 CombiFlash Companion Chromatography 体系 (Teledyne ISCO) (乙腈/水) 中纯化, 然后通过半制备薄层色谱法 (溶剂体系: 70:29:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH:AcOH) 纯化。总计获得 26 mg 纯产物 (16% 产率)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 9.79 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.31 (t, 1H), 7.11 (t, 2H), 5.51 (d, 1H), 3.85 (t, 2H), 2.25 (t, 2H), 1.73 (m, 4H), 1.65 (s, 6H)。 (Wang, et al., *Dyes and Pigments* 2003, 57, 171-179)。

合成化合物 9: 在室温下向 1.5 mL THF 中苯并噻唑-2-碳醛 (102 mg, 0.623 毫摩尔) 和  $\text{ZnBr}_2$  (140 mg, 0.623 毫摩尔) 溶液中逐滴加入 (E)-N-(2,2-二(三甲基硅烷基)亚乙基)-2-甲基丙烷-2-胺 (167 mg, 0.685 毫摩尔)。搅拌 2 小时后, 通过添加  $\text{ZnCl}_2$  (2.2 mL 水中 297 mg) 和醚 (2.56 mL) 的水性溶液将得到的混合物水解 (水解程度通过 HPLC 分析监控)。通过 Ar 流去除 THF。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取水性层。用  $\text{MgSO}_4$  干燥后, 通过 12 g RediSep 硅胶柱在 CombiFlash Companion 色谱体系 (EtOAc/己烷) 上纯化粗产物。获得 97 mg 产物 (82% 产率)。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 9.8 (d, 1H), 8.1 (d, 1H), 7.9 (d, 1H), 7.7 (d, 1H), 7.6 (t, 1H), 7.5 (t, 1H), 6.9 (dd, 1H)。 (Bellassoued, et al., *A. J. Org. Chem.* 1993, 58, 2517-2522)

合成化合物 12: 在含有 N-甲基-N-氰乙基-4-氨基苯甲醛 (1.024 g, 5.44 毫摩尔) 50 mL 圆形烧瓶中加入 27.2 mL 5N NaOH 溶液和 6.8 mL 的 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 。将反应混合物回流 2 小时。冷却后通过添加浓盐酸 (37% 重量) 中和反应混合物, 用 2 x 100 mL 的 EtOAc 和 1 x 100 mL 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃



取。合并有机层，用 50 mL 卤水洗涤一次并浓缩至干燥。用 40 g RediSep 硅胶柱在 CombiFlash Companion 色谱体系(EtOAc/MeOH)中纯化粗产物。总计获得 0.702 g 浅粉色固体 (62%)。电喷射 MS: M+H 208.0735。(Brady, et al, J. Biol. Chem. 2001, 276, 18812-18818)

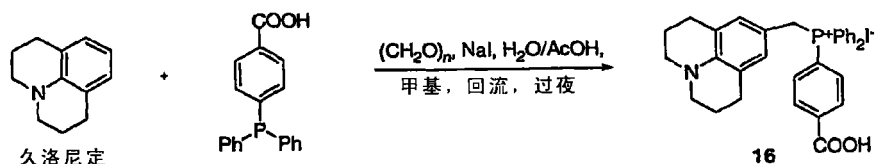
合成化合物 13: 按照与合成化合物 2 相同的步骤合成化合物 13, 将其直接用于 DNA 缀合而不经醚沉淀。

合成化合物 14: 按照 DNA 标记的一般步骤, 将 20 纳摩尔的 DNA(EDC2)与化合物 13 在 37°C 下过夜反应, 得到 8.8 纳摩尔的 14 (44%)。LC-MS: C<sub>158</sub>H<sub>204</sub>N<sub>57</sub>O<sub>91</sub>P<sub>15</sub> (单同位素) 的 Calcd: 1203.9710 [M-4H]<sup>4-</sup>; 1605.6306 [M-3H]<sup>3-</sup> Found: 1203.9664 [M-4H]<sup>4-</sup>; 1605.6305 [M-3H]<sup>3-</sup>

合成化合物 15: 按照 DNA 标记的一般步骤, 将 20 纳摩尔的 DNA(EDC3)与化合物 13 于 37°C 下过夜反应, 得到 9.7 纳摩尔的 15 (49)。LC-MS: C<sub>159</sub>H<sub>204</sub>N<sub>59</sub>O<sub>91</sub>P<sub>15</sub> (单同位素) 的 Calcd: 1213.9725 [M-4H]<sup>4-</sup>; 1618.9660 [M-3H]<sup>3-</sup> Found: 1213.9620 [M-4H]<sup>4-</sup>; 1618.9590 [M-3H]<sup>3-</sup>

合成用于 Witting 或 Horner 反应的前体。此处列出合成氨基取代的芳香族磷盐的一个例子 (流程图 18), 其使用便利的一盆方法而不分离卤化物试剂。

流程图 18: 合成氨基取代的芳香族磷盐

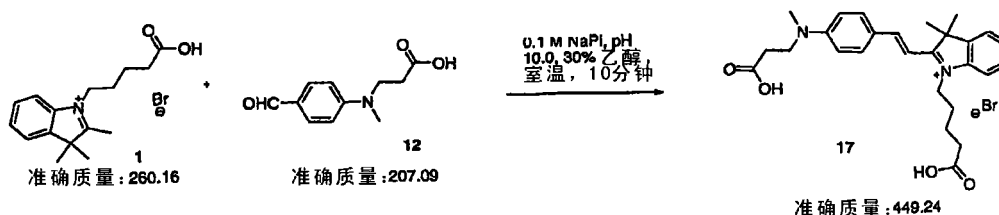


合成化合物 16: 向久洛尼定 (0.97 g, 5.60 毫摩尔)、4-(联苯磷基)苯甲酸 (1.715 g, 5.60 毫摩尔) 和多聚甲醛 (0.168 g) 在 8 mL 甲苯中的溶液中添加 NaI (0.84 g, 5.60 毫摩尔)、水 (0.397 mL) 和 HOAc (1.13 mL)。将混合物回流过夜。添加 15 mL 水后, 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 将反应混合物萃取两次。用饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 将合并的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 层洗涤两次并用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。去除溶剂后, 用 40 g RediSep 硅胶柱在 CombiFlash Companion 色谱体系 (EtOAc/己烷) 上纯化残余物。获得 1.77 g 黄色固体 (51% 产率)。<sup>1</sup>H

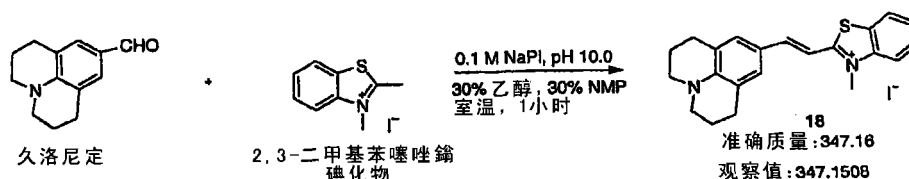
NMR ( $\text{CD}_3\text{Cl}$ )  $\delta_{\text{ppm}}$ : 8.01 (dd, 2H), 7.86 (t, 2H), 7.77 (m, 4H), 7.62 (m, 4H), 7.52 (m, 2H), 6.20 (s, 2H), 4.77 (d, 2H), 3.03 (t, 4H), 2.36 (t, 4H), 1.75 (m, 4H)。MS (阳性模式): 492.205。

通过水性条件下的羟醛缩合产生聚甲炔。尽管先前的文献数据中大部分指出羟醛缩合仅在苛刻的条件（在碱性条件下乙醇回流）下发生，但是我们在本显示两个例子，其中带有活性氢的 N-四元杂环前体在温和的水性条件下参与羟醛缩合。在流程图 19 中，将化合物 1 和 12 在水性缓冲液中混合仅几分钟后，观察到深紫色。质量分析指出形成羟醛缩合产物（图 35），稀释的反应混合物显示特征性的半花青染料荧光（图 36，543 nm 激发和 586 nm 发射）。流程图 20 指出在水性条件下羟醛缩合的另一例子，所述条件下纯化的半花青产物在 615 nm 处显示荧光（在 540 nm 处激发，图 37）。

流程图 19: 在水性条件下羟醛缩合化合物 1 和 12

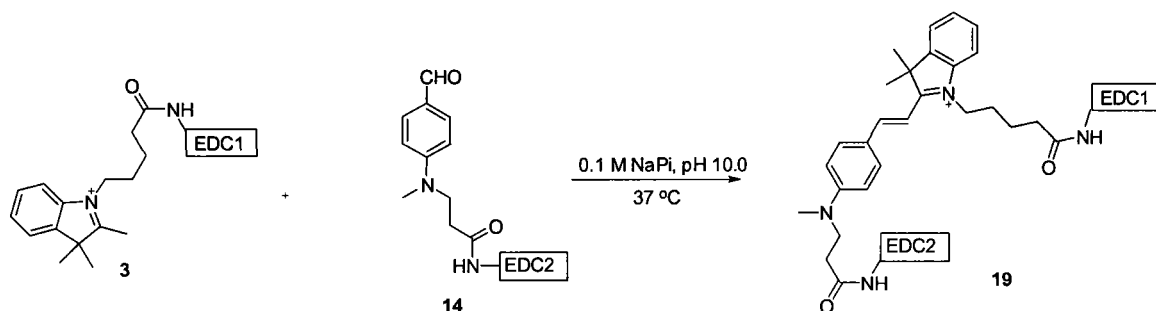


流程图 20: 在水性条件下久洛尼定和苯并噻唑之间的羟醛缩合



通过核酸模板反应产生聚甲炔。流程图 21 阐述了化合物 3 和化合物 14 之间核酸模板羟醛缩合的一个例子。在 37°C 孵育过夜后，产物的 LC-MS 分析显示聚甲炔染料形成（图 38）。

流程图 21: 化合物 3 和化合物 14 之间 DNA 程序化的羟醛缩合



### 通过引用并入

就所有目的而言，本文涉及的每份出版物和专利文件的全部公开内容通过引用整体并入本文，这与每份出版物或专利文件被单独指出一样。

### 等同

本发明可以以其它特异的形式具体化，而不偏离其思想或主要特征。因此，在所有的方面，前述实施方案都应被认为是阐述性的，而不是限制本文所述的发明。因此本发明的范围由附加的权利要求书代表，而不是由前述描述代表，包含在权利要求书等同物的含义和范围内的所有改变旨在被包括于其中。

## 序列表

<110> 通信探索公司

<120> 通过核酸模板化学生物检测的相关应用

<130> ENS-027PC

<140> PCT/US 06/020834

<141> 2006-05-26

<150> US 60/685,047

<151> 2005-05-26

<150> US 60/701,165

<151> 2005-07-21

<150> US 60/713,038

<151> 2005-08-31

<150> US 60/724,743

<151> 2005-10-07

<150> US 60/758,837

<151> 2006-01-13

<150> US 60/786,247

<151> 2006-03-27

<160> 65

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 探针寡核苷酸

<400> 1

tgtaggtaac

<210> 2  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针寡核苷酸

<400> 2  
 gttacctaca 10

<210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针寡核苷酸

<400> 3  
 cttctcatg taggtaac 18

<210> 4  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 探针寡核苷酸

<400> 4  
 cttctcagt tacctaca 18

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 5

caatggatgt acttcttc

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 6

acatccattg acttcttc

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 7

caatggatgt acttcttc

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸

<400> 8

acatccttg acttcttc

18

<210> 9

<211> 10

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸报告子序列	
<400> 9	
cgaatttata	10
<210> 10	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸报告子序列	
<400> 10	
tataaattcg	10
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 11	
caggctacgg cacgtagagc atcacatga tctctg	35
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸压缩码	
<400> 12	
gctgccatcg atggtcag	18

<210> 13  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 寡核苷酸反压缩码

<400> 13  
 ctgaccatcg atggcagc 18

<210> 14  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 寡核苷酸反压缩码

<400> 14  
 ggactcgagc accaatac 18

<210> 15  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 寡核苷酸压缩码

<400> 15  
 gtattggt gctcagctcc 18

<210> 16  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>



<223> 寡核苷酸压缩码

<400> 16

gctgccatcg atggt

15

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸反压缩码

<400> 17

accatgatg gcagc

15

<210> 18

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸压缩码

<400> 18

ttggtgctcg agt

13

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo1 寡核苷酸

<400> 19

gtgtagttg gagctggtgg cgtaggcaag a

31

<210> 20

<211> 15

---

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo2 寡核苷酸	
<400> 20	
agctccaact accac	15
<210> 21	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo4 寡核苷酸	
<400> 21	
gtggtagttg gagct	15
<210> 22	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo5 寡核苷酸	
<400> 22	
tcttgctac gccac	15
<210> 23	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo6 寡核苷酸	
<400> 23	
agatcccact agcac	15

<210> 24  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 26 寡核苷酸

<400> 24  
cttcggcca gatatcgt 18

<210> 25  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 27 寡核苷酸

<400> 25  
ctacagctac gatatctg 18

<210> 26  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 28 寡核苷酸

<400> 26  
ctacagctgt gatatcat 18

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> 富含 AT 的寡核苷酸

<400> 27

ttttttttt tttaattaaa

20

<210> 28

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 201 寡核苷酸

<400> 28

caggctacgg cacgtagagc atcacatga tctgcccc ccccatatt taagc

55

<210> 29

<211> 55

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 202 寡核苷酸

<400> 29

gcttaaatat cccccccc caggctacgg cacgtagagc atcacatga tctg

55

<210> 30

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 203 寡核苷酸

<400> 30

gtgggaatgg tgccccccc cccaggctac ggcacgtaga gcatcacat gatcctg

57

<210> 31

<211> 30

---

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo 204 寡核苷酸	
<400> 31	
gtggtagttg gagtcgtggc gtaggcaaga	30
<210> 32	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo 205 寡核苷酸	
<400> 32	
gtggtagttg gagtcacacg tggcgtaggc aaga	34
<210> 33	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo 206 寡核苷酸	
<400> 33	
gtggtagttg gagctcacac cacacgtggc gtaggcaaga	40
<210> 34	
<211> 46	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Oligo 207 寡核苷酸	
<400> 34	
gtggtagttg gagtcacaca caccacacac agtggcgtag gcaaga	46

<210>	35	
<211>	68	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Oligo 208 寡核苷酸	
<400>	35	
	gtggtagttg gagctcacac cacaccaacc acaccacacc acacacacca cacgtggcgt	60
	aggcaaga	68
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Oligo 209 寡核苷酸	
<400>	36	
	gtgtggtgtg gtgtggtgtg	20
<210>	37	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Oligo 210 寡核苷酸	
<400>	37	
	gtggcgtagg caagagtgg agtggagct	30
<210>	38	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>

<223> Oligo 211 寡核苷酸

<400> 38

gtgggaatgg tg

12

<210> 39

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 212 寡核苷酸

<400> 39

agatcccact agcac

15

<210> 40

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 213 寡核苷酸

<400> 40

agctccaact accac

15

<210> 41

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 214 寡核苷酸

<400> 41

tcttgctac gccac

15

<210> 42  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Oligo 215 寡核苷酸  
  
 <400> 42  
 caggctacgg cacgtagagc atcacatga tcctg 35

<210> 43  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Oligo 106 寡核苷酸  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(19)  
 <223> C18 PEG  
  
 <400> 43  
 ggactcgagc accaatacnt ataaattcg 29

<210> 44  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> Oligo 109 寡核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> C18 PEG



<400> 44  
cgaattata nctgaccatc gatggcagc 29

<210> 45  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 112 寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (36)..(36)  
<223> C18 PEG

<400> 45  
caggctacgg cacgtagagc atcaccatga tcctgngctg ccatcgatgg tcag 54

<210> 46  
<211> 54  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 113 寡核苷酸

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(19)  
<223> C18 PEG

<400> 46  
gtattggtgc tcgagtcnc aggctacggc acgtagagca tcaccatgat cctg 54

<210> 47  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 119 寡核苷酸

<400> 47

gtattggtgc tcgagtccca ggctacggca cgtagagcat caccatgac ctg 53

<210> 48

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 120 寡核苷酸

<400> 48

gtattggtgc tcgagtcccc cccccccca ggctacggca cgtagagcat caccatgac 60

ctg 63

<210> 49

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 121 寡核苷酸

<400> 49

gtattggtgc tcgagtcccc ccccccccc cccccccca ggctacggca cgtagagcat 60

caccatgac ctg 73

<210> 50

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo 122 寡核苷酸

<400> 50		
caggctacgg cacgtagagc atcacatga tcctggctgc catcgatggt cag		53
<210> 51		
<211> 63		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Oligo 123 寡核苷酸		
<400> 51		
caggctacgg cacgtagagc atcacatga tcctgcccc cccccgctgc catcgatggt	60	
cag		63
<210> 52		
<211> 73		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Oligo 124 寡核苷酸		
<400> 52		
caggctacgg cacgtagagc atcacatga tcctgcccc ccccccccc cccccgctgc	60	
catcgatggt cag		73
<210> 53		
<211> 50		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> Oligo 127 寡核苷酸		
<400> 53		
caggctacgg cacgtagagc atcacatga tcctggctgc catcgatggt	50	

---

<210> 54  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 128 寡核苷酸

<400> 54  
caggctacgg cacgtagagc atccatga tcctggctgc catcgat 47

<210> 55  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 129 寡核苷酸

<400> 55  
ttggctcg agtcccaggc tacggcagc agatcac catgatcctg 50

<210> 56  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> Oligo 130 寡核苷酸

<400> 56  
gtgctcagt cccaggctac ggcacgtaga gcatcacat gatcctg 47

<210> 57  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 寡核苷酸压缩码

---

<400> 57  
gctgaggtac gatgctga 18

<210> 58  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 寡核苷酸反压缩码

<400> 58  
tcagcatcgt acctcagc 18

<210> 59  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 寡核苷酸

<400> 59  
ttggtgctcg agtcccccc ccccccccc ccccc 35

<210> 60  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 寡核苷酸

<400> 60  
ccccccccc ccccccccc gctgaggtac gatgctga 38

<210> 61  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo EDC1 寡核苷酸

<400> 61

gtgtagttg gagct

15

<210> 62

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo EDC2 寡核苷酸

<400> 62

agctccaact accac

15

<210> 63

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Oligo EDC3 寡核苷酸

<400> 63

agatcccact agcac

15

<210> 64

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 适体寡核苷酸

<400> 64

caggctacgg cacgtagagc atcaccatga tcctg

35

<210> 65

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 适体寡核苷酸

<400> 65

caggctacgg cacgtagagc atcacatga tcctg

35

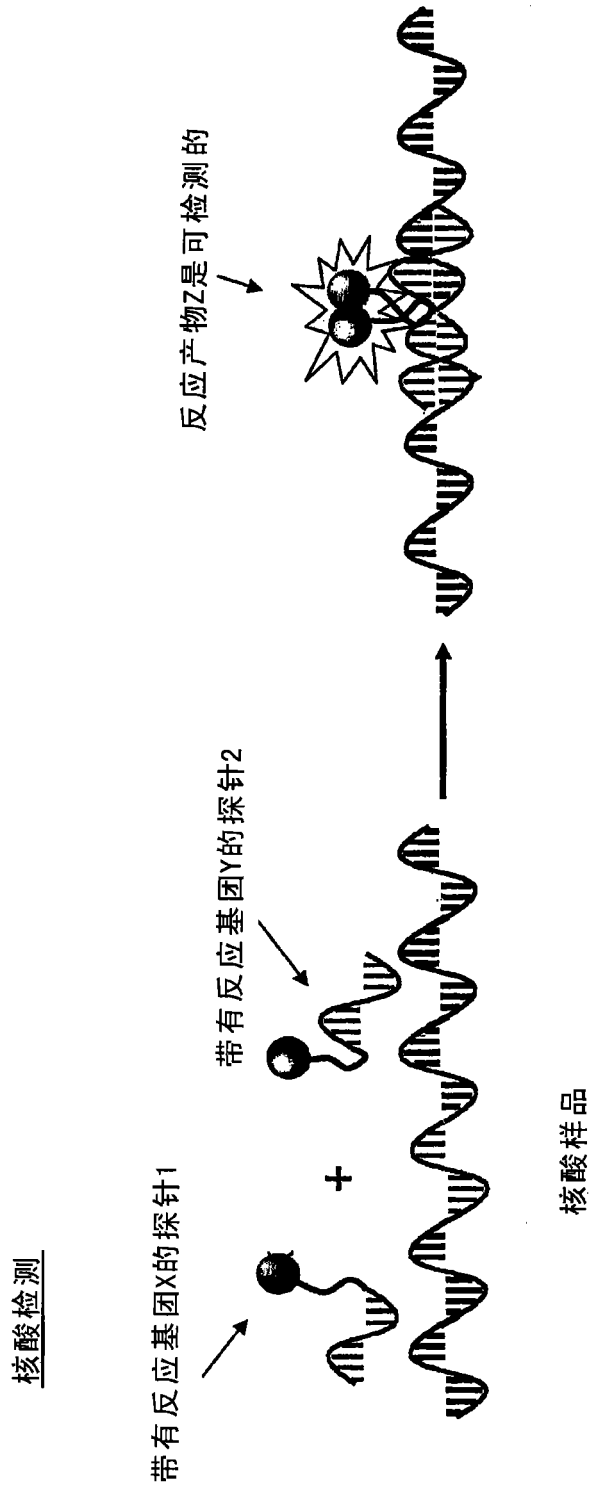


图1



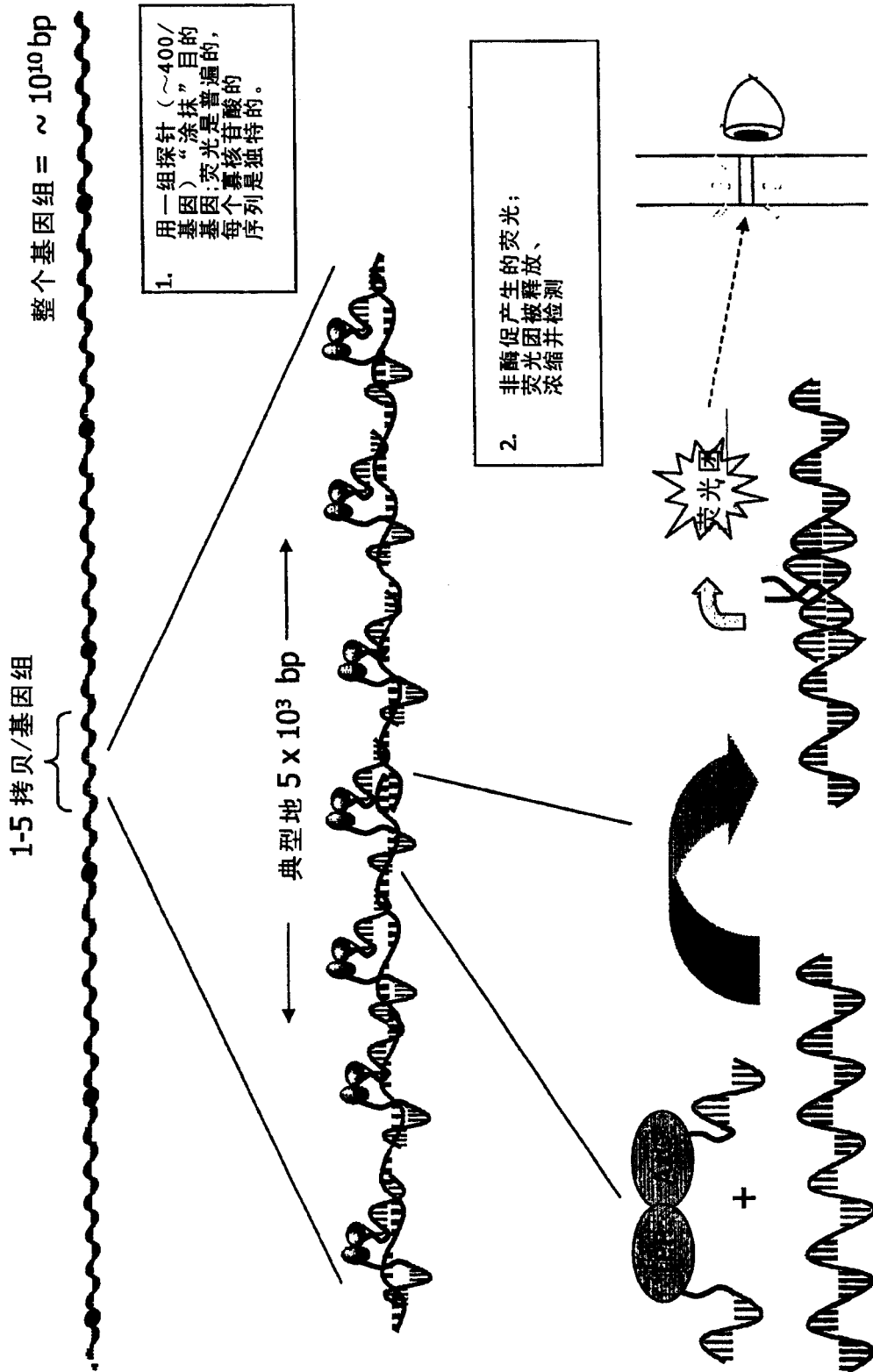
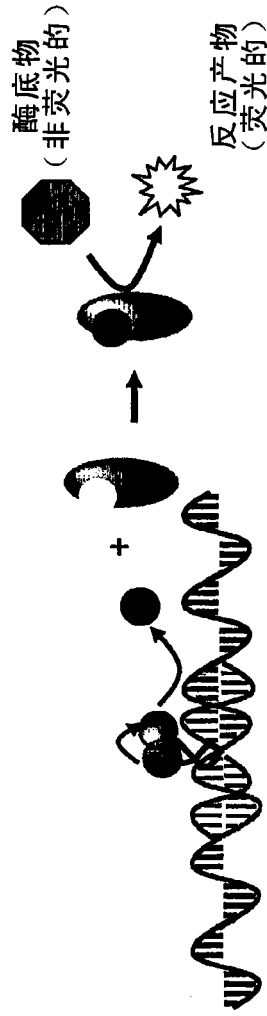


图2

辅因子释放



- 探针结合引起核酸模板反应
- 产物释放，跟着可检测的反应
- 每个探针结合事件释放许多产物分子

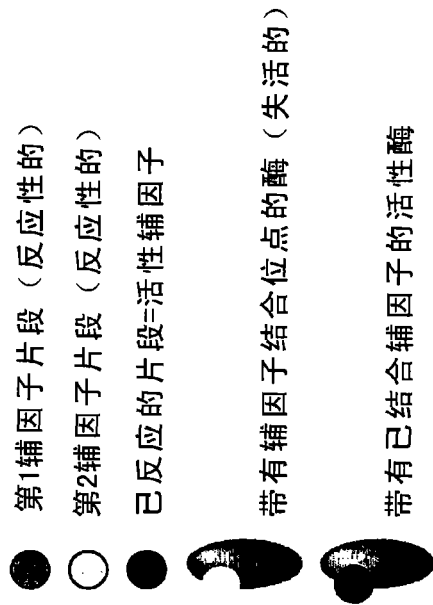
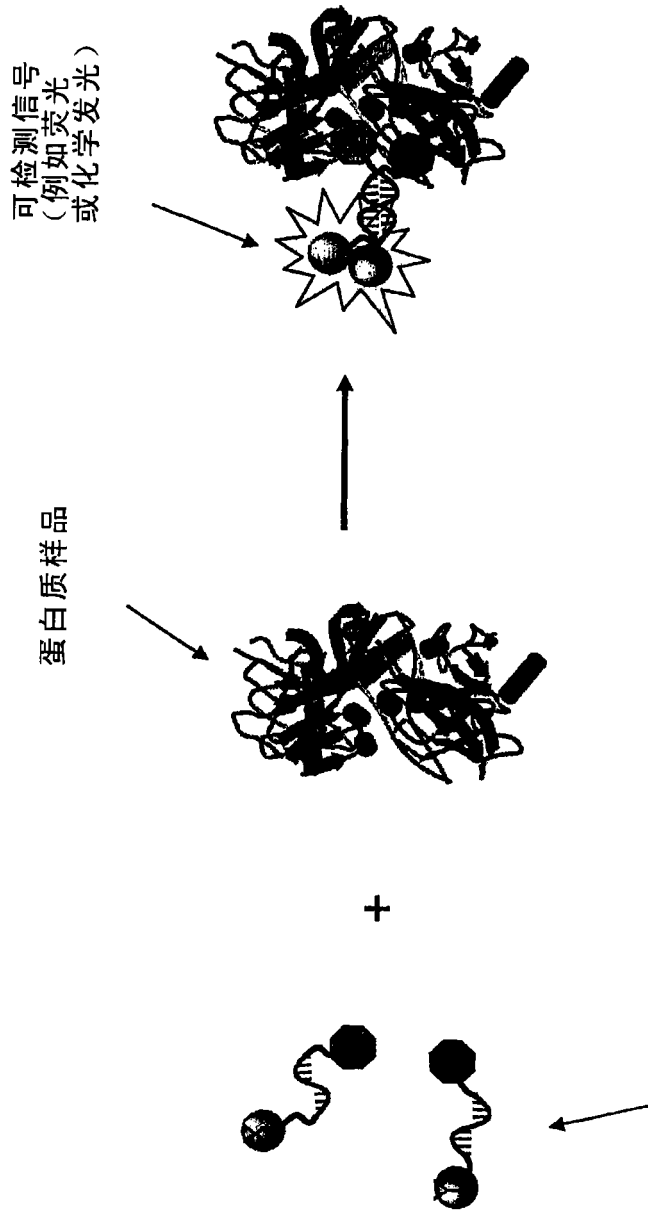


图3

蛋白质检测



- 探针，其带有基于抗体，适配体或小分子的蛋白质结合部分和反应基团
- 反应基团之间的互补寡核苷酸模板可检测反应

图4

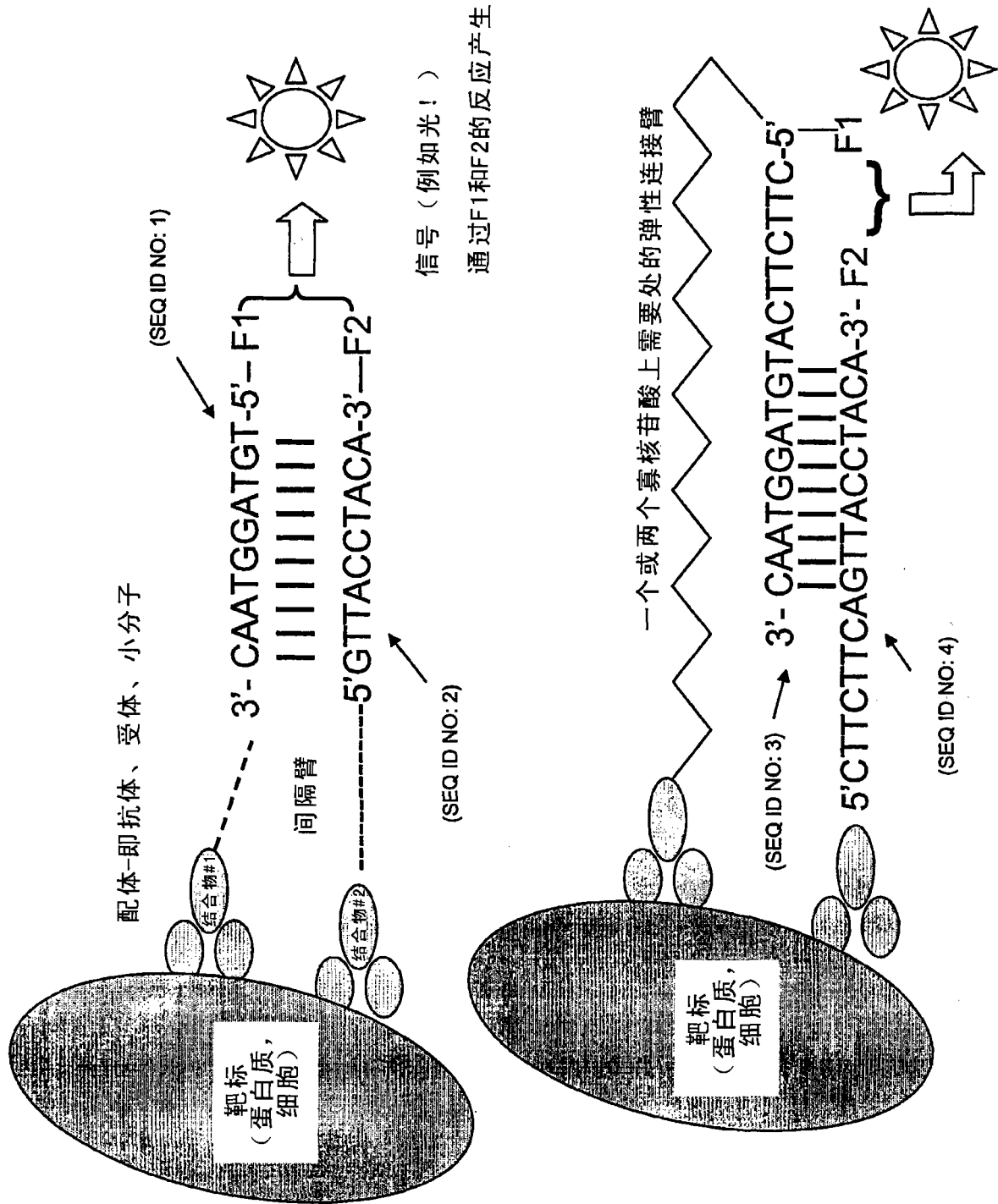
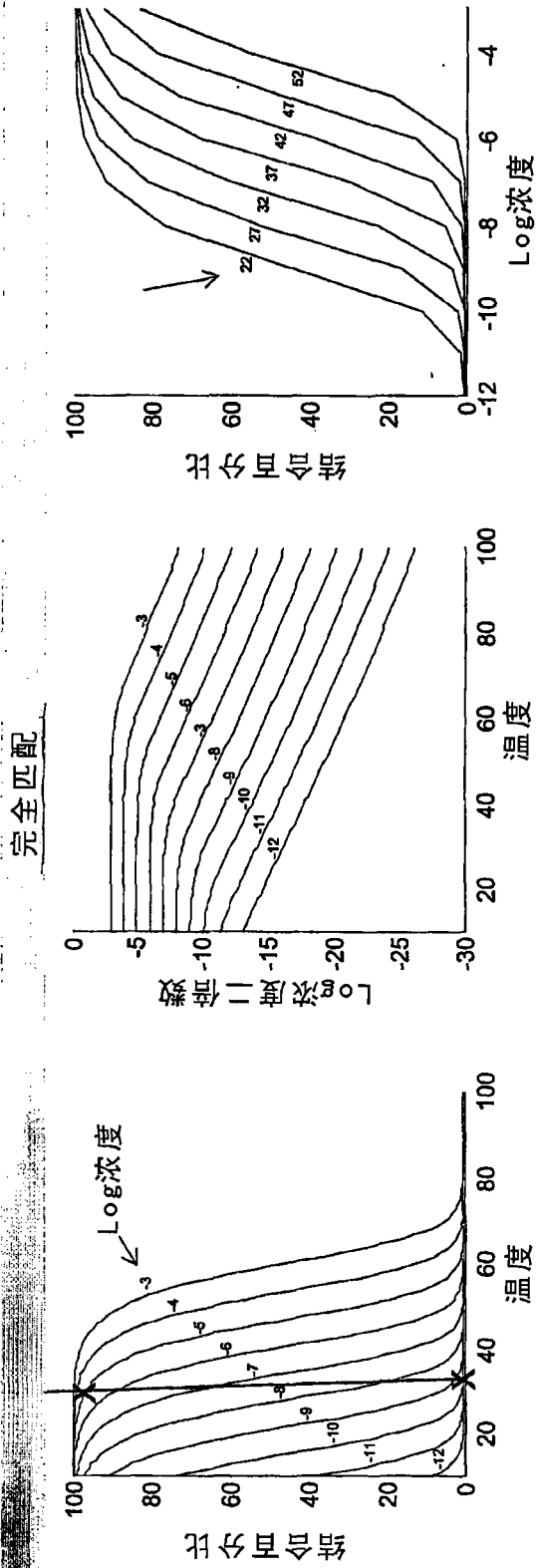
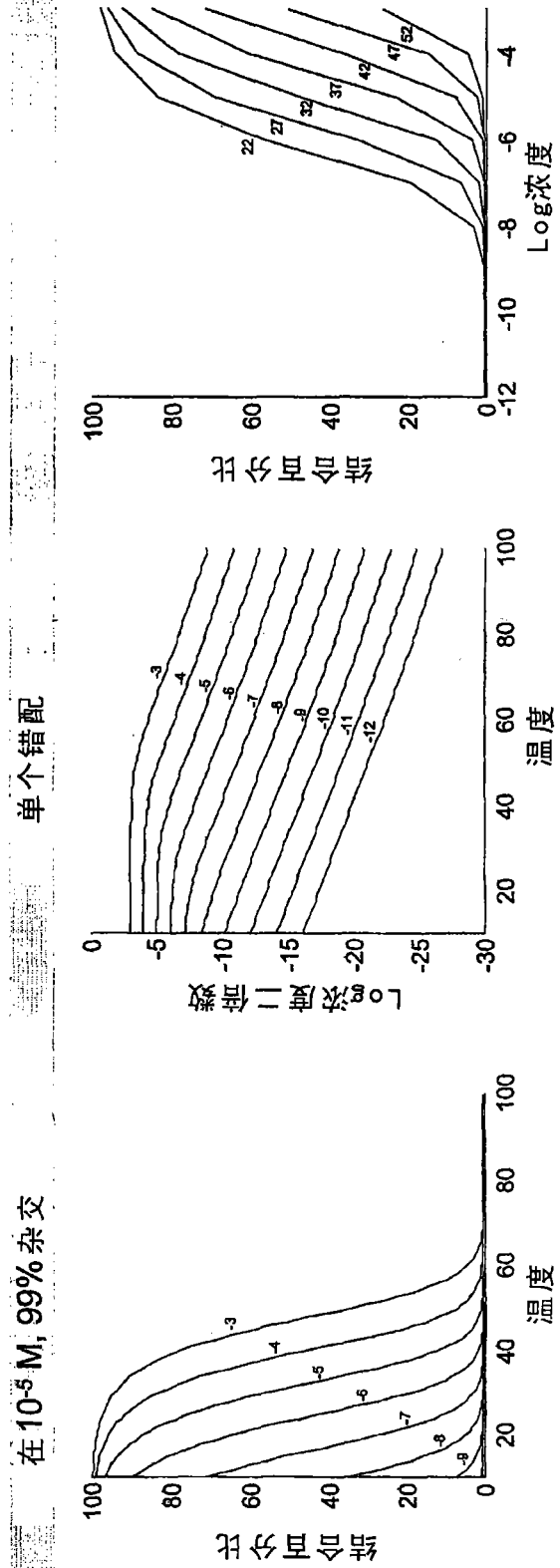


图5



在 37°C & 10<sup>-10</sup> M, 1% 杂交



在 10<sup>-5</sup> M, 99% 杂交

图6

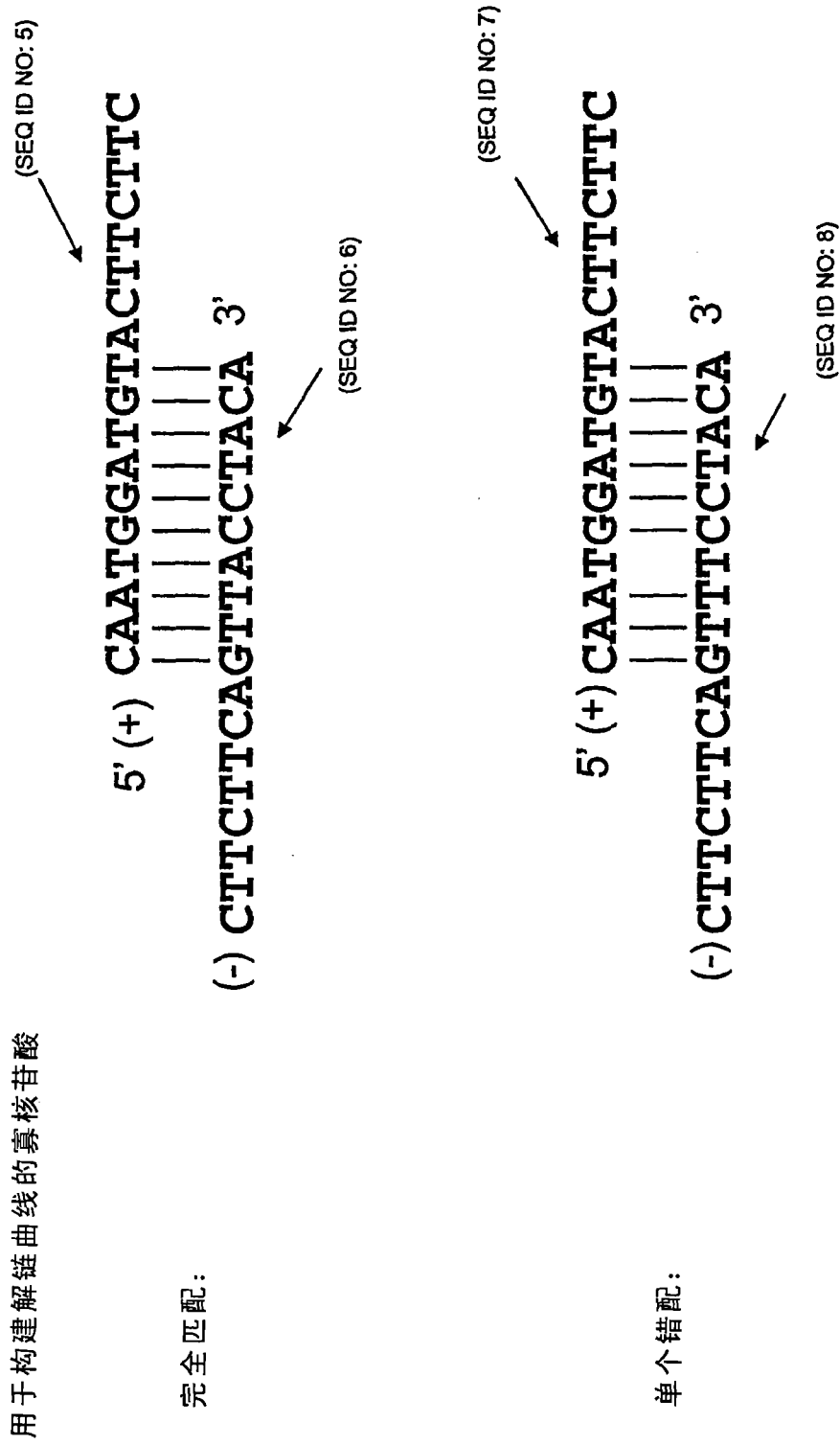
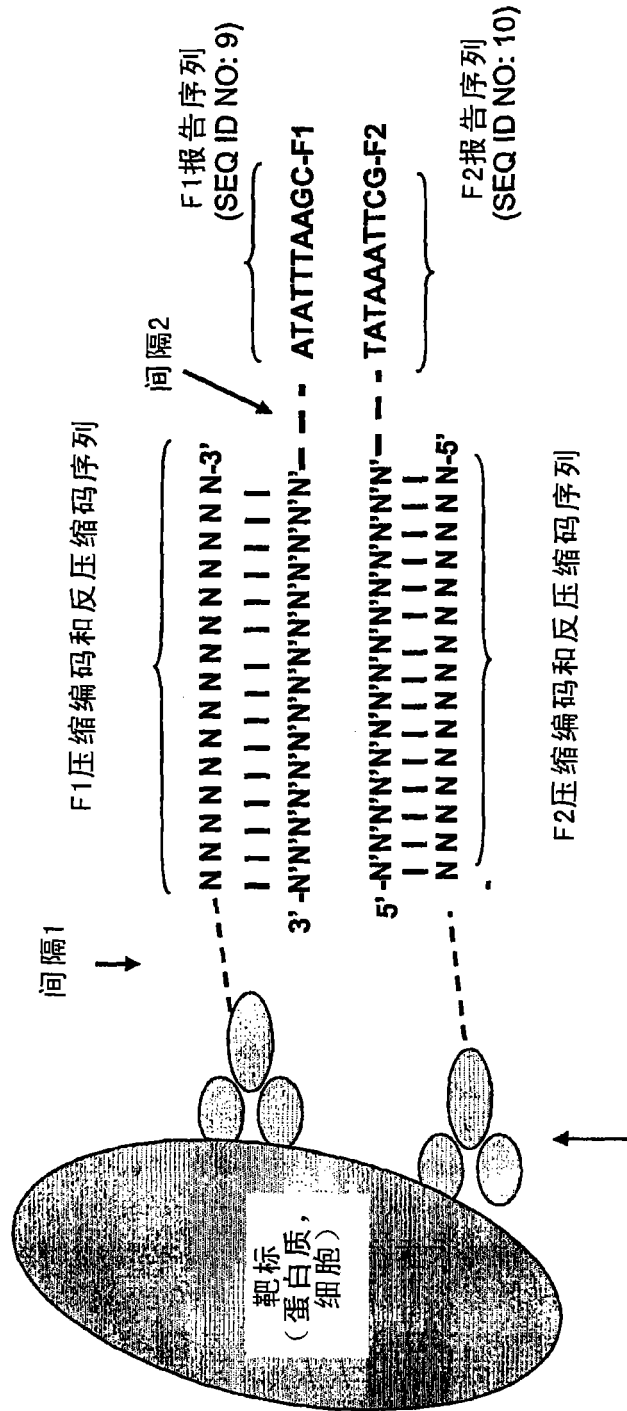


图7

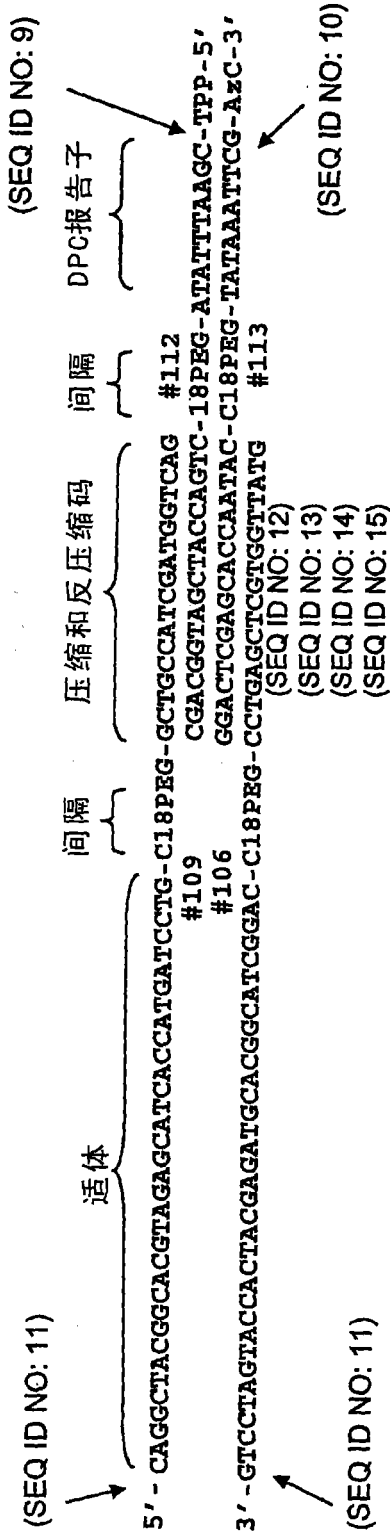


配体-即抗体、受体、小分子

图8



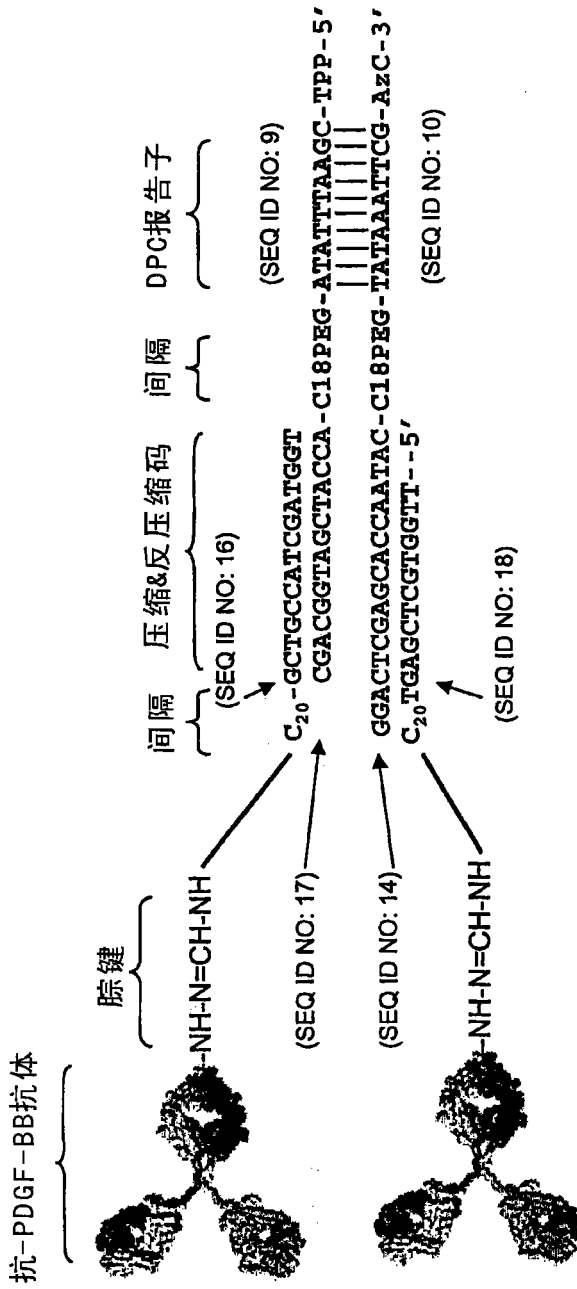




使用适体结合物的夹板、压缩码检测探针的例子

- 上面和下面的两个寡核苷酸包括适体序列，其与带有C18 PEG间隔的分离的压缩码序列连接。
- 内部的两个寡核苷酸（报告寡核苷酸）包括反压缩码（各自与上面和下面的寡核苷酸序列之一互补的序列），所述反压缩码通过C18 PEG间隔与报告寡核苷酸连接。
- 一个报告寡核苷酸含有5' 末端TTP残基，另一个含有3' 末端AzC残基。每个压缩码仅与其反压缩码互补。
- 报告序列仅彼此互补。

图10



使用抗体的夹板、压缩码检测探针的实例

- 抗-PDGF-BB抗体通过肽键用15-碱基的压缩码序列共价标记，所述压缩码序列带有胞嘧啶的20碱基的间隔(C20)。
- 带有互补的15碱基的反压缩码序列的TPP报告寡核苷酸通过C18 PEG间隔与10-碱基报告序列连接。
- 带有反压缩码序列和10碱基的报告序列的AzC报告寡核苷酸，所述10-碱基报告序列与TPP报告序列互补。反压缩码序列长20碱基，其中15个碱基与压缩码序列互补。

图11

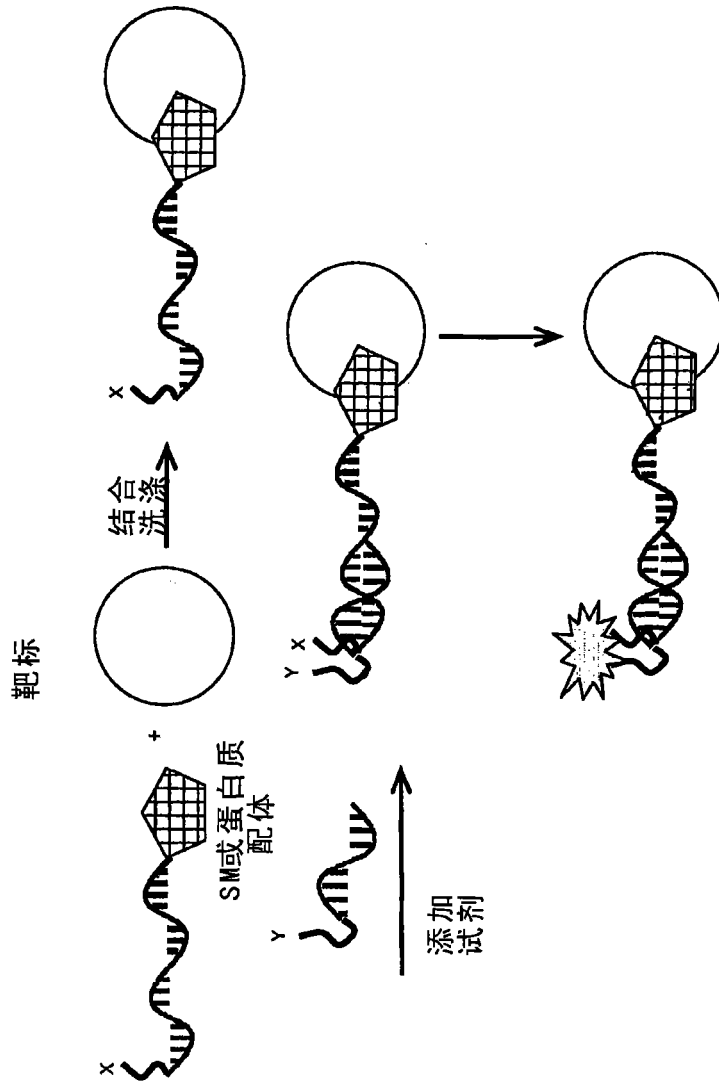
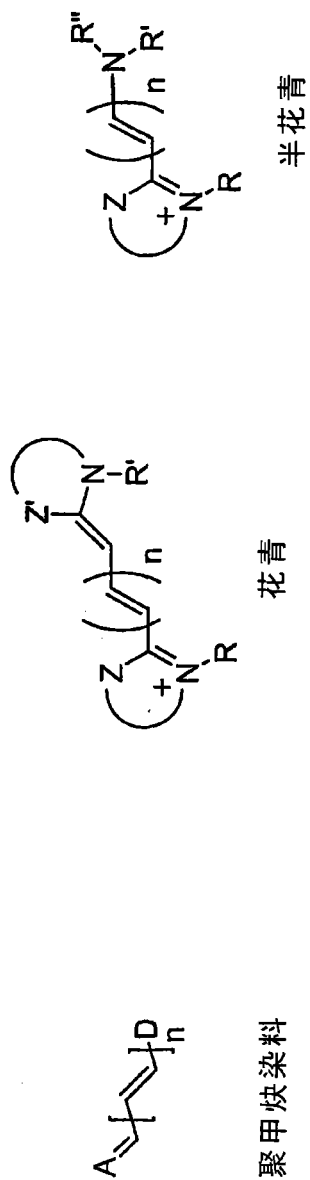


图12

聚甲炔染料、花青和半花青的一般结构



聚甲炔染料

花青

半花青

A = 受体 D = 供体 Z, Z' = O, S, N, C ... n = 0, 1, 2 ... R, R', R'' = 烷基链

用于聚甲炔染料的典型A和D: 噻唑、吡咯、吡啶、咪唑、1,3,3-三甲基咪唑啉、四唑、噻吩、吡啶、喹啉和高级的融合N-杂环或任何取代的苯基环。

图13

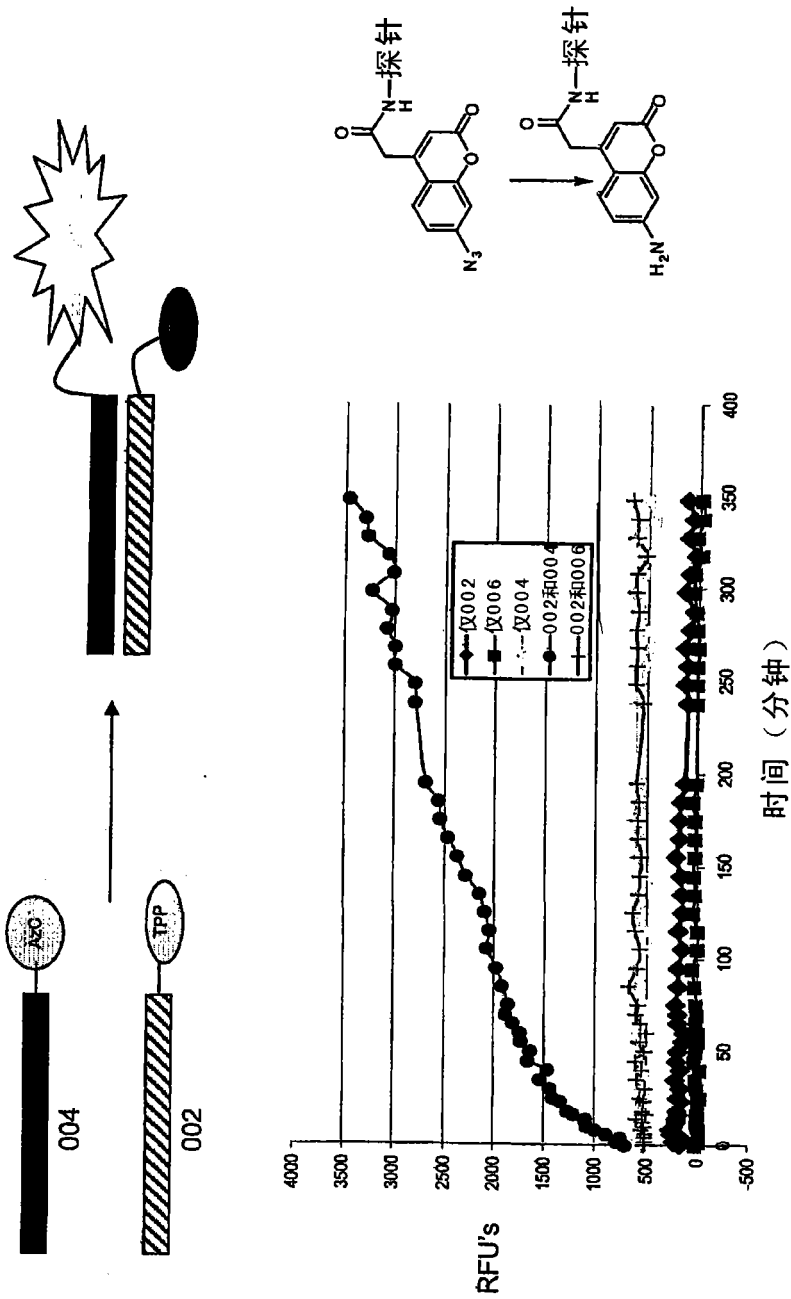


图14

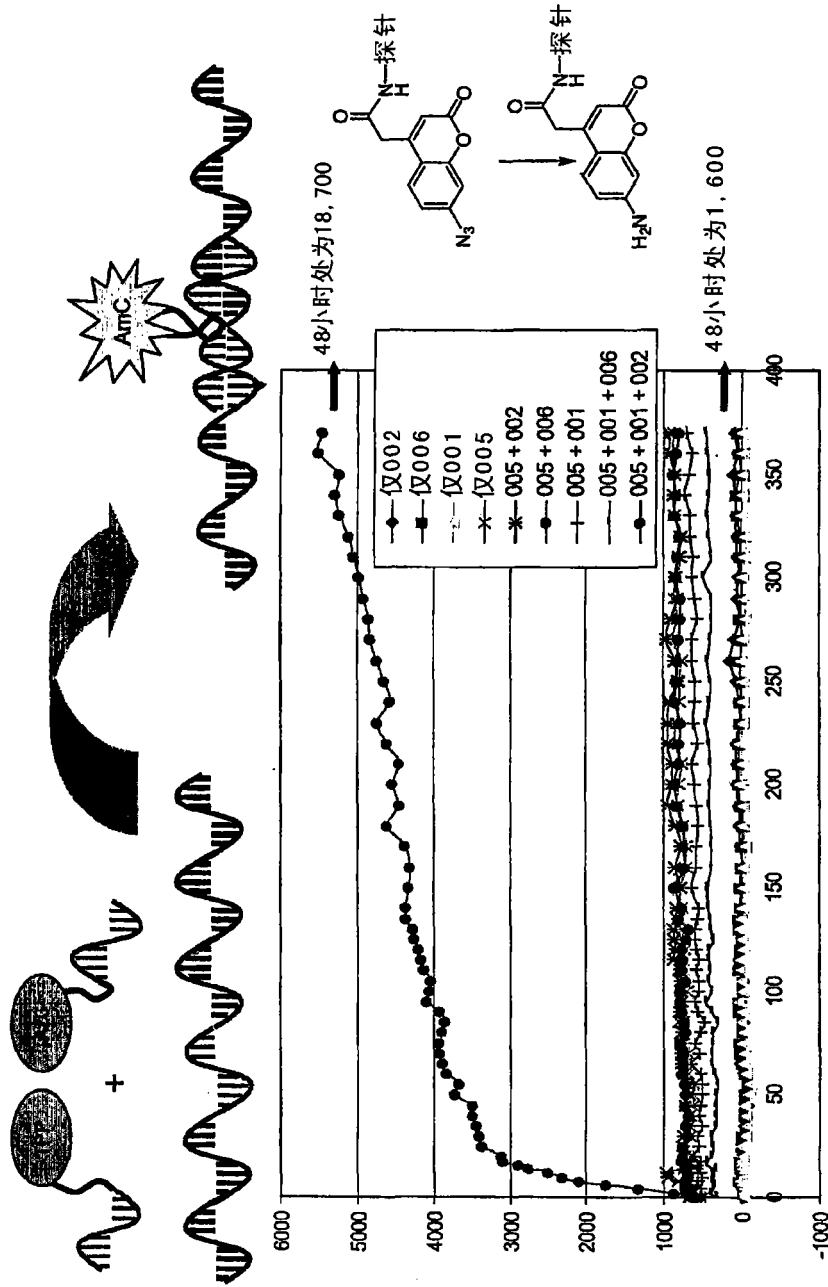
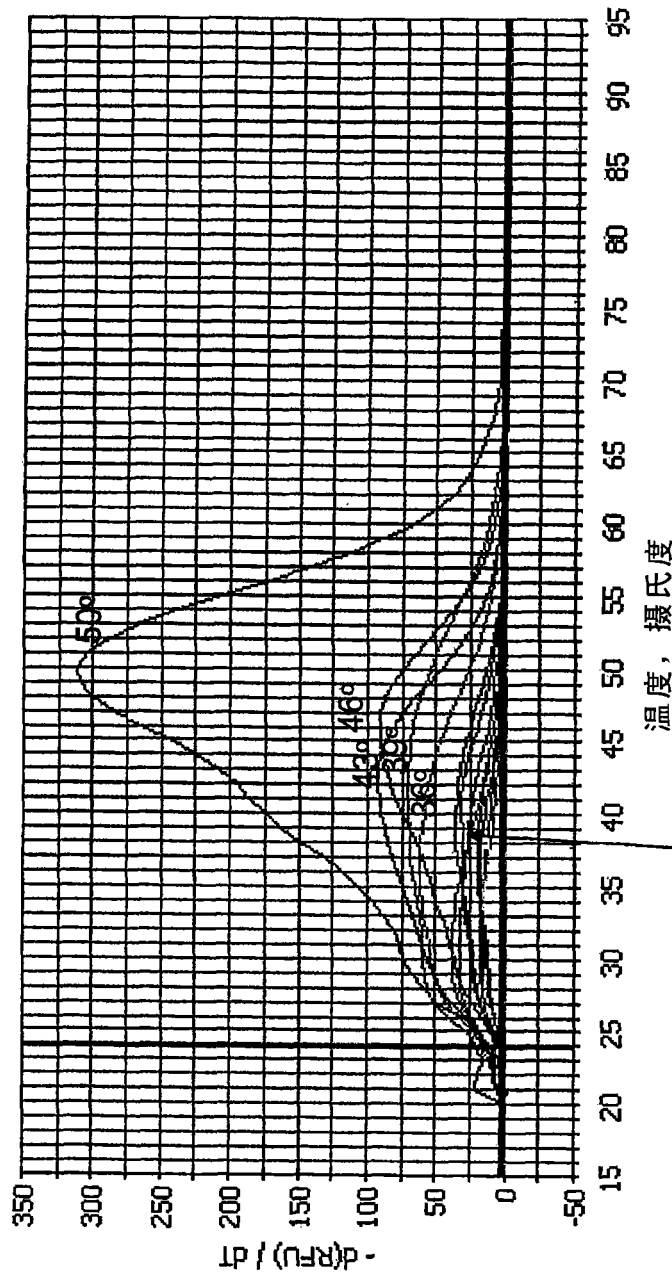


图15

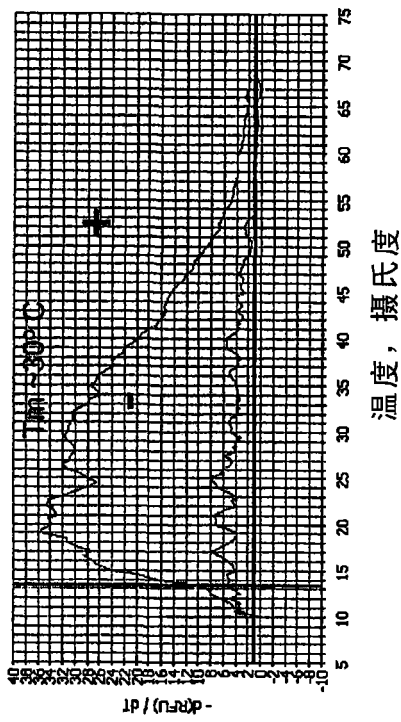
解链曲线, 10碱基的互补寡核苷酸  
1.0 M NaCl, 500 nM -20 nM 寡核苷酸



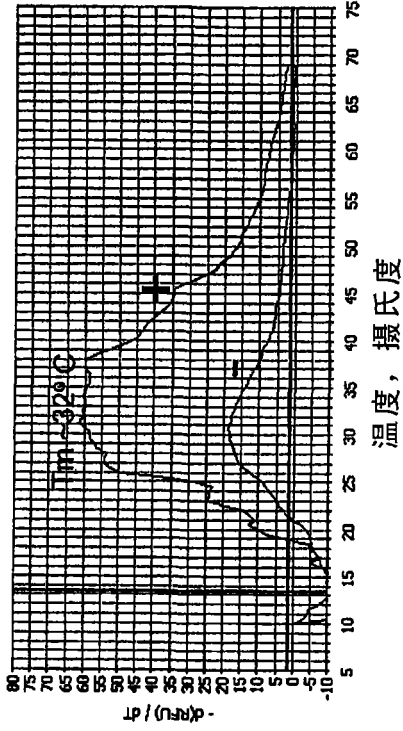
2-2-碱基错配 -  $T_m$  为42°C到31°C  
每10倍寡核苷酸浓度  $T_m$  降低约10°C

图16

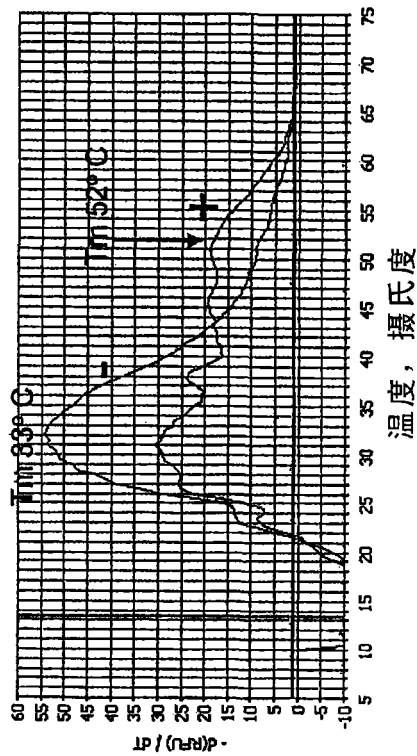
未生物素化的寡核苷酸23



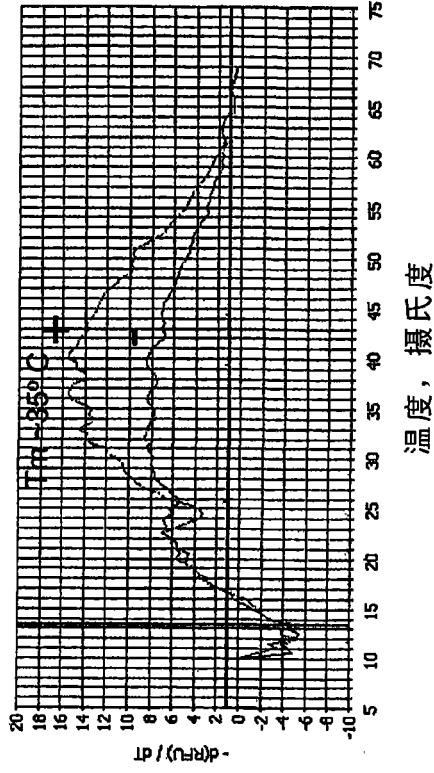
互补的未生物素化寡核苷酸



互补的生物素化寡核苷酸



部分互补的生物素化寡核苷酸



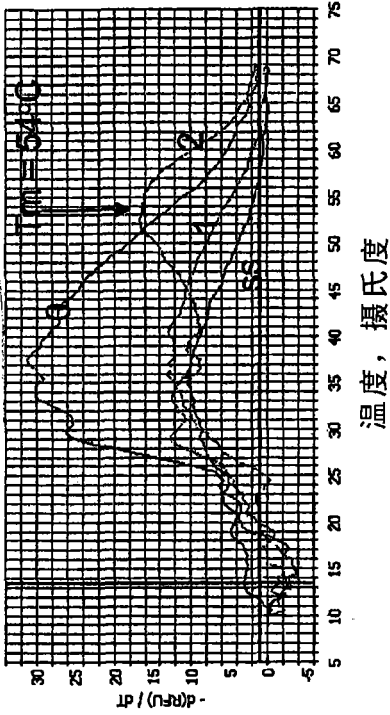
“热启动”DNA杂交体解链曲线+/-抗生物素蛋白  
100 nM 寡核苷酸, 100 nM 抗生物素蛋白, 25 mM 盐

图17

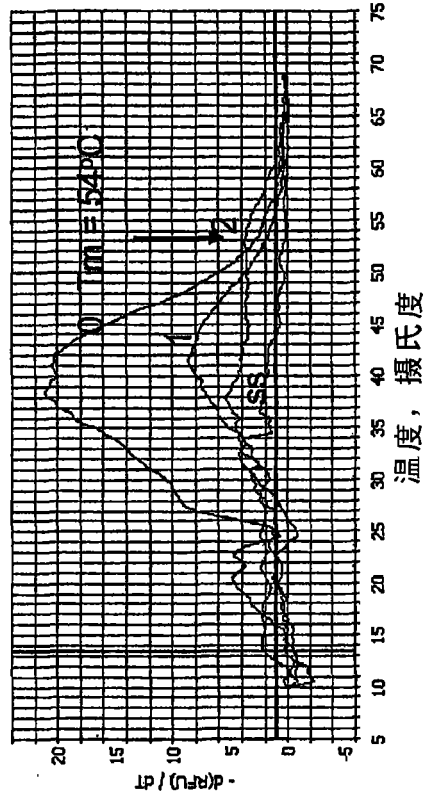


互补的生物素化寡核苷酸

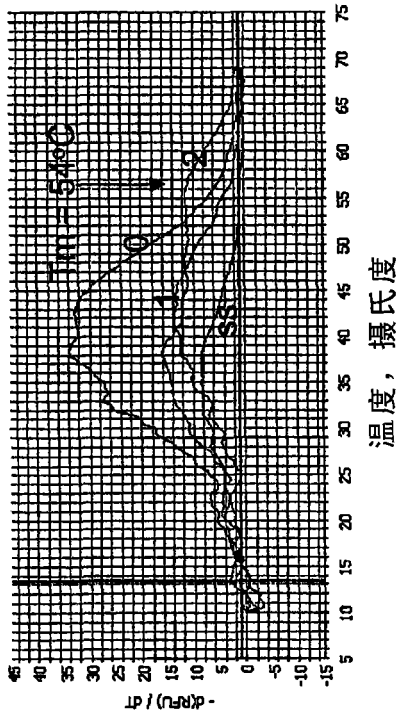
与抗生物素蛋白结合后 $T_m$ 从 $\sim 35^\circ\text{C}$ 提高至 $\sim 54^\circ\text{C}$



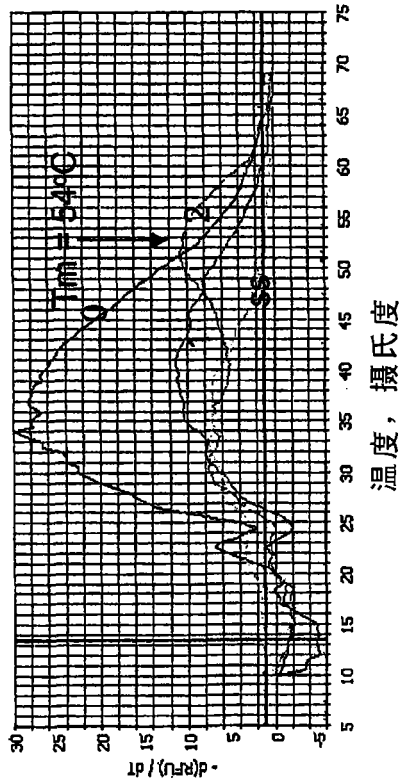
25 mM 盐, 50 nM 抗生物素蛋白



200 mM 盐, 50 nM 抗生物素蛋白



100 mM 盐, 50 nM 抗生物素蛋白



50 mM 盐, 50 nM 抗生物素蛋白

2=两条链均被生物素化, 1=两条链之一被生物素化,  
0=两条链均未生物素化 SS=仅一条链被生物素化

图18

盐浓度对 $T_m$ 的影响

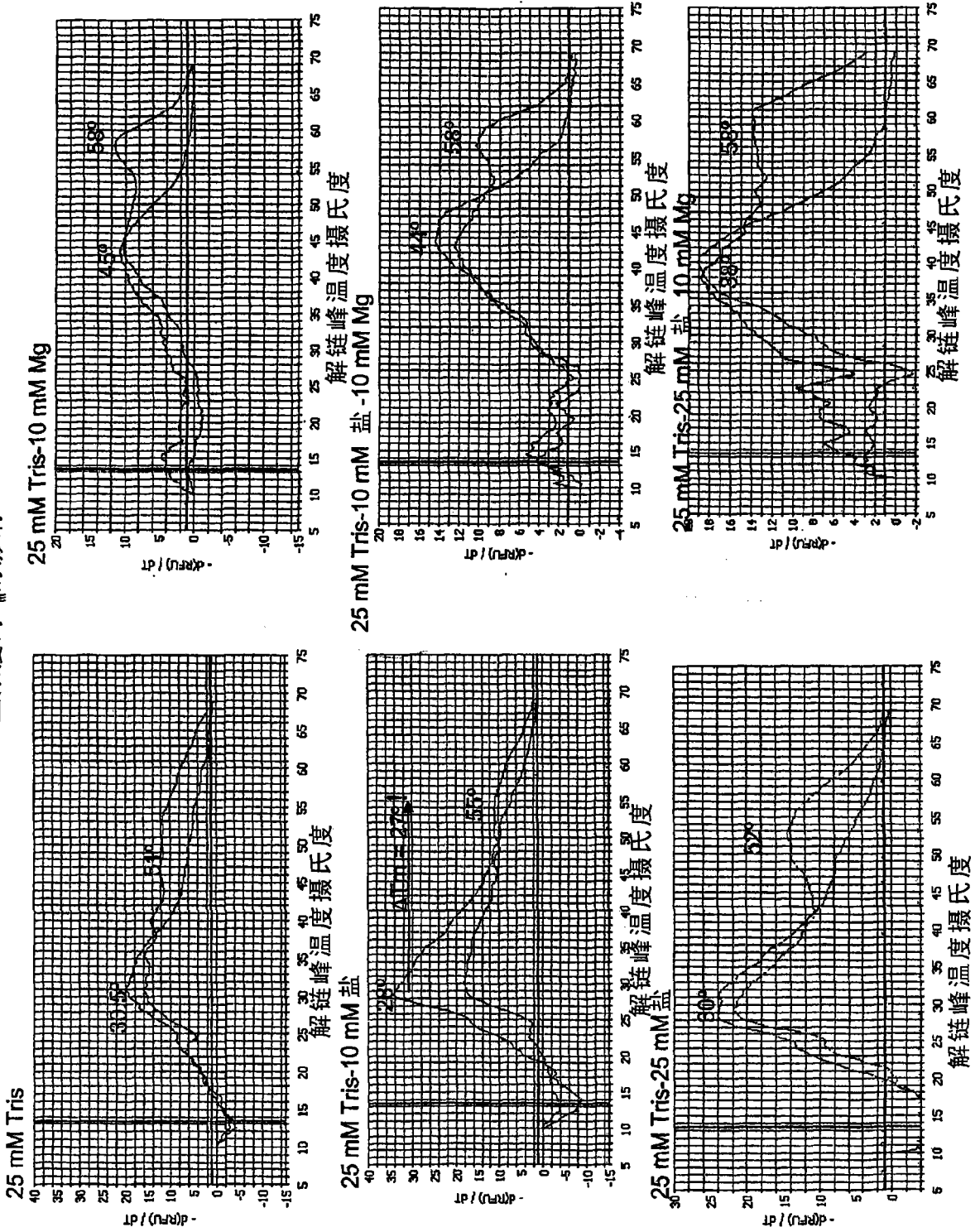
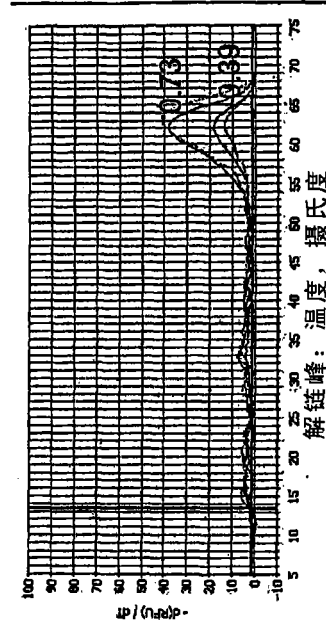
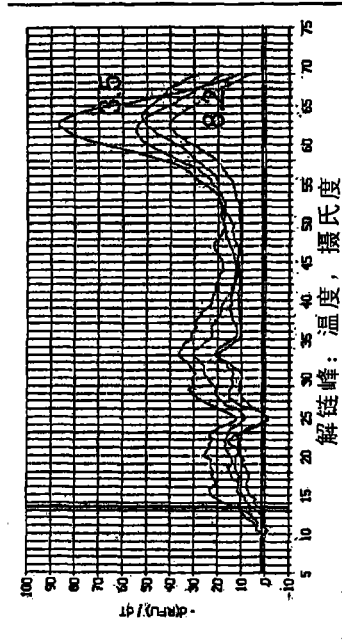
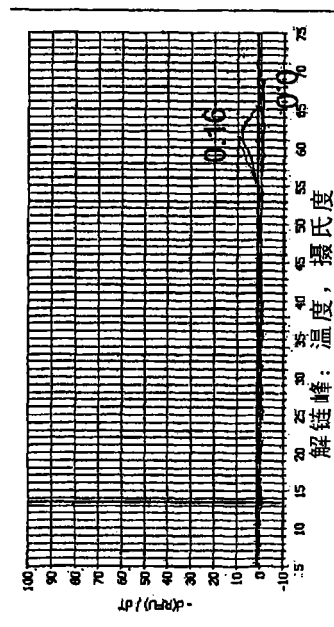
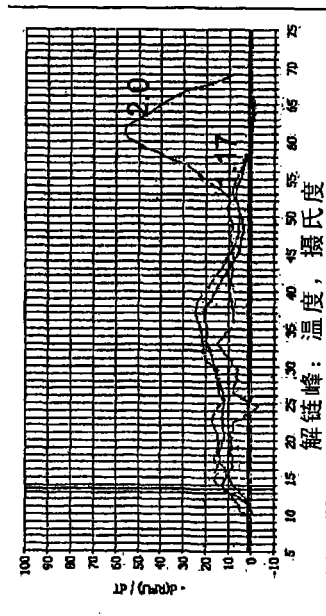
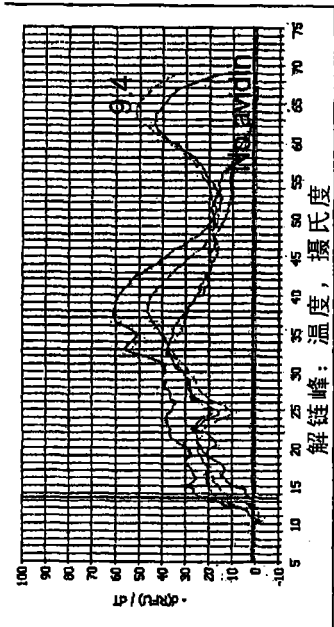


图19

生物素化的寡核苷酸对抗生素蛋白的比例



富含A-T的生物素化的寡核苷酸解链曲线的一阶导数

寡核苷酸对抗生素蛋白的摩尔比例

寡核苷酸+抗生素蛋白=恒为7μM

图20

与生物素-5' (+) 链寡核苷酸成为双链体的5' 和3' (-) 生物素-链寡核苷酸的解链曲线

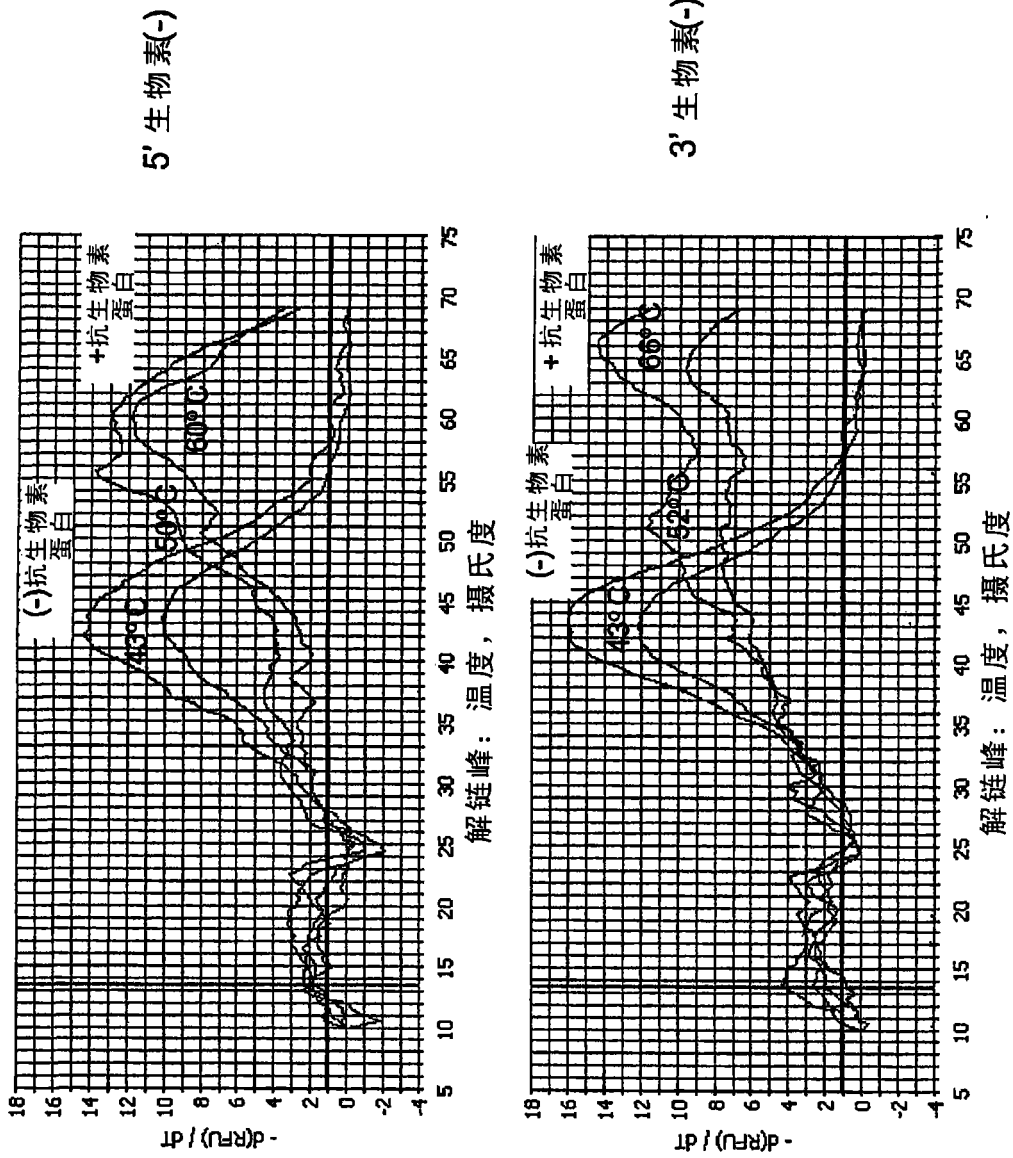
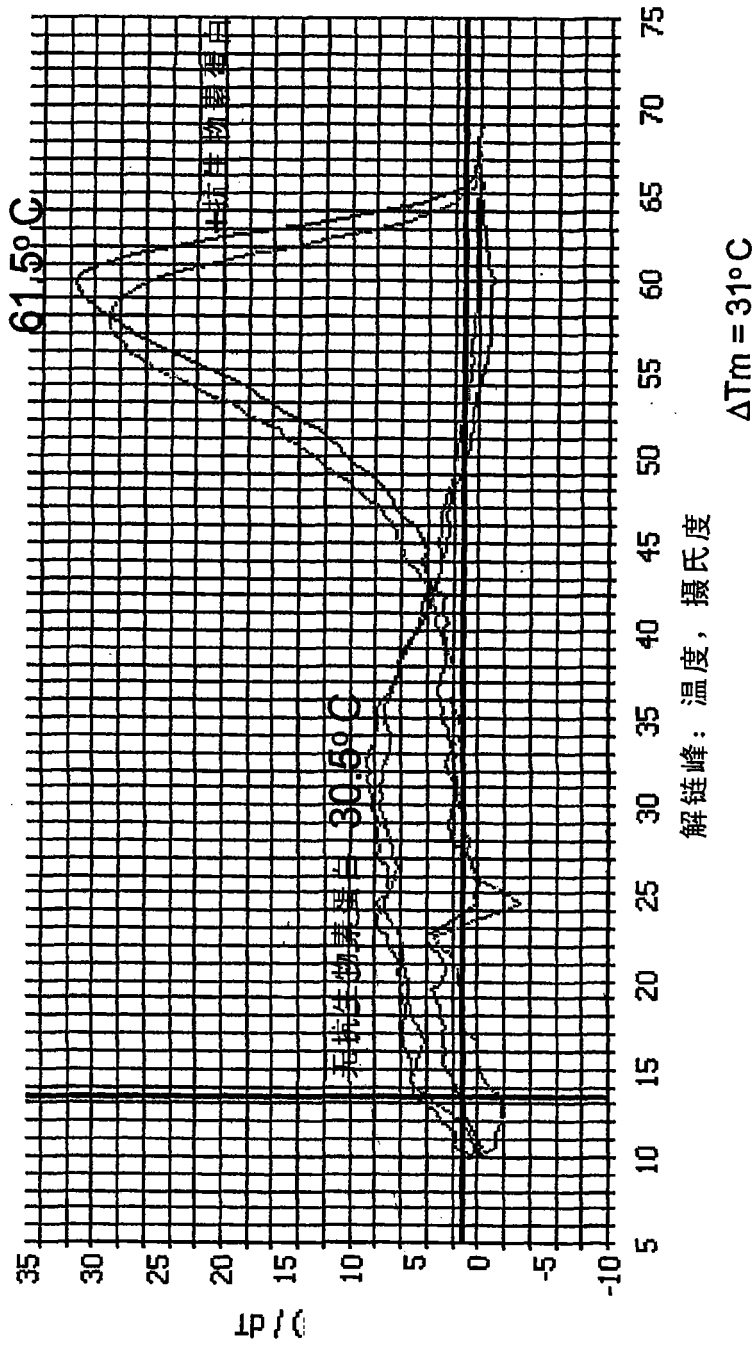


图21

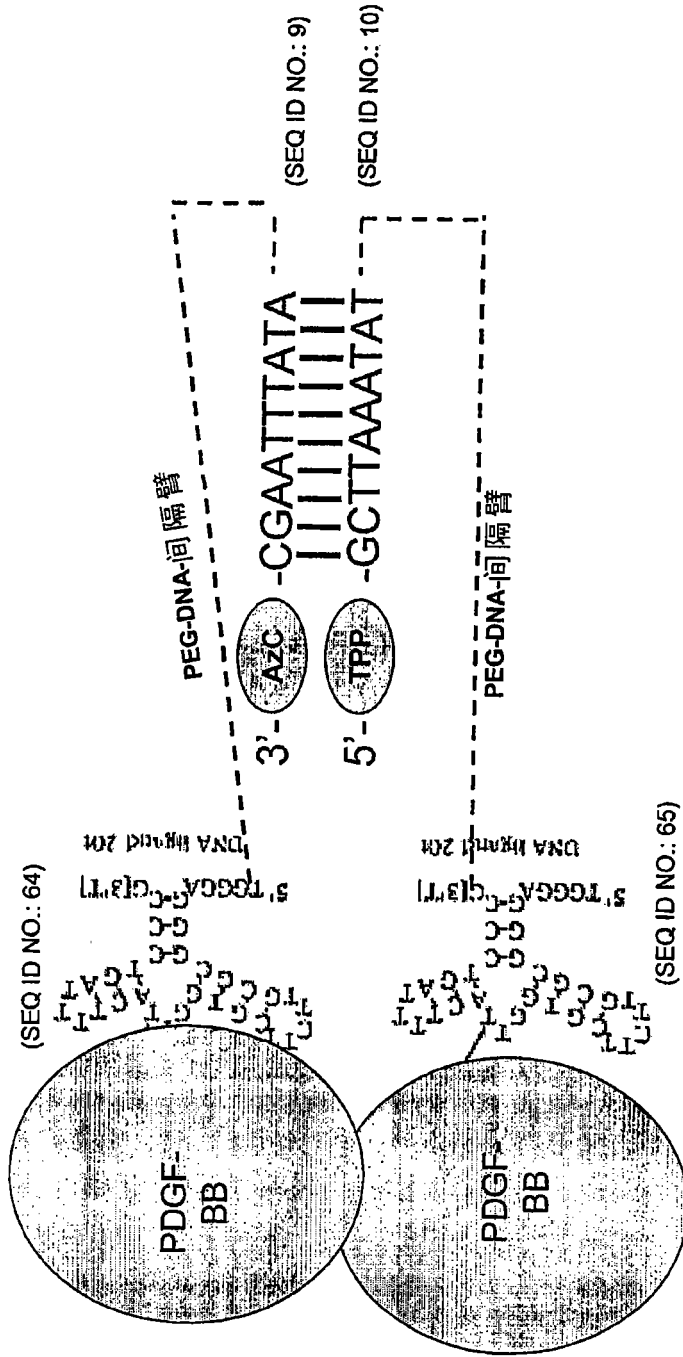
富含AT的生物素化寡核苷酸二聚体+/-靶标的解链曲线



(+) 5'-TTTTTTTTTTTTTTAAATTTAAA-3' (SEQ ID NO.:27)  
 (-) 3'AAATTTAATTTTTTTTTTTTTTT-5' (SEQ ID NO.:27)

图22

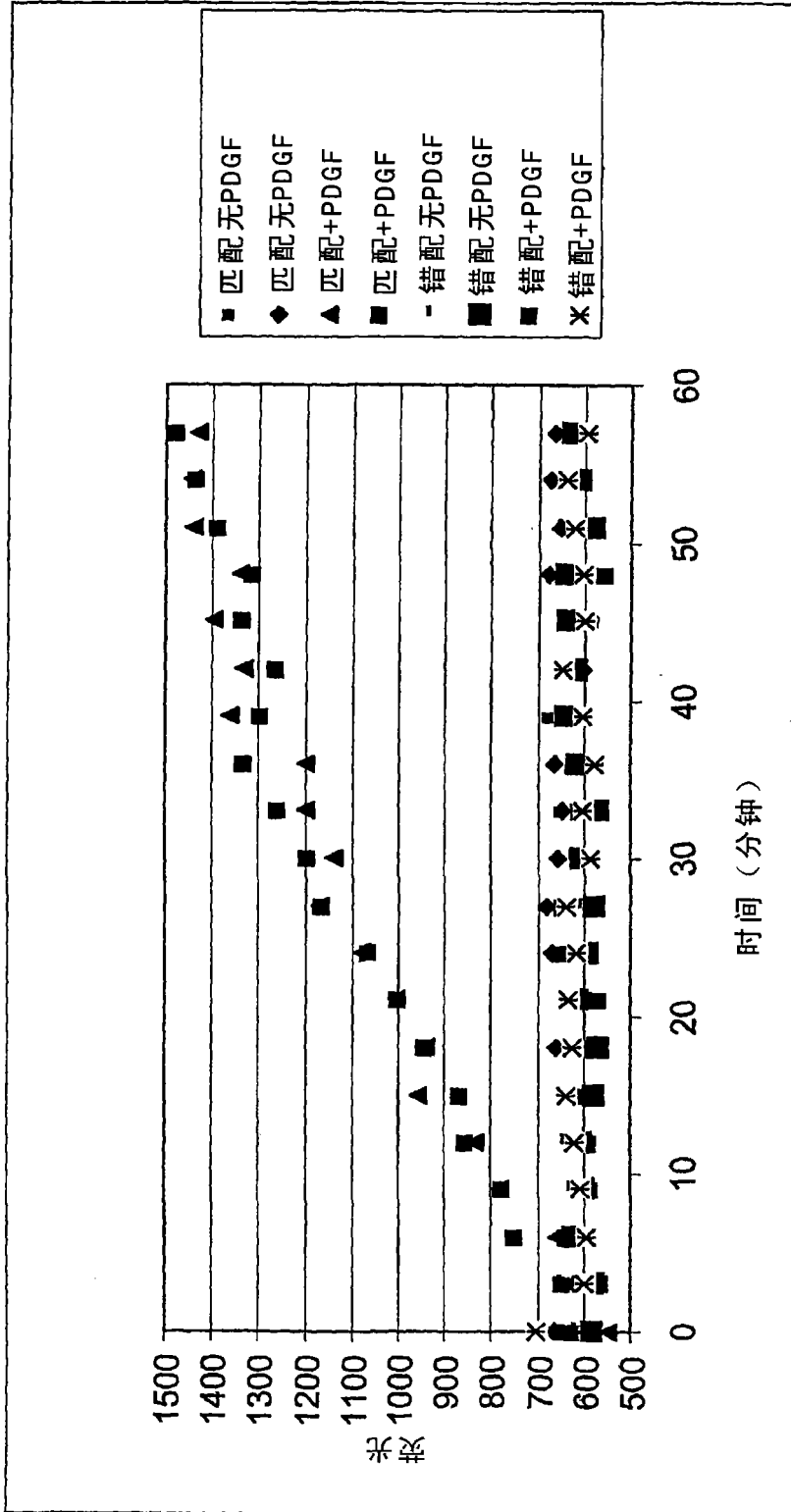
用适体-DPC寡核苷酸检测PDGF-BB



用于单片检测寡核苷酸的示例性序列和比对。

- 在该模式中测试的间隔序列与图10中适体寡核苷酸中的压缩码序列相同。
- 上面的序列是寡核苷酸#104，下面是寡核苷酸#108。这两个序列不互补。

图23



不发生适体探针与PDGF的反应。

1) 不存在PDGF时

2) 如果DNA序列与香豆素探针中TPP探针错配时

图24

甲酰胺中的速率

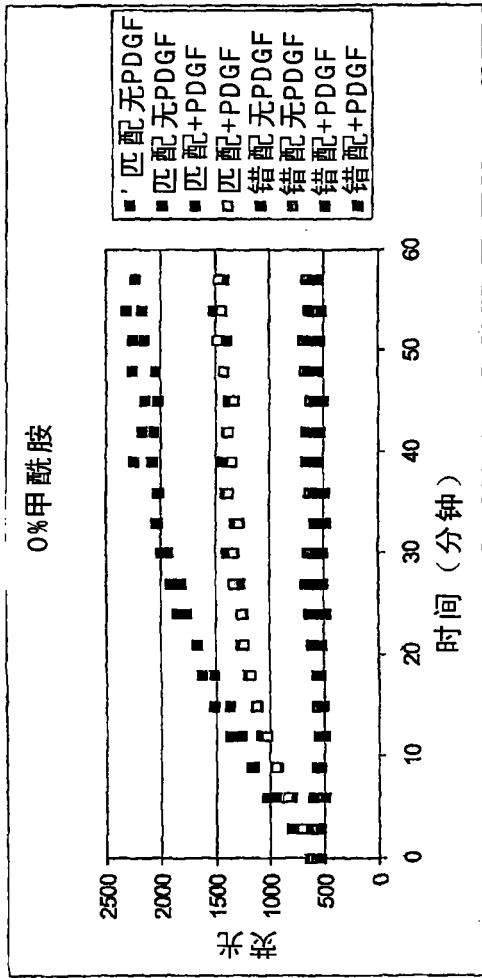


图25A

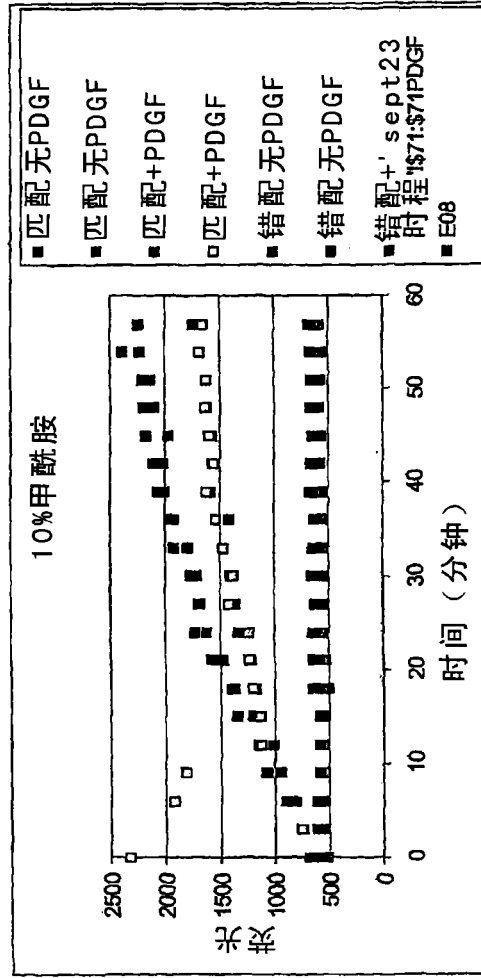


图25B



甲酰胺中的速率

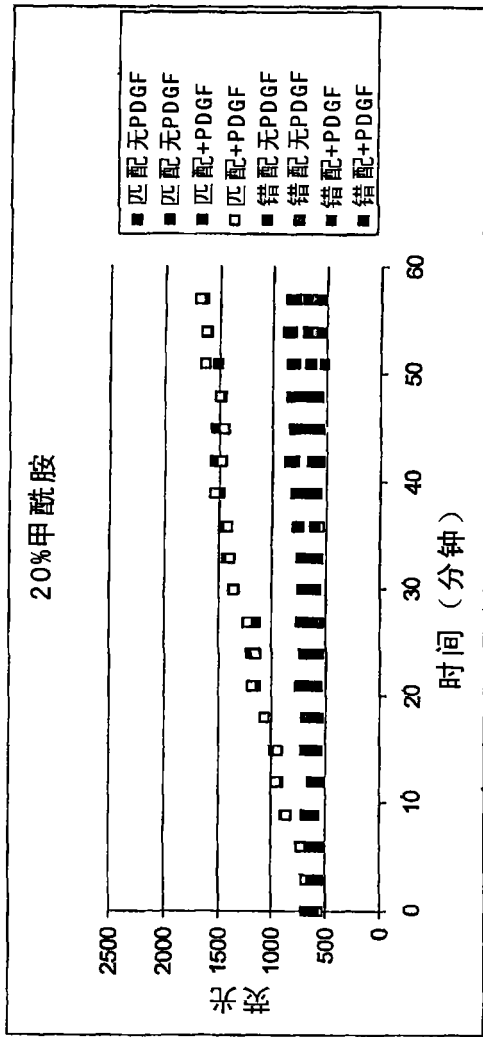


图26A

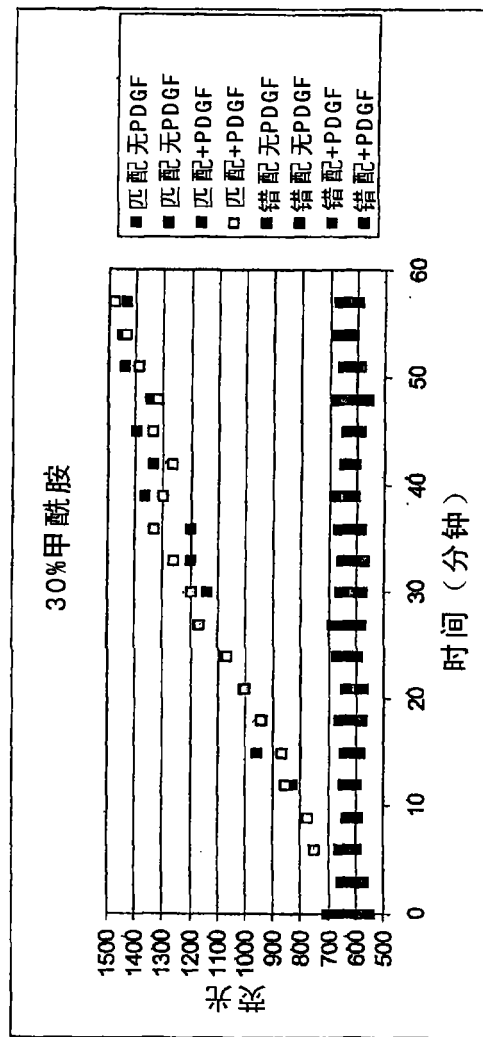


图26B

甲酰胺中的速率

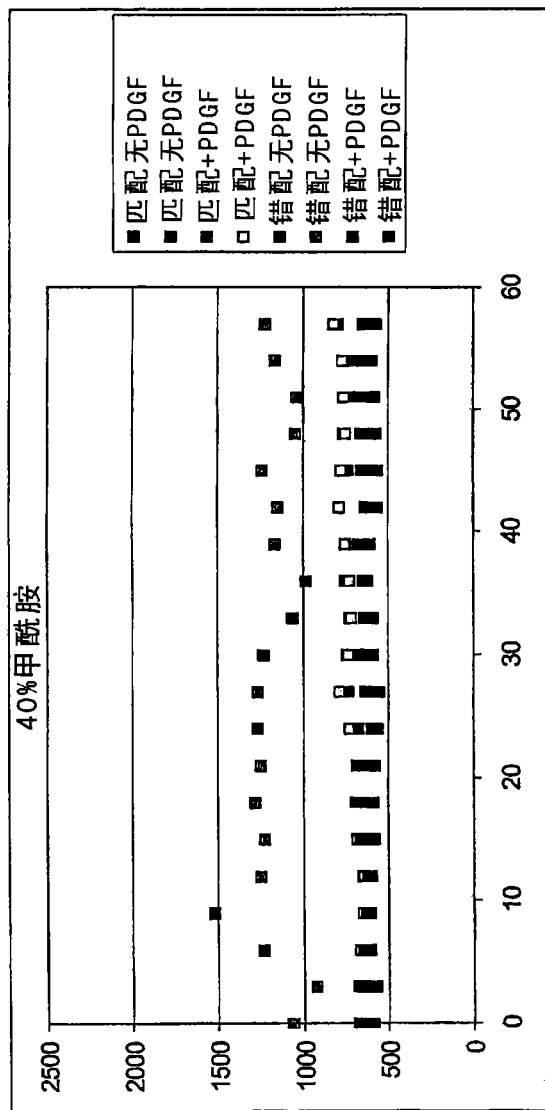


图27

用基于适体的探针同源测定检测PDGF-BB

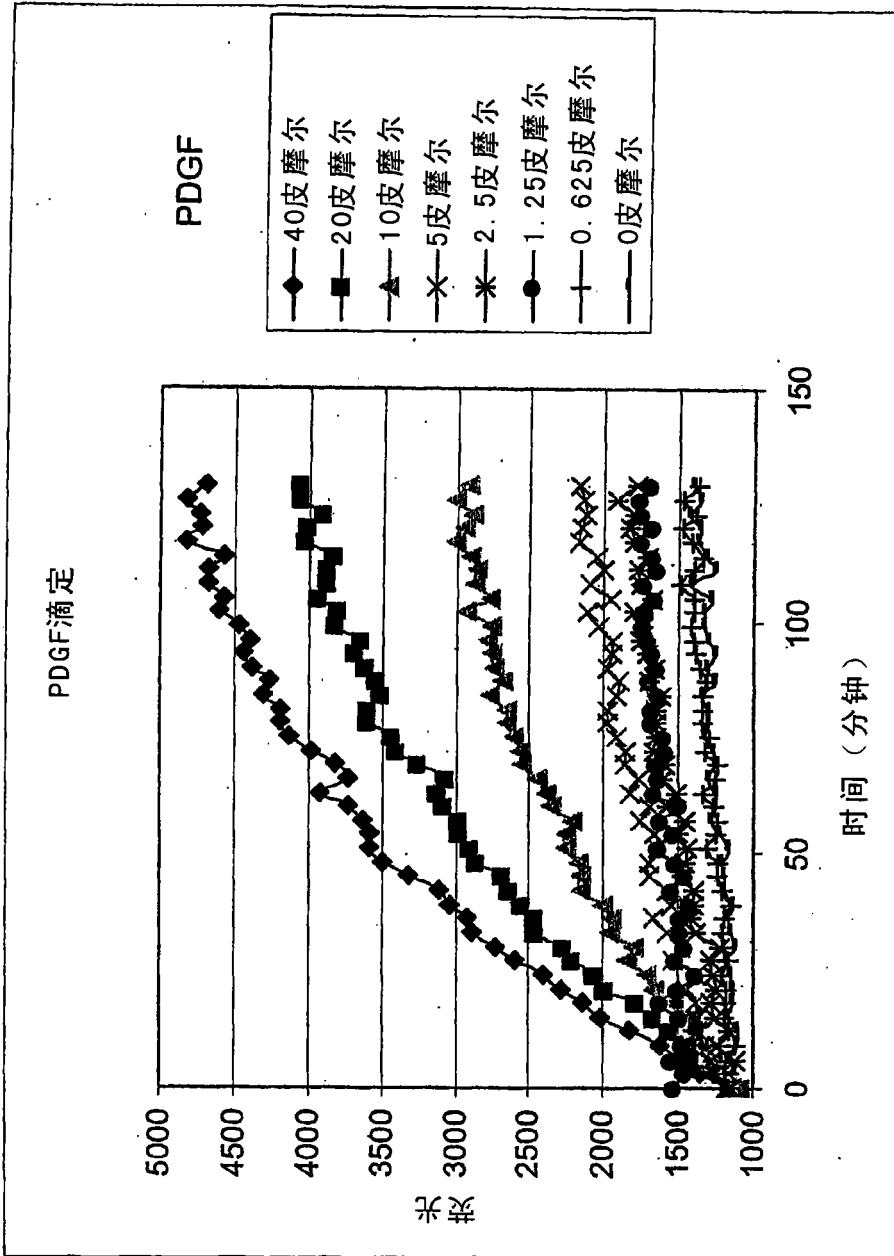


图28

用适体-DPC探针同源测定检测PDGF-AA

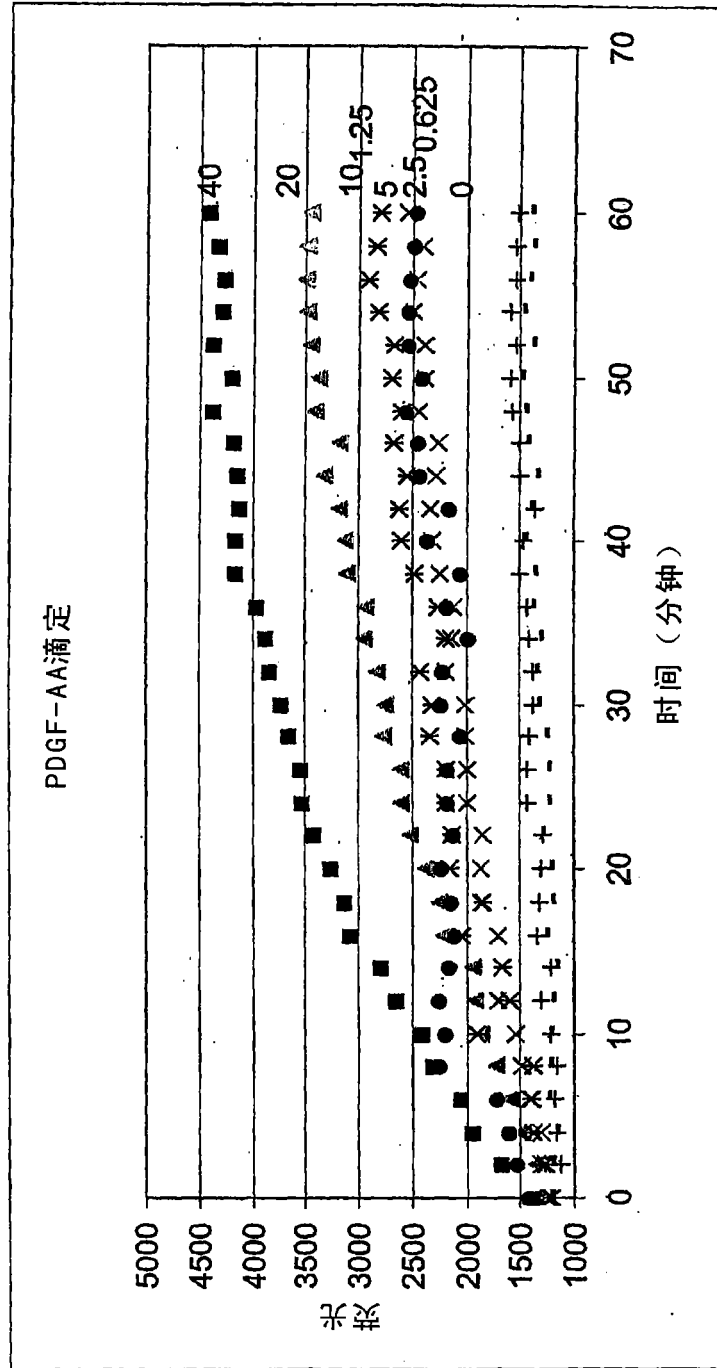


图29

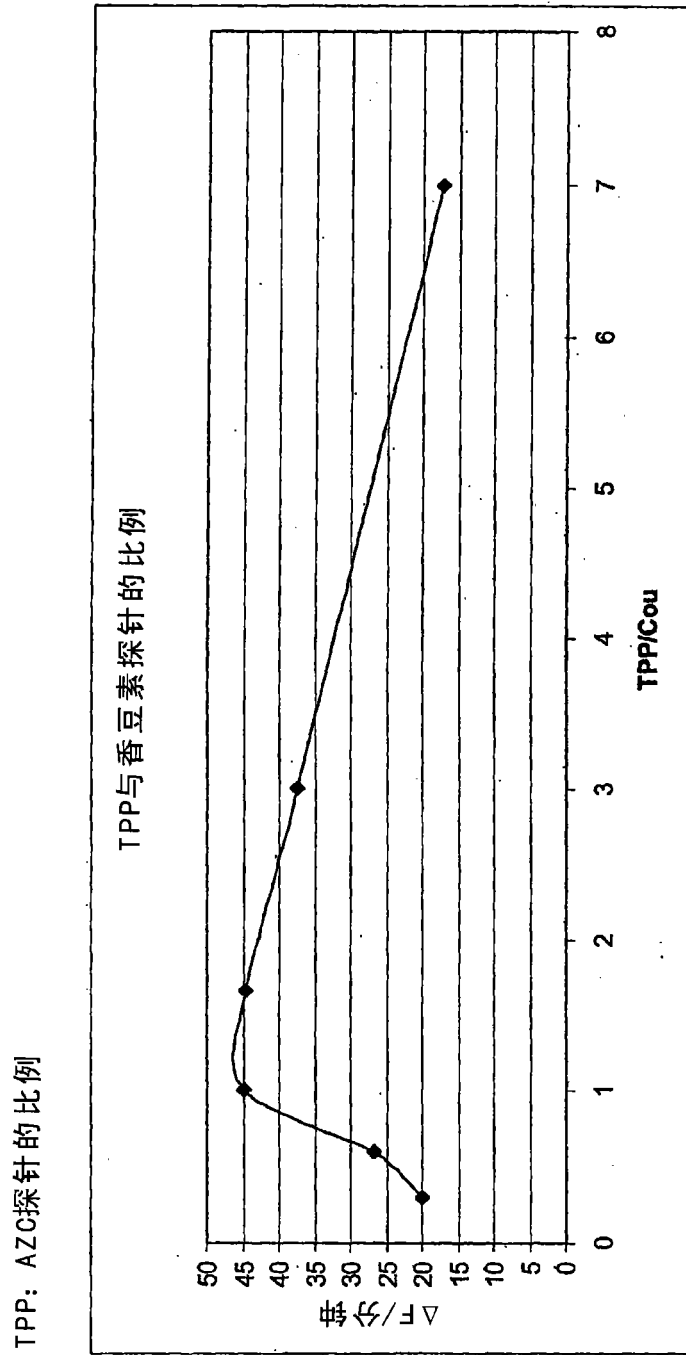
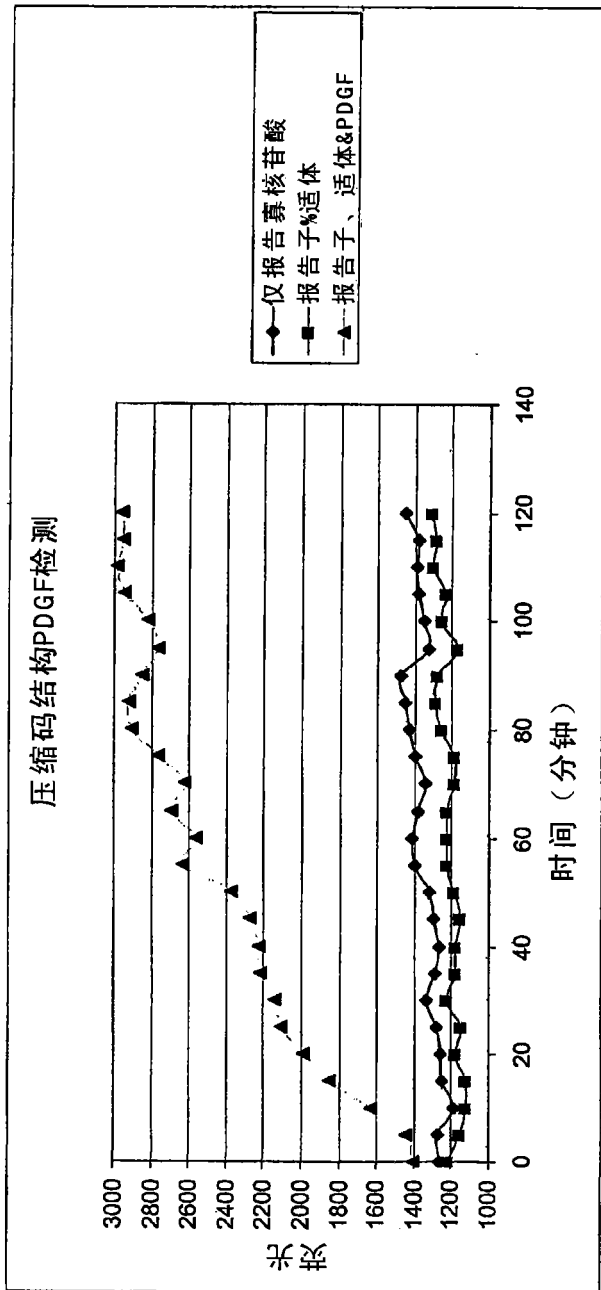
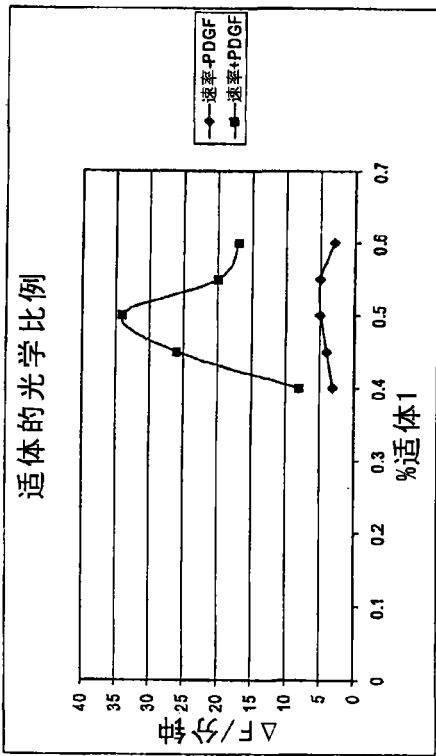


图30

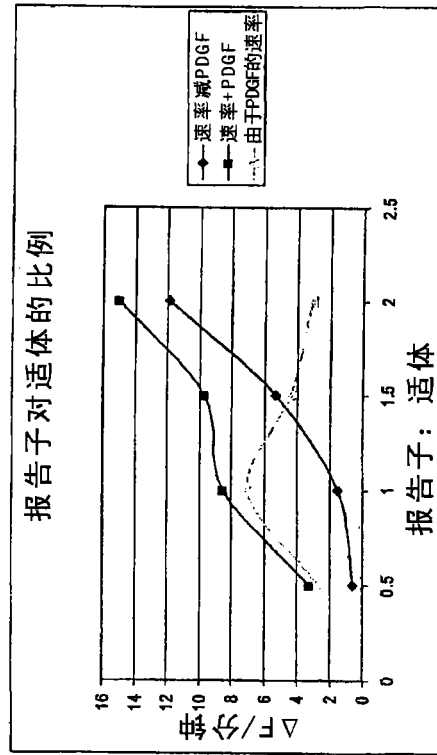


- 夹板结构取决于适体和报告寡核苷酸二者的存在。
- 所有的反应物均在0到0.4 μM浓度、22°C、50 mM Tris/HCl pH 8.5-10 mM MgCl<sub>2</sub>-35% v/v 甲酰胺中测试。
- 在Wallac Victor光度计中用350 nm处激发和460 nm处发射测量。

图31



A)



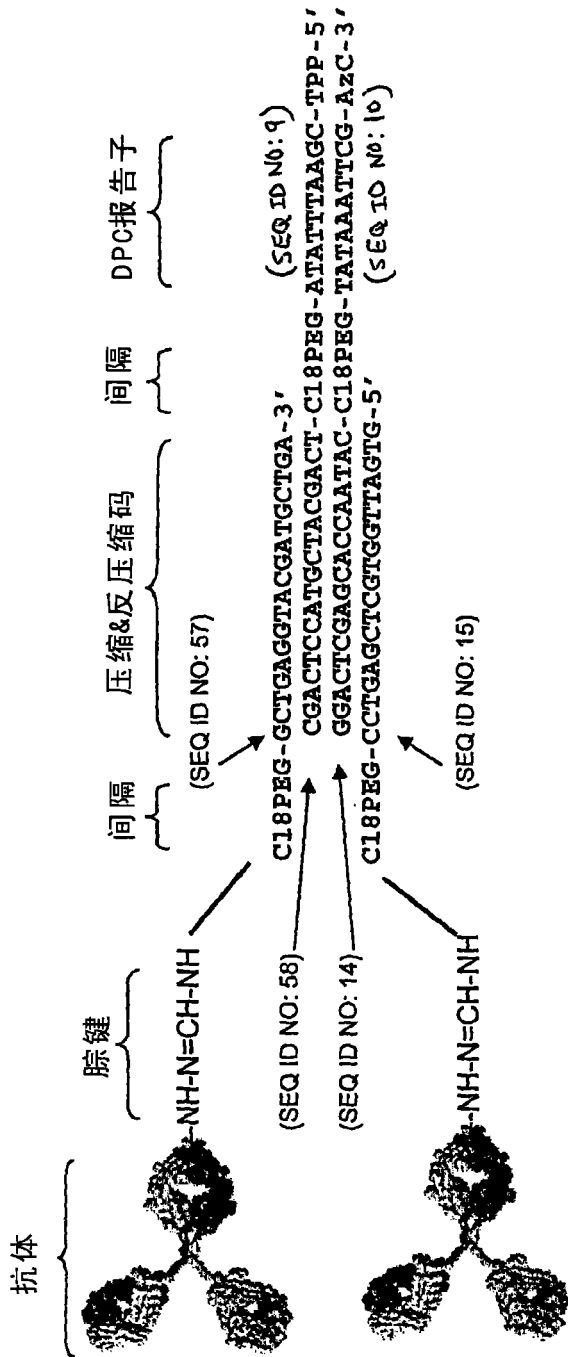
B)

在TPP对AzC适体寡核苷酸(A)或报告子对适体(B)的不同比例下的反应速率。

图32



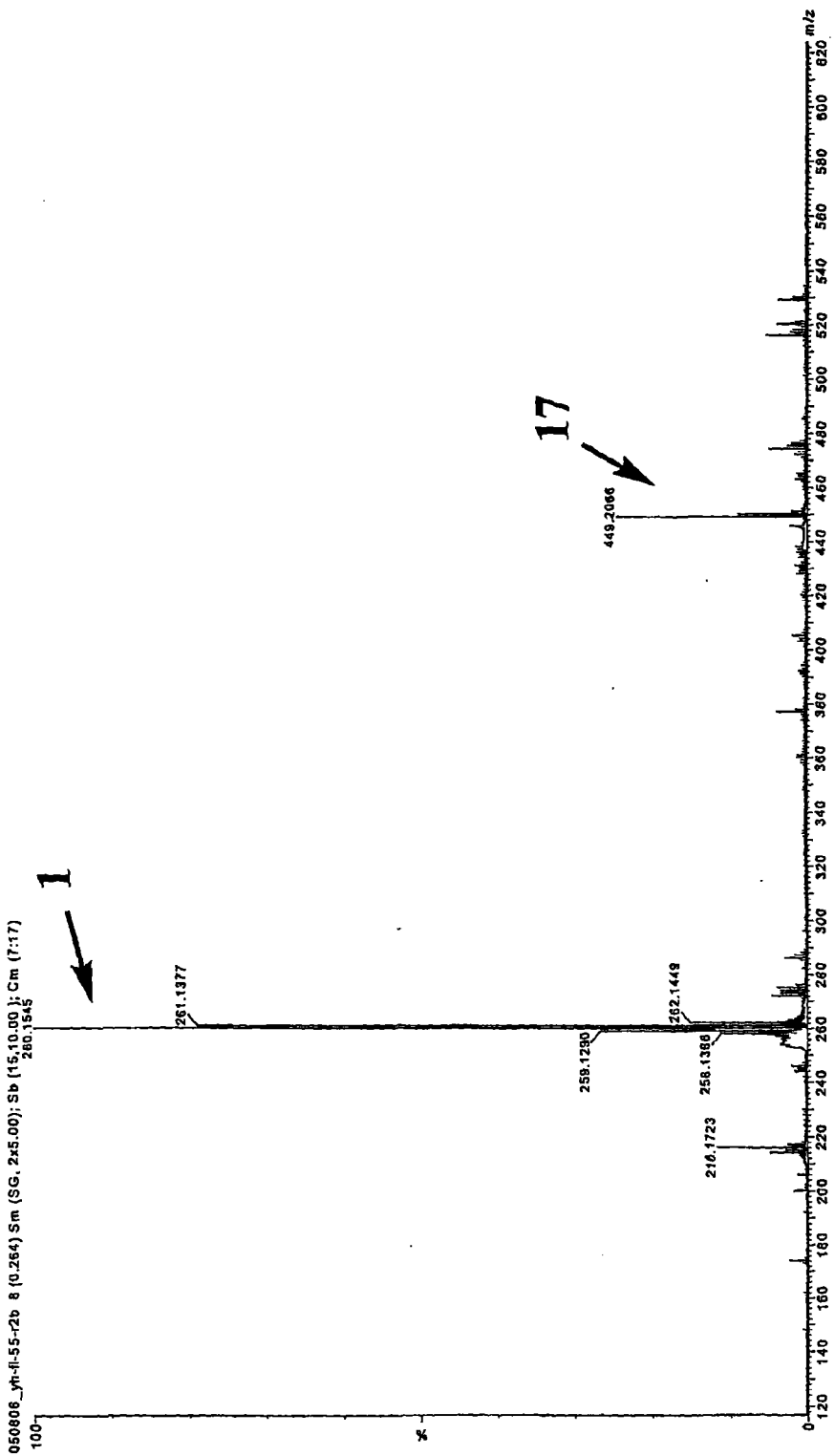




连接抗体的压缩码检测缀合物的示例性集合

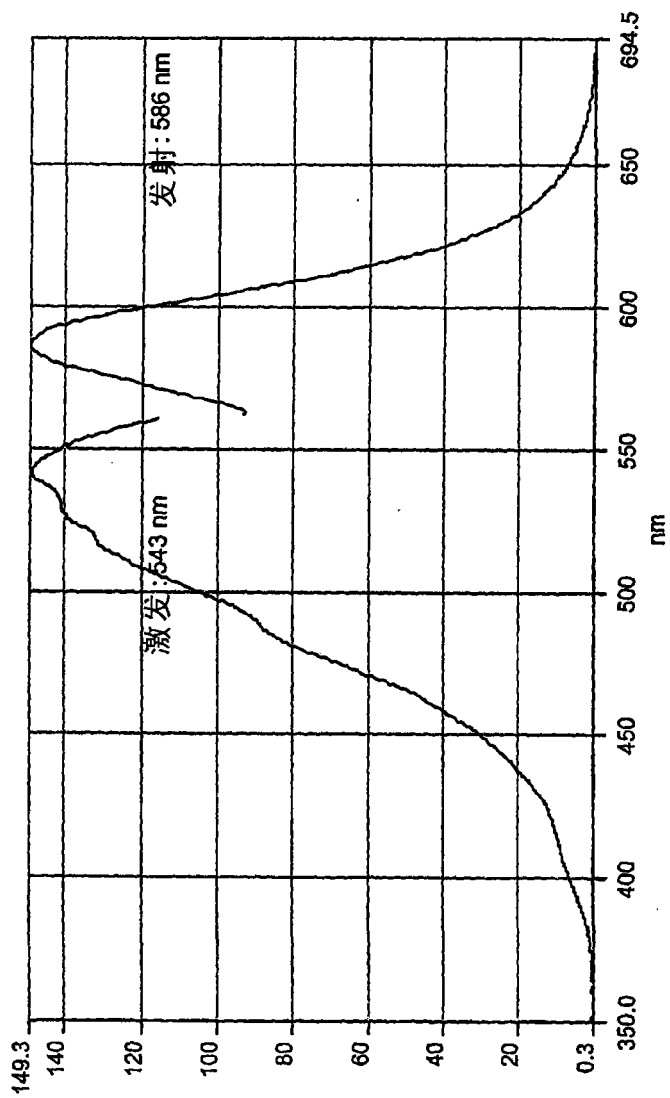
- 抗体中的伯氨基被激活为胍并含醛的寡核苷酸反应形成脞键。
- 与抗体连接的上面和下面两个寡核苷酸也含有独立的压缩码序列，所述压缩码序列通过C18间隔臂从抗体上分离。
- 由反压缩码序列组成的内部两个寡核苷酸（报告寡核苷酸）通过C18 PEG间隔臂与报告寡核苷酸连接。
- 一个报告寡核苷酸含有5'末端TTPP残基，另一含有3'末端AzC残基。每个压缩码仅与其反压缩码互补，DPC报告序列仅彼此互补。

图34



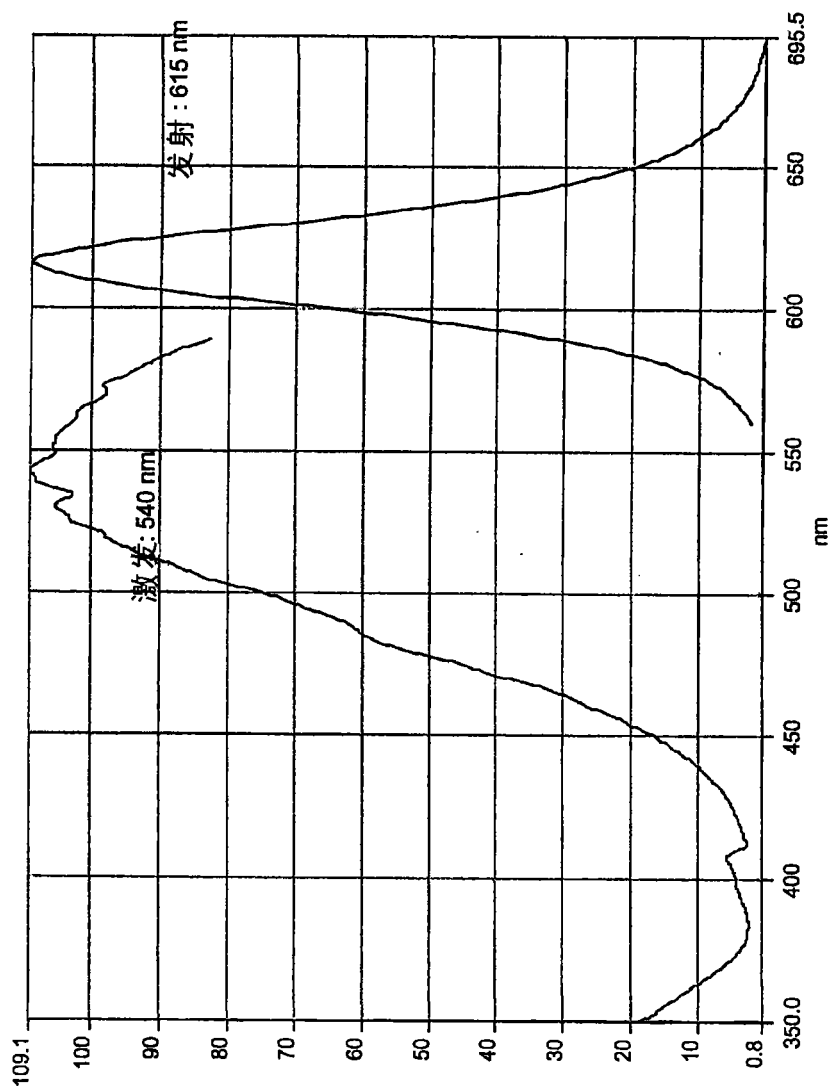
化合物1和2反应混合物的MALDI-MS谱 (阳性模式)

图35



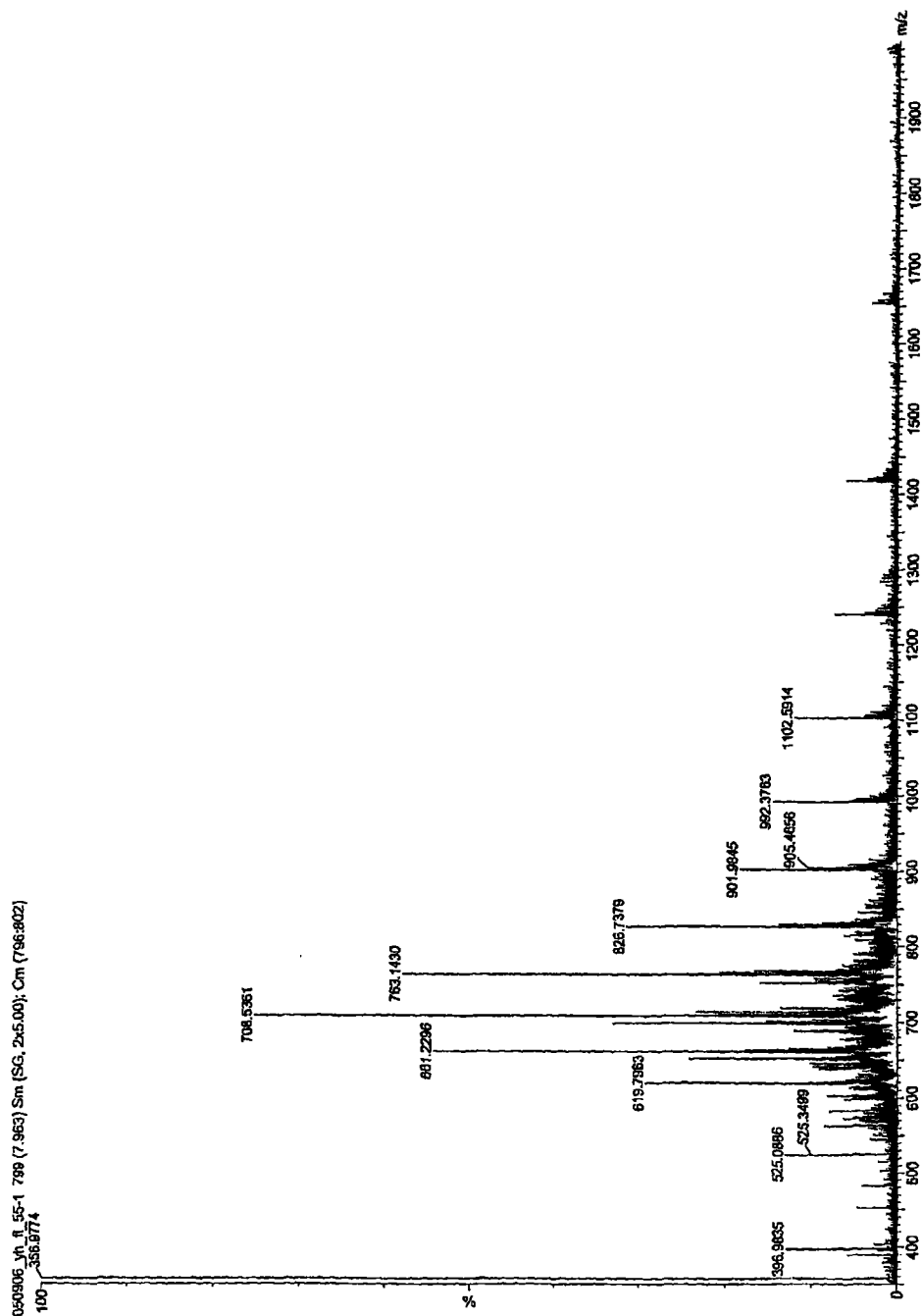
化合物1和12在水中的反应混合物的吸收和荧光发射光谱

图36



化合物18 (乙醇中10 μM) 的吸收和荧光发射光谱

图37



化合物19的电喷射质谱数据

图38

专利名称(译)	通过核酸模板化学生物检测的相关应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101248189A</a>	公开(公告)日	2008-08-20
申请号	CN200680027521.X	申请日	2006-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	通信探索公司		
申请(专利权)人(译)	通信探索公司		
当前申请(专利权)人(译)	通信改革公司		
[标]发明人	詹姆斯M库尔 安德鲁M斯登 劳伦斯A哈夫 芭芭拉S福克斯 黄玉梅		
发明人	詹姆斯·M·库尔 安德鲁·M·斯登 劳伦斯·A·哈夫 芭芭拉·S·福克斯 黄玉梅		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/6486 C12Q1/6818 C12Q1/6823 G01N33/532 G01N33/58 C12Q2565/501 C12Q2523/101		
优先权	60/713038 2005-08-31 US 60/685047 2005-05-26 US 60/758837 2006-01-13 US 60/724743 2005-10-07 US 60/786247 2006-03-27 US 60/701165 2005-07-21 US		
其他公开文献	CN101248189B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于检测生物靶标(例如核酸和蛋白质)的组合物和方法,所述方法通过核酸模板化学,例如通过产生荧光、化学发光和/或发色信号来实现。

