



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104003902 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201410203327. 9

(22) 申请日 2014. 05. 14

(73) 专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 沈玉梅 龚兵 魏晓飞 伍新燕

邵志峰 李小卫 赵小东

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限

公司 31236

代理人 牛山 陈少凌

(51) Int. Cl.

C07C 247/10(2006. 01)

C07H 19/10(2006. 01)

C07H 1/00(2006. 01)

C09K 11/06(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 103668471 A, 2014. 03. 26,

US 2011076679 A1, 2011. 03. 31,

CN 103539697 A, 2014. 01. 29,

审查员 吴俊威

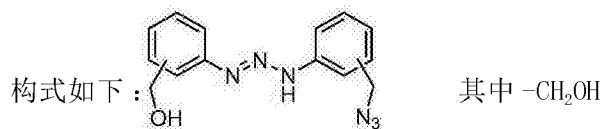
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

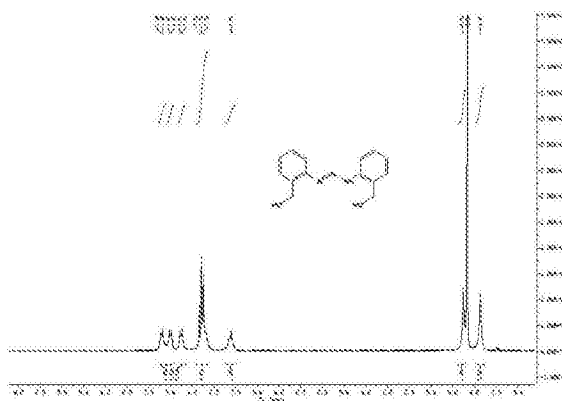
三氮烯连接单元的合成及其在 DNA 测序中的用途

(57) 摘要

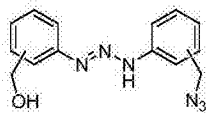
本发明公开了一种三氮烯连接单元的合成及其在 DNA 测序中的用途;该三氮烯连接单元结



和 -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 分别连接于三氮烯结构的邻位、对位或间位。该酸敏感三氮烯连接单元与核苷酸及荧光素连接得到的可逆终端可用于 DNA 合成测序。与现有技术相比,本发明合成了一类新的酸敏感连接单元,并用于合成了基于这种连接单元的可逆终端;该类可逆终端可用于 DNA 合成测序;同时,其合成所需原料简单易得,合成过程均为常规化学反应,可用于大规模推广使用。




1. 一种三氮烯连接单元,其结构式如式 (I) 所示:


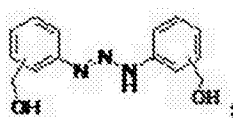


(I)。

2. 根据权利要求 1 所述的三氮烯连接单元,其特征在于,-CH<sub>2</sub>OH 连接于三氮烯结构的邻位、对位或间位;-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>连接于三氮烯结构的邻位、对位或间位。

3. 一种根据权利要求 1 所述的三氮烯连接单元的合成方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

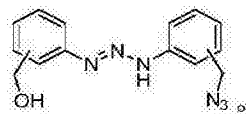
A、在酸性条件下,于亚硝酸钠水溶液中,冰浴下发生重氮化反应 5min ~ 2h 后,

缓慢加入  得化合物 A ;

B、在三乙胺存在的条件下,化合物 TsCl 和化合物 A 发生酯化反应,得到化合物



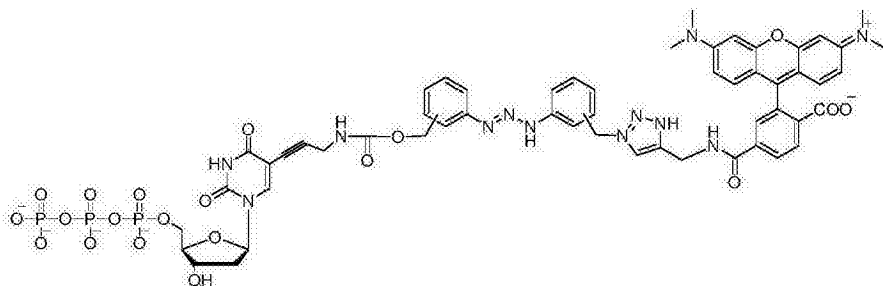
C、在 70 ~ 90 °C 下,NaN<sub>3</sub>和化合物 B 发生取代反应,即得所述三氮烯连接单元



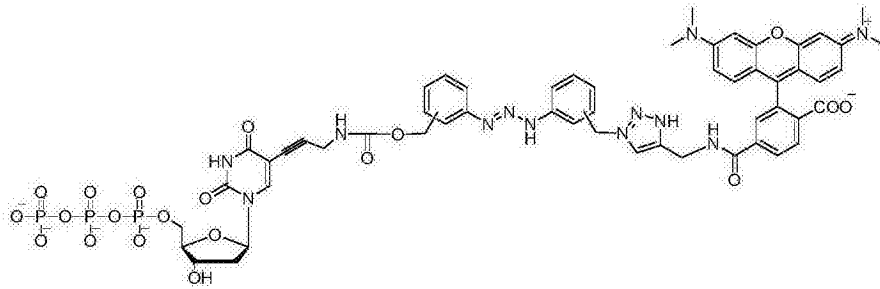
4. 根据权利要求 3 所述的合成方法,其特征在于,步骤 B 中,所述 TsCl 和化合物 A 的摩尔比为 1:(2.0 ~ 4.0)。

5. 根据权利要求 3 所述的合成方法,其特征在于,步骤 C 中,所述 NaN<sub>3</sub>和化合物 B 的摩尔比为 (1.5 ~ 3.5):1。

6. 一种根据权利要求 1 所述的三氮烯连接单元在 DNA 测序中的用途,其特征在于,所述三氮烯连接单元与核苷酸及荧光素连接得到用于 DNA 合成测序的可逆终端;所述可逆终端的结构式如下式所示:

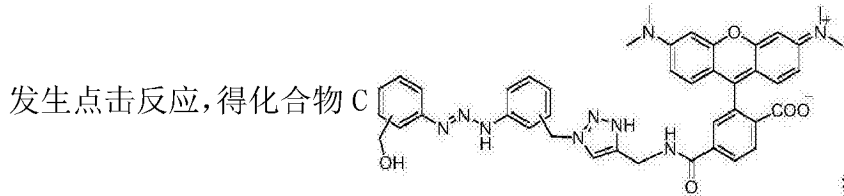


7. 一种用于 DNA 合成测序的可逆终端,其特征在于,所述可逆终端由根据权利要求 1 所述的三氮烯连接单元与核苷酸及荧光素连接而得;所述可逆终端的结构式如下式所示:

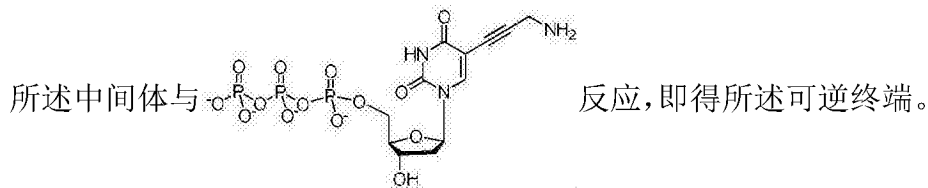
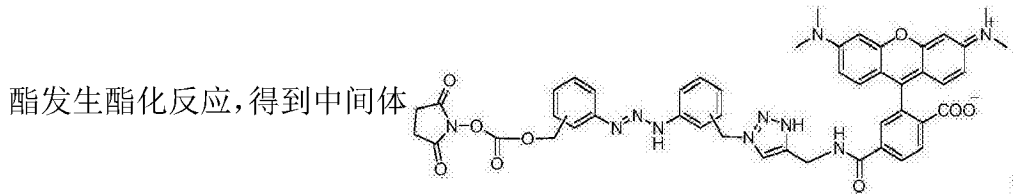


8. 一种根据权利要求7所述的用于DNA合成测序的可逆终端的制备方法,其特征在于,所述方法包含以下步骤:

A、以无水DMF为溶剂,在TEA存在的条件下,所述三氮烯连接单元与炔基化的6-TAMRA



B、在DMAP、N,N-二异丙基乙胺存在的条件下,化合物C和N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸



9. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤A中,所述炔基化的6-TAMRA、三氮烯连接单元和TEA的摩尔比为1:(1~3):(3~10)。

10. 根据权利要求8所述的制备方法,其特征在于,步骤B中,所述化合物C、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯、DMAP、N,N-二异丙基乙胺和

的摩尔比为

1:(5~12):(2~3):(2~4):(2~8)。

## 三氮烯连接单元的合成及其在 DNA 测序中的用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于化学合成和生物化学领域,涉及可用于 DNA 合成测序的化合物,具体涉及一类三氮烯连接单元的合成及其在 DNA 测序中的用途。

### 背景技术

[0002] DNA 测序技术是现代生物学研究中重要的手段之一。人类基因组计划完成后,DNA 测序技术得到了迅速发展。DNA 测序 (DNA sequencing) 是指分析特定 DNA 片段的碱基序列,也就是腺嘌呤 (A)、胸腺嘧啶 (T)、胞嘧啶 (C) 与鸟嘌呤 (G) 的排列方式。发展精确、高通量、低成本的 DNA 测序方法对于生物、医药科学等具有非常重要的意义。

[0003] 合成法测序 (Sequencing By Synthesis, SBS) 是新一代 DNA 测序技术之一。合成法测序方法通过把大量被测的模板 DNA 片段进行固定,并在固定化的 DNA 测序模板上杂交结合通用的 DNA 引物,分别控制 4 种核苷酸在 DNA 引物上的延伸。通过检测延伸反应过程或延伸核苷酸,实现高通量并行的 DNA 序列信息的检测。

[0004] 在合成法测序中,首先要合成 DNA 链延长的四种核苷酸原料,又叫“可逆终端”(reversible terminator)。这类核苷酸除了要求 3' - 羟基阻断外,为了不影响下一个指示核苷酸的并入和识别,还要求通过一个可裂解的连接单元把核苷酸和指示分子,例如荧光素,连接起来。然后,在下一个指示核苷酸并入之前,在温和的条件下使这个连接单元断裂,继续 DNA 链的延长,从而读出 DNA 碱基的序列。该连接单元对合成法测序的读长和效率有重要的影响,因此,人们也一直致力于发展新的可裂解连接单元,来提高 DNA 测序的效率。目前已报道的连接单元有还原剂敏感(二硫键,偶氮化合物);光裂解(邻硝基苄基衍生物,苯甲酰甲基酯衍生物及其它光可裂解连接单元);亲电子试剂/酸敏感(酸裂解;叠氮化合物);金属作用下的裂解;氧化剂敏感等。然而三氮烯连接单元却从来没有用于 DNA 测序 (Bioorganic&Medicinal Chemistry 2012, 20, 571-582)。这是因为含双官能团的三氮烯连接单元对酸很敏感,其合成过程以及与核苷酸和荧光素的后续反应,其要求均很高。

[0005] 可裂解连接单元对 DNA 测序的读长和效率有重要的影响,而现有的连接单元存在裂解条件不够温和、裂解效率不高,用于测序时读长太短等缺点,因此,设计、合成新的可裂解连接单元,并探索合适的裂解条件对于提高测序的效率、发展新的测序方法有非常重要的意义。到目前为止还没有报道三氮烯化合物作为可裂解连接单元应用于 DNA 测序,所以设计、合成三氮烯连接单元并用于 DNA 测序具有非常重要的意义。

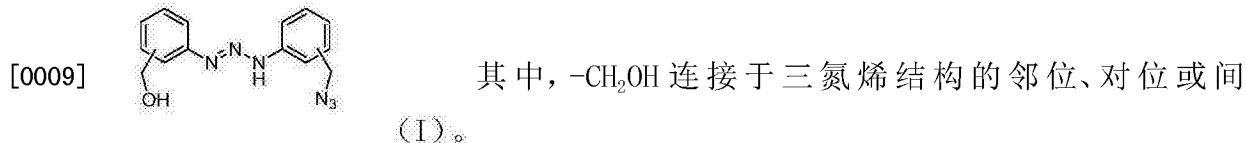
### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服上述现有技术存在的不足,提供一种三氮烯连接单元的合成及其在 DNA 测序中的用途。本发明设计合成的一类新的三氮烯连接单元(可逆终端),该类化合物合成原料简单易得,合成过程均为常规化学反应,易于实现大量合成;该类化合物可与核苷酸和荧光素实现高效率的连接。通过研究该类化合物的裂解性能,发现该类化合物在温和的条件下可以实现高效裂解,具有应用于 DNA 测序的价值。所以,基于三氮烯连接

单元在 DNA 测序体系中能够大大提高测序效率。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：

[0008] 第一方面,本发明涉及一种三氮烯连接单元,其结构式如式 (I) 所示：




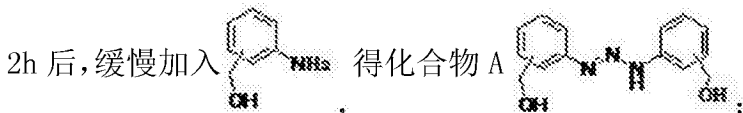
位；-CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>连接于三氮烯结构的邻位、对位或间位。

[0010] 优选的,所述 -CH<sub>2</sub>OH 为邻位时, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>为邻位或间位。

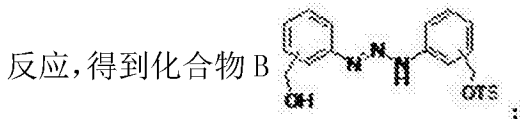
[0011] 优选的,所述 -CH<sub>2</sub>OH 为间位时, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>为间位。

[0012] 第二方面,本发明涉及一种上述的三氮烯连接单元的合成方法,包括如下步骤：

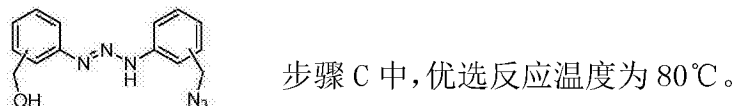
[0013] A、 在酸性条件下,于亚硝酸钠水溶液中,冰浴下发生重氮化反应 5min ~



[0014] B、在三乙胺存在的条件下,化合物 TsCl (对甲基苯磺酰氯) 和化合物 A 发生酯化



[0015] C、在 70 ~ 90℃ 下, NaN<sub>3</sub>和化合物 B 发生取代反应,即得所述三氮烯连接单元



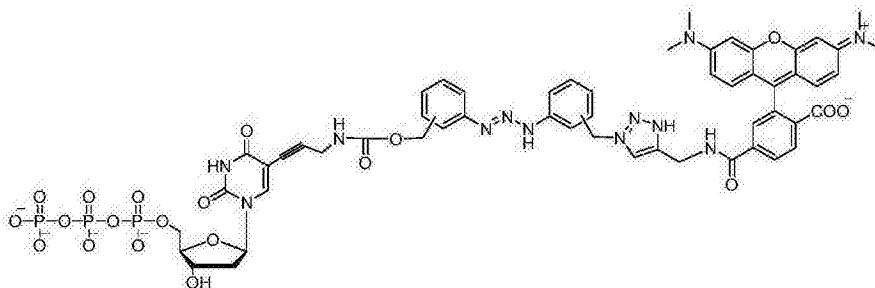
[0016] 优选的,步骤 B 中,所述 TsCl 和化合物 A 的摩尔比为 1 : (2.0 ~ 4.0)。

[0017] 优选的,步骤 C 中,所述 NaN<sub>3</sub>和化合物 B 的摩尔比为 (1.5 ~ 3.5) : 1。

[0018] 第三方面,本发明涉及一种前述的还原敏感型三氮烯连接单元在 DNA 测序中的用途,所述三氮烯连接单元与核苷酸及荧光素连接得到可逆终端,所述可逆终端用于 DNA 合成测序。

[0019] 第四方面,本发明涉及一种用于 DNA 合成测序的可逆终端,所述可逆终端由前述的三氮烯连接单元与核苷酸及荧光素连接而得；所述可逆终端的结构式如下式所示：

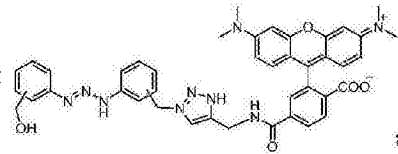
[0020]



[0021] 优选的,所述连接具体包括如下步骤:

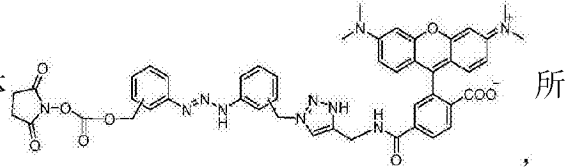
[0022] A、以无水 DMF 为溶剂,在 TEA(三乙胺)存在的条件下,所述还原敏感三氮烯连接

单元与炔基化的 TAMRA (5/6) 发生点击反应,得化合物 C

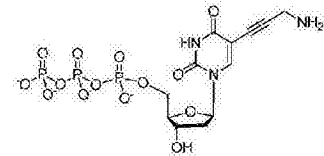


[0023] B、在 DMAP、DIPEA (N,N-二异丙基乙胺) 存在的条件下,化合物 C 和 DSC (N,N'-二

琥珀酰亚胺基碳酸酯) 发生酯化反应,得到中间体



述中间体与 dUTP (AP3)



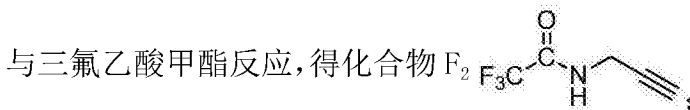
反应,即得所述可逆终端。

[0024] 优选的,步骤 A 中,所述 TAMRA (5/6)、三氮烯连接单元和 TEA(三乙胺)的摩尔比为 1 : (1 ~ 3) : (3 ~ 10)。

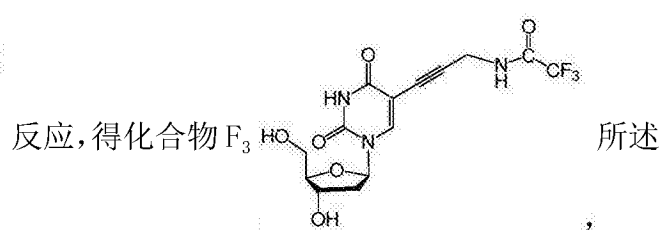
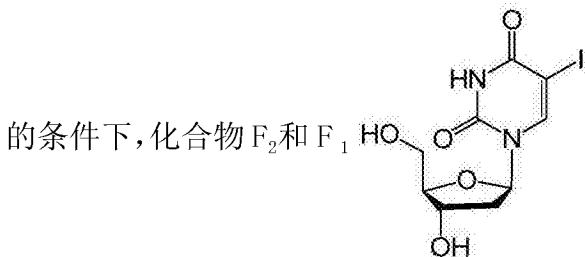
[0025] 优选的,步骤 B 中,所述化合物 C、DSC、DMAP、DIPEA 和 dUTP (AP3) 的摩尔比为 1 : (5 ~ 12) : (2 ~ 3) : (2 ~ 4) : (2 ~ 8)。

[0026] 所述核苷酸 dUTP (AP3) 是通过包含如下步骤的方法合成的:

[0027] A、化合物 F<sub>2</sub>的合成:在冰水浴搅拌条件下,摩尔比为 1.0 : (1.2 ~ 2) 的丙炔胺

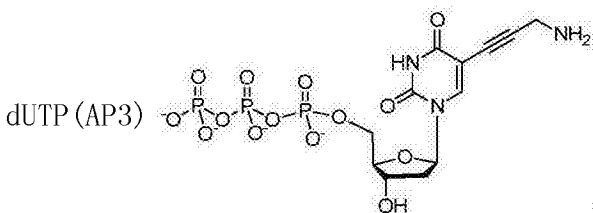


[0028] B、化合物 F<sub>3</sub>的合成:在 CuI、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (四(三苯基膦)钯) 和 TEA(三乙胺) 存在



F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、CuI、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 和 TEA(三乙胺) 的摩尔比为 1 : (2 ~ 3) : 0.072 : 0.025 : (1.5 ~ 2) ;

[0029] C、化合物 dUTP (AP3) 的合成:化合物 F<sub>3</sub>与三正丁胺焦磷酸盐 (E-4)、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮 (E-3) 在三乙胺和碘存在下反应,反应产物去保护,得化合物



所述 E-4、E-3 和 F<sub>3</sub>的摩尔比为 2 : 2 : 1。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:本发明合成了一类新的可裂解连接

单元,并用于合成了基于这种连接单元的可逆终端;该类可逆终端可用于 DNA 合成测序;同时,其合成所需原料简单易得,合成过程均为常规化学反应,可用于大规模推广使用。

### 附图说明

[0031] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0032] 图 1 为实施例 1 中化合物 A 的 NMR 谱图;

[0033] 图 2 为实施例 2 中化合物 A 的 NMR 谱图

[0034] 图 3 为实施例 3 中化合物 A 的 NMR 谱图;

[0035] 图 4 为实施例 4、5、6 的可逆终端的生物学评价结果示意图。

### 具体实施方式

[0036] 下面结合附图和具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干调整和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0037] 本发明所用的原料、试剂均为市售 AR、CP 级。

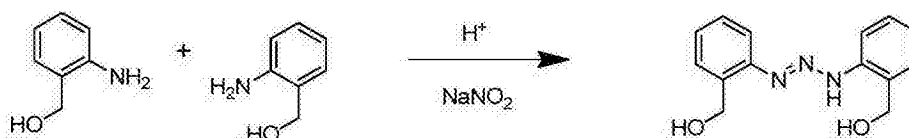
[0038] 本发明所得中间产物及最终产物采用 NMR 等进行表征。

[0039] 实施例 1、当 CH<sub>2</sub>OH 为邻位时,CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>为邻位时三氮烯连接单元的合成

[0040] 本实施例的三氮烯连接单元的合成具体包括如下步骤:

[0041] 第一步、

[0042]



[0043] 将邻氨基苯甲醇 (123mg, 1 mmol) 加入 300mg 浓盐酸和 1.5mL 水中,冰水浴下反应 10min 后,缓慢滴加 0.6mL 质量分数 15% 的亚硝酸钠水溶液,冰水浴下反应 10min,缓慢加入邻氨基苯甲醇 (123mg, 1 mmol) 后,冰水浴下反应 30min 后,加入 6.4mL 质量分数 15% 的醋酸钠水溶液,反应混合液有淡黄色絮状物沉淀生成,过滤后,柱层析 [V(石油醚):V(乙酸乙酯) = 1:1,体积分数 1% 三乙胺],得化合物 A,淡黄色固体 182mg,产率 70.8%。NMR 谱图如图 1 所示。

[0044] <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD): δ = 7.68(d, 1H, Ar, J = 7.5Hz), 7.60(d, 1H, Ar, J = 7.5Hz), 7.50(d, 1H, Ar, J = 6.7Hz), 7.31(t, 4H, Ar, J = 7.6Hz), 7.04(s, 1H, Ar), 4.90(s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.75(s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar)。

[0045] 第二步、

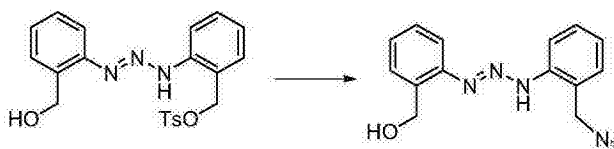
[0046]



[0047] 将上述反应物 (6.098mmol) 溶于 7.5ml DCM 中搅拌, 在冰浴下加入 0.43ml 三乙胺, 再逐滴加入溶于 1.5ml DCM 中的 TsCl (0.291g, 1.524mmol) 室温下搅拌过夜。旋除溶剂用 PE : EA 2.5 : 1 柱层析过柱, 得纯品 380mg。产物  $C_{21}H_{21}N_3O_4S$  的 HRMS, 计算值 411.1253, 实际测定值为 :411.1260。

[0048] 第三步、

[0049]



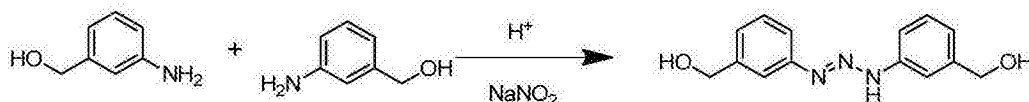
[0050] 称取上述反应物 (0.59mmol) 于单口瓶中, 加入 2.5ml DMF 搅拌后再加入  $NaN_3$  (84.1mg, 1.29mmol) 于 80℃ 下搅拌过夜, 冷却至室温后加入 10ml 水并用乙酸乙酯 15\*4 萃取, 最后合并有机相再用饱和食盐水洗涤分层, 旋除有机层后用 PE : EA 3 : 1 柱层析得纯品 39mg。产物  $C_{21}H_{21}N_6O$  的 HRMS, 计算值 282.1229, 实际测定值为 :282.1224。

[0051] 实施例 2、当  $CH_2OH$  为间位时,  $CH_2N_3$  为间位时三氮烯连接单元的合成

[0052] 本实施例的三氮烯连接单元的合成具体包括如下步骤 :

[0053] 第一步、

[0054]



[0055] 将间氨基苯甲醇 (123mg, 1mmol) 加入 1.25ml 1M 稀盐酸和 1ml 水中, 冰水浴下反应 10min 后, 缓慢滴加 0.6ml 质量分数 15% 的亚硝酸钠水溶液, 冰水浴下反应 10min 后, 缓慢加入 1ml 1M 间氨基苯甲醇 / 四氢呋喃溶液, 冰水浴下反应 30min 后, 加入 6.4ml 质量分数 15% 的醋酸钠水溶液, 反应混合液有淡黄色絮状物沉淀生成, 过滤后, 柱层析 [V (石油醚) : V (乙酸乙酯) = 1 : 1, 体积分数 1% 三乙胺], 得化合物 A, 淡黄色固体 11.4mg, 产率 4.4%。 $^1H$ -NMR 谱图如图 2 所示。

[0056]  $^1H$ -NMR (400MHz, MeOD) :  $\delta$  = 7.78 (d, 1H, Ar,  $J$  = 2.0Hz), 7.71 (dd, 1H, Ar,  $J$  = 8.52. 2Hz), 7.61 (d, 2H, Ar,  $J$  = 7.9Hz), 7.38 (dd, 3H, Ar,  $J$  = 15.37. 4Hz), 6.81 (d, 1H, Ar,  $J$  = 8.6Hz), 5.12 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar), 4.65 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar).

[0057] 第二步、

[0058]

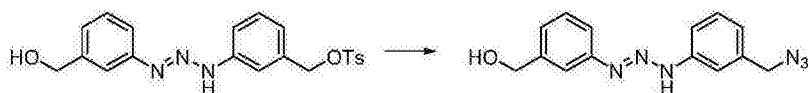


[0059] 将上述反应物 (6.098mmol) 溶于 7.5ml DCM 中搅拌, 在冰浴下加入 0.43ml 三乙胺, 再逐滴加入溶于 1.5ml DCM 中的 TsCl (0.291g, 1.524mmol) 室温下搅拌过夜。旋除溶剂用 PE : EA 2.5 : 1 柱层析过柱, 得纯品 380mg。产物  $C_{21}H_{21}N_3O_4S$  的 HRMS, 计算值 411.1253, 实际测定值为 :411.1247。

[0060] 第三步、

[0061]





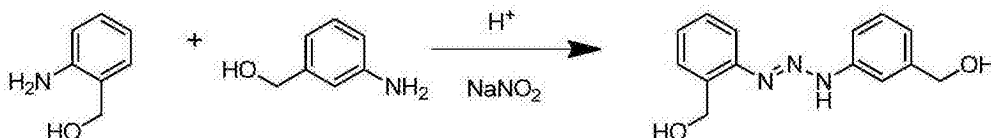
[0062] 称取上述反应物 (0.59mmol) 于单口瓶中, 加入 2.5mL DMF 搅拌后再加入  $\text{NaN}_3$  (84.1mg, 1.29mmol) 于  $80^\circ\text{C}$  下搅拌过夜, 冷却至室温后加入 10ml 水并用乙酸乙酯 15\*4 萃取, 最后合并有机相再用饱和食盐水洗涤分层, 旋除有机层后用 PE : EA3 : 1 柱层析得纯品 39mg。产物  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}$  的 HRMS, 计算值 282.1229, 实际测定值为 :282.1225。

[0063] 实施例 3、当  $\text{CH}_2\text{OH}$  为邻位时,  $\text{CH}_2\text{N}_3$  为间位时三氮烯连接单元的合成

[0064] 本实施例的三氮烯连接单元的合成具体包括如下步骤:

[0065] 第一步、

[0066]

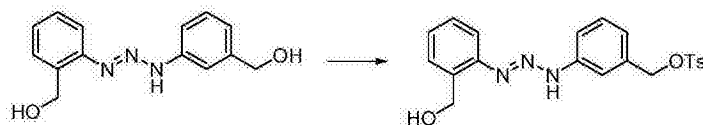


[0067] 将邻氨基苯甲醇 (123mg, 1mmol) 加入 1.25mL 1M 稀盐酸和 1mL 水中, 冰水浴下反应 10min 后, 缓慢滴加 0.6mL 质量分数 15% 的亚硝酸钠水溶液, 冰水浴下反应 10min 后, 缓慢加入间氨基苯甲醇 (123mg, 1 mmol) 后, 冰水浴下反应 30min 后, 加入 7.5mL 质量分数 15% 的醋酸钠水溶液, 反应混合液有淡黄色絮状物沉淀生成, 过滤后, 柱层析 [V(石油醚) : V(乙酸乙酯) = 1 : 1, 体积分数 1% 三乙胺], 得化合物 A, 淡黄色固体 13.2mg, 产率 5.1%。NMR 谱图如图 3 所示。

[0068]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD) :  $\delta$  = 7.68 (d, 1H, Ar, J = 7.7Hz), 7.60 (d, 1H, Ar, J = 7.3Hz), 7.50 (d, 1H, Ar, J = 6.7Hz), 7.30 (m, 4H, Ar), 7.05 (d, 1H, Ar, J = 6.9Hz), 4.90 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 4.74 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ).

[0069] 第二步、

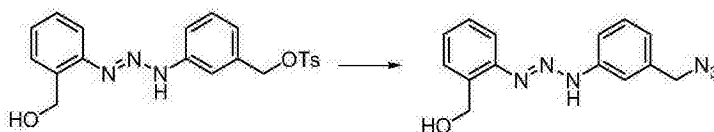
[0070]



[0071] 将上述反应物 (6.098mmol) 溶于 7.5ml DCM 中搅拌, 在冰浴下加入 0.43ml 三乙胺, 再逐滴加入溶于 1.5mL DCM 中的 TsCl (0.291g, 1.524mmol) 室温下搅拌过夜。旋除溶剂用 PE : EA2.5 : 1 柱层析过柱, 得纯品 380mg。产物  $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  的 HRMS, 计算值 411.1253, 实际测定值为 :411.1261。

[0072] 第三步、

[0073]



[0074] 称取上述反应物 (0.59mmol) 于单口瓶中, 加入 2.5mL DMF 搅拌后再加入  $\text{NaN}_3$  (84.1mg, 1.29mmol) 于  $80^\circ\text{C}$  下搅拌过夜, 冷却至室温后加入 10mL 水并用乙酸乙酯 15\*4 萃取, 最后合并有机相再用饱和食盐水洗涤分层, 旋除有机层后用 PE : EA3 : 1 柱层析得

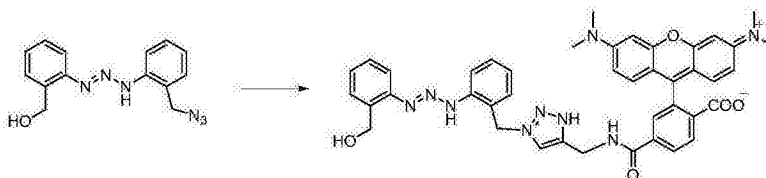
纯品 39mg。产物  $C_{21}H_{21}N_6O$  的 HRMS, 计算值 282.1229, 实际测定值为 :282.1234。

[0075] 实施例 4、基于三氮烯连接单元的可逆终端的合成

[0076] 本实施例的可逆终端是基于实施例 1 的可裂解连接单元 - 还原敏感偶氮连接单元的合成得到的, 其合成包括如下具体步骤:

[0077] 第一步、

[0078]

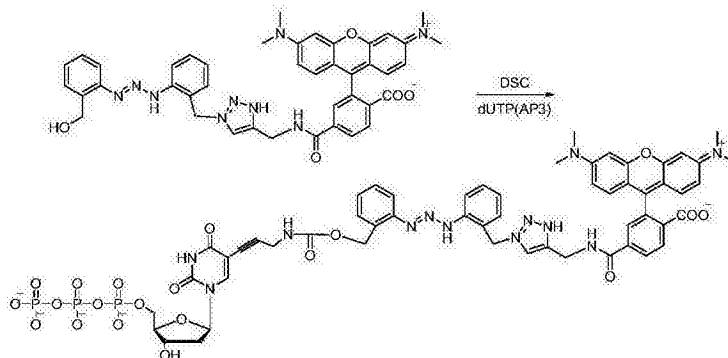


[0079] 称取上述原料 (0.019mmol) 于单口瓶中, 加入炔基 TAMRA (0.019mmol) 并加入无水 DMF 和三乙胺溶解, 室温搅拌 3h, 旋除溶剂, 硅胶板分离得产物, 产率 84%。

[0080] HRMS :calc for  $C_{42}H_{40}N_9O_5 [M]^+$  750.3152, found 750.3160.

[0081] 第二步、

[0082]



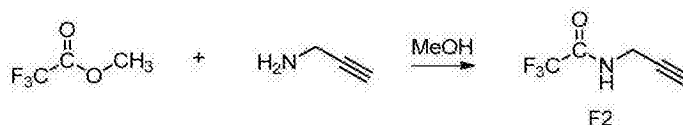
[0083] 称取上述原料 (0.016mmol) 于单口瓶中, 加入 2ml 无水乙腈, 依次加入 DSC (24.6mg, 0.096mmol) (隔 2h 分两次加入)、DMAP (3.9mg, 0.032mmol)、DIPEA (5.2g, 0.04mmol), 搅拌 6h 后硅胶板分离将未反应的除去, 将得到的产品溶于 0.8ml 乙腈中, 将 dUTP (AP3) (20mg, 38.4mmol) 溶于 1.5ml  $Na_2CO_3/NaHCO_3$  缓冲液中并加入到反应中, 在加入 6ul 三乙胺, 室温搅拌 3h。用分析型 HPLC 进行分析: 柱子: C18, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250mm; 流速: 1ml/min; 流动相: A, 8.6mM TEA (三乙胺), 100mM HFIP 水溶液和 B,  $CH_3OH$ , 梯度洗涤, 15% ~ 15%  $CH_3OH$  (5min), 15% ~ 40%  $CH_3OH$  (5min), 40% ~ 70%  $CH_3OH$  (30min) 可见光检测器: 546nm。在  $t = 30$ min 时有产物峰生成, 分离得最终产物, 即可逆终端。

[0084] HRMS :calc for  $C_{55}H_{52}N_{12}O_{20}P_3 [M+3H]^+$  1293.2656, found 1293.2661。

[0085] 本实施例中核苷酸 dUTP (AP3) 的合成, 具体包括如下步骤:

[0086] 第一步、化合物 F<sub>2</sub> 的合成:

[0087]



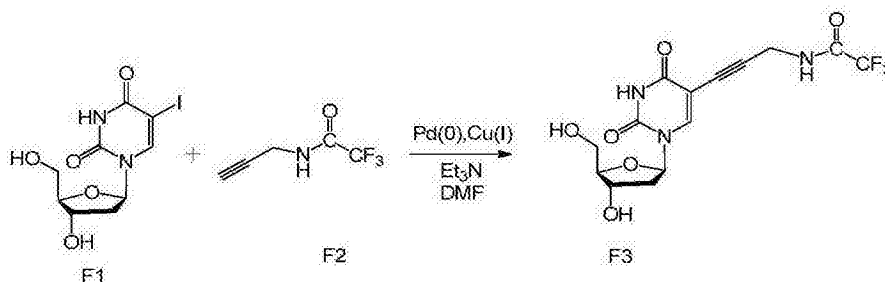
[0088] 向一单口瓶中加入 60ml 甲醇, 冰水浴下搅拌, 加入丙炔胺 (60mmol, 3.3042g), 搅

拌 15min 后缓慢加入三氟乙酸甲酯 (86.7mmol, 11.0957g), 10min 后撤去冰水浴, 室温下反应 24 小时。反应用 TLC 板进行监测, PE : EA = 8 : 1, 烤板,  $R_f = 0.5$  产生新点为产物 F2。减压蒸馏 (51°C, 280Pa), 得 3.53g, 产率 39%。

[0089]  $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 300\text{MHz})$  :  $\delta$  2.32(t,  $J = 4.0\text{Hz}$ , 1H), 4.13-4.15(m, 2H), 6.92(s, 1H)。

[0090] 第二步、化合物 F<sub>3</sub> 的合成 :

[0091]



[0092] 向一单口瓶中加入 F1 (0.7mmol, 247mg), 再称取 9.7mg CuI 和 20.3mg Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (四(三苯基膦)钯) 加入反应瓶中, 抽真空, 氮气保护, 铝箔包裹, 加入 2.3ml DMF, 搅拌溶解, 加入 0.2ml TEA (三乙胺), 称取 F2 (254mg, 1.7mmol) 用 DMF 溶解后加入上述反应瓶中, 室温搅拌, 反应过夜。TLC 板监测, EA 为展开剂,  $R_f = 0.35$  为原料 F1,  $R_f = 0.32$  为产物 F3, 两点位置非常接近。待反应结束后, 减压蒸干溶剂, 直接柱层析分离, 20 : 1 DCM : MeOH 为淋洗剂, 得 214mg, 产率 61%。

[0093]  $^1\text{H NMR}(\text{DMSO}-d_6, 300\text{MHz})$  :  $\delta$  2.11(t,  $J = 5.1\text{Hz}$ , 2H), 3.56-3.58(m, 2H), 3.78(m, 1H), 4.21(d,  $J = 5.1\text{Hz}$ , 3H), 5.08(t,  $J = 5.1\text{Hz}$ , 1H), 5.23(d,  $J = 4.2\text{Hz}$ , 1H), 6.09(t,  $J = 6.6\text{Hz}$ , 1H), 8.18(s, 1H), 10.05(t,  $J = 4.8\text{Hz}$ , 1H), 11.63(s, 1H)。

[0094] 第三步、化合物 dUTP (AP3) 的合成 :

[0095] 在手套箱中分别称取化合物 F<sub>3</sub> 60mg (0.16mmol)、三正丁胺焦磷酸盐 (E-4) 150mg (0.32mmol)、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮 (E-3) 66mg (0.32mmol) 置于三个反应管中。将三正丁胺焦磷酸盐溶于 0.5mL 无水 DMF 中, 再加入 0.6mL 新蒸的三正丁胺, 搅拌半小时。把 2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮溶于 0.5mL 无水 DMF 中, 激烈搅拌下通过注射器加入上述三正丁胺焦磷酸盐溶液, 搅拌半小时。然后将该混合液注入到 F<sub>3</sub> 中, 搅拌 1.5h。加入 5mL 3% 碘 (9 : 1 Py/H<sub>2</sub>O) 溶液。15min 后加入 4mL 水, 搅拌 2h。加入 0.5mL 3M NaCl 溶液, 再加入 30mL 无水乙醇, -20°C 冷冻过夜, 离心 (3200r/min, 25°C) 20min。倾去上清液, 得沉淀, 抽干溶剂。再依次加入 TEAB 溶液和浓氨水, 室温搅拌过夜。减压蒸干溶剂, 出现白色固体, 得 dUTP-NH<sub>2</sub>。用分析型 HPLC 进行分析, 条件 : 柱子 : C18, 10  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250mm ; 流速 : 1mL/min ; 流动相 : 20mM TEAAc 和 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, 梯度洗涤, 0% - 20% CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH (35min) ; 紫外检测器 : 254nm。在  $t = 13.5\text{min}$  时有产物峰生成。

[0096]  $^1\text{H NMR}(\text{D}_2\text{O}, 400\text{MHz})$  :  $\delta$  2.34-2.48(m, 2H), 4.03(s, 2H), 4.20-4.29(m, 3H), 4.61-4.64(m, 1H), 6.27(t,  $J = 6.4\text{Hz}$ , 1H), 8.38(s, 1H)。  $^{31}\text{P NMR}(\text{D}_2\text{O}, 162\text{MHz})$  :  $\delta$  -22.22, -11.45, -9.90。

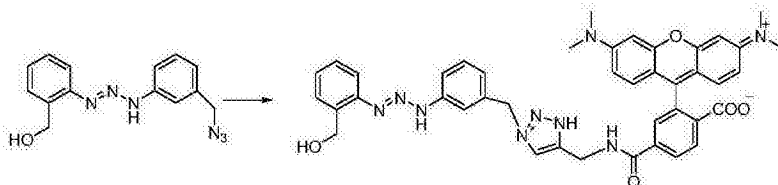
[0097] HRMS : calc for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 522.0080, found 522.0070 ; calc for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>14</sub>P<sub>3</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 543.9899, found 543.9883。

## [0098] 实施例 5、基于三氮烯连接单元的可逆终端的合成

[0099] 本实施例的可逆终端是基于实施例 3 的可裂解连接单元 - 还原敏感偶氮连接单元的合成得到的,其合成包括如下具体步骤:

[0100] 第一步、

[0101]

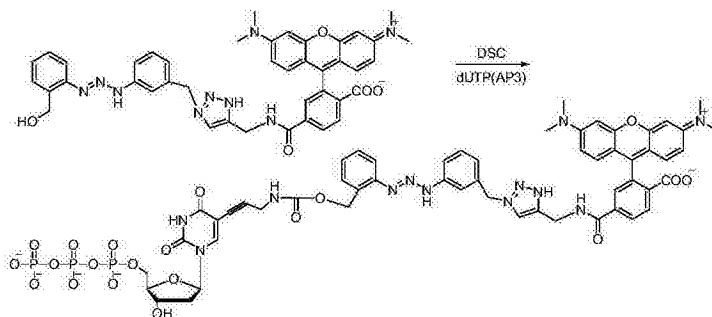


[0102] 称取上述原料 (0.019mmol) 于单口瓶中,加入炔基 TAMRA (0.019mmol) 并加入无水 DMF 和三乙胺溶解,室温搅拌 3h,旋除溶剂,硅胶板分离得产物,产率 84%。

[0103] HRMS :calc for  $C_{42}H_{40}N_9O_5 [M]^+$  750.3152, found 750.3147.

[0104] 第二步、

[0105]



[0106] 称取上述原料 (0.016mmol) 于单口瓶中,加入 2mL 无水乙腈,依次加入 DSC (24.6mg, 0.096mmol) (隔 2h 分两次加入)、DMAP (3.9mg, 0.032mmol)、DIPEA (5.2g, 0.04mmol), 搅拌 6h 后硅胶板分离将未反应的除去,将得到的产品溶于 0.8ml 乙腈中,将 dUTP (AP3) (20mg, 38.4mmol) 溶于 1.5mL  $Na_2CO_3/NaHCO_3$  缓冲液中并加入到反应中,在加入 6 $\mu$ L 三乙胺,室温搅拌 3h。用分析型 HPLC 进行分析:柱子:C18, 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250mm;流速: 1mL/min;流动相:A, 8.6mM TEA (三乙胺), 100mM HFIP 水溶液和 B,  $CH_3OH$ , 梯度洗涤, 15% ~ 15%  $CH_3OH$  (5min), 15% ~ 40%  $CH_3OH$  (5min), 40% ~ 70%  $CH_3OH$  (30min) 可见光检测器: 546nm。在  $t = 30$ min 时有产物峰生成,分离得最终产物,即可逆终端。

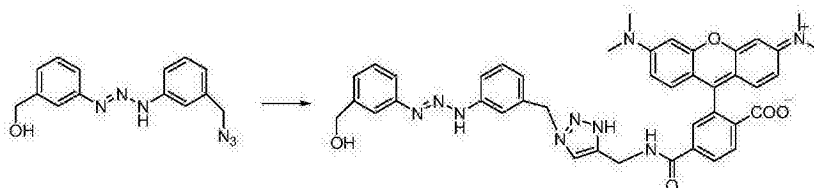
[0107] HRMS :calc for  $C_{55}H_{52}N_{12}O_{20}P_3 [M+3H]^+$  1293.2656, found 1293.2649.

## [0108] 实施例 6、基于三氮烯连接单元的可逆终端的合成

[0109] 本实施例的可逆终端是基于实施例 2 的可裂解连接单元 - 还原敏感偶氮连接单元的合成得到的,其合成包括如下具体步骤:

[0110] 第一步、

[0111]

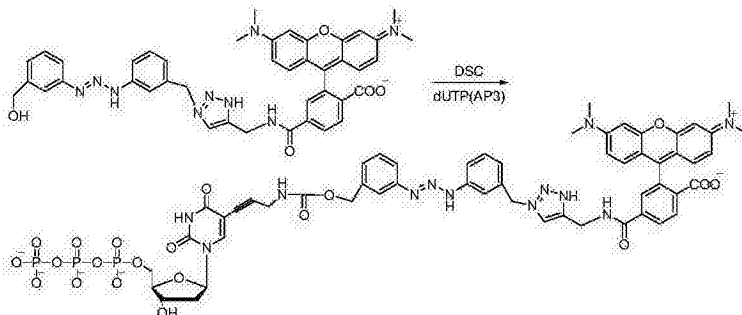


[0112] 称取上述原料 (0.019mmol) 于单口瓶中, 加入炔基 TAMRA (0.019mmol) 并加入无水 DMF 和三乙胺溶解, 室温搅拌 3h, 旋除溶剂, 硅胶板分离得产物, 产率 84%。

[0113] HRMS :calc for  $C_{42}H_{40}N_9O_5 [M]^+$  750.3152, found 750.3159.

[0114] 第二步、

[0115]



[0116] 称取上述原料 (0.016mmol) 于单口瓶中, 加入 2mL 无水乙腈, 依次加入 DSC (24.6mg, 0.096mmol) (隔 2h 分两次加入)、DMAP (3.9mg, 0.032mmol)、DIPEA (5.2g, 0.04mmol), 搅拌 6h 后硅胶板分离将未反应的除去, 将得到的产品溶于 0.8mL 乙腈中, 将 dUTP (AP3) (20mg, 38.4mmol) 溶于 1.5mL  $Na_2CO_3/NaHCO_3$  缓冲液中并加入到反应中, 在加入 6uL 三乙胺, 室温搅拌 3h。用分析型 HPLC 进行分析: 柱子: C18,  $5 \mu m$ ,  $4.6 \times 250mm$ ; 流速: 1mL/min; 流动相: A, 8.6mM TEA (三乙胺), 100mM HFIP 水溶液和 B,  $CH_3OH$ , 梯度洗涤, 15% ~ 15%  $CH_3OH$  (5min), 15% ~ 40%  $CH_3OH$  (5min), 40% ~ 70%  $CH_3OH$  (30min) 可见光检测器: 546nm。在  $t = 30min$  时有产物峰生成, 分离得最终产物, 即可逆终端。

[0117] HRMS :calc for  $C_{55}H_{52}N_{12}O_{20}P_3 [M+3H]^+$  1293.2656, found 1293.2659.

[0118] 同时也合成了基于其它三个碱基的可逆终端: dCTP-三氮烯连接单元-荧光素, dATP-三氮烯连接单元-荧光素以及 dGTP-三氮烯连接单元-荧光素。除了本实施例阐述的荧光素 TAMRA, 其它的荧光素如 FITC, Cy 系列等均可以用于合成可逆终端, 从而用于 DNA 测序。

[0119] 实施例 7、对合成的可逆终端的生物学评价

[0120] 为了检测本发明所合成的可逆终端是否可以应用于 DNA 测序, 本实施例检测了实施例 4、5、6 的可逆终端两个方面的特性:

[0121] 1) 是否可以被 DNA 聚合酶所识别, 作为 DNA 聚合酶的底物参与 DNA 的延伸反应;

[0122] 2) 参与 DNA 链延伸后能否去掉该可逆终端所携带的荧光基团, 以便下一轮的延伸反应。

[0123] 这两方面是高通量合成测序 (sequencing by synthesis) 的核心。因此配制 DNA 延伸反应体系: 将可逆终端与 DNA 模板、Klenow (exo-) DNA 聚合酶、Klenow 缓冲液充分混合,  $30^\circ C$  静置 15min,  $75^\circ C$  处理 10min 以灭活 klenow DNA 聚合酶活性, 然后针对酸敏感可逆终端检测不同酸性条件下 (pH2.95、pH3.31) 可逆终端所携带的荧光基团是否可以断裂。具体如下:

[0124] 1) 按照如下体系在 eppendorf 管里设立可逆终端的 DNA 链延伸反应:  $10 \times$  Klenow buffer 10uL, BSA (10mg/mL) 1uL, DMSO 20uL, NaCl (1M) 25uL, Klenow (exo-) pol (5U/uL) 1.32uL, dUTP (10uM) 6uL, 模板 DNA (853ng/uL) 1.25uL,  $ddH_2O$  35.43uL, 总体积 100uL。

[0125] 将反应体系置于 30℃ 水浴箱中处理 15min, 再置于 75℃ 水浴中处理 10min 以灭活 DNA 聚合酶。将反应产物用于后续的可逆终端荧光基团的断裂反应。

[0126] 2) 酸敏感可逆终端荧光基团的断裂反应

[0127] 在 DNA 链延伸反应体系中加入 13.5 $\mu$ L 0.24M HCl, 调节 pH 至 3.05, 室温处理 30min, 再用 1M Tris 调节 pH 至 8.0, 取断裂反应产物进行 12% PAGE 电泳分析, 如图 4 所示, 由图 4 可知, 酸敏感可逆终端可以被 DNA 聚合酶识别, 作为其底物参与 DNA 链的延伸, 并且在 pH3.05 和 pH3.40 的酸性条件下, 可逆终端所携带的荧光基团完全断裂, 效果很好。完全可以用于测序。图 4 中各标示的含义如下:

[0128] Lane1 :dUTP 插入

[0129] Lane2 :dUTP 插入, pH = 3.05, 1.5min 后, 中和成 pH = 8.0

[0130] Lane3 :dUTP 插入, pH = 3.05, 3min 后, 中和成 pH = 8.0

[0131] Lane4 :dUTP 插入, pH = 3.05, 10min 后, 中和成 pH = 8.0

[0132] Lane5 :dUTP 插入, pH = 3.40, 2min 后, 中和成 pH = 8.0

[0133] Lane6 :dUTP 插入, pH = 3.40, 5min 后, 中和成 pH = 8.0

[0134] Lane7 :dUTP 插入, pH = 3.40, 10min 后, 中和成 pH = 8.0

[0135] Lane8 :dUTP 插入, pH = 3.40, 20min 后, 中和成 pH = 8.0

[0136] 结论 :室温下, pH = 3.05, 3min 断裂完全 ; pH = 3.40, 10min 断裂完全。在这两种 pH 条件下, DNA 模板均无明显损伤。

[0137] 基于其它三个碱基的可逆终端 :dCTP- 三氮烯联接单元 - 荧光素, dATP- 三氮烯联接单元 - 荧光素以及 dGTP- 三氮烯联接单元 - 荧光素也同样能够为相应的 DNA 聚合酶识别并实现链延伸反应, 同时在温和的条件下可快速完全断裂, 其断裂速度与断裂条件与上述基于 dUTP 的可逆终端非常类似。

[0138] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是, 本发明并不局限于上述特定实施方式, 本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改, 这并不影响本发明的实质内容。

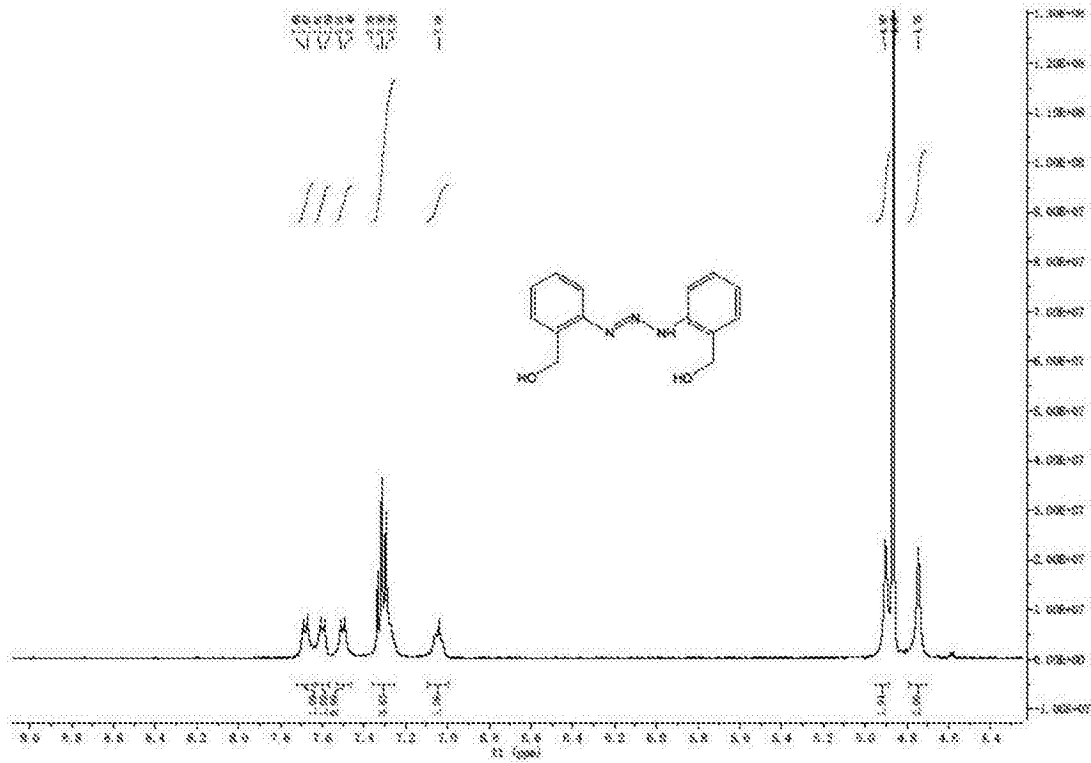


图 1

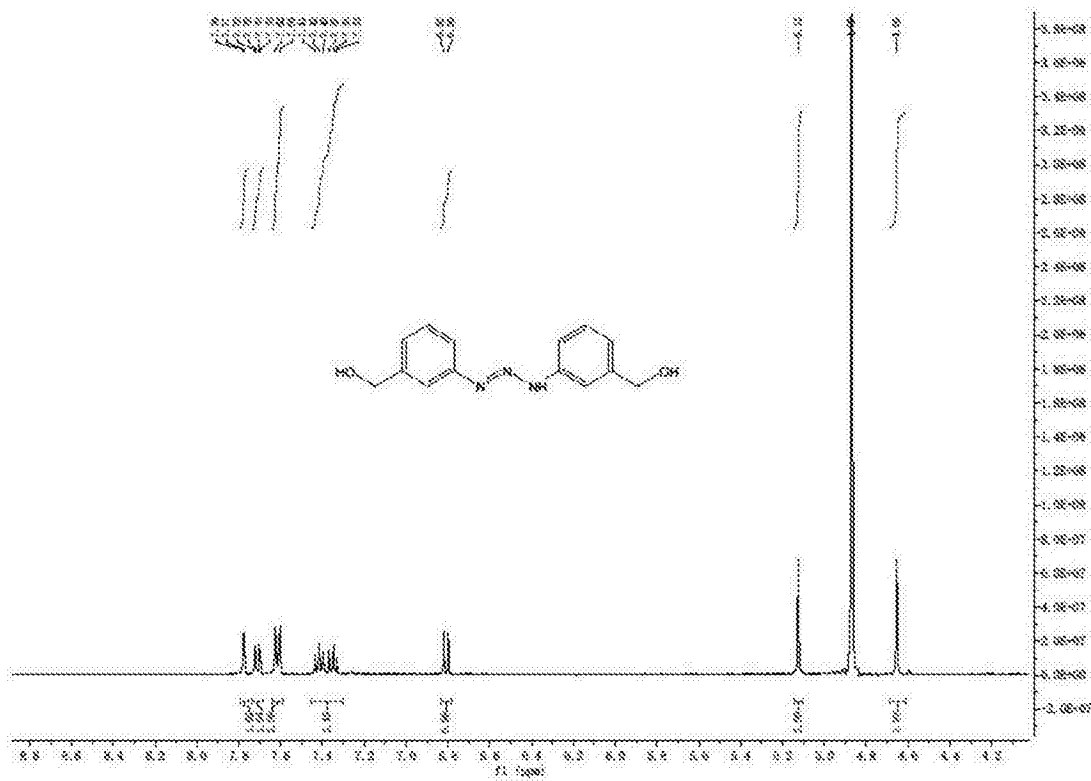


图 2

