

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01820515.1

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100385013C

[22] 申请日 2001.10.15 [21] 申请号 01820515.1

[30] 优先权

[32] 2000.10.14 [33] US [31] 60/240,397

[32] 2001.4.10 [33] US [31] 60/282,831

[32] 2001.5.18 [33] US [31] 09/861,292

[32] 2001.5.22 [33] US [31] 60/293,259

[86] 国际申请 PCT/US2001/031993 2001.10.15

[87] 国际公布 WO2002/033126 英 2002.4.25

[85] 进入国家阶段日期 2003.6.13

[73] 专利权人 伊拉根生物科学公司

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 J·K·格雷尼尔 D·J·马沙尔

J·R·普鲁登特 C·S·里奇蒙

E·B·雷施 C·W·舍雷尔

C·B·舍里尔 J·L·普塔钦

[56] 参考文献

WO9746711A 1997.12.11

US6037120A 2000.2.14

WO9814610A 1998.4.9

EP0742287A 1996.11.13

WO9631622A 1996.10.10

US5605794A 1997.2.25

审查员 吴文英

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹雯 刘玥

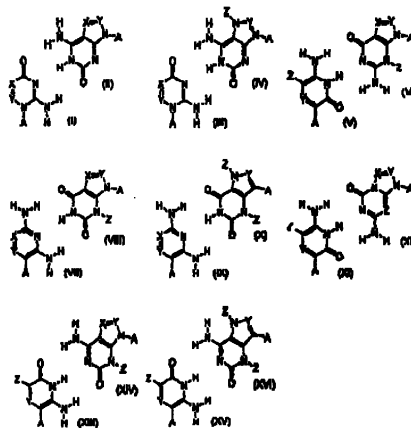
权利要求书 2 页 说明书 164 页 附图 17 页

[54] 发明名称

使用非标准碱基的固相支持体分析系统和方法

[57] 摘要

描述了使用非标准碱基的固相支持体分析系统，捕获寡聚核苷酸包括一分子识别标记序列，捕获寡聚核苷酸连接于固相支持体上，它与靶寡聚核苷酸固相支持体杂交。在一些例子中，分子识别序列包括一个或多个非标准碱基，并杂交于互补的靶寡聚核苷酸的标记序列。在一些例子中，在分析中使用一些非标准碱基(如，通过 PCR 或连接)掺入法。



1. 一种分析靶寡聚核苷酸的方法，包括步骤如下：
 - (a) 使包含被分析物特异序列的被分析物与第一引物和第二引物接触，第一引物包括一标记序列和与被分析物第一序列互补的序列，第二引物包括与被分析物第二序列互补的序列和非标准碱基；
 - (b) 酶促延伸第一和第二引物以形成靶寡聚核苷酸和第二寡聚核苷酸，其中靶寡聚核苷酸和第二寡聚核苷酸之一含有被分析物特异序列，而另一个含有与被分析物特异序列互补的序列；和在延伸的第一引物上，相对于第二引物非标准碱基的位置掺入一标记的互补的非标准碱基；
 - (c) 在杂交条件下，使偶联于支持体的捕获寡聚核苷酸与靶寡聚核苷酸接触以杂交靶寡聚核苷酸，靶寡聚核苷酸包括标记序列和被分析物特异序列或被分析物特异序列的互补序列，捕获寡聚核苷酸包括一分子识别序列，该分子识别序列与靶寡聚核苷酸的标记序列互补；和
 - (d) 基于检测来自所述标记的互补的非标准碱基的信号，检测靶寡聚核苷酸与捕获寡聚核苷酸的杂交。
2. 权利要求1的方法，其中(c)在室温下进行。
3. 权利要求1的方法，其中(c)后没有随之进行洗涤。
4. 一种分析至少两个靶寡聚核苷酸的方法，其包括步骤如下：
 - (a) 使包含被分析物特异序列的被分析物与第一引物和第二引物接触，第二引物包括，从5'到3'的顺序，非互补于被分析物特异序列的序列，非标准碱基和被分析物特异序列；
 - (b) 酶促延伸(a)的引物以形成延伸产物；
 - (c) 至少一个标记的引物与步骤(b)中第二引物的延伸产物杂交，标记的引物包括，从5'到3'顺序，包含了至少一个非标准碱基的5'标记序列，和与第二引物延伸产物互补的3'序列；
 - (d) 酶促延伸步骤(c)的标记引物以掺入与第二引物互补的序列；
 - (e) 把与非互补于步骤(a)中第二引物被分析物特异序列的序列互补的报告寡聚核苷酸与步骤(b)的延伸产物杂交；
 - (f) 在合适杂交条件下使步骤(e)的杂交产物与至少一个捕获寡聚核苷酸接

触, 所述捕获寡聚核苷酸包含至少一个非标准核苷酸并与支持体偶联, 以使步骤(e)的杂交产物与至少一个捕获寡聚核苷酸杂交; 和

(g) 通过检测来自报告寡聚核苷酸的信号, 检测步骤 (f) 的杂交。

5. 权利要求4的方法, 其中(f)在室温下进行。

6. 权利要求4的方法, 其中(f)后没有随之进行洗涤。

7. 权利要求4的方法, 进一步包括用连接酶将(d)的延伸产物与(e)的报告寡聚核苷酸共价连接。

8. 一种分析靶寡聚核苷酸的方法, 其包括步骤如下:

(a) 使包含被分析物特异序列的被分析物与第一引物和第二引物接触, 第二引物包括, 从5'到3'的顺序, 非互补于被分析物特异序列的序列, 非标准碱基和被分析物特异序列;

(b) 酶促延伸引物, 以形成靶寡聚核苷酸和第二寡聚核苷酸, 其中靶寡聚核苷酸和第二寡聚核苷酸之一含有被分析物特异序列, 而另外一个含有与被分析物特异序列互补的序列;

(c) 使标记的等位基因特异性引物与步骤(b)中第二引物的延伸产物杂交, 标记的等位基因特异性引物包括, 从5'到3'顺序, 包含了非标准碱基的5'标记序列, 连接头, 和与第二引物延伸产物互补的3'序列;

(d) 酶促延伸步骤(c)的等位基因特异性引物, 以掺入与第二引物互补的序列;

(e) 把与非互补于步骤(a)中第二引物被分析物特异序列的序列互补的报告寡聚核苷酸与步骤(d)中的延伸产物杂交;

(f) 使与支持体偶联的捕获寡聚核苷酸与步骤(e)的杂交产物接触; 和

(g) 检测报告寡聚核苷酸与捕获寡聚核苷酸的杂交。

9. 权利要求8的方法, 其中(f)在室温下进行。

10. 权利要求8的方法, 其中(f)后没有随之进行洗涤。

使用非标准碱基的固相支持体分析系统和方法

发明背景

对于寡聚核苷酸，包括DNA和RNA片段，已经发展了多种各式各样不同的分析方法，这些方法通常可以直接检测出样品中是否包括具有特定靶寡聚核苷酸序列的寡聚核苷酸。在某些情况下，许多等位基因序列，寡聚核苷酸序列的不同仅仅是几个核苷酸的不同。单核苷酸多态性（SNPs）指的是等位基因单个核苷酸的不同。至少在某种情况下，即使单个核苷酸的不同也引起相应的遗传响应或性状的改变。相应的，为了检测样品中存在何种等位基因，该检测技术必须有足够的灵敏度以区分密切相关的序列。

许多分析技术包括多个成分，在分析测试中每种成分将和其他成分相杂交。分析测试中成分之间的非特异杂交（即：两条非互补序列的杂交）产生高的杂交背景。比如，非常相似但并不完全一致的两条序列不能形成完全互补的双链，其中在两条单链的碱基不互补的位置碱基配对间断。当两条相似序列的成分互相杂交，正如上面的情况所述，很多的等位基因序列，特别是含有SNP的等位基因序列，会使非特异性杂交增加。因此，从方法上减少非特异的杂交，或者在分析中减少非特异杂交的影响，对例如测定样品中存在哪种等位基因的杂交分析是很有裨益的。

发明概述

总的来说，本发明涉及分析寡聚核苷酸的方法，试剂盒以及组合物。另外，本发明还涉及使用非标准碱基分析寡聚核苷酸的方法、试剂盒以及组合物。在一个实施方案中，提供了一种用于分析被分析物特异性序列的方法。一个捕获寡聚核苷酸包括一个分子识别序列，该分子识别序列含有至少一个非标准碱基并偶联在支持体上（例如单一的固相支持体，如芯片、晶片或颗粒支持体），它与样品接触并在适当的杂交条件下与靶寡聚核苷酸序列杂交，如果该样品含有靶寡聚核苷酸的话。靶寡聚核苷酸包括一个标记序列，它互补于捕获寡聚核苷酸分子识别序列和分析物特异序列或分析物特异序列的互补序列。检测靶寡聚核苷酸和捕获的杂交。

本发明的另一实施方案提供了另一检测被分析物特异序列的方法。捕获寡聚核苷酸与支持体相偶联，该捕获寡聚核苷酸包含一个分子识别序列，该分子识别序列与被分析物特异序列至少部分相同或互补，捕获寡聚核苷酸在杂交条件下与样品接触与靶寡聚核苷酸杂交。靶寡聚核苷酸包括含有至少一个非标准碱基的标记序列，和被分析物的特异序列或分析物特异序列的互补序列。捕获寡聚核苷酸以靶寡聚核苷酸为模板进行酶促延伸，在与标记序列的非标准碱基相对位置上掺入互补的非标准碱基。报道基团也会掺入到捕获寡聚核苷酸的延伸部分。检测靶寡聚核苷酸和捕获寡聚核苷酸的杂交。

本发明的另一实施方案提供了另一检测被分析物特异序列的方法。含有被分析物特异序列的被分析物与第一引物和第二引物接触。第一引物包括标记序列和被分析物第一序列的互补序列。第二引物包括被分析物第二序列的互补序列和一个非标准碱基。第一和第二引物酶促延伸分别形成靶寡聚核苷酸和第二寡聚核苷酸。靶寡聚核苷酸和第二寡聚核苷酸之一含有被分析物特异序列，另一个含有被分析物特异序列的互补序列。第一引物的延伸基本上停止于与第二引物的非标准碱基相遇时。互补于第二引物非标准碱基被掺入到延伸的第一引物并与第二引物的非标准碱基相对。捕获寡聚核苷酸分子识别序列与被分析物特异序列至少部分相同或互补，分析物特异序列与支持体相偶联，在杂交条件下捕获寡聚核苷酸分子识别序列与靶寡聚核苷酸接触并与与包含标记序列和被分析物特异序列、或被分析物特异序列互补序列的靶寡聚核苷酸相杂交。检测靶寡聚核苷酸和捕获寡聚核苷酸的杂交。

本发明的又一实施方案是一应用于上述方法的试剂盒。该试剂盒包括支持体和捕获寡聚核苷酸。该试剂盒还包括靶寡聚核苷酸或从被分析物中制造靶寡聚核苷酸的试剂。这些试剂包括，例如，聚合酶、互补于被分析物序列的第一、第二引物，或者第一、或者第二引物包括标记序列。在一些方法中，本试剂盒还包括非标准的碱基或掺入非标准碱基的三磷酸核苷酸。

以上有关本发明的概述并非是对本发明所有公开的实施方案或应用的描述。附图和下面的发明详述将会对这些实施方案更详细描述。

附图简述

参照本发明各种实施方案的详细描述和图解，本发明会被很好地理解，其中：

图1中展出了各种非标准碱基的化学结构，其中A是与聚合物主链相连的点，X是N或C-Z，Y是N或C-H，Z是H或是取代的或非取代的烷基；

图2A和2B是本发明寡聚核苷酸在固相支持体上杂交的两个例子；

图3说明了本发明第一次分析被分析物特异序列的步骤；

图4说明了本发明第二次分析被分析物特异序列的步骤；

图5说明了本发明第三次分析被分析物特异序列的步骤；

图6说明了本发明第四次分析被分析物特异序列的步骤；

图7说明了本发明第五次分析被分析物特异序列的步骤；

图8说明了本发明第六次分析被分析物特异序列的步骤；

图9说明了本发明第七次分析被分析物特异序列的步骤；

图10说明了本发明第八次分析被分析物特异序列的步骤；

图11说明了本发明第九次分析被分析物特异序列的步骤；

图12是3D表面图详解，说明了 98个分子识别序列（y轴），与100个分子识别序列中每一个的互补标记序列（x轴）的杂交；

图13是3D表面图详解，说明了50个分子的识别序列（y轴），与50个分子识别序列中每一个的互补标记序列（x轴）的杂交；

图14显示本发明一次等位基因分析得到的图示详解；

图15显示本发明另一次等位基因分析得到的图示详解；

图16说明了本发明第十次分析被分析物特异序列的步骤；

图17显示本发明一次等位基因分析得到的图解。

虽然本发明在附图中以举例的方式已经给出的各种修饰，选择形式以及特例一一列出并加以详细描述。但必须理解，本发明并不局限于本发明描述的具体实施方案。相反，本发明覆盖了一切不违背本发明精神和范围的修改、等价替换和形式变更，它们都属于本发明的范畴。

最佳实施方案的详细描述

本申请的相关申请为，申请号为60/240, 397的美国临时申请，申请日期为2000年10月14日；申请号为60/282, 831的美国临时申请，申请日期为2001年

4月10日；申请号为09/861, 292的美国临时申请，申请日期为2001年5月18日；申请号为60/293, 259的美国临时申请，申请日期为2001年5月22日，这些专利在此引作参考。

本发明涉及的是一种寡聚核苷酸分析及其分析方法。更具体些，本发明涉及的是一种使用一个或多个非标准碱基来测试寡聚核苷酸的测试和分析方法。虽然本发明并不局限于此，有关本发明的各个方面的好处将通过以下讨论来得到。另一些使用非标准碱基的分析方法已在申请号为60/240, 397的美国专利临时申请书中描述，该申请的申请日期为2000年10月14日。

正如我们所使用的，“核酸”包括聚合分子，象脱氧核糖核酸（DNA），核糖核酸（RNA），肽核酸（PNA），或其他任何序列，其他任何序列通常指由化学主链连接碱基，其中该序列的碱基能形成碱基对或与互补的化学结构杂交。合适的非核酸化学主链包括，比如：聚酰胺和多聚吗啉主链。术语“核酸”包括寡聚核苷酸、核苷酸、或多聚核苷酸序列、和片段及其部分序列。核苷酸能以任何适当的形式得到，例如从天然来源中分离，重组制备、人工合成，可以是单链或双链，也可以是有义链或反义链。

术语“寡聚核苷酸”通常指的是短的核酸序列（例如，长度少于100个核苷酸，通常长度是6至50个核苷酸），该序列通常可以使用该领域的以下技术得到，如核酸的固相支持体合成技术，DNA复制，逆转录，限制性内切酶消化，第二轮转录等。寡聚核苷酸确切大小由各种因素所决定，寡聚核苷酸的大小反过来又由寡聚核苷酸的根本功能或用途所决定。

“序列”指的是核苷酸的顺序。

术语“样本”包括样品或培养基（例如，微生物培养基），或者是生物样本、来源于生物体液的生物样本和非生物源的样本。

术语“被分析物”指的是样本中的待检测核酸。被分析物是分析测试的靶（例如，分析是检测样本中被分析物是否存在，浓度或量）。被分析物可直接或间接地被测试分析。至少在一些实施方案中，间接测试被分析物，如果被分析物在样本中出现，以该被分析物为模板合成靶寡聚核苷酸，例如使用PCR技术。然后靶寡聚核苷酸被用来进行分析，来说明样品中被分析物是否存在，浓度或量。

术语“靶寡聚核苷酸”指的是在分析测试方法中实际被测试的寡聚核苷

酸。靶寡聚核苷酸可以是,例如被分析物或者含有被分析物特异性序列的寡聚核苷酸,该特异性序列与被分析物序列相同或互补。比如,靶寡聚核苷酸可以是被分析物的PCR扩增产物或被分析物的一部分。

术语“捕获寡聚核苷酸”指的是拥有识别分子序列并与固相支持体表面相偶联的寡聚核苷酸序列,该序列可与含有标记序列或互补于分子识别序列的被分析物特异序列杂交,从而在固相支持体表面捕获靶寡聚核苷酸。

本申请所提到的“分子识别序列”指的是互补于靶寡聚核苷酸被分析物特异序列或标记序列的寡聚核苷酸序列。

这里,术语“互补”或“互补性”用于核酸时,(即,如寡聚核苷酸核酸或靶核酸的核苷酸序列),指的是序列的碱基配对原则。对于标准碱基来说,碱基配对原则是沃森Watson和克里克Crick提出的。对于非标准碱基来说,下面将有所描述,非标准碱基配对原则指的是以与沃森和克里克碱基配对原则相似的方式形成氢键或通过疏水性、熵值、或范德华力从而形成特殊的碱基配对。例如,序列“T-G-A”的互补序列是“A-C-T”。互补可以是“部分”互补,其中只有部分核酸序列的碱基符合碱基配原则而匹配。另一种方式是核酸之间完全或全部互补。两条核酸链间的互补程度影响着两条核酸链间杂交的效率和强度。

术语“杂交”指的是两条互补核酸链的配对。杂交和杂交强度(即,核酸间缔合的强度)被多种因素所影响,比如,核酸分子间互补的程度,杂交条件的严谨度,包括形成杂交的熔解温度(T_m),核酸分子内的G:C的比值。

进行分析测试来检测样品中是否含有拥有特定核酸序列(或它的互补序列)的被分析物。该核酸序列指的是“被分析物特异序列”。至少在一些例子中,原始样本不能够被直接分析测试。而是,如果该被分析物存在,将被分析物克隆或扩增(例如,使用PCR技术)以提供分析样品,直到样品中含有可检测量的拥有被分析物特异序列的靶寡聚核苷酸。其它的扩增技术包括,例如,核酸序列碱基扩增(NASBA,例如Guatelil等,《美国科学院进展》(Pro. Natl. Acad. Sci.) 87,1874(1990),这里引作参考),链替换扩增(SDA,例如Wakler等《美国科学院进展》(Pro. Natl. Acad. Sci.) 89,392-96(1992),这里引作参考),连接酶链式反应(LCR,例如Kalin等,《突变研究》(mutat. Res.), 283,119-23(1992),这里引作参考),转录介导的扩增(TMA,例如La

Rocco等, 欧洲微生物感染疾病临床 (Eur. J.Clin. Microbiol. Infect. Dis) 13, 726-31(1994), 这里引作参考), 滚环扩增 (RCA, 例如Lizardi等, 《自然遗传学》(Nat. Genet),19, 225-32(1998), 这里引作参考)。至少, 靶寡聚核苷酸的一部分一般相应于以下其中的一种, a)被分析物, b)被分析物的一部分, c)互补于被分析物的物质, d)互补于被分析物的一部分。该分析测试所检测出的靶寡聚核苷酸说明了原始样品中被分析物的存在。

通常, 用于检测一个或多个被分析物特异序列的分析检测系统包括固相支持体 (例如, 芯片、晶片或许多固体颗粒)。捕获寡聚核苷酸以一种只允许鉴定寡聚核苷酸的方式固定在固相支持体上 (例如, 利用在芯片或晶片上的位置或利用颗粒特性与特殊的捕获寡聚核苷酸相连)。捕获寡聚核苷酸包括分子识别序列。拥有不同的分子识别序列的不同捕获寡聚核苷酸被用来检测不同的被分析物特异序列。因此, 在单次测试系统中, 设计使用不同的捕获寡聚核苷酸可以分析含有多个被分析物特异序列的单样本。

含有被分析物特异序列的靶寡聚核苷酸与捕获寡聚核苷酸序列反应, 靶寡聚核苷酸序列除了被分析物特异序列, 还包括标记序列。特异的标记序列与每一个被分析物特异序列相连接。标记序列通常互补于其中一个分子识别序列。因此, 在杂交条件下, 靶寡聚核苷酸序列与适当的捕获序列相杂交。另外, 在本发明的一些特定方法中, 被分析物特异序列可以互补于分子识别序列之一。

靶寡聚核苷酸或它的互补链典型地含有一个报道基因或用于连接报道基因的偶联剂。通过观察固相支持体上是否存在与特定的捕获寡聚核苷酸相缔合的报道基因, 确定样品中特殊的被分析物特异分析序列是否存在。合适的报道基因包括, 但不限于, 生物素, 荧光素, 化学发光物质, 地高辛, 自旋标记物, 放射标记物, DNA 切割部分, 发色基团, 或荧光发色基团。一些合适的偶联剂包括, 但不仅限于胺, 硫醇类, 低亚硫酸钠 (hydrosines) 醇或烷基。

恰当的分析测试系统的例子正如示意图2A和2B中所示。在该分析测试中, 捕获寡聚核苷酸100a,100b偶联一固相支持体120上, 比如, 单一固体基质120a (如, 芯片或晶片), 或固体颗粒120b的成员之一。通常, 至少有一个捕获寡聚核苷酸 (如, 捕获寡聚核苷酸100a) 含有一分子识别序列102, 它互补于靶寡聚核苷酸110的标记序列112, 因此, 在杂交条件下, 靶寡聚核苷酸110和捕获寡聚核苷酸100a相杂交。

尽管本分析测试法可以将所有的捕获寡聚核苷酸用同一个球形分子识别序列进行反应，但典型的，使用两组或更多不同的组的捕获寡聚核苷酸100a, 100b。每一组捕获寡聚核苷酸都带有一个不同的分子识别序列。在一个固相基质上, 每组捕获寡聚核苷酸典型的排列在基质的一个或几个特定的区域内，这些区域与特定的分子识别序列缔合。当使用微粒支持体时，捕获寡聚核苷酸100a, 100b的每一组被排列在有着特定性质的微粒120b, 120c至少一组之一上，这样, 特定微粒上的寡聚核苷酸可以从它所连接的颗粒的性质而确定。可以使用如下的测试，例如，a) 通过使不同的寡聚核苷酸（和基质中不同的区域，不同的微粒）与每一个等位基因相缔合，检测样品中有何种等位基因存在， b) 分析多种相关的或不相关的寡聚核苷酸序列或者c) 实施这两项。正如图2A和2B所示，靶寡聚核苷酸优先与相应的捕获寡聚核苷酸杂交，通过观察靶寡聚核苷酸在单一支持体上的特定空间（图2A）或连接的特定微粒上（图2B）存在与否，来确定被分析物特异序列的存在与否。

如下所述，本分析测试系统的一个附加成分是报道基因130，它与靶寡聚核苷酸分子110（或它的互补序列120）相偶联。报道基因130是分析测试的组成成分, 该组成成分可以被检测技术（如，比色法，荧光测定法，电泳，电化学法，光谱分析法，色谱分析法，光密度法或放射技术）检测出来，以显示靶寡聚核苷酸的存在或浓度。报道基因通常由检测技术确定(例如，荧光技术使用荧光报道基因，放射技术使用放射标记。)

在一些测试分析中，捕获寡聚核苷酸和靶寡聚核苷酸它们中的一种或全部包括至少一个非标准碱基。非标准碱基的使用可以提高包括杂交在内的分析测试过程的分析特异性，因为非标准碱基优先和其它互补的非标准碱基相杂交。使用更长的寡聚核苷酸也会增加杂交的特异性的比率。核酸的杂交通常取大约三到四个碱基完全互补的样本。这就形成了成核位点。如果成核位点形成，杂交将会延伸到整个链。如果链上的碱基延伸后不能互补，两条链将会释放。因为成核过程要花费时间，非标准碱基的使用会减少成核位点形成的可能性，从而减少了为了形成完全匹配而需要的采样步骤数目。

另外，非标准碱基的使用会直接把另一个非标准碱基掺入序列（例如使用PCR技术）。被掺入的非标准碱基包括报道基因以及和报道基因偶联的试剂，该试剂可以高选择性的掺入报道基因以用于检测靶寡聚核苷酸。

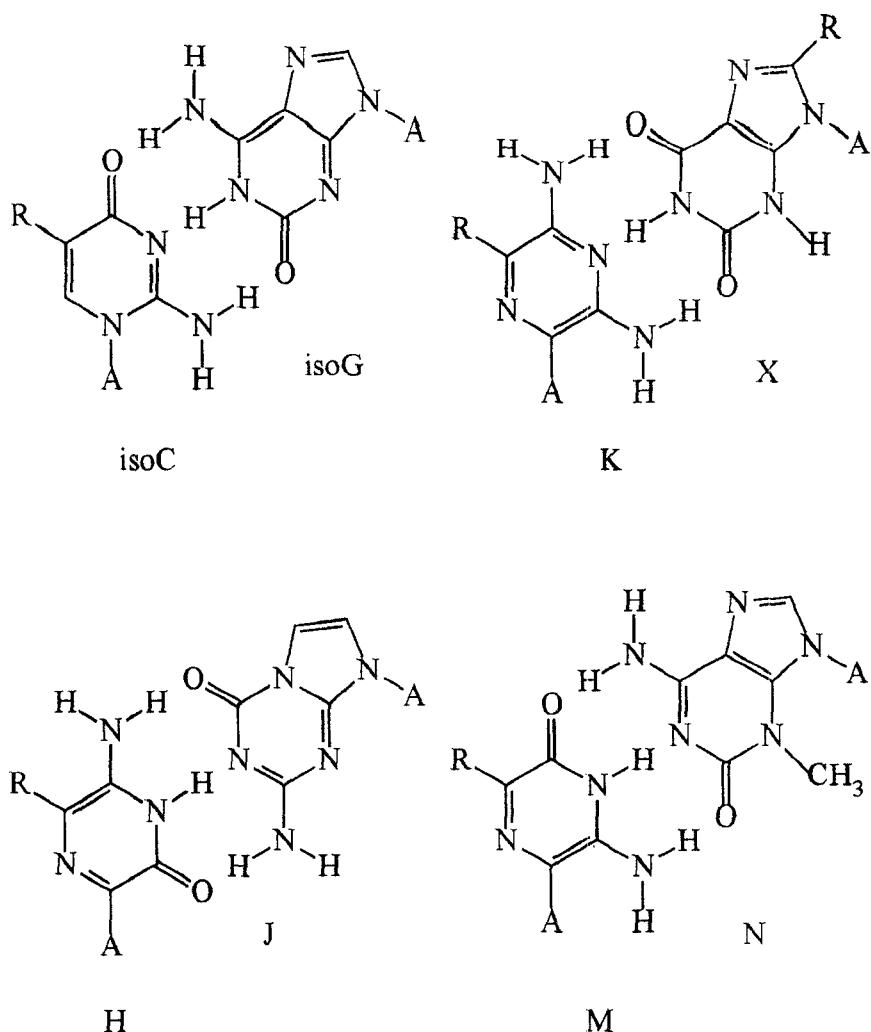
寡聚核苷酸和碱基

DNA和RNA都是寡聚核苷酸，它们分别是脱氧核苷或核苷被磷酸二脂键相连的多聚物。每一个脱氧核苷或核苷包括一个与糖基偶连的碱基。自然存在的DNA和RNA中掺入的碱基有腺嘌呤（A），鸟嘌呤（G），胸腺嘧啶（T），胞嘧啶（C）和尿嘧啶（U）。这五种碱基称为“天然碱基”。根据沃森和克里克所描述的碱基配对原则，天然碱基可以杂交形成嘌呤——嘧啶碱基对，G和C配对，A和T或U配对。这种配对原则就是寡聚核苷酸和它的互补寡聚核苷酸特异性杂交。

天然碱基的这些碱基配对的形式是由两个碱基之间形成两个或三个氢键产生的。每个碱基都有两个或三个氢键供体和氢键受体。碱基对间的每个氢键是一个碱基的至少一个氢键供体和另一个碱基的氢键受体相互作用而产生的。氢键供体包括例如杂原子（例如，氧原子、氮原子），它至少有一个相连的氢原子。氢键受体包括例如杂原子（例如，氧原子或氮原子），它至少有一对孤对电子。

天然碱基，A, G, C, T和U，在非氢键的位点被取代，衍生成被修饰过的天然碱基。例如，天然碱基可被衍生化与支持体相连是通过反应官能团（如，硫醇，肼，醇或胺）与碱基上的非氢键原子偶联而形成的。其它可能的取代基包括生物素，地高辛，英光素基团，烷基（比如，甲基或乙基）。

非标准碱基也可以通过氢键形成碱基对，可以参考以下信息的描述，例如，美国专利5,432,272, 5,965,364，6,001,983和6,037,120，和美国专利申请号08/775,401所有这些专利文献在此引作参考。“非标准碱基”指的是一种碱基，它不是A, G, C, T, 或U，却能掺入到寡聚核苷酸链中，能通过氢键，或疏水作用，熵，范德华力相互作用而互补于与之互补的碱基，形成碱基配对。图1是几个合适的碱基和与它们互补的几个碱基配对的例子。这些碱基的具体例子包括在下面的碱基对复合体（iso-C/iso-G, K/X, H/J,和M/N）中的碱基。



其中A是将与糖基或聚合物主链的其它部分相连的点，R是H或是取代的以及非取代的烷基。认识到其它的非标准碱基可以通过氢键结合而制备，或者在碱基非氢键原子结合的位置掺入官能团修饰以上的非标准碱基而制备。在图3至图9中，非标准碱基被以下的符号指明：X代表iso-C，Y代表iso-G。

非标准碱基配对的氢键与天然碱基配对的氢键相似，其中非标准碱基对的氢键供体和氢键受体之间形成了两个或三个氢键。天然碱基和非标准碱基之间的一个区别是氢键供体和受体数量和位置。例如，胞嘧啶被认为是一供体/受体/受体碱基，鸟嘌呤是互补受体/供体/供体碱基。正如参考美国专利6,037,120所述，Iso-C是一受体/受体/供体碱基，iso-G是互补的供体/供体/受体碱基，该专利在这里一并被引作参考。

寡聚核苷酸中使用的其它非标准碱基包括有，例如，萘，菲，茈衍生物。有关信息可以参阅，例如，Ren等，发表在《美国化学会》(J. Am. Chem. Soc.

) ,118,1671(1996)的文章,和McMinn等, 在《美国化学会》(J. Am. Chem. Soc.) 121, 11585 (1999) 的文章, 这两篇文献在此引作参考。这些碱基并不是通过氢键形成稳定的碱基对, 而是依靠疏水作用, 熵, 范德华力相互作用形成碱基对。

固相支持体

本分析测试的实施至少在部分使用了固相支持体。通常, 捕获寡聚核苷酸偶联于或附着于支持体表面。可以使用多种不同的支持体。在一些实施方案中, 固相支持体是单一的固相支撑体, 例如芯片、晶片、试管, 锥形瓶或其它物品的内表面或外表面。固相支持体可以由任何合适的材料制作, 只要该材料可提供诸如稳定性, 大小, 形状, 表面光滑度等最佳属性组合。优选的材料将不影响核酸杂交, 也不会和核酸大量非特异性结合。合适的材料有生物的, 非生物的, 有机的或无机材料。例如, 微阵列可以由任何合适的塑料, 聚合物, 硅, 玻璃, 陶瓷或金属材料制成, 同时也可被做成固体, 或聚合物, 胶体, 硬胶片, 弹性薄膜等各种形式。合适的聚合物材料包括, 例如, 聚苯乙烯, 聚(烷基)甲基丙烯酸酯, 聚(乙烯二苯甲酮), 聚碳酸酯, 聚乙烯, 聚丙烯, 聚酰胺, 聚偏二氟乙烯以及其它类似物。优选的材料包括聚苯乙烯, 玻璃和硅。

如图3所示, 在一些实施方案中, 单一的固相支持体300被分成了一个个独立的小区域310, 捕获寡聚核苷酸排列在每个区的支持体上。在每一个单独区域或每个微粒支持体上, 捕获寡聚核苷酸显著的(例如, 至少75%)含有相同的分子识别序列。优选地, 各个区中或各颗粒支持体上基本上所有的(比如, 至少90%, 更好些, 至少99%)捕获寡聚核苷酸分子都含有相同的分子识别序列。通常状况下, 不同区域的捕获寡聚核苷酸有着不同的序列, 即使在一些实施例中, 相同的捕获寡聚核苷酸可以被用在两个或更多的区域, 例如, 作为对照或用于确认结果。

有着不同区域的固相支持体可以做成规则或不规则的阵列, 用于测试样品并测定是否存在着多种不同的被分析物特异序列。例如, 一个微阵列可以检测10, 100, 1000或更多的不同的被分析物特异序列。

固相支持体的尺寸大小由所期望点样区域的数量和要分析的被分析物特异序列的数目等因素决定。例如, 固相支持体可以是长从0.5cm左右到7.5cm

左右，宽从0.5cm左右到7.5cm左右的二维平面。固相支持体还可以一层或多层放置在其它支持体上，比如显微镜载玻片（例如，长为7.5cm左右，宽为2.5cm左右）。固相支持体的大小可以在一些具体实施中根据需要方便地调整。

也可以使用其它一些类型的固相支持体。在一些实施方案中，固相支持体是一些微粒支持体。在这些实施方案中，捕获寡聚核苷酸偶联在微粒上。通常，微粒分成组，同一组内的微粒具有特定特性，比如，颜色，荧光，频率，密度，大小，或形状，用这些性质可以区别或分离不同组的微粒。优选地，这些微粒可以用技术分离，例如，流式细胞光度计。

按照本发明所预期的，微粒可以由任何不溶的或固体材料制成。比如，微粒可以由硅胶，玻璃，尼龙，树脂，交联葡聚糖TM，琼脂糖TM，纤维素，磁性材料，金属（如，钢，金，银，铝，铜或合金），镀金属材料，塑料（如，聚乙烯，聚丙烯，聚酰胺，聚酯，聚偏二氟乙烯（PVDF））等，以及它们的组合物制成。恰当的例子是微珠，它在美国专利5,736,330，6,046,807和6,057,107中描述，在此一并引为参考。适当的微粒的例子是可以得到的，例如从Luminex公司，奥斯汀，德州。

在一个实施方案中，与捕获寡聚核苷酸相连的微粒支持体放在一容器内，容器可以是例如小瓶子，试管，孔板。靶寡聚核苷酸加入到容器内，在杂交条件下进行分析测试。再基于每组支持体所有的特性将微粒支持体进行分离。然后再分别研究测试每组支持体上所连接的靶寡聚核苷酸。任选的，还可以洗脱支持体来减低相互杂交的影响。正如下面的描述，一次或多次的洗脱可以在相同或不同的严谨条件下进行，如下文所述。另可选的，与捕获寡聚核苷酸和支持体接触以前，含有靶寡聚核苷酸的溶液，可以用例如，大小排除色谱法，差异沉降法，旋转柱，过滤柱等方法除去没被扩增的引物或与靶寡聚核苷酸大小不一样的其它物质。

在一些实施方案中，使用多个容器（如，小瓶，试管等），分析每个容器中多个分析样品或不同捕获寡聚核苷酸的结合物（含缔合的支持体）。另一些情况下，每个容器仅包含一种类型的捕获寡聚核苷酸（和缔合的支持体）。

在另一个实施例中，支持体可以是一些独立的支持体表面，他们可任选地偶连在一起。比如，这种支持体可以包括个体的光学纤维或一些其它支持体成员，它们分别偶联不同的捕获寡聚核苷酸，再相互连接在一起，形成一个单独

的支持体，比如基质。

通常，支持体（无论是单个的支持体还是微粒支持体）能够以一种足够稳定的方式使捕获寡核苷酸结合或保持在其表面，以实现这里描述的目的。上面所提到的结合可以包括，例如，在支持体和捕获寡聚核苷酸之间形成共价键，离子键，配位键，氢键或范德华键或者被带正电荷或负电荷支持体吸引。捕获寡聚核苷酸直接或通过连接头连接在固相支持体表面。在一些实施方案中，捕获寡聚核苷酸直接连接在支持体表面，提供支持体表面，或寡聚核苷酸，或它们两者，或者用一个或多个反应基团将表面，寡核苷酸衍生化。例如，Luminex™微粒表面可以用，例如，羧酸酯，顺丁烯二酰亚胺，酰肼等官能团或抗生物素蛋白来修饰。玻璃表面可以用硅烷，乙醛处理（形成希夫氏碱基DNA醛-胺偶联物）。在一些实施方案中，支持体或支持体上的物质（例如，支持体表面的包被层）带有反应功能团，它可以偶联于捕获寡聚核苷酸上的反应功能团。例如，支持体可以被官能化（即，金属或有反应功能的多聚物表面）或含有官能化的基团（即，含有未决定的功能团的聚合物），以提供方案位点与寡聚核苷酸相偶联。

在另一个实施方案中，捕获寡聚核苷酸在表面与捕获寡聚核苷酸相互交联。优选地，交联的捕获寡聚核苷酸包括了一个交联部分和一个捕获部分，其中捕获部分包括分子识别序列，它可以和靶寡聚核苷酸的标记序列相杂交。

又一实施方案中，支持体可以部分或全部被结合试剂所包被，比如，抗生蛋白链菌素，抗体，抗原，酶，酶的辅助因子或抑制因子，激素，或激素受体。结合试剂通常是生物分子或合成分子，它们通过共价键或非共价键对其它分子或大分子具有高的亲和力。捕获寡聚核苷酸偶联于结合试剂互补体（如，生物素，抗原，抗体，酶的辅助因子或抑制因子，酶，激素受体，或激素）。当捕获寡聚核苷酸在与结合试剂接触时，捕获寡聚核苷酸将被保留在支持体上。其它的一些已知的偶联技术也可以被方便的调整采用而在本系统和方法中实施。

捕获寡聚核苷酸和靶寡聚核苷酸

捕获寡聚核苷酸包括分子识别序列，该序列通过杂交能捕获具有互补标记序列的靶寡聚核苷酸。捕获寡聚核苷酸的分子识别序列与靶寡聚核苷酸的标记序列相杂交，导致靶寡聚核苷酸连接到固相支持体上。分子识别序列和标记序

列与特定的被分析物特异序列（也是靶寡聚核苷酸的一部分）相缔合，如果有杂交发生，它将显示分析样品中，具有被分析物特异序列（或它的互补序列）的被分析物的存在或浓度。

典型的，编码和标记序列包括至少六个核苷酸，在一些实施例中，包括至少8，10，15，20，或更多的核苷酸。在一些分析测试中，正如以下的描述，分子识别序列和标记序列包含一个或多个非标准碱基。在另一些分析测试中，分子识别序列和标记序列不包含任何非标准碱基。

捕获寡聚核苷酸一般也包含一个官基团，该基团使捕获寡聚核苷酸与固相支持体表面，或者固相支持体上排列的、或延伸的官能团相连接。该官能团可直接连接聚合物主链上或核酸序列的一个碱基上。可选的，正如上描述，捕获寡聚核苷酸分子可以包括一个用于交联的交联区，它可以通过静电力结合在表面。捕获寡聚核苷酸可以用各种技术产生，如，包括固相合成，DNA复制，逆转录，限制性酶切，第二轮转录等。

除了标记序列外，靶寡聚核苷酸包括一被分析物特异序列，它与被分析物中感兴趣的序列一致或互补。被分析物特异序列可以是与标记序列完全不同的序列，或者一些或全部标记序列可以是被分析物特异序列的一部分。

捕获寡聚核苷酸的长度可以通过期望杂交的强度和动力学来优化。通常，分子识别序列的长度在范围为6至20(优选为8至12个)个核苷酸范围内。在最佳实施方案中，捕获寡聚核苷酸的不同分子识别序列相互之间并不互补，更优选的情况是，和任何已知的天然基因序列或待测样品中最有可能出现的大量的基因片段不互补。结果是，捕获寡聚核苷酸的捕获分子识别序列主要与相应的靶寡聚核苷酸互补标记序列相杂交。

靶寡聚核苷酸（或互补于靶寡聚核苷酸的至少一部分的寡聚核苷酸）包含有一报道基因或用于连接报道基因的偶联试剂。报道基因或偶联试剂可以与聚合物主链结合，或与靶寡聚核苷酸或其互补寡聚核苷酸的任何碱基结合，将报道基因与核苷酸碱基（包括天然和非标准碱基）连接的技术是已知的。一些报道基因基团的例子包括，生物素，地高辛，自旋标记基团，放射标记，DNA 分裂片段，发色基团，和荧光发色基团例如荧光素。偶联试剂的例子包括，生物素或含有反应官能团的取代物。报道基因基团然后连接链霉抗生物素蛋白或包含与偶联剂相互作用的反应官能团，从而将报告基团结合到靶寡聚核苷酸或其

互补的寡聚核苷酸分子上。

聚合酶链式反应（PCR）技术

正如以下描述，多种聚合酶链式反应（PCR）技术是已知的并且可以用于本分析测试中。通常PCR技术用于扩增寡聚核苷酸的至少一部分。存在被分析物特异序列的待测样品与以下试剂接触：寡聚核苷酸第一和第二引物；核酸聚合酶；PCR过程中加入的核苷酸相应的三磷酸核苷。天然碱基的三磷酸核苷包括：dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 和 dUTP。如果需要的话，非标准碱基的三磷酸核苷也可以加入。已知合适的PCR聚合酶，并且包括例如热稳定聚合酶，例如，无论是原酶还是改造过的*Thermus*栖热菌属种聚合酶，这些属种包括但不限于*Thermus aquaticus*水生栖热菌 (Taq), *Thermus flavus*黄栖热菌(Tfl), *Thermus thermophilus*嗜热栖热菌 (Tth)，以及DNA聚合酶I和HIV-1聚合酶的Klenow片断。

第一和第二引物互补于待扩增寡聚核苷酸双链的不同模板链的不同位置。扩增出的寡聚核苷酸序列包括与分析物杂交的两条引物序列和两条引物之间的序列。引物可以通过多种方法合成，包括固相合成技术，DNA复制，逆转录，限制性内切酶消化，第二轮转录等。

PCR技术包含的循环步骤有 (i) 将要扩增的双链寡核苷酸的或者前面循环中形成的延伸产物的第一寡聚核苷酸引物和第二寡聚核苷酸引物退火；(ii) 通过核酸聚合酶延伸退火后第一和第二寡聚核苷酸引物，合成引物延伸产物；和 (iii) 使产物变性，得到单链的核酸。通过修改反应步骤和各种条件（如，时间和温度），发展了多种PCR技术。一般情况下虽然在一些特殊的检测中，一些PCR技术也许比另一些更加好用，但以下所描述中，多种PCR方法都适用于本分析测试。

以下描述的“fast-shot PCR”是适用的一些分析改进PCR方法之一，该方法的引物延伸时间缩短或消除。正如我们所使用的，术语“fast-shot聚合酶链式反应”或“fast-shot PCR”指的是在PCR延伸终止时，也同时停止了退火和解链步骤，使用的时间非常短或说没有耗时的PCR。通常，使用该方法，两引物的3'端与模板核酸分离不会超过10个碱基。

使用fast-shot PCR循环会增强反应的特异性，该技术在PCR延伸终止时，也同时停止了退火和解链步骤，使用的时间非常短或说没有耗时。在

一些实施方案中，PCR混合液快速循环在大约90至100℃和大约55至65℃之间，在每一个温度最多只停留大约一秒钟的时间，从而使聚合酶没有时间来延伸错配引物。在一些实施方案中，反应循环的温度大约在95℃到58℃间，每个温度大约要停留一秒钟。

这种快速循环容易产生短的PCR产物，通常，在模板核酸和第一和第二引物的3'端间留下大约0至10个碱基的空位。优选地，引物被设计成T_m值在大约55至60℃。在一些实施方案中，大约总共37个循环就一般适合检测出大小为30个核苷酸的靶寡聚核苷酸分子。

等位基因特异性PCR引物能用于分辨SNP（单核苷酸多态性）和其它等位基因。对于SNP检测，引物应该设计为互补于每一个等位基因，使感兴趣的多态性碱基位于或接近于第一或第二引物的3'端（典型的，在3到5个碱基内）。高水平的等位基因分辨，部分的由于Taq聚合酶引物延伸时，3'端核苷酸与靶DNA的错配而受到局限，即，引物结合的等位基因并不是特异的。其它的聚合酶也可以被使用。

此外，通过置换等位基因特异性引物中其它位置处的错配能实现等位基因分辨。引物核苷酸错配的其他位置可以用以下两种主要方式进行选择性扩增，1) 简单地通过降低引物的T_m值（解链温度），使引物在热循环时不能在DNA模板上杂交，最终导致聚合酶不能延伸引物。2) 建立一个不利的引物/模板结构，使聚合酶不能延伸。

分析测定的实施例

使用非标准碱基分析测试编码区序列和标记序列

如图4所示的分析中，两组或更多组捕获寡聚核苷酸分子202被制备。每组捕获寡聚核苷酸分子202包括特定的分子识别序列204。每组分子识别序列至少含有一个（典型的是两个或更多）非标准碱基（在图中用虚线表示）。非标准碱基的使用大大减少了捕获寡聚核苷酸与仅由天然碱基组成的序列杂交的可能性。与使用仅有天然碱基的寡聚核苷酸的相似分析测试相比，一般导致非特异杂交远远减少。捕获寡聚核苷酸一般还包括一个反应官能团，用以连接固相支持体206，当然，根据以上所描述，还有其它的方法用以连接。

测试所使用的支持体，可以是，例如，一种单一固相支持体，如，玻璃，金属，塑料或无机芯片。捕获寡聚核苷酸被排列在支持体上，并且一般用以上

所描述的方法之一固定在支持体上（例如，通过反应基团偶联捕获寡聚核苷酸和支持体，使用结合试剂处理支持体，或者交联捕获寡聚核苷酸）。每种基团排列在固相支持体一个或多个的独特的区域，以至于该区域能和特定的寡聚核苷酸相缔合。

在另一个实施方案中（没有图示），分析测试的支持体是微粒支持体（例如，珠子）。这里所描述的任何分析测试可以在单一固相支持体上，微粒支持体上，或其它任何支持体上进行，这是可以被理解的。微粒支持体可以分为几组，每一组都有着区别于其它各组微粒的特性（如，颜色，形状，大小，密度或其它化学和物理性质）。每种寡聚核苷酸可以和一组或更多组的微粒偶联。一组特定的微粒和一组特异的寡聚核苷酸产生缔合作用，可以利用微粒支持体独特性质来鉴定相应的捕获寡聚核苷酸。

回到图4，靶寡聚核苷酸208，如果它在待测样品中存在，它包含一被分析物特异序列210和一标记序列212，该标记序列互补于一种捕获寡聚核苷酸202的分子识别序列204。标记序列212至少有一种非标准碱基，否则该标记序列将不能互补于捕获寡聚核苷酸的分子识别序列。互补于靶寡聚核苷酸208部分的寡聚核苷酸序列214包含一报道基因216或与报道基因连接的结合试剂（没有图示）。

靶寡聚核苷酸208或它的互补寡聚核苷酸214可以，例如，用PCR从含有被分析物特异序列或它的互补序列的被分析物中扩增出来。在PCR扩增中，使用了两种不同的引物（如图4B所示），第一引物218包含被分析物220第一条链第一序列的互补序列。第二引物222包含被分析物220的第二条链第二序列的互补序列，第二条链第二序列是第一序列的上游或下游。被分析物特异序列典型地包括，被分析物的延伸序列，该延伸序列包括引物杂交的序列（或其互补序列）。第一引物218包括标记序列212，第二引物212包括报道基因216（或连接报道基因的偶联剂）。使用公知的PCR扩增技术或上面所描述的fast-shot PCR技术延伸第一引物和第二引物并扩增，产物是靶寡聚核苷酸208和它的互补寡聚核苷酸214(如图4C所示)。其它已知的合成方法，如，固相合成，DNA复制，逆转录等都可用于合成靶寡聚核苷酸及它的互补链。

回到分析测试中，靶寡聚核苷酸208一般与缔合有捕获寡聚核苷酸202的支持体206（或一固定微粒支持体的容器）相接触。如果适当的捕获寡聚核苷酸

分子在支持体上存在（如图4D所示），通过条件的控制来促进靶寡聚核苷酸的标记序列和捕获寡聚核苷酸互被分子识别序列选择性杂交。还加入报道基因（除非互补的寡聚核苷酸214已经有了报道基因），用于偶联互补的寡聚核苷酸214上。可选择的是，在杂交之前使用如下技术除去没有掺入的引物，比如，尺寸排除色谱法，差异沉降法，旋转柱，过滤柱或者杂交后洗脱。

对于一些平面支持体，分析测试可以通过读取支持体各个独立区域是否有报道基因的存在而得到检测。报道基因的存在说明该原始样品中含有拥有被分析物特异序列的被分析物，该被分析物特异序列与支持体区域上特异性标记序列和分子识别序列相缔合。报道基因的不存在表明样品中不含有拥有特定被分析物特异序列的被分析物。

对于颗粒支持体的分析检测，微粒可以根据它们的特性而被分离，然后确定哪种颗粒含带有通过捕获寡聚核苷酸和靶寡聚核苷酸偶联于微粒上的报道基因。完成分离的技术包括，例如，流式细胞光度仪。报道基因基团的存在表明了样品含有靶寡聚核苷酸，该靶寡聚核苷酸含有被分析物特异序列，该序列和特定的标记序列和特定的捕获寡聚核苷酸的分子识别序列相缔合。

图4种所采用的方法可以被调整用于检测样品中等位基因的存在。比如，该分析包括相应于两个或多个等位基因的等位基因特异性引物（包括第一引物218或第二引物222，以及它们两者）。每一个等位基因特异性引物包括一个仅仅和一个等位基因特异性杂交的序列。连接于等位基因特异性引物的标记序列或报道基因（或偶联剂）对每一个等位基因来说也是特异的。如果样品中存在等位基因，与等位基因缔合的等位基因特异性引物能被延伸，并被通过与互补的，支持体上等位基因特异性捕获寡聚核苷酸杂交，或者观察等位基因特异性报道基因基团的存在而检测出来。同样认识到，这项测试也可以用于测试被分析物中的非等位基因的被分析物特异序列是否存在。

本分析方法可以用于检测等位基因中的SNP(单核苷酸多态性)。无论是第一还是第二引物都是SNP特异性的。通常，两个（或多个）不同的SNP特异性引物被用于分析测试。优选地，SNP特异性引物中的SNP位点位于或接近（例如在三至五个碱基内）引物的延伸端。"Fast-shot PCR"技术可以用于本SNP分析检测，因为短的延伸时间基本上减少了非互补引物延伸的可能性。

捕获寡聚核苷酸和靶寡聚核苷酸之间的杂交是这里描述的分析测试的特

征。象许多传统的杂交方法一样，本杂交发生在杂交混合物内，该混合物包括盐（如，钠盐或镁盐），缓冲液（如，TRIS, TAPS, BICINE或MOPS），非特异性封闭试剂（如，SDS, BSA或剪切的基因组DNA），和保护试剂（如，EDTA或叠氮化物）。典型的，杂交发生在钠离子（或其它阳离子）浓度至少0.01至1.0M和pH在7.0至8.3时。一般情况，杂交和洗脱步骤在能满足保持杂交所需要严谨度的温度和盐浓度下进行。严谨条件取决于序列。如果愿意的话，在严谨条件的基础上可以增加洗脱次数。

选择的“低严谨条件”是指，比特异性序列在杂交溶液的pH和离子强度下的热解链温度（ T_m ）低大约10至15°C。 T_m 值是指有50%的标记序列和互补的分子识别序列杂交，并处于平衡时的温度（固定的离子强度、pH和核酸浓度）。

选择的“中严谨条件”是，比特异性序列在杂交溶液的pH和离子强度下的热解链温度（ T_m ）低大约5至10°C。

选择的“高严谨条件”是比特异性序列在杂交溶液的pH和离子强度下的热解链温度（ T_m ）低不到大约5°C。

另一种检测分析方案如图5所示，在图5A中，两组或更多组的捕获寡聚核苷酸252被制备，它们与支持体256相连。捕获寡聚核苷酸252的每一组都包括一个特定的分子识别序列254。每组的分子识别序列包括至少一个（一般两个或更多）非标准碱基。靶寡聚核苷酸258和互补的寡聚核苷酸264可以，通过例如，PCR扩增含有被分析物特异序列或它的互补序列的被分析物而形成。在PCR扩增中，使用两种不同的引物（正如图5B、5C所示）。第一引物268包含互补于被分析物270第一链第一序列的序列，第二引物272包含互补于被分析物270第二链第二序列的序列，第二链第二序列位于第一序列的上游或下游。典型的，被分析物特异序列包括被分析物的延伸序列和引物所杂交的序列（或其互补序列）。第一引物268包括标记序列262，第二引物272包括报道基因266（或报道基因的偶联剂）。

靶寡聚核苷酸258一般与支持体256接触（或是一盛有微粒支持体的容器），该支持体与捕获寡聚核苷酸252相缔合。如果支持体上有适当的捕获寡聚核苷酸分子（如图5D所示），控制条件来促进靶寡聚核苷酸标记序列和捕获寡聚核苷酸互补的分子识别序列进行选择性的杂交。也加入报道基因（除非互补的寡

聚核苷酸分子264已经包含了报道基因)用于偶联互补的寡聚核苷酸264。可选择的,在杂交之前使用如下技术除去没有掺入的引物,比如,尺寸排除色谱法,或者杂交后洗脱。

使用酶280,可将互补寡聚核苷酸264和捕获寡聚核苷酸252共价相连。适用的酶有连接酶。可选择的,如图5E所示,将靶寡聚核苷酸258从互补的寡聚核苷酸264变性,靶寡聚核苷酸和分析测试中的其它成分可被洗脱除去,从而留下固定在支持体256上的互补寡聚核苷酸分子264。然后检测报道基因266。

如图6所示的另一项分析测试中,靶寡聚核苷酸314形成发卡结构或颈环结构321,323(或典型的双螺旋结构以外的结构)。在这种方法中,第一和第二引物318,322的每一个分别包括部分标记序列312b或部分标记序列312a的互补序列。此外,其中的一个引物322有一报道基因316(或用于报道基因的偶联剂)结合于部分标记序列312b上。利用,例如PCR技术,用第一和第二引物318,322扩增被分析物320,制备靶寡聚核苷酸314和它的互补序列308。靶寡聚核苷酸314的标记序列312b,313a位于靶寡聚核苷酸的两端。

靶寡聚核苷酸314从它的互补序列308变性分离下来,与固相支持体306相接触,该支持体带有拥有分子识别序列304的捕获寡聚核苷酸302。如果捕获寡聚核苷酸其中之一的分子识别标记304与靶寡聚核苷酸314的标记序列312b,313a互补,靶寡聚核苷酸314将与捕获寡聚核苷酸相杂交。在一些实施方案中,捕获寡聚核苷酸分为两部分,每一部分互补于标记序列312b,313a的一部分。这两部分可以用接头连接。接头可以是附加核苷酸或任何其他化学连接部分。靶寡聚核苷酸314的靶序列构成颈环结构321,323(或其他不是双螺旋结构的结构)的至少一部分。可以按以上实施例讨论的实行检测。

另一种检测分析方案如图7所示,在图7A中,被分析物420与起始引物440,442接触,每一个引物都具有互补于被分析物420的序列。其中一个起始引物440还包含一偶联基团444(例如,生物素,或包含反应官能团的取代基),用于底物450相连接。如图7B所示,起始引物440,442例如利用PCR技术进行延伸。延伸的起始引物446,448分别包括被分析物特异序列或它的互补序列。

然后,延伸的起始引物446,448与底物450相接触,该底物与延伸的起始引物446的偶联基团444相互作用,进而将延伸了的起始引物446连接到底物450

上,如图7C所示。例如,底物可以被链霉抗生物素蛋白包被,延伸的起始引物包包生物素。

接着,第一和第二引物418,422与延伸的起始引物446,448相接触,如图7C所示。第一引物418有一个标记序列412,第二引物422有一个报告基因416(或用于报告基因的偶联剂)。两条引物也都包括与延伸的起始引物446,448一部分互补的序列。图7所示的检测同时表明其它的引物422a也可以被添加。这不是检测的一个必需的特性,但是被用来详细说明检测等位基因的分析测试的一个实施方案。等位基因特异引物的应用可以被用于这里所说明的其它任何检测。

在详细说明的分析检测中,引物422,422a是具有等位基因特异报道基因416,416a的等位基因特异引物。在详细说明的例子中,等位基因只是一个核苷酸的差异,但这可以理解为应用这些技术对其他的有一个以上核苷酸差异的等位基因特异也可检测。引物422被延伸是因为它与延伸的起始引物446的一段序列是互补的。引物422a因为它不与延伸的起始引物446互补而不能延伸。认识到另一项检测包括有几个不同等位基因特异引物,它们带有等位基因特异标记序列(与等位基因特异性报道基因相对)。还认识到另一种分析测试包括非等位基因引物,它们用于检测被分析样品中非等位基因被分析物特异性序列的存在与否。

引物418,422被延伸,形成带有标记序列412的靶寡聚核苷酸408和带有报道基因416(或一个报道基因的偶联剂)的互补寡聚核苷酸414。靶寡聚核苷酸408和互补寡聚核苷酸414从延伸的起始引物446,448变性,并和在固相支持体406(如芯片,晶片或粒子)上的捕获寡聚核苷酸402接触。靶寡聚核苷酸414和捕获寡聚核苷酸402杂交,捕获寡聚核苷酸402含有与标记序列412互补的分子识别序列404。通过观察与特定捕获寡聚核苷酸相连的报道基因是否存在,来确定样品中被分析物特异序列的存在与否。

在本分析测试的又一个实施例中,第一引物468和第二引物472与被分析物470接触并且延伸形成靶寡聚核苷酸458和其互补寡聚核苷酸464。在详述的例子中,第一和第二引物468,472都是等位基因特异性的,但是对不同的等位基因有特异性。除第一和第二引物468,472外,其它的第一和第二引物,469,473,如果在样品中存在的话将可以扩增其它等位基因。

第一引物468包含标记序列的第一部分462a，第二引物472包含标记序列的第二部分462b。462a和462b部分之一包含一报道基因466（或报道基因的偶联剂）。通常，标记序列的462a和462b部分将具有一定的形式而使引物468，472不通过标记序列进行延伸。例如，462a和462b部分可以包含一个非标准碱基，它作为一个碱基连接引物468，472可延伸部分和标记序列部分。在这个实施方案中，非标准碱基的互补碱基三磷酸核苷不包括在PCR扩增反应之中。作为选择，化学接头可被用来把标记序列部分偶联到引物的可延伸部分。合适的接头的例子包括，但不仅限于n-丙烷基，三亚乙基二醇，六亚乙基二醇，1', 2'双脱氧核糖，2'-O-甲基核糖核苷酸，脱氧异胞啶，或任何能够停止聚合酶的链。

在支持体456上提供了一个偶联的寡聚核苷酸452。偶联的寡聚核苷酸452包括453a，453b部分，他们与标记序列的462a和462b部分互补。这些453a，453b部分通过化学的或核苷酸的接头454偶联，454它可以与两个核酸序列的5'（或3'）端偶联。

靶寡聚核苷酸458和其互补寡聚核苷酸464与支持体456和捕获寡聚核苷酸452反应，标记序列的特异部分462a，462b与捕获寡聚核苷酸的相应部分453a，453b杂交。靶寡聚核苷酸458的剩余部分和互补寡聚核苷酸464典型地形成一个如图8所示的结构。

通过PCR技术加入非标准碱基的分析测定

尽管标记的天然核苷酸碱基具有许多用途，但与标记的天然核苷酸相关也有缺点。例如，很难作到一个标记的天然核苷酸碱基的定点掺入。通常，为了在一个含有腺嘌呤的寡核苷酸上标记一个位点，标记的腺苷三磷酸[(dATP*)]被作为一个底物加入反应混合物中，反应混合物中包含寡核苷酸模板[dGTP]，[dCTP]和[dTTP]，和聚合酶。如果反应混合物中所有的dATP被标记，在寡核苷酸序列上的所有腺嘌呤残基将被标记。如果反应混合物中dATP只有部分被标记，那么，在序列中随机位置的腺嘌呤残基被标记。从而标记寡核苷酸中一个单独的核苷酸残基是非常困难的。

可用标记的双脱氧核糖核酸来克服掺入多个标记的核苷酸残基相关的问题。因为双脱氧核糖核酸缺少3'羟基，这样寡核苷酸只能在末端部分引入标记了的双脱氧核糖核酸。可用跑序列梯来测寡核苷酸序列以确定标记核苷

酸的位置。因为寡核苷酸在引入双脱氧核糖核酸的位置终止，双脱氧核糖核酸通常不能和寡核苷酸链扩增结合使用。

图9显示了本发明的一类检测，包括通过PCR把非标准碱基掺入。第一和第二引物518，522与被分析物520杂交并且延伸。引物522之一包括一个非标准碱基550，当延伸时，变成靶寡核苷酸508。可选择的，非标准碱基550后还可以附加额外的碱基。靶寡核苷酸508带有非标准碱基550，其然后与固相支持体506a，506b接触，固相支持体506a，506b包含有捕获寡核苷酸502a，502b。在图9中显示的固相支持体是上面讨论过的微粒支持体，然而，认识到也能使用一个单独的固相支持体（如，一个芯片或晶片）。

捕获寡核苷酸502a，502b是不同的，并分别与不同的支持体506a，506b连接。因此捕获寡核苷酸能通过检测所相连的支持体独有特征而被识别。一个捕获寡核苷酸502a与靶寡核苷酸508杂交。此实施方案中，捕获寡核苷酸502a具有一个与靶寡核苷酸508的被分析物特异序列至少一部分互补的序列。

靶寡核苷酸508杂交之后，捕获寡核苷酸502a在包含有dATP,dUTP,dGTP,dCTP的PCR反应液中延伸，第二个非标准碱基核苷三磷酸（如，diso-GTP）552互补于靶寡核苷酸508上的非标准碱基550。第二个非标准碱基552被报告基因516（或报告基因的偶联剂）标记。随着捕获寡核苷酸被延伸，被报告基因516标记的第二个非标准碱基552被掺入到延伸的捕获寡核苷酸中，并与非标准碱基550的位置相对。这样，在特定支持颗粒上报道基因存在与否，表明了与捕获寡核苷酸偶联的特定靶寡核苷酸的存在与否。

图10所示为另一个分析。在此分析中，第一引物618包含一个标记序列612，第二引物622在它的5'端有一个非标准碱基（或一个包含非标准碱基的序列）621。引物618,622在dATP,dCTP,dGTP,dTTP存在条件下扩增被分析物620，非标准碱基核苷三磷酸互补于非标准碱基621。这种非标准碱基核苷三磷酸被一个报道基因616（或报道基因的偶联基团）标记，并被掺入到对应于非标准碱基621的位置，形成靶寡核苷酸608。

靶寡核苷酸608与固相支持体606相接触，固相支持体606带有捕获寡核苷酸602，而捕获寡核苷酸602含有分子识别序列。如果分子识别序列其中之一与靶寡核苷酸608的标记序列612互补，靶寡核苷酸608将与捕获寡核苷酸602杂交。检测将以前面实施例中讨论过的方法进行。

图11所示仍是另一个分析。在此分析中，第一引物718包含一个标记序列712，第二引物722在它的5'端有一个非标准碱基721跟随一个天然碱基（或是一天然碱基序列）723。引物718，722在dATP, dCTP, dGTP和dTTP存在的情况下扩增被分析物720，仅形成部分延伸的靶寡核苷酸707和它的互补物714。此部分延伸的靶寡核苷酸的延伸被非标准碱基721所限。在扩增起始之后，要对扩增产物707，714进行清洗以除去dATP, dCTP, dGTP和dTTP。

第二个延伸步骤接着在互补于非标准碱基721的非标准碱基三磷酸，和至少有互补于天然碱基723的天然碱基三磷酸存在的情况下进行。这个天然碱基三磷酸被报告基因716（或报道基因的偶联基团）所标记，并且被掺入到与天然碱基723相对的位置，形成靶寡核苷酸708。

靶寡核苷酸708与固相支持体706相接触，固相支持体706带有拥有分子识别序列的捕获寡核苷酸702。如果分子识别序列中的一个是与靶寡核苷酸708的标记序列712互补的，则靶寡核苷酸708将与捕获寡核苷酸702杂交。随后的检测根据上文实施例讨论过的进行。

在一个具体的例子中，等位基因特异第二引物和相同的第一引物共同使用。等位基因特异第二引物不同于在从被分析物上退火的第二引物的部分。对每个等位基因而言选择不同的天然碱基723。在延伸的第二个步骤中，在相对于非标准碱基721和天然碱基723处加上的碱基，两个或更多的天然碱基核苷三磷酸被加入到延伸混合物中。不同的核苷三磷酸被不同的报道基因标记。因此，如果天然碱基723可以是A或C，这依赖于等位基因，在延伸步骤中使用的[dTTP]和[dGTP]被用不同的报道基因标记。报道基因的鉴定可以判断一个特定相关的等位基因的存在。进而，例如四种不同的等位基因可以用这种方法同时检测出来，在适当的报道基因的选择下，可以利用四种不同颜色而显示。

其他分析

图16所示的一个分析中，制备两组或多组捕获寡核苷酸902。每组捕获寡核苷酸902包含一个独特的分子识别序列904。每组的这一分子识别序列任选地包含有至少一个或多个非标准碱基。典型的，捕获寡核苷酸也包含一个能附着于固相支持体906的反应官能团，像上面提到的，其他连接方式也可被利用。

在一个具体例子中，检测的支持体是微粒支持体（如珠子）。可以理解，这里描述的任何检测可以在一个单独的固体支持体上，在一个颗粒支持体上，

或者其他的任何支持体上进行。颗粒支持体被分为若干组颗粒，每组颗粒具有一个特性（如颜色，形状，大小，密度或其他的物理化学特性），这特性使它们各自区分开来。每组捕获寡核苷酸与一组或多组颗粒偶联。这造成了一组特定颗粒与一组特定捕获寡核苷酸的偶联，允许通过观察独特的颗粒支持体特性来鉴别捕获寡核苷酸。

在另一个实施方案中（未给出），分析的支持体可以是，例如，一个单独固相支持体，如玻璃，金属，塑料，或无机芯片。捕获寡核苷酸被排列于支持体上，并用上述方法中的一种（如经捕获寡核苷酸和支持体上的反应基团偶联并支持，用支持体上的结合剂，或捕获寡核苷酸交联）来固定。每一组排列于一个或多个的固相支持体的特定区域，以使区域能与特定的捕获寡核苷酸相结合。

回到图16，靶寡核苷酸908，如果在检测的样品中存在，与第一引物909和第二引物911接触。第一和第二引物909，911可以是等位基因特异性的，或优选的是，是不与靶寡核苷酸等位基因特异性部分互补的（如，感兴趣的等位基因特异性部分定位在靶寡核苷酸中与两个引物杂交之间的区域）。第二引物911也包括了非互补连接区905，这个非互补报道基因连接区905可选择的包括一个或多个非标准碱基。使用第一和第二引物909，911和PCR技术使靶寡核苷酸908被扩增，获得一个扩增产物907，它含有报道基因连接区905。

扩增产物907然后与等位基因特异性引物920a，920b接触后延伸，如果存在特定的等位基因，则用与PCR相近的反应条件和反应成分来产生等位基因特异延伸产物922。每个等位基因特异性引物920a，920b带有互补于不同的分子识别序列904和捕获寡核苷酸902的等位基因特异性标记序列。当等位基因特异引物920a，920b延伸时，互补于连接区905一个或多个碱基的标记了的核苷酸925（或寡核苷酸）就可以被产生。被标记的核苷酸925或寡核苷酸可以包括一个报道基因或偶联剂，如生物素，用于报道基因的附着。

延伸产物922形成以后，与捕获寡核苷酸902和报告基因930相反应（除非报道基因已经连上）。捕获寡核苷酸902和支持体906鉴别样品中存在哪个等位基因，报道基因提供了延伸产物922的可检测性。对于颗粒支持体的检测，颗粒可以根据独特特性而被分开，然后确定哪些微粒906上有报道基因通过捕获寡核苷酸902和延伸产物922连接到微粒上。实现分离的技术包括，例如，流式

细胞术。报告基因基团的存在表明样品中含有拥有特定等位基因特异性标记序列的等位基因。

分子识别序列的选择

当多个分子识别序列被使用时,就形成了能通过对单一样品进行扩增,检测多个被分析物特异性序列的分析系统。不同分子识别序列的集合是必要的。优选地,分子识别序列有足够的不同,以准许在希望的严谨度条件下,对被分析物特异序列进行可靠的检测。各种不同的方法可以被用于选择分子识别序列的集合。下面详细描述一些能用的方法和标准。这些方法和标准可以单独使用也可以联合使用。

下面的例子是可以用于创造分子识别序列的集合的标准:序列中的碱基数目,序列中的非标准碱基数目,序列中连贯的天然碱基的数目,在任何两个序列中相同连续碱基(不是正向就是逆向)的数目,特殊需要的序列(例如,在3'端或5'端或两端的GC夹)、估计的或实际的解链温度。一个测定 T_m 的方法的例子被Peyret等描述, *Biochemistry*, 38,3468-77 (1999),在这里一并引作参考。非标准碱基可以经过估计或计算而使用,例如,其他碱基的值(如, iso-G/iso-C可以通过用G/C来估计),或应用如下面提到的实验资料。

以下是可以用于建立分子识别序列集合的一系列步骤:

1) 用天然碱基和期望的非标准碱基(如或iso-C,或iso-G或两者)建立一个寡核苷酸的系列,该寡核苷酸的系列包括具有长度 n_1 (如8,9或10个核苷酸)的所有可能的寡核苷酸。

2) 任选地要求使寡核苷酸有一个特异的亚序列(如,位于3'或5'或两末端上的GC夹)。

3) 除去不带至少 n_2 个非标准碱基(如,不带至少两个iso-C碱基)或带有多于 n_3 个非标准碱基(如,带有多于两个iso-C碱基)或综合两者(如,仅接受恰恰带有两个iso-C碱基)的寡核苷酸。

4) 任选地在一组内除去带有 n_4 (如,4或5)个天然碱基的寡核苷酸。

5) 选择一个剩余寡聚核苷酸,除去其他任何的、在寡聚核苷酸序列上有相同序列 n_5 个碱基(如5或6个碱基)的剩余寡核苷酸。对每个未除去的寡聚核苷酸重复此操作。

6) 任选地选择一个剩余寡核苷酸并测它的反向互补序列(如,“ACT”的

反向互补为“AGT”),然后除去其他任何具有 n_6 个与反向互补序列部分相同的连续碱基(如,4或5碱基)的寡核苷酸。对于每个未除去的寡核苷酸都进行重复。

7)任选地只选择估计或实际解链温度(T_m)在期望温度范围内的,在期望温度下限以上,或在期望温度上限以下的剩余寡核苷酸。例如,具有的解链温度低于室温(大约22°C)的寡核苷酸可被除去。

实施例

实施例1

编码及标记序列的交叉杂交检测

这项分析中使用的仪器包括Luminex®100和Luminex®微珠,DNA合成仪(Northern Engineering公司),点测量合成领域的分光光度计、薄层层析柱(TLC)(SI250F TLC 硅胶板, JTBaker)、用于寡聚核苷酸定性控制、离心机、超声波仪(Ney Dental)、涡旋仪(Vortex)和各种移液器(2, 20, 200和1000 μ l)

一组至少100条寡核苷酸链(分子识别序列)及其互补序列(标记序列)被设计并合成。这两组寡聚核苷酸包含非标准核苷酸(isoC和isoG)(EraGen Biosciences, Inc., Madison, WI)和天然核苷酸(A, G, C和T)(Perkin-Elmer/ABI),长9至10bp。第一组被设计为分子识别序列的寡核苷酸链的5'端用一个氨基修饰物(C6-TFA, Glen Reasch)标记。另一组互补的寡聚核苷酸被设计为标记序列,并在5'端则被Cy3(Glen Reasch))标记。

将分子识别序列与特定的Luminex微珠相偶连使用下面的试剂: 0.1mM 2-[N-吗啉子]乙磺酸(MES) (pH4.5)(Sigma)

1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺盐酸(EDC)(Pierce), 0.02%(v/v) Tween (Sigma), 0.1%(W/v) SDS(Sigma)

杂交步骤包括杂交缓冲液: Sourav 0.5, 包含10mM Tris (Sigma), 1mM EDTA (Sigma), 200mM NaCl (Aldrich), 10mM MgCl₂ (Aldrich), 及1%(W/v) PEG8000 (Sigma)。

98条分子识别序列用MES稀释成1nmol/ μ l。制备98种特异性Luminex®微珠用来偶联。微珠在实验前要经超声波处理20秒再涡旋振荡10秒。从 1.25×10^7 珠/ml的微珠溶液中取出 5×10^7 的微珠,放入一个1.5mL的微量离心管中。微珠用10,000rcf

离心1分钟。将微珠倾析，小心不要搅动微珠，然后将微珠移入50 μ L MES中，进行超声波处理和涡旋振荡。为了将分子识别序列偶联到不同微珠上，每种独特微珠中加入1nmol各种分子识别序列，再向混合物加入1.75 μ l新配制的EDC（20mg EDC/1mL ddH₂O），进行超声波处理和涡旋振荡。接着将混合液在室温、黑暗放置30分钟，每10分钟涡旋振荡一次。三十分钟后，再加入1.75 μ l新配制的EDC。温育30分钟，每10分钟涡旋振荡一次。

偶联后,加入400 μ l Tween-20洗微珠，涡旋振荡，10,000rct/分钟离心，弃上清。再加入400 μ l SDS，离心，弃上清，最后加入100 μ l MES，然后计数。

互补的寡核苷酸（标记序列）用TLC和聚丙烯酰胺凝胶来定量和定性，并用MOPS稀释为终浓度为50fmol/ μ l的操作溶液。

计数之后，Luminex[®]微珠/分子识别序列被结合在一个98微珠板上（98 bead set）（1000微珠/微珠区/孔）来进行分析。在98微珠板的基础上，有一种50微珠板（2500微珠/微珠区/孔）已经问世。表1列举了50微珠板的分子识别序列，表2列举了98微珠板的分子识别序列。

在进行交叉杂交实验时，取50fmol的标记序列（1—>98）移入两块96孔板的孔中（第1和第2孔作为对照）。现在Luminex[®] 100的局限性在于，布置的资料组为98个标记序列，和2个作为对照（没有标记序列）以消除背景。

向每孔加入主混合液（98种混合），10 μ l/孔，再向每孔加入31 μ L 2 \times Sourav 0.5杂交缓冲液，并用双蒸水补足至62 μ l/孔总体积。混合好试剂并且在室温保温约10分钟。样品立即在Luminex[®]100的流式细胞仪上进行分析。

50微珠主混合液也对其相应的互补分子识别序列及标记序列施加，只是标记序列的用量为500fmol/孔。

下面的数据报告了两块微珠板上每微珠的荧光介质强度（Median Fluorescence Intensity，MFI）。图12显示了用98微珠主混合实验所得数据绘制的3D表面图。Y轴表示分子识别序列，X轴表示标记序列。图13显示了50微珠主混合实验所得数据绘制的3D表面图。

表1
50个珠子的分子识别序列 (Y=iso, X=iso-G)

珠子序号	分子识别序列	序列号	珠子序号	分子识别序列	序列号
1	GAXGTXTGTC	1	26	CXTCGCXTAC	26
2	CXGTTXTTCC	2	27	GXCXAAAAXG	27
3	GGXTTGXTAG	3	28	CXXGACXATC	28
4	CTTXGXTCTC	4	29	CCATXAGXCC	29
5	CXTCAXGAAC	5	30	GGCAXTXTGG	30
6	GTAGXTAXGC	6	31	CTXAACXGGG	31
7	GGAXGXTAAC	7	32	GGAXACGXG	32
8	CXGTATXGTG	8	33	GCGXTTAXG	33
9	CATXGGTAXG	9	34	GAGXAGXTXC	34
10	GATTXTCGXC	10	35	GXCTAAXCCG	35
11	GTTXAXGACC	11	36	GCXTGTXCAC	36
12	CXGAAXGATC	12	37	GXCAGAXTCG	37
13	CAAXTACGXC	13	38	CGTXCTAGXG	38
14	CGGXATAXAC	14	39	CGXXTAGTXG	39
15	GXAAAXXAGG	15	40	CXAGGXAACC	40
16	GTCXTAGXXC	16	41	CXAGAXGAXG	41
17	GXCCTXTAXC	17	42	CGXTGXGTC	42
18	CCXACXTGAG	18	43	CAGXCGTXAG	43
19	CTXXCAXAGG	19	44	GGCTXTGXAC	44
20	GTXGAXATGC	20	45	CCAGXGXAAG	45
21	GAAAXTGXXG	21	46	GGCXAATXGC	46
22	GCTGXAXATC	22	47	GXCTGCXGG	47
23	CGCAXATXAC	23	48	GAXCTXCGGC	48
24	CTGGXTCXAG	24	49	GTXCGAXGGG	49
25	GGAAXAXXCC	25	50	GGXXATCCXG	50

表2

98个珠子的分子识别序列 (Y=iso-C, X=iso-G)

珠子序号	分子识别序列	序列号	珠子序号	分子识别序列	序列号
1	GAXGTXTGTC	1	50	CCXXATGTXG	67
2	CXGTTXTTCC	2	51	GAGXAGXTXC	34
3	GGXTTGXTAG	3	52	GXCTAAXCCG	35
4	CTTXGXTCTC	4	53	GCXTGTXCAC	36
5	CXTCAXGAAC	5	54	GXCAGAXTCG	37
6	GXCTTCXATG	51	55	CGTXCTAGXG	38
7	GTAGXTAXGC	6	56	CGXXTAGTXG	39
8	GGAXGXTAAC	7	57	CXAGGXAACC	40
9	CXGTATXGTG	8	58	GXGGTTXXTC	68
10	CATXGGTAXG	9	59	CXAGAXGAXG	41
11	GATTXTCGXC	10	60	CGXTGXGTC	42
12	GTTXAXGACC	11	61	CAGXCGTXAG	43
13	CXTCTTXCC	52	62	GGCTXTGXAC	44
14	CXGAAXGATC	12	63	CXCCGXAATC	69
15	CAAXTACGXC	13	64	GXXACXACAC	70
16	CTCTXAXCCC	53	65	GCXCXGTXC	71
17	CTCXTGGTXC	54	66	GXCXGGAXC	72
18	CGGXATAxAC	14	67	CGAXAGCAXC	73
19	GXAAAXXAGG	15	68	CCCAXTCCXC	74
20	GTCXTAGXXC	16	69	GTXCCXXCAG	75
21	GXCCTXTAXC	17	70	CXCCTAXCGG	76
22	CCXACXTGAG	18	71	GXGTTGXCG	77
23	CTXXCAXAGG	19	72	CXAAGXAXCG	78
24	GXCAAAXCAC	55	73	GGAGXCXXTC	79
25	GTGXAXATGC	20	74	CXGXAXGTAC	80
26	GTTXGCXTTG	56	75	GXACGAXTXG	81
27	GAAAXTGXXG	21	76	GXGCTXCATG	82
28	GCTGXAXATC	22	77	GTGXAGAGXG	83
29	CXCXTXCAAC	57	78	GCCGXCXTC	84
30	CTXXACAXXC	58	79	CAAXCGXTCCG	85
31	CXACTCXACC	59	80	CACAXACXGC	86
32	GACXCAXXTG	60	81	CCAGXGXAAG	45
33	CGCAXATXAC	23	82	GGCXAATXGC	46
34	CTCXCTXACG	61	83	GXCTGCXGG	47
35	CTGGXTCXAG	24	84	GXTGGXXCG	87
36	GGAAXAXXCC	25	85	GCCXCCXGT	88
37	GTGGXCTXTC	62	86	CXAXGGTCXC	89
38	CXTGCTXAC	26	87	CCXXGXGTG	90
39	CAXXACCXAG	63	88	GGXACXCCAG	91
40	GXCXAAAAXG	27	89	GAXCTXCGGC	48
41	GTXCXAXACC	64	90	GCCTXCXGAC	92
42	CXXGACXATC	28	91	GTXCGAXGGG	49
43	CCATXAGXCC	29	92	CXTTXCGCXC	93
44	CACXXTGXTC	65	93	GGXXATCCXG	50
45	GGCAXTXTGG	30	94	CXCTAXGXXG	94
46	CTXAACXGGG	31	95	CXGCXAGXG	95
47	GXTCCXTXGTC	66	96	CXAGCXACGG	96
48	GGAXACGXG	32	97	GACAXGCXCC	97
49	GCGXTTAXG	33	98	GGGXCGXXA	98

实施例2

初步确定非标准碱基在预测核酸双螺旋稳定性参数中的作用

本实验使用带有温控系统和样品架的beckman DU-7500分光仪。精确的控温系统可以同时测量六个样品的温度。石英杯选用美国Hellma产品,为了覆盖样品浓度的一百倍的范围,其光程长度分别为0.1cm, 0.2cm, 0.5cm,和1.0cm。DNA在Perkin-Elmer/ABI公司的392型DNA合成仪上合成。TLC层析用盛液槽(Fisher), TLC平板(Si250F, JTBaker)。使用Sanvant SpeedVac制备DNA,还使用了Sep-pak C-18纯化柱(Waters),紫外灯,涡旋振荡器,100cc针筒,及微量取液器若干(2, 20, 200, 1000 μ l)。

寡核苷酸的合成使用了天然核苷酸(A, G, C和T)(Perkin-Elmer/ABI)和isoC和isoG(EraGen Biosciences, Inc., Madison, WI)。表3和表4列举了人工合成的自身互补序列和非自身互补的序列。

表3 自身互补序列(isoG=X, isoC=Y)

3A	GGA CGT CC	对照
3B	GGA YXT CC	串联的isoC-isoG效应
3C	GXA YXT YC	isoC-isoG在倒数第二位
3D	GGA GCT CC	对照
3E	GGA XYT CC	交换串联的isoC-isoG效应

表4 非自身互补的序列(isoG=X, isoC=Y)

4A	SEQ ID NO:99	5' GCC AGT TTA A3' 3' CGGTCAAATT5'	对照
4B	SEQ ID NO:100	5' GCC AXT TTA A3' 3' CGG TYA AAT T5'	单isoC-isoG位于AT,TA间
4C	SEQ ID NO:101	5' GCX AGT TTA A3' 3' CGY TCA AAT T5'	单 isoC-isoG 混合于 GC,AT间
4D	SEQ ID NO:102	5' GYC AGT TTA A3' 3' CXG TCA AATT5'	单 isoC-isoG 混合于 GC,CG间
4E	SEQ ID NO:103	5' GYY AGT TTA A3' 3' CXX TCA AAT T5'	isoC-isoG最后串联替代

寡聚核苷酸纯化和解链实验中使用以下试剂：用n-丙醇/氨/水(体积比55:35:10) (参考以下文献Chou, S.-H., Flynn, P., 和 Reid, B. (1989) 《生物化学》(Biochemistry) 28, 2422-2435,)对 TLC洗脱5-6小时, 以纯化TLC。杂交实验在1×SL 脱气缓冲液中进行(1.0M NaCl (Fisher), 10mM 二甲胂酸钠 (Fisher), 0.5mM Na₂EDTA, pH7) (参考文献SantaLucia, J., Allawi, H., 和 Seneviratne, P. A., (1996) 《生物化学》(Biochemistry) 35,3555-3562, 这里引作参考)。

使用Meltwin™ v3.0, 热动力学参数通过解链曲线的数据确定, 如Petersheim, M., 和Turner, D. H. (1983) 《生物化学》(Biochemistry) 22,253-263所述, 这里引作参考。

合成后, 寡核苷酸链置于氨水中, 50℃过夜, 再经冻干, 将每个样品用175 μl 双蒸水溶解, 经TLC纯化, 洗脱5—6小时。洗脱越剧烈, 移动带会越少, 越不容易弄花平板。洗脱要用3ml双蒸水进行三次。使用Sep-pak™柱对寡核苷酸进行进一步除盐和纯化, 用30%乙腈, 10mM 碳酸氢铵, pH7(SantaLucia, J., Allawi, H., 和 Seneviratne, P. A., (1996) 《生物化学》(Biochemistry) 35,3555-3562)进行洗脱, 最后用SpeedVac™干燥。

自身互补的寡核苷酸被定量, 收集及OD₂₆₀为2.0的, 然后用SpeedVac™再干燥。寡核苷酸用1×SL 缓冲液进行梯度稀释以形成一百倍的稀释浓度范围。通过Beckman DU-7500分光光度计测量光吸收与温度的分布图, 过程中还需要多种常规微比色杯, 样品架及温控装置。表5和表6列举了一组样品稀释梯度, 其稀释梯度是根据表3和表4的各样品制备的。

表5：梯度A

样品	体积 (μL)	加入量 (μL)	放入比色杯的量 (μL)
A1	0.0	94.5	34.5
A2	57.5	40.2	34.5
A3	63.2	44.3	34.5
A4	73.0	51.2	69.0
A5	55.2	38.5	69.0

测量完A1—A5样品后，第二组稀释溶液被设置。B组中，在上一次样品中剩余的24.71 μ l被在A-3, A-4 和A-5比色杯中与稀释物加在一起(总共约 172.5 μ l)合并,再加入345 μ l SL 缓冲液。

表6: 梯度B

样品	体积 (μ L)	加入量 (μ L)	放入比色杯的量 (μ L)
B1	542.2	0.0	172.5
B2	369.8	230.0	172.5
B3	427.2	270.0	345.0
B4	352.5	224.0	345.0
B5	231.5	132.2	345.0

装入液体后，每个比色杯 (cuvette) 容积上部分要留出约4%的空间以保证解链过程中样品的散热。

在每次操作中，样品都要进一步脱气，然后提高温度到85 $^{\circ}$ C退火5分钟，接着降温到到10 $^{\circ}$ C保温5分钟以上。在低温条件下，取干燥氩作为空白对照以限制浓缩。A、B两组同时测量OD₂₆₀和OD₂₈₀。当温度从10 $^{\circ}$ C提升到90 $^{\circ}$ C时，样品以1.0 $^{\circ}$ C/min的恒定速度升温。

收集解链实验的数据并用MeltwinTM软件做ln(G)与Tm⁻¹的最适曲线分析，其中G是总的链的浓度，Tm⁻¹是解链温度的倒数 (Borer, P. N., Dengler, B., Tinoco, I. Jr., 和Uhlenbeck, O. C. (1974) 《分子生物学学报》(J. Mol. Biol) 86,843-853, 在此引入做为参考)。

非自身互补寡核苷酸以相同的摩尔量合并，OD₂₆₀为2.0 260nm下的光密度，并以和表5和表6中自身互补寡核苷酸稀释梯度相同的方式稀释。同样的，非自身互被寡核苷酸的解链数据由MeltwinTM收集并分析。

表7和表8总结了由MeltwinTM得到的自身互补寡核苷酸和非自身互补寡核苷酸的热动力学参数。

表7 自身互补寡核苷酸序列的热力学参数(isoC=Y,isoG=X)

		$-\Delta G_{37}$ (kcal/mol)	$-\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta S$ (cal/K·mol)	$T_M(^{\circ}C)$ 1.0e-4M
1A	GGA CGT CC	8.27	53.5	145.9	52.8
1B	GGA YXT CC	9.41	57.62	155.4	58.5
1C	GXA CGT YC	10.89	66.27	178.6	63.5
1D	GGA GCT CC	8.10	51.04	138.5	52.4
1E	GGA XYT CC	9.70	57.77	155.0	60.2

表8非自身互补寡核苷酸序列的热力学参数(isoC=Y,isoG=X)

			$-\Delta G_{37}$ (kcal/mol)	$-\Delta H$ (kcal/mol)	$-\Delta S$ (cal/K·mol)	$T_M(^{\circ}C)$ 1.0e-4M
4A	SEQ ID NO:99	5' GCC AGT TTA A 3' 3' CGG TCA AAT T 5'	8.43	69.22	196.0	45.8
4B	SEQ ID NO:100	5' GCC AXT TTA A 3' 3' CGG TYA AAT T 5'	9.56	56.66	151.9	54.5
4C	SEQ ID NO:101	5' GCY AGT TTA A 3' 3' CGX TCA AAT T 5'	9.36	62.98	172.9	51.6
4D	SEQ ID NO:102	5' GYC AGT TTA A 3' 3' CXG TCA AAT T 5'	9.62	54.30	144.1	55.7
4E	SEQ ID NO:103	5' GYY AGT TTA A 3' 3' CXX TCA AAT T 5'	10.59	70.19	192.2	56.0

所有的样品都具有浓度依赖性 T_M 并发生单相解链转换。isoC和isoG使得双螺旋形式比较稳定，每个isoC/isoG对使解链温度要比天然（A、T、G、C）的Watson—Crick 寡核苷酸高5 $^{\circ}C$ 样品3B和4C至10 $^{\circ}C$ （样品3C和4E）。

表7和8 显示了当AEGIS碱基混入天然DNA时所发生的一些最临近效应的程度。

实施例3及其对比实施例

位点控制性掺入

第一引物5'AGAACCCTTTCCTCTTCC（SEQ ID NO: 104）靶序列5'AAGAACCCTTTCCTCTTCCGATGCAGGATACTTAACAATAAATATTT（SEQ ID NO: 105）

第二引物 CTACGTCCTATGAATTGTTATTTATAAAYAGGACAGACG5'（SEQ ID NO: 106）

Y=isoCTP

第一引物及其靶序列以及第二引物分别为SEQ ID NO : 104, SEQ ID NO : 105, 和SEQ ID NO : 106所示。

用如下混合液进行PCR实验: 20 μ l反应体积中加入0.2 μ M第一引物, 0.2 μ M第二引物, 50fM 靶序列, dGTP, dATP, dTTP和dCTP, 各50 μ M, 10mM Tris pH8, 0.1%BSA, 0.1%Triton X-100, 0.1 μ g/ μ l降解的鲑鱼精DNA, 40 mM KAc, 2mM MgCl₂, 1U Amplitaq Stoffel (Perkin Elmer Biosciences, Foster City, CA)。混合液在95 $^{\circ}$ C先保温2分钟, 循环在95 $^{\circ}$ C1秒和58 $^{\circ}$ C10秒, 设置30个PCR循环。最终在58 $^{\circ}$ C保温2分钟。

制备两种PCR反应混合液。每种PCR混合液都要用AutoseqTM microspin column (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)进行脱盐以除去未结合的dNTPs, 在将样品脱盐之前用柱缓冲液与ddH₂O交换。脱盐后的样品用下面的反应组分来调节至终浓度: 在25 μ l反应体积中加入10mM Tris pH8, 0.1%BSA, 0.1%Triton X100, 0.1 μ g/ μ l降解的鲑鱼精DNA, 40mM KAc, 2mM MgCl₂, 1U/反应 Amplitaq Stoffel (Perkin Elmer Biosciences, Foster City, CA), 和10 μ M Cy3-dTTP (NEN life science Products, Inc., Boston, MA)。此外, disoGTP按如下浓度添加: 0 μ M (对照例) 或40 μ M (实施例3)。反应混合液在68 $^{\circ}$ C保温15分钟, 取5 μ l产物用10%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。凝胶用595荧光成像仪 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 检测含有Cy3的延伸产物。

结果显示 (未给出资料), 当没有disoGTP时, 第一引物在最终的PCR反应中不会引发额外的延伸 (即, 相对于引物2的iso-C, 没有或很少有碱基错配)。

实施例4

标记的5'-三磷酸脱氧iso鸟嘌呤核苷酸的合成

下面的化学反应中,三丁铵焦磷酸从Sigma公司购买,生物素N-羟基丁二酰亚胺酯, 从Pierce化学公司购买; 所有其它化学药品都购自Aldrich化学公司或者Fisher化学公司, 并且没有经过进一步的纯化就进行使用。溶剂通过4 \AA 分子筛进行干燥。反应在烘箱干烤过的玻璃器皿中, 在干燥的氩中进行。用硅胶进行柱层析 (230-425目)。

缩写:

Ac ₂ O	醋酸酐
DMF	N, N-二甲基甲酰胺
DMAP	4, 4-二甲氨基吡啶
DMT	4, 4-二甲氧三苯甲基
Et ₃ N	三乙胺
MeCN	乙腈
MeOH	甲醇
Tol	对-甲苯甲酰

1-(p,p' -二甲氧三苯甲基)- 己二胺(2)

己二胺(10当量, 375mmol, 43.5g)从吡啶中被共蒸馏两次, 并溶解在100毫升的吡啶中。加进DMAP (0.1当量, 3.75mmol, 457mg), 将反应烧瓶冰浴。溶解在100毫升吡啶中的4, 4-二甲氧三苯甲基-氯 (1当量, 37.5mmol, 12.69g) 被逐滴加进去, 耗时2个小时以上。室温, 搅动4个小时, 加进MeOH(5ml), 反应混合液进行浓缩, 剩余的残余物用碳酸氢钠水溶液/乙酸乙酯萃取。有机层用碳酸氢钠水溶液洗2遍, 干燥, 溶剂被蒸发。得到的产物不进一步纯化, 在下一步中使用。

产量: 14.895g (35.634mmol, 95%) 粘稠油状物。

2-氯-6- (6-p,p' -二甲氧三苯甲基氨基己基) -氨基嘌呤-2' -脱氧-3', 5' -二甲苯甲酰核苷 (3)

化合物2(1.3当量, 31.916mmol, 13.34g) 与DMF共蒸发并溶于100ml DMF。加入溶于100ml DMF的二异丙基乙胺 (3.9当量, 95.748mmol, 16.65ml) 和化合物1 (1当量, 24.551mmol, 13.282g), 室温搅拌3小时。之后进行浓缩, 剩余物用碳酸氢钠水溶液/乙酸乙酯萃取, 有机层干燥, 蒸发溶剂。残余物用乙醚研磨两次, 得到的固体物不经进一步纯化, 真空干燥后进一步使用。

2-苄氧基-6- (6-p,p' -二甲氧三苯甲基氨基己基) -氨基嘌呤-2' -脱氧核糖核苷 (4)

化合物3 (1当量, 19.23mmol, 17.74g) 溶于DMF(25ml) 并加给NaH (10当量, 192.3mmol, 7.69g, 在矿物油中60%的分散物) 的一种苯甲醇溶液 (128ml)。反应混合物120 °C加热6小时, 然后在滤过C矿之前于室温搅拌15小时, 蒸

发滤出物，剩余物用乙酸乙酯/水萃取，有机层用NaHCO₃溶液清洗，干燥，蒸发溶剂，剩余物用乙醚/正己烷（1：10）研磨5次。

TLC:CHCl₃/10%MeOH R_F=0.26

产量：10.280g (13.562mmol,70.5%用于2步) 泡沫。

2-苄氧基-6-(6-p,p'-二甲氧三苯甲基氨基己基)-氨基嘌呤-2'-脱氧-5'-O-p, p'-二甲氧三苯甲基核苷 (5)

化合物4 (14.7388mmol,11.172g) 用吡啶共蒸发，溶于150ml吡啶，加DMAP (0.25当量，3.6847mmol，450mg)。烧瓶放在冰浴上，在2小时中缓慢加DMTCl(1.5当量，22.108mmol，7.484g)。室温搅拌22小时，加MeOH(1ml)，浓缩反应混合物，剩余物用氯仿/NaHCO₃水溶液萃取。有机层进行干燥，蒸发溶剂，剩余物用乙醚/正己烷 1：1研磨以去除多余的DMT，不溶性固状物进行干燥，不另外纯化即可进一步使用。

产量：14.890g(14.047mmol,95%)浅棕色泡沫。

2-苄氧基-6-(6-p,p'-二甲氧三苯甲基氨基己基)-氨基嘌呤-3'-O-乙酰基-2'-脱氧-5'-O-p, p'-二甲氧三苯甲基核苷 (6)

化合物5 (14.047mmol,14.89g) 用吡啶共蒸发，溶于200ml吡啶，加DMAP(0.25当量，3.5117mmol，428mg),Et₃N(5当量，70.235mmol，9.7ml)和Ac₂O(2.5当量，35.1175mmol，3.582g)。室温搅拌4.5小时，加MeOH(2ml)，浓缩反应混合物，剩余物用乙酸乙酯/NaHCO₃水溶液萃取。有机层进行干燥，蒸发溶剂，剩余物用层析柱纯化,采用一步梯度，先乙酸乙酯/正己烷/ Et₃N 30:60:1，然后是65：35：3。
产量：5.93g(5.385mmol,38%),黄色泡沫。

2-苄氧基-6-(6-氨基己基)-氨基嘌呤-3'-O-乙酰基-2'-脱氧核苷-(7)

化合物6 (2.471mmol,2.723g) 溶于50ml乙腈/2ml水，加Ce(NH₄)₂(NO₃)₃ (0.3当量，0.74mmol，406mg)。回流加热45分钟，然后再加0.15当量Ce(NH₄)₂(NO₃)₃ (0.37mmol，205mg)，继续回流加热1小时。然后蒸发，剩余物用乙醚研磨去除DMT，不溶物进行干燥，不另外纯化备用。

2-苄氧基-6-(6-三氟乙酰氨基己基)-氨基嘌呤-3'-O-乙酰基-2'-脱氧核苷-(8)

上面所得化合物7（最多5.385mmol）溶于30ml MeOH/50 ml 三氟醋酸乙酯/5ml Et₃N 中，反应混合物于室温搅拌21.5小时。TLC(氯仿

/17.5%MeOH): $R_f=0.72$)显示完全转化。然后进行蒸发, 剩余物用盐水/乙酸乙酯萃取, 有机层干燥, 蒸发溶剂, 剩余物通过硅胶层析柱纯化, 采用一步梯度, 先是氯仿/1.5%MeOH, 然后是17.5%MeOH。产量: 2.80g(4.714mmol, 87%) 泡沫。

2-苄氧基-6-(6-三氟乙酰氨基己基)-氨基嘌呤-3'-O-乙酰基-5'-三磷酰基-2'-脱氧核苷(9)。

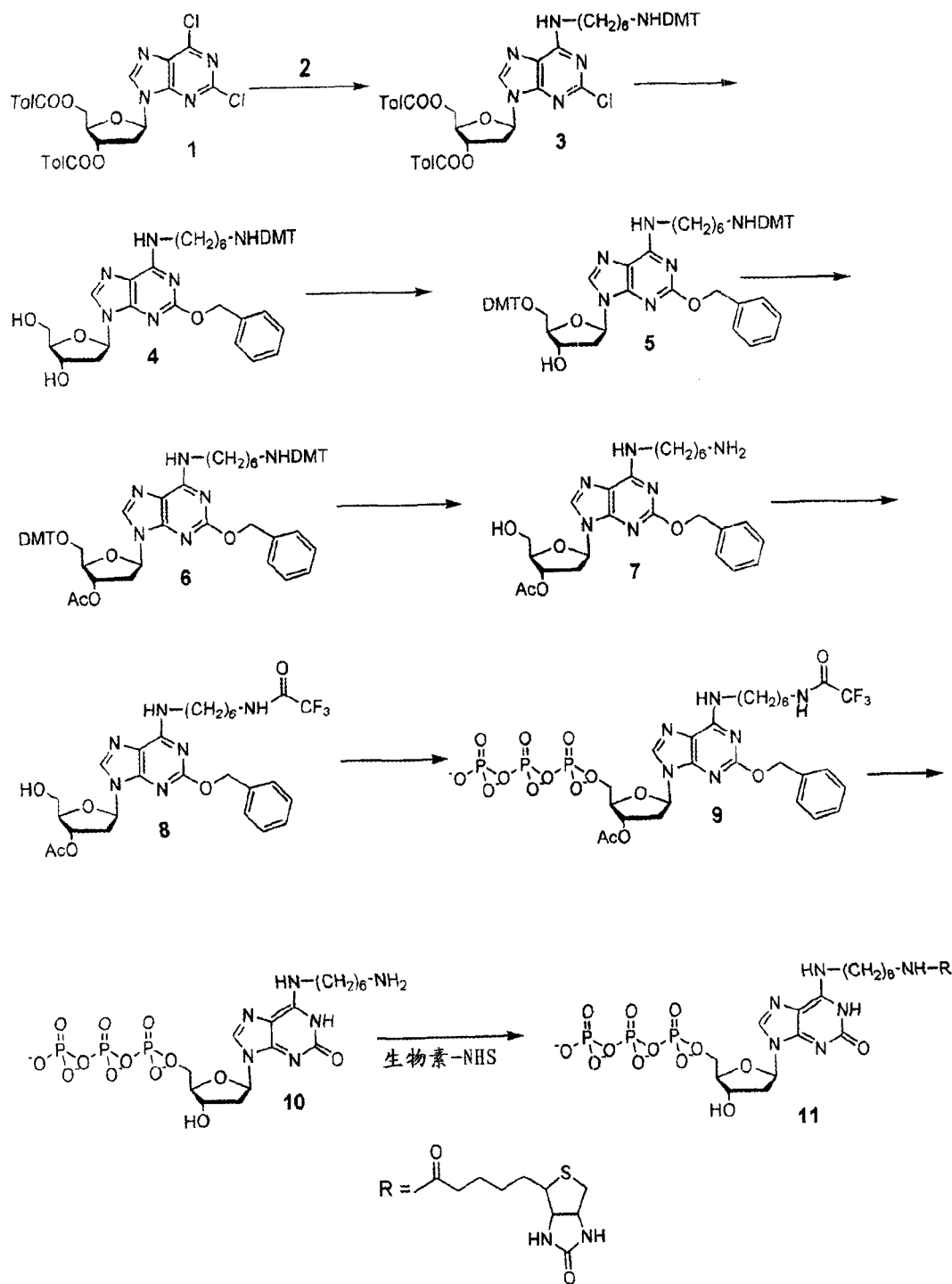
咪唑(61当量, 306mg, 4.5mmol, 重结晶)溶于乙腈(3.6ml)并冷却至0℃。加入POCl₃(19当量, 0.128ml)和三乙胺(61当量, 0.633ml), 于0℃搅拌0.5小时, 然后加一部分(0.309ml)给化合物8(1当量, 0.074mmol, 44mg)。此混合物室温下搅拌0.5小时, 然后加含有三丁基铵焦磷酸盐(2当量, 0.16mmol, 73mg)的DMF(1.5ml)。24小时后用2ml 10% NH₄CO₃终止反应并低压冻干。产物通过阴离子交换层析(Dionex ProPac SAX-10), 使用20%MeCN和一个(NH₄)₂CO₃/20% MeCN梯度而纯化。收集到的产物反复低压冻干以除去多余盐分。产量: 0.007mmol(10%), 白色固体。

6-(6-氨基己基)-氨基嘌呤-5'-三磷酰基-2'-脱氧核苷(10)。

化合物9(0.007mmol)溶于甲醇(2.5ml)然后加Pd/C(10%, 5mg)和NH₄CO₃(0.05mmol, 31mg)。悬浮液回流加热1小时, 然后滤掉催化剂并蒸发溶剂。剩余物用28%氢氧化铵(1.5ml, 3小时, 室温)处理, 然后干燥反应物, 产物通过阴离子交换层析(Dionex ProPac SAX-10), 使用20%MeCN和一个(NH₄)₂CO₃/20% MeCN梯度纯化。收集到的产物反复低压冻干以除去多余盐分。产量: 0.0063mmol(90%), 白色固体。

6-(6-生物素基酰氨基己基)-氨基嘌呤-5'-三磷酰基-2'-脱氧核苷(11)。

硼酸钠(10.5 μl, 1M, pH8.5)加入溶于40 μl水的化合物10(0.88 μmol, 三乙铵盐), 然后加入含有生物素N-羟基丁二酰亚胺酯(2.6 μmol, 3当量)的DMF(216 μl)。反应55℃进行3小时, 然后用20%MeCN稀释, 产物使用水和一个NH₄HCO₃溶液梯度, 通过阴离子交换层析(Dionex ProPac SAX-10)纯化。产率约70%。



实施例5

掺入标记碱基和在固相支持微球上进行捕获在基因组DNA多元化基因型测定中的应用

9个多态性座位上的基因型通过以下步骤确定：扩增，查询和捕获来自基因组DNA样品中的靶核酸序列。第一步是一个多重PCR反应，包括一组多样化的PCR引物对。每对PCR引物包括一个第一引物A和一个第二引物B，他们被设计成能与小鼠基因组DNA中包含一个已知多态性位点的区域杂交，并能扩增这段区域。第二步是一个多重的等位基因特异引物延伸（ASPE）反应，包括多组已标记的等位基因特异引物。每个标记的等位基因特异引物包括一个含有非标准核苷酸（iso-G）的5'标记序列，后面是一C3间隔区（n-丙二醇），再后面是一段3'序列，3'序列被设计成能与来自前面多重PCR步骤扩增的DNA链中的其中一条链杂交。通过每条标记等位基因特异引物的3'核苷酸来确定等位基因特异性。多组标记等位基因特异引物被设计，以用于查询已知的包含在多重PCR扩增序列中的多态性位点。标记的三磷酸（dATP-生物素）被加入ASPE反应物中，从而标记等位基因特异性引物的等位基因特异性延伸导致了dATP-生物素的掺入。未掺入的dATP-生物素在随后的捕获步骤之前被去除。

第三步，即多重ASPE反应产物的捕获，使用了包含有与特定Luminescence™微珠共价结合的非标准核苷酸（iso-C）的捕获序列。捕获序列与前面ASPE反应使用的标记等位基因特异性引物上的标记序列互补。加入藻红素(Phycoerythrin)是为了在标记等位基因特异引物链的延伸物上结合生物素标记，从而提供一种荧光信号。在捕获序列和标记序列杂交后，微珠被注入Luminescence 100™装置，以检测与每组特定微珠身份相关的信号。

小鼠基因组的9个多态性区域在本实施例中作为靶：

靶物	SEQ ID NO:	序列	A/J	C57BL6/J
2	104	AGAAACAACCATCTAATCCCACACTAAAAT TCAAGGCTCCACAGACGAAACAGTGAAGAA TAATTGTTTCAGCATACTAACCAACTGATTA CATATTTACCATACTCAGGTTTGTGCTTCA TACAAACCCAC/TAGTCCGGCGCTCCCTGTTA GATG	CC	TT
3	105	CTTCTCCCATTGCCAGGGCACTCTCCTCT GTAGAA/GTAGACTGATC/TTTTGTGGAGACATC A	GG	AA
4	106	AGTGCCTGCTACCTGTCAGGTGAAAATTTTC TTAGTGATCCC/TAAGCTCAATGGGTGCGYGGC TTGCAGG	CC	TT
5	107	GGTTGGAATGTTTGCACATGCAGTGTTAGT TATTTGGGC/TGATAACTACTTAGCTTATCTA GCCTGGTCCAGC	TT	CC
6	108	CTGATCTGACCTCAGACTGTTGTGCTAACA GATATAACACCAGTAAGTTGAC/GTCAAATAC TGCAGGAAGTAGAGCCTTGC	GG	CC
7	109	GACTGCTGGAGAGCTGAGGGAGGCTGTGGA GAATAAGGAGAGAGCA/GTAGTCTCGTGCCCT GCCCTGCCATACTGAGCAGCCAAGACAC	GG	AA
8	110	GGACTGTCCAAAKGGATCTCAAGGAGAATA GTCCTTGCTATTAA/GGAGTATAAAGGCATAA AAGAGGTCATAGGGGACAACCATGACCAAG AAGTTG	AA	GG
9	111	CCTTCCTGCAYTCCACAGTATAAACACAGA ATGCACACTGCA/GGTCGTTGTATTTGTGTTC GATGTGAATTAAAGATGCTTTGGCTAAGCC AGGAGATGATAAATACTG	AA	GG
10	112	CACATACACCATGTCAGCCATCAGCGCAA GCCTTCGAGTTTCAGCTGTGAGATGAAGGC TTGGAGAAGCACGTTGATCTGCAAAGAAGC AAAGGAGCTAGCGGAGGCC/TGGTCACTGACC GACTGCTCA	CC	TT

在这个例子中，下面的核酸用于多重PCR步骤：

核酸成分	序列	SEQ ID NO
PCR引物1A	5'-CATCTAACAGGGAGCGCC-3'	113
PCR引物1B	5'-6FAM-AGAAACAACCATCTAATCCCACA-3'	114
PCR引物2A	5'-6FAM-CTTCTCCCATGCCCAGG-3'	115
PCR引物2B	5'-TGATGTCTCCACAAAGATCAGTC-3'	116
PCR引物3A	5'-AGTGCCTGCTACCTGTCAG-3'	117
PCR引物3B	5'-6FAM-CCTGCAAGCCAGCACC-3'	118
PCR引物4A	5'-6FAM-GGTTGGAATGTTGCACATGC-3'	119
PCR引物4B	5'-GCTGGACCAGGCTAGATAAGC-3'	120
PCR引物5A	5'-6FAM-CTGATCTGACCTCAGACTGTTG-3'	121
PCR引物5B	5'-GCAAGGCTCTACTTCCTGC-3'	122
PCR引物6A	5'-6FAM-GACTGCTGGAGAGCTGAGG-3'	123
PCR引物6B	5'-GTGTCTTGGCTGCTCAGTATG-3'	124
PCR引物7A	5'-6FAM-GGACTGTCCAAAGGGATCTC-3'	125
PCR引物7B	5'-CAACTTCTTGGTCATGGTTGTC-3'	126
PCR引物8A	5'-Cy3-CCTTCCTGCAYTCCACAG-5'	127
PCR引物8B	5'-6FAM-CAGTATTATCATCTCCTGGCTTAGC-3'	128
PCR引物9A	5'-6FAM-CACATACACCATGTCAGCC-3'	129
PCR引物9B	5'-TGAGCAGTCGGTCAGTG-3'	130
模板1	小鼠基因组 DNA; 株: A/J	
模板2	小鼠基因组 DNA; 株: C57BL6/J	

PCR引物被合成并稀释于1 mM MOPS pH 7.5, 0.1 mM EDTA溶液中。某些PCR引物加入6 FAM或者Cy 3 荧光标记, 使得在聚丙烯酰胺凝胶上的多重PCR反应的检测具有可能。

小鼠基因组DNA样品购自Jackson实验室(Bar Harbor, ME)。所有基因组DNA样品均用1mM MOPS pH7.5, 0.1mM EDTA溶液稀释为5ng/ μ l。PCR反应成分如下:

组分	1 \times 浓度	供应者和产地
10 X PCR Buffer II	1.2 X	Applied Biosystems, Foster City, CA
MgCl ₂	2mM	Sigma, St. Louis, MO
dATP	200 μ M	Amersham
dGTP	200 μ M	Amersham
dCTP	200 μ M	Amersham
dTTP	200 μ M	Amersham
Amplitaq TM Gold DNA 聚合酶	0.1 U/ μ l	Applied Biosystems, Foster City, CA
PCR 引物(每个)	0.1 μ M	

所有列出组分的母混合液制备为25 μ l 终反应体积的1.09X浓度。23 μ l 母混合液与2 μ l 基因组DNA模板 (5ng/ μ l) 混合于单个的PCR管中。负对照用

水代替基因组DNA模板。PCR反应循环如下：

循环#	步骤	温度	时间
1	1	95°C	9分钟
2-41	1	95°C	5秒
	2	55°C	30秒
	3	62°C	30秒
42	1	62°C	5分钟
43	1	4°C	保持

PCR循环过后，各取2 μl PCR反应物作为模板转移到多重ASPE反应进行反应。下面合成的核酸被用作多重ASPE反应中的标记等位基因特异(TAS)引物：

核酸成分	序列	SEQ ID NO
TAS引物1	5'-GTGYACAYGC-c3-GCTTCATACAAACCCAC-3'	131
TAS引物2	5'-CGAYTCTGYC-c3-GCTTCATACAAACCCAT-3'	132
TAS引物3	5'-CTAYCAAYCC-c3-CACTCTCCTCTGTAGAA-3'	133
TAS引物4	5'-GAGAYCYAAG-c3-CACTCTCCTCTGTAGAG-3'	134
TAS引物5	5'-GTTTCYTAYG-c3-GAAAATTTCTTAGTGATCCT-3'	135
TAS引物6	5'-GCTAYCTAC-c3-AAAATTTCTTAGTGATCCC-3'	136
TAS引物7	5'-GTTAYCYTCC-c3-AGTGTTAGTTATTTGGGT-3'	137
TAS引物8	5'-CACYATACYG-c3-GTGTTAGTTATTTGGGC-3'	138
TAS引物9	5'-CYTACCYATG-c3-TAACACCAGTAAGTTGAC-3'	139
TAS引物10	5'-GYCGAYAATC-c3-TAACACCAGTAAGTTGAG-3'	140
TAS引物11	5'-GYCGTAYTTG-c3-AGAATAAGGAGAGAGCA-3'	141
TAS引物12	5'-GTYTATYCCG-c3-GAATAAGGAGAGAGCG-3'	142
TAS引物13	5'-GACAYACYTC-C3-AGAATAGTCCTTGCTATTAA-3'	143
TAS引物14	5'-GGAAYAACYG-C3-AGAATAGTCCTTGCTATTAG-3'	144
TAS引物15	5'-GATYTYCAGC-c3-AGAATGCACACTGCA-3'	145
TAS引物16	5'-GTYATYTGCG-c3-GAATGCACACTGCG-3'	146
TAS引物17	5'-GATYGTCYYG-c3-GCTAGCGGAGGCC-3'	147
TAS引物18	5'-GGYCTYATGG-c3-GCTAGCGGAGGCT-3'	148

ASPE反应的成分是:

组分	1×浓度	供应者和产地
Bis-Tris- 丙烷 pH 8.9	10 mM	Sigma, St. Louis, MO
乙酸钾	40 mM	Sigma, St. Louis, MO
MgCl ₂	2 mM	Sigma, St. Louis, MO
生物素-11-dATP	4 μM	NEN, Boston, MA
dGTP	200 μM	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ
dCTP	200 μM	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ
dTTP	200 μM	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ
Amplitaq™ Gold DNA聚合酶	0.067 U/μl	Applied Biosystems, Foster City, CA
PCR 引物(每个)	0.067 μM	EraGen Biosciences, Inc., Madison, WI

一种包含以上除TAS引物以外所有组分的母混合液被配成1.36X。每个ASPE反应包括11 μl 母混合液, 2 μl 多重TAS引物混合物(各0.5 μM), 2 μl PCR反应物(来自前面步骤)。ASPE反应循环如下:

循环#	步骤	温度	时间
1	1	95°C	12分钟
2-5	1	95°C	3秒
	2	48°C	15秒
	慢速扫描	每分钟30次	
	3	62°C	30秒
6	1	4°C	持续

ASPE循环后, 10 μl 反应物体积与5 μl 包含40mM Tris, 40mM EDTA的溶液混合以终止聚合酶的活性。反应物用G-50柱纯化去除未结合的dATP-生物素。然后纯化的多重ASPE反应液通过偶联Luminox™微珠(Luminox公司, 休斯敦, 德克萨斯州)的捕获序列解旋。偶联的微珠是:

微珠身份	SEQ ID NO:	捕获序列
1	2	CXGTTXTTCC
2	9	CATXGGTAXG
7	14	CGGXATAxAC
15	13	CAAXTACGXC
17	22	GCTGXAXATC
18	23	CGCAXATXAC
19	1	GAXGTXTGTC
20	3	GGXTTGXTAG
21	4	CTTXGXTCTC
22	5	CXTCAXGAAC
34	7	GGAXGXTAAC
35	8	CXGTATXGTG
37	6	GTAGXTAXGC
38	10	GATTXTCGXC
45	28	CXXGACXATC
47	29	CCATXAGXCC
61	36	GCXTGTXCAC
62	37	GXCAGAXTCG

偶联的微珠与混合物混合,该混合物在存储缓冲液(10mM MOPS pH7.5,200 mM NaCl,1mM EDTA,1%PEG8000,0.05%SDS)中含有等量的每一种特定微珠。捕获杂交反应液的成分是:

成分	1X 浓度	供应商和产地
MOPS pH 7.5	10 mM	Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ
NaCl	200 mM	Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ
MgCl ₂	50 mM	Sigma, St. Louis, MO
EDTA	1 mM	Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ
PEG8000	1%	Sigma, St. Louis, MO
SDS	0.05%	Fisher Chemical, Fair Lawn, NJ
鲑精子DNA	0.1 mg/mL	Promega, Madison, WI
微球混合物	1000各种微球	EraGen Biosciences, Inc., Madison, WI

以上列出的组分是在反应溶液终体积为60 μ L的反应体系中,母混合液的浓度为1.2倍。50 μ L的母溶液与10 μ L纯化的多重ASPE反应溶液混合,在室温条件下杂交十分钟。10 μ L含有0.01mg/ml的链霉抗生物素蛋白藻红素(Phycoerethrin)(Molecular Probes,Eugene,OR)的杂交缓冲液(10mM MOPS pH7.5,200mM NaCl,50mM MgCl₂,1mM EDTA,1% PEG8000,0.05%SDS)被加入到每一种捕获杂交反应液中,然后注射到Luminex100TM 仪中。

对于每一个捕获杂交反应，55 μ L 反应物被以60 μ L /分的速度加入到Luminex100™中，然后持续读数，直到可以分辨每50个微球的时候。荧光介质强度被用做连接于微球上荧光信号的测量。结果显示在图14上。

实施例6

标记非标准碱基的位点特异性掺入和在固相支持微球上进行捕获在基因组DNA多元化基因型测定中的应用

通过基因组DNA样品上的靶核酸序列的扩增、检验、捕获，确定了基因组上这九个多态性位点的基因型。第一步，多元PCR反应，包括多对成对PCR引物。每对引物包括第一引物A和第二引物B，而在第二引物B的近5'端包含着一个非标准核苷酸 (iso-C)。每个引物对被设计成能与小鼠基因组DNA的包含一段已知多态性位点的区域杂交，并能扩增这段区域。第二步是一个多重的等位基因特异引物延伸 (ASPE) 反应，包括多组标记等位基因特异引物。每个标记等位基因特异引物包括一个含有非标准核苷酸 (iso-G) 的5' 标记序列，后面是一C3间隔区 (n-丙二醇)，再后面是一段3' 序列，3' 序列被设计成能与来自前面多重PCR步骤扩增的DNA链中的其中一条链杂交。通过每条标记等位基因特异引物的3' 核苷酸来确定等位基因的特异性。多组已标记等位基因特异引物被设计，以用于查询已知的包含在多重PCR扩增序列中的多态性位点。标记的非标准三磷酸酯 (iso-G T P -生物素) 被加入 A S P E 反应物中，从而标记等位基因特异性引物的等位基因特异性延伸导致了在相对于模板链上的非标准核苷酸 (iso-C) 位置掺入标记的非标准三磷酸 (iso-G T P -生物素)，该模板链是由前面多重PCR反应产生的。未掺入的iso-G T P -生物素在随后的捕获步骤之前去除。

第三步，捕获多重ASPE反应的产物，这一步骤利用了各自共价结合在特定的Luminex™微球上的，含有非标准核苷酸 (iso-C) 的捕获序列。捕获序列与前面 A S P E 反应使用的标记等位基因特异性引物上的标记序列互补。加入藻红素(Phycoerythrin)是为了在标记等位基因特异引物链的延伸物上结合生物素标记，从而提供一种荧光信号。在捕获序列和标记序列杂交后，微珠被注入 L u m i n e x 1 0 0 ™ 装置，以检测与每组特定微珠相结合的信号。

小鼠基因组的9个多态性区域在该实施例中被作为靶：

靶物	SEQ ID NO:	序列	A/J	C57BL6/J	AB6F1
2	104	AGAAACAACCATCTAATCCCACACTAAAAT TCAAGGCTCCACAGACGAAACAGTGAAGAA TAATGTTCAGCATACTAACCAACTGATTA CATATTTACCATACTCAGGTTTGTGCTTCA TACAAACCCAC/TAGTCCGGCGCTCCCTGTTA GATG	CC	TT	CT
3	105	CTTCTCCCATTTGCCAGGGCACTCTCCTCT GTAGAA/GTAGACTGATYTTTGTGGAGACATC A	GG	AA	AG
4	106	AGTGCCTGCTACCTGTCAGGTGAAAATTC TTAGTGATCCC/TAAGCTCAATGGGTGCGYGC TTGCAGG	CC	TT	CT
5	107	GGTTGGAATGTTTGCACATGCAGTGTAGT TATTTGGGC/TGATACTACTTAGCTTATCTA GCCTGGTCCAGC	TT	CC	CT
6	108	CTGATCTGACCTCAGACTGTTGTGCTAACA GATATAACACCAGTAAGTTGAC/GTCAAATAC TGCAGGAAGTAGAGCCTTGC	GG	CC	CG
7	109	GACTGCTGGAGAGCTGAGGGAGGCTGTGGA GAATAAGGAGAGAGCA/GTAGTCTCGTGCCC T GCCCTGCCCATACTGAGCAGCCAAGACAC	GG	AA	AG
8	110	GGACTGTCCAAKGGATCTCAAGGAGAATA GTCCTTGCTATTAA/GGAGTATAAAGGCATAA AAGAGTTCATAGGGGACAACCATGACCAAG AAGTTG	AA	GG	AG
9	111	CCTTCCTGCAYTCCACAGTATAAACACAGA ATGCACACTGCA/GGTCGTTGTATTTGTGTTT GATGTGAATTAAAGATGCTTTGGCTAAGCC AGGAGATGATAATACTG	AA	GG	AG
10	112	CACATACCCATGTCAGCCATCAGCGCAA GCCTTCGAGTTTCAGCTGTGAGATGAAGGC TTGGAGAAGCACGTTGATCTGCAAAGAAGC AAAGGAGCTAGCGGAGGCC/TGGTCACTGACC GACTGCTCA	CC	TT	CT

在这个例子中，以下的核酸序列被用于多元PCR反应步骤。

核酸成分	序列	SEQ ID NO
PCR引物1A	5'-6FAM-AGAAACAACCATCTAATCCCACA-3'	113
PCR引物1B	5'-TXCATCTAACAGGGAGCGCC-3'	114
PCR引物2A	5'-6FAM-CTTCTCCCATTGCCAGG-3'	115
PCR引物2B	5'-TXTGATGTCTCCACAAAGATCAGTC-3'	116
PCR引物3A	5'-6FAM-CCTGCAAGCCAGCACC-3'	117
PCR引物3B	5'-TXCCTGCAAGCCAGCACC-3'	118
PCR引物4A	5'-6FAM-GGTTGGAATGTTTGCACATGC-3'	119
PCR引物4B	5'-TXGCTGGACCAGGCTAGATAAGC-3'	120
PCR引物5A	5'-6FAM-CTGATCTGACCTCAGACTGTTG-3'	121
PCR引物5B	5'-TXGCAAGGCTCTACTTCCTGC-3'	122
PCR引物6A	5'-6FAM-GACTGCTGGAGAGCTGAGG-3'	123
PCR引物6B	5'-TXGTGTCTTGGCTGCTCAGTATG-3'	124
PCR引物7A	5'-6FAM-GGACTGTCCAAAGGGATCTC-3'	125
PCR引物7B	5'-TXCAACTTCTTGGTCATGGTTGTC-3'	126
PCR引物8A	5'-6FAM-CAGTATTATCATCTCCTGGCTTAGC-3'	127
PCR引物8B	5'-TXCCTTCCTGCACTCCACAG-3'	128
PCR引物9A	5'-6FAM-CACATACACCATGTCAGCC-3'	129
PCR引物9B	5'-TXTGAGCAGTCGGTCAGTG-3'	130
模板1	小鼠基因组 DNA; 株: A/J	
模板2	小鼠基因组 DNA; 株: C57BL6/J	
模板3	小鼠基因组 DNA; 株: AB6F1	

合成PCR反应的引物并且在pH7.5的1mM的MOPS、0.1mM EDTA中进行稀释。小鼠基因组DNA样品是从Jackson Laboratory in (Bar Harbor, ME)购买的。所有的基因组DNA样品都在pH7.5的1mM的MOPS、0.1mM EDTA中被稀释到 5 ng/ μ l。PCR反应的组分是:

组分	1×浓度	供应者和产地
10 X PCR Buffer II	1.2 X	Applied Biosystems, Foster City, CA
MgCl ₂	2mM	Sigma, St. Louis, MO
DATP	200 μ M	Amersham
DGTP	200 μ M	Amersham
DCTP	200 μ M	Amersham
DTTP	200 μ M	Amersham
Amplitaq™ Gold DNA聚合酶	0.1 U/ μ l	Applied Biosystems, Foster City, CA
PCR引物 (每种)	0.2 μ M	

所有列出组分的母混合液 制备为25 μ l 终反应体积的1.09X浓度。23 μ l 母混合液 与2 μ l 基因组DNA模板 (5ng/ μ l) 混合于单个的PCR管中。负对照用

水代替基因组DNA模板。PCR反应循环如下：

循环#	步骤	温度	时间
1	1	95℃	9分钟
2-41	1	95℃	10秒
	2	55℃	10秒
	3	70℃	30秒
42	1	70℃	5分钟
43	1	4℃	持续

PCR循环过后，各取2 μl PCR反应物转移到多重ASPE反应中作为模板。

下面合成的核酸被用作多重ASPE反应的标记等位基因特异(TAS)引物：

核酸成分	序列	SEQ ID NO
TAS引物1	5' -GTGYACAYGC-c3-GCTTCATACAAACCCAC-3'	131
TAS引物2	5' -CGAYTCTGYC-c3-GCTTCATACAAACCCAT-3'	132
TAS引物3	5' -CTAYCAAYCC-c3-CACTCTCCTCTGTAGAA-3'	133
TAS引物4	5' -GAGAYCYAAG-c3-CACTCTCCTCTGTAGAG-3'	134
TAS引物5	5' -GTTTCYTGAYG-c3-GAAATTTCTTAGTGATCCT-3'	135
TAS引物6	5' -GCYTAYCTAC-c3-AAAATTTCTTAGTGATCCC-3'	136
TAS引物7	5' -GTTAYCYTCC-c3-AGTGTTAGTTATTTGGGT-3'	137
TAS引物8	5' -CACYATACYG-c3-GTGTTAGTTATTTGGGC-3'	138
TAS引物9	5' -CYTACCYATG-c3-TAACACCAGTAAGTTGAC-3'	139
TAS引物10	5' -GYCGAYAATC-c3-TAACACCAGTAAGTTGAG-3'	140
TAS引物11	5' -GYCGTAYTTG-c3-AGAATAAGGAGAGAGCA-3'	141
TAS引物12	5' -GTYTATYCCG-c3-GAATAAGGAGAGAGCG-3'	142
TAS引物13	5' -GACAYACYTC-c3-AGAATAGTCCTTGCTATTAA-3'	143
TAS引物14	5' -GGAAAYAACYG-c3-AGAATAGTCCTTGCTATTAG-3'	144
TAS引物15	5' -GATYTYCAGC-c3-AGAATGCACACTGCA-3'	145
TAS引物16	5' -GTYATYTGCG-c3-GAATGCACACTGCG-3'	146
TAS引物17	5' -GATYGTCYYG-c3-GCTAGCGGAGGCC-3'	147
TAS引物18	5' -GGYCTYATGG-c3-GCTAGCGGAGGCT-3'	148

ASPE反应中的组分为:

组分	1×浓度	供应者和产地
Bis-Tris-丙烷 pH 8.9	10 mM	Sigma, St. Louis, MO
乙酸钾	40 mM	Sigma, St. Louis, MO
MgCl ₂	2 mM	Sigma, St. Louis, MO
dATP	50 μM	Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ
dGTP	50 μM	Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ
dCTP	50 μM	Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ
dTTP	50 μM	Amersham Pharmacia,Piscataway,NJ
d-isoGTP-生物素	10 μM	EraGen Biosciences, Inc.,Madison, WI
Klentaq DNA聚合酶	0.067 U/μl	Ab Peptides,St. Louis, MO
TAS 引物(每种)	0.067 μM	EraGen Biosciences, Inc.,Madison, WI

一种包含以上所有组分的母混合液被配成1.15X。每个ASPE反应包含13 μl 母混合液,2 μl PCR反应物 (来自前面步骤)。ASPE反应循环如下:

循环#	步骤	温度	时间
1	1	95°C	2分钟
2-11	1	95°C	1秒
	2	48°C	1秒
	3	72°C	1分钟
12	1	72°C	5分钟
13	1	4°C	持续

ASPE循环后, 5 μl 包含40mM Tris,40mM EDTA的溶液被加入到多重ASPE反应物中, 以终止聚合酶的活性。反应物用G-50柱纯化去除未结合的 d-isoGTP-生物素。然后纯化的多重ASPE反应液通过结合在Luminox™微珠 (Luminox公司, 休斯敦, 德克萨斯州) 上的捕获序列解旋。偶联的微珠是

微珠身份	SEQ ID NO:	捕获序列
1	2	CXGTTXTTCC
2	9	CATXGGTAXG
7	14	CGGXATAAXAC
15	13	CAAXTACGXC
17	22	GCTGXAXATC
18	23	CGCAXATXAC
19	1	GAXGTXTGTC
20	3	GGXTTGXTAG
21	4	CTTXGXTCTC
22	5	CXTCAXGAAC
34	7	GGAXGXTAAC
35	8	CXGTATXGTG
37	6	GTAGXTAXGC
38	10	GATTXTCGXC
45	28	CXXGACXATC
47	29	CCATXAGXCC
61	36	GCXTGTXCAC
62	37	GXCAGAXTCG

偶联的微珠与混合物混合,该混合物在存储缓冲液(10mM MOPS pH7.5,200 mM NaCl,1mM EDTA,1%PEG8000,0.05%SDS)中含有等量的每一种特定微珠。捕获杂交反应液的成分是:

组分	1X浓度	供应者和产地
MOPS pH7.5	10 mM	Fisher Chemical,Fair Lawn,NJ
NaCl	200 mM	Fisher Chemical,Fair Lawn,NJ
MgCl ₂	50 mM	Sigma,St.Louis,MO
EDTA	1 mM	Fisher Chemical,Fair Lawn,NJ
PEG8000	1%	Sigma,St.Louis,MO
SDS	0.05%	Fisher Chemical,Fair Lawn,NJ
鲑精液DNA	0.1mg/mL	Promega,Madison,WI
微球混合物	1000各种微球	EraGen Biosciences,Inc.,Madison,WI

制备以上列出的组分的母混合物,反应溶液终体积为60 μ L, 1.2倍浓度。50 μ L的母溶液与10 μ L纯化的多重ASPE反应溶液混合,在室温条件下杂交十分钟。10 μ L含有0.01mg/ml的链霉抗生物素蛋白藻红素 (Phycoerethrin)(Molecular Probes,Eugene,OR)的杂交缓冲液(10mM MOPS pH7.5, 200mM NaCl, 50mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1% PEG8000,0.05%SDS)被加入到每一种捕获杂交反应液

中，然后注射到Luminex100™ 仪中。

对于每一个捕获杂交反应，55μL 反应物被以60 μL /分的速度加入到Luminex100™中，然后持续读数，直到可以分辨每50个微球的时候。荧光介质强度被用做连接于微球上荧光信号的测量。结果显示在图15上。

本发明并不局限于上面描述的特例，而进一步可以理解为覆盖本发明权利要求书提出的权利要求的各个方面。各种不同的修饰、等同替换以及其他多种应用方式，对本领域普通技术人员来讲参照本发明说明书是非常容易的。

实施例7

报道基因寡聚核苷酸与等位基因特异性延伸产物的位点特异性连接和在固相支持微球上进行捕获 在基因组DNA基因型测定中的应用

通过基因组DNA样品上的靶核酸序列的扩增、检验、捕获，我们确定了基因组上多态性位点的基因型。第一步，PCR反应，包括一系列PCR引物：第一引物A和第二引物B，第二引物B的5'端包含着一个非互补于靶的序列，该靶序列是指在其被分析物特异性序列和非互补部分的连接处含有iso-C的靶序列。引物被设计成能与小鼠基因组DNA的包含一段已知多态性位点的区域杂交，并能扩增这段区域。第二步是一个等位基因特异引物延伸（ASPE）反应，包括一系列标记等位基因特异引物。每个标记等位基因特异引物包括一个含有非标准核苷酸（iso-G）的5'标记序列，后面是一C3间隔区，再后面是一段3'序列，3'序列被设计成能与来自前面PCR步骤扩增的DNA链中的其中一条链杂交。通过每条标记的等位基因特异引物的3'核苷酸来确定等位基因的特异性。一系列标记等位基因特异引物被设计，以用于查询已知的包含在扩增序列中的多态性位点。在ASPE反应中，包括了DAN连接酶，和一个含有一5'磷酸和一3'生物素修饰的报道基因寡核苷酸。此报道基因寡核苷酸互补于引物B的5'区域，引物B被用来产生查询的扩增子。含有此非标准碱基的扩增产物链具有作为ASPE反应模板的区域。在等位基因特异引物延伸期间，DNA聚合酶在模板链iso-C的前一个碱基处终止，这样留下一个单链区域用于报道基因寡核苷酸的杂交。延伸ASPE引物，模板和报告基因寡核苷酸之间的复合体导致一个适合于DNA连接酶连接的缺口结构出现。

第三步，应用含非标准核苷酸（iso-C）序列捕获多元ASPE反应产物，每一个含非标准核苷酸（iso-C）序列均各自共价偶联于特定的luminex微球

。捕获序列与在前面ASPE反应中用于建立标签等位基因特异引物的标记序列互补。加入链霉抗生物素蛋白—藻红素是与延伸的和连接的等位基因特异性引物链上生物素标记连接，以提供荧光信号。在捕获序列和标记序列之间杂交之后，微球体被注射入一个Luminex100装置来检测与每种独特微球体相连的特有信号。

此例中，小鼠基因组单一多态性区作为靶位：

序列 ID 号:	靶序列	A/J	C57BL6/J	AB6F1
149	5' CTTCTCCCATTTGCCAGGGCACTCTCCTCT GTAGARTAGACTGATYTTTGTGGAGACATCA3'	GG	AA	AG

核酸成分	5' -3' 序列	SEQ ID NO:
PCR引物A	PO ₄ -CTTCTCCCATTTGCCAGG	115
PCR引物B	CXGCXAGXGATXTGATGTCTCCACAAAGATCAGTC	150
模板1	小鼠基因组 DNA; 株: A/J	
模板1	小鼠基因组 DNA; 株: C57BL6/J	
模板1	小鼠基因组 DNA; 株: AB6F1	

小鼠基因组DNA样品购自Jackson实验室 (Bar Harbor, ME)。所有的基因组DNA样品用1 mM MOPS pH 7.5, 0.1 mM EDTA稀释至10 ng/μl。PCR反应组成是：

组分	1×浓度	供应者和产地
10 X PCR Buffer II	1.2 X	Applied Biosystems, Foster City, CA
MgCl ₂	2mM	Sigma, St. Louis, MO
dGTP	200 μM	Promega, Madison, WI
dATP	200 μM	Promega, Madison, WI
dTTP	200 μM	Promega, Madison, WI
dCTP	200 μM	Promega, Madison, WI
Amplitaq DNA 聚合酶 Stoffel片段	0.2 U/μl	Applied Biosystems, Foster City, CA
PCR 引物A	0.2 μM	
PCR引物B	0.2 μM	

所有所列组分的母混合物制备成 $1.07 \times$ 浓度, 以使反应终体积为 $30 \mu\text{l}$ 。 $23 \mu\text{l}$ 的母混合物与 $2 \mu\text{l}$ 的基因组DNA模板($5 \text{ ng}/\mu\text{l}$)在单独的PCR小管中混合。阴性对照是由水代替基因组DNA模板。PCR反应的热循环如下:

循环#	步骤	温度	时间
1	1	95°C	2分钟
2-41	1	95°C	10秒
	2	55°C	10秒
	3	65°C	30秒
42	1	65°C	5分钟
43	1	4°C	持续

PCR循环后, 每个反应体系加入 $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ 的 λ 核酸外切酶 (New England Biolabs, Beverly, MA) $3 \mu\text{l}$ 以除去PCR引物A引入的扩增子非模板链。加入 λ 核酸外切酶后, 将反应小管加热至 37°C , 5分钟, 再加热至 95°C , 2分钟。这样消化之后, 每个PCR反应取 $1 \mu\text{l}$ 作为ASPE反应的模板。下面的核酸序列被用为ASPE反应中的标记等位基因特异性(TAS)引物:

核酸组分	5' -3' 序列	序列ID号:
TAS引物1	CTAYCAAYCC-c3- CACTCTCCTCTGTAGAA	151
TAS引物2	GAGAYCYAAG-c3- CACTCTCCTCTGTAGAG	152
报道基因寡核苷酸	PO_4 -YATCYCTYGCYG-生物素	153

ASPE反应的组分为:

组分	1×浓度	供应者和产地
10 X PCR Buffer II	1.2 X	Applied Biosystems,Foster City, CA
MgCl ₂	2mM	Sigma, St. Louis, MO
DGTP	200 μM	Promega, Madison, WI
DATP	200 μM	Promega, Madison, WI
DTTP	200 μM	Promega, Madison, WI
DCTP	200 μM	Promega, Madison, WI
Amplitaq DNA 聚合酶Stoffel片段	0.1 U/μl	Applied Biosystems,Foster City, CA
TAS引物1	0.1 μM	
TAS引物2	0.1 μM	
报道基因寡核苷酸	0.2 μM	
DTT	5 mM	Fisher Scientific,Pittsburgh,PA
NAD	1 mM	Roche, Indianapolis,IN
Taq DNA连接酶	2 U/μl	New England Biolabs,Beverly,MA

包括所有上述组分的母混合物制备为1.11×。每一ASPE反应由9 μl母混合物和1 μl PCR反应物（来自前一步）组成。ASPE反应循环如下:

循环#	步骤	温度	时间
1	1	95°C	30秒
2-13	1	95°C	1秒
	2	48°C	1秒
	3	58°C	2分钟
14	1	4°C	持续

ASPE循环之后,反应物被偶联于Luminex微球(Luminex Corp, Austin, TX)上的捕获序列解旋。偶联微球体为:

微球体身份	SEQ ID NO:	5'-3'捕获序列
20	3	GGXTTGXTAG
21	4	CTTXGXTCTC

偶联的微珠与混合物混合,该混合物在存储缓冲液(10mM MOPS pH7.5,200 mM NaCl,1mM EDTA,1%PEG8000,0.05%SDS)中等量的每一种特定微珠。捕获杂交反应液的成分是:

组分	1X浓度	供应者和产地
MOPS pH7.5	10 mM	Sigma,St.Louis,MO
NaCl	200 mM	Sigma,St.Louis,MO
MgCl ₂	50 mM	Sigma,St.Louis,MO
EDTA	1 mM	Sigma,St.Louis,MO
PEG8000	1%	Sigma,St.Louis,MO
SDS	0.05%	Sigma,St.Louis,MO
鲑精液DNA	0.1mg/mL	Promega,Madison,WI
微珠混合物	1000 每种微珠	Luminex Corp.,Austin TX

上述所有组分的母混合物制备成1.2×浓度,以使反应终体积为60 μl。50 μl 此母混合物加入每一个ASPE反应体系中,并在室温杂交10分钟。在注入Luminex100装置之前向每一个捕获杂交系加入10 μl链霉抗生物素蛋白—藻红素溶液(0.075 mg/ml于10 mM MOPS pH 7.5中,NaCl 200 mM, MgCl₂ 50 mM, EDTA 1 mM, PEG 8000 1%, SDS 0.05) (Molecular Probes, Eugene, OR)。

对于每个捕获杂交反应,取45 μl反应混合物以60 μl/min的速度注入Luminex100,然后持续读数,直到可以分辨每100个微球的时候。荧光介质强度(MFI)被用做连接于微球上荧光信号的测量。结果显示在图17上。

在上述例子中,引物B的非标准碱基,位于5'端非互补序列和分析物特异序列连接区,被设计为用来阻止酶促在标签和分析物特异序列连接处的延伸。可以明确地预想,其他合适的接头也可以用于停止聚合酶反应,包括,例如,2-O-甲基碱基,像2'-O-甲基核糖核苷酸。

序列表

<110> Grenier, Jennifer

Marshall, David

Prudent, James

Richmond, Craig

Roesch, Eric

Scherrer, Christopher

Sherrill, Christopher

Ptacin, Jerod

<120> 使用非标准碱基的固相支持体分析系统和方法

<130> 031403-9012

<140> 09/977, 615

<141> 2001-10-15

<150> 60/240, 397

<151> 2000-10-14

<150> 60/282, 831

<151> 2001-04-10

<150> 09/861,292

<151> 2001-05-18

<150> 60/293,259

<151> 2001-05-22

<160> 156

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 1

gangtntgtc

10

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 2
cngttnttcc 10

<210> 3

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 3
ggnttgntag 10

<210> 4

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 4
cttngntctc

10

<210> 5

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 5

cntcangaac

10

<210> 6

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 6

gtagntangc

10

<210> 7

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 7

ggangntaac

10

<210> 8

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2).. (2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7).. (7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 8

engtatngtg

10

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (10)..(10)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 9

catnggtang

10

<210> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 10

gattntcgnc

10

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 11

gttnangacc

10

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 12

cngaangatc

10

<210> 13

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 13
caantacgnc

10

<210> 14

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 14
cggnatanac

10

<210> 15

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 15
gnaaannagg

10

<210> 16

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 16
gtcntagnnc

10

<210> 17

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 17

gncctntanc

10

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 18
ccnactgag

10

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 19 ctnncanagg	10
<210> 20	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (3)..(3)	
<223> n 表示异鸟嘌呤	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (6)..(6)	
<223> n 表示异鸟嘌呤	
<400> 20 gtnganatgc	10
<210> 21	
<211> 10	
<212> DNA	

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 21
gaaantgngg

10

<210> 22

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 22

gctgnanatc

10

<210> 23

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 23

cgcanatnac

10

<210> 24

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 24

ctggntcnag

10

<210> 25

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 25
ggaananncc

10

<210> 26

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 26
cntcgntac

10

<210> 27

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 27

gncnaaaang

10

<210> 28

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 28
cnnagacnadc

10

<210> 29

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 29
ccatnagncc

10

<210> 30

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 30
ggcantntgg

10

<210> 31

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 31

ctnaacnggg

10

<210> 32

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 32

gganacgng

9

<210> 33

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 33

gcgntttang

10

<210> 34

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 34
gagnagntnc

10

<210> 35

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 35
gnctaancg

10

<210> 36

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 36

gcntgtncac

10

<210> 37

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 37
gncagantcg

10

<210> 38

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 38
cgtncatagng

10

<210> 39

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 39
cgntagtng

10

<210> 40

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 40

cnagгнаacc

10

<210> 41

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 41
cnagangang

10

<210> 42

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 42

cgntgngtc

9

<210> 43

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8).. (8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 43
cagncgttag

10

<210> 44

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5).. (5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8).. (8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 44
ggctntgnac

10

<210> 45

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 45

ccagngnaag

10

<210> 46

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 46
ggcnaatngc

10

<210> 47

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 47

gnetgcngg

9

<210> 48

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 48
gancnccggc

10

<210> 49

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 49
gtncganggg

10

<210> 50

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 50

gggnatccng

10

<210> 51

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 51
gncttcnatg

10

<210> 52

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 52
cntcttnccc

10

<210> 53

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 53

ctctnancce

10

<210> 54

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 54

ctcntgggtnc

10

<210> 55

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 55

gncaaancac

10

<210> 56

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 56

gttngcnttg

10

<210> 57

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 57
cncntncaac

10

<210> 58

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 58
ctnnacannc

10

<210> 59

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 59

enactcnacc

10

<210> 60

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 60
gacncanntg

10

<210> 61

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 61

ctenetnacg

10

<210> 62

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 62

gtggcctntc

10

<210> 63

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 63

cannaccnag

10

<210> 64

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 64

gtncnanacc

10

<210> 65

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 65

cacnntgntc

10

<210> 66

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤.

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤.

<400> 66

gntcctngtc

10

<210> 67

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 67

ccnmatgtng

10

<210> 68

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 68

gnggttnntc

10

<210> 69

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 69

enccgnaatc

10

<210> 70

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 70
gnnacnacac

10

<210> 71

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 71

gcnengtnc

9

<210> 72

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2).. (2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4).. (4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8).. (8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 72

gnengganc

9

<210> 73

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 73
cganagcanc

10

<210> 74

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 74

cccantccnc

10

<210> 75

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 75

gtncenncag

10

<210> 76

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 76
cncctanccg 10

<210> 77

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 77
gngttgncg 9

<210> 78

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 78

cnaagnanccg

10

<210> 79

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 79

ggagncnntc

10

<210> 80

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 80

engnangtac

10

<210> 81

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 81

gnacgantng

10

<210> 82

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 82

gngctnecatg

10

<210> 83

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 83

gtgnagagng

10

<210> 84

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7).. (7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 84

gccgncntc

9

<210> 85

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4).. (4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7).. (7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 85

caancgntcg

10

<210> 86

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 86

cacnacngc

10

<210> 87

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 87

gntggnncg

9

<210> 88

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 88

gccnccngt

9

<210> 89

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 89

cnanggtcnc

10

<210> 90

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4)..(4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 90

ccnngngtg

9

<210> 91

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 91

ggnacnccag

10

<210> 92

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7)..(7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 92
gcctnngac

10

<210> 93

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 93
enttncgenc

10

<210> 94

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (9)..(9)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 94

cnctangng

10

<210> 95

<211> 9

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 95

cngcnagng

9

<210> 96

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (6)..(6)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 96 cnagcnaagg	10
<210> 97	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (5)..(5)	
<223> n 表示异鸟嘌呤	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> (8)..(8)	
<223> n 表示异鸟嘌呤	
<400> 97 gacangcnc	10
<210> 98	
<211> 9	
<212> DNA	

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (4).. (4)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (7).. (7)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8).. (8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 98

gggncgna

9

<210> 99

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 99

gccagtttaa

10

<210> 100

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 100

gccantttaa

10

<210> 101

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (3)..(3)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 101

gcnagtttaa

10

<210> 102

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 102

gycagtttaa

10

<210> 103

<211> 10

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 103

gyyagtttaa

10

<210> 104

<211> 155

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 104

agaaacaacc atctaatecc aactaaaat tcaaggetcc acagaogaaa cagtgaagaa 60

taattgttca gcatactaac caactgatta catatttacc atactcaggt ttgtgcttca 120

tacaaacceca ctagtccgge gctccctggt agatg 155

<210> 105

<211> 63

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 105

cttctcccat tgccagggc actctctct gtagaagtag actgatcttt tgtggagaca 60

tca 63

<210> 106

<211> 68

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 106

agtgcctget acctgtcagg tgaaaatttc ttagtgatcc ctaagctcaa tgggtgcygg 60

cttgcagg	68
<210> 107	
<211> 73	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 107	
ggttggaatg tttgcacatg cagtgttagt tatttggget gataactact tagcttatct	60
agcctggtcc agc	73
<210> 108	
<211> 81	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 108	
ctgatctgac ctcagactgt tgtgctaaca gatataacac cagtaagttg acgtcaaata	60
ctgcaggaag tagagccttg c	81
<210> 109	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	

<400> 109		
gactgctgga gagctgaggg aggctgtgga gaataaggag agagcagtag tctcgtgccc		60
tgccctgccc atactgagca gccaaagacac		90
<210> 110		
<211> 97		
<212> DNA		
<213> 合成寡核苷酸		
<400> 110		
ggactgtcca aakggatctc aaggagaata gtccttgcta ttaaggagta taaaggcata		60
aaagaggtca taggggacaa ccatgaccaa gaagttg		97
<210> 111		
<211> 108		
<212> DNA		
<213> 合成寡核苷酸		
<400> 111		
cccttctgca ytccacagta taaacacaga atgcacactg caggtcgttg tatttgtgtt		60
cgatgtgaat taaagatget ttggctaagc caggagatga taatactg		108
<210> 112		
<211> 130		
<212> DNA		

<213> 合成寡核苷酸

<400> 112
 cacatacacc atgtcagcca tcagcgeaaa gccttogagt ttcagctgtg agatgaaggc 60
 ttggagaagc acgttgatct gcaaagaagc aaaggagcta gggaggcct ggtcactgac 120
 cgactgctca 130

<210> 113

<211> 18

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 113
 catctaacag ggagcgcc 18

<210> 114

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1).. (1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸

-
- <400> 114
ngaaacaacc atctaataccc aca 23
- <210> 115
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> 合成寡核苷酸
- <220>
- <221> 修饰的碱基
- <222> (1).. (1)
- <223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸
- <400> 115
nttctcccat tgcccagg 18
- <210> 116
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> 合成寡核苷酸
- <400> 116
tgatgtctcc acaaagatca gtc 23

<210> 117

<211> 19

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 117

agtgcctgct acctgtcag

19

<210> 118

<211> 16

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1)..(1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸

<400> 118

nctgcaagcc agcacc

16

<210> 119

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1)..(1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸

<400> 119

ngttggaatg tttgcacatg c

21

<210> 120

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 120

gctggaccag gctagataag c

21

<210> 121

<211> 22

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1)..(1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸

<400> 121

ntgatctgac ctcagactgt tg

22

<210> 122

<211> 19

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 122

gcaaggctct acttctctgc

19

<210> 123

<211> 19

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1)..(1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸

<400> 123
nactgctgga gagctgagg 19

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 124
gtgtcttggc tgctcagtat g 21

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1)..(1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄(6-FAM)标记的脱氧胸苷酸

<400> 125
ngactgtcca aagggatctc 20

<210> 126

<211> 22

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 126

caacttcttg gtcatggttg tc

22

<210> 127

<211> 19

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1).. (1)

<223> n 表示 indodicarbocyanine 3-1-0-(2-氰乙基)-(N,N-二异丙基)-phosphoramidit

<400> 127

nccttctgc aytccacag

19

<210> 128

<211> 25

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1).. (1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄 (6-FAM) 标记的脱氧胸苷酸

<400> 128

nagtattatc atctcctggc ttagc

25

<210> 129

<211> 19

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (1).. (1)

<223> n 表示用 6-羧基荧光黄 (6-FAM) 标记的脱氧胸苷酸

<400> 129

nacatacacc atgtcagcc

19

<210> 130

<211> 17

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 130

tgagcagtcg gtcagtg

17

<210> 131

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 131

gtgyacaygc gttcataca aaccac

27

<210> 132

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 132

cgaytctgyc gttcataca aaccat

27

<210> 133

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 133

ctaycaaycc cactctcctc tgtagaa

27

<210> 134

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 134

gagaycyaag cactctcctc tgtagag

27

<210> 135

<211> 30

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 135

gttcytagayg gaaaatttct tagtgatcct

30

<210> 136

<211> 29

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 136
gcytayctac aaaatttctt agtgateccc

29

<210> 137

<211> 28

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 137
gttaycytec agtgtagtt atttgggt

28

<210> 138

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 138
cacyatacyg gtgtagtta tttgggc

27

<210> 139

<211> 28

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 139	
cytaccyatg taacaccagt aagttgac	28
<210> 140	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 140	
gycgayaatc taacaccagt aagttgag	28
<210> 141	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 141	
gycgtayttg agaataagga gagagca	27
<210> 142	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	

<400> 142	
gtytatyccg gaataaggag agagcg	26
<210> 143	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 143	
gacayacytc agaatagtcc ttgctattaa	30
<210> 144	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 144	
ggaayaacyg agaatagtcc ttgctattag	30
<210> 145	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 合成寡核苷酸	
<400> 145	

gatytycagc agaatgcaca ctgca

25

<210> 146

<211> 24

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 146

gtyatytgcg gaatgcacac tgcg

24

<210> 147

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 147

gatygtcyyg gctagcggag gcc

23

<210> 148

<211> 23

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 148

ggyctyatgg gctagcggag gct

23

<210> 149

<211> 61

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 149

cttctcccat tgcccagggc actctcctct gtagartaga ctgatytttg tggagacatc 60

a 61

<210> 150

<211> 35

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (2)..(2)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (5)..(5)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (8)..(8)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<220>

<221> 修饰的碱基

<222> (12)..(12)

<223> n 表示异鸟嘌呤

<400> 150

engcnagnga tntgatgtct ccacaaagat cagtc

35

<210> 151

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 151

ctaycaaycc cactctcctc thtagaa

27

<210> 152

<211> 27

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 152

gagaycyaag cactctcctc tgtagag

27

<210> 153

<211> 12

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 153

yatcycytygc yg

12

<210> 154

<211> 18

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 154

agaacccttt cctcttcc

18

<210> 155

<211> 47

<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 155

aagaaccett tctcttccg atgcaggata cttacaata aatattt

47

<210> 156

<211> 39

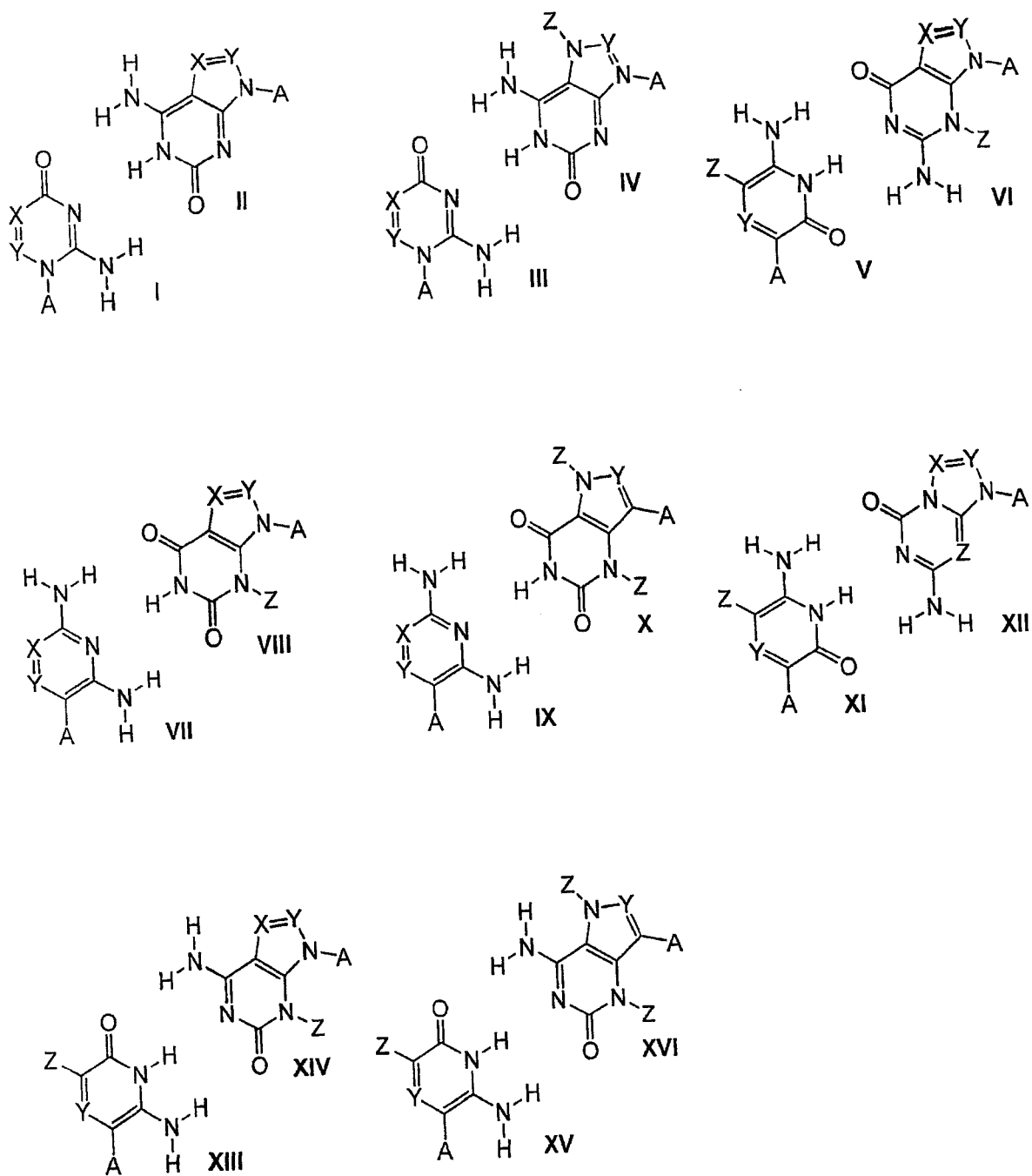
<212> DNA

<213> 合成寡核苷酸

<400> 156

gcagacagga yaaatattta ttgtaagta tctgcate

39



A是与聚合物主链连接的点
 X是N或C-Z
 Y是N或C-H
 Z是H或取代的或未取代的烷基

图 1

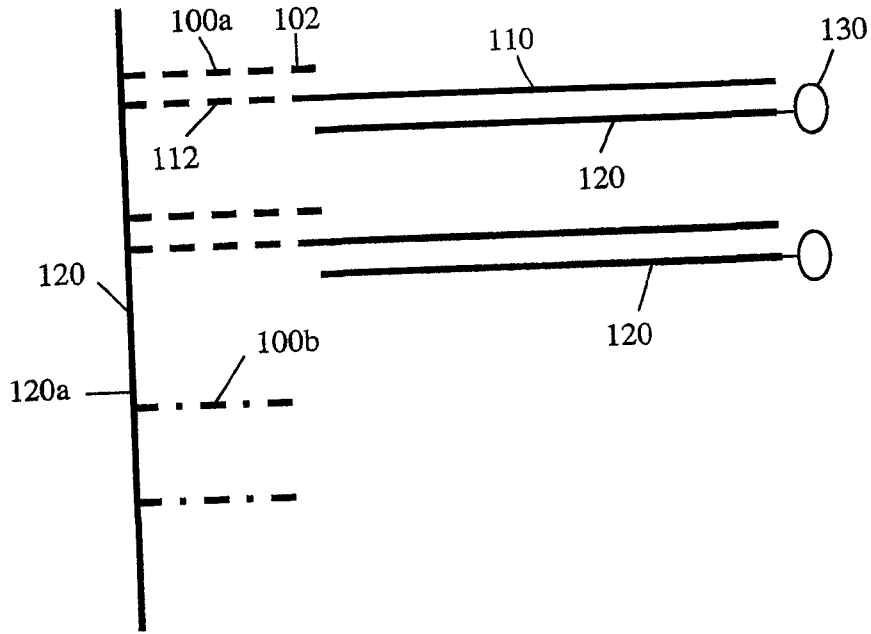


图 2A

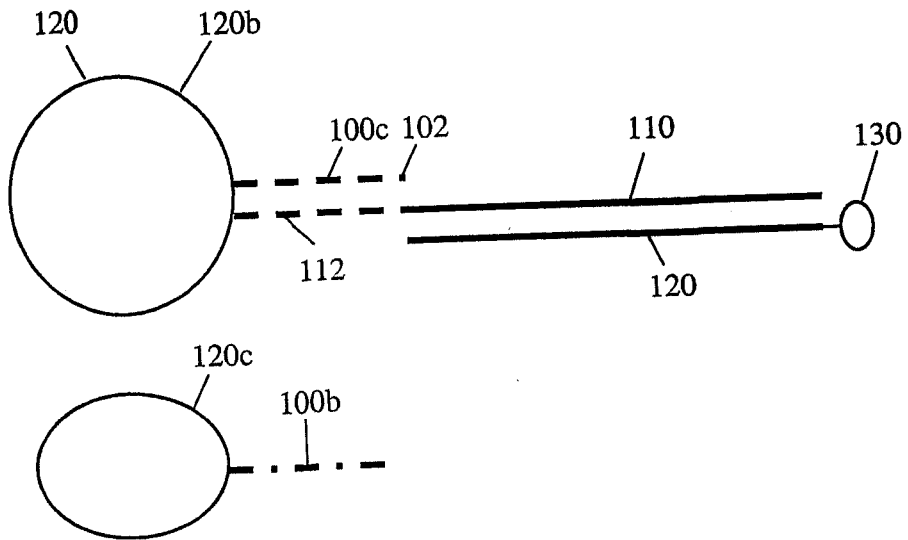


图 2B

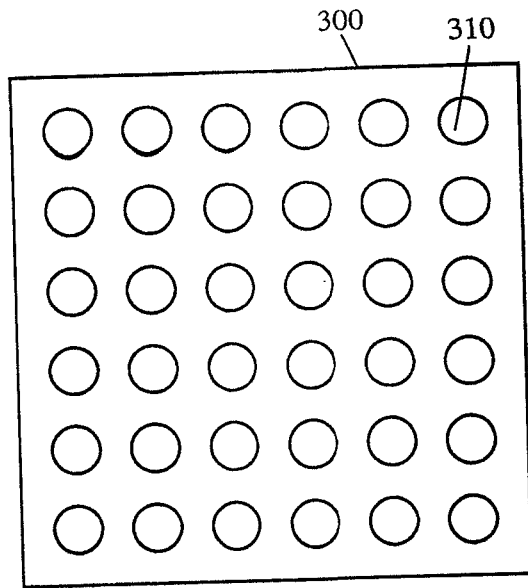


图 3

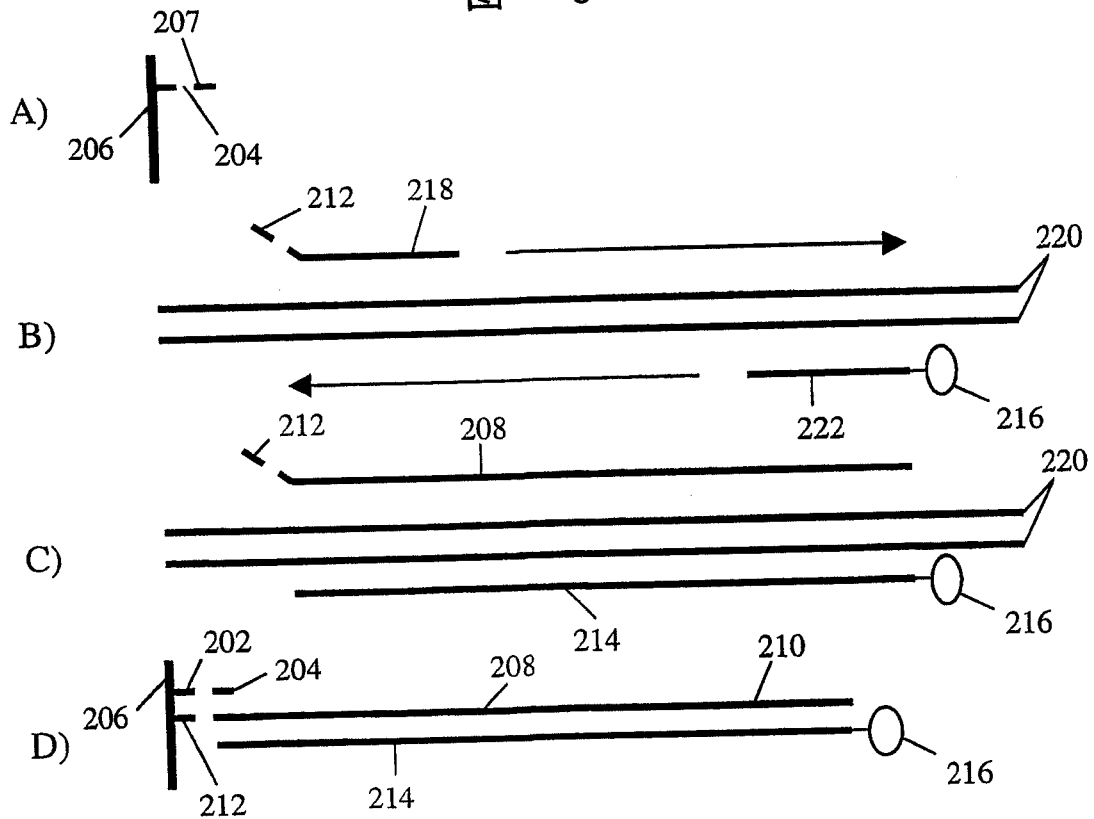


图 4

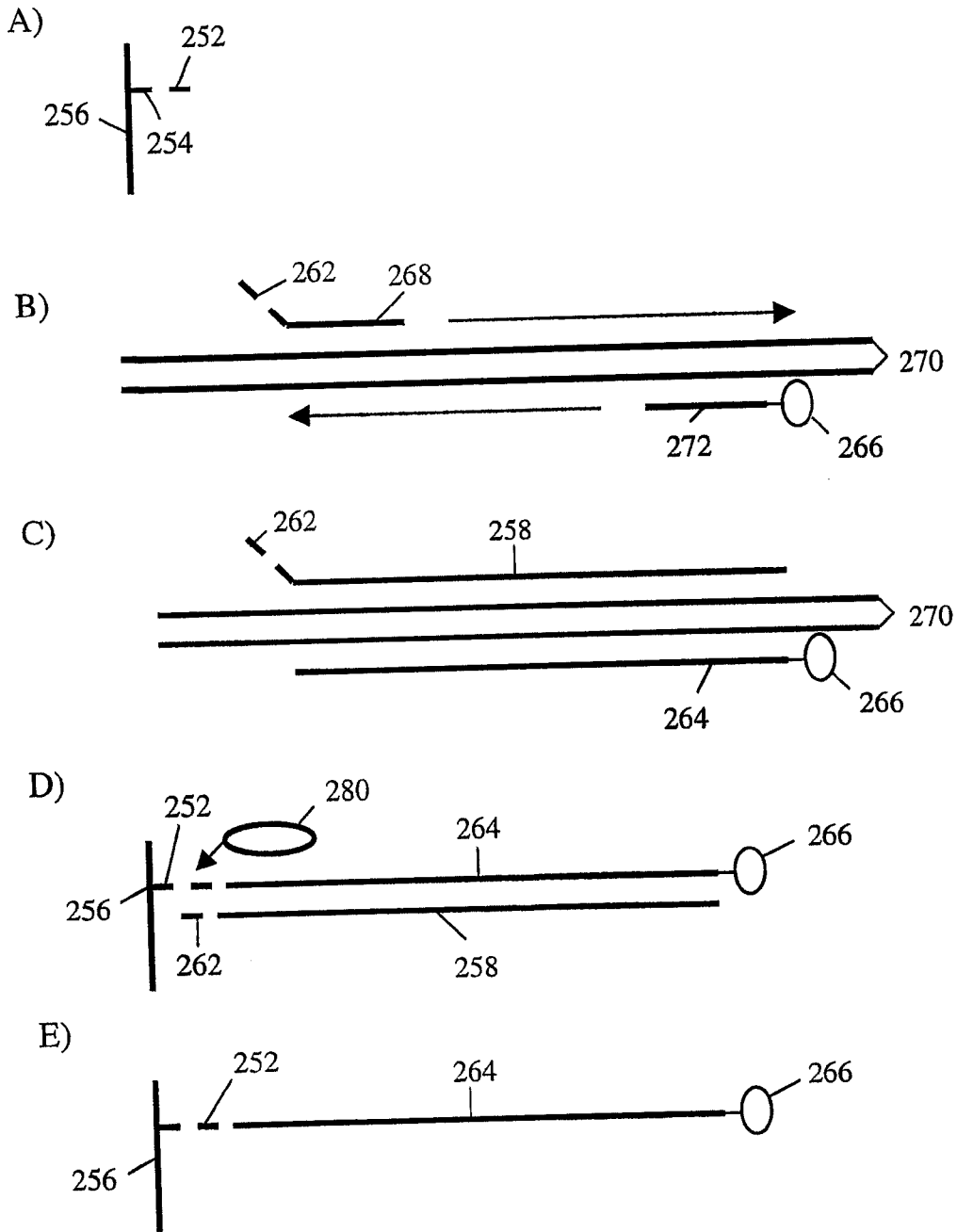


图 5

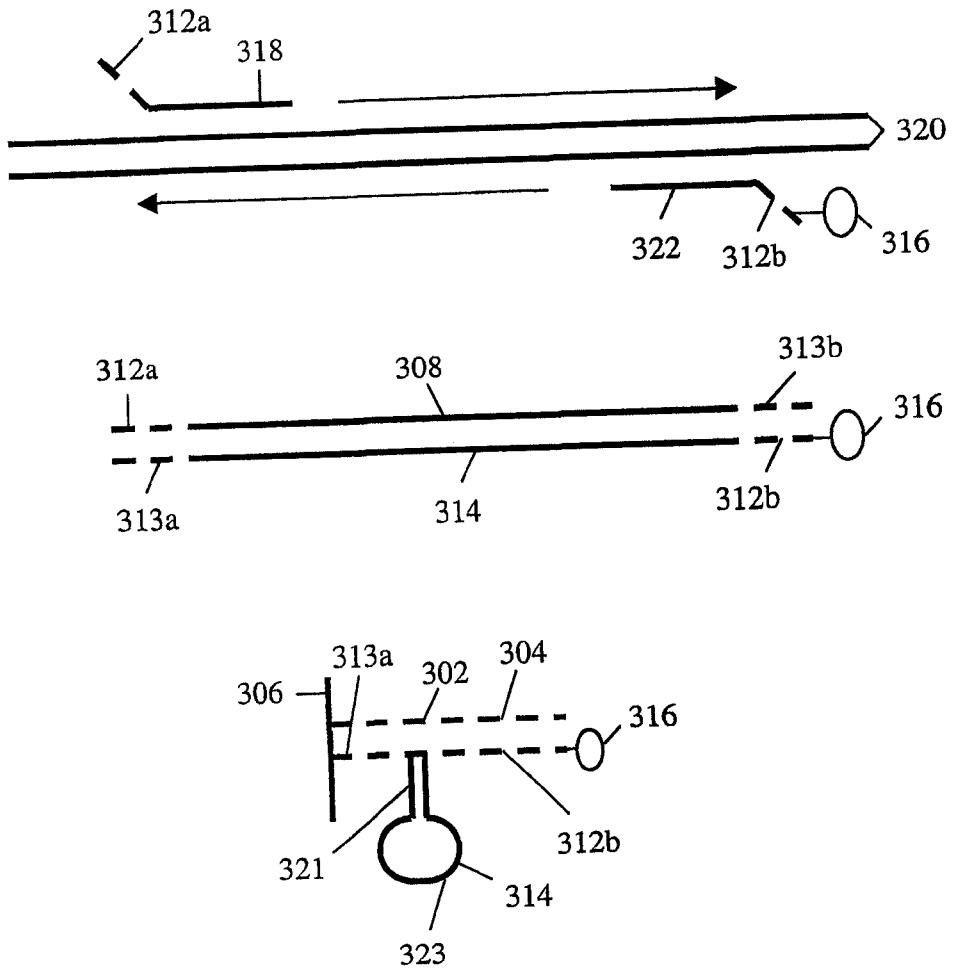


图 6

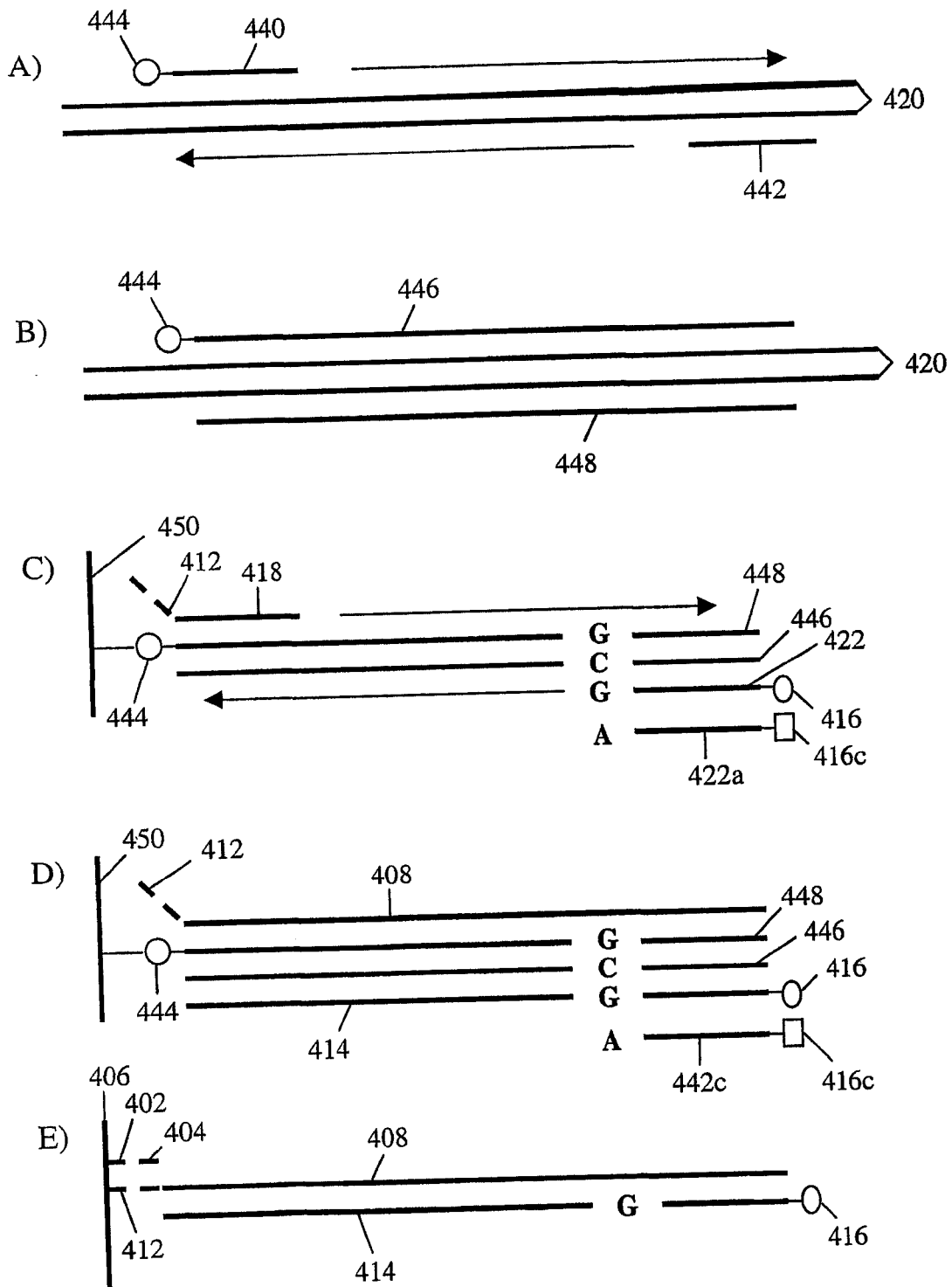


图 7

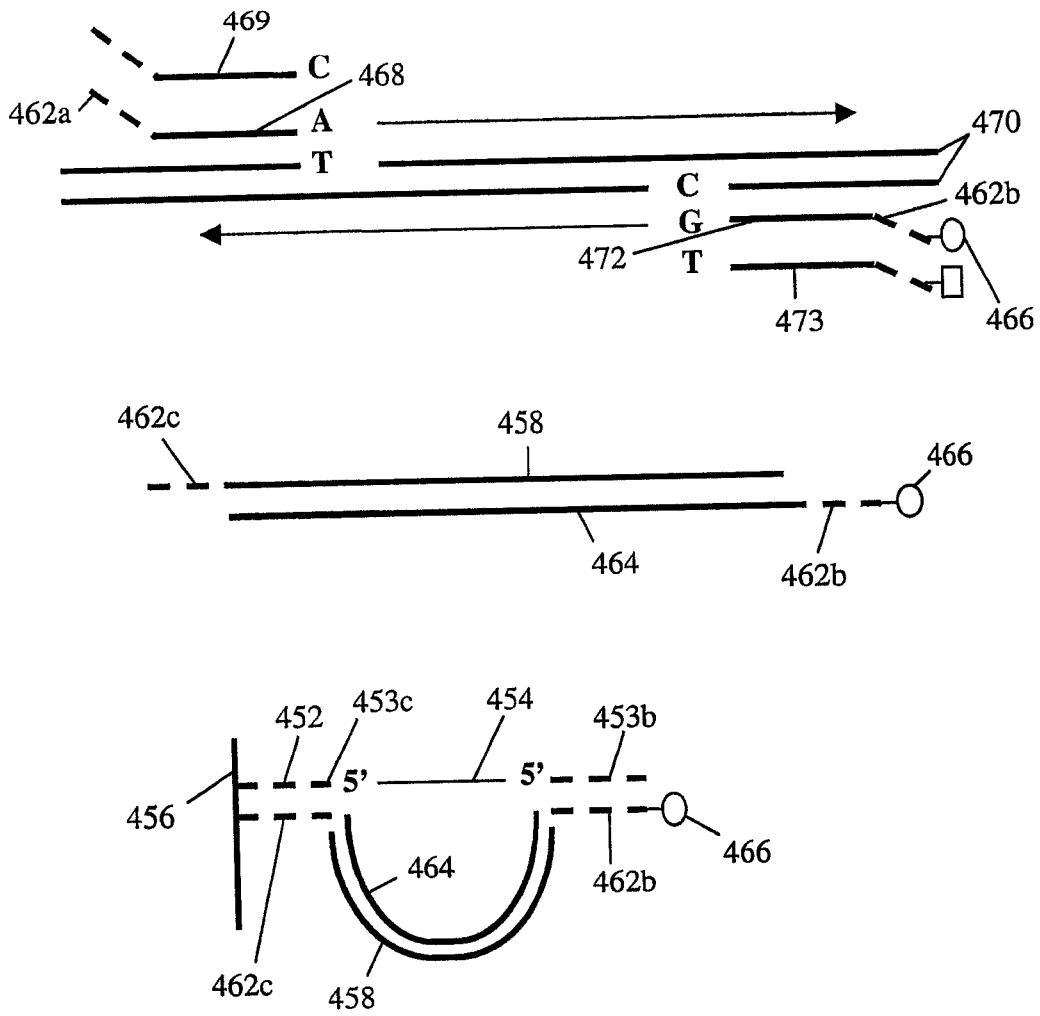


图 8

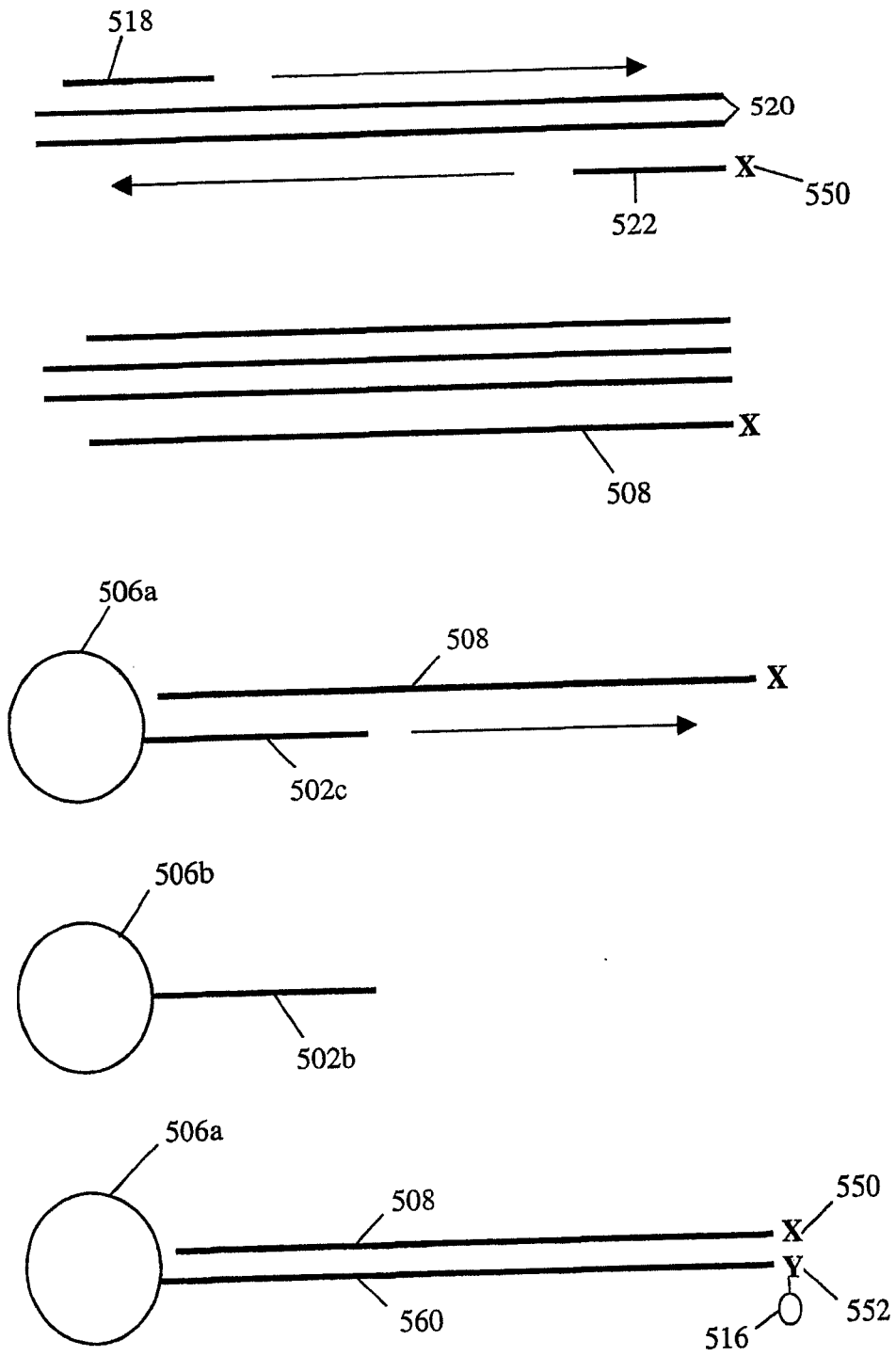


图 9

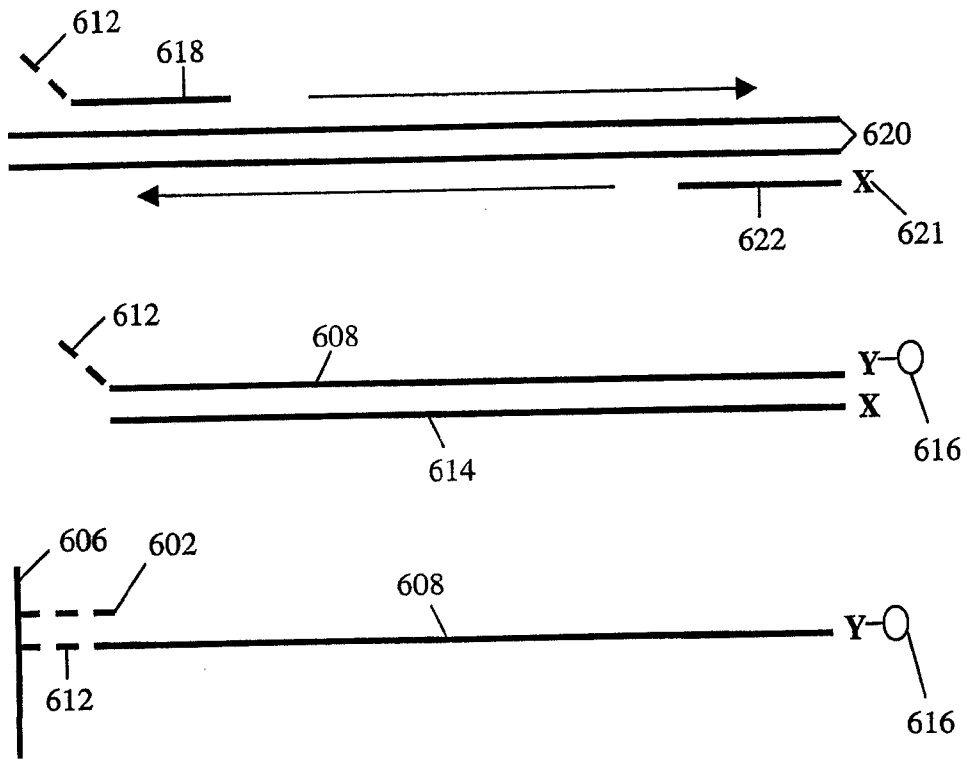


图 10

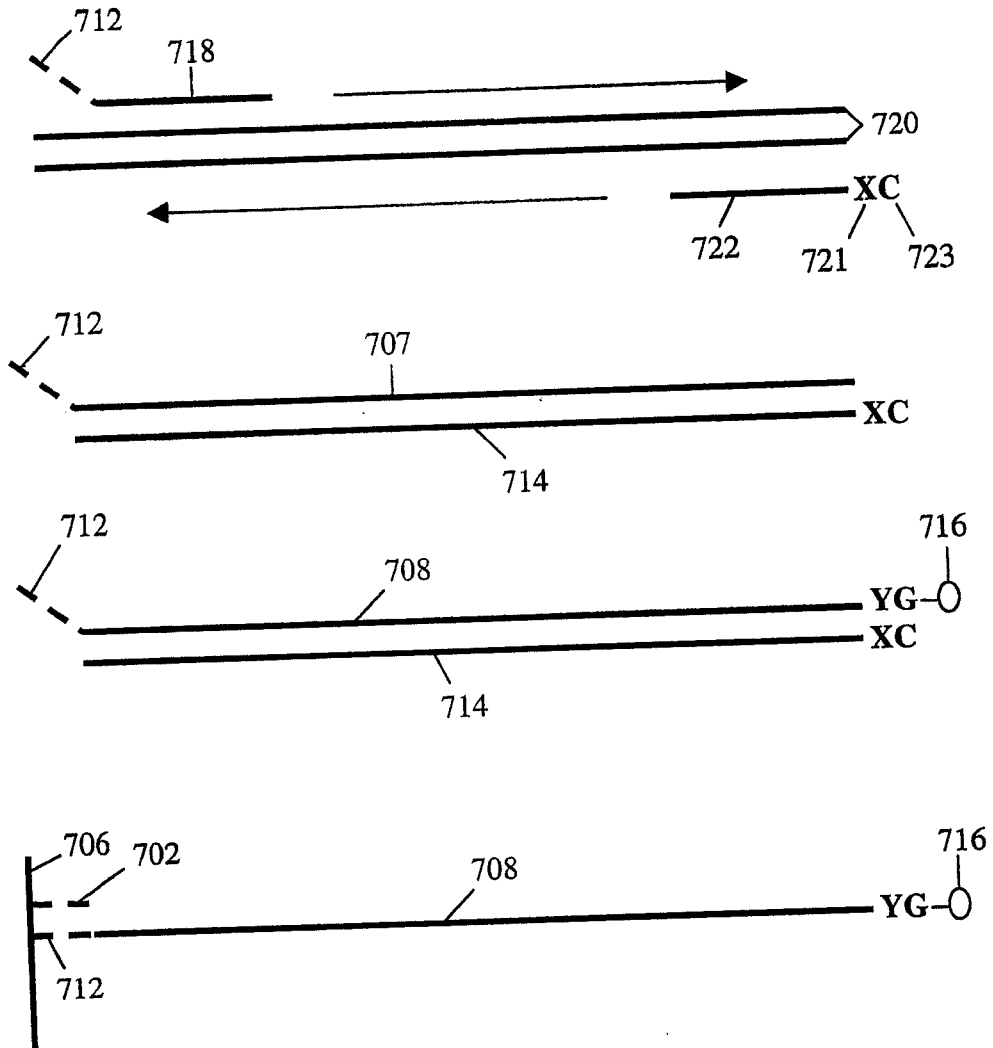


图 11

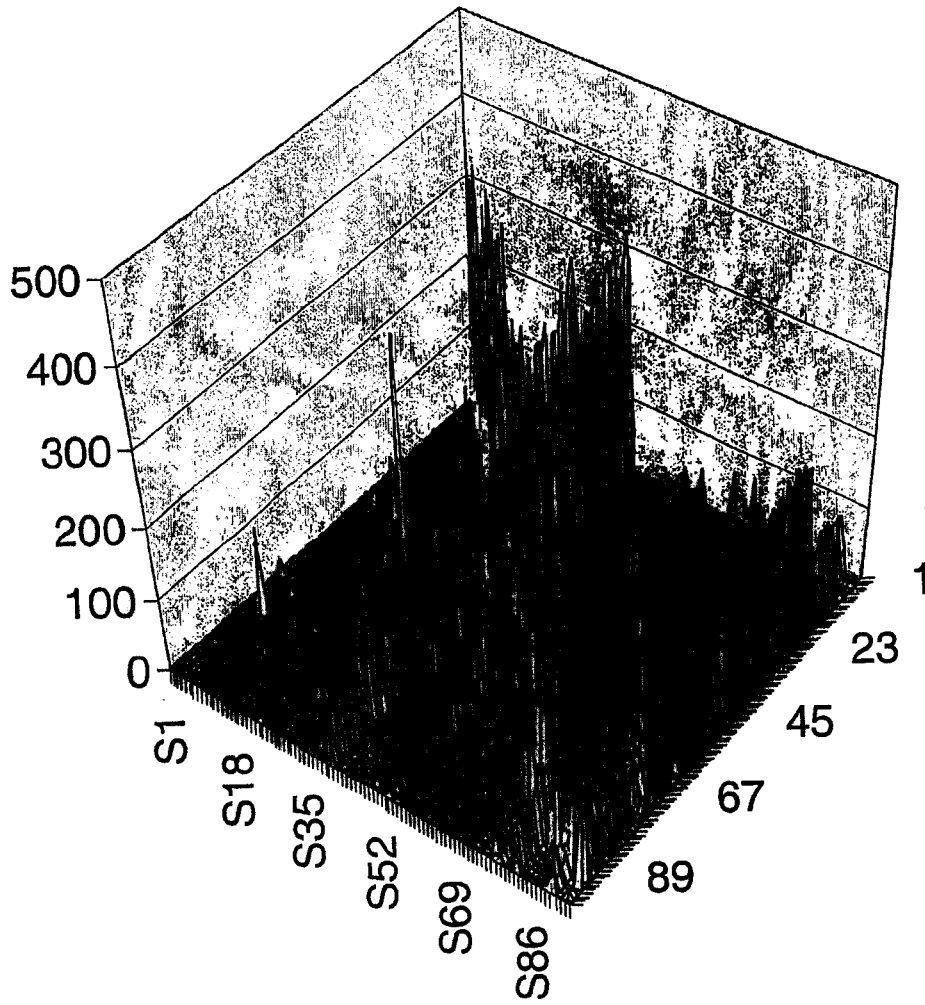


图 12

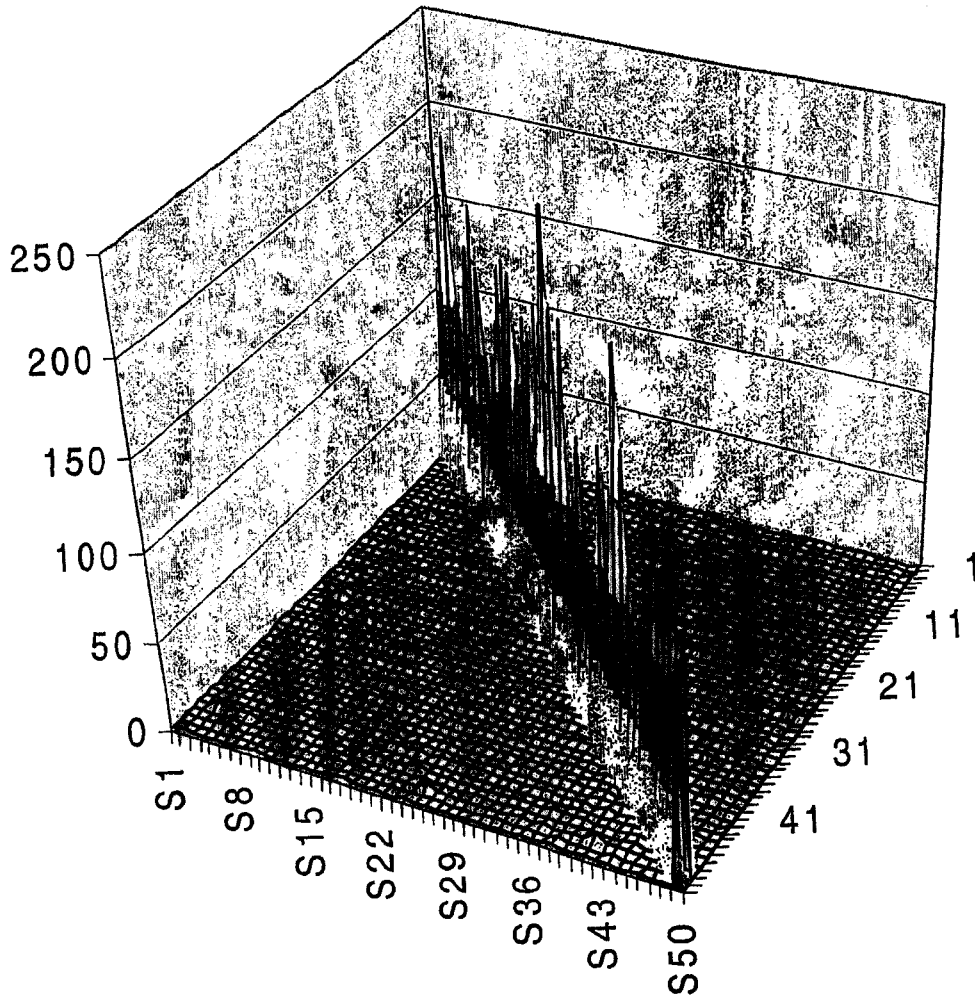


图 13

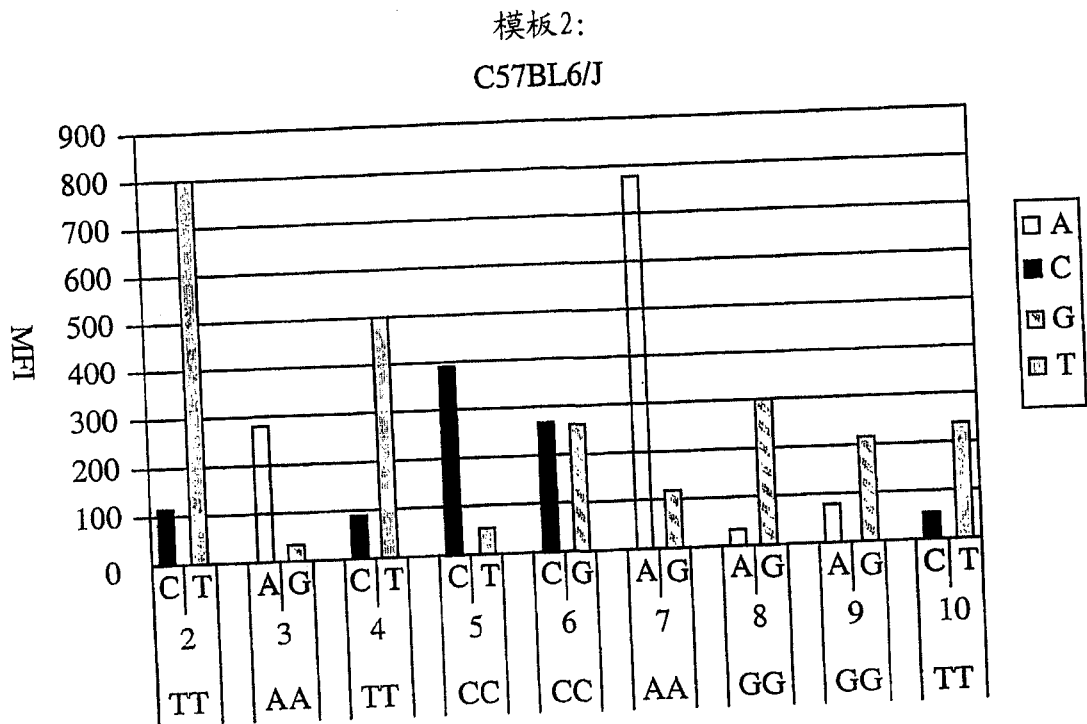
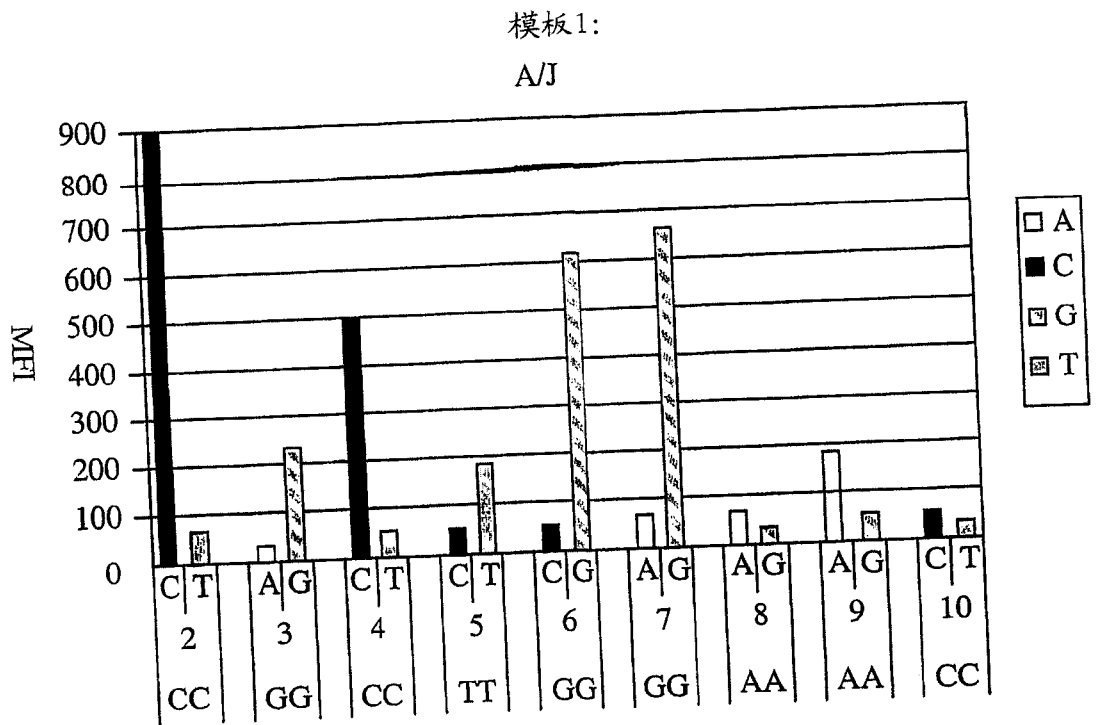


图 14

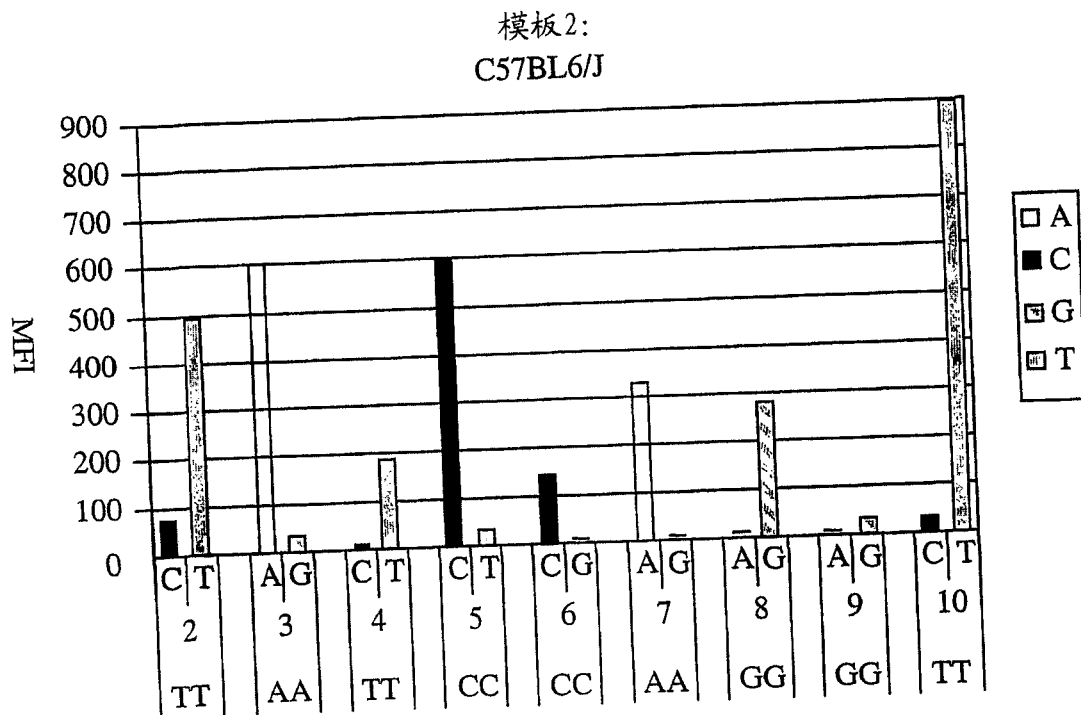
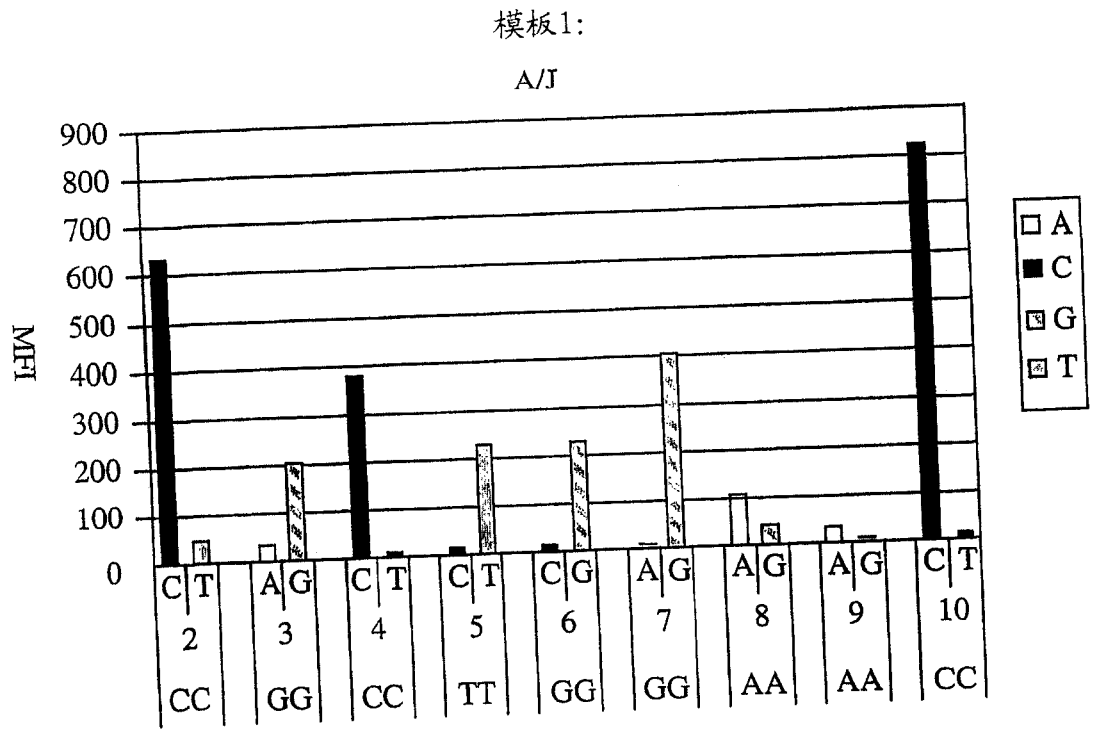


图 15a

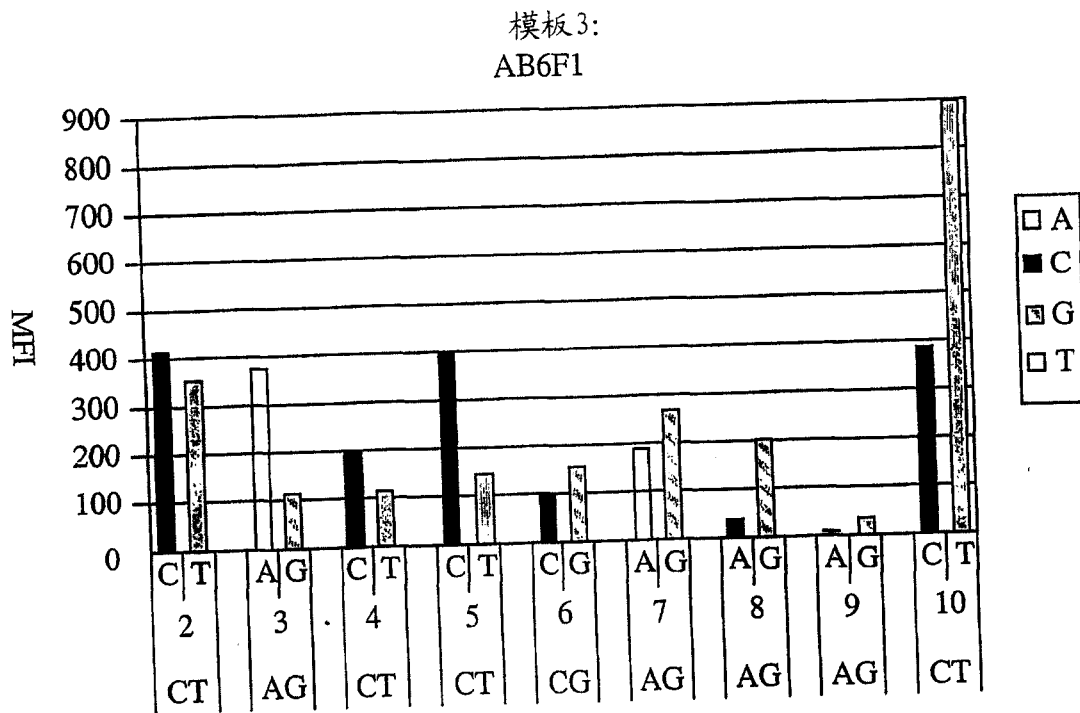


图 15b

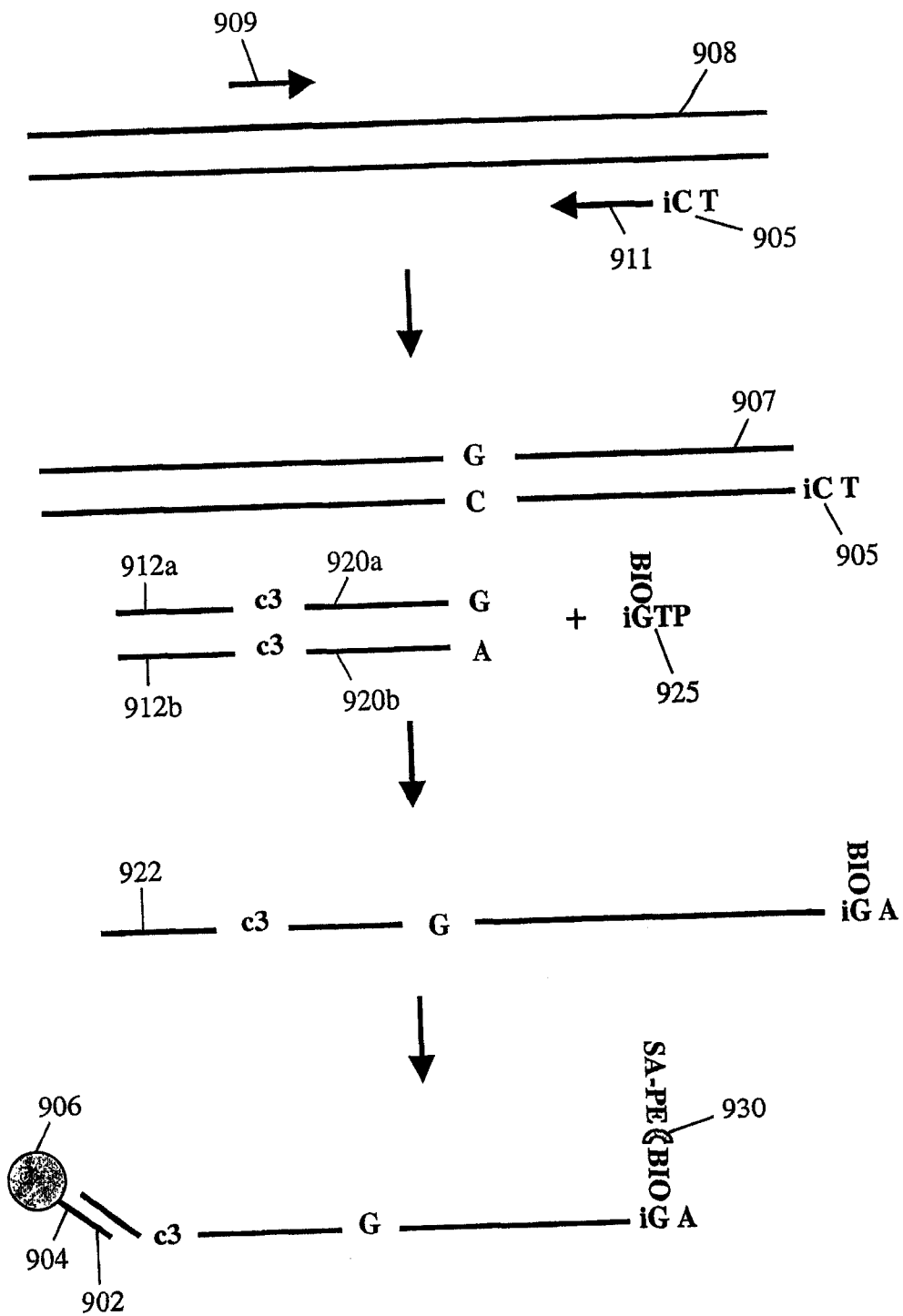


图 16

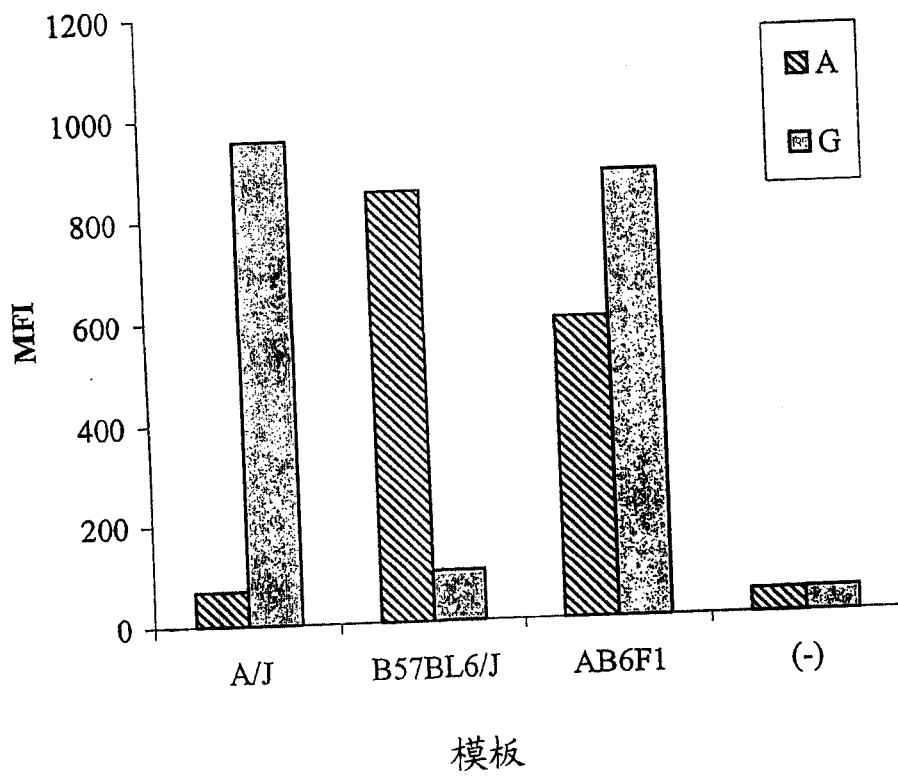


图 17