



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104693258 B

(45)授权公告日 2017.12.08

(21)申请号 201410692943.5

C09K 11/06(2006.01)

(22)申请日 2014.11.26

C12Q 1/68(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104693258 A

(56)对比文件

CN 103484106 A,2014.01.01,

WO 2008144315 A1,2008.11.27,

CN 102558535 A,2012.07.11,

(43)申请公布日 2015.06.10

(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

Qinglai Yang,等.Dynamic Covalent Diblock Copolymers: Instructed Coupling, Micellation and Redox Responsiveness.

《Macromolecules》.2014,第47卷第7431-7441页.

(72)发明人 沈玉梅 龚兵 谭连江 邵志峰

杨晴来 李小卫 姜玉 张震

审查员 严彤

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司

公司 31236

代理人 郭国中 陈少凌

(51)Int.Cl.

C07H 19/10(2006.01)

权利要求书5页 说明书27页

C07H 1/00(2006.01)

序列表2页 附图7页

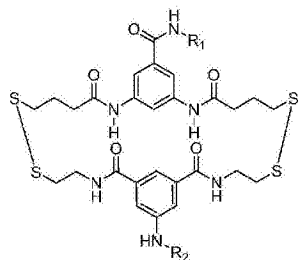
(54)发明名称

基于分子胶的荧光标记核苷酸及其在DNA测序中的用途

丹明、香豆素、咕吨、花青、苝、酞菁、alexa、squarene染料、产生能量转移染料的组合以及其衍生物中的一种。本发明的荧光标记核苷酸可用于DNA测序;同时,本发明荧光标记核苷酸的合成所需原料简单易得,可用于大规模推广使用,并且生物学评价结果表明该类可逆终端能完全满足高通量测序的生化反应所有要求,具备很好的实用前景。

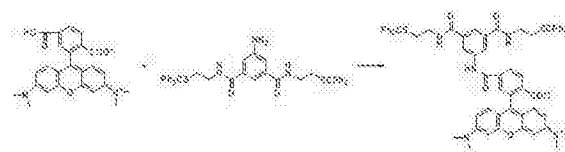
(57)摘要

本发明公开了一种基于分子胶的荧光标记核苷酸及其在DNA测序中的用途;所述荧光标记核苷酸的结构式如式(I)所示:



,其中,R1为

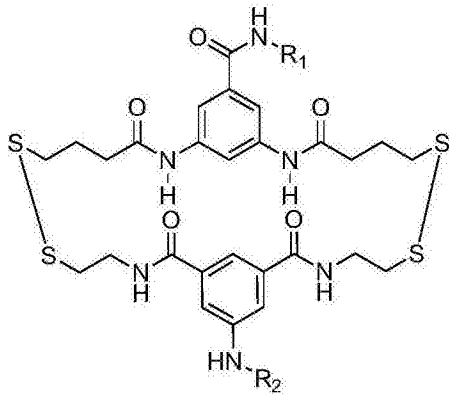
(I)



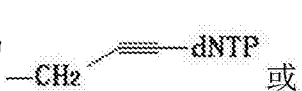
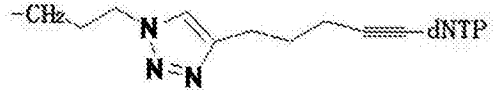
同的碱基的核苷三磷酸;荧光素选自BODIPY、罗


CN 104693258 B

1. 一种基于分子胶的荧光标记核苷酸, 其特征在于, 其结构式如式 (I) 所示:



(I),

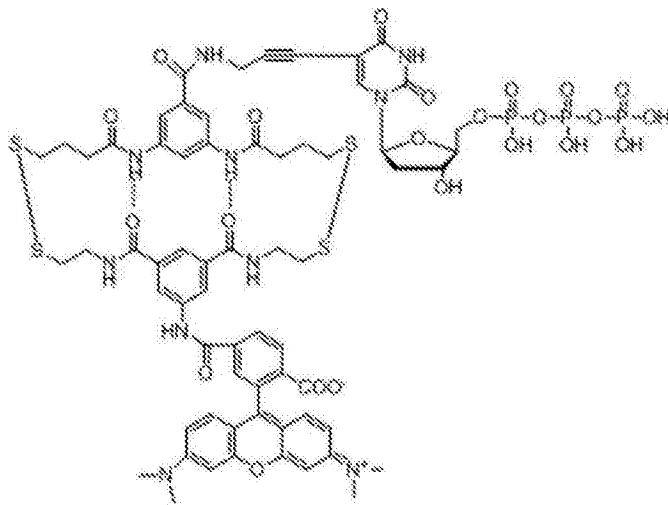
其中, R₁为  或  ;

R₂为荧光素或  ;

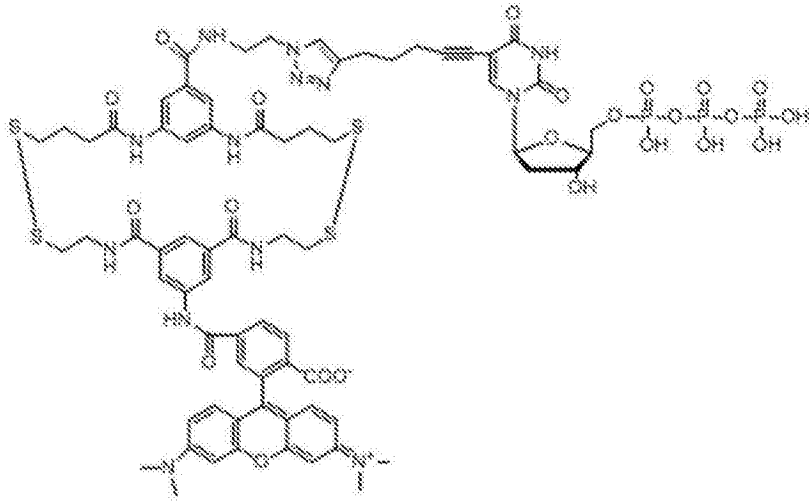
dNTP为核苷三磷酸, N为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶;

荧光素选自BODIPY、罗丹明、香豆素、咕吨、花青、芘、酞菁;

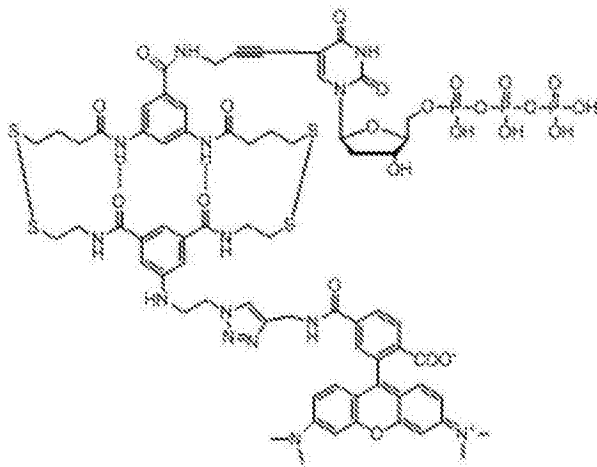
所述基于分子胶的荧光标记核苷酸选自



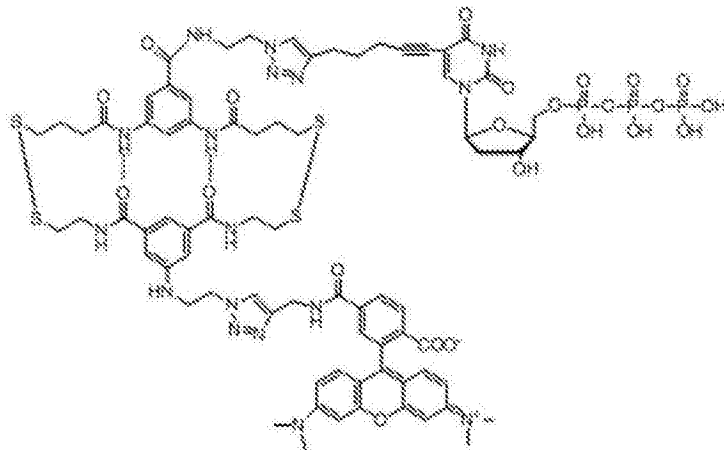
(II),



(III) ,

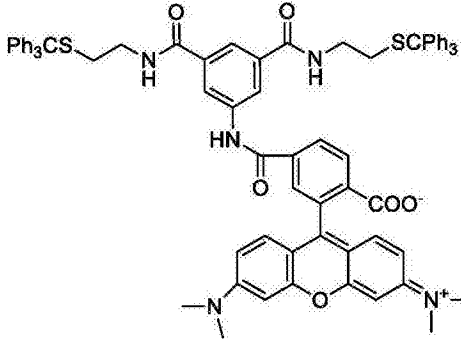
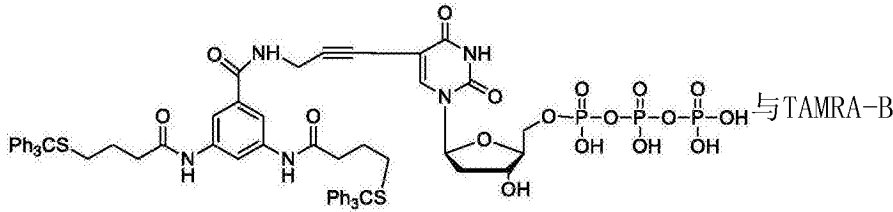


(IV) , 或



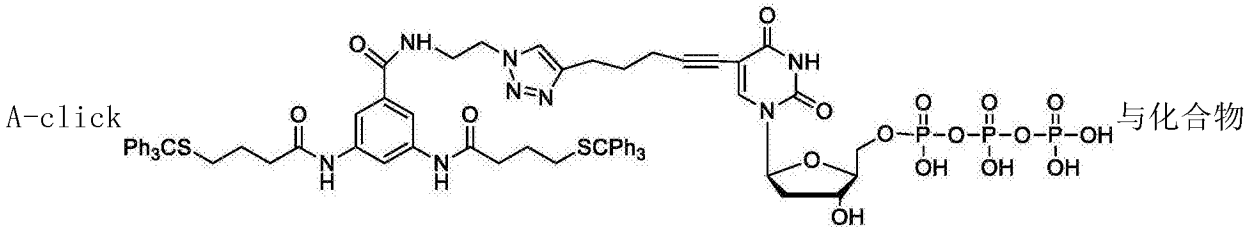
(V) 。

2. 一种根据权利要求1所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸的合成方法,其特征在于,所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式(II)所示时,其合成为:dUTP (AP₃) -A



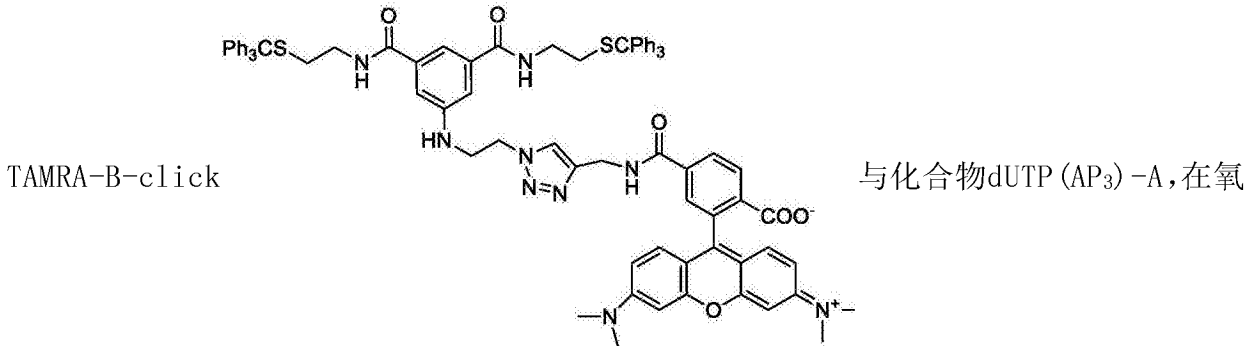
在氧化条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应,即得;

所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式 (III) 所示时,其合成为:化合物dUTP-



TAMRA-B,在氧化条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应生成双重二硫键,即得;

所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式 (IV) 所示时,其合成为:化合物



化条件下,发生氧化反应生成双重二硫键,即得;

所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式 (V) 所示时,其合成为:化合物 TAMRA-B-click与化合物dUTP-A-click,氧化条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应,生成双重二硫键,即得。

3. 根据权利要求2所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸的合成方法,其特征在于,

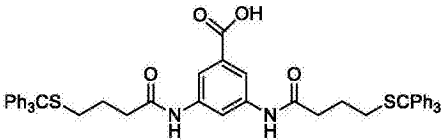
所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式 (II) 的合成中,化合物TAMRA-B与化合物 dUTP (AP₃)-A的摩尔比为3:1~3;

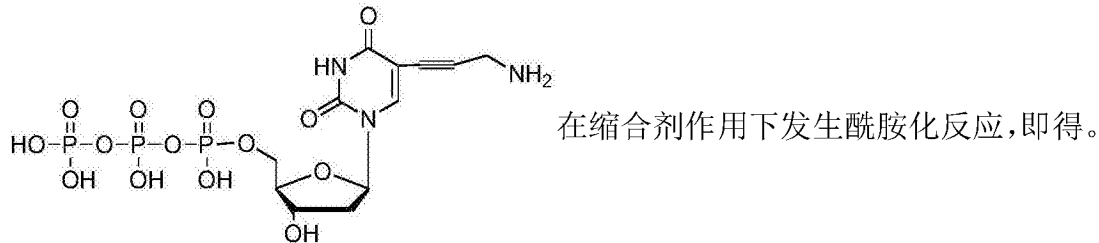
所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式 (III) 的合成中:化合物TAMRA-B与化合物 dUTP-A-click的摩尔比为3:1~3;

所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式 (IV) 的合成中:化合物TAMRA-B-click与化合物dUTP (AP₃)-A的摩尔比为3:1~3;

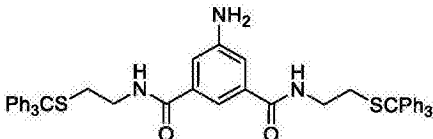
所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式(V)的合成中:所述化合物TAMRA-B-click和化合物dUTP-A-click的摩尔比为1:0.5~2。

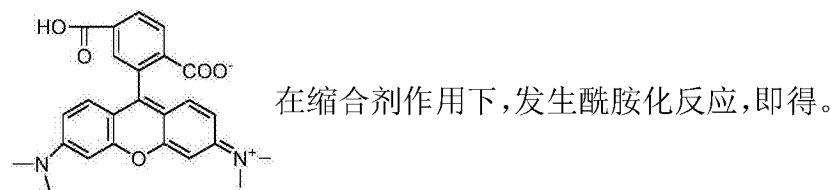
4. 根据权利要求2所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸的合成方法,其特征在于,所述

dUTP (AP₃) -A的合成为:化合物A  与化合物dUTP (AP₃)

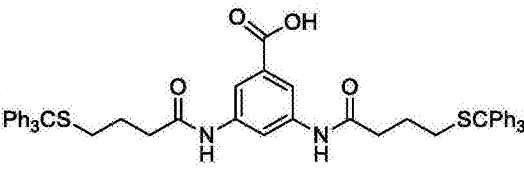
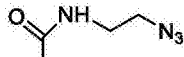
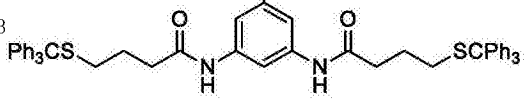


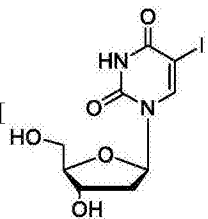
5. 根据权利要求2所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸的合成方法,其特征在于,所述

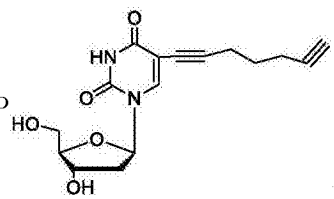
化合物TAMRA-B的合成为:化合物B  与荧光素TAMRA



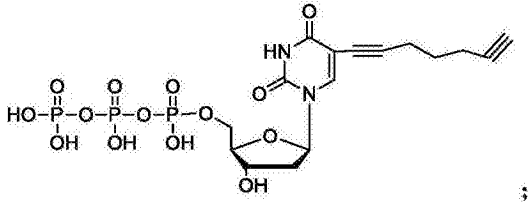
6. 根据权利要求2所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸的合成方法,其特征在于,所述

化合物dUTP-A-click的合成为:将化合物A  与2-叠氮乙胺  进行缩合反应,得化合物A-N₃  ;

将化合物dU-I  与1,6-庚二炔在催化剂作用下,进行交叉偶联反应反应,

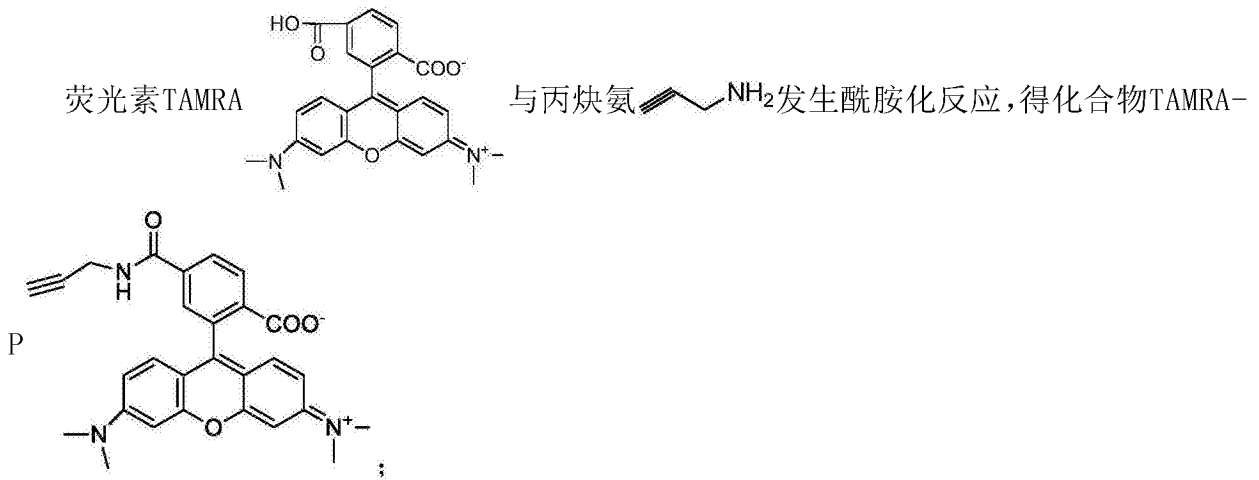
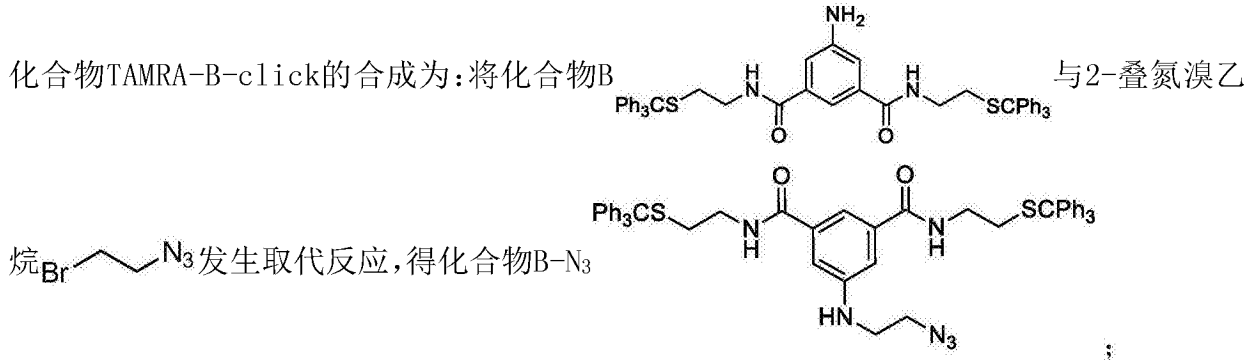
得化合物dU-P  ; 然后化合物dU-P与三正丁胺焦磷酸盐和2-氯-4H-1,

3,2-苯并二氧磷-4-酮共同作用下发生反应,得化合物dUTP-P



将化合物dUTP-P的炔基与化合物A-N₃发生点击化学反应,即得化合物dUTP-A-click。

7. 根据权利要求2所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸的合成方法,其特征在于,所述



化合物TAMRA-P与化合物B-N₃发生click反应,即得化合物TAMRA-B-click。

8. 一种根据权利要求1所述的基于分子胶的荧光标记核苷酸在非诊断和治疗目的的DNA测序中的用途。

基于分子胶的荧光标记核苷酸及其在DNA测序中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及化学合成和生物化学领域,具体涉及一类基于分子胶的荧光标记核苷酸及其在DNA测序中的用途。

背景技术

[0002] DNA测序技术是现代生命科学和医学研究的重要手段之一。DNA测序从1977年的Sanger测序技术(一代测序)开始,在三十几年的时间里,飞速发展。测序的通量大幅提高而成本急剧下降,有人甚至认为其发展的速度打破了半导体工业界已有的摩尔定律预算的速度。二代高通量平行测序技术的出现是测序技术飞速发展的集中体现。采用第一代测序技术,人类基因组计划(HGP)耗资30亿美元完成人整个基因组(30亿个碱基)的序列测定。而目前的二代测序的最新技术仅需5000美元左右就能完成人整个基因组测序。

[0003] 虽然如此,二代测序的成本和技术方面依然存在不足,不能满足基础科学和临床医学对测序的要求。单分子测序技术(三代测序技术)应运而生。三代测序技术的核心是直接对单个DNA分子进行测序,不做任何的DNA扩增反应,从而减少成本,提高通量。单分子测序技术虽然已有商业化产品,但是都还存在技术上的难点,未能大规模应用。

[0004] 目前市场上的高通量测序平台被少数几家国外产品所垄断,尤其令人忧虑的是,国外公司凭借对测序试剂的控制,几乎完全控制了国内的测序市场,即便是测序硬件上我们能有所突破,在测序试剂等配套产品上我们还将受制于人。因此,自主研发可适用于二代测序甚至是三代测序平台的测序试剂,将对改变目前的市场格局、建立我国自主的测序平台具有战略性的意义。近年来,我们发现基于氢键序列特异性作用下形成二硫键化合物时,其交叉偶联反应产物的选择性很高,而自身偶联产物得到了有效抑制。该方法用于合成含二硫键两亲性嵌段共聚物及其自组装胶束已取得较好效果。但是将该方法用于连接小分子化合物时,却遇到了一系列困难,首先反应的选择性很差,通过对反应条件的反复筛选和优化,最终得到了在特定的条件下连接特定小分子化合物时,仍然能得到良好选择性的交叉偶联产物。在这种情况下,才有可能将其应用于DNA测序以及其它领域。

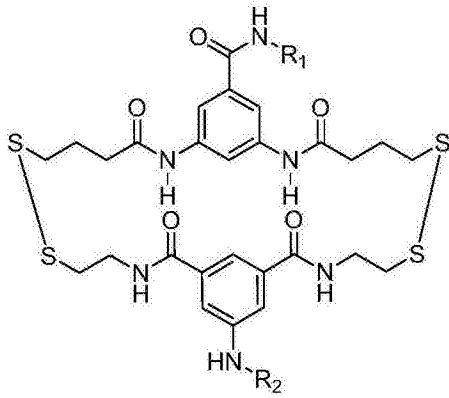
发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一类基于分子胶的荧光标记核苷酸及其在DNA测序中的用途;该基于分子胶的荧光标记核苷酸作为可逆终端具有氧化还原敏感特性。本发明在前期工作基础上,通过多学科交叉,首先合成了新型荧光标记核苷酸,并发展基于该新型核苷酸的DNA延伸反应,实现可用于DNA测序的试剂。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0007] 第一方面,本发明涉及一种基于分子胶的荧光标记核苷酸,其结构式如式(I)所示:

[0008]



(I) ;

[0009]

其中, R₁为



[0010]

R₂为荧光素或



[0011]

dNTP为核苷三磷酸, N为腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶;

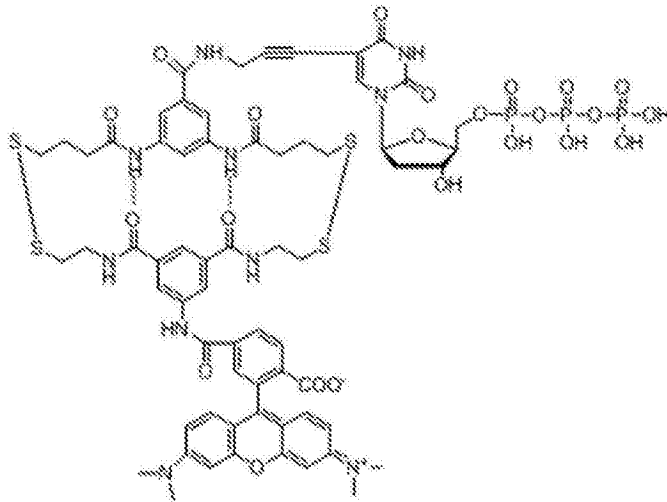
[0012]

荧光素选自BODIPY、罗丹明、香豆素、咕吨、花青、苝、酞菁、alexa、squarene染料、产生能量转移染料的组合及其衍生物。

[0013]

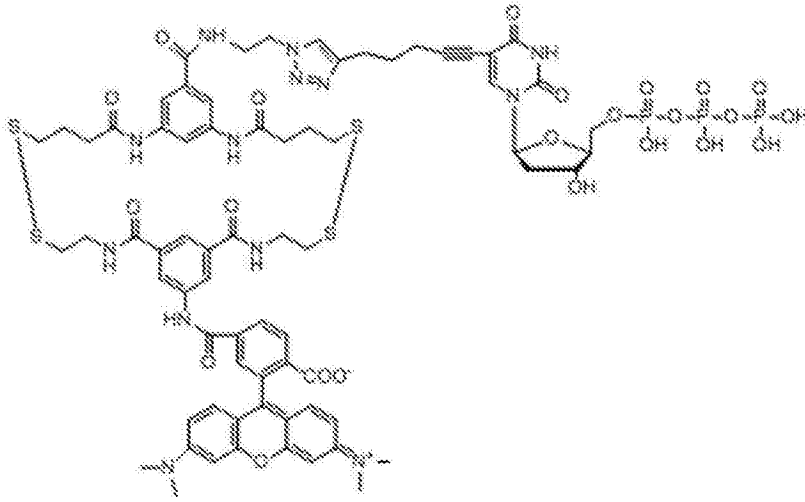
优选地, 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸选自

[0014]

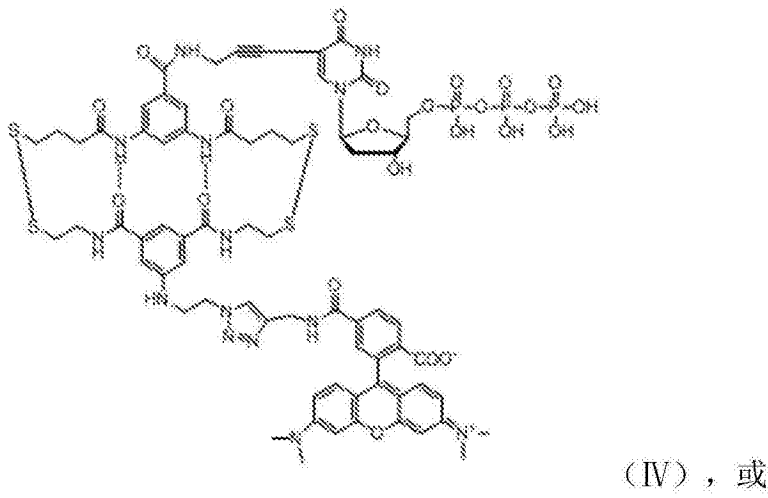


(II) ,

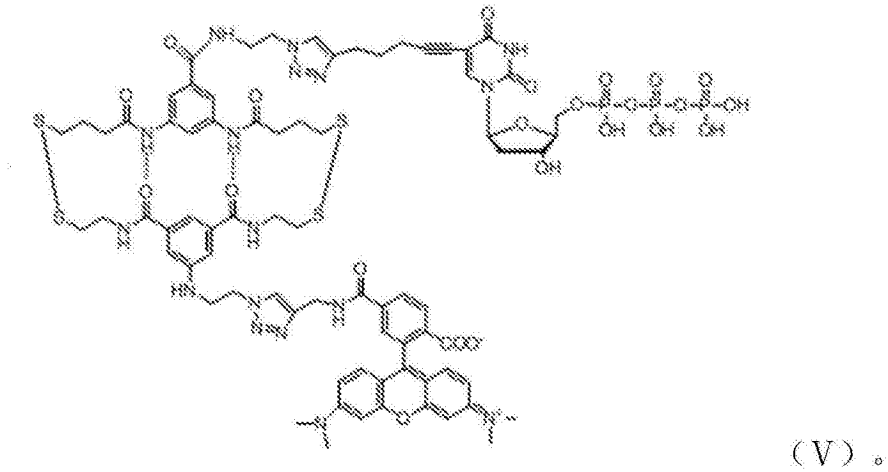
[0015]



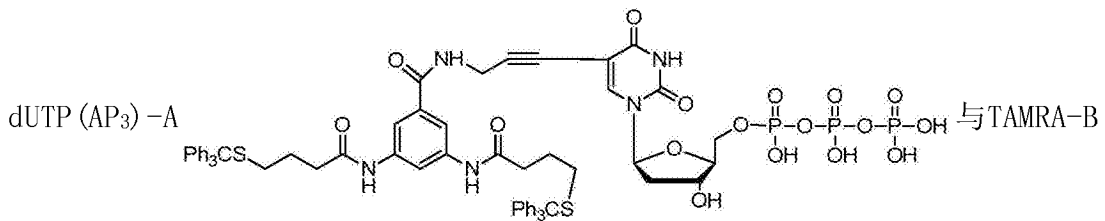
[0016]

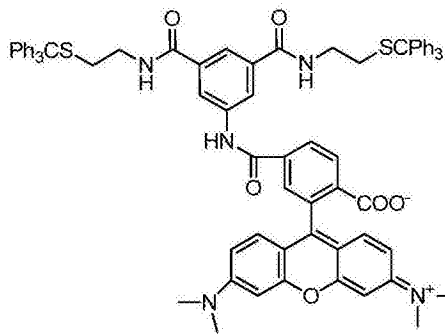


[0017]



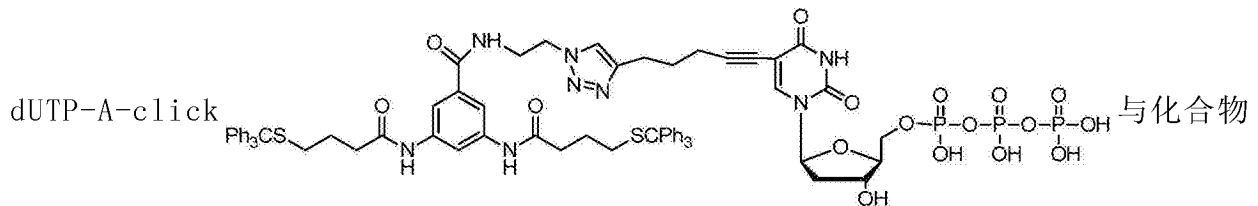
[0018] 优选地,所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式(II)所示时,其合成为:





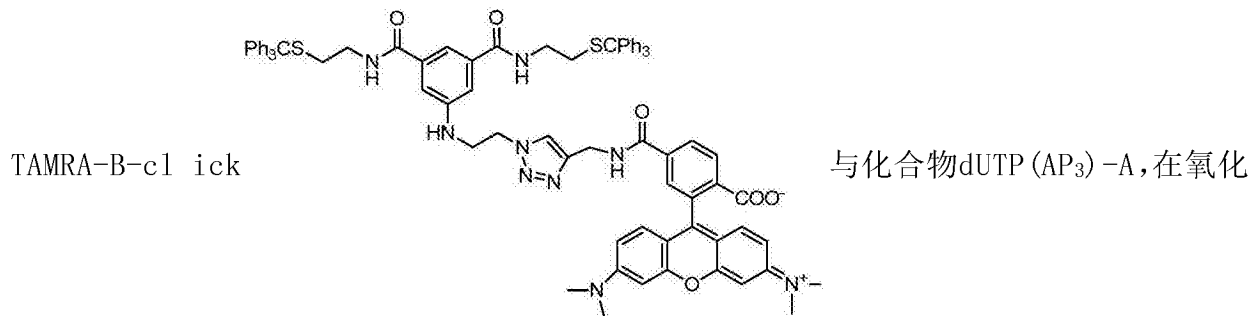
在氧化条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应,即得;

[0019] 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式(III)所示时,其合成为:化合物



TAMRA-B,在氧化条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应生成双重二硫键,即得;

[0020] 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式(IV)所示时,其合成为:化合物



条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应生成双重二硫键,即得;

[0021] 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸的结构式如式(V)所示时,其合成为:化合物 TAMRA-B-click与化合物dUTP-A-click,氧化条件下,发生脱三苯基甲基共聚反应生成双重二硫键,即得。

[0022] 优选地,所述氧化条件具体指碘的有机溶剂溶液条件;碘的有机溶剂溶液中碘的浓度为6.0mM;所述有机溶剂为二氯甲烷。

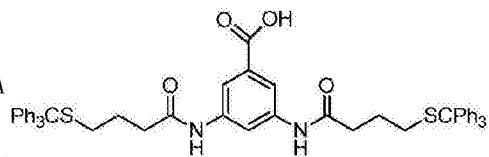
[0023] 优选地,所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式(II)的合成中,化合物TAMRA-B与化合物dUTP(AP₃)-A的摩尔比为3:(1~3);

[0024] 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式(III)的合成中,化合物TAMRA-B与化合物dUTP-A-click的摩尔比为3:(1~3);

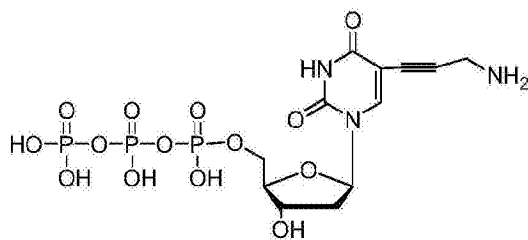
[0025] 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式(IV)的合成中,化合物TAMRA-B-click与化合物dUTP(AP₃)-A的摩尔比为3:(1~3);

[0026] 所述基于分子胶的荧光标记核苷酸结构式(V)的合成中,化合物TAMRA-B-click和化合物dUTP-A-click的摩尔比为1:(0.5~2)。

[0027] 优选地,所述dUTP (AP₃)-A的合成:化合物A



与化合物dUTP (AP₃)

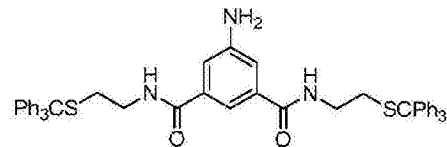


在缩合剂作用下,发生酰胺化反

应,即得。

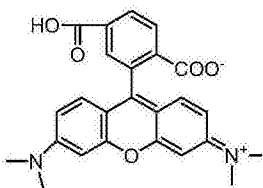
[0028] 优选地,所述缩合剂包括DCC;所述化合物A与化合物dUTP (AP₃) 的摩尔比为1:1;所述酰胺化反应的条件为:冰水浴搅拌下向化合物A中加入dUTP (AP₃),然后升温至室温,反应时间为10h。

[0029] 优选地,所述化合物TAMRA-B的合成:化合物B



与荧光素TAMRA

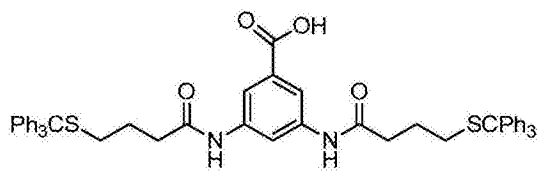
[0030]



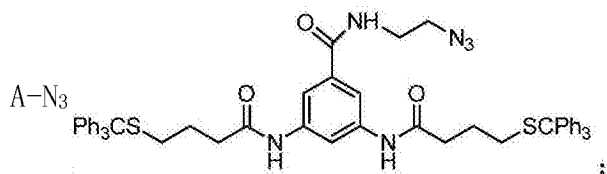
[0031] 在缩合剂作用下,发生酰胺化反应,得到化合物TAMRA-B。

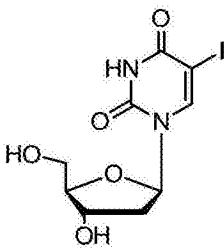
[0032] 优选地,所述缩合剂包括DCC;所述化合物B与荧光素TAMRA的摩尔比为3:2;所述酰胺化反应的条件为:化合物B与荧光素TAMRA在冰水浴氮气保护下加入与荧光素TAMRA当量的,搅拌升温至35℃,反应10h。

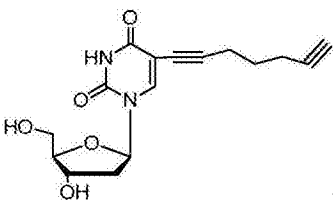
[0033] 优选地,所述化合物dUTP-A-click的合成:将化合物A



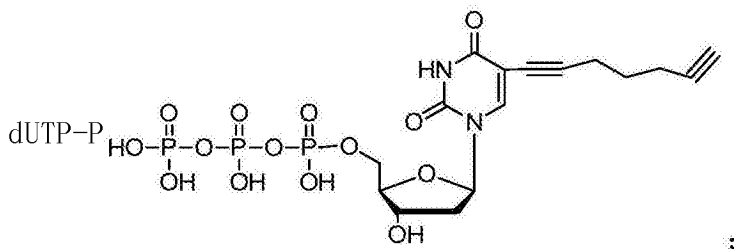
与2-叠氮乙胺N₃-CH₂-CH₂-NH₂ 进行缩合反应,得化合物



[0034] 将化合物dU-I  与1,6-庚二炔在催化剂作用下,进行交叉偶联反

应(sonogashira反应),得化合物dU-P  然后化合物dU-P与三正丁

胺焦磷酸盐和2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮共同作用下发生磷酸化反应,得化合物



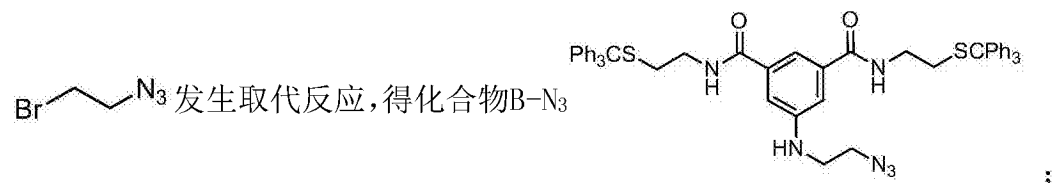
[0035] 将化合物dUTP-P的炔基与化合物A-N₃发生click(点击化学反应)反应,得化合物dUTP-A-click。


[0036] 优选地,在化合物A-N₃合成中,化合物A与2-叠氮乙胺的摩尔比为1:15;所述缩合反应的条件为:在冰水浴条件下,向化合物A中加入2-叠氮乙胺,搅拌升温至室温,反应时间为8h;

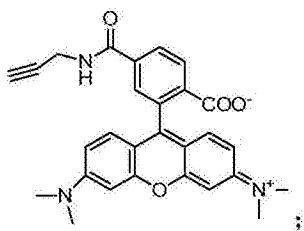
[0037] 优选地,在化合物dU-P合成中,所述化合物dU-P的合成中,化合物dU-I和1,6-庚二炔的摩尔比为1:(2~3);所述催化剂为CuI和Pd(PPh₃)₄。

[0038] 在化合物dUTP-A-click合成中,化合物dUTP-P的炔基与化合物A-N₃的浓度为1:1。

[0039] 优选地,所述化合物TAMRA-B-click的合成:将化合物B与2-叠氮溴乙烷



[0040] 将荧光素TAMRA与丙炔氨  发生酰胺化反应,得化合物TAMRA-P



[0041] 化合物TAMRA-P与化合物B-N₃发生click反应,得到化合物TAMRA-B-click。

[0042] 优选地,化合物B-N₃合成中,二叠氮溴乙烷与化合物B的摩尔比为4:3;所述取代反

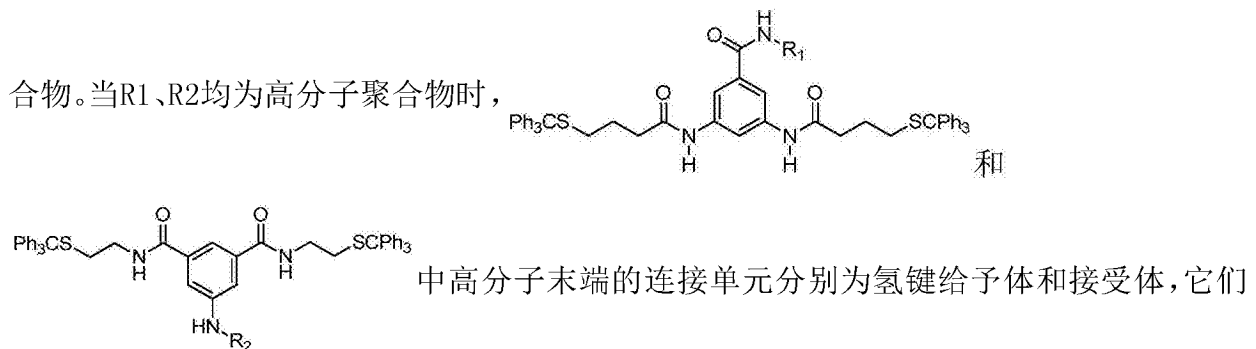
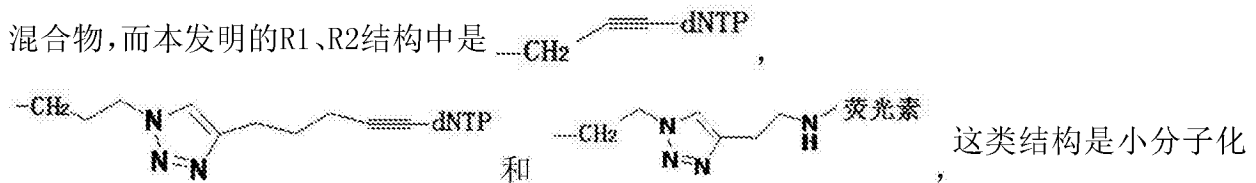
应具体为：二叠氮溴乙烷与化合物B于冰水浴和氮气保护条件下加入N-甲基吗啉、DMF，120℃反应18h，二氯甲烷萃取、旋蒸即得。

[0043] 在化合物TAMRA-P合成中，所述荧光素TAMRA与2-叠氮乙胺的摩尔比为2:3；所述酰胺化反应具体为：冰水浴下氮气保护下，向TAMRA，HATU (2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯)、丙炔氨中加入NMM (N-甲基吗啉)、DMF搅拌1h后升温至35℃，反应24h，反应液倒入无水乙醚中沉淀，离心即得。

[0044] 在化合物TAMRA-B-click合成中，所述click反应具体为：a、在氮气保护下，将等当量的TAMRA-P和B-N₃溶于适量溶剂THF，反应进行；b、将0.6倍当量的无水CuSO₄固体和2倍当量的抗坏血酸钠(VcNa)混合，抽真空，加入去离子水震荡得黄色悬浊液，注入步骤a反应液，室温搅拌36h旋蒸除去溶剂THF，HPLC分离，即得。

[0045] 本发明还涉及一种前述的基于分子胶的荧光标记核苷酸在DNA测序中的用途。

[0046] 本发明结构式(I)中，R1和R2均为非高分子基团，与R1,R2都是高分子聚合物(如：聚乙二醇，聚乳酸，壳聚糖等)不同，高分子聚合物是具一定分子量分布的大分子化合物的混合物，而本发明的R1、R2结构中是



在反应溶液中形成基于氢键序列特异性组合的中间体，该类中间体结构受到高分子长链的支撑作用形成了稳定的组合中间体，而自身偶联形成的中间体，其氢键序列是不匹配的，从而在溶液中也是不稳定的。然后在碘的氧化作用下会很容易形成目标产物，即交叉偶联产物。然而当R1、R2为小分子化合物时，形成的基于氢键序列的组合中间体由于分子量太小，相互之间碰撞反应的几率增加，从而选择性降低，增加了基于氢键序列小分子化合物合成的难度，本发明在克服了相关技术难题的基础上完成技术方案。

[0047] 与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

[0048] (1) 本发明合成了一类新的可逆终端，可用不同的荧光素分别标记含四种不同核苷酸(A,G,C,U)的可逆终端，在高通量测序的生化反应中，与只用一种荧光素标记的四种核苷酸反应体系相比较，在同样的条件下可以将生化反应的时间缩短4倍；检测时间缩短对于高通量测序结果的准确率非常重要，因为随着反应时间的延长，测序体系中的模板DNA会部分降解，导致噪声增加，降低测序准确率；

[0049] (2) 本发明提供的新的可逆终端，合成所需原料简单易得，合成过程温和，可用于大规模推广使用；

[0050] (3) 本发明提出了一种新的二硫键可逆终端及其合成方法,常规的二硫键可逆终端均采用荧光素与核苷酸通过二硫键直接相连,这种文献已经报道的可逆终端在参与DNA链延伸反应时,由于位阻太小,一次延伸反应可延伸多个可逆终端,而本发明提出的新的可逆终端在合适的DNA聚合酶作用下,一次延伸反应只能有一个可逆终端参与DNA链延伸反应,从而有效避免了多个核苷酸的延伸,这一点对DNA测序非常重要;另外利用分子胶合成分子骨架含二硫键的化合物是一种高选择性、高特异性的反应,可以先分别合成含核苷酸与荧光素的化合物片段,然后在碘溶液中室温搅拌即可得到交叉偶联产物,而自身偶联产物能得到有效抑制;再次,该方法为二硫键可逆终端的合成提出了一种全新的方法,不但避免了使用昂贵的试剂,而且简化了合成过程中对反应条件的严格控制,并且可大量制备。

附图说明

[0051] 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。

[0052] 图1为TAMRA-B的合成过程示意图;

[0053] 图2为dUTP-A-click的合成过程示意图;

[0054] 图3为TAMRA-B-click的合成过程示意图;

[0055] 图4为dUTP (AP3) -A的合成过程示意图;

[0056] 图5为实施例1的可逆终端的合成过程示意图;

[0057] 图6为实施例2的可逆终端的合成过程示意图;

[0058] 图7为实施例3的可逆终端的合成过程示意图;

[0059] 图8为实施例4的可逆终端的合成过程示意图;

[0060] 图9 (a) 为DNA链延伸反应PAGE电泳图, (b) 为断裂反应荧光扫描结果示意图;

[0061] 其中,M为DNA marker,1为对照模板,2为DNA链延伸反应阳性对照,3为含可逆终端的链延伸产物10 μ M DTT室温作用2h的断裂,4为含可逆终端的链延伸产物8mM DTT室温作用2h的断裂,5~9分别为含可逆终端的链延伸产物10mM DTT室温作用10min、20min、30min、1h和2h的断裂;

[0062] 注:对于可逆终端II,III,IV,V的DNA链延伸产物,它们的断裂效果均适用于该实验结果;

[0063] 图10为含有二硫键可逆终端的DNA链延伸产物在10mM DTT不同作用时间下的断裂测试结果;

[0064] 其中, (a) 为DNA链延伸反应PAGE电泳图, (b) 为断裂反应荧光扫描结果示意图,其中,M为DNA marker,1为对照模板,2为DNA链延伸反应阳性对照,3~7分别为含有二硫键可逆终端链延伸产物10mM DTT分别处理3min、5min、8min、10min和15min的断裂;

[0065] 注:对于可逆终端II,III,IV,V的DNA链延伸产物,它们的断裂效果均适用于该实验结果;

[0066] 图11为含有二硫键可逆终端的DNA链延伸产物分别在20、30mM DTT不同作用时间下的断裂测试结果;

[0067] 其中, (a) 为PAGE电泳图, (b) 为荧光扫描结果示意图,M为DNA marker,4为对照模板,6为DNA链延伸反应阳性对照,1~3分别为含有二硫键可逆终端链延伸产物20mM DTT分

别处理8min、5min和3min的断裂,7~8分别为含有二硫键可逆终端链延伸产物30mM DTT分别处理3min和5min的断裂;

[0068] 注:对于可逆终端II,III,IV,V的DNA链延伸产物,它们的断裂效果均适用于该实验结果;

[0069] 图12A、B均为对比例中本领域常规的将荧光素与核苷酸通过二硫键直接相连而形成的二硫键荧光标记核苷酸dUTP-SS-TAMRA的DNA链延伸反应图;

[0070] 1:引物(Oligo 2,5'-带荧光基团,25nt),

[0071] 2:引物(Oligo 2,5'-带荧光基团,24nt),

[0072] 3:dUTP (dUTP-SS-T,模板1)插入,

[0073] 4:dUTP (dUTP-SS-T,模板2)插入,

[0074] 5:dUTP (dUTP-SS-T,模板3)插入,

[0075] 6:dUTP (dUTP-SS-T,模板4)插入,

[0076] 7:dUTP (dUTP-SS-T,模板5)插入,

[0077] 8-9:dUTP (dUTP,模板5)插入;

[0078] 图13为对比例中本发明结构式III所示可逆终端的DNA链延伸反应电泳图;

[0079] 其中,2:(Oligo 2,5'-带荧光基团,24nt),3:dUTP(结构式III,模板1)链延伸反应,

4:dUTP(结构式III,模板2)链延伸,5:dUTP(结构式III,模板3)链延伸;

[0080] 图14CH₃-A-B-CH₃的¹H-NMR谱图;

[0081] 图15CH₃-A-B-CH₃的¹H,¹H-NOSEY NMR谱图。

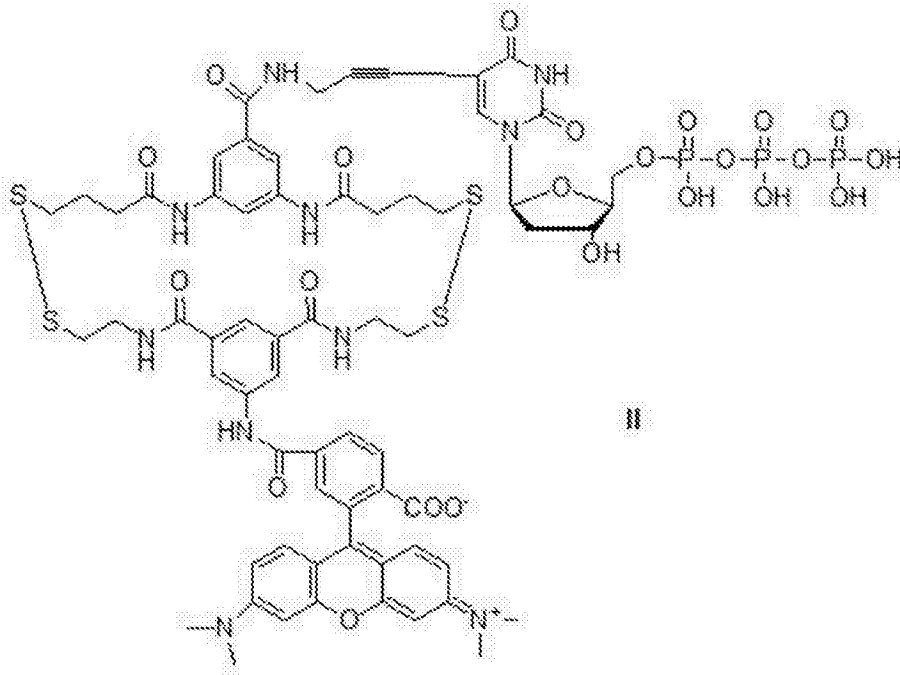
具体实施方式

[0082] 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。本发明所用的原料、试剂均为市售AR、CP级。本发明所得中间产物及最终产物采用NMR等进行表征;本发明的可逆终端的总合成过程示意图如图1所示;是采用四种不同的荧光素分别标记含四种不同核苷酸(A、G、C、U)的可逆终端。

[0083] 实施例1

[0084] 本实施例涉及一种基于分子胶的荧光标记核苷酸,即结构式为下式(II)所示的可逆终端:

[0085]

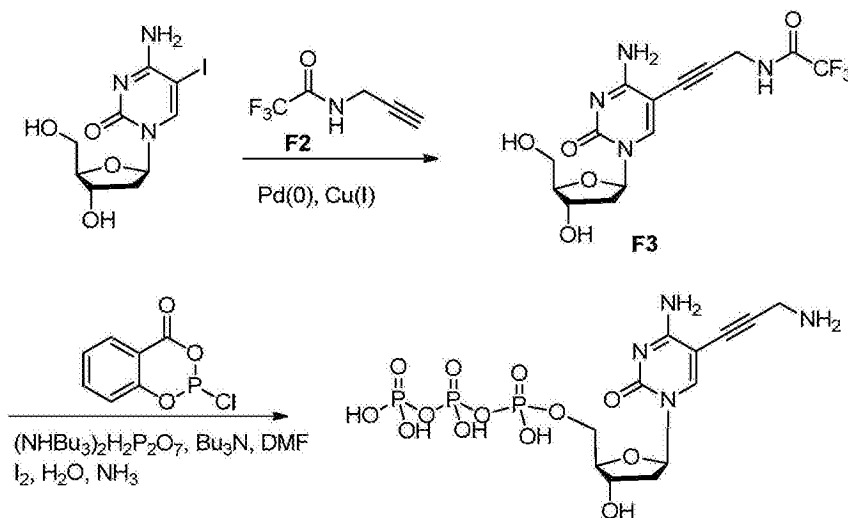


(II)。

[0086] 其对应的合成路线如图6所示；具体包括如下步骤：

[0087] 1 化合物dUTP (AP₃) -A的合成[0088] 1.1 dUTP (AP₃) 的合成：

[0089]

[0090] 1.1.1 化合物三氟乙基丙炔胺F₂的合成

[0091] 三氟乙酸甲酯与丙炔胺在有机溶剂中反应得到化合物F₂，具体为：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15分钟后缓慢加入三氟乙酸甲酯 (86.7mmol, 11.0957g)，10分钟后撤去冰水浴，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℃, 280Pa)，得三氟乙基丙炔胺F₂ 3.53g，产率39%。

[0092] ¹H NMR (CDCl₃, 300MHz) : δ 2.32 (t, J=4.0Hz, 1H), 4.13-4.15 (m, 2H), 6.92 (s, 1H)。

[0093] 在上述合成中，加入的三氟乙酸甲酯可以为72~120mmol中的任一值。

[0094] 1.1.2 化合物F₃的合成[0095] 向一单口瓶中加入dU-I (0.7mmol, 247mg)，再称取9.7mg CuI和20.3mg Pd (PPh₃)₄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,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,20:1DCM:MeOH为淋洗剂,得F₃214mg,产率61%。

[0096] ¹H NMR(DMSO-D₆, 300MHz): δ2.11 (t, J=5.1Hz, 2H), 3.56-3.58 (m, 2H), 3.78 (m, 1H), 4.21 (d, J=5.1Hz, 3H), 5.08 (t, J=5.1Hz, 1H), 5.23 (d, J=4.2Hz, 1H), 6.09 (t, J=6.6Hz, 1H), 8.18 (s, 1H), 10.05 (t, J=4.8Hz, 1H), 11.63 (s, 1H)。

[0097] 在上述合成中,加入的F₂可以为1.4~2.1mmol中的任一值,TEA可以为1.05~1.4mmol中的任一值。

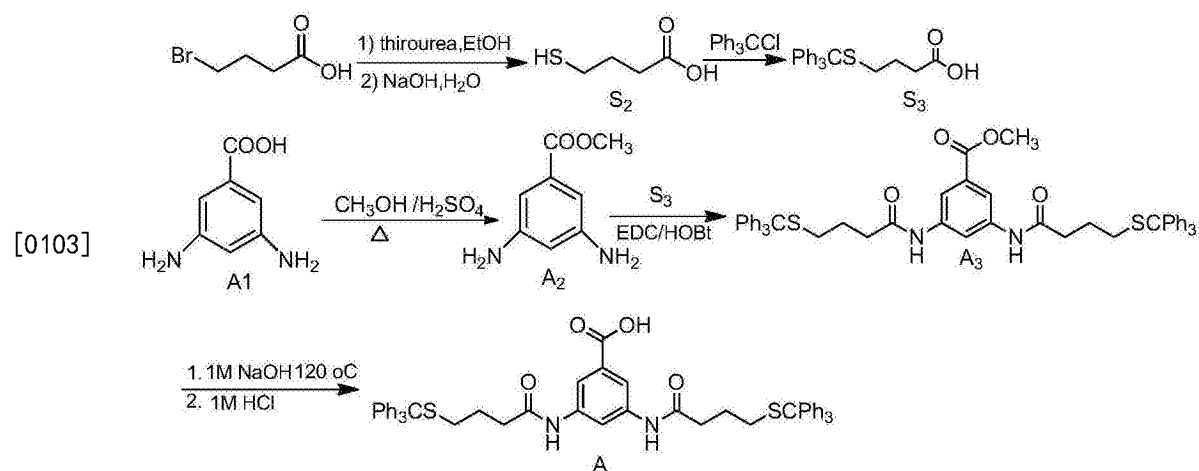
[0098] 1.1.3化合物dUTP (AP₃) 的合成

[0099] 在手套箱中分别称取化合物dU-I 60mg (0.16mmol)、三正丁胺焦磷酸盐150mg (0.32mmol)、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮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F₃中,搅拌1.5h。加入5mL 3%碘(9:1Py/H₂O)溶液。15min后加入4mL水,搅拌2h。加入0.5mL3M NaCl溶液,再加入30mL无水乙醇,-20℃冷冻过夜,离心(3200r/min, 25℃) 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 (AP₃)。

[0100] 用分析型HPLC进行分析,条件:柱子:C18, 10μm, 4.6×250mm;流速:1mL/min;流动相:20mM三乙胺乙酸盐和CH₃CH₂OH,梯度洗涤,0~20%乙醇(35min);紫外检测器:254nm。在t=13.5min时有产物峰生成。¹H NMR (D₂O, 400MHz): δ2.34-2.48 (m, 2H), 4.03 (s, 2H), 4.20-4.29 (m, 3H), 4.61-4.64 (m, 1H), 6.27 (t, J=6.4Hz, 1H), 8.38 (s, 1H)。³¹P NMR (D₂O, 161MHz): δ-22.22, -11.45, -9.90。HRMS: calc for C₁₂H₁₉N₃O₁₄P₃ [M+H]⁺+522.0080, found 522.0070; calc for C₁₂H₁₈N₃O₁₄P₃Na [M+Na]⁺+543.9899, found 543.9883。

[0101] 1.2化合物A的合成

[0102] 化合物A的合成具体如下式所示,以4-溴丁酸(S₁)和3,5-二氨基苯甲酸(A₁)为原料经多步反应合成A,反应过程如下:



[0104] 1.2.1化合物S₃的合成方法:在一单口烧瓶中加入16.84g 4-溴丁酸(S₁), 8.50g硫脲,随后加入30ml乙醇,加热至回流状态下反应3h。之后,加入50mL4M NaOH溶液,继续回流

2h。停止反应后,减压旋蒸除去乙醇,至瓶中出现白色沉淀。过滤浓缩液,沉淀部分烘干,滤液用无水乙醚洗涤。然后,将沉淀溶解于无水乙醚洗涤后的滤液中,用6M HCl酸化溶液至沉淀全部溶解,再用乙酸乙酯萃取,无水Na₂SO₄干燥有机相。干燥后,减压旋蒸除去溶剂,得到10.45g浅红色油状液体,产率约96%。

[0105] 在一单口烧瓶中加入前一步所得的浅红色油状液体以及10.0g三苯基氯甲烷。加入40ml DMF,在35℃加热下搅拌5d。停止反应后,将反应液倒入350ml 10%NaAc溶液中,得到大量白色沉淀。抽滤烘干后,得白色固体产物12.48g,即为化合物S3。产率约为90%。¹H NMR (CDCl₃,500MHz) δ:7.2-7.5 (m,15H,ArH),2.33 (d,J=7.4Hz,2H,-CH₂COO-),2.24 (d,J=7.2Hz,2H,-CH₂S-),1.70 (m,2H,-CH₂-)。

[0106] 1.2.2化合物A2的合成:在以单口烧瓶中冰水浴下依次加入1.52g A1,20ml CH₃OH,2ml浓硫酸,搅拌溶解后90℃回流反应6h,停止反应旋蒸出甲醇,加入适量的乙酸乙酯萃取,用水及饱和碳酸氢钠溶液洗涤三次后,旋蒸干乙酸乙酯的得黑色固体产物A21.48g,产率89%,¹H NMR (CDCl₃,400MHz) δ:8.01 (s,1H,Ar-H),7.85 (s,2H,Ar-H),7.15-7.45 (m,15H,ArH),3.89 (s,3H,-OCH₃),2.30 (m,4H,-CH₂S-),1.73 (m,4H,-CH₂CO-),1.57 (m,4H,-CH₂-)。

[0107] 1.2.3化合物A3的合成:将1.2g S3和1g EDC,依次加入圆底烧瓶,加入二氯甲烷30ml,活化1h后,加入0.2g A2,其中A2与羧基化合物比例为1:3;室温下反应12h。体系产生絮状沉淀,过滤,旋干二氯甲烷,加入30ml甲醇,搅拌少许时间,冰箱中静放一会,抽滤,用少量冷甲醇冲洗滤渣,滤渣干燥,即为A3纯品,得到化合物A3纯品0.63g,产率60%。¹H NMR (CDCl₃,400MHz) δ:8.01 (s,1H,Ar-H),7.85 (s,2H,Ar-H),7.15-7.45 (m,30H,ArH),3.89 (s,3H,-OCH₃),2.30 (m,4H,-CH₂S-),1.73 (m,4H,-CH₂CO-),1.57 (m,4H,-CH₂-)。¹³C NMR (101MHz,DMSO) δ:171.07,166.66,144.97,140.23,130.84,129.54,128.44,127.12,114.89,114.21,66.49,55.24,52.65,40.65,40.44,40.23,40.02,39.82,39.61,39.40,35.79,31.37,24.39.HRMS (ESI) calcd for C₅₄H₅₀N₂O₄S₂Na 877.3110 (M+Na⁺),found 877.3132。

[0108] 1.2.4化合物A的合成

[0109] 将0.3g A3溶于6ml DMSO中,升温至120℃,加入1M,NaOH溶液0.3ml,反应30min,即停止反应,倒入1M HCl中,放置10min,产生白色沉淀,过滤,滤渣干燥。干燥后用20ml二氯甲烷洗涤,过滤,滤渣即为化合物A,纯品0.25g,产率86%。¹H NMR (400MHz,DMSO) δ=10.05 (s,2H,-NH),8.11 (s,1H,ArH),7.90 (s,2H,ArH),7.38-7.17 (m,30H,ArH),2.31 (t,J=7.1,4H,-CH₂S-),2.16 (t,J=7.1,4H,-CH₂CO-),1.65 (m,4H,-CH₂CH₂CH₂-)。¹³C NMR (101MHz,DMSO) δ:170.99,167.59,148.25,144.97,140.04,131.81,129.54,128.45,128.25,127.98,127.12,115.20,66.48,40.92,40.64,40.43,40.22,40.01,39.80,39.60,39.39,35.79,31.38,24.41.HRMS (ESI) calcd for C₅₃H₄₈N₂O₄S₂Na 863.2953 (M+Na⁺),found 863.2990。

[0110] 1.3化合物dUTP (AP₃)-A的合成

[0111] 其合成路线如图5所示:在碱性条件下,取化合物A与末端为氨基的dUTP (AP₃) 在缩合剂DCC作用下进行酰胺化反应,得化合物dUTP (AP₃)-A;

[0112] 步骤具体为:称取化合物A (0.0841g,0.1mmol) 溶于5ml DMF于10ml的单口烧瓶中,冰水浴搅拌下加入NMM (N-甲基吗啉) (20μL,0.2mmol),HATU (2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯) (0.057g,0.15mmol) 活化30min后,加入dUTP (AP₃) (0.0521g,

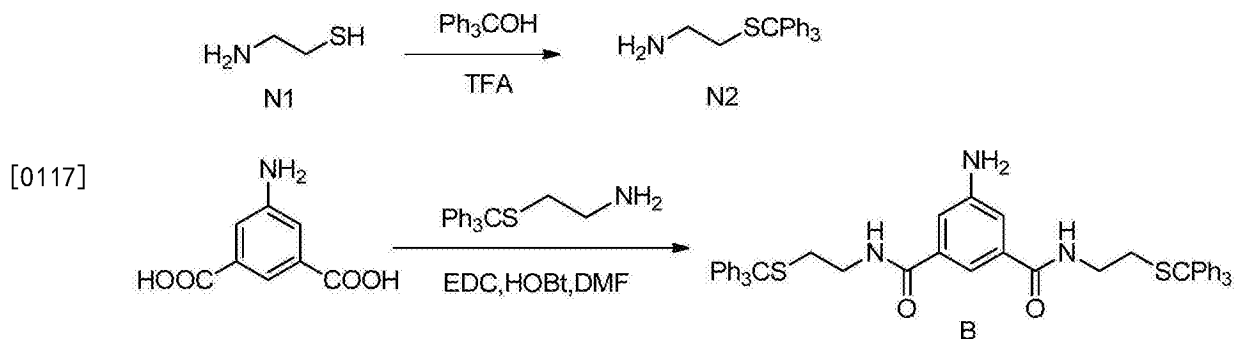
0.1mmol) 搅拌1h后升温至室温反应10h, 停止反应, 反应液倒入50ml无水乙醚中沉淀, 离心得粗产品141mg, 制备HPLC分离得dUTP (AP₃)-A纯产品81mg, 产率60%。

[0113] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 9.41 (s, 1H), 9.24 (s, 1H), 8.31 (s, 2H), 8.09-7.90 (m, 3H), 7.63 (t, J=9.2Hz, 1H), 7.47-7.08 (m, 30H), 6.54 (s, 1H), 4.50-3.81 (m, 6H), 3.55 (s, 1H), 2.66-2.47 (m, 4H), 2.47-2.09 (m, 6H), 2.07-1.87 (m, 4H). ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 173.05, 167.45, 161.60, 152.24, 149.71, 146.52, 140.74, 138.85, 128.72, 128.42, 125.63, 117.17, 116.55, 97.88, 95.98, 86.57, 85.43, 70.07, 67.97, 67.80, 67.61, 39.49, 35.20, 31.72, 29.64, 27.46. ³¹P NMR (202MHz, CDCl₃) δ -10.30 (s), -11.20 (s), -22.90 (s). HRMS (ESI) calcd for C₆₅H₆₄N₅O₁₇P₃S₂ 1344.2782 (M+H⁺), found 1344.3758.

[0114] 2化合物TAMRA-B的合成

[0115] 2.1化合物B的合成

[0116] 化合物B的合成具体如下式所示, 以半胱胺盐酸盐和5-氨基间苯二甲酸为原料经两步反应合成B, 反应过程如下:



[0118] 化合物N2的合成: 在一单口烧瓶中加入4ml三氟乙酸, 而后加入化合物半胱胺盐酸盐N1 (1.0g, 8.8mmol), 再缓慢加入三苯甲醇 (2.29g, 8.8mmol), 室温搅拌40min。停止反应蒸除三氟乙酸, 再加入无水乙醚, 有白色固体出现, 过滤, 滤饼用25mM NaOH(aq) 洗涤, 乙酸乙酯萃取, 旋干溶剂得白色粉末状固体2.35g, 即化合物N2, 产率84%。

[0119] ¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.22~7.45 (m, 15H, ArH), 2.60 (t, J=6.8Hz, 2H, -NCH₂-), 2.34 (t, J=6.4Hz, 4H, -SCH₂-)。IR (KBr) 3378.16, 2926.15, 2849.48, 1589.40, 1485.49, 1439.83, 746.90, 700.09cm⁻¹. m. p. 91.9-92.1°C。

[0120] 化合物B的合成: 在一单口烧瓶中加入20ml DMF, 控制温度0°C, 而后依次加入化合物S3 (0.36g, 2.0mmol), EDCI (0.95g, 4.8mmol), HOBT (0.65g, 4.8mmol), 化合物N2 (1.91g, 6.0mmol)。室温 (25°C) 下反应4h。停止反应把反应液逐滴加到水中, 放冰箱静置, 抽滤得淡黄色泡沫状固体3.7g, 即为化合物B, 产率62%。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 7.17~7.42 (m, 31H, ArH), 7.11 (d, J=1.2Hz, 2H, ArH), 6.22 (t, J=5.6Hz, 2H, -NH-), 3.90 (s, 2H, -NH₂), 3.23~3.28 (dd, J₁=6.0Hz, J₂=12.4Hz, 4H, -NCH₂-), 2.51 (t, J=6.4Hz, 4H, -SCH₂-)。¹³C NMR (CDCl₃, 100MHz) δ 167.25, 147.67, 145.03, 136.08, 129.75, 128.45, 127.06, 116.54, 114.68, 67.17, 38.63, 32.07。HRMS (ESI) calcd for C₅₀H₄₅N₃O₂S₂Na 806.2851 (M+Na⁺), found 806.2824。

[0121] 2.2化合物TAMRA-B的合成

[0122] TAMRA-B的合成路线如图1所示: 在酰胺化反应条件下, 取化合物B与TAMRA在缩合剂DCC作用下进行酰胺化反应, 得化合物TAMRA-B。

[0123] 步骤具体为:称取TAMRA (0.043g, 0.1mmol), HATU (2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯) (0.057g, 0.15mmol), 化合物B (0.114g, 0.15mmol) 于10ml的干燥的单口烧瓶中, 冰水浴下氮气保护下加入NMM (N-甲基吗啉) (17 μ L, 0.1mmol), 干燥的DMF 8ml, 搅拌60min后升温至35 $^{\circ}$ C反应24h, 停止反应, 反应液倒入50ml无水乙醚中沉淀, 离心得粗产品152mg, 柱层析91mg, 即得TAMRA-B, 产率76%。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.89 (s, 1H), 8.44-8.26 (m, 3H), 8.07 (dd, J=15.0, 3.1Hz, 1H), 7.90 (d, J=15.0Hz, 1H), 7.52 (dd, J=12.4, 9.4Hz, 2H), 7.45-7.09 (m, 30H), 6.91 (d, J=15.0Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 6.45-6.23 (m, 3H), 6.17 (d, J=3.1Hz, 1H), 5.89 (d, J=21.8Hz, 1H), 3.61 (t, J=9.9Hz, 4H), 2.98-2.81 (m, 10H), 2.75 (s, 6H)。¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 173.20, 166.43, 166.05, 158.50, 154.81, 153.77, 152.95, 146.27, 140.57, 137.52, 136.28, 135.62, 133.84, 131.63, 129.18, 128.58, 128.37, 125.52, 123.77, 122.46, 119.62, 113.66, 113.06, 112.48, 105.18, 99.08, 96.89, 65.94, 47.81, 41.92, 41.20, 29.43。HRMS (ESI) calcd for C₇₅H₆₅N₅O₆S₂Na 1219.4785 (M+Na⁺), found 1219.2878。

[0124] 3基于分子胶的荧光标记核苷酸(II) (即可逆终端II)的合成

[0125] 可逆终端II的合成路线如图5所示:在氧化反应条件下,取化合物TAMRA-B与dUTP (AP₃)-A进行氧化反应(脱三苯基甲基共聚反应),可得可逆终端II;

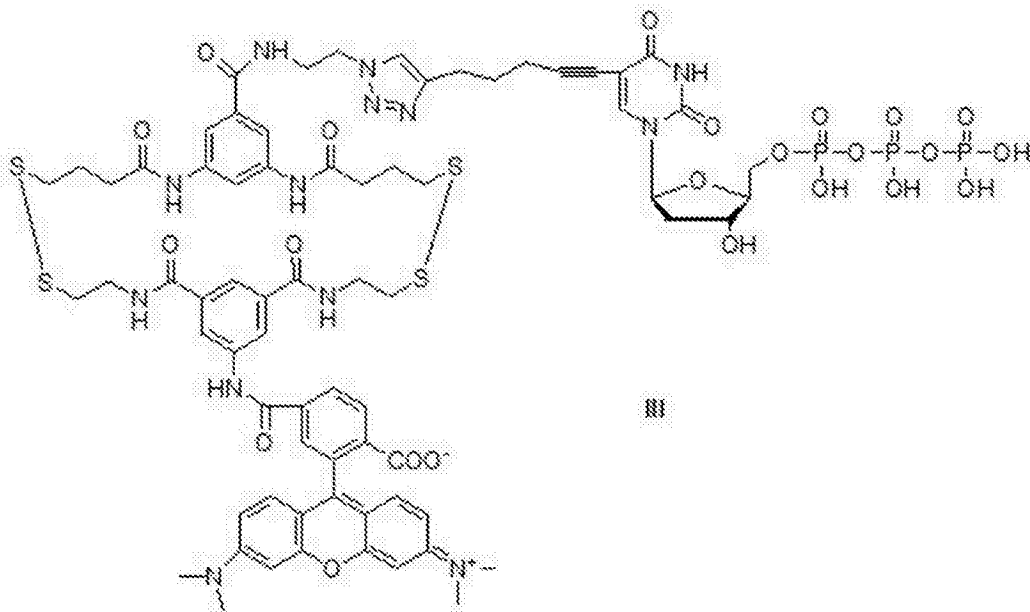
[0126] 所述步骤具体为:分别称取TAMRA-B (36mg, 0.03mmol) 和dUTP (AP₃)-A (27mg, 0.02mmol) 溶于20ml二氯甲烷与DMF体积比1:1的混合液于250ml单口瓶中, 搅拌溶解混合均匀后减压蒸馏出二氯甲烷, 残留物加入60ml二氯甲烷I₂溶液(其中I₂为6.0mM) 溶解, 常温搅拌1h后将反应液冷却到0 $^{\circ}$ C, 缓慢加入Na₂S₂O₃粉末直至I₂的颜色消失。减压蒸馏得淡黄色固体45mg, 制备HPLC分离得8mg, 即得可逆终端II, 产率25%。¹H NMR (500MHz, D₂O) δ 9.46 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.45-8.25 (m, 4H), 8.12-7.84 (m, 5H), 7.51 (d, J=3.0Hz, 1H), 6.91 (d, J=15.0Hz, 1H), 6.79 (d, J=21.8Hz, 1H), 6.64 (d, J=20.5Hz, 2H), 6.49 (s, 2H), 6.33 (dd, J=15.0, 3.1Hz, 1H), 6.25-6.13 (m, 2H), 5.89 (d, J=21.8Hz, 1H), 4.60 (td, J=6.0, 2.1Hz, 1H), 4.47-4.15 (m, 4H), 4.08-3.81 (m, 3H), 3.39-3.10 (m, 3H), 2.95-2.78 (m, 10H), 2.70 (s, 6H), 2.59-2.35 (m, 12H), 2.13 (ddd, J=24.7, 15.0, 6.0Hz, 1H)。³¹P NMR (202MHz, D₂O) δ -10.30, -11.20, -22.90。HRMS (ESI) calcd for C₆₄H₆₉N₁₀O₂₃P₃S₄Na 1590.4671 (M+Na⁺), found 1590.4598。

[0127] 同时需要说明的是,本实施例中dUTP (AP₃)-A的量在0.01~0.03mmol范围内均可完成上述反应。碱基除了U之外,还可以为C,A,G其它不同的碱基,同样可以得到基于分子胶的荧光素标记核苷酸,其中的荧光素除了TAMRA,也可以为其它的荧光素。

[0128] 实施例2

[0129] 本实施例涉及一种基于分子胶的荧光标记核苷酸,即结构式为下式(III)所示的可逆终端:

[0130]



(III);

[0131] 具体包括如下步骤:

[0132] 1 化合物dUTP-A-click的合成

[0133] 1.1 化合物A-N₃的合成

[0134] 化合物A-N₃的合成路线如图2所示:在碱性条件下,取化合物A与末端为氨基的2-叠氮乙胺进行酰胺化反应,得化合物A-N₃;

[0135] 步骤具体为:称取化合物A (0.841g, 0.1mmol) 溶于5ml DMF于10ml的单口烧瓶中,冰水浴搅拌下加入NMM (N-甲基吗啉) (200μL, 2mmol), HATU (2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯) (0.57g, 1.5mmol) 活化30min后,加入2-叠氮乙胺 (129mg, 1.5mmol) 搅拌1h后升温至室温反应8h,停止反应,加入适量二氯甲烷萃取,水洗两次,饱和NaCl溶液洗涤两次,有机相减压蒸馏得淡黄色固体1.02g,柱层析的白色固体产品A-N₃ 0.87g,产率91%。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, J=3.0Hz, 2H), 8.13 (s, 2H), 8.08 (t, J=2.9Hz, 1H), 7.43-7.06 (m, 30H), 4.62 (s, 1H), 3.01-2.85 (m, 2H), 2.82-2.73 (m, 2H), 2.51 (td, J=15.5, 0.9Hz, 4H), 2.38 (t, J=10.8Hz, 4H), 2.15-2.02 (m, 4H). ¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ 173.05, 165.12, 146.27, 138.73, 134.70, 128.61, 128.35, 125.52, 121.00, 117.05, 65.94, 54.39, 39.76, 35.20, 29.64, 27.46. HRMS (ESI) calcd for C₅₅H₅₂N₆O₄S₂Na 948.1692 (M+Na⁺), found 948.1712.

[0136] 1.2 化合物dUTP-P的合成

[0137] 化合物dUTP-P的合成路线如图2所示,步骤具体为:

[0138] dU-P的合成:向一单口瓶中加入化合物dU-I (0.7mmol, 247mg),再称取9.7mg CuI和20.3mg Pd(PPh₃)₄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,称取1,6-庚二炔 (156mg, 1.7mmol) 用DMF溶解后加入上述反应瓶中,室温搅拌,反应过夜,待反应结束后,减压蒸干溶剂,直接柱层析分离得151mg,即为dU-P,产率68%。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 9.38 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 7.57 (t, J=14.7Hz, 1H), 4.40 (td, J=14.4, 2.0Hz, 1H), 4.18 (td, J=5.7, 2.0Hz, 1H), 3.84 (dd, J=24.8, 14.4Hz, 1H), 3.59 (dd,

$J=24.8, 14.4\text{Hz}, 1\text{H}$), $2.52(\text{ddd}, J=24.9, 14.8, 5.6\text{Hz}, 1\text{H})$, $2.27-2.12(\text{m}, 4\text{H})$, $2.01-1.90(\text{m}, 2\text{H})$, $1.86-1.73(\text{m}, 2\text{H})$, $1.59(\text{s}, 1\text{H})$, $1.41(\text{s}, 1\text{H})$. ^{13}C NMR (125MHz, CDCl_3) δ 161.60, 152.24, 149.71, 102.46, 97.88, 87.13, 86.57, 84.40, 71.74, 70.73, 68.24, 62.01, 39.49, 27.84, 19.04, 18.67. HRMS: calc for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 319.3245, found 319.3266.

[0139] 在上述合成中,加入的1,6-庚二炔可以为1.4~2.1mmol中的任一值,TEA可以为1.05~1.4mmol中的任一值。

[0140] dUTP-P的合成:在手套箱中分别称取化合物dU-P 51mg (0.16mmol)、三正丁胺焦磷酸盐150mg (0.32mmol)、2-氯-4H-1,3,2-苯并二氧磷-4-酮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化合物F₃中,搅拌1.5h。加入5mL3%碘(9:1Py/H₂O)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℃冷冻过夜,离心(3200r/min, 25℃) 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-NH₂。用分析型HPLC进行分析,条件:柱子:C18, 10 μm , 4.6×250mm;流速:1mL/min;流动相:20mM三乙胺乙酸盐和CH₃CH₂OH,梯度洗涤,0~20%乙醇(35min);紫外检测器:254nm。在t=16.5min时有产物峰生成。制备HPLC分离得产品22mg,即得dUTP-P,产率24%。

[0141] ^1H NMR (500MHz, D₂O) δ 8.83 (s, 1H), 7.38-7.19 (m, 1H), 4.40 (td, $J=11.3, 2.0\text{Hz}$, 1H), 4.26 (ddd, $J=24.5, 16.8, 11.3\text{Hz}$, 1H), 4.16-4.06 (m, 1H), 4.08-3.91 (m, 2H), 2.27-2.12 (m, 4H), 2.00-1.67 (m, 4H), 1.56 (s, 1H). ^{31}P NMR (202MHz, D₂O): δ -22.90, -11.20, -10.30.

[0142] HRMS: calc for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 559.2642, found 559.2593; calc for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_{14}\text{P}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 581.2642, found 581.2688.

[0143] 1.3化合物dUTP-A-click的合成

[0144] 合成路线如图2所示,所述步骤具体为:在两口瓶中,将等当量的dUTP-P和A-N₃溶于适量THF,使得两化合物的浓度为10mmol/ml。体系抽充氮气三次,加氮气球,使反应在氮气保护下进行。将0.6倍当量的无水CuSO₄固体和2倍当量的抗坏血酸钠(VcNa)混合,抽真空,加入去离子水震荡得黄色悬浊液,再注入反应体系中,室温搅拌36h。旋蒸除去溶剂,制备HPLC分离,即得化合物dUTP-A-click,产率59%。

[0145] ^1H NMR (500MHz, D₂O) δ 9.38 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 8.13 (s, 2H), 8.02 (t, $J=2.9\text{Hz}$, 1H), 7.97 (d, $J=3.1\text{Hz}$, 2H), 7.70 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.28 (ddd, $J=4.8, 4.2, 1.7\text{Hz}$, 7H), 7.26-7.17 (m, 22H), 7.06 (s, 1H), 5.66 (t, $J=9.2\text{Hz}, 2\text{H}$), 4.40 (d, $J=1.7\text{Hz}, 1\text{H}$), 4.29-4.24 (m, 1H), 4.03-3.91 (m, 1H), 3.72 (t, $J=9.2\text{Hz}, 2\text{H}$), 2.49-2.33 (m, 11H), 2.37-2.33 (m, 1H), 2.16 (dddd, $J=14.5, 10.1, 6.8, 2.1\text{Hz}$, 6H), 1.97-1.91 (m, 1H), 1.86 (dd, $J=9.5, 5.9\text{Hz}$, 1H), 1.59 (s, 1H). ^{31}P NMR (202MHz, D₂O): δ -22.90, -11.20, -10.30. HRMS: calc for $\text{C}_{71}\text{H}_{74}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 1468.4340, found 1468.4386; calc for $\text{C}_{71}\text{H}_{73}\text{N}_8\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1470.4340, found 1470.4388.

[0146] 2化合物TAMRA-B的合成

[0147] TAMRA-B的合成参照实施例1。

[0148] 3基于分子胶的荧光标记核苷酸(III) (即可逆终端III)的合成

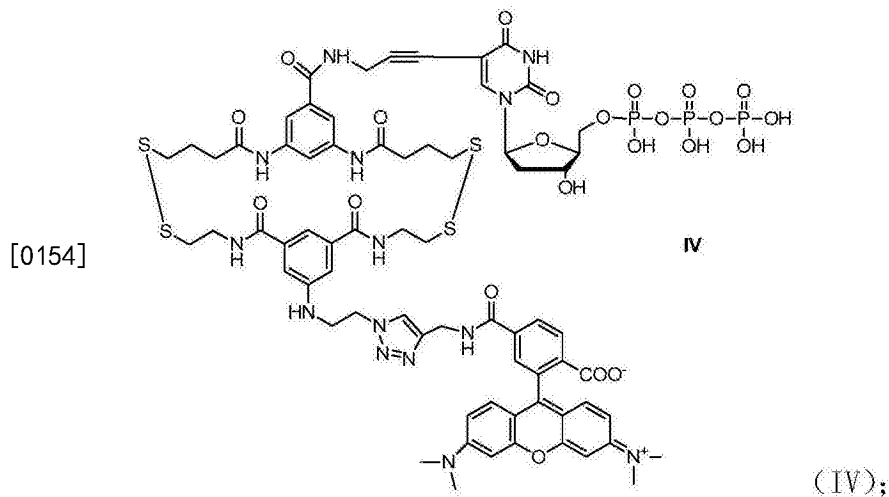
[0149] 可逆终端III的合成路线如图6所示:在氧化反应条件下,取化合物TAMRA-B与dUTP-A-click进行氧化反应(脱三苯基甲基共聚反应),可得可逆终端III;

[0150] 步骤具体为:分别称取TAMRA-B(36mg,0.03mmol)和dUTP-A-click(29mg,0.02mmol)溶于20ml二氯甲烷与DMF体积比1:1的混合液于250ml单口瓶中,搅拌溶解混合均匀后减压蒸馏出二氯甲烷,残留物加入60ml二氯甲烷I₂溶液(其中I₂为6.0mM)溶解,常温搅拌1h后将反应液冷却到0℃,缓慢加入Na₂S₂O₃粉末直至I₂的颜色消失.减压蒸馏得淡黄色固体65mg,制备HPLC分离得9mg,即可得可逆终端III,产率26%。¹H NMR(500MHz, D₂O) δ9.44(s, 1H), 9.02(s, 1H), 8.38(d, J=1.4Hz, 2H), 8.34(t, J=1.3Hz, 1H), 8.07(dd, J=7.5, 1.4Hz, 1H), 8.02(t, J=1.5Hz, 1H), 7.97(d, J=1.5Hz, 2H), 7.90(d, J=7.5Hz, 1H), 7.51(d, J=1.4Hz, 1H), 7.42(dd, J=14.4, 7.1Hz, 2H), 6.90(dd, J=13.0, 9.2Hz, 2H), 6.68(s, 1H), 6.33(dd, J=7.5, 1.4Hz, 1H), 6.17(d, J=1.7Hz, 2H), 6.10(s, 2H), 5.89(d, J=10.8Hz, 1H), 5.66(t, J=7.5Hz, 2H), 4.44-4.38(m, 2H), 4.28-4.24(m, 1H), 4.03-3.96(m, 3H), 3.80-3.76(m, 1H), 3.72(t, J=7.5Hz, 2H), 3.25(t, J=7.6Hz, 2H), 2.90(s, 6H), 2.88-2.80(m, 10H), 2.57-2.45(m, 13H), 2.43(d, J=5.6Hz, 2H), 2.18(t, J=5.1Hz, ³¹P NMR(202MHz, D₂O) δ-10.31, -11.22, -22.95. HRMS(ESI) calcd for C₇₀H₇₈N₁₃O₂₃P₃S₄Na 1713.6229(M+Na⁺), found 1713.6255.

[0151] 需要说明的是,本实施例中,化合物dUTP-A-click的量在0.01~0.03mmol范围内均可完成上述反应.碱基除了U之外,还可以为C、A、G其它不同的碱基;同样可以得到基于分子胶的荧光素标记核苷酸,其中的荧光素除了TAMRA,也可以为其它的荧光素。

[0152] 实施例3

[0153] 本实施例涉及一种基于分子胶的荧光标记核苷酸,即结构式为下式(IV)所示的可逆终端:



[0155] 其合成具体步骤如下:

[0156] 1化合物dUTP(AP₃)-A的合成

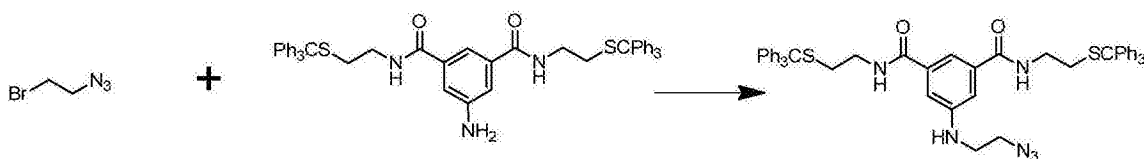
[0157] dUTP(AP₃)-A的合成参照实施例1。

[0158] 2化合物TAMRA-B-click的合成

[0159] 2.1化合物B-N₃的合成

[0160] B-N₃的合成路线如下:

[0161]

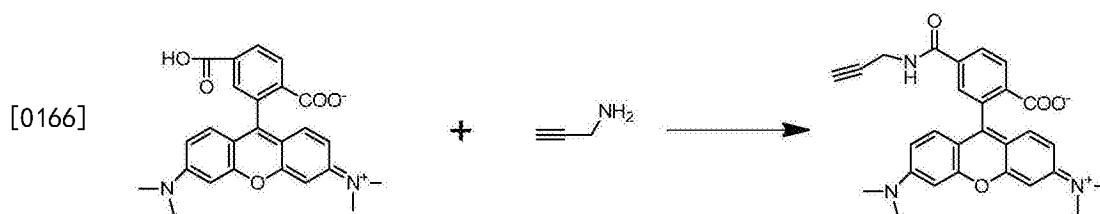


[0162] 步骤具体为:称取二叠氮溴乙烷(0.3g,2mmol),B(1.14g,1.5mmol)于10ml的干燥的单口烧瓶中,冰水浴和氮气保护下加入NMM(N-甲基吗啉)(200μL,2mmol),干燥的DMF 10ml,120℃回流反应18h,停止反应,反应液用二氯甲烷萃取,旋蒸得粗产品1.3g,柱层析1.0mg,即得B-N₃,产率82%。¹H NMR(500MHz,CDCl₃) δ7.92(t,J=3.0Hz,1H),7.42(t,J=13.2Hz,2H),7.39-7.09(m,30H),6.39(s,2H),4.68(s,1H),3.68-3.57(m,4H),3.50(t,J=11.8Hz,2H),2.91-2.63(m,6H),1.52(s,2H)¹³C NMR(125MHz,CDCl₃) δ166.43(s),147.29,146.27,139.02,128.61,128.35,125.53,117.65,113.35,65.94,46.42,41.21,40.62,29.43.HRMS(ESI) calcd for C₅₂H₄₈N₆O₂S₂Na 876.1065(M+Na⁺),found 876.1044。

[0163] 2.2化合物TAMRA-B-click的合成

[0164] 2.2.1化合物TAMRA-P的合成

[0165] TAMRA-P的合成路线下式所示:



[0167] 在酰胺化反应条件下,取化合物氨基丙炔与TAMRA进行酰胺化反应,得化合物TAMRA-P;

[0168] 步骤具体为:称取TAMRA(43mg,0.1mmol),HATU(2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯)(0.057g,0.15mmol),丙炔胺(10mg,0.15mmol)于10ml的干燥的单口烧瓶中,冰水浴下氮气保护下加入NMM(N-甲基吗啉)(17μL,0.1mmol),干燥的DMF 3ml搅拌60min后升温至35℃反应24h,停止反应,反应液倒入 50ml无水乙醚中沉淀,离心得粗产品50mg,薄层层析得产品25mg,即得TAMRA-P,产率52%。¹H NMR(500MHz,CDCl₃) δ8.07(dd,J=15.0,3.1Hz,1H),7.90(d,J=15.0Hz,1H),7.54(dd,J=27.1,12.4Hz,2H),6.91(d,J=15.0Hz,1H),6.74(s,1H),6.59(s,1H),6.33(dd,J=15.0,3.1Hz,1H),6.17(d,J=3.1Hz,1H),5.89(d,J=21.8Hz,1H),3.41(t,J=9.9Hz,2H),2.90(s,6H),2.74(s,6H),2.46(td,J=9.9,6.0Hz,2H),1.95(t,J=6.0Hz,1H)¹³C NMR(125MHz,CDCl₃) δ173.20,166.82,158.50,154.81,153.76,152.95,140.57,138.58,133.47(s),133.18,127.99,127.05,122.46,119.62,113.66,113.06,112.48,105.18,99.08,96.89,81.70,73.99,47.81,41.92,38.16,19.92.HRMS(ESI) calcd for C₂₉H₂₇N₃O₄Na 503.5424(M+Na⁺),found 503.5501。

[0169] 2.2.2化合物TAMRA-B-click的合成

[0170] 化合物TAMRA-B-click的合成路线如图3所示,步骤具体为:在两口瓶中,将等当量

的TAMRA-P和B-N₃溶于适量THF,使得两化合物的浓度为10mmol/ml。体系抽充氮气三次,加氮气球,使反应在氮气保护下进行。将0.6倍当量的无水CuSO₄固体和2倍当量的抗坏血酸钠(VcNa)混合,抽真空,加入去离子水震荡得黄色悬浊液,再注入反应体系中,室温搅拌36h。旋蒸除去溶剂,制备HPLC分离,即得化合物TAMRA-B-click,产率64%。¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ8.07 (dd, J=15.0, 2.9Hz, 1H), 7.91 (dd, J=12.0, 9.0Hz, 2H), 7.53 (dd, J=24.7, 12.4Hz, 2H), 7.40 (dd, J=39.9, 9.8Hz, 3H), 7.34-7.10 (m, 30H), 6.91 (d, J=14.8Hz, 1H), 6.75 (s, 2H), 6.59 (s, 1H), 6.43-6.25 (m, 2H), 6.17 (d, J=2.9Hz, 1H), 5.89 (d, J=21.8Hz, 1H), 5.59 (t, J=14.8Hz, 2H), 5.48 (s, 1H), 3.70-3.49 (m, 8H), 3.05 (dd, J=23.3, 7.9Hz, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.80-2.57 (m, 10H)。¹³C NMR (125MHz, CDCl₃) δ173.20, 166.82, 166.43, 158.50, 154.81, 153.76, 152.95, 148.91, 147.29, 146.27, 140.57, 139.02, 138.58 (d, J=4.4Hz), 133.47, 133.18, 128.61, 128.35, 127.99, 127.05, 125.53, 122.46, 119.62, 117.65, 113.66, 113.35, 113.06, 112.68, 112.48, 105.18, 99.08, 96.89, 65.94, 50.29, 47.81, 42.82, 41.92, 41.21, 39.81, 29.43, 25.39。HRMS: calc for C₈₁H₇₆N₉O₆S₂[M+H]⁺1335.6489, found 1335.6458; calc for C₈₁H₇₅N₉O₆S₂Na[M+Na]⁺1357.6489, found 1357.6493。

[0171] 3基于分子胶的荧光标记核苷酸(IV)(即可逆终端IV)的合成

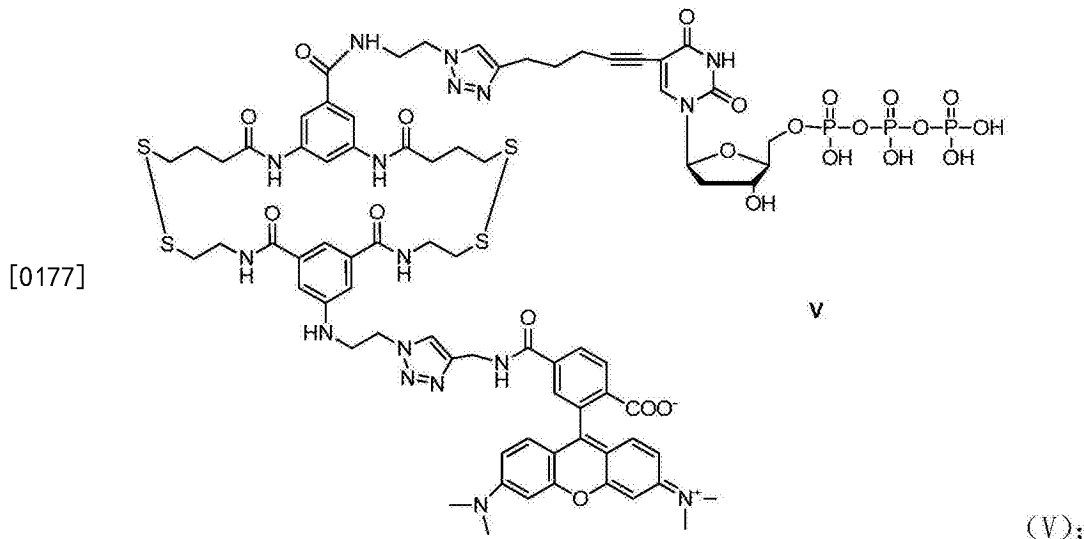
[0172] 可逆终端IV的合成路线如图7所示:在氧化反应条件下,取化合物TAMRA-B-click与dUTP(AP₃)-A进行氧化反应(脱三苯基甲基共聚反应),得可逆终端IV;

[0173] 步骤具体为:分别称取TAMRA-B-click(40mg, 0.03mmol)和dUTP(AP₃)-A(27mg, 0.02mmol)溶于20ml二氯甲烷与DMF体积比1:1的混合液于250ml单口瓶中,搅拌溶解混合均匀后减压蒸馏出二氯甲烷,残留物加入60ml二氯甲烷I₂溶液(其中I₂为6.0mM)溶解,常温搅拌1h后将反应液冷却到0℃,缓慢加入Na₂S₂O₃粉末直至I₂的颜色消失。减压蒸馏得淡黄色固体52mg,制备HPLC分离得8mg,即得可逆终端IV,产率24%。¹H NMR (500MHz, D₂O) δ9.38 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.21-7.84 (m, 6H), 7.68 (s, 1H), 7.51 (d, J=2.9Hz, 1H), 7.44 (d, J=2.9Hz, 2H), 7.32 (t, J=14.7Hz, 1H), 6.91 (d, J=15.0Hz, 1H), 6.75 (d, J=21.8Hz, 1H), 6.60-6.46 (m, 5H), 6.33 (dd, J=15.0, 2.9Hz, 1H), 6.17 (d, J=2.9Hz, 1H), 5.89 (d, J=21.8Hz, 1H), 5.59 (t, J=9.0Hz, 2H), 4.83 (s, 1H), 4.40 (dd, J=5.1, 2.7Hz, 1H), 4.29-4.15 (m, 5H), 3.84 (dd, J=24.8, 2.8Hz, 1H), 3.60 (ddd, J=18.0, 11.6, 1.7Hz, 5H), 3.27 (dd, J=15.8, 14.8Hz, 2H), 3.19-2.97 (m, 3H), 2.94-2.80 (m, 10H), 2.74 (s, 6H), 2.63-2.49 (m, 8H), 2.49-2.35 (m, 4H), 1.92-1.62 (m, 2H)。³¹P NMR (202MHz, D₂O) δ-10.30, -11.21, -22.09。HRMS (ESI) calcd for C₇₀H₇₉N₁₄O₂₃P₃S₄Na 1728.6375 (M+Na⁺), found 1728.6344。

[0174] 需要说明的是,本实施例中,化合物中dUTP(AP₃)-A的量在0.01~0.03mmol范围内均可实现上述反应。碱基除了U之外,还可以为C、A、G其它不同的碱基,同样可以得到基于分子胶的荧光素标记核苷酸,其中的荧光素除了TAMRA,也可以为其它的荧光素。

[0175] 实施例4

[0176] 本实施例涉及一种基于分子胶的荧光标记核苷酸,即结构式为下式(V)所示的可逆终端:



[0178] 其合成步骤具体如下：

[0179] 1化合物TAMRA-B-click的合成：参照实施例3。

[0180] 2化合物dUTP-A-click的合成：参照实施例2。

[0181] 3可逆终端V的合成

[0182] 可逆终端V的合成路线如图8所示：在氧化反应条件下，取化合物TAMRA-B-click与dUTP-A-click进行氧化反应(脱三苯基甲基共聚反应)，可得可逆终端V；

[0183] 步骤具体为：分别称取TAMRA-B-click (27mg, 0.02mmol) 和dUTP-A-click (29mg, 0.02mmol) 溶于20ml二氯甲烷与DMF体积比1:1的混合液于250ml单口瓶中，搅拌溶解混合均匀后减压蒸馏出二氯甲烷，残留物加入40ml二氯甲烷I₂溶液(其中I₂为6.0mM)溶解，常温搅拌1h后将反应液冷却到0℃，缓慢加入Na₂S₂O₃粉末直至I₂的颜色消失。减压蒸馏得淡黄色固体58mg，制备HPLC分离得7mg，即得可逆终端V，产率20%。¹H NMR (500MHz, D₂O) δ 9.44 (d, J = 28.4Hz, 2H), 8.15-7.83 (m, 8H), 7.46 (ddd, J = 16.0, 15.1, 6.8Hz, 5H), 6.91 (dd, J = 18.4, 7.0Hz, 2H), 6.83 (s, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.55 (s, 2H), 6.32 (dd, J = 15.0, 2.9Hz, 1H), 6.17 (d, J = 2.9Hz, 1H), 5.89 (d, J = 21.8Hz, 1H), 5.62 (dt, J = 28.4, 14.7Hz, 4H), 5.04 (d, J = 2.0Hz, 1H), 4.62 (td, J = 6.4, 2.0Hz, 1H), 4.40 (t, J = 15.4Hz, 2H), 4.05 (s, 1H), 3.84-3.46 (m, 8H), 3.20-3.00 (m, 3H), 2.97-2.72 (m, 16H), 2.65-2.35 (m, 14H), 2.29-1.84 (m, 5H). ³¹P NMR (202MHz, D₂O) δ -10.31, -11.24, -22.11. HRMS (ESI) calcd for C₇₆H₈₈N₁₇O₂₃P₃S₄Na 1851.7933 (M+Na⁺), found 1851.7963.

[0184] 需要说明的是，本实施例中，化合物dUTP-A-click的量在0.01~0.04mmol范围内均可实现上述反应。碱基除了U之外，还可以为C、A、G其它不同的碱基，同样可以得到基于分子胶的荧光素标记核苷酸，其中的荧光素除了TAMRA，也可以为其它的荧光素。

[0185] 实施例5、对合成的可逆终端的生物学评价

[0186] 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1~4的可逆终端(这些可逆终端包含C、A、G不同碱基的荧光素标记核苷酸)两个方面的特性：

[0187] (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；

[0188] (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，以便进行下一轮的

延伸反应。

[0189] 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,将反应体系置于PCR仪于30℃反应15分钟,然后于75℃反应10分钟以实现在聚合酶作用下DNA链的延伸反应,然后针对二硫键可逆终端分别检测了不同浓度还原剂条件下各可逆终端所携带的荧光基团是否可以断裂。具体如下:

[0190] 1二硫键可逆终端在DNA链延伸反应及其在不同DTT浓度下的断裂测试(实施例1、2、3、4的可逆终端以及包含C,A,G不同碱基的荧光素标记核苷酸)

[0191] (1)按照如下体系在eppendorf管里设立含二硫键可逆终端的DNA链延伸反应:10×Klenow buffer10uL,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,ddH₂O 35.43uL,总体积100uL。

[0192] 将反应体系置于PCR仪于30℃反应15分钟,然后于75℃反应10分钟以便实现聚合酶作用下的延伸反应。将反应产物用于后续的可逆终端荧光基团的断裂反应。

[0193] (2)二硫键可逆终端荧光基团的断裂反应

[0194] 在室温下分别用10uM、8mM以及10mM的DTT(二硫苏糖醇),处理含有二硫键可逆终端的DNA链延伸反应产物,作用时间从10分钟至2小时。取断裂反应产物进行12%PAGE电泳分析,如图9所示,由图9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。10uM DTT处理DNA链延伸产物,不能有效断裂二硫键可逆终端;而8mM和10mM DTT室温下分别作用10分钟至2小时,均能有效断裂二硫键可逆基团,说明其完全可以应用于高通量测序反应。

[0195] 2含有二硫键可逆终端的DNA链延伸产物分别在10mM、20mM和30mM DTT不同作用时间下的断裂测试

[0196] 测试的是实施例1、2、3、4的可逆终端以及包含C、A、G不同碱基的荧光素标记核苷酸,具体如下:

[0197] 为了进一步优化含有二硫键可逆终端的DNA链延伸产物的断裂条件,缩短断裂时间,分别测试了不同浓度DTT在不同处理时间下的断裂效果:

[0198] (1)10mM DTT室温下分别作用3分钟至15分钟,并检测断裂效果:在DNA链延伸反应体系中加入终浓度为10mM的DTT分别处理不同时间,取断裂反应产物进行12%PAGE电泳分析,如图10所示,由图10可知,含有二硫键可逆终端的DNA链延伸产物在10mM的DTT室温作用3min、5min、8min后荧光扫描结果显示仍有荧光信号,说明这个浓度下DTT不能完全将二硫键断裂;作用10min后有微弱的荧光信号,15min后荧光信号基本检测不到,显示10mM的DTT处理15分钟时断裂二硫键效果较好。

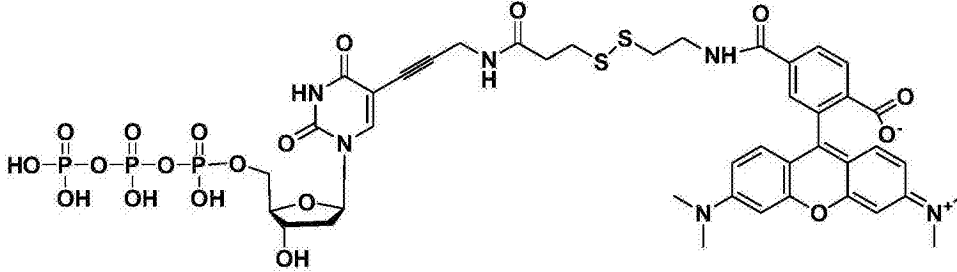
[0199] (2)20mM和30mMDTT室温下分别作用3min至8min,并检测断裂效果:按照上述方法设立DNA链延伸反应,在DNA链延伸反应体系中分别加入终浓度为20mM和30mM的DTT分别处理不同时间,取断裂反应产物进行12%PAGE电泳分析,如图11所示,由图11可知,含有二硫键可逆终端的DNA链延伸产物在20mM的DTT室温作用3min、5min、8min后荧光扫描结果检测不到荧光信号,说明20mM的DTT作用3min就能完全将含有可逆终端二硫键断裂。类似的,30mM DTT室温作用3min、5min也能完全将可逆终端的二硫键断裂。

[0200] 对比例1

[0201] 本领域现有技术中,常规的将荧光素与核苷酸通过二硫键直接相连而形成的二硫键荧光标记核苷酸dUTP-SS-TAMRA (即dUTP-SS-T) 在DNA链延伸反应中的测试,与通过分子胶连接而成的二硫键可逆终端相比,在DNA链延伸反应中有本质的区别。

[0202] 1、dUTP-SS-TAMRA的结构如下:

[0203]



[0204] 2、本发明可逆终端和常规荧光可逆终端dUTP-SS-T的DNA链延伸反应

[0205] 按照如下体系在eppendorf管里设立可逆终端的DNA链延伸反应:

10×Klenow buffer	10uL,
BSA (10mg/mL)	1uL,
DMSO	20uL,
NaCl (1M)	25uL,
[0206] Klenow (exo-) pol 或其它酶 (5U/uL)	1.32uL,
dUTP (dUTP-SS-T、dUTP天然)	6 uL,
DNA 模板 (1、2、3、4、5)	1.25uL,
ddH ₂ O	35.43uL;

[0207] 其中,DNA模板具体如下:

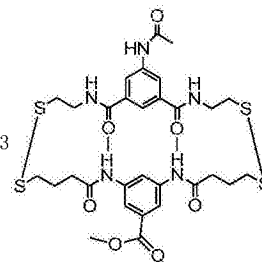
[0208]

可逆终端	模板	序列名称	序列 (具体见序列表)
常规 dUTP-SS-T	模板 1	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 3	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCATCGATCGCCATGTGC
	模板 2	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 4	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCAAACGATCGCCATGTGC
	模板 3	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 5	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCAAAGATCGCCATGTGC
	模板 4	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 6	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCAAAAGTCCGATCGCCATGTGC
	模板 5	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 1	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCAAAAAAAAAAGTGC
本发明结构 式III所示可 逆终端	模板 1	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 3	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCATCGATCGCCATGTGC
	模板 2	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
		Oligo 4	CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCAACGATCGCCATGTGC
	模板 3	Oligo 2 (5'-荧光标记)	GAGGAAAGGGAAGGAAAGGAAGG
Oligo 5		CTCCTTCCCTTCCTTTCCTTCCAAAGATCGCCATGTGC	

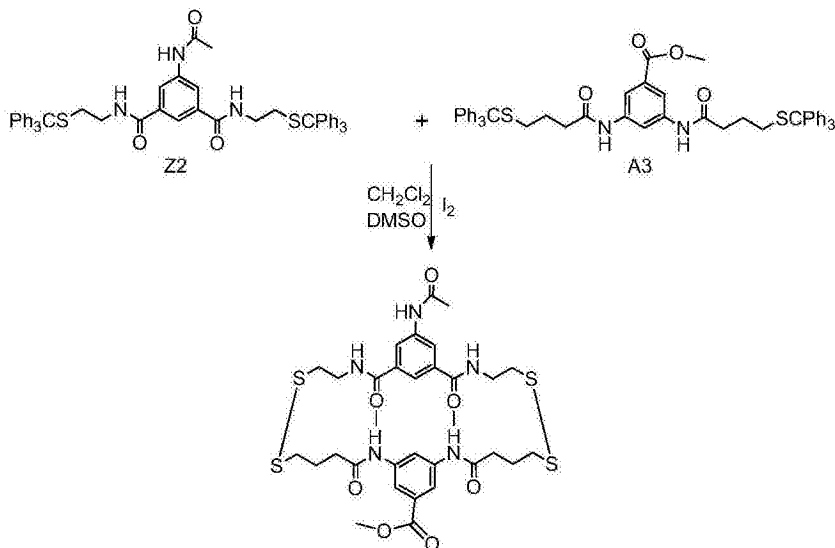
[0209] 总体积100uL,其中核苷酸dUTP的用量是模板DNA用量的60倍,将反应体系置于30℃中处理15分钟,再置于72℃中处理10分钟。冷却到室温,酚氯仿抽提,乙醇沉淀浓缩为固体后,溶于20uL水中,G-50分离纯化后,加入1uL 0.1M NaOH,95℃5min处理后,进行电泳分析,结果如图12、13所示。

[0210] 结果显示,常规的二硫键可逆终端当模板为连续多个碱基均为A时,一次延伸反应能延伸2个可逆终端(见图12)。而在同样的条件下,本发明结构III所示的可逆终端DNA链延伸反应的结果如图13所示,一次只能延伸一个可逆终端,所以本发明提供的可逆终端与现有技术相比,具有实质特点和显著进步。

[0211] 进一步需要说明的是,在具体小分子物质 $\text{CH}_3\text{-A-B-CH}_3$ 的合成



中,体现了合成的难度,我们经过多种方法的尝试才合成了目标产物,它对溶剂选择及其配比,温度,湿度,反应样品浓度等条件的要求十分苛刻,以下为合成路线及实施方法:



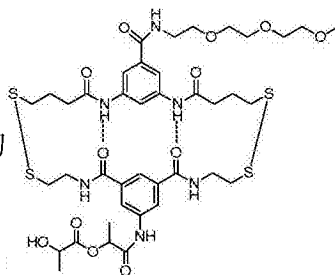
[0212]

[0213] 取Z2和A3各0.05mmol, 溶于30mL (CH₂Cl₂:DMSO=1:1) 混合溶剂中, 减压蒸馏除去CH₂Cl₂, 残留物加入50ml二氯甲烷I₂溶液(6.0mM) 溶解, 常温搅拌45min后将反应液冷却到0℃, 加入Na₂S₂O₃(3.0mM) 直至I₂的颜色消失。有机层用饱和NaCl(aq) 洗涤, 无水Na₂SO₄干燥, 减压蒸馏得淡黄色固体31mg, 薄层板层析分离(CH₂Cl₂:MeOH=10:1) 得到白色粉末a:18mg(主产物), 产率87%, ¹H NMR(400MHz, DMSO) δ=10.19(m, 3H, NH), 8.72(t, J=5.5, 2H, CH₂NH-), 8.54(s, 1H, ArH), 8.14(d, J=1.1, 2H, ArH), 7.95(s, 1H, ArH), 7.78(d, J=1.9, 2H, ArH), 3.84(s, 3H, CH₃O-), 3.53(t, J=7.3, 4H, -CH₂NH-), 2.91(t, J=7.1, 4H, -CH₂S-), 2.85-2.78(t, J=7.1, 4H, -CH₂(C=O)-), 2.45(t, J=7.1, 4H, -CH₂S-), 2.07(s, 3H, CH₃(C=O)), 1.98(m, 4H, -CH₂CH₂CH₂-)。¹H NMR如图14所示。

[0214] 采用二维核磁共振技术证明了以上小分子化合物中氢键作用力, 核磁共振¹H, ¹H-NOSEY谱如下如图15所示, 可以发现氢键受体苯环上的a氢与氢键给予体N-H上的b氢具有很强的相关作用, 从而可以证明在氢键作用下N-H的b氢偏向羰基而靠近a氢发生相关作用。

[0215] 所以并不是在氢键给予体和受体上接上任何化合物, 在可以实现的合成条件下

有效组合合成组合化合物的。以下目标化合物

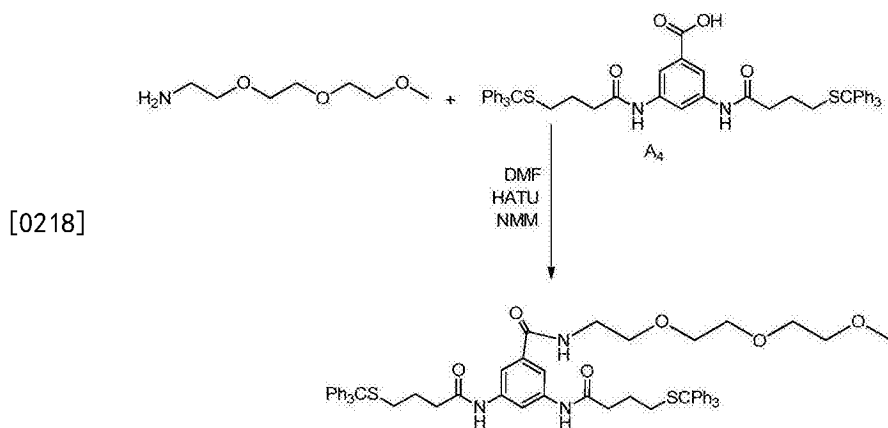


的合成, 经过多次尝

试都无法实现, 具体实施方法及过程如下(未得到预定的交叉偶联产物):

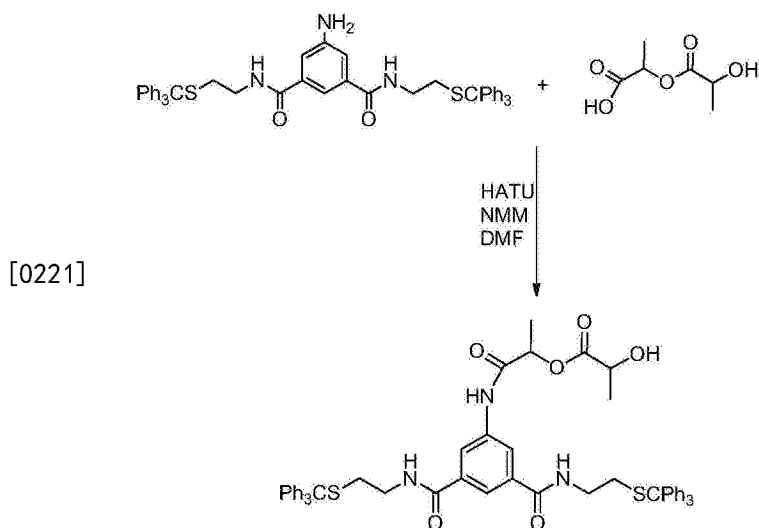
[0216] 1. PEG163-A4的合成:

[0217] 合成路线:



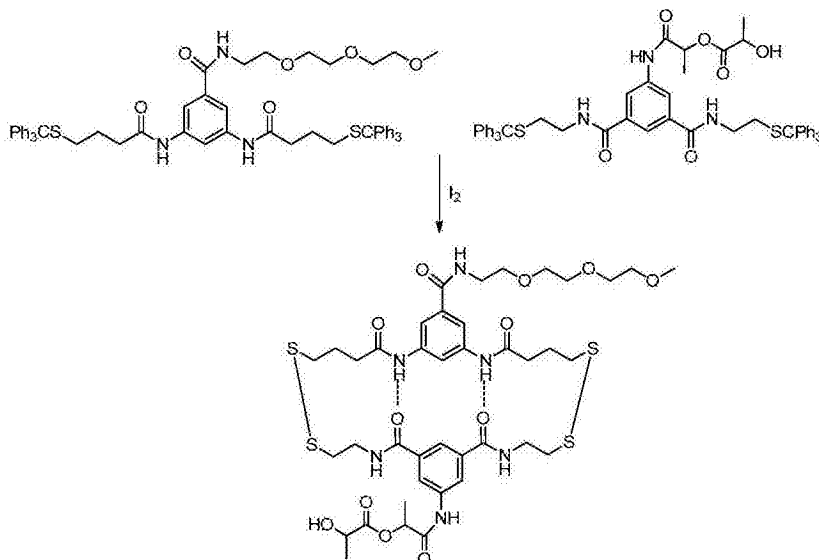
[0219] 合成步骤:称取A4 (0.841g, 1mmol) 溶于15ml DMF于25ml的单口烧瓶中,冰水浴搅拌下加入NMM(N-甲基吗啉) (112 μ L, 1.0mmol), HATU(2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯) (0.57g, 1.5mmol) 活化30min后,加入PEG163 (0.163g, 1mmol) 搅拌1h后升温至室温反应10h, 停止反应, 加入适量二氯甲烷萃取, 水洗两次, 饱和NaCl溶液洗涤两次, 有机相减压蒸馏得淡黄色固体0.91g, 柱层析的白色固体0.651g, 产率65.08%。¹H-NMR (CD₃OD, 400MHz) δ 7.94 (m, 2H, ArH), 7.66 (s, 1H, ArH), 7.12-7.37 (m, 30H, ArH), 3.53-3.65 (m, 12H, -OCH₂CH₂O-), 3.30 (s, 3H, CH₃O-), 2.36 (t, 4H, J=8Hz, -SCH₂-), 2.24 (t, 4H, J=8Hz, -CH₂-), 1.71-1.78 (m, 4H, -COCH₂-)。

[0220] 2. PLA₁₆₂-Z1的合成, 合成路线如下:



[0222] 合成步骤:称取PLA₁₆₂ (0.162g, 1mmol), HATU(2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯) (0.57g, 1.5mmol), Z1 (0.783, 1mmol) 于25ml的干燥的单口烧瓶中,冰水浴下氮气保护下加入NMM(N-甲基吗啉) (112 μ L, 1.0mmol), 干燥的DMF 15ml搅拌45min后升温至35 $^{\circ}$ C反应14h, 停止反应, 加入适量二氯甲烷萃取, 水洗两次, 饱和NaCl溶液洗涤两次, 有机相减压蒸馏得淡黄色固体1.020g, 柱层析的产品0.67g, 产率73%。¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz) δ 8.17 (s, 1H, NH), 7.91 (s, 2H, ArH), 7.70 (s, 1H, ArH), 7.19-7.70 (m, 30H, ArH), 6.62-6.64 (m, 2H, NH), 5.29~5.31 (m, 1H, CH₃-CH-O-), 4.42-4.44 (m, 1H, CH₃-CH-OH), 3.77 (brs, 1H, -OH), 3.26-3.27 (m, 4H, -NH-CH₂-), 2.50-2.53 (t, 4H, J=8.0Hz, -SCH₂-), 1.49-1.57 (m, 6H, CH₃-)。

[0223] 3.二硫键组合化合物的合成,合成路线如下:



[0225] 合成步骤一:分别称取PLA162-Z1 (19mg,0.02mmol) 和PEG163-A4 (20mg,0.02mmol) 溶于20ml二氯甲烷于500ml单口瓶中,搅拌溶解混合均匀后减压蒸馏干,残留物加入40ml二氯甲烷(其中I₂的浓度为6.0mM,两个片段的反应浓度为0.5mM),I₂溶液加入后马上产生混浊物(与大分子反应过程体系为溶解状态不一样),常温搅拌1h后将反应液冷却到0℃,加入Na₂S₂O₃ (3.0mM) 溶液直至I₂的颜色消失,在水相与有机相CH₂Cl₂分层处产生固体物质(与大分子反应淬灭后有机相CH₂Cl₂与水相分层明显不一样),固体物质在CH₂Cl₂,CHCl₃,DMF,DMSO,THF,丙酮,乙酸乙酯等溶剂中都不溶解,有机相CH₂Cl₂减压蒸馏得淡黄色固体,加入CH₂Cl₂溶解后得淡黄色液体,剩余少量白色固体不溶解与前面不溶解的固体物质一样以上溶剂都不溶解,淡黄色液体经薄层色谱(TLC)分析(现象与大分子物质反应产物中的极性最小的点一样)为A4与Z1的硫醚上脱下的三苯基化合物。未得到目标产物。

[0226] 合成步骤二:降低I₂溶液的浓度为1.0mM,加入I₂溶液后10min之内为澄清溶液,随着反应时间的延长30min后同样产生混浊物,后面的现象与以上相同,10min薄层色谱(TLC)分析发现大部分PLA162-Z1与PEG163-A4未参与反应,反应未得到目标产物。

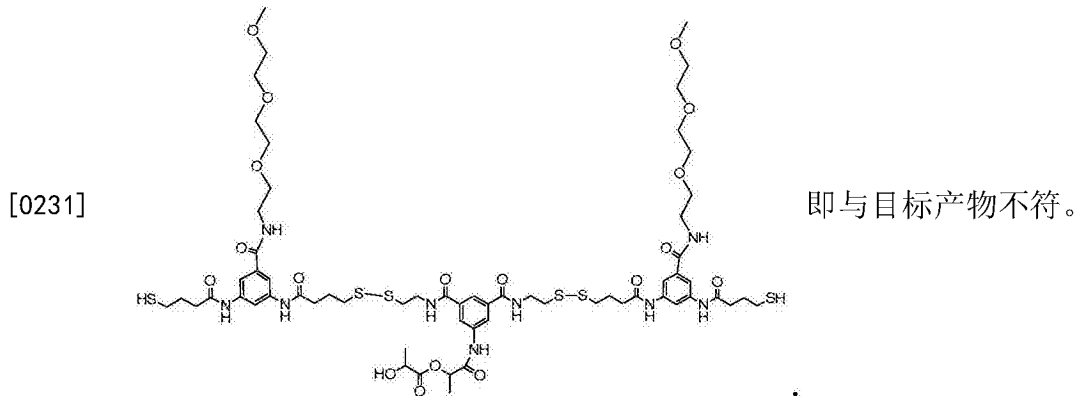
[0227] 合成步骤三:设置I₂溶液的浓度为1.0mM,反应当量PLA162-Z1:PEG163-A4为1.5:1,其反应现象与步骤二相同,反应未得到目标产物。

[0228] 合成步骤四:反应当量与步骤与步骤一相同,其中以重蒸干燥无水的CH₂Cl₂配置I₂溶液作为反应溶剂,干燥条件下反应,加入I₂溶液立即产生混浊状液体与步骤一现象一样,后面处理现象与步骤也一样,未得到目标产物。同样降低降低I₂溶液的浓度为1.0mM,但反应现象与合成步骤二还是一样,反应未得到目标产物。

[0229] 合成步骤五:反应当量与步骤一相同,取PLA162-Z1与PEG163-A4溶于5mL DMSO,同时加入10mL CH₂Cl₂一起溶解,旋蒸干CH₂Cl₂后加入I₂溶液反应,反应过程为溶解状态未见混浊物产生,反应过程中薄层色谱(TLC)检测反应,30min后反应稳定无变化,其中含有一个主产物和两个副产物(其中一个副产物点在薄层板上显示含量很少),反应1h,其后处理步骤如步骤一,淬灭后分层明显,旋蒸干有机相粗产品经薄层色谱分离的到其中主产物6mg,反应未得到目标产物,主产物NMR解析如下:


[0230] ¹H NMR (400MHz, MeOD) δ8.12 (d, J=1.5Hz, 2H, ArH), 8.04-7.93 (m, 3H, ArH), 7.66-

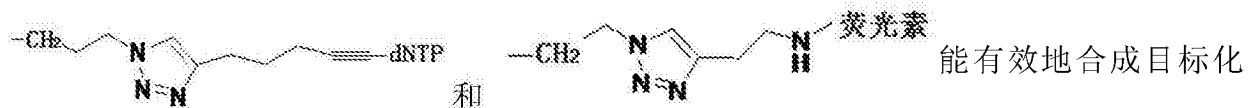
7.60 (m, 4H, ArH) , 5.18 (q, J=6.9Hz, 1H, CH₃-CH-O-) , 4.39 (q, J=6.9Hz, 1H, CH₃-CH-OH) , 3.73-3.53 (m, 28H, PEG-CH₂- , -CH₂-) , 3.33 (s, 6H, CH₃O-) , 3.00 (t, J=6.9Hz, 4H, -CH₂-) , 2.83 (q, J=6.9Hz, 8H, -CH₂-) , 2.52 (td, J=7.1, 3.2Hz, 8H, -CH₂-) , 2.10 (dd, J=13.9, 6.9Hz, 8H, -CH₂-) , 1.56 (d, J=6.9Hz, 3H, CH₃-) , 1.47 (d, J=6.9Hz, 3H, CH₃-) . 从NMR推测结构如下:



[0232] 合成步骤六: 反应当量与步骤一相同, 使用干燥除水的DMSO及CH₂Cl₂作为溶剂干燥无水条件下反应, 反应现象及结果与合成步骤五相同, 未得到目标产物。

[0233] 合成步骤七: 反应当量与步骤一相同, 反应溶剂改为干燥除水的THF, 同时使用了6.0mM及1.0mM的四氢呋喃I₂溶解作为溶剂参与反应, 其反应结果与反应步骤五同样相同, 未得到目标产物。

[0234] 所以本篇专利中, 优选的选择R₁, R₂结构中是  ,



合物, 即交叉偶联产物, 并且能应用与DNA测序, 这是非常有意义的。

[0235] 综上所述, 本发明采用分子胶为连接基团, 用于合成荧光素标记核苷酸并用于DNA测序系统进行初步的评价, 结果表明该类可逆终端具有应用于DNA测序的巨大潜力。同时将四种不同的荧光素分别标记含四种不同核苷酸(A, G, C, U)的可逆终端。在高通量测序的生化反应中, 与只用一种荧光素标记的四种核苷酸反应体系相比较, 在同样的条件下可以将生化反应的时间缩短4倍, 这对于高通量测序结果的准确率非常重要, 因为随着反应时间的延长, 测序体系中的模板DNA会部分降解, 导致反应噪声的增加, 从而降低测序准确率。因此, 用四种荧光素标记的体系, 可以大大提供测序的准确率。实施例5和6的测试结果进一步验证了本发明的可逆终端已完成满足高通量测序的生化反应要求, 具备较好的实用前景。

[0236] 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。

序 列 表

	<110> 上海交通大学	
	<120> 基于分子胶的荧光标记核苷酸及其在 DNA 测序中的用途	
	<130> DAG18229	
	<160> 6	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> artificial sequence	
	<400> 1	
	ctccttccc ttcccttcc ttccaaaaa aaaaaagtgc	40
	<210> 2	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
[0001]	<220>	
	<223> artificial sequence	
	<400> 2	
	gaggaaaggg aagggaagg aagg	24
	<210> 3	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> artificial sequence	
	<400> 3	
	ctccttccc ttcccttcc ttccatgat cgccatgctg	40
	<210> 4	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> artificial sequence	
	<400> 4	

	ctccttccc ttcccttcc ttccaaegat egccatgtgc	40
	<210> 5	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> artificial sequence	
[0002]	<400> 5	
	ctccttccc ttcccttcc ttccaaagat egccatgtgc	40
	<210> 6	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> artificial sequence	
	<400> 6	
	ctccttccc ttcccttcc ttccaaaagt egccatgtgc	40

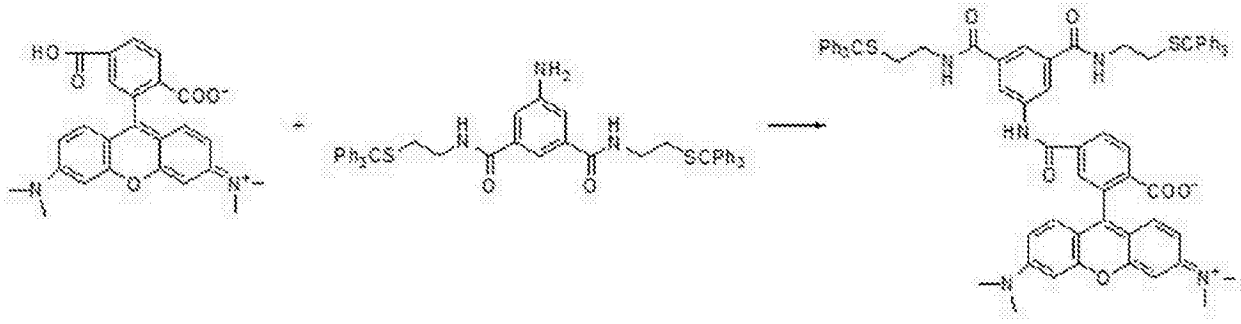


图1

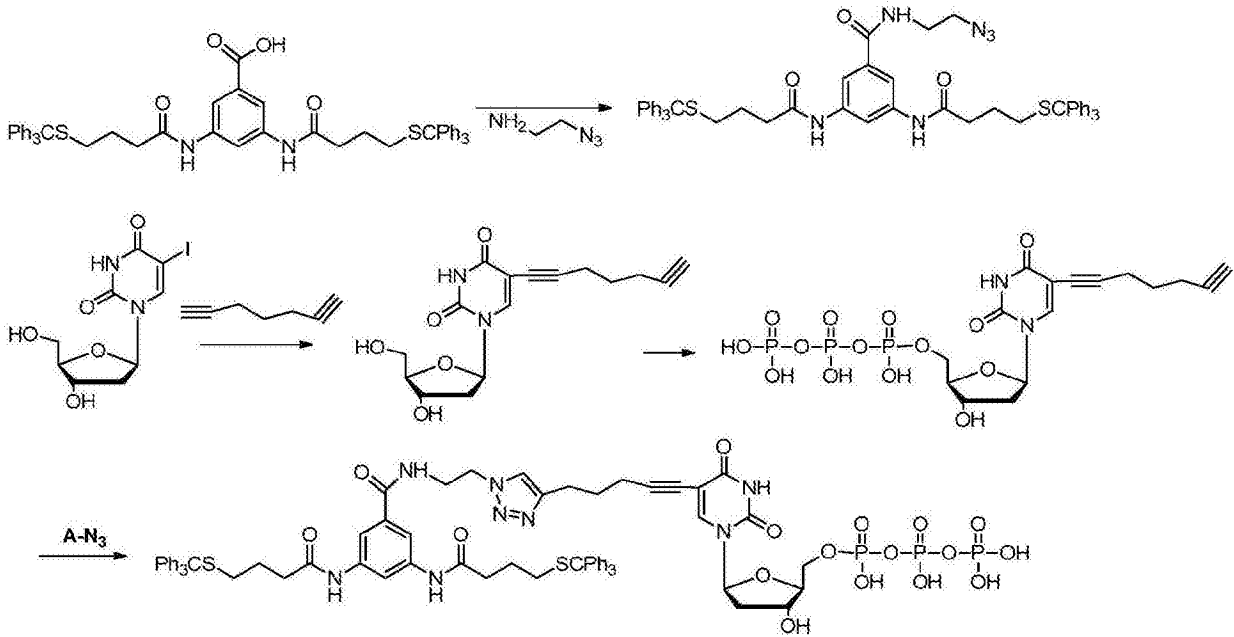


图2

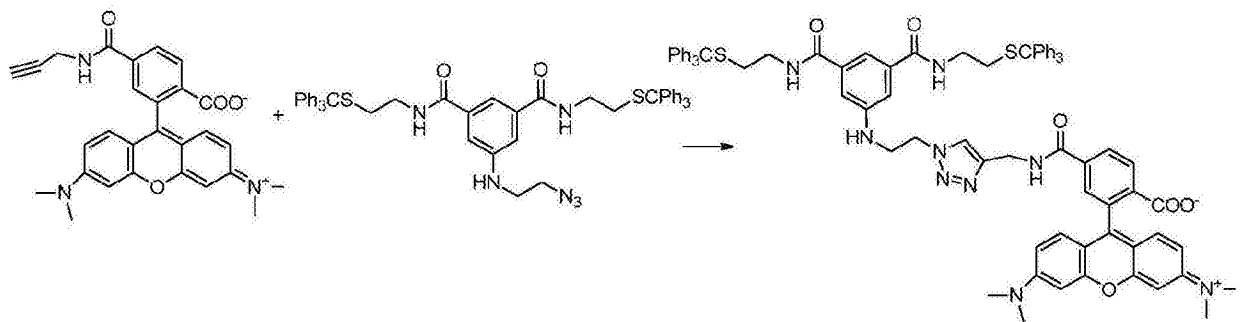


图3

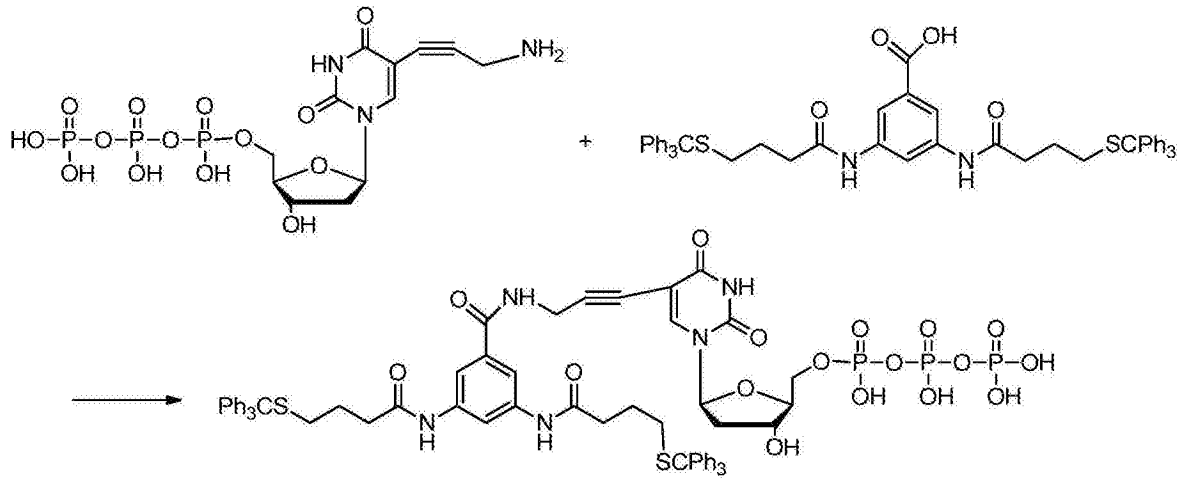


图4

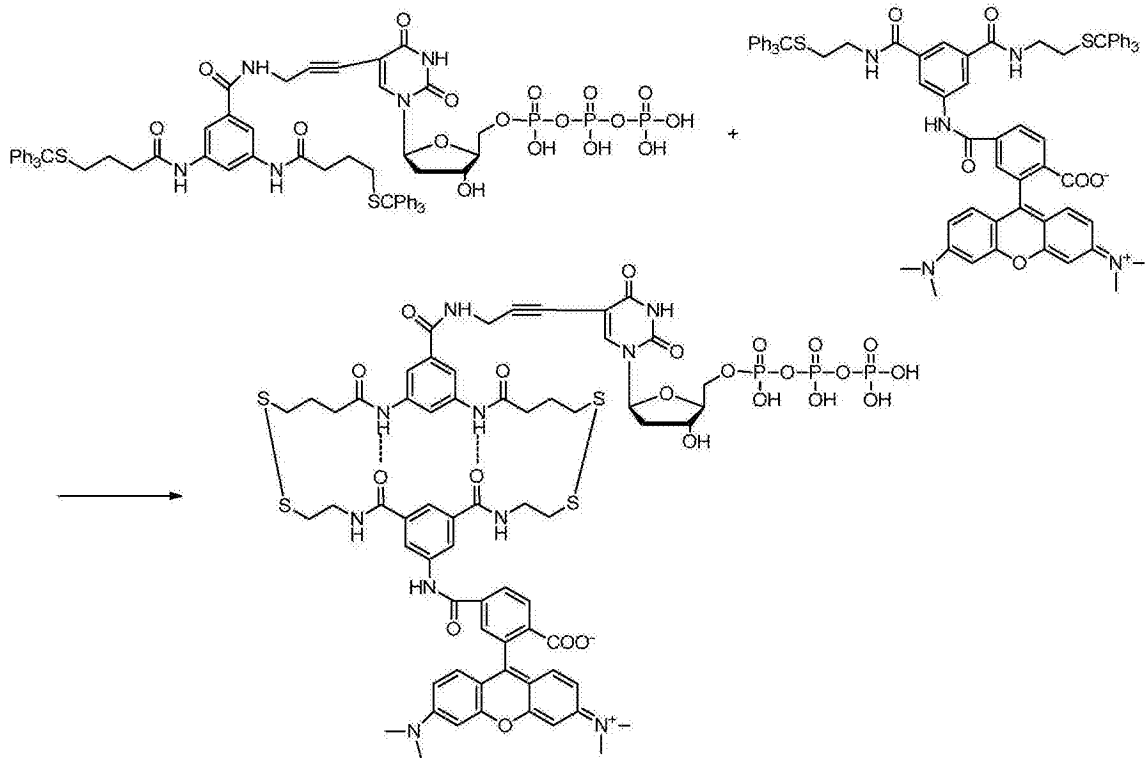


图5

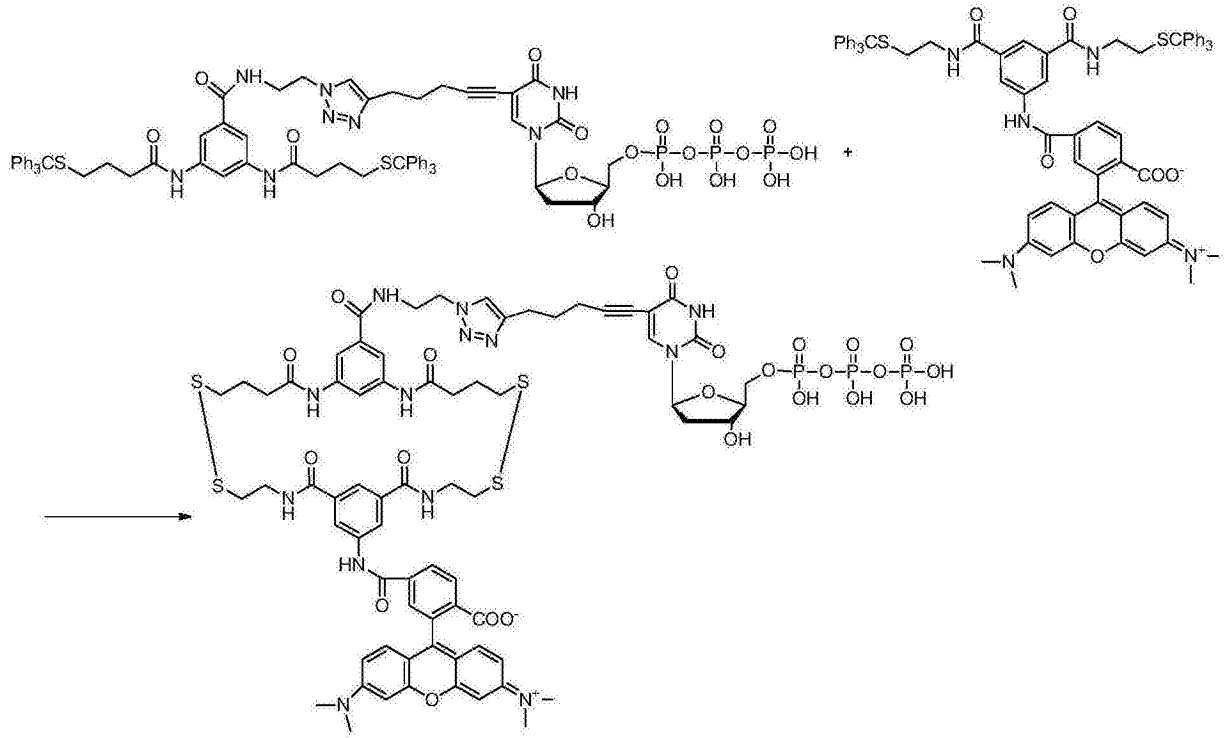


图6

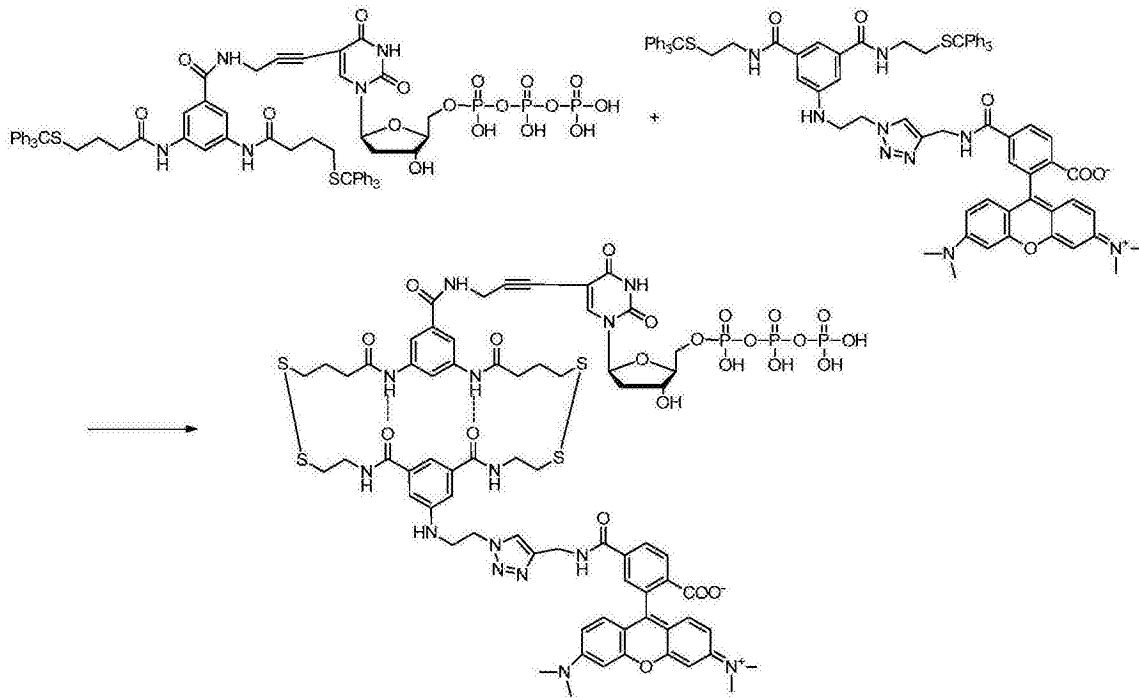


图7

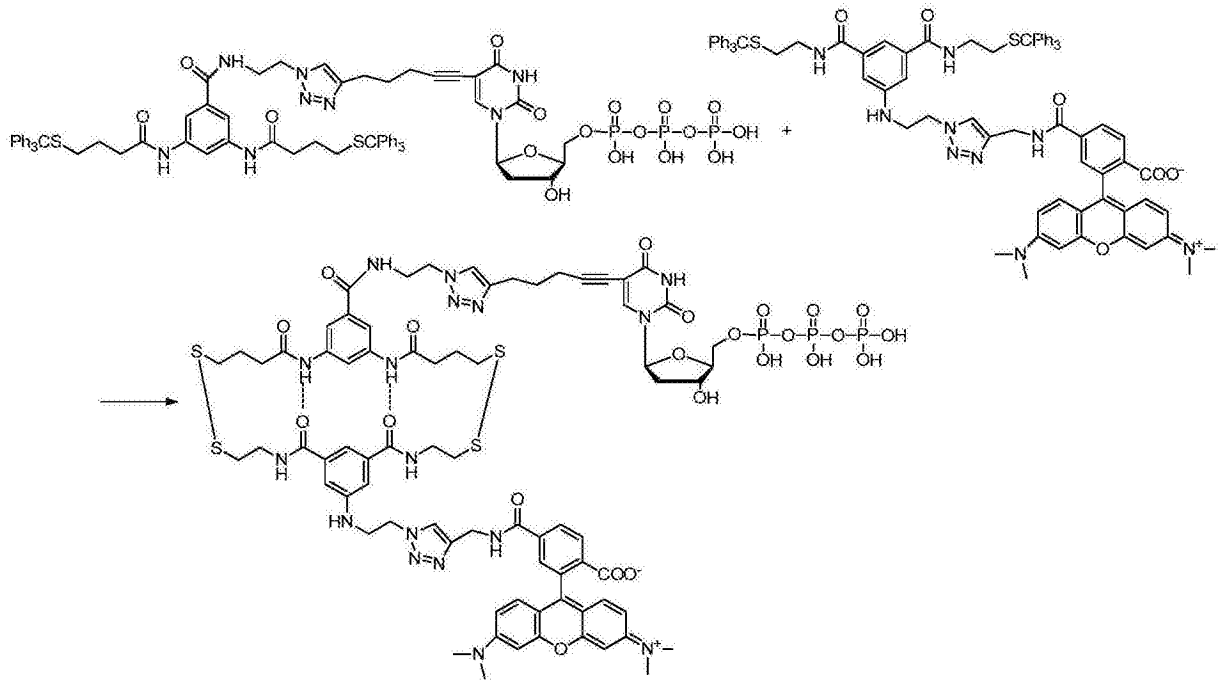


图8

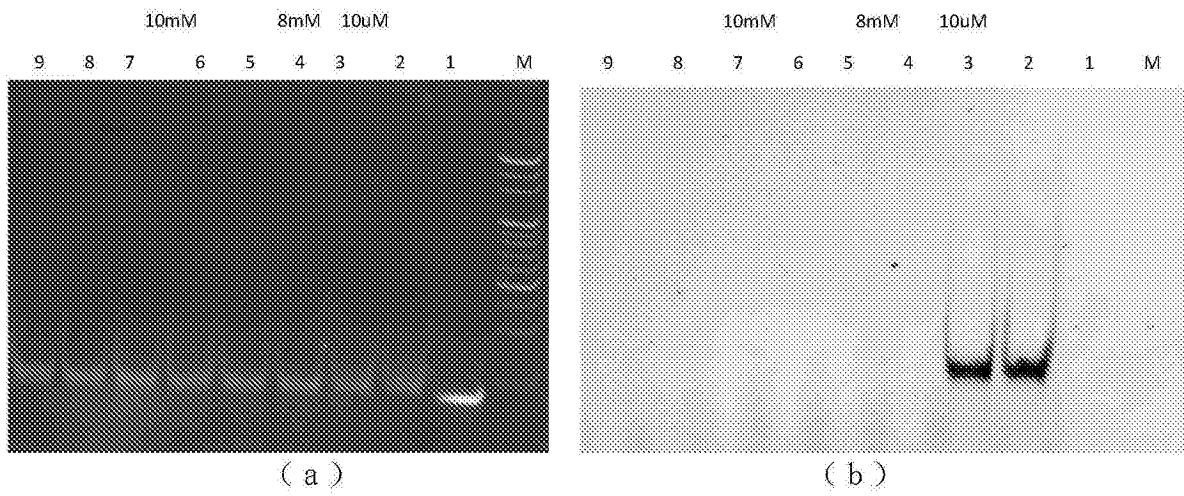


图9

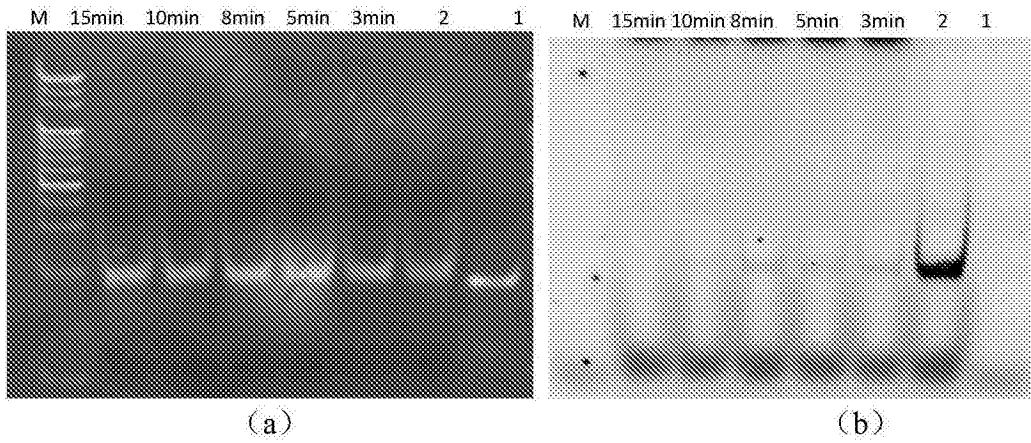


图10

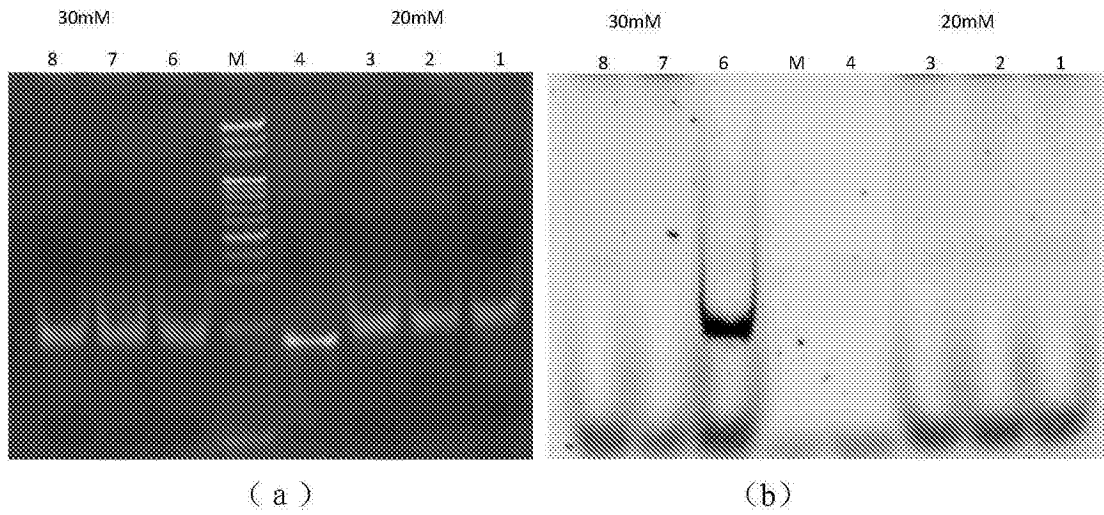


图11

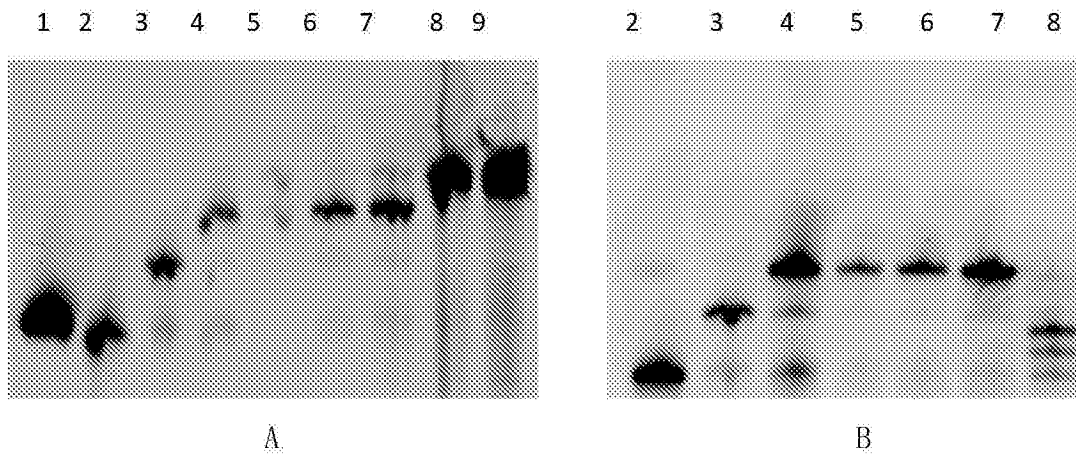


图12

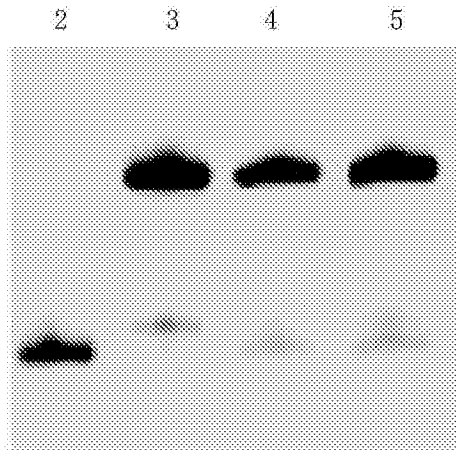


图13

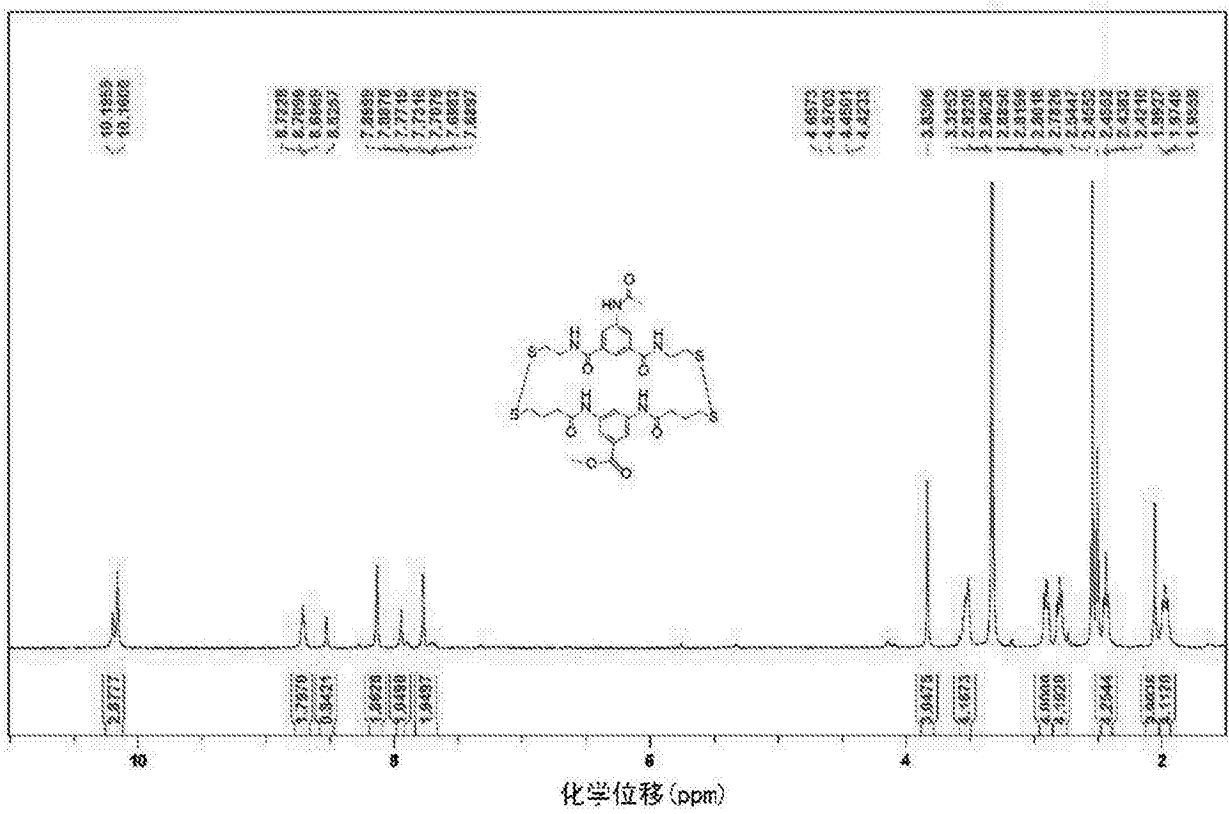


图14

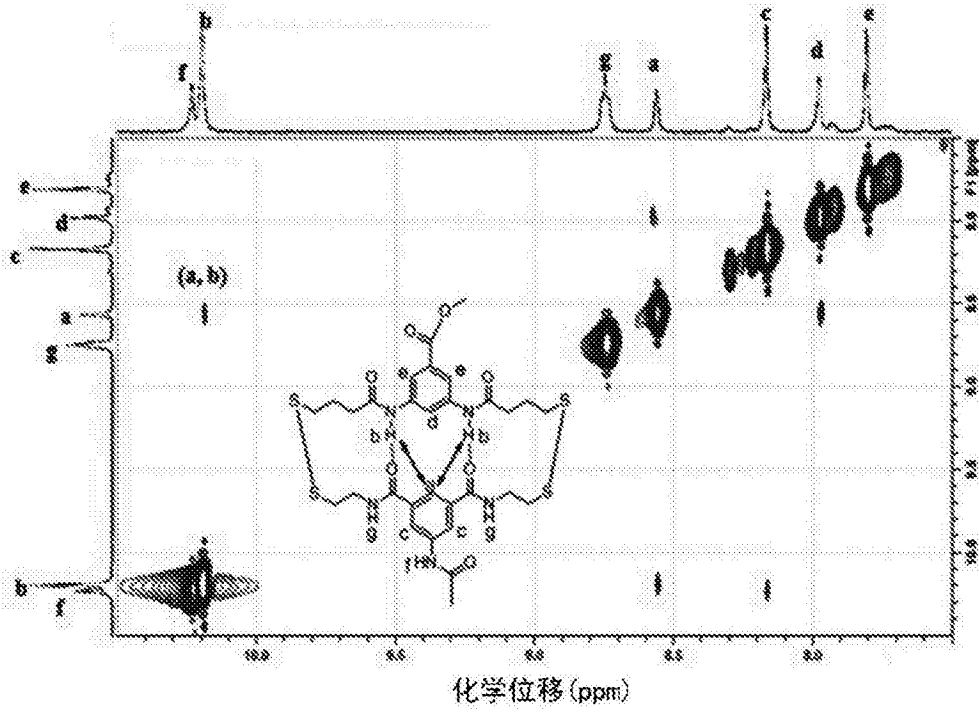


图15