



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114671842 A

(43) 申请公布日 2022.06.28

(21) 申请号 202011546546.9

(22) 申请日 2020.12.24

(71) 申请人 郑州思昆生物工程有限公司
地址 450001 河南省郑州市自贸试验区郑
州片区(经开)经开第六大街133号1号
厂房3号楼6层

(72) 发明人 龙海燕 张东阳

(51) Int. Cl.
C07D 311/82 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)
C07H 19/14 (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
C12N 15/11 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

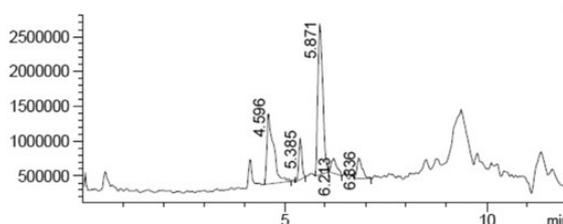
权利要求书2页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

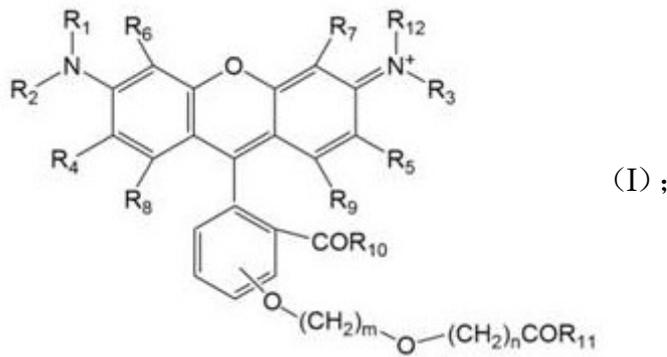
一种荧光化合物及其制备方法、荧光修饰核苷酸、试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及有机化合物试剂技术领域,具体涉及一种荧光化合物及其制备方法、荧光修饰核苷酸、试剂盒,其中荧光修饰核苷酸能够应用于边合成边测序的核酸测序反应。本发明创造性的改进-COR₁₁-与荧光化合物罗丹明染料核心结构之间的连接结构,采用含有双氧的杂烷基结构-O-(CH₂)_m-O-(CH₂)_n-作为连接结构将连接基-COR₁₁-连接至荧光化合物罗丹明核心结构,提高荧光化合物作为修饰分子形成的修饰核苷酸用作核酸测序反应过程中的荧光稳定性、荧光强度和掺入效率。



1. 一种荧光化合物,其特征在于,由式(I)所示的化学结构通式的化合物形成:



其中m、n为1~3的整数;

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{12} 分别为H或烷基、芳基或被取代的烷基或被取代的芳基;

R_4 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_4 连同 R_2 或 R_8 形成环的碳链或杂取代链;

R_5 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_5 连同 R_3 或 R_9 形成环的碳链或杂取代链;

R_6 为H、卤素、羟基-或烷氧基、烷基或被取代的烷基或连同 R_1 形成环的碳链或杂取代碳链;

R_7 为H、卤素、羟基-或烷氧基、烷基或被取代的烷基或连同 R_3 形成环的碳链或杂取代碳链;

R_8 、 R_9 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羟基-或烷氧基;

R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$,其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基;

R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$,其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基,芳基或被取代的芳基。

2. 如权利要求1所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 均为H。

3. 如权利要求2所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_1 为烷基或被 SO_3^- 取代的烷基,并且 R_2 为H。

4. 如权利要求3所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_1 为乙基。

5. 如权利要求4所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_3 为烷基或被 SO_3^- 取代的烷基,并且 R_{12} 为H。

6. 如权利要求5所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_3 为乙基。

7. 如权利要求6所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_4 为甲基。

8. 如权利要求7所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_5 为甲基。

9. 如权利要求1~8所述的荧光化合物,其特征在于,其中m为2或3,n为1。

10. 如权利要求9所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_{10} 为OH。

11. 如权利要求10所述的荧光化合物,其特征在于,其中 R_{11} 为OH。

12. 一种荧光修饰核苷酸,其特征在于,采用如权利要求1~11任一项所述的荧光化合物作为修饰基团。

13. 如权利要求12所述的荧光修饰核苷酸,其特征在于,所述荧光化合物通过连接基 R_{15} 附接至核苷酸形成所述的荧光修饰核苷酸。

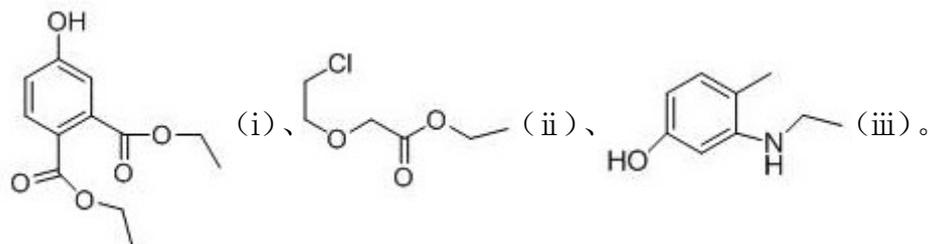
14. 如权利要求13所述的荧光修饰核苷酸,其特征在于,所述连接基附接至核苷酸嘧啶碱基的C5位或7-脱氮嘌呤碱基的C7位。

15. 如权利要求13或14所述的荧光修饰核苷酸,其特征在于,所述荧光修饰核苷酸的核糖或脱氧核糖的3' OH位置共价附接阻断基团。

16. 如权利要求15所述的荧光修饰核苷酸,其特征在于,所述阻断基团为甲基叠氮。

17. 一种试剂盒,其特征在于,包含如权利要求12~16任一项所述的荧光修饰核苷酸。

18. 一种如权利要求11所述的荧光化合物的制备方法,其特征在于,以式(i)、式(ii)、式(iii)所示化合物为原料制备而成:



一种荧光化合物及其制备方法、荧光修饰核苷酸、试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及有机化合物试剂技术领域,具体涉及一种荧光化合物及其制备方法、荧光修饰核苷酸、试剂盒,荧光修饰核苷酸应用于核酸测序。

背景技术

[0002] DNA测序作为一种重要的实验技术,在生物学研究中有着广泛的应用。早在DNA双螺旋结构被发现后不久就有人报道过DNA测序技术,但是当时的操作流程复杂,没能形成规模。随后在1977年Sanger发明了具有里程碑意义的末端终止测序法,同年A.M.Maxam 和 W.Gilbert发明了化学降解法。Sanger法因为既简便又快速,并经过后续的不断改良,成为了迄今为止DNA测序的主流。然而随着科学的发展,传统的Sanger测序已经不能完全满足研究的需要,对模式生物进行基因组重测序以及对一些非模式生物的基因组测序,都需要费用更低、通量更高、速度更快的测序技术,第二代测序技术(Next-generation sequencing)应运而生。第二代测序技术的基本原理是边合成边测序,用不同颜色的荧光标记四种不同的dNTP,当DNA聚合酶合成互补链时,每添加一种dNTP就会释放出不同的荧光,根据捕捉的荧光信号并经过特定的计算机软件处理,从而获得待测DNA的序列信息。

[0003] 然而,采用不同颜色荧光标记核苷酸进行多重荧光检测存在限制荧光标记物选择的多重因素。比如最重要的是需要考虑荧光染料必须与使用的其他试剂如缓冲液、聚合酶、连接酶等是相容的,尤其是需要荧光染料修饰后的核酸是聚合酶能够识别的。并且随着测序技术的不断发展,人们研究发现具有改进的荧光性质(例如荧光强度、荧光最大值的位置以及荧光带的形状)的荧光染料分子可以改进核酸测序的速度和准确性。由于测序反应的缓冲液环境、测序反应的温度环境以及核酸的碱基结构等均会影响荧光化合物的发光性能,比如荧光最大值、荧光强度等。由此,人们逐渐开始通过调整和改进荧光化合物的结构,提高荧光化合物与核碱基之间的序列特异性作用性能,进而提高荧光化合物在测序过程中的发光性能。同时,通过荧光化合物结构的改进,提高修饰核苷酸并入的效率,降低测序的误差水平并且减少核酸测序中试剂的使用,降低核酸测序的成本,成为了研究热点。

发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供一种荧光化合物,能够作为核酸测序的修饰核苷酸的荧光修饰结构,提高荧光修饰核苷酸在测序环境中的荧光强度、以及掺入效率。

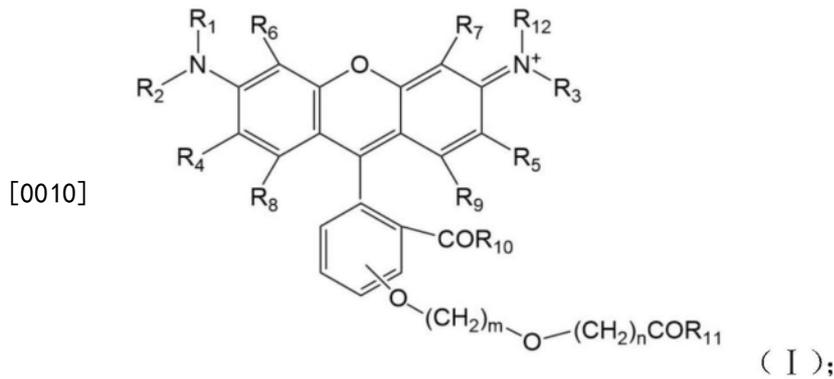
[0005] 本发明的目的之二是提供一种荧光化合物的制备方法。

[0006] 本发明的目的之三是提供连接本发明荧光化合物进行修饰的荧光修饰核苷酸,应用于边合成边测序系统,提高修饰核苷酸的荧光强度。

[0007] 同时,本发明还在于提供一种试剂盒,包含本发明提供的荧光修饰核苷酸,应用于核酸测序。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0009] 一种荧光化合物,由式(I)所示的化学结构通式的化合物形成:



[0011] 其中m、n为1~3的整数；

[0012] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{12} 分别为H或烷基、芳基或被取代的烷基或被取代的芳基；

[0013] R_4 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_4 连同 R_2 或 R_8 形成环的碳链或杂取代链；

[0014] R_5 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_5 连同 R_3 或 R_9 形成环的碳链或杂取代链；

[0015] R_6 为H、卤素、羟基-或烷氧基、烷基或被取代的烷基或连同 R_1 形成环的碳链或杂取代碳链；

[0016] R_7 为H、卤素、羟基-或烷氧基、烷基或被取代的烷基或连同 R_3 形成环的碳链或杂取代碳链；

[0017] R_8 、 R_9 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羟基-或烷氧基；

[0018] R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$ ，其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基；

[0019] R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$ ，其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基，芳基或被取代的芳基。

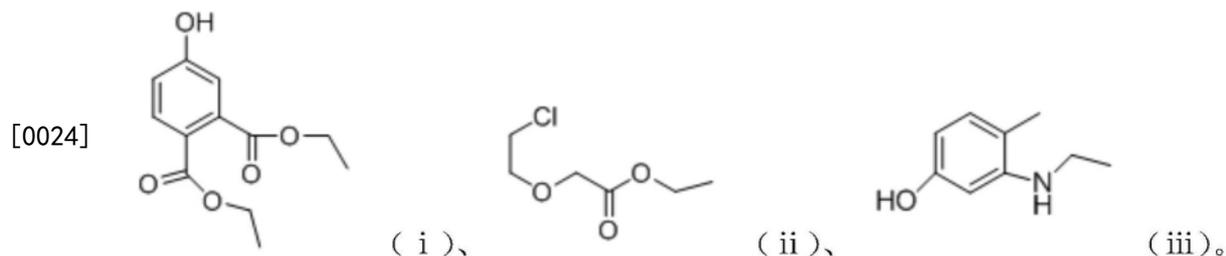
[0020] 需要解释的是，由式(I)所示的化学结构通式的化合物形成是指荧光化合物的结构可以是式(I)所示的化学结构，也可以是式(I)所示的化学结构的内消旋体，也可以是式(I)所示化学结构的其他共振结构。

[0021] 本发明荧光化合物用作以荧光作为检测信号的标记物，通常通过共价连接、表面缀合或其他形式附接至检测过程发生反应的试剂中，比如蛋白试剂、核酸试剂等；本发明具体以作为核苷酸的荧光修饰基团对本发明荧光化合物的用途进行举例说明。具体的，将本发明荧光化合物通过连接基附接至核苷酸形成修饰核苷酸，使修饰核苷酸具有独特的荧光性能，通过检测荧光信号判断修饰核苷酸的存在，甚至判断修饰核苷酸的种类。本发明荧光化合物通常是通过 $-COR_{11}-$ 作为连接基附接至核苷酸形成修饰核苷酸，本发明创造性的改进 $-COR_{11}-$ 与荧光化合物罗丹明染料核心结构之间的连接结构，采用含有双氧的杂烷基结构 $-O-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 作为连接结构将连接基 $-COR_{11}-$ 连接至荧光化合物罗丹明核心结构，进一步提高荧光化合物作为修饰分子形成的修饰核苷酸用作核酸测序反应过程中的荧光稳定性、荧光强度和掺入效率。

[0022] 本发明的一个最优选实施例中，上述荧光化合物结构中m为2或3，n为1； R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_2 、 R_{12} 均为H， R_1 、 R_3 为乙基， R_4 、 R_5 为甲基， R_{10} 为OH， R_{11} 为OH。应当可以理解的是，在不影响本发明声称的荧光化合物的荧光性能和作为修饰分子形成修饰核苷酸的其他性能的前提下，本发明荧光化合物核心结构不同位置的取代基也可以为其他结构取代基，m、n为1~3的

整数。

[0023] 上述荧光化合物的制备方法,以式(i)、式(ii)、式(iii)所示化合物为原料制备而成:



[0025] 可选的,上述制备方法包括以下操作步骤:

[0026] 1) 取式(i)化合物,加入有机溶剂和碳酸盐,室温搅拌反应后,加入式(ii)化合物,加热反应完全后,萃取出有机相并干燥有机相,制得液态中间产物1;

[0027] 2) 取液态中间产物1,加入低沸点有机溶剂,在碱性条件下,进行水解反应,冷却至室温,浓缩去除低沸点有机溶剂,调节pH为酸性,萃取分离出有机相,干燥有机相,得固体中间产物2;

[0028] 3) 取固体中间产物2、式(iii)化合物,高沸点有机溶剂和/或催化剂,加热反应完全,冷却至室温,过滤、纯化,制得所述荧光化合物。

[0029] 上述荧光化合物通过连接基 R_{15} 附接至核苷酸形成荧光修饰核苷酸,通常附接位置为核苷酸嘧啶碱基的C5位或7-脱氮嘌呤碱基的C7位。并且为了配合边合成边测序的核酸测序过程,荧光修饰核苷酸的核糖或脱氧核糖的3' OH位置共价附接阻断基团,本发明一个实施例优选的,阻断基团为甲基叠氮。

[0030] 本发明还提供一种用于核苷酸测序的试剂盒,包含四种核苷酸试剂,其中一种核苷酸试剂为上述荧光修饰核苷酸,其他三种核苷酸试剂采用不同的荧光化合物进行标记修饰,每种荧光化合物具有不同的最大吸收度且每种荧光化合物相互之间是可区分的;

[0031] 本发明另外的实施例中提供一种用于核苷酸测序的试剂盒,包含四种核苷酸试剂,其中第一种核苷酸采用上述荧光化合物作为荧光修饰基团,第二种核苷酸采用与第一种核苷酸结构不同的上述荧光化合物作为荧光修饰基团,第三种核苷酸修饰与第一种核苷酸和第二种核苷酸不同的荧光修饰基团,第四种核苷酸不带有荧光修饰基团;测序仪器可以包含在不同的波长下操作的两种激光,实现对四种修饰核苷酸的识别。

[0032] 上述荧光化合物、修饰核苷酸以及试剂盒能够用于核苷酸测序之外,还可以用于表达分析、杂交分析、细胞测定或蛋白质测定等。上述荧光化合物可以结合具体的应用场景附接至底物部分,底物部分可以是需要荧光标记修饰的任何分子或物质,例如核苷酸、多核苷酸、碳水化合物、配体、颗粒、固体表面、有机或无机聚合物、染色体、细胞核、活细胞及其组合或集合物;荧光化合物可以结合实际应用场景通过疏水吸引力、离子吸引力和共价附接等多种方式附接至相应的底物部分,优选的,通过 $-COR_5$ 转变为酰胺或酯结构通过连接基共价附接至底物部分。

附图说明

[0033] 图1是本发明实施例10中所述中间产物3的质谱图,用于表征荧光化合物连接上

Linker结构；

[0034] 图2是本发明实施例10中合成的荧光修饰核苷酸的色谱图，用于表征合成出荧光修饰核苷酸；

[0035] 图3是试验例1中不同荧光化合物的荧光强度对比图；

[0036] 图4是试验例2中不同修饰核苷酸的荧光性能稳定性对比比例图。

具体实施方式

[0037] 定义：

[0038] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所述技术领域普通技术人员通常理解相同的含义。

[0039] 术语“烷基”指的是C1-C20烃并且可以包括C3-C10非芳族的碳环，烷基可以包含一个或更多个不饱和的基团，比如烯基和炔基。

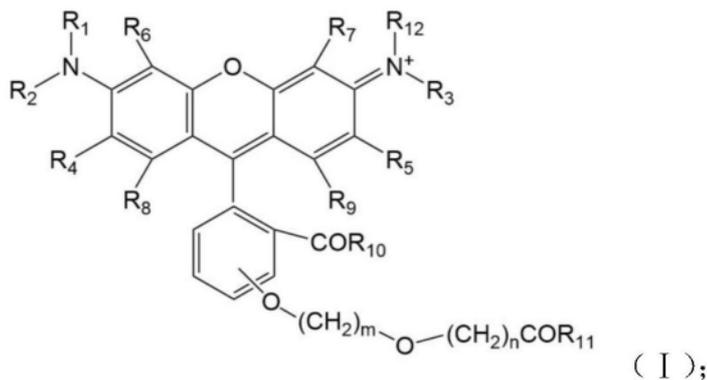
[0040] 术语“卤素”指的是氟、氯、溴、或碘，通常涉及核心结构中H原子的取代。

[0041] 术语“被取代的烷基”指的是上述烷基、烯基或炔基，任选地被卤素、氰基、 SO_3^- 、 SRa 、 ORa 、 NRbRc 、氧代、 CONRbRc 、 COOH 和 COORb 进一步取代。 Ra 、 Rb 和 Rc 可以各自独立地选自H、烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、芳基和被取代的芳基。其中被取代的烷基、被取代的烯基和被取代的炔基可以任选地通过选自O、NRb、S、S-O以及类似物至少一个杂原子或基团被中断。被取代的烷基还包括另外的芳基或被取代的芳基部分。

[0042] 本发明技术方案的详细描述：

[0043] 下面，结合具体实施方式，对本发明做进一步说明，但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明，本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。除非特别说明，以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0044] 本发明提供一种荧光化合物，其具有式(I)所示的化学结构通式，或式(I)所示的化学结构通式的内消旋体或共振结构：



[0046] 其中m、n为1~3的整数；

[0047] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_{12} 分别为H或烷基、芳基或被取代的烷基或被取代的芳基；

[0048] R_4 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_4 连同 R_2 或 R_8 形成环的碳链或杂取代链；

[0049] R_5 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_5 连同 R_3 或 R_9 形成环的碳链或杂取代链；

[0050] R_6 为H、卤素、羟基-或烷氧基、烷基或被取代的烷基或连同R1形成环的碳链或杂取代碳链；

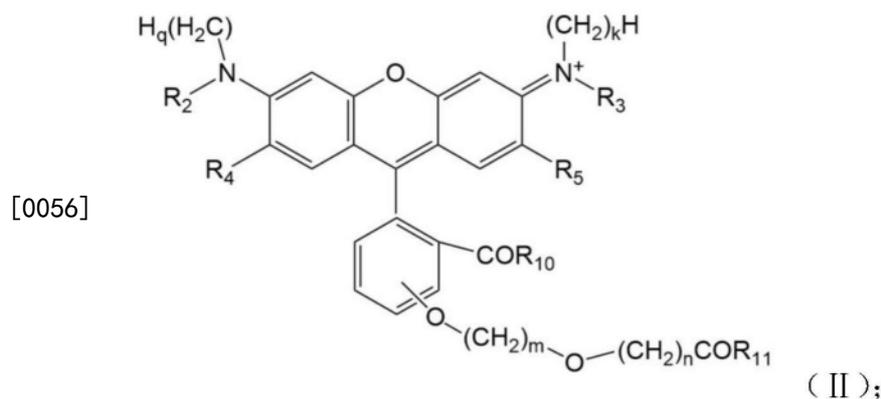
[0051] R_7 为H、卤素、羟基-或烷氧基、烷基或被取代的烷基或连同R3形成环的碳链或杂取代碳链；

[0052] R_8 、 R_9 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羟基-或烷氧基；

[0053] R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$ ，其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基；

[0054] R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$ ，其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基，芳基或被取代的芳基。

[0055] 作为优选的，本发明的其中一个实施例提供一种荧光化合物，其具有式(II)所示的化学结构通式，或式(II)所示的化学结构通式的内消旋体或共振结构：



[0057] 其中m、n为1~3的整数；q、k为1~6的整数；

[0058] R_1 、 R_{12} 为未取代的烷基； R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 为H；

[0059] R_2 、 R_3 分别为H或烷基、芳基或被取代的烷基或被取代的芳基；

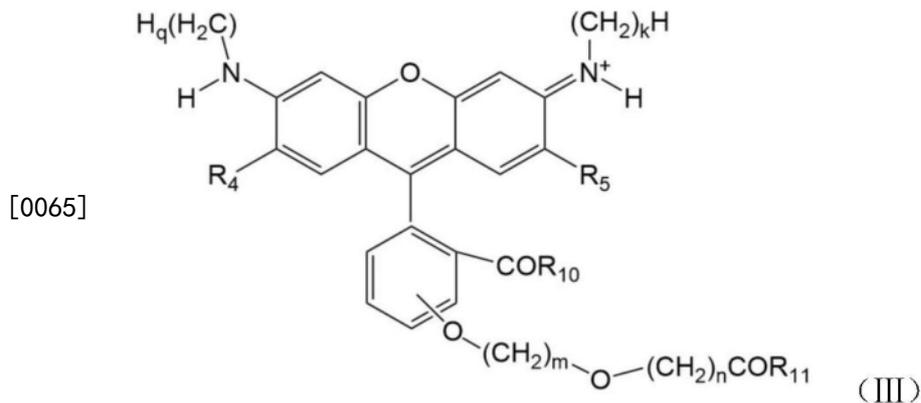
[0060] R_4 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_4 连同 R_2 或 R_8 形成环的碳链或杂取代链；

[0061] R_5 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_5 连同 R_3 或 R_9 形成环的碳链或杂取代链；

[0062] R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$ ，其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基；

[0063] R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$ ，其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基，芳基或被取代的芳基。

[0064] 作为进一步优选的，本发明的另一个实施例中提供一种荧光化合物，其具有式(III)所示的化学结构通式，或式(III)所示的化学结构通式的内消旋体或共振结构：



[0066] 其中m、n为1~3的整数；q、k为1~6的整数；

[0067] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_2 、 R_3 为H； R_1 、 R_{12} 为未取代的烷基；

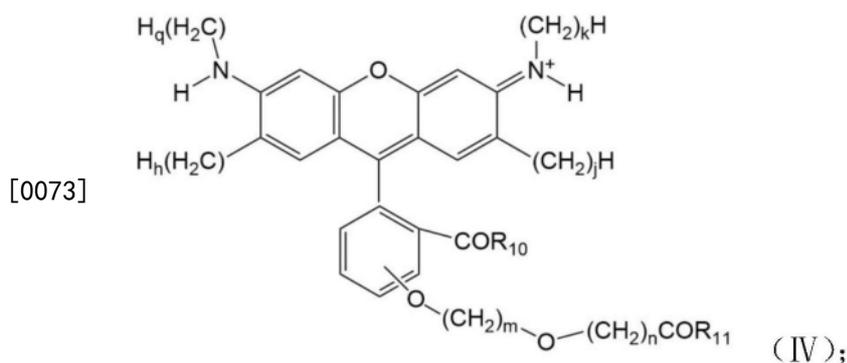
[0068] R_4 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_4 连同 R_2 或 R_8 形成环的碳链或杂取代链；

[0069] R_5 为H、烷基或被取代的烷基、卤素、羧基、甲酰胺基、羟基-或烷氧基、或 R_5 连同 R_3 或 R_9 形成环的碳链或杂取代链；

[0070] R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$ ，其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基；

[0071] R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$ ，其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基，芳基或被取代的芳基。

[0072] 作为进一步优选的，本发明的另一个实施例中提供一种荧光化合物，其具有式(IV)所示的化学结构通式，或式(IV)所示的化学结构通式的内消旋体或共振结构：



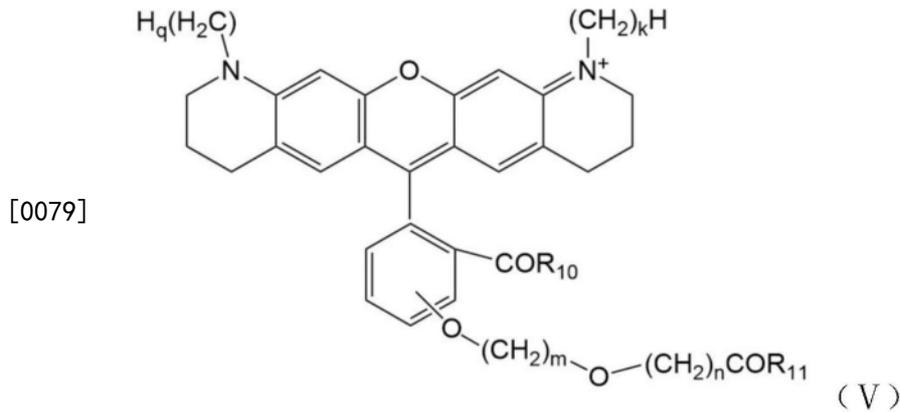
[0074] 其中m、n为1~3的整数；q、k、h、j为1~6的整数；

[0075] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_2 、 R_3 为H； R_1 、 R_{12} 、 R_4 、 R_5 为未取代的的烷基；

[0076] R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$ ，其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基；

[0077] R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$ ，其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基，芳基或被取代的芳基。

[0078] 作为进一步优选的，本发明的另一个实施例中提供一种荧光化合物，其具有式(V)所示的化学结构通式，或式(V)所示的化学结构通式的内消旋体或共振结构：



[0080] 其中m、n为1~3的整数；q、k为1~6的整数；

[0081] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 、 R_2 、 R_3 为H； R_1 、 R_{12} 为未取代的烷基；

[0082] R_4 为经由 $-CH_2-$ 的链被连接至 R_1 形成的6元环； R_5 为经由 $-CH_2-$ 的链被连接至 R_{12} 形成的6元环；

[0083] R_{10} 为 OR_{13} 或 $NR_{13}R_{14}$ ，其中 R_{13} 和 R_{14} 独立地为H、烷基或被取代的烷基；

[0084] R_{11} 为 OR_{15} 或 $NR_{15}R_{16}$ ，其中 R_{15} 和 R_{16} 独立地为H、烷基或被取代的烷基，芳基或被取代的芳基。

[0085] 上述荧光化合物结构中 COR_{11} 或 COR_{10} 作为连接基团的一部分通过将荧光化合物衔接至参与检测反应需要产生荧光信号的检测试剂或者检测载体上，比如蛋白、磁微粒、核酸等，实现对检测试剂和检测载体的荧光标记。通常当上述荧光化合物作为核苷酸的荧光修饰分子对核苷酸进行修饰改性，用于核酸测序反应时，以 COR_{11} 作为连接基团的一部分将荧光化合物连接至核苷酸的相应位置，本发明上述荧光化合物中， COR_{11} 通过含有双氧结构的杂烷链 $-O-(CH_2)_m-O-(CH_2)_n-$ 连接至荧光化合物罗丹明的核心结构中，对荧光化合物作为核苷酸修饰结构后的光谱性能进行优化，使形成的完整修饰核苷酸分子的荧光强度增强，荧光的温度稳定性提升，同时也在一定程度上提高修饰核苷酸分子在核酸测序反应中的掺入效率。下面将结合具体结构的荧光化合物以及形成的修饰核苷酸分子作为举例说明，对上述有益效果进行表征和验证：

[0086] 实施例1

[0087] 本实施例提供一种荧光化合物，其化学结构通式如式(VI)所示：

[0088] 实施例2

[0089] 本实施例提供一种荧光化合物，其化学结构通式如式(VII)所示：

[0090] 实施例3

[0091] 本实施例提供一种荧光化合物，其化学结构通式如式(VI-1)所示：

[0092] 实施例4

[0093] 本实施例提供一种荧光化合物，其化学结构式如下式(VI-2)所示：

[0094] 实施例5

[0095] 本实施例提供一种荧光化合物，其化学结构式如下式(VI-3)所示：

[0096] 实施例6

[0097] 本实施例提供一种荧光化合物，其化学结构是如下式(VI-4)所示：

[0098] 实施例7

[0099] 本实施例提供一种荧光化合物,其化学结构通式如式(VIII)所示:

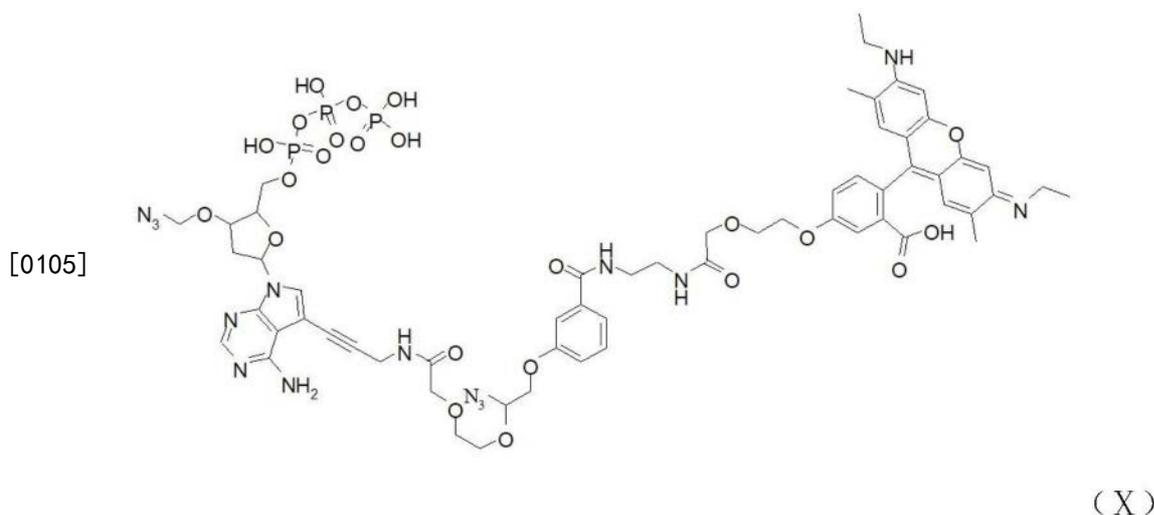
[0100] 实施例8

[0101] 本实施例提供一种荧光化合物,其化学结构通式如式(IX)所示:

[0102] 上述实施例1~8荧光化合物-COR₁₁结构均为-COOH,荧光化合物作为修饰分子对核苷酸进行荧光修饰时,通常需要中间连接基结构将荧光化合物附接至核苷酸的相应位置,通常需要首先将实施例1~8荧光化合物的-COR₁₁的COOH结构与形成连接基结构的化合物反应形成-COOR₁₅结构或-CONR₁₅R₁₆结构,通过R₁₅或R₁₅R₁₆结构将荧光化合物附接至核苷酸形成荧光修饰核苷酸,OR₁₅、NR₁₅R₁₆结构相当于荧光修饰核苷酸化合物结构中的 Linker结构,本领域技术人员公知的Linker结构均可适用于本申请,例如R₁₅和R₁₆可以选自烷基或被取代的烷基,芳基或被取代的芳基,并且通常Linker结构中包括化学可裂解或者物理/生物可切割结构。本发明下述实施例选择一种具体的Linker结构对本发明的荧光修饰核苷酸进行举例说明。

[0103] 实施例9

[0104] 本实施例提供一种荧光修饰核苷酸,其化学结构是如式(X)所示:



[0106] 在本实施例中将式(VI)荧光化合物通过具体的Linker结构附接至腺嘌呤核苷酸的C7位形成的荧光修饰核苷酸,其仍然能够响应酶促发生的沃森-克里克碱基配对反应。应当可以理解的是,本发明其他实施例提供的其他荧光化合物同样可以通过Linker结构附接至腺嘌呤核苷酸形成新的荧光修饰核苷酸,同样应当可以理解的是,本发明实施例提供的荧光化合物也可以通过linker结构附接至其他类型的核苷酸形成荧光修饰的核苷酸,对于嘧啶类核苷酸的附接位置为嘧啶碱基的C5位,形成的荧光修饰核苷酸同样能够响应酶促发生的沃森-克里克碱基配对反应。

[0107] 另外,需要解释的是上述实施例中针对荧光化合物与核苷酸之间的Linker结构进行了举例说明,为了避免荧光化合物分子影响DNA聚合酶对核苷酸的识别能力,通常会针对Linker结构进行延长改进,比如增加间隔基单元等,应当可以理解的是,本领域技术人员公知的其他结构的Linker同样适用于本发明修饰核苷酸,只需要形成的荧光修饰核苷酸能够正常响应酶促发生的沃森-克里克碱基配对反应即可。

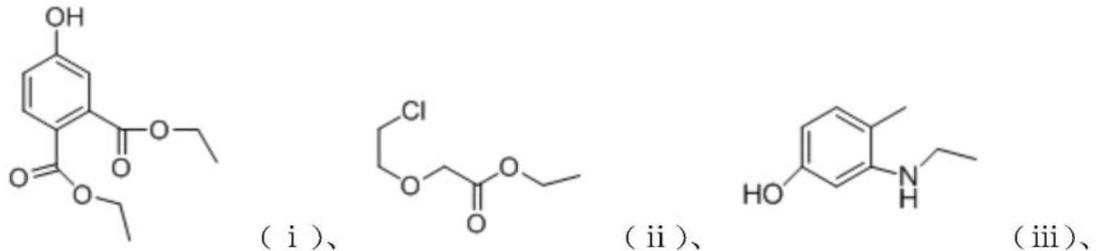
[0108] 另外,目前常用的边合成边测序的高通量测序方法,不同的核苷酸三磷酸酯(A、T、C和G)分别用独特且相互可区分的荧光分子修饰核苷酸,在测序反应中,加入修饰的核苷酸

试剂,通过检测并入测序模板多核苷酸链上的独特荧光分子的信号判断并入的核苷酸的种类,进而实现对多核苷酸链的测序;通常需要修饰的核苷酸具有3'-OH阻断基团,阻断基团包括可裂解或切割去除结构,控制聚合延伸反应的继续进行,在完成一次荧光信号检测后,将并入的修饰的核苷酸的3'-阻断基团和荧光分子通过相同的或者不同的化学或酶促或者物理方法移除,暴露可延伸的新生链用于下一步的修饰核苷酸的并入,实现核苷酸链的持续测序。因此,本发明实施例提供的荧光修饰核苷酸能够作为边合成边测序的试剂盒中的核苷酸试剂,并且当本发明荧光修饰核苷酸作为核苷酸试剂进行核苷酸测序反应时,荧光修饰核苷酸的核糖或脱氧核糖的3' OH位置共价附接阻断基团,该阻断基团通常是化学可裂解或物理/生物可切割的,比如甲基叠氮。同时,上述用于核苷酸测序的试剂盒还包括除本发明实施例提供的荧光修饰核苷酸之外的其他三种核苷酸试剂,其他三种核苷酸试剂可以是具有荧光标记的或不具有荧光标记的,作为优选的,其他三种核苷酸试剂均具有不同的荧光修饰,并且每种荧光化合物具有不同的最大吸收度且每种荧光化合物相互之间是可区分的。

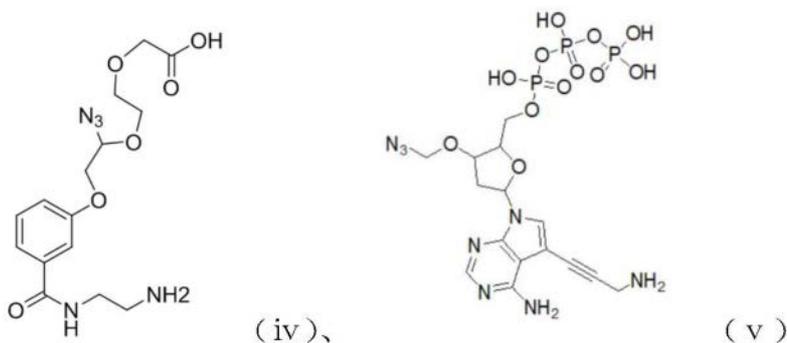
[0109] 作为进一步优选的,本发明试剂盒包含四种荧光标记的核苷酸,其中第一种核苷酸采用本发明荧光化合物作为标记,第二种核苷酸采用不同与本发明荧光化合物光谱发光颜色的化合物作为标记,第三种核苷酸采用第一种和第二种核苷酸的荧光修饰基团的混合物作为标记,第四种核苷酸不连接荧光标记物,具体的第一种核苷酸、第二种核苷酸、第三种核苷酸和第四种核苷酸分别形成“红”、“绿”、“红/绿”以及“深色”的光信号。

[0110] 实施例10

[0111] 本实施例提供一种实施例9所示荧光修饰核苷酸的制备方法,以式(i)、式(ii)、式(iii)、式(iv)、式(v)所示化合物为原料制备而成:



[0112]

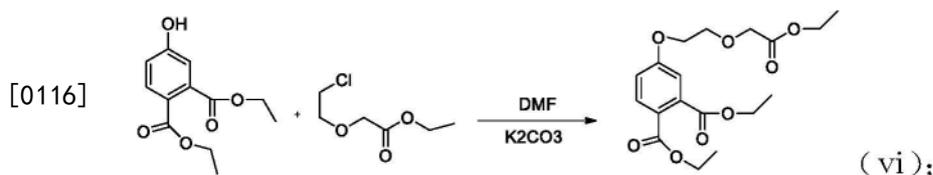


[0113] 具体操作步骤如下:

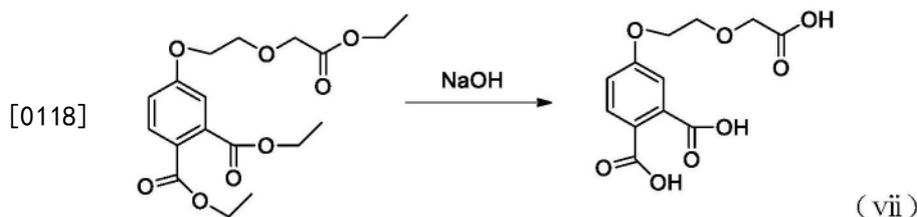
[0114] 1) 合成荧光化合物:

[0115] ①于250ml反应瓶中依次加入式(i)化合物,DMF, K_2CO_3 ,室温搅拌反应后,加入式(ii)化合物,加热反应,点板监控反应完全。加水 and EA萃取,水相再用EA进行两次萃取;合并

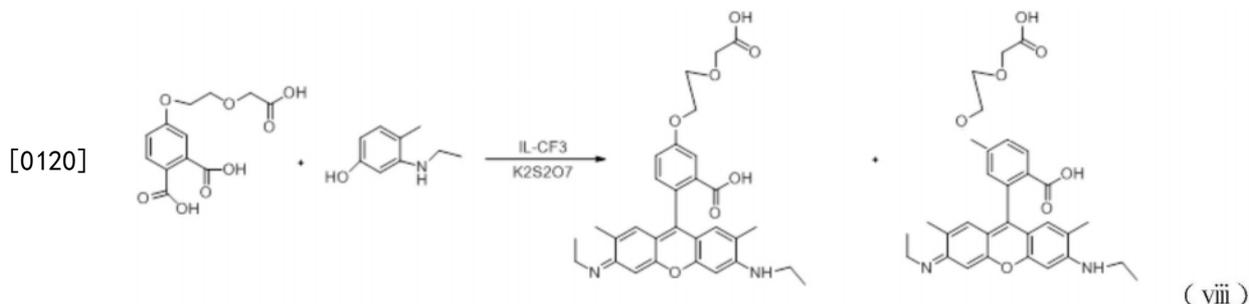
所有有机相,用饱和氯化钠洗涤后,无水硫酸钠干燥,有机相旋干,得到黄色油状液体,作为液态中间产物1;整体反应过程如下式(vi)所示:



[0117] ②于1L反应瓶中依次加入液态中间产物1,乙醇,水,NaOH,加热回流反应,点板监控反应完全。冷却至室温,浓缩除去乙醇,用稀盐酸调PH至1,加入EA萃取,分出有机相,水相再用EA进行两次萃取,至水相剩余少量残留,合并所有有机相,旋干,得到固体;作为固体中间产物2;整体反应过程如下式(vii)所示:



[0119] ③于250ml反应瓶中依次加入固体中间产物2,式(iii)化合物, $K_2S_2O_7$,IL-CF3,加热反应6,点板监控反应完全。冷却至室温,用甲醇溶解后,拌样,粗过柱,用DCM和MeOH混合物冲出产品,得到粗品;粗品用Flash分离异构体,MeOH/DCM体系冲出产品,分别收集相应的馏分,除去馏分中的溶剂,分别得到式(VI)荧光化合物和式(VII)荧光化合物;整体反应过程如下式(viii)所示:



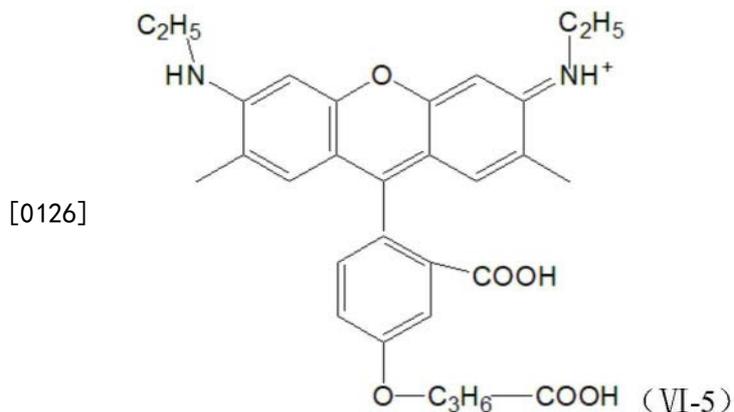
[0121] 2) 荧光化合物连接Linker结构:称取步骤1)合成的式(VI)荧光化合物,加入DMF溶解,加入DIEA,搅拌,加入TSTU,TLC监测反应完全,加入式(iv)所示的预先合成的Linker结构化合物,搅拌20min,TLC监测反应完全,加入水,旋干,大板分离,得到15mg中间产物3;表征如图1所示;

[0122] 3) 制备荧光修饰核苷酸:称取步骤2)制备的中间产物,加入DMF溶解,加入DIEA,搅拌,加入TSTU,TLC监测原料反应完全,称取预先合成的式(v)所示化合物,溶解在TEAB溶液中,加入到反应中,反应完全后,分离纯化,得到所述的荧光修饰核苷酸;表征如图2所示。

[0123] 需要说明的是按照实施例10同样的方法原理能够合成以实施例1~8所示荧光化合物作为修饰分子的荧光修饰核苷酸,只需要依据终产物的化合物结构替换式(ii)和式(iii)所示原料即可。

[0124] 对比例1

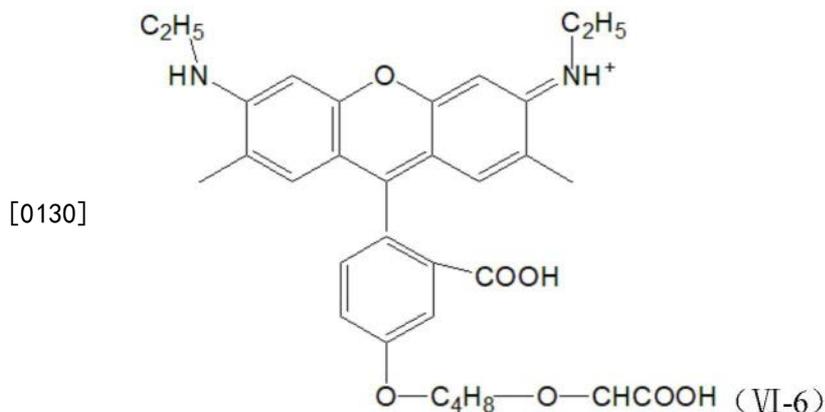
[0125] 本对比例提供一种荧光修饰核苷酸,其化学结构通式如下式(VI-5)所示:



[0127] 采用本对比例提供的荧光化合物作为原料,按照实施例10同样的方法原理,采用氯丁酸乙酯替换式(ii)化合物,制备对比例1荧光修饰核苷酸。

[0128] 对比例2

[0129] 本对比例提供一种荧光化合物,其化学结构通式如下式(VI-6)所示:



[0131] 采用本对比例提供的荧光化合物作为原料,按照实施例10同样的方法原理,采用4-氯丁氧基乙酸乙酯替换式(ii)化合物,制备对比例1荧光修饰核苷酸。

[0132] 试验例1

[0133] 将实施例1、实施例3~6、对比例1~2提供的荧光化合物配置成相同浓度的溶液(0.05 μmol/L),采用荧光分光光度计,在700V、520nm的激发光条件下,检测各个荧光化合物的荧光强度,如图3所示,由图3所示的结果可知:不同结构荧光化合物的荧光强度不同,整体而言,COR₁₁通过含有双氧结构的杂烷链-O-(CH₂)_m-O-(CH₂)_n-(m,n=1~3)连接至罗丹明的核心结构的化合物的荧光强度大于通过-O-(CH₂)₃-连接至罗丹明核心结构的化合物的荧光强度。

[0134] 试验例2

[0135] 将以实施例1、实施例3~6、对比例1~2提供的荧光化合物为修饰基团制备的修饰核苷酸配置成相同浓度的溶液(0.5 μmol/L),采用荧光分光光度计,检测不同修饰核苷酸溶液随着温度升高荧光强度的衰减比率(20℃、40℃、60℃),结果如图4所示,由图4所示的结果可知,不同结构荧光化合物制备的修饰核苷酸的荧光性能的温度稳定性不同,整体而言,COR₁₁通过含有双氧结构的杂烷链-O-(CH₂)_m-O-(CH₂)_n-(m=2或3,n=1或2)连接至罗丹明的核心结构的化合物修饰的核苷酸的荧光性能温度稳定性优于通过-O-(CH₂)₃-连接至罗丹明核心结构的化合物修饰的核苷酸的荧光性能温度稳定性。

[0136] 试验例3

[0137] 检测不同修饰核苷酸A的聚合酶亲和力Kd值:

[0138] 检测方法:50uL反应体系,TherminatorTM III DNA Polymerase 1uL,1*Thermopol Reaction Buffer,10uM ONA26,待测核苷酸A浓度0.1uM、0.2uM、0.4uM 0.8uM、1.6uM、5uM、10uM分别65℃反应10min,25mM EDTA终止并进行稀释后用Aglient DNA 1000 试剂盒分析掺入速率并根据米氏方程计算Kd;其中ONA26为发卡结构核酸底物,其序列为GACTGCGCCGC GCCATCATGACAGCTAGTTCTAGCTGTCATGATGGCGCGGCGC,下划线部分互补配对,退火形成发卡结构,结果如下表1所示:

[0139] 表1

	实施例1	实施例3	实施例4	实施例5	实施例6	对比例1	对比例2
Kd μ M	0.52	0.61	0.67	0.65	0.55	2.21	3.01

[0141] 由上述表1所示的结果可知,相比COR₁₁通过-O-(CH₂)₃-连接至罗丹明核心结构的化合物为修饰基团的修饰核苷酸A,本发明COR₁₁通过含有双氧结构的杂烷链 -O-(CH₂)_m-O-(CH₂)_n- (m,n=1~3) 连接至罗丹明的核心结构的化合物作为修饰基团形成的修饰核苷酸A,具有更高的聚合酶亲和力,提高修饰核苷酸的掺入效率,降低修饰核苷酸的用量,降低试剂成本。

[0142] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

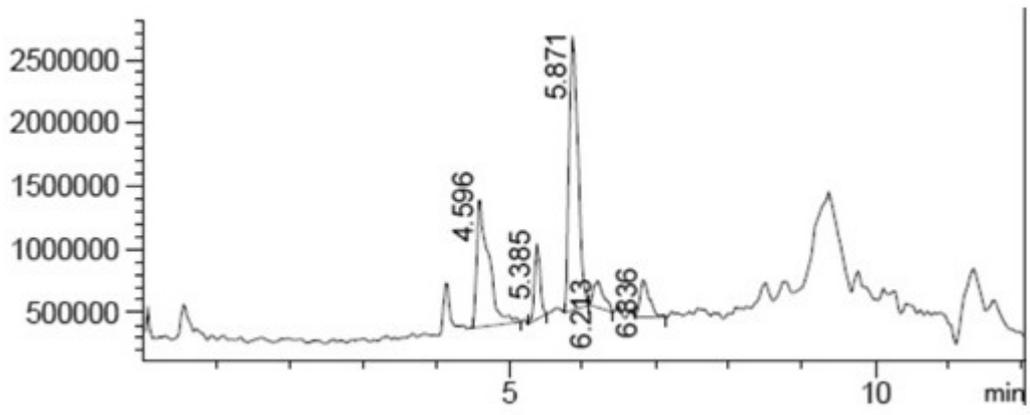


图1

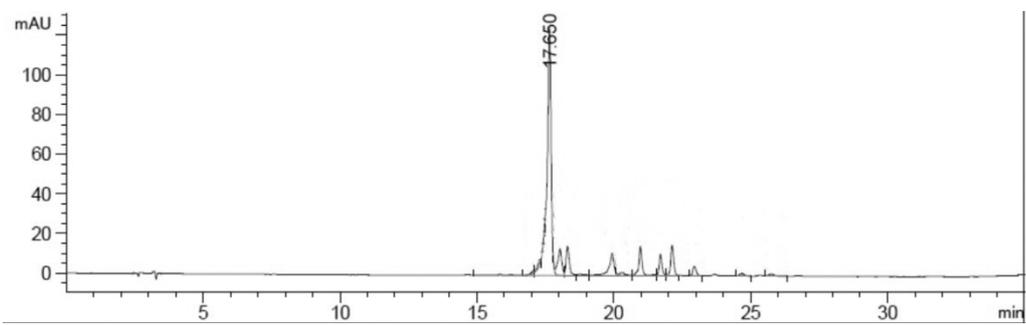


图2

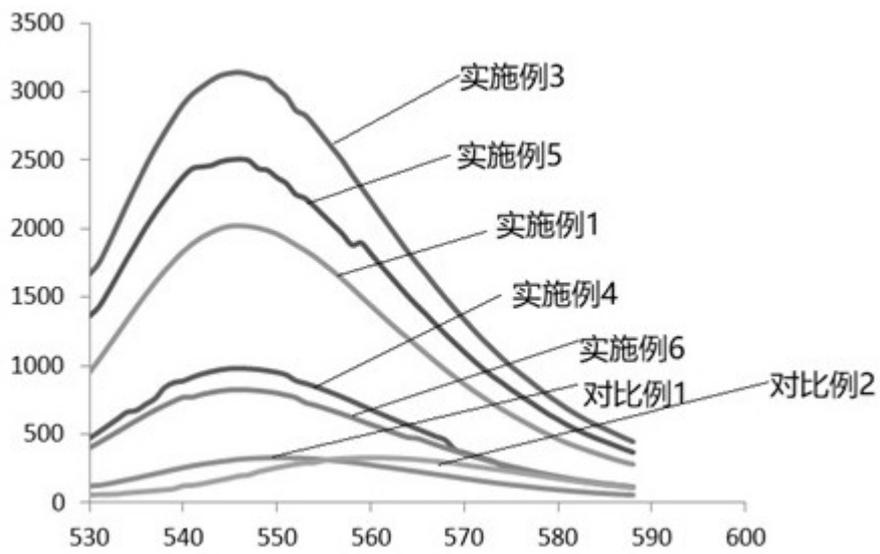


图3

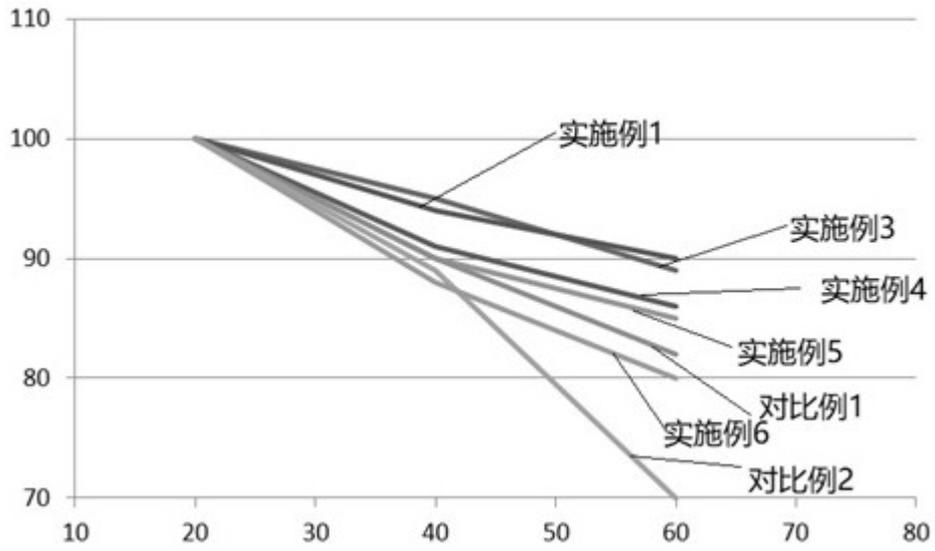


图4