



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112898580 A

(43)申请公布日 2021.06.04

(21)申请号 201911221386.8

(22)申请日 2019.12.03

(71)申请人 安序源生物科技(深圳)有限公司

地址 518051 广东省深圳市南山区粤海街
道高新南七道19号B203室

(72)发明人 何筠 秦龙 张琦文 杨照亮
田晖

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 刘阳

(51)Int.Cl.

C08G 83/00(2006.01)

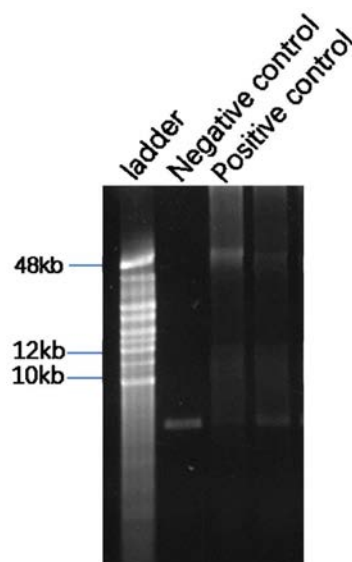
权利要求书2页 说明书13页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

测序试剂

(57)摘要

本发明涉及一种测序试剂,该测序试剂包括树杈状大分子修饰的核苷酸。一个该树杈状大分子修饰的核苷酸包括一个核苷酸及一个与核苷酸连接的树杈状大分子。上述测序试剂的树杈状大分子修饰的核苷酸与纳米孔相互作用而产生的特征电信号的均一性高。



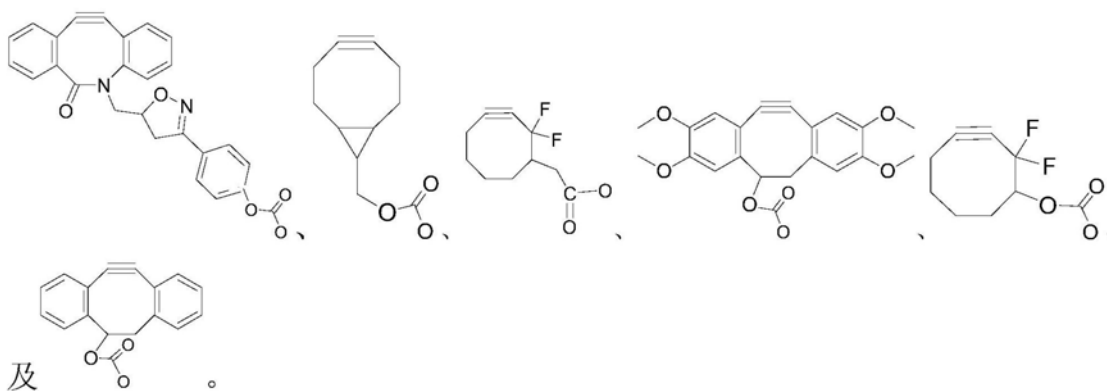
1.一种测序试剂,其特征在于,包括树杈状大分子修饰的核苷酸,一个所述树杈状大分子修饰的核苷酸包括一个核苷酸及一个与所述核苷酸连接的树杈状大分子。

2. 根据权利要求1所述的测序试剂, 其特征在于, 所述树杈状大分子的端基包括多个氨基, 所述核苷酸与其中一个所述氨基相连。

3. 根据权利要求1所述的测序试剂, 其特征在于, 所述树杈状大分子为聚酰胺-胺树杈状大分子。

4. 根据权利要求1所述的测序试剂, 其特征在于, 所述树杈状大分子修饰的核苷酸还包括连接合子, 所述连接合子具有酯基和一个炔基, 所述连接合子与所述树杈状大分子通过所述连接合子的酯基与所述树杈状大分子的氨基形成一个酰胺键而连接, 所述核苷酸连接有一个叠氮基, 所述连接合子与所述核苷酸通过所述连接合子的炔基与所述叠氮基发生点击反应而连接。

5. 根据权利要求4所述的测序试剂, 其特征在于, 所述连结合子选自



6. 根据权利要求1所述的测序试剂, 其特征在于, 所述树杈状大分子修饰的核苷酸还包括连接臂, 所述核苷酸通过所述连接臂与所述叠氮基连接。

7. 根据权利要求6所述的测序试剂, 其特征在于, 所述连接臂的原料选自聚乙二醇、碳链及芳香类化合物中的至少一种;

进一步地,所述连接臂的原料为 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 其中,n为3~44的任一整数。

8. 根据权利要求1~7任一项所述的测序试剂, 其特征在于, 所述树杈状大分子为0代~10代的树杈状大分子; 进一步地, 所述树杈状大分子为0代~10代的半代树杈状大分子或0代~10代的整代树杈状大分子; 及/或

所述核苷酸选自dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP及TNP中的一种,其中,dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP及TNP中的磷酸基团的数量为3~8的任一整数。

9. 根据权利要求1~7任一项所述的测序试剂,其特征在于,所述树杈状大分子还包括修饰基团,所述修饰基团选自荧光基团、改变所述树杈状大分子的表面电荷的基团、改变所述树杈状大分子的溶解性的基团和改变所述树杈状大分子的疏水性的基团中的至少一种。

10. 根据权利要求1所述的测序试剂,其特征在于,所述测序试剂包括多种树杈状大分子修饰的核苷酸,各所述树杈状大分子修饰的核苷酸的树杈状大分子及核苷酸各不相同。

11. 根据权利要求1所述的测序试剂, 其特征在于, 所述树杈状大分子修饰的核苷酸由以下步骤制得:

将炔基化合物与酯化底物进行酯化反应,得到含有酯基的炔基化合物;

将所述含有酯基的炔基化合物加入多个端基为氨基的树杈状大分子中,以使所述酯基与其中一个所述氨基进行酰胺化反应,得到含有炔基的树杈状大分子;及

将所述含有炔基的树杈状大分子与连接有一个叠氮基的核苷酸进行点击反应,得到所述树杈状大分子修饰的核苷酸。

测序试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种测序试剂。

背景技术

[0002] 随着技术的不断发展,基因测序已经发展到第三代测序,即纳米孔测序。纳米孔测序的原理是:标记的核苷酸与纳米孔锚定的DNA聚合酶结合后,该标记的核苷酸与纳米孔相互作用而产生特征电信号,通过不同的标记的核苷酸所对应的特征电信号不同而得到待测核苷酸序列信息。

[0003] 然而,目前用于与纳米孔产生相互作用的标记的核苷酸分子,例如寡核苷酸,多肽、线性聚合物(如PEG)等标记的核苷酸,与纳米孔作用而产生的特征电信号的均一性差。

发明内容

[0004] 基于此,有必要提供一种电信号均一性高的测序试剂。

[0005] 一种测序试剂,包括树杈状大分子修饰的核苷酸,一个所述树杈状大分子修饰的核苷酸包括一个核苷酸及一个与所述核苷酸连接的树杈状大分子。

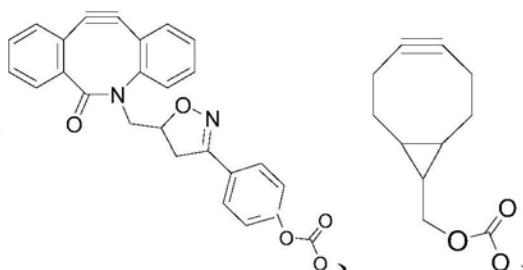
[0006] 上述测序试剂包括树杈状大分子修饰的核苷酸,该树杈状大分子修饰的核苷酸的树杈状大分子以其独特的结构及表面存在的电荷,使树杈状大分子修饰的核苷酸在溶液中的空间构象稳定,从而提高树杈状大分子修饰的核苷酸与纳米孔相互作用时产生的特征电信号的均一性,减少在是否为噪音、是否是不同标记分子信号重叠等情况下的误判,降低特征电信号判定的难度,提高测序的准确性。

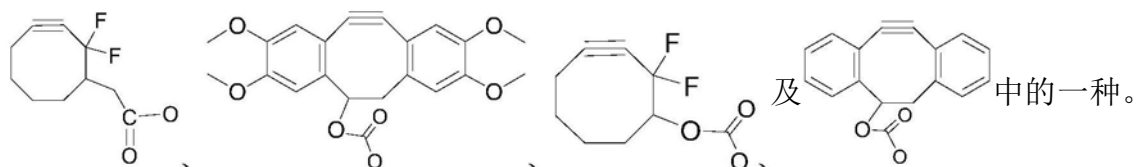
[0007] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子的端基包括多个氨基,所述核苷酸与其中一个所述氨基相连。

[0008] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子为聚酰胺-胺树杈状大分子。

[0009] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子修饰的核苷酸还包括连结合子,所述连结合子具有酯基和一个炔基,所述连结合子与所述树杈状大分子通过所述连结合子的酯基与所述树杈状大分子的氨基形成一个酰胺键而连接,所述核苷酸连接有一个叠氮基,所述连结合子与所述核苷酸通过所述连结合子的炔基与所述叠氮基发生点击反应而连接。

[0010] 在其中一个实施例中,所述连结合子选自





[0011] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子修饰的核苷酸还包括连接臂,所述核苷酸通过所述连接臂与所述叠氮基连接。

[0012] 在其中一个实施例中,所述连接臂的原料选自聚乙二醇、碳链及芳香类化合物中的至少一种。

[0013] 在其中一个实施例中,所述连接臂为 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$, 其中, n 为 3~44 的任一整数。

[0014] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子为 0 代~10 代的树杈状大分子;进一步地,所述树杈状大分子为 0 代~10 代的半代树杈状大分子或 0 代~10 代的整代树杈状大分子;及/或

[0015] 所述核苷酸选自 dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP 及 TNP 中的一种, 其中, dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP 及 TNP 中的磷酸基团的数量为 3~8 的任一整数。

[0016] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子还包括修饰基团,所述修饰基团选自荧光基团、改变所述树杈状大分子的表面电荷的基团、改变所述树杈状大分子的溶解性的基团和改变所述树杈状大分子的疏水性的基团中的至少一种。

[0017] 在其中一个实施例中,所述测序试剂包括多种树杈状大分子修饰的核苷酸,各所述树杈状大分子修饰的核苷酸的树杈状大分子及核苷酸各不相同。

[0018] 在其中一个实施例中,所述树杈状大分子修饰的核苷酸由以下步骤制得:

[0019] 将炔基化合物与酯化底物进行酯化反应,得到含有酯基的炔基化合物;

[0020] 将所述含有酯基的炔基化合物加入多个端基为氨基的树杈状大分子中,以使所述酯基与其中一个所述氨基进行酰胺化反应,得到含有炔基的树杈状大分子;及

[0021] 将所述含有炔基的树杈状大分子与连接有一个叠氮基的核苷酸进行点击反应,得到所述树杈状大分子修饰的核苷酸。

附图说明

[0022] 图1~图2为实施例1的化合物2的液相色谱图;

[0023] 图3为实施例3的电泳图;

[0024] 图4为实施例4的电泳图。

具体实施方式

[0025] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的部分实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使本发明公开内容更加透彻全面。

[0026] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。

[0027] 一实施方式的测序试剂,包括树杈状大分子修饰的核苷酸。该测序试剂尤其适用于纳米孔测序。该测序试剂包括树杈状大分子修饰的核苷酸,该树杈状大分子修饰的核苷酸的树杈状大分子以其独特的结构及表面存在的电荷,使树杈状大分子修饰的核苷酸在溶液中的空间构象稳定,从而提高树杈状大分子修饰的核苷酸与纳米孔相互作用时产生的特征电信号的均一性,减少在是否为噪音、是否是不同标记分子信号重叠等情况下的误判,降低特征电信号判定的难度,提高测序的准确性。

[0028] 具体地,一个该树杈状大分子修饰的核苷酸包括一个核苷酸及一个与核苷酸连接的树杈状大分子。进一步地,该树杈状大分子修饰的核苷酸包括核苷酸及与核苷酸连接的树杈状大分子,其中,核苷酸的数量为一个,与核苷酸连接的树杈状大分子的数量也为一个。

[0029] 树杈状大分子(Dendrimer)是指不断地向外重复支化生长而得到的结构类似于树杈状的大分子,是一种新型的高分子化合物,具有结构规整、单分散性、功能化等特点。树杈状大分子可以作为内接受体容纳小分子客体,也可以作为外接受体与金属离子络合;树杈状大分子的分子内部可以进行能量和电子的传递,可作为一种有机导体;树杈状大分子的分子具有胶囊结构和对客体分子的束缚作用,可用于分子识别、催化剂、传感器等。因此,目前树杈状大分子的应用主要集中在药物输送、催化剂、基因治疗及传感器等领域。

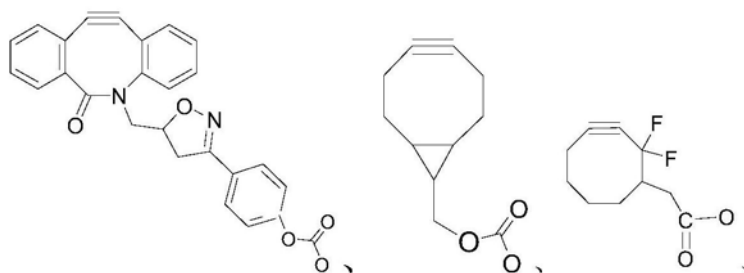
[0030] 具体地,树杈状大分子的端基包括氨基,树杈状大分子通过该氨基与核苷酸连接。进一步地,树杈状大分子为0代~10代的树杈状大分子。更进一步地,树杈状大分子为0代~10代的半代树杈状大分子(例如0.5代的树杈状大分子、1.5代的半代树杈状大分子)或0代~10代的整代树杈状大分子。

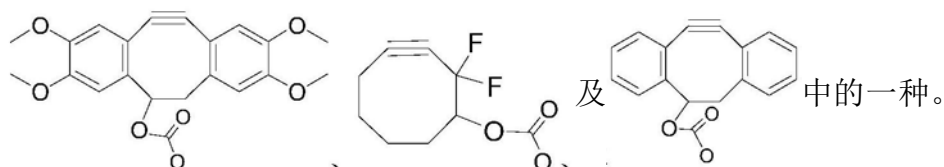
[0031] 在其中一个实施例中,树杈状大分子的端基包括多个氨基,树杈状大分子通过其中一个氨基与核苷酸相连。此时,树杈状大分子可以是聚酰胺-胺树杈状大分子。进一步地,树杈状大分子选自乙二胺为核心0代~10代聚酰胺-胺树杈状大分子、以氨为核心0代~10代聚酰胺-胺树杈状大分子、以及以0代~10代的正代聚酰胺胺型树杈状大分子与丁二酸酐进行酰胺化反应形成以羧基为端基的树杈状大分子中的一种。可以理解的是,树杈状大分子还可以是本领域常见的其他树杈状大分子。

[0032] 在另一个实施例中,树杈状大分子的端基包括一个氨基,核苷酸通过该氨基与树杈状大分子相连。此时树杈状大分子可以是扇形芳环结构单氨基末端的树杈状大分子1代~4代。当然,树杈状大分子还可以是其他只有一个氨基末端的树杈大分子。

[0033] 在其中一个实施例中,树杈状大分子修饰的核苷酸还包括连结合子,连接合子具有酯基和一个炔基。连接合子与树杈状大分子通过连接合子的酯基与树杈状大分子的氨基形成一个酰胺键而连接;核苷酸连接有一个叠氮基,连接合子与核苷酸通过连接合子的炔基与叠氮基发生点击反应而连接。

[0034] 进一步地,连接合子选自





[0035] 进一步地,树杈状大分子修饰的核苷酸还包括连接臂,核苷酸通过连接臂与叠氮基连接。进一步地,所述连接臂的原料选自聚乙二醇、碳链及芳香类化合物中的至少一种。碳链是指碳原子以单键或双键或叁键彼此连接形成的链状化合物。优选地,连接臂的原料为 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$,其中, n 为3~44的任一整数。优选地, n 为12、24或36。

[0036] 当然,在其他一些实施方式中,树杈状大分子修饰的核苷酸还包括修饰基团。具体地,修饰基团选自荧光基团、改变树杈状大分子的表面电荷的基团、改变树杈状大分子的溶解性的基团和改变树杈状大分子的疏水性的基团中的至少一种。荧光基团可以是本领域常见的荧光基团,例如异硫氰酸荧光素、荧光素、Cy3、Cy5、HEX、及ROX等。改变树杈状大分子的溶解性的基团及改变树杈状大分子的疏水性的基团的原料可以是本领域常见聚合物(例如聚乙二醇、寡糖、多肽、寡聚脱氧核糖核酸、寡聚核糖核酸等)、连接臂等。通过修饰基团的修改,能够树杈大分子的表面电荷、分子大小及物理化学性质(如溶解性、疏水性等)发生改变,从而使其更利于应用。

[0037] 在其中一个实施例中,核苷酸选自dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP及TNP中的一种,其中,dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP及TNP中的磷酸基团的数量(N)为3~8的任一整数。在dANP、dCNP、dTNP、dGNP、dUNP、ANP、CNP、GNP、UNP及TNP中,“d”是deoxy的缩写,表示此核苷酸的核糖是脱氧核糖;“A”、“T”、“C”、“G”及“U”分别对应于组成核苷酸的五种碱基:腺嘌呤(Adenine)、胸腺嘧啶(Thymine)、胞嘧啶(Cytosine)、鸟嘌呤(Guanine)及尿嘧啶(Uracil);“P”是phosphate的缩写,代表核苷酸的磷酸基团,“N”是指核苷酸中磷酸基团的数量。

[0038] 在其中一个实施例中,上述测序试剂包括多种树杈状大分子修饰的核苷酸,各树杈状大分子修饰的核苷酸的树杈状大分子及核苷酸各不相同。不同核苷酸通过连接树杈状大分子的不同而实现特征信号的区别。

[0039] 上述树杈状大分子修饰的核苷酸的制备方法,包括步骤S110~步骤S110~步骤S130。

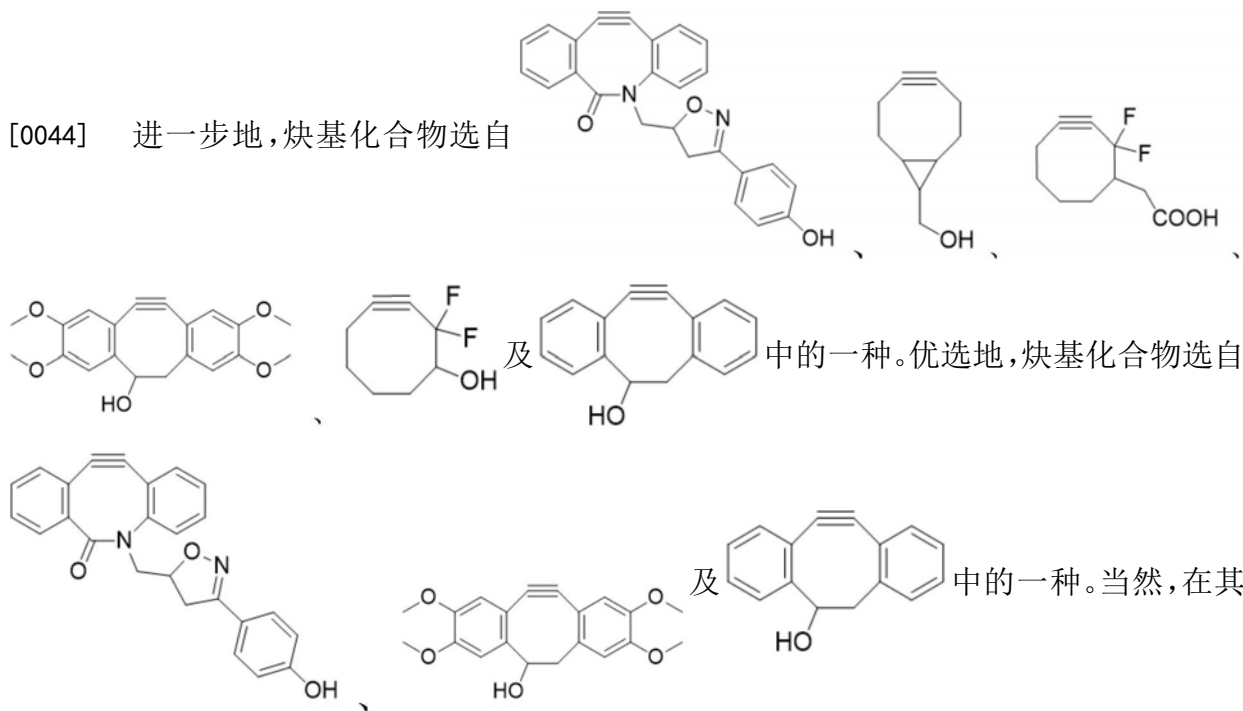
[0040] 步骤S110、将炔基化合物与酯化底物进行酯化反应,得到含有酯基的炔基化合物。

[0041] 点击化学反应主要有4种类型:环加成反应、亲核开环反应、非醇醛的羰基化学以及碳碳多键的加成反应。本实施方式中的点击反应(click reaction)是炔基与叠氮基发生环加成反应。炔基化合物是指含有炔基的化合物。炔基化合物作为点击反应中炔基的来源。

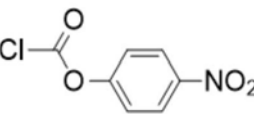
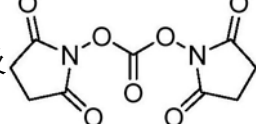
[0042] 在本实施方式中,炔基化合物具有一个炔基。可以理解的是,在其他实施方式中,炔基化合物还可以含有更多的炔基,此时需要控制炔基与叠氮基的量或者通过其他本领域常用的方式,使得一个树杈状大分子只与一个核苷酸连接。

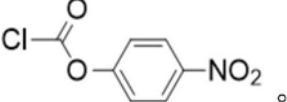
[0043] 在本实施方式中,炔基化合物还含有羧基和羟基中的一种,酯化底物含有羧基和羟基中的另一种。炔基化合物与酯化底物发生酯化反应,生成含有酯基的炔基化合物。通过炔基化合物与酯化底物进行酯化反应,得到炔基化合物的活泼酯,使得炔基化合物能够连接到树杈状大分子。

[0044] 进一步地,炔基化合物选自



他一些实施方式中,炔基化合物还可以其他含有羧基和羟基中的一种和炔基的化合物。

[0045] 进一步地,酯化底物为  及  中的一种。优选地,

酯化底物为 。当然,在其他一些实施方式中,酯化底物还可以使其能与炔基化合物发生酯化反应的物质。

[0046] 步骤S120、将含有酯基的炔基化合物加入多个端基为氨基的树杈状大分子中,以使酯基与其中一个氨基进行酰胺化反应,得到含有炔基的树杈状大分子。

[0047] 树杈状大分子一般具有多个的端基,而这些端基可以是各种官能团,例如羧基、氨基等。我们研究发现,当树杈状大分子具有多个相同活性反应位点的端基时,容易被多修饰,难以得到单位点修饰的产物,而这些被多修饰的产物因含有炔基,也能够参与后续的点击反应。所以,经过点击反应得到的树杈状大分子修饰的核苷酸往往包括较多的一个树杈状大分子修饰多个核苷酸,而一个树杈状大分子修饰一个核苷酸的含量较低。因此,上述树杈状大分子修饰的核苷酸的制备方法通过控制树杈状大分子与含有酯基的炔基化合物的量,使得一个树杈状大分子只与一个炔基相连,树杈状大分子只被单一修饰。

[0048] 具体地,含有酯基的炔基化合物与多个端基为氨基的树杈状大分子的摩尔比不超过0.8:1。含有酯基的炔基化合物与所述多个端基为氨基的树杈状大分子的摩尔比不超过0.8:1时,使得含有酯基的炔基化合物的量只足以与多个端基为氨基的树杈状大分子的其中一个氨基进行酰胺化反应。优选地,含有酯基的炔基化合物与多个端基为氨基的树杈状大分子的摩尔比为0.2~0.8:1。

[0049] 进一步地,含有酯基的炔基化合物为含有酯基的炔基化合物溶液。多个端基为氨基的树杈状大分子为多个端基为氨基的树杈状大分子的溶液。含有酯基的炔基化合物溶液

的溶剂可以本领域常用的溶剂,例如二氯甲烷。当然,多个端基为氨基的树杈状大分子的溶液的溶剂也为本领域常用的溶剂。

[0050] 在其中一个实施例中,含有酯基的炔基化合物溶液中,含有酯基的炔基化合物的质量与溶剂的体积之比为50mg:1mL~50mg:2mL。通过增大含有酯基的炔基化合物的溶剂的量,使得含有酯基的炔基化合物得到稀释,单位体积中含有酯基的炔基化合物的量相对较少,而树杈状大分子处于过量。因此,在含有酯基的炔基化合物溶液与多个端基为氨基的树杈状大分子溶液混合后,进一步使得只有其中一个氨基与含有酯基的炔基化合物的酯基发生反应,从而使得一个树杈状大分子上只连接一个炔基。过量的树杈状大分子因不含炔基,不能参与后续反应,可以通过透析等方式去除。

[0051] 更进一步地,采用延时滴加的方式将含有酯基的炔基化合物与多个端基为氨基的树杈状大分子溶液混合,以使含有酯基的炔基化合物的酯基与多个端基为氨基的树杈状大分子的其中一个氨基进行酰胺化反应,得到含有炔基的树杈状大分子。通过延时滴加的加料方式,使得单位时间内加入的含有酯基的炔基化合物溶液较少,含有酯基的炔基化合物在反应体系中的量少,更能使得多个氨基中的其中一个与含有酯基的炔基化合物的酯基发生反应。

[0052] 在其中一个实施例中,树杈状大分子选自聚酰胺-胺树杈状大分子。

[0053] 聚酰胺-胺树杈状大分子(polyamidoamine,PAMAM)是一类分子结构高度支化的纳米材料。PAMAM不但内部具有空腔,而且表面有大量可供修饰的官能团。

[0054] 在其中一个实施例中,含有炔基的树杈状大分子带正电荷或不带电荷的树杈状大分子。此时,则树杈状大分子为带正电荷或不带电荷的树杈状大分子。例如以乙二胺为核心0代~10代聚酰胺-胺树杈状大分子、以氨为核心0代~10代聚酰胺-胺树杈状大分子。

[0055] 在另一个实施例中,含有炔基的树杈状大分子带负电荷。此时,可以在含有酯基的炔基化合物的酯基与树杈状大分子的氨基发生酰胺化反应之后进行引入羧基,从而使得得到的含有炔基的树杈状大分子带负电荷。引入羧基的方式可以是含有酯基的炔基化合物的酯基与树杈状大分子的氨基进行酰胺化的产物,与丁二酸酐进行酰胺化反应,形成以羧基为端基的含有炔基的树杈状大分子。

[0056] 当然,也可以直接用端基包括羧基的树杈状大分子与含有酯基的炔基化合物反应。例如以0代~10代的正代聚酰胺-胺树杈状大分子与环酸酐(例如戊二酸酐、己二酸酐、丁二酸酐等)进行酰胺化反应,形成以羧基为端基的聚酰胺-胺树杈状大分子。

[0057] 步骤S130、将含有炔基的树杈状大分子与连接有一个叠氮基的核苷酸进行点击反应,得到树杈状大分子修饰的核苷酸。

[0058] 在其中一个实施例中,在将含有炔基的树杈状大分子与连接有一个叠氮基的核苷酸进行点击反应,得到树杈状大分子修饰的核苷酸的步骤之前,还包括采用将含有炔基的树杈状大分子进行纯化的步骤。经过纯化之后,除去微量的酰胺反应的二取代、三取代甚至四取代为主的副产物,避免副产物对后续反应的影响,进一步提高含有炔基的树杈状大分子的纯度。具体地,含有炔基的树杈状大分子的纯化为液相色谱纯化。

[0059] 在本实施方式中,点击反应为无金属催化的点击反应。无金属催化的点击反应能够减少后续金属离子对测序的影响,提高修饰后的核苷酸的纯度。

[0060] 在其中一个实施例中,连接有一个叠氮基的核苷酸通过将连接臂将叠氮基连接到

核苷酸上。连接臂的作用是增加叠氮基与核苷酸的位置,减少两者之间的相互影响。

[0061] 在其中一个实施例中,连接有一个叠氮基的核苷酸的制备步骤包括步骤 S131~步骤S132。

[0062] 步骤S131、将叠氮化物与连接臂的原料反应,使得叠氮基连接到连接臂上,得到含有叠氮基的连接臂。

[0063] 具体地,叠氮化物为 $\text{N}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---OH}$,连接臂的原料选自聚乙二醇、碳链及芳香类化合物中的至少一种。

[0064] 在其中一个实施例中,连接臂的原料为聚乙二醇。具体地,连接臂的原料为 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$,其中n为3~44的任一整数。

[0065] 步骤S132、将含有叠氮基的连接臂与核苷酸连接,得到连接有一个叠氮基的核苷酸。

[0066] 核苷酸由磷酸、核糖及碱基组成。其中,磷酸选自单磷酸、双磷酸、三磷酸、四磷酸、六磷酸、七磷酸及八磷酸中的一种。优选地,磷酸为四磷酸及六磷酸中的一种。碱基选自腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)中的一种。核糖选自D-核糖和D-2-脱氧核糖中的一种。在本实施方式中,核苷酸还包括被修饰的核苷酸,例如甲基化修饰、卤代修饰(如碘代、溴代)等。

[0067] 在其中一个实施例中, $\text{N}_3\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---OH}$ 经酯化后与具有氨基和羧基的连接臂连接,得到具有羧基和叠氮基的连接臂。然后具有羧基和叠氮基的连接臂与具有氨基的核苷酸进行酰胺化反应,使叠氮基通过连接臂连接到核苷酸上,得到连接有一个叠氮基的核苷酸;接着将连接有一个叠氮基的核苷酸与含有炔基的树杈状大分子进行无铜催化的点击反应,得到树杈状大分子修饰的核苷酸。

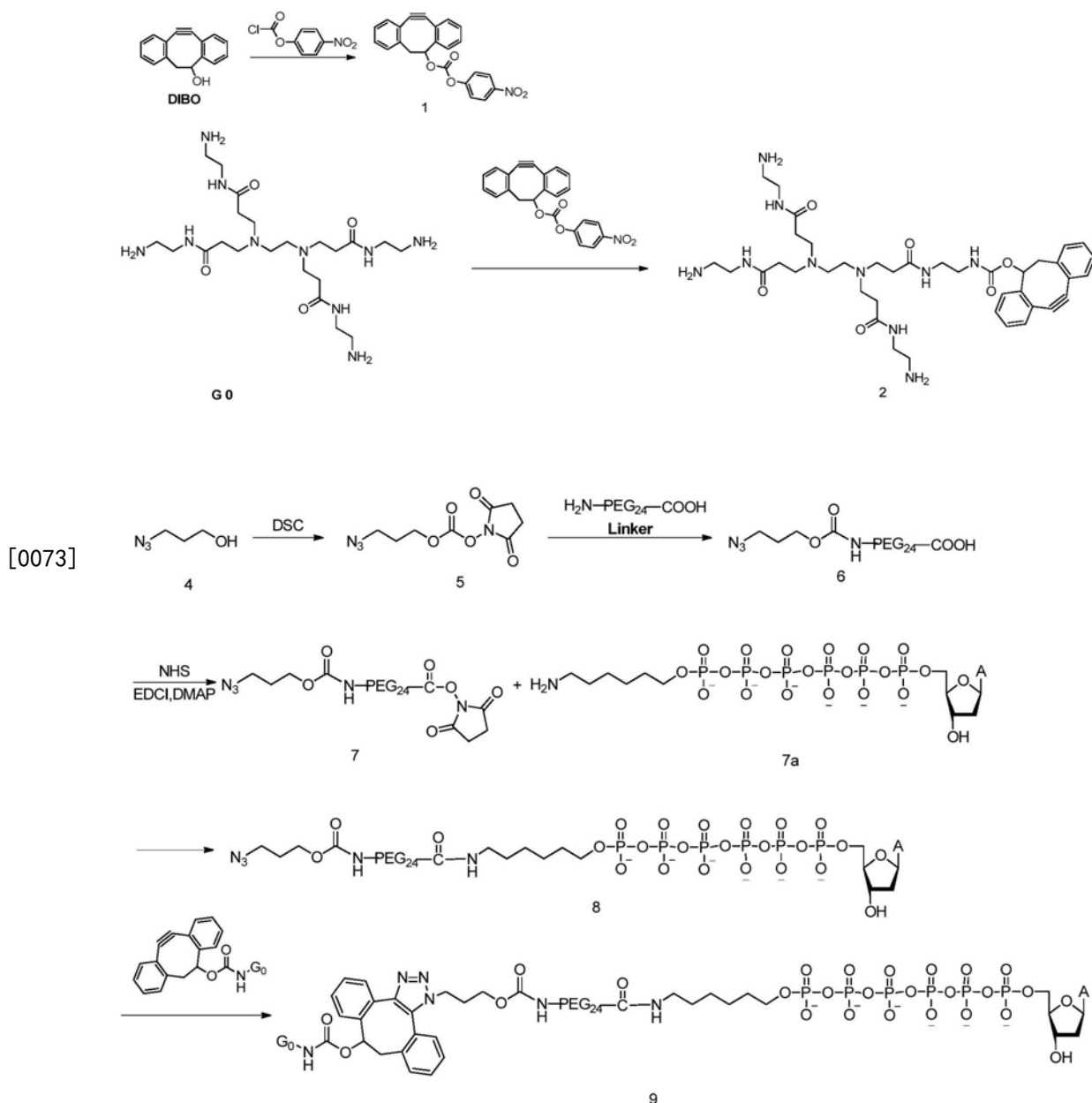
[0068] 上述树杈状大分子修饰的核苷酸的制备方法,通过控制炔基连接到树杈状大分子上的步骤中树杈状大分子与含有酯基的炔基化合物的量和添加含有酯基的炔基化合物的方式,使得树杈状大分子的多个氨基端基中只有其中一个与含有酯基的炔基化合物发生酰胺化反应,从而使得一个多个端基为氨基的树杈状大分子上只连接一个炔基化合物,使得树杈状大分子得到单一修饰。单一修饰的树杈状大分子与核苷酸点击反应,从而得到的单一的树杈大分子修饰的核苷酸,提高树杈大分子修饰的核苷酸的纯度。

[0069] 具体实施例

[0070] 以下结合具体实施例进行详细说明。实施例中采用药物和仪器如非特别说明,均为本领域常规选择。实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规条件,例如文献、书本中所述的条件或者生产厂家推荐的方法实现。

[0071] 实施例1

[0072] 实施例1的合成路线如下:



[0074] 具体步骤为：

[0075] (1) 化合物1的合成：取100mL圆底烧瓶加入二氯甲烷 (DCM 50mL)，搅拌的同时依次加入DIBO (100mg, 0.454mmol)、吡啶 (71mg, 0.909mmol) 和对硝基氯甲酸苯酯 (136mg, 0.681mmol)，25℃搅拌12小时。反应结束，柱层析纯化得到147mg化合物1，产率84%。

[0076] (2) 化合物2的合成：取100mL圆底烧瓶加入N,N-二甲基甲酰胺 (DMF 2mL)，搅拌的同时加入G0 (100mg, 0.193mmol)，将化合物1 (52mg, 0.135 mmol) 溶于二氯甲烷 (DCM 2mL) 向G0的反应液滴加，25℃搅拌12小时。反应结束，HPLC纯化得到30mg化合物2，产率20%。经HPLC (高效液相色谱) 纯化的产品的MS-HPLC谱图如图1和图2所示。图1中，自上而下依次是254波长液相谱图、最大吸收波长液相谱图和正离子模式总离子流图。

[0077] 由如图1和图2可知，产物为单一修饰。化合物2的分子量为762.45。

[0078] (3) 化合物5的合成：取100mL圆底烧瓶加入乙腈 (50mL)，搅拌的同时依次加入化合物4 (100mg, 0.99mmol)、三乙胺 (199mg, 1.98mmol) 和 N,N'-琥珀酰亚胺基碳酸酯 (380mg,

1.48mmol), 25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到191mg化合物5,产率80%。

[0079] (4) 化合物6的合成:取100mL圆底烧瓶加入二氯甲烷(50mL),搅拌的同时依次加入化合物5(100mg,0.413mmol)、三乙胺(83mg,0.826mmol)和Amino-dPEG24-acid(394mg,0.344mmol),25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到280mg化合物6,产率64%。

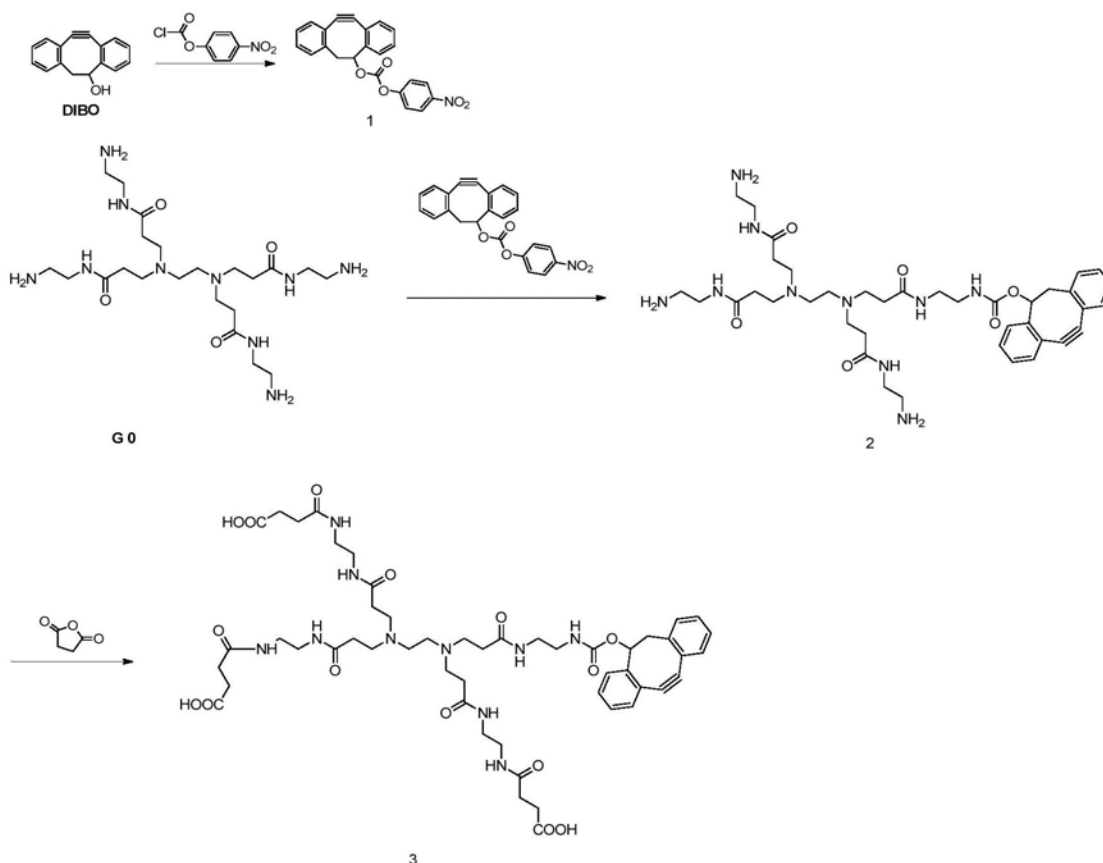
[0080] (5) 化合物7的合成:取100mL圆底烧瓶加入二氯甲烷(50mL),搅拌的同时依次加入化合物6(100mg,0.078mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(22mg,0.117mmol)、4-二甲氨基吡啶(1.9mg,0.015mmol)和N-羟基丁二酰亚胺(13mg,0.117mmol),25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到79mg化合物7,产率74%。

[0081] (6) 化合物8的合成:取50mL圆底烧瓶加入碳酸氢钠-碳酸钠缓冲液(2 mL),搅拌的同时加入化合物7a(20mg,0.024mmol)将化合物7(32mg,0.024mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF 2mL)向化合物7a的反应液中滴加,25℃搅拌12小时。反应结束,MPLC纯化得到25mg化合物8,产率52%。

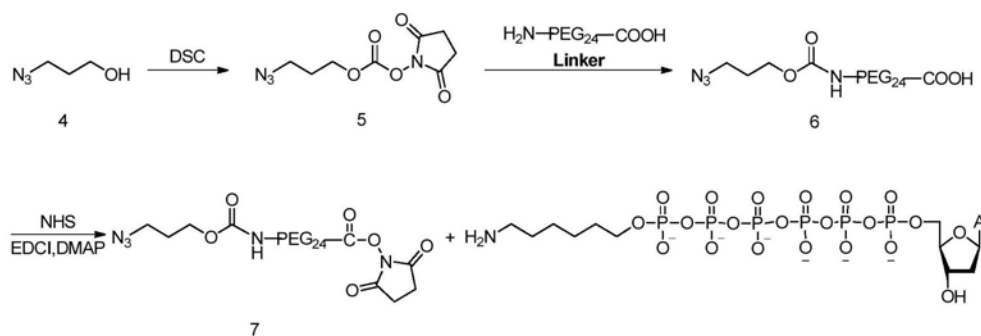
[0082] (7) 化合物9的合成:取50mL圆底烧瓶加入水(1mL),搅拌的同时加入化合物8(20mg,0.009mmol)将化合物2(7.4mg,0.009mmol)溶于水(2mL)向化合物8的反应液中滴加,25℃搅拌12小时。反应结束,MPLC纯化得到17mg树杈大分子修饰的核苷酸,产率63%。

[0083] 实施例2

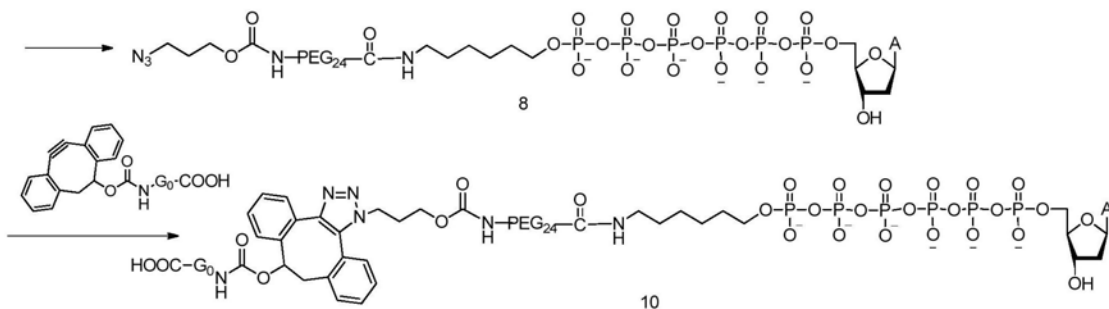
[0084] 实施例2的合成路线为:



[0085]



[0086]



[0087] 具体步骤为:

[0088] (1) 化合物1的合成:取100mL圆底烧瓶加入二氯甲烷(DCM 50mL),搅拌的同时依次加入DIBO(100mg, 0.454mmol)、吡啶(71mg, 0.909mmol) 和对硝基氯甲酸苯酯(136mg, 0.681mmol), 25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到147mg化合物1,产率84%。

[0089] (2) 化合物2的合成:取100mL圆底烧瓶加入N,N-二甲基甲酰胺(DMF 2mL),搅拌的同时加入G0(100mg,0.193mmol),将化合物1(52mg,0.135 mmol)溶于二氯甲烷(DCM 2mL)向G0的反应液滴加,25℃搅拌12小时。反应结束,HPLC纯化得到30mg化合物2,产率20%。

[0090] (3) 化合物3的合成:取100mL圆底烧瓶加入N,N-二甲基甲酰胺(DMF 50mL),搅拌的同时依次加入化合物2(100mg, 0.13mmol)、三乙胺(52mg, 0.52mmol)和丁二酸酐(52mg, 0.52mmol), 25℃搅拌12小时。反应结束, HPLC纯化得到98mg化合物3, 产率71%。

[0091] (4) 化合物5的合成:取100mL圆底烧瓶加入乙腈(50mL),搅拌的同时依次加入化合物4(100mg,0.99mmol)、三乙胺(199mg,1.98mmol)和 N,N'-琥珀酰亚胺基碳酸酯(380mg,1.48mmol),25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到191mg化合物5,产率80%。

[0092] (5) 化合物6的合成:取100mL圆底烧瓶加入二氯甲烷(50mL),搅拌的同时依次加入化合物5(100mg,0.413mmol)、三乙胺(83mg,0.826mmol) 和Amino-dPEG24-acid(394mg,0.344mmol),25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到280mg化合物6,产率64%。

[0093] (6) 化合物7的合成:取100mL圆底烧瓶加入二氯甲烷(50mL),搅拌的同时依次加入化合物6(100mg, 0.078mmol)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(22mg, 0.117mmol)、4-二甲氨基吡啶(1.9mg, 0.015mmol) 和N-羟基丁二酰亚胺(13mg, 0.117mmol), 25℃搅拌12小时。反应结束,柱层析纯化得到79mg化合物7,产率74%。

[0094] (7) 化合物8的合成:取50mL圆底烧瓶加入碳酸氢钠-碳酸钠缓冲液(2 mL),搅拌的同时加入化合物7a(20mg, 0.024mmol)将化合物7(32mg, 0.024mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(DMF 2mL)向化合物7a的反应液中滴加, 25℃搅拌12小时。反应结束, MPLC纯化得到25mg化合物8, 产率52%。

[0095] (8) 化合物10的合成:取50mL圆底烧瓶加入水(1mL),搅拌的同时加入化合物8(20mg,0.009mmol)将化合物3(9.5mg,0.009mmol)溶于水(2mL)向化合物8的反应液中滴加,25℃搅拌12小时。反应结束,MPLC 纯化得到16mg树杈大分子修饰的核苷酸(G0-COOH-PEG24-dA6P),产率60%。

[0096] 实施例3

[0097] 短链模板Hairpin测试

[0098] (1) 将模板1、模板2及模板3的浓度调整至33.3ng/ μ L。其中,模板1 的碱基序列如SEQ ID No.1所示,具体为:5'-TAGCGAAGGATGTGAACCTAATCCCTGCTCCCGCGGCCGATCTGCCGGC CGCGGGAGCA-3';模板2的碱基序列如SEQ ID No.2所示,具体为:5'-TAGCGAAGGATGTGAACC TAATCCTTGCTCCCGCGGCCGATCTGCCGGC CGCGGGAGCA-3';模板3的碱基序列如SEQ ID No.3所示,具体为:5'-TAGCGAAGGATGTGAACCTAATTTTGTCTCCCGCGGCCGATCTGCCGGC CGCGGGAGCA-3'。

[0099] (2) 将实施例2制备得到的树杈大分子修饰的核苷酸(G0-COOH-PEG24-dA6P)稀释至800 μ M,然后与相同浓度的未经修饰的dCTP、dGTP及dTTP按照1:1:1:1混合,作为验证组的dNTPs混合液。将800 μ M 的未经修饰的dATP、dCTP、dGTP、dTTP按照1:1:1:1混合,作为阳性对照组和阴性对照组的dNTPs混合液。

[0100] (3) 按照表1配制反应体系。

[0101] 表1

	阳性对照组/验证组	阴性对照组
10xphi29 Buffer	2.5 μ L	2.5 μ L
10mg/mL BSA	0.5 μ L	0.5 μ L
dNTPs (200 μ M)	2.5 μ L	2.5 μ L
[0102] Template DNA (33.33 ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L
phi29 DNA 聚合酶	1 μ L	0
ddH ₂ O	17.5 μ L	18.5 μ L
Total	25 μ L	

[0103] (4) 按照下列程序设置PCR仪进行反应,程序运行结束后将PCR管中加入2 μ L 0.5M EDTA以终止反应:

[0104] Lid heat on(35℃);

[0105] 30℃ for 10minutes;

[0106] Hold at 4℃。

[0107] (5) 将反应产物进行TBU凝胶电泳检测,电泳后使用SYBR Green进行染色成像。结果如图3所示。

[0108] 由图3可以看出,实施例2合成树杈大分子修饰的核苷酸(G0-COOH-PEG24-dA6P)

具有与未修饰的dATP相同的生物活性,可以与DNA 聚合酶phi29进行高效的结合,对模板Hairpin的延伸完全、充分。

[0109] 实施例4

[0110] 长链模板M13测试

[0111] 实施例4的模板为M13mp18单链DNA (NEB,Cat#N4040S)。

[0112] (1) 将实施例2制备的得到的树杈大分子修饰的核苷酸 (G0-COOH-PEG24-dA6P) 稀释至10mM;然后与相同浓度的未经修饰的dCTP、dGTP、dTTP进行1:1:1:1混合,作为验证组的dNTPs混合液。将10mM 未经修饰的dATP、dCTP、dGTP及dTTP按照1:1:1:1混合,作为阳性对照组和阴性对照组的dNTPs混合液。

[0113] (2) 按照表2配制模板-引物反应体系,然后按照下列程序设置PCR仪进行反应:Lid heat on(105℃);95℃ for 3minutes;25℃ for 20minutes;Hold at 4℃,得到Primed-M13。其中,引物的序列如SEQ ID No.4所示,即5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'。

[0114] 表2

[0115]	Primer	2 μL
	M13 DNA	2 μL
	Anneal Buffer	16μL
	Total	20 μL

[0116] (3) 按照表3配制扩增体系。

[0117] 表3

	阳性对照组 /验证组		阴性对照组
[0118]	10xphi29 Buffer	5 μL	5 μL
	10mg/mL BSA	1 μL	1 μL
	dNTPs	8μL	16 μL
	Primed-M13	2.5μL	2.5 μL
	phi29 DNA 聚合酶	4 μL	4 μL
	ddH ₂ O	29.5 μL	21.5 μL
	Total	50 μL	

[0119] (4) 按照下列程序设置PCR仪进行反应,程序运行结束后将PCR管中加入4μL0.5M EDTA以终止反应:Lid heat on(42℃);37℃ for 60minutes;Hold at 4℃。

[0120] (5) 将反应产物进行0.6%琼脂糖碱性凝胶电泳,电泳结束使用SYBR Gold 染色成像。结果如图4所示,图4中,ladder指分子量maker;negative control 指阴性对照组;positive control指阳性对照组;sample指验证组。

[0121] 由图4可知,实施例3合成的树杈状大分子修饰的核苷酸 (G0-COOH-PEG24-dA6P) 具有与未修饰的dATP相同的生物活性和稳定性,能与DNA聚合酶phi29进行高效的结合,将

7kb左右的M13单链模板滚环复制到70kb左右,对长链模板M13单链DNA的延伸完全、充分。

[0122] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0123] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于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,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

序列表

<110> 安序源生物科技(深圳)有限公司

<120> 测序试剂

<160> 4

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

tagcgaagga tgtgaaccta atccctgctc ccgcggccga tctgccggcc gcgggagca 59

<210> 2

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

tagcgaagga tgtgaaccta atccttgctc ccgcggccga tctgccggcc gcgggagca 59

<210> 3

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

tagcgaagga tgtgaaccta atttttgctc ccgcggccga tctgccggcc gcgggagca 59

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

gtaaaacgac ggccagt 17

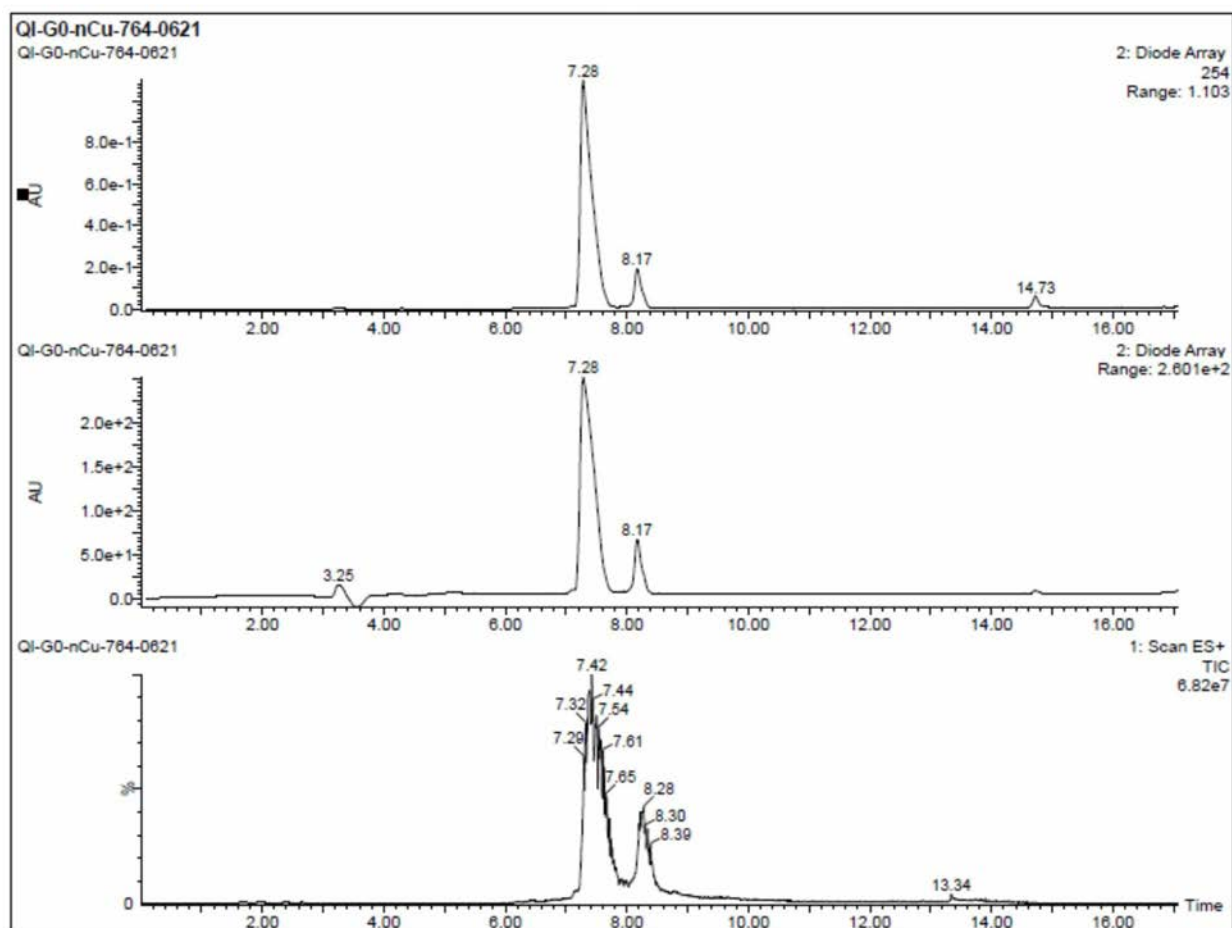


图1

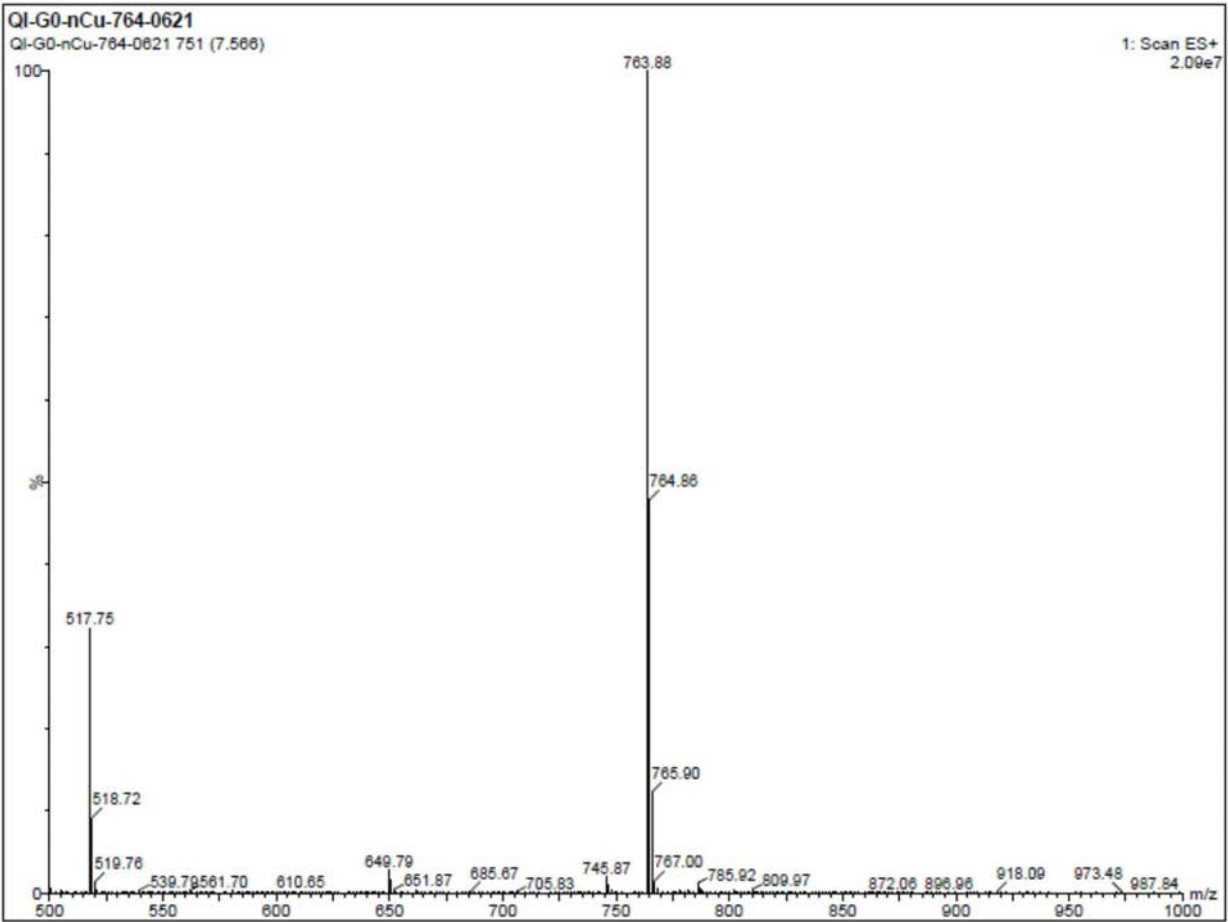


图2

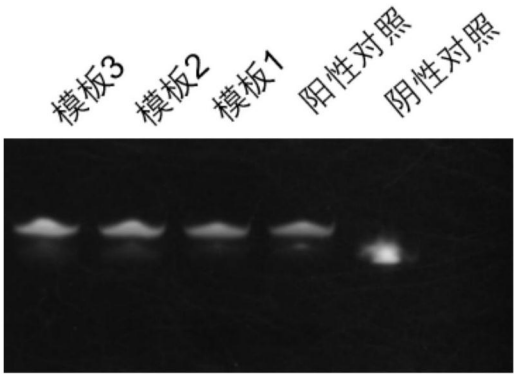


图3

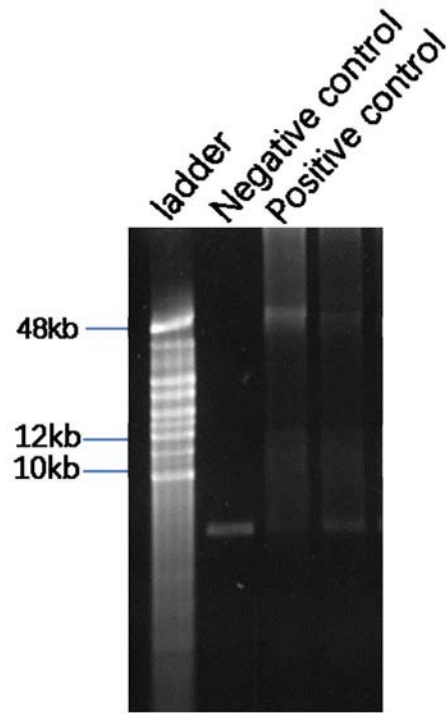


图4