

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 037029

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.01.28

(21) Номер заявки
201691975

(22) Дата подачи заявки
2015.03.27

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/542 (2006.01)

(54) ФЛЮОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННАЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНАЯ НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА И
ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 2014-072280

(32) 2014.03.31

(33) JP

(43) 2017.02.28

(86) PCT/JP2015/059550

(87) WO 2015/152024 2015.10.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАБУСИКИ КАЙСЯ ДиЭнЭйФОРМ
(JP)

(72) Изобретатель:
Ханами Такеси, Хайясизаки
Йосихиде, Сома Такахиро, Кимура
Ясумаса (JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2002077224
JP-A-11123083

Kay M. PARKHURST et al.: "Kinetic studies
by fluorescence resonance energy transfer employing
a double-labeled oligonucleotide: hybridization to the
oligonucleotide complement and to single-stranded
DNA", Biochemistry, 1995, Vol.34, p.285-292
WO-A1-2008111485

(57) Изобретение предназначено, чтобы предоставлять новую флуоресцентно меченную одноцепочечную нуклеиновую кислоту, посредством которой фон экситонного олигомера можно дополнительно уменьшать, и ее новое применение. Изобретение относится к меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте, обладающей по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота характеризуется тем, что длина волны пика излучения одной из пар флуоресцентных атомных групп (пары флуоресцентных атомных групп А) короче, чем длина волны пика возбуждения другой пары флуоресцентных атомных групп (пары флуоресцентных атомных групп В), и пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект резонансного ферстеровского переноса энергии (FRET). Эта флуоресцентно меченная одноцепочечная нуклеиновая кислота является применимой в качестве праймера для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени или зонда для гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью.

B1

037029

037029

B1

Область техники

Изобретение относится к флуоресцентно меченной одноцепочечной нуклеиновой кислоте и к ее применению. В частности, изобретение относится к флуоресцентно меченной одноцепочечной нуклеиновой кислоте, способной уменьшать флуоресцентный фон, и к ее применению.

Перекрестная ссылка на родственную заявку

По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании патентной заявки Японии No. 2014-72280, зарегистрированной 31 марта 2014 г., объект изобретения которой полностью включен в настоящий документ в качестве ссылки.

Предшествующий уровень техники

При анализе биологических феноменов клеток и диагностике факторов заболевания необходимы способы детекции и диагностики на молекулярном уровне. Для достижения этого необходимо детектировать специфический белок и специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, и флуоресценцию широко используют для детекции. Конкретно, известен способ с использованием флуоресцентного вещества, которое увеличивает интенсивность флуоресценции посредством связывания с веществом-мишенью, таким как белок-мишень или последовательность-мишень нуклеиновой кислоты. В качестве флуоресцентного вещества используют, например, вещество, проявляющее эффект ферстеровского (флуоресцентного) резонансного переноса энергии (FRET), или вещество, излучающее флуоресценцию при облучении с использованием излучения возбуждения.

Например, в способе молекулярного маяка, описанном в непатентном литературном источнике 1, используют нуклеиновую кислоту, в которой различные соответствующие красители введены в 5'-концевые и 3'-концевые последовательности нуклеиновой кислоты, которые независимо формируют структуру стебель-петля.

Флуоресценция гасится посредством эффекта FRET во время отсутствия гибридизации, и флуоресценция излучается, когда происходит специфическая гибридизация. Этот способ обладает теми ограничениями, что необходима последовательность для формирования структуры стебель-петля, и флуоресцентные красители необходимо вводить в соответствующие концы.

В качестве другого механизма тушения как заменителя общепринятому способу, предложен способ, использующий экситонный эффект, проявляемый, когда по меньшей мере две молекулы красителя агрегируют параллельно (непатентные литературные источники 2-5, патентный литературный источник 1). Это представляет собой способ с использованием комплексно меченного вещества, обладающего, в одной и той же молекуле, химическими структурами по меньшей мере двух молекул красителя, которые не излучают флуоресценцию посредством экситонного эффекта в одноцепочечном состоянии и излучают флуоресценцию посредством распада состояния агрегации в то время, когда эти молекулы интеркалируют в нуклеиновую кислоту или связываются с бороздкой нуклеиновой кислоты.

Праймер или зонд (называемый также экситонным олигомером), полученный посредством введения этого метящего вещества в олигонуклеотид, можно использовать в амплификации или детекции нуклеиновой кислоты-мишени. Этот экситонный олигомер или т.п. позволяет переключение флуоресценции до и после гибридизации с помощью только одного типа красителя, и в случае, когда экситонный олигомер используют для мониторинга реакции амплификации в реальном времени, он дает специфический для последовательности флуоресцентный сигнал. Таким образом, можно преодолевать общераспространенную проблему с тем, что неспецифическую амплификацию также детектируют, когда используют интеркалятор, такой как SYBR green I. Кроме того, поскольку флуорофор можно вводить в dT или dC, последовательность едва ли ограничена.

Патентный литературный источник 1: JP 2009-171935 A (патент Японии No. 4370385).

Патентный литературный источник 2: JP 2013-183736 A.

Их объекты изобретения полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Непатентный литературный источник 1: Tyagi S., Kramer F.R. (1996) Nat. Biotechnol., 14, 303-308.

Непатентный литературный источник 2: Ikeda S., Kubota T., Kino K., Okamoto A., Bioconjug Chem., 2008, 19, 1719-1725.

Непатентный литературный источник 3: Ikeda S., Kubota T., Yuki M., Okamoto A., Angew Chem Int. Ed. Engl., 2009, 48, 6480-6484.

Непатентный литературный источник 4: Ikeda S., Yuki M., Yanagisawa H., Okamoto A., Tetrahedron Lett. 2009, 51, 7191-7195.

Непатентный литературный источник 5: Takeshi Hanami, Diane Delobel, Hajime Kanamori, Yuki Tanaka, Yasumasa Kimura, Ayako Nakasone, Takahiro Soma, Yoshihide Hayashizaki, Kengo Usui, Matthias Harbers, PLOS ONE, August 2013, volume 8, Issue 8, e70942.

Их объекты полностью включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Сущность изобретения

Проблема, подлежащая решению посредством изобретения.

По исследованиям, проведенным авторами настоящего изобретения, оказалось, что даже при использовании экситонного олигомера определенный фон присутствует при измерении с высокой чувствительностью. Оказалось также, что этот фон мешает детекции флуоресценции в способе детекции флуо-

ресценции, слабо образуемой в то время, когда экситонный олигомер, используемый в качестве зонда, связывается с небольшим количеством мишени.

Таким образом, настоящее изобретение предназначено для предоставления новой флуоресцентно меченной одноцепочечной нуклеиновой кислоты, посредством которой фон экситонного олигомера можно дополнительно уменьшать, и к ее новому применению.

Общепринятый экситонный олигомер представляет собой меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту, в которую введены два флуоресцентных красителя (тиазол оранжевый и сходное с ним вещество). Экситонный олигомер почти не излучает флуоресценцию посредством экситонного эффекта, получаемого, когда два флуоресцентных красителя формируют эксиплекс в одноцепочечном состоянии. Однако, например, экситонный олигомер обладает свойством переключения флуоресценции, когда он гибридизуется с ДНК-мишенью, два красителя находятся на расстоянии друг от друга, и экситонный эффект прекращается, и таким образом, флуоресценция, исходно присутствующая в флуоресцентных красителях, излучается.

Однако в результате исследования авторов настоящего изобретения обнаружено, что механизм гашения флуоресценции посредством экситонного эффекта не является совершенным, исходную флуоресценцию в флуоресцентных красителях невозможно полностью потушить. Таким образом, фон, происходящий из флуоресценции в одноцепочечном состоянии, в значительной степени присутствует. Таким образом, авторы настоящего изобретения далее проводили исследования с целью дальнейшего уменьшения фоновой флуоресценции. В качестве результатов исследования они обнаружили, что фоновую флуоресценцию можно далее уменьшать посредством комбинации переключения флуоресценции, вызванного экситонным эффектом и эффектом FRET, и завершили настоящее изобретение.

Средства для решения проблемы

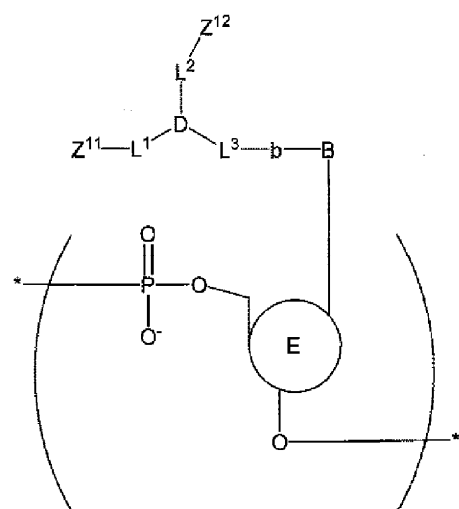
Изобретение представляет собой следующее.

Вспомогательный пункт 1. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота, обладающая по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, где длина волны пика излучения одной из пар флуоресцентных атомных групп (далее в настоящем документе обозначаемой как пара флуоресцентных атомных групп А) короче, чем длина волны пика возбуждения другой пары флуоресцентных атомных групп (далее в настоящем документе, обозначаемой как пара флуоресцентных атомных групп В), и пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект резонансного ферстеровского переноса энергии (FRET).

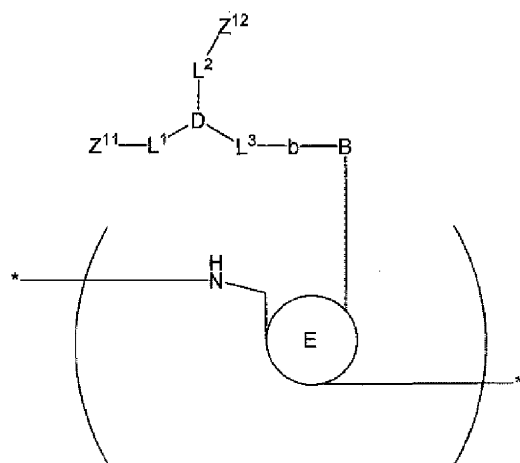
Вспомогательный пункт 2. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по вспомогательному пункту 1, где основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп А и основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп В, содержатся в меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте на расстоянии, на котором пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект FRET.

Вспомогательный пункт 3. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по вспомогательному пункту 2, где расстояние между основанием, обладающим парой флуоресцентных атомных групп А, и основанием, обладающим парой флуоресцентных атомных групп В, составляет 1-11 оснований.

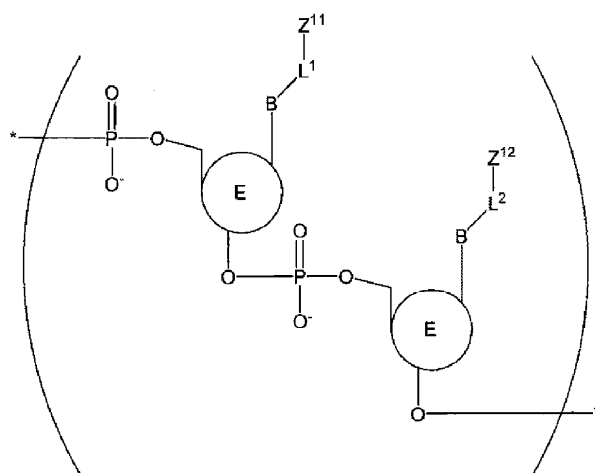
Вспомогательный пункт 4. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по любому из вспомогательных пунктов 1-3, где основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, обладает структурой, представленной следующими формулами (16), (16b), (17) или (17b):



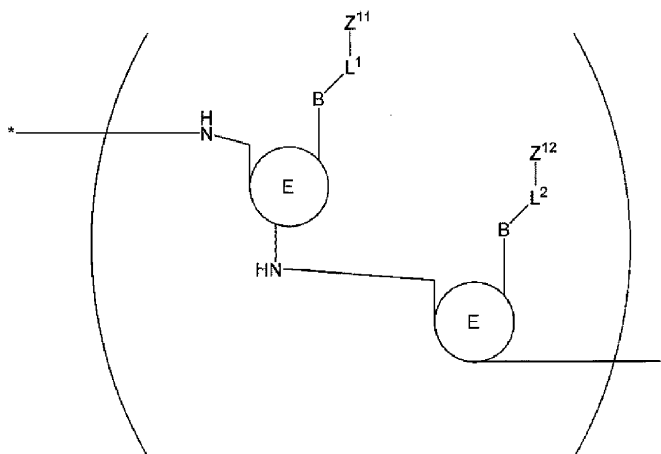
(16)



(16b)



(17)



(17b)

где в формулах (16), (16b), (17) и (17b) В представляет собой атомную группу, обладающую каркасом из природных нуклеиновых оснований (аденина, гуанина, цитозина, тимина или урацила) или каркасом из искусственных нуклеиновых оснований;

Е представляет собой:

(i) атомную группу, обладающую каркасом из дезоксирибозы, каркасом из рибозы или структурой, происходящей из любого из них, или

(ii) атомную группу, обладающую пептидной структурой или пептоидной структурой,

каждая из Z^{11} и Z^{12} представляет собой флуоресцентную атомную группу, проявляющую экситонный эффект, и они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

каждый из L^1 , L^2 и L^3 представляет собой линкер (связывающий атом или связывающую атомную группу), каждый обладает любой длиной главной цепи (количеством атомов главной цепи), каждый может содержать или не содержать каждый из C, N, O, S, P и Si в главной цепи, каждый может содержать или не содержать каждую из одинарной связи, двойной связи, тройной связи, амидной связи, сложноэфирной связи, дисульфидной связи, иминогруппы, эфирной связи, тиоэфирной связи и сложной тиоэфирной связи в главной цепи, и они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

D представляет собой CR, N, P, P=O, B или SiR, где R представляет собой атом водорода, алкильную группу, или любой заместитель, и

b представляет собой одинарную связь, двойную связь или тройную связь, или альтернативно,

в формулах (16) и (16b), каждый из L^1 и L^2 представляет собой линкер, L^3 , D и b могут не присутствовать, и L^1 и L^2 могут являться связанными напрямую с B, при условии, что

в формулах (16) и (17), Е представляет собой атомную группу, описанную в пункте (i), и по меньшей мере один атом O в связи фосфорной кислоты может быть замещен на атом S;

в формулах (16b) и (17b), Е представляет собой атомную группу, описанную в пункте (ii); и

в формулах (17) и (17b), соответствующие В могут являться идентичными или отличными друг от друга, и соответствующие Е могут являться идентичными или отличными друг от друга.

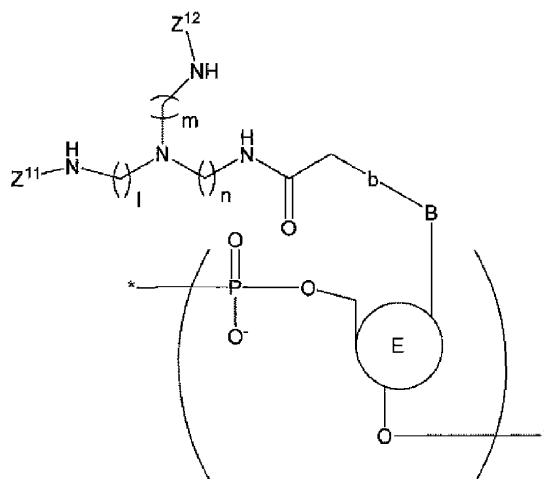
Вспомогательный пункт 5. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по вспомогательному пункту 4, где

структура, представленная формулой (16), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (16-1) или (16-2),

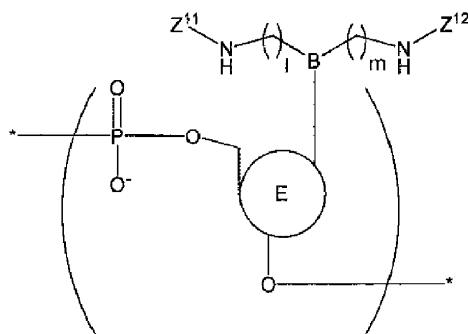
структура, представленная формулой (16b), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (16b-1) или (16b-2),

структура, представленная формулой (17), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (17-1), и

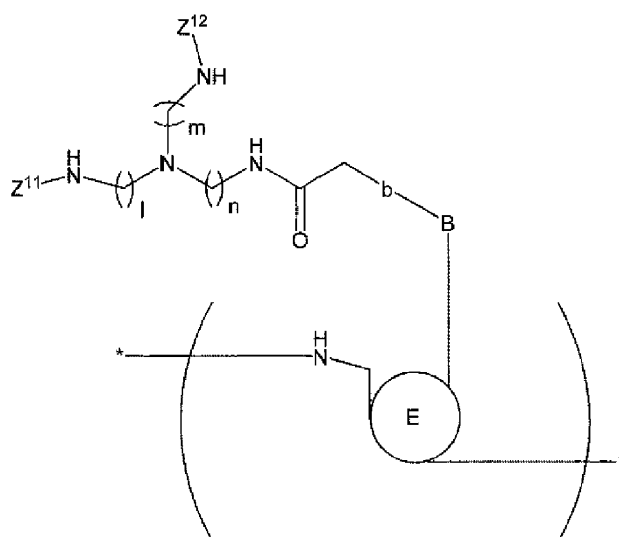
структура, представленная формулой (17b), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (17b-1):



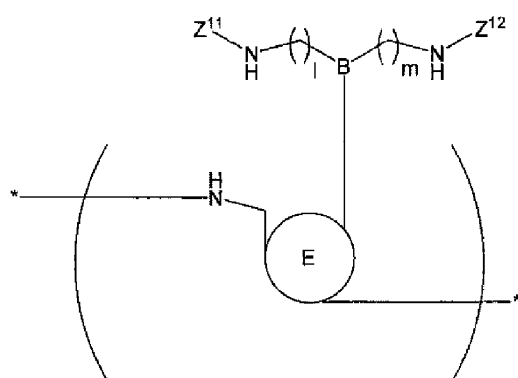
(16-1)



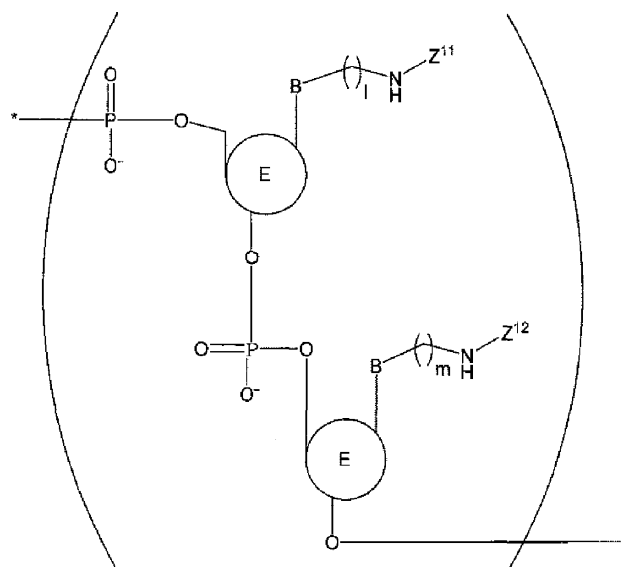
(16-2)



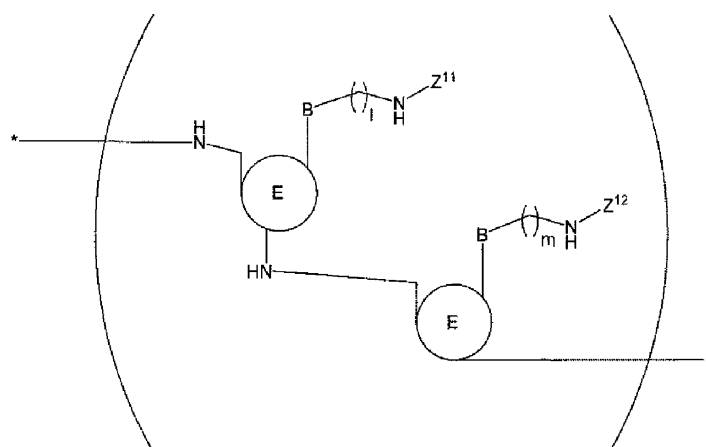
(16b-1)



(16b-2)



(17-1)



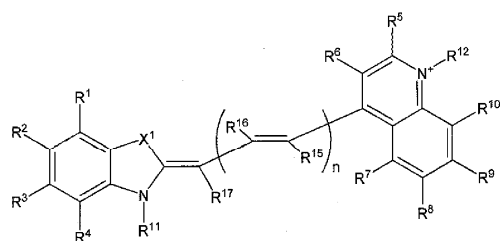
(17b-1)

где в формулах (16-1), (16-2), (16b-1), (16b-2), (17-1) и (17b-1) l , m и n представляют собой любые положительные целые числа, они могут являться идентичными или отличными друг от друга, каждый может содержать или не содержать каждый из C, N, O, S, P, и Si в своей главной цепи, и каждый может содержать или не содержать каждую из одинарной связи, двойной связи, тройной связи, амидной связи, сложноэфирной связи, дисульфидной связи, иминогруппы, эфирной связи, тиоэфирной связи и сложной тиоэфирной связи в главной цепи;

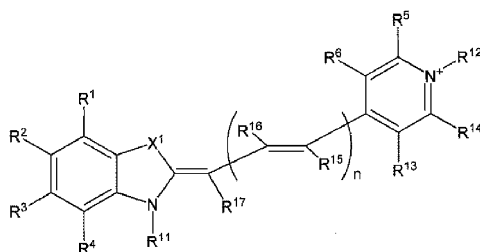
B, E, Z^{11} , Z^{12} и b являются идентичными присутствующим в формулах (16), (16b), (17) и (17b), и в формулах (16-1), (16-2) и (17-1) по меньшей мере один атом O в связи фосфорной кислоты может быть замещен на атом S.

Вспомогательный пункт 6. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по вспомогательному пункту 4 или 5, где основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, обладает структурой, представленной формулой (16).

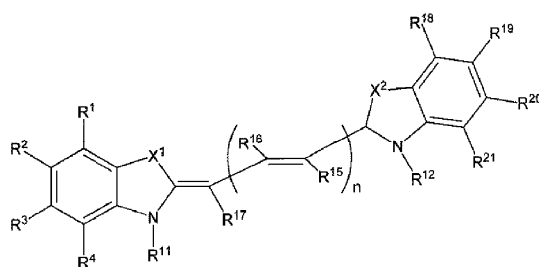
Вспомогательный пункт 7. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по любому из вспомогательных пунктов 4-6, где каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную любой из следующих формул (7)-(10):



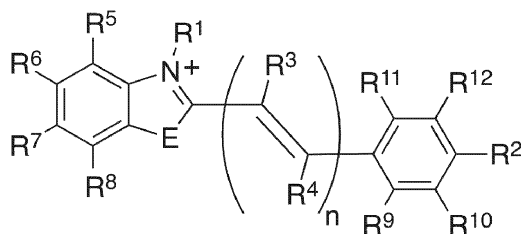
(7)



(8)



(9)



(10)

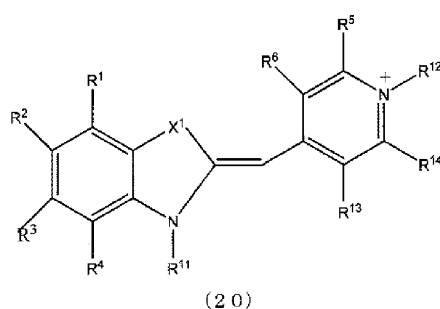
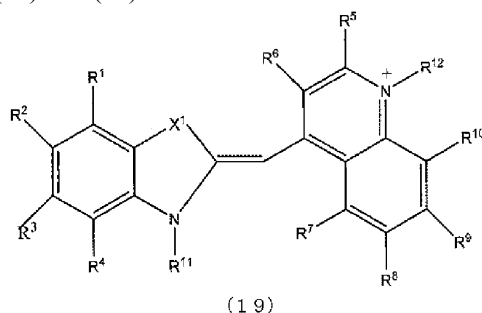
где в формулах (7)-(9) X^1 и X^2 представляют собой S или O;
 n представляет собой 0 или положительное целое число,
каждый из R^1 - R^{10} и R^{13} - R^{21} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу, низшую алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу,
один из R^{11} и R^{12} представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b), и другой представляет собой атом водорода или низшую алкильную группу,
когда множество R^{15} присутствуют в формуле (7), (8) или (9), они могут являться идентичными или отличными друг от друга,
когда множество R^{16} присутствуют в формуле (7), (8) или (9), они могут являться идентичными или отличными друг от друга, и
 X^1 , X^2 , и R^1 - R^{21} в Z^{11} , и X^1 , X^2 , и R^1 - R^{21} в Z^{12} могут являться идентичными или отличными друг от друга, соответственно, и
когда в формуле (10) E представляет собой S или O,
каждый из R^2 - R^{12} независимо представляют собой атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу, низшую алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу,
 R^1 представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b),
когда множество R^3 присутствуют в формуле (10), они могут являться идентичными или отличными друг от друга, и
когда множество R^4 присутствуют в формуле (10), они могут являться идентичными или отличными друг от друга.

Вспомогательный пункт 8. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по вспомогательному

пункту 7, где

каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную формулой (7) или (8), и

каждая из Z^{11} и Z^{12} , представленных формулой (7) или (8), представляет собой группу, представленную следующей формулой (19) или (20):



где в формулах (19) и (20) X^1 , R^1 - R^{10} , R^{13} и R^{14} , R^{11} и R^{12} являются идентичными присутствующим в формулах (7)-(9).

Вспомогательный пункт 9. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по любому из вспомогательных пунктов 1-8, используемая в качестве праймера для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени или зонда для гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью.

Вспомогательный пункт 10. Способ детекции нуклеиновой кислоты-мишени, включающий в себя измерение флуоресценции в условиях, когда меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по любому из вспомогательных пунктов 1-8 в качестве зонда является способной гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, для определения присутствия или отсутствия гибридизации нуклеиновой кислоты-мишени с зондом.

Вспомогательный пункт 11. Способ амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, включающий в себя амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени с использованием меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по любому из вспомогательных пунктов 1-8 в качестве праймера.

Эффекты изобретения.

Настоящее изобретение может обеспечивать меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту, обладающую экситонным олигомером в качестве основного каркаса, способную к дополнительному уменьшению фоновой флуоресценции.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А показан результат измерения спектра флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, полученного в примере 1. Этот результат получали с использованием олигонуклеотида (EX16-12TOTP), обладающего тиазолом розовым (TP) на 12-м основании от 3'-конца и тиазолом оранжевым (TO) на 16-м основании от 3'-конца;

на фиг. 1В - результат измерения спектра общепринятого флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты (общепринятого в данной области), в который введен один флуоресцентный краситель, обладающий экситонным эффектом, полученный в примере 1. Этот результат получали с использованием олигонуклеотида (EX16.TO), обладающего такой же последовательностью, как EX16-12TOTP, и тиазолом оранжевым (TO) на 16-м основании от 3'-конца;

на фиг. 1С - результат измерения спектра общепринятого флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты (общепринятого в данной области), в который введен один флуоресцентный краситель, обладающий экситонным эффектом, полученного в примере 1. Этот результат получали с использованием олигонуклеотида (EX16.TP), обладающего такой же последовательностью, как EX16-12TOTP, и тиазолом оранжевым (TP) на 12-м основании от 3'-конца;

на фиг. 2А - результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты

(EX8-12ТОТР), в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, полученного в примере 1 (расстояние между тиазолом оранжевым (ТО, на 8-м основании от 3'-конца) и тиазолом розовым (ТР, на 12-м основании от 3'-конца) : 3 основания). В качестве сравнения показан результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введен только тиазол оранжевый (ТО) в том же положении;

на фиг. 2В - результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты (EX10-12ТОТР), в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, полученного в примере 1 (расстояние между тиазолом оранжевым (ТО, на 10-м основании от 3'-конца) и тиазолом розовым (ТР, на 12-м основании от 3'-конца) : 1 основание). В качестве сравнения показан результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введен только тиазол оранжевый (ТО) в том же положении;

на фиг. 2С - результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты (EX14-12ТОТР), в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, полученного в примере 1 (расстояние между тиазолом оранжевым (ТО, на 14-м основании от 3'-конца) и тиазолом розовым (ТР, на 12-м основании от 3'-конца) : 1 основание). В качестве сравнения показан результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введен только тиазол оранжевый (ТО) в том же положении;

на фиг. 2D - результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты (EX16-12ТОТР), в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, полученного в примере 1 (расстояние между тиазолом оранжевым (ТО, на 16-м основании от 3'-конца) и тиазолом розовым (ТР, на 12-м основании от 3'-конца) : 4 основания). В качестве сравнения показан результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введен только тиазол оранжевый (ТО) в том же положении;

на фиг. 2Е - результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты (EX18-12ТОТР), в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, полученного в примере 1 (расстояние между тиазолом оранжевым (ТО, на 18-м основании от 3'-конца) и тиазолом розовым (ТР, на 12-м основании от 3'-конца) : 8 оснований). В качестве сравнения показан результат анализа кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введен только тиазол оранжевый (ТО) в том же положении.

Описание вариантов осуществления

Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота.

Изобретение относится к меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте, обладающей по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп, проявляющими экситонный эффект. Эта меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению характеризуется тем, что:

(а) длина волны пика излучения одной из пар флуоресцентных атомных групп (пары флуоресцентных атомных групп А) короче, чем длина волны пика возбуждения другой пары флуоресцентных атомных групп (пары флуоресцентных атомных групп В), и

(b) пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект резонансного ферстеровского переноса энергии (FRET).

Пара флуоресцентных атомных групп, проявляющая экситонный эффект, и меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота, обладающая парой флуоресцентных атомных групп, проявляющей экситонный эффект, описаны в патентных литературных источниках 1 и 2, и в непатентных литературных источниках 2-5. Однако меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота, обладающая по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп, обладающих характеристиками (а) и (b), не описана в каком-либо из патентных литературных источников 1 и 2 и непатентных литературных источников 2-5.

Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту, обладающую по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект.

Одноцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, или их смесь и может, кроме того, представлять собой нуклеиновую кислоту, в которой некоторые или все основания нуклеиновой кислоты представляют собой неприродные основания нуклеиновой кислоты. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может частично обладать двухцепочечной структурой при условии, что она способна гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью. Это более подробно описано ниже.

Длина в основаниях меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты не является ограниченной конкретной длиной в основаниях. Однако по той причине, что меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту в основном используют в качестве зонда или праймера и, кроме того, что одноцепочечная нуклеиновая кислота обладает по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, и удовлетворяет характеристике (b), длина в основаниях одноцепочечной нуклеиновой кислоты лежит, например, в диапазоне от 4- до 100-членника, предпочтительно, от 10- до 50-членника, более предпочтительно от 10- до 40-членника, еще более предпочтительно от 10- до 30-членника. Длину в основаниях выбирают, при необходимости, по применению меченой одноцепочечной

нуклеиновой кислоты. Например, в случае, когда меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту используют для связывания мРНК, предпочтительно используют одноцепочечную нуклеиновую кислоту, обладающую длиной в основаниях приблизительно 80-членника, в случае, когда меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту в качестве праймера для ПЦР, предпочтительно используют одноцепочечную нуклеиновую кислоту, обладающую длиной в основаниях приблизительно 40-членника, и в случае, когда меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту используют в качестве зонда, предпочтительно используют одноцепочечную нуклеиновую кислоту, обладающую длиной в основаниях приблизительно 30-членника.

Количество пар флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, в меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте составляет по меньшей мере два и может также составлять три или более. Чтобы проявлять эффект FRET, практически только необходимо, чтобы количество пар флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, составляло два. Однако с учетом применения меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты, вид флуоресцентных атомных групп, расстояния между парами флуоресцентных атомных групп, и степень эффекта FRET, количество может составлять три и также может составлять четыре или более.

В соответствии с экситонным эффектом, например, интенсивность флуоресценции в одноцепочечном состоянии супрессирована и таким образом позволяет детектировать двухцепочечную структуру более эффективно. Экситонный эффект (экситонное взаимодействие) представляет собой эффект, при котором, например, множество красителей агрегируют параллельно с формированием Н-агрегата и таким образом, почти не проявляют флуоресценции. Потенциально, этот эффект получают следующим образом. А именно, состояние возбуждения красителя разделяется на два энергетических уровня посредством Давыдовского расщепления, происходит возбуждение до более высокого энергетического уровня, а затем внутреннее преобразование до более низкого энергетического уровня, и таким образом, излучение термодинамически запрещено. Однако эти описания не ограничивают настоящее изобретение никаким образом. Возможное наличие экситонного эффекта можно подтверждать посредством присутствия полосы поглощения красителей, сформировавших Н-агрегат, с более короткой длиной волны по сравнению с полосой поглощения отдельного красителя. Примеры красителей, проявляющих такой эффект, включают в себя тиазол оранжевый и его производные, тиазол розовый и его производные, оксазол желтый и его производные, цианин и его производные, гемецианин и его производные, и метиловый красный и его производные, а также группы красителей, обозначаемые как цианиновые красители и азокрасители.

Эти красители легко связываются с двойной цепью ДНК-ДНК и с двойной цепью ДНК-РНК, каждая из которых формирует двойную спираль, или с двойной цепью, сформированной из искусственной нуклеиновой кислоты, такой как тиофосфатная нуклеиновая кислота, ПНК (пептидная нуклеиновая кислота) или закрытая нуклеиновая кислота (ЗНК) (МНК), с ДНК или РНК посредством интеркаляции. Когда множество таких красителей введены в одноцепочечную нуклеиновую кислоту, сильное тушение происходит в основном одноцепочечном состоянии (например, состояния только зонда или праймера перед гибридизацией). Когда одноцепочечная нуклеиновая кислота гибридизуется с ДНК- или РНК-мишенью, агрегат распадается, и красители индивидуально интеркалируют в двойную цепь. В это время не присутствует электронного взаимодействия между красителями, таким образом, не проявляется экситонный эффект и проявляется интенсивная флуоресценция. Полоса поглощения красителей в это время является такой же, как полоса поглощения одного красителя, и это показывает, что экситонный эффект между красителями не проявляется. Когда красители интеркалируют в двойную цепь, исходное скручивание структуры в красителях устраняется, и, таким образом, флуоресценция становится более интенсивной.

Характеристика (а).

Длина(длины) волны пика излучения одной из пар флуоресцентных атомных групп (пары флуоресцентных атомных групп А) короче, чем длина(длины) волны пика возбуждения другой пары флуоресцентных атомных групп (пары флуоресцентных атомных групп В). Длина волны пика излучения означает длину волны пика спектра излучения, полученного в то время, когда пару флуоресцентных атомных групп А подвергают облучению с помощью излучения возбуждения, и изменяется в соответствии с типами флуоресцентных атомных групп пары флуоресцентных атомных групп А. Длина волны пика возбуждения означает длину волны пика спектра излучения возбуждения, которое может поглощать пара флуоресцентных атомных групп В, и изменяется в соответствии с типами флуоресцентных атомных групп пары флуоресцентных атомных групп В. Длина(длины) волны пика излучения пары флуоресцентных атомных групп А и длина(длины) волны пика возбуждения пары флуоресцентных атомных групп В не являются ограниченными. Следует отметить, что когда меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению используют в качестве зонда или праймера, и флуоресцентную метку используют для детекции, флуоресценция излучается из флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп В, и таким образом, выбирают флуоресцентные атомные группы из пары флуоресцентных атомных групп В, обладающие интенсивностью и длиной(динами) волны излучения, которые являются подходящими для детекции, и с учетом длины(дин) волны пика возбуждения флуо-

ресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп В, можно выбирать флуоресцентные атомные группы из пары флуоресцентных атомных групп А. Взаимосвязь между длиной(длинами) волны пика излучения флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп А и длиной(длинами) волны пика возбуждения флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп В можно определять с учетом эффекта FRET, полученного между ними. Две флуоресцентные атомные группы в паре флуоресцентных атомных групп А могут являться идентичными или отличными друг от друга, и две флуоресцентных атомных группы в паре флуоресцентных атомных групп В также могут являться идентичными или отличными друг от друга. Когда две флуоресцентные атомные группы в паре флуоресцентных атомных групп А или две флуоресцентные атомные группы в паре флуоресцентных атомных групп В являются отличными друг от друга, длина волны пика излучения по меньшей мере одной из двух флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп А короче, чем длина волны пика возбуждения по меньшей мере одной из двух флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп В. Предпочтительно, чтобы длины волны пика излучения обеих флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп А были короче, чем длины волны пика возбуждения обеих флуоресцентных атомных групп из пары флуоресцентных атомных групп В.

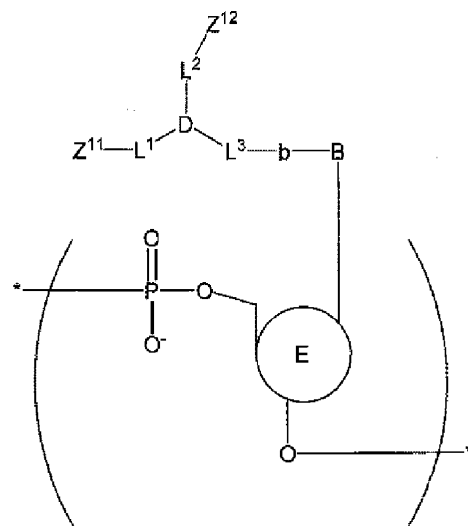
Характеристика (b).

Пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект FRET. Эффект резонансного ферстеровского переноса энергии (FRET) называют также резонансным переносом энергии флуоресценции, и он представляет собой феномен, когда энергия возбуждения между двумя соседними хромофорами не переходит в электромагнитную волну и переносится напрямую посредством резонанса электронов. Энергия переносится посредством энергии света, поглощенного одним из хромофоров (донором), к другому хромофору (рецептору), и когда рецептор представляет собой флуоресцентную молекулу, флуоресценция излучается от рецептора. В меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению, пара флуоресцентных атомных групп А, обладающая длиной волны пика излучения, более короткой, чем длина волны пика возбуждения пары флуоресцентных атомных групп В, аранжирована так, чтобы проявлять эффект FRET с парой флуоресцентных атомных групп В. Аранжировка, посредством которой пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект FRET, представляет собой, например, аранжировку в случае, когда основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп А, и основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп В, содержатся в меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте на расстоянии, на котором пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект FRET. Расстояние (длина в основаниях), на котором пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект FRET, хотя оно отличается в соответствии с типами и комбинациями флуоресцентных атомных групп из пар флуоресцентных атомных групп А и В, составляет, например, 1-11 оснований, предпочтительно 2-8 оснований, более предпочтительно 2-7 оснований, еще более предпочтительно 2-6 оснований, еще более предпочтительно 2-5 оснований, еще более предпочтительно 2-4 основания. Расстояние в одно основание означает, что одна нуклеиновая кислота, не обладающая флуоресцентной атомной группой, присутствует между парой флуоресцентных атомных групп А и В. Примеры комбинаций флуоресцентных атомных групп из пар флуоресцентных атомных групп А и В включают в себя комбинацию тиазола оранжевого (D514) и тиазола розового (D570) или D640 и комбинацию D436 и тиазола оранжевого (D514), тиазола розового (D570) или D640.

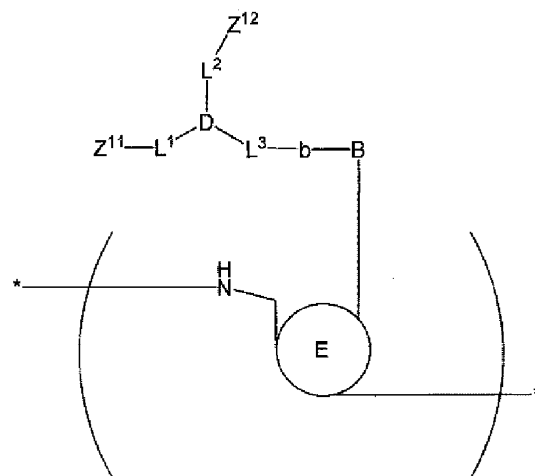
В дополнение к характеристикам (a) и (b) меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению необязательно характеризуется тем, что пары флуоресцентных атомных групп А и В расположены на любом из оснований, которые находятся по меньшей мере на два основания внутрь от каждого конца меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты. Посредством удовлетворения этой характеристики можно проявлять как экситонный эффект, так и эффект FRET.

В качестве примеров основания, обладающего парой флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, можно показать основания, описанные в патентных литературных источниках 1 и 2 и непатентных литературных источниках 2-5. Основание более подробно описано ниже.

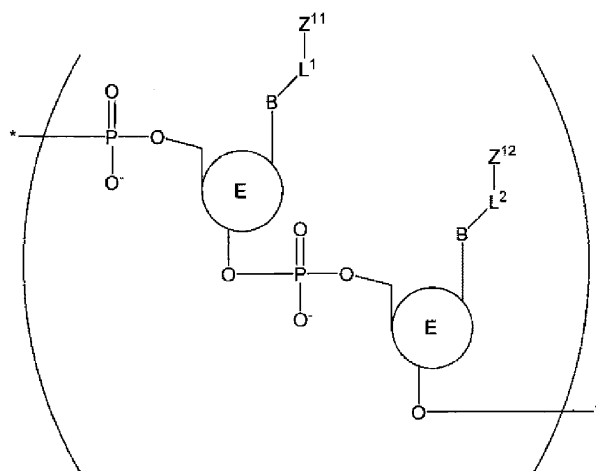
Основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, может обладать структурой, представленной следующими формулами (16), (16b), (17) или (17b):



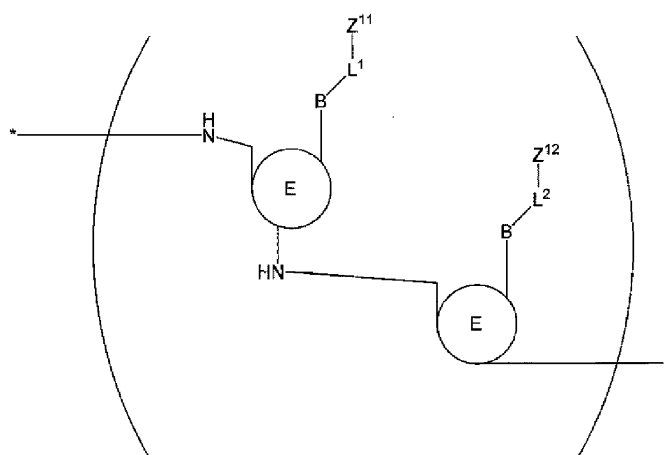
(16)



(16b)



(17)



(17b)

В формулах (16), (16b), (17) и (17b) В представляет собой атомную группу, обладающую каркасом из природных нуклеиновых оснований (аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил) или каркасом из искусственных нуклеиновых оснований;

Е представляет собой:

(i) атомную группу, обладающую каркасом из дезоксирибозы, каркасом из рибозы, или структурой, полученной из любого из них; или

(ii) атомную группу, обладающую пептидной структурой или пептоидной структурой, каждая из Z^{11} и Z^{12} представляет собой флуоресцентную атомную группу, проявляющую экситонный эффект, и они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

каждый из L^1 , L^2 , и L^3 представляет собой линкер (связывающий атом или связывающую атомную группу), каждый обладает любой длиной главной цепи (количеством атомов главной цепи), каждый может содержать или не содержать каждый из C, N, O, S, P и Si в главной цепи, каждый может содержать или не содержать каждую из одинарной связи, двойной связи, тройной связи, амидной связи, сложноэфирной связи, дисульфидной связи, иминогруппы, эфирной связи, тиоэфирной связи и сложной тиоэфирной связи в главной цепи, и они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

D представляет собой CR, N, P, P=O, B или SiR, где R представляет собой атом водорода, алкильную группу или любой заместитель, и

b представляет собой одинарную связь, двойную связь или тройную связь, или альтернативно,

в формулах (16) и (16b) каждый из L^1 и L^2 представляет собой линкер, L^3 , D и b могут не присутствовать, и L^1 и L^2 могут являться связанными напрямую с B, при условии, что

в формулах (16) и (17) Е представляет собой атомную группу, описанную в пункте (i), и по меньшей мере один атом O в связи фосфорной кислоты может быть замещен на атом S;

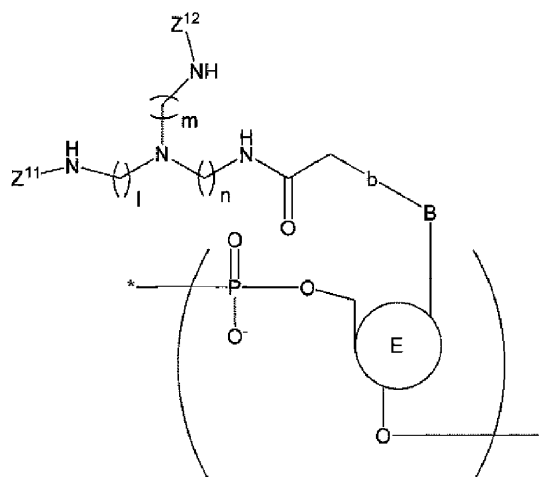
в формулах (16b) и (17b) Е представляет собой атомную группу, описанную в пункте (ii); и

в формулах (17) и (17b) соответствующие В могут являться идентичными или отличными друг от

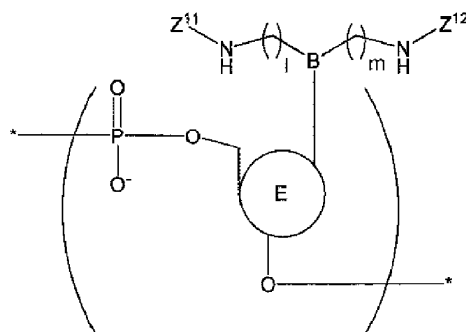
друга, и соответствующие E могут являться идентичными или отличными друг от друга.

В формулах (16), (17), (16b) и (17b), длина главной цепи (количество атомов главной цепи) каждого из L^1 , L^2 и L^3 предпочтительно составляет целое число 2 или более. Верхний предел длины главной цепи (количество атомов главной цепи) каждого из L^1 , L^2 и L^3 не является ограниченным конкретной длиной и составляет, например, 100 или менее, более предпочтительно 30 или менее и особенно предпочтительно 10 или менее.

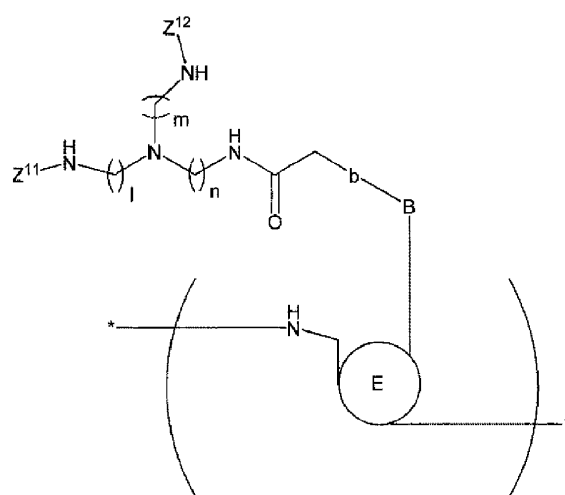
Предпочтительно, чтобы структура, представленная формулой (16), представляла собой структуру, представленную следующей формулой (16-1) или (16-2), структура, представленная формулой (16b), представляла собой структуру, представленную следующей формулой (16b-1) или (16b-2), структура, представленная формулой (17), представляла собой структуру, представленную следующей формулой (17-1), и структура, представленная формулой (17b), представляла собой структуру, представленную следующей формулой (17b-1)



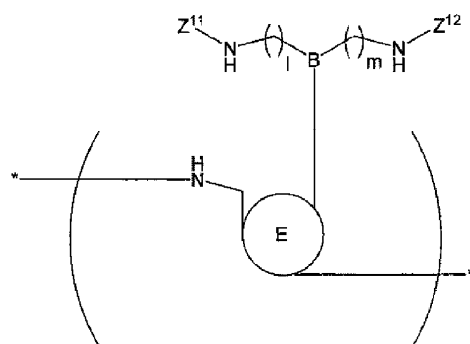
(16-1)



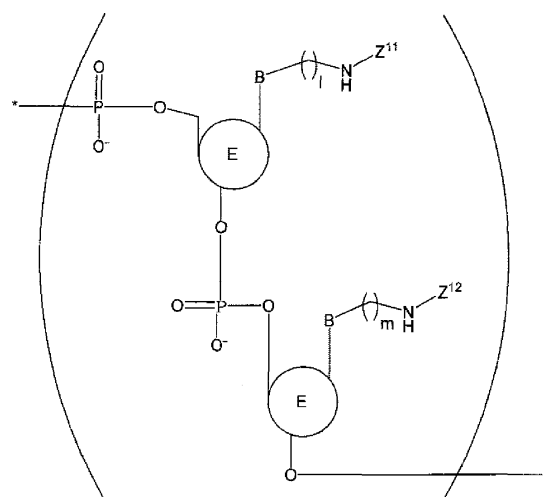
(16-2)



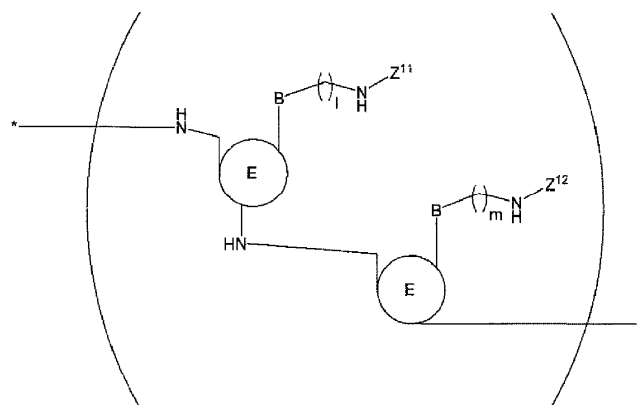
(16b-1)



(16b-2)



(17-1)



(17b-1)

В формулах (16-1), (16-2), (16b-1), (16b-2), (17-1) и (17b-1) l , m и n представляют собой любые положительные целые числа, они могут являться идентичными или отличными друг от друга, каждый может содержать или не содержать каждый из C, N, O, S, P, и Si в своей главной цепи, и каждый может содержать или не содержать каждую из одинарной связи, двойной связи, тройной связи, амидной связи, сложноэфирной связи, дисульфидной связи, иминогруппы, эфирной связи, тиоэфирной связи и сложной тиоэфирной связи в главной цепи,

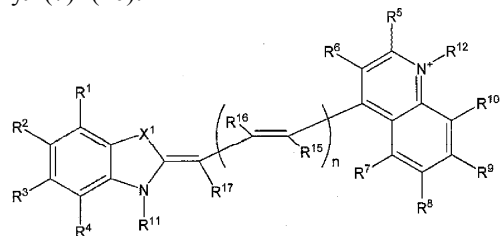
B , E , Z^{11} , Z^{12} и b являются идентичными присутствующим в формулах (16), (16b), (17) и (17b), и в формулах (16-1), (16-2) и (17-1), по меньшей мере один атом O в связи фосфорной кислоты может быть замещен на атом S.

Каждая из Z^{11} и Z^{12} представляет собой флуоресцентную атомную группу, проявляющую экситонный эффект. Соответственно, например, увеличение флуоресценции во время формирования двухспиральной структуры является большим, и далее двухспиральную структуру можно эффективно детектировать.

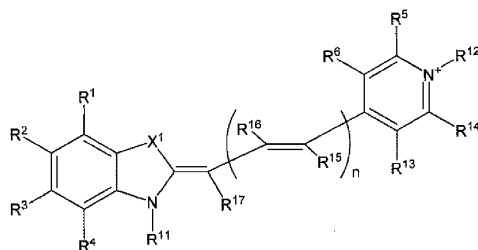
Для каждой из Z^{11} и Z^{12} необходимо только представлять собой флуоресцентную атомную группу, проявляющую экситонный эффект, и флуоресцентная атомная группа не является ограниченной конкретными флуоресцентными атомными группами. Чтобы проявлять экситонный эффект, ароматическую атомную группу предпочтительно использовать в качестве флуоресцентной атомной группы. Каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой, например, более предпочтительно, любой из тиазола оранжевого, тиазола розового, оксазола желтого, цианина, гемецианина, других цианиновых красителей, метилового красного, азокрасителя и производных из них групп. Любые из групп, производных из других известных красителей, также можно использовать при необходимости. Опубликовано множество флуоресцентных красителей, изменяющих интенсивность флуоресценции посредством связывания с нуклеиновой кислотой, такой как ДНК. В качестве типичного примера известно, что бромид этидия проявляет интенсивную флуоресценцию посредством интеркаляции в структуру двойной спирали ДНК, и его много используют для детекции ДНК. Кроме того, известны флуоресцентные красители, которые могут контролировать интенсивность флуоресценции в соответствии с микроскопической полярностью, такие как

пиренкарбоксамид и продан. Кроме того, тиазоловый оранжевый представляет собой флуоресцентный краситель, в котором бензотиазоловое кольцо и хинолиновое кольцо связаны друг с другом через метиновую группу, и обычно проявляет слабую флуоресценцию, и тем не менее обеспечивает интенсивную флуоресценцию посредством интеркаляции в ДНК, обладающую структурой двойной спирали. В дополнение к этим, примеры Z^{11} и Z^{12} включают в себя такие красители, как флуоресцеин и $\text{Cu}3$.

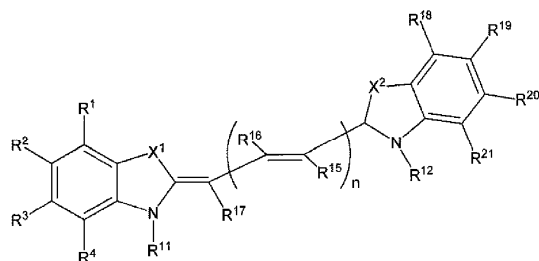
Каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо предпочтительно представляет собой атомную группу, представленную любой из следующих формул (7)-(10):



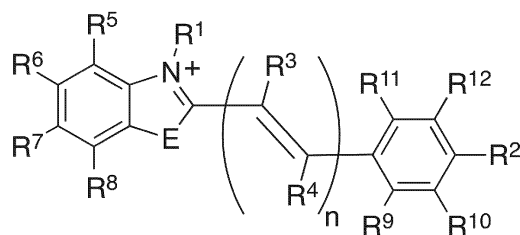
(7)



(8)



(9)



(10)

В формулах (7)-(9) X^1 и X^2 представляют собой S или O, n представляет собой 0 или положительное целое число, каждый из R^1 - R^{10} и R^{13} - R^{21} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу, низшую алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу, один из R^{11} и R^{12} представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b), и другой представляет собой атом водорода или низшую алкильную группу, когда множество R^{15} присутствуют в формуле (7), (8) или (9), они могут являться идентичными или отличными друг от друга, когда множество R^{16} присутствуют в формуле (7), (8) или (9), они могут являться идентичными или отличными друг от друга, и X^1 , X^2 , и R^1 - R^{21} в Z^{11} , и X^1 , X^2 и R^1 - R^{21} в Z^{12} могут являться идентичными или отличными друг от друга, соответственно.

В формуле (10) E представляет собой S или O, каждый из R^2 - R^{12} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, низшую алкильную

группу, низшую алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу,

R^1 представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b),

когда множество R^3 присутствуют в формуле (10), они могут являться идентичными или различными друг от друга, и

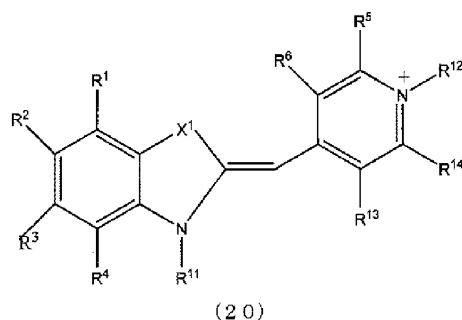
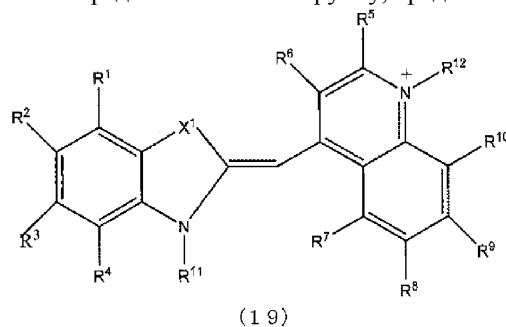
когда множество R^4 присутствуют в формуле (10), они могут являться идентичными или различными друг от друга.

Для R^1 - R^{21} из формул (7)-(9), является более предпочтительным, чтобы низшая алкильная группа представляла собой алкильную группу с неразветвленной или разветвленной цепью с количеством атомов углерода от 1 до 6, и низшая алкоксигруппа представляла собой алкоксигруппу с неразветвленной или разветвленной цепью с количеством атомов углерода от 1 до 6. Для R^2 - R^{12} из формулы (10), является более предпочтительным, чтобы низшая алкильная группа представляла собой алкильную группу с неразветвленной или разветвленной цепью с количеством атомов углерода от 1 до 6, и низшая алкоксигруппа представляла собой алкоксигруппу с неразветвленной или разветвленной цепью с количеством атомов углерода от 1 до 6.

Для R^{11} и R^{12} из формул (7)-(9), и R^1 в формуле (10), является более предпочтительным, чтобы связывающая группа представляла собой полиметиленкарбонильную группу с количеством атомов углерода 2 или более и являлась связанной с L^1 или L^2 в формулах (16), (16b), (17) и (17b) через карбонильную группу.

Верхний предел количества атомов углерода полиметиленкарбонильной группы не является ограниченным конкретными количествами и составляет, например, 100 или менее, предпочтительно 50 или менее, более предпочтительно 30 или менее, особенно предпочтительно 10 или менее.

Когда каждая из Z^{11} и Z^{12} представлена любой из формул (7)-(9), является более предпочтительным, чтобы каждая, например, независимо представляла собой группу, представленную формулой (19) или (20)



В формулах (19) и (20), X^1 представляет собой -S- или -O-. Каждый из R^1 - R^{10} , и R^{13} и R^{14} независимо обозначает атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу, низшую алкоксигруппу, нитрогруппу или аминогруппу. Один из R^{11} и R^{12} представляет собой связывающую группу, связанную с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b), и другой представляет собой атом водорода или низшую алкильную группу.

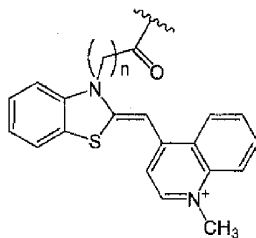
Предпочтительные аспекты являются следующими:

(i) каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную формулой (19), где X^1 представляет собой S; каждый из R^1 - R^{10} представляет собой атом водорода; и любой из R^{11} и R^{12} представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b), и другой представляет собой метильную группу;

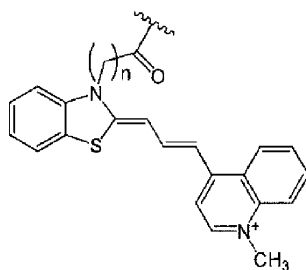
(ii) каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную формулой (19), где X^1 представляет собой S; каждый из R^1 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^9 и R^{10} представляет собой атом водорода; каждый из R^2 , R^3 и R^{12} представляет собой метильную группу; R^8 представляет собой атом галогена; R^{11} представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b);

(iii) каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную формулой (7), где X^1 представляет собой S; n представляет собой 1; каждый из R^1 - R^{10} , R^{15} , R^{16} и R^{17} представляет собой атом водорода; R^{11} представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b).

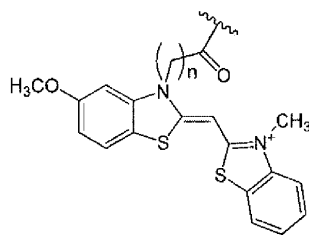
Каждая из Z^{11} и Z^{12} может независимо представлять собой атомную группу, представленную любой из следующих химических формул. Эти формулы представляют собой тиазол оранжевый (D514), D640, D436, D534, D543, и тиазол розовый (D570) сверху вниз. См. в непатентном литературном источнике 3 наименования атомных групп, начинающиеся с D



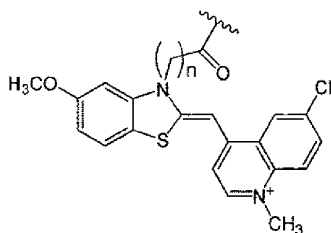
D514



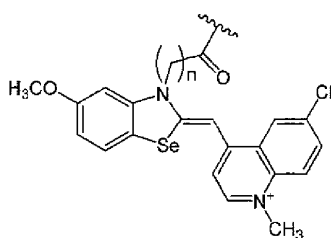
D640



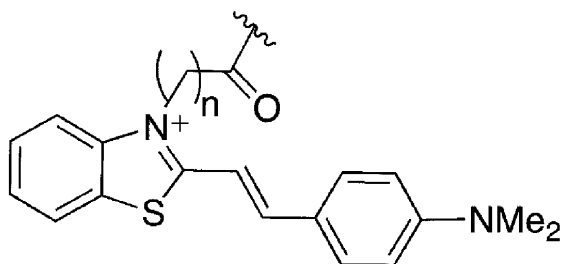
D436



D534



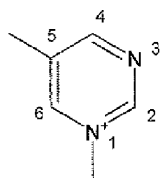
D543



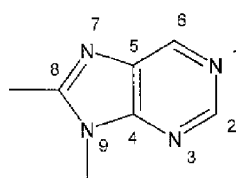
D570

В каждой из химических формул n представляет собой положительное целое число.

В формулах (16), (17), (16b) и (17b) В может обладать каркасом из природных нуклеиновых оснований, а также, как описано выше, может обладать каркасом из искусственных нуклеиновых оснований. Например, В предпочтительно представляет собой структуру, представленную Ру (пиримидиновое кольцо), Ру der., Пу (пуриновое кольцо), или Пу der. Ру представляет собой атомную группу, обладающую ковалентной связью с Е в 1-м положении и ковалентной связью с группой линкера в 5-м положении в шестичленном кольце, представленном следующей формулой (11). Ру der. представляет собой атомную группу, в которой по меньшей мере один из всех атомов шестичленного кольца Ру замещен на атом N, C, S или O, и атом N, C, S или O, необязательно, может обладать электрическим зарядом, атомом водорода или заместителем. Пу представляет собой атомную группу, обладающую ковалентной связью с Е в 9-м положении и ковалентной связью с группой линкера в 8-м положении в конденсированном кольце, представленном следующей формулой (12). Пу der. представляет собой атомную группу, в которой по меньшей мере один из всех атомов пятичленного кольца Пу замещен на атом N, C, S или O, и атом N, C, S или O, необязательно, может обладать электрическим зарядом, атомом водорода или заместителем



(11)



(12)

В меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению основной каркас нуклеиновой кислоты не является ограниченным конкретными основными каркасами. Их примеры включают в себя олигонуклеотиды, модифицированные олигонуклеотиды, олигонуклеозиды, модифицированные олигонуклеозиды, полинуклеотиды, модифицированные полинуклеотиды, полинуклеозиды, модифицированные полинуклеозиды, ДНК, модифицированную ДНК, РНК, модифицированную РНК, ЗНК, ПНК (пептидные нуклеиновые кислоты), их химерные молекулы, и другие структуры. Кроме того, основной каркас каждой нуклеиновой кислоты может являться природным или искусственно синтезированным. В случае, когда настоящее изобретение относится к набору зондов или праймеров, нуклеиновая кислота не является ограниченной конкретными нуклеиновыми кислотами при условии, что она может обеспечивать, например, спаривание оснований. В случае образца нуклеиновой кислоты или последовательности-мишени нуклеиновой кислоты нуклеиновая кислота не является ограниченной конкретными нуклеиновыми кислотами при условии, что она, например, служит матрицей для синтеза комплементарной цепи. Таким образом, нуклеиновая кислота может представлять собой производное нуклеотида, которое, например, частично или полностью сформировано из полностью искусственной структуры. Искусственные основания, составляющие нуклеиновую кислоту, можно выбирать, например, из 2-амино-6-(N,N-диметиламино)пурина, пиридин-2-она, 5-метилпиридин-2-она, 2-амино-6-(2-тиенил)пурина, пиррол-2-карбальдегида, 9-метилимидазо[(4,5)-b]пиридина, 5-иод-2-оксо(1H)пиридина, 2-оксо-(1H)пиридина, 2-амино-6-(2-тиазолил)пурина, 7-(2-тиенил)-имидазо[4,5-b]пиридина, бромтимина, азааденина и азагуанина.

Основной каркас меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой олигонуклеотид, полинуклеотид, ДНК или их модифицированный продукт. По настоящему изобретению, "нуклеотид" может представлять собой, например, либо дезокси-нуклеотид, либо рибонуклеотид, и каждый из "олигонуклеотида" и "полинуклеотида" может состоять из любого из дезоксинуклеотида и рибонуклеотида, или может содержать оба из них. По настоящему изобретению количество оснований, составляющих нуклеиновую кислоту, не является ограниченным конкретными количествами. Как правило, термин "нуклеиновая кислота" является синонимом термина "полинуклеотид". Как правило, термин "олигонуклеотид" используют в качестве термина, обозначающего полинуклеотид, состоящий, в частности, из небольшого количества оснований, среди полинуклеотидов. Как правило, полинуклеотид, например от 2- до 100-членного, в более общем смысле, приблизительно от 2- до 50-членного, обозначают как "олигонуклеотид", но он не является ограниченным этими числовыми значениями. По настоящему изобретению термин "полинуклеотид" следует также интерпретировать как включающий в себя, например, полинуклеотид и олигонуклеотид, а также искусственно синтезированные нуклеиновые кислоты, такие как пептидная нуклеиновая кислота, морфолиновая нуклеиновая кислота, метилфосфонатная нуклеиновая кислота и S-олигонуклеиновая кислота.

Как правило, пептидная нуклеиновая кислота (ПНК) обладает структурой, в которой главная дезоксирибозная цепь олигонуклеотида заменена на пептидную главную цепь. Примеры главной пептидной цепи включают в себя повторяющиеся звенья N-(2-аминоэтил)глицина, связанные амидной связью. Примеры основания для связывания с главной пептидной цепью ПНК включают в себя, но без ограничения, природные основания, такие как тимин, цитозин, аденин, гуанин, инозин, урацил, 5-метилцитозин, тиоурацил и 2,6-диаминопурин; и искусственные основания, такие как бромтимин, азааденин и азагуанин.

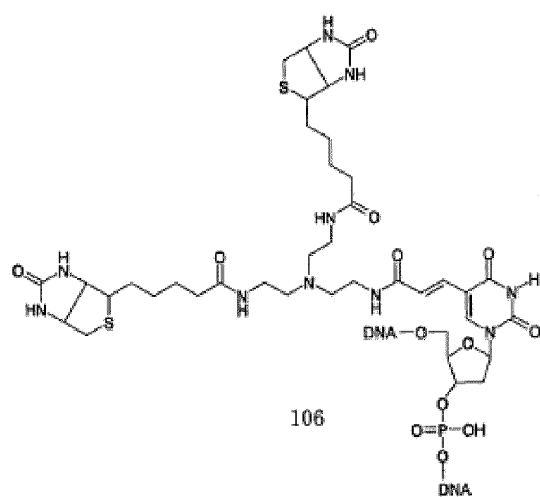
Как правило, ЗНК представляет собой нуклеиновую кислоту, обладающую двумя циклическими структурами, в которых в каркасе из сахара-фосфорной кислоты атом кислорода в 2'-положении и атом углерода в 4'-положении рибозы связаны друг с другом метиленовой связью. Когда олигонуклеотид, содержащий ЗНК, гибридизуется с ДНК, двухцепочечная конформация изменяется, посредством чего улучшается термостабильность. ЗНК обладает более сильной аффинностью связывания с нуклеиновой кислотой, чем общепринятый олигонуклеотид. Таким образом, например, в зависимости от условий конструирования олигонуклеотида, можно достигать более надежной и сильной гибридизации.

Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению относится к меченой структуре, обладающей по меньшей мере двумя парами флуоресцентных атомных групп. С этой конфигурацией меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению обладает более высокой специфичностью к мишени и гибридизуется с мишенью более сильно, например, по сравнению с немеченой нуклеиновой кислотой, которая не включает флуоресцентные атомные группы. Т.е. меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению обладает более высокой температурой плавления (значением T_m), чем немеченая нуклеиновая кислота, обладающая основным каркасом с

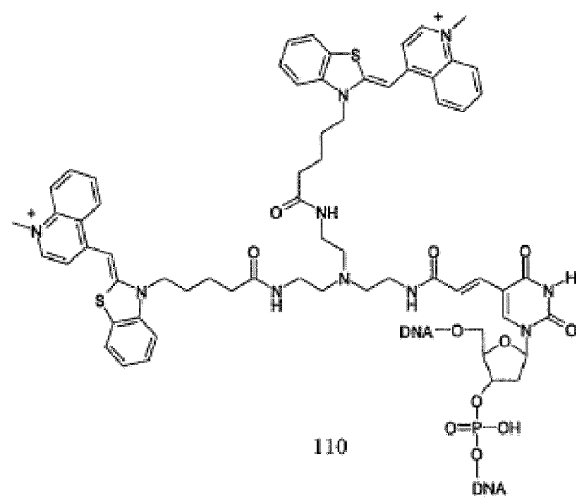
такой же последовательностью оснований и такой же длиной фрагмента нуклеиновой кислоты. Таким образом, меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может гибридизоваться с мишенью более сильно по сравнению с немеченой нуклеиновой кислотой. Соответственно, меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению, обладающая такими свойствами, позволяет, например, проводить детекцию эффективно с высокой специфичностью.

Поскольку меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению также обладает описанными выше характеристиками, ее можно применять в технологии для улучшения специфичности амплификации посредством увеличения значения T_m подобно, например, общепринятой ПНК или ЗНК. Кроме того, когда ПНК или ЗНК используют для основного каркаса меченого праймера по настоящему изобретению, значение T_m можно увеличивать дополнительно по сравнению с немеченой ПНК или ЗНК, так что эффективность гибридизации можно увеличивать еще больше. В частности, когда необходимо различать мутации от одного до нескольких оснований или когда вставку или делецию необходимо детектировать, как описано ниже, использование меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты (включая, например, меченую ПНК и меченую ЗНК) по настоящему изобретению позволяет проводить детекцию эффективно с высокой специфичностью. Когда меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению используют в качестве праймера или зонда, большое различие в значении T_m и различие в эффективности гибридизации получают между случаями, когда она полностью соответствует или не соответствует последовательности-мишени. Соответственно, детекцию мутаций, такую как различие отдельного основания, можно проводить более просто. Кроме того, поскольку меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению обладает более высоким значением T_m , чем немеченая нуклеиновая кислота, она также является применимой в качестве праймера, например, в способе ПЦР с зажимами, в способе ПЦР ПНК с зажимами, в способе ПЦР ЗНК с зажимами и в способе ПЦР в способе ПЦР ПНК с зажимами, в котором она сильно связывается со специфической областью, маскирует область и не служит в качестве матрицы для амплификации.

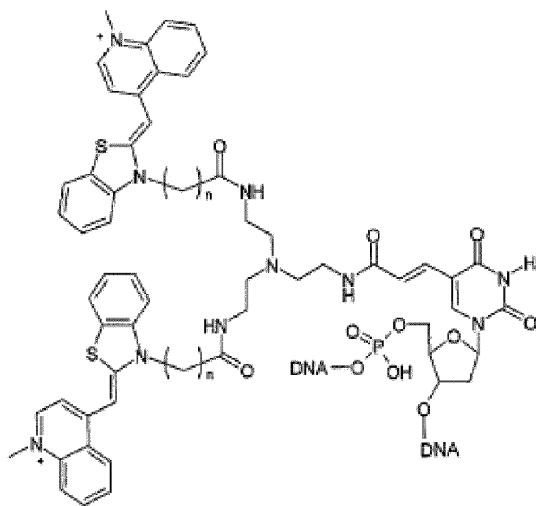
Конкретные примеры структуры, представленной формулой (16), включают в себя нуклеотидные структуры, представленные следующими формулами (1-3)-(1-10), их геометрические изомеры и стерео-изомеры или их соли



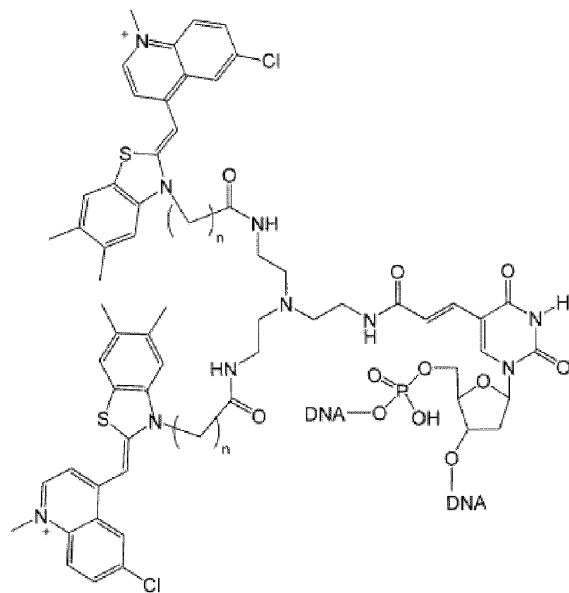
(1-3)



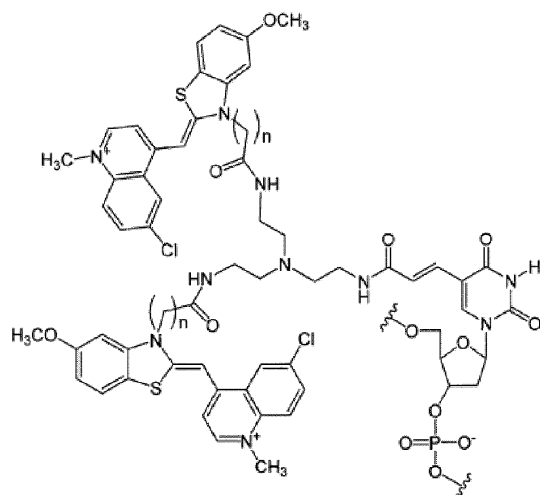
(1-4)



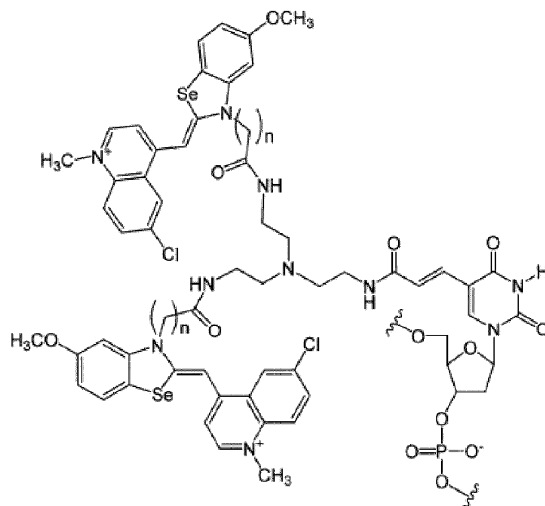
(1-5)



(1-6)



(1-9)



(1-10).

В формулах (1-3)-(1-10) n представляет собой положительное целое число.

Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению особенно предпочтительно представляет собой меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту, обладающую парами флуоресцентных атомных групп, представленными указанными выше формулами (1-1) - (1-10).

Каждая из пары флуоресцентных атомных групп в меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению характеризуется тем, что:

(i) излучает флуоресценцию с помощью двух плоских химических структур, содержащихся в одной молекуле, которые присутствуют не в одной и той же плоскости, но с определенным углом, образованным между ними, являясь локализованными так, чтобы быть аранжированными в одной и той же плоскости, когда молекула подвергается интеркаляции в нуклеиновую кислоту или связыванию с бороздкой нуклеиновой кислоты;

(ii) сформирована по меньшей мере из двух молекулярных групп красителей, которые не проявляют флуоресценцию из-за экситонного эффекта, получаемого, когда по меньшей мере две молекулы красителя агрегируют параллельно друг с другом, но проявляют флуоресценцию, когда состояние агрегации разрушается, когда молекулы подвергаются интеркаляции в нуклеиновую кислоту или связыванию с бороздкой нуклеиновой кислоты; или

(iii) обладает химической структурой из по меньшей мере двух молекул красителя, содержащихся в одной молекуле, где по меньшей мере две молекулы красителя не проявляют флуоресценцию из-за экситонного эффекта, получаемого, когда они агрегированы параллельно друг с другом, но проявляют флуоресценцию, когда состояние агрегации разрушается, когда молекулы подвергаются интеркаляции в нуклеиновую кислоту или связыванию с бороздкой нуклеиновой кислоты.

В случае (ii) или (iii) является предпочтительным, чтобы молекула красителя представляла собой молекулу, описанную в (i).

Синтез меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты.

Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно получать на основании способов, описанных в патентных литературных источниках 1 и 2. Например, соединения, представленные формулами (1-1) - (1-10), можно также синтезировать на основании способов, описанных в патентных литературных источниках 1 и 2.

Например, следующие способы получения (способы синтеза) можно использовать для получения меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Т.е. в качестве способа простого мечения ДНК широко используют способ, в котором активная аминокислота, содержащаяся в ДНК, и активированная карбоксильная группа в средстве для мечения вступают в реакцию друг с другом в буферном растворе. Этот способ можно использовать в частности для введения линкера или красителя. Примеры способа введения аминокислоты включают в себя способ с использованием аминокислотомодификатора фосфорамидита, коммерчески доступного из GLEN RESEARCH.

Способ синтеза нуклеиновой кислоты, обладающей в качестве основного каркаса модифицированной ДНК, хорошо известен. Например, ее можно синтезировать так называемым фосфорамидитным способом. Фосфорамидитный реагент, чтобы служить в качестве исходного материала для него, также можно легко синтезировать известным способом. Когда нуклеиновая кислота по настоящему изобретению представляет собой ДНК, в частности короткую олиго-ДНК, ее можно легко синтезировать, например, с помощью автоматизированного синтезатора ДНК или т.п. Кроме того, также возможно синтезировать длинноцепочечную нуклеиновую кислоту (ДНК) и т.д., например, посредством ПЦР. Как описано выше, положение, где ДНК и молекула красителя связаны друг с другом, не ограничено конкретными нуклеиновыми кислотами, и особенно предпочтительно, представляет собой, например, 5-положение тимидина. Известно, что трифосфорная кислота из производного нуклеотида с различными заместителями, исходящими из 5-положения тимидина, обладает относительно высокой эффективностью включения, осуществляемого ДНК-полимеразой. Соответственно, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению можно легко синтезировать, например, не только когда она представляет собой короткую олиго-ДНК, но также когда она представляет собой длинноцепочечную ДНК.

В частности, флуоресцентный праймер (меченая нуклеиновая кислота) по настоящему изобретению, который представляет собой одноцепочечную ДНК, например с тиазолом оранжевым, применяемую в настоящем документе, обладает следующими преимуществами, например: (1) его можно легко синтезировать, поскольку его можно получать просто посредством введения, в буферном растворе, красителя в ДНК, синтезированную с помощью автоматического синтезатора ДНК; и (2) также возможно получать длинноцепочечный флуоресцентный праймер посредством реакции красителя с длинноцепочечной ДНК, полученной ферментативно. Кроме того, его можно возбуждать светом, обладающим относительно длинной длиной волны, например приблизительно 500 нм.

Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению используют в качестве зонда для гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью или в качестве праймера для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени.

Настоящее изобретение относится к способу детекции нуклеиновой кислоты, включающему в себя измерение флуоресценции в условиях, когда меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению в качестве зонда является способной гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, для определения присутствия или отсутствия гибридизации нуклеиновой кислоты-мишени с зондом. Способ амплификации нуклеиновой кислоты, который можно использовать в способе детекции нуклеиновой кислоты-мишени, конкретно является следующим.

Этот способ амплификации нуклеиновой кислоты представляет собой способ амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты в образце нуклеиновой кислоты, включающий в себя стадии (A) и (B'):

(A) стадия получения образца нуклеиновой кислоты; и

(B') стадия, включающая в себя следующие стадии (B1') и (B2'):

(B1') стадия амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты в образце нуклеиновой кислоты с использованием праймера или набора праймеров, содержащего пару праймеров; и

(B2') стадия гибридизации одноцепочечной последовательности нуклеиновой кислоты, амплифицированной на стадии (B1'), с зондом, состоящим из меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Зонд, состоящий из меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, может содержать по меньшей мере одну из структур, представленную, например, формулами (16), (16b), (17) и (17b).

Праймер и набор праймеров в способе амплификации нуклеиновой кислоты не являются ограниченными конкретными праймерами и наборами праймеров, например, могут быть разработаны, при необходимости, в соответствии с подлежащей амплификации последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты, типом реакции амплификации нуклеиновой кислоты и т.п. Кроме того, тип способа амплификации нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению не является ограниченным конкретными способами, и его примеры включают в себя различные способы изотермической амплификации, такие как способ SМАР и способ LAMP, и способ ПЦР. Амплификацию нуклеиновой кислоты можно проводить

таким же образом, как в способе амплификации нуклеиновой кислоты.

Последовательность оснований меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, используемой в качестве зонда, можно разрабатывать, при необходимости, в соответствии с последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты, и ее разрабатывают таким образом, что зонд гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью в строгих условиях. "Строгие условия" можно определять, например, в зависимости от температуры плавления T_m (°C) двойной цепи, сформированной зондом по настоящему изобретению и комплементарной ему цепью, и концентрации солей раствора для гибридизации. Конкретные примеры можно найти в такой ссылке, как J. Sambrook, E.F. Frisch, T. Maniatis; *Molecular Cloning 2nd edition*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989). (Полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки).

В способе амплификации нуклеиновой кислоты меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению используют в качестве зонда. Таким образом, например, присутствие или отсутствие амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты можно определять, например, только посредством детекции интенсивности флуоресценции раствора для реакции амплификации нуклеиновой кислоты. Это происходит, например, по следующим причинам. Когда зонд гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты, формируется двухцепочечная нуклеиновая кислота. Каркас из нуклеиновых оснований (красителя) меченого праймера, таким образом, интеркалирует в двухцепочечную нуклеиновую кислоту или связывается с бороздкой двухцепочечной нуклеиновой кислоты. В это время, например, указанный выше экситонный эффект каркаса из нуклеиновых оснований (красителя) не проявляется, и таким образом, каркас из нуклеиновых оснований образует флуоресценцию. С другой стороны, когда зонд не гибридизуется с комплементарной последовательностью нуклеиновой кислоты, экситонный эффект проявляется, и каркас из нуклеиновых оснований, таким образом, не образует флуоресценции. Таким образом, например, когда зонд не гибридизуется с продуктом амплификации, полученным посредством реакции амплификации нуклеиновой кислоты, или амплификация не происходит, не обнаруживают каркаса из нуклеиновых оснований, образующего излучение флуоресценции, или его количество не увеличивается. Соответственно, детекцию увеличенной интенсивности флуоресценции определяют как амплификацию последовательности-мишени нуклеиновой кислоты, и детекцию не увеличенной интенсивности флуоресценции определяют как отсутствие амплификации последовательности-мишени нуклеиновой кислоты. Конкретно, меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению обеспечивает преимущества в том, что чувствительность детекции является высокой по сравнению с общепринятым меченым зондом, обладающим экситонным эффектом, из-за низкого флуоресцентного фона на время отсутствия гибридизации.

Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту, используемую в качестве зонда, можно, например, добавлять в реакционный раствор до или после реакции амплификации нуклеиновой кислоты на стадии (B1'). В первом случае интенсивность флуоресценции можно детектировать непрерывно или периодически параллельно с реакцией амплификации нуклеиновой кислоты на стадии (B1') или после завершения стадии (B1'). Когда детекцию проводят после завершения стадии (B1'), предпочтительно также проводить детекцию до начала реакции на стадии (B1') в качестве фона. С другой стороны, когда стадии (B1') и (B2') проводят индивидуально, предпочтительно, например, добавлять меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту в качестве зонда в реакционный раствор, например, после завершения реакции амплификации нуклеиновой кислоты на стадию (B1'). В этом случае интенсивность флуоресценции детектируют, например, на стадии (B1'). В это время предпочтительно детектировать также интенсивность флуоресценции после стадии (B1') и до или немедленно после добавления меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты в качестве зонда, например, в качестве фона. Конкретный пример детекции является таким, как указано выше.

(1) Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в качестве зонда можно использовать в гомогенном анализе (в 96-луночном микропланшете или в капиллярах) в жидкой фазе.

(2) Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в качестве зонда можно использовать в качестве зонда в ПЦР и можно применять для детекции (в ПЦР с детекцией в реальном времени) кривой амплификации, полученной в ходе реакции амплификации ДНК, или в недорогом способе в качестве замены зонда TaqMan. Ее также можно использовать в качестве метки для праймера или зонда с внутренней меткой.

(3) Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в качестве зонда также можно использовать в качестве связывающего зонда или меченого зонда в чипе ДНК.

Способ по настоящему изобретению представляет собой высокопроизводительную, свободную от реагентов систему и не требует процесса мечения и процесса отмывки. Можно в большой степени избежать производственных ошибок. Одновременный множественный (высокопроизводительный) анализ можно проводить на стекле или на материале твердофазной подложки в качестве замены стекла (пластичные основания, например из золота, ИТО или меди, и такого материала, как алмаз и пластик, к которым можно присоединять множество образцов).

(4) Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению в качестве зонда

может быть иммобилизована на бусинах, волокнах или гидрогеле. Гены можно детектировать в полужидком или полутвердом окружении. Зонд можно использовать в условиях, подобных измерению в жидкости, а также можно использовать, как если бы он представлял собой твердое вещество.

(5) Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в качестве зонда можно использовать в качестве зонда для блоттинга (Саузерн-блоттинга, Нозерн-блоттинга, дот-блоттинга). Только намеченный фрагмент гена можно заставлять излучать флуоресценцию, и таким образом, можно детектировать. В соответствии со способом по настоящему изобретению отмывка после стадии гибридизации не требуется.

(6) Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в качестве зонда можно использовать в качестве зонда для детекции/отслеживания внутриклеточной нуклеиновой кислоты. Соответственно, можно проводить пространственно-временной анализ внутриклеточной ДНК/РНК. Можно использовать флуоресцентный микроскоп или сортировщик клеток. Зонд можно применять для мечения ДНК, транскрипции в РНК/отслеживания сплайсинга, функционального анализа РНК и т.п. Способ по настоящему изобретению не требует отмывки, и таким образом является подходящим для отслеживания функций живых клеток.

(7) Меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению в качестве зонда можно использовать в качестве зонда для флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Способом по настоящему изобретению можно окрашивать ткани. Способ по настоящему изобретению не требует отмывки, и производственные ошибки, таким образом, невелики. Т.е. меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по настоящему изобретению в качестве зонда функционирует как флуоресцентный краситель, который не излучает флуоресценцию в то время, когда он не узнает биомолекулу-мишень. Таким образом, с использованием зонда можно разрабатывать визуализацию биологических объектов, в которой не требуется сложная стадия отмывки. Это приводит к наблюдению флуоресценции в реальном времени с высокой надежностью и небольшими усилиями.

(8) В меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению в качестве зонда можно использовать хромофоры с множеством длин волны. Таким образом, в то время когда детекцию/отслеживание проводят на уровне одной молекулы, можно легко разрабатывать дизайн, в большой степени исключающий фоновый свет и рассеянный свет излучения возбуждения. Например, во время наблюдения биомолекул на уровне одной молекулы фоновый свет и рассеянный свет излучения возбуждения, вызванный утечкой излучения возбуждения, создают помехи. Таким образом, необходимы различные способы для избегания этого. Изобретение является особенно пригодным в этом случае.

Интенсивность флуоресценции меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве зонда можно, например, изменять посредством контроля экситонного взаимодействия в связанной части красителя. По настоящему изобретению достаточно высокую эффективность тушения для функционирования зонда по принципу включено-выключено можно получать специфически посредством способа с использованием экситонного взаимодействия. Такой дизайн флуоресцентного нуклеотида, работающего по принципу включено-выключено, является действительно важным, например, для разработки анализа визуализации биологических объектов, не требующего отмывки. Фотофизические свойства, проявляемые зондом с использованием экситонного эффекта, являются действительно характерными, а также благоприятными для дизайна нового флуоресцентного ДНК-зонда для секвенирования ДНК (определения последовательности), генотипирования (анализа генотипа), мониторингирования конформационного перехода ДНК и наблюдения экспрессии гена.

Когда меченую одноцепочечную нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению используют в качестве зонда, возникновение таких феноменов, как амплификация/распад/связывание белка, для последовательности можно немедленно детектировать, и уровень феноменов можно количественно определять посредством количественного определения, например, последовательности-мишени нуклеиновой кислоты. Эту детекцию и количественное определение можно проводить следующим образом, и это, однако, является просто примером и не ограничивает настоящее изобретение. Т.е. сначала зонд (нуклеиновая кислота) по настоящему изобретению гибридизуется с последовательностью-мишенью нуклеиновой кислоты с постоянным соотношением количества вещества, таким образом, формируя двойную цепь. Количество вещества сформированной двойной цепи является прямо пропорциональным количеству вещества последовательности-мишени нуклеиновой кислоты. Таким образом, посредством измерения интенсивности флуоресценции двойной цепи можно детектировать последовательность-мишень нуклеиновой кислоты, и количество вещества последовательности-мишени нуклеиновой кислоты можно количественно определять. В этом случае в меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоте по настоящему изобретению фоновая флуоресценция дополнительно супрессирована. Таким образом, для измерения интенсивности флуоресценции двойной цепи не создается помех, и достигают более точного измерения.

Настоящее изобретение относится к способу амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, включая амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени с использованием меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве праймера. В качестве способа амплификации нуклеиновой кислоты-мишени с использованием меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению в качестве праймера, различные общеизвестные способы амплификации нуклеи-

новой кислоты можно привести в качестве примеров, и реакционная система абсолютно не является ограниченной. Примеры способов амплификации нуклеиновой кислоты включают в себя способ изотермической амплификации и способ полимеразной цепной реакции (ПЦР). Способ изотермической амплификации, как правило, представляет собой способ, в котором реакцию амплификации нуклеиновой кислоты проводят изотермически. Примеры такого способа включают в себя амплификацию с замещением цепей (SDA), способ, описанный в JP H07-114718 A (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки); улучшенный способ SDA, описанный в патенте США No. 5824517 (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки), WO 99/09211 (полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки) или WO 95/25180 (полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки); способ амплификации на основании последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA), описанный в патенте Японии No. 2650159 (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки.); способ изотермической амплификации с формированием петель (LAMP), описанный в WO 00/28082 (полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки); способ изотермической и иницируемой химерным праймером амплификации нуклеиновых кислот (ICAN), описанный в WO 02/16639 (полное описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки); способ самоподдерживаемой репликации последовательности (3SR); способ опосредованной транскрипцией амплификации (TMA); способ с Q-бета-репликазой, описанный в патенте Японии No. 2710159 (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки); и способы, описанные в патенте Японии No. 389726 (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки), патенте Японии No. 3942627 (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки) и NATURE METHODS (Vol. 4, No. 3, March 2007, pp. 257-262) (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки), Mitani Y., et al., 2007., Nat. Methods 4(3): 257-262 (полное описание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки) (далее в настоящем документе обозначаемые как способ SmartAmp (способ интеллектуальной амплификации)), способ Invader и способ амплификации по типу катящегося кольца (RCA).

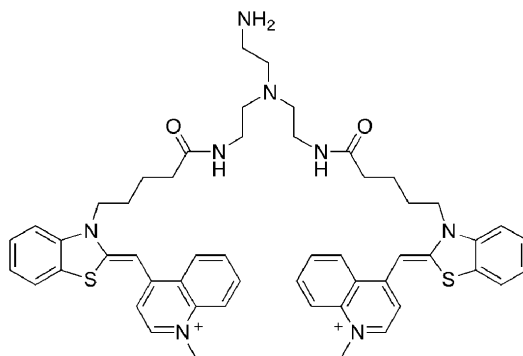
Примеры

Изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на примеры. Изобретение, однако, не является ограниченным следующими примерами.

Пример 1.

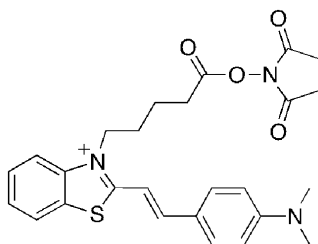
Олигоцепи ДНК, в каждую из которых тиазол оранжевый (ТО) и тиазол розовый (ТР) вводили в качестве каркаса, синтезировали посредством амидитного способа, описанного в патентном литературном источнике 2 (например, см. пример 2). ТО вводили посредством введения NHS-карбокси-dT в намеченное положение и сразу после этого вынуждения ТО2-диамида вступать с ним в реакцию, а затем синтеза последовательности после этого положения общепринятым способом. Отщепление от CPG и снятие защиты проводили в 28% водном растворе аммиака при 55°C в течение 4 ч. Очистку проводили посредством системы для ВЭЖХ, оборудованной обращеннофазовой колонкой (RP-18).

ТО2-диамид



Затем, нуклеиновую кислоту, полученную после очистки, и ТР-сложный эфир вынуждали вступать в реакцию друг с другом в буфере бикарбоната натрия способом, описанным в патентном литературном источнике 1 (например, пример 6 (см. синтез соединения, в которое введены две структуры, полученные из тиазола оранжевого, в одной молекуле)), и очистку проводили посредством системы для ВЭЖХ, оборудованной обращеннофазовой колонкой (RP-18). Таким образом, получали намеченный продукт.

ТР-сложный эфир



Олигоцепи ДНК, в каждую из которых вводили тиазол оранжевый (ТО) и тиазол розовый (ТР) (SEQ ID NO: 1 (последовательности оснований являются общими для пяти цепей), полученные этим способом, являются следующими.

20-членник.EX16-12TOTP: 5'-TGTGZATCtTTCTCTTTCTC-3';

20-членник.EX8-12TOTP: 5'-TGTGTATCtTTCZCTTTCTC-3';

20-членник.EX10-12TOTP: 5'-TGTGTATCtTZCTCTTTCTC-3';

20-членник.EX14-12TOTP: 5'-TGTGTAZCtTTCTCTTTCTC-3';

20-членник.EX18-12TOTP: 5'-TGZGTATCtTTCTCTTTCTC-3.

(Z представляет собой Т, меченый ТО, и t представляет собой Т, меченый ТР.)

Пример 2.

Эксперимент сравнения спектров между флуоресцентным зондом нуклеиновой кислоты, в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, и общепринятым флуоресцентным зондом, обладающим экситонным эффектом.

Зонды возбуждали при длине волны возбуждения (490 нм) тиазола оранжевого для проведения измерения спектров. Измерение спектров проводили с использованием устройства для измерения флуоресценции (RF5300), изготовленного Shimadzu Corporation. Измерение проводили в концентрациях каждого флуоресцентного зонда и комплементарной цепи (SEQ ID NO: 2) 1 мкМ и температуре 23°C. Результаты показаны на фиг. 1А-1С. Фиг. 1А представляет собой спектр, полученный в случае использования флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом. Фиг. 1В и 1С представляют собой спектры для общепринятого флуоресцентного зонда, обладающего экситонным эффектом. В случае двух флуоресцентных красителей, обладающих экситонным эффектом, можно наблюдать флуоресценцию при длине волны (601 нм) тиазола розового, вызванную эффектом FRET. В это время соотношение (соотношение S/N) между интенсивностью сигнала в одноцепочечном состоянии (фоновой) и интенсивностью сигнала в двухцепочечном состоянии (при измерении) составляло 4,6. В случае введения двух флуоресцентных красителей, обладающих экситонным эффектом, соотношение S/N при длине волны для объекта, подлежащего измерению, составляло 4,6, что в два или более раз улучшено по сравнению со случаем одного флуоресцентного красителя (фиг. 1В: S/N=2,1, фиг. 1С: S/N=1,8).

Это показывает, что в одноцепочечном состоянии энергия флуоресценции тиазола оранжевого (533 нм) инактивирована до определенной степени посредством экситонного эффекта. Однако, когда тиазол розовый присутствует около тиазола оранжевого, происходит получение энергии посредством эффекта FRET, и одновременно, инактивация энергии посредством экситонного эффекта.

Пример 3.

Анализ кривой плавления флуоресцентного зонда нуклеиновой кислоты, в который введены два флуоресцентных красителя, обладающие экситонным эффектом, проводили с использованием устройства для ПЦР с детекцией в реальном времени (CFX96), изготовленном BioRad. Измерение кривой плавления проводили при концентрации каждого из флуоресцентного зонда и комплементарной цепи 1 мкМ, и объеме 25 мкл. Измерение проводили при увеличении температуры от 4 до 95°C по 0,5°C. Результаты показаны на фиг. 2А-2Е. Результаты, показанные на фиг. 2А-2Е, представляют собой сравнение флуоресценции тиазола оранжевого (длина волны возбуждения: 495 нм). Когда расстояние между тиазолом оранжевым и тиазолом розовым являлось подходящим, флуоресценция тиазола оранжевого была значительно уменьшена посредством эффекта FRET.

Из результатов на фиг. 2А-2Е можно заключить, что эффект FRET наиболее проявляется в флуоресцентно меченной одноцепочечной нуклеиновой кислоте (ДНК), используемой в настоящем примере, когда расстояние между двумя флуоресцентными красителями, обладающими экситонным эффектом, составляет приблизительно 3 основания, исключая флуоресцентные красители. Обнаружено, что, когда расстояние является слишком коротким (одно основание, исключая флуоресцентные красители) или слишком длинным (пять оснований, исключая флуоресцентные красители), эффект FRET становится низким. Последовательности оснований флуоресцентных зондов нуклеиновой кислоты, использованных для получения результатов анализа кривой плавления, показанных на фиг. 2А-2Е, являются следующими.

Промышленная применимость

Изобретение является применимым в области использования флуоресцентно меченных зондов или праймеров.

Список последовательностей

SEQ ID NO: 1: последовательность оснований олигоцепи ДНК (20-членника), синтезированной в примере 1.

SEQ ID NO: 2: последовательность оснований комплементарной цепи для олигоцепи ДНК (20-членника), синтезированной в примере 1.

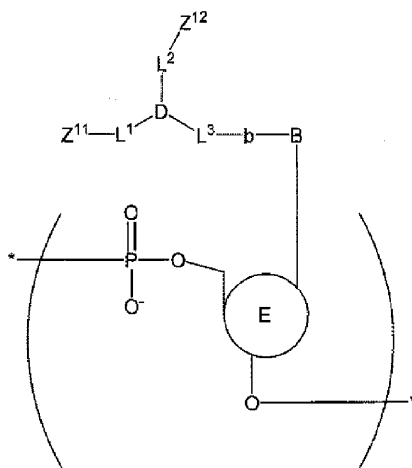
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота, содержащая по меньшей мере две пары флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, где

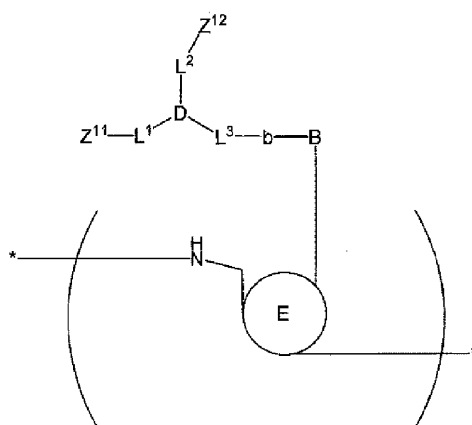
длина волны пика излучения одной из пар флуоресцентных атомных групп (далее в настоящем документе обозначаемой как пара флуоресцентных атомных групп А) короче, чем длина волны пика возбуждения другой пары флуоресцентных атомных групп (далее в настоящем документе обозначаемой как пара флуоресцентных атомных групп В),

расстояние между парами флуоресцентных атомных групп А и В составляет от 1 до 5 оснований, и пары флуоресцентных атомных групп А и В проявляют эффект резонансного ферстеровского переноса энергии (FRET),

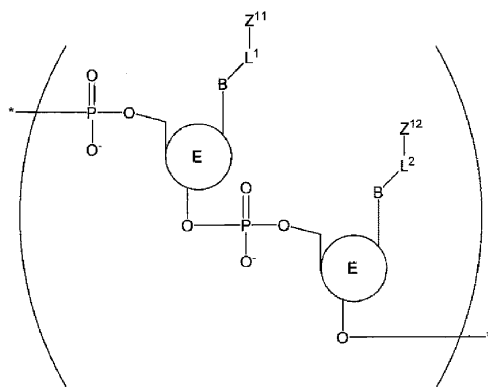
где основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, обладает структурой, представленной следующими формулами (16), (16b), (17) или (17b):



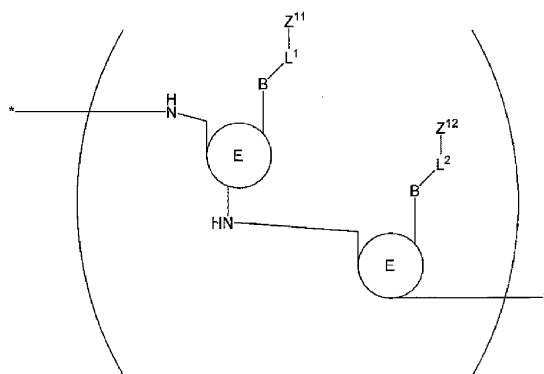
(16)



(16b)



(17)



(17b)

где в формулах (16), (16b), (17) и (17b) В представляет собой атомную группу, обладающую каркасом из природных нуклеиновых оснований (аденина, гуанина, цитозина, тимина или урацила) или каркасом из искусственных нуклеиновых оснований,

Е представляет собой:

(i) атомную группу, обладающую каркасом из дезоксирибозы или каркасом из рибозы; или

(ii) атомную группу, обладающую пептидной структурой или пептоидной структурой,

каждая из Z^{11} и Z^{12} представляет собой флуоресцентную атомную группу, проявляющую экситонный эффект, и они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

каждый из L^1 , L^2 и L^3 представляет собой линкер (связывающий атом или связывающую атомную группу), каждый обладает количеством атомов главной цепи в диапазоне от 2 до 100, каждый может содержать или не содержать каждый из C, N, O, S, P и Si в главной цепи, каждый может содержать или не содержать каждую из одинарной связи, двойной связи, тройной связи, амидной связи, сложноэфирной связи, дисульфидной связи, иминогруппы, эфирной связи, тиоэфирной связи и сложной тиоэфирной связи в главной цепи, и они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

D представляет собой CR, N, P, P=O, B или SiR, где R представляет собой атом водорода, и

b представляет собой одинарную связь, двойную связь или тройную связь, или альтернативно,

в формулах (16) и (16b) каждый из L^1 и L^2 представляет собой линкер, L^3 , D и b могут не присутствовать, и L^1 и L^2 могут являться связанными напрямую с В при условии, что

в формулах (16) и (17) Е представляет собой атомную группу, описанную в п.(i), и по меньшей мере один атом О в связи фосфорной кислоты может быть замещен на атом S;

в формулах (16b) и (17b) Е представляет собой атомную группу, описанную в п.(ii); и

в формулах (17) и (17b) соответствующие В могут являться идентичными или отличными друг от друга, и соответствующие Е могут являться идентичными или отличными друг от друга.

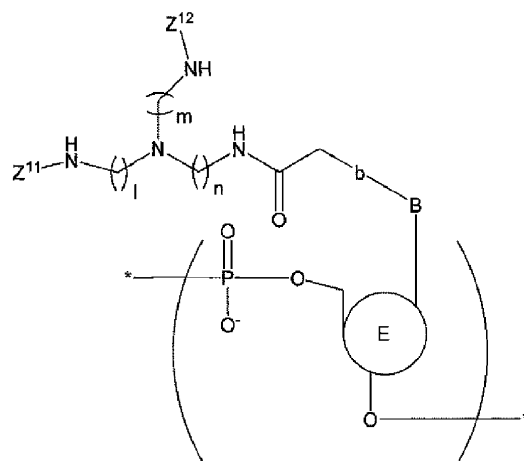
2. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по п. 1, где

структура, представленная формулой (16), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (16-1) или (16-2),

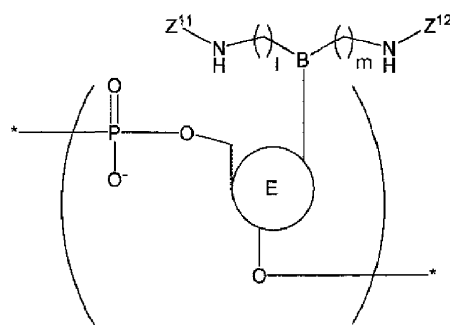
структура, представленная формулой (16b), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (16b-1) или (16b-2),

структура, представленная формулой (17), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (17-1), и

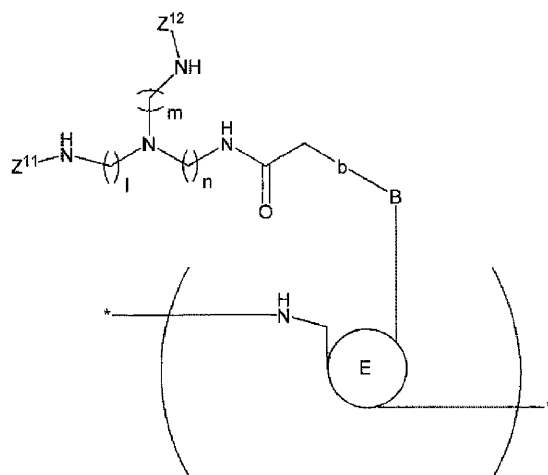
структура, представленная формулой (17b), представляет собой структуру, представленную следующей формулой (17b-1):



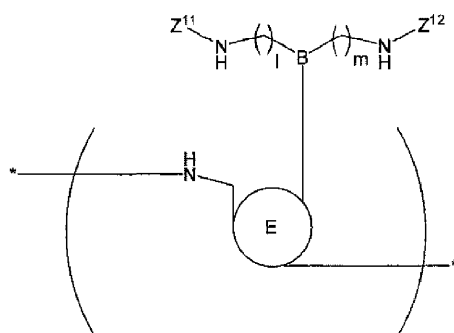
(16-1)



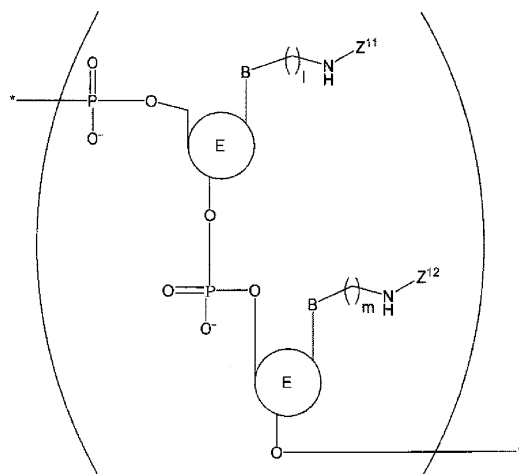
(16-2)



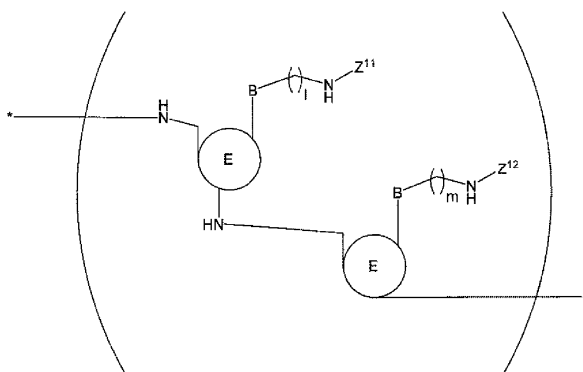
(16b-1)



(16b-2)



(17-1)



(17b-1)

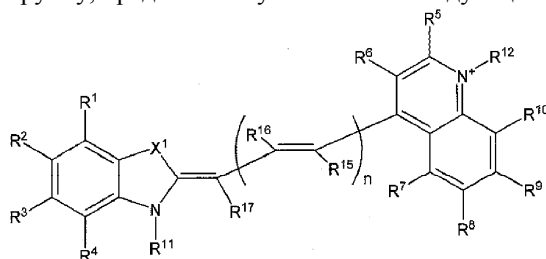
где в формулах (16-1), (16-2), (16b-1), (16b-2), (17-1) и (17b-1) l , m и n представляют собой любые положительные целые числа, они могут являться идентичными или отличными друг от друга, каждый из C, N, O, S, P и Si может содержаться или не содержаться в главной цепи каждой из формул и каждая из одинарной связи, двойной связи, тройной связи, амидной связи, сложноэфирной связи, дисульфидной связи, иминогруппы, эфирной связи, тиоэфирной связи и сложной тиоэфирной связи может содержаться или не содержаться в главной цепи каждой из формул,

B , E , Z^{11} , Z^{12} и b являются идентичными присутствующим в формулах (16), (16b), (17) и (17b), и

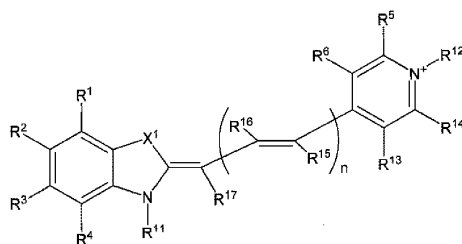
в формулах (16-1), (16-2) и (17-1) по меньшей мере один атом O в связи фосфорной кислоты может быть замещен на атом S.

3. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по п.2, где основание, обладающее парой флуоресцентных атомных групп, проявляющих экситонный эффект, обладает структурой, представленной формулой (16).

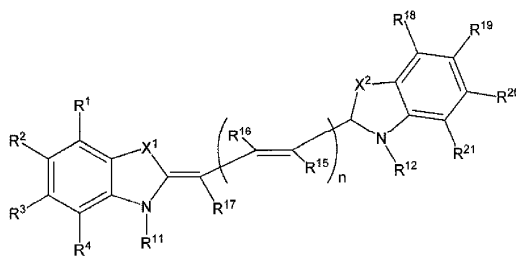
4. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по п.2 или 3, где каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную любой из следующих формул (7)-(10):



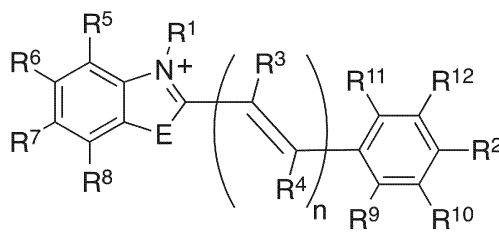
(7)



(8)



(9)



(10)

где в формулах (7)-(9) X^1 и X^2 представляют собой S или O,
 n представляет собой 0 или положительное целое число,
каждый из R^1 - R^{10} и R^{13} - R^{21} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу с углеродным числом от 1 до 6, низшую алкоксигруппу с углеродным числом от 1 до 6, нитрогруппу или аминогруппу,

один из R^{11} и R^{12} представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b), и другой представляет собой атом водорода или низшую алкильную группу с углеродным числом от 1 до 6,

когда множество R^{15} присутствуют в формуле (7), (8) или (9), они могут являться идентичными или отличными друг от друга,

когда множество R^{16} присутствуют в формуле (7), (8), или (9), они могут являться идентичными или отличными друг от друга, и

X^1 , X^2 , и R^1 - R^{21} в Z^{11} , и X^1 , X^2 , и R^1 - R^{21} в Z^{12} могут являться идентичными или отличными друг от друга, соответственно, и

когда в формуле (10) E представляет собой S или O,

каждый из R^2 - R^{12} независимо представляет собой атом водорода, атом галогена, низшую алкильную группу с углеродным числом от 1 до 6, низшую алкоксигруппу с углеродным числом от 1 до 6, нитрогруппу или аминогруппу,

R^1 представляет собой связывающую группу для связывания с L^1 или L^2 в формулах (16), (17), (16b) и (17b),

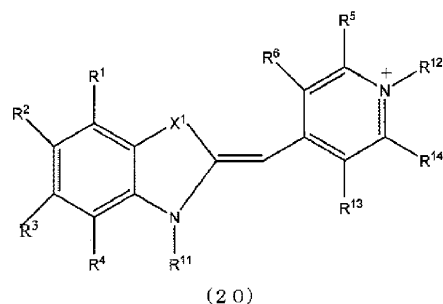
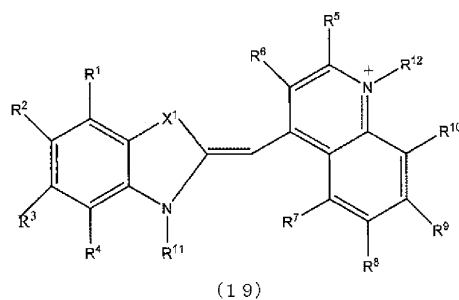
когда множество R^3 присутствуют в формуле (10), они могут являться идентичными или отличными друг от друга, и

когда множество R^4 присутствуют в формуле (10), они могут являться идентичными или отличными друг от друга.

5. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по п.4, где

каждая из Z^{11} и Z^{12} независимо представляет собой атомную группу, представленную формулой (7) или (8), и

каждая из Z^{11} и Z^{12} , представленных формулой (7) или (8), представляет собой группу, представленную следующей формулой (19) или (20):

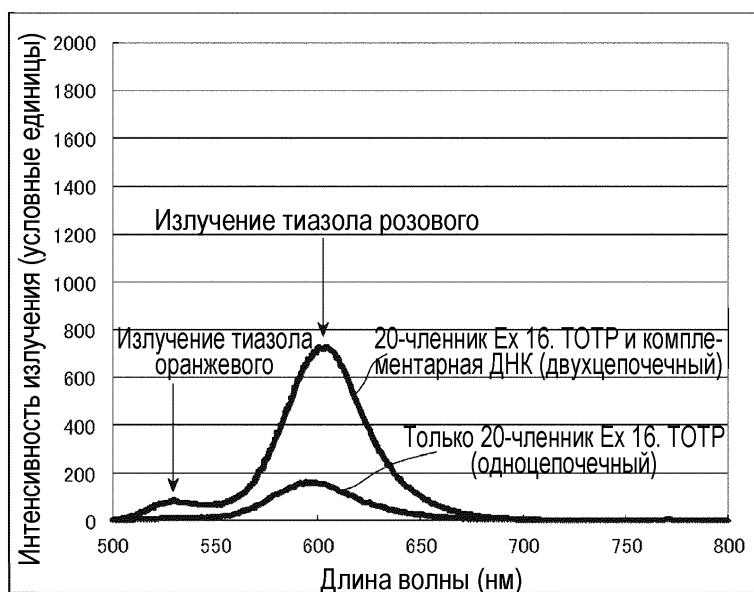


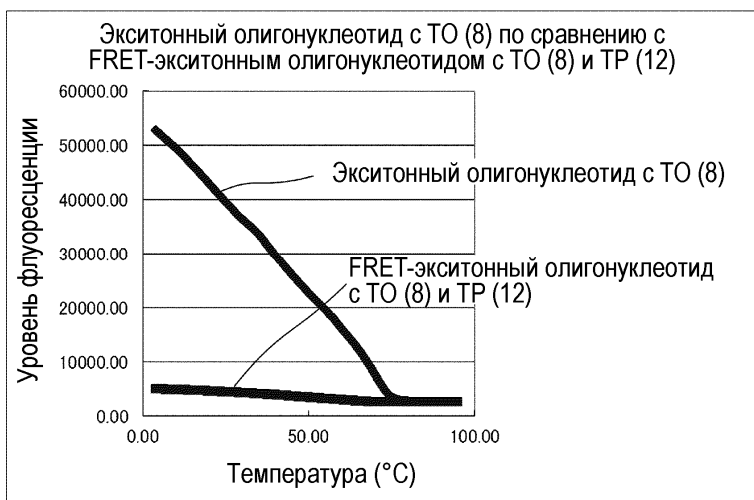
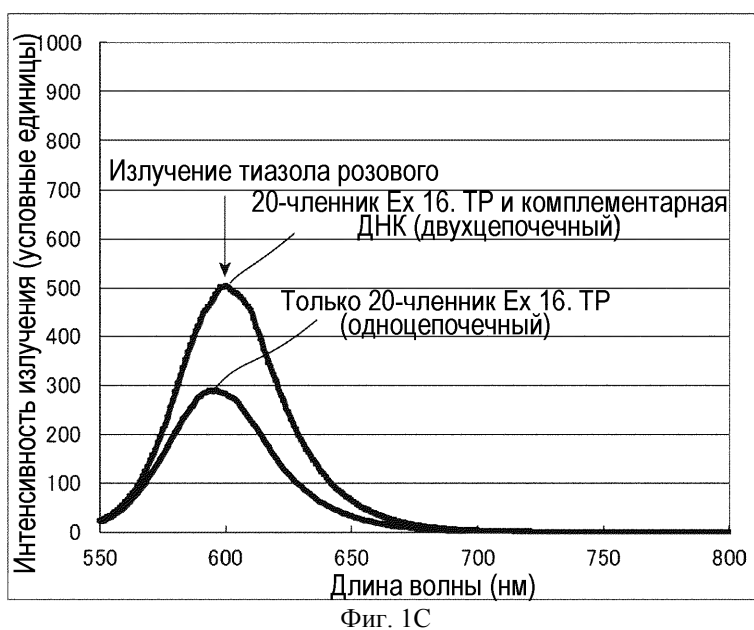
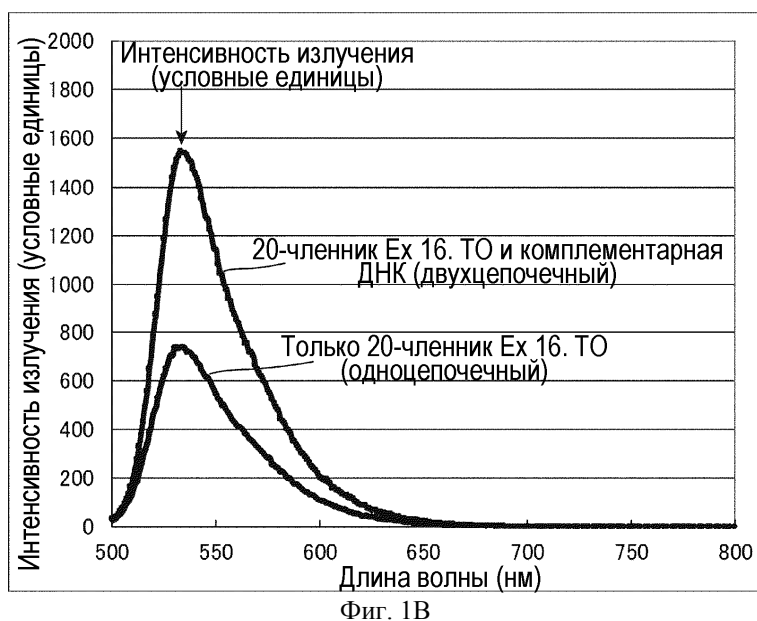
где в формулах (19) и (20) X^1 , R^1 - R^{10} , R^{13} и R^{14} , R^{11} и R^{12} являются идентичными присутствующим в формулах (7)-(9).

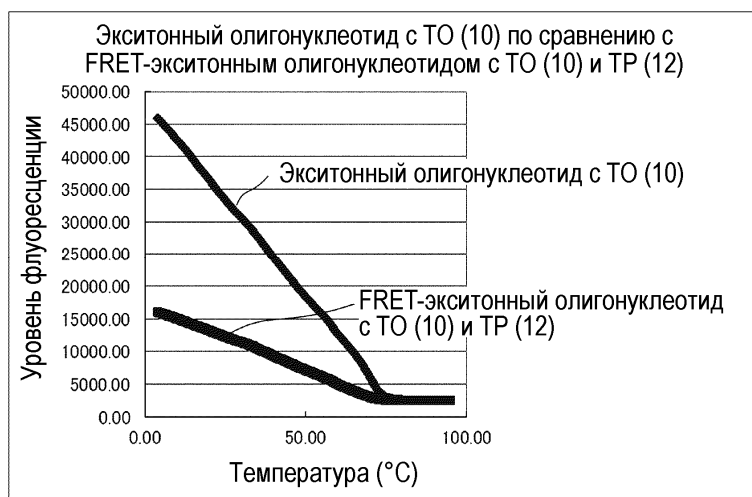
6. Меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по любому из пп.1-5, используемая в качестве праймера для амплификации нуклеиновой кислоты-мишени или зонда для гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью.

7. Способ детекции нуклеиновой кислоты-мишени, включающий в себя измерение флуоресценции в условиях, когда меченая одноцепочечная нуклеиновая кислота по любому из пп.1-5 в качестве зонда является способной гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, для определения присутствия или отсутствия гибридизации нуклеиновой кислоты-мишени с зондом.

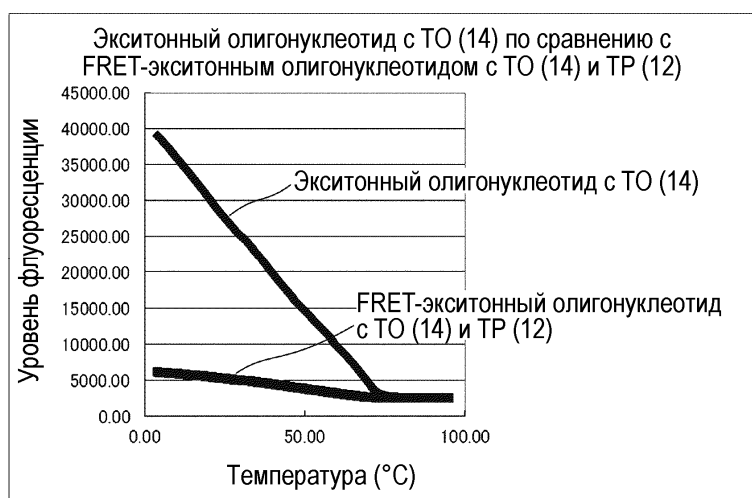
8. Способ амплификации нуклеиновой кислоты-мишени, включающий в себя амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени с использованием меченой одноцепочечной нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5 в качестве праймера.



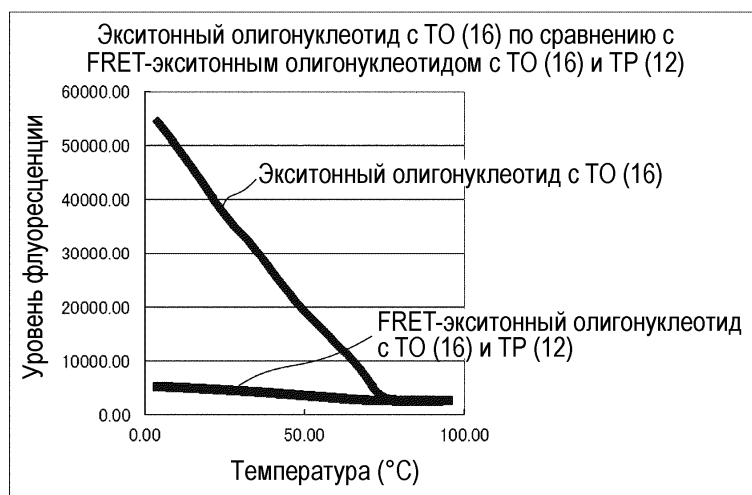




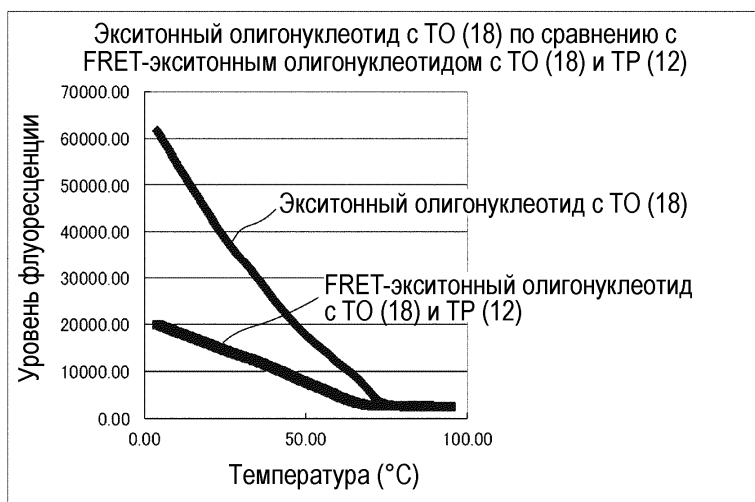
Фиг. 2В



Фиг. 2С



Фиг. 2D



Фиг. 2Е



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2