

【11】證書號數：I464402

【45】公告日：中華民國 103 (2014) 年 12 月 11 日

【51】Int. Cl. : G01N33/544 (2006.01)

發明

全 18 頁

【54】名稱：將核酸接上小分子的方法

METHOD FOR CONJUGATING NUCLEIC ACID AND SMALL MOLECULAR

【21】申請案號：100101162

【22】申請日：中華民國 100 (2011) 年 01 月 12 日

【11】公開編號：201229511

【43】公開日期：中華民國 101 (2012) 年 07 月 16 日

【72】發明人：王子斌 (TW) WANG, TZU PIN ; 邱奕璋 (TW) CIUO, YI JHANG

【71】申請人：高雄醫學大學

KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY

高雄市三民區十全一路 100 號

【74】代理人：蔡清福

【56】參考文獻：

GB 2168353A

WO 2010/015245A1

WO 2010/127666A1

審查人員：莊智惠

[57]申請專利範圍

1. 一種將一核酸接上一小分子的方法，包括下列步驟：(a)將 5' 端具有單一磷酸根的核酸與一 EDC 溶於一咪唑緩衝液中進行反應；(b)將步驟(a)中的溶液以酒精沉澱純化得到一 5'-phosphorimidazolide；以及(c)將該 5'-phosphorimidazolide 溶於含有伸乙二胺四乙酸的一 EPPS 緩衝液中，並加入一親核劑進行反應，其中該 EPPS 緩衝液為 pH 7.0-8.0。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該 5' 端具有單一磷酸根的核酸的濃度為 3.2-12.6 μ M；該 EDC 的濃度為 0.1-1.2M；該咪唑緩衝液的濃度為 0.1-1M；該(a)步驟的反應時間為 30-180 分鐘；該親核劑的濃度大於等於 187mM；當該核酸為核糖核酸時，該 EDC 緩衝液與 EPPS 緩衝液中更包含 8M 尿素，該親核劑包括 1,6-己二胺與 1,2-乙二胺；該核酸為雙股去氧核糖核酸或單股去氧核糖核酸；該親核劑為帶胺基之分子。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中該親核劑為帶有一個胺基之分子。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中該小分子包括生物素衍生物、螢光劑、顯影劑、蛋白質及胜肽，而該帶胺基之分子包括生物素衍生物、顯影劑、蛋白質及胜肽。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中該核酸保留鹼基配對特性。
6. 一種將一核酸接上一小分子的方法，包括下列步驟：(a)將 5' 端具有單一磷酸根的核酸與一 EDC 溶於一咪唑緩衝液中進行反應；以及(b)加入含有伸乙二胺四乙酸的一 EPPS 緩衝液，並加入一親核劑進行反應，其中該 EPPS 緩衝液為 pH 8.0-8.5。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之方法，其中該 5' 端具有單一磷酸根的核酸的濃度為 3.2-12.6 μ M；該活化劑的濃度為 0.1-1.2M；該咪唑緩衝液的濃度為 0.1-1M；該(a)步驟的反應時間為 20-180 分鐘；該親核劑的濃度大於等於 187mM；更包括下列步驟：(c)以酒精沈澱純化核酸-小分子產物；當該核酸為核糖核酸或雙股去氧核糖核酸，該咪唑緩衝液與 EPPS 緩衝液中更包含 8M 尿素；當該核酸為核糖核酸時，該親核劑包括 1,6-己二胺與 1,2-乙二胺；該核酸為單股去氧核糖核酸；該親核劑為帶胺基之分子。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該親核劑為帶有一個胺基之分子。

(2)

9. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該小分子包括生物素衍生物、螢光劑及顯影劑，而該帶胺基之分子包括生物素衍生物及顯影劑。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中該核酸保留鹼基配對特性。

圖式簡單說明

第 1 圖(A)~(F)為 ^{32}P 標定的 TW17 RNA 與 **11** 分別改變不同單階段 phosphoramidation 反應的反應條件(A)EDC 活化時間(B)RNA 濃度(C)**11** 濃度(D)EPPS 緩衝溶液 pH 值及與 **11** 的反應溫度(E)咪唑的濃度與 **11** 的反應溫度(F)EDC 濃度。實驗結果利用於 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析。

第 2 圖為 ^{32}P 標定的 TW17 RNA 與 **11** 改變不同 EPPS 緩衝溶液 pH 值進行兩階段 phosphoramidation 反應。實驗結果利用於 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析。

第 3 圖為 ^{32}P 標定的 TW17 RNA 與 **11** 的單階段 phosphoramidation 反應。實驗結果利用於 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析。圖中由左至右的 RNA 樣品，分別為(1)未經 phosphoramidation 反應的 TW17 RNA；(2)在沒有加入尿素的 phosphoramidation 反應時，所獲得的 TW17 RNA-**11** 鍵結產物；(3)在有加入尿素的 phosphoramidation 反應後，所獲得的 TW17 RNA-**11** 鍵結產物。

第 4 圖為利用單階段 phosphoramidation 反應形成 ^{32}P 標定的 TW17 DNA 與 **11** 的鍵結產物。實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析。圖中由左至右的樣品，分別為(1)未經 phosphoramidation 反應的 TW17 DNA、(2)在沒有加入尿素的 phosphoramidation 反應時，所獲得的 TW17 DNA-**11** 鍵結產物；(3)在有加入尿素的 phosphoramidation 反應後，所獲得的 TW17 DNA-**11** 鍵結產物。

第 5 圖為利用單階段 phosphoramidation 反應形成 ^{32}P 標定的 3' 引子 DNA 與 **11** 的鍵結產物。實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析。圖中由左至右的樣品，分別為(1)未經 phosphoramidation 反應的 3' 引子 DNA；(2)在沒有加入尿素的 phosphoramidation 反應時，所獲得的 3' 引子 DNA-**11** 鍵結產物；(3)在有加入尿素的 phosphoramidation 反應後，所獲得的 3' 引子 DNA-**11** 鍵結產物。

第 6 圖(A)~(C)為 ^{32}P 標定的 RNA 及 DNA 與 **11** 的兩階段 phosphoramidation 反應。第 6 圖(A)為 TW17 RNA 的反應產物，利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析後的結果。第 6 圖(B)為雙股 DNA(TW17 DNA)的反應產物，利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析後的結果。第 6 圖(C)為單股 DNA(3' 引子 DNA)的反應產物，利用 20% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 方法分析後的結果。每一張表中的由左至右的核酸樣品，分別為(1)未經 phosphoramidation 反應的核酸；(2)在沒有加入尿素的 phosphoramidation 反應時，所獲得的核酸-**11** 鍵結產物；(3)在有加入尿素的 phosphoramidation 反應後，所獲得的核酸-**11** 鍵結產物。

第 7 圖(A)~(D)為 ^{32}P 標定的核酸與 1,6-己二胺或 1,2-乙二胺的單階段 phosphoramidation 反應的實驗結果。第 7 圖(A)為 TW17 RNA 與 1,6-己二胺的反應產物，利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。第 7 圖(B)為 TW17 DNA 與 1,6-己二胺的反應產物，利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。第 7 圖(C)為 3' 引子 DNA 與 1,6-己二胺的反應產物，利用 20% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。第 7 圖(D)為 3' 引子 DNA 與 1,2-乙二胺的反應產物，利用 20% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。

第 8 圖(A)~(F)為利用 phosphoramidation 反應製備 ^{32}P 標定的核酸-牛血清白蛋白鍵結產物。第 8 圖(A)製備 TW17 RNA-牛血清白蛋白的實驗中不加 3M 氯化鈉，並且實驗結果利用

(3)

8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析；第 8 圖(B)製備 TW17 RNA-牛血清白蛋白的實驗中加入 3M 氯化鈉，並且實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析；第 8 圖(C)製備 TW17 DNA-牛血清白蛋白的實驗中不加 3M 氯化鈉，並且實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析；第 8 圖(D)製備 TW17 DNA-牛血清白蛋白的實驗中加入 3M 氯化鈉，並且實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析；第 8 圖(E)製備 3' 引子 DNA-牛血清白蛋白的實驗中不加 3M 氯化鈉，並且實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析；第 8 圖(F)製備 3' 引子 DNA-牛血清白蛋白的實驗中加入 3M 氯化鈉，並且實驗結果利用 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析。每一張圖中的樣品，由左至右分別為(1)反應前的 RNA；(2)聯結體為雙琥珀亞胺醯辛二酸，且核酸與牛血清白蛋白反應 2 小時的產物；(3)聯結體為雙琥珀亞胺醯戊二酸酯，且核酸與牛血清白蛋白反應 2 小時的產物；(4)聯結體為雙琥珀亞胺醯辛二酸，且核酸與牛血清白蛋白反應 16 小時的產物；(5)聯結體為雙琥珀亞胺醯辛二酸，且核酸與牛血清白蛋白反應 16 小時的產物。

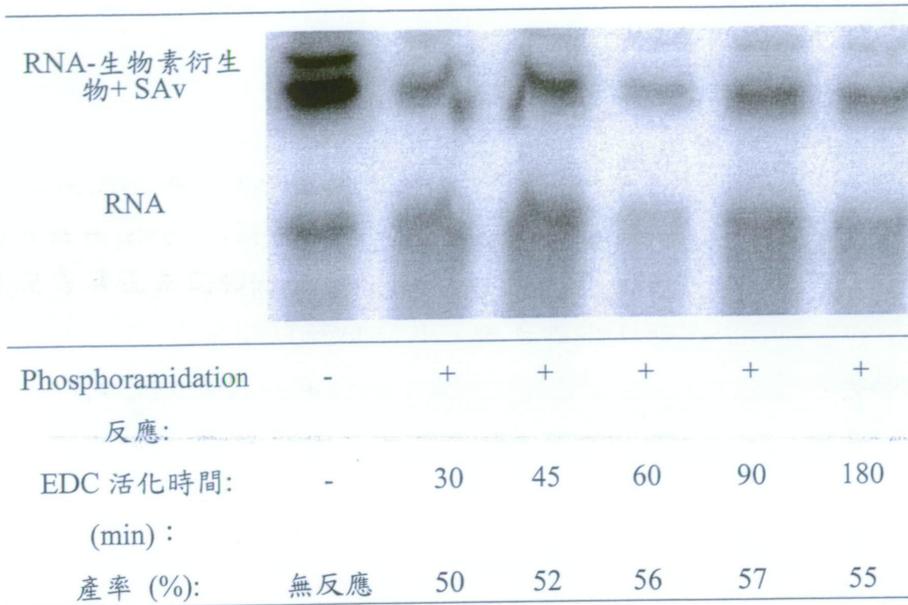
第 9 圖為經過 phosphoramidation 反應修飾後的 3' 引子 DNA 產物，利用於 PCR 反應的結果。第 9 圖(A)為 ^{32}P 標定的 3' 引子 DNA-11 鍵結產物，在經過 PCR 反應的反應產物，最後利用雙相尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳(上層 6%，下層 20%)分析所得的結果。第 9 圖(B)為 3' 引子 DNA-1,6-己二胺-異硫氰酸螢光素鍵結產物，在經過 PCR 反應的反應產物，最後利用雙相尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳(上層 6%，下層 20%)分析所得的結果。第 9 圖(A)及第 9 圖(B)中的樣品，由左至右分別為(1)PCR 反應前的 3' 引子 DNA，及(2)PCR 反應後的產物。

第 10 圖(A)~(C)為 ^{32}P 標定的 RNA 及 DNA 與 18 的兩階段 phosphoramidation 反應的實驗結果。第 10 圖(A)為 TW17 RNA 的反應產物，利用高解析的 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。第 10 圖(B)為 TW17 DNA 的反應產物，利用高解析的 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。第 10 圖(C)為 3' 引子 DNA 的反應產物，利用高解析的 20% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳分析後的結果。

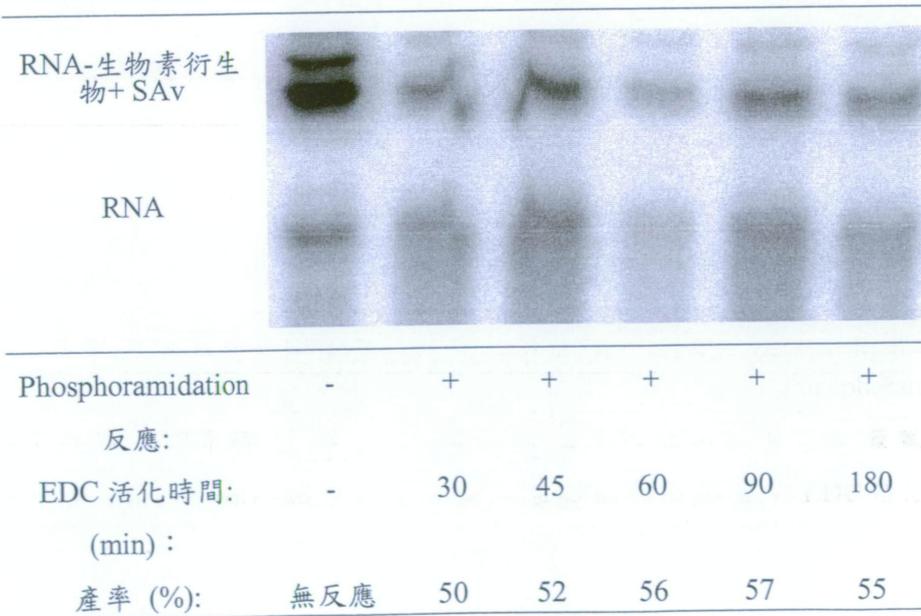
第 11 圖為代表性 phosphoramidation 反應的產率。a 沒有加入尿素；b 加入尿素；c 進行 3 小時的 phosphoramidation 反應；d 進行 16 小時的 phosphoramidation 反應；e 由 EDC 活化 15 分鐘再和 1,6-己二胺反應 10 分鐘；f 用雙琥珀亞胺醯辛二酸作為聯結體；g 在沒有加入 3M 氯化鈉的條件下與牛血清白蛋白反應 2 小時；h 在沒有加入 3M 氯化鈉的條件下與牛血清白蛋白反應 16 小時；i 在加入 3M 氯化鈉的條件下與牛血清白蛋白反應 2 小時；j 在加入 3M 氯化鈉的條件下與牛血清白蛋白反應 16 小時；k 用雙琥珀亞胺醯戊二酸酯作為聯結體。

第 12 圖(A)~(D)為介面活性劑的種類及濃度，對兩階段 phosphoramidation 反應產率之影響。TW17 RNA 與 11，分別是在加入(A)15%(B)20%(C)25%(D)32%的介面活性劑的濃度條件下，進行兩階段 phosphoramidation 反應，並且反應之產物，皆利用於 8% 尿素聚丙烯醯胺凝膠電泳的 SAv gel shift 分析。

(4)

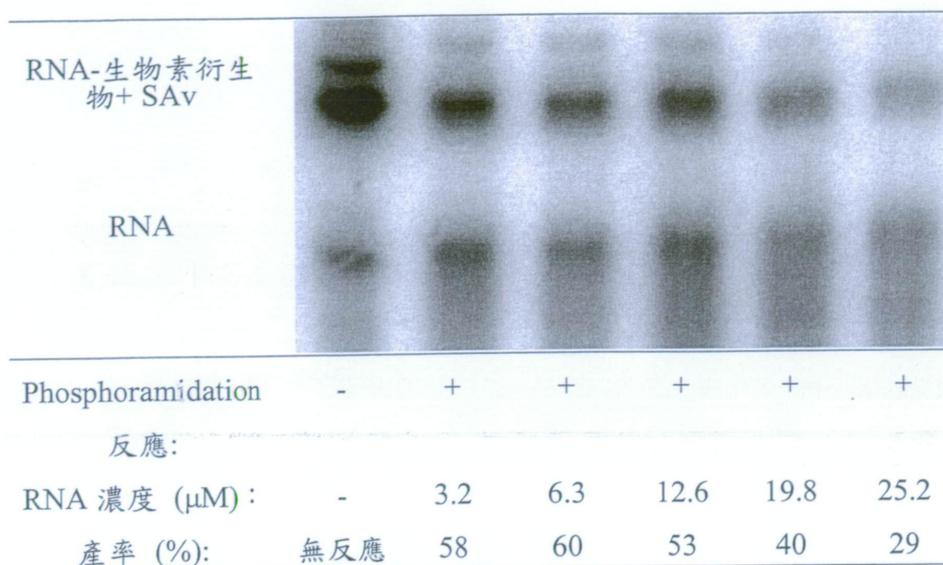


第 1 圖(A)

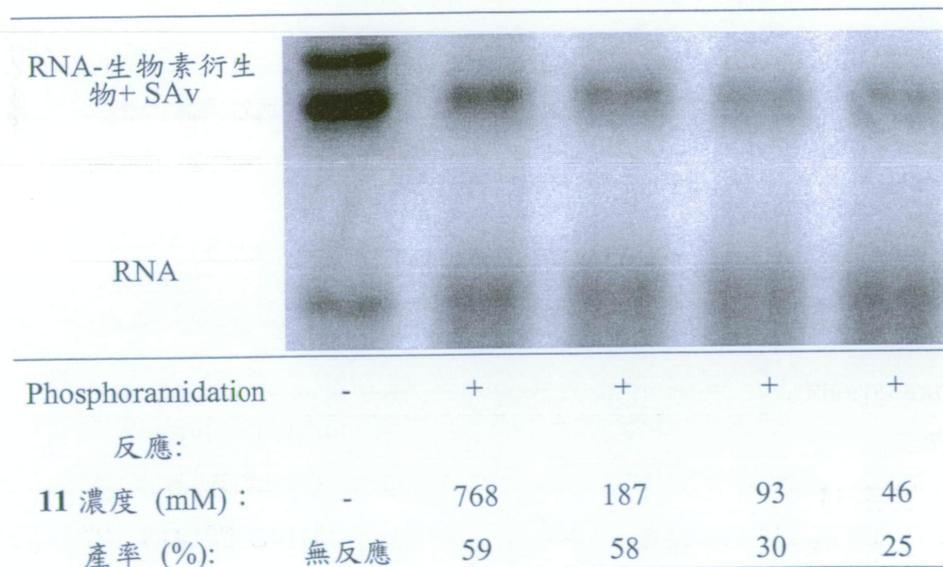


第 1 圖(B)

(5)

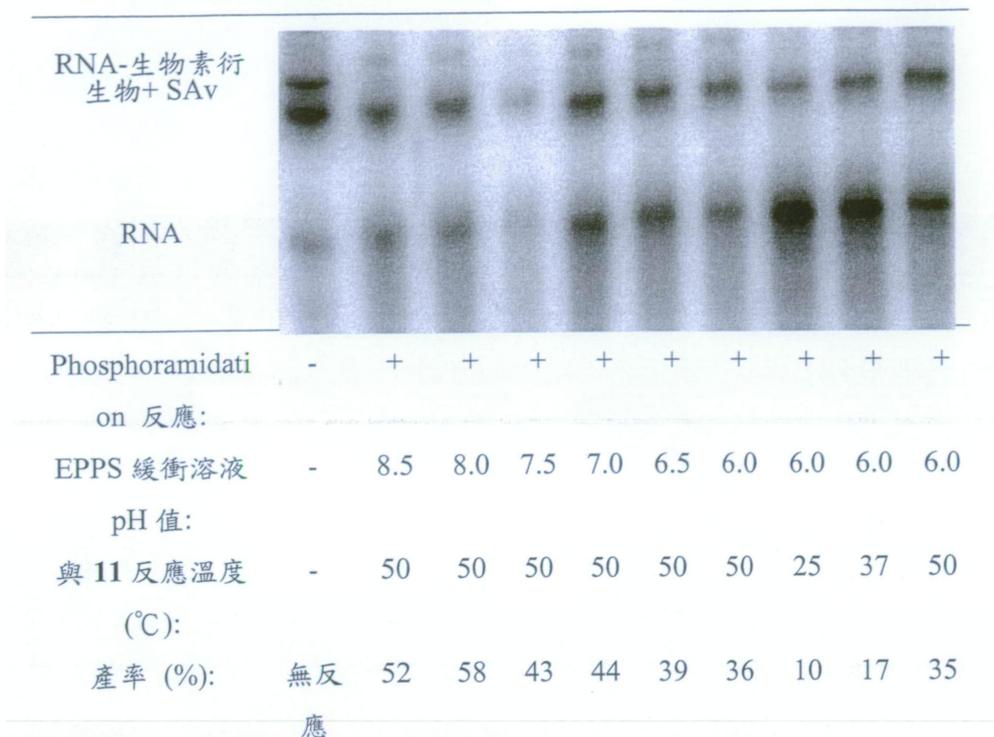


第 1 圖(C)

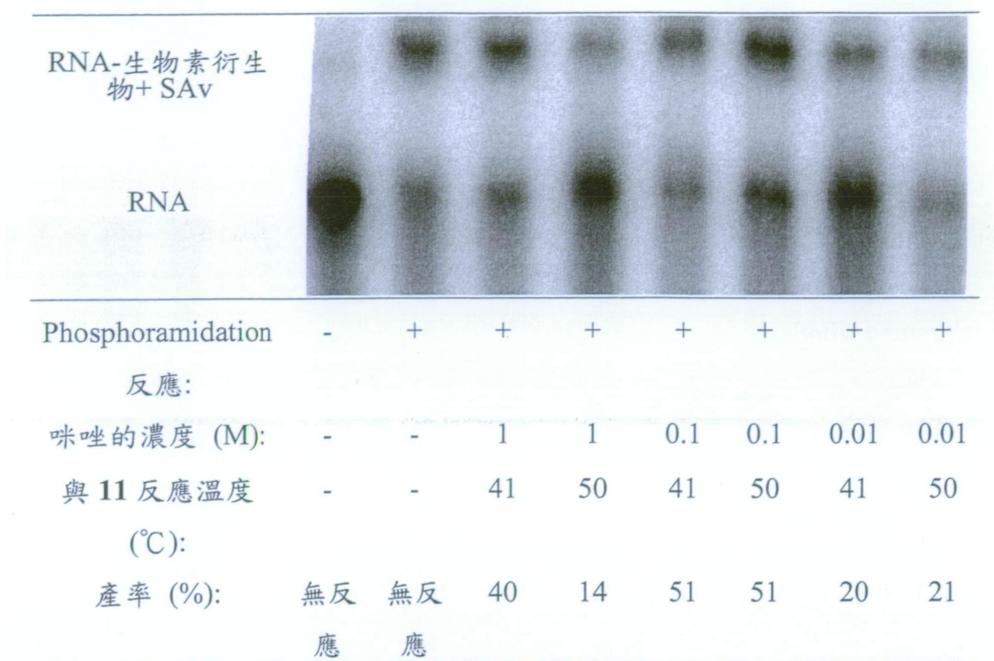


第 1 圖(D)

(6)

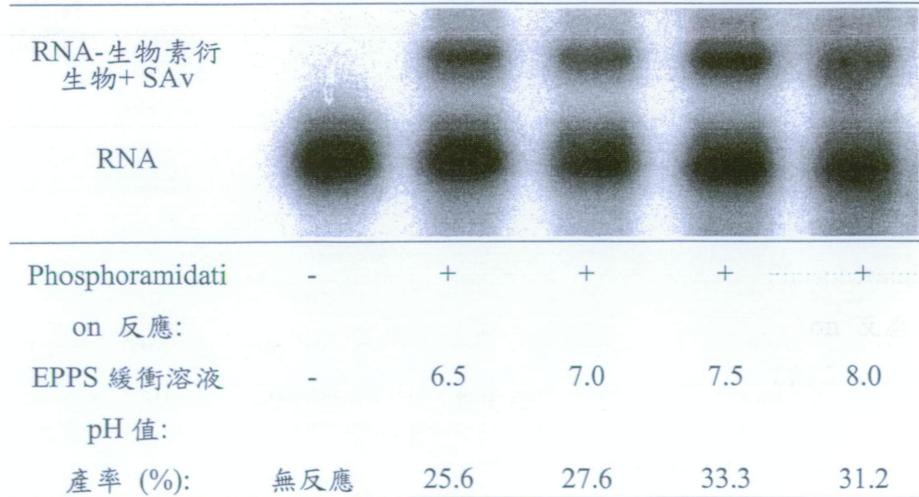


第 1 圖(E)

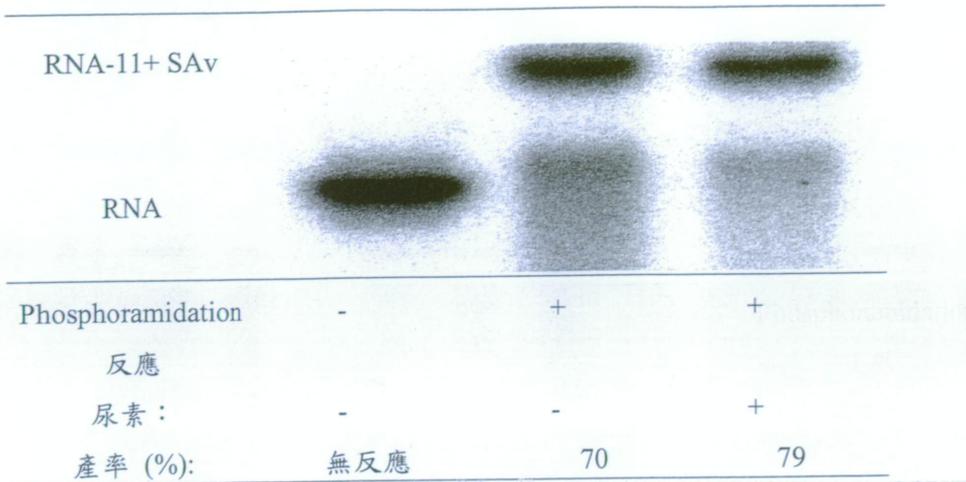


第 1 圖(F)

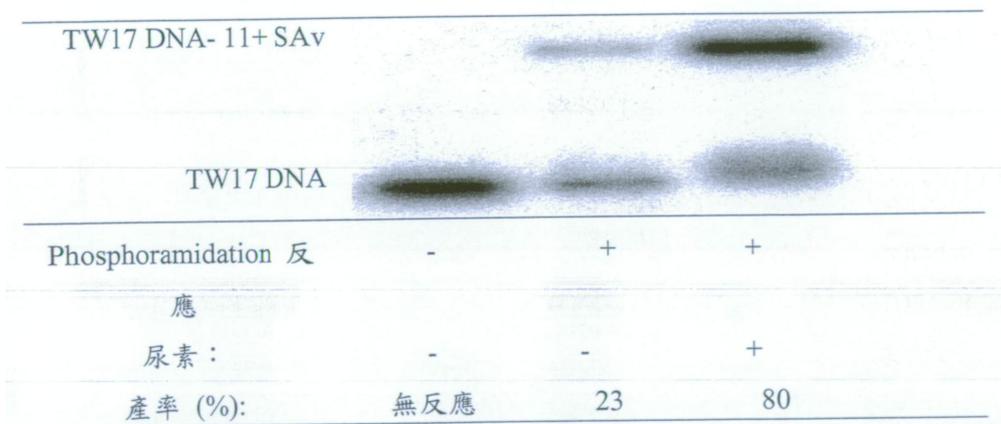
(7)



第 2 圖

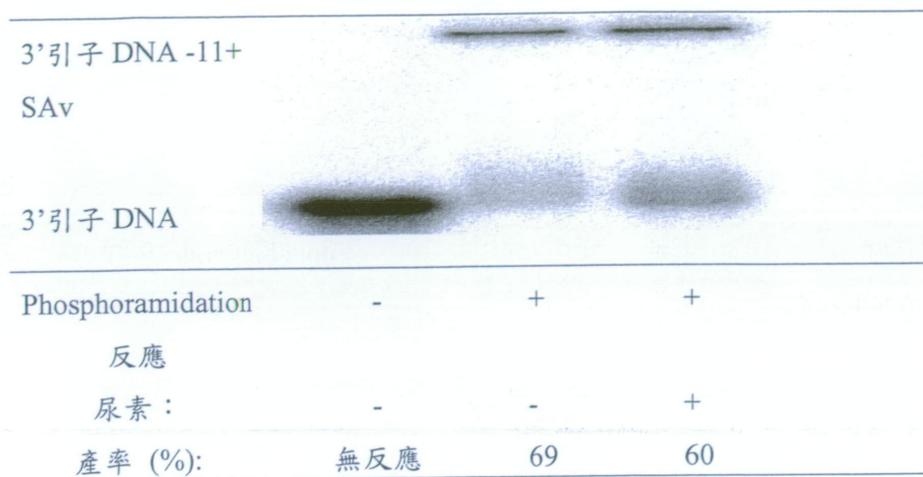


第 3 圖

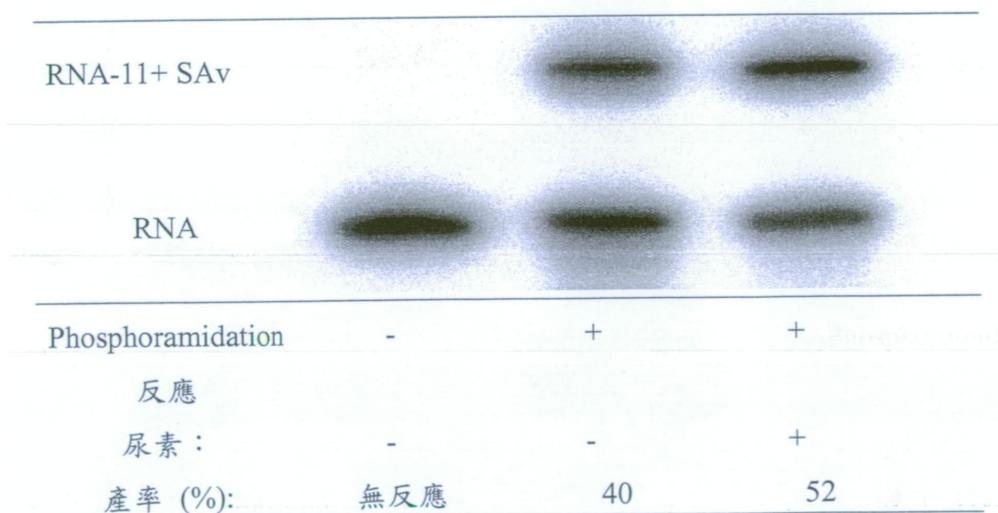


第 4 圖

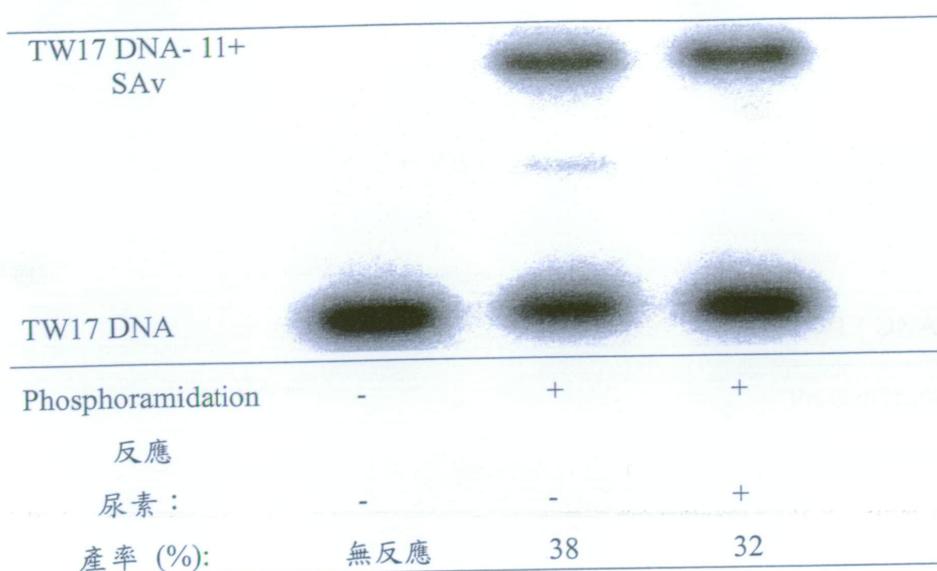
(8)



第 5 圖

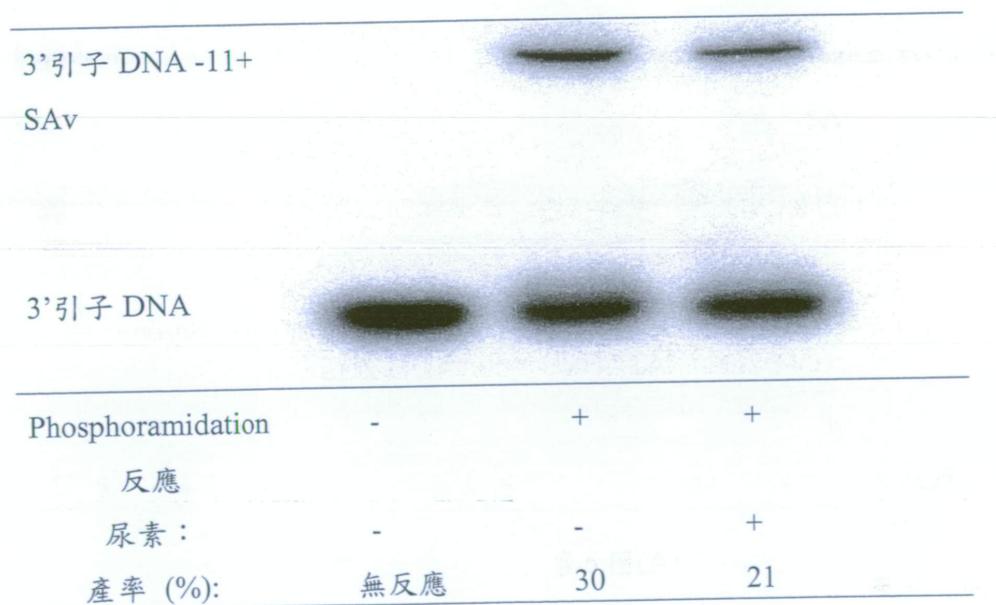


第 6 圖(A)

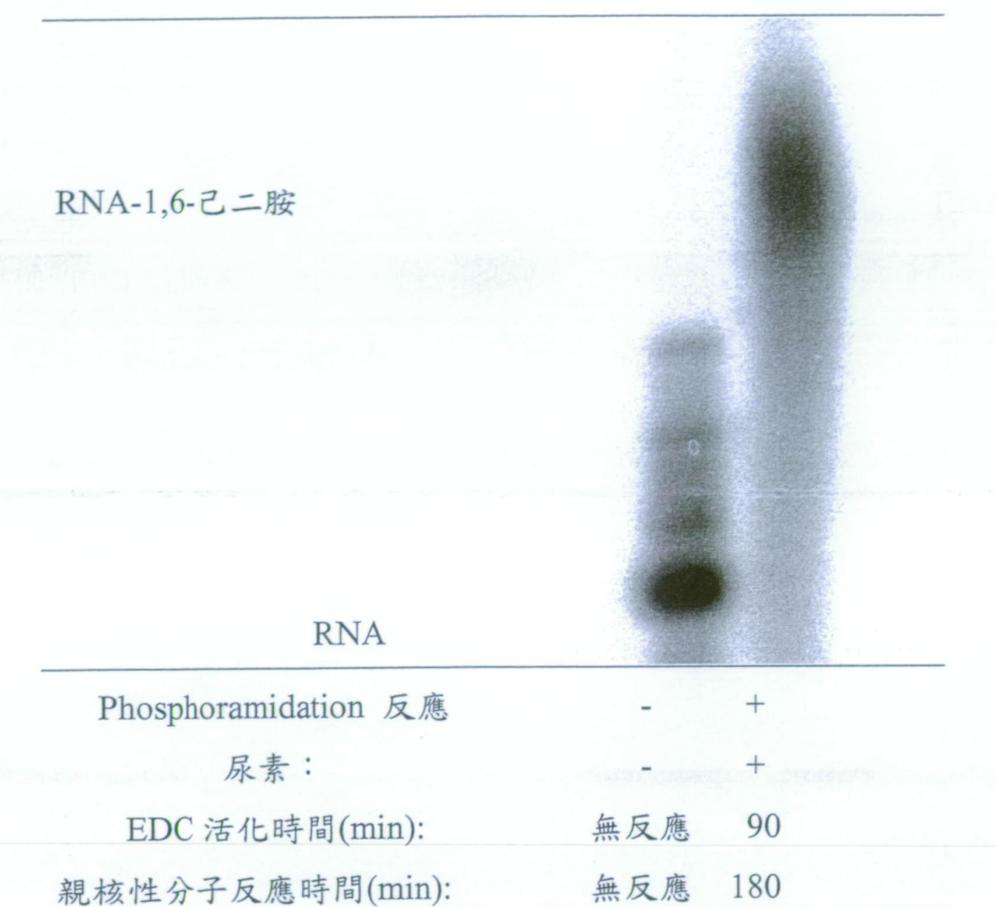


第 6 圖(B)

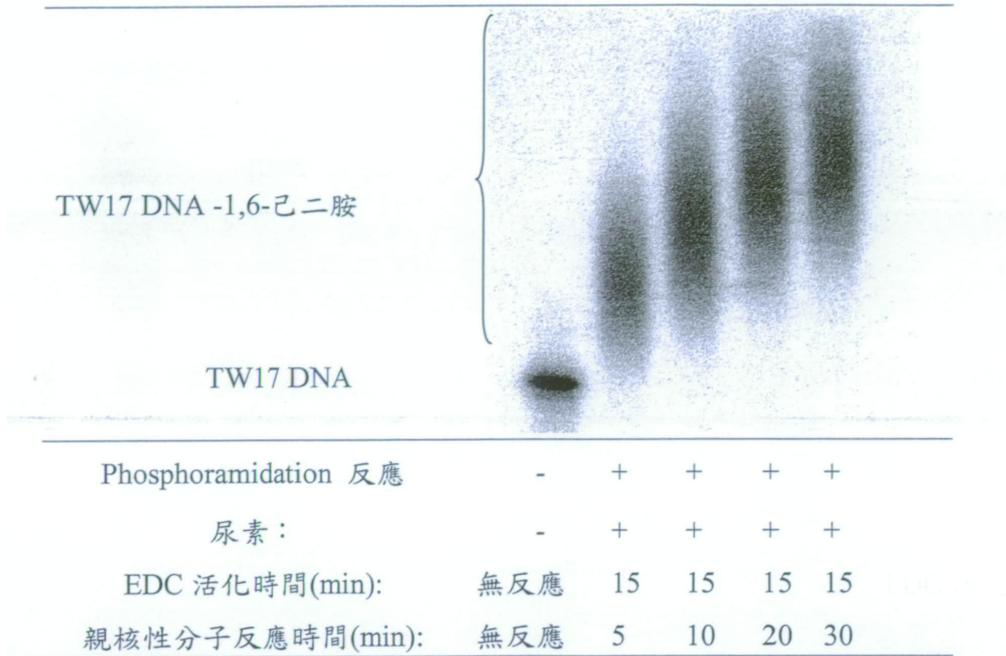
(9)



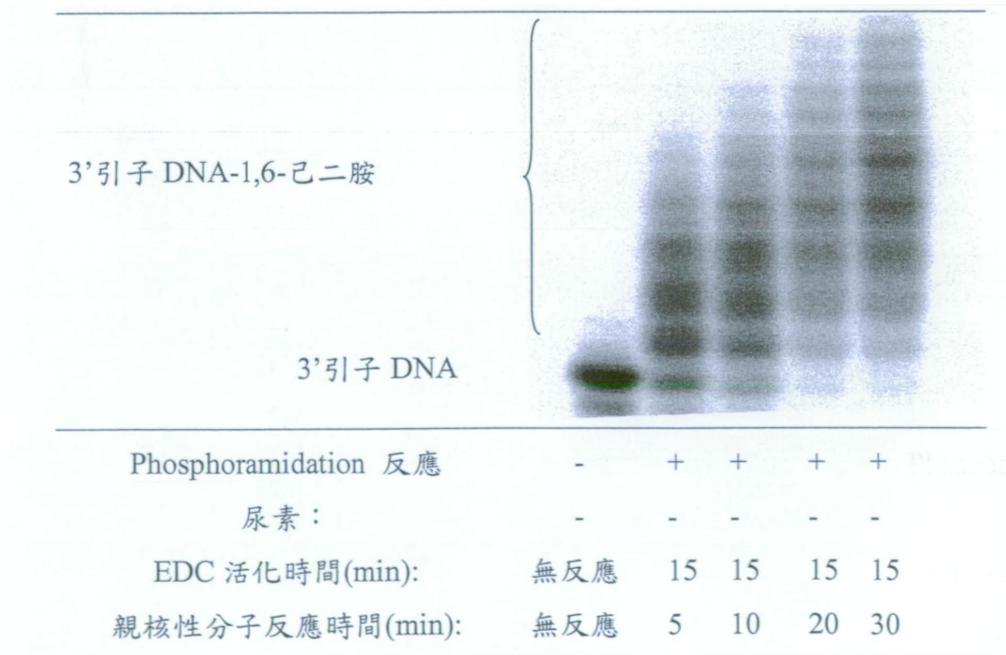
第 6 圖(C)



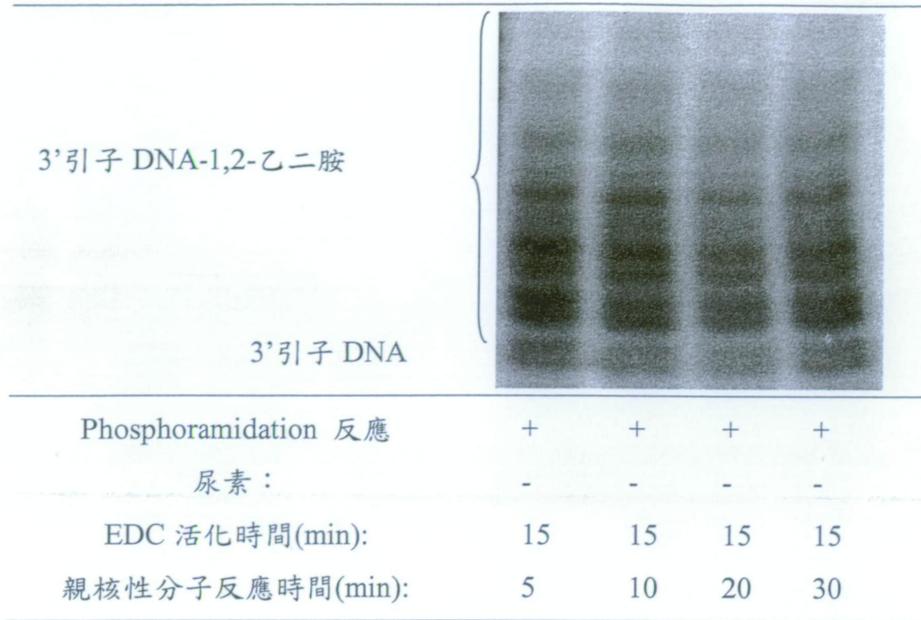
第 7 圖(A)



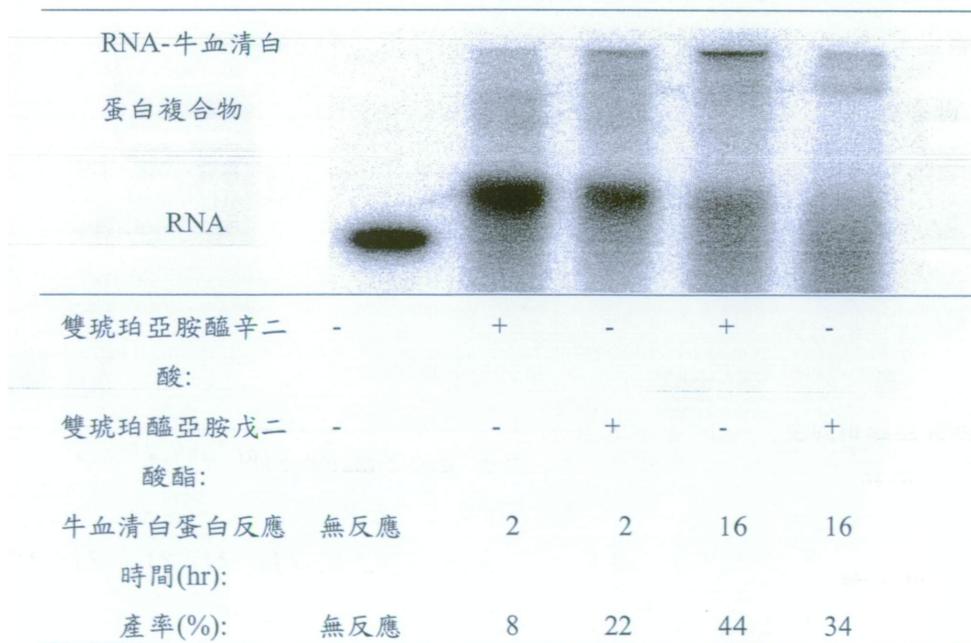
第 7 圖(B)



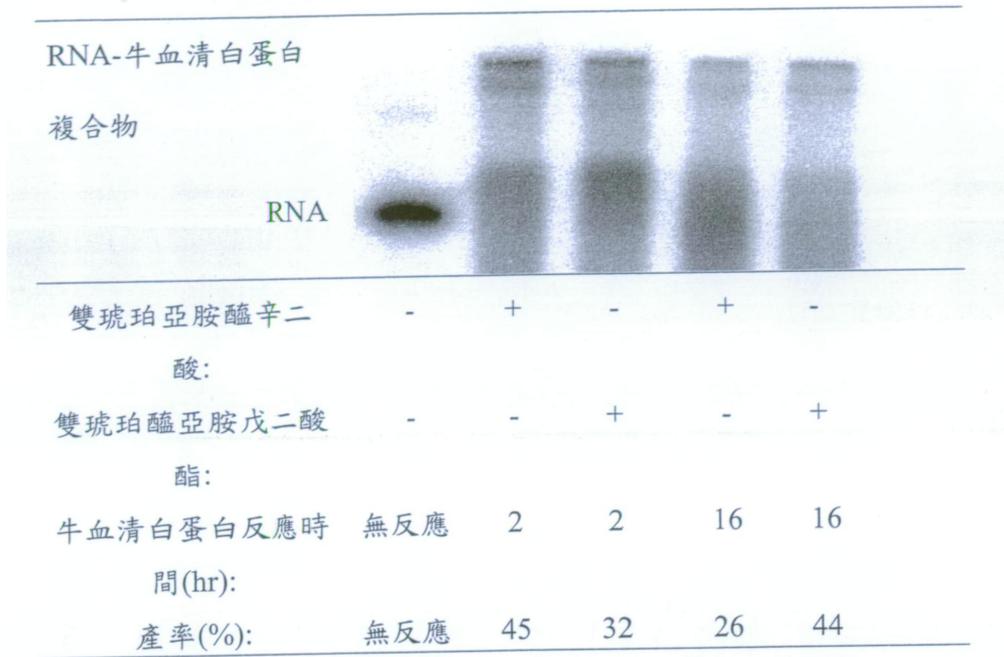
第 7 圖(C)



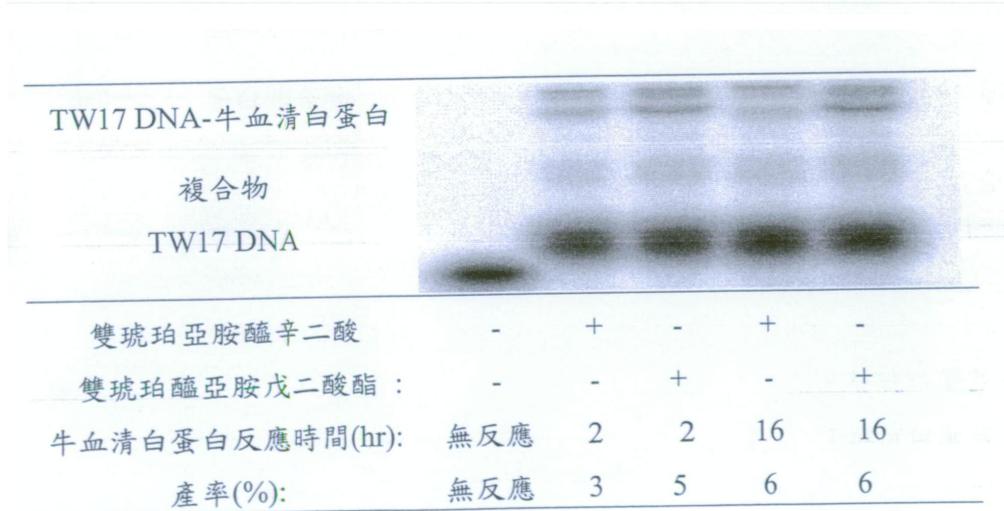
第 7 圖(D)



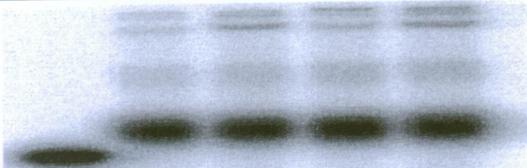
第 8 圖(A)



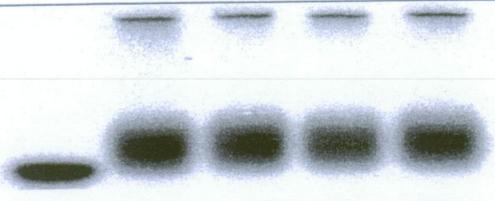
第 8 圖(B)



第 8 圖(C)

TW17 DNA-牛血清白						
蛋白複合物						
TW17 DNA						
雙琥珀亞胺醯辛二酸:	-	+	-	+	-	
雙琥珀醯亞胺戊二酸	-	-	+	-	+	
酯:						
牛血清白蛋白反應時間	無反應	2	2	16	16	
(hr):						
產率(%):	無反應	5	10	5	11	

第 8 圖(D)

3'引子 DNA-牛血清白						
蛋白複合物						
3'引子 DNA						
雙琥珀亞胺醯辛二酸:	-	+	-	+	-	
雙琥珀醯亞胺戊二酸	-	-	+	-	+	
酯:						
牛血清白蛋白反應時間	無反應	2	2	16	16	
(hr):						
產率(%):	無反應	10	8	10	9	

第 8 圖(E)

3'引子 DNA-牛血清白					
蛋白複合物					
3'引子 DNA					
雙琥珀亞胺醯辛二酸:	-	+	-	+	-
雙琥珀醯亞胺戊二酸	-	-	+	-	+
酯 :					
牛血清白蛋白反應時間	無反應	2	2	16	16
(hr):					
產率(%):	無反應	3	6	8	9

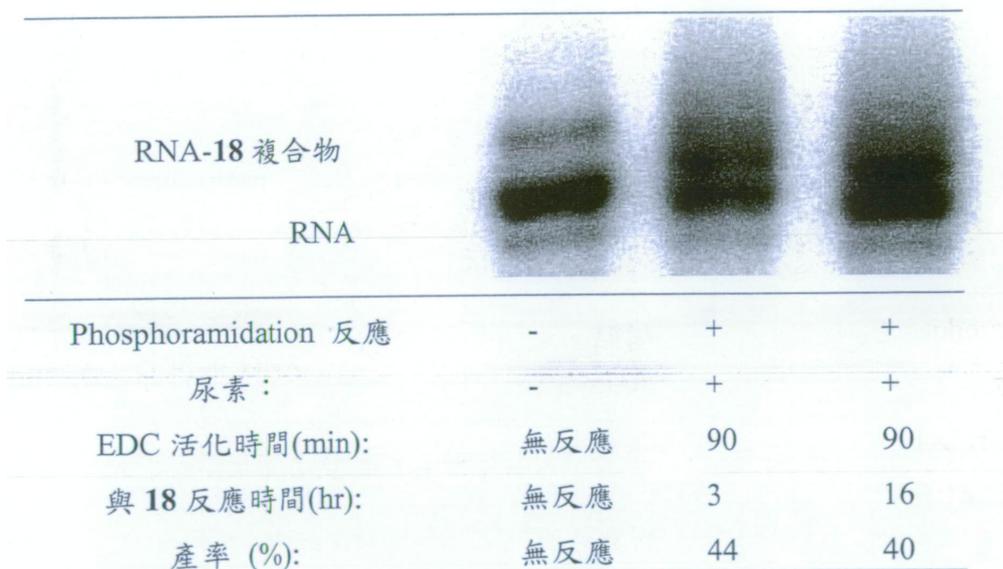
第 8 圖(F)

PCR 產物		
3'引子 DNA		
PCR 反應:	-	+
產率(%):	無反應	68

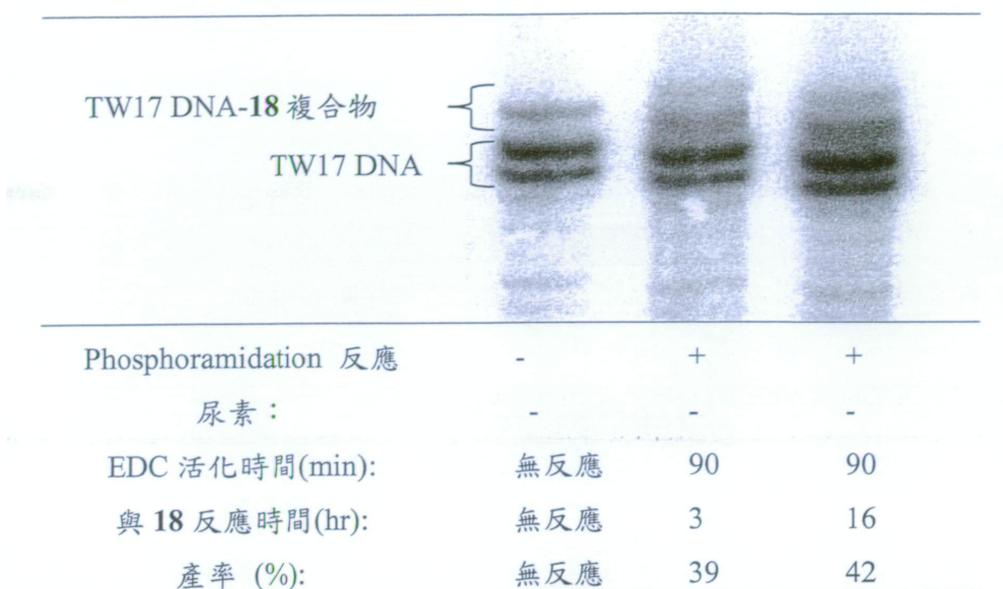
第 9 圖(A)

PCR 產物		
3'引子 DNA		
PCR 反應:	-	+
產率(%):	無反應	44

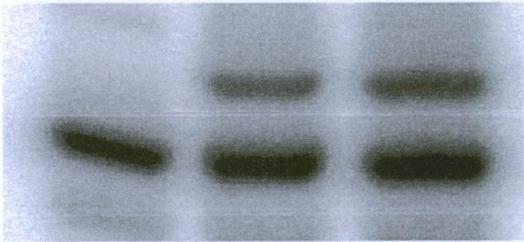
第 9 圖(B)



第 10 圖(A)



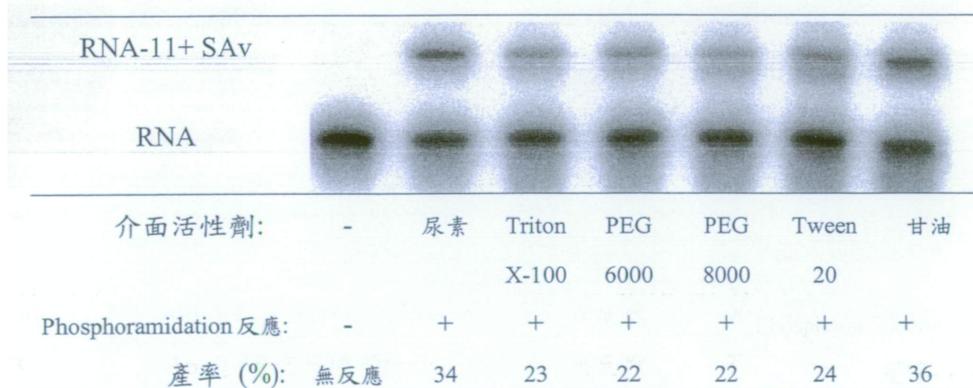
第 10 圖(B)

3'引子 DNA-18 複合物			
3'引子 DNA			
Phosphoramidation 反應	-	+	+
尿素：	-	-	-
EDC 活化時間(min):	無反應	90	90
與 18 反應時間(hr):	無反應	3	16
產率 (%) :	無反應	27	34

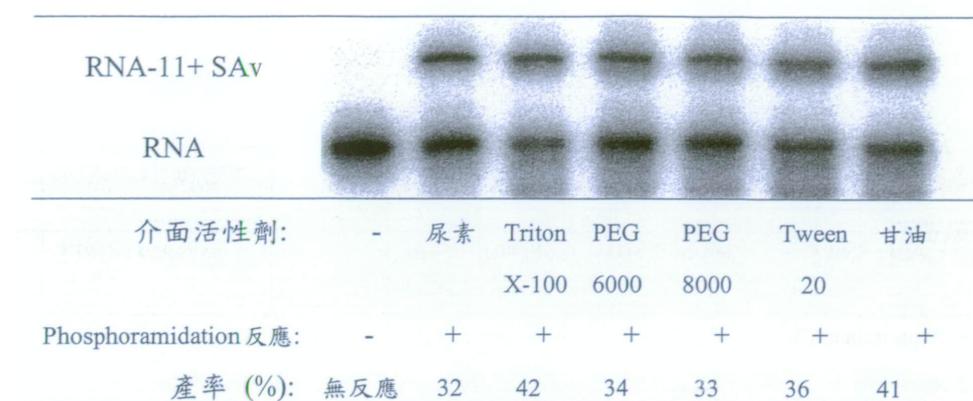
第 10 圖(C)

親核劑	TW17 RNA	TW17 DNA	3'引子 DNA
11 (單階段 phosphoramidation)	70% ^a , 79% ^b	23% ^a , 80% ^b	69% ^a , 60% ^b
11 (兩階段 phosphoramidation)	40% ^a , 52% ^b	38% ^a , 32% ^b	30% ^a , 21% ^b
18 (兩階段 phosphoramidation)	44% ^c , 40% ^d	39% ^c , 42% ^d	27% ^c , 34% ^d
1,6-己二胺 (單階段 phosphoramidation)	100%	100% ^e	100% ^e
牛血清白蛋白 (單階段 phosphoramidation) ^f	8% ^g , 44% ^h , 45% ⁱ , 26% ^j	3% ^g , 6% ^h , 5% ⁱ , 5% ^j	10% ^g , 10% ^h , 3% ⁱ , 8% ^j
牛血清白蛋白 (單階段 phosphoramidation) ^k	22% ^g , 34% ^h , 32% ⁱ , 44% ^j	5% ^g , 6% ^h , 10% ⁱ , 11% ^j	8% ^g , 9% ^h , 6% ⁱ , 9% ^j

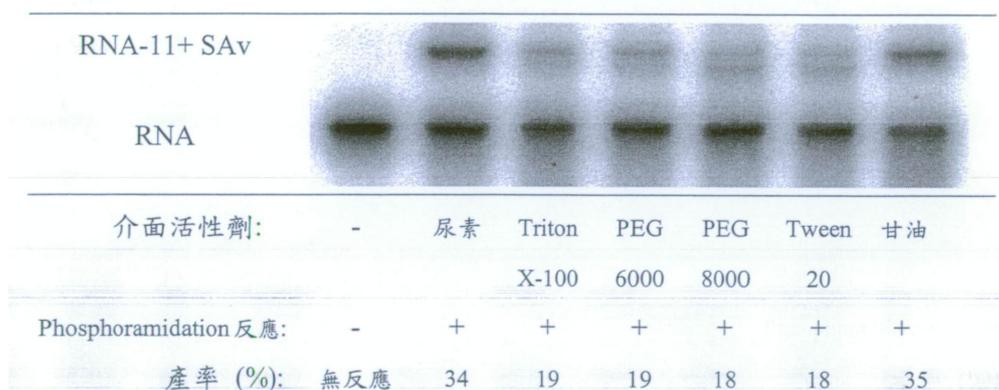
第 11 圖



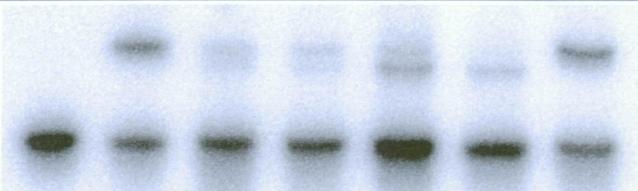
第 12 圖(A)



第 12 圖(B)



第 12 圖(C)

RNA-11+ SA _v							
RNA							
介面活性劑:	-	尿素	Tween 20	Triton X-100	PEG 6000	PEG 8000	甘油
Phosphoramidation 反應:	-	+	+	+	+	+	+
產率 (%):	無反應	38	13	10	13	10	38.7

第 12 圖(D)