



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105440725 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201510881799. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 01. 04

C09B 23/06(2006. 01)

C09B 23/08(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

G01N 1/30(2006. 01)

200810002503. 7 2008. 01. 04

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 33/52(2006. 01)

(71) 申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦

申请人 北京深迈瑞医疗电子技术研究院有限公司

(72) 发明人 邵建辉

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 郭燕 彭家恩

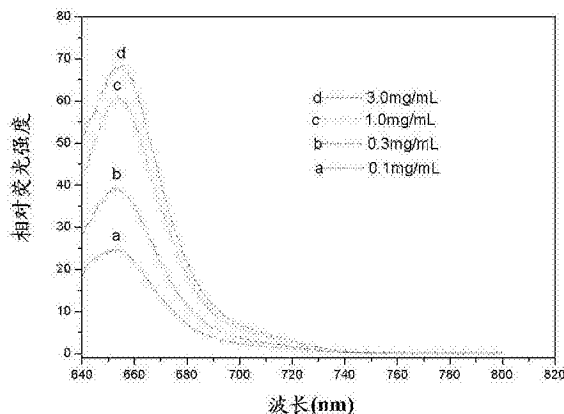
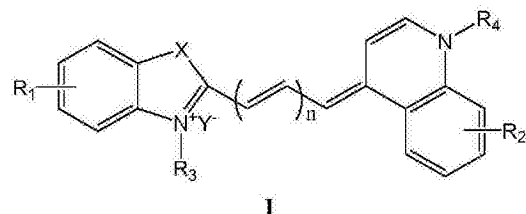
权利要求书5页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

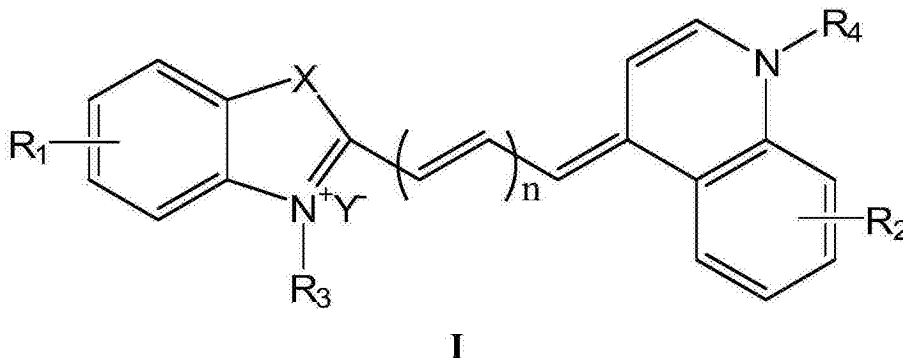
不对称菁类荧光染料, 组合物及在生物样品染色中的用途

(57) 摘要

本发明提供了一种式 I 表示的不对称菁类荧光染料, 其中 X、n、R₁、R₂、R₃、R₄ 和 Y 如说明书中的定义。该类染料可以作为优秀的核酸染色剂, 其光谱在 600 ~ 900nm 的近红外区, 没有背景荧光的干扰。同时该类染料可以利用小型红色半导体激光器作为光源 (633nm)。本发明还提供包含这种荧光染料的组合物和使用这种荧光染料或其组合物进行生物染色的方法。



1. 一种对生物样本的细胞内的核酸进行荧光染色的化合,所述化合物具有通式I结构:



其中

n为1、2或3;

X为C(CH₃)₂、O、S或Se;

R₁和R₂各自独立选自H、OH、C₁₋₁₈烷基、C₁₋₆烷基OR₅、C₁₋₁₈烷基磺酸基、苯基或卤素;

R₃、R₄各自独立选自C₁₋₁₈烷基COOR₆、C₁₋₁₈烷基OR₆、苄基,其中苄基由选自以下的取代基任选取代:卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基,条件是R₃和R₄不同时为苄基,且R₃为苄基时R₄不为C₁₋₁₈烷基OR₆;

R₅为C₁₋₁₈烷基或者H;

R₆为C₁₋₁₈烷基、H或者苯基,其中苯基由选自以下的取代基任选取代:卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基;

Y为负离子。

2. 权利要求1的化合物,R₁和R₂各自独立选自H。

3. 权利要求1-2中任一项的化合物,其中R₃为C₁₋₆烷基COOR₆、C₁₋₆烷基OR₆、苄基,所述苄基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基任选取代。

4. 权利要求1-3中任一项的化合物,其中R₄为C₁₋₆烷基COOR₆、C₁₋₆烷基OR₆、苄基,所述苄基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基任选取代。

5. 权利要求1-4中任一项的化合物,其中R₅为H或C₁₋₆烷基。

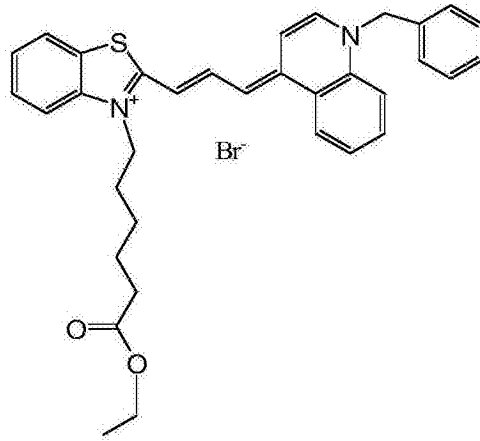
6. 权利要求1-5中任一项的化合物,其中R₆为C₁₋₆烷基或者苯基,所述苯基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基任选取代。

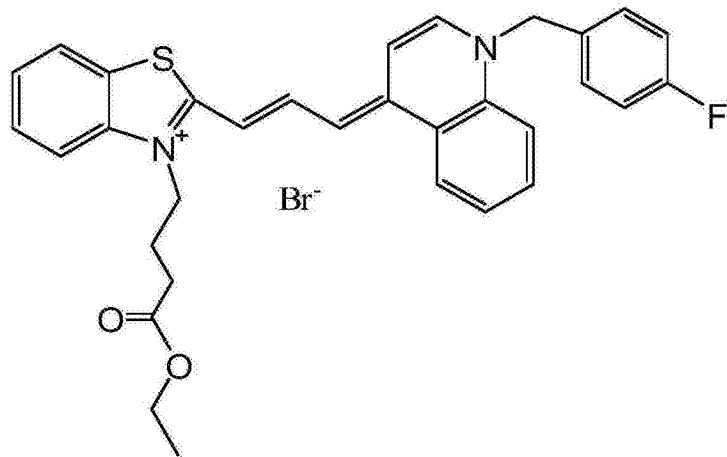
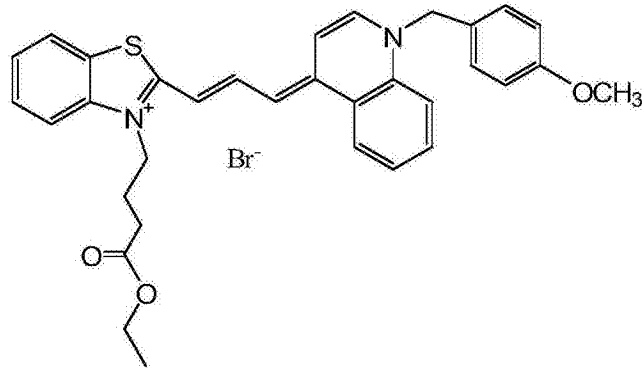
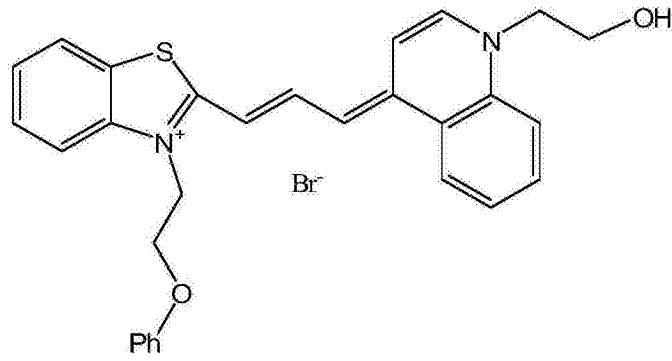
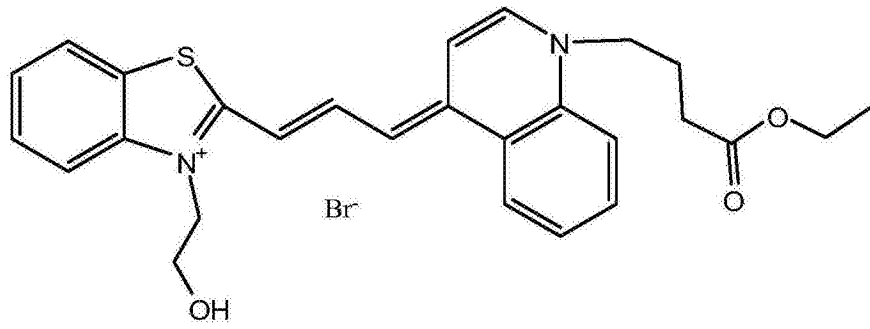
7. 权利要求1-6中任一项的化合物,其中X为C(CH₃)₂或S。

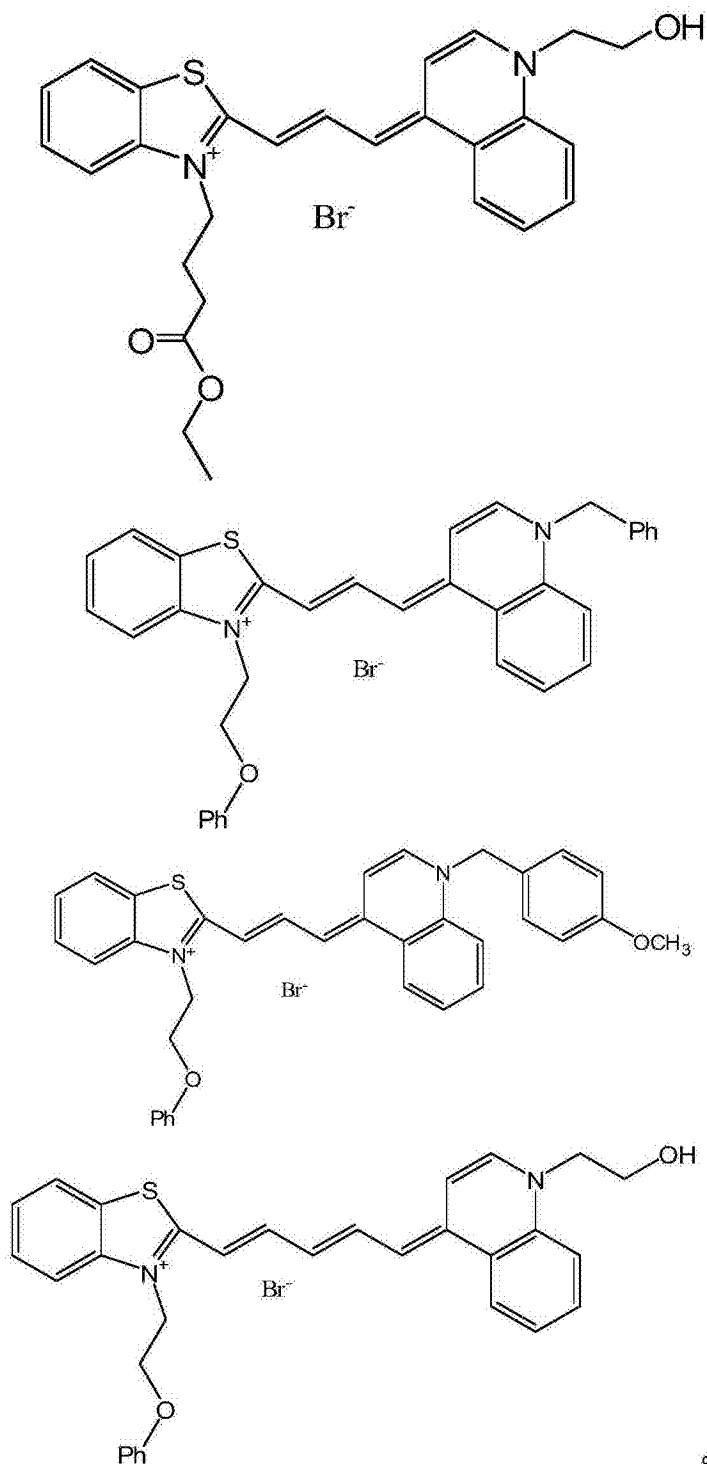
8. 权利要求1-7中任一项的化合物,其中n为1或2。

9. 权利要求1-8中任一项的化合物,其中Y为卤素离子、ClO₄⁻、PF₆⁻、CF₃SO₃⁻、BF₄⁻、乙酸根或对甲苯磺酸负离子。

10. 一种对生物样本的细胞内的核酸进行荧光染色化合物,其中所述化合物为:







11. 一种缀合物,所述缀合物包含权利要求1-10中任一项的化合物。

12. 一种用于生物样品染色的组合物,其中所述组合物包含权利要求1-10中任一项的化合物或权利要求11的缀合物。

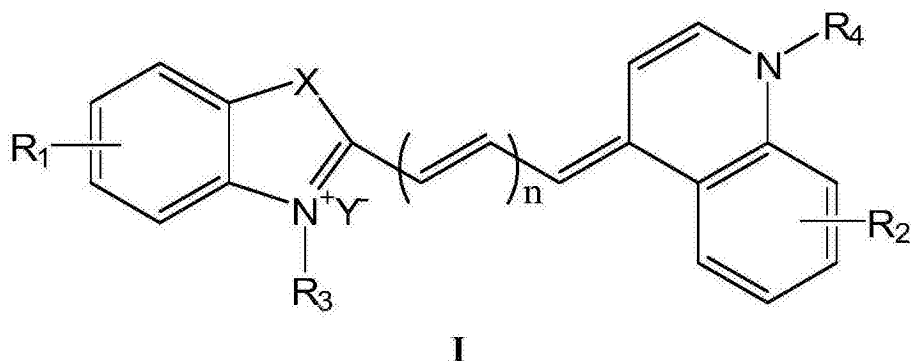
13. 权利要求12的组合物,其中所述生物样品选自血液中的白细胞、有核红细胞和网织红细胞。

14. 权利要求1-10中任一项的化合物、权利要求11的缀合物或权利要求12的组合物在对生物样品进行染色中的用途。

15. 权利要求14的用途,其中所述生物样品选自血液中的白细胞、有核红细胞和网织红

细胞。

16. 一种具有通式I结构的化合物：



其中

n为1、2或3；

X为C(CH₃)₂、O、S或Se；

R₁和R₂各自独立选自H、OH、C₁₋₁₈烷基、C₁₋₆烷基OR₅、C₁₋₁₈烷基磺酸基、苯基或卤素；

R₃、R₄各自独立选自C₁₋₁₈烷基COOR₆、苄基，其中苄基由选自以下的取代基任选取代：卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基，条件是R₃和R₄不同时为苄基或不同时为C₁₋₁₈烷基COOR₆；

R₅为C₁₋₁₈烷基或者H；

R₆为C₁₋₁₈烷基、H或者苯基，其中苯基由选自以下的取代基任选取代：卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基；

Y 为负离子。

不对称菁类荧光染料,组合物及在生物样品染色中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光染料,具体地讲,本发明涉及适合用于生物样品染色的不对称菁类荧光染料,包含所述荧光染料的组合物及其在生物样品染色中的用途。

背景技术

[0002] 荧光分析技术由于激光、微处理机和电子学等一些新的科学技术的引入和飞速发展,极大地推动了荧光分析的广泛应用。尤其近年来以荧光染料为标识剂的生物芯片的出现,使该技术在细胞免疫学、微生物学、分子生物学、分子遗传学、病理学、临床检验学、植物学等方面具有广阔的应用前景。荧光染料的开发是发展荧光分析技术的具有决定性作用的因素。

[0003] 早期应用的染料包括新亚甲蓝(NMB)、亮甲苯蓝(BCB)、派诺宁Y、溴乙锭等。它们通过嵌入或静电吸引与核酸分子形成复合物,从而可以在显微镜下观察增强后的荧光。但是这些染料自身也可以形成染料复合物,不能明显区别于染料与核酸形成的复合物,造成高的荧光背景干扰。同时,这些染料的荧光量子效率较低,降低了荧光增强的程度,影响检测结果的准确性。

[0004] 吡啶橙也应用在荧光分析中,可以和核酸形成复合物,使荧光增强。这类染料分子相互之间在能量传递的过程中可能会导致光淬灭,使得染料核酸复合物没有荧光发出,影响检测结果真实性。同时在流式细胞分析仪中,吡啶橙和塑料管路有较强的作用,会增加背景荧光强度。为了清除测试后残留的染料和保证测试结果的准确性,需要仪器进行长时间的管路清洗,这就降低了仪器的分析效率。

[0005] 美国专利4957870提出了一类噻唑蓝染料用于检测核酸和血液中的网织红细胞。该类染料使用的激发波长在488nm,需要使用价格高昂的激光器做光源,增加了仪器的使用成本。同时,这类染料需要较长的孵育时间,才能和核酸较好的结合。

[0006] 美国专利5994138公开了一种用于血液中网织红细胞染色的染料,它需要在35°C以上的反应条件下才能得到良好的检测结果,对仪器的使用条件提出了较高的要求。

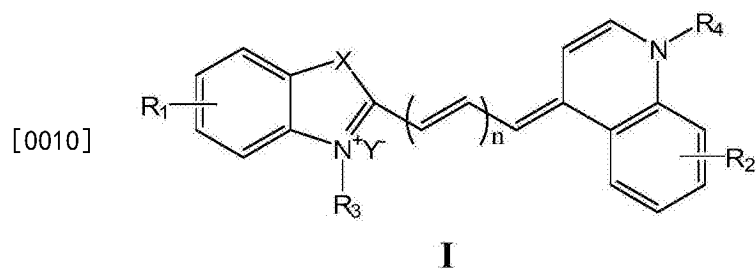
[0007] 目前使用的菁类荧光染料,如TOTAB、TOTIN、TO-PRO-3、PO-PRO-2和BO-PRO-2等[K.M.Sovenhazy, J.A.Bordelon, J.T.Petty. Nucleic Acids Res, 2003, 31, 2561],它们的吸收和发射都在近红外区(670-1000nm),但这类染料的分子结构比较复杂,合成路线较长,收率较低,因而价格高,限制了其使用范围。

[0008] 因此,需要开发新的荧光染料,该荧光染料优选具有以下性质:无核酸时染料自身不发荧光,与核酸形成复合物后时具有良好的荧光量子产率,光谱在近红外区,避免背景荧光的干扰;可以在633nm附近被激发,从而可以使用价格低廉的激光器作为激发光源;具有一定水平的水溶性,同时具有一定的穿过细胞膜的能力。

发明内容

[0009] 本发明的上述种种目的通过提供本发明化合物而得以实现。因此,本发明一方面

提供了一种具有以下通式I结构的化合物：



[0011] 其中

[0012] n为1、2或3；

[0013] X为C(CH₃)₂、O、S或Se；

[0014] R₁和R₂各自独立选自H、OH、C₁₋₁₈烷基、C₁₋₆烷基OR₅、C₁₋₁₈烷基磺酸基、苯基或卤素；

[0015] R₃、R₄各自独立选自C₁₋₁₈烷基COOR₆、C₁₋₁₈烷基OR₆、苄基，其中苄基由选自以下的取代基任选取代：卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基，条件是R₃和R₄不同时为苄基；且R₃为苄基时R₄不为C₁₋₁₈烷基OR₆；

[0016] R₅为C₁₋₁₈烷基或者H；

[0017] R₆为C₁₋₁₈烷基、H或者苯基，其中苯基由选自以下的取代基任选取代：卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基；

[0018] Y为负离子。

[0019] 本发明还一方面提供一种缀合物，所述缀合物包含上述式I化合物。

[0020] 本发明另一个方面还提供用于生物样品染色的组合物，所述组合物包含上述式I化合物或其缀合物。

[0021] 本发明再一方面还提供了本发明式I化合物或其缀合物或组合物在对生物样品进行染色中的用途。

[0022] 本发明的化合物、缀合物或组合物对生物样品如核酸、白细胞、有核红细胞、网织红细胞等具有良好的染色作用，其形成的复合物发射波长在近红外区，避免了生物自身的荧光背景干扰，有助于提高检测结果的精确度，同时可在流式细胞分析仪上用作各种生物样品的染色剂。

[0023] 本发明的这些特征和优点以及其他特征和优点在参考以下附图和本发明的具体实施方式之后将变得显而易见。

附图说明

[0024] 图1是Dye-1与含不同浓度鲑鱼精DNA结合后在磷酸盐缓冲液(PBS)中的荧光发射光谱。

[0025] 图2是Dye-1在PBS中与鲑鱼精DNA结合前后的荧光发射光谱。

[0026] 图3是Dye-1与含不同浓度甲鱼肝RNA结合后在磷酸盐缓冲液(PBS)中的荧光发射光谱。

[0027] 图4是Dye-1在PBS中与甲鱼肝RNA结合前后的荧光发射光谱。

[0028] 图5是Dye-2与含不同浓度鲑鱼精DNA结合后在磷酸盐缓冲液(PBS)中的荧光发射光谱。

- [0029] 图6是Dye-2与含不同浓度甲鱼肝RNA结合后在磷酸盐缓冲液(PBS)中的荧光发射光谱。
- [0030] 图7是Dye-2在PBS中与鲑鱼精DNA结合前后的荧光发射光谱。
- [0031] 图8是Dye-2在PBS中与甲鱼肝RNA结合前后的荧光发射光谱。
- [0032] 图9是Dye-3在PBS中与鲑鱼精DNA结合前后的荧光发射光谱。
- [0033] 图10是Dye-3在PBS中与甲鱼肝RNA结合前后的荧光发射光谱。
- [0034] 图11是Dye-0, Dye-1和Dye-2在PBS中与甲鱼肝RNA结合后的荧光发射光谱对比。

具体实施方式

[0035] 定义

[0036] 除另有说明外,本文中使用的术语具有以下含义。

[0037] 本文中使用的术语“烷基”,无论是单独使用还是与其他基团结合使用,指包含1-18、优选1-12、更优选1-8、最优选1-6个碳原子的直链烷基和支链烷基。如提及单个烷基如“正丙基”,则只特指直链烷基,如提及单个支链烷基如“异丙基”,则只特指支链烷基。例如,“C₁₋₆烷基”包括C₁₋₄烷基、C₁₋₃烷基、甲基、乙基、正丙基、异丙基和叔丁基。类似的规则也适用于本说明书中使用的其它基团。

[0038] 本文中使用的术语“烷氧基”是指与基团-O-结合的上述定义的“烷基”,其中所述“烷基”包含1-18、优选1-12、更优选1-8、最优选1-6个碳原子,例如甲氧基、乙氧基、丙氧基等。

[0039] 本文中使用的术语“卤素”包括氟、氯、溴和碘。

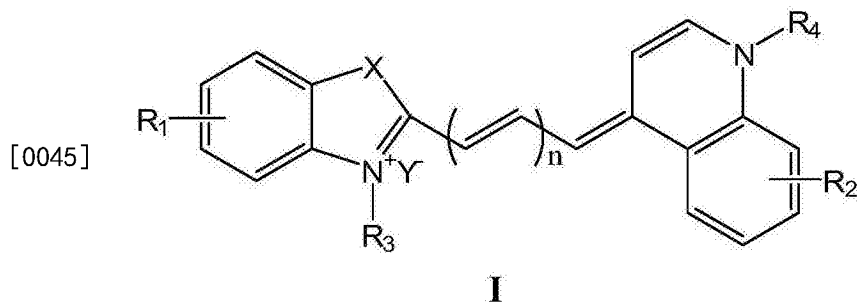
[0040] 本文中使用的术语“苄基”是指-CH₂-Ph基团。当用“任选取代”修饰苄基时,指该苄基可以未取代的形式存在,或者可被合适的取代基在任何合适的位置取代。合适的取代基包括但不限于卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基等,只要最终形成的化合物具有本发明期望的性质。优选苄基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基或氨基任选取代。

[0041] 本文中使用的术语“杂环基”是指包含3-14、优选3-10、更优选3-6个环成员并包含一个或多个选自氮、氧和硫的杂原子的单环或稠环体系。

[0042] 本文中使用的术语“生物样品”包括但不限于核酸、血液中的白细胞、有核红细胞、网织红细胞等。

[0043] 本发明的化合物

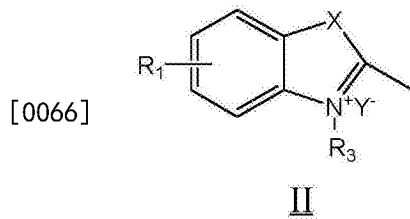
[0044] 本发明提供了一种具有以下通式I结构的化合物:



[0046] 其中

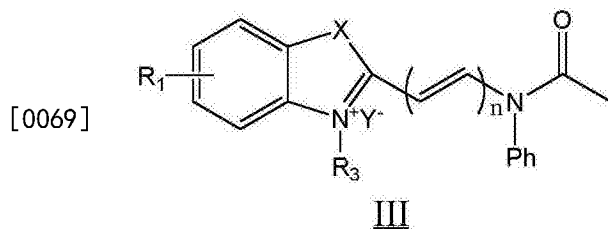
- [0047] n为1、2或3；
- [0048] X为C(CH₃)₂、O、S或Se；
- [0049] R₁和R₂各自独立选自H、OH、C₁₋₁₈烷基、C₁₋₆烷基OR₅、C₁₋₁₈烷基磺酸基、苯基或卤素；
- [0050] R₃、R₄各自独立选自C₁₋₁₈烷基COOR₆、C₁₋₁₈烷基OR₆、苄基，其中苄基由选自以下的取代基任选取代：卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基，条件是R₃和R₄不同时为苄基，且R₃为苄基时R₄不为C₁₋₁₈烷基OR₆；；
- [0051] R₅为C₁₋₁₈烷基或者H；
- [0052] R₆为C₁₋₁₈烷基、H或者苯基，其中苯基由选自以下的取代基任选取代：卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基；
- [0053] Y为负离子。
- [0054] 优选n为1或2，更优选n为1。
- [0055] 优选X为C(CH₃)₂、O或S；更优选X为C(CH₃)₂或S；最优选X为S。
- [0056] 优选R₁和R₂各自独立选自H或C₁₋₁₈烷基；更优选R₁和R₂各自独立选自H或C₁₋₆烷基；最优选R₁和R₂均为H。
- [0057] 优选R₃和R₄各自独立选自C₁₋₈烷基COOR₆、C₁₋₈烷基OR₆、苄基，所述苄基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基或氨基任选取代；更优选R₃和R₄各自独立选自C₁₋₆烷基COOR₆、C₁₋₆烷基OR₆、苄基，所述苄基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基或氨基任选取代。
- [0058] 优选R₅为H或C₁₋₁₂烷基，更优选R₅为H或C₁₋₆烷基。
- [0059] 优选R₆为C₁₋₆烷基或者苯基，所述苯基由卤素、羟基、巯基、氰基、硝基、烷基、芳基、烷氧基、杂环基、卤代烷基、氨基、烷基氨基、酰氨基、羧基任选取代。
- [0060] Y表示负离子，其可为任何合适的负离子，包括但不限于无机负离子或有机负离子，例如卤素离子、ClO₄⁻、PF₆⁻、CF₃SO₃⁻、BF₄⁻、乙酸根或对甲苯磺酸根负离子。
- [0061] 本发明化合物可作为本文中所述的盐形式直接用于生物样品的染色。或者，在一个实施方案中，本发明化合物可作为式I化合物的衍生物的形式使用，所述衍生物包括但不限于缀合物。
- [0062] 典型地，缀合物在荧光激活细胞分选仪(FACS)中使用。本文中使用的“缀合物”是指本发明荧光染料通过共价键与其它分子连接而形成的化合物。可与本发明荧光染料缀合的分子可为与细胞或细胞成分特异性结合分子，包括但不限于抗体、抗原、受体、配体、酶、底物、辅酶等。通常，测试样品与荧光缀合物温育一段时间，使得该荧光缀合物与测试样品中的某些细胞或细胞成分特异性结合，该荧光缀合物与细胞或细胞成分的结合也可被称为染色。该染色步骤可依次进行多次，或用多种缀合物同时进行多种染色。染色完成后，样品在荧光激活细胞分选仪中进行分析，其中激发光源激发缀合物中的本发明荧光染料，而测定装置测定由激发的荧光染料产生的发射光。
- [0063] 或者，在另一个实施方案中，该荧光缀合物还可用于固相免疫测试，例如夹心型免疫测试。固相免疫测试的技术是本领域公知的，可由标准教科书获得。本发明的荧光缀合物可用作固相免疫测试中的各种合适成分。
- [0064] 本发明的化合物的制备方法
- [0065] 本发明化合物可通过本领域熟知的通用方法合成得到，参见例如同属于本申请人的同时待审的中国专利申请CN200710137258.6。所述专利申请通过引用结合到本文中来。

具体地讲,本发明的不对称菁类荧光染料的一般通过以下流程合成:首先由未取代或取代的2-甲基苯并噻唑、2-甲基苯并唑或2,3,3-三甲基-3H-吡啶等原料开始,使其与式R₃X(X为F、Cl、Br或I)的卤化物反应,两者的摩尔比为1:1-2,在甲苯中回流12-36小时,可制得季铵盐中间体II:



[0067] 其中X、R₁、R₃和Y如式I化合物中所述定义;

[0068] 然后,将制得的季铵盐中间体II与连接分子缩合,可得到式III化合物:



[0070] 其中X、n、R₁、R₃和Y如式I化合物中所述定义,连接分子可为N,N'-二苯基甲脒或其高级同系物;

[0071] 通过与制备式II化合物类似的方法得到取代或未取代的4-甲基喹啉季铵盐中间体,最后将其与式III化合物在吡啶或醋酐的作用下回流,即可得到本发明的不对称菁类荧光染料。所得荧光染料可通过本领域公知的分离和纯化技术回收,以达到需要的纯度。

[0072] 本发明中使用的各种原料均可市售获得,或者可通过本领域技术人员公知的方法或现有技术中公开的方法由本领域公知的原料简单地制备得到。

[0073] 应认识到,本发明化合物中的各种环取代基有一些可在上述步骤进行之前或刚完成后,通过标准的芳族取代反应来引入或通过常规的官能团修饰来产生,这包括在本发明的方法步骤方面。这种反应和修饰包括例如取代基通过芳族取代反应的引入、取代基的还原、取代基的烷基化和取代基的氧化。用于这些过程的试剂和反应条件是化学领域公知的。芳族取代反应的具体实例包括用浓硝酸引入硝基,用例如酰卤和路易斯酸(如三氯化铝)在Friedel Crafts条件下引入酰基,用烷基卤和路易斯酸(如三氯化铝)在Friedel Crafts条件下引入烷基,和引入卤素基团。修饰的具体实例包括通过例如用镍催化剂进行催化氢化或者用铁在盐酸存在下进行加热处理,将硝基还原成氨基;将烷硫基氧化成烷基亚磺酰基或烷基磺酰基。

[0074] 包含式I化合物的本发明荧光缀合物可通过任何本领域已知的常规方法合成。

[0075] 本发明的组合物

[0076] 本发明还提供包含上述式I化合物或其缀合物的组合物,所述组合物用于生物样品的染色。

[0077] 本发明的组合物除包含式I化合物或其缀合物外,还可包含生物样品染色所需要的其它组分,例如溶剂、渗透压调节剂、pH调节剂、表面活性剂等。本发明的组合物可作为水溶液形式存在,或者可作为临用前用水配制为溶液的其它合适形式存在。

[0078] 本发明化合物或组合物的应用

[0079] 本发明还提供使用上述式I化合物或包含式I化合物的组合物以染色生物样品的方法,该方法包括使上述式I化合物或其缀合物或包含式I化合物的组合物与生物样品接触的步骤。本文中使用的术语“接触”可包括在溶液或固相中接触。

[0080] 特点

[0081] 由以上描述以及本领域技术人员公知的常识,可了解本发明荧光染料的各种优点,包括但不限于以下:

[0082] (1)本发明提供的化合物对DNA有良好的染色作用,形成染料/DNA复合物后荧光发射强度较染料自身荧光有40~100倍提高。

[0083] (2)本发明提供的化合物对RNA亦有良好的染色作用,形成染料/RNA复合物后荧光发射强度较染料自身荧光有20~40倍左右的提高。

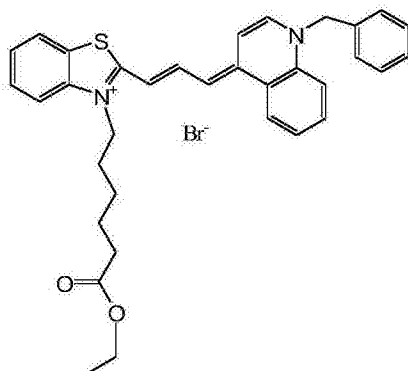
[0084] (3)染料/核酸复合物发射波长在640nm~900nm的近红外区,避免了生物自身的荧光背景干扰,有助于提高检测结果的精确度。

[0085] (4)本发明提供的化合物可在流式细胞分析仪上用做血液中网织红细胞、白细胞、有核红细胞的染色剂。

[0086] (5)本发明提供的化合物和核酸结合后可以用红色半导体激光器发射的633nm波长光激发,从而有助于降低仪器价格。

[0087] 实施例

[0088] 以下通过具体实施例对本发明作出详细说明,但本领域技术人员会理解,本发明不限于此。

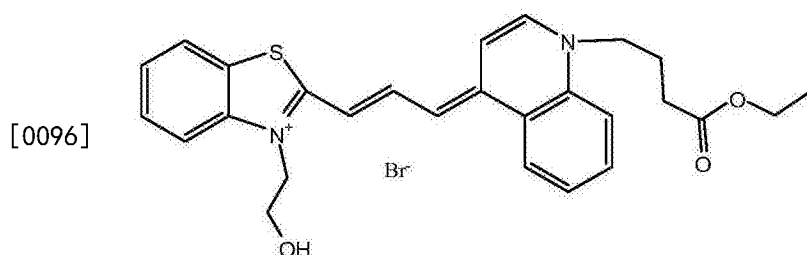
[0089] 实施例1[0090] Dye-1的合成

[0091]

[0092] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-己酸乙酯基-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol N,N'-二苯基甲脒于65°C油浴上加热搅拌6小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率42%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-苄基-4-甲基咪唑季铵盐4.2mmol及吡啶10mL,90°C油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出暗紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:10梯度洗脱,收集蓝色组分,在45°C条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率53%。

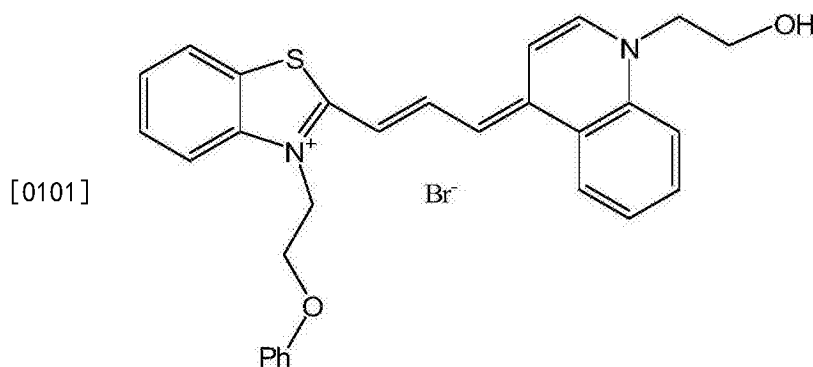
[0093] MS(EI)C₃₄H₃₅BrN₂O₂S m/z:535.2[M-Br]⁺。

[0094] 实施例2

[0095] Dye-2的合成

[0097] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-(2-羟基乙基)-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol N,N'-二苯基甲脒于65℃油浴上加热搅拌6小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率41%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(丁酸乙酯基)-4-甲基喹啉季铵盐4.5mmol及吡啶10ml,90℃油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:18梯度洗脱,收集蓝色组分,在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率49%。

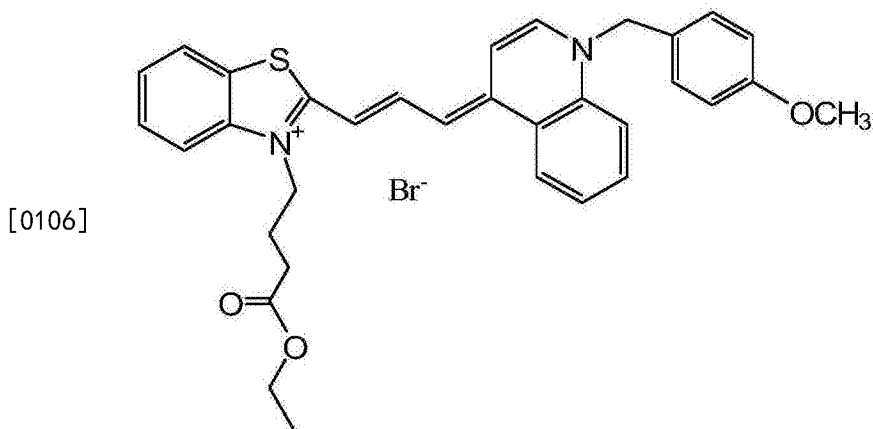
[0098] MS(EI) $C_{27}H_{29}BrN_2O_3S$:m/z:461.2[M-Br]⁺。

[0099] 实施例3[0100] Dye-3的制备

[0102] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-(2-苯氧乙基)-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol N,N'-二苯基甲脒于65℃油浴上加热搅拌5小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率47%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(2-羟基)-乙基-4-甲基喹啉季铵盐4.2mmol及吡啶10ml,90℃油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:15,收集蓝色组分,在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率40%。

[0103] MS(EI) $C_{29}H_{27}BrN_2O_2S$ m/z:467.2[M-Br]⁺。

[0104] 实施例4[0105] Dye-4的制备

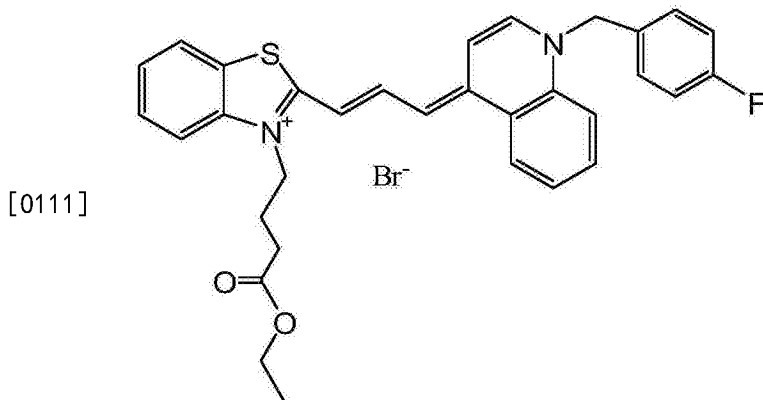


[0107] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-丁酸乙酯基-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol N,N' -二苯基甲脒于65°C油浴上加热搅拌6小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率40%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(4-甲氧基苯基)-4-甲基喹啉季铵盐4.2mmol及吡啶10ml,90°C油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:8梯度洗脱,收集蓝色组分,在45°C条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率61%。

[0108] MS(EI) $C_{33}H_{33}BrN_2O_3S$ m/z :537.2[M-Br]⁺。

[0109] 实施例5

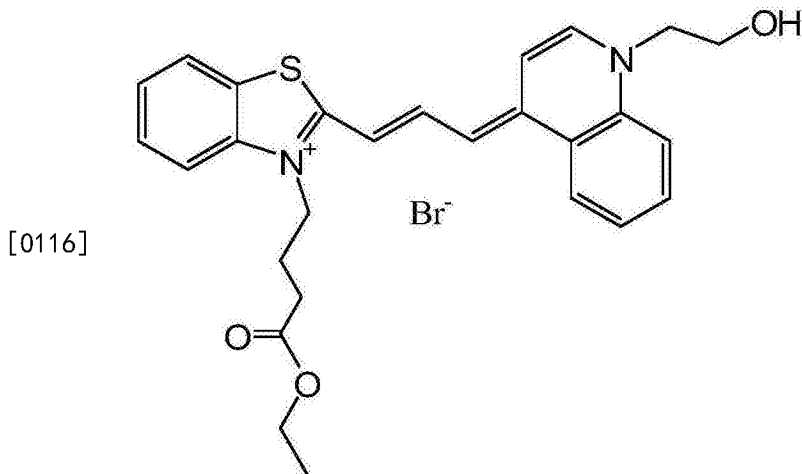
[0110] Dye-5的制备



[0112] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-丁酸乙酯基-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol N,N' -二苯基甲脒于65°C油浴上加热搅拌6小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率40%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(4-氟苯基)-4-甲基喹啉季铵盐4.2mmol及吡啶10ml,90°C油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:8梯度洗脱,收集蓝色组分,在45°C条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率49%。

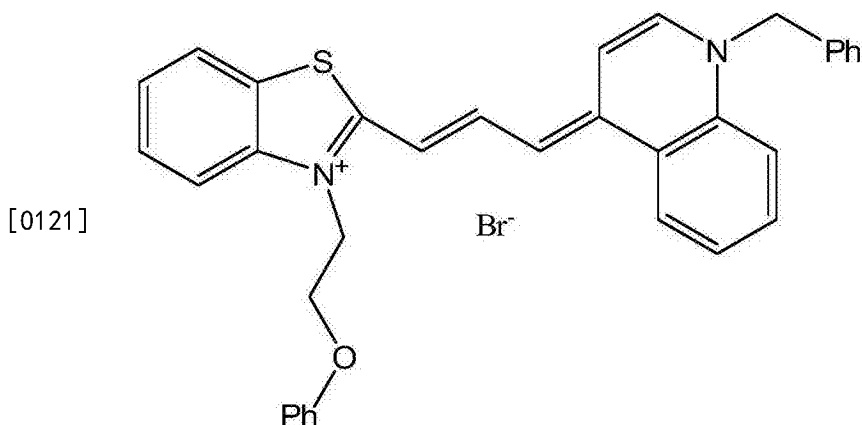
[0113] MS(EI) $C_{32}H_{30}BrFN_2O_2S$ m/z :525.2[M-Br]⁺。

[0114] 实施例6

[0115] Dye-6的制备

[0117] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-丁酸乙酯基-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol $\text{N,N}'$ -二苯基甲脒于65°C油浴上加热搅拌6小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率40%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(2-羟基)-乙基-4-甲基喹啉季铵盐4.2mmol及吡啶10mL,90°C油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:14梯度洗脱,收集蓝色组分,在45°C条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率43%。

[0118] MS(EI) $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ m/z :461.2 $[\text{M}-\text{Br}]^+$ 。

[0119] 实施例7[0120] Dye-7的制备

[0122] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-(2-苯氧乙基)-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol $\text{N,N}'$ -二苯基甲脒于65°C油浴上加热搅拌5小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率47%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-苄基-4-甲基喹啉季铵盐4.2mmol及吡啶10mL,90°C油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出暗紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:10梯度洗脱,收集蓝色组分,在45°C条件下真空干燥箱中干燥24小时,得

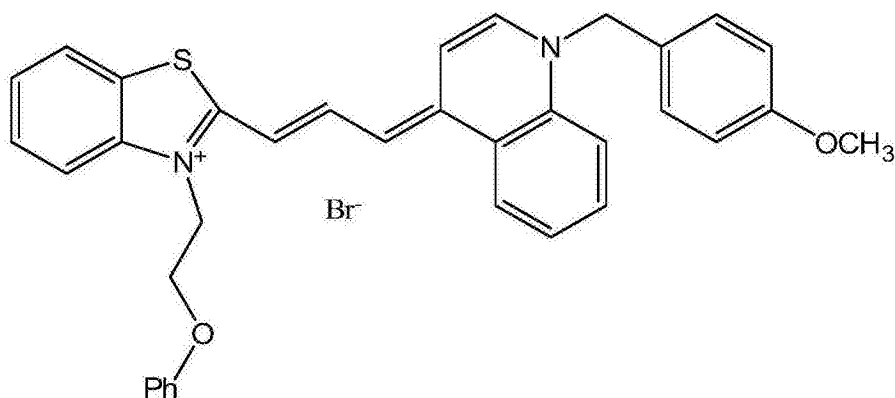
到标题化合物,收率46%。

[0123] MS(EI) $C_{34}H_{29}BrN_2OS$ m/z :513.2[M-Br]⁺。

[0124] 实施例8

[0125] Dye-8的制备

[0126]



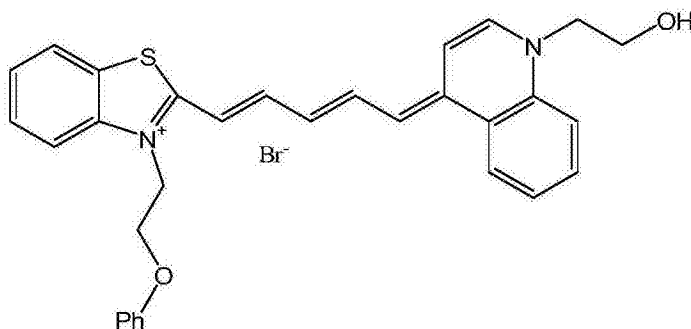
[0127] 在40mL甲醇与20mL乙醇的混合溶液中,将10mmol 1-(2-苯氧乙基)-2-甲基苯并噻唑溴季铵盐与30mmol N,N'-二苯基甲脒于65℃油浴上加热搅拌5小时。反应结束后减压蒸除溶剂,然后加入一定量的乙醚搅拌析出橙色固体粉末,过滤,干燥。将粗产物用乙酸乙酯-己烷重结晶,得到橘红色固体产物,收率47%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(4-甲氧基苯基)-乙基-4-甲基喹啉季铵盐4.5mmol及吡啶10mL,90℃油浴上加热搅拌1.5小时。冷却至室温后将反应液倒入乙醚中,析出紫红色固体物,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:7梯度洗脱,收集蓝色组分,在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率51%。

[0128] MS(EI) $C_{35}H_{31}BrN_2O_2S$ m/z :543.2[M-Br]⁺。

[0129] 实施例9

[0130] Dye-9的制备

[0131]



[0132] 在20mL溶剂(醋酸:醋酸酐=1:1)中,将8mmol 1-(2-苯氧乙基)-2-甲基苯并噻唑季铵盐与10mmol丙二醛双苯基亚胺盐酸盐加热到120℃,反应1小时后,冷却,加入乙醚析出固体。过滤,用30mL乙酸乙酯冲洗3次,除去未反应的过量的缩合剂。干燥,得棕黄色粉末,粗收率68%。取4.0mmol该反应产物,向其中加入1-(2-羟基)-乙基-4-甲基喹啉季铵盐6mmol及吡啶10mL,110℃油浴上加热搅拌1小时。将反应液冷却后倒入乙醚中,析出暗紫色小颗粒,过滤,干燥。染料通过硅胶柱分离,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=100:15梯度洗脱,收集蓝色组分,在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物,收率43%。

[0133] MS(EI) $C_{31}H_{29}BrN_2O_2S$: m/z :493.2[M-Br]⁺。

[0134] 实施例10

[0135] Dye-1在含不同浓度DNA的磷酸盐缓冲液(PBS)中荧光强度的测定:

[0136] 精确称取一定量的Dye-1充分溶解在2.5mL甲醇/乙二醇(体积比例50:50)中,配制成浓度为5mM的染料溶液,过滤后使用。分别称取一定量的鲑鱼精DNA,溶解在PBS缓冲液中,得到10mg/mL、3mg/mL、1mg/mL、0.3mg/mL、0.1mg/mL的DNA PBS缓冲液。准确量取2 μ L已经配制好的5mM染料,称取不同浓度的DNA PBS缓冲液1 μ L分别加入到1mL PBS缓冲液中进行结合,反应一定时间后,选定激发波长633nm,测定该复合物的发射光谱。测试温度为室温;所用仪器为荧光分光光度计,型号:FL-4500。结果如附图1所示。从图中可以看出,随着DNA浓度的增加,染料/DNA复合物的荧光发射强度迅速增加。

[0137] 图2为Dye-1在PBS中与DNA结合前后的相对荧光对比。从图中可以看出,Dye-1的PBS溶液几乎没有荧光产生,和DNA形成复合物后荧光强度迅速增强,最大激发峰在654nm左右,处于近红外区,可以避免生物自身的荧光背景干扰。

[0138] 实施例11

[0139] Dye-1在含不同浓度RNA的PBS中荧光强度的测定:

[0140] 精确称取一定量的Dye-1充分溶解在2.5mL甲醇/乙二醇(体积比例50:50)中,配制成浓度为5mM的染料溶液,过滤后使用。分别称取一定量的新鲜提取的甲鱼肝RNA,溶解在PBS缓冲液中,得到100 μ g/mL、30 μ g/mL、10 μ g/mL、3 μ g/mL、1 μ g/mL的RNA PBS缓冲液。准确量取2 μ L已经配制好的5mM染料,称取不同浓度的RNA PBS缓冲液1 μ L分别加入到1mL PBS缓冲液中进行结合,反应一定时间后,选定激发波长633nm,测定该复合物的发射光谱。测试温度为室温;所用仪器为荧光分光光度计,型号:FL-4500。结果如附图3所示。从图中可以看出,随着RNA浓度的增加,染料/RNA复合物的荧光发射强度同样迅速增加。

[0141] 图4为Dye-1在PBS中与RNA结合前后的相对荧光对比。从图中也可以看出,Dye-1和RNA形成复合物后荧光强度迅速增强,并且产生了一定程度的红移,最大激发峰在655nm左右,处于近红外区,在仪器检测中可避免生物自身的荧光背景干扰,因此可以提高检测的精确度。

[0142] 实施例12

[0143] Dye-2在含不同浓度DNA/RNA的PBS中荧光强度的测定:

[0144] 测定方法与实施例10和11同。Dye-2与不同浓度DNA/RNA形成复合物的荧光光谱为附图5和6。Dye-2与DNA/RNA在PBS中结合前后的荧光对比分别如附图7和8所示。从图中可以看出,染料自身几乎不产生荧光,而随着核酸的加入,与染料结合后荧光强度同样迅速增加,最大激发峰都超过了650nm。

[0145] 实施例13

[0146] Dye-3在含不同浓度DNA/RNA的PBS中荧光强度的测定:

[0147] 测定方法与实施例10和11同。Dye-3与DNA/RNA在PBS中结合前后的荧光对比分别如附图9和10所示。从图中可以看出,染料自身在PBS溶液中产生的荧光很弱,与DNA/RNA结合后荧光强度增加明显,最大激发峰都超过了650nm。

[0148] 表1比较了Dye-1、Dye-2和Dye-3与鲑鱼精DNA在PBS中结合前后的荧光增强比例。

[0149] 表1

[0150]

染料	相对荧光强度		荧光增强比例(结合后/结合前)
	未结合	结合 DNA	
Dye-1	1.82	68.63	38
Dye-2	0.97	102.93	106
Dye-3	1.64	94.37	55

[0151] 表2比较了Dye-1、Dye-2和Dye-3甲鱼肝RNA在PBS中结合前后的荧光增强比例。

[0152] 表2

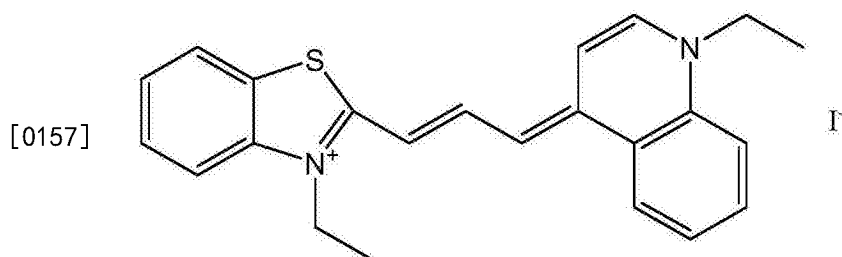
[0153]

染料	相对荧光强度		荧光增强比例(结合后/结合前)
	未结合	结合 RNA	
Dye-1	1.82	83.24	46
Dye-2	0.97	37.28	38
Dye-3	1.64	33.57	20

[0154] 实施例14

[0155] Dye-0在RNA的PBS中荧光强度的测定:

[0156] 为了说明本发明的化合物对荧光染料性能的优化改进,选择具有如下结构的已知化合物Dye-0作为参照(Journal of the American Chemical Socitey(1945)67,18889-93):



[0158] 测定方法与实施例10相同。Dye-1和Dye-2与Dye-0以相同的浓度和甲鱼肝RNA结合后的荧光光谱如图11所示。从图中可以清晰地看出,Dye-1和RNA结合后荧光强度增加幅度最大,Dye-2与RNA结合后的荧光强度也有明显增加,并且大于Dye-0与RNA结合后的增加幅度,说明在和核酸的结合能力上,Dye-1和Dye-2要优于Dye-0。

[0159] 实施例15

[0160] Dye-1、Dye-2、Dye-3和Dye-0在乙醇中的荧光量子产率的测定:

[0161] 配置一定浓度的化合物Dye-1、Dye-2、Dye-3和Dye-0的乙醇溶液,满足经紫外可见分光光度计测定最大吸收值 <0.1 。分别选定激发波长测定荧光强度。每种染料均平行测定三次,算出荧光量子产率,取平均值,在室温下进行测定。以罗丹明B作为标准物($\Phi_F=0.97$,乙醇)计算,在乙醇溶液中已知化合物M的荧光量子产率 $\Phi_F=1.099 \times 10^{-2}$;Dye-1的荧

光量子产率 $\Phi_F = 1.590 \times 10^{-2}$; Dye-2 的荧光量子产率 $\Phi_F = 1.248 \times 10^{-2}$; Dye-3 的荧光量子产率 $\Phi_F = 1.181 \times 10^{-2}$;。所用仪器为紫外可见分光光度计, 型号: Lambda 35; 荧光分光光度计, 型号: FL-4500。

[0162] 数据显示, 本发明化合物相对已知化合物, 显示出较高的荧光量子产率。

[0163] 已通过上述各实施方案和具体实施例对本发明作出说明, 但本领域技术人员会理解, 在不偏离本发明宗旨和范围的情况下, 可对本发明作出各种修改、变更和替换。

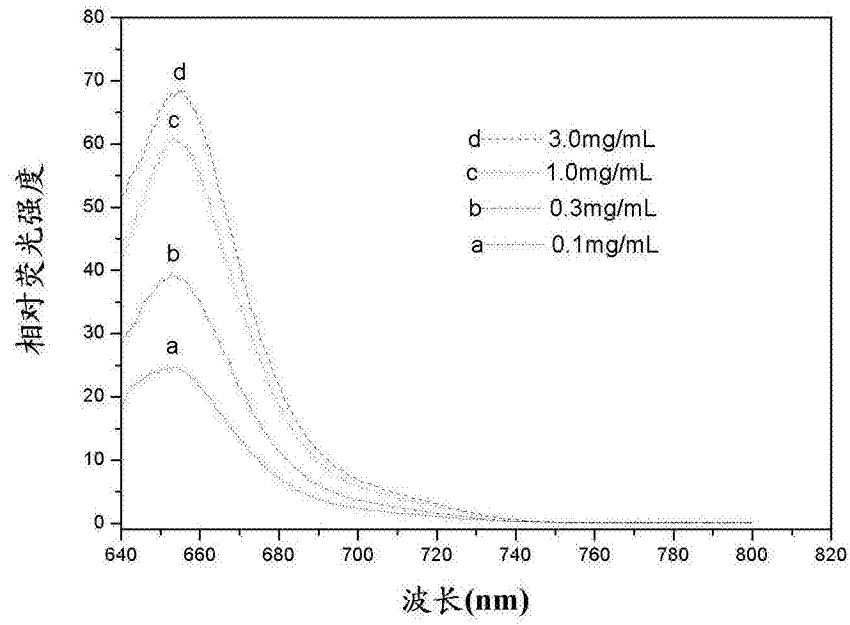


图1

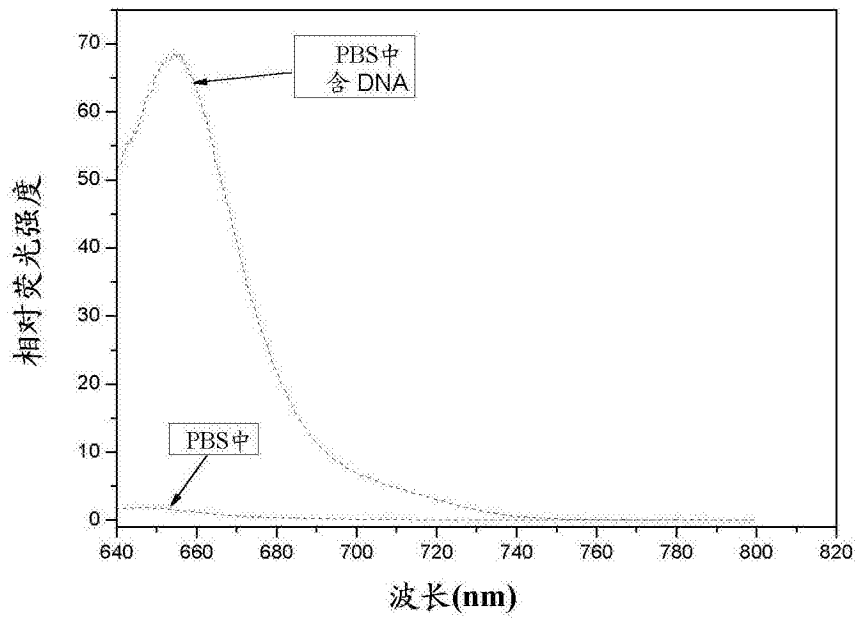


图2

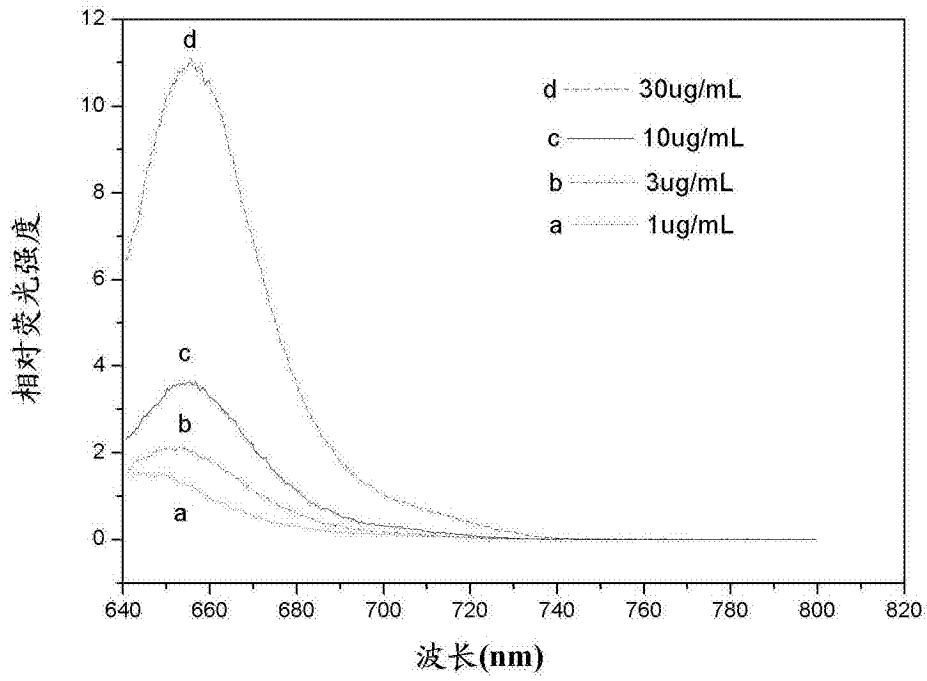


图3

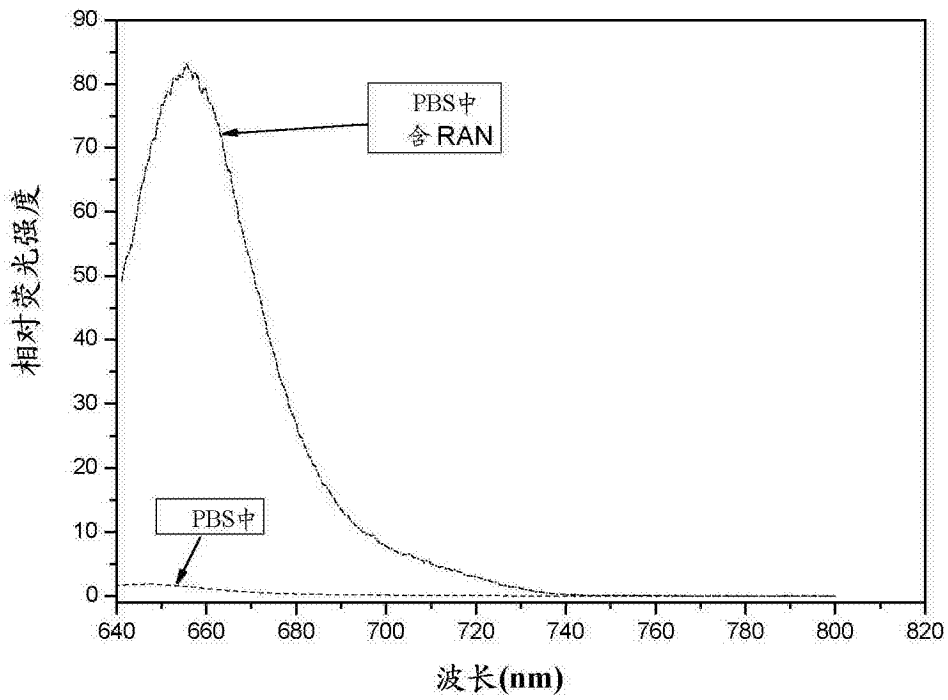


图4

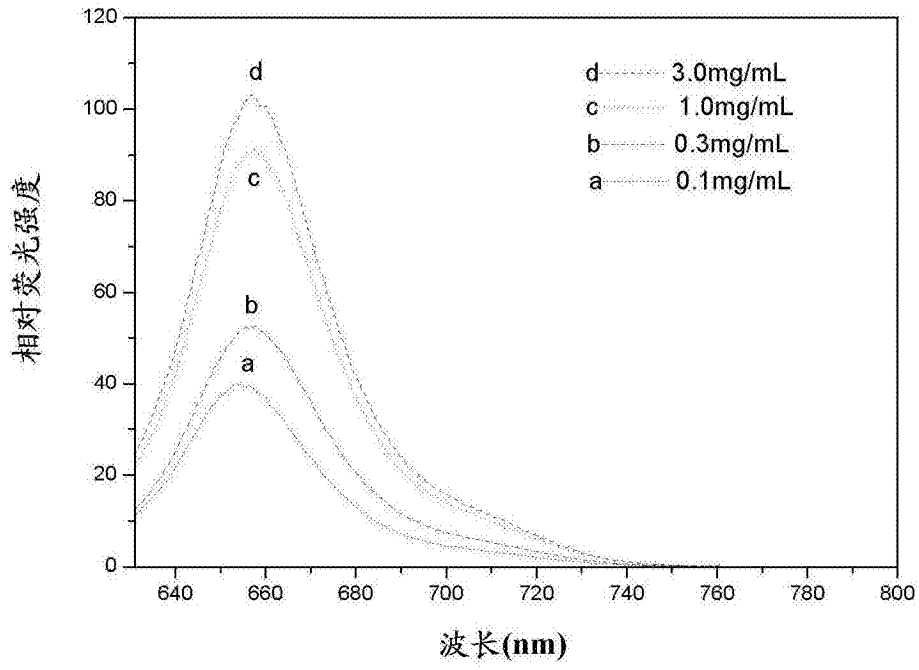


图5

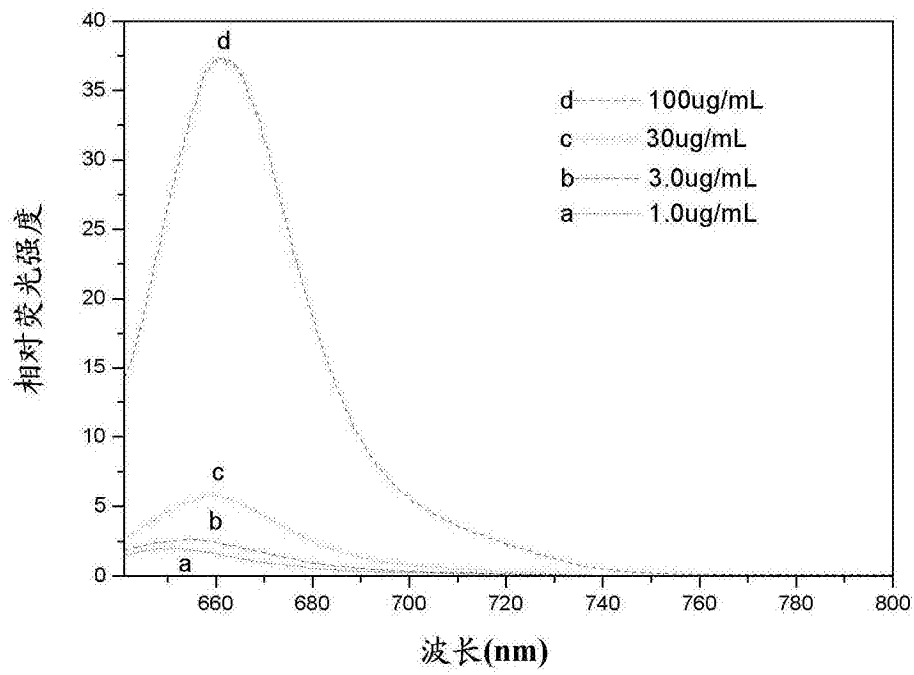


图6

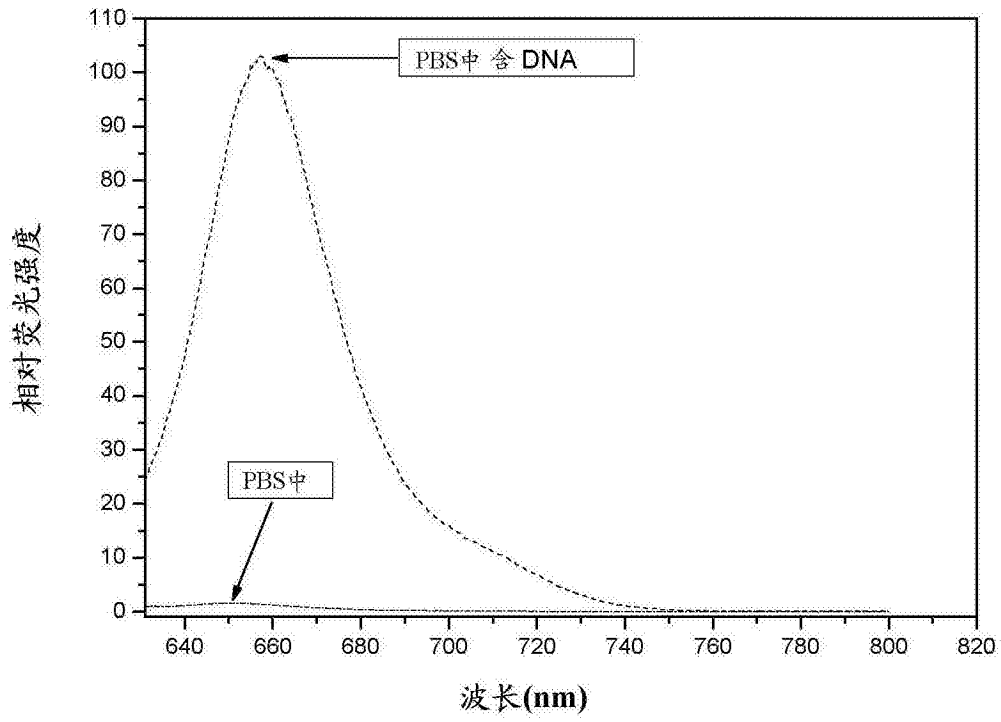


图7

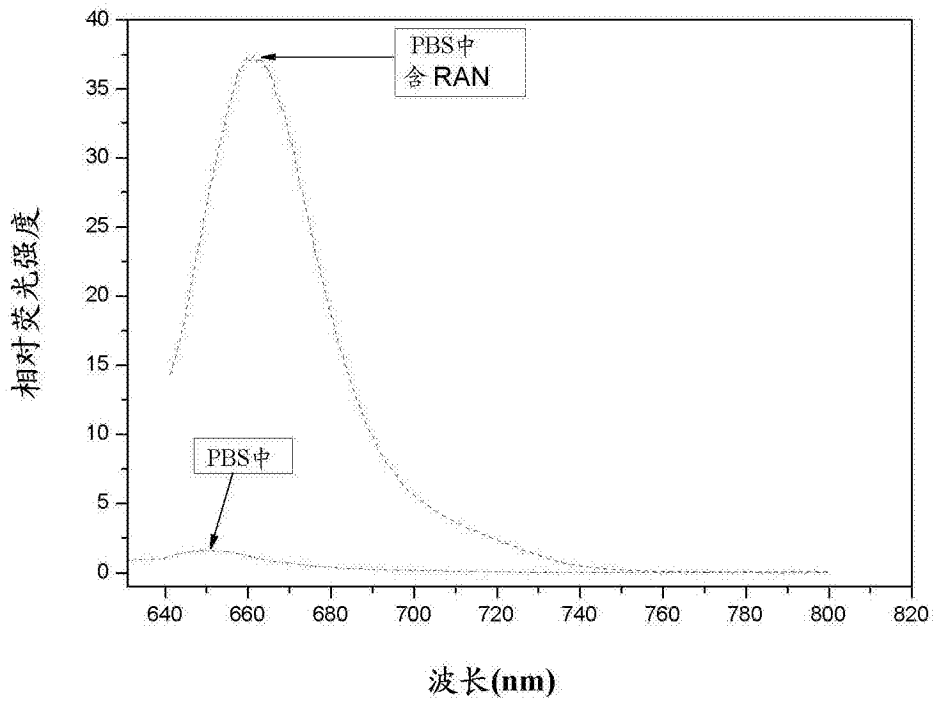


图8

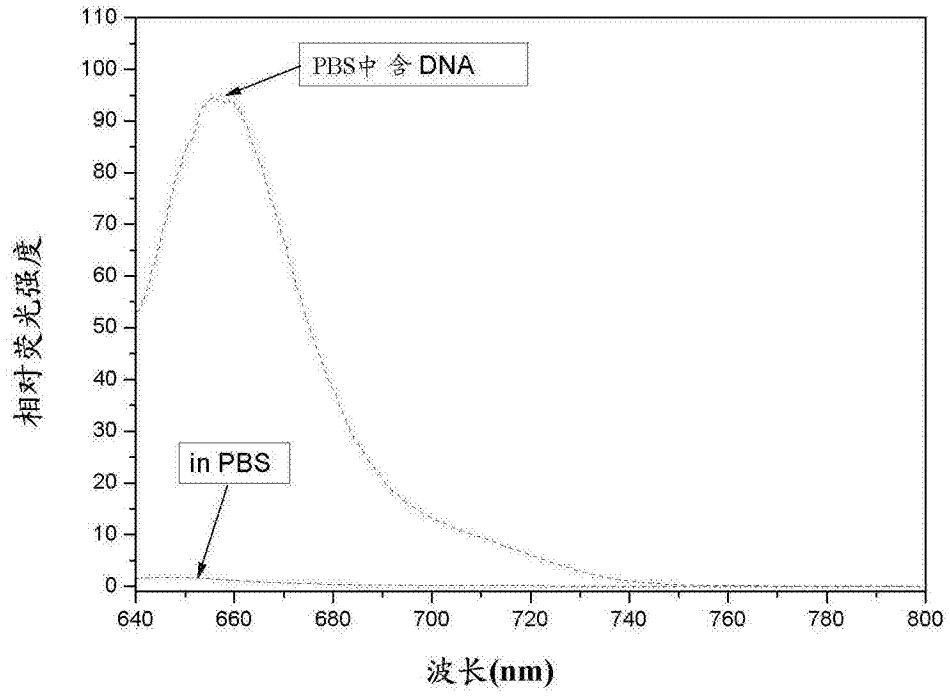


图9

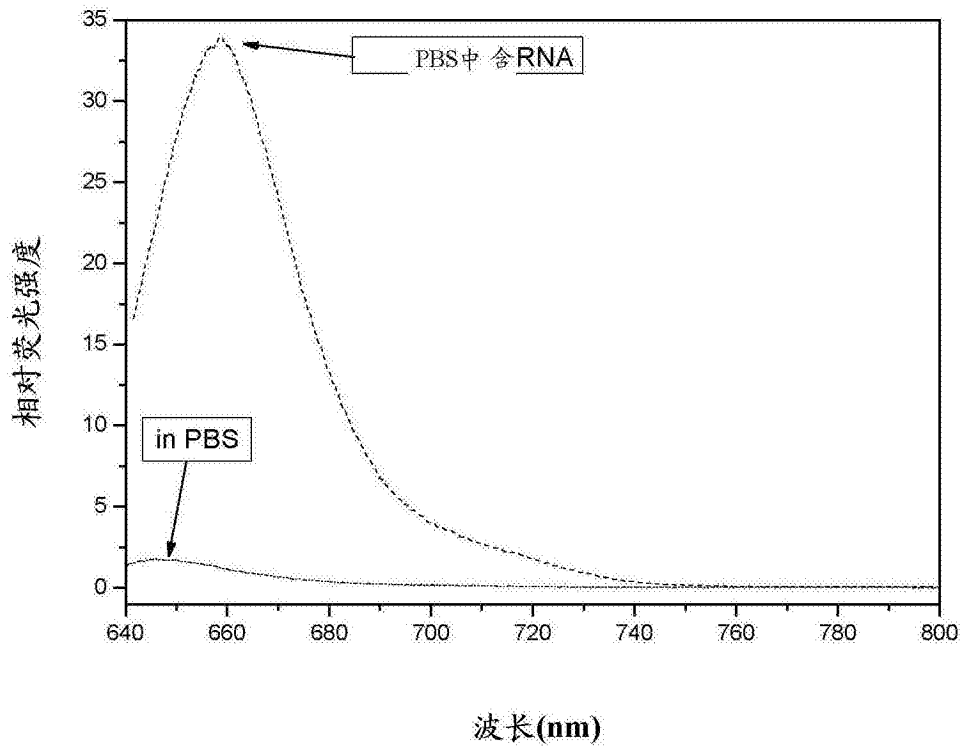


图10

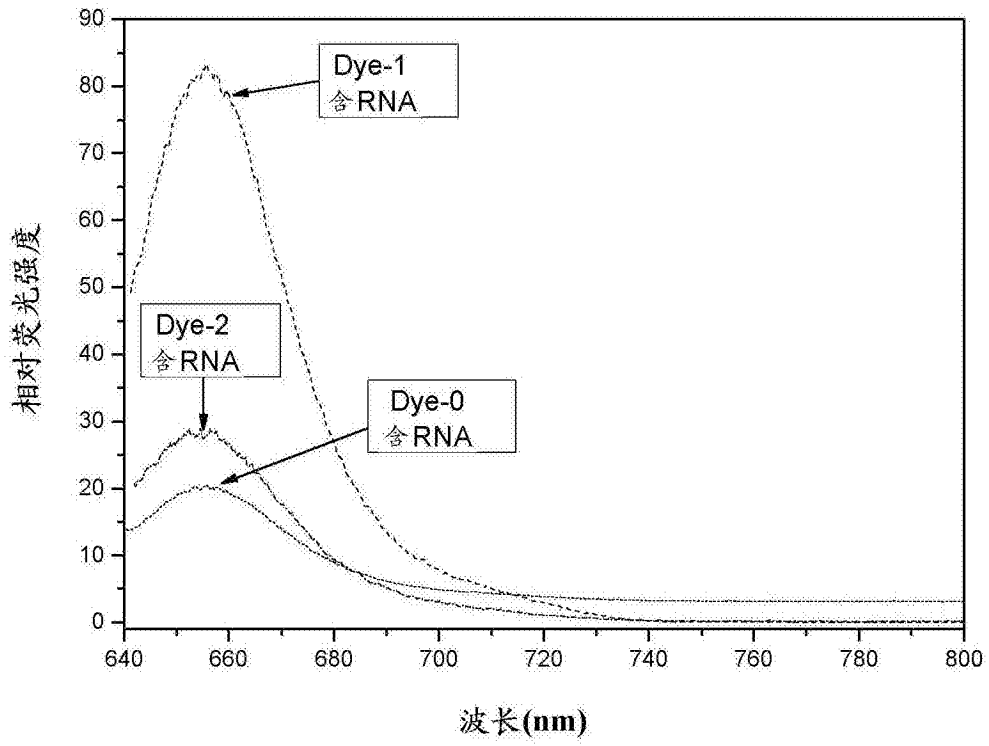


图11