



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 453**

51 Int. Cl.:
G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01918895 .2**

86 Fecha de presentación : **22.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1272655**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Estabilización de colorantes de ácidos nucleicos altamente sensibles en disoluciones acuosas.**

30 Prioridad: **24.03.2000 US 535129**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2007

73 Titular/es: **Cambrex Bio Science Rockland, Inc.**
191 Thomaston Street
Rockland, Maine 04841-2994, US

72 Inventor/es: **Wu, Minjie;**
White, Hugh, W.;
Kusukawa, Noriko y
Stein, Thomas, M.

74 Agente: **Torner Lasalle, Nuria**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estabilización de colorantes de ácidos nucleicos altamente sensibles en disoluciones acuosas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de compuestos cuaternarios para estabilizar colorantes de ácidos nucleicos fluorescentes altamente sensibles en disolventes acuosos. La presente invención se refiere también a una composición novedosa para geles para electroforesis de agarosa precoloreados prefabricados con un aumento de la vida útil de
10 almacenamiento para la detección de ácidos nucleicos de alta sensibilidad. La presente invención se refiere además a composiciones de disolventes que son útiles como disoluciones de colorante listas para su uso.

Antecedentes

15 Los tintes fluorescentes se usan ampliamente para la detección de ácidos nucleicos en ensayos biológicos. En particular, se ha demostrado que una variedad de tintes de cianina asimétrica son altamente sensibles y útiles en electroforesis y otros ensayos basados en disoluciones para el análisis y la detección de ADN y ARN. Productos comerciales tales como los colorantes SYBR[®] Green I y II (Molecular Probes Inc, Eugene OR; patentes de los EE.UU. números 5.436.134 y 5.658.751); colorante GelStar[™] (Bio Whittaker Molecular Applications Inc, Rockland ME, patente de los EE.UU. número 5.863.753); y colorante SYBR Gold (Molecular Probes, Eugene OR) son algunos
20 ejemplos de esos tintes de cianina asimétrica. Estos tintes proporcionan una alta sensibilidad debido a la combinación de un aumento en la fluorescencia de más de 1000 veces con la unión a ácidos nucleicos y de un fondo muy bajo en el estado sin unión. El uso de estos tintes en transiluminación ultravioleta permite la detección de ADN a niveles de picogramo. Se cree que el modo de unión de los tintes a ácidos nucleicos tiene un mecanismo distinto al de los tintes
25 intercalantes de fenantridinio más convencionales tales como bromuro de etidio y yoduro de propidio.

A pesar de la sensibilidad superior de los tintes de cianina asimétrica, estos tintes no son estables en disolventes acuosos. Son estables en disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido, pero deben transferirse a disolventes acuosos antes de usarse en ensayos biológicos. En disolventes acuosos, la sensibilidad de estos tintes para la detección
30 de ADN disminuye aproximadamente a la mitad en un plazo de 4 a 14 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Como resultado los geles para electroforesis prefabricados que se precolorean con estos colorantes sensibles tienen una vida útil de almacenamiento corta y no son útiles de manera fiable, incluso si los geles prefabricados precoloreados con bromuro de etidio están disponibles comercialmente (por ejemplo geles prefabricados Reliant[®], vendidos por Bio Whittaker Molecular Applications). Por tanto, la disponibilidad de geles prefabricados con colorantes altamente
35 sensibles tiene un beneficio sustancial, especialmente para laboratorios de alta capacidad de producción, donde de lo contrario, el gran número de muestras necesitaría la fabricación de numerosos geles.

Se han usado detergentes para mejorar la estabilidad de colorantes de ácidos nucleicos altamente sensibles pero sólo prolongan ligeramente la estabilidad de los colorantes, si acaso lo hacen (véase el ejemplo 1, tabla 1), y no son
40 útiles para geles prefabricados. Los informes de Mathies (Zeng *et al* 1997, Analytical Biochemistry 252: 110-114; Clark *et al* 1997, Analytical Chemistry 69: 1355-1363) describen el uso del ion tetrapentilamonio en tampón TAPS (ácido 3-[tris-(hidroximetil)metilamino]-propanosulfónico) para aumentar la estabilidad de los complejos formados entre ADN y tintes bis-intercalantes. Sin embargo estos informes no sugieren que se lograra la estabilidad de los
45 propios tintes, ni mencionan el efecto sobre los tintes de cianina asimétrica tales como los colorantes SYBR Green y GelStar. Por tanto, existe todavía una necesidad de un método para estabilizar colorantes de ácidos nucleicos altamente sensibles, y para proporcionar un medio para crear geles prefabricados, precoloreados y disoluciones con una vida útil de almacenamiento.

Breve resumen de la invención

50 La presente invención proporciona un método para estabilizar colorantes de ácidos nucleicos fluorescentes altamente sensibles en disolventes acuosos mediante adición de uno o más compuestos cuaternarios al disolvente. También es un objeto de esta invención proporcionar una composición de gel de electroforesis para un sistema de gel de electroforesis prefabricado que incluye un gel, un tampón de electroforesis, un colorante de unión de ácidos nucleicos
55 fluorescente altamente sensible, y uno o más compuesto cuaternarios, haciendo dichos compuestos cuaternarios que los tintes se incorporen en el gel para tener un aumento de la estabilidad en disolventes acuosos. Es además un objeto de esta invención proporcionar una disolución de colorante estabilizada que comprende un disolvente acuoso, un colorante de ácidos nucleicos fluorescente, y una cantidad estabilizadora de uno o más compuestos cuaternarios. Los compuestos cuaternarios de la invención tienen la fórmula estructural general de R₄NX, en la que R₄N es un catión, y
60 cada R es independientemente un grupo alquilo C₁₋₆ o un grupo alcoxilo C₁₋₆; N es nitrógeno, X es un anión haluro o un anión hidroxilo que se disocia del catión (R₄N)⁺ en un entorno acuoso; y en el que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible comprende un tinte de cianina. Los objetos y las ventajas anteriores de la presente invención serán evidentes con la consideración de la siguiente descripción detallada.

65 **Descripción detallada de la invención, y la realización preferida**

Se proporciona un método de prolongación de la vida útil de almacenamiento de colorantes fluorescentes en disolución acuosa, mediante la adición de uno o más compuestos cuaternarios al disolvente acuoso que contiene el colorante.

El compuesto cuaternario tiene una fórmula estructural R_4NX^- en la que R_4 consiste en cuatro cadenas de alcóxido o alquilo C_{1-6} homogéneas o heterogéneas que se unen covalentemente a un nitrógeno cuaternario, N; y X^- es un anión que se disociará del catión $(R_4N)^+$ en un entorno acuoso. En realizaciones preferidas, X^- es un anión hidróxido o haluro. En realizaciones más preferidas, X^- es un ion bromuro o cloruro. El compuesto cuaternario se disuelve fácilmente en el sistema acuoso y puede estar presente en cualquier cantidad eficaz. En general, el compuesto cuaternario está presente en concentraciones de entre 1 mM a 200 mM, que pueden optimizarse según el uso. Cuando se usa en geles para separación electroforética de ácidos nucleicos y proteínas, la concentración útil del compuesto cuaternario está entre 5 y 20 mM.

Los colorantes fluorescentes se utilizan ampliamente para la detección de moléculas biológicas. Un grupo de este tipo son las cianinas asimétricas que fluorescen con la unión a ácidos nucleicos, que incluyen pero no se limitan a compuestos tales como los colorantes de ácidos nucleicos SYBR Green I y II, SYBR Gold, y GelStar, y sus derivados, y otros colorantes descritos en la patente de los EE.UU. número 5.436.134, patente de los EE.UU. número 5.658.751, y patente de los EE.UU. número 5.863.753. Cuando estos colorantes están en sistemas acuosos (tales como geles para electroforesis o tampones biológicos) y en presencia de los compuestos cuaternarios mencionados, hay un aumento de al menos 4 veces en la semivida de estos colorantes. Para los fines de la presente invención, la semivida, o $t_{1/2}$ se define como el tiempo que lleva que los colorantes pierdan la mitad de su intensidad de fluorescencia que resulta de la unión al ADN. Las sales cuaternarias de tetrametilamonio, tetrabutilamonio, y tetrapentilamonio son realizaciones particularmente preferidas. Los hidróxidos de amonio cuaternario se usan convenientemente como parte del sistema tampón (tal como en el caso del tampón TAPS) y son particularmente compatibles con electroforesis en gel de alta resolución. Los haluros de amonio cuaternario pueden usarse convenientemente para complementar disolventes tamponados o no tamponados para el almacenamiento de colorantes. Puede usarse una combinación de dos o más compuestos cuaternarios mientras que ésta sea compatible con el uso. No son útiles para los fines de la presente invención, los compuestos de amonio cuaternario con cadenas de carbono de más de 6, tales como pero no limitadas a compuestos de tetrahexilamonio (que no son solubles en disolventes acuosos) y detergentes (véase la tabla I). Sin embargo, pueden usarse detergentes además de los compuestos cuaternarios de la invención para aumentar adicionalmente el efecto estabilizante del colorante. Se muestra un ejemplo en la tabla 3, en la que la adición de detergente a una disolución que contiene hidróxido de tetrametilamonio prolonga la semivida del colorante SYBR Green I en de 1,6 a 2 veces además del aumento de 4 veces ya conseguido por el hidróxido de tetrametilamonio solo.

Además de las cianinas asimétricas mencionadas anteriormente, también pueden estabilizarse los tintes de ácidos nucleicos fluorescentes tales como dímeros y monómeros de cianina mediante los compuestos cuaternarios, mientras que los tintes de ácidos nucleicos de fenantridinio convencionales tales como bromuro de etidio y yoduro de propidio no. Los dímeros y monómeros de cianina preferidos incluyen, pero no se limitan a, TOTO, YOYO, TO-PRO (cada uno disponible comercialmente de Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y Cy3, Cy5 y Cy7 (cada uno disponible comercialmente de Amersham Life Science, Inc., Arlington Heights, IL).

El gel para electroforesis de la invención comprende un hidrogel, un sistema tampón, un tinte de ácidos nucleicos fluorescente, y uno o más compuestos cuaternarios. Los hidrogeles útiles para electroforesis incluyen geles de agarosa y poliacrilamida, aunque cuando se usan geles de poliacrilamida, puede requerirse incorporar el colorante tras la formación del gel para evitar la descomposición del colorante durante la polimerización de la acrilamida. Los tampones usados normalmente para electroforesis incluyen, pero no se limitan a, MOPS, TAPS (cada uno disponible comercialmente de Sigma, St. Louis, MO), TAE (la concentración 1x es Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y puede usarse TBE para la invención, siempre que el pH de los tampones se ajuste apropiadamente tras la adición de los compuestos cuaternarios y que el sistema sea compatible con la separación electroforética. Se prefiere particularmente la combinación de tampón TAPS e hidróxido de tetrapentilamonio. Se prefiere la combinación de tampón TAPS e hidróxido de tetrapentilamonio e hidróxido de tetrabutilamonio. También se prefiere la combinación de tampones TBE o TAE con bromuro de tetrapentilamonio. Los tintes de ácidos nucleicos fluorescentes pueden ser colorantes de cianina asimétrica. Se prefiere particularmente el uso del colorante de ácidos nucleicos GelStar. El uso de geles con colorante SYBR Green o SYBR Gold requiere la optimización de la concentración de colorante y la cantidad de ADN o ARN aplicada al gel con el fin de obtener resultados de electroforesis de alta resolución.

Las disoluciones de tinte estables en almacenamiento de la invención están comprendidas por un tinte de cianina fluorescente, un disolvente acuoso y uno o más compuestos cuaternarios. Las disoluciones pueden usarse para colorear geles tras electroforesis con el fin de visualizar ácidos nucleicos o proteínas que se separaron en los geles.

Ejemplo 1

Estabilización del tinte en geles

Se vaciaron geles de agarosa SeaKem LE (al 1% p/v, BMA Inc) en tampón 1X TAPS (ácido 3-(N-tris(hidroximetil)metilamino)propanosulfónico, 40 mM) en presencia de colorante de ácidos nucleicos 1X GelStar (BMA Inc) y los aditivos indicados en la tabla 1. Se incubaron los geles en la oscuridad durante 6 días a 45°C y se sometieron a prueba para la detección de ADN, tal como sigue: Se sumergieron los geles en tampón de electroforesis 1X TAPS sin tinte. Entonces, se sometió a electroforesis el ADN a través del gel a 20 V/cm durante una hora. Se examinó la intensidad de una banda de ADN de 2,5 ng mediante transiluminación a 300 nm. El colorante en el gel se consideró estabilizado si la intensidad de fluorescencia del ADN fue superior al 80% comparado con cuando el gel estaba recién preparado con el colorante. El colorante de ácidos nucleicos GelStar se estabilizó por la presencia de compuestos de tetrapentilamonio

y tetrabutilamonio, pero no con detergentes de amonio cuaternario. La calidad de resolución del ADN en los geles nuevos se registró como “buena” cuando la banda de ADN era estrecha, “regular” cuando la banda de ADN era ancha y “mala” cuando la banda de ADN era borrosa.

TABLA 1

El efecto de aditivos sobre la estabilidad del colorante de ácidos nucleicos GelStar en geles

10	Aditivo	Concentración	Resolución cuando es nuevo	Estabilización del tinte a 45°C
15	Control	Hidróxido de sodio (NaOH) Valorado el tampón hasta pH 8,2	Regular	No
20	Invención	Hidróxido de tetrapentilamonio (TPAOH)	Regular	Sí
25	Invención	TPAOH	Buena	Sí
30	Invención	Hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH)	Regular	Sí
35	Invención	TPAOH y TBAOH NaOH y bromuro de tetrapentilamonio (TPABr)	Buena	Sí
40	No funcional	Tween-20	Regular	No
45	No funcional	Bromuro de dodeciltri-28 mM metilamonio	Mala	No
50	No funcional	Bromuro de hexadecil-2 mM trimetilamonio	Mala	No

Ejemplo 2

55 Estabilización del tinte en disolución

Se suspendió el colorante de ácidos nucleicos SYBR Green I (1X, BMA Inc) en los disolventes indicados (tabla 2) y se guardó en botellas de polipropileno a 21-23°C con luz ambiental. El tampón TBE a una concentración 1X consistió en Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 2 mM. Periódicamente, se mezclaron 5 µl de las disoluciones con 3 ng de ADN de lambda, y luego se aplicaron como una mancha en una placa Petri de poliestireno (VWR, MA). Se excitó la mancha a 500 nm (Dark Reader, Clare Chemical Research, CO) y se capturó la intensidad de fluorescencia y se integró sobre un área superficial constante mediante el analizador AlphaImager (“Spot Density Tools” (herramientas de densidad de las manchas), Alpha Innotech, CA). Los números se normalizaron entonces frente a la intensidad en tiempo cero. Se registró el tiempo que lleva que el colorante pierda la mitad de su intensidad de fluorescencia como t_{1/2}. El t_{1/2} del colorante de ácidos nucleicos SYBR Green I sin los aditivos de la invención fue de entre 5 y 14 días, dependiendo del tipo de disolvente control.

TABLA 2

Disolventes

Disolvente		Composición	t½ del colorante SYBR Green I en el disolvente
A	Control	Tampón 1xTAPS, valorado con NaOH 1 N hasta pH 8,2 a 25°C	5 días
B	Invención	Tampón 1xTAPS, TPAOH 14,6 mM (pH 8,2 a 25°C)	92 días
C	Invención	Tampón 1xTAPS, TPAOH 7,3 mM (pH 8,2 a 25°C)	92 días
D	Invención	Disolvente A con TPABr 1,5 mM	24
E	Invención	Disolvente A con TPABr 3,6 mM	25 días
F	Invención	Disolvente A con TPABr 7,3 mM	> 100 días
G	Invención	Disolvente A con TPABr 14,6 mM	> 100 días
H	Invención	Disolvente A con TPABr 29,2 mM	> 100 días
I	Invención	Disolvente A con TPABr 58,4 mM	> 100 días
J	Invención	Disolvente A con TPABr 116,8 mM	> 100 días
K	Control	Tampón 1x TBE (pH 8,0)	5 días
L	Invención	Disolvente K con TPABr 14,6 mM	67 días
M	Control	Agua (pH 6,8)	14 días
N	Invención	Disolvente M con TPABr 14,6 mM (pH 5,0)	> 100 días

Ejemplo 3

Tintes que se estabilizan por el aditivo

Se sometieron a prueba cianinas asimétricas (colorantes de ácidos nucleicos 1X SYBR Green I, 1X SYBR Gold y 1X GelStar), Hoechst 33258 pentahidratado (bis-bencimida: BisBnz., 1,5 µg/ml) y tintes intercalantes de fenantridinio (bromuro de etidio 1 µg/ml; yoduro de propidio 10 µg/ml) para determinar su respuesta frente al agente estabilizante TPABr. Se sometieron a prueba los tintes en tampón 1X TAPS que se ajustó con NaOH hasta pH 8,2, con o sin TPABr 14,6 mM. Se midió la estabilización del tinte usando el método descrito en el ejemplo 2 excepto en que para la medición de los colorantes bromuro de etidio, yoduro de propidio y Hoechst 33258 se usó la transiluminación a 300 nm. El efecto de TPABr sobre la estabilidad de estos tres compuestos fue mínimo. Por el contrario, el t½ de SYBR Green se extendió hasta más de 100 días (comparado con 5 días sin TPABr), el del colorante SYBR Gold hasta 36 días (comparado con 9 días sin TPABr); y el del colorante GelStar hasta 24 días (comparado con 4 días sin TPABr).

Ejemplo 4

Efecto de detergentes sobre la estabilización del tinte

Se suspendió el colorante de ácidos nucleicos SYBR Green I (1X) en tampón 1X TAPS con los aditivos indicados (tabla 3) y se sometieron a prueba para determinar si se estabilizaba usando el método descrito en el ejemplo 2.

TABLA 3

El efecto de detergentes en combinación con sal cuaternaria

Disolvente		Compuesto añadido	Concentración de detergente	t½ del colorante SYBR Green I
A	Control	NaOH, pH 8,2	0%	5 días
O	Invención	Hidróxido de tetrametil-amonio (TMAOH) 14,6 mM, pH 8,2 Disolvente O con Tween-20	0%	20 días
P	Invención	Disolvente O con dodecil-	0,04% (v/v)	40 días
Q	Invención	sulfato de sodio Disolvente O con octil éter de	0,05% (p/v)	32 días
R	Invención	polioxietileno 5	1,39% (v/v)	38 días

REIVINDICACIONES

1. Método para estabilizar un colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible en disolventes acuosos que comprende añadir uno o más compuestos cuaternarios al disolvente, en el que el componente cuaternario tiene una fórmula estructural de R_4NX , en la que R_4N es un catión, y cada R es independientemente un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo alcoxilo C_{1-6} ;
N es nitrógeno;
X es un anión haluro o un anión hidroxilo que se disocia del catión $(R_4N)^+$ en un entorno acuoso; y
en el que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible comprende un tinte de cianina.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto cuaternario está presente en una concentración en el intervalo de 1 mM a 200 mM.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto cuaternario está presente en una concentración en el intervalo de 5 mM a 20 mM.
4. Método según la reivindicación 1, en el que el compuesto cuaternario comprende una sal de tetrapentilamonio, una sal de tetrabutilamonio, o una mezcla de sal de tetrapentilamonio y sal de tetrabutilamonio.
5. Método de la reivindicación 1, en el que el compuesto cuaternario comprende bromuro de tetrapentilamonio, cloruro de tetrapentilamonio, o hidróxido de tetrapentilamonio.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el tinte de cianina comprende un tinte de cianina asimétrica.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible comprende los colorantes SYBR Green I, SYBR Green II, GelStar, y SYBR Gold, o un derivado de los mismos.
8. Composición de gel para electroforesis que comprende un gel, un tampón de electroforesis, un colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible, y una cantidad estabilizadora de uno o más compuestos cuaternarios, en la que el compuesto cuaternario tiene una fórmula estructural de R_4NX ,
en la que R_4N es un catión y cada R comprende independientemente un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo alcoxilo C_{1-6} ;
en la que N es nitrógeno;
en la que X es un ion haluro o un anión hidroxilo que se disocia del catión $(R_4N)^+$ en un entorno acuoso; y
en la que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible comprende un tinte de cianina.
9. Composición según la reivindicación 8, en la que dicho compuesto cuaternario está presente en una concentración en el intervalo de 1 mM a 200 mM.
10. Composición según la reivindicación 8, en la que dicho compuesto cuaternario está presente en una concentración en el intervalo de 5 mM a 20 mM.
11. Composición según la reivindicación 8, en la que el compuesto cuaternario comprende una sal de tetrapentilamonio, una sal de tetrabutilamonio, o una mezcla de sal de tetrapentilamonio y sal de tetrabutilamonio.
12. Composición según la reivindicación 8, en la que el tinte de cianina comprende un tinte de cianina asimétrica.
13. Composición según la reivindicación 8, en la que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente altamente sensible comprende los colorantes SYBR Green I, SYBR Green II, GelStar, y SYBR Gold, o derivados de los mismos.
14. Composición según la reivindicación 8, en la que gel comprende agarosa, el colorante es GelStar; y
el compuesto cuaternario comprende hidróxido de tetrapentilamonio, bromuro de tetrapentilamonio, o una combinación de hidróxido de tetrapentilamonio e hidróxido de tetrabutilamonio.
15. Composición según la reivindicación 8, en la que el gel comprende agarosa y el colorante es SYBR Green I.
16. Disolución de colorante estabilizada que comprende un disolvente acuoso, un colorante de ácidos nucleicos fluorescente, y una cantidad estabilizante de uno o más compuestos cuaternarios, en la que dicho compuesto cuaternario tiene una fórmula estructural de R_4NX ,

ES 2 272 453 T3

en la que R_4N es un catión y cada R comprende independientemente un grupo alquilo C_{1-6} o un grupo alcóxido C_{1-6} ;

en la que N es nitrógeno;

en la que X es un anión haluro o un anión hidróxido que se disocia del catión $(R_4N)^+$ en un entorno acuoso; y

en la que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente comprende un tinte de cianina.

17. Disolución de colorante según la reivindicación 16, en la que dicho compuesto cuaternario está presente en una concentración en el intervalo de 1 mM a 200 mM.

18. Disolución de colorante según la reivindicación 16, en la que dicho compuesto cuaternario está presente en una concentración en el intervalo de 5 mM a 20 mM.

19. Disolución de colorante según la reivindicación 16, en la que el compuesto cuaternario comprende o bien sal de tetrapentilamonio, una sal de tetrabutilamonio, o una mezcla de sal de tetrapentilamonio y sal de tetrabutilamonio.

20. Disolución de colorante según la reivindicación 16, en la que el tinte de cianina comprende un tinte de cianina asimétrica.

21. Disolución de colorante según la reivindicación 16, en la que el colorante de ácidos nucleicos fluorescente comprende los colorantes SYBR Green I, SYBR Green II, GelStar, y SYBR Gold o un derivado de los mismos.