

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 2 月 23 日 (23.02.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/019983 A1

(51) 国际专利分类号:
C09B 23/04 (2006.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)
C09K 11/06 (2006.01) *G01N 27/447* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/086524

(22) 国际申请日: 2022 年 4 月 13 日 (13.04.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110958363.6 2021 年 8 月 20 日 (20.08.2021) CN

(71) 申请人: 四川大学 (SICHUAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国四川省成都市一环路南一段 24 号刘文娟, Sichuan 610065 (CN)。

(72) 发明人: 吴鹏 (WU, Peng); 中国四川省成都市一环路南一段 24 号刘文娟, Sichuan 610065 (CN)。
王彦莹 (WANG, Yanying); 中国四川省成都市一

环路南一段 24 号刘文娟, Sichuan 610065 (CN)。
董真 (DONG, Zhen); 中国四川省成都市一环路南一段 24 号刘文娟, Sichuan 610065 (CN)。
李显明 (LI, Xianming); 中国四川省成都市一环路南一段 24 号刘文娟, Sichuan 610065 (CN)。
杨琴 (YANG, Qin); 中国四川省成都市一环路南一段 24 号刘文娟, Sichuan 610065 (CN)。

(74) 代理人: 成都点睛专利代理事务所 (普通合伙) (CHENGDU, DIANJING IP AGENCY); 中国四川省成都市成华区一环路东一段 159 号电子信息产业大厦 304 室刘文娟, Sichuan 610054 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC,

(54) Title: NUCLEIC ACID FLUORESCENT DYE AND PREPARATION AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种核酸荧光染料及其制备和应用

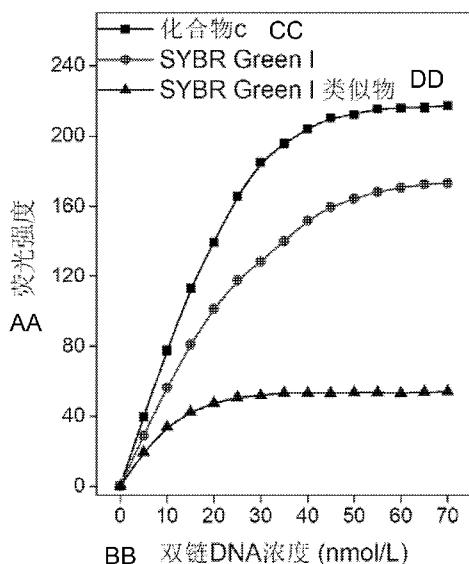
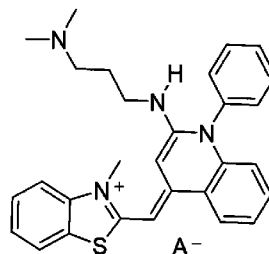


图 2



式 I

AA Fluorescence intensity
BB Double stranded DNA concentration
CC Compound c
DD Analog

(57) Abstract: A novel nucleic acid fluorescent dye, the structural formula of the fluorescent dye being shown in formula I, A⁻ being a chloride ion, a bromide ion, or an iodide ion. By means modifying the structure of the dye, another compound with high sensitivity, good stability, readily available raw materials, simple synthesis, low sequence preference, and small inhibitory effect on PCR is provided.

(57) 摘要: 一种新型的核酸荧光染料, 所述荧光染料的结构式如式 I 所示, 其中, A⁻ 为氯离子、溴离子或碘离子。通过对染料进行结构改造, 提供另一种灵敏度高、稳定性好、原料易得、合成简单、序列偏好低、对 PCR 的抑制性小的化合物。

LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种核酸荧光染料及其制备和应用

技术领域

本发明涉及荧光染料领域，特别是涉及一种新型的核酸荧光染料。

背景技术

荧光染料，指吸收某一波长的激发光后可以发射出特定波长的荧光物质。将荧光染料与不发射荧光的物质以某种方式结合，可以有选择性地将该物质的化学信号转变为易被分析仪器测量到的荧光信号，从而实现对特定目标的荧光检测。该检测方法具有灵敏性高，选择性好，可实现可视化以及生物体内实时、非破坏性在线监测等优势，因此在生物分析领域得到广泛的应用。

核酸（如 DNA 及 RNA）是生命体遗传信息的载体，由于其携带信息量大，并且在细胞内含量相对稳定经常被作为目标分析物。目前，荧光检测是实现核酸分析的主流方法。除通过共价偶联标记荧光染料外，非共价结合的“发光探针”（即核酸荧光染料）是核酸定性定量分析最有利的手段。荧光染料可与核酸分子非共价结合，通过结合前后自身荧光性质的巨大差异实现对靶标核酸分子的检测。这类荧光染料被广泛用于各种状态下，如溶液、凝胶电泳、细胞内及环境中等的核酸分析。目前，市售的核酸分析荧光染料较多，其中由美国 Invitrogen 公司销售的 SYBR 系列染料性能优异，占据了国际上大部分的核酸染料市场。

在 SYBR 系列的染料中，应用最广的是 SYBR Green I，因其具有低背景、低毒性及超高的灵敏度已被广泛应用于 DNA 常规分析、DNA 凝胶染色以及作为实时定量 PCR（qPCR）常规检测专用的核酸染料。然而，SYBR Green I 仍有如下不足：

（1）首先，应用于 qPCR 的染料在 PCR（105°C-55°C）和保存期间（-20°C-4°C）应具有优异的化学稳定性。这就要求染料及其与核酸分子的复合物应具备一定的热稳定性。此外，qPCR 多使用 Tris 作为缓冲液，低温为碱性高温为微酸性。因此，要求染料也具备较好的酸碱稳定性。然而，在上述条件下 SYBR Green I 并不具备良好的稳定性；

（2）SYBR Green I 对 PCR 过程具有浓度依赖的抑制效果，高浓度的染料使用会抑制 PCR 过程；

（3）在核酸的常规分析中（包括 qPCR 以及凝胶电泳成像），染料结合 DNA 的序列应偏好低或没有。但据文献报道，SYBR Green I 存在较明显的 A-T 序列偏好（参见 Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Nucleic Acids Res 32:103e）；

(4) 根据 Invitrogen 公司提供的使用说明, SYBR Green I 在 DMSO 中可保持良好的稳定性, 在水溶液中稳定性差;

(5) 另外, 虽然 SYBR Green I 荧光性能优异, 但根据逆合成分析, 其合成极其困难, 并且收率极低 (小于 2%)。此外, 由于其原料的价格较高致使 SYBR Green I 价格昂贵 (规格 10000 x, 1 mL 的储备液官方售价高达 1 万元左右), 在实际应用中成本居高不下。

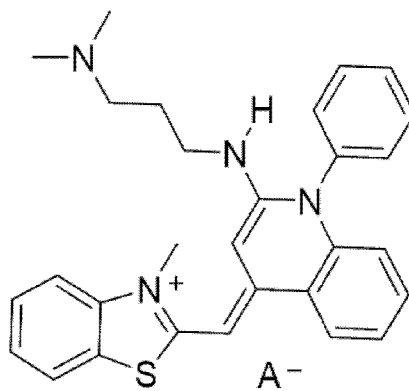
尽管 Invitrogen 公司还售有另一种染料 SYBR Safe, 价格较低且诱变性低, 可以作为 SYBR Green I 的替代品, 但是这种替代的染料水溶性和灵敏度不够理想。

发明内容

针对现有技术中高效的核酸荧光染料 (如 SYBR Green I) 不稳定、高浓度影响 PCR 过程、合成困难等缺点, 本发明对染料进行结构改造, 提供另一种灵敏度高、稳定性好、原料易得、合成简单、序列偏好低、对 PCR 的抑制性小的化合物。

本发明的技术方案:

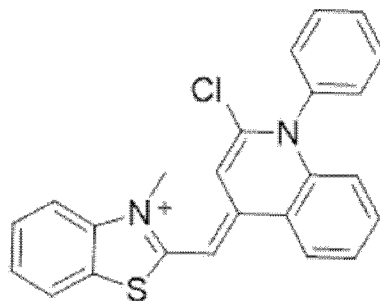
本发明要解决的第一个技术问题是提供一种荧光染料, 所述荧光染料的结构式如式 I 所示:



式 I

其中, A^{-} 为氯离子、溴离子或碘离子。

本发明要解决的第二个技术问题是提供上述荧光染料的制备方法, 所述制备方法为: 将式 II 所示的化合物与单体 M 室温下在溶剂中搅拌反应 6~24 h 得混合物, 然后将混合物纯化处理得式 I 所示的荧光染料; 其中, 所述单体 M 为烷胺基取代的丙胺。



式 II。

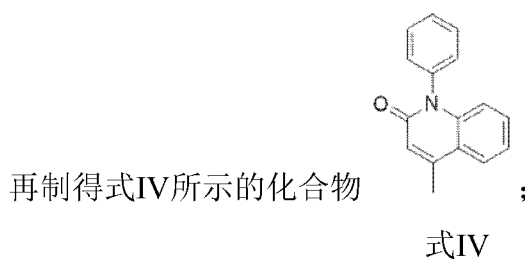
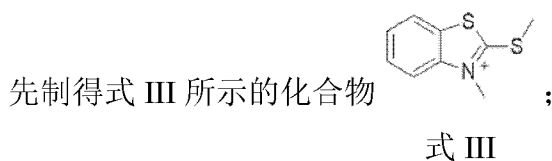
进一步，上述制备方法中，式 II 所示的化合物与单体 M 的当量比为 1:1~1:5。

进一步，上述制备方法中，单体 M 选自：N,N-二甲基-1,3-二氨基丙烷或 3-二乙胺基丙胺。

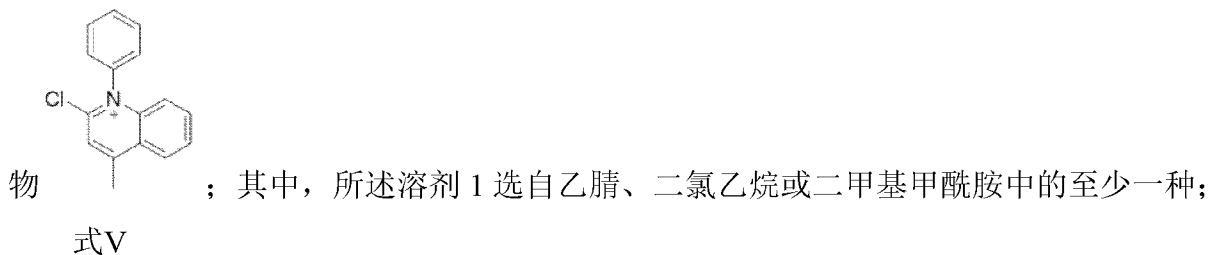
进一步，上述制备方法中，所述溶剂为乙醇或二氯甲烷。

进一步，上述反应中，搅拌时间为 6~12 小时。

进一步，所述式 II 所示的化合物采用下述方法制得：



将式 IV 所示的化合物与三氯氧磷在溶剂 1 中于 65℃~85℃ 回流反应得式 V 所示的化合物



式 V 所示的化合物与式 III 所示的化合物在溶剂 2 中，以当量比为 1:1~1:3 于室温下混合得式 II 所示的化合物；所述溶剂 2 为乙醇或二氯甲烷。

进一步，式 III 所示的化合物采用下述方法制得：用甲基化试剂（如碘甲烷）将 2-甲基巯基苯并噻唑（含有或不含有取代基）通过甲基化反应即得式 III 所示的化合物。

进一步，式 IV 所示的化合物采用下述方法制得：将 2-羟基-4-甲基喹啉与碘苯或苯硼酸

在催化剂的作用下制得式IV所示的化合物；其中，所述催化剂为醋酸铜、碳酸钾和铜粉。

本发明要解决的第三个技术问题式提供上述荧光染料的用途，其可用在 qPCR 分析或凝胶电泳成像。

本发明首次发现，当使用式 II 所示的化合物与 N,N-二甲基-1,3-二氨基丙烷等单体为原料时，仅在室温下搅拌反应 6~24 h 就能够得到一类新型荧光染料（式 I），并且所得荧光染料较 SYBR Green I 具有更高的核酸分子响应灵敏度，与核酸结合之后具有更高的热稳定性，同时还能够提高核酸分子的熔解温度。

另外，本发明荧光染料中的苯并噻唑和喹啉环通过甲川键连接，其中的单键可自由转动，导致该染料分子在自由状态下存在强烈的分子内扭转电荷转移（TICT）。并且，由于喹啉环上苯基取代基和烷胺基取代基的位阻作用，降低了染料分子聚集堆积的紧密性，进而导致染料单体本身几乎没有荧光。当该荧光染料与核酸分子结合后，其中连接苯并噻唑和喹啉环的甲川键受到核酸分子结构的限制而固定，便于共轭结构的形成，从而可以获得增强的荧光信号。

本发明的有益效果：

1) 本发明提供了一种新型核酸荧光染料的设计，制备该类染料的原料易得、购买渠道众多、成本低廉，同时合成条件简单、容易合成（室温下短时间即可完成反应），并且无需对中间产物进行额外纯化。

2) 本发明所得荧光染料具有优异的荧光性能和良好的稳定性，可以直接用于普通的 PCR 缓冲液（甚至纯水中），不需要添加保护试剂；可特异性识别核酸分子的二级结构；该染料在与核酸分子作用后具有良好热稳定性，可以有效提高核酸分子的熔解温度。

3) 本发明所得荧光染料对核酸分子具有低的序列偏好性，并且具有高灵敏度。通过探测染料与核酸分子混合体系的荧光信号可实现对溶液、凝胶、细胞及环境中核酸分子的高灵敏检测。

附图说明：

图 1 为本发明实施例 1 的化合物 c 的吸收光谱及荧光光谱。

图 2 为本发明化合物 c（-■-），SYBR Green I（-●-）及 SYBR Green I 类似物（-▲-）结合不同浓度双链 DNA 后的荧光强度与相应的双链 DNA 浓度关系的曲线图。

图 3A 为本发明化合物 c（实线）与 SYBR Green I（虚线）结合双链 DNA 样品 dsDNA-2 后的荧光强度对温度关系的曲线图，图 3B 为相应的 dsDNA-2 的熔解曲线。

图 4A 为本发明化合物 c（实线）与 SYBR Green I（虚线）结合双链 DNA 样品 Harpin-1

荧光强度对温度关系的曲线图，图 4B 为相应的 Harpin-1 的熔解曲线。

图 5A 为本发明化合物 c (实线) 与 SYBR Green I (虚线) 结合双链 DNA 样品 dsDNA-3 荧光强度对温度关系的曲线图，图 5B 为相应的 dsDNA-3 的熔解曲线。

图 6 为本发明化合物 c 与 SYBR Green I 对不同 d (A-T) 含量的双链 DNA 荧光响应变化的柱状图。

图 7 左图为本发明化合物 c 在 0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的 qPCR 荧光扩增曲线，图 7 右图为 SYBR Green I 在 0.5 (0.55 x)、1 (1.1 x)、2 (2.2 x)、4 (4.4 x) $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的 qPCR 荧光扩增曲线。

图 8 上图为 1 $\mu\text{mol/L}$ 本发明化合物 c 在引物浓度为 50、100、200、300 nmol/L 浓度下的 qPCR 扩增曲线，图 8 下图为 1 $\mu\text{mol/L}$ (1.1 x) SYBR Green I 在相同条件下的 qPCR 扩增曲线。

图 9 上图为 1 $\mu\text{mol/L}$ 本发明化合物 c 在引物浓度为 50、100、200、300 nmol/L 浓度下的扩增产物熔解曲线，图 8 下图为 1 $\mu\text{mol/L}$ (1.1 x) SYBR Green I 在相同条件下的扩增产物熔解曲线。

图 10 为标准分子量 DNA 在前染方式下的凝胶成像效果对比图，左图为 1 $\mu\text{mol/L}$ (1.1 x) SYBR Green I 以及右图为 1 $\mu\text{mol/L}$ 本发明化合物 c。

图 11 为标准分子量 DNA 在后染方式下的凝胶成像效果对比图，左图为 1 $\mu\text{mol/L}$ (1.1 x) SYBR Green I 以及右图为 1 $\mu\text{mol/L}$ 本发明化合物 c。

图 12 左图为 1 $\mu\text{mol/L}$ (1.1 x) SYBR Green I 以及 1 $\mu\text{mol/L}$ 本发明化合物 c 对 PCR 扩增产物在前染方式下的凝胶成像效果对比图，图 12 右图为后染方式下的凝胶成像效果对比图。

图 13 为本发明化合物 c 在 55°C 检测的荧光强度与经历热循环次数的关系图。

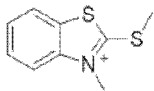
图 14A 为本发明化合物 c (-●-) 与 SYBR Green I (-■-) 在纯水中吸光度与时间变化的关系图，图 14B 为本发明化合物 c (-●-) 与 SYBR Green I (-■-) 在 Tris-HCl 缓冲溶液中吸光度与时间变化的关系图。

图 15 化合物 c 与 SYBR Green I 的合成路线、成本对比图。

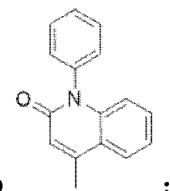
具体实施方式

本发明的荧光染料可采用下述制备方式制得，制备方法包括以下步骤：

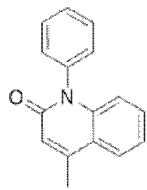
1) 先用甲基化试剂 (如碘甲烷) 将 2-甲巯基苯并噻唑 (含有或不含有取代基) 进行

甲基化反应，得到化合物 a  ;

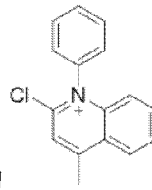
2) 将 2-羟基-4-甲基喹啉与苯硼酸在醋酸铜的催化下得到化合物 b



3) 将



与三氯氧磷混合，得到化合物



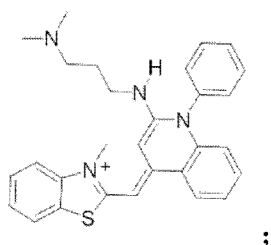
，随后将其与化合物



混合得到化合物

，其与 N,N-二甲基-1,3-二氨基丙烷反应，可

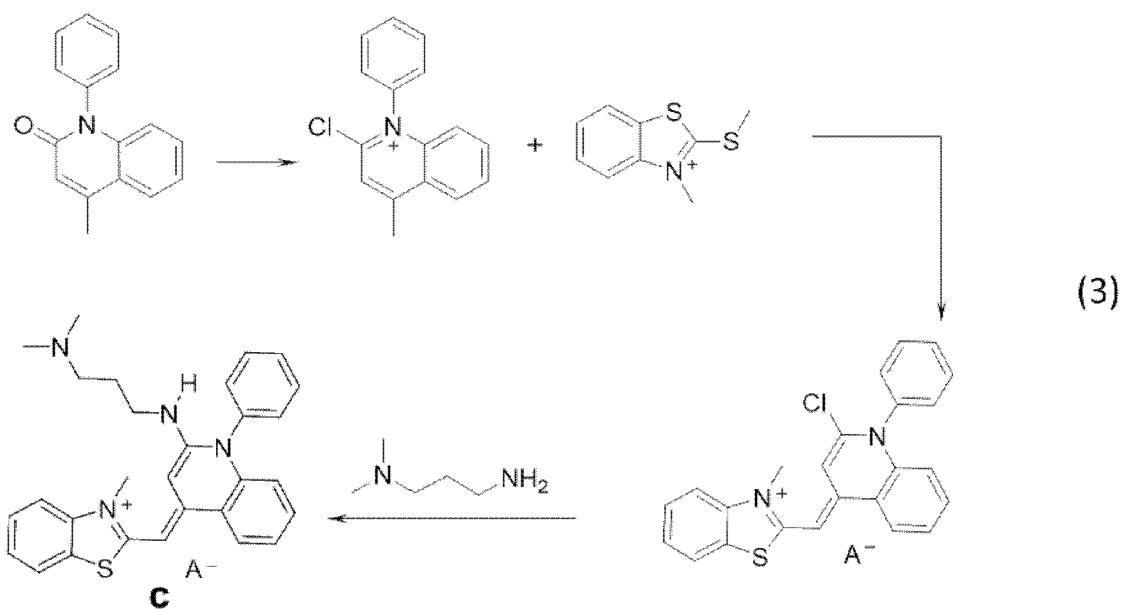
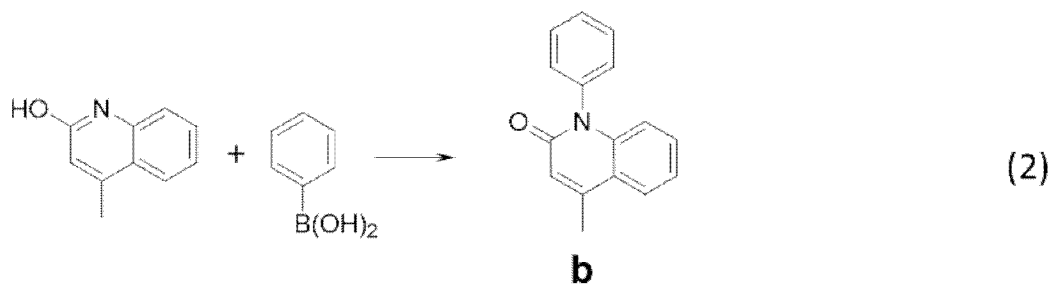
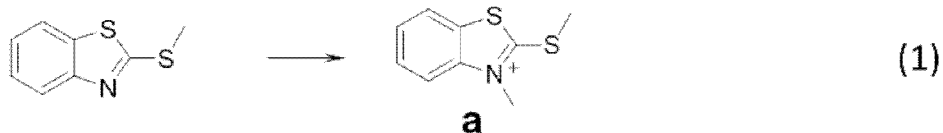
得到最终的染料结构



；

具体的反应式如下：

7

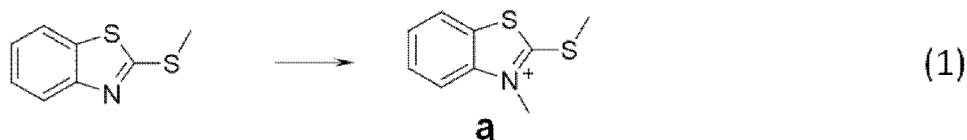


下面结合实施例对本发明的具体实施方式做进一步的描述，并不因此将本发明限制在所述的实例范围之中。

实施例 1：本发明核酸荧光染料的制备

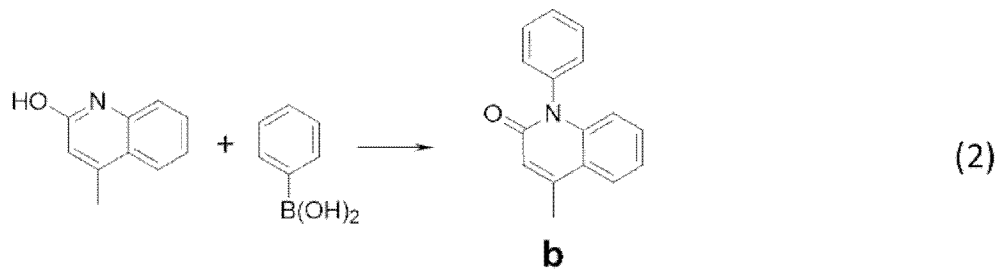
制备方法如下：

1) 将原料 2-甲巯基苯并噻唑 (1.5 g, 8.3 mmol, 1eq) 溶于 30 mL 的干燥乙醇中，加入碘甲烷 (1.4 g, 10 mmol, 1.2 eq)，60°C 下反应 5 小时。反应完成后，移除溶剂，使用石油醚多次清洗，利用抽滤的方法收集米白色固体产物 a：

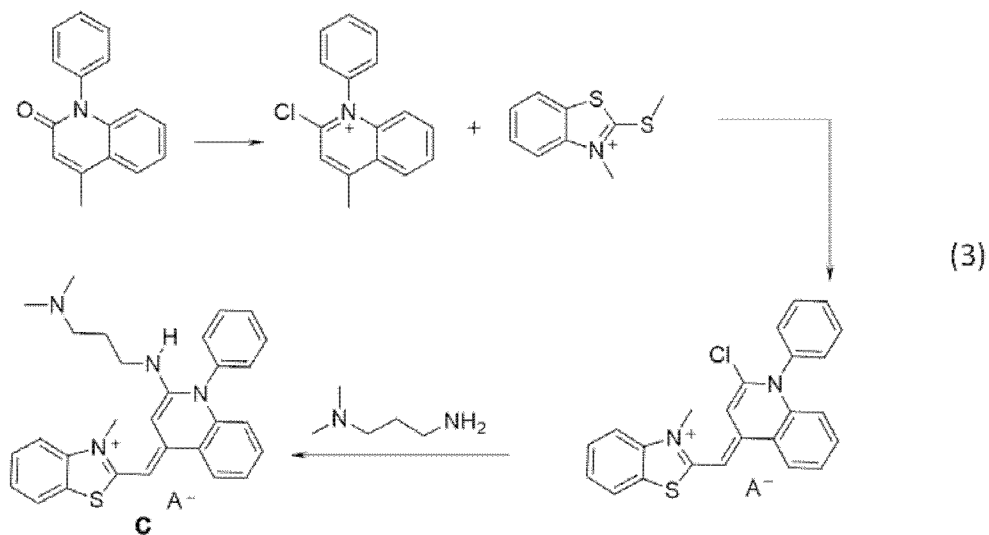


2) 将原料 2-羟基-4-甲基喹啉 (3.0 g, 18.8 mmol, 1 eq) 及苯硼酸 (2.3g, 18.8 mmol, 1 eq) 和醋酸铜 (3.75g, 18.8 mmol, 1 eq) 溶于 150-250 mL 的二氯甲烷中，常温搅拌反应

48-96 h 后, 减压抽滤。将过滤液用水萃取三次, 留取二氯甲烷相萃取液, 加入无水氯化钙干燥 1-2 h。浓缩萃取液, 通过 SiO_2 柱纯化后得到白色固体 **b**:



3) 将产物 **b** (100 mg, 0.4 mmol, 1 eq) 溶于 30 mL 乙腈中, 加入三氯氧磷 (184 mg, 1.2 mmol, 3 eq), 在氮气氛围下 60-85°C 回流 12-24 h。反应完成后, 冷却至室温, 移除溶剂, 与化合物 **a** 一起溶于 20-30 mL 二氯甲烷, 室温下边搅拌边滴加三乙胺至无明显白烟冒出。室温下搅拌 5 h 后滴加原料 *N,N*-二甲基-1,3-二氨基丙烷 (122 mg, 1.2 mmol, 3 eq), 室温下继续搅拌 6-24 h, 浓缩反应混合物, 通过 SiO_2 柱纯化分离, 在二氯甲烷和石油醚溶剂中重结晶得到纯的化合物 **c**。



实施例 2: 化合物 **c** 的吸收光谱及荧光光谱

DNA 样品购买自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 为两条互补的寡聚核苷酸链, 如表 1 所示。DNA 样品经 HPLC 纯化, 按照说明书将 DNA 适量溶于 TE 缓冲 (pH 7.4, 10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA) 中配置相应浓度的储备液, 4°C 储存。使用时, 分别加入相同浓度的上述两条单链 (Pro-20 与 Tar-20) 即可形成双链 DNA (dsDNA-1)。

表 1

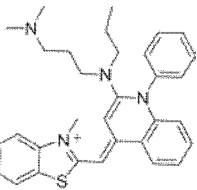
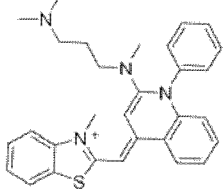
DNA 样品名称		DNA 序列
dsDNA-1	Pro-20	5'-ACAGACACCTACAGACACCT-3'
	Tar-20	5'-AGGTGTCTGTAGGTGTCTGT-3'

在 TE 缓冲中检测化合物 c (1 μmol/L) 的吸收光谱及与 dsDNA-1 (20 bp, 100 nmol/L) 结合后的荧光发射光谱 (图 1 所示)。化合物 c 的吸收峰最大值为 467 nm (蓝光), 结合 DNA 后的荧光最大发射峰位于 505 nm (绿光)。化合物 c 可被 400 nm - 500 nm 区域内的光源激发, 与目前市面上主流的 qPCR 以及化学发光成像仪的光学通道匹配, 这表明该染料可良好的适配于现有仪器。

实施例 3: 化合物 c 用于常规核酸分子定量

DNA 样品同实施例 2。

对比了化合物 c 与化合物 c 的 N-H 键被正丙基封闭后的结构 SYBR Green I

() 以及被甲基封闭后的 SYBR Green I 类似物 () 对不同浓度核酸分子的荧光响应灵敏度。在体积为 200 μL, TE 缓冲液中, 以 5 nmol/L 为浓度梯度, 分别配置含有 0-75 nmol/L 终浓度的 dsDNA-1 与终浓度为 0.5 μmol/L 的化合物 c、SYBR Green I (0.55 x) 及 SYBR Green I 类似物的混合液。使用荧光光谱仪 Fluorolog-3 (HORIBA, 美国) 检测了上述混合物的荧光, 如图 2 所示, 以探测到的荧光强度对 dsDNA-1 浓度作图。首先可以看出, dsDNA-1 浓度为 0 时, 几乎没有检测到荧光信号响应。随着 dsDNA 浓度的增加, 在一定范围内荧光对 DNA 浓度变化呈线性; 而 DNA 浓度较高时, 响应变为非线性, 信号逐渐趋于饱和。线性变化范围内的上升区域斜率代表染料分子对 DNA 浓度变化的响应灵敏度。结果显示, 化合物 c 对 5 nmol/L 的 dsDNA-1 的响应灵敏度明显高于 SYBR Green I 及 SYBR Green I 的类似物。其次, 对比相同浓度的染料与 dsDNA-1 结合饱和后的荧光强度, 化合物 c 的饱和荧光强度要明显高于 SYBR Green I 和 SYBR Green I 类似物。以上结果表明: 相比于 SYBR Green I 以及 SYBR Green I 类似物, 化合物 c 的结构具有独特的优势, 对 DNA 分子具有更好的结合能力和更高的检测灵敏度。

实施例 4: 化合物 c 与核酸分子结合后的热稳定性

DNA 样品制备同实施例 2, DNA 使用序列如表 2 所示。

表 2

DNA 样品名称		DNA 序列
dsDNA-2	Pro-A	5' -CTCTCAGTCTGCATCTCACT-3'
	Tar-B	5' -AGTGAGATGCAGACTGAGAG-3'
dsDNA-3	Pro-60	5' -ACAGACACCTACAGACACCTACAGACACCTACAGACACCTACAGACACCTACAGACACCT -3'
	Tar-60	5' -AGGTGTCTGTAGGTGTCTGTAGGTGTCTGTAGGTGTCTGTAGGTGTCTGTAGGTGTCTGT -3'
Harpin-1		5' -GCAGACACCTACAGACACCTAAAAAATAGGTGTCTGTAGGTGTCTGC-3'

热稳定性测定方案：将含有 1 μmol/L 化合物 c 和 100 nmol/L DNA 样品，与体积为 20 μL, pH = 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液(含 Mg²⁺)在 95 °C保持 15 s 随后退火；在 45 °C保温 15 min 后，使用 StepOnePlus™qPCR 仪（ABI, 美国）每隔+0.5°C采集一次荧光信号（包括 45°C）；升温至 95 °C，保温 30 s（SYBR Green I 的热稳定性测试条件与化合物 c 保持一致）。绘制化合物 c 及 SYBR Green I 与上述不同 DNA 样品形成复合物的荧光强度对温度的曲线（图 3A、图 4A 及图 5A），并对每一点的斜率取负倒数后绘制不同 DNA 样品的熔解曲线（图 3B、图 4B 及图 5B）。测试结果表明：一方面本发明实施例 1 制备的化合物 c 与 DNA 结合后在升温过程中荧光强度的下降速度（在荧光强度变化发生陡降之前较为平缓的变化区域）明显慢于 SYBR Green I, 这表明化合物 c 与 DNA 形成的复合物热稳定性较 SYBR Green I 有显著提升。另一方面对比不同 DNA 样品熔解曲线的峰值处对应的横坐标（即熔解温度值，T_m 值），化合物 c 探测到的 T_m 值也要大于 SYBR Green I（如表 3 所示），进一步证实证明化合物 c 与 DNA 的复合物具有良好的结合能力和热稳定性。

表 3

DNA 样品名称	T _m /°C（SYBR Green I）	T _m /°C(化合物 c)
dsDNA-2	65.2	66.2
Harpin-1	80.6	80.9
dsDNA-3	80.3	80.6

实施例 5：化合物 c 的序列选择性

DNA 样品制备同实施例 2，DNA 使用序列如表 4 所示。

表 4

DNA 样品名称		DNA 序列
AT-1	10%-1	5'-TCCGCGCGCCCGGGCCGCCA-3'
	10%-2	5'-TGGCGGCCCGGGCGCGCGGA-3'
AT-2	100%-1	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
	100%-2	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

在体积为 1 mL, pH = 7.4 TE 缓冲液中分别配置浓度为 100 nmol/L, 含 10%腺嘌呤 (A) -胸腺嘧啶 (T) 的 DNA 样品 (AT-1) 和含 100%腺嘌呤 (A) -胸腺嘧啶 (T) 的 DNA 样品 (AT-2), 并在其中加入终浓度为 1 μ mol/L 的化合物 c。孵育 10 min 后使用荧光光谱仪 Fluorolog-3 (HORIBA, 美国) 测定了化合物 c 与两种不同 DNA 样品形成复合物的荧光强度, 用于对比的 SYBR Green I 的序列选择性测试条件与之保持一致, 结果如图 6 所示。化合物 c 对 A-T 序列偏好的信号响应差异仅为 15%, 明显低于 SYBR Green I (40%), 表明化合物 c 对核酸分子的序列偏好性很低, 适用于核酸分子的常规检测。

实施例 6: 化合物 c 在 qPCR 扩增中的应用

以实施例 1 中制备的化合物 c 为荧光染料, 使用 StepOnePlus™qPCR 仪 (ABI, 美国), 对沙门氏菌中的 invA 基因进行扩增。qPCR 扩增的引物序列如下:

上游引物: 5'-TCCCTTTCCAGTACGCTTCG-3'

下游引物: 5'-TCTGGATGGTATGCCCGGTA-3'

模板基因获取: 使用细菌 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Bacteria DNA Kit, 货号: DP302, TIANGEN, 北京), 按照说明书步骤提取沙门氏菌 DNA。

qPCR 条件: 95°C 保持 20 s 后 55°C 保温 30 s, 并在 55°C 时设定测试荧光强度, 接着在 72°C 延伸 30 s, 共 30-40 个循环。

选用 PCR 试剂盒 (TaKaRa Taq™ HS Low DNA, 货号: R090A, TaKaRa, 日本) 按照使用说明书配制体积为 20 μ L 的反应体系, 包括 Taq™ HS Low DNA (2x), 10 μ L; 上游引物及下游引物各 0.4 μ L (分别含终浓度为 50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L 及 300 nmol/L, DNA); 化合物 c 或用于对比的 SYBR Green I, 2 μ L (分别含终浓度为 0.5 μ mol/L、1 μ mol/L、2 μ mol/L 及 4 μ mol/L); 模板基因, 2 μ L; 加入无菌水补齐至终体积 20 μ L。

1) 比较 qPCR 中化合物 c 与 SYBR Green I 的信号强度

保持其他条件一致, 仅改变化合物 c 浓度的 qPCR 荧光扩增曲线 (荧光强度对循环个数) 如图 7A 所示, 用于对比的不同浓度的 SYBR Green I 如图 7B 所示, 结果表明不同浓度的

化合物 c 所监测到的荧光信号变化幅度和强度都要高于相应浓度下的 SYBR Green I。另外，在较高浓度时，SYBR Green I 出现了较明显的浓度抑制效应，相比于相同浓度下的化合物 c，出现 C_T 值滞后（约 1 个循环）。实验证实了相比于 SYBR Green I，化合物 c 在较大的浓度范围内均能用于核酸的实时扩增检测，并能够实现更加灵敏的检测。

2) 比较 qPCR 中化合物 c 与 SYBR Green I 的扩增曲线

保持其他条件一致（化合物 c 与 SYBR Green I 的浓度均为 $1\ \mu\text{mol/L}$ ），仅改变引物浓度的 qPCR 扩增曲线（纵坐标 ΔR_n 对横坐标循环个数）如图 8A 所示，用于对比的不同浓度的 SYBR Green I 如图 8B 所示。结果表明：本发明所合成的化合物 c 具有较低的扩增背景，并且在低引物浓度（ $50\ \text{nmol/L}$ ）时，相比于 SYBR Green I 也没有明显的浓度依赖性。

3) 化合物 c 监测 PCR 扩增子熔解温度

据报道，SYBR Green I 是监测 qPCR 扩增完成后扩增产物（即扩增子的熔解温度）的有利工具。测定扩增子的熔解温度能提供是否存在非特异性扩增、扩增子是否单一等有价值的信息。据此，同时测定了改变引物浓度，以本发明中化合物 c 监测扩增子的熔解曲线（图 9A），以测试以化合物 c 监测扩增子熔解峰的效果，并与 SYBR Green I（图 9B）进行对比。首先，二者扩增子熔解温度测试结果具有良好的相关性，测定结果一致。其次，相较于 SYBR Green I，化合物 c 的测试基线更低，表明本发明中实施例 1 提供的化合物 c 能够实现对于扩增子熔解温度的检测。

实施例 7：凝胶染色效果对比实验

据报道，凝胶染色目前主要通过两种方式实现：（1）进行分离前，将染料预先加入 DNA 混合液中进行电泳分离后进行荧光成像，即前染法；（2）DNA 混合液进行电泳分离后，将凝胶至于荧光染料的水溶液或缓冲液中浸泡一段时间后进行荧光成像，即后染法；两种使用方式应用都非常普遍。将实施例 1 制备的化合物 c（终浓度为 $1\ \mu\text{mol/L}$ ）与 SYBR Green I（终浓度为 $1\ \mu\text{mol/L}$ ， $1.1\times$ ）分别对前染法（图 10）与后染法（图 11）效果进行对比，使用的 DNA 样品为 25-500 bp DNA 分子量标准 Marker（货号：B600303，BBI，美国）按照使用说明书控制上样量依次为：10 ng、5 ng、2 ng、1 ng 及 0.5 ng。

从前染法（图 10）和后染法的效果对比（图 11）可以看出，本发明实施例 1 制备的化合物 c 两种染色方式都与 SYBR Green I 效果相当，并且在前染法中，与 SYBR Green I 对比，化合物 c 的染色结果没有出现明显的拖尾现象，条带更干净。另外，也对比了化合物 c（终浓度为 $1\ \mu\text{mol/L}$ ）与 SYBR Green I（终浓度为 $1\ \mu\text{mol/L}$ ， $1.1\times$ ）对实施例 6 中产生的扩增子样品进行前染法与后染法的效果对比（图 12），结果表明在实际应用的过程中，化

合物 c 与 SYBR Green I 相比无论前染还是后染,效果相当。并且更明显地,相比于 SYBR Green I 化合物 c 前染实际样品没有的拖尾现象,条带更干净清晰,对不同 DNA 片段的区分更加明显。

实施例 8: 化合物 c 的本征稳定性

一般情况 qPCR 的温度范围为 55°C-105°C, qPCR 试剂储存要在 -20°C-4°C。另外,核酸分子需要在在纯水溶液或者缓冲溶液的环境。这就要求染料分子在水中或缓冲液中稳定,并且同样在温度范围为 55°C-105°C 及 -20°C-4°C 是稳定的。

1) 热稳定性

在体积为 20 μL , 含有终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 c, pH = 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液(含 Mg^{2+})的体系中, 化合物 c 在经历 95°C 保持 20 s、55°C 保温 30 s、72°C 保温 30 s 的 40 次热循环后, 如图 13 所示, 依旧保持稳定(55°C 时设定测试荧光强度), 信号无明显降低, 证实化合物 c 在 qPCR 中的耐用性。

2) 溶液中的稳定性

在体积为 3 mL, 含有终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的化合物 c 或 SYBR Green I (1.1x) 的 pH = 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液(含 Mg^{2+})或纯水的体系中, 每隔 12-24 h 监测化合物 c 及 SYBR Green I 在各自最大吸收波长处的信号变化, 纯水中为图 14A, 缓冲液中为图 14B。结果表明: 纯水中 SYBR Green I 相比于缓冲中极不稳定, 这与已报道的现象是一致的, 在经历 72 h 已有近一半的分子分解; 而经历相同时间化合物 c 无论在纯水中还是缓冲液中都要较 SYBR Green I 稳定。更为重要的是, 化合物 c 在纯水中非常稳定, 这表明化合物 c 的存储环境不如 SYBR Green I 苛刻, 在凝胶染色采用后染法时, 可以直接使用纯水配置无需额外再配置缓冲液, 使用更为方便。

实施例 9: 比较化合物 c 与 SYBR Green I 合成成本

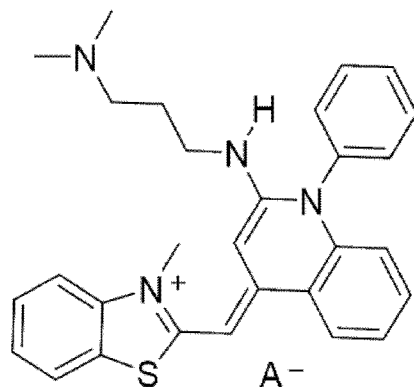
目前, SYBR Green I 是目前市场上应用最为广泛、且相对性价比较高的染料。然而根据对 SYBR Green I 合成路径分析(图 15), 化合物 c 反应条件要求低, 原料购买渠道众多, 无需自行合成, 且价格便宜(试剂价格查询网站: <https://www.bidepharm.com>; <https://www.chemicalbook.com/ProductIndex.aspx>); 仅需三步反应, 无需中间产物纯化, 关键步骤反应无需加热, 且产率更高, 并且上述实验已表明化合物 c 的性能要优于 SYBR Green I。

更为重要的是, 在实际的核酸分子检测中, 染料成本是影响实验总成本的最重要一环。虽然 SYBR Green I 是高灵敏的核酸染料, 但是其价格昂贵, 官方售价约 1 万元 1 mL

(10000x)，其试剂本身成本过高，特别是投放于大规模核酸检测和凝胶电泳成像中。如实施例 7 的凝胶染色实验中已证实了化合物 c 不仅染色效果与 SYBR Green I 相当，甚至效果更优，但化合物 c 合成成本远远低于 SYBR Green I。这表明了化合物 c 能够在保持高灵敏的条件下，能够极大地降低与之匹配的生产成本。

权 利 要 求 书

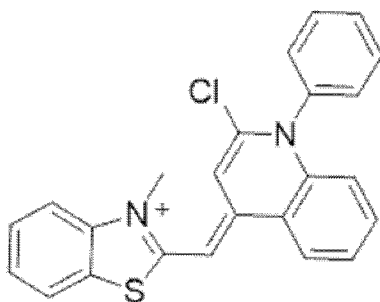
1、一种荧光染料，其特征在于，所述荧光染料的结构式如式 I 所示：



式 I

其中，A⁻为氯离子、溴离子或碘离子。

2、权利要求 1 所述的荧光染料的制备方法，其特征在于，所述制备方法为：将式 II 所示的化合物与单体 M 室温下在溶剂中搅拌反应 6~24 h 得混合物，然后将混合物纯化处理得式 I 所示的荧光染料；其中，所述单体 M 为烷胺基取代的丙胺；



式 II。

3、根据权利要求 2 所述的荧光染料的制备方法，其特征在于，式 II 所示化合物与单体 M 的当量比为 1：1~1：5。

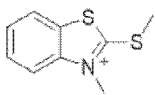
4、根据权利要求 2 或 3 所述的荧光染料的制备方法，其特征在于，所示单体 M 选自：N,N-二甲基-1,3-二氨基丙烷或 3-二乙胺基丙胺。

5、根据权利要求 2 或 3 所述的荧光染料的制备方法，其特征在于，所述溶剂为乙醇或二氯甲烷。

6、根据权利要求 2~5 任一项所述的荧光染料的制备方法，其特征在于，所述搅拌时间为 6~12 小时。

7、根据权利要求 2~6 任一项所述的荧光染料的制备方法，其特征在于，所述式 II 所示的化合物采用下述方法制得：

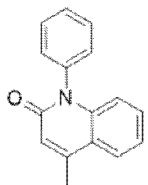
先制得式 III 所示的化合物



;

式 III

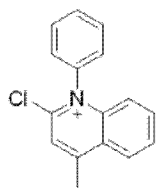
再制得式 IV 所示的化合物



;

式 IV

将式 IV 所示的化合物与三氯氧磷在溶剂 1 中于 65℃~85℃回流反应得式 V 所示的化合物



; 其中, 所述溶剂 1 选自乙腈、二氯乙烷或二甲基甲酰胺中的至少一种;

式 V

式 V 所示的化合物与式 III 所示的化合物在溶剂 2 中, 以当量比为 1: 1~1: 3 于室温下混合得式 II 所示的化合物; 所述溶剂 2 为乙醇或二氯甲烷。

8、根据权利要求 7 所述的荧光染料的制备方法, 其特征在于, 式 III 所示的化合物采用下述方法制得: 用甲基化试剂将 2-甲巯基苯并噻唑通过甲基化反应即得式 III 所示的化合物。

9、根据权利要求 7 所述的荧光染料的制备方法, 其特征在于, 式 IV 所示的化合物采用下述方法制得: 将 2-羟基-4-甲基喹啉与碘苯或苯硼酸在催化剂的作用下制得式 IV 所示的化合物; 其中, 所述催化剂为醋酸铜、铜粉。

10、荧光染料在 qPCR 分析或凝胶电泳成像中的用途, 所述荧光染料为权利要求 1 所述的荧光染料, 或为采用权利要求 2~9 任一项所述的方法制得的荧光染料。

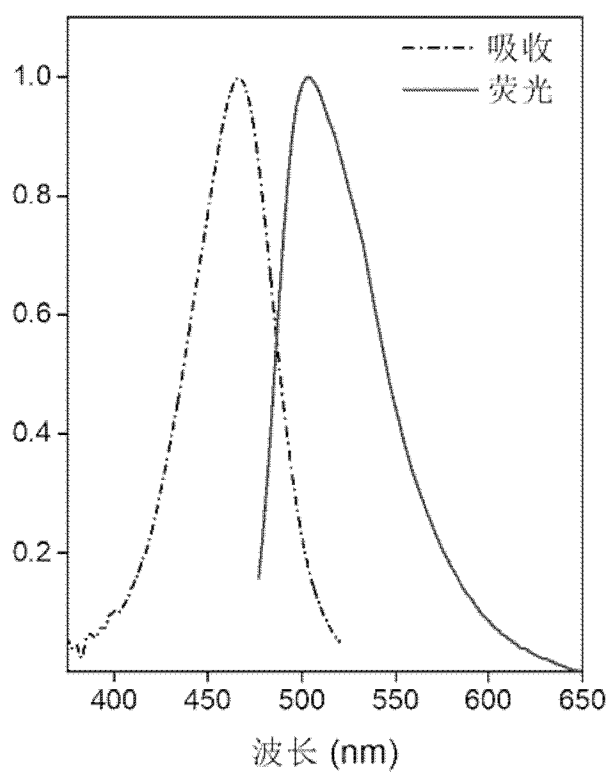


图 1

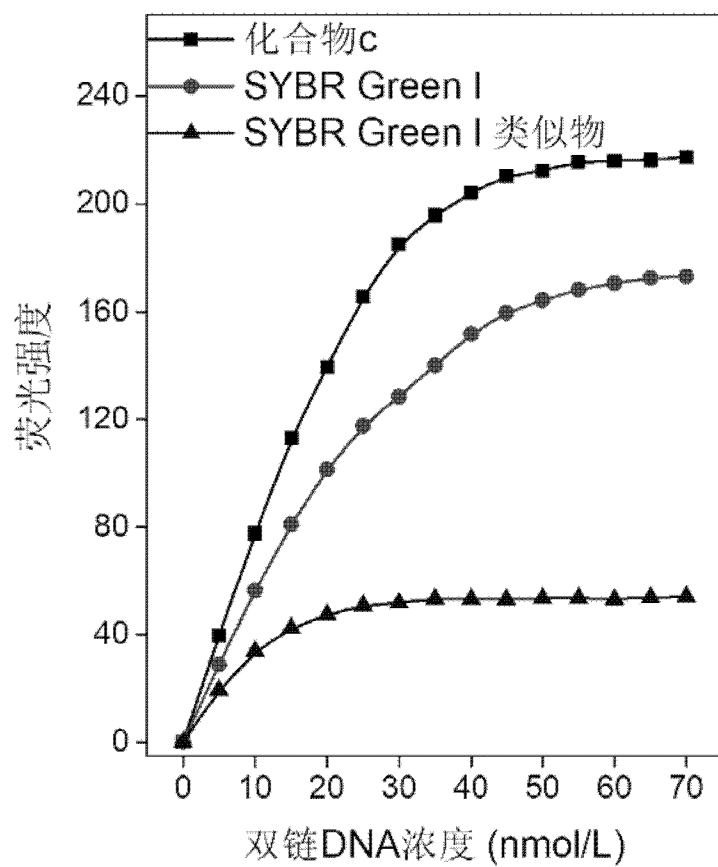


图 2

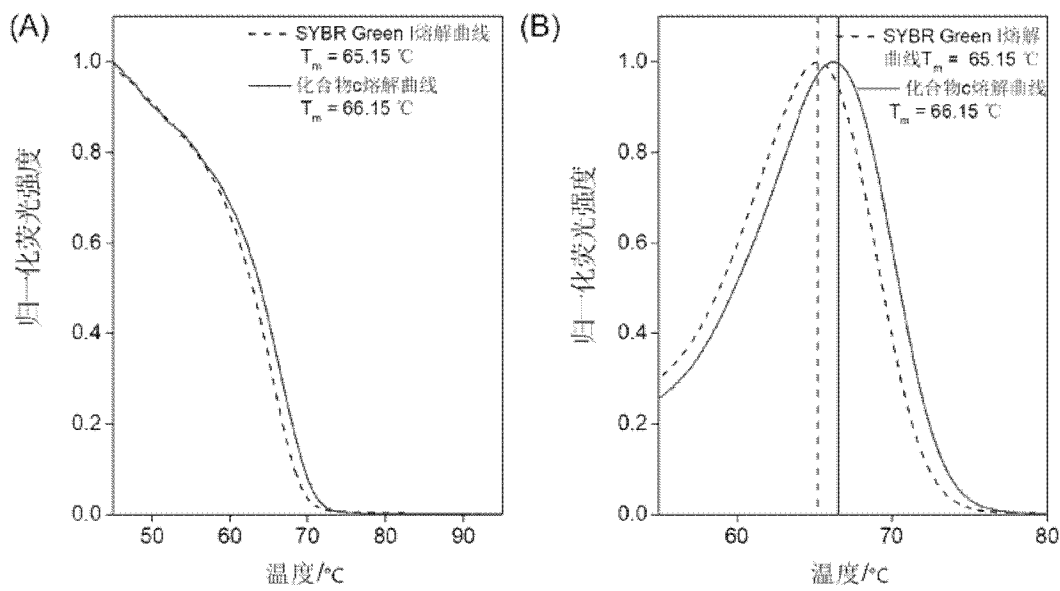


图 3

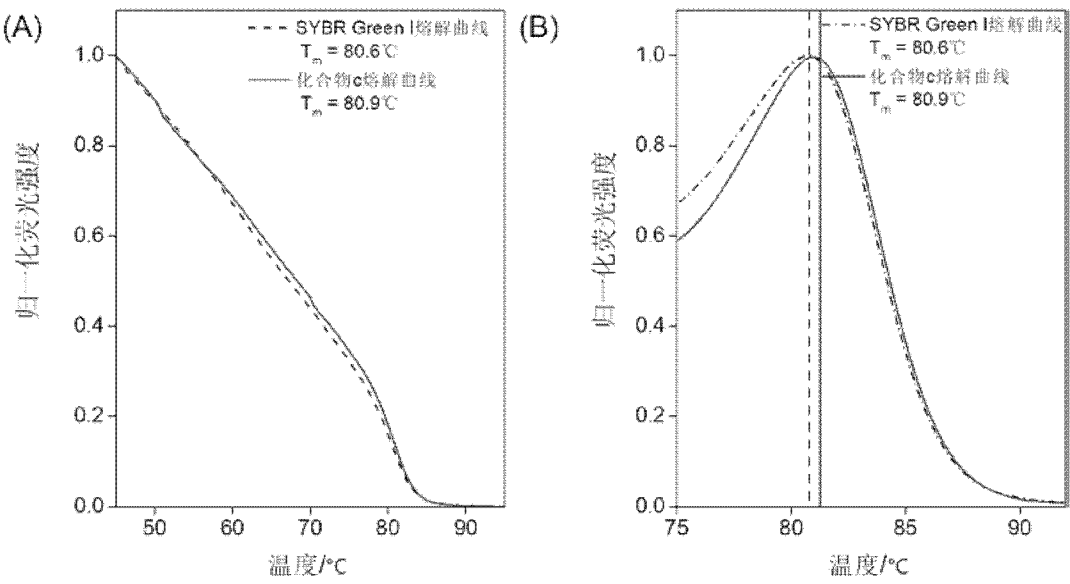


图 4

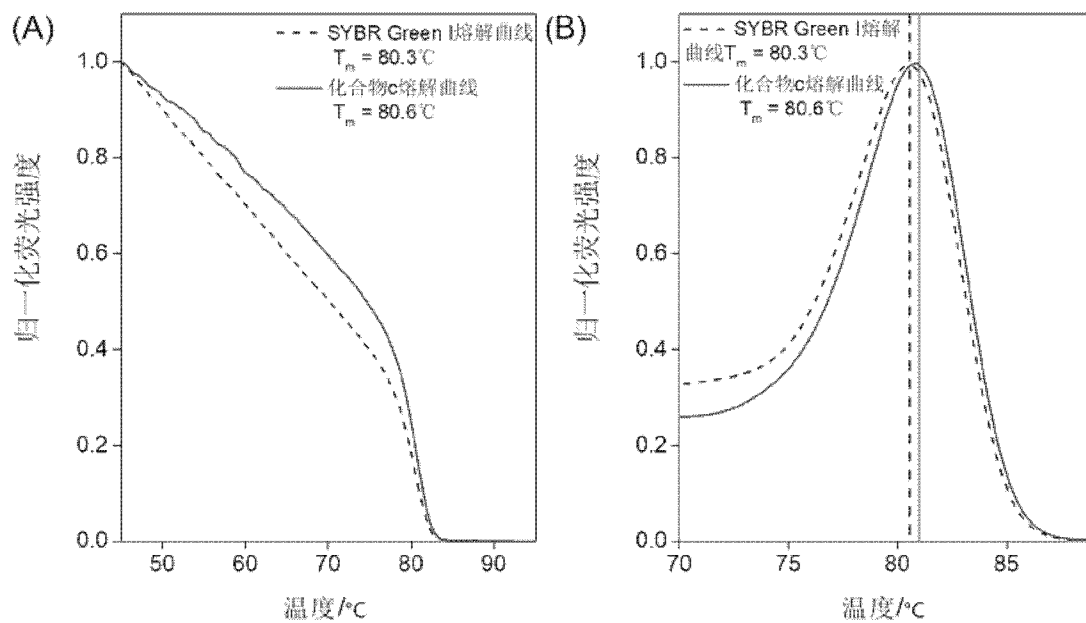


图 5

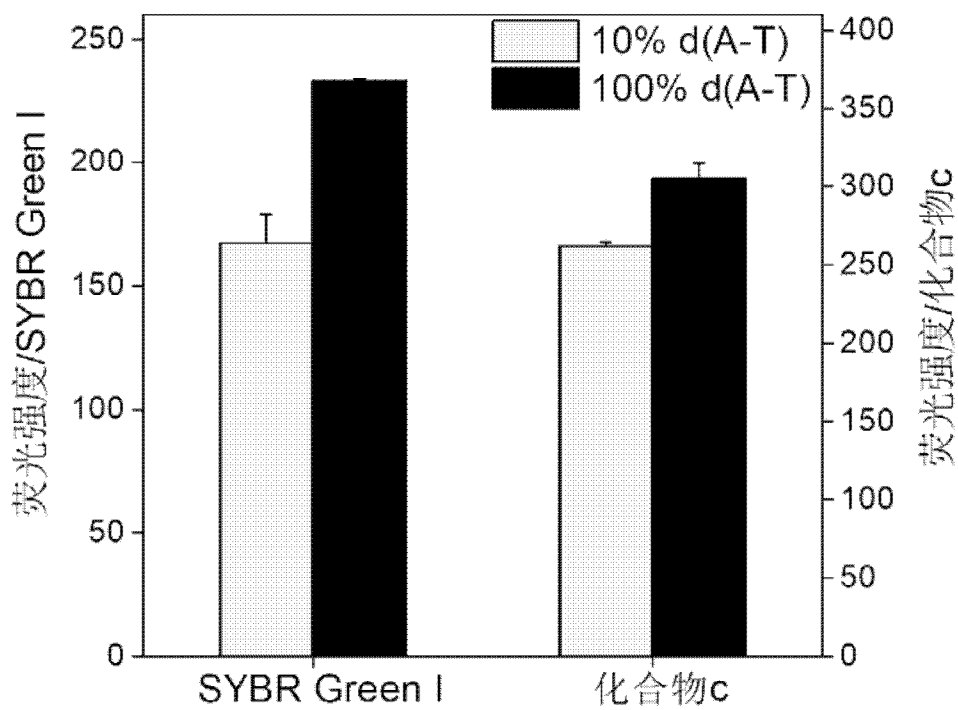


图 6

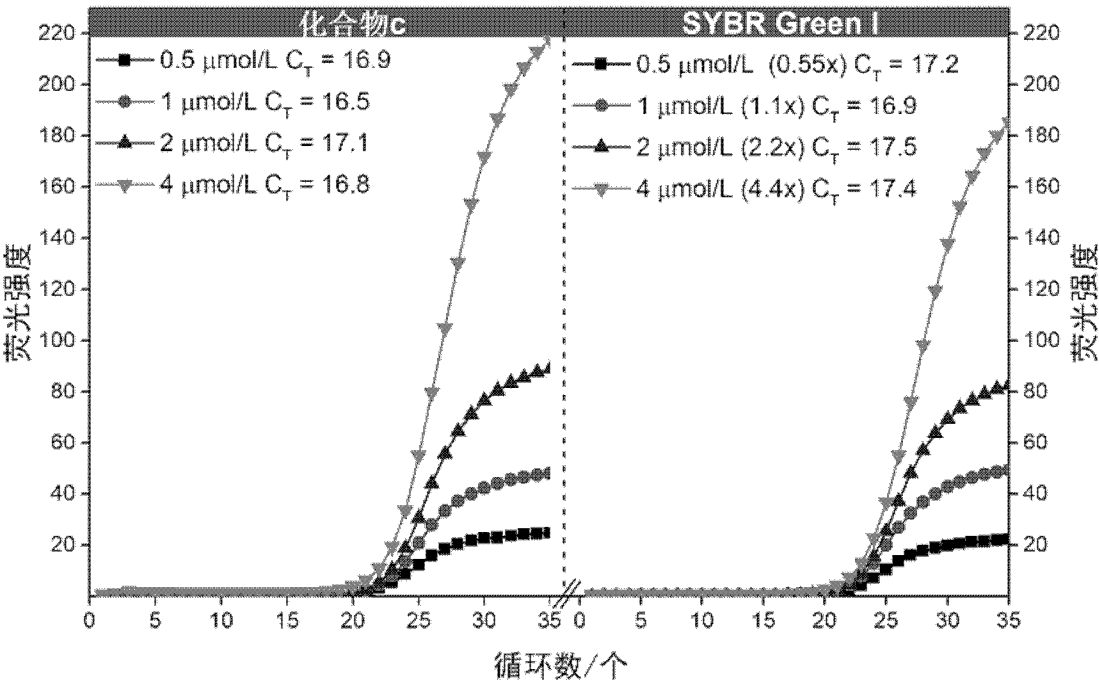


图 7

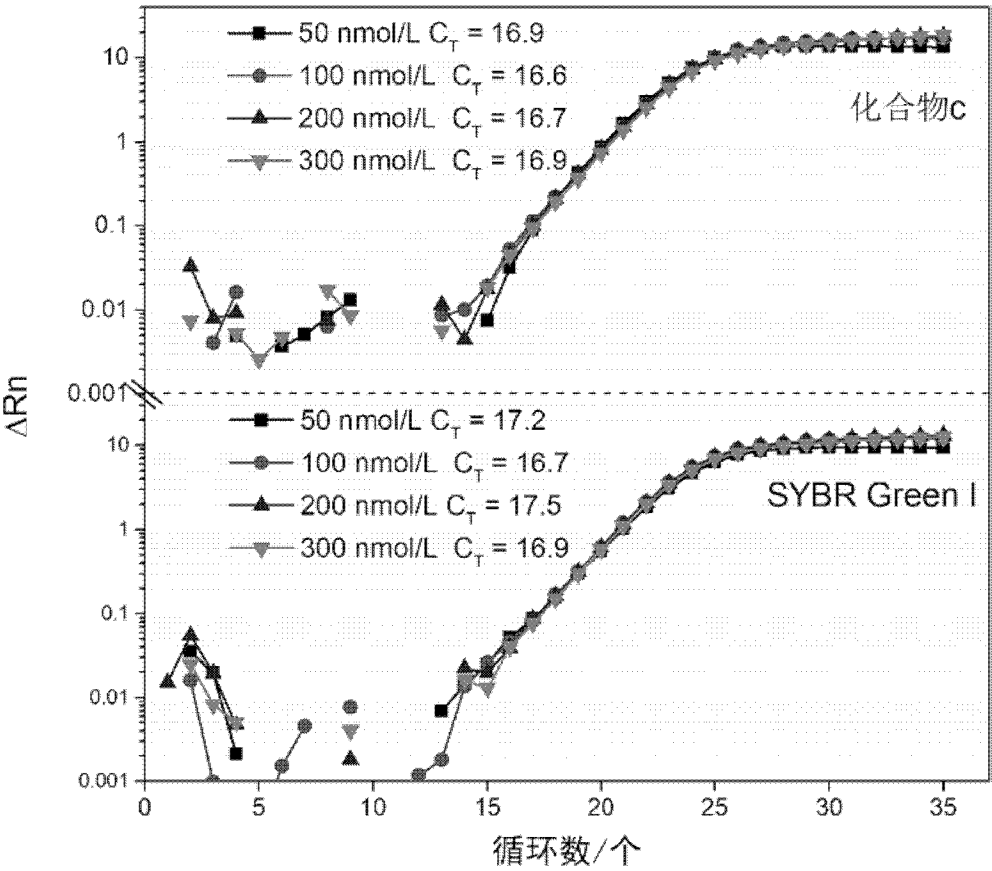


图 8

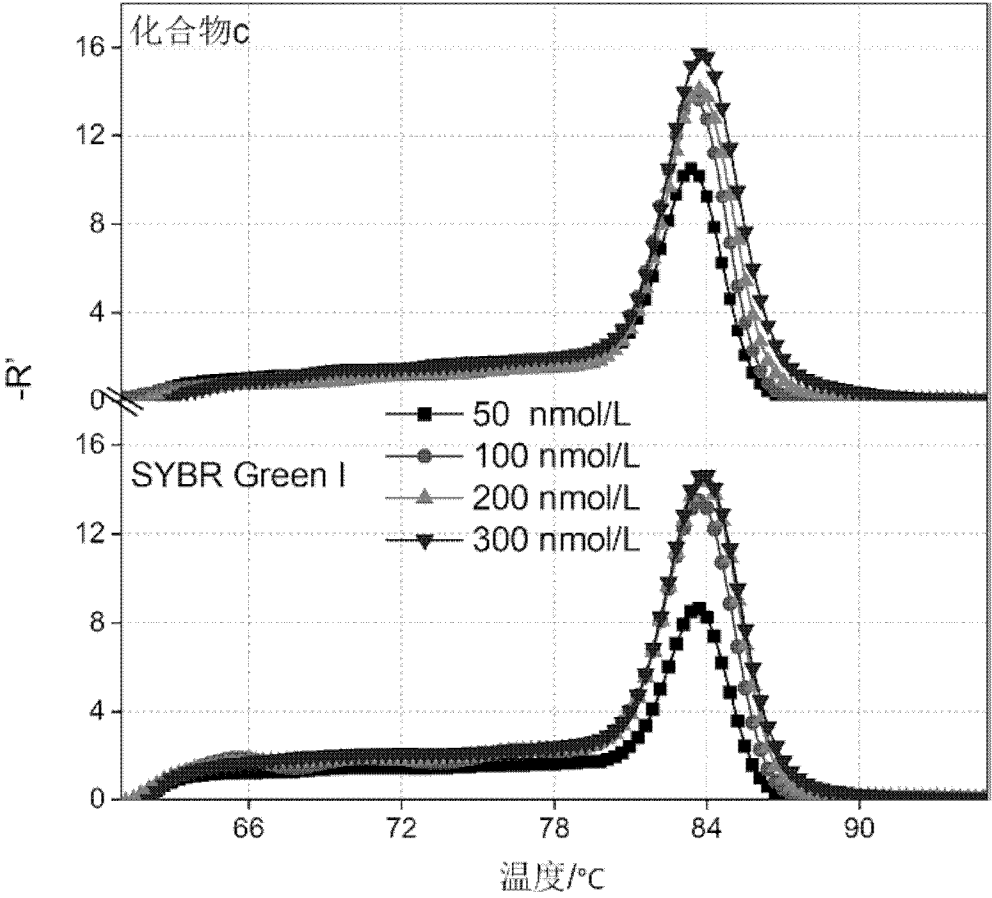


图 9

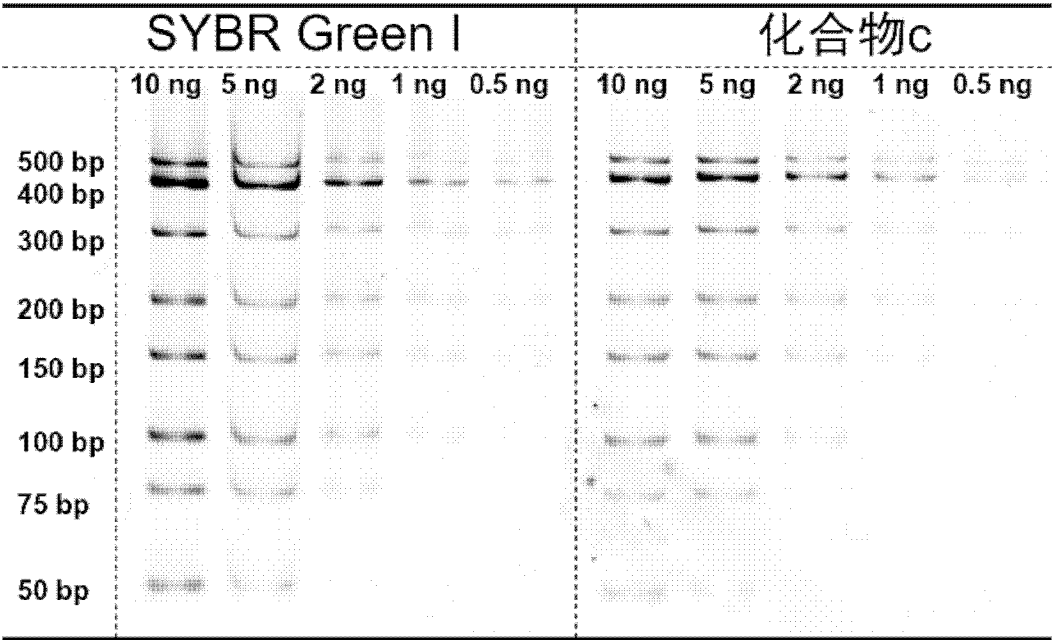


图 10

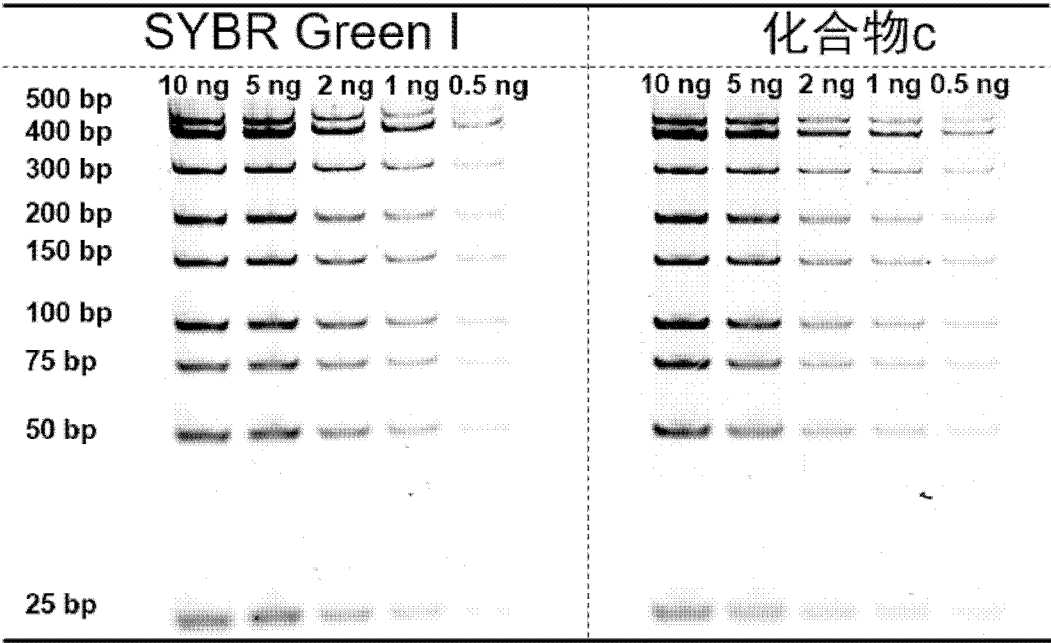


图 11

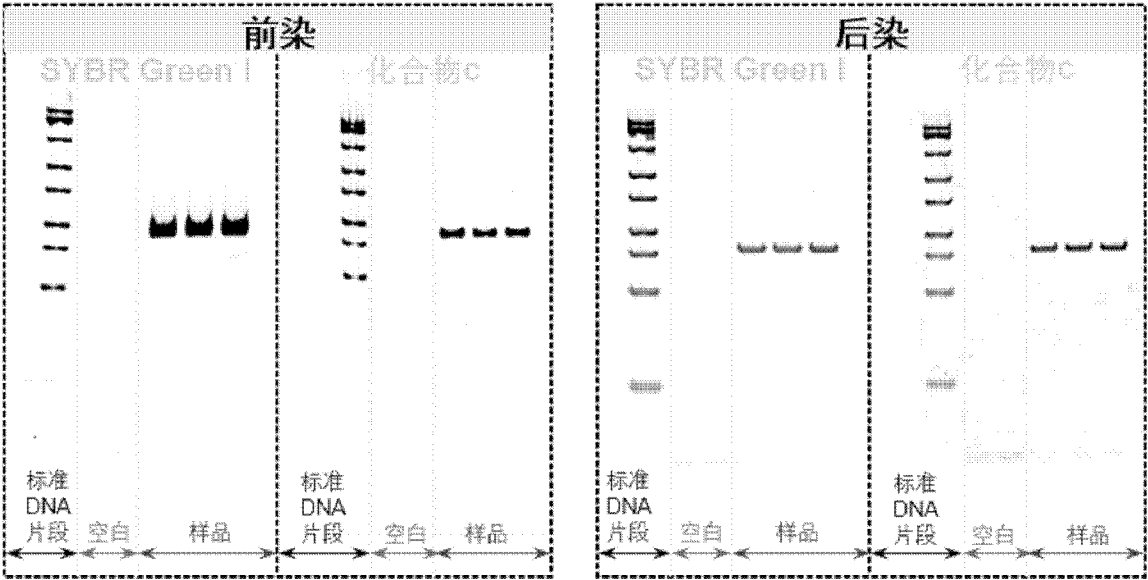


图 12

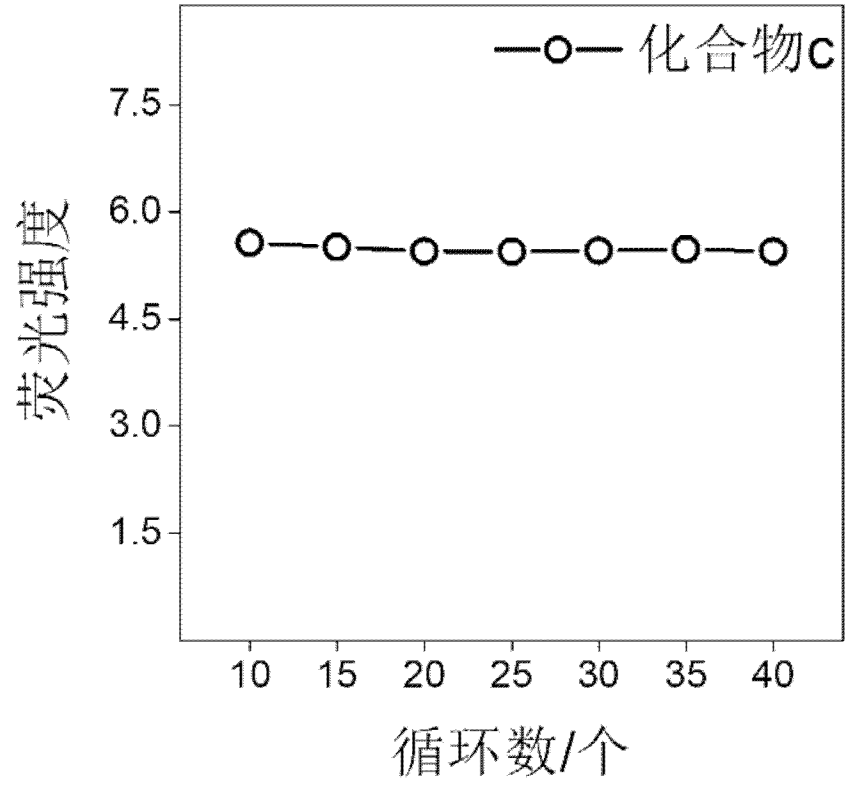


图 13

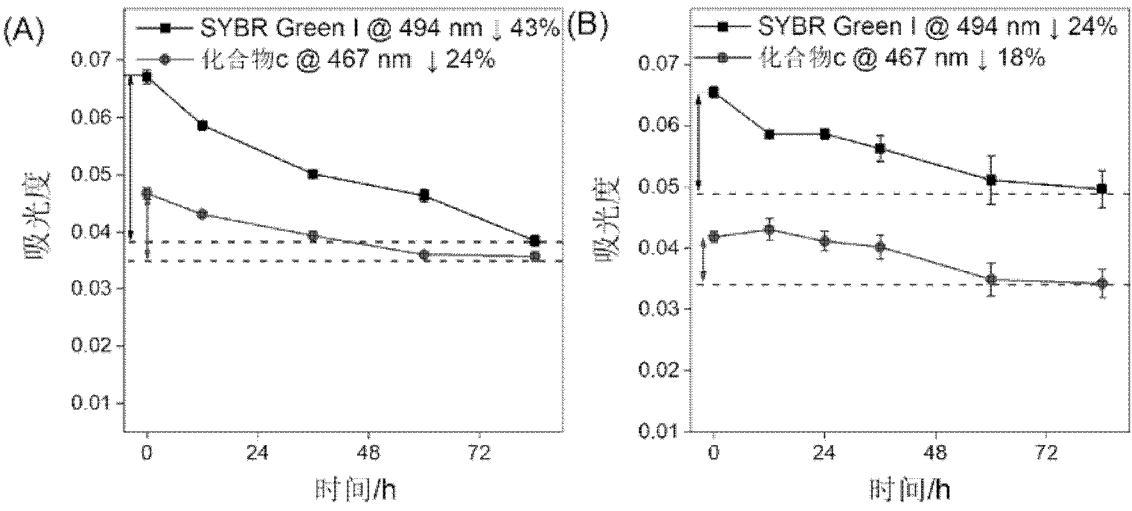


图 14

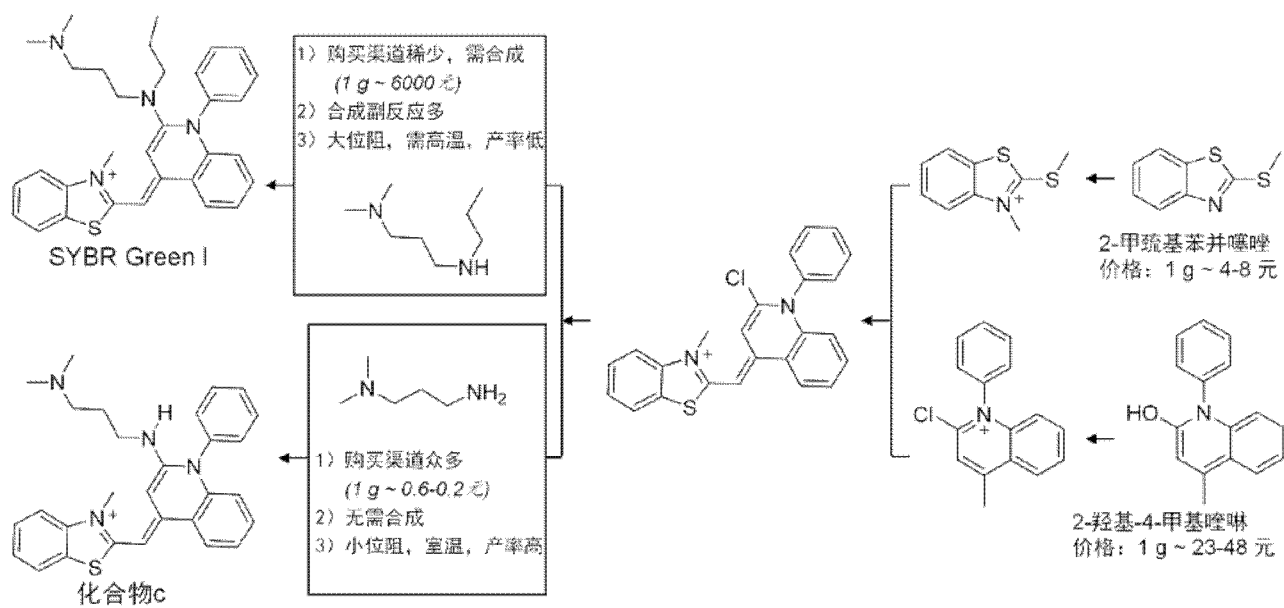


图 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/086524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09B 23/04(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; G01N 27/447(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C09B 23; C12Q 1; C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, VEN, CJFD, STN on the Web: 四川大学, 吴鹏, 王彦莹, 董真, 李显明, 杨琴, 核酸, 序列, DNA, 荧光, 染料, 探针, 噻唑, 喹啉, 胺, 氨, nucleic acid, sequence, fluorescent, fluorescence, dye, dyestuff, thiazol, quinoline, amine, 2638556-27-9, 163795-75-3, 178918-98-4, 1874146-74-3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 113583467 A (SICHUAN UNIVERSITY) 02 November 2021 (2021-11-02)	claims 1-10
A	CN 106147753 A (GUANGDONG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 23 November 2016 (2016-11-23)	see entire document
A	CN 102115610 A (DALIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 06 July 2011 (2011-07-06)	see entire document
A	CN 104650609 A (SHENYANG PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 27 May 2015 (2015-05-27)	see entire document
A	WO 2014005125 A2 (BIOT-N BIOTIUM INC. et al.) 03 January 2014 (2014-01-03)	embodiment 20
A	US 2011130305 A1 (PATTON WAYNE FORREST et al.) 02 June 2011 (2011-06-02)	see entire document



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 July 2022

Date of mailing of the international search report

13 July 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/086524

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	113583467	A	02 November 2021	None			
CN	106147753	A	23 November 2016	CN	106147753	B	10 March 2020
CN	102115610	A	06 July 2011	WO	2011082566	A1	14 July 2011
				JP	2012526862	A	01 November 2012
				US	2011262904	A1	27 October 2011
				US	8298766	B2	30 October 2012
				CN	102115610	B	02 July 2014
				JP	5671525	B2	18 February 2015
CN	104650609	A	27 May 2015	CN	104650609	B	26 April 2017
WO	2014005125	A2	03 January 2014	US	2016024067	A1	28 January 2016
				WO	2014005125	A3	22 May 2014
				US	9682970	B2	20 June 2017
US	2011130305	A1	02 June 2011	US	2016280921	A1	29 September 2016
				US	2013137112	A1	30 May 2013
				WO	2011065980	A2	03 June 2011
				EP	2507319	A2	10 October 2012
				CA	2782045	A1	03 June 2011
				US	2018273759	A1	27 September 2018
				US	2015376411	A1	31 December 2015
				US	2021009809	A1	14 January 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/086524

A. 主题的分类

C09B 23/04(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; C12Q 1/6851(2018.01)i; G01N 27/447(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C09B 23; C12Q 1; C07D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, VEN, CJFD, STN on the Web: 四川大学, 吴鹏, 王彦莹, 董真, 李显明, 杨琴, 核酸, 序列, DNA, 荧光, 染料, 探针, 噻唑, 喹啉, 胺, 氨, nucleic acid, sequence, fluorescent, fluorescence, dye, dyestuff, thiazol, quinoline, amine, 2638556-27-9, 163795-75-3, 178918-98-4, 1874146-74-3

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 113583467 A (四川大学) 2021年11月2日 (2021 - 11 - 02)	权利要求1-10
A	CN 106147753 A (广东工业大学) 2016年11月23日 (2016 - 11 - 23)	参见全文
A	CN 102115610 A (大连理工大学) 2011年7月6日 (2011 - 07 - 06)	参见全文
A	CN 104650609 A (沈阳药科大学) 2015年5月27日 (2015 - 05 - 27)	参见全文
A	WO 2014005125 A2 (BIOT-N BIOTIUM INC等) 2014年1月3日 (2014 - 01 - 03)	实施例20
A	US 2011130305 A1 (PATTON WAYNE FORREST等) 2011年6月2日 (2011 - 06 - 02)	参见全文

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2022年7月6日

国际检索报告邮寄日期

2022年7月13日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

王中良

电话号码 62084595

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/086524

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	113583467	A	2021年11月2日	无	
CN	106147753	A	2016年11月23日	CN	106147753 B 2020年3月10日
CN	102115610	A	2011年7月6日	WO	2011082566 A1 2011年7月14日
				JP	2012526862 A 2012年11月1日
				US	2011262904 A1 2011年10月27日
				US	8298766 B2 2012年10月30日
				CN	102115610 B 2014年7月2日
				JP	5671525 B2 2015年2月18日
CN	104650609	A	2015年5月27日	CN	104650609 B 2017年4月26日
WO	2014005125	A2	2014年1月3日	US	2016024067 A1 2016年1月28日
				WO	2014005125 A3 2014年5月22日
				US	9682970 B2 2017年6月20日
US	2011130305	A1	2011年6月2日	US	2016280921 A1 2016年9月29日
				US	2013137112 A1 2013年5月30日
				WO	2011065980 A2 2011年6月3日
				EP	2507319 A2 2012年10月10日
				CA	2782045 A1 2011年6月3日
				US	2018273759 A1 2018年9月27日
				US	2015376411 A1 2015年12月31日
				US	2021009809 A1 2021年1月14日