

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

C07D 209/12 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480028870.4

[43] 公开日 2006 年 11 月 15 日

[11] 公开号 CN 1863889A

[22] 申请日 2004.9.30

[21] 申请号 200480028870.4

[30] 优先权

[32] 2003.10.3 [33] GB [31] 0323171.9

[86] 国际申请 PCT/GB2004/004167 2004.9.30

[87] 国际公布 WO2005/033245 英 2005.4.14

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.3

[71] 申请人 考文垂大学

地址 英国考文垂

[72] 发明人 D·E·林奇 J·黑普廷斯托尔

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限公司
代理人 程金山

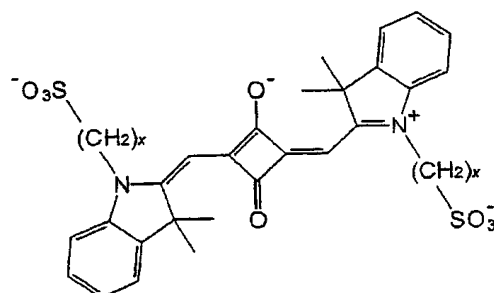
权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

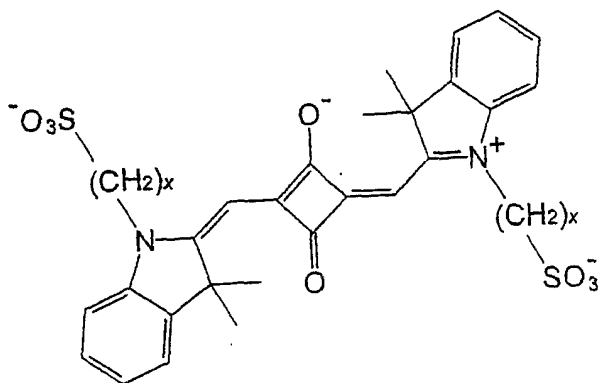
荧光化合物

[57] 摘要

本发明公开了一种水溶性光致发光化合物，其包括式(A)的对称骨架结构，其中 x 可以代表任何整数，并且其中苯环可以被取代。本发明还公开了包含这种化合物的蛋白质检测物和测量流体样品中总溶解蛋白质含量的方法。

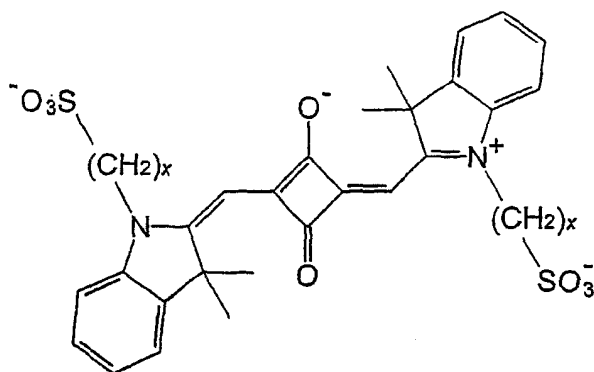


1. 包括下式的对称骨架结构的水溶性光致发光化合物：



其中， x 可以代表任何整数，并且其中苯环可以被取代。

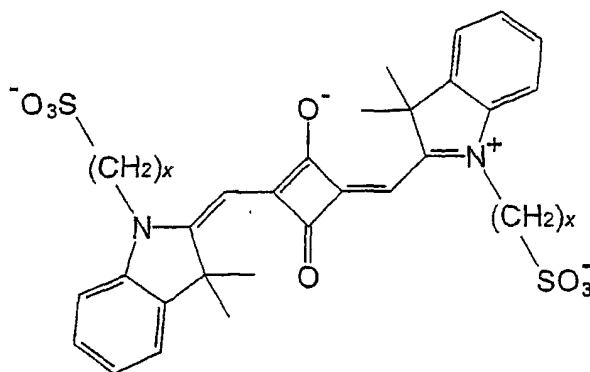
2. 按照权利要求 1 的光致发光化合物，其中 $x = 3$ 。
3. 按照权利要求 1 或权利要求 2 的光致发光化合物，其是未被取代的。
4. 按照权利要求 1 或权利要求 2 的光致发光化合物，其中一个或两个苯环在 5 位上被烷基或卤素基团所取代，所述烷基包括ⁱ丙基和^t丁基。
5. 按照权利要求 1-4 中任一项的光致发光化合物，其是 2,4-二(1-(丙-3-磺酸)-3,3-三甲基-2-二氢亚吲哚基甲基)环丁烯二酮-1,3-二醇酸酯或所述磺酸的任何金属或季氮(即，铵，一-、二-或三烷基铵，吡啶鎓等)盐。
6. 基本上如本文所述并参考实施例的光致发光化合物。
7. 一种蛋白质检测物，其在水溶液中以 1×10^{-10} 到 1 摩尔/L 的浓度包含光致发光化合物，所述光致发光化合物包括如下通式的对称骨架结构：



其中 x 可以表示任何整数，并且其中苯环可以被取代。

8. 一种测量流体样品的总溶解蛋白质含量的方法，该方法包括如下步骤：

(a) 以 $1 \times 10^{-10} - 1 \text{ mol/L}$ 的浓度，在水溶液中溶解包括如下通式的对称骨架结构的光致发光化合物：



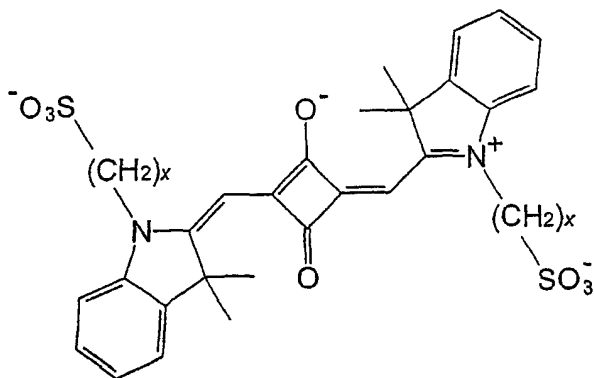
其中 x 可以表示任何整数，并且其中苯环可以被取代；

(b) 将步骤(a)的溶液与测试流体样品混合；

(c) 测量所述样品的荧光；和

(d) 将所述荧光与标准值比较从而获得所述总溶解蛋白质含量的值。

9. 一种检测蛋白质和/或将蛋白质定量的方法，所述蛋白质在十二烷基硫酸钠(SDS)存在或缺乏的情况下、在已经被固定在包含含水甲醇和乙酸的水性/有机/酸混合物中的支持基质中电泳分离，其中接着以 1×10^{-10} 到 1 mol/L 的浓度、用在 10% 含水甲醇或含水乙酸的溶液中的光致发光化合物对所述基质进行染色，并进行脱色以显现条带，所述光致发光化合物包括如下通式的对称骨架结构：



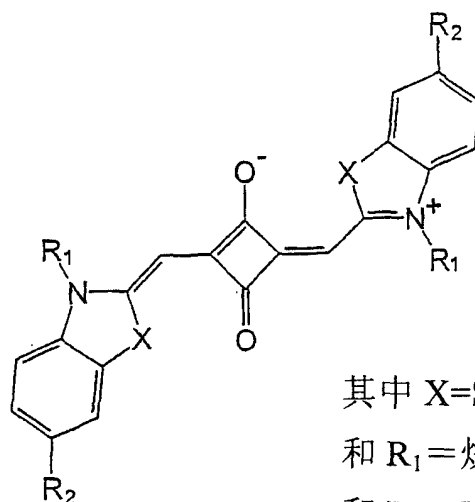
其中 x 可以代表任何整数，并且其中苯环可以被取代。

10. 按照权利要求 9 的方法，其中所述支持基质是聚丙烯酰胺，琼脂糖或淀粉。

荧光化合物

本发明涉及新的光致发光化合物，涉及新的蛋白质检测物(detector)并涉及检测蛋白质在流体、特别是水或体液中的存在的新方法。

光致发光化合物是已知的，并且已知的光致发光化合物包括被称为 squaraine 染料的染料类别，特别是假吲哚系列的 squaraine 染料，它们是如下通式的取代和未取代化合物：



其中 X=S, Se 或 C(CH₃)₂

和 R₁=烷基

和 R₂=H, 烷基或卤素

已知的假吲哚 squaraine 染料包括对称和不对称的化合物，并且描述于，例如 E. Terpetschnig 等在 Anal. Chim. Acta 282 (1993) 第 633-641 页的文章中。

这些染料在水中是不可溶的，并且特别用于在流体中的蛋白质存在的定性检测。为了使用这些染料来对蛋白质的存在进行检测，必须将所述染料溶解在包含水和醇诸如甲醇的混合物的溶剂中，所述蛋白质本身在流体，特别是水性流体中是水溶性的。当将蛋白质加入假吲哚 squaraine 染料的水/甲醇溶液中时，存在荧光的增加。在上述引用的文章中公开的分析方法是纯定性的方法，仅仅记录蛋白质在测试的流体样品中的存在或缺乏，并且因此不能用于测定存在的蛋白质的量。

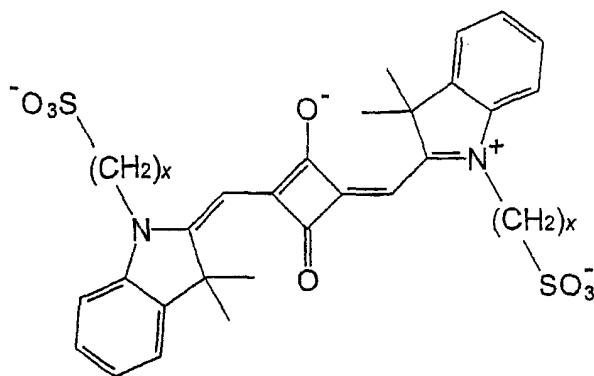
目前对于流体中蛋白质的定量分析的方法和对于凝胶中的蛋白质进行定量和半定量分析如染色的方法包括针对流体的 Bradford[M.M.

Bradford, Anal. Biochem. 72(1976) 248], Lowry [O.H. Lowry 等 J. Biol. Chem. 193(1951) 265]方法和二金鸡纳酸(bicinchoninic acid) (BCA)[P.K. Smith 等 Anal. Biochem. 150(1985)76]方法以及针对凝胶的银染[C. R. Merril, Meth. Enzymol. 182 (1990) 477]和考马斯蓝[S. Fazekas de St. Groth 等, Biochim. Biophys. Acta 71 (1963)377]。Bradford, Lowry 和 BCA 方法是比色技术(即, 颜色变化)并适合于 8-2000 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液蛋白质范围, 需要多个试剂和温育时间并受到来自许多常见试剂的干扰。用在 Bradford 方法中的考马斯蓝需要 20-30 分钟并且不被 tris 缓冲液所阻碍。银染是非常敏感的(10-100 ng/mL)显色技术并被用作凝胶染色技术但是在处理凝胶中必须小心, 整个技术需要 2-3 小时。考马斯蓝也是凝胶染色剂并且如果蛋白质范围在显色 μg 范围内, 可以代替银染色剂使用。检测蛋白质浓度的其它商业技术包括来自 Molecular Probes 的 NanoOrange™ 蛋白质定量试剂盒和 CBQCA™ 蛋白质定量试剂盒, 它们是依赖于荧光变化的超灵敏溶液技术, 但是在对于 squaraine 衍生物给定的范围内不是线性的。这两种技术也需要 30 分钟的制备时间。

本发明的一个目的是提供新的光致发光化合物, 特别是可溶于水、或包含水的溶剂混合物的新的光致发光化合物, 并且它保持其在这些介质中的光致发光性质。

本发明的另一个目的是提供检测蛋白质在流体中的存在的方法, 或作为凝胶染色的方法, 其中上述时间限制被减少或基本被避免并具有更高的灵敏度。

本发明提供包括下式对称骨架结构的水溶性光致发光化合物:



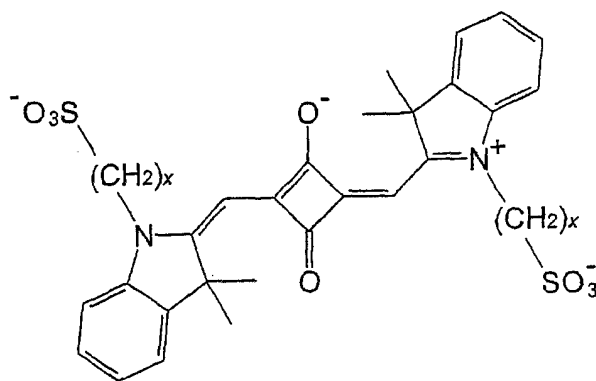
其中 x 可以代表任意整数, 并且其中苯环可以被取代。

特别优选的按照本发明的化合物包括其中 $x = 3$ 的那些。

另外优选的按照本发明的化合物包括未被取代的那些或其中一个或两个苯环在 5 位上被烷基(包括ⁱ丙基和^t丁基)或卤素基团取代的那些。

特别优选的按照本发明的化合物包括 2,4-二(1-(丙-3-磺酸)-3,3-三甲基-2-二氢亚吲哚基甲基)环丁烯二酮-1,3-二醇酸酯(diolate)或所述磺酸的任何金属或季氮(即, 铵, 一-、二-或三烷基铵, 吡啶鎓等)盐。

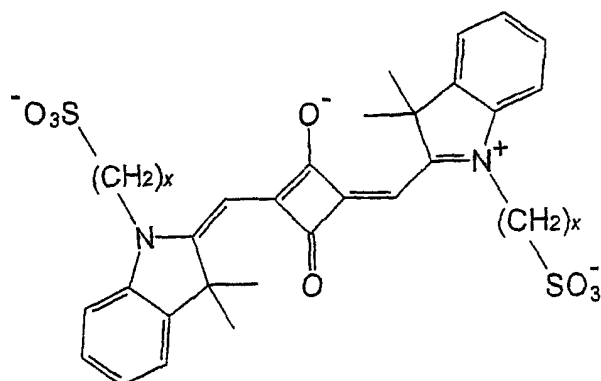
本发明还提供蛋白质检测物, 所述检测物以 1×10^{-9} - 1 mol/L 的浓度, 在水溶液或含水的溶剂混合物中, 包含包括如下通式的对称骨架结构的化合物:



其中 x 可以表示任何整数, 并且其中苯环可以被取代。

本发明还提供测量流体样品的总溶解蛋白质含量的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 以 1×10^{-10} - 1 mol/L 的浓度, 在水溶液或含水的溶剂混合物中溶解包括如下通式的对称骨架结构的化合物:



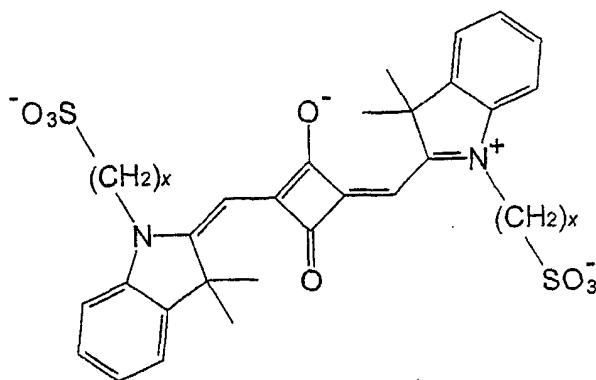
其中 x 可以表示任何整数, 并且其中苯环可以被取代。

(b) 将步骤(a)的溶液与测试流体样品混合;

(c) 测量样品的荧光; 和

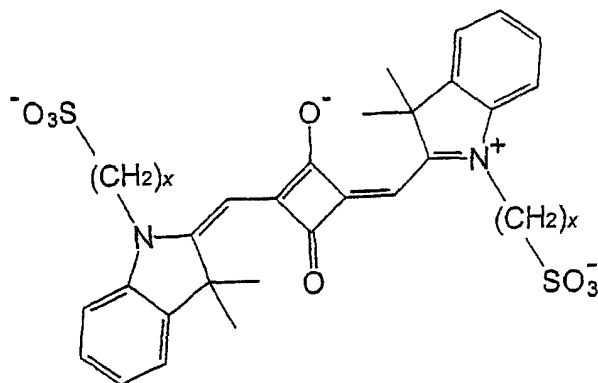
(d) 将所述荧光与一个标准值或多个标准值(即, 校正曲线)比较从而获得所述总蛋白质含量的值。

本发明还提供检测蛋白质和/或将蛋白质定量的方法, 所述蛋白质在十二烷基硫酸钠(SDS)存在或缺乏的情况下, 在已经被固定在包含含水甲醇和含水乙酸的水性/有机/酸混合物中的支持基质例如聚丙烯酰胺、琼脂糖或淀粉中以电泳分离, 在所述方法中接着以 1×10^{-10} 到 1 mol/L 的浓度, 用在 10% 含水甲醇或含水乙酸的溶液中的光致发光化合物对所述基质进行染色, 并进行脱色以显现条带, 所述光致发光化合物包括如下通式的对称骨架结构:



其中 x 可以代表任何整数, 并且其中苯环可以被取代。

为了在需要的检测范围内建立蛋白质水溶液的荧光的标准值, 使用 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 的化合物的水溶液来测量含有已知浓度的蛋白质 BSA 的溶液的荧光, 所述化合物包括下式的对称骨架结构:



其中 $x = 3$

染料 1

，所述荧光测量是在 624 nm 的激发波长($\epsilon = 1.0 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)和 638 nm 的检测波长下进行。

在 0-100 ng/mL BSA 的范围内，对于两条单独的校正曲线的结果显示于图 1；在 0-500 ng/mL BSA 的检测范围内，对于三条单独的校正曲线的结果显示于图 2；在 0-10 $\mu\text{g/mL}$ BSA 的检测范围内，对于三条单独的校正曲线的结果显示于图 3。

特别令人吃惊的是注意到在这些检测范围内的线性反应。

对于本发明的光致发光化合物而言还有一个优势的是，一旦已经使用 BSA 建立了校正曲线，那么可以即刻测量任何数量的蛋白质浓度。荧光也在较高的波长，并且不被任何漫射的较低波长的有机荧光所掩蔽。

实施例

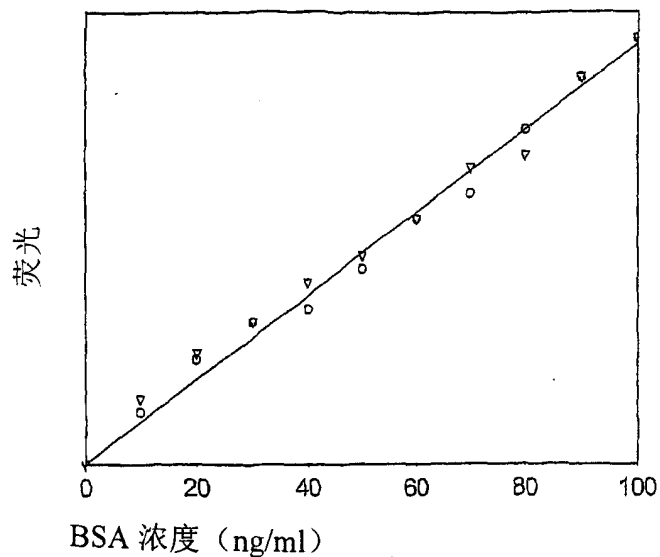
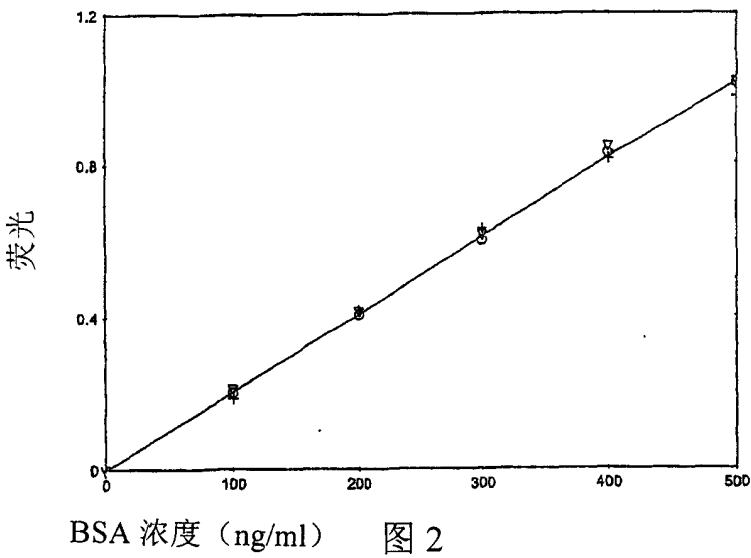
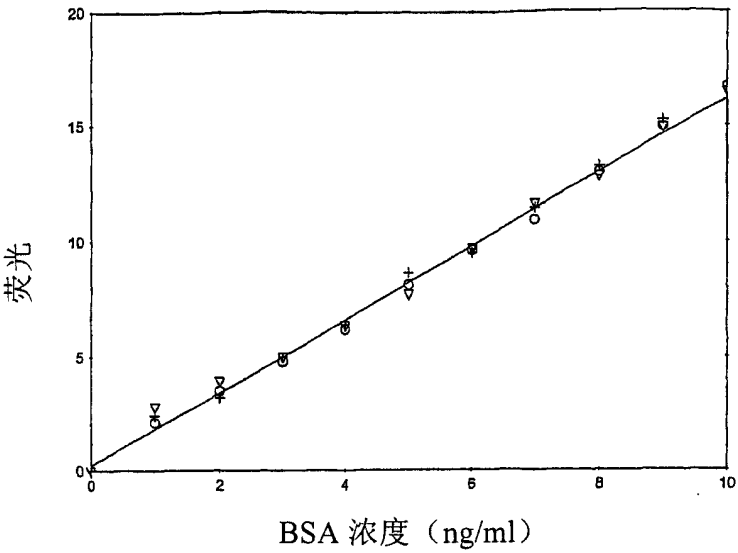


图 1



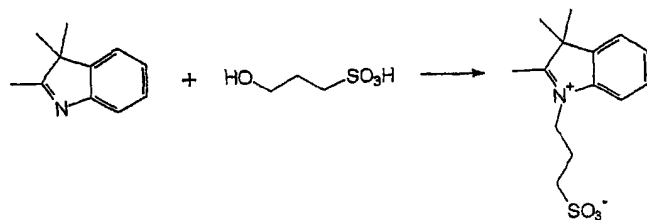
BSA 浓度 (ng/ml) 图 2



BSA 浓度 (ng/ml)

图 3

实验例
原材料



使用 E. Havinga 等在 *Synthetic Metals* 69 (1995) 第 581-582 页中的文献方法，通过使用迪安-斯达克装置在过量 1,3-丙磺酸内酯和甲苯中加热 2,3,3-三甲基假吲哚来制备 2,3,3-三甲基-1-(丙-3-磺酰基)假吲哚。冷却后，将过量溶剂倾析掉并用石油醚重复洗涤从而得到红色的油。在静置数周后，从所述油形成 2,3,3-三甲基-1-(丙-3-磺酰基)假吲哚的晶体，单晶 x-射线结构显示于图 4。

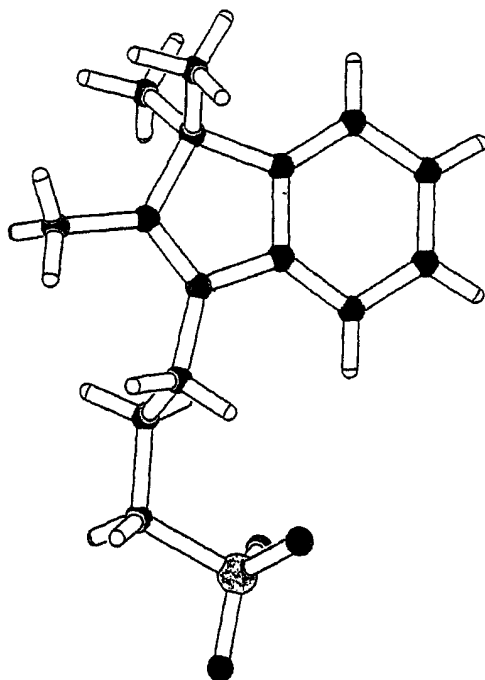
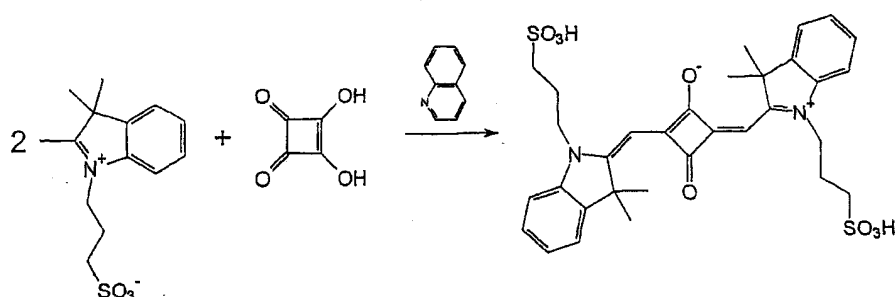


图 4

2,3,3-三甲基-1-(丙-3-磺酰基)假吲哚结构的分子构象和原子命名方案。

染料 1 的制备



使用 Sprenger 和 Ziegenbein 在 *Angew. Chem. Int. Ed.* 6 (1967) 第 533 页中的文献方法, 通过使用迪安-斯达克装置, 与在 50/50 甲苯/丁烷-1-醇中的催化量的 quinaline 一起回流 2:1 摩尔量的 2,3,3-三甲基-1-(丙-3-磺酰基)假吲哚和方形酸来制备 2,4-二(1-(丙-3-磺酸)-3,3-二甲基-2-二氢亚吲哚基甲基)环丁烯二(磺)-1,3-二醇酸酯。去除反应溶剂后, 在真空中收集产物并重复用石油醚热洗。