



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102459168 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201080030692. 4

C07H 7/06 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 05. 06

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

09159639. 5 2009. 05. 07 EP

EP 1790734 A1, 2007. 05. 30, 说明书第 2-9 页.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 09

Donald C. Rogness et.al.. Rapid synthesis of the indole-indolone scaffold via [3+2] annulation of arynes by methyl indole-2-carboxylates. 《Tetrahedron Letters》. 2009, 第 50 卷 4003 - 4008.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/EP2010/056212 2010. 05. 06

Jean-Philippe Goddard et.al.. Recent advances in enzyme assays. 《TRENDS in Biotechnology》. 2004, 第 22 卷 (第 7 期), 363-370.

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02010/128120 EN 2010. 11. 11

(73) 专利权人 生物合成股份公司

地址 瑞士塔尔

审查员 郝小燕

(72) 发明人 U. 斯皮兹 L. 维克 A. 拜尔

C. 维穆斯 G. 沙伯特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 贾静环

(51) Int. Cl.

C07D 209/36 (2006. 01)

C07D 487/04 (2006. 01)

C12Q 1/00 (2006. 01)

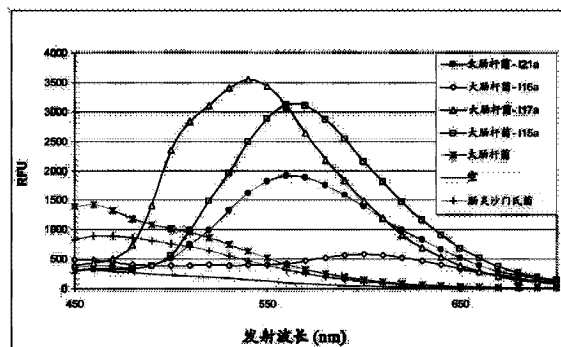
权利要求书6页 说明书52页 附图4页

(54) 发明名称

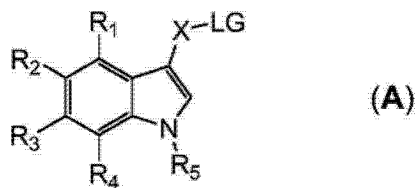
新指示剂平台

(57) 摘要

本发明提供了一种新指示剂平台,其包含多种 1H-吲哚-3-基指示剂化合物,其能够相应于外部刺激转化成信号团。在一种类型的指示剂化合物中,所得信号团为通过分子间羟醛型方法形成的 2-苯亚甲基二氢吲哚化合物;在另一类型的指示剂化合物中,所得信号团为通过分子内羟醛型方法形成的 10H-吲哚并[1,2-a]吲哚化合物。所述指示剂可以用于广泛范围的应用,涉及例如生物体系或光学数据存储的应用。



1. 用于检测外部刺激的指示剂体系,其包含下述通式的指示剂化合物



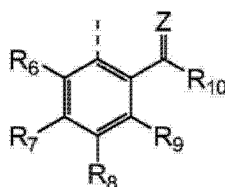
其中:

X 为 O、NH 或 S;

LG 为不稳定基团,其中 X-LG 部分易于通过所述外部刺激的作用而转化;

R₁、R₂、R₃ 和 R₄ 独立地选自氢、C1-4 烷基;C1-4 烷氧基;融合或线性连接的芳基;融合或线性连接的杂芳基;卤素;氰基;硝基;甲酰基;和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基;

R₅ 为氢或 R₁₂, 其中 R₁₂ 为

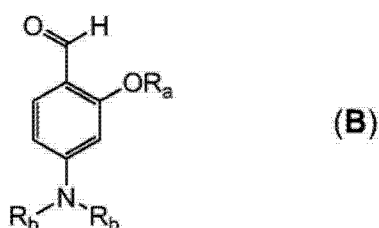


其中:

Z 为 O、NH 或 S;

R₆、R₇、R₈、R₉ 和 R₁₀ 独立地选自氢、C1-4 烷基;C1-4 烷氧基;融合或线性连接的芳基;融合或线性连接的杂芳基;卤素;氰基;硝基;甲酰基;和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基;

和其中,如果 R₅ 为氢,所述指示剂体系进一步包含下述通式的受体化合物



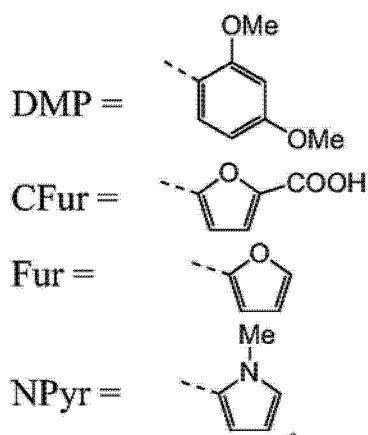
其中:

R_a 和 R_b 独立地选自氢和 C1-4 烷基。

2. 根据权利要求 1 的指示剂体系,其中 R₅ 为氢,所述受体化合物 (B) 为 2- 甲氧基-4-(N, N- 二甲基氨基) 苯甲醛。

3. 根据权利要求 1 的指示剂体系,其中 X-LG 选自 β-D- 吡喃半乳糖苷、叔丁基二甲基甲硅氧基 (TBDMS)、乙酰氧基、磷酸胆碱、α-D- 吡喃葡萄糖苷、β-D- 葡萄糖苷酸钠盐、N- 乙酰基-β-D- 氨基半乳糖苷和 β-D- 吡喃葡萄糖苷。

4. 根据权利要求 1 的指示剂体系,其中 R₁₀ 选自氢、甲基、甲氧基、苯基、DMP、CFur、Fur、NPyr, 其中:



5. 在关注区域中检测外部刺激的方法,其包含以下步骤:

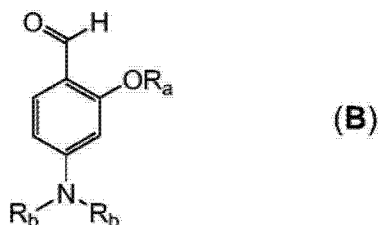
- 向关注区域提供指示剂体系;和
- 监控来自作为所述外部刺激的结果而形成的信号团物质的信号;

其特征在于,

所述指示剂体系如权利要求1所限定,其中所述X-LG部分易于通过所述外部刺激的作用而转化,所述转化导致形成包含烯醇部分的信号原物质,其中XH连接至碳原子,该碳原子通过双键连接至另一碳原子;所述信号团物质通过所述烯醇部分与选自羰基、亚氨基和硫代羰基的受体部分反应而形成。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述受体部分为羰基部分。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述羰基部分通过加入下述通式的受体化合物而提供:



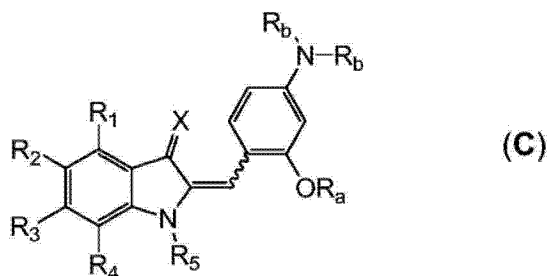
其中:

R_a和R_b独立地选自氢和C1-4烷基。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述受体化合物(B)为2-甲氧基-4-(N,N-二甲氨基)苯甲醛。

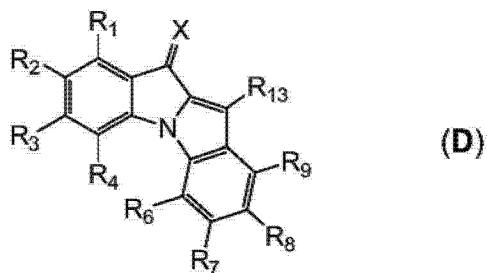
9. 根据权利要求5所述的方法,其中所述受体部分为所述指示剂分子的部分。

10. 根据权利要求5所述的方法,其中所述指示剂体系如权利要求1中所定义,其中,如果R₅为氢,则所述信号团物质为具有下述结构式的2-苯亚甲基二氢吲哚:



并且其中,如果R₅为R₁₂,所述信号团物质为具有下述结构式的10H-吲哚并[1,2-a]吡

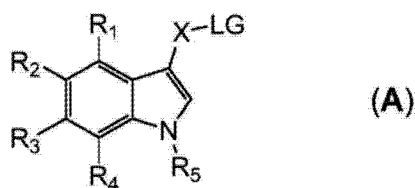
噪



其中 R_{13} 为 OH 或 R_{10} 。

11. 根据权利要求 5 所述的方法, 其在基本排除氧的条件下进行。

12. 下述通式的指示剂化合物的制备方法



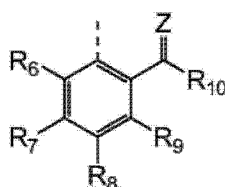
其中：

X 为 O、NH 或 S；

LG 为不稳定基团, 其中 X-LG 部分易于通过所述外部刺激的作用而转化；

R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地选自氢、C1-4 烷基；C1-4 烷氧基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基；

且 R_5 为 R_{12} , 其为

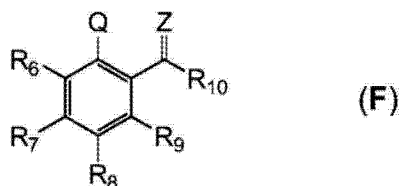


其中：

Z 为 O、NH 或 S；

以及其中 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 独立地选自氢、C1-4 烷基；C1-4 烷氧基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基；

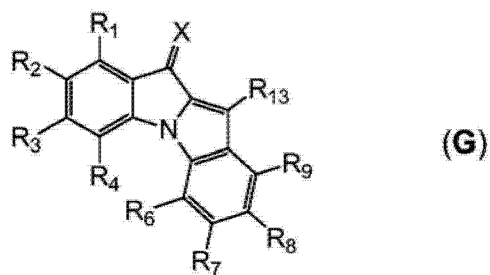
其特征在于, 其包含用下述通式的苯衍生物



其中 Q 为选自碘、溴、三氟甲磺酰氧基和甲苯磺酰氧基的离去基团。

13. 根据权利要求 12 所述的制备指示剂化合物的方法, 其中 Q 是碘或溴。

14. 下述结构式的化合物

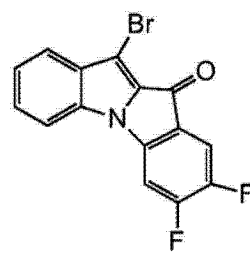
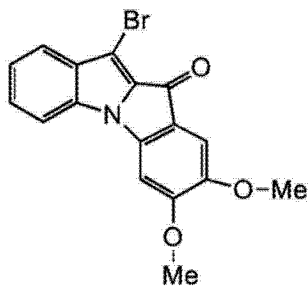
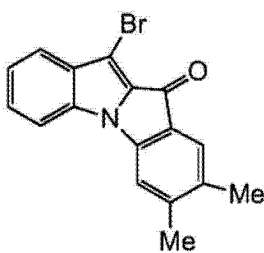
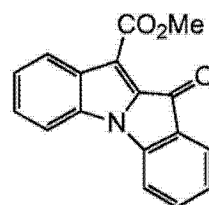
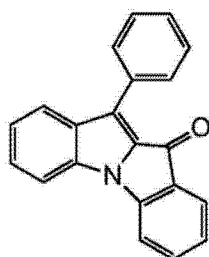
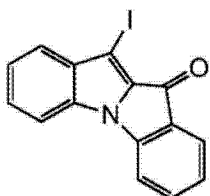
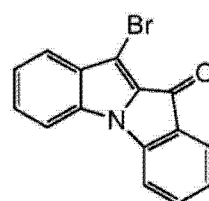
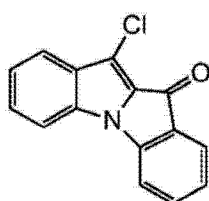
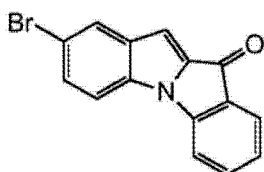
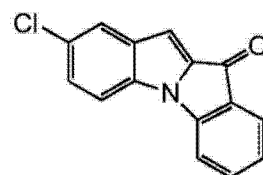
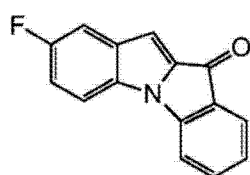
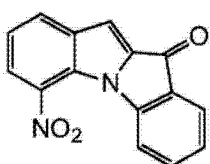
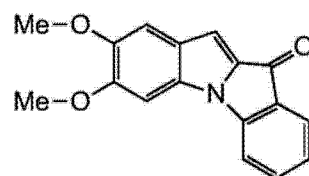
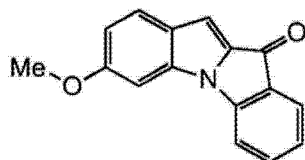
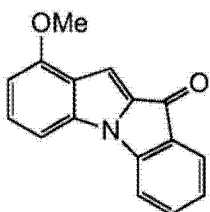
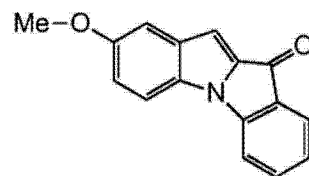
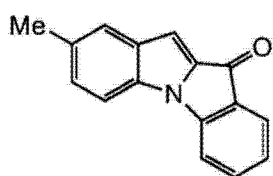
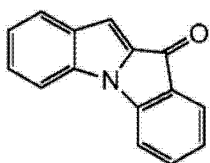


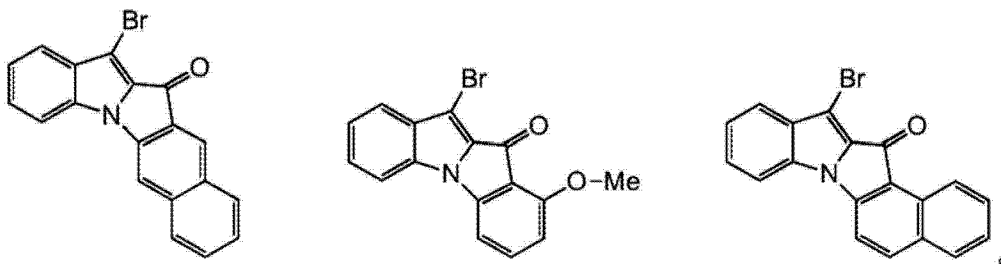
其中

X 为 O、NH 或 S,

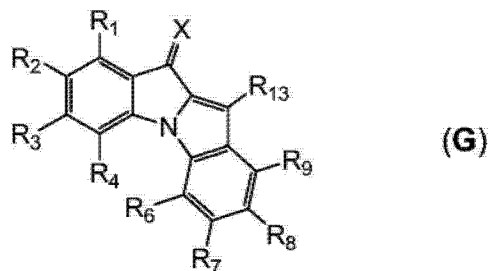
R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{13} 独立地选自氢、C1-4 烷基 ;C1-4 烷氧基 ;融合或线性连接的芳基 ;融合或线性连接的杂芳基 ;卤素 ;氰基 ;硝基 ;甲酰基 ;和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基 ;

其中排除以下化合物 :





15. 下述结构式的化合物在用于检测外部刺激的指示剂体系中的用途，



其中

X 为 O、NH 或 S，

R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{13} 独立地选自氢、C1-4 烷基；C1-4 烷氧基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基。

新指示剂平台

发明领域

[0001] 本发明公开了一类新的响应外部刺激如生化环境、温度或光辐射的生色和荧光的指示剂。所述新指示剂提供了广泛的可能应用范围,涉及例如生物体系或光学数据存储的应用。

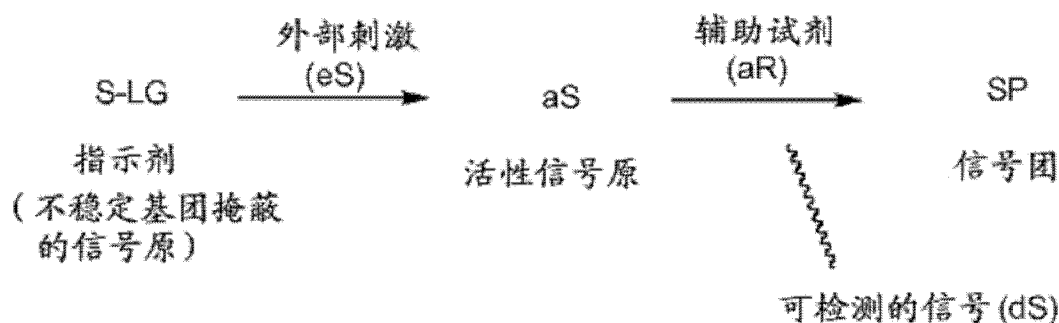
[0002] 发明背景

[0003] 指示剂为响应于外部刺激(也表示为"eS")生成可检测信号(也表示为"dS")的物质。该刺激一般包括温度、光(光不稳定或光致变色的指示剂)、电场(电致变色的指示剂)、压力(压电指示剂)、离子浓度(例如,pH指示剂)和生物化学反应性(例如,酶指示剂)。

[0004] 将刺激翻译为可检测信号的机制解释在方案 I 中,并且通常涉及在所述刺激介导的过程中指示剂的不稳定基团(也表示为"LG")的化学除去或改性。

[0005] 方案 I:指示剂体系的一般概念和术语

[0006]



[0007] 不稳定基团的除去或改性最经常获得活化的信号原(signalogen)(也表示为"aS"),其通常经历进一步的转化(常常涉及与辅助试剂(也表示为"aR")的相互作用)以生成信号团(signalophore)(也表示为"SP"),该信号团的形成通常与所述可检测信号的发生同时。因此,指示剂表示被掩蔽的活化的信号原,即通过不稳定基团使其失活。指示剂体系(也表示为"IS")包含活化的信号原、不稳定基团、辅助试剂(任选的)、可检测信号的要素,以及询问(interrogation)可检测信号的合适手段(means)。可检测信号的出现为经历外部刺激的结果,并且因此通过合适的设备或人眼的询问实现了外部刺激的方便的检测和/或定量。

[0008] 可检测信号的实例包括光密度的改变、吸收(absorption)或发射(emission)(如生色、荧光和发光的指示剂)或者电流或电场的改变(生电指示剂)。

[0009] 可检测信号在性质上可以为短暂的或持久的:例如,荧光酶指示剂在经历一定的酶活性时可以释放出荧光实体。在该情况中,可检测信号在性质上是持久的。相反,生物发光指示剂可以响应于ATP的存在而发光。代表可检测信号的光的发射在性质上是短暂的。

[0010] 可检测信号可以与暂时或永久性外部刺激相关:例如,pH指示剂响应于表示永久性外部刺激的质子浓度变化而连续改变颜色。在该情况中,相应的指示剂经历相反的改变,并且称为可逆指示剂体系。相反,光不稳定的(photo-labile)指示剂响应于短激光脉冲可

以经历持久的颜色变化。在这种情况下,相应的指示剂在单个外部刺激时经历不可逆的变化,并称为不可逆指示剂体系。

[0011] 此处存在大量的重要应用,包括与不可逆指示剂相关的生物、诊断、化学和光学数据存储。

[0012] 在生物中使用的指示剂常常响应于酶活性。酶指示剂用于许多形式的测定中。这些测定可以在需求可溶性指示剂体系的溶液相中实施。

[0013] 其他测定需求酶活性的物理位置。在此,合适的指示剂将会对与酶活性相关的具体位点进行染色。为此目的,响应于局部的酶刺激指示剂必须形成不可溶沉淀。这些类型的指示剂称为不可溶或沉淀指示剂体系。沉淀指示剂体系在性质上是不可逆的。

[0014] 检测酶活性在诊断和测试应用以及生物化学、分子生物学和组织学研究中是重要的。在诊断中,酶活性与微生物病原体的存在相关,以及与代谢不良或基因疾病相关。

[0015] 免疫方法基于抗体与抗原的相互作用。为了检测这种相互作用,抗体必须携带标记。通常使用酶标记第二抗体。因此,检测酶活性对于免疫测定是基础。免疫测定广泛适用于临床诊断、食品和环境测试以及生物化学实验方案如蛋白质印迹法 (Western blotting)。

[0016] 在分子生物学中,需要在报道基因实验方案中检测酶活性。报道基因的基因表达产生了可以被检测的酶活性。以这种方式,研究者获得了遗传转化的信息。

[0017] 1H-Indox-3-基指示剂体系

[0018] 1H-Indox-3-基(也表示为"Indox")指示剂是在微生物学、免疫学、生物化学和遗传学中广泛用于使酶活性形象化的生色指示剂(chromogenic indicator)。

[0019] Indox 指示剂体系衍生自 1H-吲哚-3-酚(1H-indol-3-ol)(3-羟基吲哚,其相应的互变异构体形式二氢吲哚-3-酮或 3-氧代二氢吲哚,称为 Indoxol) 结构,其中 3-羟基的氢原子被不稳定基团所取代。不稳定基团的失去生成 Indoxol 作为活化的信号原,其与大气氧(常见辅助试剂)以复杂自由基链反应形式相互作用从而生成胶体靛蓝染色剂作为信号团。与靛蓝染料相关的样品在光传输方面的剧烈变化表示指示剂体系的可检测信号。

[0020] 尽管它们具有广泛的用途和在商业上的重要性,Indox 指示剂体系的应用承受一些重要的限制:

[0021] 例如,Indox 指示剂体系依赖于分子氧或其他氧化辅助试剂来产生所需的靛蓝信号团。由于所述需要,吲哚酚(indoxyl)底物在厌氧条件下是受限的或者无法利用。考虑到在缺氧情况中进行的酶测定部分,该限制是显著的。

[0022] 因此,性质类似于吲哚酚指示剂但不具有对分子氧或其他氧化剂的所不期望的依赖性的指示剂将构成相对于现有技术的重大进步。

[0023] 大多数常见的 Indox 指示剂产生紫色至绿色范围的染色,这是由于红靛对于染色目的而言效率较低。

[0024] 然而,当使用生色的或荧光的指示剂体系时,具有许多可选的颜色将会是有利的。这在要求平行检测的二元或多元酶测定中或者在相对灰白色背景(offwhite background)要求光学对比度的应用中是特别重要的。

[0025] 因此,将目前的颜色选择扩大至黄色至红色范围的新的生色酶指示剂会代表对现有技术的更有价值的贡献。

[0026] 此外,常见的酶指示剂在性质上为生色的或荧光的:例如,常见的基于荧光团如7-羟基香豆素(7-hydroxycoumarine)(可溶性荧光指示剂)或喹唑啉(沉淀荧光指示剂-参见例如:EP 0 641 351 A1)的市售酶指示剂在可见电磁谱带缺乏显著的吸收,并且因此在不应用光学仪器而通过人眼观察时不可被检测。相反地,常见的生色指示剂,如衍生自3-吲哚酚的那些,缺乏荧光。这特别对于沉淀指示剂是确实的,这是由于固态荧光是很稀少的现象(归因于公知的排列在密晶格(tight lattice)中的激发分子的自淬灭作用)。

[0027] 相对于现有技术如果能够提供同时具有生色性能和荧光性能的酶指示剂将会是有利的。

[0028] 重氮染色(Diazonium Staining)

[0029] 历史上,另一类型的指示剂是公知的,并且经常用来定位酶活性。该方法由Seligman等人(J. Histochem. Cytochem. 1954, 2, 209-229)、Burstone等人(J. Histochem. Cytochem. 1956, 4, 217-226)和Rutenburg等人(J. Histochem. Cytochem. 1958, 6, 122-129)开创。其基于稳定的重氮盐与富电子芳香胺和酚类形成偶氮染料反应。许多偶氮染料具有浓烈的颜色,其中一些为荧光的。

[0030] 与芳香胺类和酚类进行的该重氮偶联反应将会以比与它们相应的酯类和酰胺类进行的该重氮偶联反应更快的速度进行。因此,水解酶活性可以通过将样品暴露于合适的酚酯或苯胺、接着使用重氮盐染色来检测。取决于底物和重氮盐,可以实现好的定位(localization)。

[0031] 实际上,使用了不同类型的发色团(chromogen)如萘胺或萘酚衍生物。存在相当大量的这种类型与合适的重氮染色盐一起的市售底物。

[0032] Pearson等人(Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1961, 108, 619-613; Lab. Invest. 1963, 12, 712-720)、Yarborough等人(J. Reticuloendothelial Soc. 1967, 4, 390-408)、Gossrau等人(Histochemistry, 1987, 397-404)和其他人开发出了基于Indox指示剂与重氮亲电子试剂的反应在组织学中应用的染色方法。

[0033] Mohler和Blau(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 12423-12427)已经评估了用于 β -D-半乳糖苷酶结合Indox指示剂和各种商用重氮盐的许多指示剂体系。

[0034] 然而,应当注意的是,由于重氮盐对人和细胞组织的致癌性和高毒性以及其他有害性质,该方法向使用者带来了很大的危险,并且一般而言与体内或非破坏性类型的测定是不相容的。

[0035] 依据上述内容,将会有利的是高级类型的释放活化信号原的指示剂,其同时在方法中产生信号团,该信号团完全独立于在周围环境中存在的外部因子如分子氧或任何试剂或化学物质。

[0036] 金属螯合物

[0037] 另一类沉淀底物基于与金属离子形成不可溶复合物的金属螯合分子。螯合分子含有两种或更多种配位至金属离子的官能团。这些官能团可以被不稳定基团掩蔽以防止金属复合物的形成,这代表相对常见的指示剂设计。

[0038] 基于金属螯合物的酶指示剂没有实际的相关性。例如,衍生自8-羟基喹啉如8-羟基喹啉- β -D-葡萄糖苷酸或天然存在的七叶亭(七叶苷- β -D-吡喃葡萄糖苷)的底物可以用来检测在铁(III)盐中存在的相应的酶。

[0039] 然而,这些指示剂具有其他缺点:许多这些螯合分子对培养物显示了杀生物作用。这些毒性是所有金属螯合剂的本质,这是由于它们一般干涉金属酶的功能性。此外,必须在测定中保持存在一定浓度的金属离子,这可能会引起不期望的干涉。此外,金属螯合产生的大多数染色剂为棕色的,因此不会提供相对于背景的良好对比。

[0040] 例如,8-羟基喹啉为与多种过渡金属形成稳定配合物的优异配体。用合适的不稳定基团掩蔽羟基产生了可能有用的指示剂。该测定将会释放出8-羟基喹啉作为活化的信号原,其快速结合铁(II或III),由此形成深色着色的沉淀金属复合物。此外,8-羟基喹啉具有显著的抗微生物活性,其可以抑制在微生物测定中一些突出有机体(prominent organism)的生长。

[0041] 因此,酶指示剂优选应当不包括螯合剂或非天然的金属离子浓度,这本质上会干扰测定过程。

[0042] 发明概述

[0043] 本发明意在克服现有指示剂的严重局限,所述局限包括:

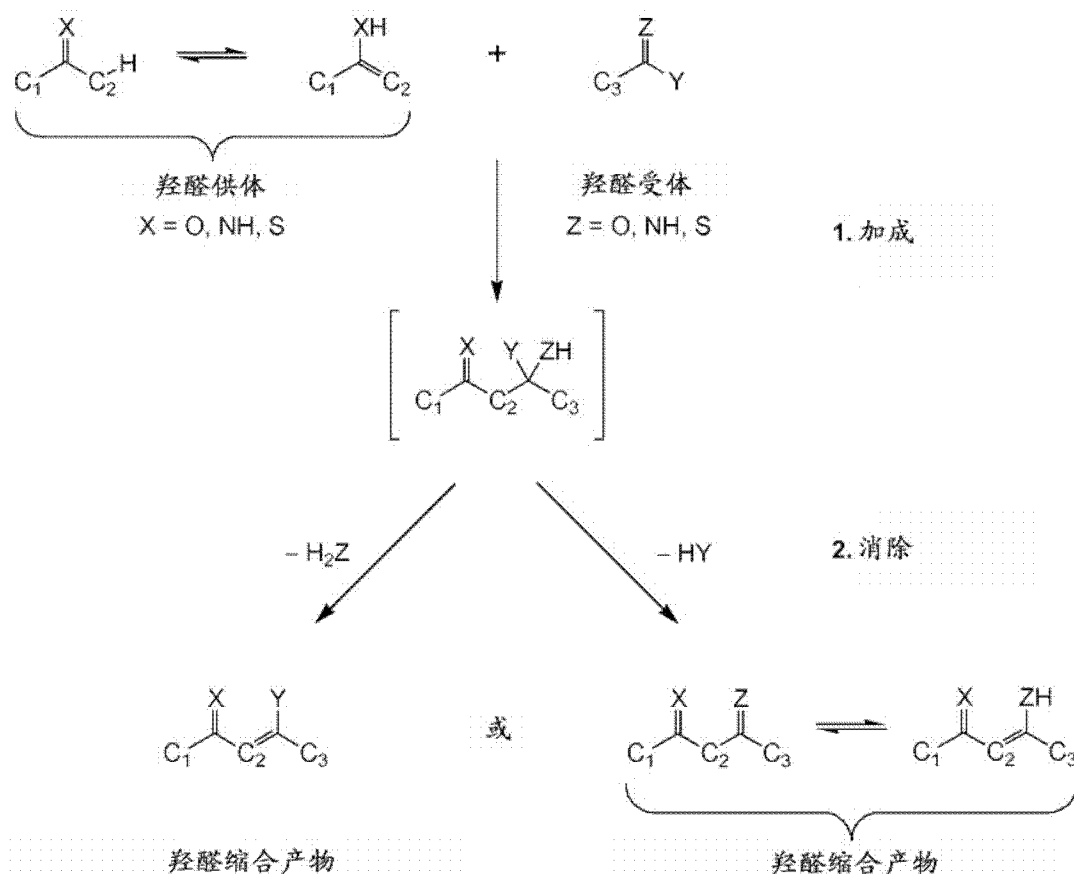
- [0044] • 对辅助染色试剂如氧、氧化剂、金属离子、烈性 pH 条件或毒性重氮盐的需求。
- [0045] • 可能影响测定的毒性试剂、中间体或产物的存在。
- [0046] • 沉淀生色指示剂的指示剂颜色局限于绿色-蓝色-紫色范围(缺乏黄色至红色)。
- [0047] • 对显示荧光性质的沉淀酶指示剂的选择的缺乏。
- [0048] • 结合生色性质和荧光性质的沉淀酶指示剂的缺乏。

[0049] 本发明是基于发现 1H-Indox-3-基化合物及其衍生物有效地经历分子间和分子内羟醛类型的反应生成了新的染料,该染料适于指示事件或环境变化的目的。

[0050] 术语“羟醛缩合(aldehyde condensation)”通常用于羟醛供体基团 $C_1-(C=O)-C_2$ 或其互变异构体 $C_1-C(OH)=C_2$ (即烯醇式)与羟醛受体 $C_3-(C=O)-Y$ 之间的两步化学反应。该反应涉及(1)前者向后者的碳基添加甲醛,由此形成供体的 C_2 与受体的羰基碳原子之间的碳-碳键,和(2)接下来消除水(H_2Z , $Z=O$)或 HY ,取决于余下的 Y 的性质。其中两个羰基氧中的任一个被含杂原子的物种 Z 如 NH 或 S 所取代的等价反应为杂-羟醛缩合(hetero-aldehyde condensation)。在下文中,术语“羟醛”过程也意在包括杂-羟醛过程,除非另有说明。羟醛缩合的一般原理示于方案 II 中。

[0051] 方案 II:羟醛和杂-羟醛缩合的一般示意

[0052]

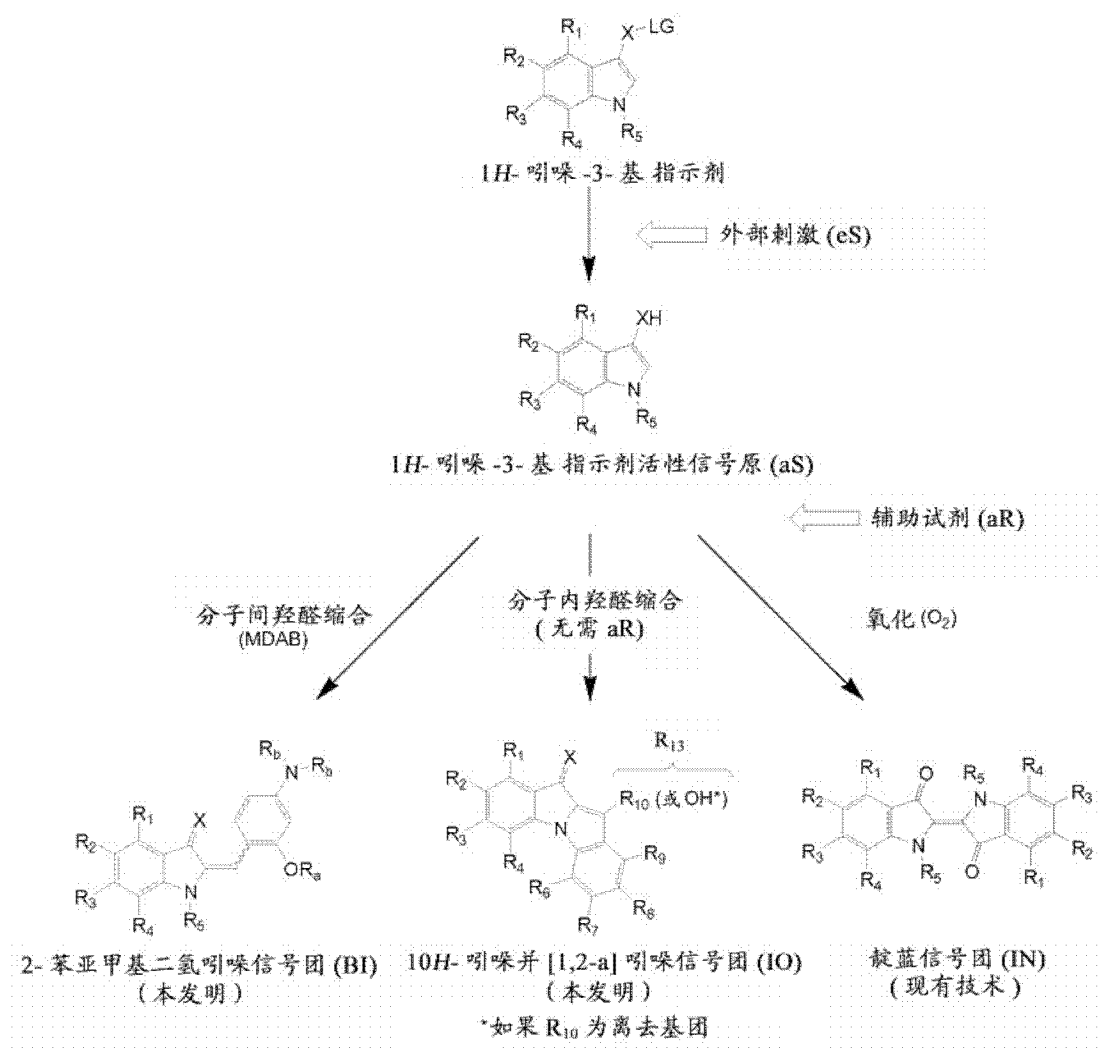


[0053] 在以上示意中,如果Y表示有效的离去基团(比ZH更有可能离开),如卤素、氰基、氰硫基和任选取代的铵、羟基、巯基和磺酰基,缩合产物的形成包括HY的消除(方案II,右下结构)。此外, H_2Z (一般为水)的损失引起另一种缩合产物(方案II,左下结构)。

[0054] 根据本发明包括与现有技术比较的分子间和分子内羟醛缩合途径的介绍性概览示于方案III中。

[0055] 方案III:本发明的概述和总结

[0056]



[0057] 在上述中，

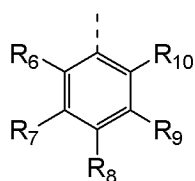
[0058] -R_a 和 R_b 表示氢或 C1-4 烷基，

[0059] -R₁、R₂、R₃、R₄、R₆、R₇、R₈、R₉ 和 R₁₀ 独立地选自氢、C1-4 烷基；C1-4 烷氧基；融合或线性连接芳基 (fused or linearly connected aryl)；融合或线性连接的杂芳基 (fused or linearly connected heteroaryl)；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基；

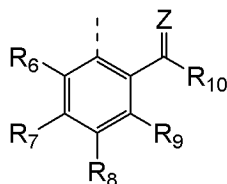
[0060] -R₅ 表示氢、R₁₁ 或 R₁₂，

[0061] 其中 R₁₁ 为

[0062]



和 R_{12} 为



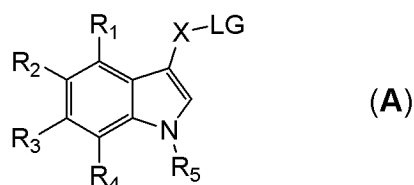
[0063] -X 选自 O、NH 和 S, 和

[0064] -MDAB 表示 2- 甲氧基 -4-(N, N- 二甲基氨基) 苯甲醛。

[0065] 在上文中和在下文中, 术语“任选取代的”表示具有一般呈惰性部分的取代, 其中术语“一般呈惰性”在本文中是指一般不干涉本发明方法操作的任何部分。一般呈惰性的基团或部分的代表性实例一般可以包括氢和如下的有机基团, 如芳香族, 包括苯基、烷基 - 和 / 或卤素取代的苯基、萘基、苯基 -、烷基 - 和 / 或卤素取代的萘基; 饱和的有机残基包括直链和支链的烷基, 例如, 甲基, 乙基, 丙基, 包括环丙基, 丁基, 包括环丁基和甲基取代的环丙基, 戊基, 包括例如环戊基和甲基取代的环丁基, 己基, 包括例如环己基、甲基取代的环戊基和二甲基或乙基取代的环丁基、庚基, 包括环庚基等, 辛基、包括环辛基, 等; 卤素取代的烷基, 包括卤素取代的环烷基, 例如, 氟烷基, 全氟烷基, 例如, 三氟甲基, 和氯烷基; 烷氧基, 例如, 甲氧基, 芳氧基, 例如, 苯氧基; 烷基硫氧基 (thioxy), 例如, 甲基硫氧基; 芳基 - 硫氧基, 例如, 苯基硫氧基; 酰基, 例如, 苯甲酰基和乙酰基, 等等。

[0066] 根据本发明的一个方面, 检测外部刺激的指示剂体系包括如下通式的指示剂化合物

[0067]



[0068] 其中:

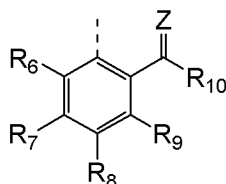
[0069] X 为 O、NH 或 S;

[0070] LG 为不稳定基团, 其中 X-LG 部分易于通过所述外部刺激的作用而转化;

[0071] R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地选自氢、C1-4 烷基; C1-4 烷氧基; 融合或线性连接的芳基; 融合或线性连接的杂芳基; 卤素; 氰基; 硝基; 甲酰基; 和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基;

[0072] R_5 为氢或 R_{12} , 其中 R_{12} 为

[0073]



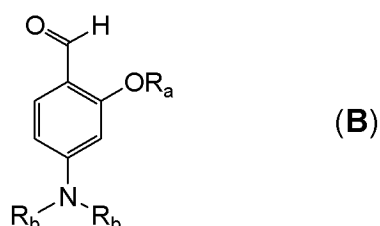
[0074] 其中：

[0075] Z 为 O、NH 或 S；

[0076] R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 独立地选自氢、C1-4 烷基；C1-4 烷氧基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基；

[0077] 并且其中，如果 R_5 为氢，则所述指示剂体系进一步包含下述通式的受体化合物

[0078]



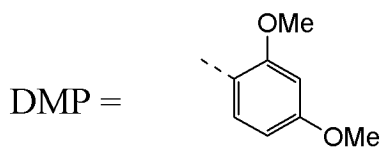
[0079] 其中 R_a 和 R_b 独立地选自氢和 C1-4 烷基。

[0080] 根据基于分子间羟醛反应的指示剂体系的一个实施方案， R_5 为氢，且所述受体化合物 (B) 为 2-甲氧基-4-(N,N-二甲基氨基)苯甲醛，其已经被确定为优选用于预期目的。

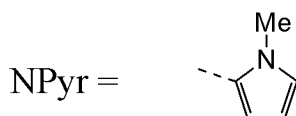
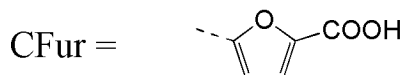
[0081] 取决于指示剂体系的应用，LG 可以选自大量可能的不稳定基团，其中许多在本领域中是已知的。特别地，LG 选自 β -D-吡喃半乳糖苷、叔丁基二甲基甲硅氧基 (TBDMS)、乙酰氧基 (acetate)、磷酸胆碱、 α -D-吡喃葡萄糖苷、 β -D-葡萄糖苷酸钠盐、N-乙酰基- β -D-吡喃半乳糖苷和 β -D-吡喃葡萄糖苷。

[0082] 根据基于分子内羟醛反应的指示剂体系的一个实施方案， R_{10} 选自氢、甲基、甲氧基、苯基、DMP 或杂芳基，所述杂芳基包括 CFur、Fur、NPyr，其中：

[0083]



[0084]



[0085] 根据本发明另一方面，在关注区域检测外部刺激的方法包括以下步骤：

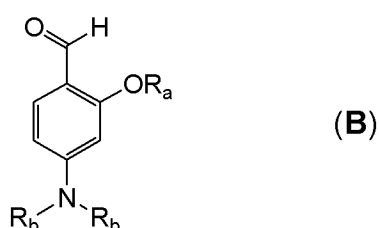
[0086] - 向关注区域提供如上所定义的指示剂体系 ; 和

[0087] - 监控来自作为所述外部刺激的结果而形成的信号团物质的信号 ;

[0088] 所述指示剂体系包括指示剂化合物, 其具有连接至杂原子 X 的不稳定基团 LG, 其中 X 为 O、NH 或 S, 所述 X-LG 部分易于通过所述外部刺激的作用而转化, 所述转化导致活性信号原物质 (aS) 的形成, 该活性信号原物质 (aS) 包含如下的部分, 其中 X 连接至碳原子, 该碳原子通过双键连接至另一碳原子 ; 并且所述活性信号原物质具有羟醛供体性质, 并由此促进了羟醛缩合事件。因此, 所述活性信号原物质 (aS) 在合适的羟醛受体分子的存在下生成信号团物质, 所述受体分子含有选自羰基、亚氨基和硫代羰基的反应性亚结构 (sub structure)。

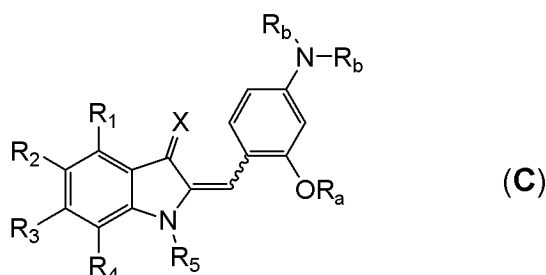
[0089] 在基于分子间羟醛缩合的优选实施方案中, 所述受体部为羰基部分, 并且通过施用以下通式的受体化合物而提供 :

[0090]



[0091] 其中 R_a 和 R_b 独立地选自氢和 C1-4 烷基, 由此提供指示剂体系, 其中所述信号团物质衍生自如下所示的一般结构 2- 苯亚甲基二氢吡啶 (C)。

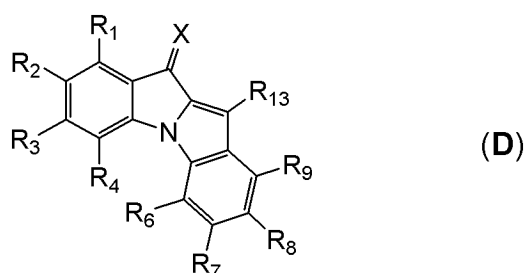
[0092]



[0093] 在该实施方案中, 所述受体化合物 (B) 优选选为 2- 甲氧基 -4-(N,N- 二甲基氨基) 苯甲醛。

[0094] 在基于分子内羟醛反应的特别优选的实施方案中, 所述受体部分为所述指示剂分子的部分, 并且如果 R_5 为 R_{12} , 那么信号团物质为具有以下结构通式的 10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶 :

[0095]

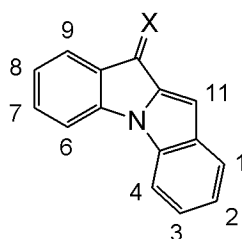


[0096] 其中 R_{13} 为 OH 或 R_{10} 。

[0097] 注意 : R_x 的编号从指示剂保持到信号团, 但是命名方法发生变化。因此, 结构 (D)

的化学名称衍生自以下编号方案：

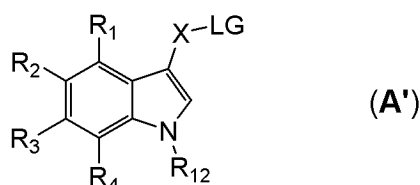
[0098]



[0099] 在一个实施方案中,上文所定义的方法在基本除氧的条件下实施。

[0100] 根据本发明的再一方面,提供了制备通式 (A') 的指示剂化合物的方法

[0101]



[0102] 其中：

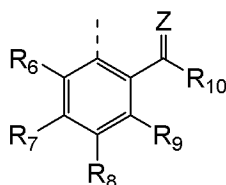
[0103] X 为 O、NH 或 S；

[0104] LG 为不稳定基团其中 X-LG 部分易于通过所述外部刺激的作用而转化；

[0105] R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 独立地选自氢、C1-4 烷基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基；

[0106] 且 R_{12} 为

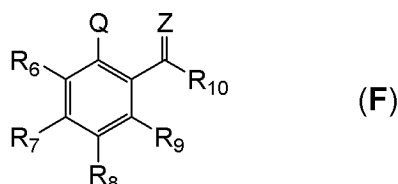
[0107]



[0108] 其中：Z 为 O、NH 或 S；

[0109] 和其中 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 独立地选自氢、C1-4 烷基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基。该方法包括用以下通式的苯衍生物

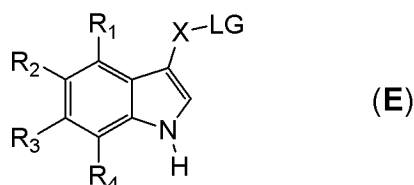
[0110]



[0111] 其中 Q 为选自碘、溴、三氟甲磺酰氧基 (triflate) 和甲苯磺酰氧基 (tosylate) 离去基团, 优选碘或溴,

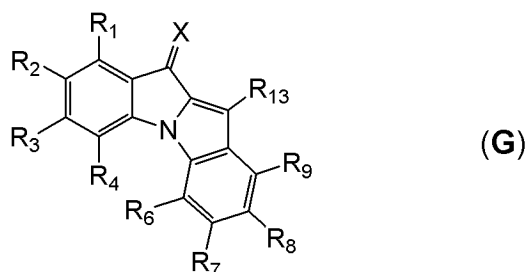
[0112] N-芳基化以下通式的吲哚酚化合物的步骤

[0113]



[0114] 根据本发明的另一方面,提供了结构式 (G) 的化合物

[0115]



[0116] 其中

[0117] X 为 O、NH 或 S

[0118] R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{13} 独立地选自氢、C1-4 烷基 ; 融合或线性连接的芳基 ; 融合或线性连接的杂芳基 ; 卤素 ; 氰基 ; 硝基 ; 甲酰基 ; 和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基。这些化合物 (G) 一般分类为咪唑并 [1,2-a] 咪唑 (因此也表示为 " IO ")。

[0119] 大量的式 (G) 化合物已经在 Rogness 和 Larock (Tetrahedron Letters 2009, 50, 4003-4008) 中提及,该文献据传可在 2009 年 4 月 14 日获得。因此,优选的实施方案包括上述定义的结构式 (G) 的化合物,其中除了 Rogness 和 Larock 的表 2 和 3 中列出的化合物 (参见权利要求 14)。

[0120] 根据本发明的另一方面,结构式 (G) 的化合物在指示剂体系中用于检测外部刺激。这种外部刺激包括但不限于 : 加热或温度变化 ; 电磁辐射 ; 施加电势 ; 特定化学环境如酸性、碱性、氧化或还原 ; 特定化学物质如离子、酶、氧或氧化剂、氢或还原剂的存在 ; 特定生物物种如病毒、细菌、真菌、抗体、细胞和细胞器、细胞组织的存在 ; 和甚至植物、动物和人以及器官、体液、其废物或腐烂物 (decay)。

[0121] 根据本发明的指示剂或指示体系特别用于染色细胞、微生物菌落或细胞组织的目的。

[0122] 根据一个实施方案,本发明的用 IO 指示剂染色或指示与传统 Indox 染色或指示组合使用。

[0123] IO 指示剂的多种用途包括但不限于在血液培养物中生长的细菌菌落的染色、真菌培养物的染色,为标记单个细胞、微生物菌落或细胞组织进行染色,为在细胞组织、细胞菌落、细胞、细胞结构或细胞器内诱导荧光的目的进行染色。

[0124] 此外,IO 染色有助于以下目的 : 成像静态条件,如良性或恶性细胞组织、细胞、细胞结构、细胞壁、膜、室、细胞器、抗体、染色体、基因组、基因、质粒、载体、核酸链、蛋白质或酶的尺寸、位置、列举 (enumeration) 和扩散 (spread)。

[0125] 此外,IO 染色有助于以下目的 : 可视化动态事件,如良性或恶性细胞组织、单个细胞、细胞结构、细胞器、抗体、染色体、基因组、基因、质粒、载体、核酸链、蛋白质或酶的扩散 (diffusion)、生长或衰退,以及吞噬和发病的过程。

[0126] 再此外, I0 染色有用于以下目的: 记录、恢复 (retrieving)、存储或存档 (archiving) 数字信息。

[0127] 发明详述

[0128] 通过参照下文中本发明各个实施方式的描述和附图, 本发明在上文所述的和其他的特征和目的以及实现它们的方法将会更加明显, 并且将会更好地理解本发明本身, 在附图中:

[0129] 图 1 显示了各种 10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚染色剂 (标记为 “I0x”) 和相应的 β -D- 半乳糖苷酶指示剂 (标记为 “Ixa”) 的 UV/ 可见吸收光谱 (任意的吸光度单位 “AU”) (对于符号定义, 参见表 Ia 和 Ic) : a) x = 14 ; b) x = 16 ; c) x = 19 ; d) x = 21 ; e) x = 17 ; f) x = 15 ;

[0130] 图 2 显示了用各种 10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚染色的细菌菌落在 360nm 激发的以相对荧光单位 (RFU) 表示的荧光发射光谱 (对于符号定义, 参见表 Ia) ; 和

[0131] 图 3 显示了用各种 10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚染色的细菌菌落在 550nm 发射的以相对荧光单位 (RFU) 表示的荧光激发光谱 (对于符号定义, 参见表 Ia)。

[0132] 分子间羟醛指示剂: MDAB 染色和 BI 指示剂体系

[0133] 在该第一部分中, 公开了一种新的方法, 称为 MDAB 羟醛染色。该方法基于如下的发现: 一些 1H-Indox-3- 基活化的信号原和 2- 甲氧基 -4-(N, N- 二甲基氨基) 苯甲醛 (MDAB) 辅助试剂有效地经历分子间羟醛缩合, 得到了深红色至棕色着色的沉淀, 该沉淀适合于指示目的, 并由此提供了比现有技术广泛得多的新的指示剂体系。

[0134] 本文公开的 MDAB 染色技术的基础是发现了, Indox 活化的信号原具有显著的羟醛供体性质, 并且这种性质对一些羟醛受体、特别是 MDAB 具有高度特异性。

[0135] 具体地, 发现广泛使用的市售 Indox 指示剂, 其释放出 Indoxol 活化的信号原 5- 溴 -4- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (表 Ib, aS4) 和 5- 溴 -6- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (表 Ib, aS5), 产生了衍生自 2- 苯亚甲基二氢吲哚 -2- 酮母结构的深紫色染色剂 (表 Ic, 项目 11-22)。

[0136] 此外, 认识到 Indox 活化信号原的所述羟醛供体性质可以通过将氢替换为不稳定基团而掩蔽 3 位的 X-H 部分进行弱化或消除。

[0137] 原则上, 目前在指示剂体系中使用的包括氧或其他氧化剂作为辅助试剂的 Indox 指示剂可以用 MDAB 代替作为辅助试剂。

[0138] 然而, 在实践中, 不是所有的 Indox 活化信号原 (或其衍生的指示剂) 都会与 MDAB 形成有效的羟醛供体 / 受体对: 例如, 常用的 5- 溴 -4- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (表 Ib, aS4) 和 5- 溴 -6- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (表 Ib, aS5) 活化的信号原经证实比 6- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (表 Ib, aS3) 有效得多。

[0139] 例如, 0- 甲硅烷基化的 5- 溴 -4- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (表 Ia, I4b) 用作对于氟离子 (外部刺激) 的简单的指示剂: 该甲硅烷基基团对于氟离子而言是不稳定的, 在所述氟离子存在时释放出 5- 溴 -4- 氯 -1H- 吲哚 -3- 酚 (aS4) 与 MDAB 反应以得到所述的不溶性粉色沉淀 (表 Ic, BI4)。

[0140] 在第二实施例, 商购试剂 5- 溴 -4- 氯 -1H- 吲哚 -3- 基 - β -D- 吡喃半乳糖苷 (表 Ia, I4a) 和 MDAB 的混合物在无氧存在下在用 β -D- 半乳糖苷酶温育时产生了所述粉色染料, 而本领域公知的是, I4a 本身依赖于用作其指示剂作用的氧或氧化剂的存在。

[0141] 此外,测试 Indox 活化的信号原 3-氨基吲哚或 3-巯基吲哚(表 Ib, aS6 和 aS7)的羟醛供体性质。尽管 3-氨基吲哚不能与 MDAB 产生任何羟醛产物(表 Ic, BI6),但是 3-巯基吲哚和 MDAB 在强酸性条件下确实产生了特征性粉色染料(BI7)(表 IIa-c, 项目 14 和 15)。

[0142] 已测试的 Indox 指示剂体系列于表 IIa(需氧, 无 MDAB)、IIb(需氧, MDAB) 和 IIc(厌氧, MDAB) 中。

[0143] 进一步的实验揭示了 Indox/MDAB 指示可以用来通过使用特征性生物标记酶作为外部刺激对微生物菌落进行染色。重要的是,在这些研究中,MDAB 显示了对微生物细胞的生长没有毒性作用。结果总结在表 III 中。

[0144] 例如,在大气氧的存在或不存在下温育含所述 I4a/MDAB 指示剂体系的微生物平板培养物:尽管在氧的大气浓度条件下绿松石靛蓝(表 Ic, IN4)的形成占主导,但是染色的菌落由于在微-厌氧条件或厌氧条件下因 MDAB 染色(表 III, 项目 10)的作用形成 BI4(表 Ic)而表现为粉色。

[0145] 一般而言,发现衍生自 aS4 或 aS5 与 2 至 4 当量的 MDAB 的组合的市售获得的 Indox 指示剂是优选的用于在厌氧条件下染色微生物培养基的指示剂体系。

[0146] 指示剂 I9a, I10a, I11a 和 I12a 与 MDAB 的组合代表在需氧条件下有效的指示剂体系(表 III, 项 26-37):表现为,由 N-芳基化的 Indox 活化的信号原形成靛蓝是效率低的,并且分子内羟醛缩合反而占主导。

[0147] 分子内羟醛指示剂:I0 指示剂体系

[0148] 上述的 MDAB 染色为基于独特匹配的羟醛供体和 MDAB 羟醛受体对。在下文中,将披露类似的作用可以通过化学连接羟醛供体和受体而实现。

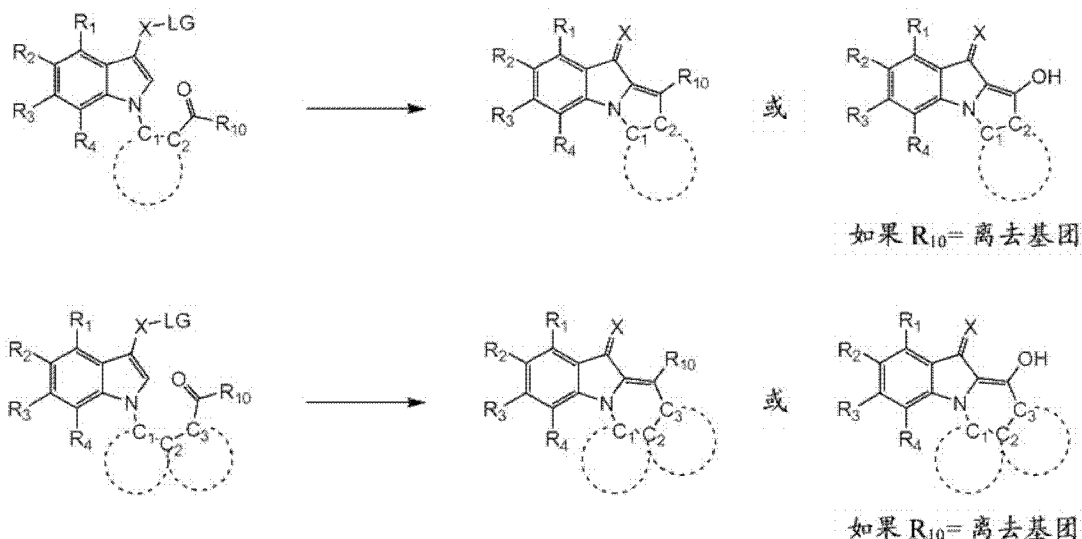
[0149] 本领域公知的是,分子内闭环反应(包括分子内羟醛反应)在高速率下进行,特别是如果在该过程中形成 5 或 6 元环的话。因此,开发该概念(the concept was developed)以连接羟醛供体和受体,使得供体和受体部分的空间安排有利于分子内羟醛缩合的事件。

[0150] 与上述 MDAB 染色类似,过早发生的羟醛缩合可以通过不稳定基团共轭至所述羟醛供体的掩蔽作用而防止。自发的羟醛缩合在不稳定基团响应外部刺激而离去或改性(化学还原)后发生。

[0151] 分子内羟醛指示剂的设计要求羟醛受体通过连接羟醛受体的 C₃ 原子的化学结构而连接至所述供体(方案 II)。传统的 IN Indox 指示剂向该连接基(linker)提供了完美的锚固位点:吲哚氮。所述连接可以包括一个或两个连续设置的原子 C₁ 和 C₂, 如方案 IV 所示。在前一种情况中,甲醛的分子内羟醛缩合(formal intramolecular aldol condensation)将会产生 5 元环,而在后一种情况中其将会在信号团结构中产生 6 元环。

[0152] 方案 IV:分子内 Indox 羟醛指示剂的可选设计

[0153]



[0154] • C₁、C₂、C₃ 代表任选被氢取代的碳原子；C1-4 烷基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；氰硫基；硝基；亚硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基、巯基和磺酰基

[0155] • R₁、R₂、R₃、R₄ 选自氢、C1-4 烷基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；氰硫基 (thiocyano)；硝基；亚硝基；甲酰基；和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基、巯基和磺酰基

[0156] • X 选自 O、NH 和 S。

[0157] 所述羟醛受体优选为芳香族羰基化合物, (因此 C_1 和 C_2 表示芳香环的成员) 从而使得分子内羟醛缩合将会引起延伸的共轭体系 (extended conjugated system) 的形成, 并由此提供具有有利光学性质的信号团。

[0158] 由于分子内羟醛反应的动力学优势,供体和受体分子不需要形成匹配供体 / 受体对,如 Indox/MDAB。

[0159] 在开发用来实现供体和受体结构之间所需连接的许多合成途径中,N-芳基化被发现是优选的方法。

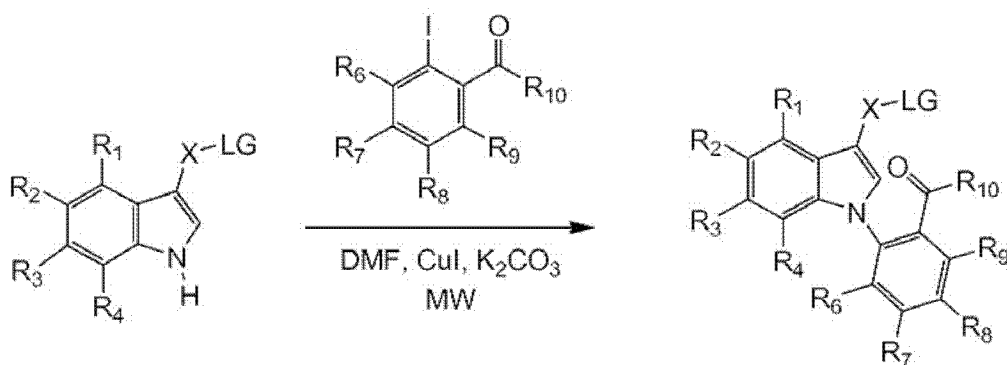
[0160] N-芳基化是良好建立的合成方法。例如,在本领域公知的是,吡啶容易与碘苯反应高产率地生成 N-苯基吡啶。

[0161] 例如, 3- 吡啶基 - β -D- 半乳糖苷 (I1a) 在 DMF 中在铜催化剂的存在下与碘苯的衍生物反应生成了相应的 1- 苯基 -3- 吡啶基 - β -D- 吡喃半乳糖苷 (I8a)。这是非常显著的, 因为选择糖类 (carbohydrate) 作为不稳定基团, 并且在不用化学保护的条件下使用所述糖类。

[O162] 类似地,新的羟醛型指示剂通过在多种条件(包括传统的 Ullmann 型铜催化或其较新的变体,如最近由 Taillefer 等人 (Efficient Iron/Copper Co-Catalyzed Arylation of Nitrogen Nucleophiles. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2007, 46, 934-936) 发表的)下,在一个简单的步骤中并且高产率地 N-芳基化相应的市购 1H-indox-3-基指示剂而获得。

[0163] 方案 V: 分子内 Indox 羟醛指示剂的制备

[0164]



Indox 指示剂

羟醛-Indox 指示剂

[0165] • R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 选自氢、C1-4 烷基；融合或线性连接的芳基；融合或线性连接的杂芳基；卤素；氰基；硝基；甲酰基和任选取代的氨基、羧基、羰基、羟基和磺酰基

[0166] • X 选自 O、NH 和 S。

[0167] 该方案显示了普遍的有效性：庞大数量的市售 Indox 指示剂通过上述 N-芳基化技术成功地共轭至大范围的芳香族羟醛受体，并由此提供简单、有效和一般性项目进入新类型的指示剂中（表 Ia，项目 15-46）。

[0168] 新的指示剂一般如所预期地响应于合适的外部刺激（表 IVa-c）。不稳定的掩蔽基团的除去引发了假设的羟醛缩合。

[0169] 酮类，（起内部受体作用），一般得到了亮色着色的不溶性颜色，范围从黄色、橙色、红色至棕色。偶尔地，观察到暂时性的深绿色荧光，这是 3-吡啶氧基（3-indoxyl）物质（如 aS 物质所代表的）的特点，这在假设的羟醛缩合方法中也具有暂时性。

[0170] 相反地，酯类（起内部受体作用）产生了持久的绿色荧光染料（表 Ic：I010，I011，I012），其自由地溶解于 pH 5 以上的水中。在进一步酸化时，所述染料从水溶液中形成橙色着色的非荧光沉淀。发现该方法通过添加碱可以完全反转。显然，所述染料性质为高度酸性的，并且在去质子化的形式下为高度荧光的。

[0171] 一般而言，所有这些染料衍生自母体吡啶并 [1,2-a] 吡啶（表 Ic，项目 23-46）。该吡啶并 [1,2-a] 吡啶结构形式上由共用氮和相邻吡咯碳的两个吡啶构成。尽管该结构的吸引力和简单性，吡啶并 [1,2-a] 吡啶（因此称为“IO”）看上去是新型的。

[0172] 在图 1 中，各种 IO 染色剂的吸收光谱与相应指示剂的一些重叠。该图显示了在相应的指示剂中同时缺乏 300 和 400nm 之间、400 和 500nm 之间的 IO 吸收，并因此提供了有用的可检测信号。

[0173] 例如， β -D-半乳糖苷酶温育 6-氯吡啶酚- β -D-半乳糖苷（I21a）的 N-二苯甲酮共轭物 24 小时产生了亮黄色沉淀，将该黄色沉淀收集、用水洗涤、干燥，并表征为 7-氯-11-苯基-10H-吡啶并 [1,2-a] 吡啶-10-酮（表 Ic，I021），其相应于期望的羟醛缩合产物。

[0174] IO 染色在平板培养基上测试，所述平板培养基用各种细菌 β -D-半乳糖苷酶阳性菌株温育。大肠杆菌（E. coli）的 β -D-半乳糖苷酶阳性菌株的菌落表现为黄色至红色，取决于所使用的指示剂，尽管 β -半乳糖苷酶阴性沙门氏菌属（Salmonella）菌落在存在或不存在测试的半乳糖苷酶指示剂时表现为无差异（表 Iva 和 IVb）。

[0175] 此外, I0 染色在产生各种不同生物标记酶的不同细菌上进行测试(表 IVc)。

[0176] 应当注意的是, I0 染色和经典的靛蓝(IN)染色可以有用地进行组合, 由此扩展了颜色方案(表 IVd): 例如, 指示剂 I4h 组合 I21a 在二元平板培养基测定中用于同时染色 β -D-葡萄糖苷酶和 β -D-半乳糖苷酶细菌菌种。对于前者生物标记呈阳性的菌株染色蓝色, 并且对于后者呈阳性的菌株染色黄色, 对于两种酶呈阳性的菌株染色绿色(蓝色和黄色的混合物)。

[0177] 公知的是, 兼性厌氧的微生物菌种的菌落生长在厌氧条件下相对较慢。由于温育时间延长, 用于厌氧培养菌落目的指示剂体系必须提供出色的局域化(localization)(或最小的扩散)。从表 IVe 中示出的实验数据, 可以总结出, 一些 I0 指示剂体系出色地适于所述目的。同时, 该数据显示出经典 IN 染色(I4a)的失败, 并显示出由匹配辅助试剂(如氧)的不存在所引起的相应的活化信号原的积累部分地抑制了微生物生长。

[0178] 血液培养基在临床微生物学中代表常见和必要的工具。微生物菌落在琼脂平板上的染色由于深色而模糊, 并且血琼脂平板缺乏半透明性。因此, 已经评估该 I0 指示剂体系适用于血琼脂(表 IVf)。这些实验生成了非常有利的结果: I0 信号团提供了出色的光学对比度和局域化。

[0179] 真菌培养物的染色是生物指示剂体系的另一重要应用领域。出于此目的, 已经设计出 I0 指示剂体系, 其对 D-半乳糖胺酶(D-galactosamidase)、臭名昭著的病原体白色念珠菌(*Candida albicans*)的生物标记酶的作用是不稳定的。尽管在所选条件下的菌落生长是适度的, 但是在 I21g 的存在下, 产生匹配外部刺激的真菌菌落变成黄色, 并且变为人眼易于辨别(表 IVg)。

[0180] 在温育之前、期间和之后在 366nm 的照明条件下检查在表 IVa-f 中列出的所有平板培养基。由此发现, 10H-吲哚并[1,2-a]吲哚-10-酮在固态为荧光的, 并且荧光作用通过 I0 染色的菌落保持: 一般而言, 在 366nm, 含有 I0 指示剂体系的平板培养基(除了血琼脂平板之外)提供了蓝色(bluish)背景, 在该背景上未染色的菌落表现为浅的阴影, 而 I0 染色的菌落突出于黄绿色至红色-棕色范围的亮色中, 提供出色的视觉上的对比度和高的灵敏性。

[0181] 血琼脂平板的血液成分有效地淬灭了荧光。因此, 平板在 366nm UV 光下表现为黑色。令人感兴趣的是, 分散在生长于血琼脂平板上的菌落中 I0 染色剂的荧光保持不受干扰, 并且提供了菌落相对于黑色背景的惊人的发光(表 IVf)。

[0182] 在下文中, 进一步研究如下的发现: I0 染色剂在微生物菌落内诱导了持久的荧光: 通过使用标准平板读取器, 可以在从平板培养基上收获的菌落中对荧光进行定量。发射的强度和波长很强地依赖于所使用的指示剂体系的类型。在各种发射扫描中收集的数据示于图 2 中。

[0183] 相应的样品同样经历了在 550nm 发射的激发扫描记录(图 3)。令人感兴趣的是, 已经发现 I0 染色剂在异常宽范围的 300 至 500nm 之间是可激发的。清楚的是, 许多 I0 染色剂的亮的闪亮颜色是由于环境光的激发(光学增亮)作用。

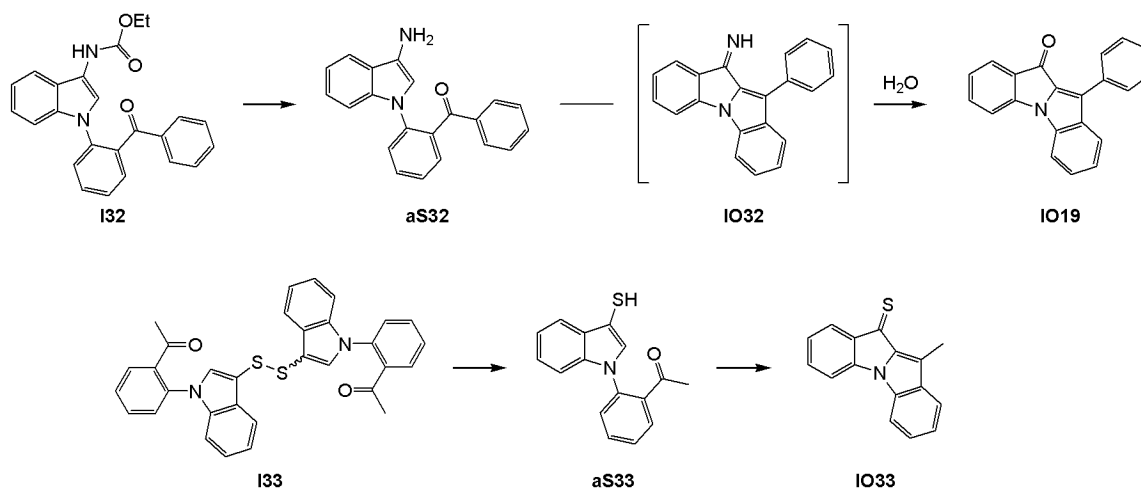
[0184] 在上述延伸研究中, 还识别出在产生荧光信号团的 I0 指示剂体系的存在下的大肠杆菌(*E. coli*)的标准液体培养提供了荧光标记单个细胞的新方法: 在从所述培养物采样的样品中, 大肠杆菌(*E. coli*)的单个细胞在标准荧光显微镜下变得清晰可见。

[0185] 因此, I0 染色可以提供简单和经济的方法用于活细胞标记, 活细胞标记通常依靠精细地应用荧光抗体或编码荧光蛋白质的遗传载体。

[0186] 最终, 本发明的范围通过评估 I0 指示剂体系的结构变化而进一步发展, 所述 I0 指示剂体系的结构变化来自于 1- 芳基 -1H- 吡啶 -3- 酚活化的信号原的氮和硫类似物。

[0187] 方案 VI : 杂原子连接的不稳定基团

[0188]



[0189] 对于所述目的, 1-(2- 苯甲酰基苯基)-1H- 吡啶 -3- 基乙基氨基甲酸酯 (I32) 经历碱和猪肝酯酶催化的水解。分离黄色沉淀, 通过与参考样品比较, 其鉴定为 11- 苯基 -10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶 -10- 酮 (IO19), 而不是期望的 11- 苯基 -10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶 -10- 亚胺 (IO32)。可能的解释为: 在会将 IO32 转化为所观察的 IO19 的测定条件下亚氨基可能发生水解。独立于作用的机制及其操作相关性, 该实验证实了, 该方案在原则上可以延伸至包括如下的指示剂体系, 其中所述不稳定基团连接至氮原子。该发现的重要性 (relevance) 在于多种重要的基于检测氨基 - 肽酶活性的生物应用, 以及在现有技术中没有可用的沉淀指示剂体系提供。

[0190] 在第二实施例中, 1-(2- 乙酰基苯基)-1H- 吡啶 -3- 硫醇 (thiole) (aS33) 的氧化形式, 二 [1-(2- 乙酰基苯基)-1H- 吡啶 -3- 基] - 二硫烷 (I33), 经历由 TCEP (为在蛋白生物化学中使用的标准试剂) 还原 S-S 桥, 由此释放出 aS33。尽管在中性条件下没有观察到可检测信号, 但是当使用碱性条件时, 测定溶液变成黄色, 由此清楚地显示出二硫化物还原的事件。该实施例强调了如下的实施: I0 指示剂体系代表一般性的和高度多样化的概念 (concept)。其也可以用于强调: 该 I0 指示剂体系绝不会受限于检测与酶活性相关的外部检测。在下文中呈现的许多实施例不应当被认为是对本发明的限制, 而仅仅是反映本发明人所努力从事的领域。

实施例

[0191] 实施例 1 : 通过 N- 芳基化 I1 至 I4 (表 Ia) 制备指示剂 I8 至 I31

[0192] 注意: 芳香族碘代化合物可以购买获得, 或者可以通过用邻 - 碘代苯甲酸的标准 Friedel-Crafts 酰化而制备。2-(2- 碘代苯甲酰基)-N- 甲基吡咯以类似于 Carson 等人 (W02000048584) 中的方法制备, 2-(2- 碘代苯甲酰基) 呋喃和 2-(2- 碘代苯甲酰基)-5- 羧基呋喃以类似于 Garland 等人 (DE2557956) 的方法制备, 和 4- 氯 -2- 碘代二苯甲酮根据

Gabbutt 等人 (Tetrahedron 2006, 62, 737-745) 的方法制备。1-乙酰基-2-碘代-4-甲氧基苯和 1-苯甲酰基-2-碘代-4-甲氧基苯通过 3-碘苯甲醚 (3-iodoanisole) 在氯化铝存在下的 Friedel-Crafts 反应而得到。

[0193] 实验在 Synthos 3000 多模式微波反应器 (Anton Paar GmbH) 中进行。调节下列参数: $P(\text{max}) = 1400\text{W}$; $T(\text{IRmax}) = 200^\circ\text{C}$; 驱动: 旋转; 搅拌子: 3; $p\text{-rate} = 2.0\text{bar/s}$ 。变速时间 (Ramp-time) = 2min (130°C) 和保持时间 = 180min (130°C)。配有特氟隆包覆的搅拌棒的 PTFE-衬管 (liner) (100ml) 用作反应容器。在典型的方法中, 5mmol 的 1H-吡啶-3-基指示剂、10mmol 的相应的芳基碘化物、5mmol 碳酸钾、0.5mmol 碘化亚铜 (I) 在 20ml DMF 中的混合物经历微波辐射 (MW irradiation)。产物混合物经过滤, 并且固体用 10ml 乙醇洗涤。滤液蒸发至干, 并且粗产物通过快速色谱法 [如硅胶、甲苯/乙醇 (5 : 1)] 纯化。

[0194] 在 Perkin-Elmer FT-IR 光谱仪 (模式 Spectrum ONE ($\nu[\text{cm}^{-1}]$)) 上的 IR 光谱显示为纯净固体。在 Bruker AVANCE-400 [400.13MHz (^1H), 100.61MHz (^{13}C)] 波谱仪上于 298K 记录 ^1H -NMR 光谱和 ^{13}C -NMR 光谱 (δ [ppm], J [Hz])。

[0195] 1-苯基-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I8a):

[0196] 产率: 628mg (34%); TLC [甲苯/乙醇 (5 : 3)]: R_f 0.47。

[0197] ^1H -NMR [$\text{DMSO}-d_6$]: 7.73-7.71 (m, 1H); 7.56-7.54 (m, 5H); 7.42 (s, 1H); 7.37-7.32 (m, 1H); 7.23-7.19 (m, 1H); 7.14-7.10 (m, 1H); 5.30-5.28 (d, 1H); 4.89-4.87 (d, 1H); 4.74-4.72 (d, 1H, $J = 7.8\text{Hz}$); 4.71-4.69 (d, 1H); 4.54-4.53 (d, 1H); 3.72-3.66 (m, 1H); 3.61-3.56 (m, 3H); 3.48-3.41 (m, 2H)。

[0198] ^{13}C -NMR [$\text{DMSO}-d_6$]: 139.18, 139.01, 132.28, 129.73, 125.73, 123.33, 122.99, 121.42, 119.60, 118.19, 113.35, 110.17, 104.22, 75.71, 73.33, 70.39, 68.23, 60.54。

[0199] 6-氯-1-苯基-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I9a):

[0200] 产率: 560mg (28%); TLC [甲苯/乙醇 (5 : 3)]: R_f 0.43。

[0201] ^1H -NMR [$\text{DMSO}-d_6$]: 7.72-7.70 (m, 1H); 7.58-7.56 (m, 4H); 7.52-7.51 (m, 1H); 7.45 (s, 1H); 7.41-7.37 (m, 1H); 7.16-7.13 (m, 1H); 5.30-5.29 (d, 1H); 4.89-4.87 (d, 1H); 4.72-4.71 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H); 4.69-4.67 (m, 1H); 4.54-4.53 (d, 1H); 3.71-3.63 (m, 2H); 3.59-3.55 (m, 3H); 3.43-3.39 (m, 1H)。

[0202] ^{13}C -NMR [$\text{DMSO}-d_6$]: 138.75, 138.55, 132.48, 129.85, 127.82, 126.29, 123.56, 120.11, 119.99, 119.65, 114.43, 109.81, 104.18, 75.73, 73.23, 70.30, 68.18, 60.50。

[0203] 1-[2-(甲氧基羰基)苯基]-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I10a):

[0204] 产率: 496mg (23%); TLC [甲苯/乙醇 (5 : 3)]: R_f 0.41。

[0205] ^1H -NMR [$\text{DMSO}-d_6$]: 7.89-7.87 (m, 1H); 7.77-7.69 (m, 2H); 7.56-7.52 (m, 2H); 7.25-7.02 (m, 4H); 5.27-5.26 (br. d, 1H); 4.87 (br. s, 1H); 4.67-4.65 (d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H); 4.65-4.64 (br. d, 1H); 4.53-4.52 (br. d, 1H); 3.71-3.63 (m, 2H); 3.58-3.49 (m, 3H); 3.44-3.39 (m, 1H)。

[0206] ^{13}C -NMR [$\text{DMSO}-d_6$]: 166.38, 138.94, 137.68, 133.77, 133.16, 130.73, 128.21, 128.04, 127.41, 122.79, 120.96, 119.41, 118.16, 114.62, 109.39, 104.54, 75.65, 73.34, 70.50, 68.16, 60.43, 52.24。

[0207] 6-氯-1-[2-(甲氧基羰基)苯基]-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I11a):

[0208] 产率:526mg(23%);TLC[甲苯/乙醇(5:3)]: R_f 0.41。

[0209] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6]:7.91-7.89(m,1H);7.78-7.74(m,1H);7.70-7.68(m,1H);7.60-7.55(m,2H);7.19(s,1H);7.10-7.08(m,1H);6.98(d,1H);4.65-4.63(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H);3.66-3.61(m,2H);3.56-3.51(m,3H);3.48(s,3H);3.42-3.39(m,1H)。

[0210] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6]:165.94,138.58,136.99,134.01,133.29,130.77,128.25,128.14,127.94,127.52,119.68,119.62,119.58,115.73,109.12,104.46,75.64,73.19,70.35,68.05,60.34,52.23。

[0211] 5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基羰基)苯基]-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I12a):

[0212] 产率:572mg(21%);TLC[甲苯/乙醇(5:3)]: R_f 0.41。

[0213] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6]:7.93-7.91(m,1H);7.81-7.74(m,1H);7.62-7.58(m,1H);7.54-7.52(m,1H);7.37-7.34(m,1H);7.27(s,1H);6.87-6.84(m,1H);4.70-4.68(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H);3.70-3.63(m,2H);3.54-3.52(m,3H);3.49(s,3H);3.43-3.39(m,1H)。

[0214] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6]:165.56,139.53,137.85,136.76,133.66,133.40,130.88,128.63,128.38,128.20,126.60,123.67,116.21,112.73,110.12,103.91,75.59,73.46,70.31,68.05,60.30,52.33。

[0215] 1-(2-甲酰基苯基)-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I13a):

[0216] 产率:443mg(22%);TLC[甲苯/乙醇(5:3)]: R_f 0.42。

[0217] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6]:9.64(s,CHO);8.01-7.99(m,1H);7.89-7.85(m,1H);7.75-7.73(m,1H);7.66-7.59(m,2H);7.45(s,1H);7.26-7.09(m,3H);5.29-5.27(br. d, 1H);4.89-4.88(br. d, 1H);4.75-4.73(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H);4.63-4.61(br. d, 1H);4.54-4.53(br. d, 1H);3.71-3.65(m,2H);3.54(br. s, 3H);3.43-3.36(m,1H)。

[0218] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6]:189.40,141.07,139.27,135.46,135.02,131.03,128.37,127.99,127.91,123.37,120.92,119.88,118.24,115.60,109.66,104.13,75.61,73.26,70.36,68.09,60.35。

[0219] 1-(2-乙酰基苯基)-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I14a):

[0220] 产率:1.20g(60%);TLC[甲苯/乙醇(5:3)]: R_f 0.38。

[0221] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6]:7.75-7.70(m,3H);7.59-7.54(m,2H);7.21(s,1H);7.18-7.09(m,2H);7.05-7.03(m,1H);5.29-5.27(br. d, 1H);4.87-4.85(br. d, 1H);4.69-4.67(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H);4.63-4.61(br. s, 1H);4.52-4.51(br. d, 1H);3.71-3.62(m, 2H);3.58-3.50(m,3H);3.46-3.39(m,1H);1.82(s,3H)。

[0222] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6]:200.12,139.13,137.09,136.59,133.75,132.61,129.14,127.86,127.69,123.10,120.72,119.64,118.16,114.58,109.56,104.24,75.56,73.23,70.38,68.05,60.28,28.28。

[0223] 1-(2-乙酰基苯基)-4-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I15a):

[0224] 产率:1.09g(49%);TLC[甲苯/乙醇(5:3)]: R_f 0.41。

[0225] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6]:7.79-7.72(m,2H);7.62-7.58(m,1H);7.54-7.53(m,1H);7.29(s,1H);7.12-7.07(m,2H);6.97-6.92(m,1H);5.02-5.01(br. d, 1H);4.86-4.85(br. d, 1H);4.77-4.75(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H);4.63(br. s, 1H);4.55-4.54(br. d, 1H);3.72-3.65(m,

2H) ;3.55(br. s, 3H) ;3.46-3.40(m, 1H) ;1.92(s, 3H)。

[0226] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :199.75, 138.48, 137.14, 136.00, 135.01, 132.72, 129.27, 128.24, 128.07, 124.21, 123.63, 120.41, 117.24, 114.95, 108.65, 103.51, 75.53, 73.54, 70.39, 68.07, 60.27, 28.40。

[0227] 1-(2-乙酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I16a) :

[0228] 产率:0.96g(44%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.46。

[0229] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.78-7.70(m, 3H) ;7.62-7.57(m, 2H) ;7.25(s, 1H) ;7.17-7.12(m, 1H) ;7.05-7.04(m, 1H) ;5.30-5.29(br. d, 1H) ;4.88-4.86(br. d, 1H) ;4.68-4.66(d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H) ;4.63-4.61(br. s, 1H) ;4.52-4.51(br. d, 1H) ;3.70-3.62(m, 2H) ;3.56-3.50(m, 3H) ;3.42-3.39(m, 1H) ;1.91(s, 3H)。

[0230] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :199.95, 138.83, 137.06, 135.83, 133.97, 132.71, 129.29, 128.18, 127.85, 125.23, 120.04, 119.70, 119.49, 115.73, 109.38, 104.25, 75.62, 73.17, 70.33, 68.04, 60.29, 28.45。

[0231] 1-(2-乙酰基苯基)-5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I17a) :

[0232] 产率:0.61g(23%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.42。

[0233] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.83-7.80(m, 1H) ;7.77-7.73(m, 1H) ;7.64-7.60(m, 1H) ;7.56-7.53(m, 1H) ;7.41-7.39(m, 1H) ;7.35(s, 1H) ;6.92-6.90(m, 1H) ;5.07-5.06(br. d, 1H) ;4.87-4.86(br. d, 1H) ;4.74-4.72(d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H) ;4.62(br. s, 1H) ;4.55-4.53(br. d, 1H) ;3.71-3.64(m, 1H) ;3.55(br. s, 3H) ;3.47-3.39(m, 2H)。

[0234] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :199.56, 138.04, 137.03, 135.44, 133.60, 132.77, 129.38, 128.54, 128.33, 126.96, 123.77, 118.55, 116.27, 113.05, 110.39, 103.72, 75.57, 73.44, 70.32, 68.06, 60.27, 28.50。

[0235] 1-(2-乙酰基-5-甲氧基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I18a) :

[0236] 产率:1.6g(65%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (4 : 1)] : R_f 0.36。

[0237] FT-IR :3459m, 2964w, 2927w, 2867w, 1665s, 1601s, 1569m, 1497m, 1471s, 1451s, 1372s, 1267s, 1220s, 1140s, 1081s, 1053s, 1020s, 975m, 945m, 880m, 800m, 735m, 696m。

[0238] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.80(d, $J = 8.7$, 1arom. H) ;7.71(d, $J = 8.5$, 1arom. H) ;7.28(s, 1arom. H) ;7.17-7.11(m, 2arom. H) ;7.07(d, $J = 2.5$, 1arom. H) ;7.06(d, $J = 1.7$, 1arom. H) ;5.30(d, $J = 5.0$, OH) ;4.87(d, $J = 5.8$, OH) ;4.68(d, $J = 7.8$, H-C(1)_{Gal}) ;4.64(t, $J = 5.2$, OH) ;4.52(d, $J = 4.7$, OH) ;3.88(s, OCH₃) ;3.70(t, $J = 4.0$, H-C(4)_{Gal}) ;3.65(m_c, 1H-C_{Gal}) ;3.58-3.51(m, 3H-C_{Gal}) ;3.48-3.39(m, 1H-C_{Gal}) ;1.86(s, CH₃)。

[0239] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :197.86(s, C = O) ;162.54(s, C-OCH₃) ;138.79, 138.18, 134.01(3s) ;131.68(d) ;129.00(s) ;128.82, 128.12(2d) ;127.85(s) ;125.23, 120.01, 119.66(3d) ;119.53(s) ;115.67, 113.92, 113.27, 109.44(4d) ;104.22(d, C(1)_{Gal}) ;75.68, 73.22, 70.36, 68.11(4d, C(2-5)_{Gal}) ;60.38(t, C(6)_{Gal}) ;55.90(q, OCH₃) ;28.03(q, CH₃-C = O)。

[0240] 1-(2-苯甲酰基苯基)-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I19a) :

[0241] 产率:1.09g(46%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.41。

[0242] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 7.82-7.81 (m, 1H) ; 7.80-7.79 (m, 1H) ; 7.78-7.77 (m, 2H) ; 7.70-7.69 (m, 1H) ; 7.68-7.67 (m, 3H) ; 7.64-7.13 (m, 4H) ; 7.03 (s, 1H) ; 6.99-6.95 (m, 1H) ; 5.23-5.22 (br. d, 1H) ; 4.85-4.83 (br. d, 1H) ; 4.68-4.65 (br. s, 1H) ; 4.51-4.50 (br. d, 1H) ; 4.29-4.27 (d, $J = 7.7\text{Hz}$, 1H) ; 3.72-3.70 (m, 1H) ; 3.63-3.52 (m, 3H) ; 3.42-3.32 (m, 2H)。

[0243] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 195.54, 138.83, 136.97, 135.68, 135.48, 133.41, 132.92, 132.21, 129.92, 128.30, 128.14, 127.86, 127.48, 127.18, 125.24, 122.63, 120.61, 119.38, 117.80, 115.27, 109.87, 104.49, 75.40, 73.19, 70.31, 67.91, 60.17。

[0244] 1-(2-苯甲酰基苯基)-4-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I20a) :

[0245] 产率 : 0.87g (34%) ; TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.52。

[0246] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 7.82-7.78 (m, 1H) ; 7.70-7.60 (m, 3H) ; 7.45-7.41 (m, 3H) ; 7.26-7.22 (m, 2H) ; 7.10 (s, 1H) ; 7.05-6.94 (m, 3H) ; 4.89-4.87 (d, 1H) ; 4.83-4.81 (d, 1H) ; 4.66-4.64 (br. s, 1H) ; 4.53-4.52 (d, $J = 4.7\text{Hz}$, 1H) ; 4.43-4.41 (br. s, 1H) ; 3.72-3.70 (m, 1H) ; 3.61-3.51 (m, 3H) ; 3.48-3.41 (m, 2H)。

[0247] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 195.25, 138.20, 136.41, 135.87, 135.58, 134.70, 133.14, 132.23, 129.84, 128.48, 128.02, 127.62, 123.76, 123.15, 120.19, 117.01, 115.40, 108.94, 103.68, 75.36, 73.46, 70.26, 67.91, 60.10。

[0248] 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I21a) :

[0249] 产率 : 1.30g (51%) ; TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.21。

[0250] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 7.83-7.79 (m, 1H) ; 7.71-7.64 (m, 3H) ; 7.48-7.46 (m, 1H) ; 7.41-7.37 (m, 3H) ; 7.26-7.13 (m, 3H) ; 7.07 (s, 1H) ; 7.01-6.98 (m, 1H) ; 5.24-5.23 (br. d, 1H) ; 4.86-4.84 (br. d, 1H) ; 4.68-4.65 (br. s, 1H) ; 4.52-4.50 (br. d, 1H) ; 4.29-4.27 (d, $J = 7.5\text{Hz}$, 1H) ; 3.71-3.69 (m, 1H) ; 3.59-3.53 (m, 3H) ; 3.44-3.33 (m, 2H)。

[0251] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 195.45, 138.60, 136.32, 135.66, 135.63, 133.66, 133.04, 132.35, 129.93, 128.82, 128.41, 128.12, 127.96, 127.49, 127.34, 125.23, 119.78, 119.35, 119.28, 116.30, 109.69, 104.49, 75.46, 73.13, 70.26, 67.91, 60.18。

[0252] 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- α -D-吡喃葡萄糖苷 (I21e) :

[0253] 产率 : 1.57g (61%) ; TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.28。

[0254] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 7.83-7.79 (m, 1H) ; 7.72-7.62 (m, 3H) ; 7.46-7.44 (m, 1H) ; 7.39 (s, 1H) ; 7.38-7.35 (m, 2H) ; 7.21-7.17 (m, 3H) ; 7.12 (m, 1H) ; 7.00-6.98 (m, 1H) ; 5.08-5.06 (d, 1H) ; 5.00-4.99 (d, 1H) ; 4.96-4.95 (d, 1H) ; 4.91-4.90 (d, $J = 2.2\text{Hz}$, 1H) ; 4.59-4.57 (m, 1H) ; 3.68-3.58 (m, 2H) ; 3.54-3.31 (m, 3H) ; 3.21-3.15 (m, 1H)。

[0255] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 195.53, 137.91, 136.42, 135.63, 135.45, 133.59, 133.00, 132.45, 130.06, 128.34, 127.97, 127.88, 127.56, 127.32, 119.70, 119.36, 119.20, 115.82, 109.70, 100.63, 73.53, 73.00, 71.70, 70.01, 60.83。

[0256] 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-葡萄糖苷酸钠盐 (I21f) :

[0257] 产率 : 1.79g (69%) ; TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.07。

[0258] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$: 7.82-7.79 (m, 1H) ; 7.69-7.63 (m, 3H) ; 7.57-7.54 (m, 1H) ; 7.40-7.38 (m, 3H) ; 7.24-7.20 (m, 2H) ; 7.11 (m, 2H) ; 6.99-6.97 (m, 1H) ; 6.66 (br. s, 1H) ; 5.45 (br. s, 1H) ; 5.21 (br. s, 1H) ; 4.30 (br. s, 1H) ; 3.47-3.40 (m, 1H) ; 3.27-3.22 (m, 3H)。

[0259] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :195.39, 172.84, 138.69, 136.30, 135.61, 133.73, 133.09, 132.41, 129.94, 128.43, 128.02, 127.45, 127.40, 119.79, 119.62, 119.38, 118.31, 116.62, 116.57, 109.64, 103.96, 76.43, 73.93, 73.04, 71.92。

[0260] 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基-N-乙酰基- β -D-氨基半乳糖苷(galactosaminide) (I21g) :

[0261] 产率:1.46g(53%) ;TLC[甲苯/乙醇(5:3)] : R_f 0.28。

[0262] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.82-7.74(m, 2H) ;7.70-7.64(m, 2H) ;7.62(d, NH) ;7.43-7.35(m, 3H) ;7.24-7.17(m, 3H) ;7.09(d, 1H) ;7.02(s, 1H) ;6.98(dd, 1H) ;4.73(d, 1H) ;4.63(t, 1H) ;4.60(d, 1H) ;4.42(d, 1H) ;3.93(q, 1H) ;3.70(t, 1H) ;3.60-3.48(m, 3H) ;3.40-3.32(m, 1H) ;1.83(s, 3H)。

[0263] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :195.5, 169.6, 162.3, 138.7, 136.34, 135.72, 133.70, 133.15, 132.45, 129.95, 128.5, 128.0, 127.55, 127.5, 120.0, 119.3, 118.8, 116.2, 109.8, 103.0, 75.55, 70.8, 67.3, 60.25, 52.0, 23.2。

[0264] 1-(2-苯甲酰基苯基)-5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I22a) :

[0265] 产率:1.14g(39%) ;TLC[甲苯/乙醇(5:3)] : R_f 0.48。

[0266] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.83-7.79(m, 1H) ;7.71-7.61(m, 3H) ;7.46-7.42(m, 3H) ;7.34-7.32(m, 1H) ;7.28-7.24(m, 2H) ;7.16(s, 1H) ;7.00-6.98(m, 1H) ;4.96-4.95(br. d, 1H) ;4.84-4.82(br. d, 1H) ;4.66-4.65(br. s, 1H) ;4.53-4.52(d, J = 4.7Hz, 1H) ;4.38-4.35(br. s, 1H) ;3.72-3.70(m, 1H) ;3.61-3.54(m, 3H) ;3.48-3.43(m, 2H)。

[0267] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :195.12, 137.81, 135.92, 135.55, 133.32, 133.23, 132.30, 129.88, 128.51, 128.35, 128.08, 127.69, 126.55, 123.38, 118.34, 116.70, 112.84, 110.64, 103.89, 75.41, 73.37, 70.18, 67.90, 60.10, 55.98。

[0268] 1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I23a) :

[0269] 产率:1.28g(47%) ;TLC[甲苯/乙醇(5:3)] : R_f 0.49。

[0270] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.79(s, 1H) ;7.72(m, 2H) ;7.45-7.39(m, 4H) ;7.22-7.17(m, 3H) ;7.12(s, 1H) ;7.02-6.99(m, 1H) ;5.23-5.22(d, 1H) ;4.85-4.84(d, 1H) ;4.68-4.65(m, 1H) ;4.51-4.50(d, 1H) ;4.29(br. s, 1H) ;3.71-3.69(m, 1H) ;3.57-3.52(m, 3H) ;3.44-3.33(m, 2H)。

[0271] ^{13}C -NMR[DMSO- d_6] :194.51, 138.89, 137.74, 136.51, 135.38, 134.28, 133.64, 133.15, 131.65, 128.41, 128.05, 127.93, 127.66, 127.32, 120.05, 119.49, 119.24, 116.06, 109.84, 104.36, 75.49, 73.12, 70.23, 67.90, 60.19。

[0272] 1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷(I24a) :

[0273] 产率:2.4g(76%) ;TLC[甲苯/乙醇(4:1)] : R_f 0.23。

[0274] FT-IR :3367m, 2911w, 2853w, 1654s, 1600s, 1579m, 1499m, 1470m, 1448m, 1365m, 1264s, 1239s, 1118s, 1075s, 1022s, 975m, 923m, 872s, 750m, 703s。

[0275] ^1H -NMR[DMSO- d_6] :7.66(d, J = 8.6, 1arom. H) ;7.44(d, J = 8.5, 1arom. H) ;

6.36-7.32(m, 1arom. H) ; 7.34(s, 1arom. H) ; 7.32(s, 1arom. H) ; 7.21-7.14(m, 6arom. H) ; 6.98(dd, J = 8.5, 1.8, 1arom. H) ; 5.23(d, J = 4.9, OH) ; 4.85(d, J = 5.7, OH) ; 4.69(t, J = 5.5, OH) ; 4.51(d, J = 4.7, OH) ; 4.29(br. s, H-C(1)_{Gal}) ; 3.92(s, OCH₃) ; 3.71(t, J = 4.0, H-C(4)_{Gal}) ; 3.60-3.53(m, 3H-C_{Gal}) ; 3.46(t, J = 6.2, 1H-C_{Gal}) ; 3.39-3.34(m, 1H-C_{Gal})。

[0276] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] : 194.80(s, C = O) ; 162.32(s, C-OCH₃) ; 138.58, 138.49, 136.35, 133.58(4 s) ; 132.46, 132.14, 128.16, 127.67(4 d) ; 127.48, 127.44(2 s) ; 119.73(d) ; 119.46(s) ; 119.21, 116.35, 113.68, 112.35, 109.75(5d) ; 104.42(d, C(1)_{Gal}) ; 75.56, 73.17, 70.28, 68.00(4d, C(2-5)_{Gal}) ; 60.32(t, C(6)_{Gal}) ; 55.87(q, OCH₃)。

[0277] 1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷(I25a) :

[0278] 产率 : 1.28g(48%) ; TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f0.45。

[0279] ¹H-NMR[DMSO-d₆] : 7.70-7.65(m, 1H) ; 7.55-7.47(m, 4H) ; 7.09-6.95(m, 5H) ; 6.26-6.23(m, 2H) ; 5.25-5.23(d, 1H) ; 4.86-4.84(d, 1H) ; 4.69-4.66(br. s, 1H) ; 4.51-4.50(d, 1H) ; 4.33-4.31(d, J = 7.7Hz, 1H) ; 3.69(s, 3H) ; 3.61-3.54(m, 4H) ; 3.44(s, 3H) ; 3.48-3.41(m, 1H) ; 3.39-3.34(m, 1H)。

[0280] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] : 193.05, 163.77, 159.66, 138.91, 138.70, 136.42, 133.78, 131.89, 131.33, 128.95, 127.21, 126.78, 122.30, 120.45, 119.50, 119.02, 117.73, 115.10, 109.65, 105.23, 104.75, 97.55, 75.50, 73.18, 70.35, 68.01, 60.32, 55.41, 55.38。

[0281] 1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吡啶-3-基磷酸胆碱(I25d) :

[0282] 产率 : 0.92g(68%) ; TLC[乙酸乙酯 / 吡啶 / 乙酸 / 水 (30 : 25 : 5 : 15)] : R_f0.46。

[0283] ¹H-NMR[DMSO-d₆] : 7.68-7.62(m, 1H) ; 7.48(m, 2H) ; 7.43(2d, 2H) ; 7.20(d, 1H) ; 7.10(s, 1H) ; 7.05(t, 1H) ; 7.02(t, 1H) ; 6.94(t, 1H) ; 6.35(d, 1H) ; 6.32(dd, 1H) ; 4.05(m, 2H) ; 3.72(s, 3H) ; 3.53(s, 3H) ; 3.46(t, ³J[H, P] = 4.6Hz, 2H) ; 3.03(s, 9H)。

[0284] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] : 193.0, 164.1, 160.0, 157.0, 138.8, 136.7, 134.0(d, J[C, P] = 7.4Hz) ; 133.6, 132.3, 131.3, 129.0, 127.0(J[C, P] = 2.4Hz) ; 122.0, 121.6(J[C, P] = 6.3Hz) ; 119.5, 118.9, 117.6, 116.1, 109.7, 105.7, 97.9, 65.4(J[C, P] = 4.8Hz) ; 59.0(J[C, P] = 5.36Hz) ; 55.5(2 OCH₃) ; 53.0。

[0285] 4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷(I26a) :

[0286] 产率 : 1.76g(62%) ; TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f0.54。

[0287] ¹H-NMR[DMSO-d₆] : 7.70-7.66(m, 1H) ; 7.58-7.53(m, 2H) ; 7.49-7.47(m, 1H) ; 7.12-7.10(m, 1H) ; 7.02(s, 1H) ; 7.01-6.99(m, 1H) ; 6.96-6.93(m, 2H) ; 6.34-6.29(m, 2H) ; 4.85-4.83(br. s, 2H) ; 4.67-4.64(br. s, 1H) ; 4.53-4.52(d, 1H) ; 4.48-4.46(d, J = 5.9Hz, 1H) ; 3.73(s, 3H) ; 3.72-3.70(m, 1H) ; 3.64-3.55(m, 3H) ; 3.48(s, 3H) ; 3.46-3.38(m, 2H)。

[0288] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] : 192.84, 163.99, 159.72, 139.25, 138.17, 135.77, 135.07, 131.92, 131.33, 128.91, 127.18, 123.74, 122.88, 119.84, 119.36, 116.86, 115.14, 108.77, 105.40, 103.94, 97.59, 75.50, 73.44, 70.32, 68.00, 60.24, 55.48, 55.40。

[0289] 6-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳

糖苷 (I27a) :

[0290] 产率 :1.88g(66%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] :R_f0.45。

[0291] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :7.72-7.67(m, 1H) ;7.57-7.56(m, 2H) ;7.52-7.50(m, 2H) ;7.12-7.10(m, 1H) ;7.02(s, 1H) ;7.00-6.98(m, 2H) ;6.31-6.26(m, 2H) ;5.27-5.26(d, 1H) ;4.87-4.86(d, 1H) ;4.69-4.66(br. s, 1H) ;4.52-4.51(d, J = 4.6Hz, 1H) ;4.38-4.35(br. s, 1H) ;3.71(s, 3H) ;3.70-3.68(m, 1H) ;3.60-3.55(m, 3H) ;3.48(s, 3H) ;3.48-3.43(m, 2H)。

[0292] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :192.89, 163.89, 159.54, 138.89, 138.52, 135.69, 133.98, 131.92, 131.54, 129.06, 127.77, 127.21, 127.03, 119.36, 119.21, 119.18, 116.09, 109.42, 105.38, 104.68, 97.41, 75.59, 73.13, 70.30, 68.03, 60.36, 55.44, 55.32。

[0293] 5-溴-4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷 (I28a) :

[0294] 产率 :2.17g(67%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] :R_f0.58。

[0295] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :7.72-7.67(m, 1H) ;7.61-7.49(m, 3H) ;7.34-7.31(m, 1H) ;7.12-7.10(m, 1H) ;7.06(s, 1H) ;6.88-6.86(m, 1H) ;6.34-6.31(m, 1H) ;6.28-6.27(m, 1H) ;4.95-4.94(d, 1H) ;4.85-4.84(d, 1H) ;4.67-4.64(br. s, 1H) ;4.53-4.52(d, J = 4.6Hz, 1H) ;4.45(br. s, 1H) ;3.73(s, 3H) ;3.72-3.70(m, 1H) ;3.64-3.51(m, 3H) ;3.47(s, 3H) ;3.46-3.37(m, 2H)。

[0296] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :192.76, 163.98, 159.63, 139.30, 137.84, 135.27, 133.68, 131.82, 131.42, 128.97, 128.14, 127.24, 126.32, 123.33, 119.28, 118.17, 116.38, 112.51, 110.45, 105.40, 104.06, 97.48, 75.53, 73.36, 70.24, 67.99, 60.24, 55.48, 55.39。

[0297] 1-[2-(5-羧基呋喃酰基(furanoly))苯基]-6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷 (I29a) :

[0298] 产率 :0.99g(36%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] :R_f0。

[0299] ¹H-NMR[CD₃COOD] :7.82-7.74(m, 2H) ;7.69-7.67(m, 1H) ;7.63-7.59(m, 1H) ;7.55-7.49(m, 1H) ;7.33-7.32(m, 1H) ;7.12(s, 1H) ;7.04-7.02(m, 1H) ;6.97-6.96(d, 1H) ;6.88-6.87(d, 1H) ;4.69-4.67(d, J = 7.2Hz, 1H) ;4.14-4.13(d, 1H) ;4.04-3.94(m, 3H) ;3.86-3.82(m, 2H)。

[0300] ¹³C-NMR[CD₃COOD] :184.9, 154.0, 147.7, 139.6, 138.2, 135.2, 135.1, 133.6, 130.9, 129.8, 128.4, 127.8, 121.3, 120.6, 119.8, 119.5, 119.1, 116.6, 110.9, 104.3, 75.5, 73.9, 71.9, 69.8, 62.1。

[0301] 6-氯-1-(2-呋喃酰基苯基)-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷 (I30a) :

[0302] 产率 :1.65g(66%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] :R_f0.38。

[0303] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :7.84(m, 1H) , 7.80-7.76(m, 1H) ;7.72-7.70(m, 1H) ;7.64-7.57(m, 3H) ;7.18(s, 1H) ;7.10-7.03(m, 3H) ;6.54-6.53(m, 1H) ;5.28-5.27(d, 1H) ;4.87-4.85(d, 1H) ;4.66-4.63(m, 1H) ;4.52-4.51(d, 1H) ;4.47-4.45(d, J = 7.7Hz, 1H) ;3.71-3.69(m, 1H) ;3.63-3.53(m, 3H) ;3.48-3.41(m, 2H)。

[0304] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :181.55, 151.01, 148.81, 138.58, 136.06, 135.24, 133.78, 132.32, 129.62, 127.83, 127.62, 127.56, 120.83, 119.85, 119.48, 119.42, 116.24, 112.61, 109.64, 104.50, 75.54, 73.16, 70.32, 68.00, 60.27。

[0305] 6-氯-1-[2-(N-甲基吡咯-2-羰基)苯基]-1H-吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷 (I31a) :

[0306] 产率:1.76g(69%) ;TLC[甲苯 / 乙醇 (5 : 3)] : R_f 0.36。

[0307] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6] :7.95(m, 1H) ;7.73-7.69(m, 1H) ;7.63-7.55(m, 3H) ;7.17(m, 1H) ;7.10(s, 1H) ;7.05-7.02(m, 2H) ;6.35-6.34(m, 1H) ;5.91-5.90(m, 1H) ;5.27-5.26(d, 1H) ;4.86-4.84(d, 1H) ;4.63-4.60(br. s, 1H) ;4.51-4.50(d, 1H) ;4.45-4.43(d, J = 7.7Hz, 1H) ;3.71-3.68(m, 1H) ;3.61-3.33(m, 5H) ;2.88(s, 3H) 。

[0308] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6] :183.78, 162.23, 138.49, 137.27, 135.67, 133.72, 132.73, 131.16, 129.86, 129.41, 127.44, 127.34, 127.18, 121.99, 119.62, 119.34, 116.07, 109.87, 108.05, 104.62, 75.42, 73.14, 70.29, 67.86, 60.08, 36.40。

[0309] 实施例2:通过N-芳基化 I1c 制备 I19c 和 I25c(表 Ia)

[0310] 在氮气氛围下将 5.0mmol 芳基碘化物、1.31g(7.48mmol) I1c 和 0.67g(5.47mmol) 乙酸亚铜(I) 在 25ml 无水二甲基乙酰胺中加热至 150℃保持 2 小时。将产物混合物冷却至室温,并用 25ml 乙酸乙酯稀释。将悬浮液倒入 50ml 饱和氯化铵水溶液上,并搅拌 30 分钟。有机相用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,过滤并蒸发至干。所得油状物通过硅胶柱状色谱法[甲苯 ;甲苯 / 丙酮 (10 : 1)] 纯化。

[0311] 1-(2-苯甲酰基苯基)-1H-吲哚-3-基乙酸酯 (1-(2-Benzoylphenyl)-1H-indol-3-yl acetate) (I19c) :

[0312] 产率:590mg(33%) ;TLC(甲苯) : R_f 0.15。

[0313] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6] :7.83-7.79(m, 1H) ;7.71-7.64(m, 3H) ;7.42-7.36(m, 3H) ;7.32-7.30(m, 1H) ;7.26-7.25(m, 1H) ;7.23-7.11(m, 4H) ;7.05-7.01(m, 1H) ;2.27(s, 3H) 。

[0314] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6] :195.27, 168.03, 136.36, 135.78, 135.63, 133.41, 133.08, 132.23, 130.69, 129.91, 128.49, 128.11, 127.94, 127.61, 122.89, 120.24, 120.04, 118.37, 117.35, 110.27, 20.46。

[0315] 1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吲哚-3-基乙酸酯 (I25c) :

[0316] 产率:1.23g(59%) ;TLC[甲苯 / 丙酮 (10 : 1)] : R_f 0.66。

[0317] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6] :7.71-7.67(m, 1H) ;7.56-7.52(m, 3H) ;7.37-7.35(m, 1H) ;7.31(s, 1H) ;7.18-7.16(m, 1H) ;7.14-7.10(m, 3H) ;7.06-7.02(m, 1H) ;6.30(s, 1H) ;3.70(s, 3H) ;3.49(s, 3H) ;2.30(s, 3H) 。

[0318] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6] :192.77, 167.99, 163.99, 139.07, 135.72, 133.60, 131.92, 131.31, 130.42, 128.92, 128.79, 128.09, 127.65, 127.13, 125.21, 122.64, 119.75, 118.24, 117.16, 110.09, 105.52, 97.58, 55.38, 55.33, 20.51。

[0319] 实施例3:通过N-芳基化 I6 制备 I32(表 Ia)

[0320] 1-(2-苯甲酰基苯基)-1H-吲哚-3-基乙基氨基甲酸酯 (1-(2-Benzoylphenyl)-1H-indol-3-yl ethyl carbamate) (I32) :

[0321] 在氮气氛围下将 1.30g(4.22mmol) 2-碘代二苯甲酮、1.29g(6.32mmol) 3-氨基吲哚-3-基氨基甲酸乙酯和 0.57g(4.65mmol) 乙酸亚铜(I) 在 25ml 无水二甲基乙酰胺中加热至 150℃持续两小时。将产物混合物冷却至室温,并用 25ml 乙酸乙酯稀释。将悬浮液倒入 50ml 饱和氯化铵水溶液上,并搅拌 30 分钟。有机相用盐水洗涤,用硫酸钠干燥,过滤并蒸发

至干。所得油状物通过硅胶柱状色谱法 [甲苯 ; 甲苯 / 丙酮 (10 : 1)] 纯化。

[0322] 产率 : 100mg (6%) ; TLC [甲苯] : R_f 0.10。

[0323] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6] : 9.50 (s, NH) ; 7.81–7.77 (m, 1H) ; 7.71–7.60 (m, 4H) ; 7.41–7.36 (m, 4H) ; 7.20–7.16 (m, 3H) ; 7.11–7.07 (m, 1H) ; 6.99–6.95 (m, 1H) ; 4.13 (q, 2H) ; 1.24 (t, 3H)。

[0324] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6] : 195.42, 153.57, 136.98, 135.73, 135.43, 133.92, 132.95, 132.15, 129.89, 128.42, 127.86, 127.43, 127.13, 122.59, 121.06, 119.21, 118.44, 117.53, 117.08, 109.78, 60.15, 14.53。

[0325] 实施例 4 : 二 [1-(2-乙酰基苯基)-1H-吡啶-3-基]-二硫烷 (I33, 表 Ia) 的制备

[0326] 1-(2-乙酰基苯基)-1H-吡啶-3-基-异硫脲鎓碘化物 :

[0327] 将 1.80g (7.65mmol) 1-(2-乙酰基苯基)-1H-吡啶 (通过实施例 1 的方法制备) 和 1.17g 硫脲 (15.4mmol) 溶解于 35ml 甲醇 (35ml) 和 4ml 水的混合物中。将 3.90g 碘 (15.4mmol) 溶解于碘化钾 (3.82g, 23mmol) 在水 (7.7ml) 中的溶液中。在环境温度经 1 小时将该碘溶液滴加至上述溶液中, 并温热至 35°C 保持 3 小时。蒸发除去溶剂。将残余油状物溶解于乙酸乙酯 (40ml) 中。该溶液用水萃取三次 (3x10ml)。有机层经干燥, 并用活性炭 (1g) 处理。蒸发滤液后得到粗产物, 并通过硅胶柱状色谱法 (100g, 乙酸乙酯) 纯化。

[0328] 产率 : 1.27g (38%)。

[0329] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6] : 9.06 (s, NH₂) ; 8.62 (s, NH₂) ; 8.18 (s, 1H) ; 7.98 (d, 1H) ; 7.84 (t, 1H) ; 7.70 (2t, 2x 1H) ; 7.61 (m, 1H) ; 7.30 (m, 2H) ; 7.12 (m, 1H) ; 2.18 (s, 3H)。

[0330] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6] : 199.4, 170.2, 139.3, 137.8, 136.2, 135.0, 133.1, 129.9, 129.3, 129.0, 128.5, 123.9, 122.0, 118.2, 111.0, 92.6, 29.0

[0331] 二 [1-(2-乙酰基苯基)-1H-吡啶-3-基]-二硫烷 (I33) :

[0332] 在氮气氛围下将 1-(2-乙酰基苯基)-1H-吡啶-3-基-异硫脲鎓碘化物 (0.47g, 1.07mmol) 溶解于脱气二噁烷 (2.7ml) 和脱气水 (1.57ml) 的混合物中。

[0333] 在环境温度下滴加氢氧化钠 (0.8ml, 1.22mmol) 的脱气 5% 水溶液, 由此该溶液变成深棕色。在 45°C 搅拌溶液 48 小时。产物混合物经蒸发, 溶解于水 (5ml) 中, 并用乙酸乙酯萃取。有机层经硫酸钠干燥并蒸发, 剩下的粗产物为粘稠油状物, 通过硅胶快速色谱法纯化。

[0334] 产率 : 70mg (24%)。

[0335] $^1\text{H-NMR}$ [DMSO- d_6] : 7.84 (dd, 1H) ; 7.66 (dt, 1H) ; 7.62 (dt, 1H) ; 7.60 (d, 1H) ; 7.55 (s, 1H) ; 7.38 (d, 1H) ; 7.19 (2t, 2x 1H) ; 7.03 (d, 1H) ; 1.94 (s, 3H)。

[0336] $^{13}\text{C-NMR}$ [DMSO- d_6] : 199.1, 137.5, 136.4, 135.3, 132.8, 129.6, 128.8, 128.7, 128.5, 123.5, 121.3, 119.3, 110.4, 108.0, 28.4。

[0337] 实施例 5 : 制备 10H-吡啶并 [1,2-a] 吡啶 (表 Ic)

[0338] 酶促反应在 100mM Na₂PO₄ 缓冲液, pH 7.3 (含 1mM MgCl₂ 和 670mg/l 酶底物) 中进行。将大肠杆菌 (E. coli) β -半乳糖苷酶或乳酸克鲁维斯酵母 (K. lactis) 乳糖酶添加至最终浓度分别为 1000U/l 或 1500U/l。在 37°C 温育 30ml 反应体积 5–18 小时, 伴随温和搅拌。反应产物通过离心 (4400g, 15min) 收集, 颗粒用 10ml H₂O 洗涤, 并再次离心 (4400g, 15min)。

[0339] 11-羟基-10H-吡啶并 [1,2-a] 吡啶-10-酮 (I010)

[0340] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:7.73(d, $J = 8.2\text{Hz}$, 2arom. H) ;7.69(d, $J = 7.7\text{Hz}$, 2arom. H) ;7.50(t, $J = 7.3\text{Hz}$, 2arom. H) ;7.07(t, $J = 7.5\text{Hz}$, 2arom. H) ;5.79(br. s)。

[0341] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:160.75(s, C = O) ;138.32(s, arom. C) ;132.10(d, arom. C-H) ;127.15(s, arom. C) ;123.27, 121.52(2d, arom. C-H) ;118.65(s, C(10a) ;111.72(d, arom. C-H)。

[0342] 注意 :I010 在高于 pH 5 时变为易溶于水。

[0343] 10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I013) :

[0344] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:7.94(m, 1H) ;7.84(m, 1H) ;7.74(m, 1H) ;7.67(m, 1H) ;7.62(m, 1H) ;7.48(m, 1H) ;7.35(m, 1H) ;7.18(m, 1H) ;7.17(m, 1H)。

[0345] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:180.7, 144.8, 136.3, 135.0, 133.7, 132.0, 128.5, 128.4, 124.9, 124.7, 124.3, 122.2, 112.2, 112.0, 108.1。

[0346] MS(CI) :220.2($[\text{M}+\text{H}]^+$)。

[0347] 11- 甲基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I014) :

[0348] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:7.85(m, 1H) ;7.77(m, 1H) ;7.71(m, 1H) ;7.62(m, 1H) ;7.59(m, 1H) ;7.47(m, 1H) ;7.16(m, 1H) ;7.13(m, 1H) ;2.50(s, 3H)。

[0349] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:180.8, 144.0, 135.8, 133.3, 132.6, 131.7, 128.6, 128.5, 124.1, 123.4, 122.8, 121.5, 121.3, 111.7, 111.6, 8.8。

[0350] UV : $\lambda_{\text{max}} = 255, 355, 435\text{nm}$ 。

[0351] 9- 氯 -11- 甲基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I015) :

[0352] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:7.88-7.86(m, 1H) ;7.76-7.72(m, 2H) ;7.60-7.56(m, 1H) ;7.51-7.47(m, 1H) ;7.21-7.17(m, 1H) ;7.12-7.10(m, 1H) ;2.49(s, 3H)。

[0353] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:178.3, 145.6, 136.8, 133.2, 133.0, 132.3, 130.8, 128.8, 124.8, 124.3, 123.0, 122.2, 121.9, 112.0, 110.8, 8.9。

[0354] UV : $\lambda_{\text{max}} = 245, 365, 440\text{nm}$ 。

[0355] 7- 氯 -11- 甲基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I016) :

[0356] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:8.00-7.98(m, 1H) ;7.92(m, 1H) ;7.73-7.71(m, 1H) ;7.58-7.56(m, 1H) ;7.50-7.46(m, 1H) ;7.20-7.15(m, 2H) ;2.48(s, 3H)。

[0357] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:179.9, 144.8, 140.4, 133.4, 132.9, 132.1, 128.9, 127.7, 125.6, 123.5, 123.0, 122.6, 122.0, 112.24, 112.21, 9.00。

[0358] UV : $\lambda_{\text{max}} = 245, 360, 430\text{nm}$ 。

[0359] 8- 溴 -9- 氯 -11- 甲基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I017) :

[0360] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:7.96-7.94(m, 1H) ;7.90-7.87(m, 1H) ;7.76-7.72(m, 2H) ;7.53-7.48(m, 1H) ;7.22-7.18(m, 1H) ;2.50(s, 3H)。

[0361] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:177.3, 144.6, 139.5, 133.2, 132.9, 131.9, 130.7, 129.2, 126.0, 123.2, 123.1, 122.2, 116.9, 112.2, 112.1, 9.0。

[0362] UV : $\lambda_{\text{max}} = 245, 365, 450\text{nm}$ 。

[0363] 7- 氯 -3- 甲氧基 -11- 甲基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I018)

[0364] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO-d}_6]$:8.07(d, $J = 1.6$, 1H) ;7.61(d, $J = 8.8$, 1H) ;7.56(d, $J = 8.0$, 1H) ;7.39(d, $J = 2.1$, 1H) ;7.17(dd, $J = 8.0, 1.6$, 1H) ;6.80(dd, $J = 8.8, 2.2$, 1H) ;

3.94(s, OCH₃) ;2.46(s, CH₃)。

[0365] 11- 苯基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I019) :

[0366] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :8.04-8.02(m, 1H) ;7.99-7.92(m, 4H) ;7.71-7.65(m, 2H) ;7.59-7.55(m, 3H) ;7.51-7.47(m, 1H) ;7.29-7.19(m, 2H)。

[0367] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :180.1, 144.0, 136.0, 133.9, 130.7, 130.2, 128.9, 128.8, 124.6, 124.5, 124.3, 123.7, 122.7, 112.4, 112.3。

[0368] UV : λ_{max} = 245, 370, 460nm。

[0369] 9- 氯 -11- 苯基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I020) :

[0370] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :8.05-8.03(m, 1H) ;7.97-7.90(m, 4H) ;7.67-7.63(m, 1H) ;7.59-7.55(m, 3H) ;7.51-7.49(m, 1H) ;7.31-7.27(m, 1H) ;7.20-7.18(m, 1H)。

[0371] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :145.5, 137.0, 133.7, 131.0, 130.5, 129.0, 128.8, 125.4, 124.9, 124.4, 123.8, 123.1, 112.6, 111.1。

[0372] 8- 溴 -9- 氯 -11- 苯基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I022) :

[0373] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :8.04-8.00(m, 2H) ;7.98-7.92(m, 3H) ;7.89-7.86(m, 1H) ;7.60-7.48(m, 4H) ;7.31-7.28(m, 1H)。

[0374] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :144.3, 139.5, 133.7, 131.0, 130.4, 130.2, 129.0, 128.9, 128.7, 126.2, 125.4, 123.9, 123.1, 117.5, 112.6, 112.5。

[0375] 7- 氯 -3- 甲氧基 -11- 苯基 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I024)

[0376] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :8.13(d, J = 1.6, 1H) ;7.94, 7.92(2br. s, 2H) ;7.77(d, J = 9.0, 1H) ;7.59(d, J = 8.0, 1H) ;7.54(br. t, J = 8.0, 2H) ;7.48-7.44(m, 2H) ;7.21(dd, J = 8.0, 1.6, 1H) ;6.87(dd, J = 9.0, 2.2, 1H) ;3.37(s, OCH₃)。

[0377] 11-(5- 羧基呋喃 -2- 基)-7- 氯 -10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I029) :

[0378] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :8.57-8.54(m, 1H) ;8.08-8.06(m, 1H) ;8.00(m, 1H) ;7.84(m, 1H) ;7.71-7.69(m, 1H) ;7.61-7.57(m, 1H) ;7.36-7.33(m, 1H) ;7.26-7.24(m, 1H) ;6.85-6.84(m, 1H)。

[0379] 7- 氯 -11-(呋喃 -2- 基)-10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚 -10- 酮 (I030) :

[0380] ¹H-NMR[DMSO-d₆] :8.33-8.30(m, 1H) ;8.16-8.14(m, 1H) ;8.09(m, 1H) ;8.03(m, 1H) ;7.86-7.83(m, 1H) ;7.70-7.68(m, 1H) ;7.60-7.56(m, 1H) ;7.34-7.31(m, 1H) ;7.27-7.25(m, 1H) ;6.82-6.81(m, 1H)。

[0381] ¹³C-NMR[DMSO-d₆] :177.7, 148.0, 145.0, 144.2, 140.2, 133.9, 129.4, 128.3, 127.4, 125.8, 125.2, 124.0, 123.1, 114.0, 113.2, 112.7, 112.6, 112.4。

[0382] 结论 :通过使相应的指示剂经历酶促外部刺激 (eS) 有效地产生了 I0 染色剂。

[0383] 实施例 6 :10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚的光吸收 (图 1)

[0384] 将从实施例 5 的方法得到的干燥的 10H- 吲哚并 [1,2-a] 吲哚颗粒实施例 5 以 2.5mM 溶解于乙醇 /DMF(1 : 1) 中。将该储备溶液稀释成 0.22mM(在 100% EtOH 中,在光谱仪 max M5(Spectramax M5)(Molecular Devices)上记录光谱扫描。记录相应指示剂的光谱用于对比。数据显示在图 1 中。

[0385] 指示剂和相应 I0 染色剂的吸收光谱基本不同于在可见谱带的吸收光谱。

[0386] 结论 :I0 染色产生了强烈且方便的可检测信号。

[0387] 实施例 7 :使用指示剂体系 I4b/MDAB 和 I4c/MDAB 对氯离子和氢氧离子进行体外指示

[0388] 将 I4b(0.4g, 1.11mmol) 和 MDAB(0.25g, 1.39mmol) 溶解于乙醇(8ml)中。将所得指示剂溶液保持在氮气体的氛围中。室温下将四丁基氟化铵在 THF(1.6ml) 中的 1mM 溶液添加至该指示剂溶液中。10 分钟后, BI4 沉淀为深紫色重固体(intensely violet heavy solid), 收集并干燥(0.19g, 42%)。

[0389] 类似地, BI4 通过将 I4c/MDAB 暴露于碱性水溶液得到。

[0390] $^1\text{H-NMR}[\text{DMSO}-d_6]$: 9.84(s, H1) ; 7.68(d, $J = 8.6\text{Hz}$, H6) ; 7.61(d, $J = 8.8\text{Hz}$, H6') ; 7.07(s, = CH-) ; 7.02(d, $J = 8.6\text{Hz}$, H7) ; 6.38(dd, $J = 8.8\text{Hz}$, H5') ; 6.24(d, H3') ; 3.88(s, OCH_3) ; 3.02(s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$)。

[0391] $^{13}\text{C-NMR}[\text{DMSO}-d_6]$: 181.0(C = O), 160.0, 152.8, 152.5, 138.3, 130.74, 130.71, 129.9, 118.3, 113.0, 111.4, 110.0, 109.1, 104.9, 94.6(OCH_3), 55.5($\text{N}(\text{CH}_3)_2$)。

[0392] 注意 : 有两种可能的 BI4 的立体异构体, (E)-5-溴-4-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)二氢吡啶-3-酮和 (Z)-5-溴-4-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)二氢吡啶-3-酮。NOE NMR 测量表明在该过程中仅形成了 (Z)-BI4。

[0393] 结论 : (1) 指示剂体系 I4b/MDAB 有可能用于厌氧检测氟离子, 且 (2) 指示剂体系 I4c/MDAB 有可能用于不可逆地检测瞬时(transient)碱性 pH 条件(常见的 pH 指示剂只能进行可逆的检测)。

[0394] 实施例 8 :MDAB 与吡啶-3-胺(aS6)和吡啶-3-硫醇(aS7)的反应

[0395] 活性信号原 aS6(通过还原相应的亚硝基化合物制备)暴露于大气氧生成了聚合物棕色沉淀, 而不是双亚胺基-靛蓝衍生物。在存在 MDAB 和不存在氧时, aS6 生成了黄色, 可能为希夫碱(Schiff base), 但是其为不能分离(escaped isolation)。没有观察到所期望的杂羟醛产物的形成。

[0396] 活性信号原 aS7(类似于 I33 得到)暴露于氧生成了相应的二硫烷, 而不是双-硫-靛蓝(bis-thion-indigo)类似物。在存在 MDAB 和不存在氧时, 期望的紫色仅在强酸条件下出现。

[0397] 结论 :MDAB 染色可能不适合于衍生自吡啶-3-胺或吡啶-3-硫醇的指示剂。

[0398] 实施例 9a :用指示剂 I4a 和 I5a 对细菌菌落进行 MDAB 染色(表 III, 项目 1-25)

[0399] 含有酵母提取物(0.6%)的胰酪大豆琼脂(TSA)用作基础平板培养基(base plating medium)。该培养基在 121°C 高压灭菌 15 分钟, 并且置于 50°C 水浴中冷却。将该指示剂加入基础培养基中, 最终浓度为 40mg/100ml(来自 80mg/ml 储备溶液, 在 DMF 中)。在平板上画线脑-心浸萃液态培养基(Brain Heart Infusion Broth)中的肠道细菌细胞的过夜培养物, 并在需氧和厌氧条件下于 35°C 温育 24 小时。温育后, 记录平板上的菌落形貌(表 III)。

[0400] 在需氧条件下且不存在 MDAB 时, 测试的指示剂不能染色产生合适的外部刺激(β -D-半乳糖苷酶)的细菌菌落。由于残余氧(微厌氧条件)偶尔观察到弱的染色。在需氧条件下, 靛蓝(IN-染色剂)一般主导 MDAB 染色的作用。例如, 指示剂体系 I4a/MDAB 在厌氧条件下将菌落染色成紫色, 在需氧条件下将菌落染色成靛蓝。

[0401] 结论 :MDAB 染色是用于特别在厌氧条件下检测和分离微生物菌种的潜在有价值

的方法。

[0402] 注意：当用来代替 MDAB 时，4-(N, N-二甲基)氨基苯甲醛 (DAB) 和大量其他选自芳族羰基化合物的潜在合适的羟醛受体在所有测试条件下不产生任何 BI-染色剂。

[0403] 实施例 9b：用指示剂 I9a, I10a, I11a 和 I12a 对细菌菌落进行 MDAB 染色（表 III，项目 26-37）

[0404] 在营养琼脂平板上用活培养物测试指示剂。对营养琼脂（5g/1 蛋白胨，5g/1 NaCl，2g/1 酵母提取物，1g/1 牛肉提取物，13g/1 琼脂，pH 7.4）进行高温灭菌，并冷却至 50℃。然后，将该底物添加至最终浓度为 150mg/1（来自 20mg/ml 储备溶液，在 DMF 中）。任选地，将 MDAB 添加至浓度为 1mM（来自 200mM 储备溶液，在 DMF 中），并倒入平板。琼脂平板用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (NM1) 或肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) (RKI05/07992)（在营养肉汤中预生长 8-18 小时）的培养物接种，并在需氧条件下于 37℃ 温育。在温育 48 小时后记录结果，并示于表 III 中。

[0405] 结论：指示剂 I9a、I11a 和 I12a 可以用于在需氧条件下的 MDAB 染色。

[0406] 实施例 10：细菌菌落的 10H-吡啶并 [1,2-a] 吡啶 (IO) 染色（表 IVa-c）

[0407] 对营养琼脂（5g/1 蛋白胨、5g/1 NaCl、2g/1 酵母提取物、1g/1 牛肉提取物、13g/1 琼脂，pH 7.4）进行高温灭菌，并冷却至 50℃。然后，将指示剂添加至最终浓度为 150mg/1（来自 20mg/ml 储备溶液，在 DMF 中）。

[0408] 任选地，将 IPTG 添加至 100mg/1（来自 100mg/ml 储备溶液，在 H₂O 中），并且倒入平板。琼脂平板用 β-半乳糖苷酶阳性大肠杆菌大肠杆菌 (NM1) 或 β-半乳糖苷酶阴性肠炎沙门氏菌 (RKI 05/07992)（在营养肉汤中预生长 8-18 小时）的培养物接种，并在 37℃ 温育。在 16、20、24 和 48 小时后检查平板，并在 18、24 和 48 小时后用 Digistore 2 Image documentation system (CAMAG) 在白光条件下记录图片。数据示于表 IVa、IVb 和 IVc 中。

[0409] 用各种生成不同生物标记酶（外部刺激，eS）的微生物菌种测试相当大量的指示剂分子（表 IVa, IVb）和一组不稳定基团（表 IVc）。染色剂的颜色在黄色至红色范围。一些测试的染色剂显示出出色的外部刺激（酶活性）的局域化，而另一些显著溶解于培养基中，并且可以用于基于溶液的测定（表 IVa）。染色伴随着荧光，同时观察到绿色荧光为暂时性的，（由活性信号原的荧光引起），该更长波长（黄色-红色）的 10H-吡啶并 [1,2-a] 吡啶荧光是稳定的。

[0410] 结论：IO 染色是用于检测和分离微生物菌种的潜在有价值的方法，提供了新的颜色方案、长波荧光和完全独立于可能干扰测定的辅助试剂 (aR)。

[0411] 实施例 11：靛蓝 (IN) 和 10H-吡啶并 [1,2-a] 吡啶 (IO) 同时染色（表 IVd）

[0412] 用大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 接种营养琼脂（含 150mg/1 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷 (I21a)、100mg/1 IPTG 和 75mg/1 5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃葡萄糖苷 (I4h)）。在 37℃ 温育 24 小时后收集的数据给出在表 IVd 中。

[0413] 同时生成 β-D-半乳糖苷酶和 β-D-葡萄糖苷酶的微生物菌落由于平行形成蓝色 IN 和黄色 IO 染色剂而表现为绿色。

[0414] 结论：互补的 IN 和 IO 染色的组合潜在地有用于扩展可获得的颜色方案。

[0415] 实施例 12 :细菌菌落在厌氧条件下的 IN 和 IO 染色剂 (表 IVe)

[0416] 用大肠杆菌接种营养琼脂平板 (含有 150mg/l 的各种底物和 100mg/l IPTG。将平板至于厌氧罐 (Anaerojar, Oxoid) 中,加入 AnaeroGen 囊袋 (Oxoid),关闭该罐,并在 37℃ 温育 24 小时。记录数据并示于表 IVe 中。

[0417] IN 染色不能在厌氧条件下使用。尽管由于菌落生长较慢,一些 IO 染色剂的扩散在厌氧条件下增加,其他染色剂如由指示剂 I22a 制备的 IO22 提供了完美的局域化。

[0418] 结论 :IO 染色是在微需氧条件或厌氧条件下潜在有价值的技术。

[0419] 实施例 13 :在血琼脂平板上的细菌菌落的 IO 染色 (表 IVf)

[0420] 标准的市购获得的血琼脂平板用 150mg/l 1-(2- 苯甲酰基苯基)-6- 氯 -1H- 吡啶 -3- 基 - β -D- 吡喃半乳糖苷 (I21a) 和 100mg/l IPTG 浸渍。平板用肺炎克雷伯氏菌接种。在 37℃ 温育 24 小时后的结果给出在表 IVf 中。

[0421] IO 染色与琼脂平板形成非常好的对比。此外,尽管血 IO 具有淬灭作用,但是荧光得以完全保持并易于检测。

[0422] 结论 :IO 染色对于在微生物血培养物中的应用是潜在有价值的。

[0423] 实施例 14 :真菌菌落的 IO 染色 (表 IVg)

[0424] 对琼脂基质 (6g/l 大豆胨,1.5g/l 酵母提取物,1g/l 葡萄糖,10mM 磷酸钠缓冲液,13g/l 琼脂, pH 7.0) 进行高温灭菌,并冷却至 50℃。然后加入 1mM MnSO₄,1g/lN- 乙酰基 -D- 半乳糖胺,和 :将 1-(2- 苯甲酰基苯基)-6- 氯 -1H- 吡啶 -3- 基 -N- 乙酰基 - β -D- 氨基半乳糖苷 (I21g) 加至最终浓度为 0.64mM (来自 50mM 储备溶液,在 DMF 中),并倒入平板。平板用白色念珠菌、克鲁斯氏念珠菌 (*Candida krusei*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 接种,并在 37℃ 温育 48 小时。记录结果并示出在表 IVg 中。

[0425] 实施例 15 :染色微生物细胞的 10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶的荧光 (图 2)

[0426] 借助 Digistore 2 Image documentation system (CAMAG) 在 366nm UV 辐射下在 16、20、24 和 48 小时检测来自实施例 10 的平板培养基。数据示于表 Iva、IVb 和 IVc 中。

[0427] 将数接种环的细菌细胞 (在含 150mg/l β -D- 半乳糖苷酶指示剂和 100mg/l IPTG 的营养琼脂平板上生长 48 小时) 直接放入黑色透明底部微滴定板的孔中。荧光扫描在 Spectramax M5 (Molecular Devices) 上记录。数据示于图 2 中。染色的细胞在标准荧光显微镜下显示为可检测的。

[0428] IO 染色剂伴随着显著的荧光。尽管观察到的绿色荧光表现为具有暂时性, (由活性 1H- 吡啶 -3- 基信号原的荧光引起),发现 IO 荧光在更长的波长 (黄色 - 红色) 为持久的。

[0429] 结论 :IO 染色代表了检测和分离微生物菌种的潜在有价值的方法,其提供了长波荧光染色活微生物菌落的手段,以及提供了荧光标记单个细胞的新的简单的工具。

[0430] 实施例 16 :氨基甲酸酯水解的指示

[0431] 当 1-(2- 苯甲酰基苯基)-1H- 吡啶 -3- 基乙基氨基甲酸酯 (I32) 用 1N NaOH 水溶液短时间处理或延长暴露于猪肝酯酶的时间时,生成了黄色沉淀,通过与参照样品进行 TLC 比较鉴定为 11- 苯基 -10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶 -10- 酮 (I019)。

[0432] 显然,有望从羟醛缩合获得的 11- 苯基 -10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶 -10- 亚胺 (I032) 快速水解成 I019。

[0433] 结论：I0 染色的概念可以延伸至包括生成 1-(2- 苯甲酰基苯基)-1H- 吡啶-3- 胺 (aS32) 或类似的活性信号原的指示剂，因此提供了寻找已久的对于氨基- 肽酶的沉淀指示剂的潜在设计。

[0434] 实施例 17：二硫化物还原的指示

[0435] 将二 [1-(2- 乙酰基苯基)-1H- 吡啶-3- 基]- 二硫烷 (I33, 2mg) 溶解于甲醇 (0.5ml) 中。将三 (2- 羧基乙基) 膦盐酸盐 (TCEP, 20mg) 加入至几乎无色的溶液中。在继续添加 1N 氢氧化钠水溶液后，溶液表成黄色。

[0436] 结论：(1) I0 染色 / 指示能够用于检测还原性环境，(2) I0 染色的概念可以延伸至包括生成 1-(2- 乙酰基苯基)-1H- 吡啶-3- 硫醇 (aS33) 或类似活性信号原的指示剂。

[0437] 表 Ia：1H- 吡啶-3- 基指示剂的列表

[0438]

项目	编码	指示剂	LG	aS	指示剂(R ₄ =H)的化学结构									
					R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	X	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
1	I1a	1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	1	H	H	H	H	O	-	-	-	-	-
2	I1c	1H-吡啶-3-基乙酸酯	c	1	H	H	H	H	O	-	-	-	-	-
3	I2a	4-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	2	Cl	H	H	H	O	-	-	-	-	-
4	I3a	6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	3	H	H	Cl	H	O	-	-	-	-	-
5	I3e	6-氯-1H-吡啶-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷	e	3	H	H	Cl	H	O	-	-	-	-	-
6	I3f	6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-葡萄糖苷酸钠盐	f	3	H	H	Cl	H	O	-	-	-	-	-
7	I3g	6-氯-1H-吡啶-3-基-N-乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷	g	3	H	H	Cl	H	O	-	-	-	-	-
8	I4a	5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	4	Cl	Br	H	H	O	-	-	-	-	-
9	I4b	5-溴-3-(叔丁基二甲基硅氧基)-4-氯-1H-吡啶	b	4	Cl	Br	H	H	O	-	-	-	-	-
10	I4c	5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基乙酸酯	c	4	Cl	Br	H	H	O	-	-	-	-	-
11	I4d	5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基磷酸胆碱	d	4	Cl	Br	H	H	O	-	-	-	-	-
12	I4h	5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃葡萄糖苷	h	4	Cl	Br	H	H	O	-	-	-	-	-

项目	编码	指示剂	LG	aS	指示剂(R ₄ -H)的化学结构									
					R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	X	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
13	I5a	5-溴-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	5	H	Br	Cl	H	O	—	—	—	—	—
14	I6-	1 <i>H</i> -吡啶-3-基-乙基氨基甲酸酯	1)	6	H	H	H	H	N	—	—	—	—	—
15	I8a	1-苯基-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	8	H	H	H	R ₁₁	O	H	H	H	H	H
16	I9a	6-氯-1-苯基-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	9	H	H	Cl	R ₁₁	O	H	H	H	H	H
17	I10a	1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	10	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
18	I11a	6-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	11	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
19	I12a	5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	12	Cl	Br	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
20	I13a	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	13	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	H
21	I14a	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	14	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me
22	I15a	1-(2-乙酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	15	Cl	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me
23	I16a	1-(2-乙酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	16	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me
24	I17a	1-(2-乙酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	17	Cl	Br	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me
25	I18a	1-(2-乙酰基-5-甲氧基-苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	18	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	OMe	H	H	Me
26	I19a	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	19	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
27	I19c	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-乙酸酯	c	19	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
28	I20a	1-(2-苯甲酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	20	Cl	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
29	I21a	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	21	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
30	I21e	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷	e	21	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
31	I21f	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-葡萄糖酸钠盐	f	21	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
32	I21g	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基- <i>N</i> -乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷	g	21	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
33	I22a	1-(2-苯甲酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	22	Cl	Br	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe
34	I23a	1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	23	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	Cl	H	H	Phe
35	I24a	1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基-苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	24	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	OMe	H	H	Phe
36	I25a	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	25	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP
37	I25c	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-乙酸酯	c	25	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP
38	I25d	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-磷酸胆碱	d	25	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP
39	I26a	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	26	Cl	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP
40	I27a	6-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-	a	27	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP

[0440]

项目	编码	指示剂	LG	aS	指示剂(R ₄ =H)的化学结构									
					R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	X	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
		吡喃半乳糖苷												
41	I28a	5-溴-4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	28	Cl	Br	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP
42	I29a	1-[2-(5-羧基吡喃酰基)-苯基]-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	29	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	CFur
43	I30a	6-氯-1-(2-吡喃酰基-苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	30	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	Fur
44	I31a	6-氯-1-[2-(<i>N</i> -甲基-吡咯-2-羧基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	a	31	H	H	Cl	R ₁₂	O	H	H	H	H	NPyrr
45	I32-	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基乙基氨基甲酸酯	1)	32	H	H	H	R ₁₂	N	H	H	H	H	Phe
46	I33-	二[1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基]-二硫烷	2)	33	H	H	H	R ₁₂	S	H	H	H	H	Me

[0441] 1) LG : -N-C = O- 乙基 (氨基甲酸乙酯)

[0442] 2) LG : -S-S- (二硫烷) 或异硫脲鎓碘化物

[0443] 表 Ib : 1*H*-吡啶-3-基活性信号原的列表

[0444]

项目	编码	活性信号原	活性信号原的化学结构											
			R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	
1	aS1	1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	H	O	—	—	—	—	—	
2	aS2	4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	H	H	H	H	O	—	—	—	—	—	
3	aS3	6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	H	O	—	—	—	—	—	
4	aS4	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	Br	H	H	H	O	—	—	—	—	—	
5	aS5	5-溴-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	Br	Cl	H	H	O	—	—	—	—	—	
6	aS6	1 <i>H</i> -吡啶-3-胺	H	H	H	H	H	N	—	—	—	—	—	
7	aS7	1 <i>H</i> -吡啶-3-硫醇	H	H	H	H	H	S	—	—	—	—	—	
8	aS8	1-苯基-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	R ₁₁	O	H	H	H	H	H	
9	aS9	6-氯-1-苯基-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₁	O	H	H	H	H	H	
10	aS10	1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe	
11	aS11	1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe	
12	aS12	5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	Br	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe	
13	aS13	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	H	
14	aS14	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me	
15	aS15	1-(2-乙酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me	
16	aS16	1-(2-乙酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me	
17	aS17	1-(2-乙酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	Br	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Me	
18	aS18	1-(2-乙酰基-5-甲氧基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	OMe	H	H	Me	
19	aS19	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe	
20	aS20	1-(2-苯甲酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe	
21	aS21	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe	
22	aS22	1-(2-苯甲酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	Br	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Phe	
23	aS23	1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	Cl	H	H	Phe	
24	aS24	1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基-苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	OMe	H	H	Phe	
25	aS25	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP	
26	aS26	4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP	
27	aS27	6-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP	
28	aS28	5-溴-4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	Cl	Br	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	DMP	
29	aS29	6-氯-1-[2-(5-羧基-呋喃酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	CFur	
30	aS30	6-氯-1-(2-呋喃酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	Fur	
31	aS31	6-氯-1-[2-(<i>N</i> -甲基-吡咯-2-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-酚	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	NPyr	
32	aS32	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-胺	H	H	H	H	R ₁₂	N	H	H	H	H	Phe	
33	aS33	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-硫醇	H	H	H	H	R ₁₂	S	H	H	H	H	Me	

[0445] 表 Ic : 1H-吡啶-3-基指示剂体系生成的信号团的列表

项目	编码	类型	信号团	aS	aR	信号团的化学结构(R ₁₃ = R ₁₀ , OH)										
						R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₃
1	IN1	IN	靛蓝	1	空气	H	H	H	H	H	O	—	—	—	—	—
2	IN2	IN	4,4'-二氯靛蓝	2	空气	Cl	H	H	H	H	O	—	—	—	—	—
3	IN3	IN	6,6'-二氯靛蓝	3	空气	H	H	Cl	H	H	O	—	—	—	—	—
4	IN4	IN	5,5'-二溴-4,4'-二氯靛蓝	4	空气	Cl	Br	H	H	H	O	—	—	—	—	—
5	IN5	IN	5,5'-二溴-6,6'-二氯靛蓝	5	空气	H	Br	Cl	H	H	O	—	—	—	—	—
6	IN8	IN	1,1'-二苯基靛蓝	8	空气	II	II	II	II	R ₁₁	O	II	II	II	II	II
7	IN9	IN	6,6'-二氯-1,1'-二苯基靛蓝	9	空气	H	H	Cl	H	R ₁₁	O	H	H	H	H	H
8	IN10	IN	1,1'-二[2-(甲氧基羰基)苯基]靛蓝	10	空气	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
9	IN11	IN	1,1'-二[2-(甲氧基羰基)苯基]-6,6'-二氯靛蓝	11	空气	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
10	IN12	IN	1,1'-二[2-(甲氧基羰基)苯基]-5,5'-二溴-4,4'-二氯靛蓝	12	空气	Cl	Br	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
11	BI1	BI	2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-酮	1	MDAB	H	H	H	H	H	O	—	—	—	—	—
12	BI2	BI	4-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-酮	2	MDAB	Cl	H	H	H	H	O	—	—	—	—	—
13	BI3	BI	6-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-酮	3	MDAB	H	H	Cl	H	H	O	—	—	—	—	—
14	BI4	BI	5-溴-4-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-酮	4	MDAB	Cl	Br	H	H	H	O	—	—	—	—	—
15	BI5	BI	5-溴-6-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-酮	5	MDAB	H	Br	Cl	H	H	O	—	—	—	—	—
16	BI8	BI	2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-1-苯基二氢吡啶-3-酮	8	MDAB	H	H	H	H	R ₁₁	O	H	H	H	H	H
17	BI9	BI	6-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-1-苯基二氢吡啶-3-酮	9	MDAB	H	H	Cl	H	R ₁₁	O	H	H	H	H	H
18	BI10	BI	2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-1-(2-(甲氧基羰基)苯基)二氢吡啶-3-酮	10	MDAB	H	H	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
19	BI11	BI	6-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-1-[2-(甲氧基羰基)苯基]二氢吡啶-3-酮	11	MDAB	H	H	Cl	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
20	BI12	BI	5-溴-4-氯-2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-1-[2-(甲氧基羰基)苯基]二氢吡啶-3-酮	12	MDAB	Cl	Br	H	H	R ₁₂	O	H	H	H	H	OMe
21	BI6	BI	2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-亚胺	6	MDAB	H	H	H	H	H	N	—	—	—	—	—
22	BI7	BI	2-(4-二甲基氨基-2-甲氧基苯亚甲基)-二氢吡啶-3-硫酮	7	MDAB	II	II	II	II	II	S	—	—	—	—	—
23	IO10	IO	11-羟基-10H-吡啶并[1,2-a]吡啶-10-酮	10	—	H	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	OH
24	IO11	IO	7-氯-11-羟基-10H-吡啶并[1,2-a]吡啶-10-酮	11	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	OH
25	IO12	IO	8-溴-9-氯-11-羟基-10H-吡啶并[1,2-a]吡啶-10-酮	12	—	Cl	Br	H	H	NA	O	H	H	H	H	OH
26	IO13	IO	10H-吡啶并[1,2-a]吡啶-10-酮	13	—	H	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	H
27	IO14	IO	11-甲基-10H-吡啶并-	14	—	H	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	Me

项目	编码	类型	信号团	aS	aR	信号团的化学结构(R ₁₃ = R ₁₀ , OH)										
						R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	X	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₃
			[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮													
28	IO15	IO	9-氯-11-甲基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	15	—	Cl	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	Me
29	IO16	IO	7-氯-11-甲基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	16	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	Me
30	IO17	IO	8-溴-9-氯-11-甲基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	17	—	Cl	Br	H	H	NA	O	H	H	H	H	Me
31	IO18	IO	7-氯-11-甲基-3-甲氧基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	18	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	OMe	H	H	Me
32	IO19	IO	11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	19	—	H	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	Phe
33	IO20	IO	9-氯-11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	20	—	Cl	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	Phe
34	IO21	IO	7-氯-11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	21	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	Phe
35	IO22	IO	8-溴-9-氯-11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	22	—	Cl	Br	H	H	NA	O	H	H	H	H	Phe
36	IO23	IO	3,7-二氯-11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	23	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	Cl	H	H	Phe
37	IO24	IO	7-氯-3-甲氧基-11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	24	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	OMe	H	H	Phe
38	IO25	IO	11-(2,4-二甲氧基)-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	25	—	H	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	DMP
39	IO27	IO	7-氯-11-(2,4-二甲氧基)苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	27	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	DMP
40	IO26	IO	9-氯-11-(2,4-二甲氧基)苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	26	—	Cl	H	H	H	NA	O	H	H	H	H	DMP
41	IO28	IO	8-溴-9-氯-11-(2,4-二甲氧基)苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	28	—	Cl	Br	H	H	NA	O	H	H	H	H	DMP
42	IO29	IO	7-氯-11-(5-羧基呋喃-2-基)-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	29	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	CFur
43	IO30	IO	7-氯-11-(呋喃-2-基)-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	30	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	Fur
44	IO32	IO	11-苯基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-亚胺	32	—	H	H	H	H	NA	N	H	H	H	H	Phe
45	IO33	IO	11-甲基-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-硫酮	33	—	H	H	H	H	NA	S	H	H	H	H	Me
46	IO31	IO	7-氯-11-(<i>N</i> -甲基吡咯-2-基)-10 <i>H</i> -咪唑并[1,2- <i>a</i>]咪唑-10-酮	31	—	H	H	Cl	H	NA	O	H	H	H	H	NPyr

[0448] 表 IIa :需氧的 1*H*-咪唑-3-基指示剂体系(无 MDAB) 的列表

[0449]

项目	指示剂 / 活性信号原					外部刺激	信号团		
		编码	aS	aR	LG		BI	IO	IN
1	1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I1a	1	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	1
2	1 <i>H</i> -咪唑-3-基乙酸酯	I1c	1	空气	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NA	NA	1
3	4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I2a	2	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	2
4	6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I3a	3	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	3
5	6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷	I3e	3	空气	e	酶: α-葡萄糖苷酶	NA	NA	3
6	6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-葡萄糖苷酸钠盐	I3f	3	空气	f	酶: β-D-葡萄糖醛酸糖苷酶	NA	NA	3
7	6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- <i>N</i> -乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷	I3g	3	空气	g	酶: 半乳糖胺酶	NA	NA	3
8	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I4a	4	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	4
9	5-溴-3-(叔丁基二甲基硅氧基)-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑	I4b	4	空气	b	离子: 氟离子	NA	NA	4
10	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基乙酸酯	I4c	4	空气	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NA	NA	4
11	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基磷酸胆碱	I4d	4	空气	d	酶: 磷脂酶 c	NA	NA	4
12	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃葡萄糖苷	I4h	4	空气	h	酶: β-D-葡萄糖苷酶	NA	NA	4
13	5-溴-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I5a	5	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	4
14	1 <i>H</i> -咪唑-3-基-乙基氨基甲酸酯	I6	6	空气	1)	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NA	NA	*
15	(1 <i>H</i> -咪唑-3-硫醇)	NA	7	空气	2)	—	NA	NA	—
16	1-苯基-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I8a	8	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	8
17	6-氯-1-苯基-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I9a	9	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	NA	9
18	1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I10a	10	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	10	(10)
19	6-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I11a	11	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	11	(11)
20	5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I12a	12	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	12	(12)
21	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I13a	13	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	13	-
22	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I14a	14	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	14	-
23	1-(2-乙酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I15a	15	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	15	-
24	1-(2-乙酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I16a	16	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	16	-
25	1-(2-乙酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I17a	17	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	17	—
26	1-(2-乙酰基-5-甲氧基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I18a	18	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	18	—
27	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I19a	19	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	19	—
28	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基乙酸酯	I19c	19	空气	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NA	19	—
29	1-(2-苯甲酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I20a	20	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	20	
30	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I21a	21	空气	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NA	21	—

[0450]

项目	指示剂 / 活性信号原					外部刺激	信号团		
		编码	aS	aR	LG		BI	IO	IN
31	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- α -D-吡喃葡萄糖苷	I21e	21	空气	e	酶: α -葡萄糖苷酶	NA	21	—
32	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-葡萄糖苷酸钠盐	I21f	21	空气	f	酶: β -D-葡萄糖醛酸糖苷酶	NA	21	—
33	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- <i>N</i> -乙酰基- β -D-氨基半乳糖苷	I21g	21	空气	g	酶: 半乳糖胺酶	NA	21	—
34	1-(2-苯甲酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I22a	22	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	22	—
35	1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I23a	23	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	23	—
36	1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I24a	24	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	24	—
37	1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I25a	25	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	25	—
38	1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基乙酸酯	I25c	25	空气	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NA	25	—
39	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基磷酸胆碱	I25d	25	空气	d	酶: 磷脂酶 c	NA	25	—
40	6-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I27a	26	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	26	—
41	4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I26a	27	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	27	—
42	5-溴-4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I28a	28	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	28	—
43	1-[2-(5-羧基呋喃酰基)苯基]-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I29a	29	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	29	—
44	6-氯-1-(2-呋喃酰基-苯基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I30a	30	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	30	—
45	6-氯-1-[2-(<i>N</i> -甲基-吡咯-2-羧基)苯基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I31a	31	空气	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NA	31	—
46	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基乙基氨基甲酸酯	I32	32	空气	1)	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NA	32	—
47	二[1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基]-二硫烷	I33	33	空气	2)	还原剂: TCEP	NA	33	—

[0451] NP:未实施

[0452] NA:不可应用

[0453] *:深色沉淀

[0454] 1) LG:—N—C=O—乙基(氨基甲酸乙酯)

[0455] 2) LG:—S—S—(二硫烷)或异硫脲鎓碘化物

[0456] 表 I Ib:需氧的 1*H*-吲哚-3-基/MDAB 指示剂体系的列表

[0457]

项目	指示剂 / 活性信号原	编码	aS	aR	LG	外部刺激	信号团		
							BI	IO	IN
1	1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I1a	1	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	(1)	NA	1
2	1 <i>H</i> -吡啶-3-基乙酸酯	I1c	1	空气 / MDAB	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NP	NA	NP
3	4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I2a	2	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	(2)	NA	2
4	6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I3a	3	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	(3)	NA	3
5	6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷	I3e	3	空气 / MDAB	e	酶: α-葡萄糖苷酶	NP	NA	NP
6	6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-葡萄糖苷酸钠盐	I3f	3	空气 / MDAB	f	酶: β-D-葡萄糖醛酸糖苷酶	NP	NA	NP
7	6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基- <i>N</i> -乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷	I3g	3	空气 / MDAB	g	酶: 半乳糖胺酶	NP	NA	NP
8	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I4a	4	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	(4)	NA	4
9	5-溴-3-(叔丁基二甲基甲硅氧基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶	I4b	4	空气 / MDAB	b	离子: 氟离子	(4)	NA	4
10	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基乙酸酯	I4c	4	空气 / MDAB	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	(4)	NA	4
11	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基磷酸胆碱	I4d	4	空气 / MDAB	d	酶: 磷脂酶 c	NP	NP	NP
12	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃葡萄糖	I4h	4	空气 / MDAB	h	酶: β-D-葡萄糖苷酶	NP	NP	NP
13	5-溴-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I5a	5	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	(4)	NA	4
14	1 <i>H</i> -吡啶-3-基-乙基氨基甲酸酯	I6	6	空气 / MDAB	1)	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	*	NA	—
15	(1 <i>H</i> -吡啶-3-硫醇)	NA	7	空气 / MDAB	2)	离子: 氢氧根离子	(6)	NA	—
16	1-苯基-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I8a	8	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NP	NP	NP
17	6-氯-1-苯基-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I9a	9	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	9	NA	(9)
18	1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I10a	10	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	10	—
19	6-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I11a	11	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	11	(10)	—
20	5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I12a	12	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	12	(12)
21	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I13a	13	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	13	(13)
22	1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I14a	14	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	14	—
23	1-(2-乙酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I15a	15	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	15	—
24	1-(2-乙酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I16a	16	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	16	—
25	1-(2-乙酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I17a	17	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	17	—
26	1-(2-乙酰基-5-甲氧基-苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I18a	18	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	18	—
27	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I19a	19	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	19	—
28	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基乙酸酯	I19c	19	空气 / MDAB	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NP	NP	NP
29	1-(2-苯甲酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I20a	20	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	20	—
30	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I21a	21	空气 / MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	21	—

[0458]

项目	指示剂 / 活性信号原					外部刺激	信号团		
31	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- α -D-吡喃葡萄糖苷	I21e	21	空气 / MDAB	e	酶: α -葡萄糖苷酶	NP	NP	NP
32	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-葡萄糖苷酸钠盐	I21f	21	空气 / MDAB	f	酶: β -D-葡萄糖醛酸糖苷酶	NP	NP	NP
33	1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- <i>N</i> -乙酰基- β -D-氨基半乳糖苷	I21g	21	空气 / MDAB	g	酶: 半乳糖胺酶	NP	NP	NP
34	1-(2-苯甲酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I22a	22	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	22	—
35	1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I23a	23	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	23	—
36	1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基-苯基)-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I24a	24	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	24	—
37	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I25a	25	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	25	—
38	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基乙酸酯	I25c	25	空气 / MDAB	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NP	NP	NP
39	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基磷酸胆碱	I25d	25	空气 / MDAB	d	酶: 磷脂酶 c	NP	NP	NP
40	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-6-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I27a	27	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	27	—
41	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-4-氯-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I26a	26	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	26	—
42	5-溴-4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I28a	28	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	28	—
43	6-氯-1-[2-(5-羧基咪唑基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I29a	29	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	29	—
44	6-氯-1-(2-咪唑基-苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I30a	30	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	—	30	—
45	6-氯-1-[2-(<i>N</i> -甲基-吡咯-2-羧基)苯基]-1 <i>H</i> -咪唑-3-基- β -D-吡喃半乳糖苷	I31a	31	空气 / MDAB	a	酶: β -D-半乳糖苷酶	NP	NP	NP
46	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基乙基氨基甲酸酯	I32	32	空气 / MDAB	1)	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	NP	NP	NP
47	二(1-(2-乙酰基苯基)-1 <i>H</i> -咪唑-3-基)-二硫烷	I33	33	空气 / MDAB	2)	还原剂: TCEP	NP	NP	NP

[0459] NP:未实施

[0460] NA:不可应用

[0461] *:黄色-棕色溶液

[0462] 1) LG:—N—C=O—乙基(氨基甲酸乙酯)

[0463] 2) LG:—S—S—(二硫烷)或异硫脲鎓碘化物

[0464] 表 I1c:厌氧的 1*H*-咪唑-3-基 / MDAB 指示剂体系的列表

[0465]

项目	指示剂 / (活性信号原)	编码	aS	aR	LG	外部刺激	信号团		
							BI	IO	IN
1	1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I1a	1	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	1	NA	—
2	1 <i>H</i> -吲哚-3-基 乙酸酯	I1c	1	MDAB	c	酶: 酯酶; 离子: 氢氧根离子	1	NA	—
3	4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I2a	2	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	2	NA	—
4	6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I3a	3	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	3	NA	—
5	6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷	I3e	3	MDAB	e	酶: α-葡萄糖苷酶	NP	NP	NP
6	6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-葡萄糖醛酸钠盐	I3f	3	MDAB	f	酶: β-D-葡萄糖醛酸糖苷酶	NP	NP	NP
7	6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- <i>N</i> -乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷	I3g	3	空气 / MDAB	g	酶: 半乳糖胺酶	NP	NP	NP
8	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I4a	4	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	4	NA	—
9	5-溴-3-(叔丁基二甲基-甲硅烷基)-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚	I4b	4	MDAB	b	离子: 氟离子	4	NA	—
10	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基 乙酸酯	I4c	4	MDAB	c	酶: 酯酶	4	NA	—
11	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基磷酸胆碱	I4d	4	MDAB	d	酶: 磷脂酶 c	NP	NP	NP
12	5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃葡萄糖苷	I4h	4	空气 / MDAB	h	酶: β-D-葡萄糖苷酶	NP	NP	NP
13	5-溴-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I5a	5	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	4	NA	—
14	1 <i>H</i> -吲哚-3-基-乙基氨基甲酸酯	I6	6	MDAB		-	-	NA	*
15	(1 <i>H</i> -吲哚-3-硫醇)	NA	7	MDAB		-	6	NA	—
16	1-苄基-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I8a	8	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NP	NP	NP
17	6-氯-1-苄基-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I9a	9	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	9	NA	—
18	1-[2-(甲氧基-羰基)苄基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I10a	10	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	10	—
19	6-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苄基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I11a	11	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	11	11	—
20	5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苄基]-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I12a	12	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	12	—
21	1-(2-甲酰基苄基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I13a	13	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	13	—
22	1-(2-乙酰基苄基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I14a	14	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	14	—
23	1-(2-乙酰基苄基)-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I15a	15	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	15	—
24	1-(2-乙酰基苄基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I16a	16	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	16	—
25	1-(2-乙酰基苄基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I17a	17	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	17	—
26	1-(2-乙酰基-5-甲氧基苄基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I18a	18	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	18	—
27	1-(2-苯甲酰基苄基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I19a	19	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	19	—
28	1-(2-苯甲酰基苄基)-1 <i>H</i> -吲哚-3-基 乙酸酯	I19c	19	MDAB	c	酶: 酯酶	NP	NP	NP
29	1-(2-苯甲酰基苄基)-4-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I20a	20	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	20	—
30	1-(2-苯甲酰基苄基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I21a	21	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	21	—
31	1-(2-苯甲酰基苄基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷	I21e	21	MDAB	e	酶: α-葡萄糖苷酶	NP	NP	NP
32	1-(2-苯甲酰基苄基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基-β-D-葡萄糖醛酸钠盐	I21f	21	MDAB	f	酶: β-D-葡萄糖醛酸糖苷酶	NP	NP	NP
33	1-(2-苯甲酰基苄基)-6-氯-1 <i>H</i> -吲哚-3-基- <i>N</i> -乙酰基-β-D-氨基半乳糖苷	I21g	21	MDAB	g	酶: 半乳糖胺酶	NP	NP	NP
34	1-(2-苯甲酰基苄基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -	I22a	22	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	22	—

[0466]

项目	指示剂 / (活性信号原)					外部刺激	信号团		
	吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷								
35	1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-6-氯-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I23a	23	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	23	—
36	1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基苯基)-6-氯-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I24a	24	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	24	—
37	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)l 苯基]-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I25a	25	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	25	—
38	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1H-吲哚-3-基乙酸酯	I25c	25	MDAB	c	酶: 酯酶	NP	NP	NP
39	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1H-吲哚-3-基磷酸胆碱	I25d	25	MDAB	d	酶: 磷脂酶 c	NP	NP	NP
40	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-6-氯-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I27a	27	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	27	—
41	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-4-氯-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I26a	26	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	26	—
42	1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-5-溴-4-氯-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I28a	28	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	28	—
43	1-[2-(5-羧基吡喃酰基)苯基]-6-氯-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I29a	29	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	29	—
44	6-氯-1-(2-吡喃酰基苯基)-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I30a	30	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	—	30	—
45	6-氯-1-[2-(N-甲基吡咯-2-羧基)苯基]-1H-吲哚-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	I31a	31	MDAB	a	酶: β-D-半乳糖苷酶	NP	NP	NP
46	1-(2-苯甲酰基苯基)-1H-吲哚-3-基乙基氨基甲酸酯	I32	32	MDAB		酶: 酯酶	NP	NP	NP
47	二(1-(2-乙酰基苯基)-1H-吲哚-3-基)-二硫烷	I33	33	MDAB		还原剂: TCEP	NP	NP	NP

[0467] NP :未实施

[0468] NA :不可应用

[0469] * :黄色 - 棕色溶液

[0470] 1) LG : -N-C = O- 乙基 (氨基甲酸乙酯)

[0471] 2) LG : -S-S- (二硫烷) 或异硫脲鎓碘化物

[0472] 表 III : β-D- 半乳糖苷酶阳性 / 阴性细菌菌落的 2- 苯亚甲基二氢吲哚 (MDAB) 染色

[0473]

项目	指示剂	aR	当量	菌种	eS	需氧条件	微需氧的(厌氧)条件
					b-gal	TSAYE, 含 40 mg/100 ml 的指示剂	TSAYE, 含 40 mg/100 ml 的指示剂
1	I4a	-	NA	弗氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)	-	蓝绿色(深色着色的菌落), 没有环	绿色(浅色着色的菌落), 没有环
2	I4a	DAB	2:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	蓝绿色(中度着色的菌落), 没有环	乳色着色的菌落, 没有环
3	I4a	DAB	1:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	蓝绿色(浅色着色的菌落), 具有清晰环	乳色着色的菌落, 没有环
4	I4a	MDAB	2:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	蓝绿色(深色着色菌落), 具有浅色环	绿色(浅色着色的菌落), 没有环
5	I4a	MDAB	1:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	蓝绿色(浅色着色的菌落), 具有淡红色调	粉色(浅色着色的菌落), 没有环
6	I4a	-	NA	大肠杆菌	-	蓝绿色(非常深色着色的菌落), 没有环	绿色(浅色着色的菌落), 没有环
7	I4a	DAB	2:1	大肠杆菌	-	蓝绿色(非常深色着色的菌落), 没有环	淡绿色(非常浅色着色的菌落), 没有环
8	I4a	DAB	1:1	大肠杆菌	-	蓝绿色(非常深色着色的菌落), 没有环	乳色着色的菌落, 没有环
9	I4a	MDAB	2:1	大肠杆菌	-	蓝绿色(非常深色着色的菌落), 没有环	绿色(浅色着色的菌落), 具有乳色环
10	I4a	MDAB	1:1	大肠杆菌	-	蓝绿色(非常深色着色的菌落), 具有白色环	粉色(中度着色的菌落), 具有乳色环
11	I4a	MDAB	1:1	曼哈顿沙门氏菌 (<i>Salmonella manhattan</i>)	-	乳色着色的菌落	乳色着色的菌落
12	I4a	MDAB	1:1	曼哈顿沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	乳色着色的菌落
13	I5a	-	NA	弗氏柠檬酸杆菌	-	紫色(深色着色菌落), 具有清晰环(clear ring)	浅紫色(浅色着色的菌落), 没有环
14	I5a	DAB	2:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	紫色(中度着色的菌落), 具有清晰环	乳色着色的菌落, 没有环
15	I5a	DAB	1:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	紫色(浅色中度着色的菌落), 具有白色环	乳色着色的菌落, 没有环
16	I5a	MDAB	2:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	紫色(深色着色菌落), 具有清晰环	紫色(浅色着色的菌落), 具有清晰环
17	I5a	MDAB	1:1	弗氏柠檬酸杆菌	-	紫色(中度着色的菌落), 具有清晰环	紫色(中度着色的菌落), 具有清晰环
18	I5a	-	NA	曼哈顿沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	乳色着色的菌落
19	I5a	-	NA	大肠杆菌	-	紫色(非常深色着色的菌落), 没有环	浅紫色(浅色着色的菌落), 没有环
20	I5a	DAB	2:1	大肠杆菌	-	紫色(非常深色着色的菌落), 没有环	乳色着色的菌落, 没有环
21	I5a	DAB	1:1	大肠杆菌	-	紫色(中度着色的菌落), 具有清晰环	乳色着色的菌落, 没有环
22	I5a	MDAB	2:1	大肠杆菌	-	紫色(非常深色着色的菌落), 没有环	紫色(浅色着色的菌落), 具有清晰环
23	I5a	MDAB	1:1	大肠杆菌	-	紫色(非常深色着色的菌落), 没有环	紫色(中度着色的菌落), 具有清晰环
24	I5a	-	NA	曼哈顿沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	乳色着色的菌落
25	I5a	MDAB	1:1	曼哈顿沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	乳色着色的菌落
26	I9a	-	NA	大肠杆菌	-	乳色至黄褐色着色的菌落	-
27	I9a	MDAB	1:1	大肠杆菌	-	红色着色的菌落	-
28	I9a	MDAB	1:1	肠炎沙门氏菌肠炎血清型	-	乳色着色的菌落	-
29	I10a	-	NA	大肠杆菌	-	乳色至黄褐色着色的菌落	-
30	I10a	MDAB	1:1	大肠杆菌	-	乳色至黄褐色着色的菌落	-
31	I10a	MDAB	1:1	肠炎沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	-
32	I11a	-	NA	大肠杆菌	-	乳色至黄褐色着色的菌落	-
33	I11a	MDAB	1:1	大肠杆菌	-	红色至棕色着色的菌落	-
34	I11a	MDAB	1:1	肠炎沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	-
35	I12a	-	NA	大肠杆菌	-	乳色至黄褐色着色的菌落	-
36	I12a	MDAB	1:1	大肠杆菌	-	棕色着色的菌落	-
37	I12a	MDAB	1:1	肠炎沙门氏菌	-	乳色着色的菌落	-
DAB: 4-(二甲基氨基)苯甲醛					- : 不存在		
MDAB: 2-甲氧基-4-(二甲基氨基)苯甲醛					+ : 存在		
b-gal: β -D-半乳糖苷酶							

[0474] 表 Iva : 各种 IO 染色剂对微生物平板培养基的颜色、荧光和局域化

[0475]

在营养琼脂(含 150 mg/l 底物和 100 mg/l IPTG)上 24 小时后的细菌菌落					
			eS: b-gal	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
				+	-
I19a	1-(2-苯甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄-橙色	+	-
		F	黄色	+	-
		L		+	NA
		G		+	+
I17a	1-(2-乙酰基苯基)-5-溴-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄-橙色	+	-
		F	-	-	-
		L		+	NA
		G		+	+
I20a	1-(2-苯甲酰基苯基)-4-氯-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	橙色	+/-	-
		F	橙色	+/-	-
		L		结晶(cryst.)	NA
		G		+	+
I13a	1-(2-甲酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	乳-橙色	+/-	-
		F	-	-	-
		L		+	-
		G		+	+
I10a	1-[2-(甲氧基羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄-绿色	+	-
		F	绿色	+	-
		L		-	NA
		G		+	+
I28a	5-溴-4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	橙色	+	-
		F	(红色)	+/-	-
		L		+	NA
		G		+	+
I26a	4-氯-1-[2-(2,4-二甲氧基-苯甲酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄-橙色	+	-
		F	橙色	+/-	-
		L		+	NA
		G		+	+
I12a	5-溴-4-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄-绿色	+/-	-
		F	绿色	+/-	-
		L		-	NA
		G		+	+
I11a	6-氯-1-[2-(甲氧基-羰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄-绿色	+	-
		F	绿色	+	-
		L		-	NA
		G		+	+
I29a	6-氯-1-[2-(5-羧基-呋喃酰基)苯基]-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	红色	+	-
		F	-	-	-
		L		-	-
		G		+	+
I30a	6-氯-1-(2-呋喃酰基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	深橙色	++	-
		F	橙-红色	+/-	-
		L		+/-	-
		G		+	+
I23a	6-氯-1-(2-苯甲酰基-5-氯苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	黄色	+	NA
		F	绿-黄色	+	NA
		L		+	NA
		G		+	NA
I18a	1-(2-乙酰基-5-甲氧基苯基)-1 <i>H</i> -吡啶-3-	C	浅黄色	+	-

[0476]

在营养琼脂(含 150 mg/l 底物和 100 mg/l IPTG)上 24 小时后的细菌菌落					
			eS: b-gal	大肠杆菌	肠炎沙门氏菌
				+	-
	基-β-D-吡喃半乳糖苷	F	绿色	+/-	-
		L		+/-	NA
		G		+	+
I24a	1-(2-苯甲酰基-5-甲氧基苯基)-1H-咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	深黄色	+	-
		F	黄-绿色	+	-
		L		+/-	NA
		G		+	+
I14a	1-(2-乙酰基苯基)-1H-咪唑-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	C	浅黄色	+	-
		F	-	-	-
		L		+	NA
		G		+	+

[0477] C:菌落的颜色 - :不存在

[0478] F:菌落的荧光 +/- :弱

[0479] G:菌落的生长 + :强

[0480] L:染色剂在菌落上的局域化 ++ :非常强

[0481] eS:外部刺激

[0482] b-gal : β -D- 半乳糖苷酶

[0483] NA :不可应用

[0484]

表 IVb: β -D- 半乳糖苷酶阳性 / 阴性细菌菌落的 IO 染色
在营养琼脂 (含 150 mg/ β -D- 半乳糖苷酶指示剂和 100 mg/l IPTG) 上 24 小时后的细菌菌落

菌种	菌株	eS b-gal	II6a			II2a			I22a			I25a		
			C	F	G	C	F	G	C	F	G	C	F	G
			y	y	g	y	y	g	o	o		y	o	
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	292	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
弗氏柠檬酸杆菌	181	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
产气肠杆菌	242	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	245	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大肠杆菌 (<i>O157: H7</i>)	60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大肠杆菌	61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大肠杆菌	270	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肺炎克雷伯氏菌	164	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
粘质沙雷氏菌 (<i>Serratia marcescens</i>)	40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
中间葡萄球菌 (<i>Staphylococcus intermedius</i>)	31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
腐生葡萄球菌 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	273	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乍得沙门氏菌 (<i>Salmonella bongori</i>)	81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Illa	73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
痢疾志贺氏菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>) Serovar 1	131	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
索氏志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>)	133	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	175	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
肺炎沙门氏菌 (<i>Salmonella enteritidis</i>)	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
单核细胞增生利斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>) (4b)	290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鲍氏志贺氏菌 (<i>Shigella boydii</i>)	135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0485]

在营养琼脂 (含 150 mg/β-D-半乳糖苷酶指示剂和 100 mg/l IPTG) 上 24 小时后的细菌菌落 (续表)

菌种	菌株	eS	128a			127a			131a			14a(续)		
			C	F	G	C	F	G	C	F	G	C	F	G
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	292		o	o	+	y	o		r	r		b	-	
弗氏柠檬酸杆菌	181		+/-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
产气肠杆菌	242		+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-	+
阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	245		+	+/-	+	++	++	+	+	+/-	+	++	-	+
大肠杆菌 (O157: H7)	50		+	+/-	+	++	++	+	+	+/-	+	++	-	+
大肠杆菌	61		+	+/-	+	++	++	+	+	+/-	+	++	-	+
大肠杆菌	270		++	+/-	+	++	++	+	+	+/-	+	++	-	+
肺炎克雷伯氏菌	164		+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	++	-	+
粘质沙雷氏菌 (<i>Serratia marcescens</i>)	40		+/-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
中国葡萄球菌 (<i>Staphylococcus intermedius</i>)	31		+	+/-	+	-	-	+/-	+	-	+	+	-	+
腐生葡萄球菌 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	273		+/-	-	+	+/-	+/-	+	+	-	+	+	-	+
乍得沙门氏菌 (<i>Salmonella bongori</i>)	51		+/-	-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+	+/-	-	+
<i>Salmonella</i> Illa	73		-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
痢疾志贺氏菌 (<i>Shigella dysenteriae</i>) Serovar 1	131		-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
索氏志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>)	133		+	+/-	+	+	++	+	+	+/-	+	+	-	+
小肠结肠炎耶尔森氏菌 (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	175		-	-	+	+/-	-	+	+/-	-	+	-	-	+
肠炎沙门氏菌 (<i>Salmonella enteritidis</i>)	43		-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	65		-	-	+/-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
单核细胞增生利斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>)(4b)	290		-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	158		-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
鲍氏志贺氏菌 (<i>Shigella boydii</i>)	135		-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	2		-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+	y	-	+
无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)	195		-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-

C: 菌落的颜色 y: 黄色
 F: 菌落的荧光 g: 绿色
 G: 菌落的生长 o: 橙色

r: 红色
 b: 蓝色
 p: 粉色

-: 不存在
 +/-: 弱/易变
 +: 强
 ++: 非常强

1: 蓝色自发荧光
 2: 金黄色葡萄球菌天然颜色

[0486] 表 IVc: 产生各种生物标记酶的细菌菌落的 10 染色

[0487]

在营养琼脂(含 0.45 mM β -D-葡糖醛酸糖苷酶指示剂)上 24 小时后的细菌菌落								
菌株	菌株	eS	I21f			I3f(对照)		
		葡糖醛酸糖苷酶	C	F	G	C	F	G
			y	y - o		p		
大肠杆菌	61	+	+	+/-	+	+	-	+
大肠杆菌	62	+	+	+/-	+	+	-	+
大肠杆菌	270	+	+	+/-	+	+	-	+
肺炎克雷伯氏菌	164	-	-	-	+	-	-	+

[0488]

在营养琼脂(含 150 mg/l α -D-葡糖苷酶指示剂)上 24 小时后的细菌菌落								
菌种	菌株	eS	I21e					
		α -葡糖苷酶	C	F	G			
			y	y - g				
阪崎肠杆菌 (<i>Enterobacter sakazakii</i>)	141	+	+	+/-	+			
阪崎肠杆菌	142	+	+	+/-	+			
产气肠杆菌	242	-	-	-	+			
阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	245	-	-	-	+			
索氏志贺氏菌 (<i>Shigella sonnei</i>)	133	-	-	-	+			
大肠杆菌	270	-	-	-	+			

[0489]

在营养琼脂(含 0.52 mM C1-酯酶指示剂)上 24 小时后的细菌菌落								
菌种	菌株	eS	I19c			I4c(对照)		
		c1-酯酶	C	F	G	C	F	G
			y	y		b	-	
肺炎克雷伯氏菌	164		+	*	+	+	-	+
大肠杆菌	270		+/-	*	+	-	-	+/-
蜡状芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	289		++	*	+	-	-	-

[0490]

在胰酪大豆琼脂(含 0.78 mM PC PLC 指示剂、3.2 g/l BSA、0.05% Tween 80 和 5 mM MnCl_2)上 24 小时后的细菌菌落								
菌种	菌株	eS	I25d			I4d(对照)		
		plc	C	F	G	C	F	G
			y	y - g		b	-	
蜡状芽孢杆菌	51	+	+	++	+	+/-	-	+
蜡状芽孢杆菌	289	+	+	++	+	-	-	+
蜡状芽孢杆菌	191	+	+	++	+	+/-	-	+
蜡状芽孢杆菌	192	+	++	++	+	++	-	+
草状芽孢杆菌 (<i>Bacillus mycoides</i>)	64	+	+	++	+	+	-	+
苏云金芽孢杆菌 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	66	+	+	++	+	+/-	-	+
大肠杆菌	61	+/-	+/-	+/-	+	+	-	+
大肠杆菌	270	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	+
单核细胞增生利斯特氏菌 (<i>Listeria monocytogenes</i>) (4b)	290	+	-	-	+	-	-	+
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	168	+	y - g ¹	b ²	+	y - g ¹	b ²	+

[0491]

*: 由于一些底物沉淀引起的弥散背景		C: 菌落的颜色
¹ : 天然颜色, 同样在不含底物的琼脂上		F: 菌落的荧光
² : 天然荧光, 同样在不含底物的琼脂上		G: 菌落的生长
I21f : 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-葡糖苷酸钠盐		y: 黄色
I3f : 6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-葡糖苷酸钠盐		g: 绿色
I21e : 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基-α-D-吡喃葡萄糖苷		o: 橙色
I19c : 1-(2-苯甲酰基苯基)-1H-吡啶-3-基乙酸酯		r: 红色
I4c : 5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基乙酸酯		b: 蓝色
I25d : 1-[2-(2,4-二甲氧基苯甲酰基)苯基]-1H-吡啶-3-基磷酸胆碱		p: 粉色
I4d : 5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基磷酸胆碱		-: 不存在
eS: 外部刺激		+/-: 弱/易变
葡糖醛酸糖苷酶: β-D-葡糖醛酸糖苷酶		+: 强
a-葡糖苷酶: α-D-葡糖苷酶		++: 非常强
plc: 磷脂酰胆碱磷脂酶 c		

[0492] 表 Ivd :细菌菌落的 IN 和 IO 共同染色

[0493]

营养琼脂(含 β-D-半乳糖苷酶 IO 指示剂 I21a 和 IN 指示剂 I4h)					
菌种	菌株	eS: b-gal	eS: b-glu	C	G
大肠杆菌	270	+	-	y	+
肺炎克雷伯氏菌	164	+	+	g	+
产气肠杆菌	242	+	+	g	+
粪肠球菌	210	-	+	b	+

[0494]

I21a: 1-(2-苯甲酰基苯基)-6-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃半乳糖苷	y: 黄色
I4h: 5-溴-4-氯-1H-吡啶-3-基-β-D-吡喃葡萄糖苷	g: 绿色
IO: 10H-吡啶并[1,2-a]吡啶染色	b: 蓝色
IN: 靛蓝染色	
eS: 外部刺激	
b-gal: β-D-半乳糖苷酶	
b-glu: β-D-葡萄糖苷酶	
-: 不存在	
+/-: 弱 / 易变	
+: 强	

[0495] 表 IVe :在厌氧条件下细菌菌落的 IN 和 IO 染色

[0496]

营养琼脂平板(含各种 β -D-半乳糖苷酶指示剂, 用大肠杆菌厌氧温育)							
指示剂	类型/系统	C	I	L	D	S	G
I21a	IO	y	+	+	+/-	0.7 mm	+
I22a	IO	o - r	+	++	-	0.5 mm	+
I27a	IO	y - o	+	+	+/-	1 mm	+
I31a	IO	o - r	+	+/-	+	0.8 mm	+
I4a	IN	b	+/-	-	++	极小	+/-

[0497]

IN :靛蓝染色		I21a :1-(2- 苯甲酰基苯基)-6- 氯-1H- 吡啶-3- 基- β -D- 吡喃半乳糖苷
IO :10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶染色		I22a :1-(2- 苯甲酰基苯基)-5- 溴-4- 氯-1H- 吡啶-3- 基- β -D- 吡喃半乳糖苷
C :菌落颜色		I27a :6- 氯-1-[2-(2,4- 二甲氧基苯甲酰基) 苯基]-1H- 吡啶-3- 基- β -D- 吡喃半乳糖苷
I :颜色强度		I31a :6- 氯-1-[2-(N- 甲基吡咯-2- 羰基) 苯基]-1H- 吡啶-3- 基- β -D- 吡喃半乳糖苷
L :菌落的局域化		I4a :5- 溴-4- 氯-1H- 吡啶-3- 基- β -D- 吡喃半乳糖苷

[0498]

D :菌落周围分布		
S :菌落大小		
G :菌落生长		
- :不存在		y :黄色
+/- :弱 / 易变		r :红色
+:强		b :蓝色
++ :非常强		o :橙色

[0499] 表 IVf :细菌菌落在血琼脂平板上的 IO 染色

[0500]

在血琼脂(含 150 mg/l I21a 和 100 mg/l IPTG)上 24 小时后的肺炎克雷伯氏菌菌落			
指示剂	菌落颜色	菌落颜色	生长
	白色/可见	UV (366 nm)	
I21a	黄色	在深色背景上的黄-橙色	+
-	灰色	在深色背景前的非常弱的蓝色(几乎不可见)	+

[0501] IO :10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶

[0502] I21a :1-(2- 苯甲酰基苯基)-6- 氯-1H- 吡啶-3- 基- β -D- 吡喃半乳糖苷

[0503] - :不存在

[0504] + :强

[0505] 表 IVg :真菌菌落的 IO 染色

[0506]

含指示剂 I21g 的琼脂平板				
菌种	菌株	eS: 半乳糖胺酶	颜色	生长
白色念珠菌	304	+	黄色	+/-
克鲁斯氏念珠菌	305	-	乳色(cream)	+/-
酿酒酵母	306	-	乳色	+/-

[0507] IO :10H- 吡啶并 [1,2-a] 吡啶

[0508] I21g :1-(2- 苯甲酰基苯基)-6- 氯 -1H- 吡啶 -3- 基 -N- 乙酰基 - β -D- 氨基半乳糖苷

[0509] - :不存在

[0510] +/- :弱 / 易变

[0511] + :强

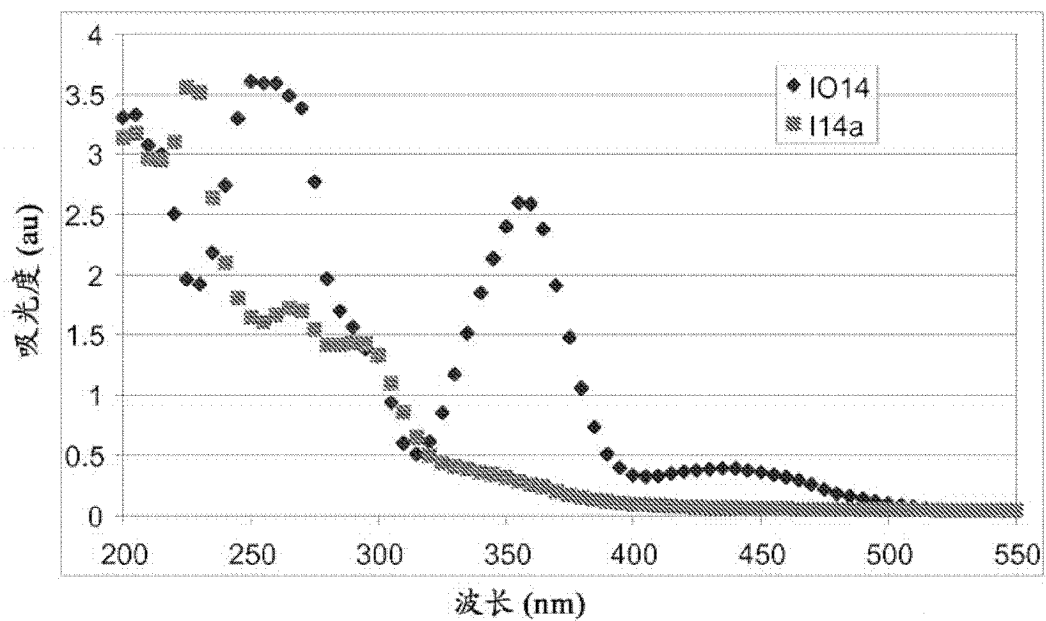


图 1a

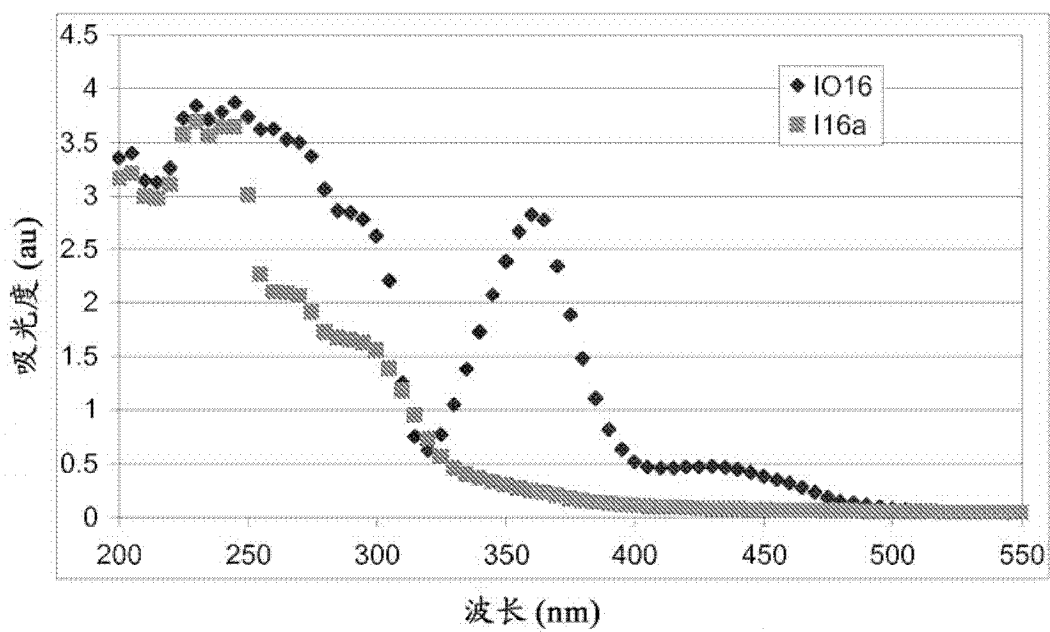


图 1b

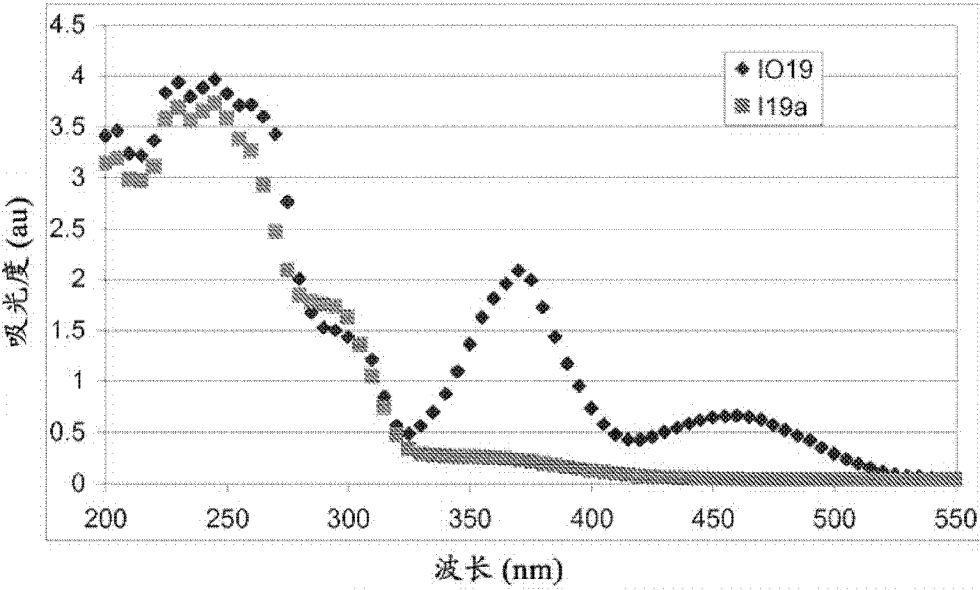


图 1c

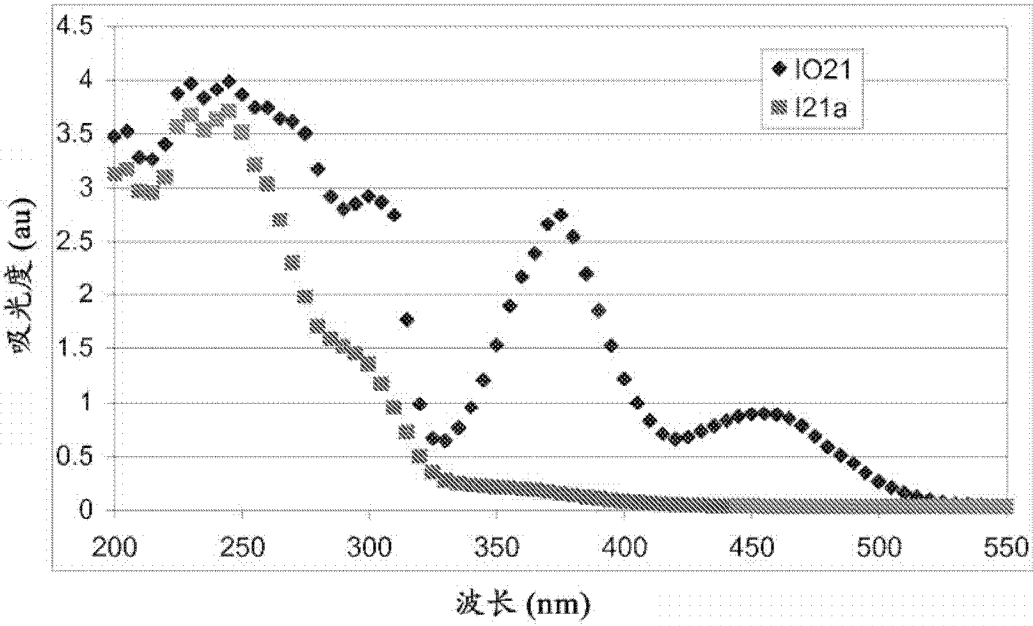


图 1d

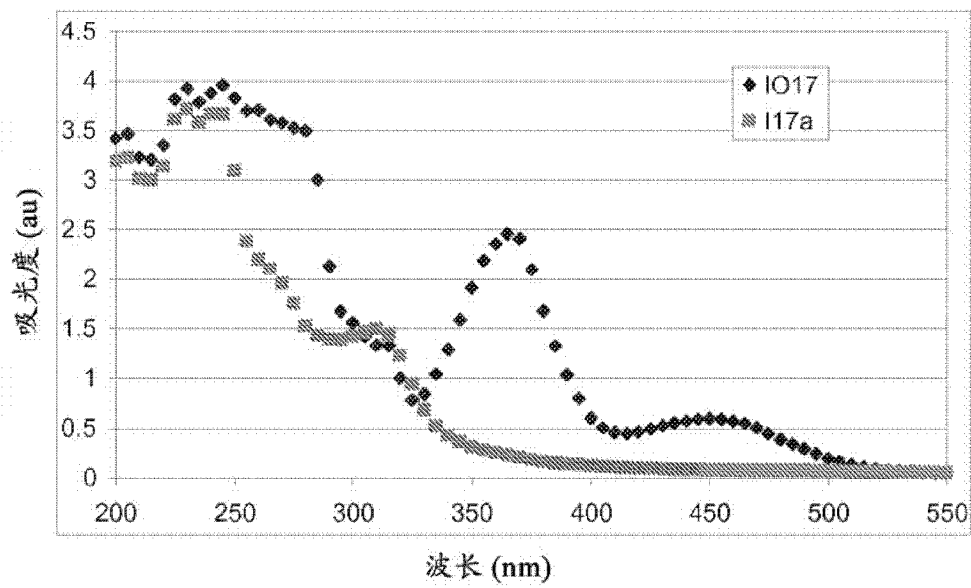


图 1e

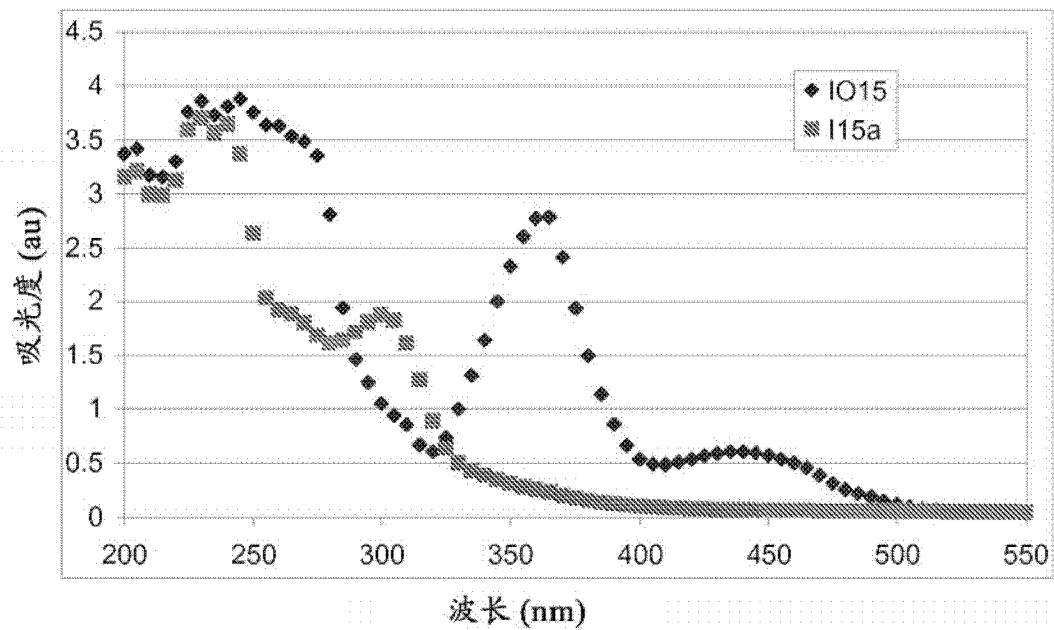


图 1f

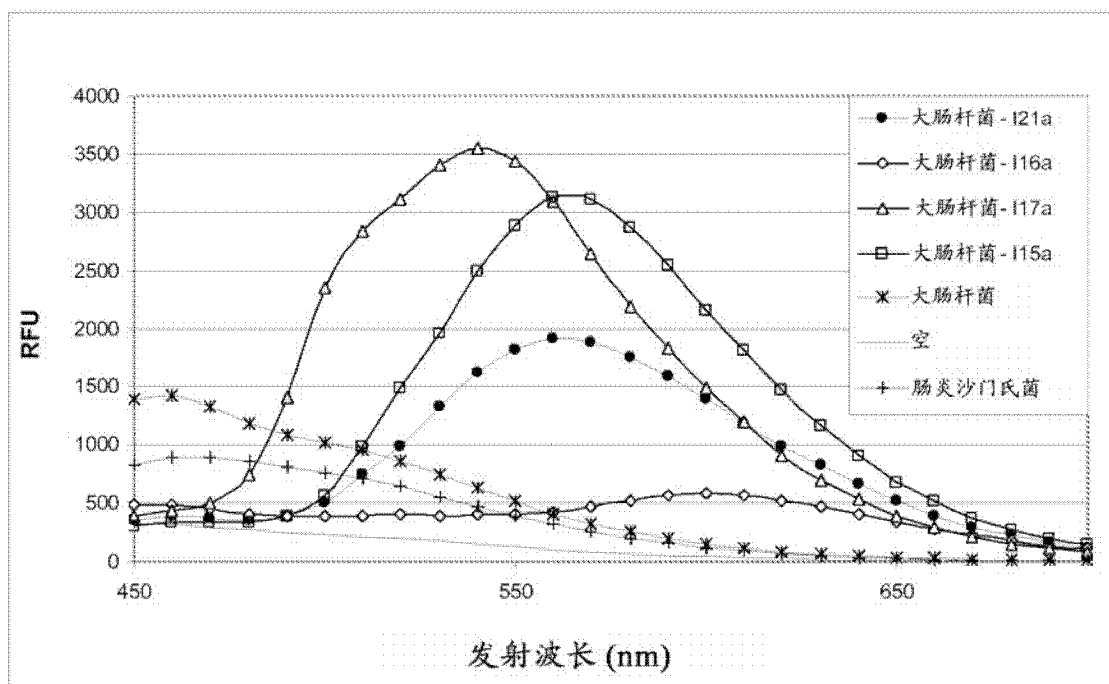


图 2

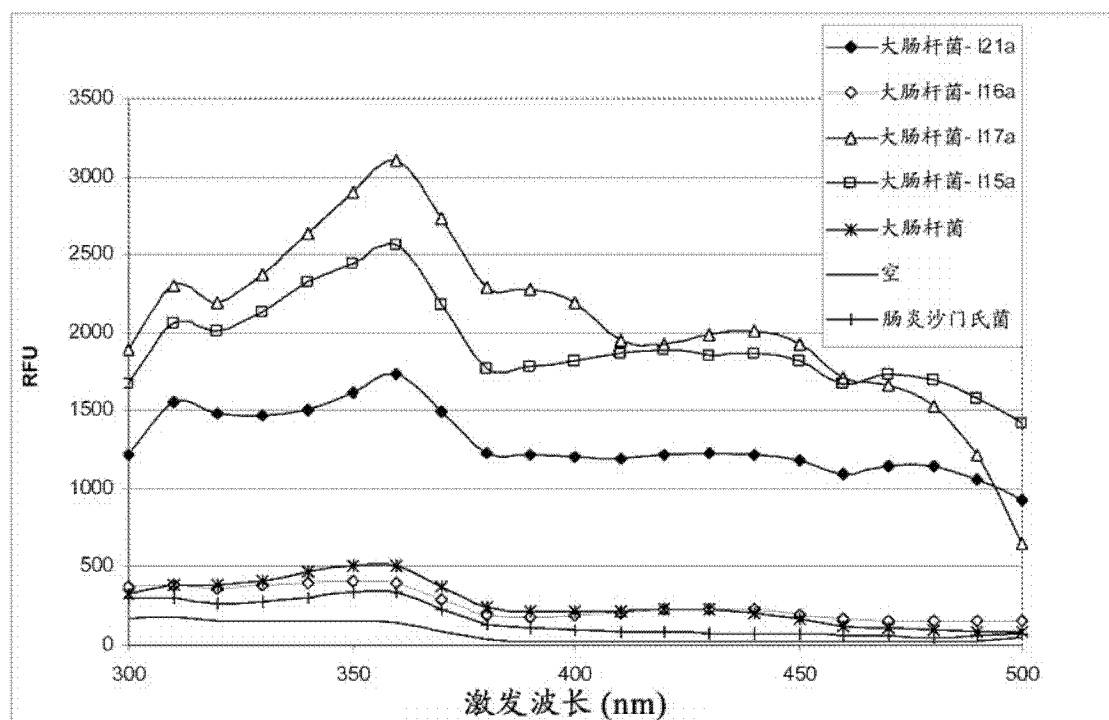


图 3