

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480013569.6

[51] Int. Cl.

C09B 67/00 (2006.01)

C09B 67/14 (2006.01)

C09B 67/18 (2006.01)

C09B 13/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月21日

[11] 公开号 CN 1791644A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/533 (2006.01)

[22] 申请日 2004.3.25

[21] 申请号 200480013569.6

[30] 优先权

[32] 2003.3.25 [33] AU [31] 2003901361

[86] 国际申请 PCT/AU2004/000370 2004.3.25

[87] 国际公布 WO2004/085546 英 2004.10.7

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.18

[71] 申请人 福罗若技术有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 詹姆斯·亚历山大·麦金托士

邓肯·亚当·维尔

彼得·海尔莫斯·克鲁索

丹尼尔·理查德·考夫兰 崔弘仑

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司
代理人 丁香兰

权利要求书 6 页 说明书 36 页 附图 26 页

[54] 发明名称

增强荧光的方法

[57] 摘要

本发明描述了增强荧光染料的荧光的方法和/或使荧光染料产生斯托克斯频移的方法，该方法包括使染料与碱和/或去污剂结合。该方法适合于使用荧光染料的化学技术和/或生物化学技术，尤其适合于诸如电泳等需要对有机分子进行染色或标记的技术。

1. 增强荧光染料的荧光的方法, 所述方法包括使该染料与碱和/或去污剂混合或接触。

5 2. 提高荧光染料的发射波长的方法, 所述方法包括使该染料与碱和/或去污剂混合或接触。

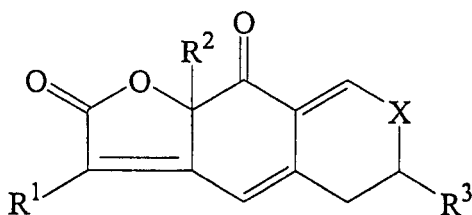
3. 改善荧光染料-有机分子络合物的稳定性的方法, 所述方法包括使该染料-有机分子络合物与酸接触。

10 4. 如权利要求3所述的方法, 其中, 所述的络合物进一步包含碱和/或去污剂。

5. 如权利要求3或4所述的方法, 其中, 所述的络合物包含在基质中或表面上。

6. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述的染料为通式(Ia)化合物, 并包括其异构体:

15



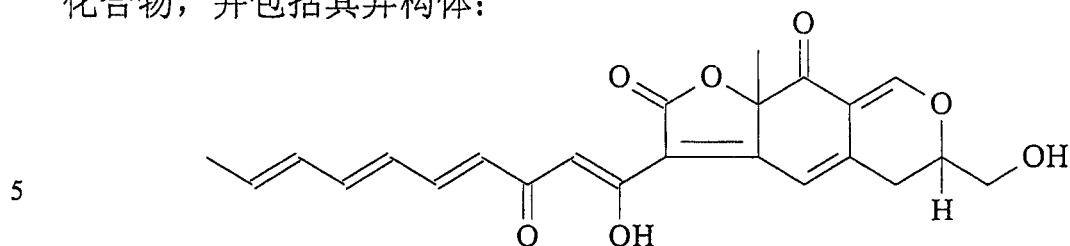
(Ia)

20 其中, X 是 O、NR⁴ 或 C; R¹ 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 共轭烯基, 所述烯基选择性地具有 1~6 个基团作为取代基, 所述取代基独立地选自羟基或氧代基团; R² 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基; R³ 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基, 所述烷基选择性地具有羟基作为取代基; R⁴ 是 N、O、直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基和/或芳基, 所述烷基和/或芳基选择性地具有一个或多个
25 以下基团作为取代基: 羟基、卤素、胺、羧基、与羧基有关的基团或杂芳基。

7. 如权利要求6所述的方法, 其中, R² 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基。

8. 如权利要求6或7所述的方法, 其中, R³ 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基, 所述烷基选择性地具有羟基作为取代基。

9. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述染料为通式 (Ib) 化合物, 并包括其异构体:



(Ib)。

10. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述荧光染料是本发明定义的氮啡罗荧光染料。

11. 如权利要求 6~10 中任一项所述的方法, 其中, 所述的异构体为互变异构体。

12. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述荧光染料是黑附球菌酮或含有黑附球菌酮的染料混合物或提取物。

15 13. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述碱为含氮碱。

14. 如权利要求 1~13 中任一项所述的方法, 其中, 所述碱选自氨、胺、金属氢氧化物、金属碳酸盐、金属碳酸氢盐或者它们的组合。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的方法, 其中, 所述的碱选自氨、伯胺、仲胺、叔胺、季铵或者它们的组合。

20 16. 如权利要求 13~15 中任一项所述的方法, 其中, 所述碱选自氨、 C_{1-20} 烷基胺、 C_{1-20} 烷基二胺、 C_{1-20} 胺和二胺, 例如甲胺、乙胺、丙胺、丁胺、乙胺、丙胺、丁胺、戊胺、己胺、庚胺、辛胺、壬胺、癸胺、十一胺、十二胺和它们的异构体; 烯丙胺、苯胺、苄胺、2-苯基乙胺、4-苯基丁胺、胍; 1,2-二氨基乙烷、1,3-二氨基丙烷、1,4-二氨基丁烷、1,5-
25 二氨基戊烷、1,6-二氨基己烷、1,7-二氨基庚烷、1,8-二氨基辛烷、1,9-二氨基壬烷、1,10-二氨基癸烷、1,12-二氨基十二烷和它们的异构体; 二甲胺、二乙胺、二丙胺、二丁胺、二戊胺、二己胺、二辛胺、二癸胺、*N*-甲基苯胺、*N*-乙基苯胺、*N*-丙基苯胺、*N*-丁基苯胺和它们的异构体; 三甲胺、三乙胺、三丙胺、三丁胺、三戊胺、三己胺、三辛胺、三癸胺、

三(十二烷基)胺和它们的异构体; 四甲基乙酸铵、四甲基溴化铵、四甲基碳酸铵、四甲基氯化铵、四甲基氟化铵、四甲基甲酸铵、四甲基硫酸氢铵、四甲基碘化铵、四甲基碘化铵、四甲基硝酸铵、四甲基硫酸铵、四乙基乙酸铵、四乙基溴化铵、四乙基氯化铵、四乙基氰化铵、四乙基氟化铵、四乙基氢氧化铵、四乙基碘化铵、四乙基硝酸铵、四丙基溴化铵、四丙基氢氧化铵、四丁基氢氧化铵、四丁基碘化铵、吡咯烷、哌啶、吡啶、咪唑、吡啶、吡啶、吡啶、吡啶、吡啶、三(羟甲基)氨基甲烷(“Tris”)或氨基十二烷基胺; 或者它们的组合。

17. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 其中, 所述碱提高了所述
10 荧光染料的荧光强度、信号背景比和/或灵敏性检测限度。

18. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法是使用荧光染料的化学或生物化学技术的一部分。

19. 如权利要求 18 所述的方法, 其中, 所述的化学或生物化学技术选自电泳、流式细胞术、pH 传感、蛋白-蛋白相互作用分析、荧光布拉德福测定、蛋白定量、抗体标记、配基标记、蛋白矩阵或蛋白芯片测定、
15 基因矩阵或基因芯片测定、DNA 或 RNA 测定/检测、荧光显微术或生物传感器。

20. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法是对蛋白、肽、核酸或核苷酸进行染色和/或标记的方法的一部分, 所述的方法包括在蛋白、肽、核酸或核苷酸与
20 所述荧光染料之间形成荧光络合物, 其中, 所述荧光络合物在碱存在时形成和/或在所述荧光络合物形成后用碱对其进行处理。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中, 所述的蛋白、肽、核酸或核苷酸包含在组织或细胞中。

22. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法是使蛋白、肽、核酸或核苷酸在基质上迁移并对其进行检测的方法的一部分。

23. 如权利要求 22 所述的方法, 该方法为在聚丙烯酰胺凝胶基质上进行的电泳。

24. 如权利要求 22 所述的方法, 该方法为在琼脂糖凝胶基质上进行

的电泳。

25. 如权利要求 23 或 24 所述的方法, 其中, 用去污剂对所述的蛋白、肽、核酸或核苷酸进行预处理以形成有机分子-去污剂络合物。

26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, 所述的去污剂选自阴离子去污剂、阳离子去污剂或两性离子去污剂。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其中, 所述的去污剂选自十二烷基硫酸钠 (SDS)、十二烷基硫酸锂 (LDS)、曲通、吐温、3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙烷硫酸盐、十六烷基三甲基溴化铵、十二烷基三甲溴化铵、十四烷基三甲溴化铵、十六烷基氯化吡啶鎓、胆酸和辛基-D-葡萄糖苷。

28. 如权利要求 22~27 中任一项所述的方法, 其中, 在电泳前用所述碱处理所述的凝胶基质、去污剂和/或所述的蛋白、肽、核酸或核苷酸。

29. 如权利要求 28 所述的方法, 其中, 所述的碱为脂肪胺。

30. 如权利要求 22~27 中任一项所述的方法, 其中, 在电泳后用所述碱处理所述的凝胶基质和/或所述的蛋白、肽、核酸或核苷酸。

31. 如权利要求 20~30 中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括用酸处理所述荧光络合物的步骤。

32. 如权利要求 31 所述的方法, 其中, 所述的酸处理使所述的络合物稳定化, 进一步提高所述荧光络合物的荧光强度和/或进一步提高所述荧光络合物的信号背景比。

33. 如权利要求 31 或 32 所述的方法, 其中, 所述的酸选自无机酸、有机酸或者它们的组合。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述的无机酸选自硫酸、盐酸、硝酸、磷酸、正磷酸。

35. 如权利要求 33 所述的方法, 其中, 所述的有机酸选自链烷酸、卤代链烷酸、抗坏血酸或三氟甲磺酸。

36. 如权利要求 35 所述的方法, 其中, 所述的链烷酸选自乙酸或丙酸, 所述的卤代链烷酸选自三氯乙酸、氯乙酸或三氟乙酸。

37. 如上述权利要求中任一项所述的方法, 所述方法进一步包括检测

所述荧光染料的荧光的步骤。

38. 如权利要求 37 所述的方法, 其中, 所述的检测通过透照法、光谱法、显微术或细胞计量术来进行。

39. 迁移和检测蛋白的方法, 所述方法包括以下步骤:

- 5 (a) 将蛋白的溶液施用至基质;
- (b) 使所述蛋白在所述基质上迁移;
- (c) 使迁移的蛋白与权利要求 6~12 中任一项所述的荧光染料之间形成荧光络合物; 和
- (d) 检测所形成的荧光络合物;

10 其中, 所述荧光络合物在碱存在下形成和/或在所述荧光络合物形成后用碱对其进行处理。

40. 如权利要求 39 所述的方法, 所述方法进一步包括在用所述碱进行处理之前或之后使所述的荧光络合物与去污剂相接触。

15 41. 如权利要求 40 所述的方法, 其中, 所述的去污剂是阴离子去污剂。

42. 如权利要求 39~41 中任一项所述的方法, 其中, 所述的基质为聚丙烯酰胺凝胶基质, 所述的方法是 PAGE 电泳或 SDS-PAGE 电泳。

43. 迁移和检测核酸的方法, 所述方法包括以下步骤:

- 20 (a) 将核酸的溶液施用至基质;
- (b) 使所述核酸在所述基质上迁移;
- (c) 使迁移的核酸与权利要求 6~12 中任一项所述的荧光染料之间形成荧光络合物; 和
- (d) 检测所形成的荧光络合物;

25 其中, 所述荧光络合物在碱存在时形成和/或在所述荧光络合物形成后用碱对其进行处理。

44. 如权利要求 43 所述的方法, 所述方法进一步包括在用所述碱进行处理之前或之后使所述的荧光络合物与去污剂相接触。

45. 如权利要求 44 所述的方法, 其中, 所述的去污剂是阳离子去污剂。

46. 如权利要求 43~45 中任一项所述的方法, 其中, 所述的基质为琼脂糖凝胶基质。

47. 荧光化合物, 该荧光化合物可通过将权利要求中 6~12 中任一项所述的荧光染料与权利要求 13~16 中任一项所述的碱组合而获得。

5 48. 权利要求 6~12 中任一项所述的荧光染料与碱组成的组合物。

49. 如权利要求 48 所述的组合物, 该组合物进一步包含权利要求 20 或 21 所述的蛋白、肽、核酸或核苷酸。

50. 如权利要求 48 所述的组合物, 其中, 所述的蛋白、肽、核酸或核苷酸采用与去污剂组成的络合物的形式存在。

增强荧光的方法

5 技术领域

本发明涉及增强荧光的方法，尤其是在用荧光染料染色或标记的诸如蛋白和核酸等有机分子中增强荧光的方法。

背景技术

10 在说明书全文中对现有技术进行的所有讨论决不应被认为是承认所述现有技术在本领域中是众所周知的或形成本领域中的一部分普通常识。

发荧光的化合物具有许多用途，并已知其特别适合于生物应用，在所述的生物应用中，荧光本质上比吸收更为灵敏，因为入射波长和观测
15 波长是不同的。可以将荧光用于对全细胞、细胞组分和细胞功能进行检测。例如，许多诊断和分析技术需要对样品进行荧光标记，以便能够对它们进行检测。所述检测可以通过使用与诸如细胞、组织、蛋白、抗体、酶、药物、激素、脂类、核苷酸、核酸、糖、或者天然的或合成的聚合物等各种物质相互作用而生成荧光结合物的荧光染料或者荧光探针来完成。
20 成。

对于合成荧光探针，通常使用配基以使其获得对所观测的生物化学反应的特异性；荧光染料则提供了检测或定量该相互作用的手段。该类应用还包括蛋白检测（例如在凝胶中、在表面上或在水溶液中）、细胞示踪、酶活性评测、核酸或其它生物聚合物的染色等。

25 长波长吸收通常增加了荧光探针的效用，因为它减少了来自细胞自身荧光的干扰，而且不容易造成带标记的生物分子的光破坏。尽管将激光作为荧光激发的集束光源特别有用，但是目前强大的激光的输出被限定于特定的光波长。因此，激发光谱与激光输出一致的化合物非常有用。氩激光是荧光激发最普遍的光源，其在 488 nm 具有主要输出，在 514 nm

具有较弱的输出。因此，被这些波长之一所激发的荧光化合物尤其有用。钕铝石榴石激光器 (YAG laser) (532 nm 或 473 nm) 和氦氖 (HeNe) (543 nm、633 nm) 也正在逐渐普及。

5 红色荧光化合物被广泛用于生物研究的许多领域。包括德克萨斯红 (Texas red)、四甲基罗丹明或红色发射 BODIPY 染料等的红色荧光化合物需要在诸如 542 nm 等绿色波长处激发。这限制了它们在许多应用中的用途，尤其是限制了它们在用氩离子激光器激发的那些应用中的用途。

10 诸如溴化乙啶等化合物可以被来自氩离子激光器的光所激发，但是此类化合物通常不适合用于除了核酸以外的其它有机分子的标记。诸如藻红蛋白等其它化合物可以用氩离子激光器 (488 nm) 进行激发，并在橙色波长 (大约 580 nm) 处发射。但是，藻红蛋白稳定性差，分子量大 (大约 240,000 Da)，使得它不适合用于诸如细胞示踪、核酸标记或蛋白染色等许多应用中。

15 对于蛋白染色，可使用很多方法。这些方法可以使用非荧光化合物或荧光化合物。最常用的方法利用了非荧光性的考马斯亮兰 (布拉德福测定 (Bradford assay))。基于荧光的蛋白检测方法使用荧光染料，该染料与蛋白形成络合物，该方法本质上要比非荧光方法更灵敏。蛋白荧光染色与传统的银染或考马斯亮兰染色相比具有很多优点。这些优点包括更高的灵敏性、更低的背景干扰和更宽的动力学范围。

20 对于诸如 DNA 和 RNA 等核酸的染色，由于成本效率和高灵敏性 (2 ng/ban 的双链 DNA) 方面的原因，溴化乙啶作为荧光染色剂已被广泛使用。因为溴化乙啶被认为是致癌的，所以其在研究者中的使用受到一定的限制。目前虽然存在其它荧光核酸染色剂可用于核酸定量和凝胶染色，但是这些染色剂在使用时还存在明显缺陷。

25 在本文中作为参考引入的 WO01/81351 记载了基于呋喃[3,2-g][2]苯并吡喃-2,9(9aH)二酮核的荧光染料化合物。

荧光染料在电泳领域尤其有用。电泳通过利用诸如 DNA、RNA 和/或蛋白等带电荷的生物分子在施加电场后的凝胶基质中的相对迁移率，可将这些带电荷的生物分子分离。各分子在电场中移动的距离取决于所

述分子的电荷、形状和重量。

最常用的分离蛋白的凝胶基质是聚丙烯酰胺（PAGE 电泳）。SDS-PAGE 是用阴离子去污剂十二烷基硫酸钠（SDS）处理蛋白随后再进行电泳的一项技术。SDS 使蛋白变性，并且使该蛋白被均一的负电荷所包被。这意味着分离完全基于分子量，因此 SDS-PAGE 通常被用于蛋白分子量的测定¹。

相反地，因为核酸的每一个核苷酸（分子量约为 500 道尔顿）具有单个负电荷，所以具有相当恒定的质量/电荷比。对于核酸这种情况，就不必用去污剂中和其电荷。

虽然在本领域中许多荧光染料是已知的，但是还需要提高信号强度、信号背景比和荧光染料的灵敏性。还需要提高在电泳凝胶基质上形成的荧光络合物的稳定性。

本发明的目的是克服或改进现有技术中的至少一个缺点，或提供有用的替代方案。

发明内容

本发明提供了增强荧光染料的荧光的方法，该方法产生提高的斯托克斯频移（Stokes' shift，即，进一步提高激发波长和发射波长之间的普通差异）并提高荧光染料/有机分子络合物的稳定性，从而提高溶液中或凝胶基质上的保存样品的荧光强度和/或荧光寿命。

除非上下文中另有明确要求，本说明书全文和权利要求书全文中的动词“包含”、“包括”等应解释为与排它性或穷尽性相反的开放性含义，也就是说，应解释为“包括但不限于”之义。

本文使用的术语“增强荧光”通常是指提高从荧光染料中发射的荧光。这种提高可以是在染料的正常发射波长处或在另一波长处的提高。所述提高可以由荧光强度的提高、信号背景比的提高或荧光染料的检测灵敏性限度的提高（即更高的灵敏性）而表现出来。

本文使用的术语“斯托克斯频移”是指从荧光染料的激发波长到发射波长中的频移这一公知现象。该频移是向更高波长的频移（即红移）。

本文使用的术语“氮啡罗(azaphilone)荧光染料”是指由聚酮化合物生物合成途径获得或可以由该合成途径获得的任何荧光染料。所述可以由多聚乙酰生物合成途径获得的染料的例子在 WO01/81351 中有记载，该文献通过参考方式引入本文中。

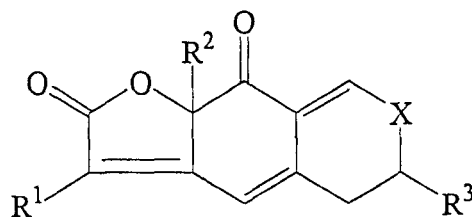
5 而且，除非在上下文中另有明确要求，术语“荧光染料”是指荧光染料化合物，以及当荧光染料化合物与诸如蛋白或核酸等有机分子结合或配位时所形成的荧光络合物或配合物。荧光络合物或配合物可以通过与有机分子非共价相互作用或共价相互作用而形成。

10 本发明人已发现碱(尤其是含氮碱)的存在导致特定的荧光染料(尤其是氮啡罗荧光染料)的正常发射波长由绿色荧光频移到红色荧光。这种斯托克斯频移是有利的，因为它将荧光染料的发射波长进一步从典型的氩离子激光器的激发波长(488 nm)进行了频移。斯托克斯频移长的荧光染料是重要的生物试剂，因为可以在尽可能减少来自激发光源的干扰的情况下检测该类荧光染料的荧光发射，并且由于激发范围和发射范围之间的重叠较小，所以不容易引起自猝灭。而且，因为自身荧光是由存在于许多生物样品中斯托克斯频移短的荧光团的存在引起的，所以斯托克斯频移长的染料不易受到自身荧光的干扰。已知具有长斯托克斯频移的荧光染料通常是高分子量分子，其渗透性和蛋白水解作用欠佳，因此严重限制了它们作为荧光标记物的应用。

20 更重要的是，在本发明中，所述的斯托克斯频移和/或斯托克斯频移的增加还可以伴随有信号强度的增强，信号强度的增强又会使信号背景比增大(即非特异性背景荧光的降低)和/或导致荧光染料的检测灵敏度提高。因此，碱的存在显著改进了已知的荧光技术，尤其是用于有机分子检测的荧光染色技术。

25 而且，在本发明中，已发现碱的选择可以影响斯托克斯频移提高的幅度。

优选地，所述荧光染料为通式(Ia)化合物或其异构体：



5

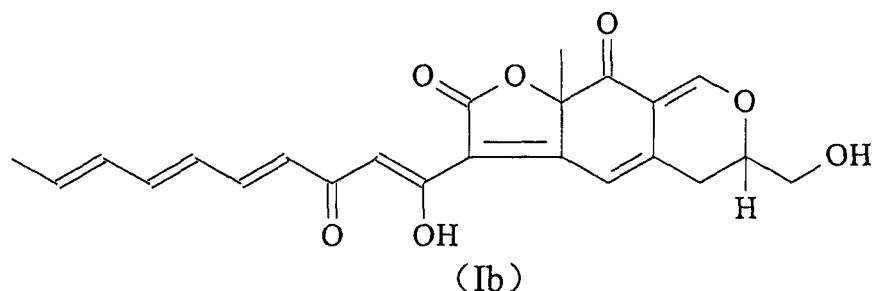
(Ia)

优选地，X 是 O、NR⁴ 或 C。优选地，R¹ 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 共轭烯基，所述烯基选择性地具有 1~6 个基团作为取代基，所述取代基独立地选自羟基或氧代基团。优选地，R² 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基。优选地，R³ 是直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基，所述烷基选择性地具有羟基作为取代基。R⁴ 是 N、O、直链或支链的 C₁₋₂₀ 的烷基和/或芳基，所述烷基和/或芳基选择性地具有一个或多个以下基团作为取代基：羟基、卤素、胺、羧基、与羧基有关的基团或杂芳基。

10

优选地，该染料为通式 (Ib) 化合物，并包括其异构体：

15



(Ib)

20

通式 (Ib) 化合物是 5,6-二氢-3-[(1z,4E,6E,8E)-1-羟基-3-氧代-1,4,6,8-十四碳烯基]-6-羟甲基-9a-甲基-2H-呋喃[3,2g][2]-苯并吡喃-2-9(9aH)-二酮。该化合物在下文中以其俗名表示，其俗名为“黑附球菌酮 (epicocconone)”。

25

在本发明的上下文中，式 (Ia) 和 (Ib) 化合物的异构体包括互变异构体和立体异构体等异构体。

黑附球菌酮和含有黑附球菌酮的染料的混合物和提取物是优选的。

在本发明中所使用的碱优选选自氨和各种胺。因此，优选的碱是含氮碱。本文中所使用的术语“胺”是指含有一个或多个氨基的任何化合物。因此，该术语包括一元胺、二元胺、三元胺等。该胺可以是伯胺、

仲胺、叔胺或季铵。而且，胺盐（例如 HCl 盐）包括在术语“胺”的含义之内。也可以使用金属碳酸盐和金属碳酸氢盐，或者它们的组合。

优选地，所述碱是氨、伯胺、仲胺、叔胺、季铵、或者它们的组合。在本发明中所使用的碱优选为氨或 C₁₋₂₀ 胺和二胺，例如甲胺、乙胺、丙胺、丁胺、乙胺、丙胺、丁胺、戊胺、己胺、庚胺、辛胺、壬胺、癸胺、十一胺、十二胺、及它们的异构体；烯丙胺、苯胺、苄胺、2-苯基乙胺、4-苯基丁胺、胍；1,2-二氨基乙烷、1,3-二氨基丙烷、1,4-二氨基丁烷、1,5-二氨基戊烷、1,6-二氨基己烷、1,7-二氨基庚烷、1,8-二氨基辛烷、1,9-二氨基壬烷、1,10-二氨基癸烷、1,12-二氨基十二烷、及它们的异构体；二甲胺、二乙胺、二丙胺、二丁胺、二戊胺、二己胺、二辛胺、二癸胺、N-甲基苯胺、N-乙基苯胺、N-丙基苯胺、N-丁基苯胺、及它们的异构体；三甲胺、三乙胺、三丙胺、三丁胺、三戊胺、三己胺、三辛胺、三癸胺、三（十二烷基）胺、及它们的异构体；四甲基乙酸铵、四甲基溴化铵、四甲基碳酸铵、四甲基氯化铵、四甲基氟化铵、四甲基甲酸铵、四甲基硫酸氢铵、四甲基碘化铵、四甲基碘化铵、四甲基硝酸铵、四甲基硫酸铵、四乙基乙酸铵、四乙基溴化铵、四乙基氯化铵、四乙基氰化铵、四乙基氟化铵、四乙基氢氧化铵、四乙基碘化铵、四乙基硝酸铵、四丙基溴化铵、四丙基氢氧化铵、四丁基氢氧化铵、四丁基碘化铵、吡咯烷、哌啶、吡啶、咪唑、吡啶、吡啶、咪唑、吡啶、咪唑、吡啶、咪唑、三(羟甲基)氨基甲烷（“Tris”）或氨基十二烷基胺。

优选地，金属碳酸盐和金属碳酸氢盐为诸如碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢钠等碱金属和碱土金属的盐。更优选地，金属碳酸盐为碳酸钠。

优选地，本发明方法是使用荧光染料的任意化学或生物化学技术的一部分。可以使用本发明的化学或生物化学技术的典型实例是电泳、流式细胞术、pH 传感、蛋白-蛋白相互作用分析、荧光蛋白定量、蛋白矩阵或蛋白芯片测定、基因矩阵或基因芯片测定、核酸测定/检测/定量、荧光显微术和荧光抗体染色等^{2-10,14-16}。相关出版物以参考的方式引入本文中。

在一个实施方案中，上述方法是染色和/或标记有机分子的方法的一部分，该方法包含使有机分子和荧光染料之间形成荧光络合物，其中该

荧光络合物在碱存在的条件下形成和/或在荧光络合物形成后用碱对其进行处理。

在另一个实施方案中，上述方法包含在碱和/或去污剂存在的条件下使有机分子和荧光染料之间形成荧光络合物和/或在荧光络合物形成后用碱和/或去污剂对该荧光络合物进行处理。

有机分子可以是需要用荧光染料染色或标记的任何分子。但是，有机分子通常为蛋白、肽、核苷酸或核酸（DNA 或 RNA 等），该有机分子可以包括在或不包括在另一个络合物分子之内，所述另一个络合物分子为例如酶、细胞受体、生长因子、抗体，或者为组织、器官或细胞的一部分。

可以在形成所述荧光络合物之前，将所述碱加入含有有机分子的溶液中。碱在该溶液中的终浓度优选为 0.001%~10%，更优选为 0.02%~5%。该百分比值根据所使用的碱为重量/体积(w/v)的量或体积/体积(v/v)的量。可选择地，碱的终浓度优选为 100 μ M~2 M，更优选为 1 mM~100 mM。

在另一个实施方案中，在所述的荧光络合物形成后，将所述碱加入到该荧光络合物中。在该实施方案中，所使用的碱的浓度与上述的那些浓度相似。

在一个方面，将本发明方法用作使基质上的有机分子迁移并对其进行检测的方法的一部分，所述方法例如在凝胶基质上进行电泳分离。如上所述，通常在聚丙烯酰胺凝胶基质上进行电泳，用以对蛋白进行分离和/或分子量测定。蛋白溶液通常被上样到该凝胶上，并且施加电场，使带负电荷的分子向阳极迁移。在 SDS-PAGE 电泳中，使该蛋白与诸如 SDS 等阴离子去污剂络合，以使该蛋白带有均一的负电荷。传统的 PAGE 电泳和 SDS-PAGE 电泳的方法包括在本发明的范围之内。

在本发明中，还考虑在电泳后可以用碱处理有机分子和/或凝胶基质。例如，可以在用荧光染料处理之前或之后，用碱洗涤电泳后的凝胶。优选用脂肪胺（C₄-C₂₀ 伯胺）或氨进行电泳后的洗涤，这是由于这些碱易于隔开包围着凝胶中的所分离的蛋白的 SDS 胶束。通常，将凝胶用适当浓

度的碱溶液洗涤 2×10 分钟，但是洗涤次数和洗涤时间取决于所使用的碱、凝胶板的尺寸、碱的浓度等。

在另一个实施方案中，对于所述的去污剂，不管是单独使用还是与碱结合使用，都可以在形成荧光络合物之前将所述的去污剂加入到含有有机分子的溶液中。当该有机分子是蛋白或肽时，通常可以使用该方法。5 在该溶液中，去污剂的终浓度优选为 0.001%~10%，更优选为 0.01%~1%。该百分比值根据所使用的去污剂为重量相对于体积之比的量或体积比的量。可选择地，去污剂的终浓度优选为 20 μM ~200 mM，更优选为 200 μM ~20 mM。

10 在另一个实施方案中，在所述的荧光络合物形成后，将所述去污剂加到该荧光络合物中（该络合物可以在碱存在下形成或在其形成后再与碱接触）。当所述的有机分子是核酸时，通常使用该方法，但是对于蛋白也可以使用。在该实施方案中，所使用的去污剂的浓度与上述的那些浓度相似。

15 类似于上述的用于蛋白的方法，可以将本发明方法用作使在溶液中或在凝胶基质上进行电泳分离后的核酸（例如，DNA 或 RNA 等）迁移并对其进行检测的方法的一部分。通常在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶基质上进行核酸电泳，并将核酸电泳用于核酸的分离、纯化和/或分子量测定。通常将核酸溶液上样到凝胶中，并施加电场，使得核酸向阳极迁移。该20 方法类似于上述的蛋白电泳技术。

如以上关于碱所描述的那样，可以在检测荧光络合物之前进行电泳的任何适当阶段加入本发明所使用的去污剂。例如，在使用蛋白的方法的情况中，可以将去污剂（优选为 SDS，但本文中还提供其它的例子）与蛋白在溶液中混合，然后将其上样到凝胶上。或者，在电泳后，在碱25 存在或不存在的情况下用去污剂洗涤凝胶基质。对于核酸的分离和分析，通常使用后一种技术。

在本发明的另一个方面，上述方法进一步包括用酸处理所述的荧光络合物。该进一步处理步骤尤其适合于在电泳凝胶上所形成的荧光络合物，但是也可以将其用于溶液中的络合物。

酸处理意外地稳定了所述的荧光络合物，进一步提高了荧光强度，防止荧光的损失或使其损失最小化和/或进一步提高该荧光络合物的信号背景比。所述的酸可以选自无机酸、有机酸，或者它们的组合。适宜的无机酸是硫酸、盐酸、硝酸、磷酸、正磷酸。适宜的有机酸是链烷酸（例如 C₁₋₂₀ 链烷酸）、卤代链烷酸（例如具有 1、2、3、4、5 或 6 个选自 F、Cl、Br 或 I 的基团的 C₁₋₂₀ 链烷酸）、抗坏血酸或三氟甲磺酸。优选地，所述的酸为硫酸、乙酸、丙酸、抗坏血酸、盐酸、正磷酸、三氟乙酸、三氯乙酸或氯乙酸。

所使用的酸的浓度通常为约 0.01%~20% (v/v)，优选为约 0.02%~10% (v/v)。或者，酸的浓度根据所使用的酸通常为约 0.1 mM~2 M，但是酸的浓度通常优选为约 10 mM。

在一个典型的酸处理步骤中，在成像前将电泳凝胶置于酸（例如 10 mM 的硫酸）中温浴约 10 分钟。

优选地，用本领域已知的任何标准技术检测本发明中形成的荧光络合物。通常，通过透照法、光谱法、显微术、扫描法、摄影术或细胞计量术来检测荧光络合物的荧光。

本发明还提供迁移和检测蛋白的方法，该方法包括以下步骤：

- (a) 将蛋白溶液施用至基质；
- (b) 使蛋白在基质上迁移；
- (c) 使迁移的蛋白与上述荧光染料之间形成荧光络合物；和
- (d) 检测所形成的荧光络合物；

其中，荧光络合物是在碱和/或去污剂存在的情况下形成的。

蛋白所用的去污剂优选为阴离子去污剂。

本发明的另一个实施方案涉及以上方法，其中，在该荧光络合物形成之后采用碱和/或去污剂对所述荧光络合物进行处理。

优选地，蛋白和肽所使用的基质是聚丙烯酰胺凝胶基质，并且该方法是 PAGE 电泳或 SDS-PAGE 电泳。

本发明进一步提供迁移和检测核酸的方法，该方法包括以下步骤：

- (a) 将核酸溶液施用至基质；

- (b) 使核酸在基质上迁移;
- (c) 使迁移的核酸与上述荧光染料之间形成荧光络合物; 和
- (d) 检测所形成的荧光络合物;

其中, 荧光络合物是在碱和/或去污剂存在的情况下形成的。

- 5 核酸所用的去污剂优选为阳离子去污剂。

本发明的另一个实施方案涉及以上方法, 其中, 在该荧光络合物形成之后采用碱和/或去污剂对所述荧光络合物进行处理。

优选地, 核酸所使用的基质是琼脂糖凝胶基质。

- 10 上述方法还可包括作为最终步骤的用酸处理基质的步骤。酸处理过的基质可保存一段时间而不会明显损失荧光强度。

本发明还提供一种荧光化合物或荧光络合物, 其可通过使上述荧光染料与上述碱和/或去污剂相结合而获得。

本发明还提供包含上述的荧光染料、上述的碱和/或去污剂的组合物。该组合物可以进一步包括诸如蛋白和/或核酸等有机分子。

- 15 本发明还提供含有上述荧光染料、上述碱和/或去污剂的试剂盒。该试剂盒可以进一步包括诸如蛋白和/或核酸等有机分子。

附图说明

- 20 图 1 显示在 390 nm 对混有下述物质的黑附球菌酮进行激发时的发射曲线: a) 100 mM 乙酸水溶液、b) 1mM 乙酸、c) 10 μ M 乙酸、d) 1 μ M 乙酸和 e) 不含有乙酸。

- 25 图 2: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 1 mM 的乙酸的 Deep Purple™ (深紫™): 300 nm~500 nm 激发/524 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 不含酸的同样浓度的 Deep Purple™: 300 nm~500 nm 激发/523 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 3: 将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较: a) 含 1 mM 的硫酸的黑附球菌酮: 300 nm~490 nm 激发/516 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 不含酸的同样浓度的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~

700 nm 发射。

图 4: 在 390 nm 对含有 a) 1.8% (w/v) 的 SDS 水溶液、b) 0.8% SDS、c) 0.4% SDS、d) 0.1% SDS、e) 0.1% SDS 的黑附球菌酮进行激发时的发射曲线。

5 图 5: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 0.3% (w/v) SDS 水溶液的 Deep Purple™: 300 nm~500 nm 激发/525 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射;c)不含 SDS 的同样浓度的 Deep Purple™: 300 nm~500 nm 激发/523 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

10 图 6: 将下述 a) 与 b) 和 c) 进行比较: a) 含 CTAB 的黑附球菌酮: 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; b) 不含 CTAB 的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射、c)390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

15 图 7: 将下述 a) 与 b) 和 c) 进行比较: a) 含 CPC 的黑附球菌酮: 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; b) 不含 CPC 的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射、c) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

20 图 8: 将下述 a) 与 b) 和 c) 进行比较: a) 含 CHAPS 的黑附球菌酮: 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; b) 不含 CHAPS 的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射、c)390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

25 图 9: 将下述 a)、b) 和 c) 与 d) 和 e) 进行比较: a) 含 Tween 80 (吐温 80) 的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/526 nm 发射、b) 440 nm 激发/470 nm~700 nm 发射、c) 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; d) 不含 Tween 80 的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射、e) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 10: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 Tween 20 (吐温 20) 的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/524 nm 发射、b) 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; c) 不含 Tween 20 的同样浓度的黑附球菌酮:

300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 11: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含辛基 *D*-葡糖苷的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/524 nm 发射、b) 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; c) 不含有辛基 *D*-葡糖苷的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射和 d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 12: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 Triton X-100 (曲通 X-100) 的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/526 nm 发射、b) 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; c) 不含 Triton X-100 的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射和 d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射进行比较。

图 13: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 SDS 和乙酸的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/525 nm 发射、b) 390 nm 激发/420 nm~700 nm 发射; c) 含 SDS 但不含酸的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/515 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 14: 将下述 a) 与 b)、c) 和 d) 进行比较: a) 含 CTAB 和乙酸的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射; b) 含 CTAB 但不含酸的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射、以及 c) 不含 CTAB 且不含酸的同样浓度的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/516 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 15: 下述物质的 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射: a) 含 1.625 mM DTAB 和 1 mM 乙酸的黑附球菌酮, b) 含 DTAB 但不含酸的黑附球菌酮、以及 c) 不含 DTAB 且不含酸的黑附球菌酮。

图 16: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 CHAPS 和乙酸的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/525 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 含 CHAPS 但不含酸的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/528 nm 发射、d) 不含 CHAPS 且不含酸的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 17: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含胆酸钠盐和乙酸的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/525 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 含胆酸钠盐但不含酸的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射、d) 不含胆酸钠盐且不含酸的黑附球菌酮: 390 nm 5 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 18: 下述物质的 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射: a) 含 0.3% SDS (w/v) 和 1 mM 乙酸的 Deep Purple™、b) 含 0.3% SDS (w/v) 的 Deep Purple™、c) 含 1 mM AcOH 的 Deep Purple™、d) Deep Purple™。

图 19: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 SDS 和氨的黑附球菌酮: 310 nm~500 nm 激发/605 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 含同样浓度 SDS 但不含氨的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/520 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 20: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 0.3% SDS 和 1 mM 氨的 Deep Purple™: 300 nm~500 nm 激发/605 nm 发射、b) 390 nm 15 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 含 0.3% SDS 但不含氨的同样浓度的 Deep Purple™: 300 nm~500 nm 激发/525 nm 发射、d) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 21: 将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较: a) 含 SDS 和乙胺的黑附球菌酮: 320 nm~550 nm 激发/610 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 不含 SDS 且不含乙胺的同样浓度的黑附球菌酮: 390 nm 20 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 22: 将下述 a) 与 b) 进行比较: a) 含 SDS 和丁胺的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; b) 不含 SDS 且不含丁胺的相同浓度的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 23: 将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较: a) 含 SDS 和辛胺的黑附球菌酮: 320 nm~550 nm 激发/600 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 不含 SDS 且不含丁胺的同样浓度的黑附球菌酮: 390 nm 25 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 24: 将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较: a) 含 SDS 和 TRIS 的黑附

球菌酮：320 nm~550 nm 激发/600 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射；c)不含 SDS 且不含 TRIS 的同样浓度的黑附球菌酮：390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 25：将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较：a) 含 SDS 和苄胺的黑附球菌酮：320 nm~550 nm 激发/600 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射；c) 不含 SDS 且不含苄胺的同样浓度的黑附球菌酮：390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 26：将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较：a) 含 SDS 和苯胺的黑附球菌酮：320 nm~550 nm 激发/620 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射；c) 不含 SDS 且不含苯胺的同样浓度的黑附球菌酮：390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 27：下述物质的 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射：a) 用 SDS、DNA 和 1,3-二氨基丙烷处理一天后的黑附球菌酮；b) 含有 SDS、DNA 和 1,3-二氨基丙烷的黑附球菌酮。

图 28：下述物质的 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射：a)含 CHAPS 和氨的黑附球菌酮；b)含 CHAPS 但不含氨的黑附球菌酮；c)不含 CHAPS 且不含氨的黑附球菌酮。

图 29：将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较：a) 含 SDS、乙酸和苄胺的黑附球菌酮：320 nm~600 nm 激发/621 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射；c) 含 SDS 和苄胺但不含酸的黑附球菌酮：390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 30：将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较：a) 含 SDS、乙酸和 TRIS 的黑附球菌酮：320 nm~550 nm 激发/605 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射；c) 含有 SDS 和 TRIS 但不含酸的黑附球菌酮：390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 31：将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较：a) 含 SDS、乙酸和乙胺的黑附球菌酮：320 nm~550 nm 激发/610 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射；c) 含有 SDS 和乙胺但不含酸的黑附球菌酮：390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 32: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 DTAB、乙酸和 DNA 的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/533 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 含有 DTAB 和乙酸但不含 DNA 的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射、d) 单独的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 33: 将下述 a) 和 b) 与 c) 和 d) 进行比较: a) 含 CHAPS、氨和氨基葡萄糖盐酸盐的黑附球菌酮: 320 nm~550 nm 激发/605 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 含有 CHAPS 和氨但不含氨基葡萄糖盐酸盐的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射、d) 单独的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 34: 将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较: a) 含 DTAB 和 BSA (牛血清清蛋白) 的黑附球菌酮: 320 nm~550 nm 激发/615 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 单独的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 35: 将下述 a) 和 b) 与 c) 进行比较: a) 在乙腈中的黑附球菌酮: 300 nm~500 nm 激发/532 nm 发射、b) 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射; c) 在水中的相同浓度的黑附球菌酮: 390 nm 激发/ 420 nm~700 nm 发射。

图 36 显示由基于激光的 Typhoon 成像仪 (532 nm 激光, 610 BP 30 发射滤波器) 记录的微量滴定板的图像。

图 37: A) 原始荧光数据对 12 ng/mL~100 μ g/mL 范围的每 mL 的 BSA 浓度作图。在该范围内的 r^2 值为 0.985。B) 原始荧光数据的对数值 \log_{10} 对 781 ng/mL~800 μ g/mL 范围的每 mL 的 BSA 浓度的对数值 \log_{10} 作图。在该范围的 r^2 值为 0.997。

图 38: A~G: 用水和不同的碱对经染色的凝胶进行处理后, 所述经染色的凝胶和它们相应的强度曲线。

图 39: A 和 B: 用 Deep Purple™ 染色并用 8 mM 氨处理后的凝胶胶块。将胶块 1 (A) 于 8 mM 的氨中避光保存 46 小时。将完全相同的凝胶胶块 2 (B) 用 8 mM 的氨洗涤 3 次, 每次 10 分钟, 并转移到 100 mM

的正磷酸中也避光保存 46 小时。

图 40: A~D: 用氨处理后立即成像的凝胶 (A) 和在 10 mM 硫酸中保存 2 小时 (B)、21 小时 (C) 和 93 小时 (D) 后成像的凝胶。E~H: 在将凝胶放入 10 mM 硫酸中之前 (E, 时间 0) 和加 10 mM 硫酸之后 2 小时 (F)、21 小时 (G) 和 93 小时 (H) 凝胶的泳道 3 的信号强度曲线。

图 41: A~C: 用氨处理后立即成像的凝胶 (A) 和保存在 10 mM 的乙酸中 46 小时 (B) 和 167 小时 (C) 后成像的凝胶。

图 42: 显示 DNA 凝胶胶条 (1: 不用去污剂处理, 只用黑附球菌酮染色; 2: SDS 温浴和黑附球菌酮染色; 3: DDTAB 温浴和黑附球菌酮染色; 4: SDS 和 DDTAB 温浴并用黑附球菌酮染色) 的台风(Typhoon)扫描图像。

图 43: 红色发射光、532 nm 激光、560 LP 滤波器的台风(Typhoon)图像。加染色剂后, 加入按上述程序配制的 Deep Purple™, 然后向孔中加入 10 mM 的氨溶液。

图 44: A) 以来自图 43 的信号作为原始数据所作的图。B) 以 \log_{10} 转换数据所作的图。

图 45: 绿色发射光、532 nm 激光、526 SP 滤波器的台风图像。加染色剂后, 加入按上述程序配制的 Deep Purple™, 然后向孔中加入 10 mM 的乙酸溶液。

图 46: A) 以来自图 45 的信号作为原始数据所作的图。B) 以相同数据经 \log_{10} 转换后所作的图。

图 47: 显示 DNA 凝胶(A 和 C, DNA MWM XVII; B, SPP-1 DNA/*Eco*RI) 胶条的台风扫描图。图 47-A, 将 DNA 凝胶胶条在 TATAB (1, 0.001 mM; 2, 0.01 mM, 0.1 mM 和 1 mM) 中预温浴然后用黑附球菌酮染色; 图 47-B, DNA 凝胶胶条在 CTAB (1, 0.001 mM; 2, 0.01 mM, 0.1 mM 和 1 mM) 中预温浴然后用黑附球菌酮染色; 图 47-C, 将 DNA 凝胶胶条在 CPC (1, 0.001 mM; 2, 0.01 mM, 0.1 mM 和 1 mM) 中预温浴然后用黑附球菌酮染色。

下面通过下述非限制性实施例来描述本发明。

实施例

实施例 1 碱、酸和去污剂对黑附球菌酮的荧光的影响

为了证明当黑附球菌酮与胺共存时斯托克斯频移的增强和提高，对黑附球菌酮与各种胺、酸和去污剂的溶液的荧光进行测定。发现胺和去污剂的组合增强了荧光，并导致斯托克斯频移的提高。诸如 NaHCO_3 等无机碱导致荧光的损失，而且去污剂的加入没有使该荧光恢复。

使用 Perkin Elmer LS 50B 荧光光谱仪（Perkin Elmer，澳大利亚墨尔本）进行荧光光谱测定。将新制备的溶液放入 Hellma Quartz SUPRASIL 精密杯（precision cell）中，然后将该精密杯放入所述的光谱仪中。溶液的体积通常为 3mL，用 Gilson M-1000 Microman 容积式移液管（positive displacement pipette）添加各成分。对于每个样品给出成分及其终浓度。除非另有说明，所用溶液都是水溶液（Millipore，RiOS 5）。

定义和来源

Deep Purple™（Amersham Biosciences，澳大利亚，货号为 RPN6305 或 RPN6306）是黑附球菌酮的部分纯化形式，其在 550 nm 具有 0.8 的吸光度。通过用水将甲醇原液稀释（稀释系数为 12.5），制备水性的原液。将石英杯中的最终溶液进一步稀释，其稀释系数为 4。该 Deep Purple™ 原液在甲醇中的总稀释度为 1:50（来自 Amersham 的甲醇中的 Deep Purple™）。

按照 Bell P.J.L. 和 Karuso P.¹³ 记载的方法分离黑附球菌酮，所述文献通过参考的方式引入本文中。在 DMSO（二甲亚砜）（28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，在二甲亚砜中）中制备黑附球菌酮原液，并将所述的 DMSO 溶液分别以稀释系数 5 或 10 进行稀释而用于制备水性的原液。将石英杯中的最终溶液进一步稀释，其稀释系数为 4。黑附球菌酮的终浓度记录在各实施例中。

乙酸：（APS，Asia Pacifici Specialty Chemicals Ltd，formerly Ajax：1-2.5L GL）

乙腈：（Ajax Finechem-2315-2.5L GL）

氨溶液：（Ajax Finechem-43-2.5L GL）

苯胺：（Aldrich-13,293-4）

- 苜胺: (BDH-27355)
- BSA—牛血清清蛋白: (Sigma-A-2153)
- 丁胺: (Aldrich-47,130-5)
- CHAPS — 3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙烷硫酸盐
5 (BDH-30632)
- 胆酸钠盐: (Sigma-C-1254)
- CPC—十六烷基氯化吡啶鎓 (Ajax-UL 0000145)
- CTAB—十六烷基三甲基溴化铵 (Sigma-H-5882)
- 1,3-二氨基丙烷: (Koch-Light Laboratories-4774)
- 10 DMSO—二甲亚砷: (Aldrich-27,043-1)
- DNA—来自鲑鱼精巢的脱氧核糖核酸钠盐: (Sigma-D-1626)
- DTAB—十二烷基三甲溴化铵: (Sigma-D-8638)
- TDTAB—十四烷基三甲溴化铵: (Sigma-T-4762)
- 乙胺: (Lancaster-10838)
- 15 *D*-(+)-氨基葡萄糖盐酸盐: (Sigma-G-4875)
- H₂SO₄—硫酸: (Ajax Finechem-534)
- 辛胺: (Lancster-8.06917.0250)
- 辛基 *D*-葡糖苷: (ICN Biomedicals-153941)
- SDS—十二烷基硫酸钠: (BDH-301754)
- 20 TRIS (HCl) —三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐: (Sigma-T-3253)
- Triton[®] X-100: (BDH-30632)
- Tween 20—聚氧乙烯脱水山梨糖醇单月桂酸酯: (Sigma-P-1379)
- Tween 80—聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯: (BDH-56023)
- 除了 SDS 外,去污剂的浓度为高于它们各自的 CMC(临界胶束浓度)
- 25 值。
- 所使用的去污剂的原液浓度:
- CHAPS: 0.27%w/v(重量体积百分比)
- 胆酸钠盐: 1.7%w/v (40 mM)
- CPC: 0.148%w/v (4.1 mM)

CTAB: 0.172%w/v (4.7 mM)

DTAB: 0.2%w/v (6.5 mM)

辛基 *D*-葡萄糖苷: 3.1%w/v (106 mM)

SDS: 1.2%w/v (41.7 mM)

5 Triton[®] X-100: 0.27%w/v (4.35 mM)

Tween 20: 0.56%w/v

Tween 80: 0.64%w/v

按 1:4 将去污剂稀释在最终溶液中。

(i) 酸对黑附球菌酮和 Deep Purple[™] 的荧光的增强

10 可以通过添加乙酸增强水中的黑附球菌酮的荧光 (见图 1)。使用固定浓度 (1.05 $\mu\text{g/mL}$; 2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液, 在乙酸的终浓度范围 100 nM~100 mM 记录荧光光谱。

图 2 显示, 通过添加乙酸也可以增强水中 Deep Purple[™] 的荧光。

还可以通过添加诸如硫酸等其它酸, 增强水中黑附球菌酮的荧光。

15 在图 3 中显示的荧光光谱是固定浓度的黑附球菌酮水溶液 (1.05 $\mu\text{g/mL}$; 2.56×10^{-6} M) (H_2SO_4 的终浓度为 1 mM) 的荧光光谱。

(ii) 去污剂对黑附球菌酮和 Deep Purple 的荧光的增强

20 可以通过添加 SDS (阴离子去污剂) 增强水中的黑附球菌酮的荧光。随着 SDS 浓度的增加, 观察到的荧光 (在 390 nm 激发, 在 525 nm 最大发射) 增强。

使用固定浓度 (1.05 $\mu\text{g/mL}$; 2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液, 在 SDS 的终浓度范围 0.1%~1.8% (w/v) 记录荧光光谱。图 4 中的荧光光谱显示, 荧光随着 SDS 浓度的增加而增强。

通过添加 SDS 也可以增强水中的 Deep Purple 的荧光 (见图 5)。

25 可以通过添加诸如 CTAB (阳离子去污剂) 等其它去污剂, 增强水中的黑附球菌酮的荧光, 并伴随斯托克斯频移的增加。若向黑附球菌酮溶液中添加 CTAB, 则其在 625 nm 的荧光高于单独的黑附球菌酮在 625 nm 时的荧光。当添加 CTAB 时, 其在 525 nm 的荧光则下降。图 6 所示的荧光光谱是在由浓度为 1.05 $\mu\text{g/mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液

(CTAB 的终浓度为 1.175 mM)所产生的。

使用 CTAB 时所观察到的效果在其它诸如 CPC 等去污剂中也可以观察到。可以通过添加诸如 CPC (阳离子去污剂) 来增强水中的黑附球菌酮的荧光, 并且伴随有斯托克斯频移。与单独的黑附球菌酮在 630 nm 处的荧光相比, 若向黑附球菌酮溶液中添加 CPC, 其在 630 nm 的荧光有所增强。添加 CPC 时其在 520 nm 的荧光将减弱。图 7 所示的荧光光谱是浓度为 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液(其中含有终浓度为 1.025 mM 的 CPC)所产生的。

也可以通过添加 CHAPS (两性离子去污剂) 来增强水中的黑附球菌酮的荧光。图 8 所示的荧光光谱是浓度为 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液(其中含有终浓度为 0.0675% (w/v) 的 CPC)所产生的。

还可以通过添加多种不同的非离子去污剂 (见下文列出的去污剂的列表) 来增强水中的黑附球菌酮的荧光。图 12~图 15 所示的荧光光谱是浓度为 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液所产生的。

15 Tween 80: (终浓度为 0.16% w/v) —图 9

Tween 20: (终浓度为 0.14% w/v) —图 10

辛基-D-葡萄糖苷: (终浓度为 0.775% w/v) —图 11

Triton X-100: (终浓度为 0.0675% w/v) —图 12

(iii) 去污剂和酸对黑附球菌酮和 Deep Purple™ 的荧光的增强

20 还可以通过添加酸和多种不同的去污剂 (见下文列出的去污剂的列表) 来增强水中的黑附球菌酮的荧光。图 14~图 17 所示的荧光光谱是浓度为 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3.4×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液(其中含有终浓度为 1 mM 的乙酸)所产生的。

SDS (阴离子去污剂—终浓度为 0.03% w/v) —图 13

25 CTAB (阳离子去污剂—终浓度为 1.175 mM) —图 14

DTAB (阳离子去污剂—终浓度为 1.625 mM) —图 15

CHAPS (两性离子去污剂—终浓度为 0.0675% w/v) —图 16

胆酸钠盐 (阴离子去污剂—终浓度为 10 mM) —图 17

通过添加乙酸和 SDS 的组合也可以增强水中 Deep Purple™ 的荧光

(见图 18)。

(iv) 在碱和去污剂存在时黑附球菌酮和 Deep Purple™ 的斯托克斯频移的变化

氨减弱了黑附球菌酮的荧光。可以通过添加 SDS 增强该混合物的荧光强度。通常该荧光与单独的黑附球菌酮的荧光强度大致相同，但是其发射波长频移到较长的波长（增加了斯托克斯频移）。由于单独的黑附球菌酮通常在较长波长的发射较弱，因此也可以认为其在较长波长的发射得到了增强。

对于含 SDS 的黑附球菌酮水溶液，在氨存在的条件下，其荧光的发射伴随有较长的斯托克斯频移。当该混合物在 390 nm 被激发时，其在 605 nm 具有最大发射。图 19 所示的荧光光谱是浓度为 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3.4×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液（其中含有终浓度为 0.3% (w/v) 的 SDS 且含有终浓度为 1 mM 的氨）所产生的。

对于含 SDS 的 Deep Purple™ 水溶液，在氨存在的条件下，其荧光的发射也伴随有较长的斯托克斯频移。当该混合物在 390 nm 被激发时，其在 605 nm 具有最大发射（见图 20）。

当在 390 nm 被激发时，黑附球菌酮的斯托克斯频移也可以通过添加诸如乙胺、丁胺、辛胺、TRIS、苜胺和苯胺等碱而得到提高。图 21~图 26 所示的荧光光谱是浓度为 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液（其中含有终浓度为 0.3% (w/v) 的 SDS）所产生的。以下是所使用的碱的终浓度：

乙胺—1mM 水溶液（图 21）

丁胺—10 mM 水溶液（图 22）

正辛胺—10 mM 水溶液（图 23）

25 TRIS—100 mM 水溶液（图 24）

苜胺—10 mM 水溶液（图 25）

苯胺—10 mM 水溶液（图 26）

在这一系列的实验中，苯胺获得最大的斯托克斯频移 ($\lambda_{\text{cm}}=620$ nm)。

当在 390 nm 被激发时，黑附球菌酮的斯托克斯频移可以通过添加

1,3-二氨基丙烷而得到提高。图 27 所示的荧光光谱是使用浓度为 1.05 $\mu\text{g/mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮、0.3% 的 SDS、DNA (1 mg/mL) 和 1 mM 的 1,3-二氨基丙烷的混合溶液而记录得到的荧光光谱。当将样品在 4°C 放置 1 天后再进行试验, 其发射得到进一步增强 (见图 27)。

5 当添加氨时, 含有 CHAPS (两性去污剂) 的黑附球菌酮水溶液的荧光以更长的斯托克斯频移发射。若向黑附球菌酮/CHAPS 溶液中添加氨, 则其在 630 nm 的荧光强于单独的黑附球菌酮在 630 nm 时的荧光。图 28 所示的荧光光谱是浓度为 1.05 $\mu\text{g/mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮水溶液 (其中含有终浓度为 0.0675% (w/v) 的 CHAPS) 所产生的。

10 当在 390 nm 被激发时, 黑附球菌酮/去污剂的混合物的斯托克斯频移可以通过添加碱而得到提高, 并且在含乙酸时得到增强。图 32~图 34 所示的荧光光谱是浓度为 1.05 $\mu\text{g/mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮 (其中含有终浓度为 0.3% (w/v) 的 SDS 和终浓度为 1 mM 的乙酸) 所产生的。以下是所使用的规定终浓度的碱。

15 苯胺—10 mM 水溶液 (图 29)

TRIS—100 mM 水溶液 (图 30)

乙胺—1mM 水溶液 (图 31)

在各种情况中, 通过添加乙酸可在斯托克斯频移升高的同时进一步增强荧光。

20 (v) 其它的荧光增强和/或斯托克斯频移的变化

当在 390 nm 被激发时, 含有黑附球菌酮、乙酸和 DTAB 的水溶液的发射在 DNA 存在时得到增强, 同时斯托克斯频移从 520 nm 变为 540 nm。图 32 所示的荧光光谱是使用含有浓度为 1.05 $\mu\text{g/mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮、1.625 mM 的 DTAB、1 mM 的乙酸和作为代表性核酸的 DNA
25 (1 mg/mL) 的水溶液所记录得到的。这表明在 DNA 等核酸的检测和/或分析中可以使用黑附球菌酮与去污剂和/或酸的组合。

当在 390 nm 被激发时, 含有黑附球菌酮、CHAPS 和氨的水溶液的发射在氨基葡萄糖盐酸盐存在时得到增强, 发射增强的同时斯托克斯频移也增大。图 33 所示的荧光光谱是使用含有浓度为 1.05 $\mu\text{g/mL}$ ($2.56 \times$

10^{-6} M) 的黑附球菌酮、0.0675% 的 CHAPS、1 mM 的氨和氨基葡萄糖盐酸盐 (13.25 mM) 的水溶液所记录得到的。

当在 390 nm 被激发时, 含有黑附球菌酮和 DTAB 的水溶液的发射在蛋白存在时得到增强, 该发射增强的同时斯托克斯频移也增大。图 34 所示的荧光光谱是使用含有浓度为 $1.05 \mu\text{g/mL}$ (2.56×10^{-6} M) 的黑附球菌酮、1.625 mM 的 DTAB 和 BSA (1 mg/mL) 的水溶液所记录得到的。

由黑附球菌酮的 DMSO 原液来制备黑附球菌酮 ($1.05 \mu\text{g/mL}$; 2.56×10^{-6} M) 的乙腈溶液。黑附球菌酮在有机溶剂中的荧光强于在水中的荧光 ($\lambda_{\text{cm}}=520 \text{ nm}$) (见图 35)。

10 在 390 nm 被激发的样品的发射波长的总结

黑附球菌酮和 SDS ($\lambda_{\text{cm}}=525 \text{ nm}$) 含有:

| | 胺 | $\lambda_{\text{cm}}=$ (nm) |
|----|-----------|-----------------------------|
| a) | 十二胺 | 584 |
| b) | 苜胺 | 600 |
| c) | 丁胺 | 600 |
| d) | 1,6-二氨基己烷 | 600/447 |
| e) | 辛胺 | 600 |
| f) | TRIS | 600 |
| g) | 氨 | 605 |
| h) | 乙胺 | 610 |
| i) | 苯胺 | 620 |

用其它碱的初步结果的总结

| | |
|-----------|--------------|
| 二乙胺 (仲胺) | 红移 |
| 三乙胺 (叔胺) | 红移 |
| 胍 | 在绿色波长和红色波长发射 |
| 1,6-二氨基己烷 | 红移 |
| 苯胺 | 红移 |

15

试剂添加顺序可以影响黑附球菌酮水溶液的荧光增强的程度。最佳的条件和各步骤的顺序受到所使用的分析技术或定量技术的控制, 可以

容易地通过简单的试验确定所述最佳的条件和顺序，以适合于任何的所述技术。

实施例 2 用增强荧光的组合测定蛋白浓度

成分

- 5 A 部分：用 80% (v/v; 体积百分比) 二甲亚砷和 20% (v/v) 的乙腈配制 Deep Purple™，其在 550 nm 的吸光度=0.30。

B 部分：按下表 1 中所示制备 10×溶液

| 试剂 | 浓度 |
|--------------------|---------|
| SDS | 3% w/v |
| NaHCO ₃ | 200 mM |
| 乙腈 | 25% v/v |
| 水 | 75% v/v |

- 10 通过混合 8 份的水以及 A 部分和 B 部分的成分各 1 份来制备试剂盒的 1×工作液。

程序

- 制备牛血清清蛋白的两倍稀释系列的蛋白标准物水溶液，其浓度范围为 10 ng/mL~100 μg/mL。用移液管将标准蛋白的等分试样 (50 μL) 一式两份移取到微量滴定板的板孔中。加入 50 μL 的等分水作为无蛋白的对照物。向各板孔中加入等体积 (50 μL) 的 1×工作液。
- 15

然后在测定前至少放置 5 分钟以发出荧光。在记录荧光前，制备蛋白标准物和实验样品并温浴相同的时间。

- 对于激光式成像系统，使用具有 610 BP 30 nm 或类似的发射滤波的 532 nm 激光激发。对于诸如 BMG Fluostar (BMG Labtech, Mornington, VIC, 澳大利亚) 的板式(plate-based)荧光测定系统，推荐使用 540 nm 激发滤波和 630-12 nm 发射滤波或类似的发射滤波。
- 20

实例

- 将 Sigma 牛血清清蛋白 (Castle Hill, NSW, 澳大利亚, 货号为 A3059) 悬浮在水中，其浓度为 800 μg/mL，并经两倍稀释法将其稀释至终浓度为
- 25

0.76 ng/mL。将 50 μ L 等分试样从板孔中倒出，一式 3 份地放入 Greiner (Interpath Services, 西海德尔堡, VIC) 96 孔板 (货号为 655096) 中。图 36 显示了台风激光式成像仪 (532 nm 激光, 610 BP 30 发射滤波器) 记录的微量滴定板的图像。图 37A 和图 37B 显示了荧光数据对 12 5 ng/mL~100 μ g/mL 范围的每 mL 的 BSA 浓度所作的图。

凝胶染色

原料和方法

制备 Invitrogen Bis-Tris 10 孔 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 按照生产商的说明书 (NuPAGE 技术指南, D 版本, 2002 年 8 月 26 日, *IM-1001*) 进行 10 电泳。制备 Amersham Biosciences (Castle Hill, NSW, 澳大利亚) SDS 低分子量蛋白标记物, 并用含有 50 mM 二硫苏糖醇 (Bio-Rad, Regents Park, NSW, 澳大利亚) 的 Invitrogen LDS 样品缓冲液 (Mt Waverly, VIC, 澳大利亚, 货号为 NP0007) 进行两倍稀释。在 70 $^{\circ}$ C 加热样品 10 分钟。用 1 \times MES (Sigma, Castle Hill, NSW, 澳大利亚, 货号为 M2933) 缓 15 冲液分离凝胶。将 Invitrogen 抗氧化剂 (货号为 NP0005; 500 μ L) 加到 Invitrogen X-cell Sure-Lock Mini Cell 的阴极室, 以 200 V 的恒定电压进行凝胶电泳, 直到示踪染料到达该凝胶的底部。

将凝胶在 100 mL 7.5% 的乙酸 (v/v) 中固定 1 小时, 然后用等体积的双蒸 (dd) 水洗涤凝胶 30 分钟, 共两次。

20 然后将凝胶转移到新鲜双蒸水和 250 μ L Deep PurpleTM (Amersham Biosciences) 的 50mL 的溶液中, 在室温染色 1 小时。

为进行氨凝胶显色步骤, 移去上述凝胶染色剂, 加入 8 mM (0.05% v/v) 的浓缩氨 100 mL。将该凝胶洗涤 10 分钟, 共洗两次。

然后在酸稳定步骤中, 用等体积的 0.05% (9 mM) 的硫酸代替氨溶液, 另外洗涤 10 分钟。然后该凝胶就可以用于成像和保存。在保存过程 25 中, 将凝胶保持在避光和室温条件下。

利用台风成像系统 (Amersham Biosciences, Castle Hill, NSW, 澳大利亚), 采用具有设定在 540 V 和 100 μ m² 像素大小的光电倍增管的 532 nm YAG 激光器进行凝胶成像。使用 560 nm 长波域或 610 带通 30 nm

的发射滤波器以获得图像。

实施例3 Deep Purple™ 蛋白凝胶染色

1. 凝胶染色剂强度的提高

程序

- 5 将减量的（50 mM 的二硫苏糖醇）Amersham Biosciences 低分子量标记物上样到 Invitrogen Bis-Tris 12 孔 10% 聚丙烯酰胺凝胶上，所述低分子量标记物溶于 Invitrogen 1×LDS 缓冲液中，并在 70°C 加热 10 分钟而制得。每 5 μ L 等分试样中上样的大豆胰蛋白酶抑制剂（6 种低分子量标记物之一）的量如下：

10

| 泳道 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----|-------|------|-----|---|---|----|----|----|-----|-----|
| ng | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |

- 以 200 V 的恒定电压进行凝胶电泳，然后将凝胶转移到 60 mL 7.5% (v/v) 的乙酸溶液中放置 30 分钟，接着用 60 mL 的 RO 水洗涤 30 分钟，依次洗涤 3 次。将凝胶置于 250 μ L Deep Purple™ (Amersham Biosciences) 的 50mL Ro 水溶液中，避光染色 1 小时。凝胶分别用表 2 中列出的 16 mM 溶液洗涤 10 分钟，共洗涤三次，并采用 Amersham Biosciences Typhoon 成像，该仪器利用了 532 nm 激光器、560 LP 发射滤波器和 520 V 下的光电倍增管。使用 ImageQuant 5.2 (Amersham Biosciences, Castle Hill, NSW, 澳大利亚)，通过各凝胶的泳道 9 描绘印迹，由此可以在各凝胶之间对信号绝对强度进行比较。
- 15
- 20

| 凝胶编号 | 16 mM 的试剂 |
|------|-----------|
| 1. | 辛酸 |
| 2. | Tris 碱 |
| 3. | 丁胺 |
| 4. | 苯胺 |
| 5. | 1,3-二氨基丙烷 |
| 6. | 氨 |
| 7. | 水 |

结果如图 38A~38G 所示，在各种情况下，与用水洗涤 10 分钟（共洗涤三次）的凝胶相比，用列出的 16 mM 试剂洗涤 10 分钟（共洗涤三次）导致荧光信号的绝对提高。

2. 使用正磷酸提高和稳定凝胶中的荧光强度

5 程序

将减量的（50 mM 的二硫苏糖醇）Amersham 低分子量标记物上样到 Invitrogen Bis-Tris 10 孔 12% 聚丙烯酰胺凝胶上，所述低分子量标记溶于 Invitrogen 1×LDS 缓冲液中，并在 70°C 加热 10 分钟而制得。将大豆胰蛋白酶抑制剂上样到完全相同的凝胶上，每个泳道 100 ng。将凝胶在 1×
10 MES 电泳缓冲液中以 200 V 进行电泳。接着将凝胶转移到 100 mL 7.5%（v/v）的乙酸中放置 1 小时，然后用 100 mL 的 RO 水依次洗涤凝胶两次，每次 30 分钟。将凝胶置于 RO 水和 250 μL Deep Purple™ 的 50 mL 溶液中，避光染色 1 小时。

在除去凝胶染色剂时，用 8 mM 的氨将 1 号凝胶胶块（见图 39A）
15 洗涤 3 次，每次 10 分钟，并在 8 mM 的氨中避光保存 46 小时。用 8 mM 的氨洗涤完全相同的 2 号凝胶胶块（图 39B）3 次，每次 10 分钟，转移到 100 mM 的正磷酸中，也避光保存 46 小时。用具有 532 nm 激光器、560 LP 滤波器和 540 伏特下的光电倍增管的 Amersham Bioscience Typhoon 进行凝胶成像。

20 与仅用氨（图 39B）相比，在用氨显色后，正磷酸提高了用黑附球菌酮染色的凝胶的荧光强度（图 39A）。

3. 使用硫酸提高和稳定凝胶中的荧光强度

程序

研究凝胶在硫酸中的保存。将减量的（50 mM 的二硫苏糖醇）
25 Amersham 低分子量标记物等量上样到 Invitrogen Bis-Tris 15 孔 10% 聚丙烯酰胺凝胶上，所述低分子量标记物溶于 Invitrogen 1×LDS 缓冲液中，并在 70°C 加热 10 分钟而制得。将 5 μL 的大豆胰蛋白酶抑制剂上样到完全相同的凝胶上，每个泳道 100 ng。将凝胶以 200 V 的恒定电压进行电泳，然后转移到 100 mL 7.5%（v/v）的乙酸中放置 1 小时，接着用 100 mL

RO 水依次洗涤凝胶两次,每次 30 分钟。然后将凝胶置于 RO 水和 250 μL Deep Purple™ 的 50mL 溶液中,避光染色 1 小时。然后用 8 mM 的氨洗涤凝胶 3 次,每次 10 分钟,并用具有 532 nm 激光器、560 LP 滤波器和 540 V 下的光电倍增管的 Amersham Bioscience Typhoon 对凝胶进行成像 (图 40A)。在室温下将凝胶保存在 10 mM 的硫酸中,在 2 小时、21 小时和 93 小时 (图 40B~40D) 后,按照实施例 2 中所述再次成像。在不同的时间点对凝胶相同泳道的强度印迹作图 (图 40E~40H)。图 40E~40H 显示,在浸入 10 mM 的硫酸之前 (E, 时间 0) 和浸入 10 mM 硫酸后 2 小时 (F)、21 小时 (G) 和 93 小时 (H) 上述凝胶的泳道 3 的信号强度印迹,发现浸入硫酸后 2 小时染色强度增加。

结果

与染色后用氨洗涤所产生的荧光强度相比,随后加入 10 mM 的硫酸提高了荧光强度。将凝胶保存在硫酸中所保持的信号水平高于将凝胶保存在 8 mM 的氨中或水中所保持的信号水平。

4. 使用乙酸提高和稳定凝胶中的荧光强度

研究凝胶在乙酸中的保存。将减量的 (50 mM 的二硫苏糖醇) Amersham Biosciences 低分子量标记物等量上样到 Invitrogen Bis-Tris 10 孔 12% 聚丙烯酰胺凝胶上,其中,大豆胰蛋白酶抑制剂的浓度为 400ng/5 μL 。将蛋白样品用 Invitrogen 1 \times LDS 缓冲液进行两倍稀释,使其终浓度达 0.76 ng/5 μL ,并于 70°C 加热 10 分钟。以 200 V 的恒定电压进行凝胶电泳,然后转移到 100 mL 7.5% (v/v) 的乙酸中放置 1 小时,接着在 100 mL 的 RO 水中依次洗涤凝胶两次,每次 30 分钟。然后将凝胶置于 RO 水和 250 μL Deep Purple™ (Amersham Biosciences) 的 50mL 溶液中,避光染色 1 小时。在除去凝胶染色剂时,以 8 mM 的氨洗涤凝胶 2 次,每次 10 分钟,并采用具有 532 nm 激光器、560 LP 发射滤波器和 540 V 下的光电倍增管的 Amersham Bioscience Typhoon 对凝胶进行成像 (图 41A)。将凝胶置于 10 mM 的乙酸中,在 46 小时和 167 小时后再次成像 (图 41B~41C)。

结果

与染色后用 8 mM 氨洗涤所产生的染色剂强度相比, 随后加入 10 mM 的乙酸提高了染色强度。将凝胶保存在乙酸中所保持的信号水平高于将凝胶保存在 8 mM 的氨中或水中所保持的信号水平。

实施例 4 在琼脂糖凝胶中对 DNA 片段用黑附球菌酮染色: 去污剂

5 对黑附球菌酮染色的影响

原料

黑附球菌酮 (0.042 mg/ml DMSO)

DNA 片段: SPP-1 噬菌体/*Eco* RI (货号为 DWM-S1, Geneworks),
DNA 分子量标记物 XVII (货号为 1855646, Roche)。

10 DTAB (1.625 mM)

TDTAB (0.001, 0.01, 0.1 和 1 mM)

CTAB (0.001, 0.01, 0.1 和 1 mM)

CPC (0.001, 0.01, 0.1 和 1 mM)

SDS (1.625 mM)

15 乙酸 (1 mM)

反渗透 (RO) 水

琼脂糖凝胶 (1.5%) (DNA 级琼脂糖, Progen)

TAE 电泳缓冲液 (Tris-乙酸盐/EDTA, pH 8.3)

DNA 样品上样缓冲液 (货号为 200-0424, Progen)

20 因为 DTAB、TDTAB、CTAB 和 CPC 的阳离子特性, 其易于与 DNA 进行适当反应^{11,12}, 所以将上述物质作为适宜的阳离子去污剂的例子而用于该核酸实验, 相关的出版物以参考方式引入本文中。被用作阴离子去污剂的例子的 SDS 尽管在蛋白质方法学中有用, 但是其并不与核酸发生适宜的反应。

25 染色方法

1. 利用 Progen 样品上样缓冲液来制备 DNA 分子标记物样品。将其浓度调整到 1000 ng/样品。将该样品上样到琼脂糖凝胶上(1.0%或 1.5%), 并以 100 V 电泳 1.5 小时。

2. 该凝胶进行电泳后, 用 1 L 的 RO 水对该凝胶进行漂洗。

3. 将该 DNA 凝胶各泳道切成胶条。
4. 然后将含有 DNA 片段的各胶条放入 15-mL 的 Falcon 管中, 所述 Falcon 管内装有 10-mL 各种浓度的不同的阳离子去污剂, 所述去污剂在原料部分有详细说明。在室温下用去污剂温浴 30 分钟。
5. 经过 30 分钟的温浴, 倒掉各管内的最初温浴溶液。然后在管内加入 10-mL 在 RO 水中制得的黑附球菌酮染色溶液 (0.0042 mg/mL)。将凝胶胶条试管在室温 (避光) 染色 1 小时。
6. 用黑附球菌酮染色 1 小时后, 倒掉染色液, 加入 10-mL 的乙酸 (1 mM), 并在室温温浴 30 分钟 (分 3 次, 每次 10 分钟温浴)。
7. 乙酸处理后, 用台风扫描仪 (型号为 9200, Amersham Biosciences) 扫描凝胶胶条。扫描条件为: 550 V, 常规灵敏度和 610 BP 30/绿色 (532 nm)。

结果

图 42 显示 DNA 凝胶 (SPP-1 DNA/*Eco* RI) 胶条的台风扫描图像 (1: 没有去污剂处理, 只用黑附球菌酮染色; 2: SDS (1.625 mM) 温浴并用黑附球菌酮染色; 3: DTAB (1.625 mM) -温浴并用黑附球菌酮染色; 4: SDS 和 DTAB 温浴并用黑附球菌酮染色)。

1. 只用黑附球菌酮染色时, 凝胶胶条 1 的 DNA 分子条带没有被染色。
2. 当先用 SDS 温浴 DNA, 然后再使用黑附球菌酮染色时, 凝胶胶条 2 的 DNA 分子条带没有被染色。
3. 当先用 DTAB 温浴 DNA, 然后再使用黑附球菌酮染色时, 凝胶胶条 3 的 DNA 分子条带被染色。
4. 当先用 SDS 和 DTAB 温浴 DNA, 然后再使用黑附球菌酮染色时, 凝胶胶条 4 的 DNA 分子条带被染色。

图 47 显示台风扫描的 DNA 凝胶胶条的图像 (A 和 C, DNA MWM XVII; B, SPP-1 DNA/*Eco* RI)。图 47-A, 于 DTAB (1, 0.001 mM; 2, 0.01 mM, 0.1mM 和 1mM) 中预温浴然后进行黑附球菌酮染色的 DNA 凝胶胶条。图 47-B, 于 CTAB (1, 0.001 mM; 2, 0.01 mM, 0.1 mM 和

1 mM) 中预温浴然后进行黑附球菌酮染色的 DNA 凝胶胶条; 图 47-C, 于 CPC (1, 0.001 mM; 2, 0.01 mM, 0.1 mM 和 1 mM) 中预温浴然后进行黑附球菌酮染色的 DNA 凝胶胶条。

1. TDTAB 预温浴、用黑附球菌酮染色的 DNA 片段, 其中去污剂浓度范围为 0.1 mM~1 mM。

2. CTAB 预温浴、用黑附球菌酮染色的 DNA 片段, 其中去污剂浓度范围为 0.01 mM~0.1 mM。

3. CPC 预温浴、用黑附球菌酮染色的 DNA 片段, 其中去污剂浓度范围为 0.01 mM~0.1 mM。

10 结论

1. 使用的阴离子去污剂 (SDS) 对用黑附球菌酮进行 DNA 染色没有帮助, 而不同的阳离子去污剂 (DTAB、TDTAB、CTAB 和 CPC) 可以有效地暴露出由黑附球菌酮染色的 DNA 片段。

2. 目前的实验表明, 当采用很宽范围内的诸如 DTAB、TDTAB、CTAB 和 CPC 等不同的阳离子去污剂进行处理时, 可以将黑附球菌酮用作 DNA 和其他核酸的染色剂。

可以使用其他适宜的阳离子去污剂, 其对本领域技术人员是公知的。这类去污剂中的一些已在例如 Bhairi SM¹⁷ 中披露, 该参考文献以参考的方式引入本文中。其他来源的适宜的去污剂和表面活性剂对于本领域技术人员来说也应该是已知的。

由于 DNA 操作容易, 因而被用作方便稳定的核酸的例子, 但是以上的原理同样非常适用于包括单链和双链的核酸在内的 RNA 和其他核酸以及它们的衍生物。而且, 这些概念和原理可以应用于许多已知的核酸分析和定量技术, 例如由 Old RW 和 Primrose SB¹⁴、Innis MA 等人¹⁵ 和 sambrook J 等人¹⁶ 记载的那些技术。

实施例 5. DNA 浓度的测定

成分

用 80% (v/v) 二甲亚砜和 20% (v/v) 乙腈配制的 Deep PurpleTM, 其在 550 nm 吸光度=0.30。

程序

在水中制备鲑鱼双链 DNA (Sigma, D1626), 其浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 并通过用水进行两倍稀释使其终浓度为 488 ng/mL 。将等分试样 (25 μL) 的 DNA 一式两份吸到 96 孔的微量滴定板 (Greiner, 货号为 655096) 的板孔中。同样使用了 25 μL 的等分水作为无 DNA 对照物。

然后在该板的平行列中加入 25 μL 浓度为 3 mM 的阳离子表面活性剂十二烷基三甲基溴化铵 (Sigma, D5047) 水溶液。然后根据特定的实验, 分别向各列中加入 25 μL 的 10 mM 乙酸、10 mM 氨溶液或 40 mM 的 NaHCO_3 的等分试样。然后向各孔中加入 25 μL 的按 1:10 稀释至水中的 A 部分的等分试样。将板避光温浴大约 30 分钟, 然后用 UVA 和 UVB 透明照明器进行可视化, 并用配有 532 nm 激发激光器和 560 LP 或 526 SP 发射滤波器的 Amersham Bioscience Typhoon 进行成像, 分别测定红色和绿色发射光。

通过以上操作, 可以对溶液中的 DNA 进行定量。结果见图 43、44A~44B、45 和 46A~46B。图 43 显示红色发射光、532 nm 激光器、560 LP 滤波器的台风图像。加入染色剂后, 加入按程序中描述的方法配制的 Deep Purple, 然后向板孔中加入 10 mM 的氨溶液。图 44A 显示以来自图 43 的信号作为原始数据所作的图表。图 44B 是 \log_{10} 对数转换数据的图表。图 45 是绿色发射光、532 nm 激光器、560 LP 滤波器的台风图像。加入染色剂后, 加入按程序中描述的方法配制的 Deep Purple, 然后向板孔中加入 10 mM 的乙酸溶液。在 UVA 和 UVB 透明照明器上, 用乙酸处理的各孔的强度呈浓郁的亮绿, 且亮度显著高于用 10 mM 的氨或 40 mM 的 NaCO_3 处理过的板孔的红色荧光。由于硬件配置的原因, 台风仪器激发和记录该信息的性能欠佳。图 46A 是以来自图 43 的信号作为原始数据所作的图表。图 44B 是相同数据经 \log_{10} 对数转换后所作的图表。

该结果清楚表明了使用染料以及去污剂和/或碱和/或酸在对核酸的检测和定量进行改进中的用途。

通过参考具体的实施例对本发明进行了描述。本领域技术人员应该理解, 在保持本文所描述的创造性概念的精神的条件下, 可以以多种其

他形式来实施本发明。

参考文献

- 1 Hames, B.D. (1990). 一维聚丙烯酰胺凝胶电泳, “蛋白凝胶电泳: 实用方法” (One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, in “Gel electrophoresis of proteins: a practical approach”) 第二版, (B.D. Hames 和
5 D. Rickwood 编), 1~139 页. IRL 出版社, 牛津.
- 2 Bartoszek A, Sielenko A 和 Wesiora M. (2003). 在遗传工程中应用碱技术以研究低分子量化合物在没有细胞的系统中与 DNA 结合的能力的通用方法 (Versatile method employing basic techniques of genetic engineering to study the ability of low-molecular-weight compounds to bind
10 covalently with DNA in cell-free systems) *Anal Biochem.* 313(1):53-59
- 3 Jaroszeski MJ, Gilbert R 和 Heller R(1994). 通过流式细胞术检测和定量细胞间电子融合产物 (Detection and quantitation of cell-cell electrofusion products by flow cytometry) *Anal Biochem* 216:271-275
- 4 Kamp F, Guo W, Souto R, Pilch PF, Corkey BE 和 Hamilton JA (2003).
15 油酸跨脂肪细胞的细胞质膜的快速翻转 (Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes) *J Biol Chem* 278:7988-7995
- 5 Paulmurugan R, Massoud TF, Huang J 和 Gambhir SS (2004). 药物调节的活受试对象中的蛋白互相作用的分子成像 (Molecular imaging of drug-modulated protein-protein interactions in living subjects) *Cancer Res.*
20 64:2113-2119.
- 6 Kersten B, Feilner T, Kramer A, Wehrmeyer S, Possling A, Witt I, Zanol MI, Stracke R, Lueking A, Kreutzberger J, Lehrach H, Cahill DJ. (2003). 用于抗体和血清筛选的拟南芥蛋白的产生 (Generation of Arabidopsis protein chips for antibody and serum screening) *Plant Mol Biol.*
25 52:999-1010.
- 7 Breadmore MC, Wolfe KA, Arcibal IG, Leung WK, Dickson D, Giordano BC, Power ME, Ferrance JP, Feldman SH, Norris PM 和 Landers JP (2003). 对来自生物样品的 DNA 进行基于微芯片的纯化 (Microchip-based purification of DNA from biological samples) *Anal Chem.* 75:1880-1886.

- 8 Ferrai BC, Attfield PV, Veal DA 和 Bell PJ. (2003). 新荧光染料 Belgian 红在贾第虫孢囊分化中的应用 (Application of the novel fluorescent dye Belgian red to the differentiation of Giardia cysts) *J Microbiol Methods*. 52:133-135.
- 5 9 Graozky TK, Grimes BH, Knight R, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Veal DA. (2003). 通过结合荧光原位杂交和单克隆抗体对由生态上与人类关联的蝇携带的微小隐孢子虫和伦伯尔氏贾第虫的检测 (Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody) *Am J Trop Med Hyg.* 68:228-232.
- 10 10 Shapiro, H.M. 2003.实用流式细胞术 (Practical Flow Cytometry), 第四版, John Wiley, 新泽西州.
- 11 Bathaie SZA, Moosavi-Movahedi AA, Saboury AA. (1999). DNA 与十二烷基三甲基溴化铵相互作用的能量和结合特性 (Energetic and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethylammonium bromide) *Nucleic Acids Res.* 1999年2月15日; 27(4):1001-1005.
- 15 12 Harrington LA 和 Andrews, BJ. (1996). 酵母 Swi4,6-依赖细胞周期盒 CACGAAA 的结合是体内调节的细胞周期 (Binding to the yeast Swi4,6-dependent cell cycle box, CACGAAA, is cell cycle regulated in vivo) *Nucleic Acids Res.* 24:558-565.
- 20 13 Bell PJJ 和 Karuso P, (2003), 黑附球菌酮, 新的来自真菌黑附球菌的荧光化合物 (Epicocconone, A Novel Fluorescent Compound from the Fungus *Epicoccum nigrum*) *J Am Chem Soc*, 125:9304-9305.
- 14 Old RW 和 Primrose SB, 基因操作原理: 遗传工程导言 (Principles of manipulation: An Introduction to genetic engineering), Blackwell Scientific Publication, 第四版, 1989.
- 25 15 Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ 和 White TJ, PCR Protocols: 方法和应用指南 (A guide to methods and applications) .Academic Press Inc. 1990.

16 Sambrook J, Fritsch EF 和 Maniatis T. 分子克隆, 实验室手册 (Molecular cloning, a laboratory manual) .冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), NY, 1989.

5 17 Bhairi SM. 去污剂: 去污剂在生物系统中的特性和用途指南 (Detergents: A guide to the properties and uses of detergents in biological systems) .Cabiochem-Novabiochem Corp., 2001.

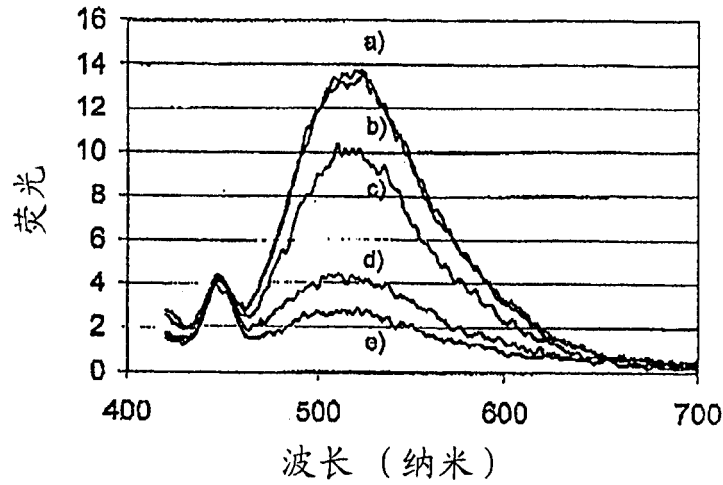


图 1

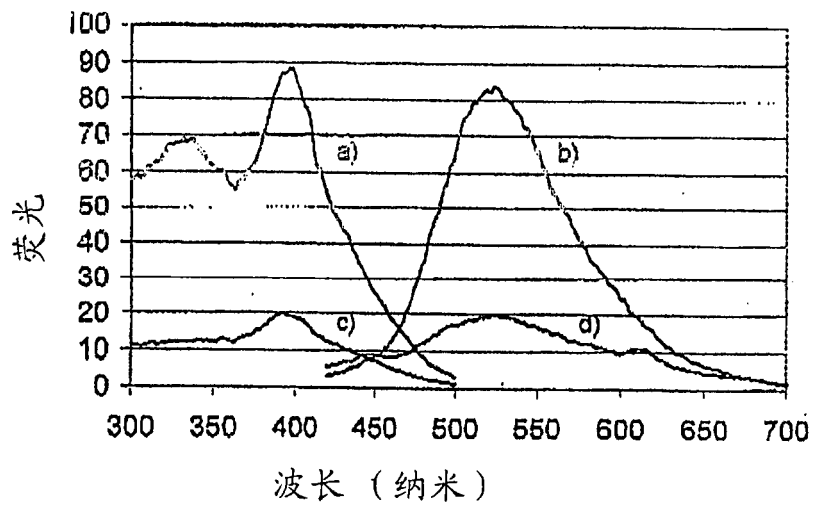


图 2

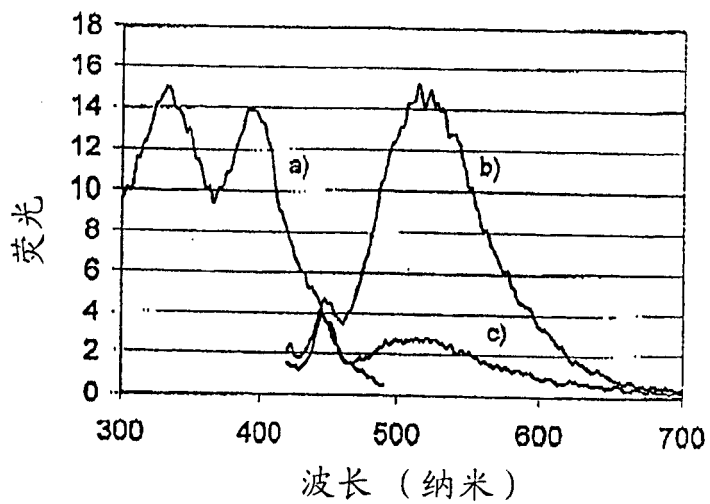


图 3

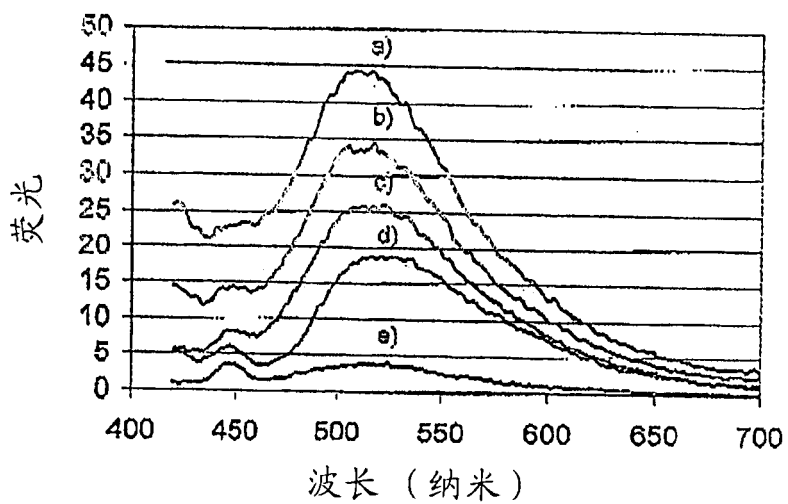


图 4

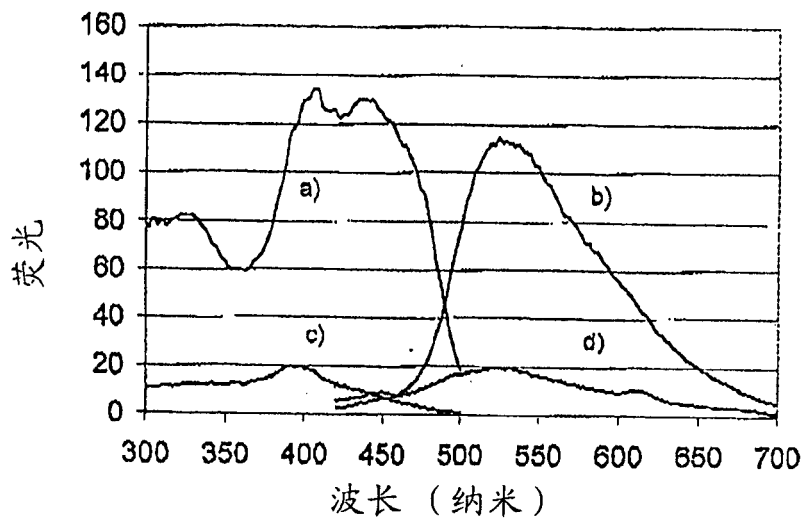


图 5

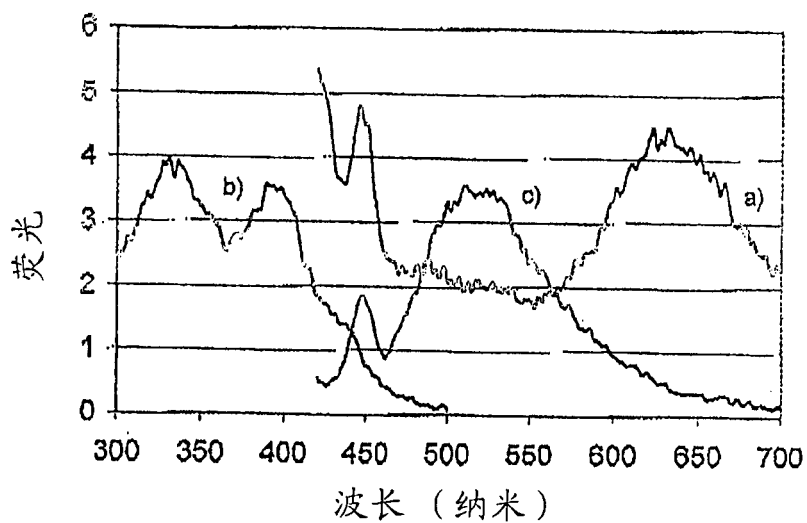


图 6

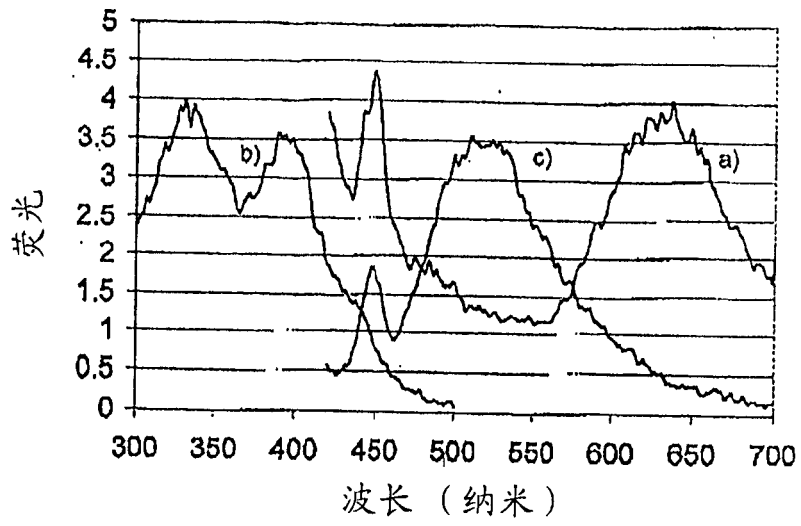


图 7

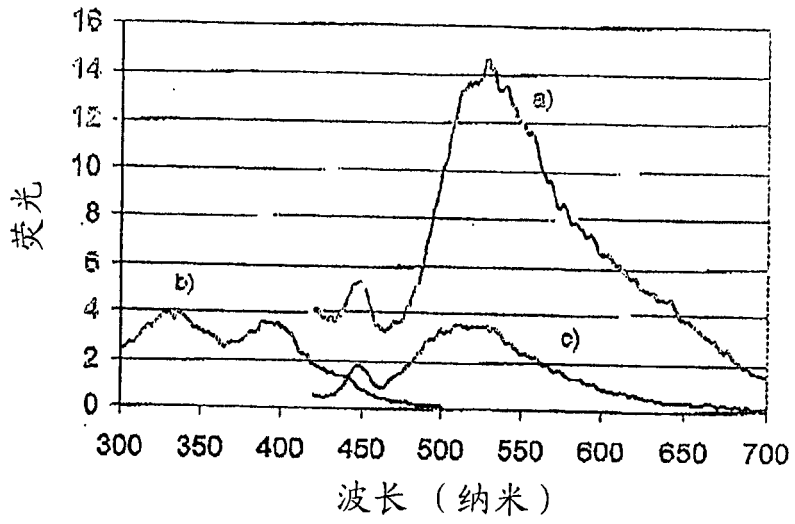


图 8

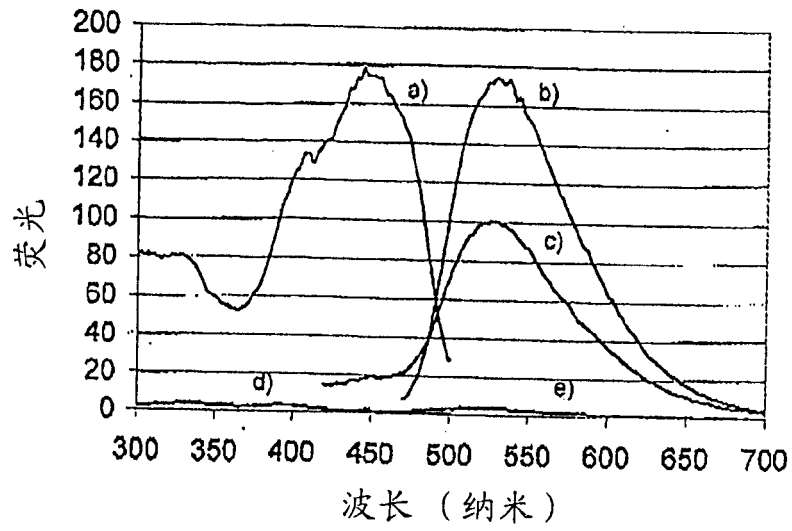


图 9

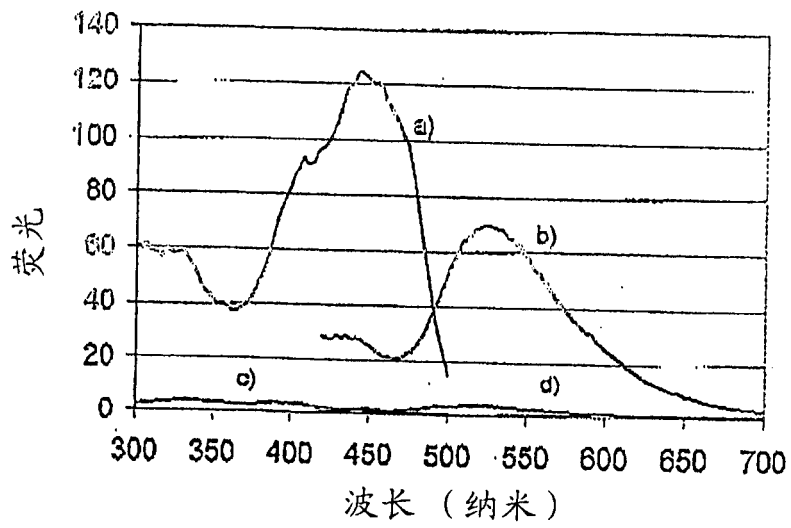


图 10

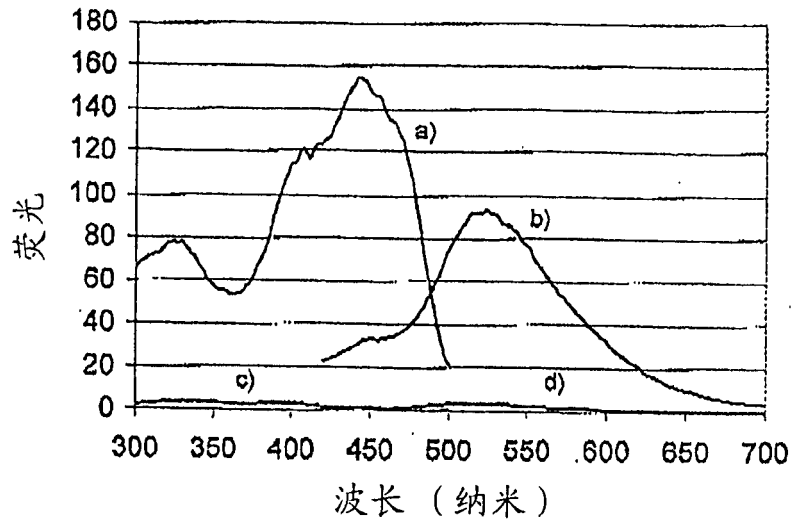


图 11

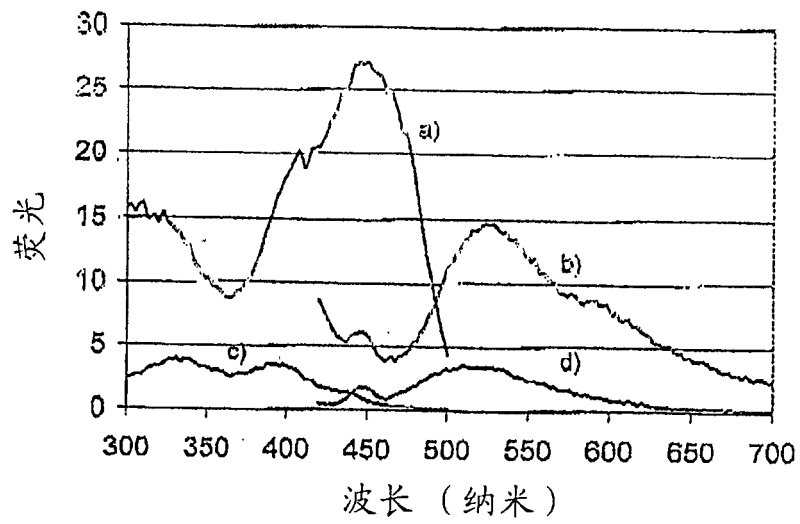


图 12

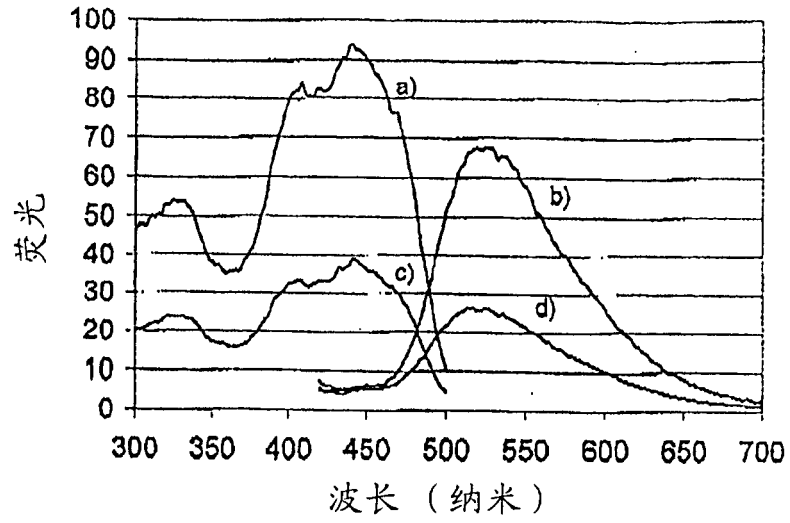


图 13

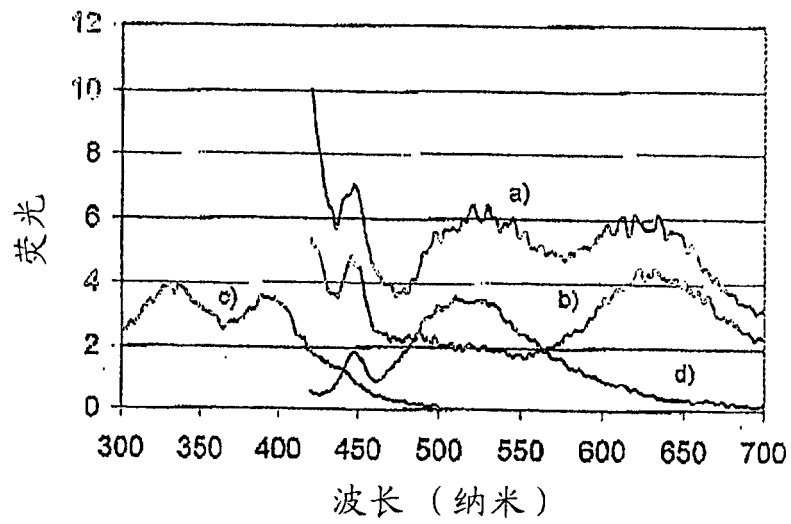


图 14

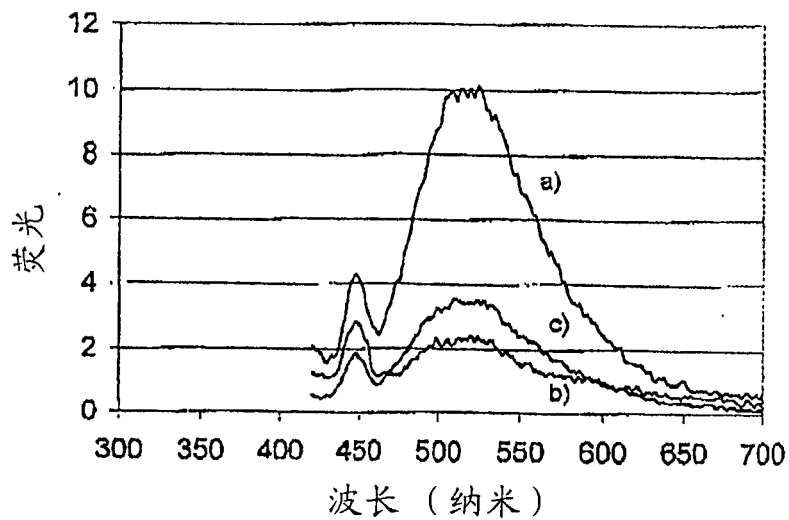


图 15

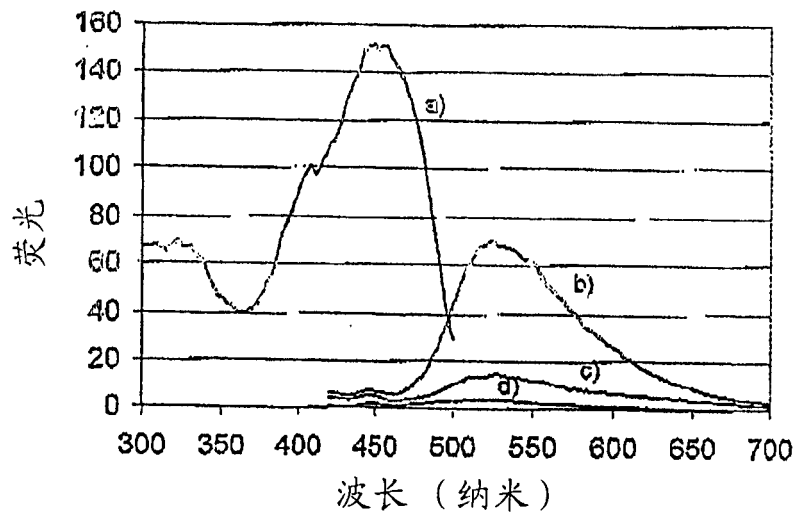


图 16

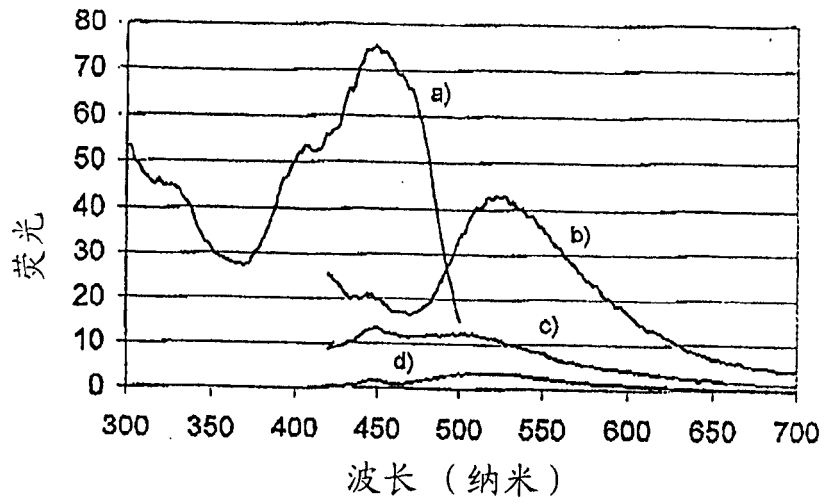


图 17

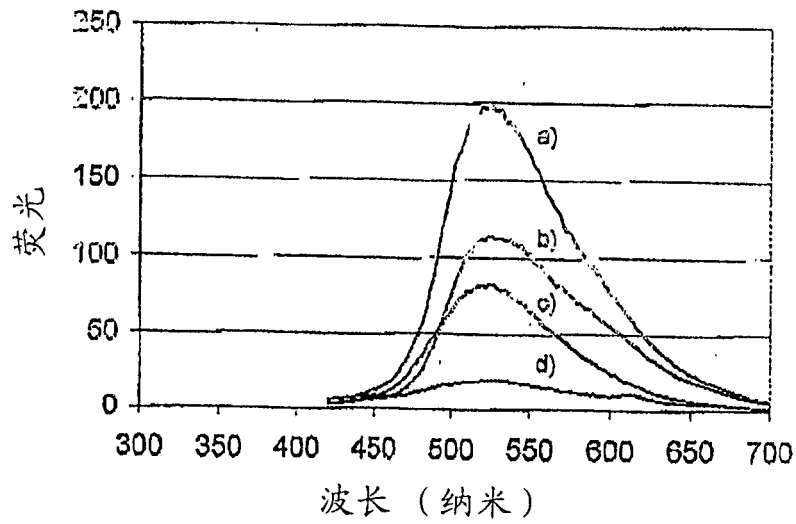


图 18

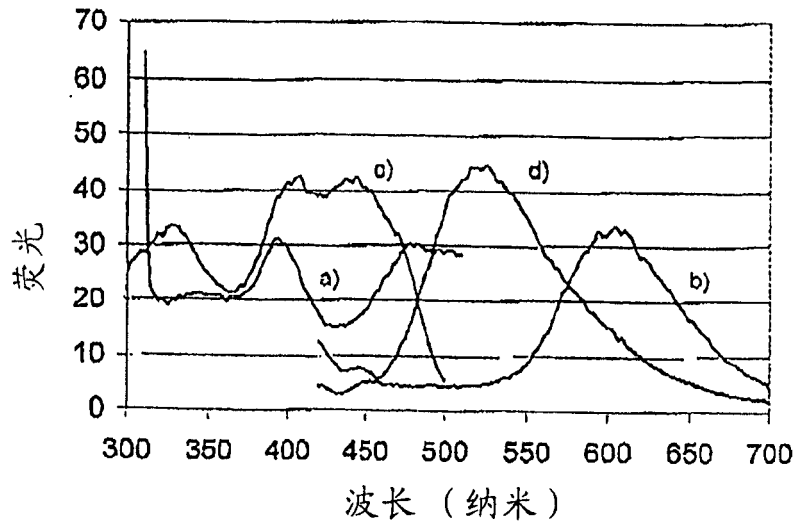


图 19

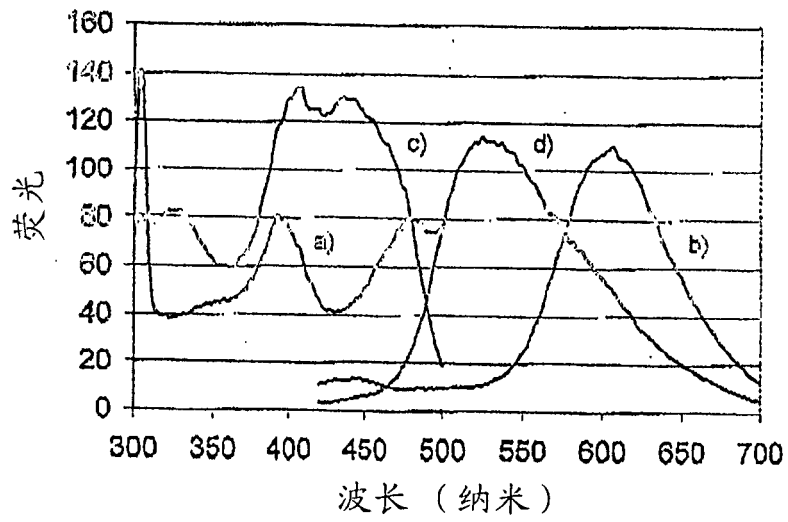


图 20

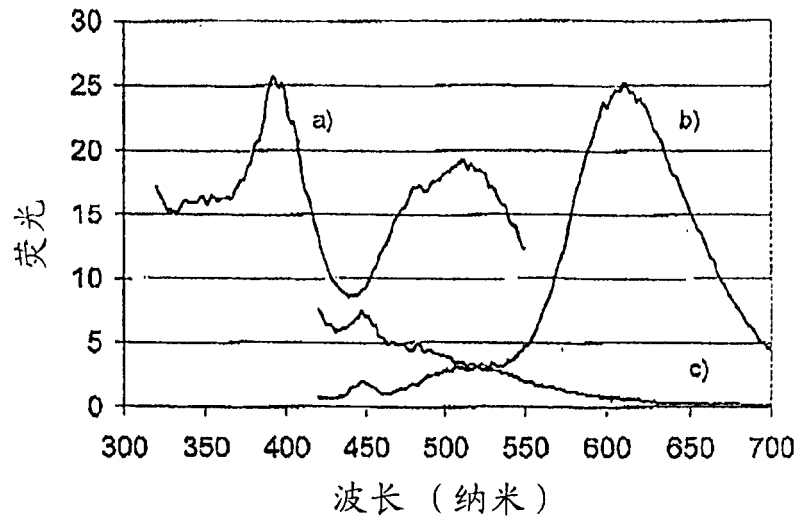


图 21

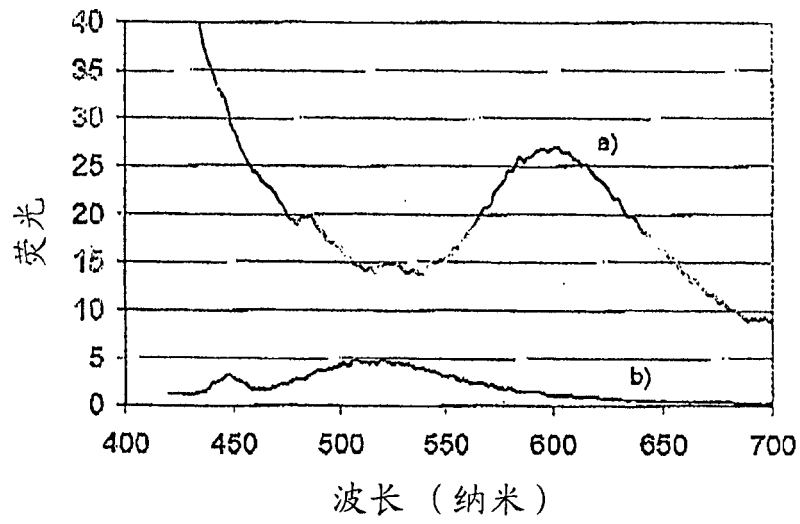


图 22

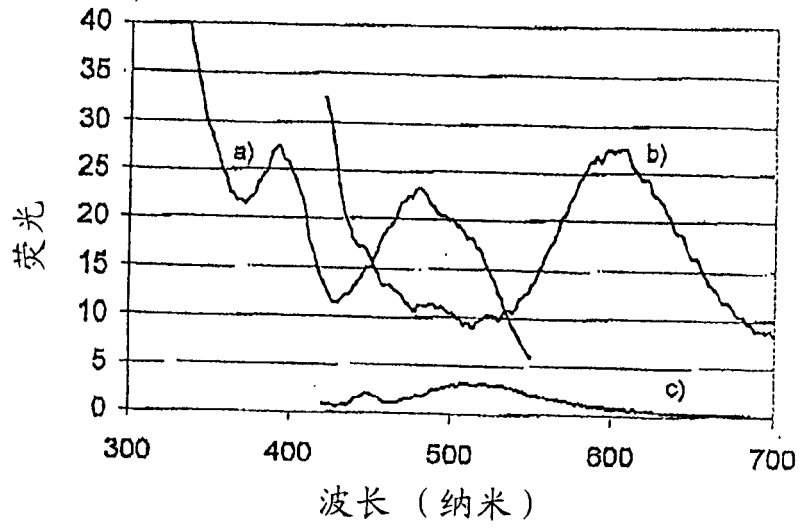


图 23

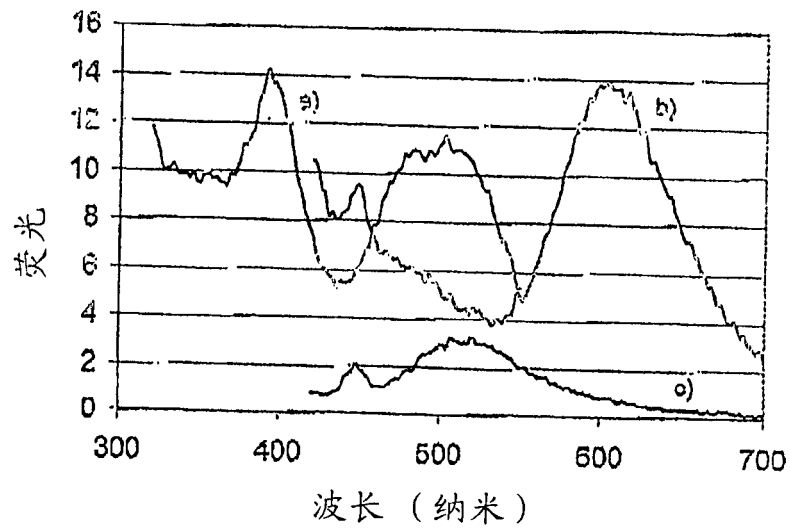


图 24

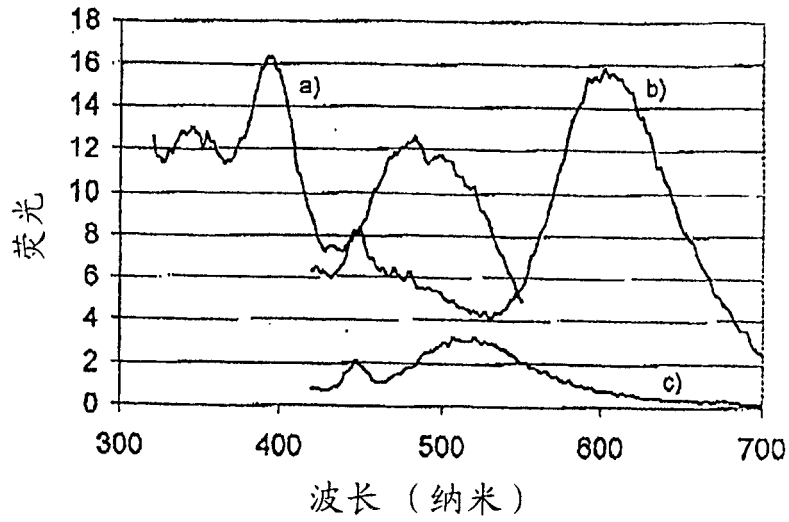


图 25

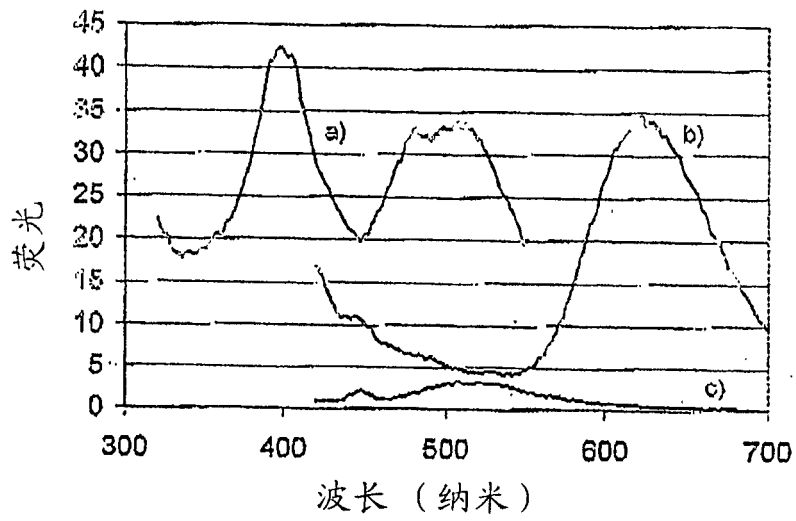


图 26

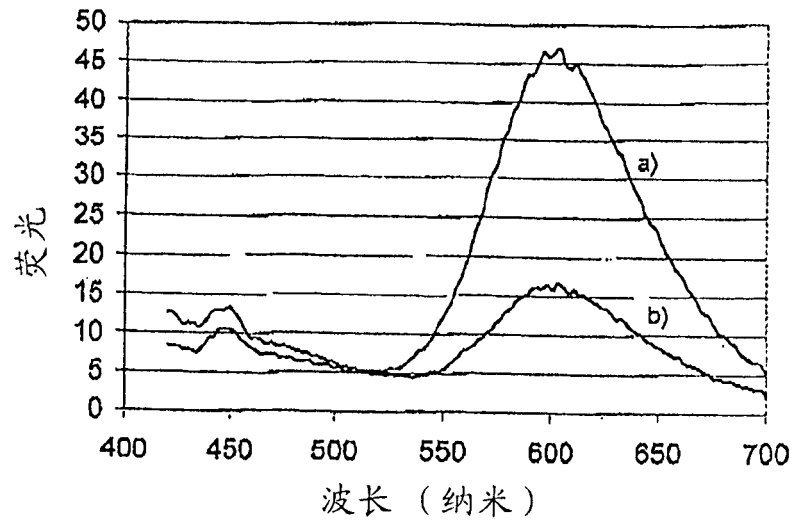


图 27

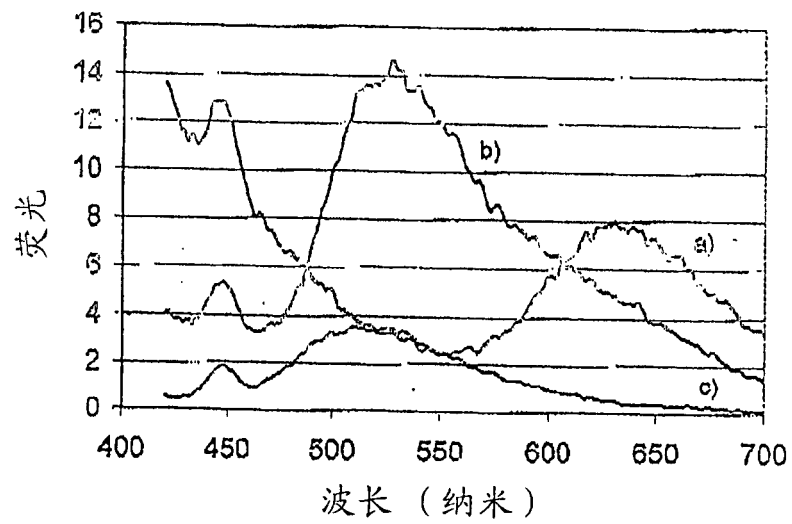


图 28

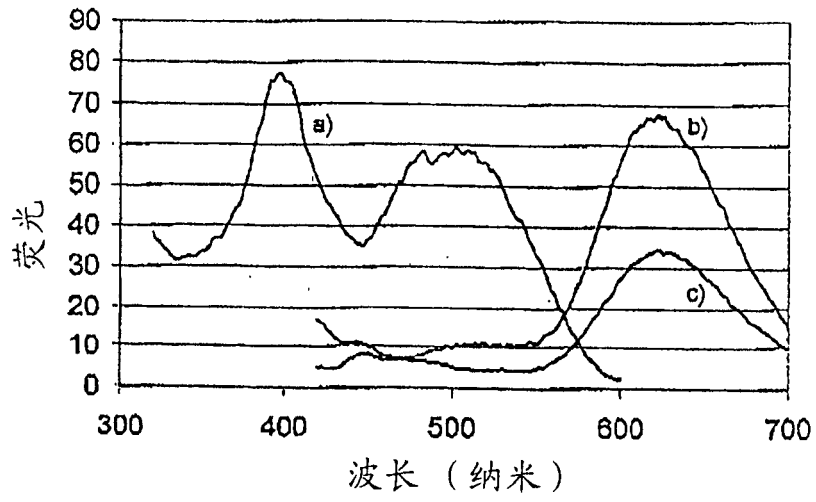


图 29

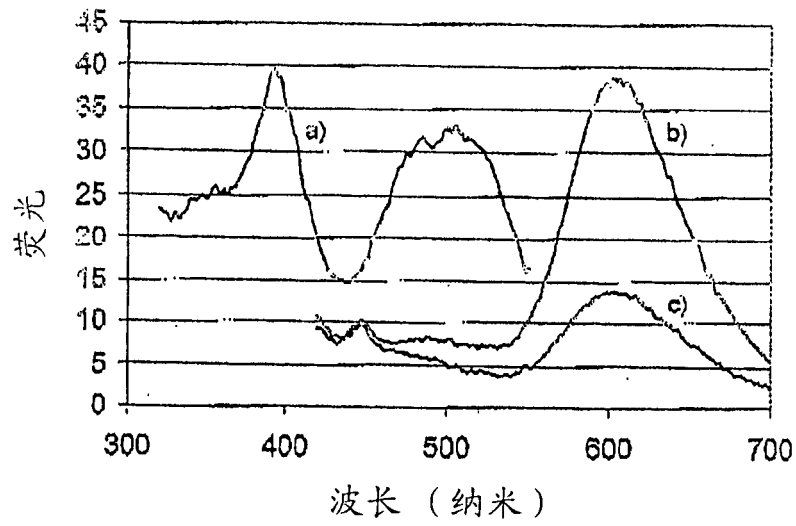


图 30

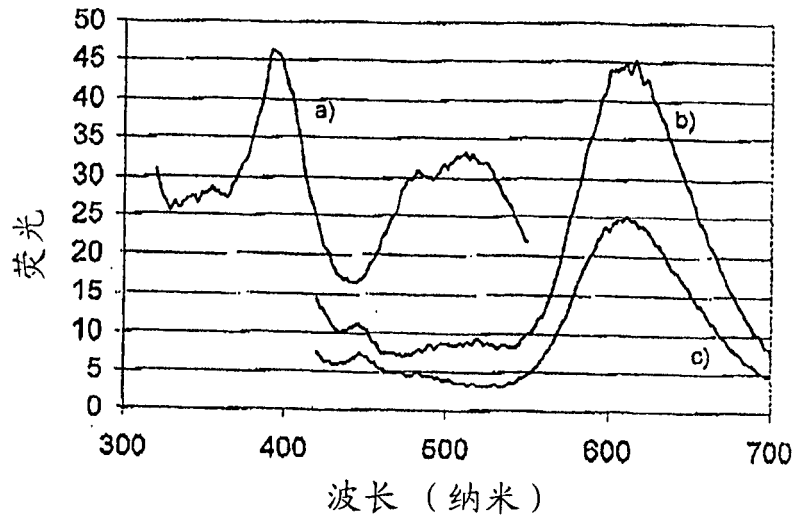


图 31.

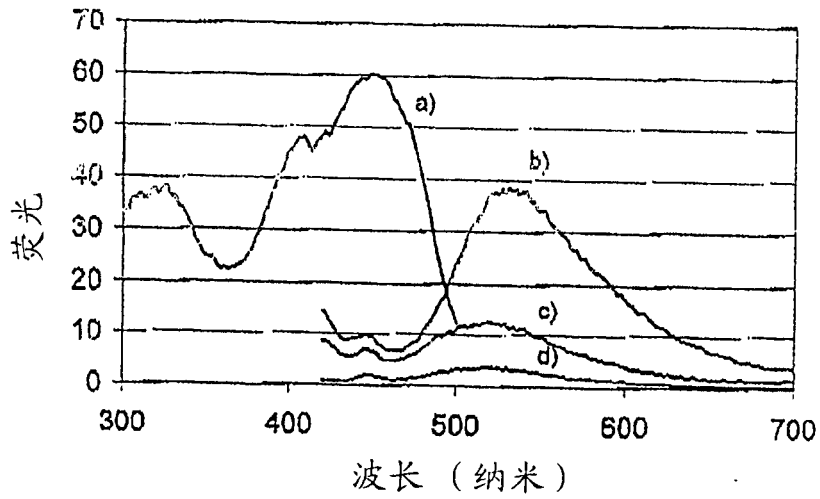


图 32

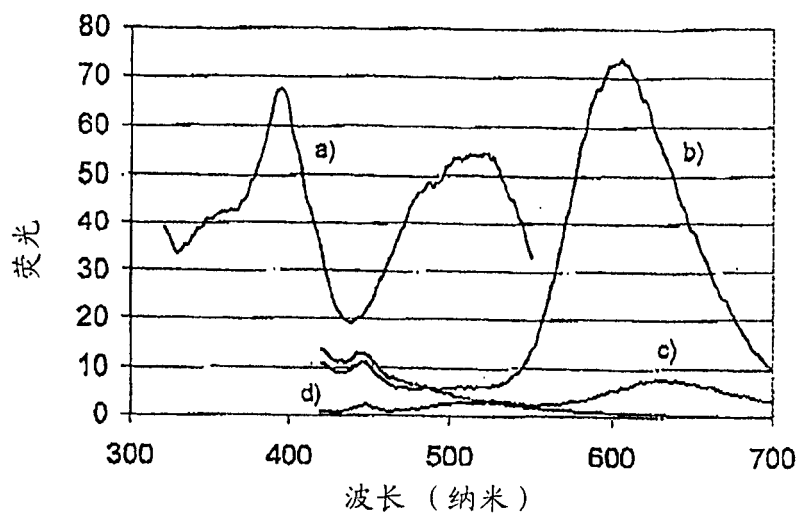


图 33

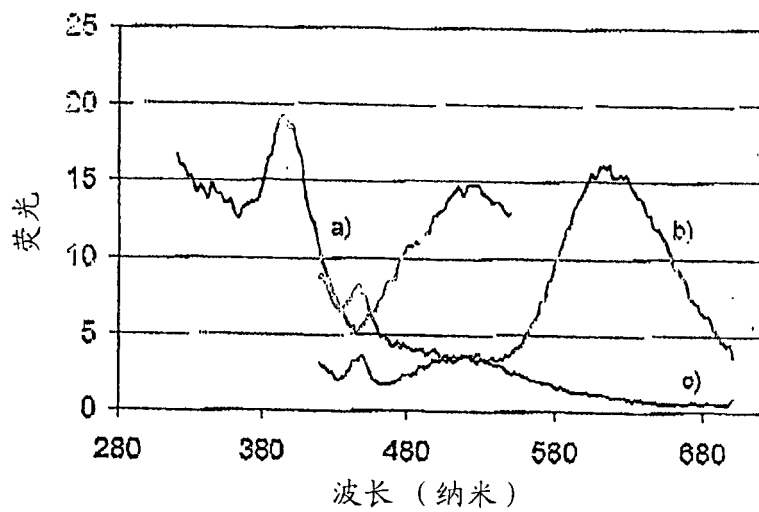


图 34

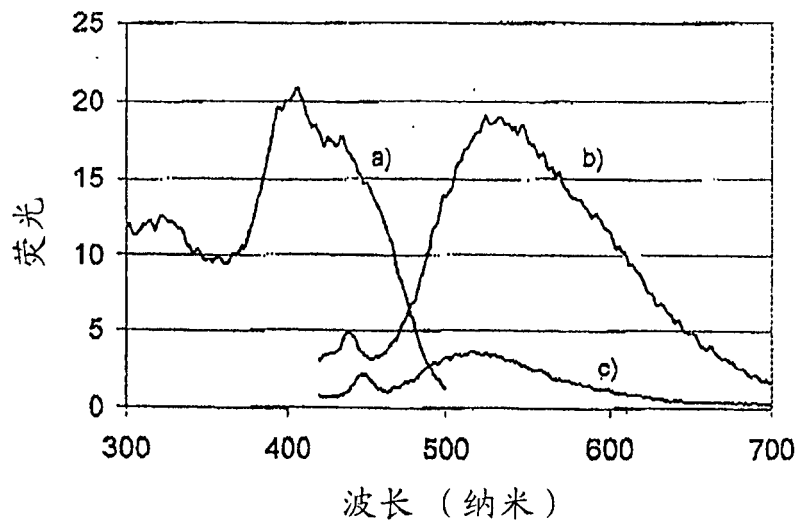


图 35

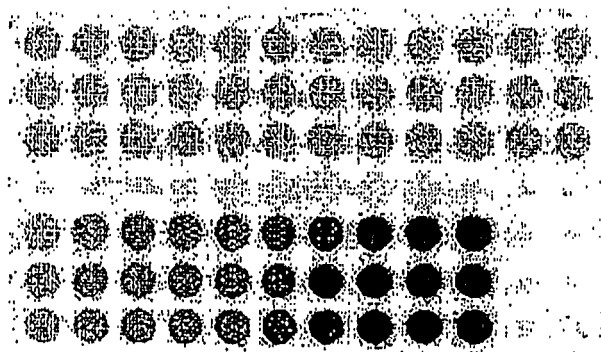


图 36

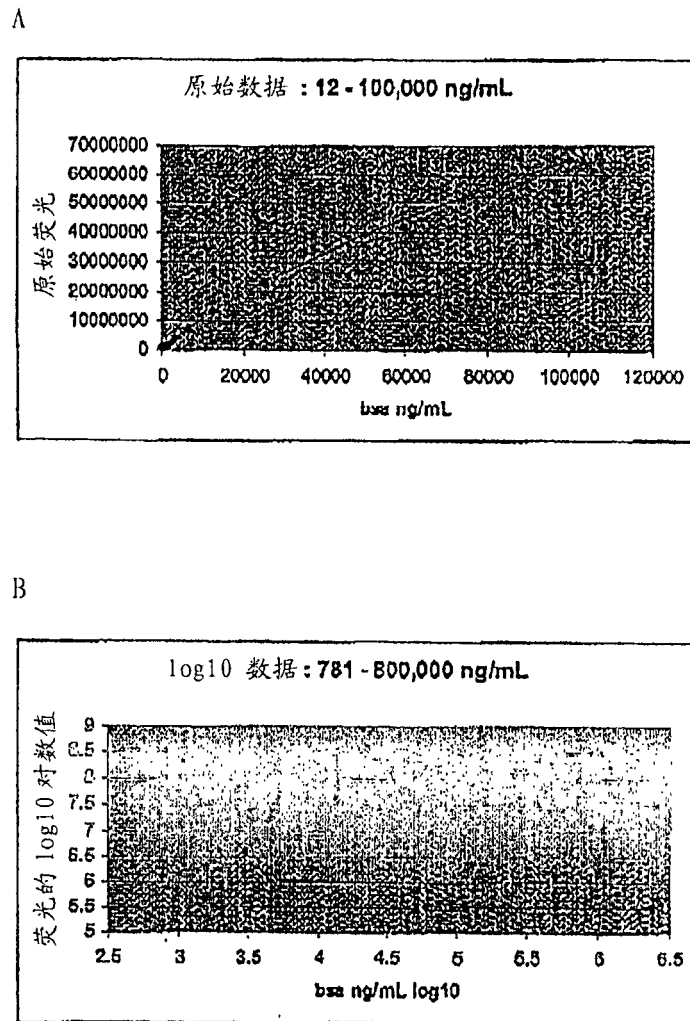


图 37

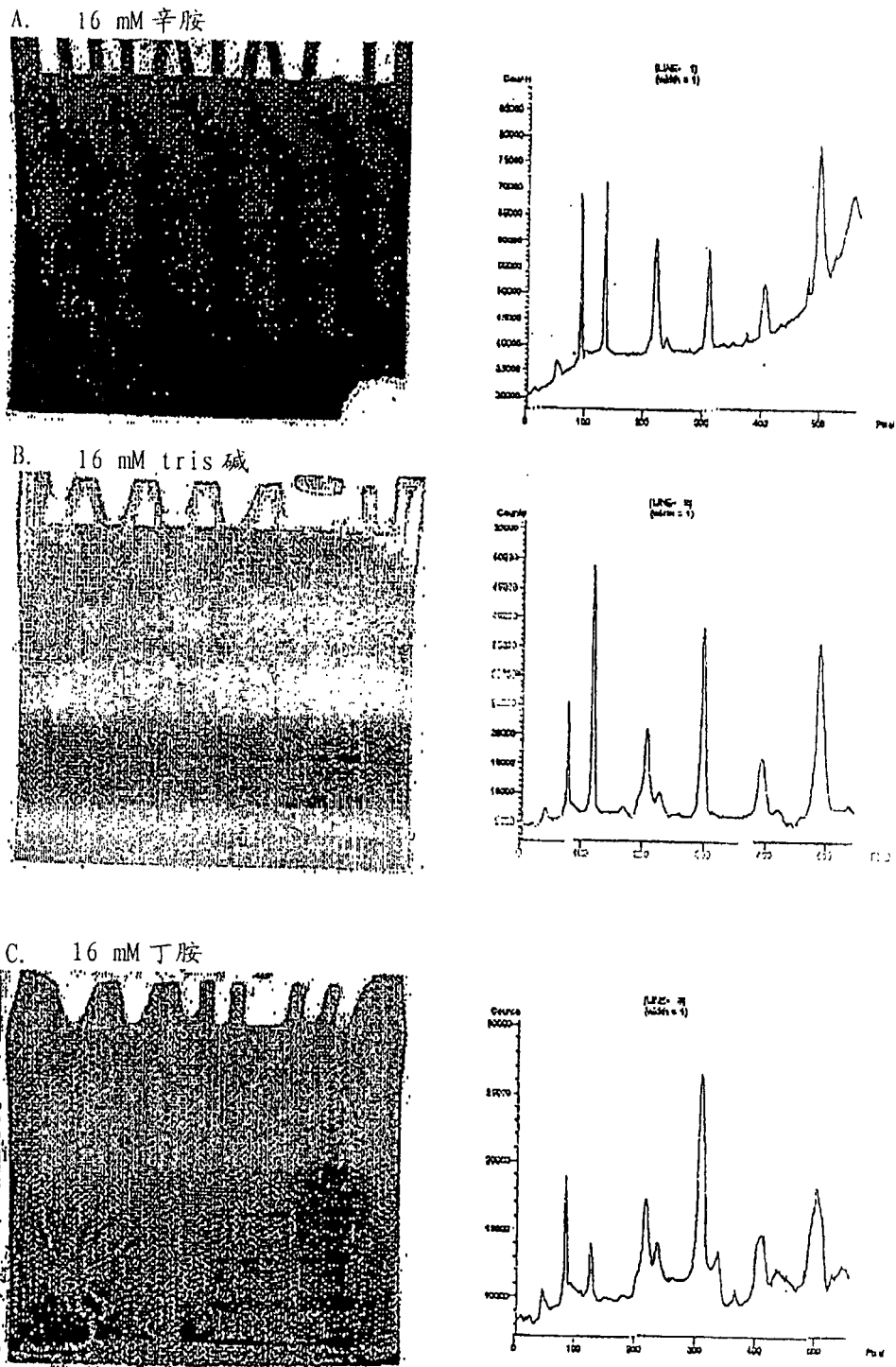
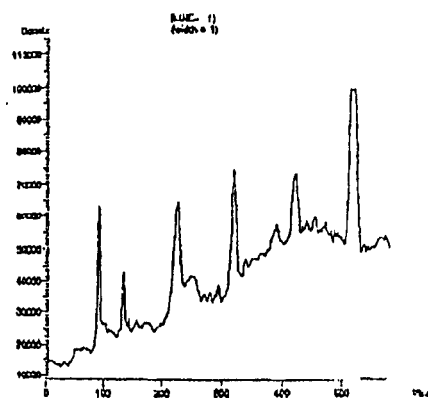
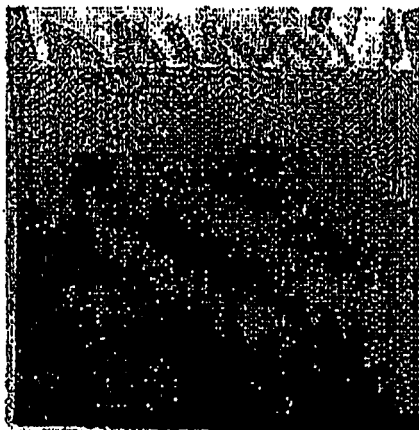
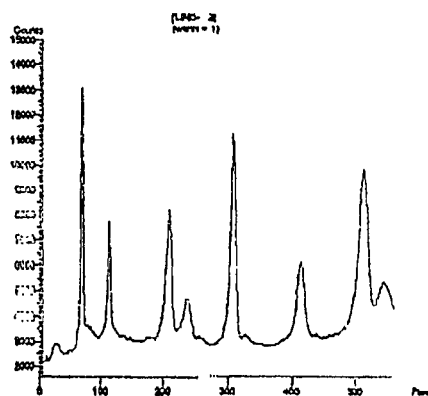
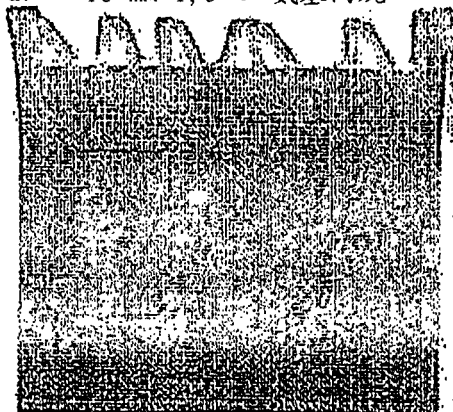


图 38

D. 16 mM 苯胺



E. 16 mM 1,3-二氨基丙烷



F. 16 mM 氨

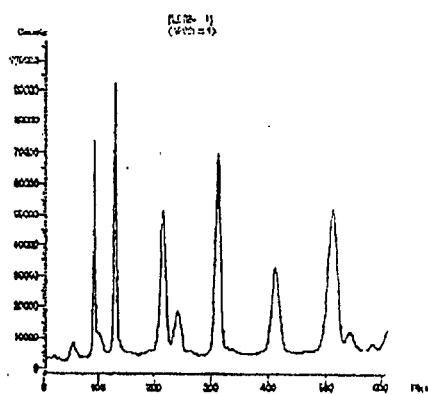
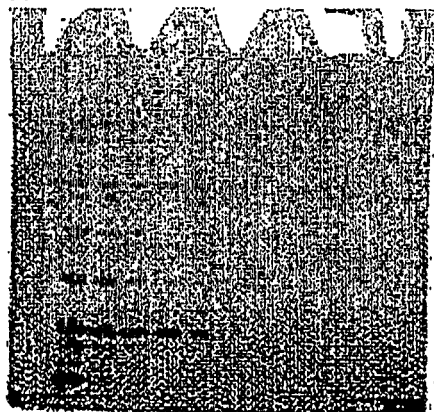


图 38 续

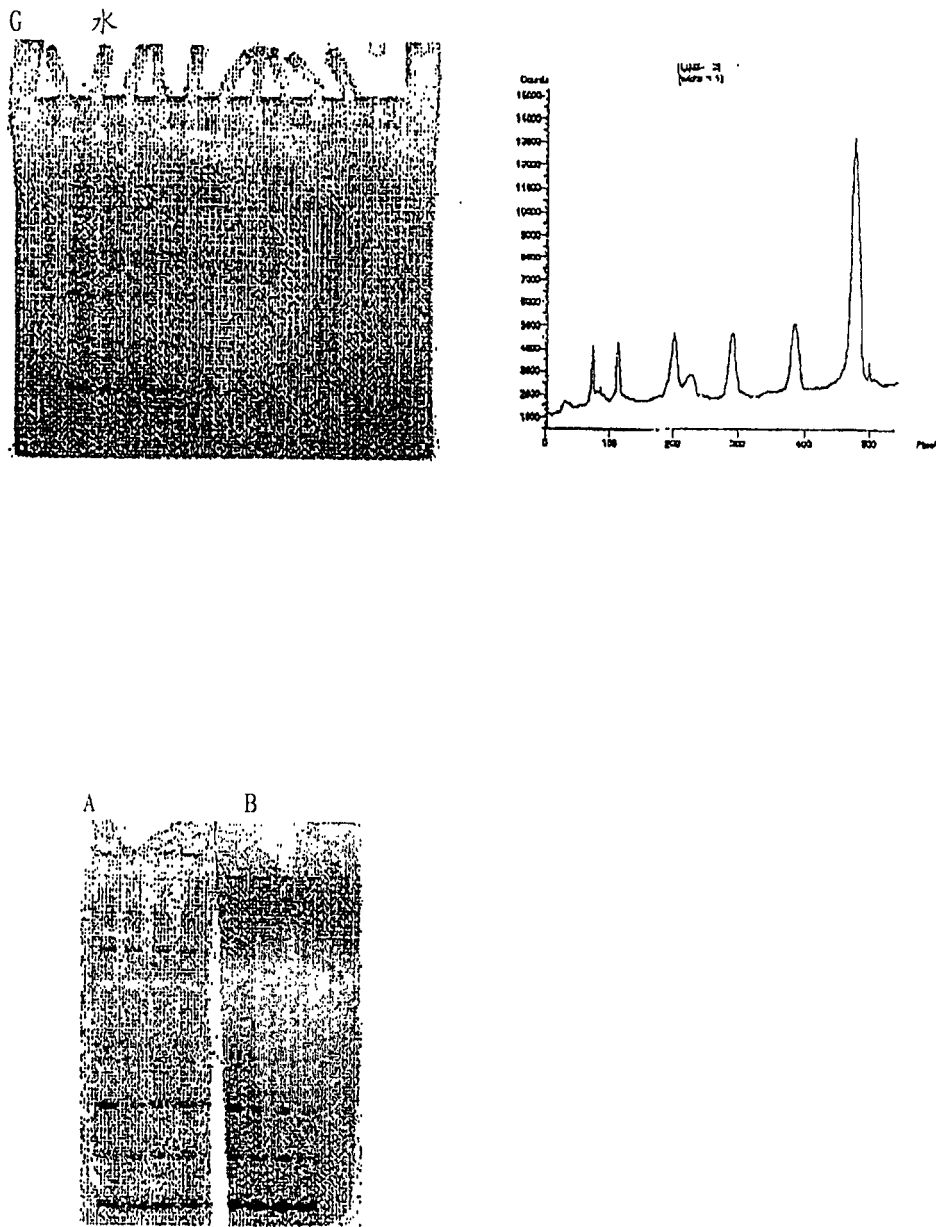


图 39

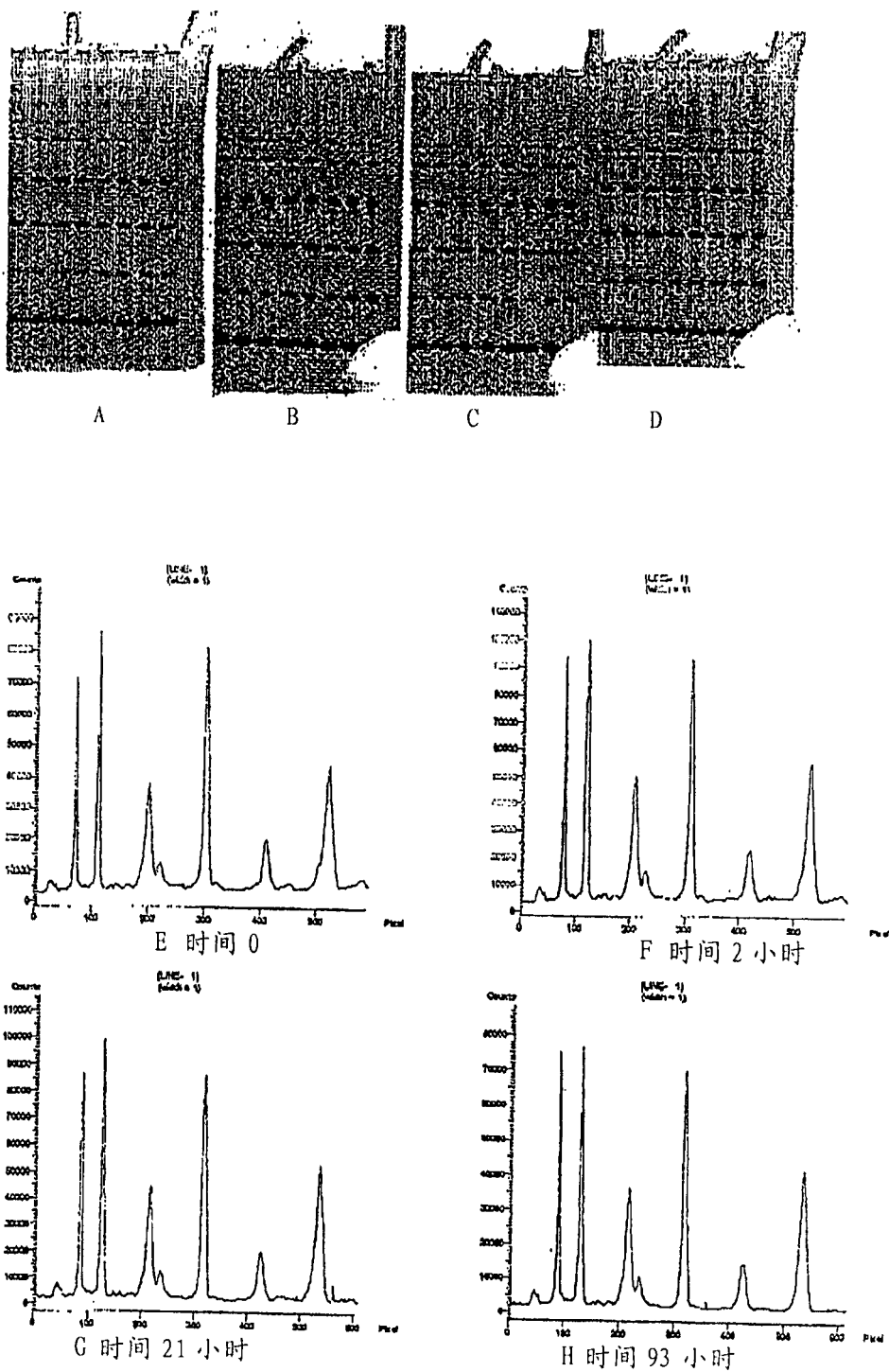


图 40

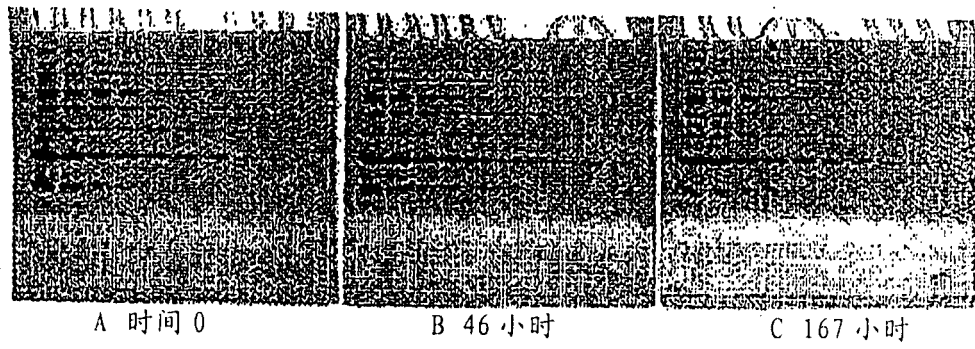


图 41



图 42



图 43

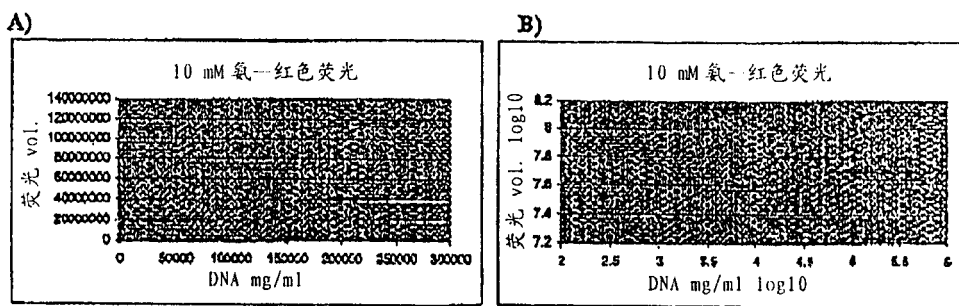


图 44



图 45

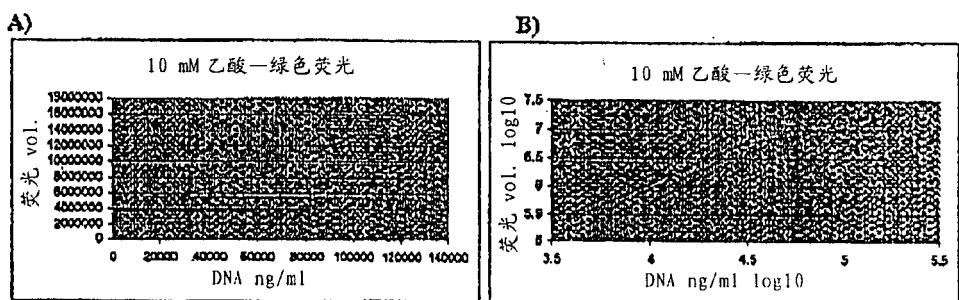


图 46

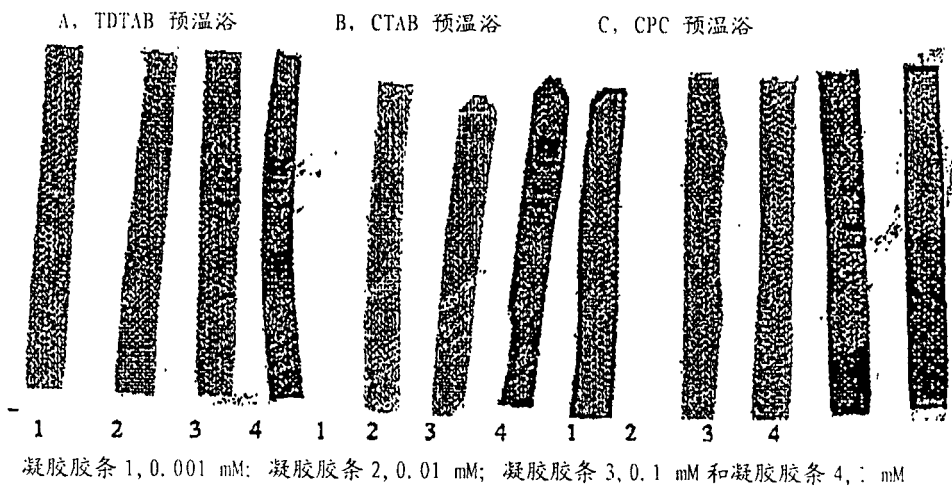
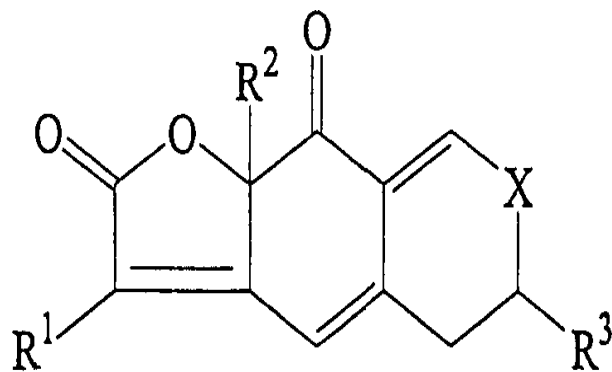


图 47

| | | | |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 增强荧光的方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1791644A | 公开(公告)日 | 2006-06-21 |
| 申请号 | CN200480013569.6 | 申请日 | 2004-03-25 |
| [标]发明人 | 詹姆斯亚历山大·麦金托士 邓肯·亚当·维尔 彼得·海尔·莫斯克鲁索 丹尼尔·理查德·考夫兰 崔弘仑 | | |
| 发明人 | 詹姆斯·亚历山大·麦金托士 邓肯·亚当·维尔 彼得·海尔·莫斯克鲁索 丹尼尔·理查德·考夫兰 崔弘仑 | | |
| IPC分类号 | C09B67/00 C07K17/02 C09B13/00 C09B67/14 C09B67/18 C09B67/44 C12Q1/68 G01N33/533 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | C09B67/0083 C12Q1/6816 G01N33/6839 C12Q2563/107 C12Q2523/113 C12Q2527/125 | | |
| 优先权 | 2003901361 2003-03-25 AU | | |
| 其他公开文献 | CN100587010C | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明描述了增强荧光染料的荧光的方法和/或使荧光染料产生斯托克斯频移的方法，该方法包括使染料与碱和/或去污剂结合。该方法适合于使用荧光染料的化学技术和/或生物化学技术，尤其适合于诸如电泳等需要对有机分子进行染色或标记的技术。



(Ia)