



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103772437 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201410076390. 0

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 04

审查员 许敏

(73) 专利权人 华南师范大学

地址 510631 广东省广州市天河区石牌中山
大道西 55 号

(72) 发明人 邢达 周小明 廖玉辉

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 苏运贞

(51) Int. Cl.

C07F 15/00(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 27/26(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页

序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其
应用

(57) 摘要

本发明公开一种 pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其应用。本发明采用逐步降低 pH 值的结晶方法,使 pH 值由高到底降低,每降低 pH 值一个梯度就收集一次结晶,在整个降低过程中,三联吡啶钌结晶会源源不断地出现,直至 pH 降到最低。采用本发明的方法能大大提高产率,使三联吡啶钌的合成产率从 70% 左右提高到 89%,产率提升约 20% 左右,产率显著提高。以此为基点,我们将合成的三联吡啶钌应用到核酸检测领域,并验证了其用于核酸检测领域的可行性。本发明的 DNA 探针性质稳定,便于修饰及储存,操作简单。该方法适用于核酸检测,也可作为免疫分析中抗体标记的方法,以提高灵敏度。



1. 一种 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于包括如下步骤:

①称取二氯双(2, 2'-联吡啶)钕、 NaHCO_3 和 4-羧酸-2, 2'-联吡啶,混合;

②往步骤①得到的混合物中加入甲醇水溶液,得到混合液,混合液在硅油浴下回流,收集溶液;

③将步骤②中所得溶液在冰浴中冷却 2h;

④将 pH 值调到 4.4,形成沉淀;

⑤将步骤④中形成的沉淀过滤,收集滤液;

⑥往步骤⑤中所得滤液中加入 NaPF_6 水溶液,搅拌后进行反应;

⑦将 pH 值调到 4,冰浴 2h,观察结晶形成;

⑧抽滤并收集晶体,并保留滤液;将所得晶体进行干燥;

⑨取步骤⑧中所得滤液,将 pH 值调到 3,冰浴 2h,观察结晶形成;抽滤并收集晶体,并保留滤液;将所得晶体进行干燥;

⑩取步骤⑨中所得滤液,将 pH 值调到 2,冰浴 2h,观察结晶形成;抽滤并收集晶体,并保留滤液;将所得晶体进行干燥;

⑪取步骤⑩中所得滤液,将 pH 值调到 1,冰浴 2h,观察结晶形成;抽滤并收集晶体,将所得晶体进行干燥;

⑫将步骤⑧至⑪中所得晶体汇总,得到二(2, 2'-联吡啶)(4-羧酸-2, 2'-联吡啶)钕的二(六氟磷酸盐)结晶。

2. 根据权利要求 1 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于:步骤①中所述的二氯双(2, 2'-联吡啶)钕、 NaHCO_3 和 4-羧酸-2, 2'-联吡啶的质量比为 4:4:3;

步骤①中所述的二氯双(2, 2'-联吡啶)钕与步骤⑥中所述的 NaPF_6 的质量比为 2:25。

3. 根据权利要求 1 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于:步骤②中所述的混合液中各成分的终浓度为二氯双(2, 2'-联吡啶)钕 20g/L, NaHCO_3 20g/L, 4-羧酸-2, 2'-联吡啶 15g/L。

4. 根据权利要求 1 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于:步骤②中所述的甲醇水溶液为体积分数 80% 的甲醇水溶液;

步骤②所述的回流的条件为 80℃ 下回流加热 10h。

5. 根据权利要求 1 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于:步骤④、⑦、⑨、⑩和⑪中所述的 pH 值用 1mol/L 的 H_2SO_4 进行调节;

步骤⑤中所述的过滤为用滤纸过滤。

6. 根据权利要求 1 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于:步骤⑥中所述的 NaPF_6 水溶液为将 NaPF_6 溶于水中得到,浓度为 200g/L。

7. 根据权利要求 1 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法,其特征在于:步骤⑥中所述的反应为 37℃ 反应四个小时;

步骤⑧、⑨、⑩和⑪中所述的干燥为用真空冷冻干燥机干燥。

8. 权利要求 1 ~ 7 任一项所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法在核酸检测领域上的应用,其特征在于包括如下步骤:

(1) 通过上述方法合成二 (2, 2' - 联吡啶) (4- 羧酸 -2, 2' - 联吡啶) 钕的二 (六氟磷酸盐) 结晶;

(2) 三联吡啶钕的活化: 称量是根据晶体量调整的

①称取二环己基碳二亚胺 1.1635g 和 N- 羟基琥珀酰亚胺 0.5947g;

②搅拌条件下溶解于 7.7568mL 二甲基甲酰胺中, 然后冰浴冷却 1h;

③加入 0.1616g 步骤 (1) 合成的二 (2, 2' - 联吡啶) (4- 羧酸 -2, 2' - 联吡啶) 钕的二 (六氟磷酸盐), 混合物冰浴搅拌混匀;

④室温下密封振荡;

⑤通过吸滤装置除去所得沉淀, 滤液中含有活性的钕配合物, 即活化三联吡啶钕;

(3) 三联吡啶钕 DNA 探针的制备

①取一管 5' 端连六碳氨基探针离心;

②打开管盖, 并加入 75 μ L 0.1M、pH8.5 的硼酸钠溶液, 盖上管盖; 上下振荡 5min, 离心收集;

③加入 30 μ L 步骤 (2) ⑤中所得到的活化三联吡啶钕; 室温避光孵育 12 小时;

④加入 1mL 预冷无水乙醇, 低温放置 2 小时;

⑤离心, 倒去溶液, 加入 1mL 预冷无水乙醇洗涤, 低温放置 1 小时;

⑥离心, 倒去溶液, 加入 1mL 预冷体积百分比 80% 乙醇水溶液洗涤, 低温放置 1 小时;

⑦离心, 倒去溶液, 加入 1mL 预冷体积百分比 80% 乙醇水溶液洗涤, 低温放置 1 小时;

⑧离心, 倒去溶液, 加 20 μ L 水稀释, 得到三联吡啶钕 DNA 探针, 分成两管;

(4) 磁捕捉检测目标 DNA 序列:

(I) 取生物素探针、电化学探针, 靶序列溶解于水中, 终浓度为 10 μ M;

(II) 构建磁捕捉核酸检测体系: 体系总体积为 100 μ L, 生物素探针及电化学探针的终浓度为 100nM, PBS 缓冲液的终浓度为 1 $\times$ PBS 缓冲液, 加水补充至 100 μ L;

(III) 信号检测: 将步骤 (II) 的产物, 放入分析仪中检测电化学发光信号。

9. 根据权利要求 8 所述的应用, 其特征在于:

步骤 (2) ④所述的振荡的条件为 1500r/min 振荡 5h;

步骤 (3) ①和步骤 (3) ②中所述的离心的条件为 12000r/min 离心 5min;

步骤 (3) ⑤、⑥、⑦、⑧中所述的离心的条件为 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 离心 20min;

步骤 (3) ③中所述的避光为用黑胶布或锡箔纸进行避光;

步骤 (3) ④、⑤、⑥和⑦中所述的低温为 -86 $\sim$ -60 $^{\circ}$ C;

步骤 (4) (III) 所述的分析仪为罗氏 Elecsys2010 电化学发光全自动免疫分析仪。

10. 根据权利要求 8 所述的应用, 其特征在于: 步骤 (4) 中所述的生物素探针为 DNA 探针。

pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于三联吡啶钌合成及核酸电化学检测技术领域,特别涉及一种 pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其应用。

背景技术

[0002] 三联吡啶钌电化学发光 (Electrochemiluminescence, 简称 ECL) 具有原位响应、检测灵敏度高、线性范围宽和仪器简单等优点,在药物分析、氨基酸分析、DNA 探针分析、酶生物传感器领域得到了广泛应用。近年来,随着免疫分析与三联吡啶钌技术相结合,使得电化学免疫分析日益成为分子诊断的重要手段,并广泛的运用于临床分子诊断领域。因此,三联吡啶钌的需求量大大增加,然而其价格居高不下,给免疫分析带来了较高的成本。因此,发展一种高产率的三联吡啶钌合成方法具有重要意义。核酸电化学检测技术是重要的检测手段,广泛运用于免疫诊断、病原微生物筛查及环境监控等领域。该方法以分子生物学技术为检测基础(常利用核酸扩增技术)、以电化学发光原理为支撑,旨在于构建高灵敏度、快速及可靠的检测方法。得益于电化学发光原理的优越性,该方法具有较宽的检测范围、高灵敏度、反应体系可控及高信噪比等特点。

[0003] 现有的三联吡啶钌合成方法,通常采用降低 pH 值至 4.4 的单步结晶的方法,结晶完成时,其产率也只能达到 70% 左右。但反应溶液还有三联吡啶钌溶解其中,不能很好的收集三联吡啶钌。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供一种 pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法。本发明采用逐步降低 pH 值的方法,使 pH 值由高到底降低(从 pH 值为 4 一直降到 1,设置 4 个梯度,每降低一个梯度,pH 值降低 1),每降低 pH 值一个梯度就收集一次结晶,在整个降低过程中,三联吡啶钌结晶会源源不断的出现,直至 pH 降到最低。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供上述方法在核酸检测领域上的应用。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案实现:一种 pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法,包括如下步骤:

[0007] ①称取二氯双(2, 2'-联吡啶)钌、 NaHCO_3 和 4-羧酸-2, 2'-联吡啶,混合;

[0008] ②往步骤①得到的混合物中加入甲醇水溶液,得到混合液,混合液在硅油浴下回流,收集溶液;

[0009] ③将步骤②中所得溶液在冰浴(冰水混合物)中冷却 2h;

[0010] ④将 pH 值调到 4.4,形成沉淀;

[0011] ⑤将步骤④中形成的沉淀过滤,收集滤液;

[0012] ⑥往步骤⑤中所得滤液中加入 NaPF_6 水溶液,搅拌后进行反应;

[0013] ⑦将 pH 值调到 4,冰浴 2h,观察结晶形成;

- [0014] ⑧抽滤并收集晶体,并保留滤液;将所得晶体进行干燥;
- [0015] ⑨取步骤⑧中所得滤液,将 pH 值调到 3,冰浴 2h,观察结晶形成;抽滤并收集晶体,并保留滤液;将所得晶体进行干燥;
- [0016] ⑩取步骤⑨中所得滤液,将 pH 值调到 2,冰浴 2h,观察结晶形成;抽滤并收集晶体,并保留滤液;将所得晶体进行干燥;
- [0017] 1 ○ 1 取步骤⑩中所得滤液,将 pH 值调到 1,冰浴 2h,观察结晶形成;抽滤并收集晶体,将所得晶体进行干燥;
- [0018] 1 ○ 2 将步骤⑧至 1 ○ 1 中所得晶体汇总,得到二(2,2'-联吡啶)(4-羧酸-2,2'-联吡啶)钕的二(六氟磷酸盐)结晶。
- [0019] 步骤①中所述的二氯双(2,2'-联吡啶)钕、 NaHCO_3 和 4-羧酸-2,2'-联吡啶的质量比优选为 4:4:3;
- [0020] 步骤①中所述的二氯双(2,2'-联吡啶)钕与步骤⑥中所述的 NaPF_6 的质量比优选为 2:25;
- [0021] 步骤②中所述的甲醇水溶液优选为体积分数 80% 的甲醇水溶液;
- [0022] 步骤②中所述的混合液中各成分的终浓度优选为二氯双(2,2'-联吡啶)钕 20g/L, NaHCO_3 20g/L, 4-羧酸-2,2'-联吡啶 15g/L;
- [0023] 步骤②所述的回流的条件优选为 80℃ 下回流加热 10h;
- [0024] 步骤④、⑦、⑨、⑩和 1 ○ 1 中所述的 pH 值优选使用 1mol/L 的 H_2SO_4 进行调节;
- [0025] 步骤⑤中所述的过滤优选为用滤纸过滤;
- [0026] 步骤⑥中所述的 NaPF_6 水溶液优选为将 NaPF_6 溶于水中得到,浓度为 200g/L;
- [0027] 步骤⑥中所述的反应优选为 37℃ 反应四个小时;
- [0028] 步骤⑧、⑨、⑩和 1 ○ 1 中所述的干燥优选为用真空冷冻干燥机干燥,去除挥发性物质甲醇及水;
- [0029] 所述的 pH 值依赖的三联吡啶钕重复结晶合成法在核酸检测领域上的应用,包括如下步骤:
- [0030] (1) 通过上述方法合成二(2,2'-联吡啶)(4-羧酸-2,2'-联吡啶)钕的二(六氟磷酸盐)结晶;
- [0031] (2) 三联吡啶钕的活化:(称量是根据晶体量调整的)
- [0032] ①称取二环己基碳二亚胺(DCC) 1.1635g 和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 0.5947g;
- [0033] ②搅拌条件下溶解于 7.7568mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,然后冰浴冷却 1h;
- [0034] ③加入 0.1616g 步骤(1)合成的二(2,2'-联吡啶)(4-羧酸-2,2'-联吡啶)钕的二(六氟磷酸盐),混合物冰浴搅拌混匀;
- [0035] ④室温下密封振荡;
- [0036] ⑤通过吸滤装置除去所得沉淀,滤液中含有活性的钕配合物,即活化三联吡啶钕;
- [0037] (3) 三联吡啶钕 DNA 探针的制备
- [0038] ①取一管 5 端连六碳氨基探针(2.50D)离心,使粘在管壁上的 DNA 落入管底;
- [0039] ②打开管盖,并加入 75 μL 0.1M、pH8.5 的硼酸钠溶液,盖上管盖;上下振荡 5min,离心收集;

- [0040] ③加入 30 μL 步骤(2)⑤中所得到的活化三联吡啶钌；室温避光孵育 12 小时；
- [0041] ④加入 1mL 预冷无水乙醇(沉淀 DNA)，低温放置 2 小时；
- [0042] ⑤离心，倒去溶液，加入 1mL 预冷无水乙醇洗涤，低温放置 1 小时；
- [0043] ⑥离心，倒去溶液，加入 1mL 预冷 80% (v/v) 乙醇水溶液洗涤，低温放置 1 小时；
- [0044] ⑦离心，倒去溶液，加入 1mL 预冷 80% (v/v) 乙醇水溶液洗涤，低温放置 1 小时；
- [0045] ⑧离心，倒去溶液，加 20 μL 水稀释，得到三联吡啶钌 DNA 探针，分成两管；
- [0046] (4) 磁捕捉检测目标 DNA 序列：
- [0047] 本部分以传统的磁捕捉及“sandwich”模型为基础，构建了一种三联吡啶钌为信号放大基团的核酸检测方法；
- [0048] (I) 取生物素探针、电化学探针，靶序列溶解于水中，终浓度为 10 μM ；
- [0049] (II) 构建磁捕捉核酸检测体系：体系总体积为 100 μL ，生物素探针及电化学探针的终浓度为 100nM，PBS 缓冲液的终浓度为 1 $\times$ PBS 缓冲液，加水补充至 100 μL ；
- [0050] (III) 信号检测：将步骤(II)的产物，放入分析仪中检测电化学发光信号。
- [0051] 步骤(2)④所述的振荡的条件优选为 1500r/min 振荡 5h；
- [0052] 步骤(3)①和步骤(3)②中所述的离心的条件优选为 12000r/min 离心 5min；
- [0053] 步骤(3)⑦、⑧、⑨、⑩中所述的离心的条件优选为 4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000rpm 离心 20min；
- [0054] 步骤(3)③中所述的避光优选为用黑胶布或锡箔纸进行避光；
- [0055] 步骤(3)④、⑤、⑥和⑦中所述的低温优选为 -86 $\sim$ -60 $^{\circ}\text{C}$ ；
- [0056] 步骤(4)中所述的生物素探针优选为 DNA 探针；
- [0057] 步骤(4)(III)所述的分析仪优选为罗氏 Elecsys2010 电化学发光全自动免疫分析仪。
- [0058] 本发明相对于现有技术，具有如下的优点及效果：
- [0059] (1) 本发明采用 pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成方法合成三联吡啶钌，能大大提高产率，使三联吡啶钌的合成产率从 70% 左右提高到 89%，产率提升约 20% 左右，产率显著提高。以此为基点，我们将合成的三联吡啶钌应用到核酸检测领域，并验证了其用于核酸检测领域的可行性。
- [0060] (2) 本发明的发明人在实验过程中发现如果将 pH 值再调低，结晶又会出现。因此，设计一种采用梯度 pH 值的结晶方法，多步结晶提高产率，以达到节约合成成本。
- [0061] (3) 本发明最终可得到纯度高的活化钌。
- [0062] (4) 本发明的 DNA 探针性质稳定，便于修饰及储存，操作简单。
- [0063] (5) 适用于核酸检测：该实验原理可用于 DNA 及 RNA 的检测。
- [0064] (6) 本发明亦可作为免疫分析中抗体标记的方法，以提高灵敏度。

附图说明

- [0065] 图 1 是三联吡啶钌合成及其活化过程原理图。
- [0066] 图 2 是磁捕捉“sandwich”模型原理图。
- [0067] 图 3 是实施例 1 获得的三联吡啶钌的吸收光谱图。
- [0068] 图 4 是实施例 1 所得的活化三联吡啶钌的吸收光谱图。
- [0069] 图 5 是实施例 1 所得的活化三联吡啶钌的荧光光谱图。

[0070] 图 6 是实施例 1 所得的三联吡啶钌结晶的粒径图。

[0071] 图 7 是实施例 2 所得 DNA 探针标记三联吡啶钌前后的质谱图 ; 其中图 A 为 DNA 探针标记三联吡啶钌前的质谱图 ; 其中图 B 为 DNA 探针标记三联吡啶钌后的质谱图。

[0072] 图 8 是实施例 3 中目标序列检测电化学发光强度图。

具体实施方式

[0073] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述, 但本发明的实施方式不限于此。

[0074] 实施例 1 三联吡啶钌的合成及活化

[0075] (1) pH 值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法

[0076] ①称取 : 二氯双 (2, 2'-联吡啶) 钌 0.2g, NaHCO_3 0.2g, 4-羧酸 -2, 2'-联吡啶 0.15g ;

[0077] ②加入 10mL 体积分数 80% 甲醇水溶液, 混合液在硅油浴下加热并回流 12 小时, 收集溶液 ;

[0078] ③将步骤②中所得溶液在冰浴 (冰水混合物) 中冷却 2h ;

[0079] ④用 1mol/L 的 H_2SO_4 将 pH 值调到 4.4 (精密 pH 试纸定标), 形成沉淀 ;

[0080] ⑤将步骤④中形成的沉淀用滤纸过滤, 收集滤液 ;

[0081] ⑥将步骤⑤中所得滤液中加入 12.5mL NaPF_6 水溶液 (2.5g NaPF_6 溶于 12.5mL 水中), 搅拌后置于 37℃ 环境反应四个小时。

[0082] ⑦用 1mol/L 的 H_2SO_4 将 pH 值调到 4, 冰浴两小时, 观察结晶形成。

[0083] ⑧抽滤并收集晶体, 并保留滤液。所得晶体用真空冷冻干燥机干燥去除挥发性物质甲醇及水。

[0084] ⑨取步骤⑧中所得滤液, 用 1mol/L 的 H_2SO_4 将 pH 值调到 3, 冰浴两小时, 观察结晶形成。抽滤并收集晶体, 并保留滤液。所得晶体用真空冷冻干燥机干燥。

[0085] ⑩取步骤⑨中所得滤液, 用 1mol/L 的 H_2SO_4 将 pH 值调到 2, 冰浴两小时, 观察结晶形成。抽滤并收集晶体, 并保留滤液。所得晶体用真空冷冻干燥机干燥。

[0086] 1 ○ 1 取步骤⑩中所得滤液, 用 1mol/L 的 H_2SO_4 将 pH 值调到 1, 冰浴两小时, 观察结晶形成。抽滤并收集晶体。所得晶体用真空冷冻干燥机干燥。

[0087] 1 ○ 2 将步骤⑧至 1 ○ 1 中所得晶体汇总, 得到二 (2, 2'-联吡啶) (4-羧酸 -2, 2'-联吡啶) 钌的 (六氟磷酸盐) 晶体并称量, 计算产率。二 (2, 2'-联吡啶) (4-羧酸 -2, 2'-联吡啶) 钌的 (六氟磷酸盐) 晶体的产率达到理论值的 89% (质量百分比)。

[0088] 取部分所得结晶溶解于水后测量吸收光谱, 所得实验结果如图 3 所示。在 480nm 处有明显的吸收峰。

[0089] (2) 三联吡啶钌的活化 : (称量是根据晶体量调整的)

[0090] ①称取 : 二环己基碳二亚胺 (DCC) 1.1635g, N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 0.5947g ;

[0091] ②搅拌条件下溶解于 7.7568mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 然后冰浴冷却 1h ;

[0092] ③加入 0.1616g 步骤 (1) 合成的二 (2, 2'-联吡啶) (4-羧酸 -2, 2'-联吡啶) 钌的六氟磷酸盐晶体, 混合物冰浴搅拌混匀 ;

[0093] ④室温下密封振荡 ;

[0094] ⑤通过吸滤装置除去所得沉淀,滤液中含有活性的钌配合物,即活化三联吡啶钌,密封并做防水处理,保存于 -20°C 。

[0095] 将所得活化三联吡啶钌用吸收光谱去表征质量的好坏;活化三联吡啶钌在 480nm 处具有明显的吸收峰,实验结果如图 4 所示。并用 480nm 激发测量其荧光光谱,所得实验结果如图 5 所示。所得结晶用纳米粒度仪测量了其晶体直径,实验结果如图 6 所示。

[0096] 实施例 2 三联吡啶钌 DNA 探针的制备

[0097] ①取一管 5 端连六碳氨基探针(2.50D)(购自上海生工生物工程有限公司)离心 5 分钟,使粘在管壁上的 DNA 落入管底。

[0098] ②轻轻的打开管盖,并迅速加入 $75\mu\text{L}$ 0.1M 硼酸钠(pH8.5),立即盖上管盖。充分上下振荡 5min,离心收集。

[0099] ③加入 $30\mu\text{L}$ 的实施例 1 中步骤(2)⑤获得的活化三联吡啶钌。缠上黑胶布,置离心管架上避光孵育 12 小时。

[0100] ④往上述管中各加入 1mL 预冷无水乙醇(沉淀 DNA),放入超低温冰箱中 2 小时。

[0101] ⑤离心,12000rpm, 4°C ,20min。倒去橙色溶液,加入 1mL 预冷无水乙醇洗涤,放入超低温冰箱中 1 小时。

[0102] ⑥离心,12000rpm, 4°C ,20min。倒去浅黄色溶液,加入 1mL 预冷 80% (v/v)乙醇水溶液洗涤,放入超低温冰箱中 1 小时。

[0103] ⑦离心,12000rpm, 4°C ,20min。倒去溶液,加入 1mL 预冷 80% (v/v)乙醇水溶液洗涤,放入超低温冰箱中 1 小时。

[0104] ⑧离心,12000rpm, 4°C ,20min,倒去溶液。加 $20\mu\text{L}$ 水稀释,由于损失比较大分成两管进行下面的实验。DNA 标记前及标记后的质谱图如图 7A、B 所示。

[0105] 实施例 3 磁捕捉检测目标 DNA 序列:

[0106] 本部分以传统的磁捕捉及“sandwich”模型为基础,构建了一种三联吡啶钌为信号放大基团的核酸检测方法(原理图如图 2 所示)。该方法包含有两种探针,生物素探针及电化学探针,生物素探针用于捕捉目标序列并可连接到磁珠上,实现磁捕捉,5' 端标记有生物素,其序列为:5' -Biotin-TTTTTGGAGCACCCACGTGTCCTGGCC-3';电化学探针用于标记三联吡啶钌并作为电化学信号给出探针,3' 端标记有氨基(用于 DNA 与三联吡啶钌的羧基连接),其序列为:5' -GCTCAGTTTACTAGTGCCATTT-NH₂-3'。核酸靶序列为:5' -ACTAGTAACTGAGCATACTGGCCAGGACACGTGGGTGC-3',该序列是乙肝病毒的 pre-s 基因的部分序列。

[0107] (I) 取生物素探针、靶序列溶解于水中,终浓度为 $10\mu\text{M}$ 。

[0108] (II) 构建磁捕捉核酸检测体系:体系总体积为 $100\mu\text{L}$,生物素探针及电化学探针的终浓度为 100nM, PBS 缓冲液的终浓度为 $1\times\text{PBS}$ 缓冲液(即用 0.1M 的 PBS 配制),加水补充至 $100\mu\text{L}$ 。

[0109] (III) 信号检测:将步骤(II)的产物,放入罗氏 Elecsys2010 电化学发光全自动免疫分析仪中检测电化学发光信号,并记录数据。实验结果如图 8 所示。结果显示,以三联吡啶钌为信号基团,电化学发光信号明显增强。

[0110] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

序 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> 华南师范大学

<120> pH值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其应用

<130> 1

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 5' 端标记

<220>

<221> Biotin标记

<222> (1).. (1)

<400> 1

tttttggagc acccacgtgt cctggcc

27

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 3' 端标记

<220>

<221> NH2标记

<222> (22).. (22)

<400> 2

gctcagttta ctagtgccat tt

22

[0002]

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 核酸靶序列

<400> 3

actagtaaac tgagcatact ggccaggaca cgtgggtgc

39

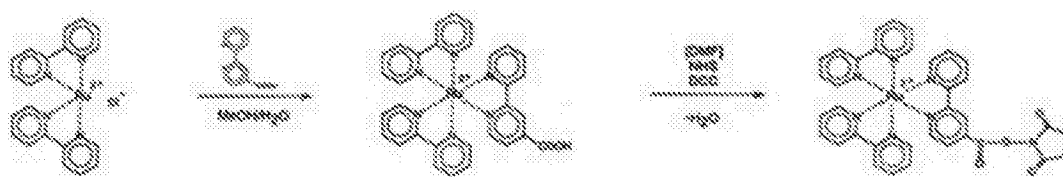


图 1

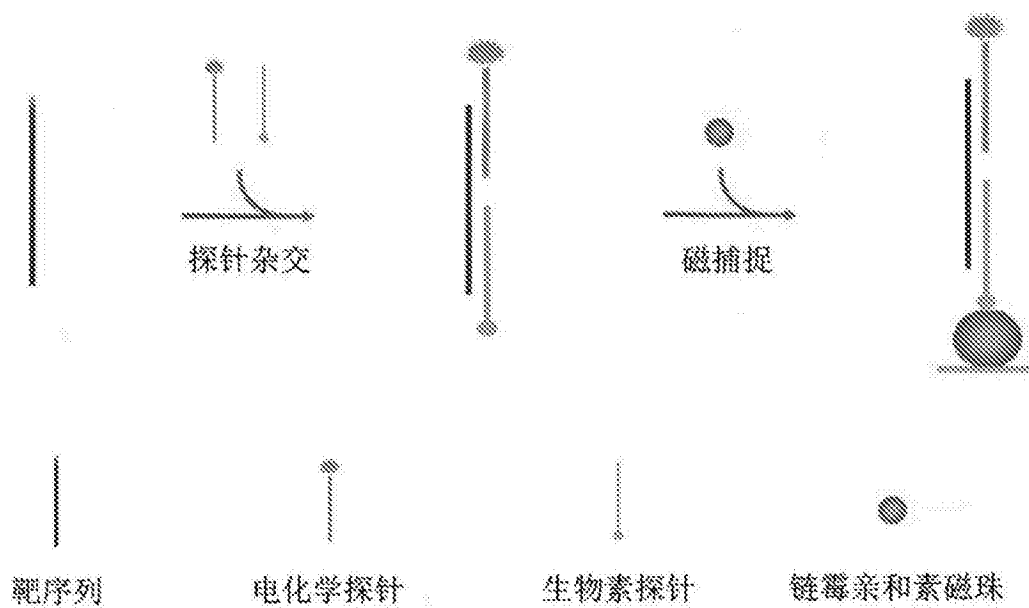


图 2

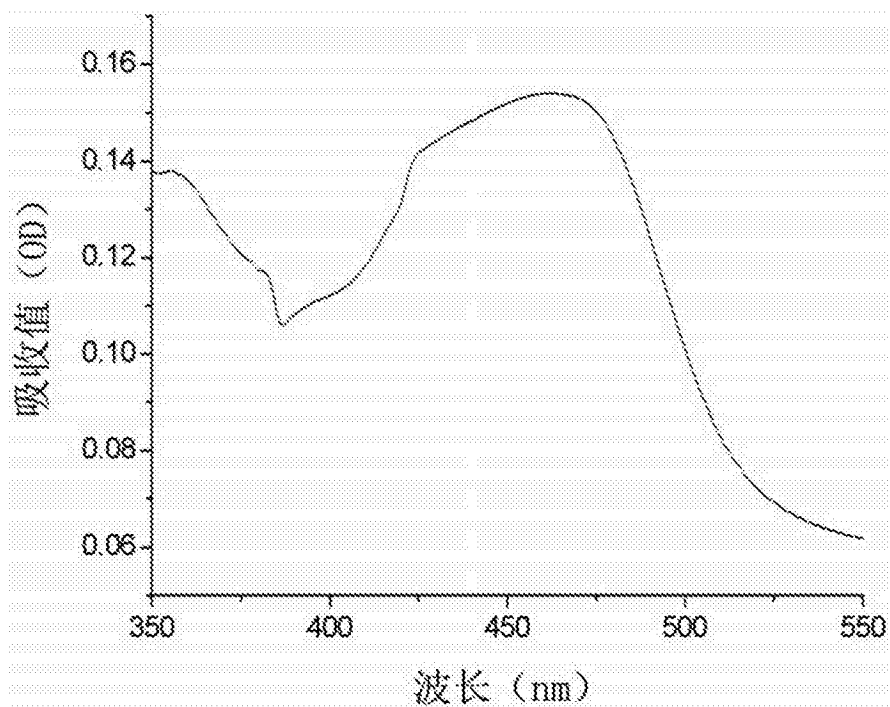


图 3

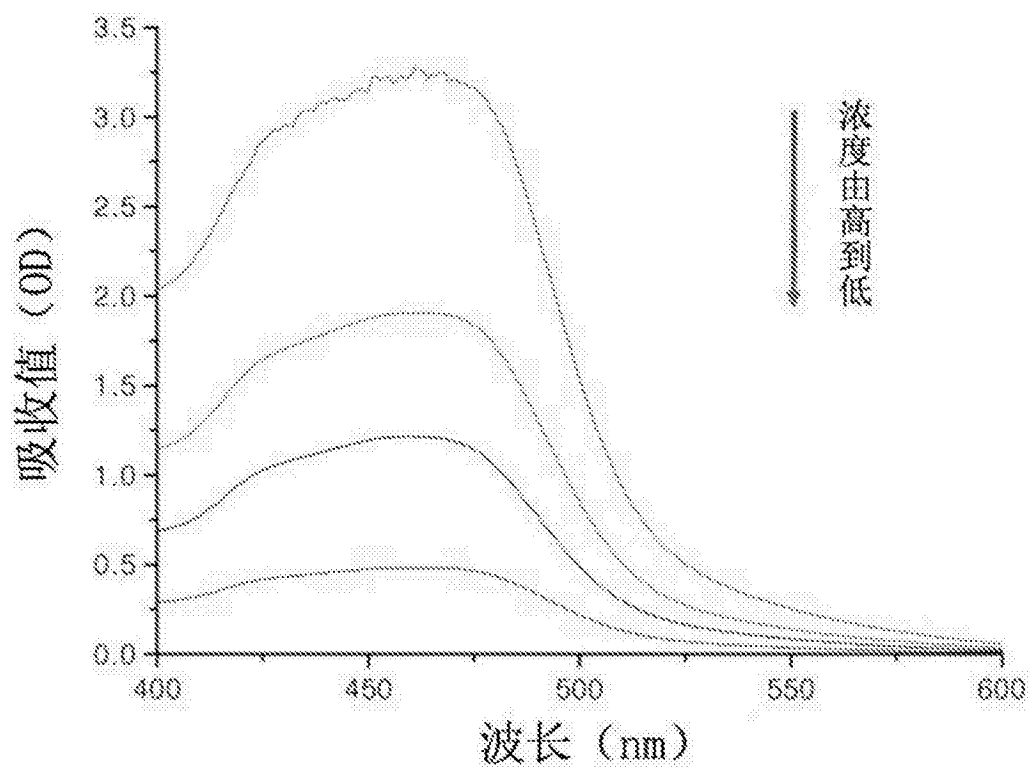


图 4

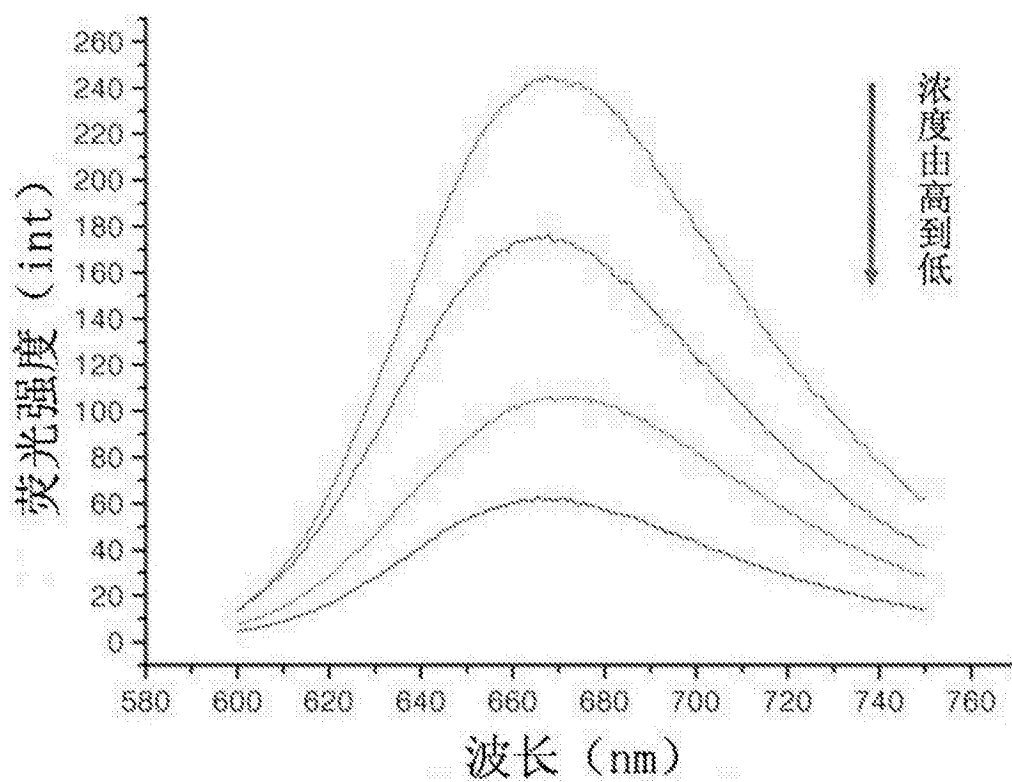


图 5

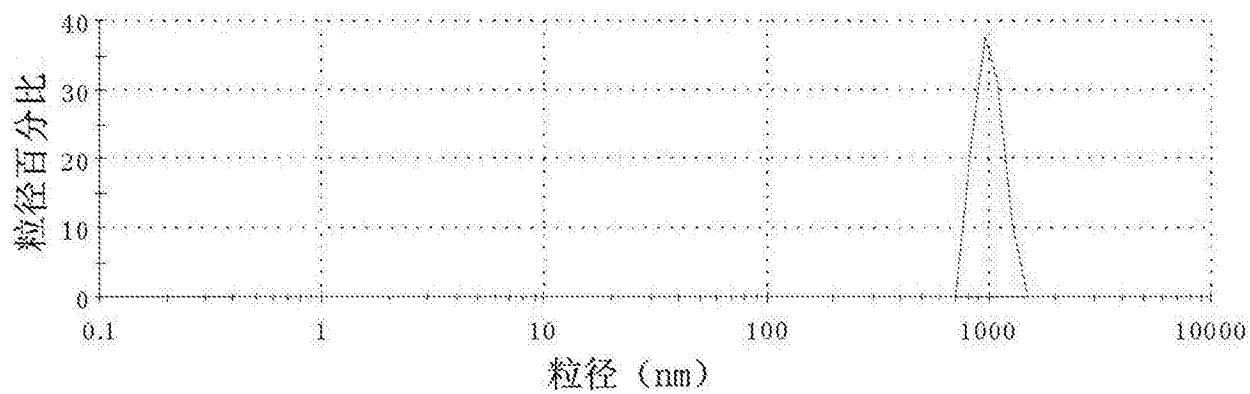
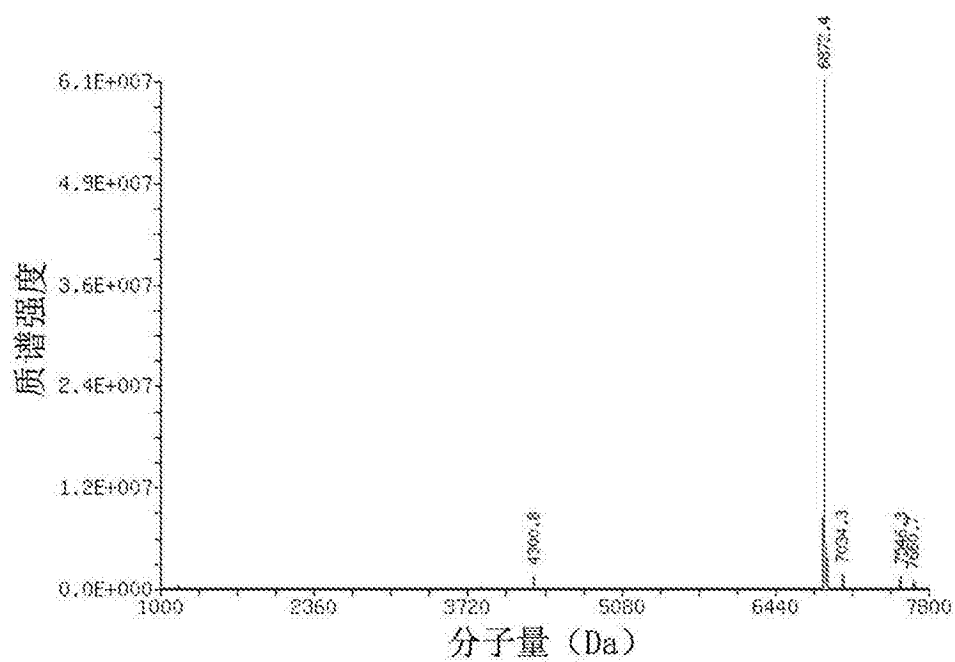
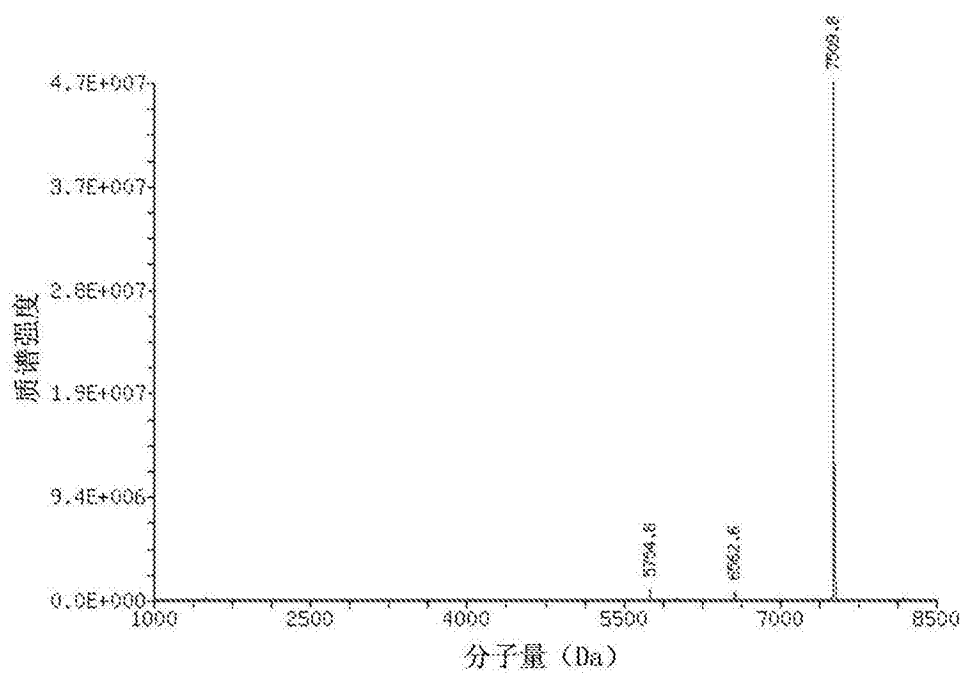


图 6



A



B

图 7

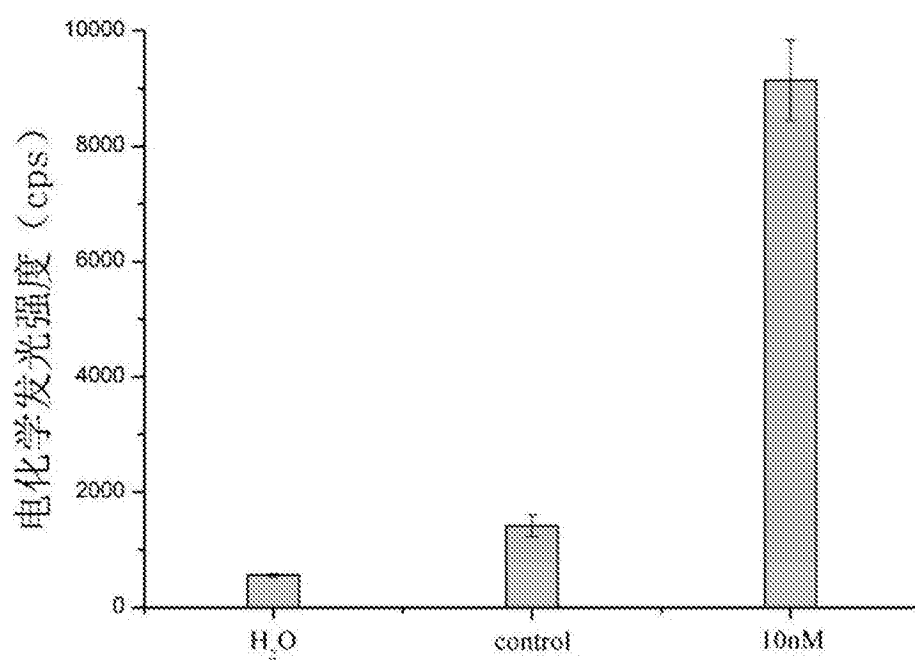


图 8

专利名称(译)	pH值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其应用		
公开(公告)号	CN103772437B	公开(公告)日	2015-12-02
申请号	CN201410076390.0	申请日	2014-03-04
[标]申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南师范大学		
[标]发明人	邢达 周小明 廖玉辉		
发明人	邢达 周小明 廖玉辉		
IPC分类号	C07F15/00 C12Q1/68 G01N27/26 G01N21/76 G01N33/53		
审查员(译)	许敏		
其他公开文献	CN103772437A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种pH值依赖的三联吡啶钌重复结晶合成法及其应用。本发明采用逐步降低pH值的结晶方法，使pH值由高到底降低，每降低pH值一个梯度就收集一次结晶，在整个降低过程中，三联吡啶钌结晶会源源不断地出现，直至pH降到最低。采用本发明的方法能大大提高产率，使三联吡啶钌的合成产率从70%左右提高到89%，产率提升约20%左右，产率显著提高。以此为基点，我们将合成的三联吡啶钌应用到核酸检测领域，并验证了其用于核酸检测领域的可行性。本发明的DNA探针性质稳定，便于修饰及储存，操作简单。该方法适用于核酸检测，也可作为免疫分析中抗体标记的方法，以提高灵敏度。

