



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118956171 A
(43) 申请公布日 2024.11.15

(21) 申请号 202410880273.3

C09B 23/04 (2006.01)

(22) 申请日 2024.07.02

C09B 57/00 (2006.01)

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

C09K 11/06 (2006.01)

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 蓝琳 王志明 刘勇
龚晚君

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理人 江裕强 刘远

(51) Int.Cl.

C09B 23/14 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

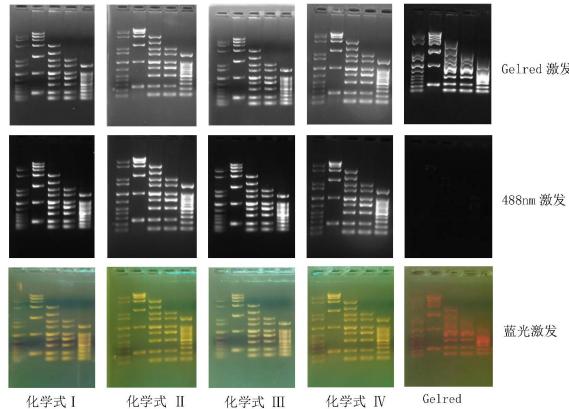
权利要求书4页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

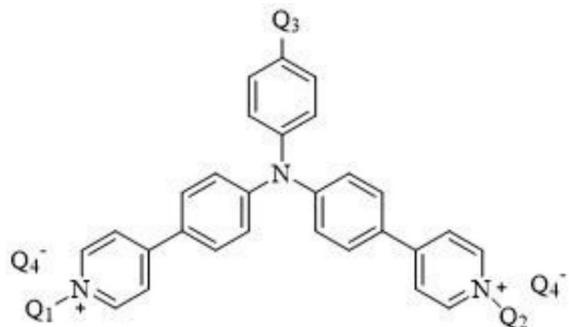
一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料及其应用

(57) 摘要

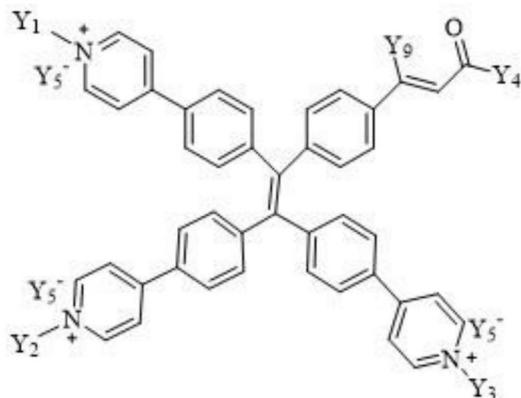
本发明公开了一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料及其应用，所述基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料包括式(1)、式(2)中任意一种结构的AIE分子。本发明基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料用于核酸电泳常见的凝胶成像染色，可同时适用于琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳，尤其可用蓝光成像。本发明的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料，集染色效果好、灵敏度高、染色时间短、以及适应现有的所有染料激发通道，成为与激光扫描仪配合使用的理想选择。有效解决了现有核酸染料，由于染色效果差、应用在聚丙烯酰胺凝胶电泳时，灵敏度较低的缺陷，尤其解决了现有染料激发通道比较单一等问题。



1. 一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料, 其特征在于, 包括式(1)、式(2)中任意一种结构的AIE分子;

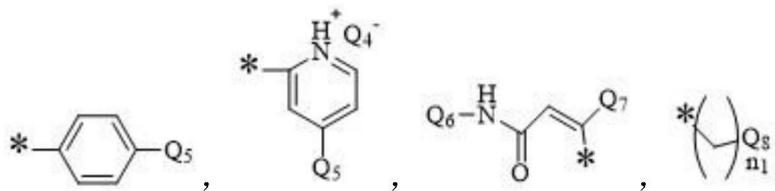


式 (1)

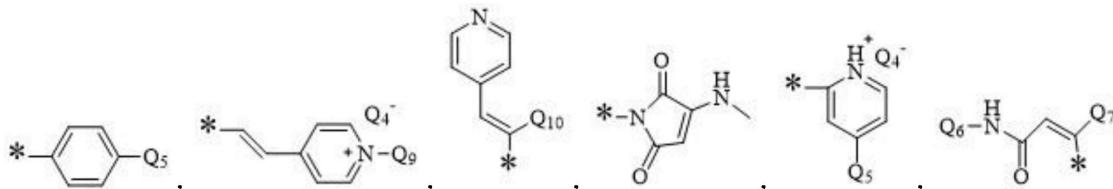


式 (2)

式(1)中, Q_1, Q_2 各自独立选自以下结构中的一种:



Q_3 选自以下结构中的一种:



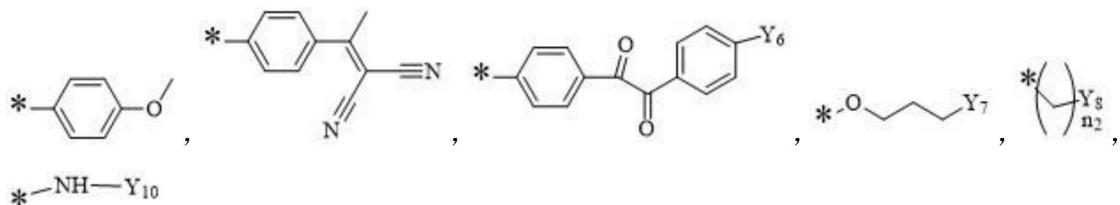
Q_4^- 各自独立为阴离子;

$Q_5, Q_6, Q_7, Q_8, Q_9, Q_{10}$ 各自独立选自 $-H, -NH_2, -COOH, -CN, -CHO, -OH, -CH_3$ 中的一种;

n_1 为大于等于1的整数;

其中,*表示取代位置;

式(2)中, Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 各自独立选自以下结构中的一种:



Y_5^- 各自独立为阴离子；

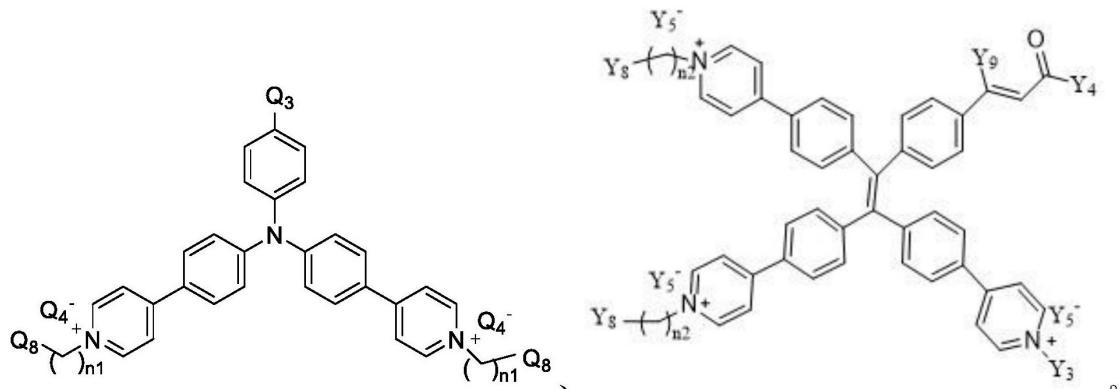
$\text{Y}_6, \text{Y}_7, \text{Y}_8, \text{Y}_9, \text{Y}_{10}$ 各自独立选自-H, -COOH, -CN, -CHO, -OH, -CH₃中的一种；

n_2 为大于等于1的整数；

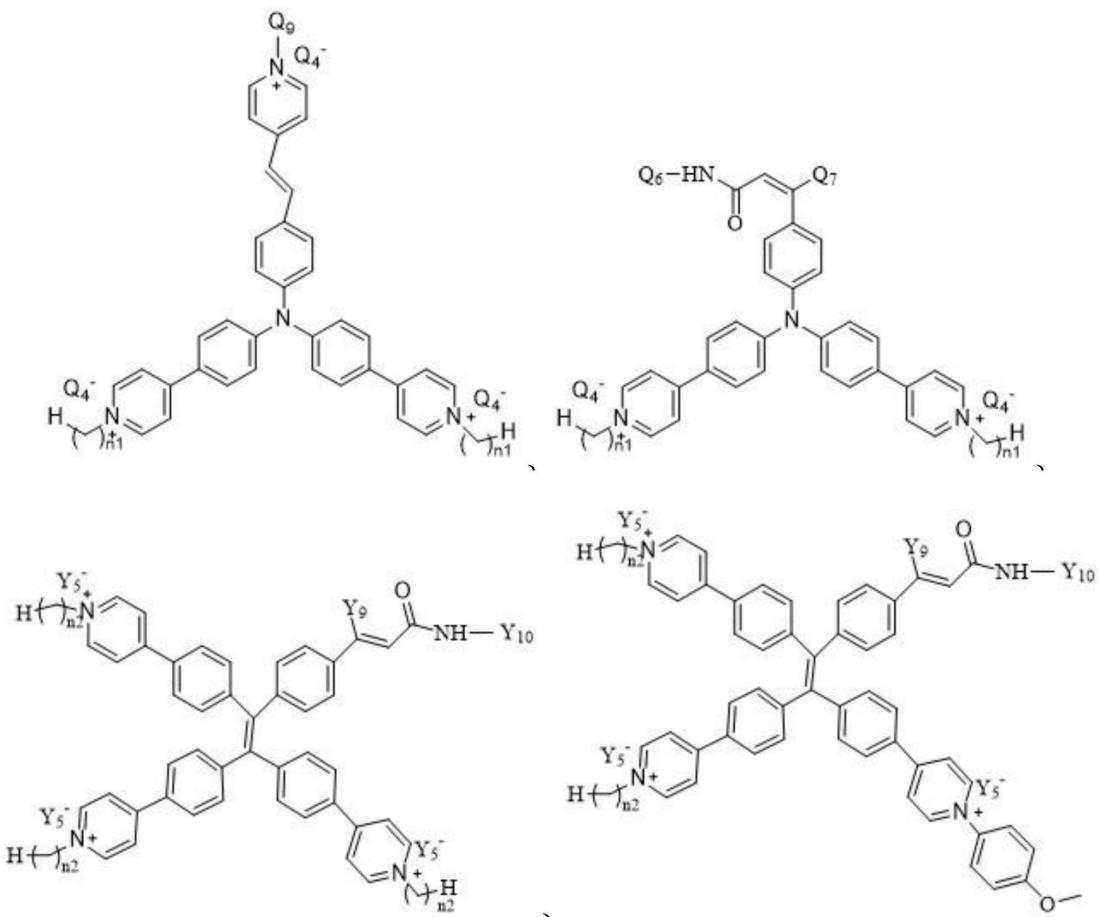
其中,*表示取代位置。

2. 根据权利要求1所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,式(1)中, Q_1 与 Q_2 结构相同;式(2)中, Y_1 与 Y_2 结构相同,或者, Y_2 与 Y_3 结构相同。

3. 根据权利要求2所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,包括以下任意一种结构的AIE分子:

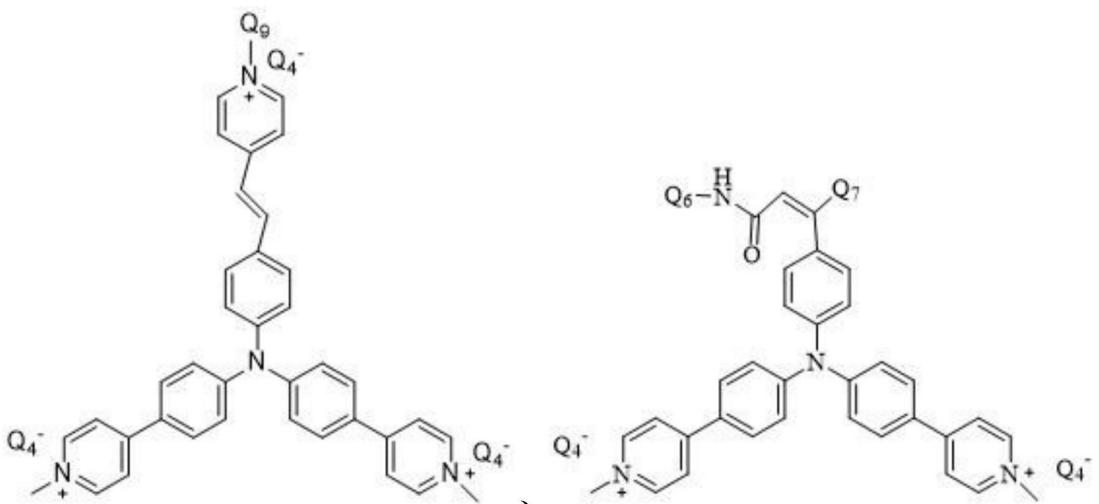


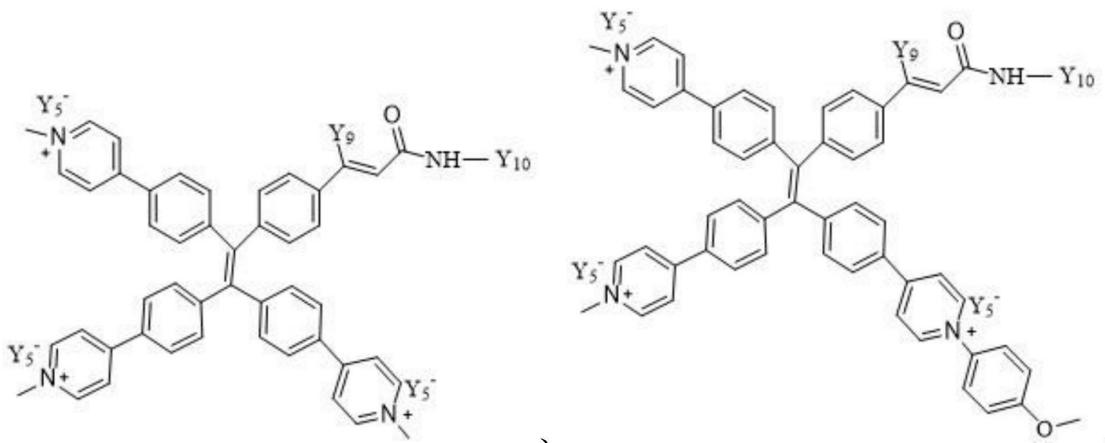
4. 根据权利要求3所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,包括以下任意一种结构的AIE分子:



5. 根据权利要求4所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,所述 Q_6 , Q_7 , Q_9 , Y_9 , Y_{10} 各自独立选自-H, -COOH, -OH, -CH₃中的一种。

6. 根据权利要求4所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,包括以下任意一种结构的AIE分子:





7. 根据权利要求1所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,所述n₁为1-4的整数;所述n₂为1-4的整数。

8. 根据权利要求1所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,其特征在于,所述阴离子选自F⁻、Cl⁻、Br⁻、I⁻、NO₂⁻、NO₃⁻、PF₆⁻、CF₃SO₃⁻、ClO₄⁻中的一种;

所述核酸凝胶染料还包括溶剂;所述溶剂包括二甲基亚砜、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺、水、甲醇中的至少一种。

9. 权利要求1~8任一项所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料在琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳的激发通道为蓝光。

一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,具体涉及一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料及其应用。

背景技术

[0002] 核酸电泳是研究核酸性质的一种相对简单、快速和高灵敏度的工具。它是核酸探针、核酸扩增和序列分析等技术所不可或缺的组成部分。核酸电泳方式通常分为琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳两种。琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖,许多琼脂糖依据氢键及其它力的作用使其相互盘绕形成绳状琼脂糖束,构成大网孔型凝胶。不同浓度的琼脂糖可形成分子筛网孔大小不同的凝胶,用于分离不同分子量的核酸片段,可对相差100bp的DNA片段进行区分,适用于分子量较大的样品,如细菌或病毒等的基因组序列、大分子片段的核酸等。聚丙烯酰胺凝胶是密集程度非常高的高聚物,具有分子筛效应、浓缩效应、电荷效应,对于小片段DNA(5bp-500bp)的分离效果最好。琼脂糖的分辨率低于聚丙烯酰胺凝胶,如需分辨率特别高的电泳,特别是只有几个bp区别的片段时,应该选择聚丙烯酰胺凝胶电泳。

[0003] 常用的核酸电泳染料有EB、SYBR Green、SYBR Gold、GelRed和GelGreen等。不同核酸染料的激发波长存在差异,且这些染料的激发波长范围小,在凝胶成像系统上能兼容的通道比较单一。目前,用于核酸电泳常见的凝胶成像仪分为两类波段,即紫外凝胶成像系统和蓝光凝胶成像仪(或蓝光切胶仪)。紫外长时间照射对核酸(DNA)以及对实验人员都有一定的危害性,因而未来的核酸染料更趋向安全无毒的蓝光核酸染料。

[0004] 现有的核酸染料,如GelGreen染料安全无毒,灵敏度也高,但是应用在聚丙烯酰胺凝胶电泳中的染色效果不佳,且染色时间较长。其原因是:聚丙烯酰胺凝胶密是密集程度更高的三维空间的高聚物。这种高密集聚合物结构,使得在分离不同大小范围、不同浓度范围的核酸分子时,作为核酸凝胶染料的荧光染料很难渗透进去以致核酸染色效果不佳。另外,现有染料在应用上也有很多限制,譬如对于LAMP这种扩增产物,现有的很多核酸染料总是出现拖带形式,难以呈现出清晰可见的梯形条带。

[0005] 综上所述,现有技术主要存在二大问题:

[0006] 第一个问题问题是现有的染料分子的激发波长比较窄,使得其在仪器上的激发通道比较单一,限制了染料的使用。并且有部分染料在蓝光下激发效果不佳,甚至不能在蓝光下激发,而长时间用紫外照射对核酸(DNA)以及对实验人员都有一定的危害性;

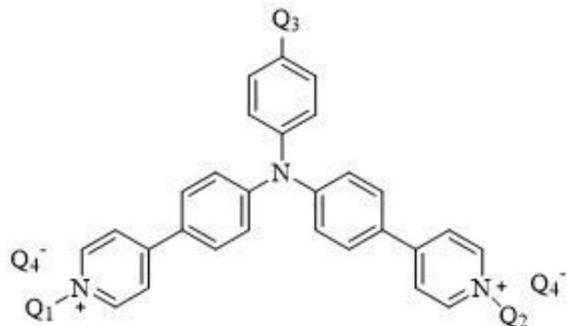
[0007] 第二个问题是由于聚丙烯酰胺凝胶是密集程度更高的三维空间的高聚物,这种高密集聚合物结构,使得在分离不同大小范围,不同浓度范围的核酸分子时,现有的多种作为核酸凝胶染料的荧光染料很难渗透进去以致核酸染色效果不佳,且染色时间过长。因此,开发一种同时适用于琼脂糖凝胶电泳和高密集程度的聚丙烯酰胺凝胶电泳且可在蓝光下激发的核酸染料,具有很大的市场前景。

发明内容

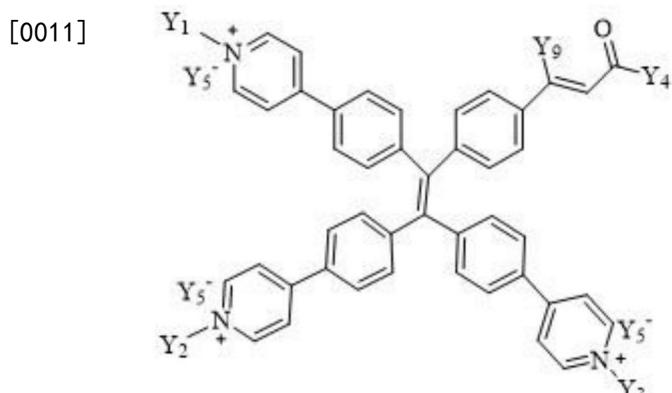
[0008] 为解决上述的技术问题,本发明提供了一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料及其应用;本发明的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料可同时适用于琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳,尤其可用蓝光成像。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 一种基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料,包括式(1)、式(2)中任意一种结构的AIE分子;

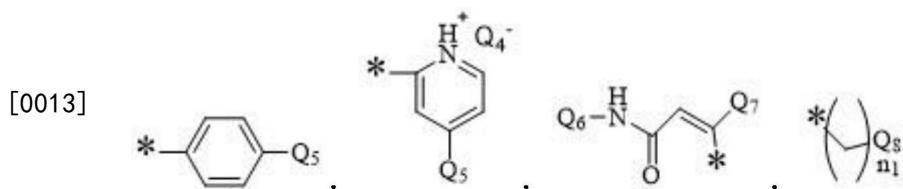


式 (1)

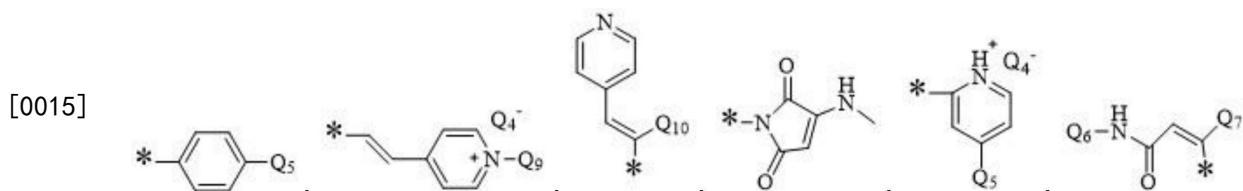


式 (2)

[0012] 式(1)中,Q₁,Q₂各自独立选自以下结构中的一种:



[0014] Q₃选自以下结构中的一种:



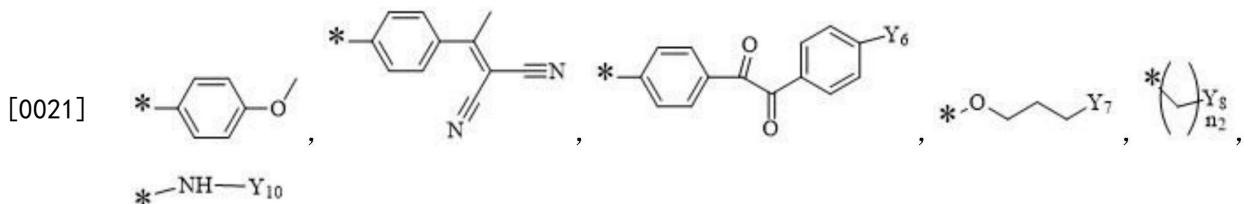
[0016] Q₄⁻各自独立为阴离子;

[0017] Q₅,Q₆,Q₇,Q₈,Q₉,Q₁₀各自独立选自-H,-NH₂,-COOH,-CN,-CHO,-OH,-CH₃中的一种;

[0018] n_1 为大于等于1的整数；

[0019] 其中,*表示取代位置；

[0020] 式(2)中, Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 各自独立选自以下结构中的一种：



[0022] Y_5^- 各自独立为阴离子；

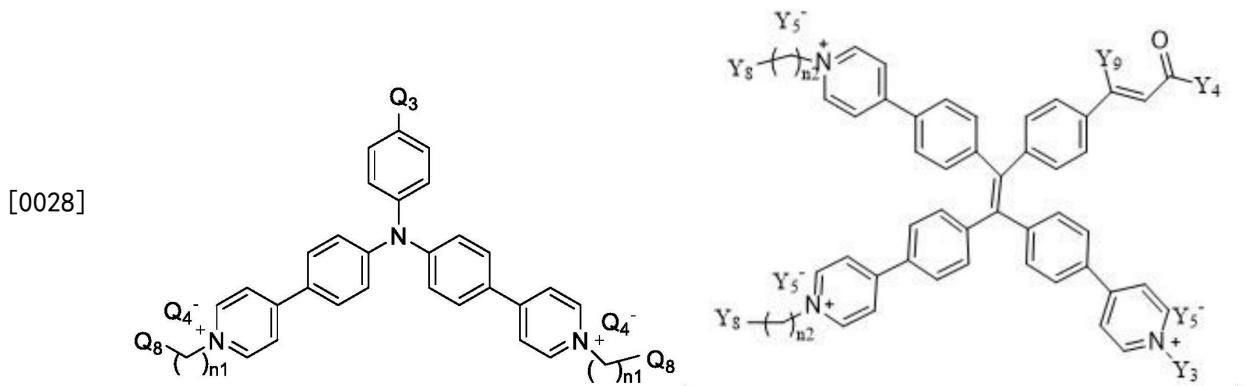
[0023] Y_6 , Y_7 , Y_8 , Y_9 , Y_{10} 各自独立选自-H,-COOH,-CN,-CHO,-OH,-CH₃中的一种；

[0024] n_2 为大于等于1的整数；

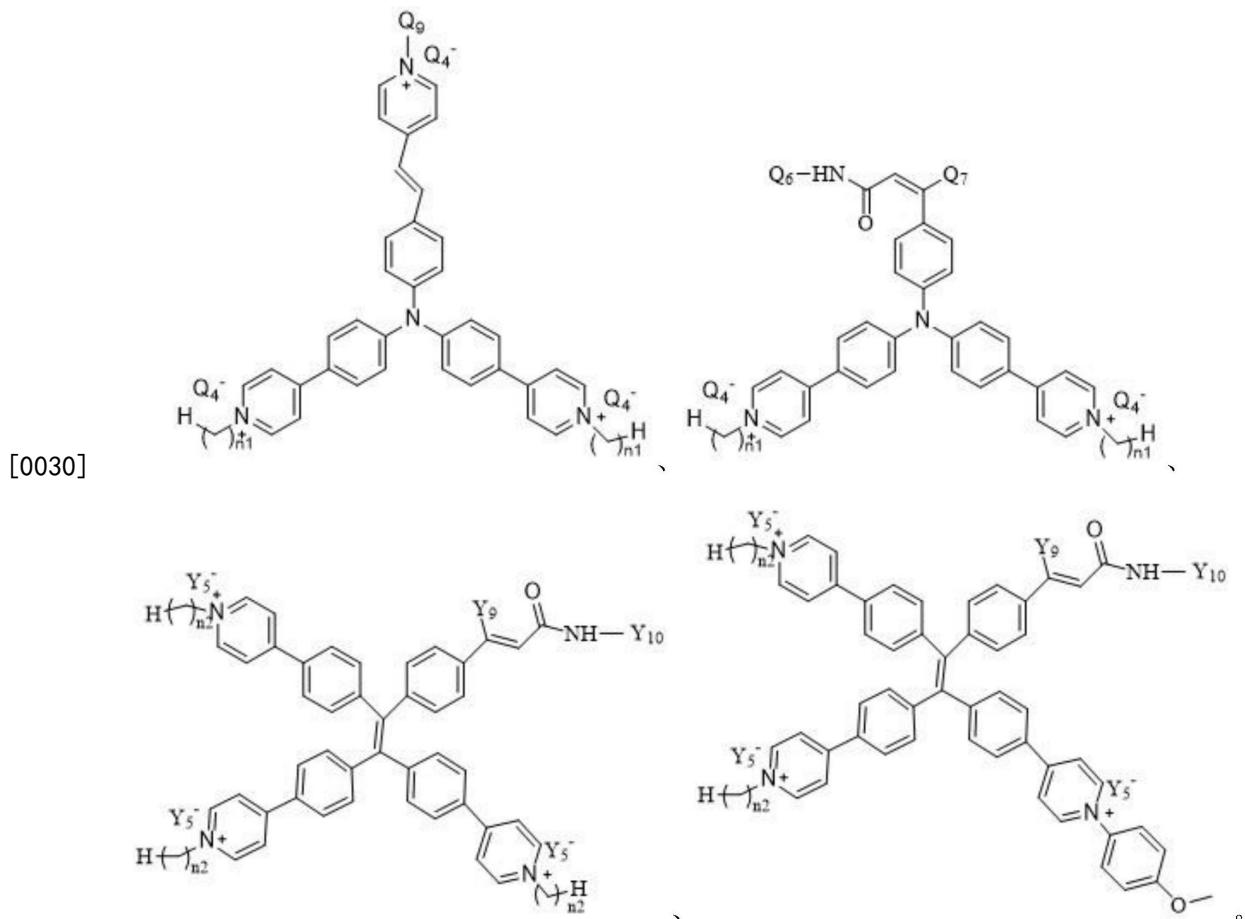
[0025] 其中,*表示取代位置。

[0026] 优选的,式(1)中, Q_1 与 Q_2 结构相同;式(2)中, Y_1 与 Y_2 结构相同,或者, Y_2 与 Y_3 结构相同。

[0027] 优选的,所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料包括以下任意一种结构的AIE分子：

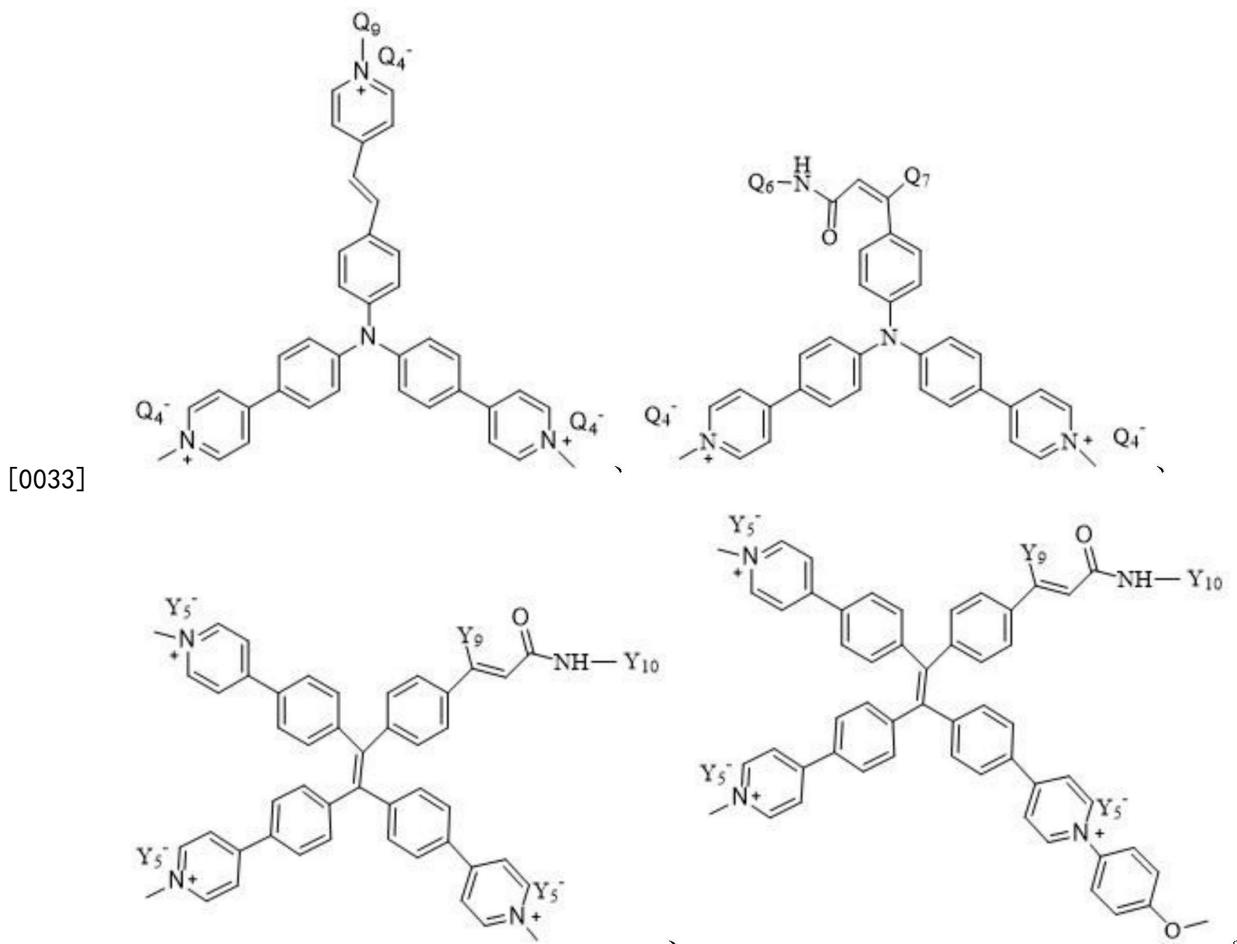


[0029] 优选的,所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料包括以下任意一种结构的AIE分子：

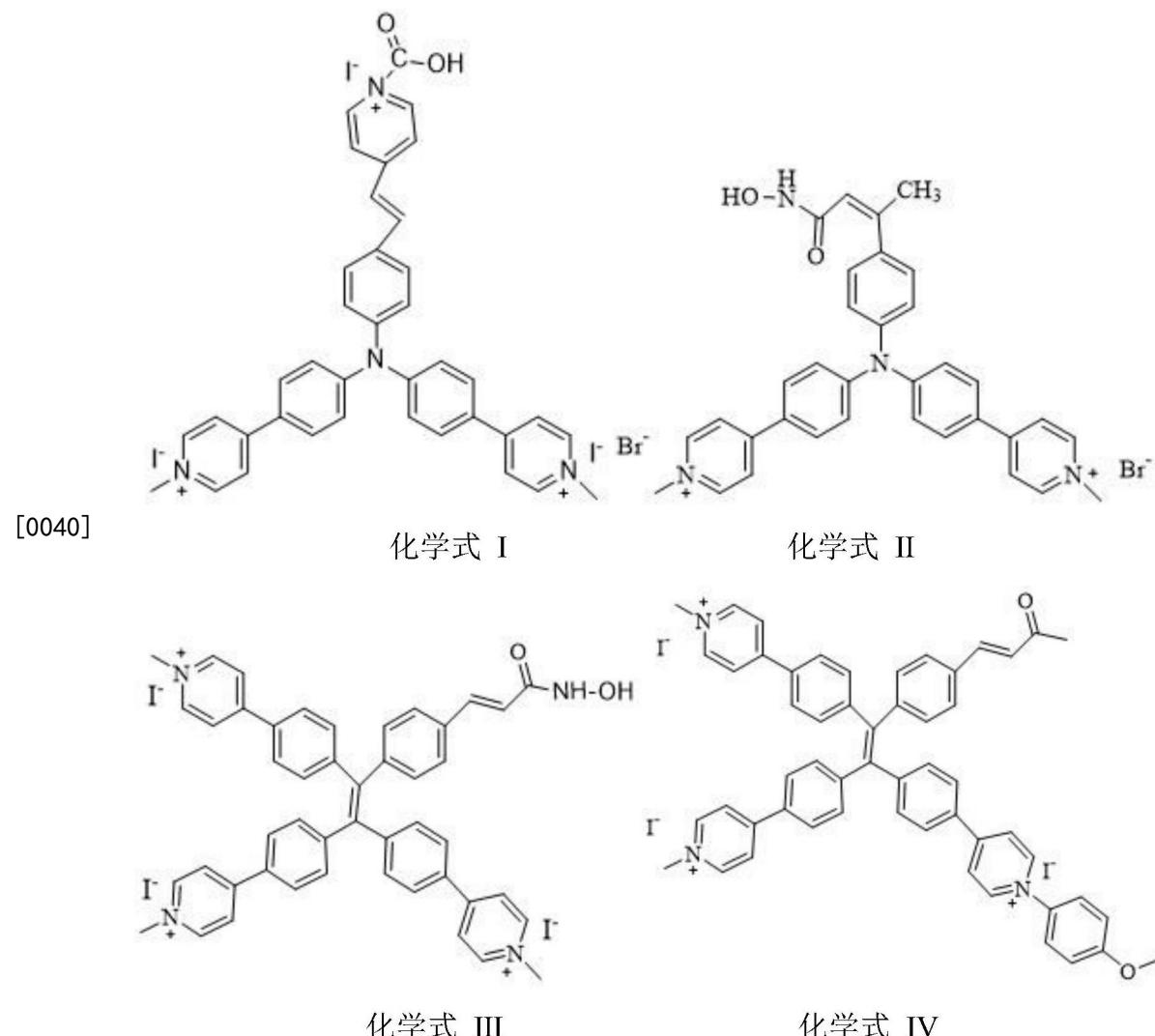


[0031] 进一步优选的，所述 Q_6 、 Q_7 、 Q_9 、 Y_9 、 Y_{10} 各自独立选自-H、-COOH、-OH、-CH₃中的一种。

[0032] 优选的，所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料包括以下任意一种结构的AIE分子：



- [0034] 优选的，所述 n_1 为1-4的整数(1、2、3、4)；所述 n_2 为1-4的整数(1、2、3、4)。
- [0035] 进一步优选的，所述 n_1 为2或3；所述 n_2 为2或3。
- [0036] 优选的，所述阴离子选自 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_2^- 、 NO_3^- 、 PF_6^- 、 $CF_3SO_3^-$ 、 CIO_4^- 中的一种；
- [0037] 优选的，所述基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料还包括溶剂；
- [0038] 进一步优选的，所述溶剂包括二甲基亚砜DMSO、二甲基甲酰胺DMF、二甲基乙酰胺DMAC、水、甲醇中的至少一种。。
- [0039] 优选的，所述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料包括以下化学式I-化学式IV任意一种结构的AIE分子：



[0041] 上述的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料在琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳中的应用。

[0042] 优选的，琼脂糖凝胶电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳的激发通道为蓝光。

[0043] 本发明提供一种所述核酸凝胶染料在琼脂糖凝胶电泳中应用的方法，包括以下步骤：

[0044] 称取琼脂糖粉末置于容器中，加入电泳缓冲液，并加入本发明所述核酸凝胶染料，加热至琼脂糖粉末充分溶解后，冷却，使其凝固形成凝胶；将琼脂糖凝胶放入电泳槽中，上样，通电，电泳完成后，将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统上，获得凝胶色谱图。

[0045] 优选的，所述电泳缓冲液选自TAE溶液或TBE溶液；所述核酸凝胶染料为浓度8-15mM的溶液。

[0046] 进一步优选的，所述电泳缓冲液与核酸凝胶染料的体积比为10000:1。

[0047] 本发明提供一种所述核酸凝胶染料在聚丙烯酰胺凝胶电泳中应用的方法，包括以下步骤：

[0048] 在氯化钠溶液中加入本发明所述核酸凝胶染料，配制泡染液，将完成电泳后的聚丙烯酰胺凝胶浸泡于泡染液中，染色完成后，将聚丙烯酰胺凝胶置于凝胶成像系统上，获得凝胶色谱图。

[0049] 优选的，所述氯化钠溶液为浓度0.1M的NaCl水溶液；所述核酸凝胶染料为浓度8-15mM的溶液。

[0050] 进一步优选的，所述氯化钠溶液与核酸凝胶染料的体积比为10000:3。

[0051] 与现有技术相比，本发明具有如下的有益效果：

[0052] 本发明的基于聚集诱导发光材料的核酸凝胶染料，同现有的产品相比较，不仅可以在琼脂糖凝胶中保持高度灵敏度，同时能在聚丙烯酰胺凝胶电泳中保持同等的高灵敏度，并且大幅度缩短了泡染的时间，在5min内即可呈现清晰明亮的条带；尤其扩宽了染料分子的激发波长，因此极具兼容性，使其可以适应现有的所有染料的激发通道，成为与激光扫描仪配合使用的理想选择，尤其可用蓝光成像。本发明的化合物在同样条件下获得的凝胶电泳测试结果显示，其作为核酸染料对核酸具有极高的分辨率，即使对LAMP这种梯形产物，也可以做到清晰辨别，这样既可以保证电泳测试的灵敏度，也可以保证其准确性。

附图说明

[0053] 图1为荧光染料式I、式II、式III、式IV和Gelred在琼脂糖凝胶成像的图片。

[0054] 图2为荧光染料式V、式VI在琼脂糖凝胶成像的图片。

[0055] 图3为荧光染料式VII、式VIII在琼脂糖凝胶成像的图片。

[0056] 图4为荧光染料式II和SYBR Gold在琼脂糖凝胶成像的图片。

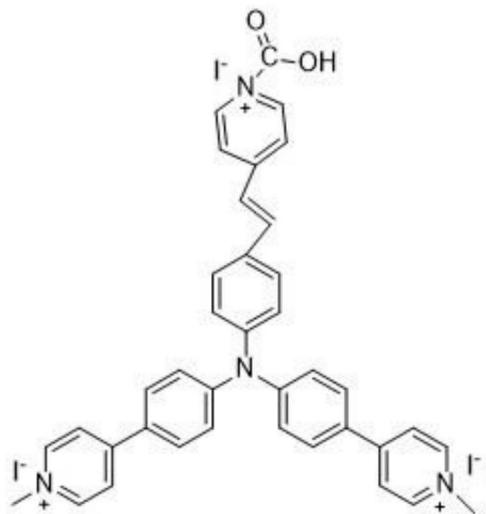
[0057] 图5为荧光染料式II和SYBR Gold在聚丙烯酰胺凝胶成像的图片。

[0058] 图6为荧光染料式II在聚丙烯酰胺凝胶成像的图片。

具体实施方式

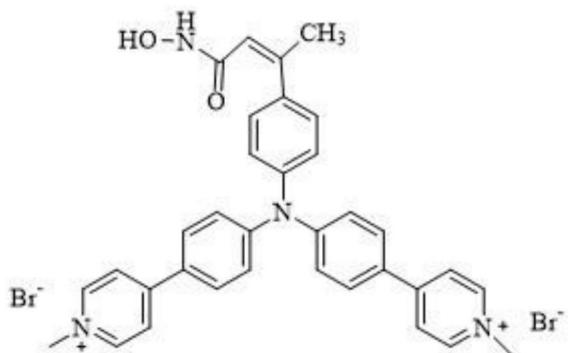
[0059] 下面结合本发明的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、具体地描述，但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。

[0060] 实施例所用的荧光分子化学式I、化学式II、化学式III、化学式IV结构如下：

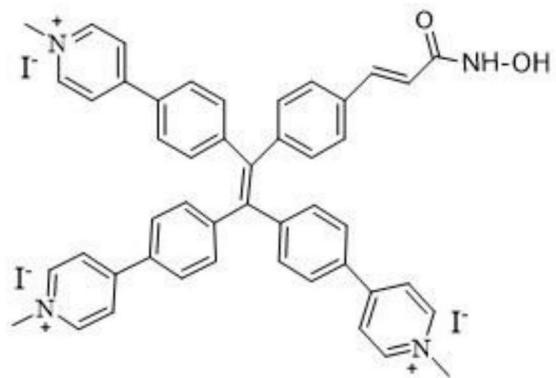


化学式 I

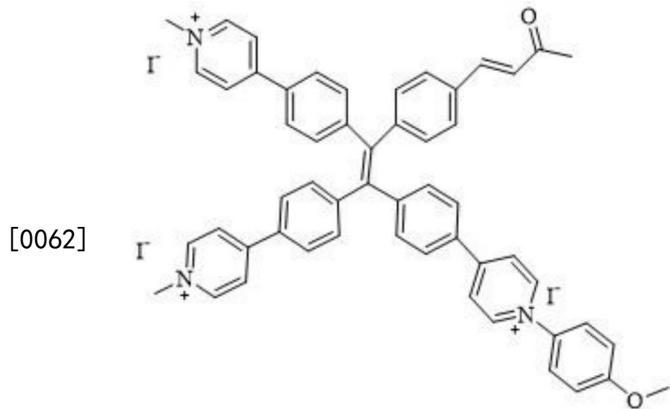
[0061]



化学式 II

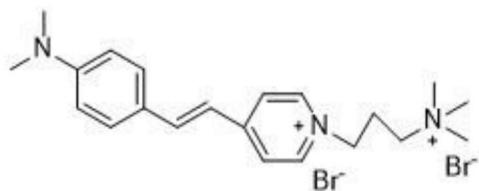


化学式 III

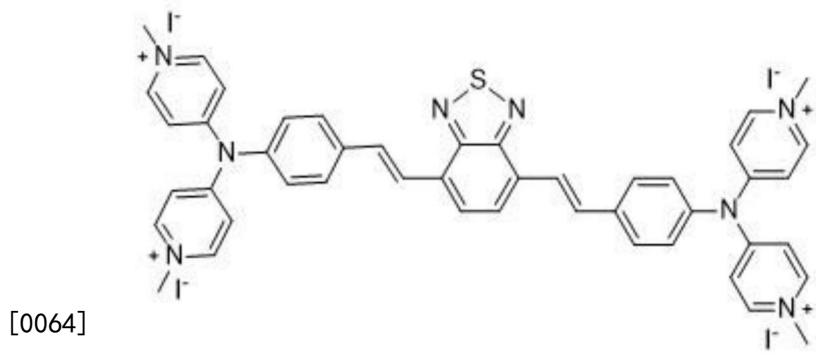


化学式 IV

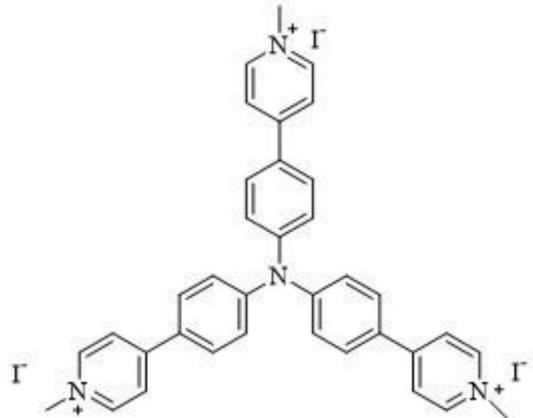
[0063] 实施例所用的对比荧光分子化学式V、化学式VI、式VII、式VIII结构如下：



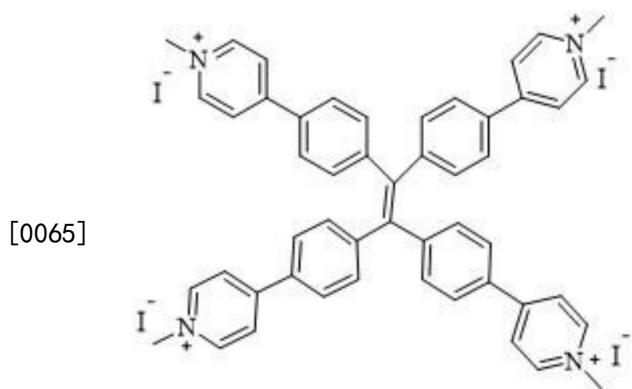
化学式 V



化学式 VI



化学式 VII



化学式 VIII

[0066] 实施例1:

[0067] 本发明染料的应用

[0068] (一) 本发明染料的配制

[0069] 称取式I荧光分子固体,加入生物级无水DMSO,充分溶解得到浓度为10mM的核酸凝胶染料。以相同方法,将式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII、式VIII分别配制成浓度为10mM的核酸凝胶染料。

[0070] (二) 本发明染料在琼脂糖凝胶电泳中应用的具体实验方法如下:

[0071] 1、称取0.3g琼脂糖粉末至锥形瓶中;

[0072] 2、向锥形瓶中加入30mL的1×TAE (TAE电泳缓冲液购自北京科创欣达科技有限公司,50×TAE电泳缓冲液,稀释50倍得到1×TAE溶液),并加入步骤(一)配制的核酸凝胶染料3μL;

[0073] 3、在微波炉中加热煮沸,直至琼脂糖充分溶解,最终溶液体积为30mL;

[0074] 4、同时,用另一个锥形瓶量取同等体积的琼脂糖溶液,加入3μL对照组10000×Biotium Gelred (41005) 染料溶液,使其煮沸至充分溶解。并分别倒入已准备好的凝胶装置中;

[0075] 5、室温凝胶1h(也可以室温放置20min待胶不晃动后,放入4°C冰箱中,放置15min使其凝固);

[0076] 6、将凝好的琼脂糖凝胶放入加满电泳缓冲液(1×TAE)的电泳槽中,在对照组凝胶(Gelred)和实验组凝胶(本发明染料)中依次常规上样5μL核酸marker(现有常规物质);

[0077] 7、上样完成后打开电泳槽开关,设置电压为120V,时间为30min,开始跑电泳;

[0078] 8、电泳完成后,取出琼脂糖凝胶,放在仪器的不同通道(Gelred、488nm)和蓝光切胶仪上,拍照,保存图片至相应的文件夹下,结果如图1、图2和图3,每个图中,从左到右上样顺序:(1)1Kb plus DNA; (2)DL 15000bp; (3)DL 5000bp; (4)DL 2000bb; (5)DL 100bp。

[0079] 结果:

[0080] 从图1可以看出:

[0081] ①本发明染料(左边4列,式I、式II、式III、式IV)与对照组(右列,Gelred)相比,在条带清晰的前提下,适用的通道更广,更具兼容性;

[0082] ②本发明染料与对照组相比,大片段条带能明显分离,不会出现弥散拖尾的现象;

[0083] ③说明本发明染料能够有效解决现有产品通道单一的现象,极具兼容性,可以在

不改变任何成像系统的情况下用来替换Gelred和其它凝胶染料,适用于原先使用SYBR Green或SYBR Gold等为核酸染料的凝胶成像和检测系统使其成为与激光扫描仪配合使用的理想选择。

[0084] 从图2和3可以看出:

[0085] 本发明对比荧光染料化学式V、化学式VI染料在凝胶成像中效果不佳;对比荧光染料化学式VII和式VIII染料在蓝光下可以呈现出较亮的条带,但是其背景颜色较深,且胶块颜色分布不均匀,影响电泳结果的观察分析。

[0086] 9、将本发明的染料(式II),采用和上述同样的凝胶成像方法,与SYBR Gold做比较,得到凝胶图谱(蓝光激发通道,488nm激发通道),见图4,其中条带为LAMP扩增产物。可以看出,相比于SYBR Gold,本发明的染料具备更高的分辨率。

[0087] (三)本发明染料在聚丙烯酰胺凝胶电泳中应用的具体实验方法如下:

[0088] 1、凝胶装置制胶板组装好后加水静置20min,检查装置的密封性,密封性较好则倒干净水准备配置15wt %的非变性PAGE胶2块;

[0089] 2、在50mL的试管中,依次加入H₂O 5.86mL、30wt %Acrylamid 10mL、5×TBE 4mL(TBE电泳缓冲液购自上海泽叶生物科技有限公司,10×TBE电泳缓冲液,稀释2倍得到5×TBE溶液),最后加入10wt %AP 0.14mL以及TEMED 0.014mL并混匀(H₂O、30wt %Acrylamid、5×TBE提前配置好,10wt %AP以及TEMED则需灌胶前再加入);

[0090] 3、加入混合好的非变性胶,使制胶板中完全充满液体,插入梳子(注意正反面,梳子平滑的一面靠近里面厚的制胶板一侧);

[0091] 4、室温凝固1h,使胶完全凝固;

[0092] 5、上样5μL核酸marker;

[0093] 6、电泳缓冲液为1×TBE(TBE电泳缓冲液购自上海泽叶生物科技有限公司,10×TBE电泳缓冲液,稀释10倍得到1×TBE溶液),设置电压为100V,电泳时间为60min,开始电泳;

[0094] 7、配置泡染液:取2个容器,分别加入100mL 0.1M NaCl溶液(10mL1M NaCl与90mL去离子水混合),向前述100mL溶液中分别加入30μL对照组染料SYBR Gold(10000×)和步骤(一)配制的染料(式II),分别混合均匀;

[0095] 8、电泳完成后小心从玻璃板上取下凝胶并分别放入泡染液中染色30min(SYBR Gold)和5min(式II);

[0096] 9、染色完成后,分别放在凝胶成像系统(488nm激发通道)上,拍照,保存图片至相应的文件夹下;

[0097] 10、结果见图5,泳道从左到右的上样浓度分别为:(1) 25ng;(2) 10ng;(3) 5ng;(4) 2.5ng;(5) 1ng;(6) 500pg;(7) 250pg;(8) 100pg。

[0098] 结果:

[0099] 与对照组相比,本发明染料能够染色PAGE胶,染色时间短,并且具备高灵敏度,在保持条带清晰的情况下,灵敏度能低至100pg。

[0100] 11、对LAMP扩增产物按上述方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,按上述方法用本发明染料(式II)泡染5min,采用同样的蓝光和凝胶成像仪(488nm激发通道)的方法(重复三组),得到PAGE凝胶色谱,见图6。

[0101] 可以看出,本发明染料对聚丙烯酰胺凝胶泡染5min即可,大大缩短了实验时间,是银染的理想替代品。

[0102] 以上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。

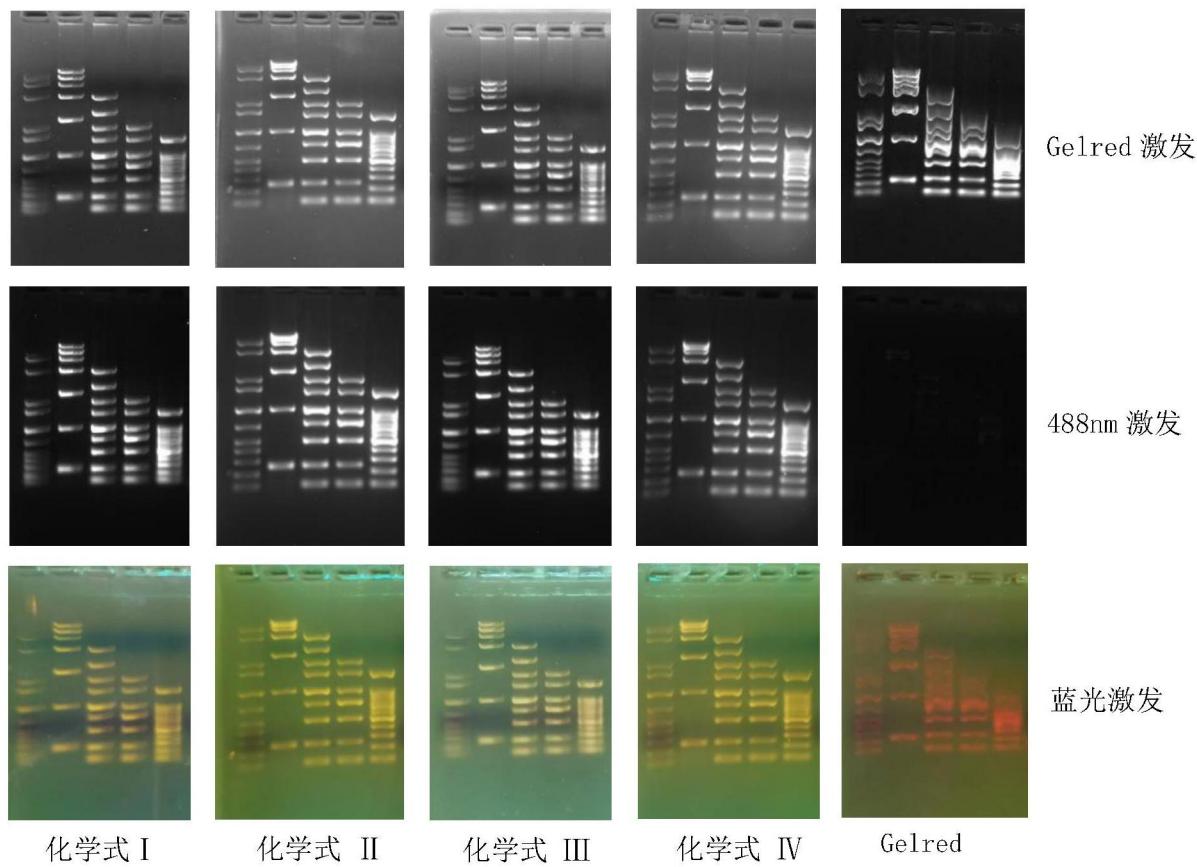


图1

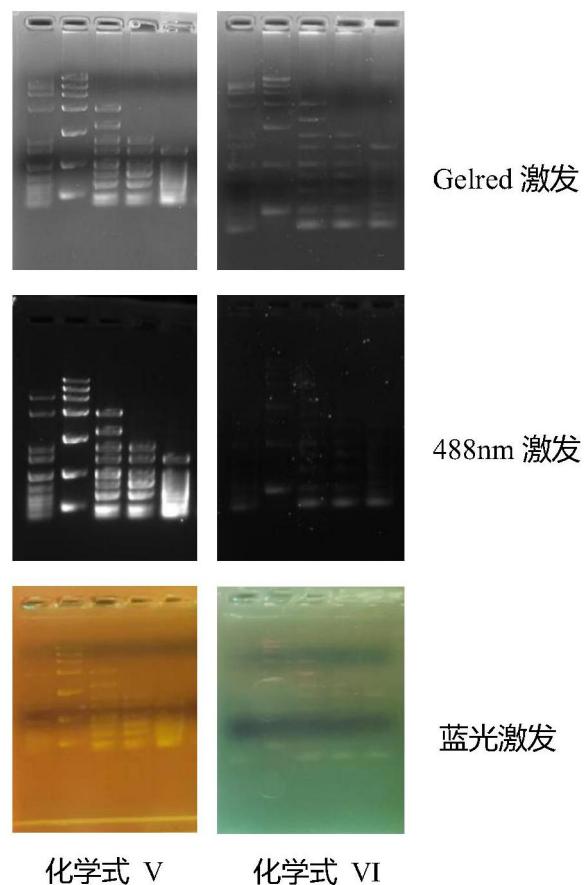


图2

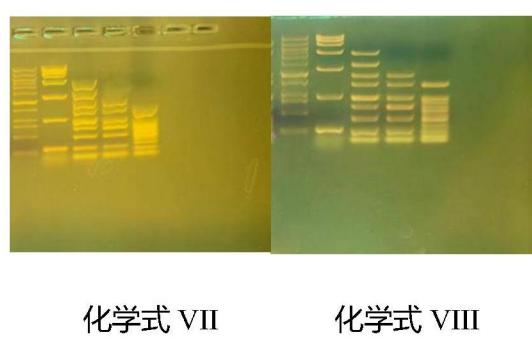
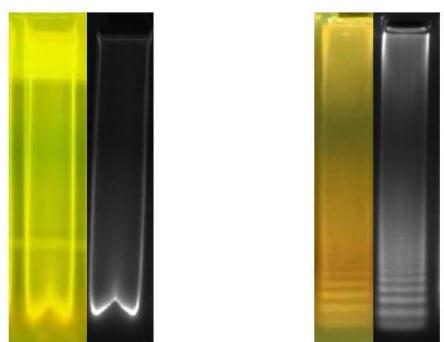


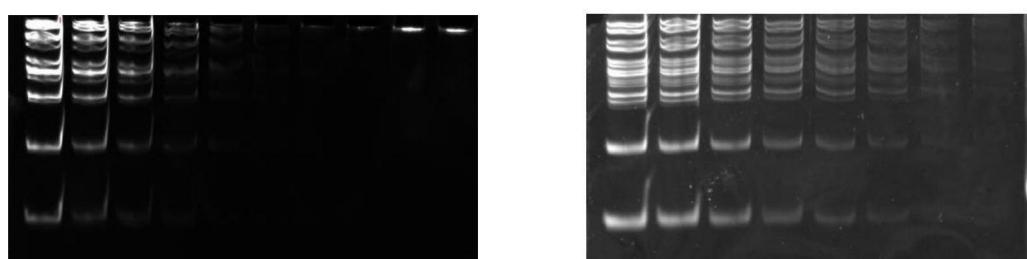
图3



SYBR Gold

本发明染料

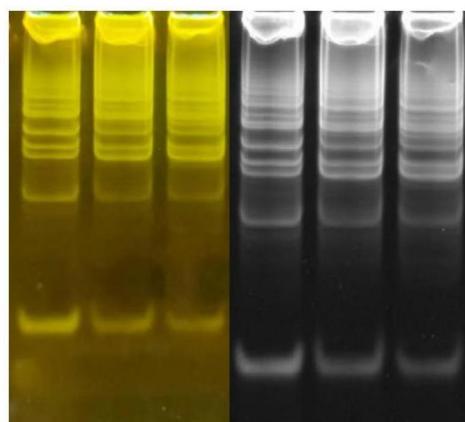
图4



SYBR Gold

本发明染料

图5



泡染 5min

图6