

苯并噻唑类核酸分子荧光探针的合成及光谱性质

陈秀英* 郭琳 郑昌戈 高海燕 安文

(江南大学化学与材料工程学院 无锡 214122)

摘要 设计合成了3种两端杂环氮原子上具有不同取代基的苯并噻唑类不对称三甲川菁染料,并对染料的结构进行了表征。测试了染料在乙醇中的吸收和荧光发射光谱,染料的最大吸收值和荧光发射值分别在629~635 nm和656~672 nm之间。染料**8**、**9**和**10**的斯托克斯位移分别为23、37和27 nm。染料在溶剂中基本无荧光,荧光量子产率小于0.021,可以极大的降低染料自身的荧光背景干扰。染料的光降解实验表明,两端杂环氮原子苄基取代后可以明显增强染料的光稳定性。测试循环伏安曲线得到染料的氧化电位分别为0.535、0.456和0.399 V,氧化电位越大,光降解速率常数越小,与光降解实验得到的降解速率常数结果一致。

关键词 苯并噻唑菁染料,核酸探针,光降解,循环伏安,疾病诊断

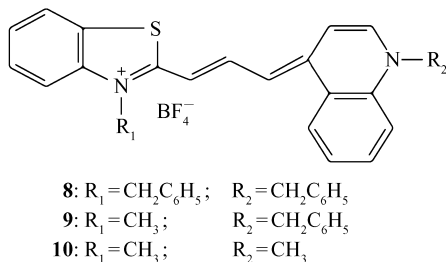
中图分类号:O626

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2012)08-0892-06

DOI:10.3724/SP.J.1095.2012.00441

核酸作为生命遗传物质,其定量分析、特异识别,对基因组学的发展、功能基因的研究、基因技术的应用等具有十分重要的意义。20世纪60年代有学者相继发现,吡啶橙、溴化乙锭嵌入DNA的双螺旋碱基中,可以形成强荧光化合物。但它们的主要缺陷是染料具有很强的毒性,且染料本身会带来较强的荧光背景干扰^[1]。噻唑橙染料是由Lee等^[2]发现的一类用于网状红细胞分析的菁染料,该类染料能渗透膜,与RNA结合后荧光显著增强,已经取代了传统荧光染料并被研究者所熟悉和使用^[3-6]。噻唑菁染料在游离状态下几乎无荧光,在荧光检测时可以避开染料自身的荧光干扰,提高了检测灵敏度,减少了标记过程中除去游离染料的复杂步骤^[7]。随着分子生物学、诊断学的不断发展,对荧光试剂的荧光性能要求越来越高,因此研究开发出性能优异的新型荧光染料成为学者们关注的热点。噻唑菁染料核酸探针是非共价结合探针,常见的染料结构含有噻唑环和喹啉环,环之间通过亚甲基链共轭连接起来。中间亚甲基链上碳原子个数不同,其光谱性质不同。中间亚甲基链上为3个碳原子的染料,文献报道较少。本文以苯并噻唑为原料,合成了含有不同取代基的噻唑类不对称三甲川菁染料,研究了取代基对光谱性质和光稳定性的影响。染料的分子结构如Scheme 1所示。



Scheme 1 Structures of the dyes

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

紫外-可见吸收光谱在北京谱析通用仪器有限责任公司 TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度计上

2011-09-30 收稿,2011-11-25 修回

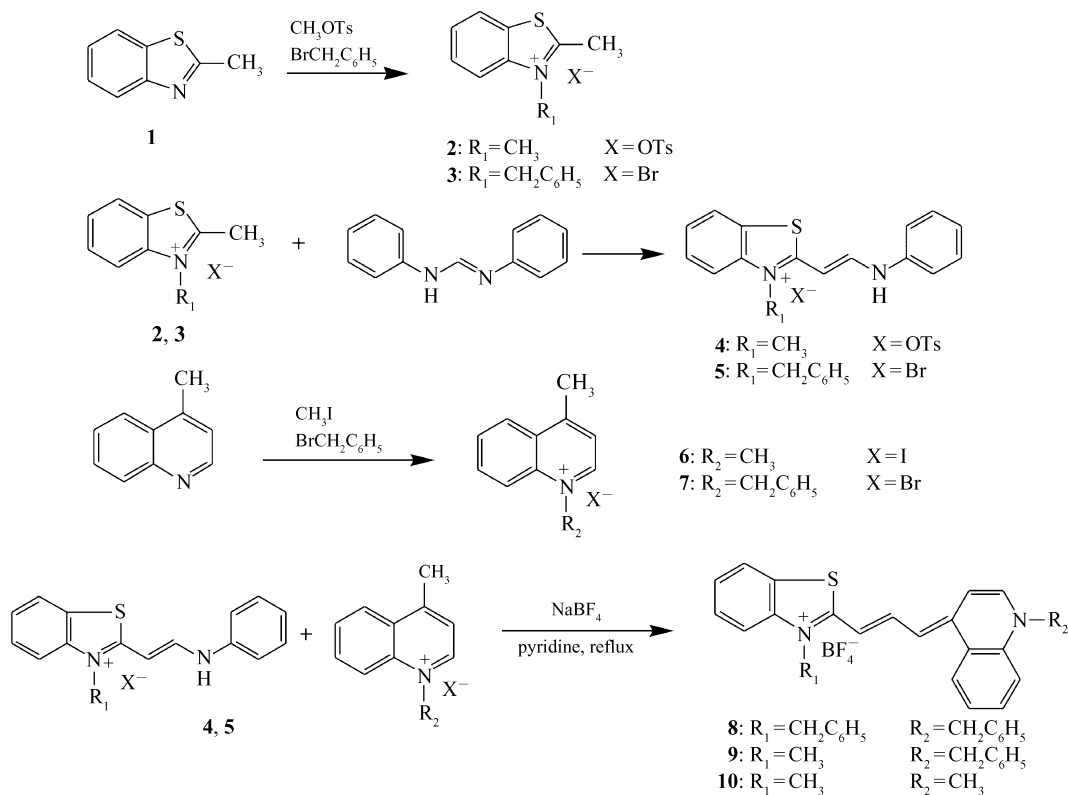
国家自然科学基金(20706026)资助项目,中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP211A12, JUSRP21110)

通讯联系人:陈秀英,副教授; Tel:0510-85917090; Fax:0510-85917763; E-mail:chenxiuying1975@163.com; 研究方向:精细化学品及有机发光材料

测得;美国 Varian 公司 Cary Eclipse 型荧光光谱仪;核磁(^1H NMR)数据在德国 Bruker 公司 AVANCE-III 型 400MHz 全数字化核磁共振谱仪(TMS 为内标)测得;电喷雾质谱(ESI-MS)数据在美国 Waters 公司 Maldi Synapt Q-ToF MS 液相色谱串联四极杆飞行时间质谱仪测得。循环伏安实验在上海辰华 CHI660D 型电化学工作站上测得。工作电极为玻碳电极,参比电极为饱和甘汞电极,对电极为铂丝电极,扫描速率 100 mV/s,染料浓度为 1×10^{-4} mol/L 乙腈溶液,电解质为氯化锂。实验用水为二次去离子水。其它试剂如未说明均为国产分析纯或化学纯试剂,如未说明均未经过任何处理直接使用。

1.2 染料的合成及表征

染料的合成路线主要步骤如 Scheme 2 所示。



Scheme 2 Synthesis route of the dyes

中间体 2 的合成:将 7.4 g 中间体 1(50 mmol)和 8 mL 对甲苯磺酸甲酯(53 mmol)加入到 10 mL 乙酸乙酯中,70 ℃加热搅拌回流 3 h。冷却,过滤后得到白色粉末。剩余母液继续加热反应,过滤后收集固体粉末,共得到白色固体 10 g,粗收率 60%,产品未纯化直接用于下一步反应。

中间体 3 的合成:将 3.7 g 中间体 1(25 mmol)和 4.3 g 溴化苄(25 mmol)加入到 5 mL 乙酸乙酯中,70 ℃加热搅拌回流 2 h。冷却,过滤沉淀,得到白色固体 7.2 g,粗收率 90%,产品未纯化直接用于下一步反应。

中间体 4 的合成:将 3 g 中间体 2(10 mmol)溶于 10 mL 醋酸中,再加入 *N,N*-二苯基甲脒 3 g(15 mmol),90 ℃加热搅拌 1.7 h。冷却后用 300 mL 正己烷洗涤,析出固体。过滤后,得黄色固体 2.5 g,粗收率为 60%,产品未经纯化直接用于下一步反应。

中间体 5 的合成:将 3.2 g 中间体 3(10 mmol)溶于 10 mL 醋酸中,再加入 *N,N*-二苯基甲脒 2 g(10 mmol),60 ℃加热搅拌 1.5 h。冷却后用 300 mL 正己烷洗涤,析出固体。过滤后,得黄色固体 2.9 g,粗收率为 85%,产品未经纯化直接用于下一步反应。

中间体 6 的合成:将 4-甲基喹啉 1.43 g(10 mmol)、碘甲烷 1.41 g(10 mmol)依次加入到 50 mL 单口烧瓶中,90 ℃下暗室搅拌 3 h,过滤,用乙醚洗涤滤饼,空气中干燥后得到固体 2.4 g,未经纯化直接用于下一步反应,粗收率 84%。

中间体7的合成:将4-甲基喹啉1.43 g(10 mmol)、溴化苄1.71 g(10 mmol)依次加入到50 mL单口烧瓶中,90℃下暗室搅拌3 h,冷却过滤,用乙醚洗涤滤饼,空气中干燥后得到固体2.8 g,未经纯化直接用于下一步反应,粗收率89%。

染料8的合成:称取0.313 g中间体7(1 mmol)和0.343 g中间体5(1 mmol)溶于5 mL吡啶中,90℃搅拌下反应1 h后,将0.160 g氟硼酸钠(1.5 mmol)溶于1 mL DMF中,加入到反应混合物中,继续搅拌15 min,析出蓝色固体,冷却过滤得0.41 g粉末,粗收率72%。经3次乙醇重结晶纯化,质谱ES-MS和 ^1H NMR核磁表征,结构正确。 ^1H NMR(d^6 -DMSO), δ :5.66(s,2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$),5.85(s,2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$),6.61(d,1H, $J=12$ Hz,C=CH),7.12(d,1H, $J=12$ Hz,C=CH),7.39~7.98(m,18H,Ar—H),8.26(t,1H, $J=12$ Hz,C=CH),8.46(d,1H, $J=8$ Hz,Ar—H),8.65(d,1H, $J=8$ Hz,Ar—H);MS(m/z):483[M] $^+$ 。

染料9的合成:称取0.313 g中间体7(1 mmol)和0.438 g中间体4(1 mmol)溶于5 mL吡啶中,90℃搅拌下反应1 h,将0.160 g氟硼酸钠(1.5 mmol)溶于DMF 1 mL中,加入到反应混合物中,继续搅拌15 min,将染料溶液倒入乙醚中,析出沉淀经过滤,得到蓝紫色固体粉末0.23 g,粗收率47%。经3次乙醇重结晶纯化,质谱ES-MS和 ^1H NMR核磁表征,结构正确。 ^1H NMR(d^6 -DMSO), δ :3.79(s,3H,NCH₃),5.81(s,2H, $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$),6.60(d,1H, $J=12$ Hz,C=CH),7.14(d,1H, $J=12$ Hz,C=CH),7.29~8.28(m,13H,Ar—H),8.15(t,1H, $J=12$ Hz,C=CH),8.45(d,1H, $J=8$ Hz,Ar—H),8.55(d,1H, $J=8$ Hz,Ar—H);MS(m/z):407[M] $^+$ 。

染料10的合成:称取0.285 g中间体6(1 mmol)和0.438 g中间体4(1 mmol)溶于5 mL吡啶中,90℃搅拌下反应1 h,将0.160 g氟硼酸钠(1.5 mmol)溶于DMF 1 mL中,加入到反应混合物中,继续搅拌15 min,将染料溶液倒入乙醚中,析出沉淀经过滤,得到蓝紫色固体粉末0.20 g,粗收率48%。经3次乙醇重结晶纯化,质谱ES-MS和 ^1H NMR核磁表征,结构正确。 ^1H NMR(d^6 -DMSO), δ :3.74(s,3H,NCH₃),4.14(s,3H,NCH₃),6.46(d,1H, $J=12$ Hz,C=CH),7.14(d,1H, $J=12$ Hz,C=CH),7.32~8.01(m,8H,Ar—H),8.17(t,1H, $J=12$ Hz,C=CH),8.41(d,1H, $J=8$ Hz,Ar—H),8.48(d,1H, $J=8$ Hz,Ar—H);MS(m/z):331[M] $^+$ 。

1.3 荧光量子产率

荧光量子产率测量用罗丹明B($\Phi=0.56$,乙醇)做标准物^[8],计算荧光量子产率公式^[9]为:

$$\Phi_x = \Phi_s (F_x/F_s) (A_x/A_s) (\lambda_s/\lambda_x) (n_x/n_s)^2$$

式中, Φ_x 、 Φ_s 分别为被测样品和标准物的荧光量子产率, A_x 、 A_s 分别为被测样品和标准物在激发波长处的吸光度, n_x 、 n_s 分别为被测样品和标准物所在溶液的折射率, F_x 、 F_s 分别为被测样品和标准物的荧光发射峰的积分面积, λ_x 、 λ_s 分别为被测样品的激发波长(560 nm)和标准物的激发波长(470 nm)。

1.4 光降解实验

将1 cm厚的石英比色皿充满染料的乙醇溶液并保持密闭,在500 W的碘钨灯下照射。为了除去短波长光的吸收及照射过程中产生的热量,在比色皿和碘钨灯之间设置一冷阱,其中充满2 L浓度为50 g/L的NaNO₂溶液,冷阱宽度为15 cm,碘钨灯与染料溶液间相距25 cm。照射过程中尽量保持避光以排除其它因素的影响。通过测量染料在光照过程中最大吸收值的变化研究染料的取代基不同对染料光稳定性的影响。

2 结果与讨论

2.1 染料的合成

苯并噻唑不对称三甲川菁染料由苯并噻唑环和喹啉环通过中间亚甲基链连接组成,该类染料是噻唑橙^[10]染料的衍生物,主要应用于血细胞分析仪的检测试剂^[11-12]。有关合成的详细报道不多,在合成反应中间体5过程中,由于中间体3和N,N-二苯基甲脒反应的活性较高,反应温度应选择低于60℃,温度高则副产物含量迅速增大,造成收率降低,分离困难。合成目标产物时,吡啶既作催化剂又作溶剂,吡啶的量加入太少,导致反应时间延长且反应不充分;加入量过多,导致反应产物不易从溶液中析出,且

吡啶有恶臭味,对环境会造成污染。最终目标产物采用乙醇重结晶的方法,乙醇无毒且易得,极大的简化了纯化的步骤,降低了纯化的成本。

2.2 染料的吸收光谱和荧光光谱

图 1 为染料 **8** 在乙醇中经归一化后的吸收和荧光发射光谱。从图 1 可以看出,染料 **8** 的最大吸收值在 635 nm,最大荧光发射值在 658 nm,最大吸收值与商用的半导体激光器的激发波长匹配。

3 种染料的光谱性质见表 1。染料具有较大的摩尔消光系数($>1 \times 10^5 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$)。在溶液中染料基本无荧光,荧光量子产率较低,在 0.019 ~ 0.024 之间,可能是由于亚甲基桥链两端的苯并噻唑(头部)和喹啉环(尾部)之间的自由旋转造成的^[13-16]。染料 **9** 两端杂环氮原子引入不同的取代基,其 Stokes 位移值比其它 2 种引入相同取代基的染料 Stokes 位移大 10 nm 以上,可能是由于染料氮原子取代基不同导致由激发态回到基态荧光发射过程中产生更大的能量损失^[17]。

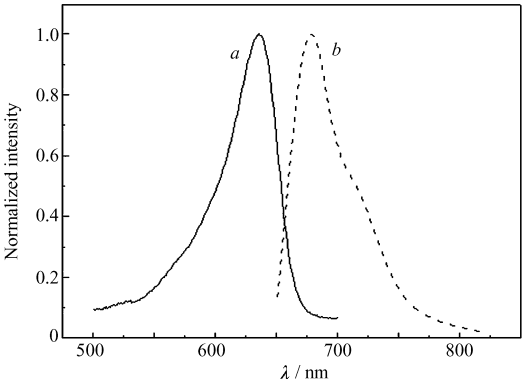


图 1 染料 **8** 在乙醇中的吸收(a)和荧光(b)光谱
Fig. 1 Absorption(a) and fluorescent(b) spectra of dye **8** in ethanol

表 1 染料在乙醇中的光谱性质

Table 1 Spectral properties of the dyes in ethanol

Dye	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Stokes shift/nm	$10^{-5} \varepsilon/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	Φ
8	635	658	23	1.61	0.024
9	635	672	37	1.68	0.019
10	629	656	27	1.62	0.021

2.3 染料的光降解

染料应用于荧光检测的前提是染料必须具有高的光稳定性。为了得到这一类染料的光降解速率常数,对比研究了 3 种染料在乙醇中的光降解性质。光降解实验在 1 cm 宽的石英比色皿中进行,样品溶液用 500 W 的碘钨灯照射,实验在室温下避光进行,实验结果见图 2。实验初始,将 3 种染料的最大吸收值调至一致,光照 5 h 后,染料 **8**、**9** 和 **10** 分别产生了 7%、8% 和 12% 的光分解,其中染料 **8** 降解速率最慢,说明杂环的两端氮原子引入苄基后使得染料的稳定性明显增加。对于低浓度染料,染料的浓度和最大波长处的吸收值之间具有线性关系,光降解反应方程^[18]可简化如下:

$$\ln(A_0/A_t) = kt$$

式中, A_0 为光照前染料最大波长处的吸收值, A_t 为光照中染料在最大波长处的吸收值, t 为光照反应时间, k 为光降解反应速率常数,因而光降解反应速率常数可以通过实验测到^[19]。

图 3 所示,拟合后直线的斜率即为光降解反应的速率常数,经过计算,3 种染料在乙醇中的光降解速率常数 k 分别为 2.59×10^{-4} 、 2.82×10^{-4} 和 $4.40 \times 10^{-4} \text{ mol}/\text{min}$ 。实验结果表明,该类染料比七甲川菁染料(光降解速率常数约为 $1 \times 10^{-3} \text{ mol}/\text{min}$)^[18]具有更好的光稳定性;同时两端杂环氮原子上引入苄基取代可以明显增强染料的光稳定性。

循环伏安实验是一种判断氧化还原反应难易程

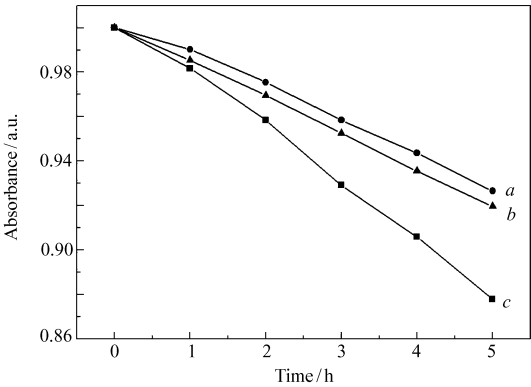


图 2 染料在乙醇中的光降解实验对比
Fig. 2 Comparisons on the photodegradation of the dyes in ethanol

a. dye **8**; b. dye **9**; c. dye **10**

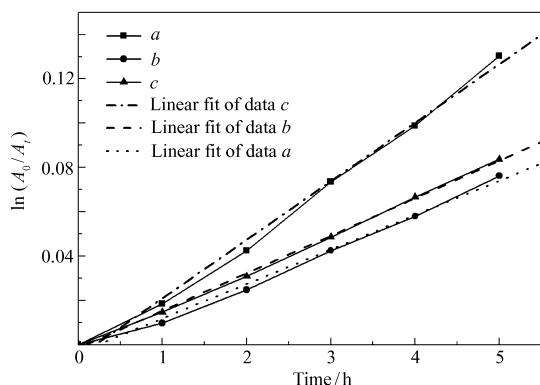


图3 染料的光降解速率常数

Fig. 3 Rate constants of the photodegradation for the dyes

a. dye 8; b. dye 9; c. dye 10

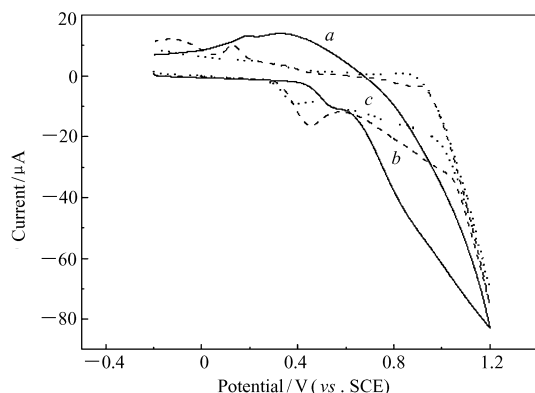


图4 染料的循环伏安曲线

Fig. 4 Cyclic voltammograms of the dyes

a. 8; b. 9; c. 10

度的电化学分析方法。菁染料发生氧化反应是在共轭亚甲基链上失去电子与氧结合的行为^[20]。图4为染料的循环伏安曲线,从循环伏安曲线可以看出,染料8、9、10的氧化电位分别为0.535、0.456和0.399 V,氧化电位越大,染料分子越难以被光降解,光降解速率常数越小^[21],循环伏安实验结果和染料的光降解速率常数测定结果一致。

3 结 论

合成了3种两端杂环氮原子具有不同取代基的苯并噻唑不对称三甲川菁染料。染料在乙醇中的最大吸收和荧光发射光谱值分别在629~635 nm和656~672 nm之间,染料在溶液中几乎无荧光,可以减少自身的荧光干扰,增大了分析灵敏度。光降解实验表明,苯并噻唑类菁染料具有较好的光稳定性,染料8、9和10在乙醇中的光降解速率常数分别为 2.59×10^{-4} 、 2.82×10^{-4} 和 4.40×10^{-4} mol/min;两端杂环氮原子上引入苄基后使得染料的光稳定性明显增强。该类染料的最大吸收波长和商品化半导体激光器的激发波长相匹配,且具有较强的光稳定性,在生物分子标记及疾病诊断领域具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Huashan, WANG Hong, ZHAO Yuanyuan. Molecular Probes and Reagents[M]. Beijing: Science Press, 2002: 322 (in Chinese).
张华山, 王红, 赵媛媛. 分子探针与检测试剂[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 322.
- [2] Lee L G, Chen C H, Chiu L A. Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis[J]. *Cytometry*, 1986, **7**: 508-517.
- [3] Todor D, Nikolai G, Aleksey V, et al. Synthesis of Novel Monomeric and Homodimeric Cyanine Dyes with Thioacetyl Substituents for Nucleic Acid Detection[J]. *Dyes Pigm*, 2007, **72**: 28-32.
- [4] Bethge L, Singh I, Seitz O. Designed Thiazole Orange Nucleotides for the Synthesis of Single Labelled Oligonucleotides That Fluoresce upon Matched Hybridization[J]. *Org Biomol Chem*, 2010, **8**: 2439-2448.
- [5] Lubitz I, Zikich D, Kotlyar A. Specific High-Affinity Binding of Thiazole Orange to Triplex and G-Quadruplex DNA[J]. *Biochemistry*, 2010, **49**: 3567-3574.
- [6] Benson S C, Mathies R A, Glazer A N. Heterodimeric DNA-binding Dyes Designed for Energy Transfer: Stability and Applications of the DNA Complexes[J]. *Nucl Acids Res*, 1993, **21**: 5720-5726.
- [7] CHEN Xiuying, PENG Xiaojun. DNA Fluorescence Probes[J]. *Chemistry*, 2004: 19-25 (in Chinese).
陈秀英, 彭孝军. DNA分子荧光探针[J]. 化学通报, 2004: 19-25.
- [8] Karstern T Kobs. Rhodamine B and Rhodamine 101 as Reference Substances for Fluorescence Quantum Yield Measurements[J]. *J Phys Chem*, 1980, **84**: 1871-1872.
- [9] Velapoldi R A, Tönnesen H H. Corrected Emission Spectra and Quantum Yields for A Series of Fluorescent Compounds in the Visible Spectral Region[J]. *J Fluoresc*, 2004, **14**(4): 465-472.
- [10] Petersen M, Hamed A A, Pedersen E B, et al. Bis-Intercalation of Homodimeric Thiazole Orange Dye Derivatives in DNA[J]. *Bioconjugate Chem*, 1999, **10**: 66-74.

- [11] XIAO Dongjie, LI Xiaoying, LIU Yang, *et al.* A Self-made Lysing Solution in Flow Cytometry on White Blood Cells and Red Blood Cells[J]. *J Shandong Univ(Health Sci)*, 2006, **44**(9):946-948 (in Chinese).
肖东杰, 李晓英, 刘洋, 等. 一种自制流式细胞仪专用溶血素对红细胞和白细胞作用的研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2006, **44**(9):946-948.
- [12] CAO Yunxin, LIU Zhiguang. Study on Preparation of Reagents for Leucocyte of Whole Blood in Flow Cytometry[J]. *Chinese J Cell Mol Immunol*, 1999, **15**(2):156-158 (in Chinese).
曹云新, 刘智广. 流式细胞仪全血白细胞样品制备试剂的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, **15**(2):156-158.
- [13] Stærk D, Hamed A A, Pedersen E B, *et al.* Bisintercalation of Homodimeric Thiazole Orange Dyes in DNA: Effect of Modifying the Linker[J]. *Bioconjugate Chem*, 1997, **8**:869-877.
- [14] Timcheva I, Maximova V, Deligeorgiev T, *et al.* Fluorescence Spectra Characteristics of Novel Asymmetric Monomethine Cyanine Dyes in Nucleic Acid Solutions[J]. *FEBS Lett*, 1997, **405**:141.
- [15] Netzel T L, Nafisi K, Zhao M, *et al.* Base-content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Biochromophoric DNA Stains[J]. *J Phys Chem A*, 1995, **99**:17936.
- [16] Jacobsen J P, Pedersen J B, Hansen L F, *et al.* Site Selective Bis-Intercalation of A Homodimeric Thiazole Orange Dye in DNA Oligonucleotides[J]. *Nucl Acids Res*, 1995, **23**:753-760.
- [17] CHEN Guozhen. Fluorometry[M]. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 1990:10-15 (in Chinese).
陈国珍. 荧光分析法[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1990:10-15.
- [18] Chen X, Peng X, Cui A, *et al.* Photostabilities of Novel Heptamethine 3*H*-Indolenine Cyanine Dyes with Different *N*-Substituents[J]. *J Photochem Photobiol A*, 2006, **181**:79-85.
- [19] Chen P, Sun S, Hu Y, *et al.* Structure and Solvent Effect on the Photostability of Indolenine Cyanine Dyes[J]. *Dyes Pigm*, 1999, **41**:227-231.
- [20] Lenhard J R, Cameron A D. Electrochemistry and Electronic Spectra of Cyanine Dye Radicals in Acetonitrile[J]. *J Phys Chem*, 1993, **97**:4916-4925.
- [21] Kanofsky J R, Sima P D. Structural and Environmental Requirements for Quenching of Singlet Oxygen by Cyanine Dyes[J]. *Photochem Photobiol*, 2000, **71**:361-368.

Synthesis and Spectral Properties of Benzothiazole Cyanine Dyes for Nucleic Acid Fluorescence Probe

CHEN Xiuying*, GUO Lin, ZHENG Changge, GAO Haiyan, AN Wen
(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Three novel asymmetric trimethine benzothiazole cyanine dyes with different *N*-substituents were designed and synthesized. The structures of the dyes were characterized, and the maximums of the spectral absorption and emission of the dyes in ethanol were found in the range of 629 ~ 635 nm and 656 ~ 672 nm. The Stokes shift values for dyes **8**, **9** and **10** were 23, 37 and 27 nm, respectively. The dyes were almost non-fluorescent in solvents with a low fluorescent quantum yield of less than 0.021 in ethanol, which could reduce the background interference greatly. The photodegradation experiment showed that the introduction of benzyl group on the heteroaromatic rings improved the photostabilities of the dyes obviously. The oxidizing potentials for the dyes **8**, **9** and **10** were at 0.535, 0.456 and 0.399 V *vs* SCE, which was consistent with the data of photodegradation experiment.

Keywords benzothiazole cyanine dye, nucleic acid probe, photodegradation, cyclic voltammetry, disease diagnosis