

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780001656.3

[51] Int. Cl.

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 403/14 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月4日

[11] 公开号 CN 101360739A

[22] 申请日 2007.2.5

[21] 申请号 200780001656.3

[30] 优先权

[32] 2006.2.10 [33] US [31] 60/772,090

[86] 国际申请 PCT/CN2007/000385 2007.2.5

[87] 国际公布 WO2007/090343 英 2007.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.20

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 任詠华 于 聪 陈凯耀 黄文忠

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 健 黄可峻

权利要求书 3 页 说明书 17 页 附图 26 页

[54] 发明名称

通过 d^8 或 d^{10} 金属络合物对生物分子的无标记
光学检测及表征

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测和/或表征多电荷生物分子的包含带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物, 其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合, 从而通过金属...金属相互作用、 $\pi \cdots \pi$ 相互作用或这两种相互作用的组合来诱导金属络合物的聚集和自组装。本发明进一步提供了使用包含带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物进行无标记光学检测和/或表征带多电荷的生物分子, 例如单链核酸、聚天冬氨酸、聚谷氨酸的检测方法和试剂盒。

1. 一种检测多电荷生物分子的包含带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物，其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合，以诱导金属带电荷络合物通过金属...金属相互作用、 π ... π 相互作用或两种相互作用的组合而聚集和自组装。

2. 一种表征多电荷生物分子的包含带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物，其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合，以诱导金属络合物通过金属...金属相互作用、 π ... π 相互作用或两种相互作用的组合而聚集和螺旋状自组装。

3. 权利要求 1 的组合物，其中自组装造成金属络合物一个或多个光学性质的变化。

4. 权利要求 2 的组合物，其中自组装造成金属络合物一个或多个光学性质的变化。

5. 权利要求 3 的组合物，其中一个或多个光学性质变化是 UV/vis、发射或 CD 强度的变化。

6. 权利要求 1 的组合物，其中多电荷生物分子带有不少于 3 个净电荷。

7. 权利要求 2 的组合物，其中多电荷生物分子带有不少于 3 个净电荷。

8. 权利要求 1 的组合物，其中多电荷生物分子是单链核酸。

9. 权利要求 2 的组合物，其中多电荷生物分子是单链核酸。

10. 权利要求 1 的组合物，其中多电荷生物分子是蛋白或多肽。

11. 权利要求 2 的组合物，其中多电荷生物分子是蛋白或多肽。

12. 权利要求 1 的组合物，其中金属络合物包含至少一种过渡态金属和至少一种相应的配位体。

13. 权利要求 2 的组合物，其中金属络合物包含至少一种过渡态金属和至少一种相应的配位体。

14. 权利要求 8 的组合物，其中单链核酸形成 i-基序结构。

15. 权利要求 8 的组合物，其中单链核酸形成 G-四联体。

16. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种过渡态金属是铂 (Pt)、金 (Au)、钯 (Pd)、铑 (Rh)、铱 (Ir) 或银 (Ag)。

17. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种相应的配位体是芳基、

烷基、炔基及其衍生物；氮供体配体；硫、磷或氧供体配体。

18. 权利要求 17 的组合物，其中所述氮供体配体是吡啶、联吡啶、三联吡啶、多吡啶、芳基吡啶、二芳基吡啶、芳基联吡啶、菲咯啉、二嗪、三嗪、酞菁、亚胺、二亚胺、三亚胺、卟啉或其衍生物。

19. 权利要求 17 的组合物，其中所述硫、磷和氧供体配体是磷腈、硫醇盐、羧酸盐或衍生物。

20. 权利要求 12 的组合物，其中金属络合物具有扁平结构或部分扁平结构，及至少一个能够发生 $\pi \cdots \pi$ 堆积相互作用的相应的配位体。

21. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种过渡态金属是铂 (Pt)。

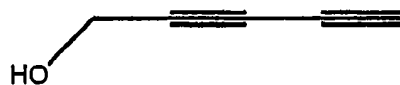
22. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种相应的配位体是三联吡啶。

23. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种过渡态金属是铂 (Pt)，且至少一种相应的配位体是三联吡啶。

24. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种相应的配位体具有以下结构：



25. 权利要求 12 的组合物，其中至少一种相应的配位体具有以下结构：



26. 一种检测样品中目标多电荷生物分子存在的检测方法，所述方法包括：

- (a) 将带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物与可能含有目标多电荷生物分子的样品在有效使 d^8 或 d^{10} 金属络合物与目标多电荷生物分子通过静电相互作用彼此结合的条件下进行合并，其中金属络合物包含至少一种过渡态金属和至少一种相应的配位体，然后使带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚

集体自组装, 和

(b) 检测带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚集体的光学性质。

27. 一种用于检测样品中多电荷生物分子的试剂盒, 所述试剂盒包括:

(a) 含有带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物, 其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合, 以诱导 d^8 或 d^{10} 金属络合物通过金属...金属相互作用和 π ... π 相互作用而聚集和自组装, 和

(b) 使用说明书。

通过 d^8 或 d^{10} 金属络合物对生物分子的无标记光学检测及表征

相关申请的交叉引用

本申请要求 2006 年 12 月 10 日提交的美国临时专利申请 No. 60/772,090 的优先权，其全文引入本文以供参考。

发明领域

本发明涉及用于样品中携带多个电荷的生物分子的无标记光学检测及表征的方法和材料。

发明背景

核酸，DNA 或 RNA，单链或双链的，是活细胞中最基本和最重要的生物分子。DNA 编码可在后代间进行传递的遗传信息。通过转录，编码的信息转移到可与核糖体(特定的核糖体 RNA 和蛋白质的复合物)结合的 mRNA 中。在含反义密码子和特定氨基酸的 tRNA 的协助下，mRNA 中携带的信息被翻译为由 20 种氨基酸组成的精确的多肽序列。多肽折叠成确定的三维结构，从而得到蛋白质。各种类型的蛋白质可作为构建模块、酶和调控因子。蛋白质与其它类型的生物分子一起负责活细胞的构建及执行正确的功能。

由于核酸具有带多个阴性电荷的磷酸功能基团，因此是聚阴离子。在生理条件下，聚(天冬氨酸)和聚(谷氨酸)形成聚羧酸酯，它们也属于聚阴离子。另一方面，聚赖氨酸、聚精氨酸和聚组氨酸(在酸性水溶液中)携带多个阳性电荷，称为聚阳离子。许多蛋白质在溶液 pH 不在其等电点(pI)值时可携带多个净的阳性或阴性电荷。根据以上所述，检测和表征具有多个电荷的生物分子是非常重要的，这不仅可帮助我们理解细胞是如何发挥功能的，辅助生物/生物化学研究，而且可提供推动生物医学研究、临床诊断和新药开发的途径。

正方形扁平的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的令人惊奇的结构和键合特性已引起人们长久兴趣，最近对该类金属络合物的分光镜性质产生了极大的兴趣。已知这些金属络合物在固态下具有形成高度有序的延伸的线性链或寡聚结构的强烈倾向性。金属-金属的相互作用程度和芳香基

配体的 $\pi\cdots\pi$ 堆积相互作用导致可观察到有趣的分光镜性质和发光特性，最近已有基于这些发现而进行分子识别、化学检测及光电子应用方面的报道。(17, 23, 27)

上述 d^8 或 d^{10} 金属络合物的代表性例子是炔基铂(II)三联吡啶络合物(25, 26, 28)。通过改变溶剂的极性，或使用聚电解质(聚阴离子)，即聚丙烯酸盐，可诱导 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚集和自组装，从而使 UV/vis 和发射光谱发生可观察到的显著变化。

目前有多种检测方法可对多电荷生物分子进行检测和表征。但大部分常用的现存方法需要精密的分析技术和昂贵的设备。许多方法需要用放射性同位素或荧光物质等检测基团进行标记，而且需要杂交流程进行核酸检测。因此，这些方法通常需要高昂的花费，复杂的技术，而且是耗时的。

本发明提供了一种新型的检测和表征多电荷生物分子的无标记检测法。将 d^8 或 d^{10} 金属络合物与带相反电荷的生物分子结合可诱导金属络合物的聚集和自组装，从而可产生明显的 UV/vis、发射和 CD 强度的变化。该检测法不仅提供了一种检测多电荷生物分子存在的方法，而且可用于研究其二级结构及结构/构象变化。

发明概述

一般来说，本发明提供了检测和/或表征带多个电荷的生物分子的组合物、方法和试剂盒。将带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物与生物分子混合。带电荷的金属络合物与带相反电荷的生物分子的静电结合可诱导金属络合物通过金属-金属相互作用和/或金属络合物中相应的配位体间的 $\pi\cdots\pi$ 堆积相互作用而进行聚集和自组装，从而使金属络合物的光学性质发生显著改变，例如 UV/vis、发射和 CD 强度的变化(29)。

本发明提供了一种检测和/或表征多电荷生物分子的包含带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物，其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合，从而诱导金属络合物通过金属-金属相互作用、 $\pi\cdots\pi$ 相互作用或两种相互作用的组合而进行聚集和自组装。

本发明也提供了一种检测样品中目标多电荷生物分子存在的检测方法，所述方法包括：(a)将带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物与可能含有目标多电荷生物分子的样品在有效使 d^8 或 d^{10} 金属络合物与目标多电

荷生物分子通过静电相互作用彼此结合的条件下进行合并, 其中金属络合物包含至少一种过渡态金属和至少一种相应的配位体, 然后使带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚集体自组装, 和(b)检测带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚集体的光学性质。

本发明进一步提供了用于检测样品中多电荷生物分子的试剂盒, 包括(a)含有带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物, 其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合, 以诱导 d^8 或 d^{10} 金属络合物通过金属...金属相互作用和 $\pi\cdots\pi$ 相互作用而聚集和自组装, 和(b)使用说明书。

附图的简要描述

图 1 显示了作为说明性实例的两种阳离子 d^8 金属络合物。

图 2 显示了合成图 1 所示一个说明性实例(络合物 2)的代表性途径。

图 3 显示了其中一个代表性 d^8 金属络合物—— $30\mu\text{M}$ 络合物 1 (线 a) 的覆盖电子吸收光谱, 以及与 $90\mu\text{M}$ 聚(dA)₂₅ (线 b)、聚(dG)₂₅ (线 c)、聚(dC)₂₅ (线 d) 和聚(dT)₂₅ (线 e) 结合后吸收光谱的变化。

图 4 显示了其中一个代表性 d^8 金属络合物—— $30\mu\text{M}$ 络合物 2 (线 a) 的覆盖电子吸收光谱, 以及与 $90\mu\text{M}$ 聚(dA)₂₅ (线 b)、聚(dC)₂₅ (线 c)、聚(dG)₂₅ (线 d) 和聚(dT)₂₅ (线 e) 结合后吸收光谱的变化。

图 5 显示了其中一个代表性 d^8 金属络合物—— $30\mu\text{M}$ 络合物 1 (线 a) 的覆盖发射光谱, 以及与 $90\mu\text{M}$ 聚(dA)₂₅ (线 b)、聚(dC)₂₅ (线 c)、聚(dG)₂₅ (线 d) 和聚(dT)₂₅ (线 e) 结合后发射光谱的变化。

图 6 显示了其中一个代表性 d^8 金属络合物—— $30\mu\text{M}$ 络合物 2 (线 a) 的覆盖发射光谱, 以及与 $90\mu\text{M}$ 聚(dA)₂₅ (线 b)、聚(dC)₂₅ (线 c)、聚(dG)₂₅ (线 d) 和聚(dT)₂₅ (线 e) 结合后发射光谱的变化。

图 7 显示了其中一个代表性单链核酸—— $90\mu\text{M}$ 聚(dT)₂₅ (线 a) 的覆盖 CD 光谱, 以及其与 d^8 金属络合物 $30\mu\text{M}$ 络合物 1 (线 b) 和络合物 2 (线 c) 结合后 CD 光谱的变化。

图 8 显示了其中一个代表性单链核酸—— $90\mu\text{M}$ 聚(dA)₂₅ (线 a) 的覆盖 CD 光谱, 以及其与 d^8 金属络合物 $30\mu\text{M}$ 络合物 1 (线 b) 和 $30\mu\text{M}$ 和 $60\mu\text{M}$ 络合物 2 (线 c 和 d) 结合后 CD 光谱的变化。备注: 通过从线 c 中减去线 a 而得到差别 CD 光谱。

图 9 显示了其中一个代表性单链核酸——90 μ M 聚(dC)₂₅ (线 a) 的覆盖 CD 光谱, 以及其与 d⁸ 金属络合物 30 μ M 络合物 1 (线 b) 和 30 μ M 和 45 μ M 络合物 2 (线 c 和 d) 结合后 CD 光谱的变化。

图 10 显示了其中一个代表性单链核酸——90 μ M 聚(dG)₂₅ (线 a) 的覆盖 CD 光谱, 以及其与 d⁸ 金属络合物 30 μ M 络合物 1 (线 b) 和络合物 2 (线 c) 结合后 CD 光谱的变化。

图 11 显示了 G 四联体 (quadruplex) 结构中 4 个鸟嘌呤碱基间的氢键。

图 12 显示了代表性 d⁸ 金属络合物——30 μ M 络合物 1 (线 a) 和 2 (线 b) 的覆盖电子吸收光谱, 以及其与 90 μ M polyU (线 c 和 d 分别为络合物 1 和 2) 结合后吸收光谱的变化。

图 13 显示了代表性 d⁸ 金属络合物——30 μ M 络合物 1 (线 a) 和 2 (线 b) 的覆盖发射光谱, 以及其与 90 μ M polyU 结合后发射光谱的变化 (线 c 和 d 分别为络合物 1 和 2)。

图 14 显示了其中一个代表性 d⁸ 金属络合物——30 μ M 络合物 1 (线 a) 的覆盖电子吸收光谱, 以及其与 90 μ M 聚(天冬氨酸钠) (线 b) 和聚(谷氨酸钠) (线 c) 结合后吸收光谱的变化。

图 15 显示了其中一个代表性 d⁸ 金属络合物——30 μ M 络合物 2 (线 a) 的覆盖电子吸收光谱, 以及其与 90 μ M 聚(天冬氨酸钠) (线 b) 和聚(谷氨酸钠) (线 c) 结合后吸收光谱的变化。

图 16 显示了代表性 d⁸ 金属络合物——30 μ M 络合物 1 (线 a) 和 2 (线 b) 的覆盖发射光谱, 及其与 90 μ M 聚(天冬氨酸钠) (线 c 和 d 分别为络合物 1 和 2) 和聚(谷氨酸钠) (线 e 和 f 分别为络合物 1 和 2) 结合后发射光谱的变化。

图 17 显示了其中一个代表性 d⁸ 金属络合物——30 μ M 络合物 2 结合 90 μ M 聚(天冬氨酸钠) (线 a) 和聚(谷氨酸钠) (线 b) 后的覆盖 CD 光谱。

图 18 显示了胞嘧啶-质子化胞嘧啶 (C-C⁺) 碱基对间的氢键。

图 19 显示了 90 μ M 聚(dC)₂₅ + 30 μ M 络合物 2 所的覆盖 UV-vis 吸收和发射光谱。介质: 5 mM HOAc-NaOAc、10 mM NaCl、pH 5.0。

图 20 显示了聚(dC)₂₅ (线 a) 及其与络合物 2 结合后 (线 b) 的覆盖 CD 光谱。介质: 5 mM HOAc-NaOAc、10 mM NaCl、pH 5.0。

图 21 显示了 30 μ M 络合物 2 (线 a) 及其与 90 μ M 聚(dA)₂₅ 结合后 (线 b) 的覆盖 UV-vis 吸收光谱。介质: 80%水缓冲液 (5 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、pH 7.5) + 20% CH₃CN。

图 22 显示了 30 μ M 络合物 2 (线 a) 及其与 90 μ M 聚(dA)₂₅ 结合后 (线 b) 的覆盖发射光谱。介质: 80%水缓冲液 (5 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、pH 7.5) + 20% CH₃CN。

图 23 显示了 30 μ M 络合物 2 (线 a) 及其与寡核苷酸 (CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG) (线 b) 结合后的覆盖 UV-vis 吸收光谱。介质: 80%水缓冲液 (5 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、pH 7.5) + 20% TFE。

图 24 显示了与 90 μ M (总碱基浓度) 寡核苷酸 (CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG) 结合后的 30 μ M 络合物 2 的 CD 光谱。介质: 80%水缓冲液 (5 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、pH 7.5) + 20% TFE。

图 25 显示了与 45 μ M 聚(dA)₂₅ + 45 μ M 聚(dT)₂₅ (线 a); 90 μ M 聚(dA)₂₅ + 90 μ M 聚(dT)₂₅ (线 b); 180 μ M 聚(dA)₂₅ + 180 μ M 聚(dT)₂₅ (线 c); 270 μ M 聚(dA)₂₅ + 270 μ M 聚(dT)₂₅ (线 d) 结合后的 30 μ M 络合物 2 的覆盖 UV-vis 吸收光谱。介质: 5 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、pH 7.5。

图 26 显示了与 45 μ M 聚(dA)₂₅ + 45 μ M 聚(dT)₂₅ (线 a); 90 μ M 聚(dA)₂₅ + 90 μ M 聚(dT)₂₅ (线 b); 180 μ M 聚(dA)₂₅ + 180 μ M 聚(dT)₂₅ (线 c); 270 μ M 聚(dA)₂₅ + 270 μ M 聚(dT)₂₅ (线 d) 结合后的 30 μ M 络合物 2 的覆盖发射光谱。介质: 5 mM Tris-HCl、10 mM NaCl、pH 7.5。

优选实施方案的详细描述

定义

以下每个在本申请中使用的术语除非特别声明外均具有以下阐述的含义:

此处所用术语“单链核酸”可以是任何长度的,天然或人工合成的单链 DNA、RNA,任何衍生物或其类似物,只要它携带负电荷及核碱基序列即可。可以是双螺旋 DNA 或 RNA 部分,任何 DNA、RNA、蛋白质、糖、脂的组合部分及其衍生物。可以在溶液中自由分布,或固定在固体支持物表面。核酸可以直接从样品溶液或从扩增的基因或基因片段获得。

此处所用术语“蛋白”或“多肽”可以是任何长度的天然或人工合成的蛋白质，任何衍生物或其类似物，只要它带有基本的肽序列即可。可以是任何 DNA（双链或单链）、RNA（双链或单链）、蛋白质、糖、脂的任何组合部分，或其衍生物。可以在溶液中自由分布，或固定在固体支持物表面。

此处所用术语“生物分子”可以是 DNA、RNA、蛋白质、糖、脂、其组合及带有多电荷的衍生物。可以在溶液中自由分布，或固定在固体支持物表面。

此处所用术语“电荷的”可以是阴离子的或阳离子的。

此处所用术语“带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚合体”可以是任何含至少一种 d^8 或 d^{10} 电子构象，带有净的正或负电荷的金属中心的金属络合物，当其与带相反电荷的生物分子接近时可通过生物分子与金属络合物间的静电相互作用而引起金属络合物的局部浓度浓缩。

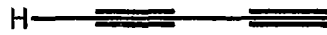
此处所用术语“相应的配位体”可以是任何可与金属中心形成配价键的供体配体。

本发明实施方案

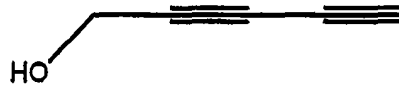
本发明提供一种检测和/或表征多电荷生物分子的包含带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物，其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合，以通过金属...金属相互作用、 π ... π 相互作用或两种相互作用的组合来诱导金属络合物的聚集和自组装。

在一个实施例中，带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物包含至少一种过渡态金属和至少一种相应的配位体。过渡态金属的非限制性实例包括可参与金属...金属相互作用的铂 (Pt)、金 (Au)、钯 (Pd)、铑 (Rh)、铱 (Ir) 和银 (Ag)。相应的配位体的非限制性例子包括芳基、烷基、炔基及其衍生物；氮供体配体包括吡啶、联吡啶、三联吡啶、多吡啶、芳基吡啶、二芳基吡啶、芳基联吡啶、菲咯啉、二嗪、三嗪、酞菁、亚胺、二亚胺、三亚胺、卟啉及其衍生物；硫、磷及氧供体配体包括膦、硫醇盐、羧酸盐及其衍生物。相应的配位体也可以具有以下结构：

(a)



(b)



带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物应至少带有一个正或负电荷。优选地，金属络合物具有扁平结构或部分扁平结构，及具有至少一个可进行 $\pi \cdots \pi$ 堆积相互作用的相应的配位体。

优选地，多电荷生物分子应带有至少 3 个净电荷，以诱导带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的聚集。

本发明也提供了一种检测样品中目标多电荷生物分子存在或不存在的检测方法，所述方法包括：(a)将带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物与可能含有目标多电荷生物分子的样品在有效使 d^8 或 d^{10} 金属络合物与目标多电荷生物分子通过静电相互作用彼此结合的条件下进行合并，其中金属络合物包含至少一种过渡态金属和至少一种相应的配位体，然后使带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚集体自组装，和(b)检测带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物聚集体的光学性质。

在一个实施方案中，本发明提供一种检测样品溶液中目标单链核酸分子的方法。目标核酸分子可直接被分析，或在分析前进行扩增。该方法包括将带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物与可能含目标核酸分子的样品溶液在可有效使至少一个单链核酸与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合的条件下合并；测定是否至少有一个单链核酸与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合，其中 d^8 或 d^{10} 金属络合物的自组装及随后目标核酸分子存在与否通过光学性质，例如比色检测法、光致发光检测法或 CD 光谱分析中的变化来指示。

在另一个实施方案中，本发明提供一种表征目标单链核酸的结构特征的方法。该方法包括将其结构特征已良好表征的单链核酸分子与带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物在有效使至少一个单链核酸与 d^8 或 d^{10}

金属络合物静电结合的条件下合并，以形成结合络合物；然后使 d^8 或 d^{10} 金属络合物进行自组装，其中 d^8 或 d^{10} 金属络合物的自组装是通过其光学性质，例如比色检测法、光致发光检测法或 CD 光谱分析来进行记录的。通过用不同已知结构性质的核酸分子进行这种实验，其组合信息可提供一种有效地推测目标单链核酸结构特征的方法。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种检测目标单链核酸结构变化的方法。该方法可通过两种不同方式进行。在一个实施方案中，该方法包括将目标单链核酸分子与 d^8 或 d^{10} 金属络合物在有效使至少一个单链核酸与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合的条件下合并，以形成结合络合物；然后使 d^8 或 d^{10} 金属络合物进行自组装，其中 d^8 或 d^{10} 金属络合物的自组装是通过其光学性质，例如比色检测法、光致发光检测法或 CD 光谱分析来进行记录的。通过在不同条件（例如不同温度、不同离子强度或加入可能引起目标核酸分子结构特征改变的化合物）下进行这种实验，记录光学性质，从而可通过比较光学性质的变化而推测其结构性质的变化。

在另一个实施方案中，该方法包括将目标核酸分子暴露在可引起结构性质变化的不同条件下；将目标核酸分子与带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物在有效使至少一个单链核酸与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合的条件下合并，以形成结合络合物；然后使 d^8 或 d^{10} 金属络合物自组装，其中 d^8 或 d^{10} 金属络合物的自组装是通过其光学性质，例如比色检测法、光致发光检测法或 CD 光谱分析来进行记录的。然后用记录的光学性质的变化来推测目标核酸分子结构性质的变化。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种检测样品溶液中目标核酸分子的突变的方法。该方法包括获得含有目标核酸分子的样品溶液；将含有目标核酸分子的样品溶液与具有能够与可含有一个或几个突变的目标核酸分子区杂交的核苷酸序列的单链核酸探针合并，以形成检测杂交溶液；将包括不含突变的新目标核酸分子的对照溶液与能够和目标核酸分子完全杂交的单链核酸探针合并，以形成对照杂交溶液；维持杂交溶液温度在第一杂交溶液的融解温度与第二对照杂交溶液的融解温度之间，将检测和对照杂交溶液在有效使杂交溶液至少一个未杂交的探针与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合的条件下暴露于带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物，以形成结合络合物；然后使 d^8 或 d^{10} 金属络合物

自组装,其中 d^8 或 d^{10} 金属络合物的自组装是通过其光学性质,例如比色检测法、光致发光检测法或 CD 光谱分析来进行记录的;并测定检测和对照杂交溶液的光学性质是否显著不同,从而推测目标核酸分子中是否存在突变。

在另一个实施方案中,本发明提供了一种检测样品溶液中目标多电荷蛋白存在的方法。该方法包括将带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物与可能含有目标多电荷蛋白的样品溶液在有效使至少一个目标多电荷蛋白与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合的条件下合并,然后使 d^8 或 d^{10} 金属络合物自组装;并测定是否至少有一个目标多电荷蛋白与 d^8 或 d^{10} 金属络合物静电结合,其中 d^8 或 d^{10} 金属络合物的自组装和随后的目标多电荷蛋白是否存在是通过其光学性质的变化,例如比色检测法、光致发光检测法或 CD 光谱分析来进行指示。

本发明进一步提供了包括各个构成部分,可使用户进行一个或多个本发明上述方法的试剂盒。具体地,本发明进一步提供了一种用于检测样品中多电荷生物分子的试剂盒,所述试剂盒包括(a)含有带电荷的 d^8 或 d^{10} 金属络合物的组合物,其中金属络合物与多电荷生物分子静电结合,以诱导 d^8 或 d^{10} 金属络合物通过金属...金属相互作用和 π ... π 相互作用而聚集和自组装,和(b)使用说明书。

该试剂盒最少包括第一容器,所述第一容器包含可以是阳离子或阴离子的带电荷 d^8 或 d^{10} 金属络合物的溶液,和第二容器,所述第二容器包含包括至少一个带至少 3 个与 d^8 或 d^{10} 金属络合物的电荷相反的净电荷的多电荷生物分子的水溶液。

实施例

以下实施例用于举例说明本发明,而不对本发明的范围进行限定。本领域中熟练人员应认识到本发明的各种变化和修改均不偏离其主题和范围。

实施例 1 - d^8 或 d^{10} 金属络合物的代表性实施例

提供了两个金属络合物的实例(图 1)。络合物 1 是通过本领域技术人员已知的现有文献中的方法制备的,而络合物 2 是通过图 2 所示

的合成途径制备的。两种金属络合物均具有本发明所述的特别适于聚集研究的特征。两种络合物均含有一个金属中心 (Pt)，它是 d^8 过渡态金属离子，能够参与金属...金属相互作用。它们也包括可通过 π ... π 堆积相互作用而彼此相互作用的芳族三吡啶配体。

实施例 2 – 通过 UV/vis 光谱研究图 1 所示的 d^8 金属络合物与单链 DNA 的结合

聚电解质，即去质子化聚丙烯酸可在甲醇和乙腈的有机溶剂混合液中诱导络合物 1 的聚集和自组装。诱导的自组装可根据金属络合物和聚电解质的结构特征进行解释。络合物的结构几乎是扁平的，并且携带正电荷。另一方面，去质子化聚丙烯酸带有负电荷。正负电荷的静电相互作用使金属络合物与聚电解质非常接近，即引起金属络合物与聚阴离子结合。因此，金属络合物的局部浓度增加。同样重要地，金属络合物的正电荷被聚合物的负电荷平衡，从而大大消除金属络合物间的排斥力。因此络合物可通过金属...金属相互作用和 π ... π 相互作用或两种作用的组合而容易地聚集和自组装。

在水溶液中，情况略微不同，但基本原理是一样的，其中芳族三联吡啶配体的疏水堆积相互作用可能起更重要的作用。另外的要求是金属络合物必须在水中可充分溶解。络合物 1 具有有限的溶解性，而络合物 2 在水溶液中表现出很好的溶解性。但这两种络合物在适于本发明结合和聚集研究的浓度范围（约 30 μM ）都是易溶解的。

图 3 和 4 显示的是络合物 1 和 2 的覆盖电子吸收光谱，以及当与各种寡核苷酸，即 poly(dA)₂₅、poly(dG)₂₅、poly(dC)₂₅ 和 poly(dT)₂₅（此处及全文中 poly(dA)₂₅、poly(dG)₂₅、poly(dC)₂₅ 和 poly(dT)₂₅ 分别代表具有 25 个重复的 A、G、C 和 T 单位的寡核苷酸）混合后相应光谱的变化。在整个本发明中的实验条件下，在室温，含有 5 mM Tris pH7.5/10 mM NaCl 的水溶液中，可检测到显著的吸收变化。吸收变化根据寡核苷酸的序列而显著改变。对于 poly(dT)₂₅，络合物 1 和 2 最大的吸收增加和新峰形成分别在约 581 nm 和 544 nm，对于 poly(dA)₂₅，没有新峰形成，仅观察到吸收变化，对于 poly(dC)₂₅ 和 poly(dG)₂₅，可观察到新峰形成及中度的吸收变化。

根据我们以前的工作和其他相关研究，络合物 1 和 2 在更长波长处形成的新带是由于金属络合物通过金属...金属相互作用， π ... π 相互作用或两种作用的组合而聚集导致的金属-金属-配体电荷转移 (“MMLCT”) 过渡态。

实施例 3 -通过发射光谱研究图 1 所示的 d^8 金属络合物与单链 DNA 的结合

随着明显的 UV/vis 变化，对某些寡核苷酸来说，在聚集和自组装后，在约 800 nm 处由于 MMLCT 三重来源而出现新的发射带。

图 5 和 6 显示的是络合物 1 和 2 的覆盖发射光谱，以及其与各种寡核苷酸（此处和全文中，发射光谱不进行有关 PMT 反应的校正）的混合物相应的发射光谱。可观察到各种金属络合物-寡核苷酸混合物显著的发射强度的变化。络合物 1 和 2 本身在研究条件下几乎是非发射的。强度变化根据寡核苷酸序列而显著改变。对于 poly(dT)₂₅，分别在约 784 nm 和 760 nm 观察到络合物 1 和 2 最大的吸收增加和发射带，而 p 对于 oly(dA)₂₅，则具有一个很宽的，几乎无结构的弱强度的带。对于 poly(dC)₂₅ 和 poly(dG)₂₅ 而言，观察到新带，其中在 780-790 nm 范围具有最大带，并且具有中等强度。

实施例 4 -通过 CD 光谱研究图 1 所示的 d^8 金属络合物与单链 DNA 的结合

图 7-10 显示的是被研究的寡核苷酸的 CD 光谱，以及与络合物 1 和 2 混合后的相应光谱变化。对某些寡核苷酸而言，可观察到显著的光谱变化。当络合物 2 与 poly(dT)₂₅ 混合时，观察到在约 307 nm 到 550 nm 的中等强度的宽的阴性带，在约 296 nm 到 278 nm 的中等强度的阳性带，以及在约 207 nm 的一个很强的阳性带（图 7）。相反，当络合物 2 与 poly(dC)₂₅ 混合时，观察到相反结果，其中观察到在约 315 nm 到 525 nm 的中等强度的宽的阳性带，在约 294 nm、270 nm 和 239 nm（肩部）的中等强度的阴性带以及在约 197 nm 的一个很强的阴性带（图 9）。某些混合物表现出很小的光谱变化，例如当 poly(dG)₂₅ 与金属络合物混

合时，仅可观察到很小的强度改变，而且没有新带产生（图 10）。

非手性分子可通过两条不同途径获得手性：(i)将非手性分子接近手性中心，即将非手性发色团置于手性环境中（例如苯酚与环糊精结合），(ii)非手性分子可排列成螺旋结构，从而获得手性（21）。已知核酸是天然的手性的，因为它们含有手性的糖部分。然而，我们的结果清晰地表明络合物与核酸的结合不总是诱导手性。例如，络合物 1 和 2 与 poly(dG)₂₅ 结合均不能引起任何 CD 光谱变化，而络合物 1 与 poly(dC)₂₅ 结合也只引起很小的 CD 光谱变化。因此结果表明诱导的手性不是简单的将铂络合物与手性核酸接近的结果，而更可能与铂络合物与阴离子磷酸位点结合，由这些正方形-扁平 d⁸ 铂（II）三联吡啶单位通过金属···金属和 $\pi\cdots\pi$ 相互作用诱导而进行螺旋排列有关。络合物的螺旋超分子排列的证据可通过在聚(L-谷氨酸)和聚(D-谷氨酸)存在下获得的 CD 光谱的镜向关系和其与在也可以具有不同螺旋手性的各种寡核苷酸存在下 CD 光谱的相似性而反映出来(图 17, 参见实施例 5)。因此结果表明金属络合物阳离子与寡核苷酸结合后可自组装成具有不同手性的螺旋超分子排列。

金属络合物与各种寡核苷酸混合后光学性质的改变明显与络合物的结构性质相关，，以及更重要地，与寡核苷酸的一级和二级结构明显相关。例如，性质与其它寡核苷酸明显不同的 poly(dA)₂₅ 导致最小程度的金属络合物聚集，这可能是由于核酸碱基腺嘌呤与配体三联吡啶环通过芳族 $\pi\cdots\pi$ 相互作用而发生强烈的相互作用，从而干涉金属络合物的自组装过程。值得注意的是，其它嘌呤碱基，鸟嘌呤碱基 dG 可诱导更好的金属络合物的聚集，这可能是由于 poly(dG)₂₅ 在水溶液中形成一种非常特有的称为 G 四联体的二级结构，其中鸟嘌呤碱基通过氢键相互堆积在一起（图 11），因此，避免了与金属络合物的 $\pi\cdots\pi$ 相互作用。胸腺嘧啶碱基 dT 不能通过 $\pi\cdots\pi$ 堆积相互作用而相互结合，而且其相对疏水特性和较大的甲基的存在也可能阻止其与金属络合物的 $\pi\cdots\pi$ 相互作用，因此，poly(dT)₂₅ 可诱导最大程度的金属络合物的聚集和自组装。

实施例 5 - 通过 UV/vis、发射和 CD 光谱研究图 1 中所示 d⁸ 金属络合物与 RNA 分子 (polyU)、聚(天冬氨酸钠)和聚(谷氨酸钠)的结合

图 12 和 13 显示的是络合物 1 或 2 与 polyU 混合后的 UV/vis 和发射光谱的变化。图 14-17 显示的是络合物 1 或 2 与聚(天冬氨酸钠)和聚(谷氨酸钠)混合后 UV/vis、发射和 CD 光谱的变化。这些生物分子在水溶液中于接近中性 pH 条件下均带有多个负电荷,因此就象与单链核酸结合一样,当与带正电荷的金属络合物混合时,会诱导络合物 1 和 2 发生聚集和自组装,从而导致随后的显著光谱性质的变化。

实施例 6 -通过 UV/vis、发射和 CD 光谱研究图 1 中所示 d⁸ 金属络合物 2 与 i-基序 DNA 结构的结合

虽然已知 poly(dC)在碱性条件下可形成螺旋构象,但在酸性条件下, poly(dC)作为 C-C⁺ (胞嘧啶-质子化胞嘧啶) 碱基配对的结果而形成非常独特的 i-基序结构(图 18)。在 pH 5.0, 我们的结果表明络合物 2 与 poly(dC)₂₅ 混合时可改善自组装,表现为在 UV-vis 和发射光谱中 MMLCT 带均有增强(图 19)。然而,发现由金属络合物结合而诱导的 CD 光谱与以前获得的螺旋组装非常不同,而且与金属络合物结合前最初形成的 i-基序结构(图 20)的 CD 信号不一样。虽然这种紧凑的 i-基序结构与 CD 显示的螺旋组装不同,但是它有利于络合物阳离子的自组装。

实施例 7 -通过 UV/vis、发射和 CD 光谱研究图 1 中所示 d⁸ 金属络合物 2 与单链 DNA 的结合, 有机溶剂的影响

由于众所周知加入有机溶剂可以降低水介质中的疏水相互作用,并且在这种情况下降低与络合物自组装形成竞争的与寡聚体的 $\pi\cdots\pi$ 相互作用,因此研究了加入有机溶剂对络合物自组装性质的影响。在络合物 2 与 poly(dA)₂₅ 的结合研究中,加入 20% CH₃CN 完全消除了络合物单体的发射,而且 UV-vis 和发射光谱的变化也表明络合物形成非常好的自组装(图 21 和 22)。结果表明增加有机溶剂含量降低了带来络合物单体发射光谱的金属络合物与与核酸碱基间的 $\pi\cdots\pi$ 疏水相互作用。但可观察到弱的 CD 信号,这表明在这种条件下螺旋性降低。加入 20% 三氟乙醇(TFE)也可得到类似的结果。对于 poly(dT)₂₅, 在存

在 20% TFE 时, 虽然比在水缓冲液中的强度弱一些, 但根据 UV-vis、发射和 CD 的测定表明络合物 2 可给出很确定的螺旋排列。

随机选择含所有四种碱基的寡核苷酸序列。序列为 CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG (标准载体引物)。在纯缓冲液中, 其与络合物 2 的混合物仅表现出很弱的络合物的诱导自组装, 这可能是由于核酸碱基与金属阳离子间的疏水作用, 以及寡核苷酸中某些未明确定义的二级结构造成的。然而, 当加入 20% TFE 时, UV-vis 和发射光谱均表明金属络合物具有很好的自组装 (图 23), 而且可观察到强的 CD 信号, 表明这种排列是高度螺旋的 (图 24)。

基于与四种不同核碱基的观察表明, 和 DNA 的疏水 π 堆积相互作用与金属-金属相互作用之间的微妙竞争作用所帮助的铂 (II) 络合物自组装在控制二者间的精细平衡中起重要作用。

实施例 8 - 通过 UV/vis、发射和 CD 光谱研究图 1 中所示 d^8 金属络合物 2 与双链 DNA 的结合

我们也将我们的研究延伸到双链 DNA 中。初步研究表明, 将 $30\mu\text{M}$ 络合物 2 加入到通过将等量 ($45\mu\text{M}$, 碱基浓度) $\text{poly}(\text{dA})_{25}$ 和 $\text{poly}(\text{dT})_{25}$ 混合而制备的 $\text{poly}(\text{dA})_{25}$ - $\text{poly}(\text{dT})_{25}$ 双链体 (duplex) 中, UV-vis 和发射光谱均显示明显的 MMLCT 带, 也观察到络合物螺旋组装而引起的典型的 CD 信号变化。随着二联体的量增加, MMLCT 吸收带逐渐消失, 在 UV-vis 光谱中 425 nm 处出现新带 (图 25)。随着 UV-vis 光谱的改变, 在约 800 nm 处的发射带逐渐消失, 在约 557 nm 处出现新的强发射带 (图 26)。另外, 在高双链体浓度 ($270\mu\text{M poly}(\text{dA})_{25} + 270\mu\text{M poly}(\text{dT})_{25}$, 碱基浓度) 时, 加入 $30\mu\text{M}$ 络合物 2 引起很小的 CD 光谱变化。由于正方形扁平的铂三联吡啶型络合物是众所周知的双螺旋 DNA 嵌入剂, 结果表明在低的双链体浓度下, 大部分络合物与 DNA 上的阴离子磷酸基团通过静电作用相互结合, 从而导致螺旋自组装, 而在高的双链体 DNA 浓度下, 大部分络合物与双链体相互嵌入, 从而没有观察到络合物的自组装。吸收和发射带分别移动到更短的波长 425 nm 和 557 nm 处, 这强烈表明络合物阳离子处于非常不同的环境中, 可能与核酸碱基对以嵌入方式而堆积在一起。

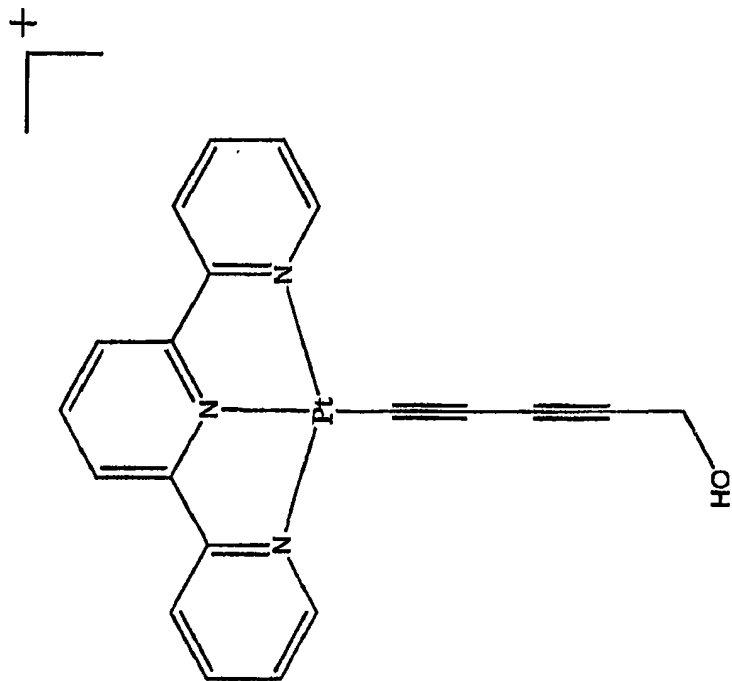
参考文献

以下专利、专利申请和文章（或本申请中的任何其它引用的参考文献）都引入本文以供参考。

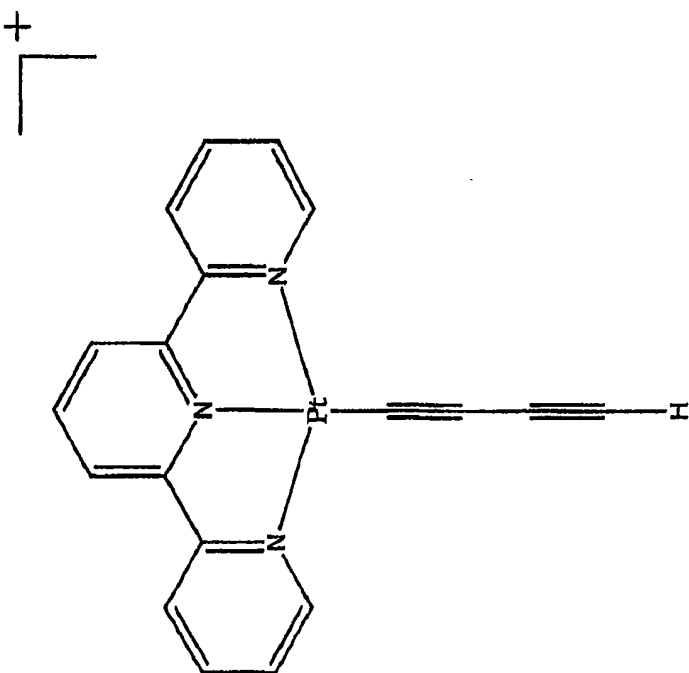
1. 美国专利 No. 5,985,567, 1999 年 11 月 16 日授权 (Rampal)。
2. 美国专利 No. 6,132,972, 2000 年 10 月 17 日授权 (Shigemori 等人)。
3. 美国公开申请 No. US20050059042, 2005 年 3 月 17 日公开 (Rothberg 等人)。
4. 美国公开申请 No. US20040219556, 2004 年 11 月 4 日公开 (Bazan 等人)。
5. 美国公开申请 No. US20040033518, 2004 年 2 月 19 日公开 (Wittwer 等人)。
6. 美国公开申请 No. US20050048485, 2005 年 3 月 3 日公开 (Kurane 等人)。
7. 美国公开申请 No. US20010046670, 2001 年 11 月 29 日公开 (Brookes)。
8. PCT 国际公布 No. WO2004111602, 2004 年 12 月 23 日公开 (Rothberg 等人)。
9. PCT 国际公布 No. WO03091408, 2003 年 11 月 6 日公开 (Wittwer 等人)。
10. PCT 国际公布 No. WO9846790, 1998 年 10 月 22 日公开 (Harbron)。
11. PCT 国际公布 No. WO9942616, 1999 年 8 月 26 日公开 (Patel 等人)。
12. 加拿大专利申请 No. CA2489922, 2003 年 6 月 20 日提交 (Gaylord, B. and Bazan, G.)。
13. 英国专利 No. GB2318791, 1998 年 5 月 6 日授权 (Charles)。
14. 日本专利 No. JP11151100, 1999 年 6 月 8 日授权 (Shigemori 等人)。
15. 日本专利 No. JP61219400, 1986 年 9 月 29 日授权 (Yokota 等人)。
16. KOKAI 公开申请 No. JP2005000088, 2005 年 1 月 6 日公开 (Shigemori 等人)。
17. Adamovich 等人, “High Efficiency Single Dopant White Electrophosphorescent Light Emitting Diodes”, *New Journal of Chemistry*, 2002, 26, 1171-1178.

18. Blackburn 等人 ed., "Nucleic Acids in Chemistry and Biology", Oxford University Press, Oxford, 1996.
19. Bloomfield 等人, "Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions", University Science Books, California, 2000.
20. Creighton, "Proteins: Structure and Molecular Properties", W. H. Freeman and Company, New York, 1993.
21. Fasman ed., "Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules", Plenum Press, New York, 1996.
22. Gaylord 等人, "DNA Detection Using Water-Soluble Conjugated Polymers and Peptide Nucleic Acid Probes", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99, 10954-10957.
23. Goshe 等人, "Supramolecular Recognition. Terpyridyl Palladium and Platinum Molecular Clefs and Their Association with Planar Platinum Complexes", Journal of the American Chemical Society, 2003, 125, 444-451.
24. Li 等人, "Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequence in Genomic DNA by the Polymerase Chain Reaction", Journal of the American Chemical Society, 2004, 126, 10958-10961.
25. Yam 等人, "Luminescent Platinum(II) Terpyridyl Complexes: Effect of Counter Ions on Solvent-Induced Aggregation and Color Changes", Chemistry – A European Journal, 2005, 11, 4535-4543
26. Yam 等人, "Solvent-Induced Aggregation through Metal•••Metal/ π ••• π Interactions: Large Solvatochromism of Luminescent Organoplatinum(II) Terpyridyl Complexes", Journal of the American Chemical Society, 2002, 124, 6506-6507.
27. Yam 等人, "Synthesis, Luminescence, Electrochemistry, and Ion-Binding Studies of Platinum(II) Terpyridyl Acetylide Complexes", Organometallics, 2001, 20, 4476-4482.
28. Yu 等人, "Polymer-Induced Self-Assembly of Alkynylplatinum(II) Terpyridyl Complexes by Metal•••Metal/ π ••• π Interactions", Angewandte Chemie International Edition, 2005, 44, 791-794.

-
29. Yu 等人, “Single-Stranded Nucleic Acid-Induced Helical Self-Assembly of Alkynylplatinum(II) Terpyridyl Complexes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103, 19652-19657.



络合物2



络合物1

图 1

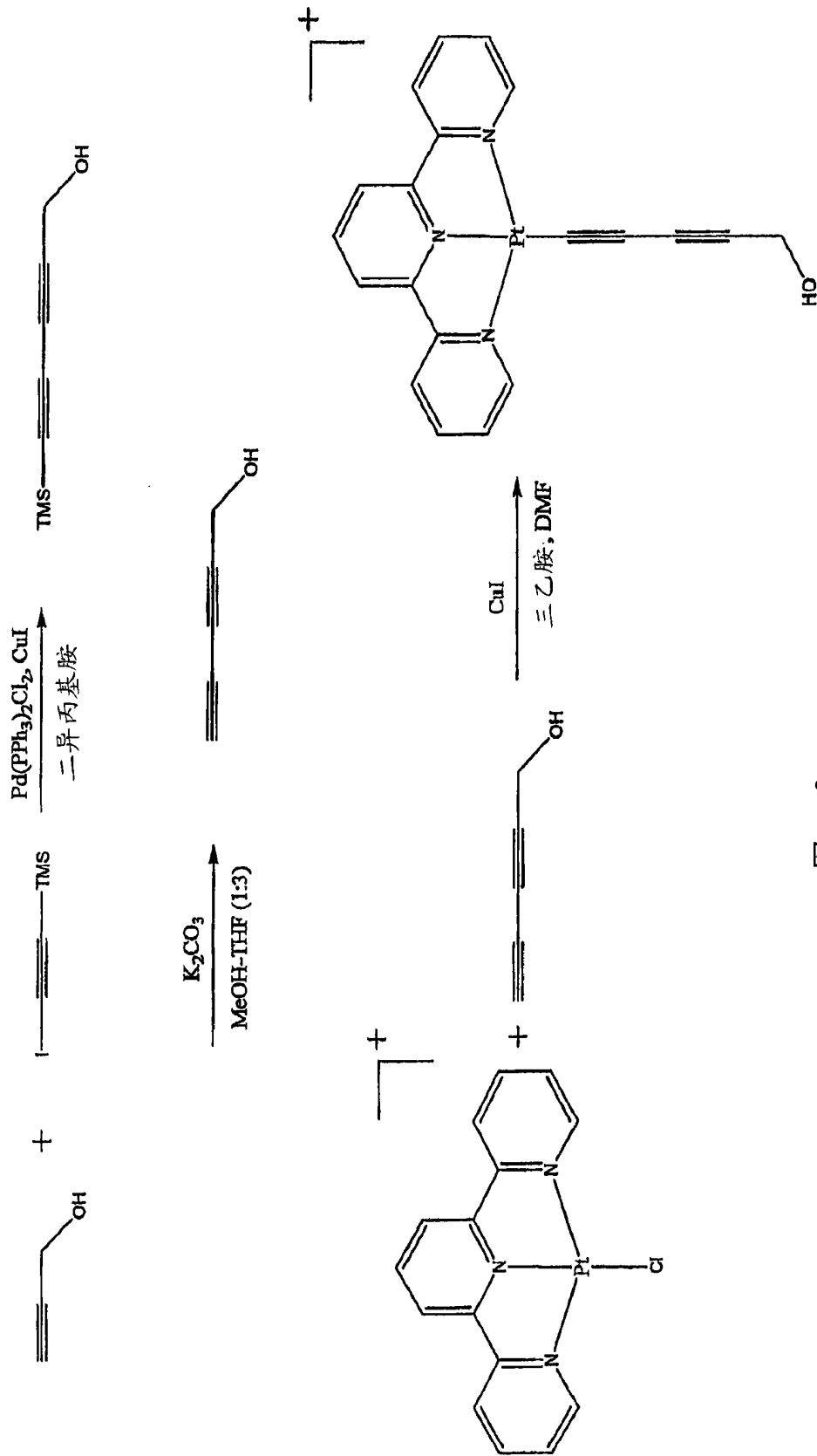


图 2

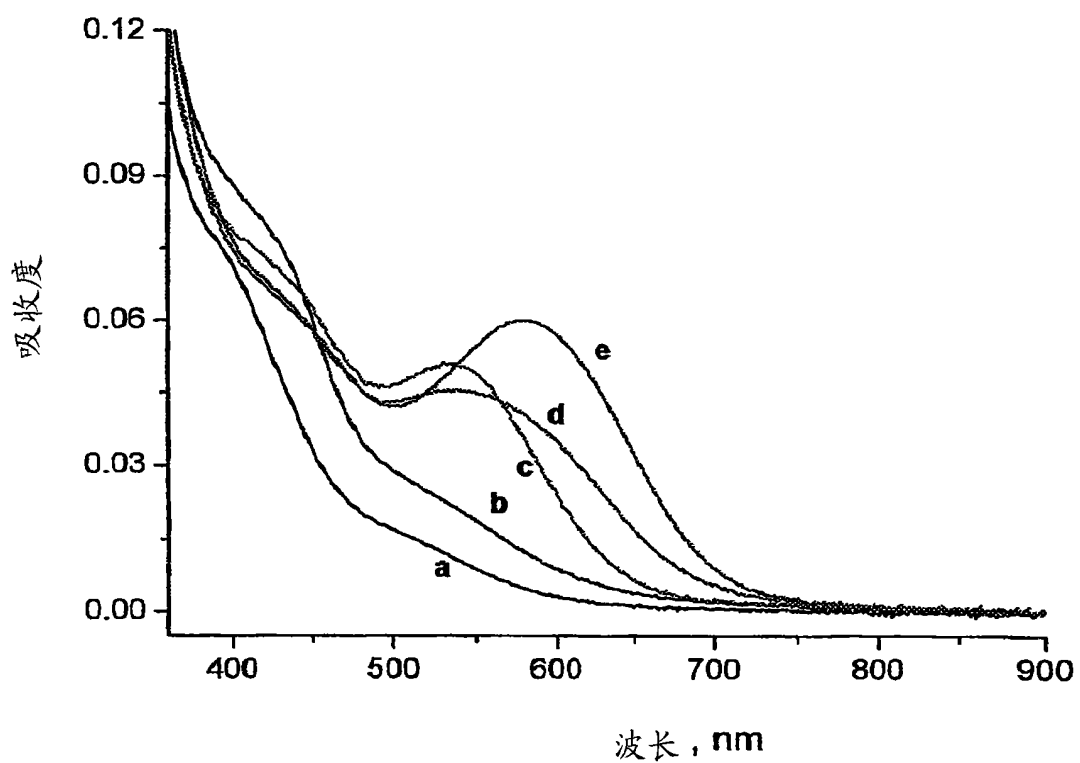


图 3

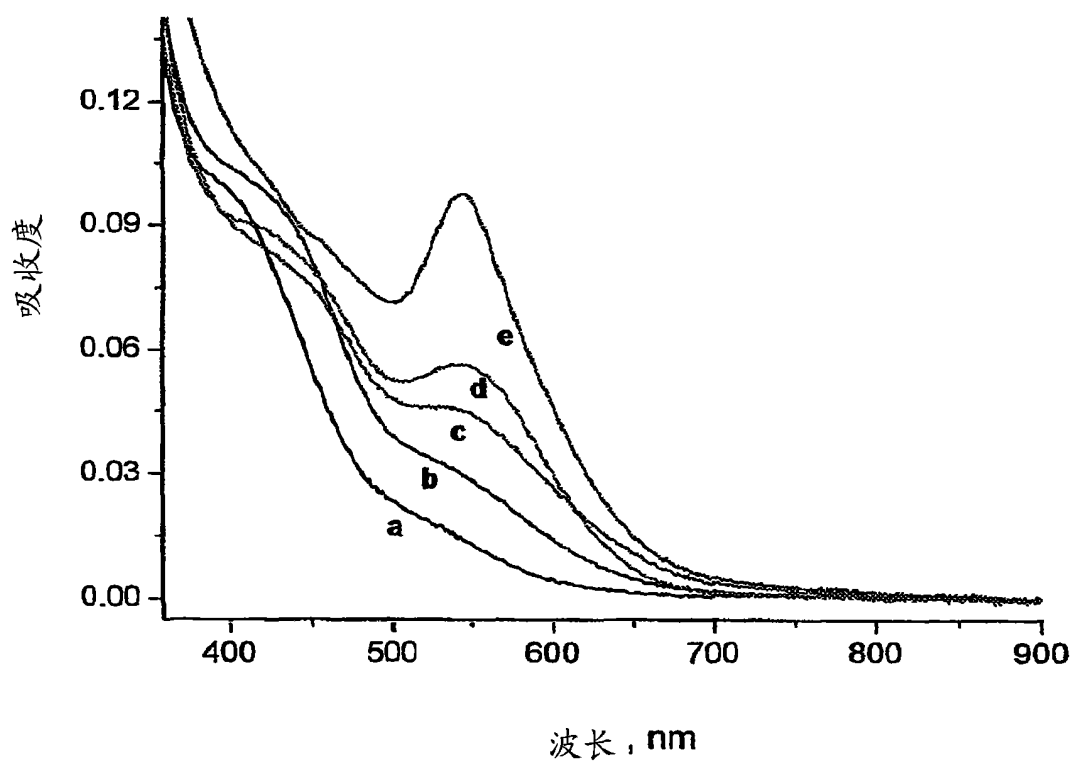


图 4

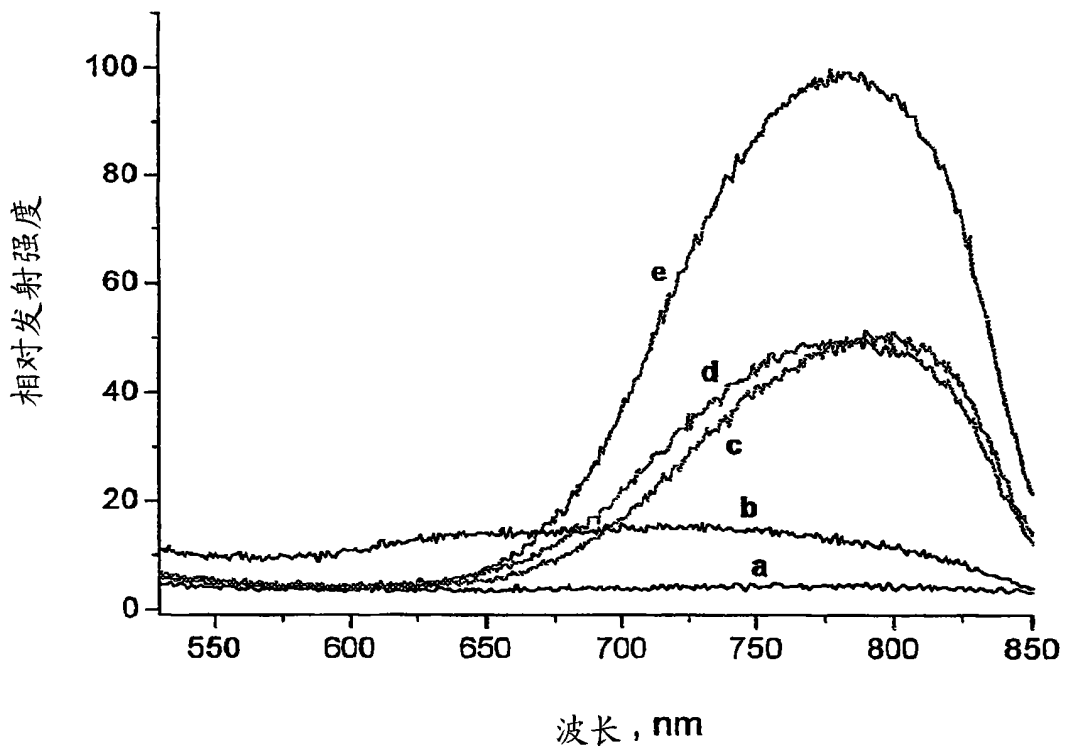


图 5

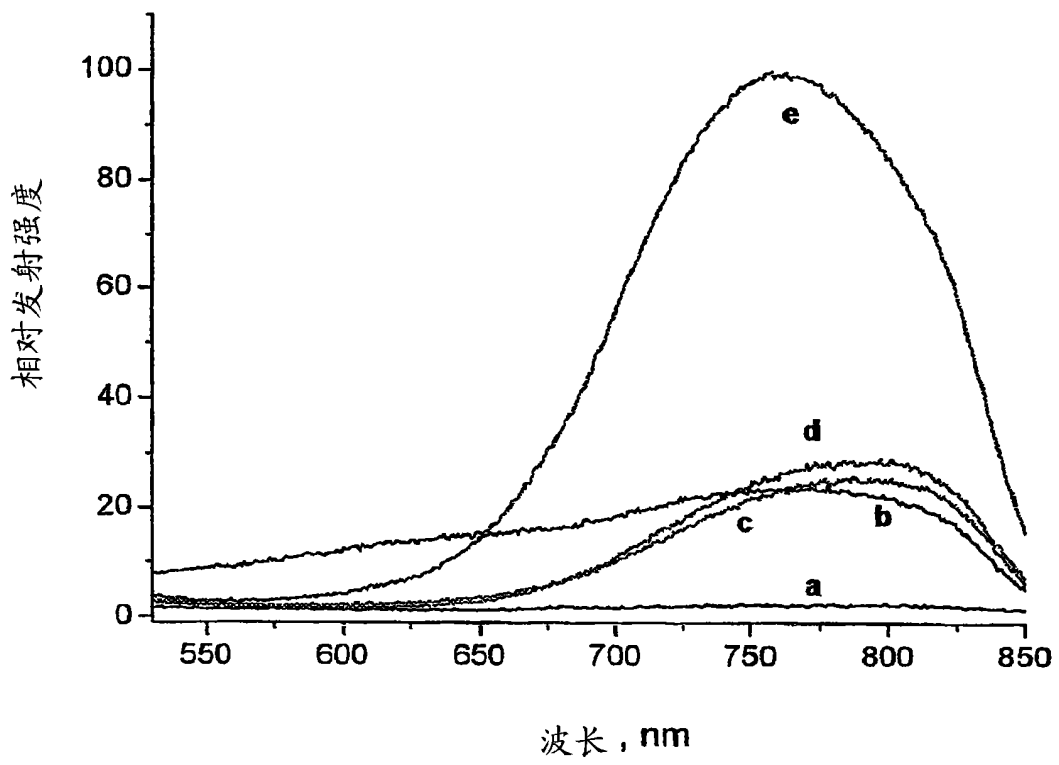


图 6

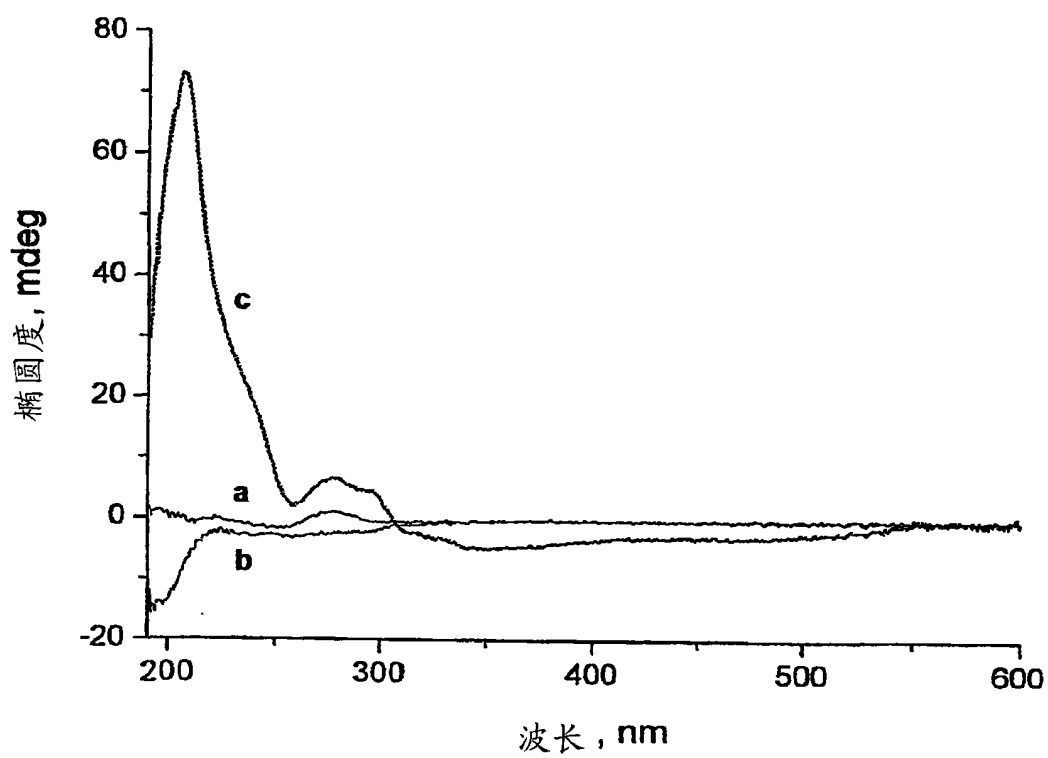


图 7

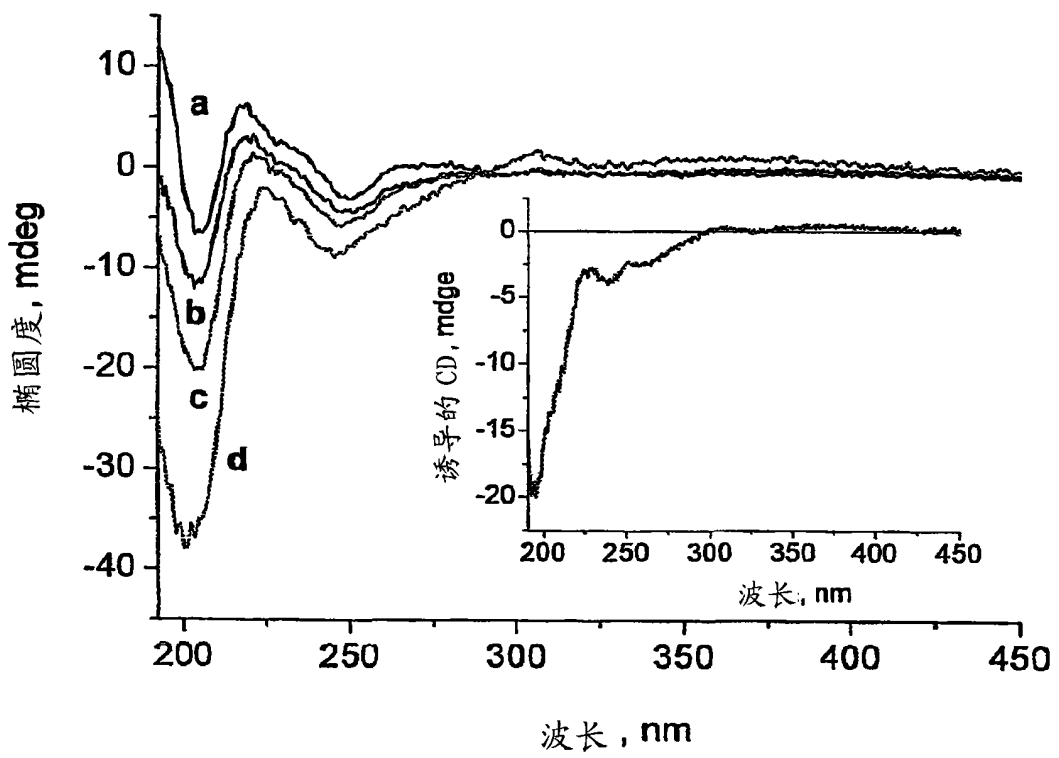


图 8

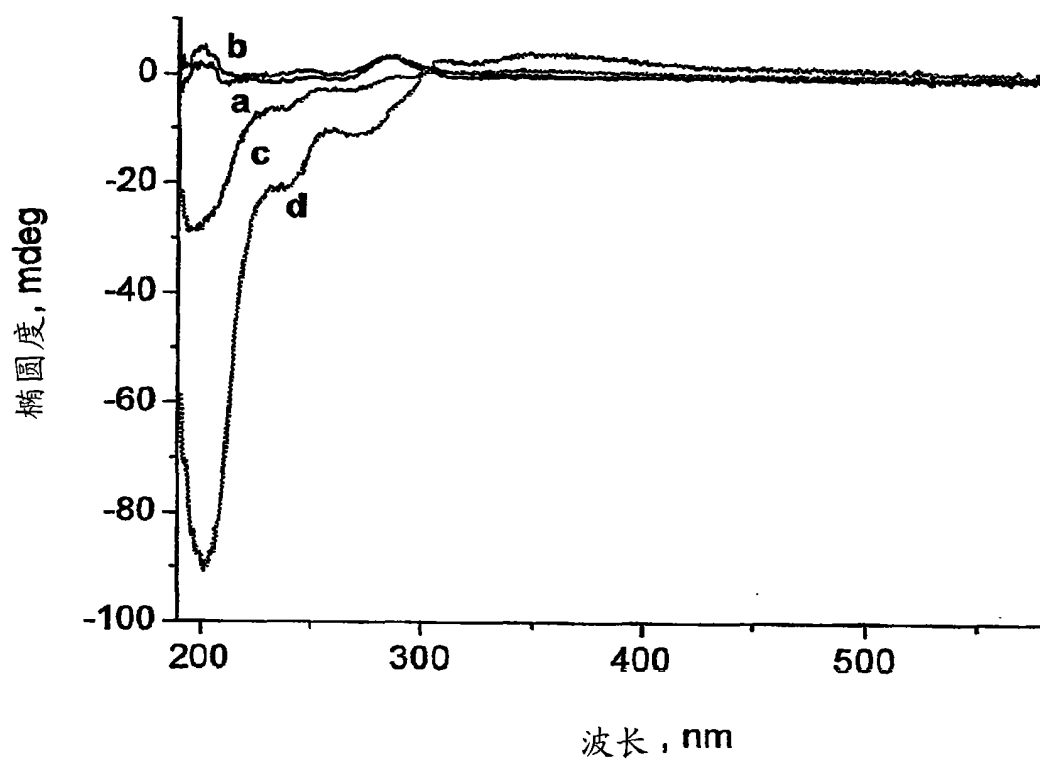


图 9

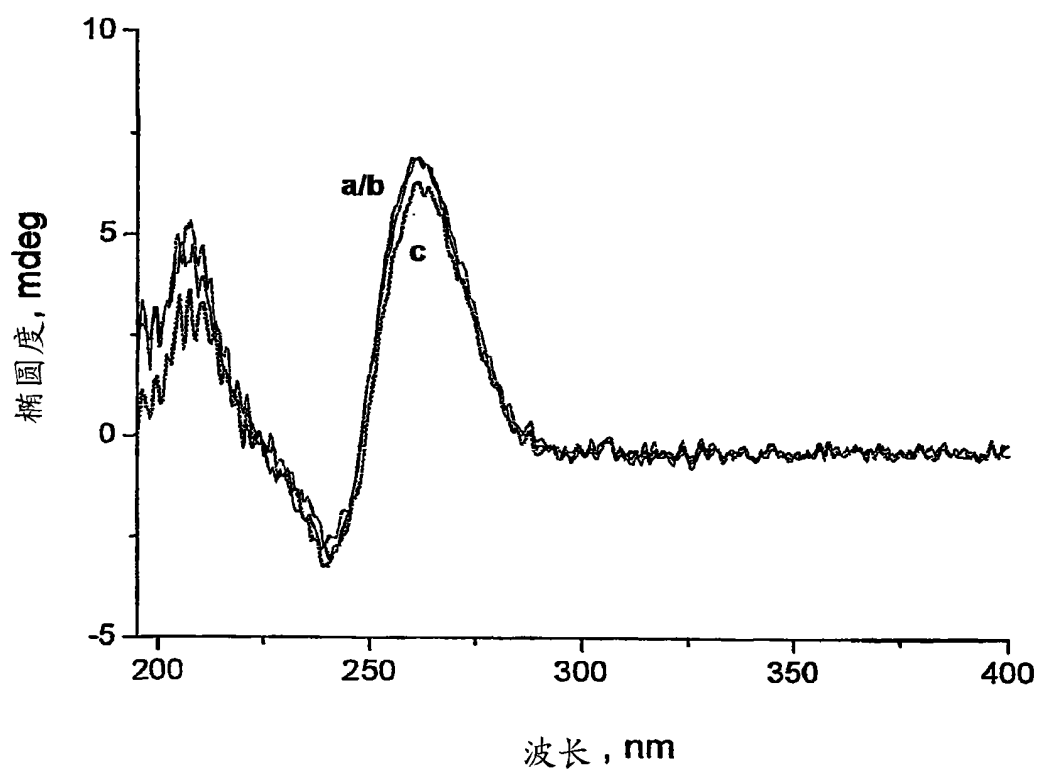


图 10

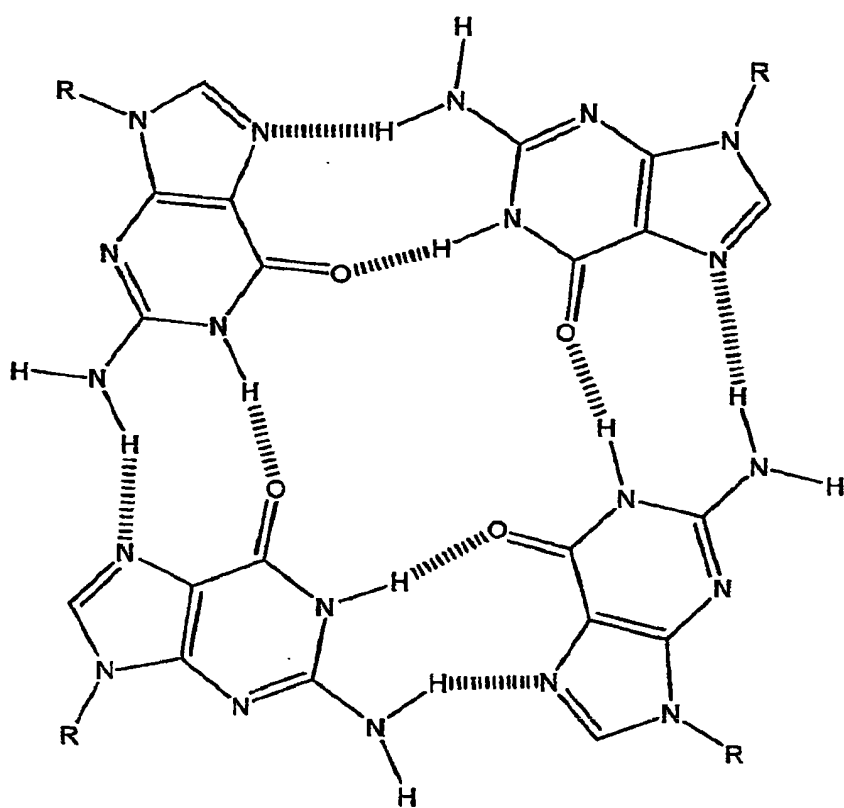


图 11

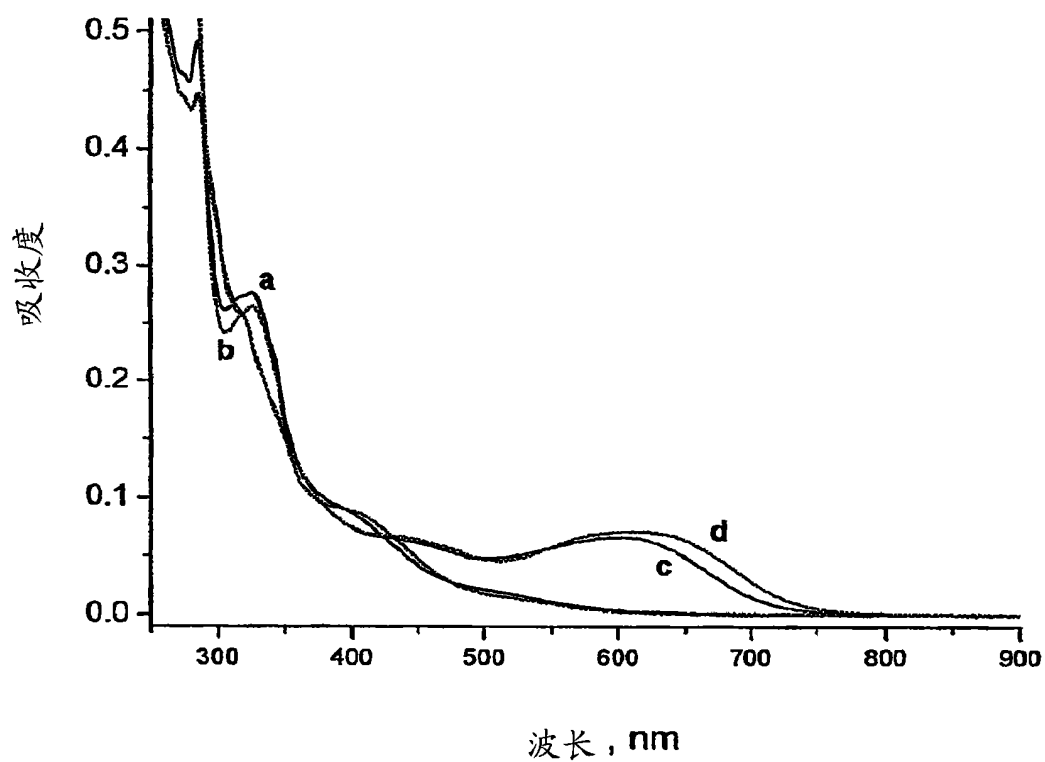


图 12

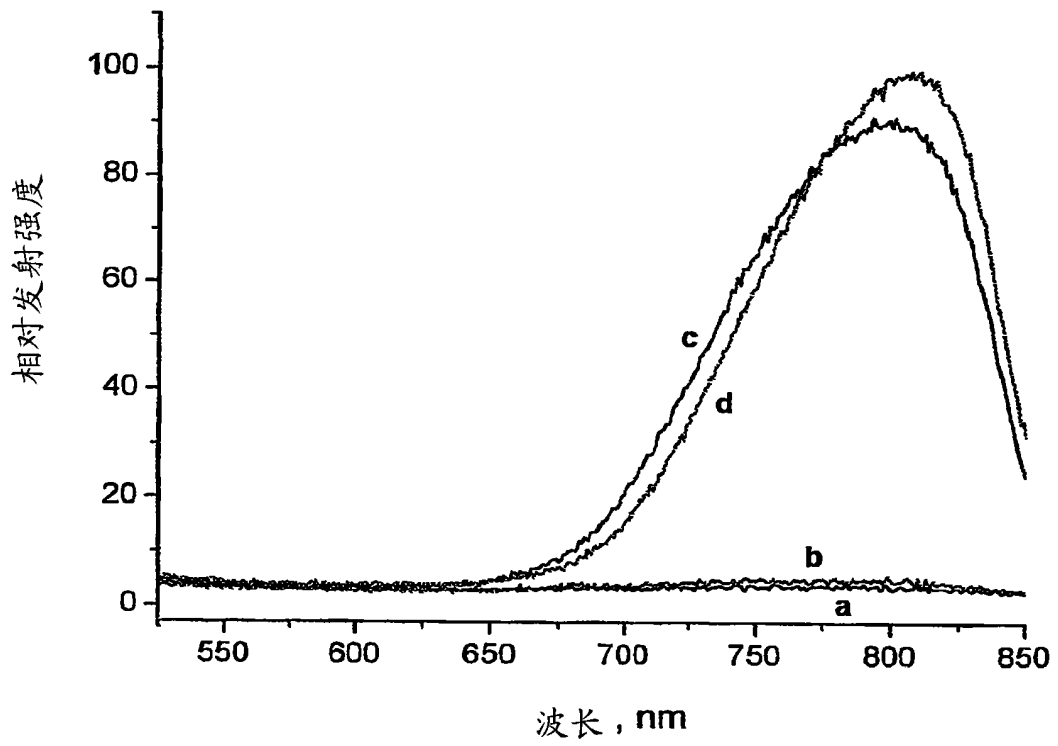


图 13

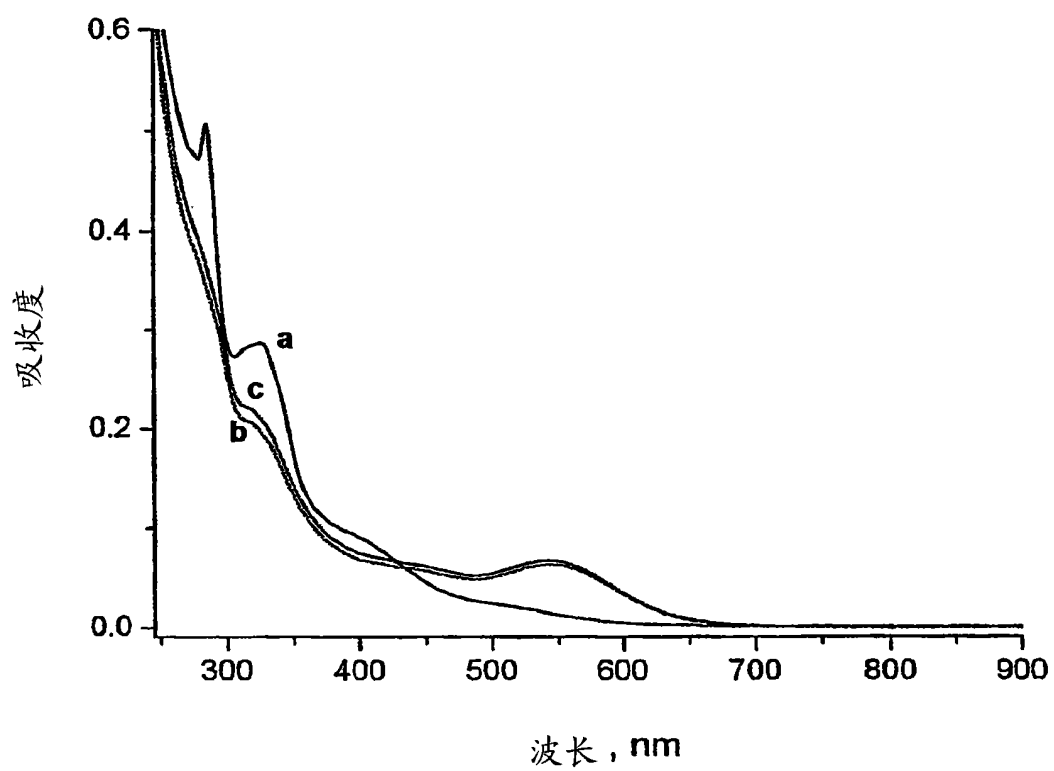


图 14

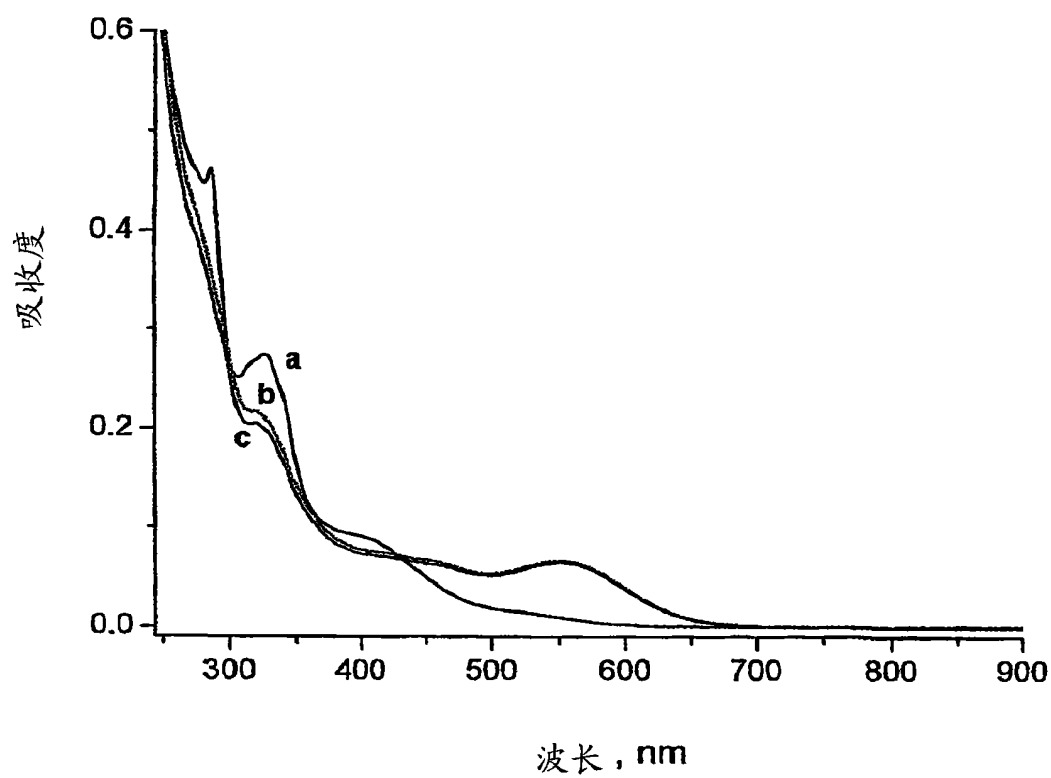


图 15

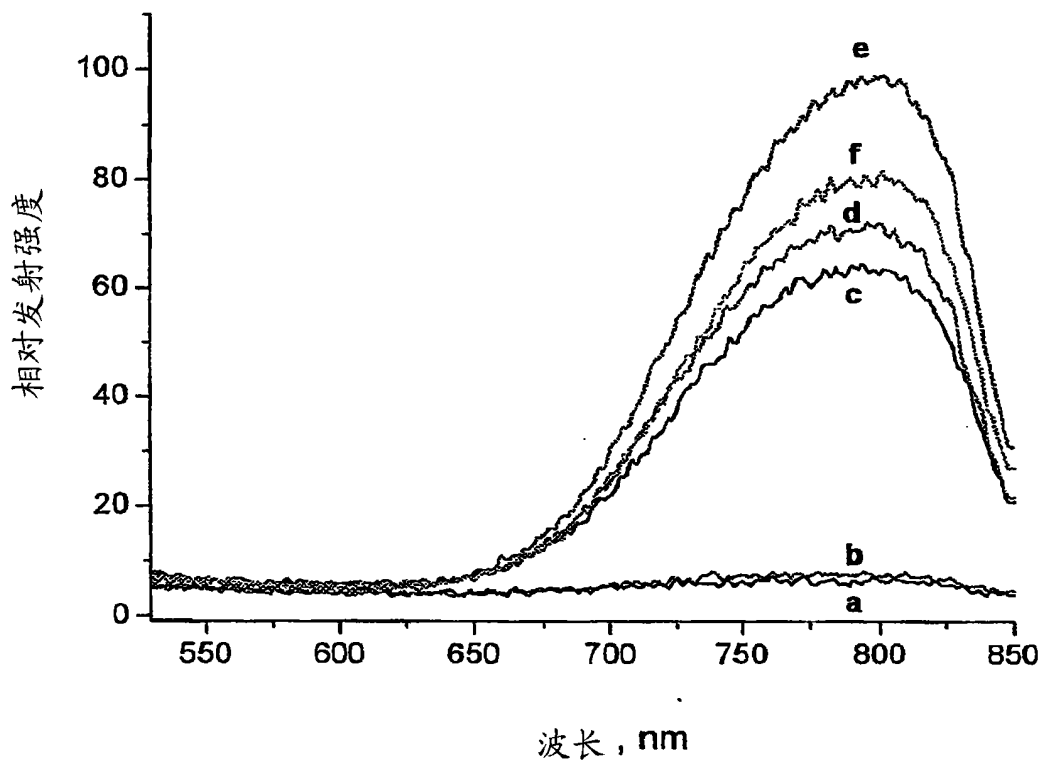


图 16

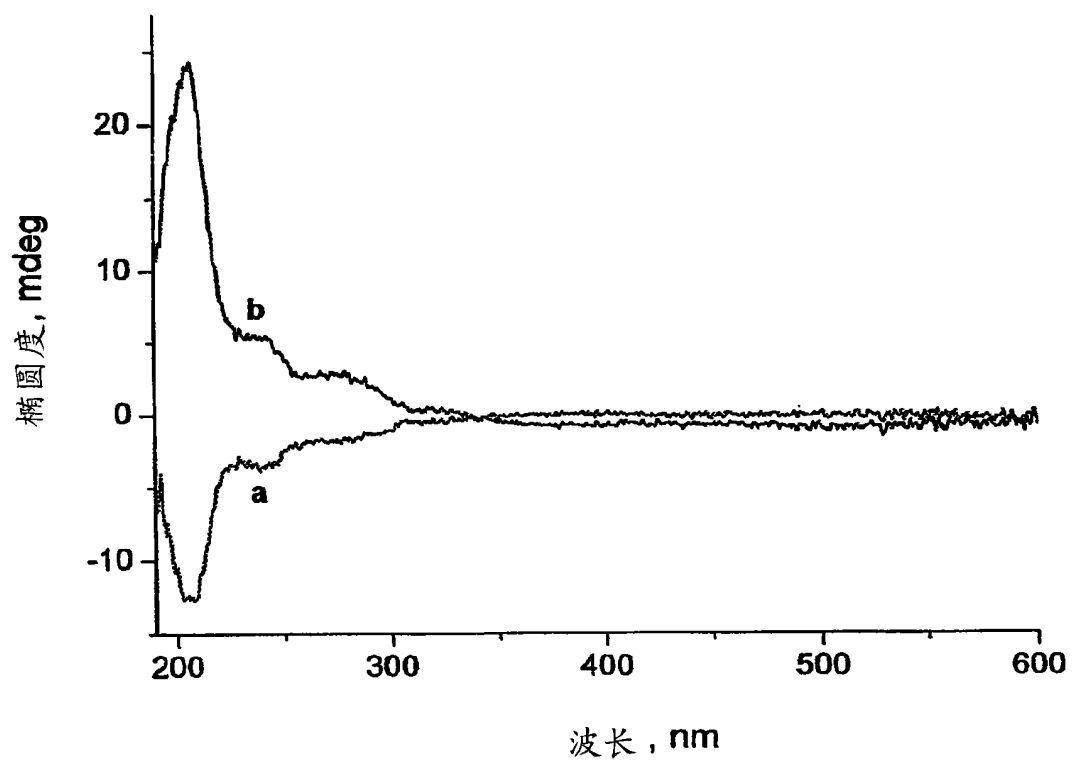


图 17

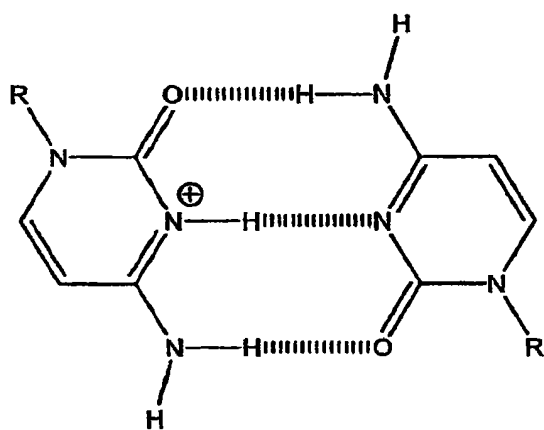


图 18

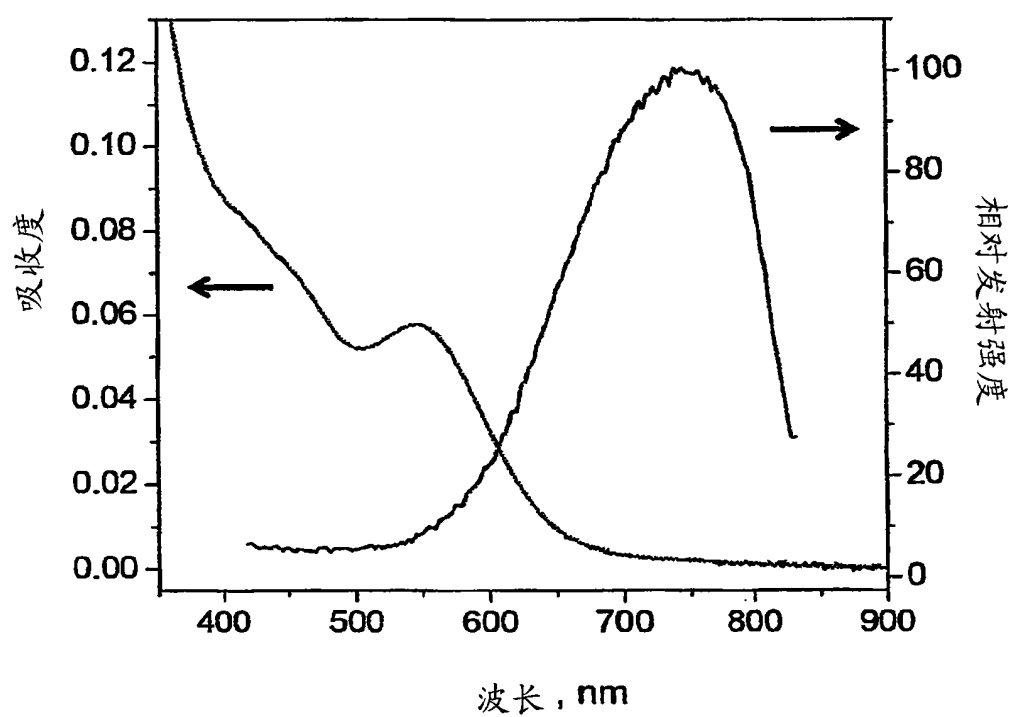


图 19

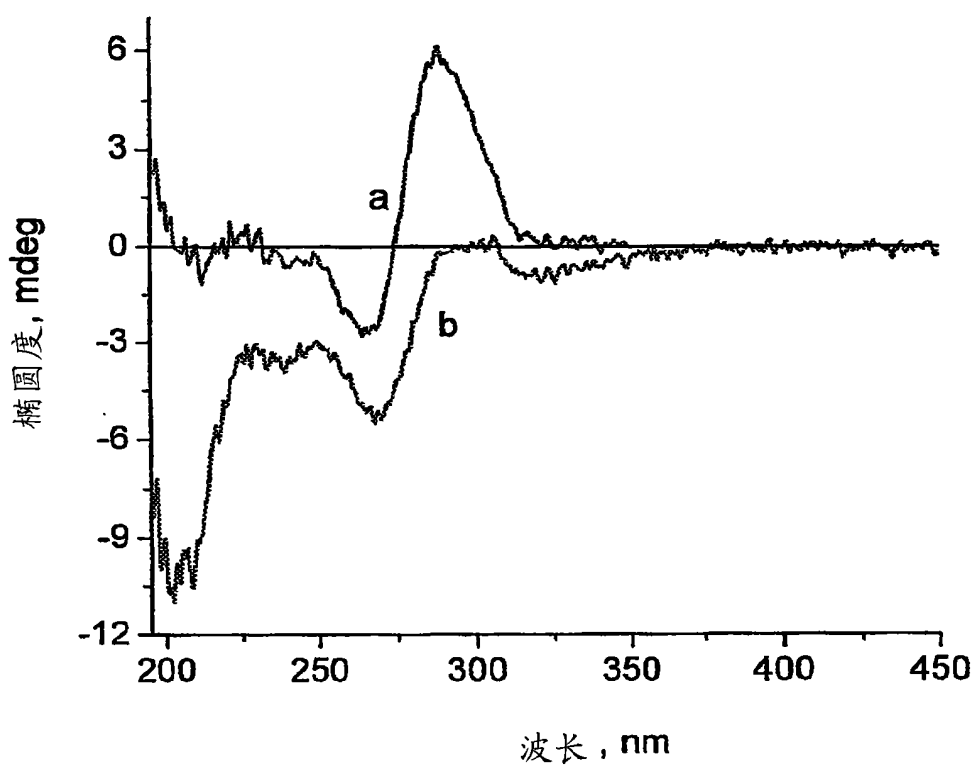


图 20

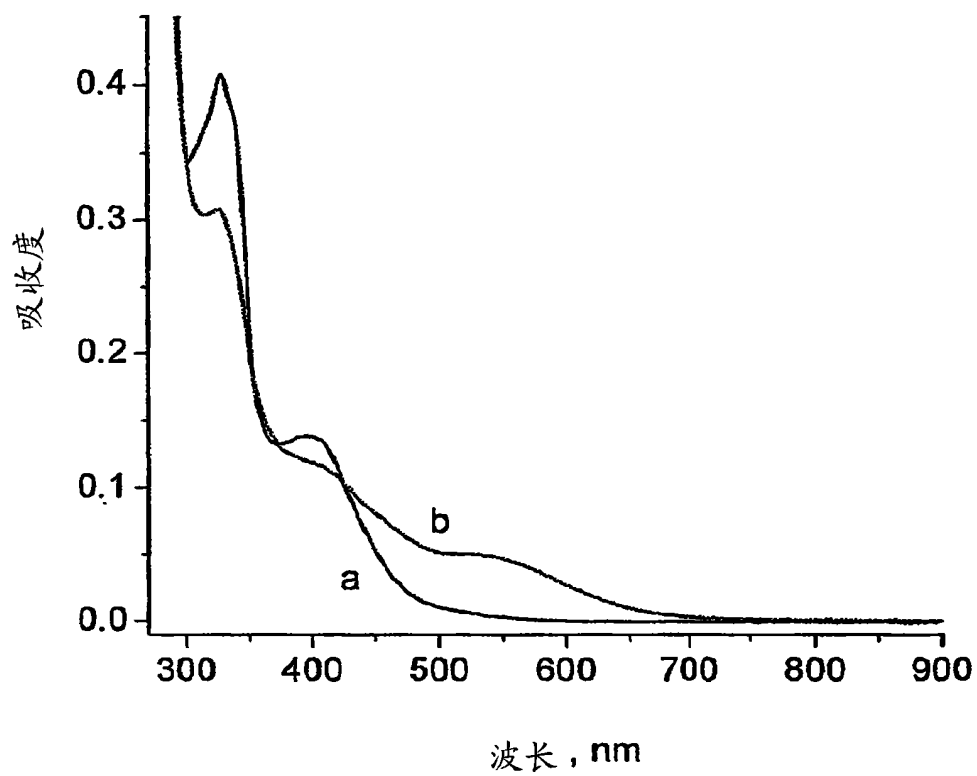


图 21

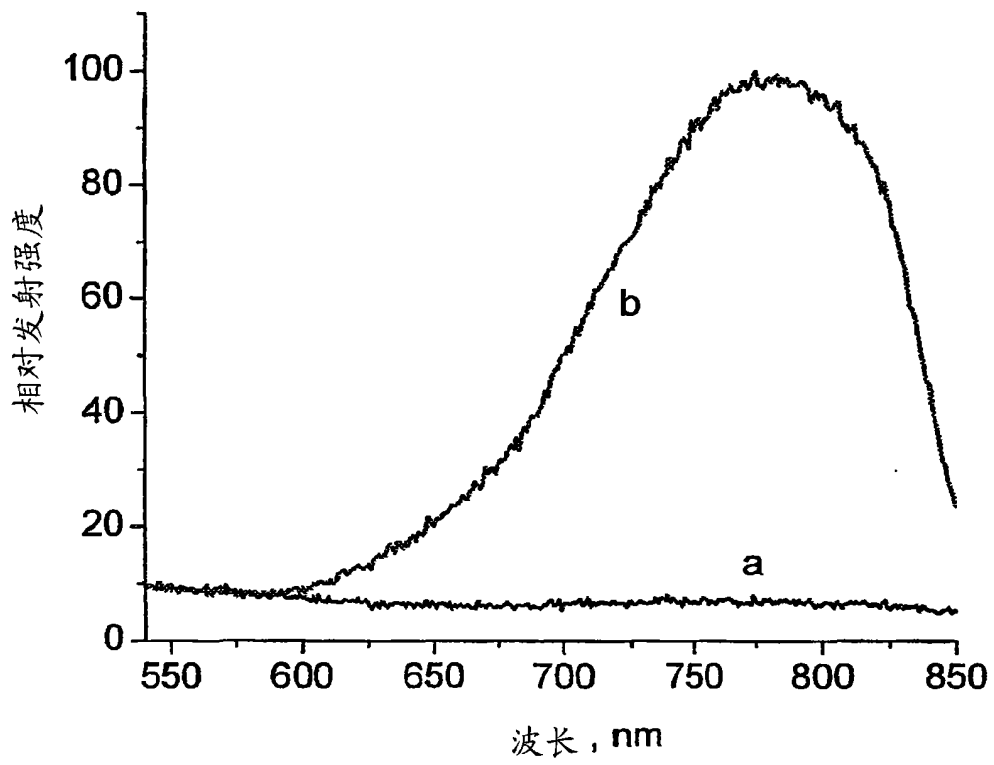


图 22

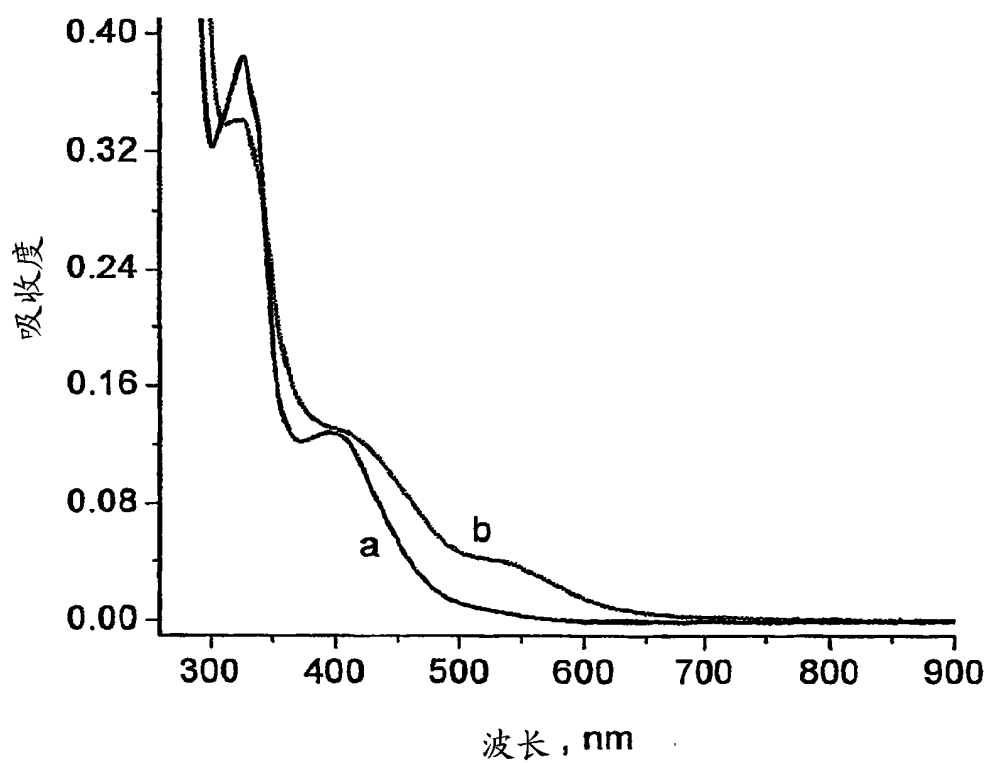


图 23

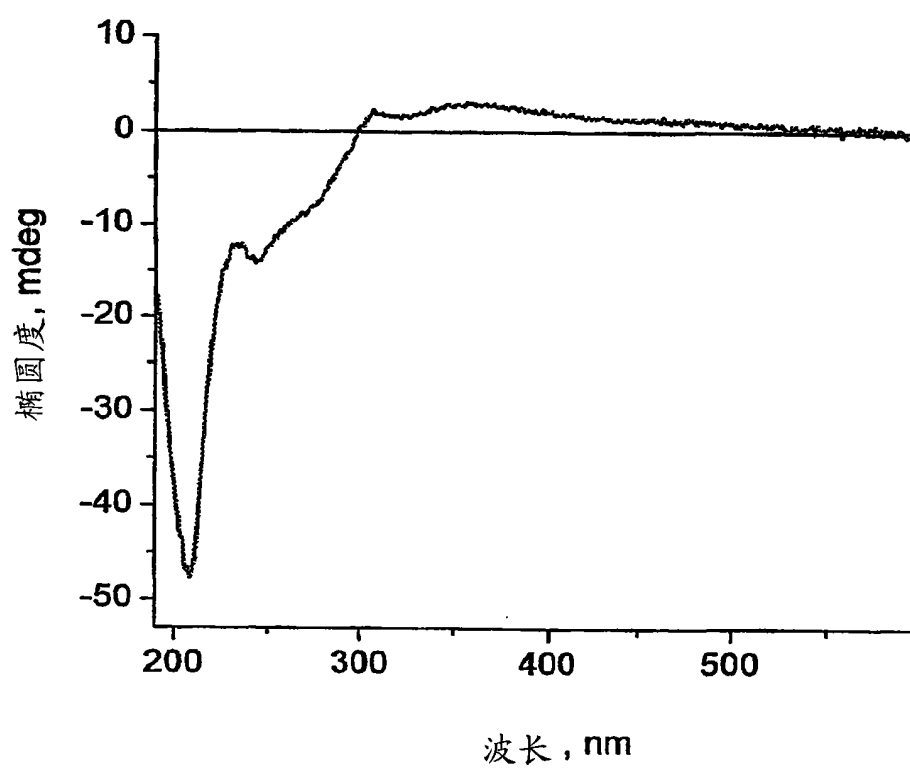


图 24

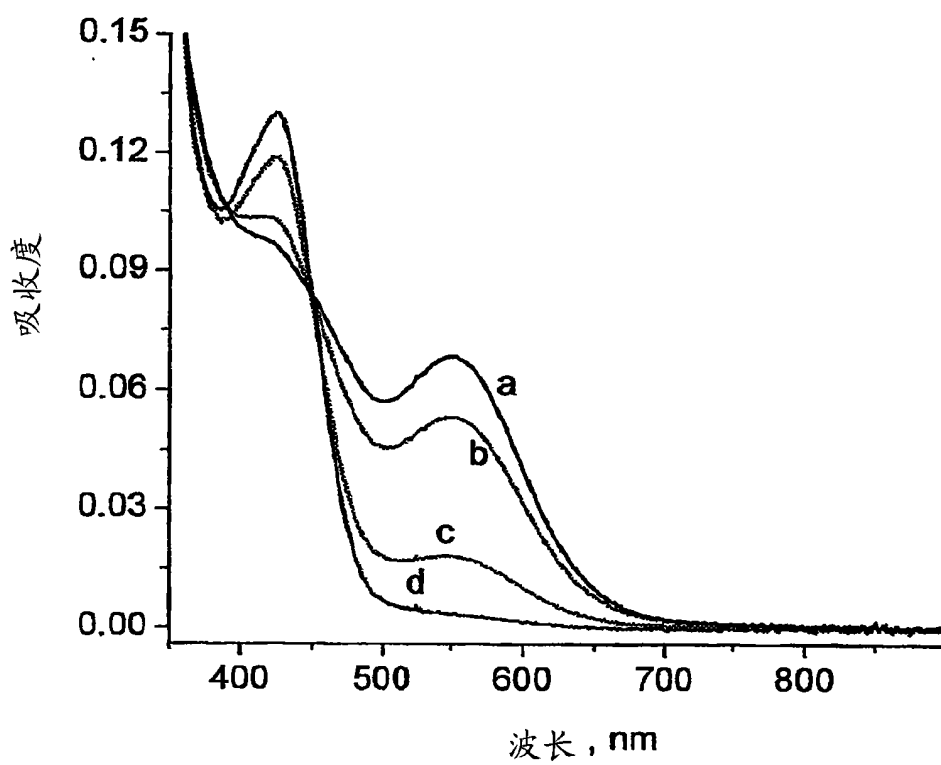


图 25

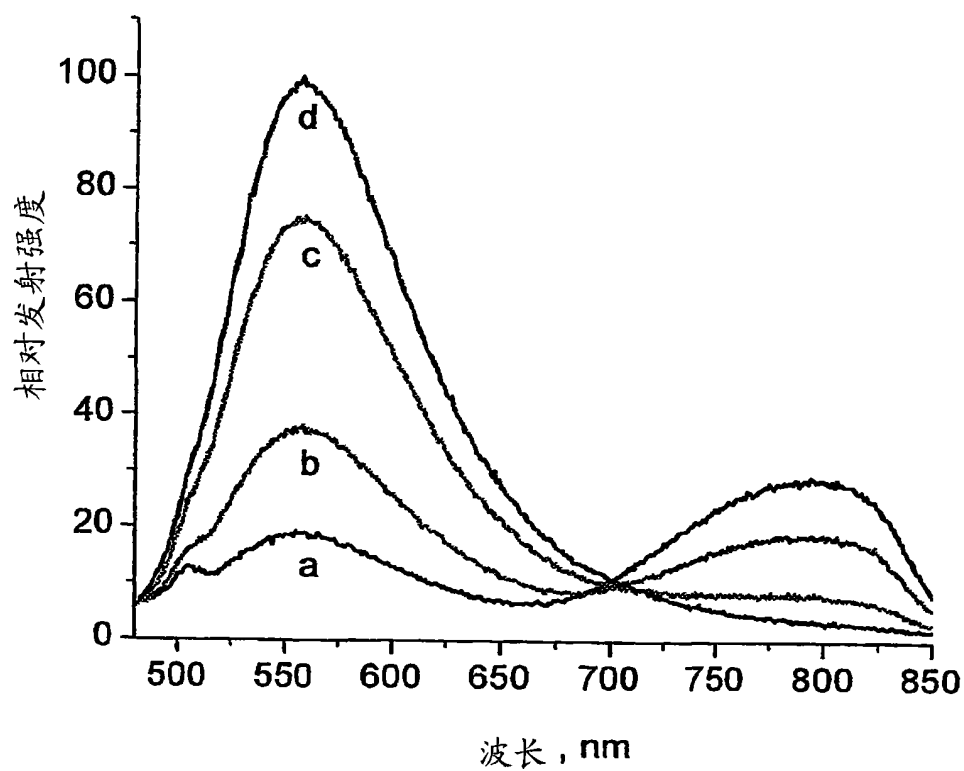


图 26