



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115819486 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 21

(21) 申请号 202210587979.1

(22) 申请日 2022.05.27

(66) 本国优先权数据

202210517266.8 2022.05.12 CN

(71) 申请人 厦门大学

地址 361000 福建省厦门市思明南路422号

(72) 发明人 严晓文 谢鹏

(74) 专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所

有限公司 35204

专利代理师 姜谧

(51) Int. Cl.

C07H 21/04 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

C07F 9/80 (2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

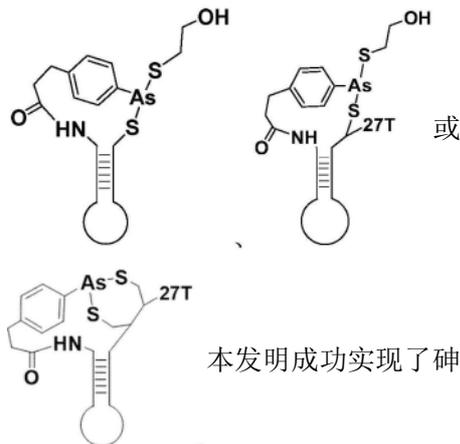
序列表1页 附图8页

(54) 发明名称

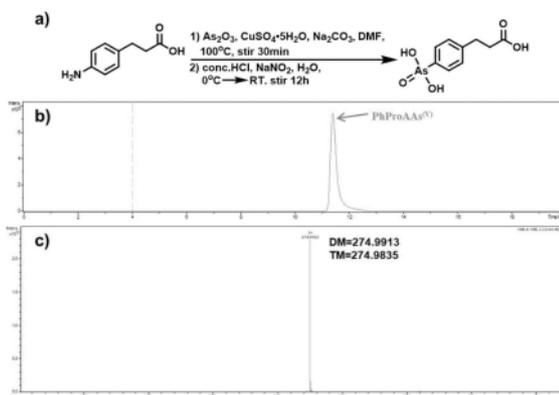
一种砷-巯基分子信标化合物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种砷-巯基分子信标化合物及其应用,其结构式为



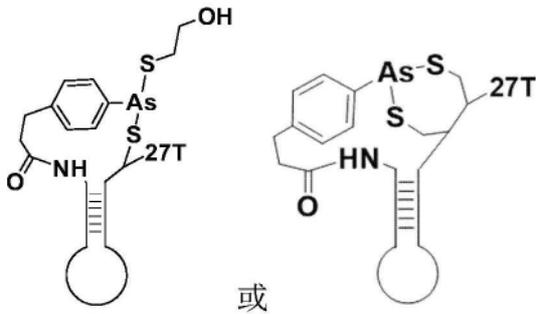
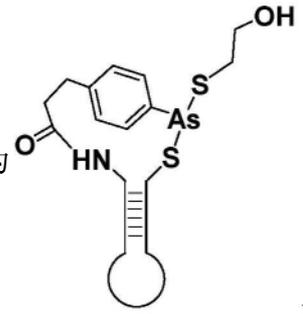
本发明成功实现了砷-巯基分子



CN 115819486 A

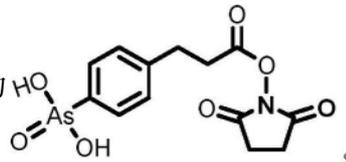
信标调控砷与小分子巯基化合物硫辛酸的多次可逆结合与解离,证明通过调控砷与巯基的距离来调控砷与巯基相互作用策略可控性高、稳定性高、反应速率快。

1. 一种砷-巯基分子信标化合物, 其特征在于: 其结构式为

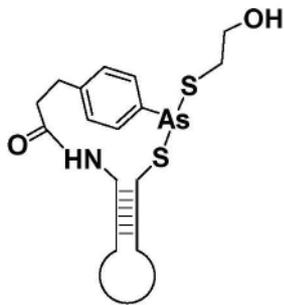


其由4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯、巯基乙醇和DNA分子

反应制成, 该4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯的结构式为



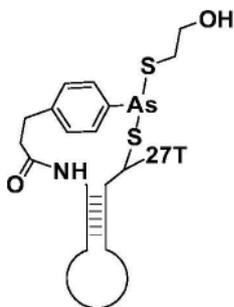
2. 如权利要求1所述的一种砷-巯基分子信标化合物, 其特征在于: 其结构式为



所述DNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO.01所示, 其5' 端修饰有

Amino Linker C6, 3' 端修饰有Thiol Modifier C6 S-S。

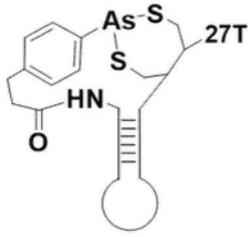
3. 如权利要求1所述的一种砷-巯基分子信标化合物, 其特征在于: 其结构式为



所述DNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO.02所示, 其5' 端其第28位的C修

饰有/iUniAmM/, 其3' 端修饰有Thiol Modifier C3 S-S。

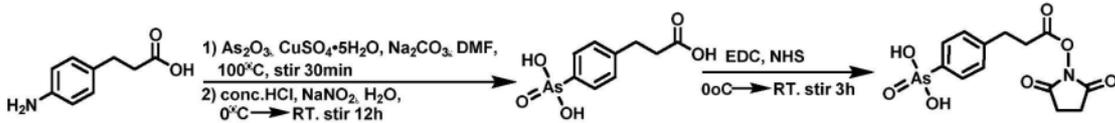
4. 如权利要求1所述的一种砷-巯基分子信标化合物, 其特征在于: 其结构式为



所述DNA分子的核苷酸序列如SEQ ID NO.02所示,其5'端其第28位的C修

饰有/iDTPA/,其3'端修饰有/3AmMO/。

5.如权利要求1至4中任一权利要求所述的砷-巯基分子信标化合物,其特征在于:所述4-砷氢化肉桂酸NHS酯的合成路线为:



6.权利要求1至5中任一权利要求所述的砷-巯基分子信标化合物在制备砷-巯基化合物相互作用检测试剂盒中的应用,其特征在于:该砷-巯基化合物相互作用检测试剂盒还包括如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

7.一种砷-巯基化合物相互作用检测试剂盒,其特征在于:具有权利要求1至5中任一权利要求所述的砷-巯基分子信标化合物、如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

8.权利要求1至5中任一权利要求所述的砷-巯基分子信标化合物在制备砷毒性可控药物组合物中的应用。

9.如权利要求8所述的应用,其特征在于:所述砷毒性可控药物组合物中还包括如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

10.一种砷毒性可控药物组合物,其特征在于:包括权利要求1至5中任一权利要求所述的砷-巯基分子信标化合物、如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

### 一种砷-巯基分子信标化合物及其应用

#### 技术领域

[0001] 本发明属于砷-巯基相互作用研究技术领域,具体涉及一种砷-巯基分子信标化合物及其应用。

#### 背景技术

[0002] 砷(As)是一种环境污染物,饮用水、空气、食物等来源的砷暴露影响人类健康。砷的毒性主要来源于三价砷(As<sup>III</sup>)与蛋白质巯基有较高的亲和力,砷的结合会抑制蛋白质活性,导致蛋白质构象变化,影响蛋白质正常功能。充分了解砷与巯基的相互作用对于理解砷的作用机制拥有重要的意义。但现有技术中,对砷与巯基相互作用方面的研究仍然十分不足,且没有合适的工具进行这些研究。

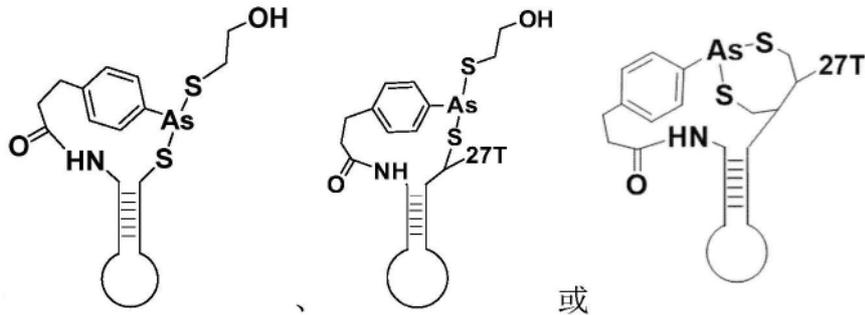
#### 发明内容

[0003] 本发明目的在于克服现有技术缺陷,提供一种砷-巯基分子信标化合物。

[0004] 本发明的另一目的在于提供该砷-巯基分子信标化合物的应用。

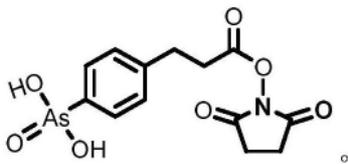
[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种砷-巯基分子信标化合物,其结构式为

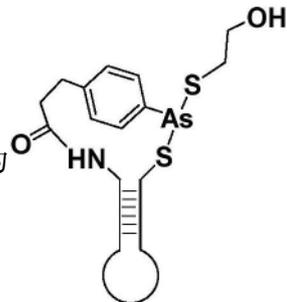


其由4-砷酸氢化肉桂酸

NHS酯、巯基乙醇和DNA分子反应制成,该4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯的结构式为



[0007] 在本发明的一个优选实施方案中,其结构式为

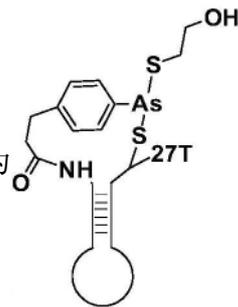


所述DNA分子

的核苷酸序列如SEQ ID NO.01所示,其5'端修饰有Amino LinkerC6,3'端修饰有Thiol

Modifier C6 S-S。

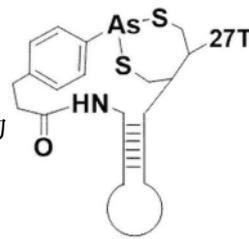
[0008] 在本发明的一个优选实施方案中,其结构式为



所述DNA分子的核

苷酸序列如SEQ ID NO.02所示,其5'端其第28位的C修饰有/iUniAmM/,其3'端修饰有Thiol Modifier C3 S-S。

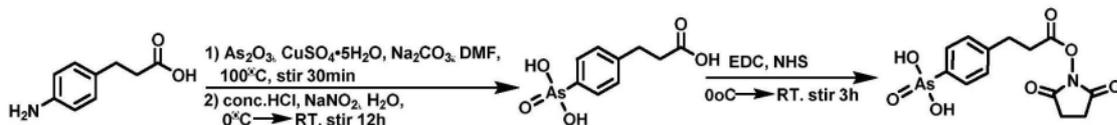
[0009] 在本发明的一个优选实施方案中,其结构式为



所述DNA分子的

核苷酸序列如SEQ ID NO.02所示,其5'端其第28位的C修饰有/iDTPA/,其3'端修饰有/3AmMO/。

[0010] 在本发明的一个优选实施方案中,所述4-砷氢化肉桂酸NHS酯的合成路线为:



[0011] 上述砷-巯基分子信标化合物在制备砷-巯基化合物相互作用检测试剂盒中的应用,该砷-巯基化合物相互作用检测试剂盒还包括如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

[0012] 一种砷-巯基化合物相互作用检测试剂盒,具有上述的砷-巯基分子信标化合物、如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

[0013] 上述砷-巯基分子信标化合物在制备砷毒性可控药物组合物中的应用。

[0014] 在本发明的一个优选实施方案中,所述砷毒性可控药物组合物中还包括如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

[0015] 一种砷毒性可控药物组合物,包括上述砷-巯基分子信标化合物、如SEQ ID NO.03所示的LC DNA分子和如SEQ ID NO.04所示的LCD DNA分子。

[0016] 本发明的有益效果是:本发明成功实现了砷-巯基分子信标调控砷与小分子巯基化合物硫辛酸的多次可逆结合与解离,证明通过调控砷与巯基的距离来调控砷与巯基相互作用策略的可控性,其巯基选择性高、稳定性高、反应速率快。

## 附图说明

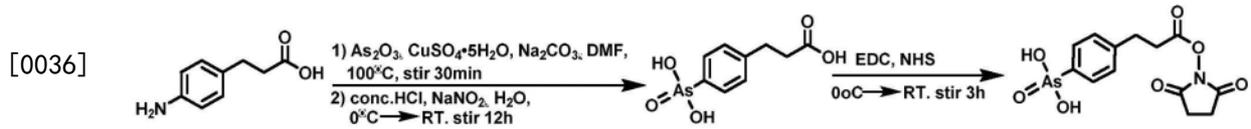
[0017] 图1为本发明实施例1中4-砷酸氢化肉桂酸的(a)合成路线图;(b)HPLC-ESI-MS选择离子流图和(c)质谱图。

[0018] 图2为本发明实施例1中4-砷酸氢化肉桂酸在DMSO-D<sub>6</sub>中的核磁共振<sup>1</sup>H谱图。

- [0019] 图3为本发明实施例1中4-砷酸氢化肉桂酸在DMSO-D<sub>6</sub>中的核磁共振<sup>13</sup>C谱图。
- [0020] 图4为本发明实施例1中4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯的(a)合成路线、(b)HPLC-ESI-MS选择离子流图和(c)质谱图。
- [0021] 图5为本发明实施例1中4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯在DMSO-D<sub>6</sub>中的核磁共振<sup>1</sup>H谱图。
- [0022] 图6为本发明实施例1中4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯在DMSO-D<sub>6</sub>中的核磁共振<sup>13</sup>C谱图。
- [0023] 图7为本发明实施例2中砷-巯基分子信标(ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>)合成路线图。
- [0024] 图8为本发明实施例2中(a)硫辛酸-荧光素(LA-FITC)的(a)合成路线图;(b)HPLC-ESI-MS选择离子流图和(c)质谱图。
- [0025] 图9为本发明实施例2中(a)ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC反应经脱盐处理过程;(b)产物的12% native page凝胶电泳图,其中,泳道M:DNA marker;泳道1:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>;2:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>脱盐;3:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>-LC;3:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>-LC脱盐。
- [0026] 图10为本发明实施例2中(a)ATMB-1Thiol-LC与LCD反应过程;(b)产物的12% native page凝胶电泳图,其中,泳道M:DNA marker;泳道1:ATMB-1T;2:ATMB-1Thiol-LC;3-6:ATMB-1Thiol/LC-LCD。
- [0027] 图11为本发明实施例2中(a)ATMB-1Thiol与LC反应循环过程;(b)产物的12% nativepage凝胶电泳图,泳道1:ATMB-1Thiol;2:ATMB-1Thiol-LC;
- [0028] 3:ATMB-1Thiol/LC-LCD;4-7:ATMB-1Thiol-LC/LC-LCD。
- [0029] 图12为本发明实施例2中(a)ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC反应过程;(b)产物的12% native page凝胶电泳图,泳道1-3:ATMB-1Thiol;4-6:ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>;7-9:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>。
- [0030] 图13为本发明实施例2中(a)ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC反应过程(R=OH或SH);(b)产物的12% nativepage凝胶电泳图,其中,泳道1:ATMB-1Thiol;2:ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>;3,4:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>;5,7,8:ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>-LC;6,9:LC-LCD/ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>。
- [0031] 图14为本发明实施例3中(a)ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC反应过程;(b)产物的12% nativepage凝胶电泳图,泳道1:ATMB-27T-1Thiol;2:ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(V)</sup>;3-4:ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup>;5:ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup>-LC;6:ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup>/LC-LCD。
- [0032] 图15为本发明实施例4中(a)ATMB-27T-2Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC反应过程;(b)产物的12% nativepage凝胶电泳图,泳道1、3、5、7:ATMB-27T-2Thiol-As<sup>(III)</sup>;2、4、6:ATMB-27T-2Thiol-As<sup>(III)</sup>-LC。

### 具体实施方式

- [0033] 以下通过具体实施方式结合附图对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。
- [0034] 实施例1 4-砷氢化肉桂酸NHS酯的合成
- [0035] 合成路线如下:



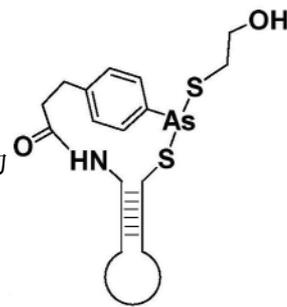
[0037] 具体包括如下步骤:

[0038] (1) 4-砷酸氢化肉桂酸的合成: 于50mL烧瓶中加入无水碳酸钠(500mg, 4.67mmol)、三氧化二砷(250mg, 1.26mmol)和五水合硫酸铜(20mg, 0.075mmol), 再加入8mL水, 搅拌加热。当大部分固体溶解后, 停止加热, 溶液静置冷却, 得到亚砷酸盐混合物。于50mL烧杯中, 加入4-氨基氢化肉桂酸(330mg, 2mmol), 再加入10mL DMF促进溶解, 而后缓慢加入浓盐酸(200 $\mu$ L), 加入一定量冰块得到15mL的溶液, 缓慢加入亚硝酸钠(139mg, 2mmol)的饱和水溶液, 得到淡黄色重氮盐溶液, 接着将其缓慢加入到亚砷酸盐混合物中, 置于冰浴搅拌1h, 进一步将产生的浆液搅拌过夜得到棕色混合液。往以上溶液中添加8mL浓盐酸酸化直到棕色油状沉淀产生, 混合物通过离心去除沉淀。产物由反相色谱柱纯化, 旋蒸后得到237mg白色固体, 产率为43.2%。利用HPLC-ESI-MS ( $m/z=274.9913$ ) (图1) 和核磁共振 $^1\text{H}$ 谱(图2)和 $^{13}\text{C}$ 谱(图3)对产物进行结构鉴定。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.70 (d, 2H), 7.49 (d, 2H), 2.91 (t, 2H), 2.59 (t, 2H),  $^{13}\text{C}$  NMR (126MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  173.90, 147.00, 130.99, 130.55, 129.87, 35.05, 30.73.

[0039] (2) 4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯的合成: 于25mL烧瓶中加入4-砷酸氢化肉桂酸(30mg, 0.1mmol), 加入5mL乙腈, 置于 $0^\circ\text{C}$ 冰浴条件下, 再加入EDC(25mg, 0.12mmol)活化20min, 之后加入N-羟基琥珀酰亚胺(14mg, 0.12mmol), 自然升温至室温反应3h。产物由反向色谱柱纯化, 旋蒸得到34mg白色固体, 产率为90%。利用HPLC-ESI-MS ( $m/z=372.0006$ ) (图4) 和核磁共振 $^1\text{H}$ 谱(图5)和 $^{13}\text{C}$ 谱(图6)对产物进行结构鉴定。 $^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.70 (d, 2H), 7.49 (d, 2H), 2.91 (t, 2H), 2.64 (t, 4H), 2.59 (t, 2H),  $^{13}\text{C}$  NMR (126MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  173.25, 171.35, 147.02, 131.05, 130.58, 130.54, 35.09, 31.55, 30.14, 25.90.

[0040] 实施例2

[0041] 本实施例的砷-巯基分子信标化合物的结构式为



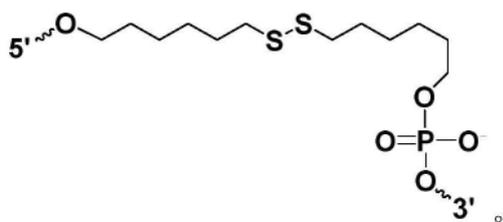
由实施例1

制得的4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯、巯基乙醇和DNA分子ATMB-1Thiol反应制成;

[0042] 该DNA分子ATMB-1Thiol的核苷酸序列为cgtacggaggtgatgtgtgtgtgagtggttacg (SEQ ID NO.01), 其5'端修饰有Amino Linker C6, 3'端修饰有Thiol Modifier C6S-S, Amino

Linker C6的结构式为

Thiol Modifier C6 S-S的结构式为



[0043] 该砷-巯基分子信标化合物的制备方法包括:将无菌水加入至设计DNA序列中得到浓度为20mM的ATMB-1Thiol母液,取5 $\mu$ L加入4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯(5 $\mu$ L,200 $\mu$ M),再加入1 $\mu$ L 1 $\times$ PBS及9 $\mu$ L水,置于室温下反应2h,得到ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>,用Micro Bio-Spin 6 Columns脱盐柱将混合物中过量的4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯除去,而后加入巯基乙醇(20 $\mu$ L,1M)将砷还原为三价,用Micro Bio-Spin 6 Columns脱盐柱脱盐两次,除去过量的巯基乙醇,得到浓度为25 $\mu$ M的所述砷-巯基分子信标化合物ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>,合成路线如图7所示。

[0044] 为了便于使用荧光凝胶电泳表征本发明砷-巯基分子信标化合物,本实施例合成了带有巯基和荧光基团的小分子化合物硫辛酸-荧光素。

[0045] 硫辛酸-荧光素(LA-FITC)的合成及表征:于50ml烧瓶中加入FITC(50mg,0.13mmol),加入5ml DMF溶解,再加入Boc-乙二胺(25mg,0.16mmol),反应在室温下搅拌8h。粗产物直接加入80 $\mu$ L TFA脱保护,混合物置于室温下搅拌12h。得到DEA-FITC,此粗产物加入NHS-DLTA(50mg,0.17mmol),反应体系于冰浴条件下温度保持在0 $^{\circ}$ C搅拌1h。而后室温搅拌2h。产物由反相色谱柱纯化,旋蒸后得到黄色固体33mg,产率为40%。利用HPLC-ESI-MS(m/z=638.1487)(图8)对产物进行结构鉴定。

[0046] TCEP还原LA-FITC:称量10mg LA-FITC固体,溶于300 $\mu$ L DMF中得到浓度为50mM氧化态的LA-FITC母液,将其与溶于500mM NH<sub>4</sub>Cl、浓度为100mM的TCEP等体积反应,置于室温下震荡2h,打开二硫键,得到浓度为25mM还原态的LA-FITC。

[0047] 砷-巯基分子信标化合物ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>的表征:为了分析DNA末端修饰的氨基已经与4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯偶联,同时研究ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC的相互作用,过程示意如图9(a)所示。

[0048] DNAmarker浓度为15 $\mu$ M;1号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LA-FITC(3 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应30min;2号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LA-FITC(3 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应30min,用Micro Bio-Spin 6 Columns脱盐柱脱盐;3号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LA-FITC(3 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应30min,加入LC(核苷酸序列如SEQ ID NO.03所示,1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min;4号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LA-FITC(3 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应30min,加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,用Micro Bio-Spin 6 Columns脱盐柱脱盐。各泳道样品体积为10 $\mu$ L,浓度为5 $\mu$ M并含1 $\times$ PBS,且加入2 $\mu$ L DNA上样液。

[0049] 制胶:取4.5mL聚丙烯酰胺,加入9.5mL 1 $\times$ TBE和9mL H<sub>2</sub>O,再加入150 $\mu$ L 10%APs和15 $\mu$ L TEMED,混匀后注入提前准备好的电泳玻璃板中,插入梳子,10min后制得凝胶。

[0050] 上样:将12 $\mu$ L DNA marker及1、2、3、4号样品分别加入对应泳道中。

[0051] 电泳:所有DNA在1 $\times$ TBE电泳缓冲液中经80V电压凝胶电泳1h。

[0052] 染色:于40mL电泳液中加入溴化乙锭(20 $\mu$ M,100 $\mu$ L)染色凝胶20min后使用凝胶成像仪扫描,凝胶电泳成像结果如图9(b)所示。没有偶联砷功能基团的信标,在打开下不与

LA-FITC结合,由泳道3、4可知,偶联了砷功能基团的ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>打开时与LA-FITC成功结合,证明砷-巯基分子信标合成成功。

[0053] LCD用量的优化:

[0054] 为确定分子信标在加入LC打开后,使其重新回到关闭状态的最佳LCD(核苷酸序列如SEQ ID NO.04所示)当量,本实施例利用未功能化修饰的DNA序列通过凝胶电泳实验进行优化,过程示意如图10(a)所示。

[0055] DNA marker浓度15 $\mu$ M;1号为ATMB-1Thiol(5 $\mu$ M,10 $\mu$ L)空白对照样品;2号为ATMB-1Thiol(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,此泳道条带确定1.0倍当量LC可将分子信标完全打开;3-6号样品为取ATMB-1Thiol(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,再分别加入1 $\mu$ L、1.2 $\mu$ L、1.5 $\mu$ L、2.0 $\mu$ L浓度为50 $\mu$ M的LCD反应10min,各泳道样品体积10 $\mu$ L含1 $\times$ PBS,且加入2 $\mu$ LDNA上样液。凝胶电泳结果如图10(b)所示,ATMB-1Thiol与LC结合打开后,加入LCD回到关闭状态的最佳当量为1:1.2。

[0056] 循环调控LC用量的优化:

[0057] ATMB-1Thiol与LC杂交后,加入1.2倍当量LCD使分子信标回到关闭状态,为确定分子信标重新打开所需的LC最佳当量,利用未功能化修饰的DNA序列进行优化,过程示意如图11(a)所示。

[0058] DNA marker浓度15 $\mu$ M;1号为ATMB-1Thiol(5 $\mu$ M,10 $\mu$ L)空白对照样品,2号为ATMB-1Thiol(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min;3号为ATMB-1Thiol(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,再加入LCD(1.2 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min;泳道4-7为ATMB-1Thiol(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,再加入LCD(1.2 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,再分别加入1.2 $\mu$ L、1.4 $\mu$ L、1.6 $\mu$ L、2.0 $\mu$ L浓度为50 $\mu$ M的LC反应10min,各泳道样品体积10 $\mu$ L含1 $\times$ PBS,且加入2 $\mu$ LDNA上样液,凝胶电泳结果如图11(b)所示,由泳道4-7可知,ATMB-1Thiol加入LC使分子信标重新打开的最佳当量为1:1.2。

[0059] LA-FITC用量的优化

[0060] 接下来,本实施例进一步优化了确定ATMB-1Thiol、ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>及ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC的相互作用情况与最佳当量,并分析了他们的相互作用过程,示意如图12(a)所示。

[0061] DNA marker浓度为15 $\mu$ M;1-3号为ATMB-1Thiol(2 $\mu$ L,25 $\mu$ M),分别加入1 $\mu$ L、2 $\mu$ L、3 $\mu$ L浓度为50 $\mu$ M的LA-FITC反应30min,再加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min;4-6号为ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>(2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),分别加入1 $\mu$ L、2 $\mu$ L、3 $\mu$ L浓度为50 $\mu$ M的LA-FITC反应30min,再加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min;7-9号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),分别加入1 $\mu$ L、2 $\mu$ L、3 $\mu$ L浓度为50 $\mu$ M的LA-FITC反应30min,再加入LC(1 $\mu$ L,50 $\mu$ M)反应10min,各泳道样品体积10 $\mu$ L含1 $\times$ PBS,且加入2 $\mu$ LDNA上样液,凝胶电泳结果如图12(b)所示,由泳道8可知,ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC反应的最佳当量比为1:2,ATMB-1Thiol与ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>不结合LA-FITC。

[0062] ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>与LA-FITC相互作用的调控

[0063] 为了探究ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>分子信标打开及关闭状态下与LA-FITC的结合情况,分别从路线1和2进行研究,过程示意如图13(a)所示。

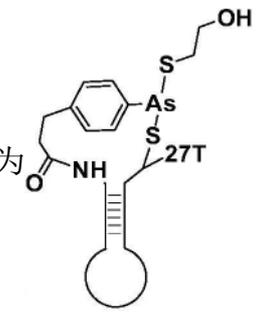
[0064] DNA marker浓度为15 $\mu$ M;1-3号分别为ATMB-1Thiol、ATMB-1Thiol-As<sup>(V)</sup>、ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(5 $\mu$ M,10 $\mu$ L)对照样品;4号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup>(2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),加入LA-

FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min; 5号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min, 再加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min; 6号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min, 再加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min, 再加入LCD (1.2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min; 7号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min; 8号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min, 再加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min; 9号为ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min, 再加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min, 再加入LCD (1.2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min, 各泳道样品体积10 $\mu$ L含1 $\times$ PBS, 且加入2 $\mu$ L DNA上样液, 凝胶电泳结果如图13 (b) 所示。

[0065] 路线1为先加入LA-FITC再加入LC打开分子信标, 凝胶电泳结果表明, 打开后的分子信标加入LA-FITC能成功偶联, 在路线2中, 先加入LC打开分子信标, 而后加入LA-FITC, 同样得到了偶联的复合物, 但由于ATMB-1Thiol-As<sup>(III)</sup> 闭合时迁移位置与LA-FITC重合, 不能判断闭合状态下分子信标能否结合LA-FITC, 因此本实施例对分子信标的长度进行了优化。

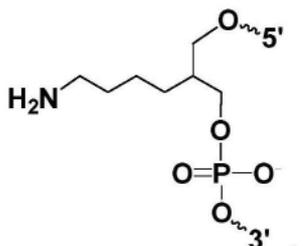
[0066] 实施例3

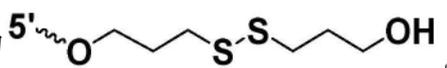
[0067] 本实施例设计了更长的DNA序列ATMB-27T-1Thiol, 此序列增加了27个碱基, 从而达到与游离的LA-FITC分离的目的, 过程示意如图14 (a) 所示。

[0068] 本实施例的砷-巯基分子信标化合物的结构式为  由实施例1制得

的4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯、巯基乙醇和DNA分子ATMB-27T-1Thiol反应制成;

[0069] 该DNA分子ATMB-27T-1Thiol的核苷酸序列为tttttttttttttttttttttttttttttttcgt acggaggtgatgtgtgtgagtggttacg (SEQ ID NO.02), 其5' 端其第28位的C修饰有/iUniAmM/,

其3' 端修饰有ThiolModifierC3S-S, /iUniAmM/ 的结构式为 

ThiolModifierC3S-S的结构式为 

[0070] 该砷-巯基分子信标化合物的制备方法参考实施例2进行。

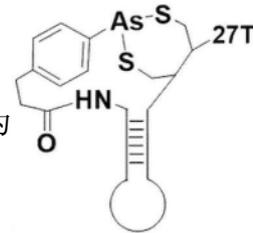
[0071] DNAMarker浓度为15 $\mu$ M; 1-3号分别为ATMB-27T-1Thiol、ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(V)</sup>、ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> 对照样品; 4号为ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min; 5号为ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min, 加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min; 6号ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ M), 加入LA-FITC (2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应30min, 再加入LC (1 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min, 再加入LCD (1.2 $\mu$ L, 50 $\mu$ M) 反应10min, 各泳道样品体积10 $\mu$ L含1 $\times$ PBS, 且加入2 $\mu$ LDNA上样液, 凝胶电泳结果如

图14 (b) 所示。由泳道4-6可知,ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> 分子信标能够实现开与关,在打开状态下成功与LA-FITC结合,但是关闭状态下分子信标仍可与LA-FITC结合。由于设计的DNA序列所修饰的功能基团只含一个巯基,但砷<sup>(III)</sup> 含有两个巯基结合位点,因此闭合状态下的分子信标砷功能基团仍保留1个与巯基化合物的结合位点,从而与LA-FITC结合。

#### [0072] 实施例4

[0073] 为了使得分子信标上的砷基团与巯基形成更为稳定的分子内砷硫键,保证砷-巯基分子信标在闭合状态下不结合小分子LA-FITC,本实施例设计了含有双巯基修饰的分子信标ATMB-27T-2Thiol-As<sup>(III)</sup>。分子信标处于关闭状态时,砷的两个巯基结合位点均与链上修饰的双巯基稳定结合,因此达到关闭状态下无法结合其他巯基化合物的理想状态。本实施例通过凝胶电泳实验探究了ATMB-27T-2Thiol-As<sup>(III)</sup> 与LA-FITC的相互作用情况及砷-巯基分子信标的可逆调控情况,过程示意如图15 (a) 所示。

[0074] 本实施例的砷-巯基分子信标化合物的其结构式为

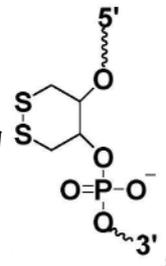


由实施例1

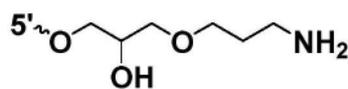
制得的4-砷酸氢化肉桂酸NHS酯、巯基乙醇和DNA分子ATMB-27T-2Thiol反应制成

[0075] 该DNA分子ATMB-27T-2Thiol的核苷酸序列为tttttttttttttttttttttttttttttttttcgtacggaggtgatgtgtgtgagtgggtacg (SEQ ID NO.02),其5' 端其第28位的C修饰有/iDTPA/,其

3' 端修饰有/3AmMO/, /iDTPA/ 的结构式为



/3AmMO/ 的结构式为



[0076] 该砷-巯基分子信标化合物的制备方法参考实施例2进行。

[0077] DNAMarker浓度为15 $\mu$ M;1号为ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),加入LA-FITC (2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应30min;2号为ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),加入LA-FITC (2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应30min,再加入LC (1 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应10min;3号为ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),加入LA-FITC (2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应30min,再加入LC (1 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应10min,再加入LCD (1.2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应10min;4号为ATMB-27T-1Thiol-As<sup>(III)</sup> (2.5 $\mu$ L,20 $\mu$ M),加入LA-FITC (2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应30min,再加入LC (1 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应10min,再加入LCD (1.2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应10min,再加入LC (1.2 $\mu$ L,50 $\mu$ M) 反应10min;5、6、7号样品依规律逐级添加,各泳道样品体积10 $\mu$ L含1 $\times$  PBS,且加入2 $\mu$ LDNA上样液,凝胶电泳结果如图15 (b) 所示。电泳结果显示,ATMB-27T-2Thiol-As<sup>(III)</sup> 分子信标在打开状态下成功与LA-FITC结合,关闭状态下不结合,并且成功实现了砷-巯基分子信标与小分子巯基化合物LA-FITC的多次可逆循环调控。

[0078] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例而已,故不能依此限定本发明实施的范围,即依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰,皆应仍属本发明涵盖的范围内。

## 序列表

<110> 厦门大学

<120> 一种砷-巯基分子信标化合物及其应用

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

cgtacggagg tgatgtgtgt gagggttac g 31

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

tttttttttt tttttttttt tttttttcgt acggaggtga tgtgtgtgag tgggtacg 58

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

ccactgccac tcacacacat cacctcc 27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

ggaggtgatg tgtgtgagtg gcagtgg 27

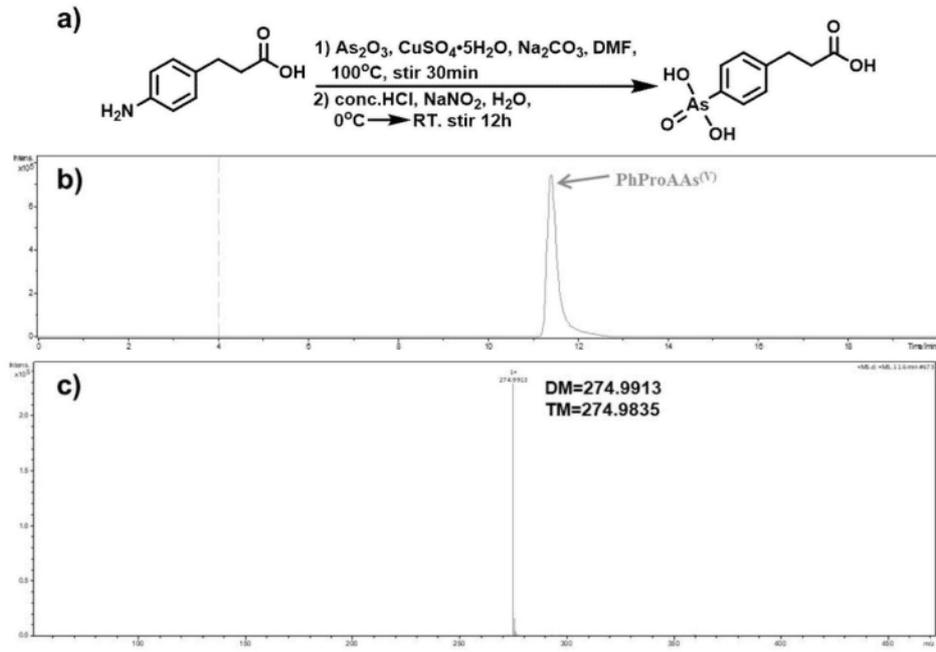


图1

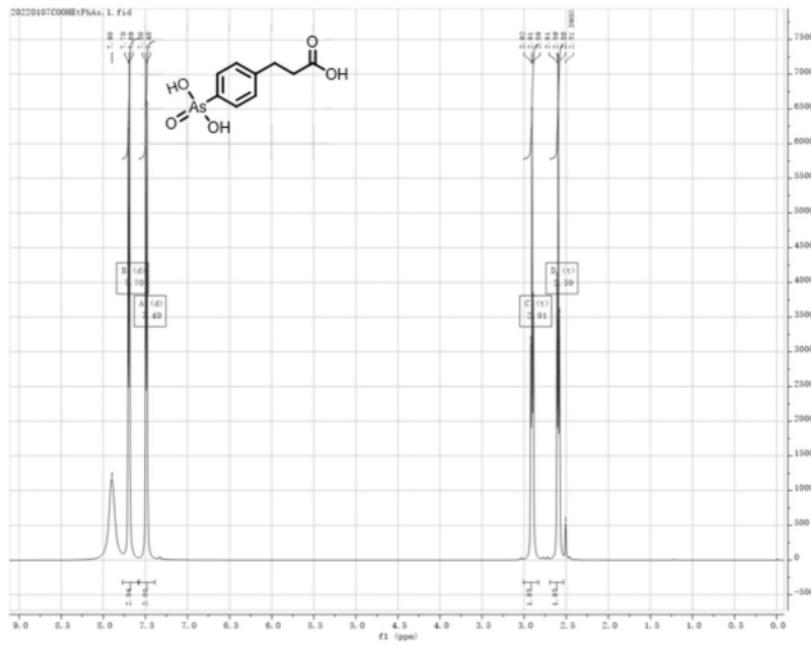


图2

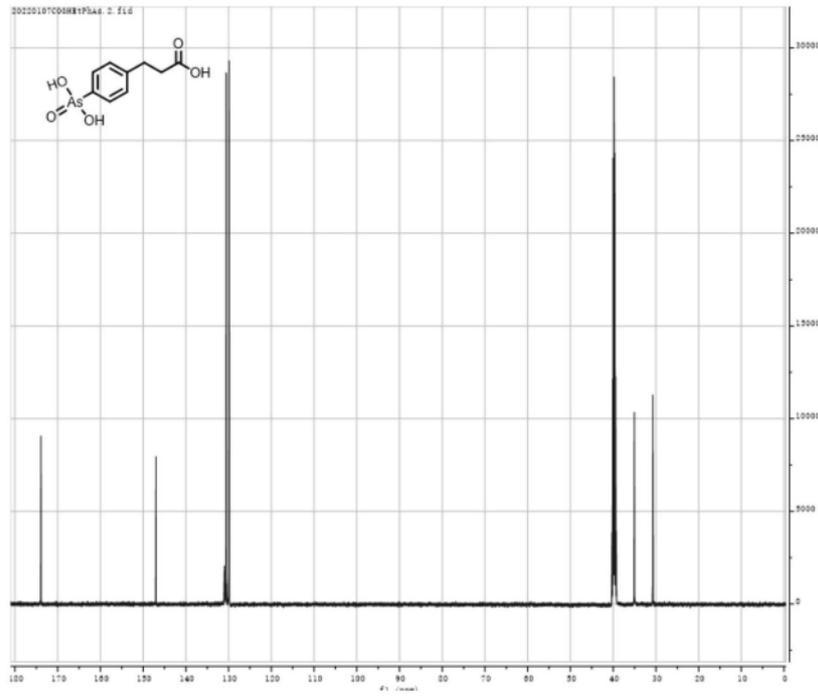


图3

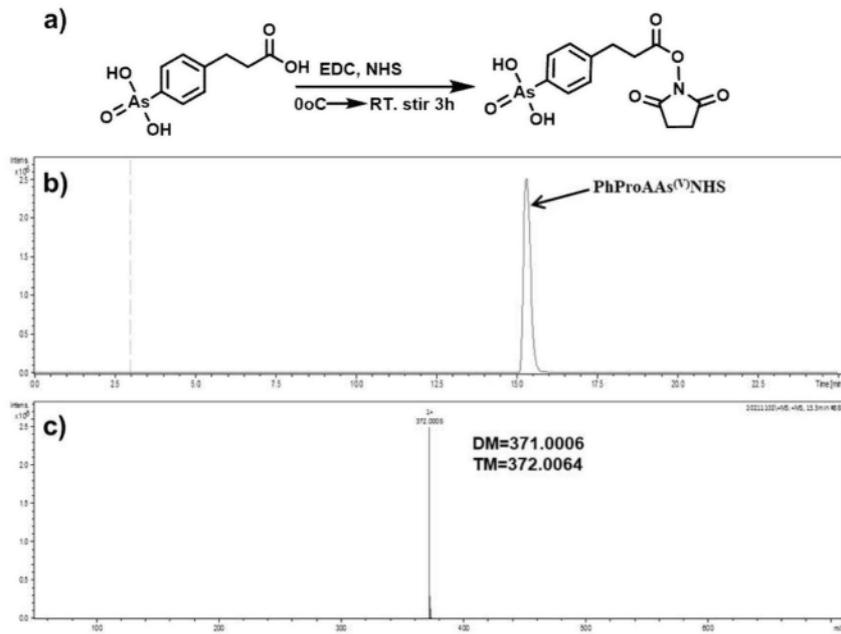


图4

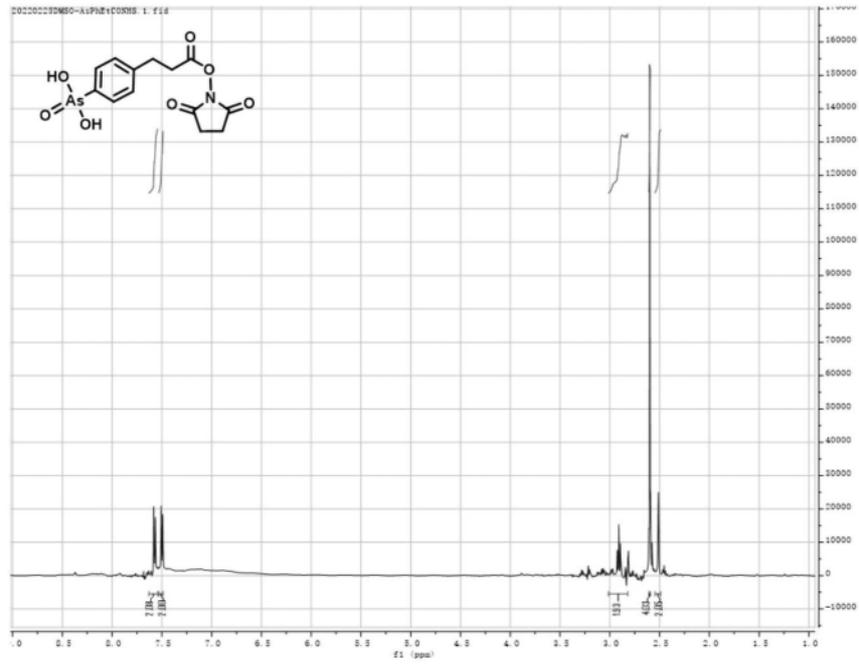


图5

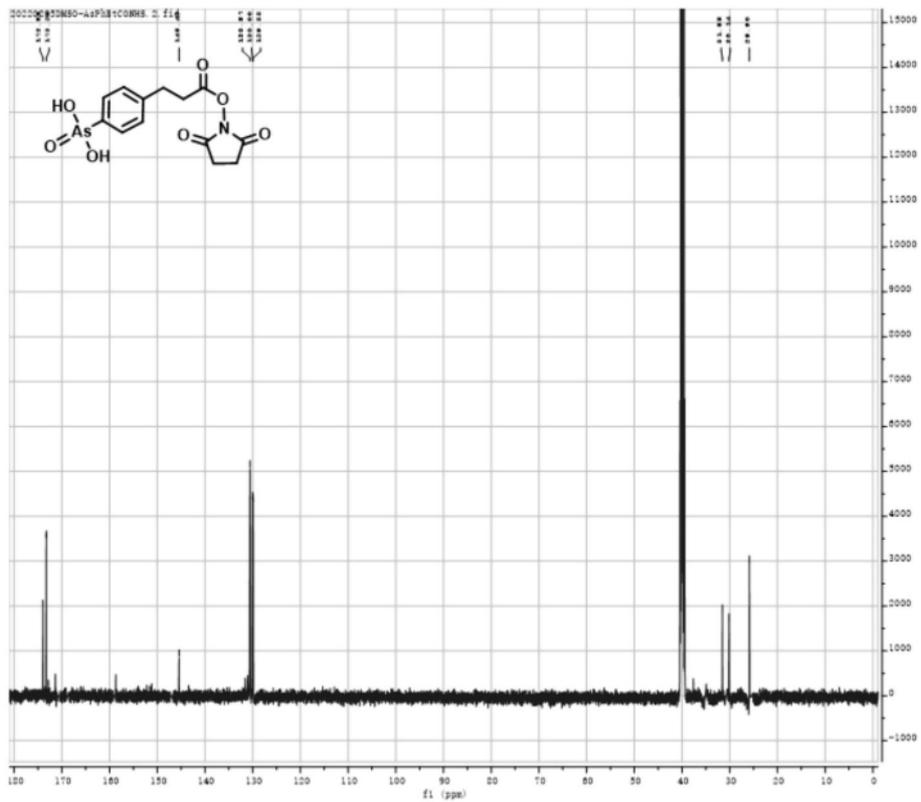


图6

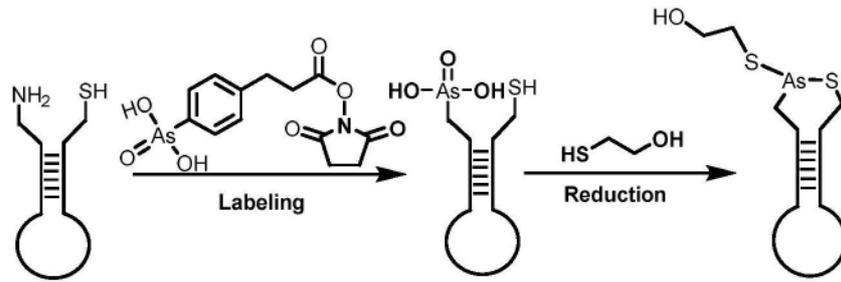


图7

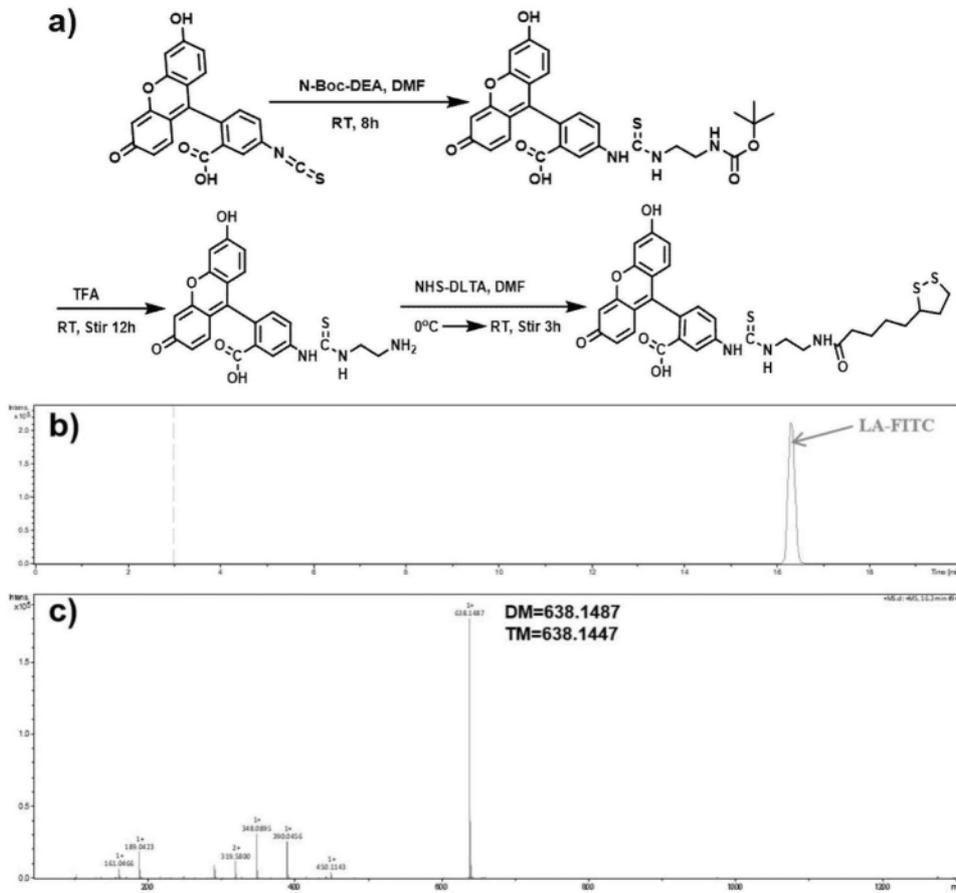


图8

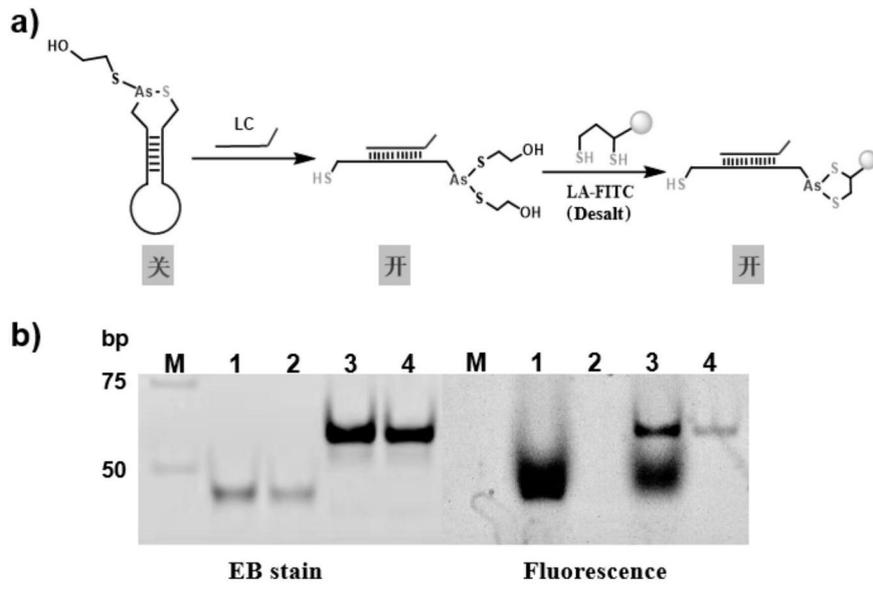


图9

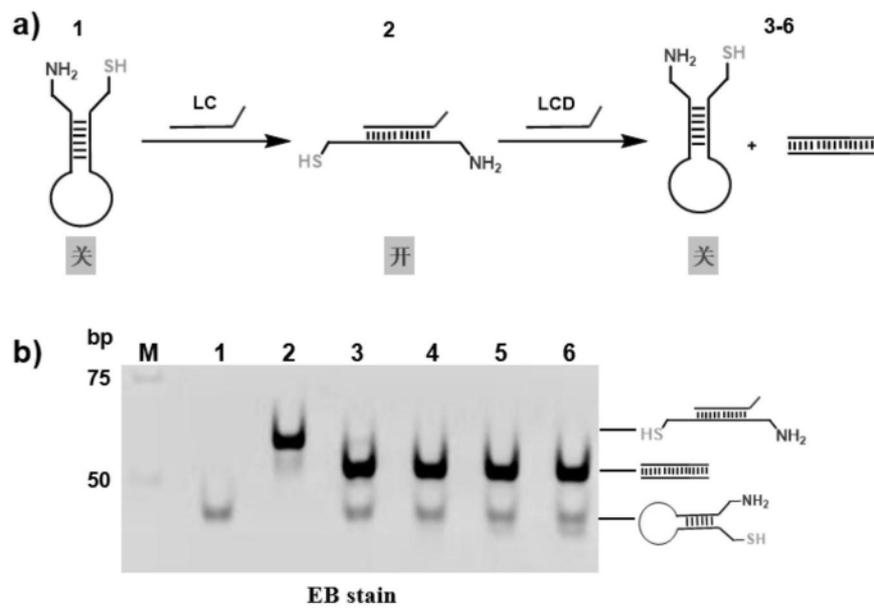


图10

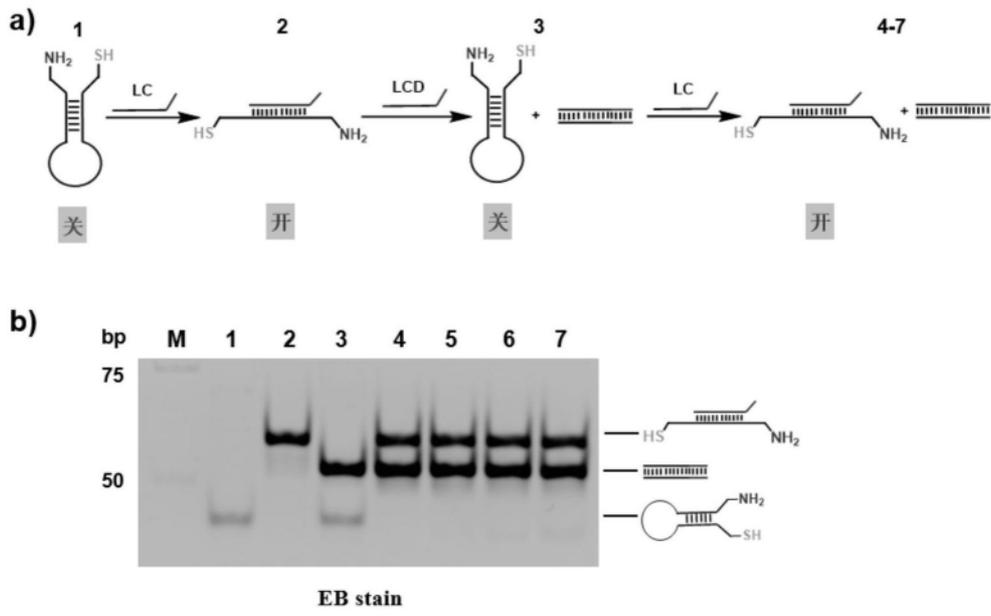


图11

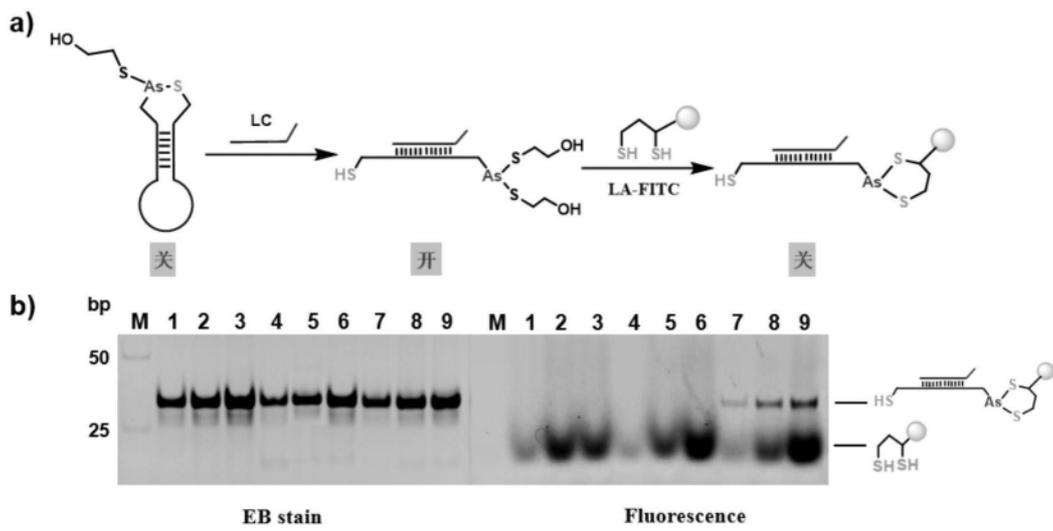


图12

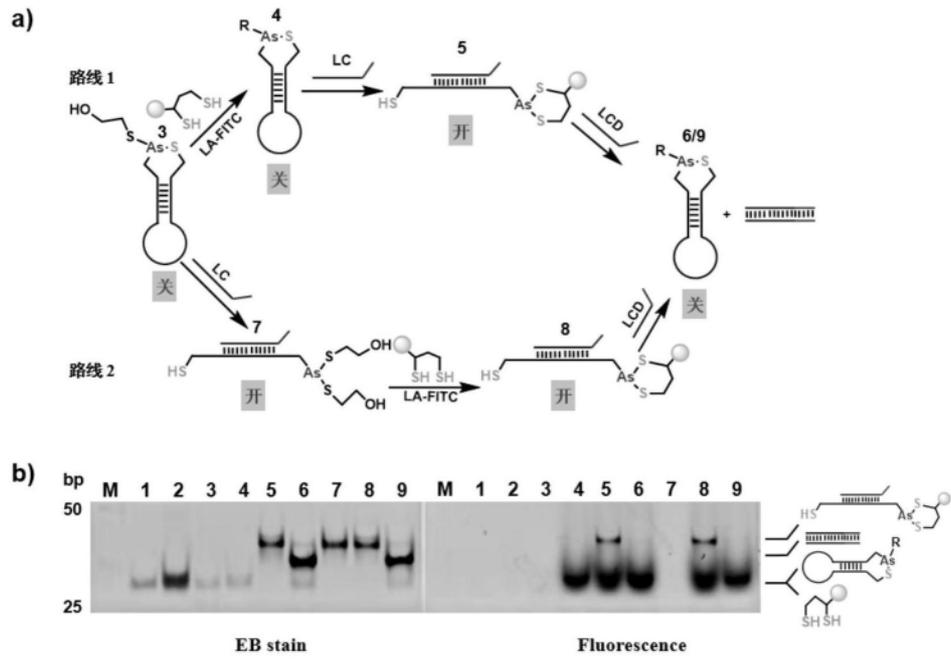


图13

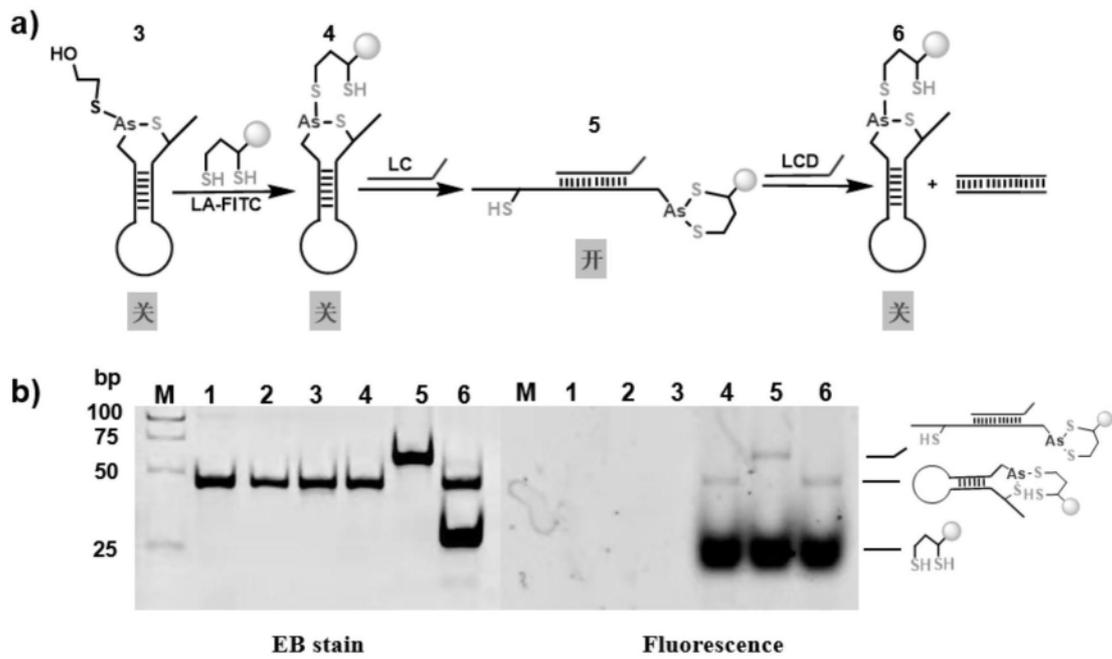


图14

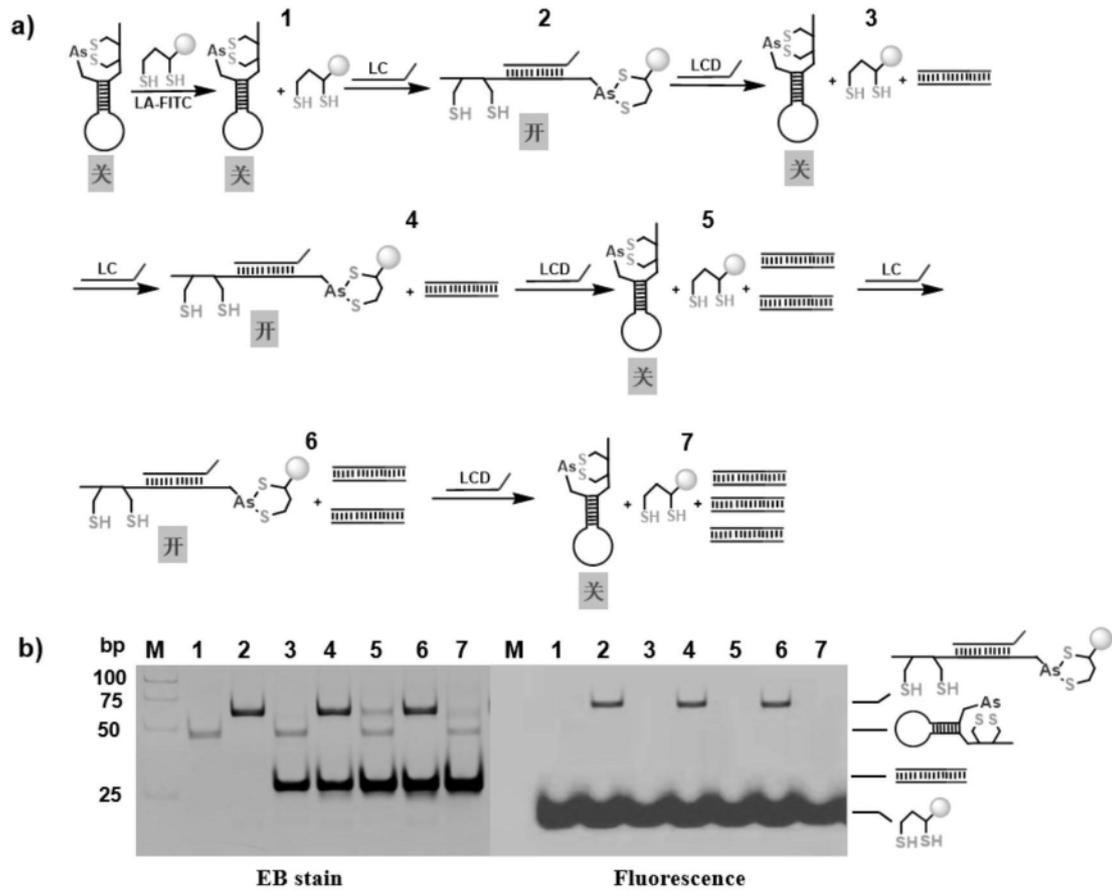


图15