

[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 200710064101.5

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2008年9月3日

[11] 公开号 CN 101255462A

[22] 申请日 2007.2.28

[21] 申请号 200710064101.5

[71] 申请人 中国科学院生态环境研究中心

地址 100085 北京市海淀区双清路18号

[72] 发明人 郭良宏 张勤

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 王旭

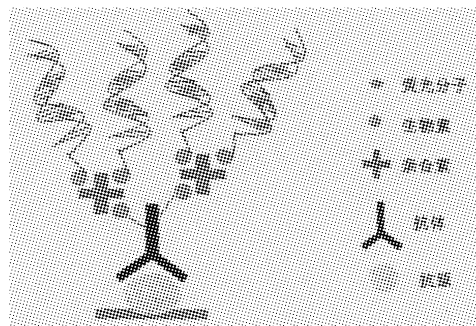
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

树状结构标记物及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种包含核酸，荧光分子，和蛋白质/化合物的树状结构标记物；制备该树状结构分子的方法；以及形成该树状结构标记物的免疫检测试剂盒。其中所述的荧光分子与作为载体的核酸通过非嵌入方式结合形成信号标记物，所述信号标记物与蛋白质或化合物以非共价键方式连接，形成树状结构；所述的标记方法可用于所有免疫测试(肿瘤标志物、传染性疾病、激素、心脏疾病、食品污染物、环境污染等)，能显著增加免疫检测中信号分子的数目，大幅度提高检测灵敏度。



1. 一种树状结构标记物，包含核酸，荧光分子，和蛋白质/化合物，其中所述的荧光分子与作为载体的核酸通过非嵌入方式结合形成信号标记物，所述信号标记物与蛋白质或化合物以非共价键方式连接，形成树状结构。

2. 根据权利要求 1 所述的树状结构标记物，其中所述核酸为单链脱氧核糖核酸，双链脱氧核糖核酸，单链核糖核酸，双链核糖核酸，双链脱氧核糖核酸/核糖核酸，寡核苷酸，核酸适配体，或肽核糖核酸。

3. 根据权利要求 1 所述的树状结构标记物，其中所述蛋白质是抗原，半抗原，抗体及或作为小分子抗原载体的蛋白质；所述化合物为有机化合物、激素、类固醇、碳水化合物、维生素、单糖、寡糖、脂类、氨基酸、肽、核苷、核苷酸、寡核苷酸或其复合物。

4. 根据权利要求 1 所述的树状结构标记物，其中所述结合物与蛋白质或化合物的连结方式为生物联结。

5. 根据权利要求 4 所述的树状结构标记物，其特征在于，所述结合物与蛋白质或化合物的连结方式为通过生物素/亲合素的生物连结。

6. 根据权利要求 1-5 中任何一项的树状结构标记物，其中所述的荧光分子为无机分子、有机分子、无机/有机复合分子、无机聚合物、有机聚合物、无机/有机复合聚合物、无机颗粒物、有机颗粒物或无机/有机复合颗粒物。

7. 根据权利要求 6 所述的树状结构标记物，其中所述荧光分子为核酸结合剂。

8. 根据权利要求 7 所述的树状结构标记物，其中所述荧光分子为荧光染料。

9. 根据权利要求 8 所述的树状结构标记物，其中所述荧光染料为 DAPI 染料、Pico-Green 染料、SYBR Green 染料、SYBR Gold 染料。

10. 根据权利要求 7 所述的树状结构标记物，其中所述荧光分子为金属/有机配体的络合物。

11. 根据权利要求 1-5 和 7-10 中任何一项的树状结构标记物，其中

所述荧光分子与核酸作用的结合方式为小沟结合、大沟结合或静电作用。

12. 一种制备权利要求 1-10 或 11 任意一项中的树状结构标记物的方法，其包括下列步骤：

(a) 提供核酸作为荧光分子的载体；

(b) 以非嵌入方式将多个荧光分子与所述核酸结合，形成高结合率的结合物；和

(c) 将所述结合物作为信号标记物，与蛋白质或化合物以非共价键方式联结，用于免疫测试。

13. 一种对免疫检测进行多标记的方法，其包括通过测量权利要求 12 的树状结构标记物中荧光分子的荧光信号，根据信号的强度对样品进行定性或定量分析的步骤。

14. 一种用于免疫分析的试剂盒，其包括

(a) 生物素修饰的抗体或化合物；

(b) 亲和素或其类似物；

(c) 生物素修饰的核酸；

(d) 荧光核酸结合剂；和

(e) 用法说明书。

树状结构标记物及其制备方法

技术领域

本发明涉及抗原/抗体免疫测试中使用的标记物及其制备方法，特别地，涉及用核酸和荧光分子的结合物对免疫检测进行多标记的方法。

技术背景

免疫分析方法由于具有高度的特异性、快速、简便等优势，已广泛的应用于生命科学，药物分析，临床诊断及环境监测领域。由于免疫反应自身产生的物理变化非常微弱，难于检测，通常在抗原或抗体上标记产生特异信号的物质或分子，称为标记物。根据产生信号的不同，标记物可分为放射性同位素、荧光染料、电化学分子、酶、化学发光物、电化学发光物等，其中荧光检测应用非常广泛，而且是生物芯片的标准检测方法。然而，随着对低丰度蛋白检测的需求日益迫切，进一步提高荧光免疫试验的灵敏度成为研究的热点。在免疫分析方法中，检测灵敏度的提高主要采取两种手段：一是体外扩增低丰度蛋白；一是增加信号分子的数量。前者在实际运用中难以实现，因为目前的技术条件难以使蛋白质像核酸（例如：DNA）那样，采用多聚酶链反应在体外扩增。因此，增加信号分子的数量就成为提高蛋白质检测灵敏度的主要突破口。在免疫分析过程中，信号分子通常是标记于抗体或抗原上，如何将更多的信号分子标记于同一个抗原或抗体上，使检测信号得到增强，同时不影响抗原或抗体的识别性能，是最大的难点之一。按照标记物和被标记蛋白之间联结方式的不同，标记方法可分为共价标记和非共价标记两类。而根据标记物与蛋白联结位点的数目，又可分为多个位点标记和单个位点标记。一般而言，共价标记的制备难度大于非共价标记，单个位点标记难于多个位点标记。其中单个位点多标记的蛋白标记方法由于在一个蛋

白分子上引入了多个标记物，可大幅度地提高检测信号。同时由于在目标蛋白上只涉及单个联结位点，可最大限度地减少标记物对目标蛋白免疫活性的干扰，因此兼顾了免疫测试的信号强度和特异性。

采用核酸进行免疫测试标记，在专利和科研文章中已有描述或报道。在美国专利 US4748111（公开日：1988-05-31）中，Dattagupta 等人描述了一个用核酸作为信号分子载体对免疫测试进行多标记的方法，其中核酸的 3'端与免疫测试的蛋白质通过共价键连接。在美国专利 US4921788（公开日：1990-05-01）中，Deutsch 描述了一个免疫测试分析物的单链核酸类似物，可是该类似物与抗体结合后，失去了与互补核酸的杂交能力，导致与核酸双链特异性结合的信号分子的信号下降。在美国专利 US6280933（公开日：2001-08-28）中，Glazer 等人描述了一个用双链核酸作为荧光分子载体对免疫测试进行多标记的方法，其中的荧光分子是核酸嵌入剂并带两个正电荷。在美国专利 US6117631（公开日：2000-09-12）中，Nilsen 描述了一个特定的树枝状核酸（DNA dendrimer）对免疫测试进行多标记的方法。另外，在美国专利 US5665539（公开日：1997-09-09）中，Sano 等描述了一个称为免疫 PCR（immuno-PCR）的方法，用核酸对免疫测试进行标记，然后通过 PCR 对核酸标记进行扩增，最后通过核酸定量进行免疫分析。国内目前还没有这方面的专利。

发明内容

本发明主要是针对现有技术以下几个方面不足进行改进：1）为了降低在抗体上标记信号分子的难度，采用非共价的方式引入信号分子载体；2）为了实现单个位点多标记的策略，以核酸为信号分子载体；3）为了获得简便且适应范围更广的信号分子标记方法，采用非嵌入式核酸结合剂。简言之，即是以核酸为信号分子载体，通过核酸的多个作用位点引入大量的荧光信号分子，搭建一种由核酸/荧光分子结合体构成的链状标记物，用于免疫检测。与常规的免疫荧光测试比较，本方法提供的标记物中的荧光信号分子不只一个，而是多个甚至几十个，因此可以大幅度提高检测信号的强度，明显改善检测灵敏度。与通过化学合成方法制备的有机聚合物、树枝状有机分子（dendrimer）、无机复合物和无机

纳米标记物比较，本方法采用常规生化 and 化学试剂，易于获得，价格低廉，操作简单，重复性好。

本发明的一个方面提供了一种树状结构标记物，其包含核酸，荧光分子，和蛋白质/化合物，其中所述的荧光分子与作为载体的核酸通过非嵌入方式结合形成信号标记物，所述信号标记物与蛋白质或化合物以非共价键方式连接，形成树状结构。

本发明的第二个方面提供了所述树状结构标记物的制备方法，其包括下列步骤：

(a) 提供核酸作为荧光分子的载体；

(b) 以非嵌入方式将多个荧光分子与所述核酸结合，形成高结合率的结合物；和

(c) 将所述结合物作为信号标记物，与蛋白质或化合物以非共价键方式联结，用于免疫测试。

本发明的第三个方面提供了一种快速、简便、有效且经济的免疫分析方法，其除了本发明第二方面的步骤外，还包括下列步骤：

(d) 测量荧光分子的荧光信号，根据信号的强度对样品进行定性或定量分析。

其代表性操作步骤是（见图 2）：

(a) 按照常规操作，完成免疫反应，其中最后一步的反应物带有生物素标记，

(b) 免疫反应完成后，加入亲和素或其类似物（avidin, streptavidin, neutravidin），

(c) 加入生物素修饰的核酸，通过生物素/亲和素之间的非共价键作用，完成对免疫测试的核酸标记，

(d) 加入荧光核酸结合剂，如 SYBR Green I，使之与核酸高比率地结合，完成对免疫测试的高荧光标记。

(e) 检测荧光信号，根据信号强度的变化，对免疫测试的样品进行定性或定量分析。

本发明的第四个方面提供了一种以核酸/荧光分子结合物为多标记的免疫分析试剂盒，代表性试剂盒包括：

- (a) 生物素标记的抗体或化合物;
- (b) 亲和素或其类似物 (avidin, streptavidin, neutravidin);
- (c) 生物素修饰的核酸;
- (d) 荧光核酸结合剂; 和
- (e) 用法说明书

在本发明的一个方面中, 所提供的由核酸/荧光分子结合物组成的树状免疫检测标记物, 具有如下的特征:

作为荧光信号分子载体的核酸是经过修饰的脱氧核糖核酸 (ssDNA), 双链脱氧核糖核酸 (dsDNA), 单链核糖核酸 (ssRNA), 双链核糖核酸 (dsRNA), 双链脱氧核糖核酸/核糖核酸 (dsRNA/DNA), 寡核苷酸 (oligonucleotide), 核酸适配体 (aptamer), 或肽核糖核酸 (peptide nucleic acid, PNA)。它们与被标记的蛋白质或化合物通过非共价键方式连接。与美国专利 4748111 描述的共价连接比较, 本方法更具有普适性和可操作性。

在本发明的另一个方面中, 所述结合物与蛋白质或化合物的连结方式为生物联结。比如, 可以通过生物素/亲和素 (biotin/avidin, biotin/streptavidin, biotin/neutravidin) 之间的高特异性和高亲和力的生物结合作用, 将核酸与蛋白质或化合物连接。各种分子 (包括核酸、蛋白质和化合物) 的生物素 (biotin) 修饰已经成为常规技术, 操作容易, 费用低廉, 结果重复可靠。

在本发明的又一个方面中, 所述蛋白质是抗原, 半抗原, 抗体及或作为小分子抗原载体的蛋白质。

在本发明的另一个方面中, 所述化合物为有机化合物、激素、类固醇、碳水化合物、维生素、单糖、寡糖、脂类、氨基酸、肽、核苷、核苷酸、寡核苷酸或其复合物。

在本发明的又一个方面中, 所述的荧光分子为无机分子、有机分子、无机/有机复合分子、无机聚合物、有机聚合物、无机/有机复合聚合物、无机颗粒物、有机颗粒物或无机/有机复合颗粒物。

在本发明的一个实施方案中, 所述荧光分子为核酸结合剂。在本发

明的另一个实施方案中，所述荧光分子为荧光染料，其中所述荧光染料为 DAPI 染料、Pico-Green 染料、SYBR Green 染料、SYBR Gold 染料。本发明中的荧光信号分子都是核酸结合剂，它们与核酸作用的方式为非嵌入式，其中包括小沟结合、大沟结合和静电结合及其他方式结合。荧光信号分子可以是有机荧光染料，如 DAPI 染料、Pico-Green 染料、SYBR Green 染料、SYBR Gold 染料（参见文献：Cosa, G., et al. *Photochem. Photobio.* 2001. 73: 585-599.）等。也可以是具有荧光性能的金属/有机配体的络合物，比如钌或铱与含氮芳香族杂环形成的络合物（参见文献：Barton, JK. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1990. 112: 4960-4962.）。与美国专利 6280933 描述的嵌入式荧光染料比较，本方法更具有普适性，既可标记单链核酸，也可标记双链核酸。

在本发明的一个方面中，所述荧光分子为金属/有机配体的络合物。在一个实施方案中，所述金属/有机配体络合物中的金属为钌或铱。在另一个实施方案中，所述金属/有机配体络合物中的有机配体为含氮的芳香族杂环。在本发明的一个实施方案中，所述有机配体为联吡啶、联吡嗪、三联吡啶、菲酚、酞菁染料、取代的联吡啶、取代的联吡嗪、取代的三联吡啶、取代的菲酚、二吡啶并[3, 2-a; 2', 3'-c]吩嗪或邻二单氮杂菲。

在本发明的一个方面中，所述荧光分子与核酸作用的结合方式为小沟结合、大沟结合或静电作用。

本发明的核酸/荧光分子结合物可通过常规方法获得，代表性合成方法例子如下（如图 1 所示）：在一段核酸的末端连接 9 个连续的脱氧胸腺嘧啶，再连接生物素。加入荧光核酸结合剂，如 SYBR Green I，使之通过非嵌入方式与核酸高比率地结合，形成以核酸为载体的高标记物。

利用本发明的方法标记免疫测试的优点是：（1）以核酸为荧光分子的载体，可大量引入信号分子，极大增强检测的灵敏度；（2）核酸与被标记的蛋白质或化合物通过非共价键方式连接，具有普适性和可操作性；（3）蛋白质单个位点的标记可减少对其生物活性的影响，极大的减少非特异性反应；（4）荧光信号分子与核酸作用的方式为非嵌入式，既可标记单链核酸，也可标记双链核酸；（5）核酸标记物的制备方法简单，实验成本低；（6）所有标记试剂可单独保存，使用前现配，可延长试剂的

保质期。

附图说明

图 1 为核酸/荧光分子结合物。

图 2 为核酸/荧光分子结合物作为标记物用于免疫测试的示意图。

图 3 是分别用核酸/荧光分子结合物作为信号标记物，和用荧光分子直接标记，所得到的免疫测试结果。

具体实施方式

实验前材料准备

1、生物素标记双链寡核苷酸的制备

用 2×SSC(0.3M 柠檬酸钠, 30mM 氯化钠, pH7.0)缓冲液等比例混合生物素标记单链脱氧核糖核酸 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 及其互补核酸链 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 例如两条链分别为: 链 A: biotin-5'-TTT TTT TTT GCG GGT AAC GTC AAT ATT AAC TTT ACT CCC-3', 链 B: 5'-GGG AGT AAA GTT AAT ATT GAC GTT ACC CGC-3'。95°C 变性 5 分钟, 自然冷却至室温, 以分光光度计确定杂交后核酸的浓度。

2、异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记抗体或蛋白分子

溶于碳酸盐缓冲液中 (50mM 碳酸钠, 50mM 碳酸氢钠, pH9.15) 的小鼠免疫球蛋白 G (mIgG), 羊抗小鼠免疫球蛋白 G 和链亲和素 (SA) 分别按照 1:5.6 的摩尔比与溶于二甲基亚砜中 (DMSO) 的 FITC (5mg FITC/mL DMSO) 混合, 室温反应 4 小时, 采用聚丙烯酰胺凝胶脱盐柱 (Pierce, Rockford, IL) 纯化标记抗体, 分光光度计检测抗体浓度及 FITC 的标记率。

3、活化的生物素标记抗体

称取适量活化的生物素即生物素-N-羧基丁二酰亚胺酯 (BNHS) 溶于无水 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 终浓度为 20mg BNHS/ml DMF。羊抗

小鼠免疫球蛋白 G 按照 1:5.6 的摩尔比与 BNHS 混合溶于碳酸盐缓冲液中 (50mM 碳酸钠, 50mM 碳酸氢钠, pH9.15), 室温反应 4 小时, 采用聚丙烯酰胺凝胶脱盐柱 (Pierce, Rockford, IL) 纯化标记抗体, 分光光度计检测抗体浓度, HABA/Avidin 试剂盒 (Sigma, St. Louis, MO) 检测抗体的生物素标记率。

实施例 1、小鼠免疫球蛋白 G 的包被条件优化

分别取 100 μ l 浓度为 0、0.3、1、3、10、30、100 μ g/mL 的 FITC 标记的小鼠免疫球蛋白 G (FITC-mIgG) 溶于含有 50 mM 碳酸氢钠, pH 值为 9.6 的缓冲液中, 按照每孔 100 μ l 的用量包被 96 孔板, 4 $^{\circ}$ C 过夜。用含有 50 mM 3-羟甲基-氨基甲烷, 50 mM 氯化钠和 0.1% 吐温 20, pH 值为 8.0 的缓冲液冲洗 3 次后, 以 FITC 的最佳荧光检测条件 (即最佳荧光激发波长, 激发狭缝宽度, 荧光发射波长, 发射狭缝宽度), 检测荧光强度的变化, 以指示 FITC-mIgG 的饱和浓度, 并以该饱和浓度作为未标记的 mIgG 的包被浓度。

实施例 2、生物素标记的羊抗小鼠免疫球蛋白 G 的实验条件优化

以优化的 mIgG 包被条件包被 mIgG, 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤 3 次后, 加入 300 μ l 含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液中, 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤 3 次后, 加入 100 μ l 浓度分别为 0、1.0、3.2、9.7、29.0、87.1、261.3、784.0、2352.0 μ g/mL FITC 标记的羊抗小鼠 IgG, 37 $^{\circ}$ C, 空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时; 洗涤 3 次后, 以 FITC 的最佳荧光检测条件, 检测荧光强度的变化, 以指示 FITC-mIgG 的饱和浓度, 并以该饱和浓度作为生物素标记的羊抗小鼠 IgG (BT-Ab) 的工作浓度。

实施例 3、链亲和素的实验条件优化

以优化条件包被 mIgG 和 BT-Ab 后, 分别加入 100 μ l 浓度为 0、0.01、0.03、0.09、0.27、0.82、2.47、7.40、22.2 μ g/mL 的 FITC 标记的链亲和素 (FITC-SA), 37 $^{\circ}$ C, 空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时; 洗涤 3 次后, 以 FITC 的最佳荧光检测条件, 检测荧光强度的变化, 以指示 FITC-SA 的

饱和浓度，并以该饱和浓度作为未标记的链亲和素的工作浓度。

实施例 4、生物素化双链寡核苷酸及荧光分子的实验条件优化

以优化条件包被 mIgG、BT-Ab 和链亲和素后，分别加入 100 μ l 浓度为 0、0.04、0.12、0.37、1.11、3.33、10 μ M 的生物素化双链寡核苷酸，37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时；洗涤 3 次，分别加入 100 μ l 浓度为 0、14、27、55、110、219、438nM 的核酸荧光染料如 SYBR Green I，室温，200rpm 振荡避光孵育 10 分钟。或者按照一定比例预先混合生物素修饰的双链 DNA 和核酸荧光染料，再与亲和素在 37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡反应 2 小时。不清洗多余的染料或者清洗多余的染料，以核酸荧光染料与核酸结合的最佳荧光检测条件（即最佳荧光激发波长，激发狭缝宽度，荧光发射波长，发射狭缝宽度），检测荧光强度的变化，以指示双链寡核苷酸和荧光染料的饱和浓度，并以此饱和浓度作为工作浓度。

实施例 5、搭建免疫反应体系

根据优化条件，取 30 μ g/mL 小鼠免疫球蛋白 G (mIgG) 溶于含有 50 mM 碳酸氢钠，pH 值为 9.6 的缓冲液中，按照每孔 100 μ l 的用量包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。用含有 50 mM 3-羟甲基-氨基甲烷，50 mM 氯化钠和 0.1% 吐温 20，pH 值为 8.0 的缓冲液冲洗 3 次后，加入 300 μ l 含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤 3 次后，加入 100 μ l 生物素标记的羊抗小鼠 IgG，37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时；洗涤 3 次后，加入 100 μ l 亲和素，37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时；洗涤 3 次。

实施例 6、含有核酸荧光染料的标记物与分析物反应

洗涤后，加入 100 μ l 生物素修饰的双链 DNA，37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时；洗涤 3 次，加入 100 μ l 核酸荧光染料如 SYBR Green I，室温，200rpm 振荡避光孵育 10 分钟。或者按照一定比例预先混合生物素修饰的双链 DNA 和核酸荧光染料，再与亲和素在 37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡反应 2 小时。

实施例 7、以荧光分子直接标记的链亲和素检测生物素化的羊抗小鼠 IgG 作为实验体系对照

按照实施例 5 的实验步骤，取 30 μ g/mL 小鼠免疫球蛋白 G (mIgG) 溶于含有 50 mM 碳酸氢钠，pH 值为 9.6 的缓冲液中，按照每孔 100 μ l 的用量包被 96 孔板，4 $^{\circ}$ C 过夜。用含有 50 mM 3-羟甲基-氨基甲烷，50 mM 氯化钠和 0.1% 吐温 20，pH 值为 8.0 的缓冲液冲洗 3 次后，加入 300 μ l 含有 1% 牛血清白蛋白的磷酸缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤 3 次后，加入 100 μ l 生物素标记的羊抗小鼠 IgG，37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时；洗涤 3 次后，加入 100 μ l 异硫氰酸荧光素标记的链亲和素，37 $^{\circ}$ C，空气浴恒温 200rpm 振荡 2 小时；洗涤 3 次。

实施例 8、荧光强度检测

不清洗多余的染料或者清洗多余的染料，以核酸荧光染料与核酸结合的最佳荧光检测条件，检测荧光强度的变化，以指示生物素标记的羊抗小鼠 IgG 的浓度。由图三可见，检测的荧光信号强度与羊抗小鼠 IgG 的浓度之间存在对应关系，而且用核酸/荧光分子结合物作为信号标记物，比用荧光分子直接标记（即异硫氰酸荧光素标记的链亲和素），信号强度高出 10 倍左右。



图 1

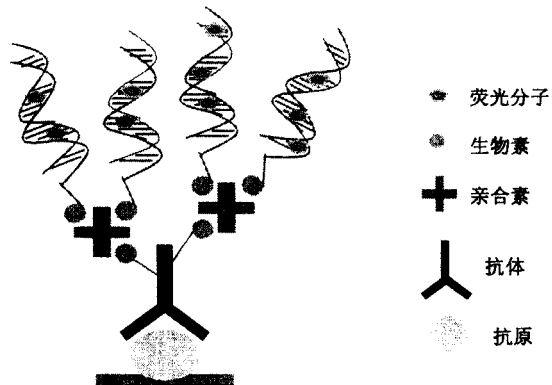


图 2

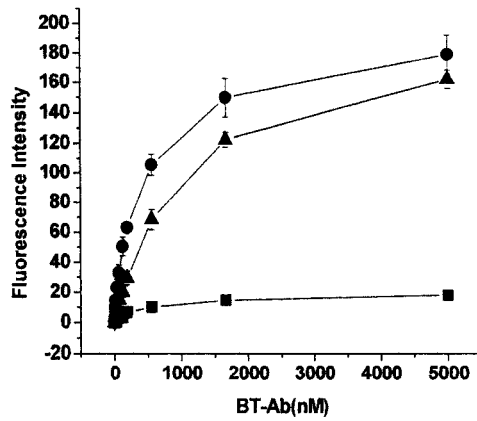


图 3

专利名称(译)	树状结构标记物及其制备方法		
公开(公告)号	CN101255462A	公开(公告)日	2008-09-03
申请号	CN200710064101.5	申请日	2007-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院生态环境研究中心		
[标]发明人	郭良宏 张勤		
发明人	郭良宏 张勤		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N21/64 G01N33/533		
代理人(译)	王旭		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种包含核酸，荧光分子，和蛋白质/化合物的树状结构标记物；制备该树状结构分子的方法；以及形成该树状结构标记物的免疫检测试剂盒。其中所述的荧光分子与作为载体的核酸通过非嵌入方式结合形成信号标记物，所述信号标记物与蛋白质或化合物以非共价键方式连接，形成树状结构；所述的标记方法可用于所有免疫测试(肿瘤标志物、传染性疾病、激素、心脏疾病、食品污染物、环境污染物等)，能显著增加免疫检测中信号分子的数目，大幅度提高检测灵敏度。

