



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107219356 A

(43)申请公布日 2017.09.29

(21)申请号 201610166061.4

(22)申请日 2016.03.22

(71)申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦

申请人 北京深迈瑞医疗电子技术研究院有限公司

(72)发明人 安婧 李瀚 邓橙 雷霆

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

权利要求书2页 说明书13页 附图7页

(54)发明名称

掺杂荧光标记生物高聚物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了掺杂荧光标记生物高聚物及其制备方法和应用,其中掺杂荧光标记生物高聚物由以下部分组成:生物高聚物;以及多种荧光素,其中,所述多种荧光素中的每一种各自独立地与所述生物高聚物偶联,且所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。该掺杂荧光标记生物高聚物性能与串联荧光素标记的类似,即基于FRET原理,其可以与荧光供体共用一种波长的激发光,而可以发射荧光受体的荧光,应用于荧光检测时,能够拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,但相对于串联荧光素,其制备过程简单,成本也大大降低,且回收率高,推广应用价值高。

1. 一种掺杂荧光标记生物高聚物,其特征在于,由以下部分组成:

生物高聚物;以及

多种荧光素,

其中,所述多种荧光素中的每一种各自独立地与所述生物高聚物偶联,且所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移,

任选地,所述生物高聚物为蛋白质、多肽、核酸或多糖。

2. 根据权利要求1所述的掺杂荧光标记生物高聚物,其特征在于,所述多种荧光素中的每一种均不为荧光蛋白。

3. 根据权利要求1所述的掺杂荧光标记生物高聚物,其特征在于,所述多种荧光素中的每一种均为小分子荧光素。

4. 根据权利要求1所述的掺杂荧光标记生物高聚物,其特征在于,所述多种荧光素中的每一种各自独立地具有选自异硫氰酸基、琥珀酰亚胺基、氟化苯基、硫代琥珀酰亚胺基、硫代四氟化苯基和氯化磺酰基的至少一种活性基团。

5. 根据权利要求4所述的掺杂荧光标记生物高聚物,其特征在于,所述多种荧光素中的每一种各组独立地选自Cyanine类荧光素和罗丹明类荧光素的至少一种,

任选地,Cyanine类荧光素为选自Cyanine3,Cyanine3.5,Cyanine5,Cyanine5.5和Cyanine7的至少一种,

任选地,罗丹明类荧光素为选自FITC,TRITC,Rhodamine B,Rhodamine 101,Rhodamine110,Rhodamine 123,Rhodamine 700,Rhodamine 800和Rhodamine 6G的至少一种,

任选地,所述生物高聚物为抗人CD4单克隆抗体或抗人CD3单克隆抗体,

任选地,所述多种荧光素为FITC和Cyanine5,

任选地,所述多种荧光素为Cyanine3和Cyanine5,

任选地,所述多种荧光素为FITC和Rhodamine B,

任选地,所述多种荧光素为FITC、Rhodamine B和Cyanine5。

6. 一种制备掺杂荧光标记生物高聚物的方法,其特征在于,包括:

将多种荧光素与待标记生物高聚物混合,以便获得所述掺杂荧光标记生物高聚物,

其中,所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,包括:

在4℃-35℃的温度下,将所述多种荧光素与所述待标记生物高聚物混合,并使所得到的混合物反应10分钟~4小时,

任选地,在15℃-30℃的温度下,将所述多种荧光素与所述待标记生物高聚物混合,并使所得到的混合物反应20分钟-2小时。

8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述混合是在pH为7.0~10.0的溶液中进行的,优选地,所述溶液的pH为8.5~9.5。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述待标记生物高聚物被预先溶解在缓冲液中,所述缓冲液的pH为7.0~10.0,优选8.5~9.5,

其中,所述缓冲液为选自磷酸钠缓冲液、碳酸钠缓冲液、硼酸缓冲液的至少之一。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,所述待标记生物高聚物在溶解得到的混

合溶液中的浓度为3-7mg/mL,优选5mg/mL,

任选地,所述多种荧光素中的每一种与所述待标记生物高聚物的摩尔比为2:1-200:1,优选5:1-50:1。

11.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述多种荧光素中作为荧光供体的荧光素与作为荧光受体的荧光素的摩尔比为1:50-50:1,优选1:20-20:1,

任选地,所述待标记生物高聚物为抗人CD4单克隆抗体或抗人CD3单克隆抗体,

任选地,所述多种荧光素为FITC和Cyanine5,

任选地,所述多种荧光素为Cyanine3和Cyanine5,

任选地,所述多种荧光素为FITC和Rhodamine B,

任选地,所述多种荧光素为FITC、Rhodamine B和Cyanine5。

12.一种试剂盒,其特征在于,包含:

至少一种权利要求1-5任一项所述的掺杂荧光标记生物高聚物,

任选地,所述生物高聚物为蛋白质、多肽、核酸或多糖,优选抗体或蛋白类抗原。

13.根据权利要求12所述的试剂盒,其特征在于,进一步包含:

至少一种荧光标记生物高聚物,

任选地,所述荧光标记生物高聚物的荧光标记物为小分子荧光素、荧光蛋白或串联染料,

所述荧光标记生物高聚物和所述掺杂荧光标记生物高聚物能够联合使用。

14.权利要求1-5任一项所述的掺杂荧光标记生物高聚物在流式检测或免疫荧光显微检测中的用途。

掺杂荧光标记生物高聚物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及荧光标记检测技术领域,具体地,涉及掺杂荧光标记生物高聚物及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 荧光标记抗体试剂是一种重要的生物学/医学检测试剂,其荧光检测原理是:抗体与待测样品中的抗原特异性结合后,用特定波长的激发光照射样品,激发抗体上标记的荧光素,然后检测荧光素发射的荧光。荧光的波长与激发光有一定差异(一般大于激发光),因此可以用滤光片或单色器将荧光与激发光分离,实现高信噪比的检测。运用此原理的检测仪器有流式细胞仪、荧光显微镜、荧光光谱仪等;检测方法有流式细胞术、免疫荧光成像等。

[0003] 荧光检测的一个特点和优势是,可以对同一样品进行多通道检测。即用超过2种抗体与样品进行反应,不同抗体上标记不同荧光素,而这些荧光素可以被相同或不同的激发光激发,发射出不同波段的荧光,用滤光片或单色器将不同波段荧光分离后进行检测,可以获得样品中多种抗原的相关信息。

[0004] 随着荧光检测技术的不断发展,更多参数检测成为了科研或临床应用的新需求,参数的增多需要更多的检测通道以及更多种类荧光素的支持,且这些荧光素应能够被同一波长的激发光激发以简化仪器配置并降低仪器成本。

[0005] 然而,目前的多种荧光素支持的多通道荧光检测技术仍有待进一步研究。

发明内容

[0006] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提出一种制备过程简单,成本低,且回收率高,推广应用价值高的掺杂荧光标记生物高聚物以及利用其的多通道荧光检测手段。

[0007] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0008] 针对多种荧光素支持的多通道荧光检测技术,目前流式厂商为多参数分析所提供的荧光素除常规的FITC、PE等荧光素外,串联荧光素(tandem dye)成为了一种很好的选择。例如,Cyanine7荧光素本身不能被480~540nm或630nm的激发光激发;但将Cyanine7与PE或APC串联后形成PE-Cyanine7或APC-Cyanine7串联荧光素,则PE-Cyanine7与PE都可以被480~540nm的激发光激发,PE-Cyanine7发射Cyanine7的荧光,可以与PE组成2个检测通道;APC-Cyanine7与APC都可以被630nm的激发光激发,APC-Cyanine7发射Cyanine7的荧光,可以与APC组成2个检测通道。

[0009] 串联荧光素形成荧光依据据荧光共振能量转移原理(Fluorescence/Förster Resonance Energy Transfer,FRET),即当一种荧光素(能量供体donor)的发射光谱与另一种荧光素(能量受体acceptor)的激发光谱重叠或更偏短波方向,被激发光照射的供体可能以非辐射方式将能量转移给受体,受体接受能量发射荧光。

[0010] 但是,目前串联染料依赖于荧光蛋白如PE、APC等作为供体,且制备荧光标记抗体

的过程比较复杂:首先要将受体与供体荧光蛋白共价偶联,第二步将结合受体的荧光蛋白纯化得到串联荧光素,第三步将串联荧光素和抗体分别用双功能试剂或二硫键还原剂活化,第四部将抗体与串联荧光素偶联,最后纯化得到偶联产物。并且,依赖荧光蛋白的串联染料标记抗体生产成本昂贵,原因是:1、荧光蛋白需从藻类中提取和纯化,成本远超化学合成制备的荧光素高;2、制备步骤复杂,原材料损失大。3. 荧光蛋白分子空间位阻大,与抗体标记的偶联产率低,导致抗体整体回收率低。

[0011] 而发明人发现,理论分析和实验显示,受体和供体无需预先共价偶联结合成一个“串联荧光素”,只要其空间位置足够近就可能发生FRET。并且FRET现象并不依赖于荧光蛋白,小分子荧光素之间也可以产生FRET能量转移。当一种荧光团(受体)的激发光谱与另一种荧光团(配体)的发射光谱存在重叠,并且这两种荧光团之间的距离小于10nm时,这两个荧光团之间可能发生非辐射的FRET作用;而当两种荧光距离较远时,不会发生FRET作用。由此,发明人发现,将适于发生荧光共振能量转移的多种荧光素同时标记在同一个抗体分子上,能够基于FRET作用开发出新的荧光标记抗体,其性能与串联荧光素标记的抗体类似,即可以与荧光供体共用一种波长的激发光,而可以发射荧光受体的荧光,应用于荧光检测时,能够拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,但相对于串联荧光素制备过程简单,成本大大降低。

[0012] 进而,在本发明的第一方面,本发明提供了一种掺杂荧光标记生物高聚物。根据本发明的实施例,该掺杂荧光标记生物高聚物由以下部分组成:生物高聚物;以及多种荧光素,其中,所述多种荧光素中的每一种各自独立地与所述生物高聚物偶联,且所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。

[0013] 发明人惊奇地发现,本发明的掺杂荧光标记生物高聚物,其性能与串联荧光素标记类似,即基于FRET原理,其可以与荧光供体共用一种波长的激发光,而可以发射荧光受体的荧光,应用于荧光检测时,能够拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,但相对于串联荧光素,其制备过程简单,成本也大大降低,,且回收率高,推广应用价值高。

[0014] 在本发明的第二方面,本发明提供了一种制备掺杂荧光标记生物高聚物的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将多种荧光素与待标记生物高聚物混合,以便获得所述掺杂荧光标记生物高聚物,其中,所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。发明人发现,利用该方法能够有效地制备获得上述掺杂荧光标记生物高聚物,且制备过程简单,操作方便,成本低,得到的掺杂荧光标记生物高聚物性能与串联荧光素标记类似,能够有效用于荧光检测,拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,且回收率高,易于推广应用。

[0015] 在本发明的第三方面,本发明提供了一种试剂盒。根据本发明的实施例,该试剂盒包含:至少一种前面所述的掺杂荧光标记生物高聚物。根据本发明的实施例,本发明的试剂盒,其中的掺杂荧光标记生物高聚物性能与串联荧光素标记类似,能够有效用于荧光检测,拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,且生产成本低,回收率高,推广应用价值高。

[0016] 在本发明的第四方面,本发明提供了前面所述的掺杂荧光标记生物高聚物在流式检测或免疫荧光显微检测中的用途。由此,利用掺杂荧光标记生物高聚物进行流式检测或

免疫荧光显微检测等荧光检测,能够拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,且生产成本低,推广应用价值高。

[0017] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0018] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0019] 图1显示了根据本发明一个实施例,CD4-Cyanine5单独标记抗体流式染色的散点图;

[0020] 图2显示了根据本发明一个实施例,CD4-FITC/Cyanine5掺杂荧光标记抗体流式染色的散点图;

[0021] 图3显示了根据本发明一个实施例,CD3-Cyanine5单独标记抗体流式染色的散点图;

[0022] 图4显示了根据本发明一个实施例,CD3-Cyanine3/Cyanine5掺杂荧光标记抗体流式染色的散点图;

[0023] 图5和图6显示了根据本发明一个实施例,CD45-FITC、CD4-FITC/Rhodamine B双抗体流式染色的散点图;

[0024] 图7和图8显示了根据本发明一个实施例,CD3-Cyanine5单独标记抗体流式染色的直方图;

[0025] 图9和图10显示了根据本发明一个实施例,CD3-FITC/Rhodamine B/Cyanine5三荧光素掺杂荧光标记抗体流式染色的直方图;

[0026] 图11显示了根据本发明一个实施例,本发明的掺杂荧光标记生物高聚物的结构示意图。

具体实施方式

[0027] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0028] 掺杂荧光标记生物高聚物

[0029] 在本发明的第一方面,本发明提供了一种掺杂荧光标记生物高聚物。根据本发明的实施例,该掺杂荧光标记生物高聚物由以下部分组成:生物高聚物;以及多种荧光素,其中,所述多种荧光素中的每一种各自独立地与所述生物高聚物偶联,且所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。

[0030] 发明人惊奇地发现,本发明的掺杂荧光标记生物高聚物,无需荧光素间共价偶联,而是均掺杂标记在生物高聚物上,也即各自独立地与该生物高聚物偶联,从而由于位置靠近,也可以实现和串联荧光素类似的能量传递,发生FRET,从而其性能与串联荧光素类似,其可以与荧光供体共用一种波长的激发光,而可以发射荧光受体的荧光,应用于荧光检测时,能够提供更多的荧光素选择,但相对于串联荧光素,其制备过程简单,成本也大大降低,且回收率高,推广应用价值高。

[0031] 根据本发明的一些实施例,,参照图11,本发明的掺杂荧光标记生物高聚物还可以被认为是至少由三个部分组成:荧光供体、荧光受体以及被标记生物高聚物,其中荧光供体及荧光受体直接掺杂标记在被标记生物高聚物上,由荧光供体吸收激发光,通过FRET方式将能量传递给荧光受体,荧光受体发射荧光。

[0032] 根据本发明的实施例,所述生物高聚物为蛋白质、多肽、核酸或多糖。根据本发明的一些实施例,所述生物高聚物为抗体或抗原,则本发明的掺杂荧光标记生物高聚物即为掺杂荧光标记抗体或掺杂荧光标记抗原。其中,掺杂荧光标记抗体中的被标记抗体,在免疫检测中承担特异性识别抗原的功能,同时也为荧光供体和荧光受体提供结合位点。该掺杂荧光标记抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,其被标记抗体可以来源于动物免疫,也可以来源于体外细胞培养。根据本发明的一些具体示例,所述生物高聚物为抗人CD4单克隆抗体或抗人CD3单克隆抗体。

[0033] 根据本发明的实施例,所述多种荧光素中的每一种均不为荧光蛋白。如前所述,这是因为:荧光蛋白需从藻类中提取和纯化,成本远超化学合成制备的荧光素高;制备步骤复杂,原材料损失大;荧光蛋白分子空间位阻大,与待标记生物高聚物的偶联产率低,从而导致制得的掺杂标记生物高聚物抗体整体回收率低。

[0034] 根据本发明的实施例,所述多种荧光素中的每一种均为小分子荧光素。由此,该掺杂标记生物高聚物中各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好,应用时整体回收率高。

[0035] 需要说明的是,为了与被标记生物高聚物结合,参与标记反应的荧光素需具有活化的反应基团。生物高聚物表面通常含有一定数目的氨基,因此通常选择含有能与氨基直接进行反应的活化基团,如异硫氰酸基、琥珀酰亚胺基等即可。而荧光供体与荧光受体可以含有相同的活化反应基团,也可以含有不同的活化反应基团,但如果含有不同的反应基团,两种反应基团应有相似的反应条件,如酸碱度、反应温度、离子强度等。

[0036] 根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素中的每一种各自独立地具有选自异硫氰酸基、琥珀酰亚胺基、氟化苯基、硫代琥珀酰亚胺基、硫代四氟化苯基和氯化磺酰基的至少一种活性基团。由此,该掺杂标记生物高聚物中各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好。

[0037] 根据本发明的实施例,所述多种荧光素中的每一种各组独立地选自Cyanine类荧光素和罗丹明类荧光素的至少一种。根据本发明的一些实施例,Cyanine类荧光素为选自Cyanine3,Cyanine3.5,Cyanine5,Cyanine5.5和Cyanine7的至少一种。根据本发明的一些实施例,罗丹明类荧光素为选自FITC,TRITC,Rhodamine B,Rhodamine 101,Rhodamine 110,Rhodamine 123,Rhodamine 700,Rhodamine 800和Rhodamine 6G的至少一种。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为FITC和Cyanine5。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为Cyanine3和Cyanine5。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为FITC和Rhodamine B。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为FITC、Rhodamine B和Cyanine5。由此,利用本发明的掺杂标记生物高聚物进行荧光检测时,能够拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求。

[0038] 此外,需要说明的是,在本文中所采用的表达方式“多种荧光素”是指至少两种荧光素。也即,本发明的掺杂标记生物高聚物由生物高聚物和至少两种荧光素组成,且各种荧光素中的每一种各自独立地与所述生物高聚物偶联,且各种荧光素被选择为适于发生荧光

共振能量转移。

[0039] 进一步,为方便理解,下面以标记了3种荧光素的掺杂标记生物高聚物为例,列举本发明的掺杂标记生物高聚物的其中两种情形:

[0040] a.可以以其中的2种荧光素为荧光供体,第3种荧光素为荧光受体,形成本发明的标记了3种荧光素的掺杂标记生物高聚物,由此,该掺杂标记生物高聚物可以被两种不同的激发光激发,但是两种不同的激发光下,发射的荧光相同,都为荧光受体的荧光。在此情况下,选择的两种荧光供体需分别可以与荧光受体发生FRET,并且两种荧光供体间不发生FRET或FRET较弱;

[0041] b.可以以其中的1种荧光素为荧光供体,另外2种荧光素为荧光受体,形成本发明的标记了3种荧光素的掺杂标记生物高聚物,由此,该掺杂标记生物高聚物只能被一种激发光激发,但是可以同时发出两种不同的荧光。在此情况下,选择的两种荧光受体需分别可以与荧光供体发生FRET,并且两种荧光受体间不发生FRET或FRET较弱。

[0042] 另外,发明人还发现,利用本发明的掺杂荧光标记生物高聚物例如掺杂荧光标记荧光标记抗体,对处理过的组织切片或细胞进行染色,经过清洗、固定等步骤,然后使用荧光显微镜对样本进行观测或拍照,能够有效确定待检测物在组织或细胞中的分布。

[0043] 其中,将本发明的掺杂荧光标记生物高聚物例如掺杂荧光标记荧光标记抗体应用于免疫荧光显微检测时,可以将掺杂荧光标记抗体与其他荧光标记抗体配合使用,条件是:掺杂荧光标记抗体以及配合使用的一种或多种荧光标记抗体发出的荧光颜色具有肉眼可以辨别的差异,如此才能通过不同的荧光确认不同的待检测物质的分布。

[0044] 并且,需要注意的是,当掺杂荧光标记抗体与其他单色荧光标记抗体共同使用并应用于流式检测时,掺杂荧光标记抗体中参与标记的两种荧光素可以都不与单色荧光标记抗体的荧光素相同,但必须满足:两种荧光标记抗体的激发光或发射光(荧光)光谱具有可被流式细胞仪检测出的差异,具体地,例如:

[0045] 1、掺杂荧光标记抗体及另一种单色荧光标记抗体具有相近的激发光谱(例如都能被488nm激发光激发),但是二者发出的荧光光谱差异较大,可以被仪器的不同波长的检测通道检测(如FITC通道及PE通道),这种情况是可以配合使用的;

[0046] 2、掺杂荧光标记抗体及另一种单色荧光标记抗体所需的激发光波长不同(比如一种可被488nm激光激发,另一种可被630nm激光激发),但是二者被激发后发射出的荧光光谱接近(例如都可被PerCP通道检测),这样在检测时,流式细胞仪分两次分别发射出两种不同的激发光,分别检测每次样品发出的荧光,获得两个信号值,这种情况也是可以配合使用的;

[0047] 3、掺杂荧光标记抗体及另一种单色荧光标记抗体所需的激发光波长不同,二者被激发后发射出的荧光光谱也不同,也可以配合使用;

[0048] 4、只有当掺杂荧光标记抗体及另一种单色荧光标记抗体的激发光或发射光的光谱均无差异,或者差异不足以被流式细胞仪检测出,那这种情况下两种荧光标记抗体就不能配合使用。

[0049] 制备掺杂荧光标记生物高聚物的方法

[0050] 在本发明的第二方面,本发明提供了一种制备掺杂荧光标记生物高聚物的方法。根据本发明的实施例,该方法包括:将多种荧光素与待标记生物高聚物混合,以便获得所述

掺杂荧光标记生物高聚物,其中,所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。

[0051] 发明人发现,利用该方法能够有效地制备获得上述掺杂荧光标记生物高聚物,且制备过程简单,操作方便,成本低,得到的掺杂荧光标记生物高聚物性能与串联荧光素标记的类似,能够有效用于荧光检测,拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,且回收率高,易于推广应用。

[0052] 首先,需要说明的是,实施本发明的制备掺杂荧光标记生物高聚物的方法时可以从以下几个方面着手:

[0053] (1)选择活化荧光供体及活化荧光受体

[0054] 为了与被标记生物高聚物结合,参与标记反应的荧光素应该具有活化的反应基团。生物高聚物表面通常含有一定数目的氨基,因此通常选择含有能与氨基直接进行反应的活化基团,如异硫氰酸基、琥珀酰亚胺基等。

[0055] 荧光供体与荧光受体可以含有相同的活化反应基团,也可以含有不同的活化反应基团,但如果含有不同的反应基团,两种反应基团应有相似的反应条件,如酸碱度、反应温度、离子强度等。

[0056] (2)荧光供体及荧光受体与被标记生物高聚物共价结合

[0057] 将两种荧光素加入抗体溶液中进行反应。可以将2种荧光素同时加入生物高聚物溶液反应,也可以先加入一种反应一定时间后再加入另一种荧光素进行分步反应。分步反应对荧光供体和荧光受体反应的先后顺序没有要求。具有相同活化反应基团的荧光素同时反应效果较好,同时可节省反应时间;具有不同活化反应基团的荧光素分步反应效果较好。

[0058] 而反应时间则可以根据反应基团种类、反应温度、反应溶液体系灵活选择。根据本发明的一些实施例,所述反应时间根据反应基团种类、反应温度、反应溶液体系有所不同,通常反应时间为10分钟-4小时;所述反应温度范围在4℃-35℃均可。反应在低温时需要的反应时间较长,高温时反应时间较短,根据被标记抗体可耐受的温度进行选择。优选的时间范围与温度范围为:20分钟-2小时,15℃-30℃。

[0059] 所述反应溶液为一种缓冲溶液,可以为反应提供稳定的酸碱度、离子强度。缓冲体系可以为磷酸钠缓冲体系、碳酸钠缓冲体系、硼酸缓冲体系等任何可以提供所需条件的缓冲体系。所述缓冲体系应能够提供pH值在7.0-10.0的酸碱度,优选的pH值范围为8.5-9.5。缓冲液中可加入氯化钠、氯化钾等盐类调节溶液离子强度,也可以不加。

[0060] 掺杂荧光标记反应中,荧光素与抗体的比例没有特别限制,但通常情况下荧光素与抗体的摩尔比为2:1到200:1范围内,优选5:1到50:1的比例。荧光供体与荧光受体的比例也无特别限制,通常选择荧光供体与荧光受体的摩尔比为1:50到50:1的范围内,优选1:20到20:1的比例。

[0061] (3)掺杂荧光标记生物高聚物的纯化

[0062] 标记反应结束后可以进行纯化,从而将掺杂荧光标记生物高聚物与未结合的游离荧光素进行分离。掺杂荧光标记生物高聚物的纯化方法有很多,常规的可将抗体与荧光素分离的纯化方法均可,如层析法、透析法或超滤法。具体地,例如:针对2种荧光素同时加入生物高聚物溶液进行反应的方式,仅需在反应结束后进行一步纯化;针对2种荧光素分步加入生物高聚物溶液中、分2个阶段进行反应的方式,可以选择只在最终反应完毕后进行一步纯化,也可以进行2次纯化,即在第1种荧光素反应完毕后增加一次纯化过程。

[0063] 根据本发明的一些实施例,通过凝胶层析柱分离纯化掺杂荧光标记生物高聚物。反应混合液加入预平衡的凝胶层析柱,通过离心的方式获得含有掺杂荧光标记生物高聚物的流出液,未结合荧光素保留在层析柱中。

[0064] 根据本发明的实施例,本发明的方法包括:在4℃-35℃的温度下,将所述多种荧光素与所述待标记生物高聚物混合,并使所得到的混合物反应10分钟~4小时。由此,各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好,获得的掺杂标记生物高聚物应用时整体回收率高。

[0065] 根据本发明的一些实施例,在15℃-30℃的温度下,将所述多种荧光素与所述待标记生物高聚物混合,并使所得到的混合物反应20分钟-2小时。由此,各种荧光素与生物高聚物的偶联效果突出,获得的掺杂标记生物高聚物应用时整体回收率很高。

[0066] 根据本发明的一些具体示例,所述混合是在pH为7.0~10.0的溶液中进行的,优选地,所述溶液的pH为8.5~9.5。由此,各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好。

[0067] 根据本发明的实施例,所述待标记生物高聚物被预先溶解在缓冲液中,所述缓冲液的pH为7.0~10.0,优选8.5~9.5,其中,所述缓冲液为选自磷酸钠缓冲液、碳酸钠缓冲液、硼酸缓冲液的至少之一。由此,反应效果好,各种荧光素与生物高聚物的偶联效果突出,获得的掺杂标记生物高聚物应用时整体回收率高。

[0068] 根据本发明的实施例,所述待标记生物高聚物在溶解得到的混合溶液中的浓度为3-7mg/mL,优选5mg/mL。由此,有利于反应的进行,使得各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好,获得的掺杂标记生物高聚物应用时整体回收率高。

[0069] 根据本发明的实施例,所述多种荧光素中的每一种与所述待标记生物高聚物的摩尔比为2:1-200:1,优选5:1-50:1。由此,各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好,且容易控制各种荧光素与生物高聚物的偶联比例。

[0070] 根据本发明的实施例,所述多种荧光素中作为荧光供体的荧光素与作为荧光受体的荧光素的摩尔比为1:50-50:1,优选1:20-20:1。由此,能够很好地控制荧光供体与荧光受体的比例,从而有利于有效获得目的掺杂标记生物高聚物。

[0071] 根据本发明的实施例,所述生物高聚物为蛋白质、多肽、核酸或多糖。根据本发明的一些实施例,所述生物高聚物为抗体或抗原,则本发明的掺杂荧光标记生物高聚物即为掺杂荧光标记抗体或掺杂荧光标记抗原。其中,掺杂荧光标记抗体中的被标记抗体,在免疫检测中承担特异性识别抗原的功能,同时也为荧光供体和荧光受体提供结合位点。该掺杂荧光标记抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,其被标记抗体可以来源于动物免疫,也可以来源于体外细胞培养。根据本发明的一些具体示例,所述生物高聚物为抗人CD4单克隆抗体或抗人CD3单克隆抗体。

[0072] 根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素中的每一种各自独立地具有选自异硫氰酸基、琥珀酰亚胺基、氟化苯基、硫代琥珀酰亚胺基、硫代四氟化苯基和氯化磺酰基的至少一种活性基团。由此,各种荧光素与生物高聚物的偶联效果好。

[0073] 根据本发明的实施例,所述多种荧光素中的每一种各组独立地选自Cyanine类荧光素和罗丹明类荧光素的至少一种。根据本发明的一些实施例,Cyanine类荧光素为选自Cyanine3,Cyanine3.5,Cyanine5,Cyanine5.5和Cyanine7的至少一种。根据本发明的一些实施例,罗丹明类荧光素为选自FITC,TRITC,Rhodamine B,Rhodamine 101,Rhodamine 110,Rhodamine 123,Rhodamine 700,Rhodamine 800和Rhodamine 6G的至少一种。根据本

发明的一些具体示例,所述多种荧光素为FITC和Cyanine5。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为Cyanine3和Cyanine5。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为FITC和Rhodamine B。根据本发明的一些具体示例,所述多种荧光素为FITC、Rhodamine B和Cyanine5。由此,利用制得的掺杂标记生物高聚物进行荧光检测时,能够拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求。

[0074] 试剂盒

[0075] 在本发明的第三方面,本发明提供了一种试剂盒。根据本发明的实施例,该试剂盒包含:至少一种前面所述的掺杂荧光标记生物高聚物。根据本发明的实施例,本发明的试剂盒,其中的掺杂荧光标记生物高聚物性能与串联荧光素标记的类似,能够有效用于荧光检测,拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,且生产成本低,回收率高,推广应用价值高。

[0076] 根据本发明的实施例,所述生物高聚物为蛋白质、多肽、核酸或多糖,优选抗体或蛋白类抗原。根据本发明的一些具体示例,所述生物高聚物为抗人CD4单克隆抗体或抗人CD3单克隆抗体。

[0077] 根据本发明的实施例,本发明的试剂盒进一步包含:至少一种荧光标记生物高聚物。由此,可以将掺杂荧光标记生物高聚物与其他荧光标记生物高聚物联合使用,用于荧光检测例如免疫荧光显微检测或流式检测。如前所述,当将掺杂荧光标记生物高聚物与其他荧光标记生物高聚物配合使用并应用于免疫荧光显微检测时,条件是:掺杂荧光标记生物高聚物以及配合使用的一种或多种荧光标记生物高聚物发出的荧光颜色具有肉眼可以辨别的差异,如此才能通过不同的荧光确认不同的待检测物质的分布。当掺杂荧光标记生物高聚物与其他单色荧光标记生物高聚物共同使用并应用于流式检测时,掺杂荧光标记抗体中参与标记的两种荧光素可以都不与单色荧光标记生物高聚物的荧光素相同,但必须满足:两种荧光标记生物高聚物的激发光或发射光(荧光)光谱具有可被流式细胞仪检测出的差异。

[0078] 根据本发明的一些实施例,所述荧光标记生物高聚物的荧光标记物为小分子荧光素、荧光蛋白或串联染料,所述荧光标记生物高聚物和所述掺杂荧光标记生物高聚物能够联合使用。

[0079] 需要说明的是,前面描述的掺杂荧光标记生物高聚物的优点,同样适用于本发明的试剂盒,在此不再赘述。

[0080] 用途

[0081] 在本发明的第四方面,本发明提供了前面所述的掺杂荧光标记生物高聚物在流式检测或免疫荧光显微检测中的用途。由此,利用本发明的掺杂荧光标记生物高聚物进行流式检测或免疫荧光显微检测等荧光检测,能够提供更多的激发光或检测通道的选择,从而拓宽荧光标记物种类的选择空间,增加实验设计的灵活性,并降低对检测仪器的要求,且生产成本低,且回收率高,推广应用价值高。

[0082] 如前所述,本发明的掺杂荧光标记生物高聚物在用于荧光检测时,提供了更多的激发光或检测通道的选择性。其中,两种荧光素的掺杂荧光标记物,只具有一种激发光谱(一种最适的激发波长)和一种发射光谱(一种最适的检测通道);而三种或以上荧光素的掺杂荧光标记物,可能具有多种激发光谱(适用多种激发波长)和多种发射光谱(多种检测通

道)。

[0083] 对于两种荧光素标记的掺杂荧光标记生物高聚物来说,一种荧光素作为供体,决定了掺杂荧光标记生物高聚物的激发光谱(从而决定了适用仪器的激发波长);另一种荧光素作为受体,决定了掺杂荧光标记生物高聚物的发射光谱(从而决定了适用仪器的检测通道)。因此,如果与单纯标记有一种荧光素的生物高聚物相比,例如与供体相比,掺杂荧光标记物具有相同的激发光谱和不同的发射光谱,相当于在检测时多了对于检测通道的选择;如果与受体相比,掺杂荧光标记物具有相同的发射光谱和不同的激发光谱,相当于在检测时多了对仪器激发波长的选择。无论是增加对检测通道的选择,还是增加对激发波长的选择,都是对荧光检测技术中多参数检测需求的满足。

[0084] 以FITC/Cyanine5掺杂标记荧光抗体为例,它可以被488nm激光激发,发出的荧光可被PerCP检测通道检测(>670nm)。它与FITC具有相同的激发波长,但检测通道不同;与Cyanine5具有相同的检测通道,但激发波长不同(详见下表)。

[0085]

标记荧光素	激发波长	检测通道
FITC	488nm	FITC

[0086]

FITC/Cyanine5	488nm	PerCP
Cyanine5	630nm	PerCP

[0087] 由此,当在一项流式检测中需要对两个参数同时进行检测时,如果一种抗体标记FITC,另一种抗体标记Cyanine5,那就需要检测仪器同时具有488nm及630nm两种激发光,并且具有FITC及PerCP两种检测通道。而本发明的掺杂荧光标记抗体,提供了FITC/Cyanine5掺杂荧光标记抗体,当它与FITC配合使用时,降低了对仪器激发波长的要求;当与Cyanine5配合使用时,降低了对仪器检测通道的要求。

[0088] 更进一步,当进行三参数或更多参数的检测时,荧光素的选择变得更加复杂也更加困难,对仪器的要求也变得更高。而本发明的掺杂荧光标记生物高聚物,能够为检测提供更大的荧光素选择空间,从而增加了实验设计的灵活性,也降低了对检测仪器的要求,相对于现有技术具有显著的进步。

[0089] 需要说明的是,前面针对掺杂荧光标记生物高聚物应用方面的描述,同样适用于本发明的用途,在此不再赘述。

[0090] 下面通过具体的实施例,对本发明进行描述。这些实施例仅仅为了说明的目的,而不以任何方式限制本发明。需要说明的是,除非特别说明,在下面的实施例中所采用的试剂和设备均为市售可得的。

[0091] 以下所有实施例中所使用的流式细胞仪为深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产的BriCyte E6流式细胞分析仪。

[0092] 以下实施例中使用的试剂纯度均为分析纯。

[0093] 实施例中所使用的试剂:

[0094] 碳酸钠缓冲液:称取 Na_2CO_3 1.0g, NaHCO_3 7.6g溶解在蒸馏水中, NaOH 调节pH值至9.5,定容至500mL。

[0095] PBS:称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.2g, NaCl 8.5g,溶解在蒸馏水中,

定容至1L。

[0096] 溶血剂:流式细胞仪用溶血剂;品牌:迈瑞;规格:50mL。

[0097] 实施例1:FITC和Cyanine5掺杂

[0098] 选取FITC(异硫氰酸荧光素,含有异硫氰酸基)为荧光供体,Cyanine5-琥珀酰亚胺酯(含有琥珀酰亚胺基)为荧光受体,对抗人CD4单克隆抗体进行掺杂荧光标记。

[0099] 使用碳酸钠缓冲液将5.0mg抗体溶液稀释至5mg/mL,向抗体溶液中加入DMSO溶解的FITC,使反应液中FITC与抗体的摩尔比为5:1,充分混匀后避光室温反应2小时。再向抗体溶液中加入DMSO溶解的Cyanine5,使反应液中Cyanine5与抗体的摩尔比为10:1,充分混匀后避光室温继续反应2小时。将反应后的抗体溶液加入到使用PBS平衡的离心脱盐柱中,离心获得纯化的CD4-FITC/Cyanine5掺杂荧光标记抗体共计4.7mg。计算整个标记过程中抗体的整体回收率为94%。

[0100] 取100μL人外周血样本,再加入1.0μg CD4-FITC/Cyanine5掺杂荧光标记抗体共同孵育,经过溶血、洗涤后使用流式细胞分析仪对样品进行检测。使用Cyanine5单独标记的CD4抗体,以相同方式进行流式检测,作为对照。

[0101] CD4-Cyanine5单独标记抗体流式染色的散点图,如图1。其中Q3区域为淋巴细胞。由于Cyanine5不能被488nm激光激发,因此无法区分外周血样本中的CD4阴/阳性淋巴细胞。

[0102] CD4-FITC/Cyanine5掺杂荧光标记抗体流式染色的散点图,如图2。经过掺杂荧光标记抗体染色后,原本不能被488nm激光激发的Cyanine5荧光素,在FITC存在的情况下发生了FRET,由FITC吸收激发光,由Cyanine5发出可被PerCP通道(>670nm)检测的荧光,从而区分出外周血样本中的CD4阳性淋巴细胞(Q4)及CD4阴性淋巴细胞(Q3)。

[0103] 结论:

[0104] 1.以FITC为荧光供体,Cyanine5为荧光受体,可以制备掺杂荧光标记抗体;

[0105] 2.荧光供体及荧光受体分别含有异硫氰酸基、琥珀酰亚胺基,可以用于制备掺杂荧光标记抗体;

[0106] 3.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,其回收率可以达到92%,远高于荧光蛋白标记抗体及串联染料标记抗体;

[0107] 4.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,可以用于流式检测。

[0108] 实施例2:Cyanine3和Cyanine5掺杂

[0109] 选取Cyanine3-琥珀酰亚胺酯(含有琥珀酰亚胺基)为荧光供体,Cyanine5-琥珀酰亚胺酯(含有琥珀酰亚胺基)为荧光受体,对抗人CD3单克隆抗体进行掺杂荧光标记。

[0110] 使用碳酸钠缓冲液将2mg抗体溶液稀释至5mg/mL,向抗体溶液中分别加入DMSO溶解的Cyanine3及Cyanine5荧光素,使反应液中Cyanine3与抗体的摩尔比为20:1,Cyanine5与抗体的摩尔比为30:1。充分混匀后避光室温反应2小时。将反应后的抗体溶液加入到使用PBS平衡的离心脱盐柱中,离心获得纯化的CD3-Cyanine3/Cyanine5掺杂荧光标记抗体共计1.78mg。计算整个标记过程中抗体的整体回收率为89%。

[0111] 取100μL人外周血样本,再加入2.0μg CD3-Cyanine3/Cyanine5掺杂荧光标记抗体共同孵育,经过溶血、洗涤后使用流式细胞分析仪对样品进行检测。使用Cyanine5单独标记的CD3抗体,以相同方式进行流式检测,作为对照。

[0112] CD3-Cyanine5单独标记抗体流式染色的散点图,如图3。其中Q3区域为淋巴细胞。

由于Cyanine5不能被488nm激光激发,因此无法区分外周血样本中的CD3阴/阳性淋巴细胞。

[0113] CD3-Cyanine3/Cyanine5掺杂荧光标记抗体流式染色的散点图,如图4。经过掺杂荧光标记抗体染色后,原本不能被488nm激光激发的Cyanine5荧光素,在Cyanine3存在的情况下发生了FRET,由Cyanine3吸收激发光,由Cyanine5发出可被PerCP通道(>670nm)检测的荧光,从而区分出外周血样本中的CD3阳性淋巴细胞(Q1)及CD3阴性淋巴细胞(Q3)。

[0114] 结论:

[0115] 1.以Cyanine3为荧光供体,Cyanine5为荧光受体,可以制备掺杂荧光标记抗体;

[0116] 2.荧光供体及荧光受体含有相同的琥珀酰亚胺基,可以用于制备掺杂荧光标记抗体;

[0117] 3.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,其回收率可以达到89%,远高于荧光蛋白标记抗体及串联染料标记抗体;

[0118] 4.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,可以用于流式检测。

[0119] 实施例3:FITC和Rhodamine B掺杂

[0120] 选取FITC(异硫氰酸荧光素,含有异硫氰酸基)为荧光供体,Rhodamine B(含有异硫氰酸基)为荧光受体,对抗人CD4单克隆抗体进行掺杂荧光标记。

[0121] 使用碳酸钠缓冲液将5.0mg抗体溶液稀释至5mg/mL,向抗体溶液中分别加入DMSO溶解的FITC及Rhodamine B,使反应液中FITC与抗体的摩尔比为20:1,Rhodamine B与抗体的摩尔比为20:1。充分混匀后避光室温反应2小时。将反应后的抗体溶液加入到使用PBS平衡的离心脱盐柱中,离心获得纯化的CD4-FITC/Rhodamine B掺杂荧光标记抗体共计4.5mg。计算整个标记过程中抗体的整体回收率为90%。

[0122] 由一瓶CD4-FITC/Rhodamine B掺杂荧光标记抗体试剂,与一瓶CD45-FITC单独标记荧光抗体组合成一种CD45/CD4双色检测试剂盒。

[0123] 取100μL人外周血样本,分别加入2.0μg CD45-FITC单独标记荧光抗体及1.0μg CD4-FITC/Rhodamine B掺杂荧光标记抗体共同孵育,经过溶血后使用流式细胞分析仪对样品进行检测。

[0124] CD45-FITC、CD4-FITC/Rhodamine B双抗体流式染色的散点图,如图5(FITC通道为横坐标,SSC通道为纵坐标)及图6(PE通道为横坐标,FITC通道为纵坐标)。

[0125] 经过掺杂荧光标记抗体染色后,原本不能被488nm激光激发的Rhodamine B荧光素,在FITC存在的情况下发生了FRET,由FITC吸收激发光,由Rhodamine B发出可被PE通道(565nm-605nm)检测的荧光,从而区分出外周血样本中的CD4阳性淋巴细胞(图6-Q2)及CD4阴性淋巴细胞(图6-Q1)。

[0126] CD4-FITC/Rhodamine B掺杂荧光标记抗体进行流式染色时,加入CD45-FITC荧光标记抗体,可以起到区分淋巴细胞及红细胞碎片的作用。人外周血样本中的淋巴细胞高表达CD45抗原,同时具有较低的侧向散射荧光,淋巴细胞在以FITC通道为横坐标,SSC通道为纵坐标的散点图中的位置如图5-P1所示。在此基础上进一步分析淋巴细胞中CD4抗原的表达情况(图6),使得检测结果更加精确,同时省去了流式检测样本制备中的洗涤步骤。

[0127] 结论:

[0128] 1.以FITC为荧光供体,Rhodamine B为荧光受体,可以制备掺杂荧光标记抗体;

[0129] 2.荧光供体及荧光受体含有相同的异硫氰酸基,可以用于制备掺杂荧光标记抗

体;

[0130] 3.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,其回收率可以达到90%,远高于荧光蛋白标记抗体及串联染料标记抗体;

[0131] 4.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,可以与其他荧光标记抗体组合成一种试剂盒,并用于流式检测。

[0132] 实施例4:FITC、Rhodamine B和Cyanine5掺杂

[0133] 选取FITC(异硫氰酸荧光素,含有异硫氰酸基)为第一荧光供体,Rhodamine B(异硫氰酸基)为第二荧光供体,Cyanine5-琥珀酰亚胺酯(含有琥珀酰亚胺基)为荧光受体,对抗人CD3单克隆抗体进行掺杂荧光标记。

[0134] 使用碳酸钠缓冲液将5.0mg抗体溶液稀释至5mg/mL,向抗体溶液中分别加入DMSO溶解的FITC、及Rhodamine B,使反应液中FITC及Rhodamine B与抗体的摩尔比均为10:1,充分混匀后避光室温反应2小时。再向抗体溶液中加入DMSO溶解的Cyanine5,使反应液中Cyanine5与抗体的摩尔比为10:1,充分混匀后避光室温继续反应2小时。将反应后的抗体溶液加入到使用PBS平衡的离心脱盐柱中,离心获得纯化的CD3-FITC/Rhodamine B/Cyanine5三荧光素掺杂荧光标记抗体共计4.6mg。计算整个标记过程中抗体的整体回收率为92%。

[0135] 取100μL人外周血样本,加入2.0μg CD3-FITC/Rhodamine B/Cyanine5三荧光素掺杂荧光标记抗体进行孵育,经过溶血后使用流式细胞分析仪对样品进行检测。使用Cyanine5单独标记的CD3抗体,以相同方式进行流式检测,作为对照。

[0136] CD3-Cyanine5单独标记抗体流式染色的直方图,如图7及图8。其中图7为使用488nm激光激发,图8为使用532nm激光激发。由于Cyanine5不能被上述两种激光激发,因此无法区分外周血样本中的CD3阴/阳性淋巴细胞。

[0137] CD3-FITC/Rhodamine B/Cyanine5三荧光素掺杂荧光标记抗体流式染色的直方图,如图9及图10。其中图9为使用488nm激光激发,图10为使用532nm激光激发。

[0138] 经过CD3-FITC/Rhodamine B/Cyanine5三荧光素掺杂荧光标记抗体染色后,原本不能被488nm激光激发的Cyanine5荧光素,在FITC存在的情况下发生了FRET,由FITC吸收488nm激发光,由Cyanine5发出可被PerCP通道(>670nm)检测的荧光,从而区分出外周血样本中的CD3阳性淋巴细胞(B3-R)及CD3阴性淋巴细胞(B3-L)。原本不能被532nm激光激发的Cyanine5荧光素,在Rhodamine B存在的情况下发生了FRET,由Rhodamine B吸收532nm激发光,由Cyanine5发出可被PerCP通道(>670nm)检测的荧光,从而区分出外周血样本中的CD3阳性淋巴细胞(B3-R)及CD3阴性淋巴细胞(B3-L)。

[0139] 结论:

[0140] 1.以FITC为荧光供体,Rhodamine B为第二荧光供体,Cyanine5为荧光受体,可以制备三荧光素掺杂荧光标记抗体;

[0141] 2.上述三荧光素掺杂标记荧光抗体,两种荧光供体可以分别被不同的激光激发,分别与荧光受体发生FRET;

[0142] 3.按上述制备方法制备的掺杂荧光标记抗体,其回收率可以达到92%,远高于荧光蛋白标记抗体及串联染料标记抗体。

[0143] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特

点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0144] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

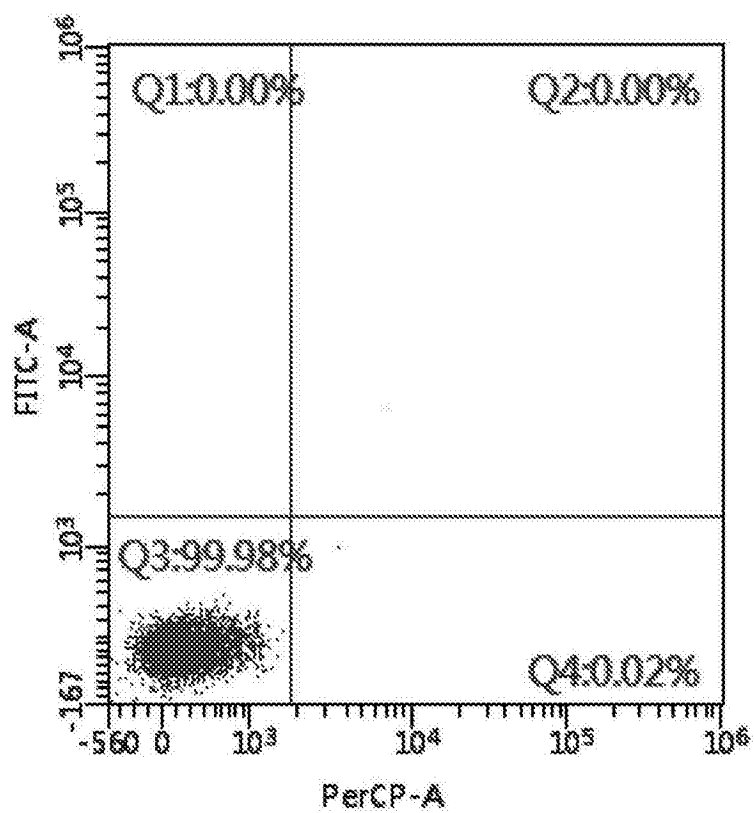


图1

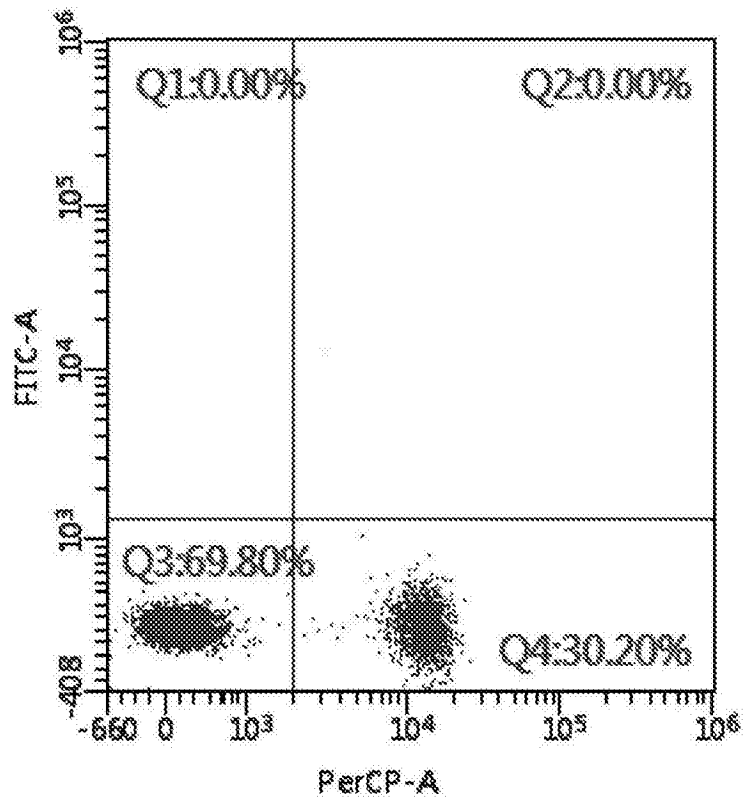


图2

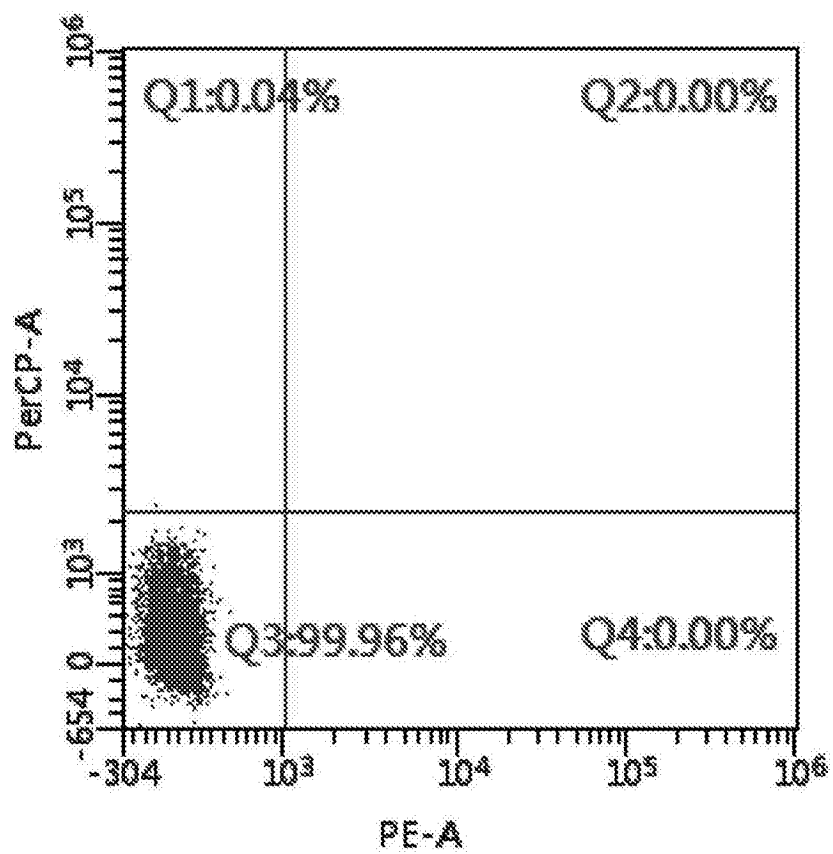


图3

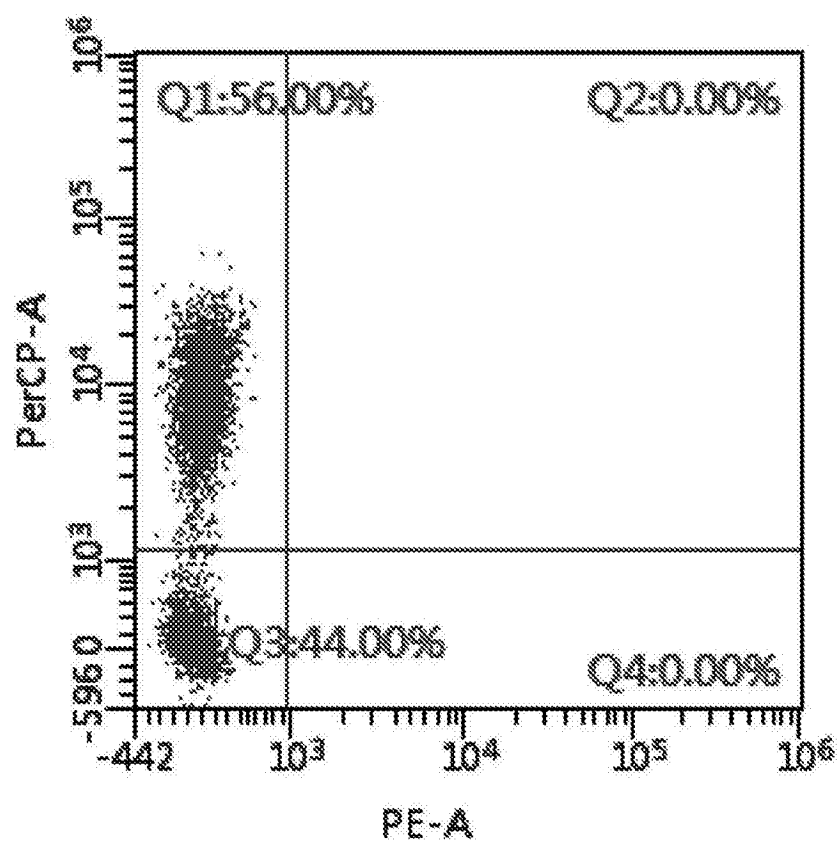


图4

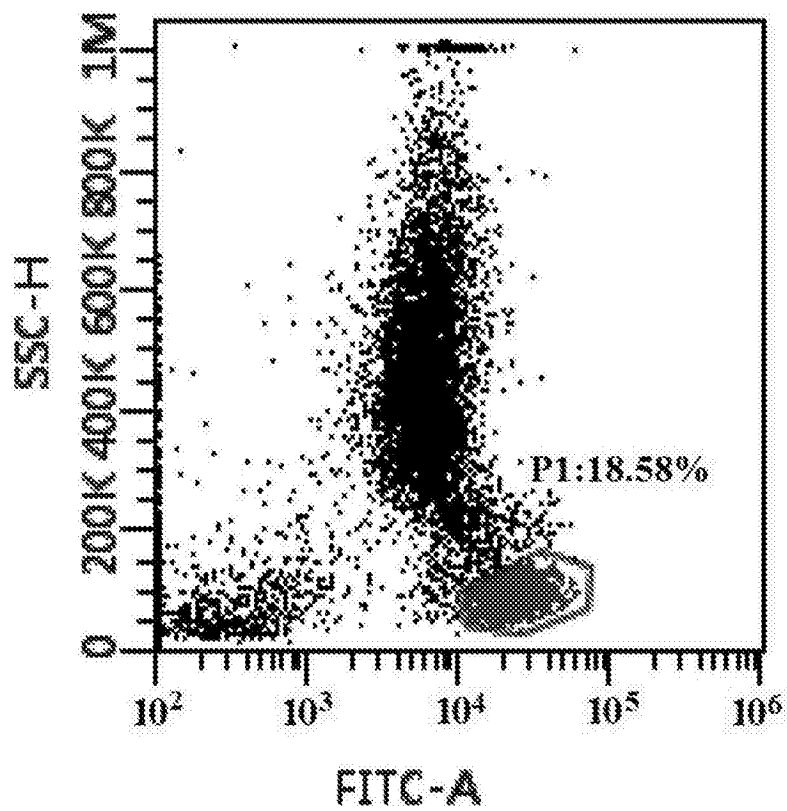


图5

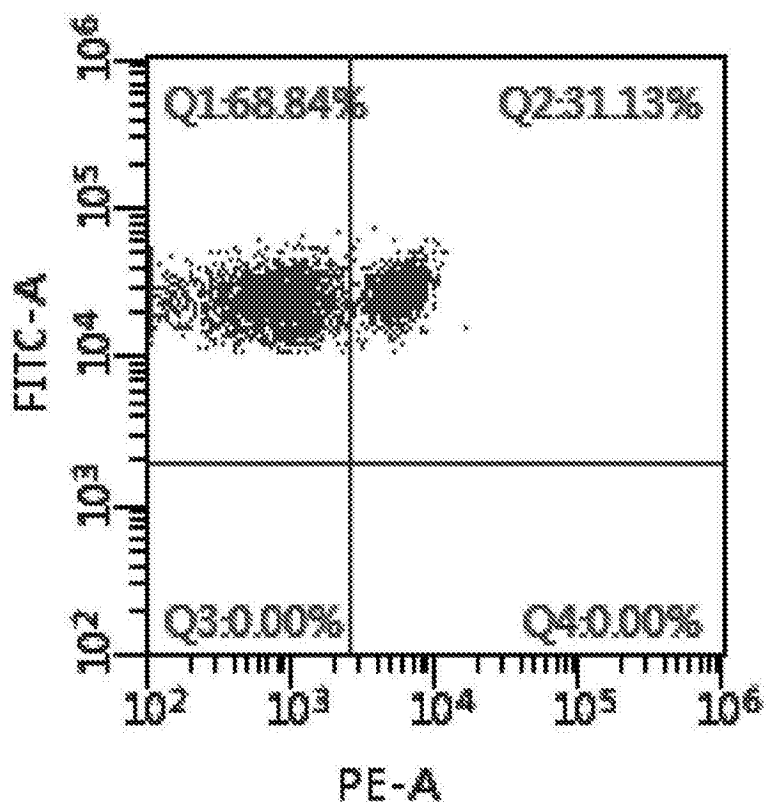


图6

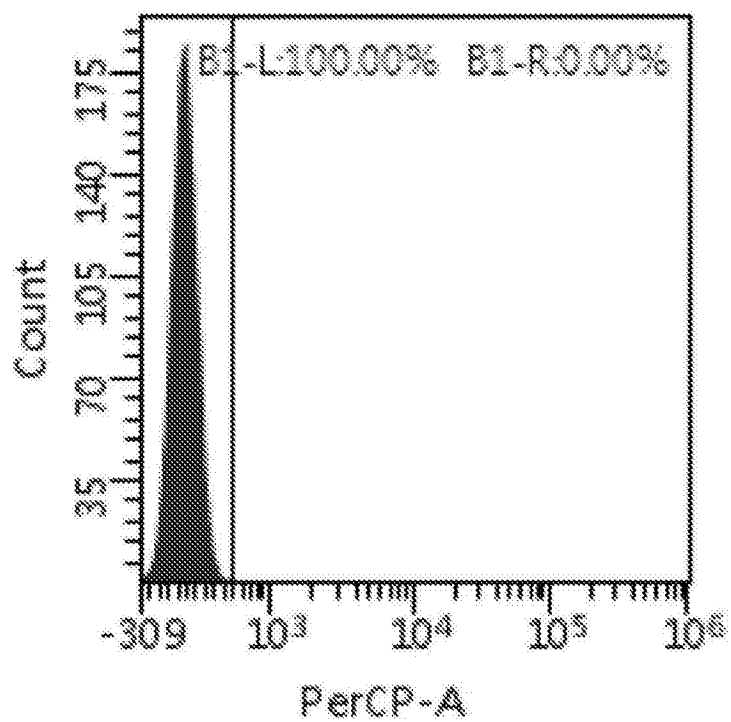


图7

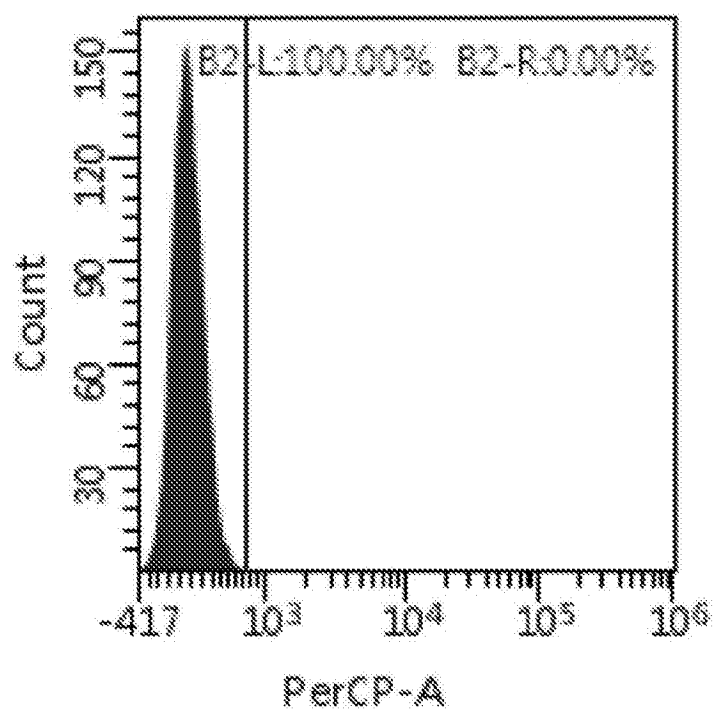


图8

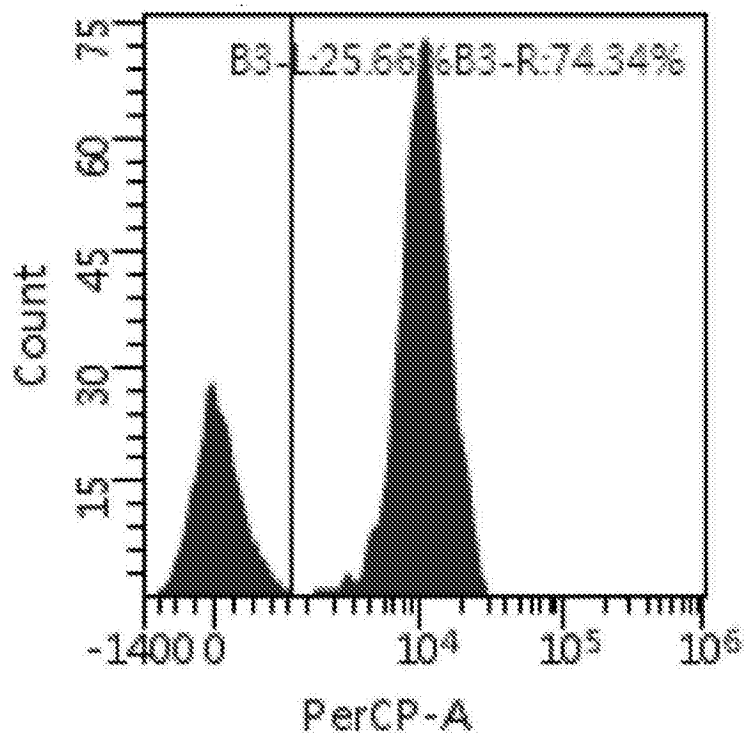


图9

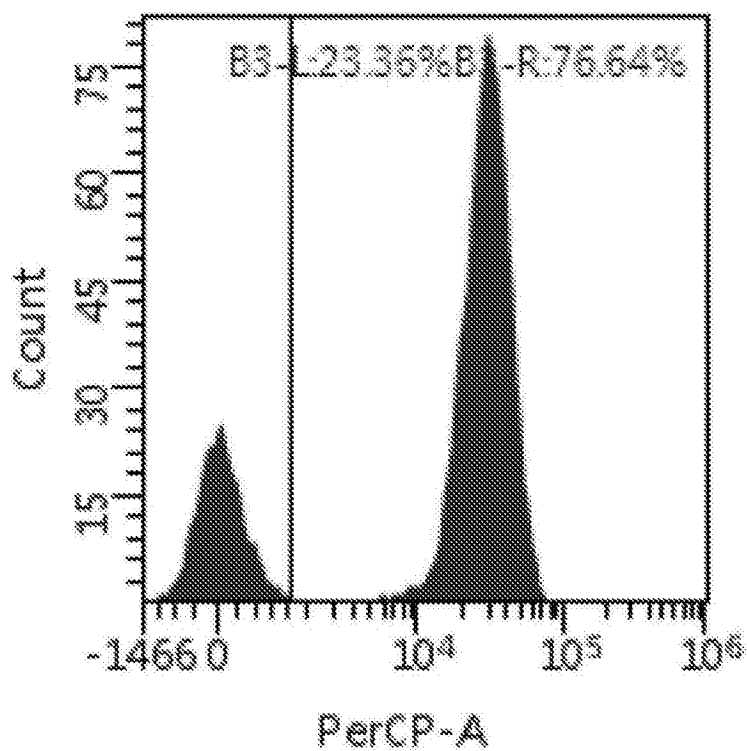


图10

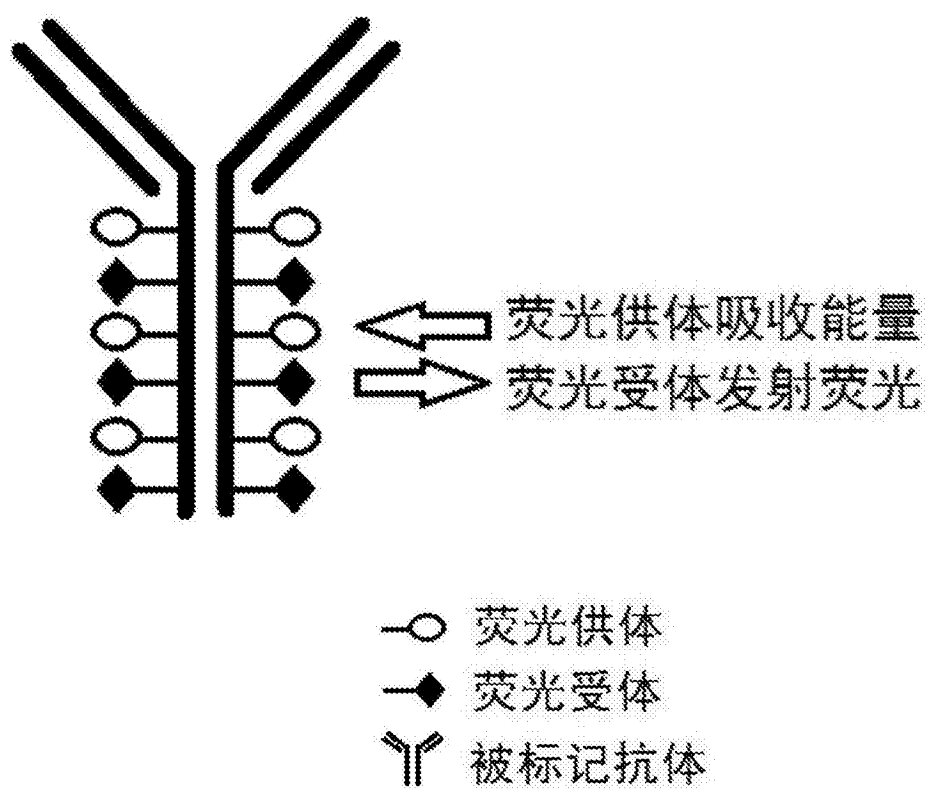


图11

专利名称(译)	掺杂荧光标记生物高聚物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107219356A	公开(公告)日	2017-09-29
申请号	CN201610166061.4	申请日	2016-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 北京深迈瑞医疗电子技术研究院有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 北京深迈瑞医疗电子技术研究院有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司 北京深迈瑞医疗电子技术研究院有限公司		
[标]发明人	安婧 李瀚 邓橙 雷霆		
发明人	安婧 李瀚 邓橙 雷霆		
IPC分类号	G01N33/533 G01N15/14		
CPC分类号	G01N33/533 C09K2211/1007 C09K2211/1029 G01N15/14		
代理人(译)	李志东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了掺杂荧光标记生物高聚物及其制备方法和应用，其中掺杂荧光标记生物高聚物由以下部分组成：生物高聚物；以及多种荧光素，其中，所述多种荧光素中的每一种各自独立地与所述生物高聚物偶联，且所述多种荧光素被选择为适于发生荧光共振能量转移。该掺杂荧光标记生物高聚物性能与串联荧光素标记的类似，即基于FRET原理，其可以与荧光供体共用一种波长的激发光，而可以发射荧光受体的荧光，应用于荧光检测时，能够拓宽荧光标记物种类的选择空间，增加实验设计的灵活性，并降低对检测仪器的要求，但相对于串联荧光素，其制备过程简单，成本也大大降低，且回收率高，推广应用价值高。

