



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110229231 A

(43)申请公布日 2019.09.13

(21)申请号 201910644315.2

(22)申请日 2019.07.17

(71)申请人 大连理工大学

地址 116024 辽宁省大连市高新园区凌工
路2号

(72)发明人 肖义 陈令成 张新富

(74)专利代理机构 大连星海专利事务有限公
司 21208

代理人 杨翠翠

(51)Int.Cl.

C07K 16/42(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 1/13(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

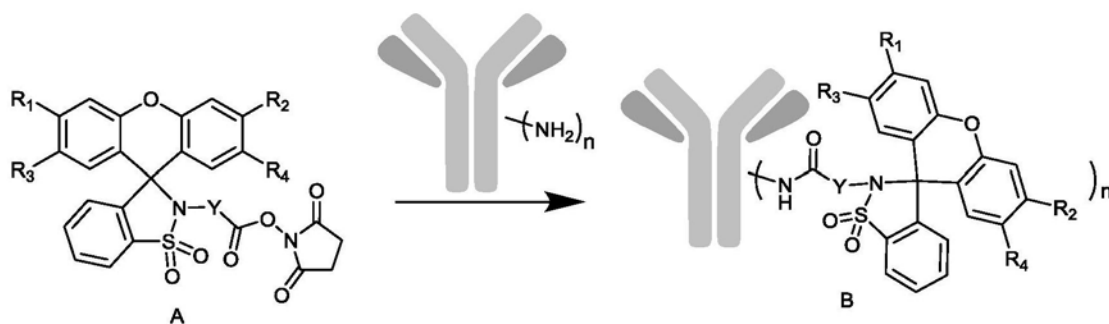
权利要求书2页 说明书15页

(54)发明名称

一类荧光标记抗体及应用

(57)摘要

本发明涉及一类荧光标记抗体及应用,其属于精细化工领域。这类荧光标记抗体通过连有氨基酸吡咯烷基酯的磺酸罗丹明荧光化合物和抗体在Ph为9的缓冲溶液中脱除N-羟基马来酰亚胺制得。该荧光标记抗体将荧光化合物通过化学键连接到抗体分子中,克服了以往仅用荧光染料浸染抗体而导致荧光染料极易溶于细胞液而导致示踪效果差的问题。同时,本发明选取的磺酸罗丹明具有优异的水溶性和细胞膜穿透性,为研究抗体在生物细胞中的作用机理提供了有利条件。该荧光标记抗体可通过磺酸罗丹明荧光团的荧光显色观察到抗体在生物组织或细胞中作用过程和机理,为研究抗体在发挥抗感染、抗肿瘤、免疫调节与监视等功能的过程提供一种可视化工具。



其中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 n 的定义同结构通式中的定义。

3. 根据权利要求1所述的一类荧光标记抗体的应用, 其特征在于: 该荧光标记抗体用于监测、示踪抗体以及研究抗体在各项生命活动中的作用机理。

一类荧光标记抗体及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一类荧光标记抗体及应用,其属于精细化工领域。

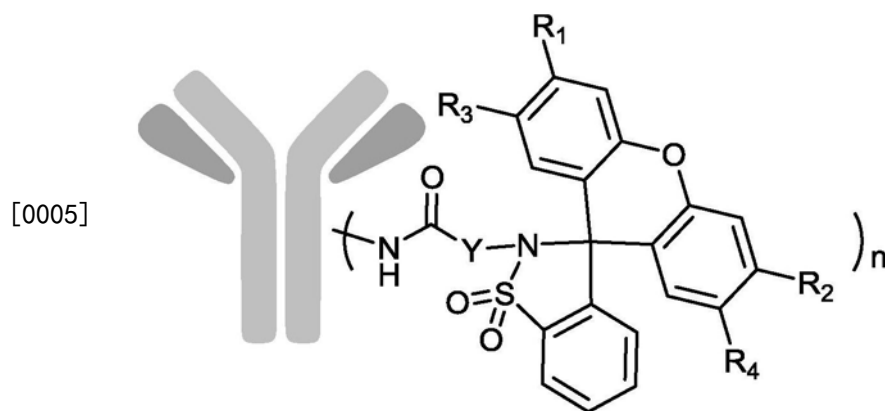
背景技术

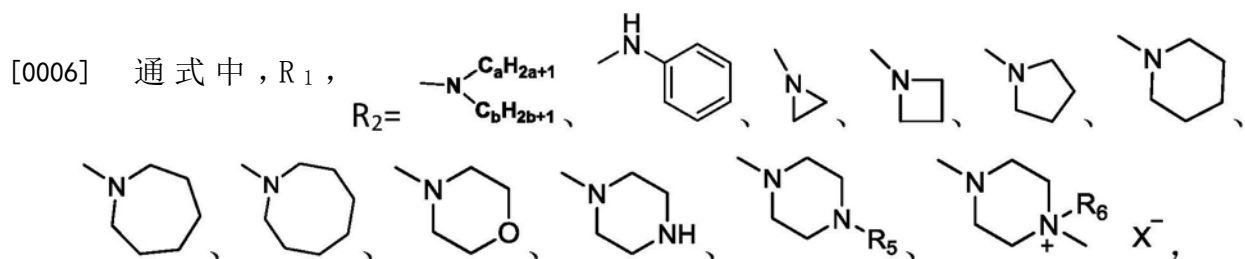
[0002] 抗体是机体免疫系统最重要的效应分子,具有结合抗原、结合补体、中和毒素、介导细胞毒、促进吞噬和通过胎盘等功能,发挥抗感染、抗肿瘤、免疫调节与监视等作用。随着生物技术的发展,抗体在同种异体免疫排斥、自身免疫反应抑制、抗血小板治疗、癌症治疗和感染性疾病治疗等方面都有广泛的应用。人源化抗体和人抗体的出现为多种疾病的治疗带来了新的希望,但人抗体是否可以解决鼠抗体临床应用中出现的所有问题,还有待大量临床试验的检验。由于影响抗体免疫原性的因素很多,如抗原呈递方式、信号传递系统以及患者的个体差异性等,而抗体的人源化只能解决部分问题,其广泛应用还有赖于对抗体效应机制及机体免疫系统调节机制进行更加细致深入的研究。同样,抗体衍生物也会面临诸如免疫原性、稳定性、活性、不良反应等自身固有问题。因此,研究抗体在发挥抗感染、抗肿瘤、免疫调节与监视等功能时的作用机理具有重要意义,即可为抗体药物的研发提供依据,又可预防临床应用中存在的一系列不良反应。

[0003] 荧光显微成像技术的发展为生物大分子的检测及研究提供了一种方便、快捷以及可视化的工具,目前用于抗体的荧光标记方法大多数都是将荧光化合物与抗体混合浸染从而使抗体被荧光标记。这种方法操作简单,但是抗体表面的荧光化合物很容易被漂洗掉以及溶解到PBS中,导致抗体的荧光信号较弱,而背景荧光干扰较强,使得抗体的可视化研究结果不够理想。

发明内容

[0004] 为解决现有技术中存在的问题,本发明提供一类荧光标记抗体及应用,为研究抗体在生物细胞中的作用机制提供一种可视化工具。本发明采用的技术方案为:一类荧光标记抗体,该荧光标记抗体的结构通式如下:

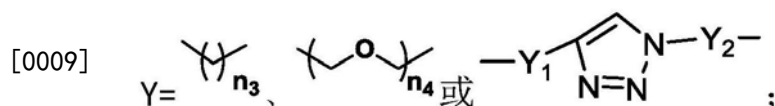




[0007] 其中: $a=0-18$ 的整数, $b=0-18$ 的整数, X^- 为阴离子, 所述阴离子为 BF_4^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 ClO_4^- 、 CH_3COO^- 、 $CH_3SO_3^-$ 或 $CF_3SO_3^-$, $R_5, R_6 =$

$=0-18$ 的整数, $n_2=0-18$ 的整数; 所述 所带正电荷总数等于阴离子所带负电荷总数, R_1 和 R_2 可为不同基团, R_5 和 R_6 可为不同基团;

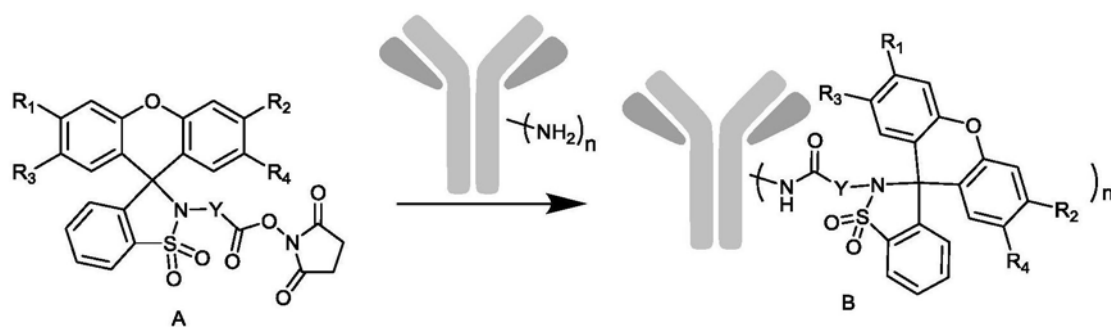
[0008] $R_3, R_4 =$ R_3 和 R_4 可为不同基团;



[0010] 其中: $Y_1 =$
或 $n=1-10$ 的整数, $n_3=1-11$ 的整数, $n_4=1-5$ 的整数, $n_5=1-5$ 的整数, n_6

$=1-11$ 的整数, $n_7=1-5$ 的整数, $m_1=0-11$ 的整数, $n_8=0-5$ 的整数, $m_2=0-11$ 的整数, $n_9=0-11$ 的整数, $n_{10}=0-5$ 的整数, $m_3=0-11$ 。所述的一类荧光标记抗体的制备方法, 该荧光标记抗体通过化合物A和抗体在 Ph 为9的缓冲溶液中脱除N-羟基马来酰亚胺制得。

[0011]



[0012] 其中, R_1, R_2, R_3, R_4, Y, n 的定义同结构通式中的定义。

[0013] 所述的一类荧光标记抗体的应用, 该荧光标记抗体用于监测、示踪抗体以及研究抗体在各项生命活动中的作用机理。。

[0014] 本发明的有益效果是: 一类荧光标记抗体及应用, 这类荧光标记抗体通过连有氨基酸吡咯烷基酯的磺酸罗丹明荧光化合物和抗体在 Ph 为9的缓冲溶液中脱除N-羟基马来酰亚胺制得, 制备方法简单。该荧光标记抗体将荧光化合物通过化学键连接到抗体分子中, 克

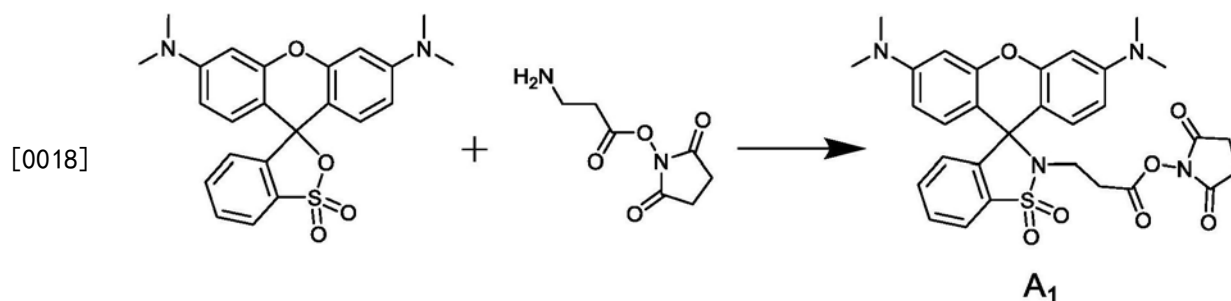
服了以往仅用荧光染料浸染抗体而导致荧光染料极易溶于细胞液而导致示踪效果差的问题,同时,本发明选取的磺酸罗丹明具有优异的水溶性和细胞膜穿透性,为研究抗体在生物细胞中的作用机理提供了有利条件。该荧光标记抗体可通过磺酸罗丹明荧光团的荧光显色观察到抗体在生物组织或细胞中作用过程和机理,为研究抗体在发挥抗感染、抗肿瘤、免疫调节与监视等功能的过程提供一种可视化工具。为研发抗体药物和研究抗体在临床应用中可能存在的一系列不良反应提供一种新的研究方向。

具体实施方式

[0015] 本发明用以下实例加以说明但不局限于此,其中除非另有说明,所有的份数和百分数均以重量计。

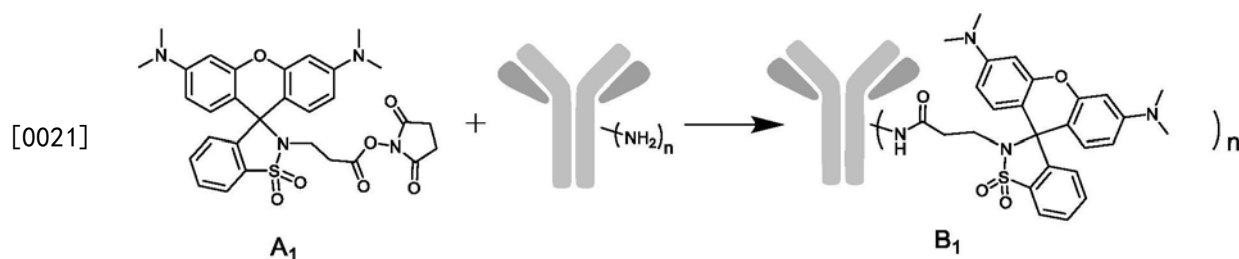
[0016] 以下结合技术方案详细叙述本发明的具体实施例,本发明实施例中抗体均购买于市售抗体。

[0017] 实施例1



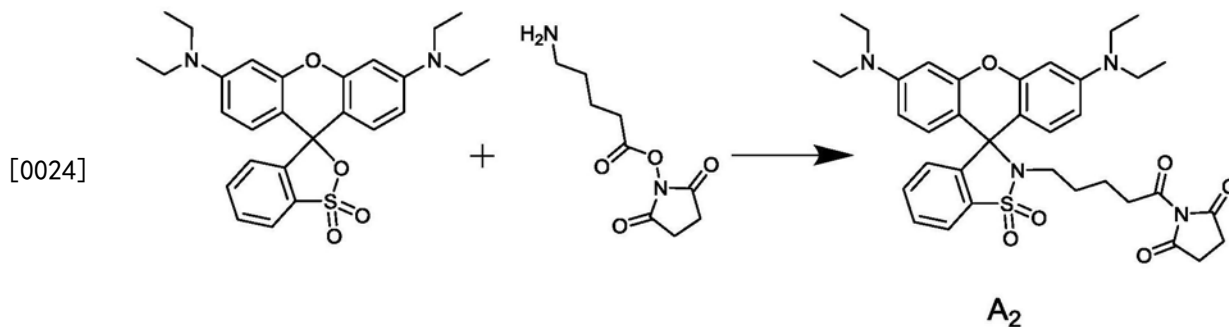
[0019] 称取磺酸罗丹明 (0.84g, 2mmol) 于反应瓶中,加入1,2-二氯乙烷充分搅拌,缓慢滴加三氯氧磷,95℃回流反应,硅胶板监测反应进度,待磺酸罗丹明反应完全后,冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用;将氨基酸吡咯烷基酯 (0.74g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌,将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液,室温反应,薄层色谱监测反应进度。产物 A_1 水洗萃取,减压蒸出溶剂,经柱色谱分离提纯,产物结构通过HRMS鉴定。

[0020] 实施例2



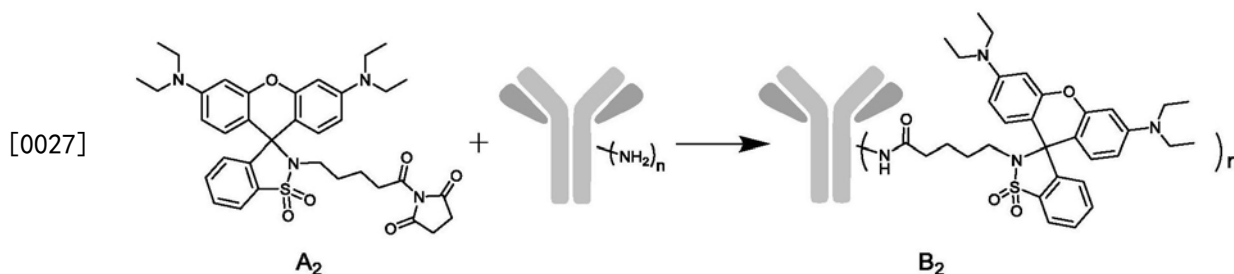
[0022] 将化合物 A_1 溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物 A_1 溶液,然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG4Fc二抗溶液(货号为A-10651), 2μL 5mM/L的化合物 A_1 溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合,室温搅拌2小时,产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的 B_1 溶液,冷冻或冷藏备用,产物结构通过HRMS鉴定。

[0023] 实施例3



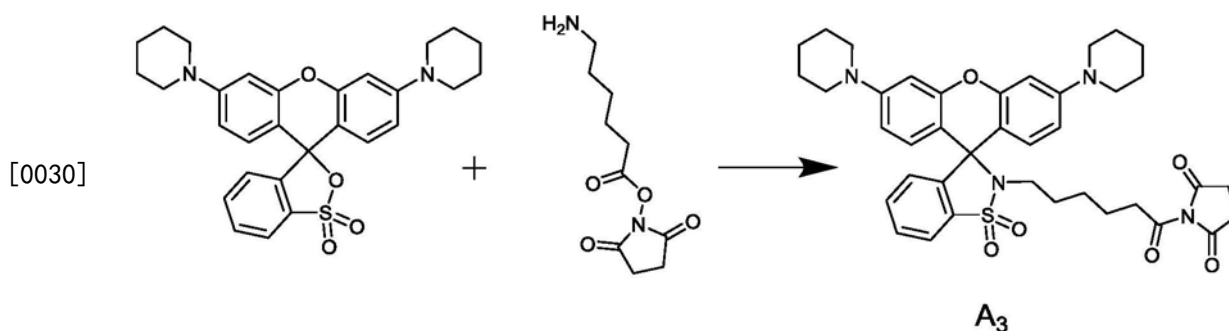
[0025] 称取磺酸罗丹明 (0.96g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入 1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃ 回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (0.86g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物 A₂ 水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过 HRMS 鉴定。

[0026] 实施例 4



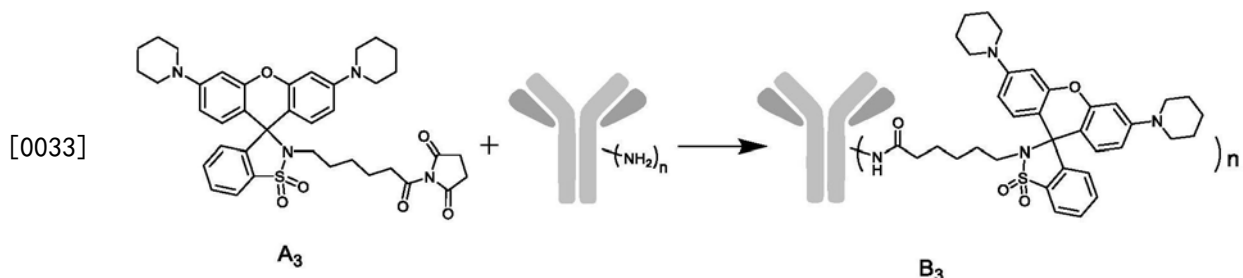
[0028] 将化合物 A₂ 溶于 DMSO 溶剂中配制成 5mM/L 的化合物 A₂ 溶液, 然后将 14μL 20mg/mL 的鼠抗人 IgG Fab 二抗溶液 (货号为 SA1-19255), 2μL 5mM/L 的化合物 A₂ 溶液, 100μL pH 为 7.40 的 PBS 和 28μL 1M/L 的 NaHCO₃ 溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌 2 小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得 142μL, 2mg/mL 的 B₂ 溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过 HRMS 鉴定。

[0029] 实施例 5



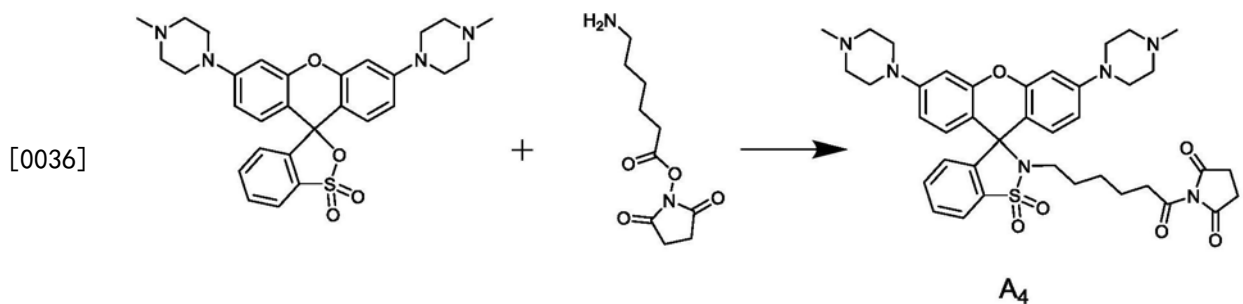
[0031] 合成方法同实施例 3。

[0032] 实施例 6



[0034] 合成方法同实施例4。

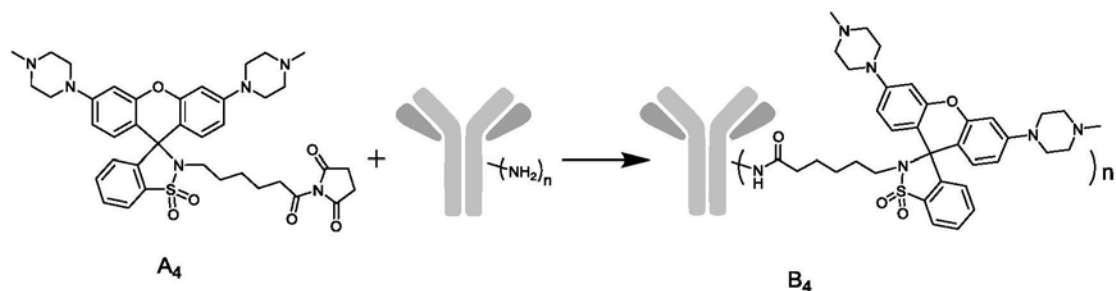
[0035] 实施例7



[0037] 合成方法同实施例3。

[0038] 实施例8

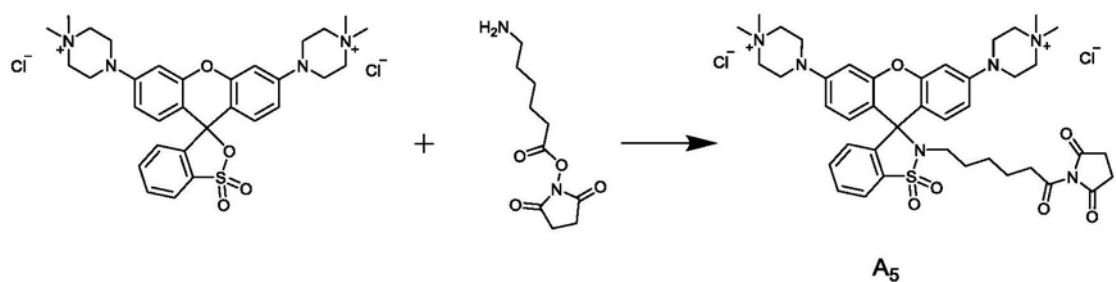
[0039]



[0040] 合成方法同实施例4。

[0041] 实施例9

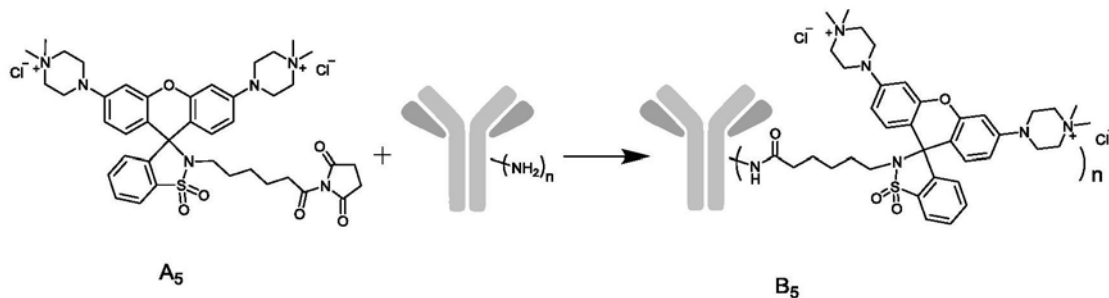
[0042]



[0043] 称取磺酸罗丹明 (1.26g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (0.91g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A5水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

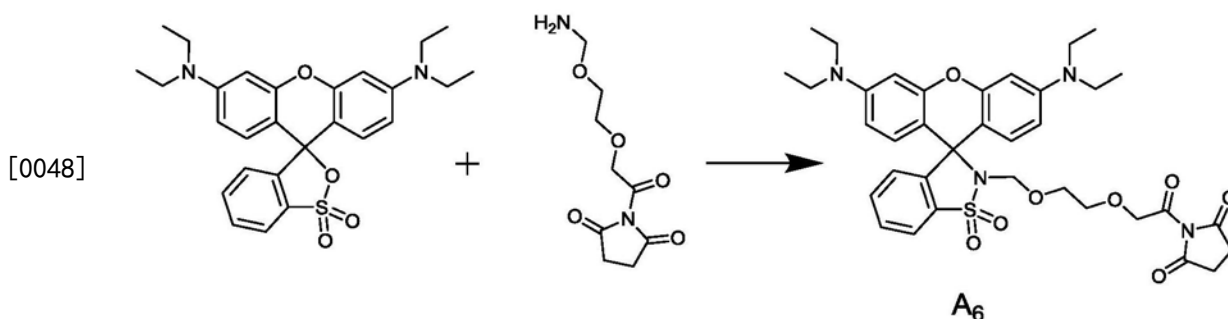
[0044] 实施例10

[0045]



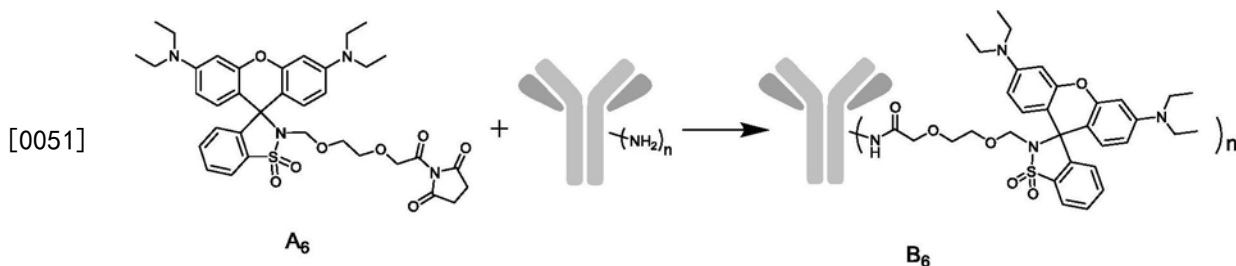
[0046] 将化合物A₅溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₅溶液,然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG (H+L) 二抗溶液(货号为MA5-14728), 2μL 5mM/L的化合物A₅溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₅溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0047] 实施例11



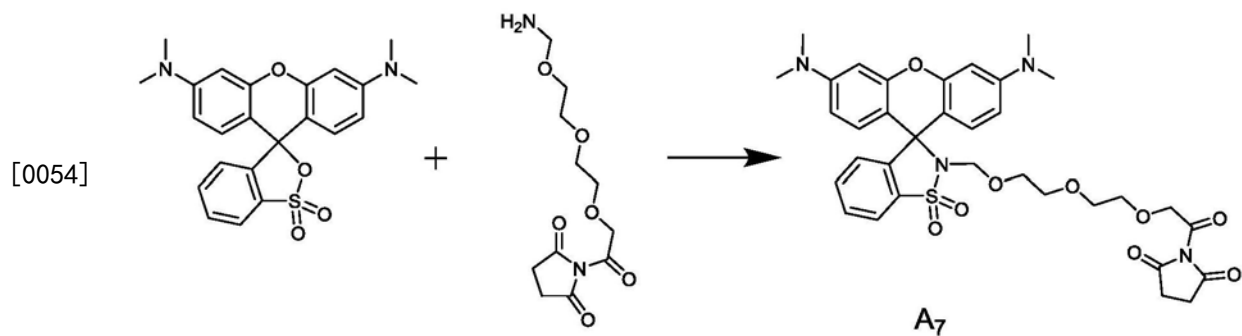
[0049] 称取磺酸罗丹明(0.96g, 2mmol)于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯(0.92g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₆水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0050] 实施例12



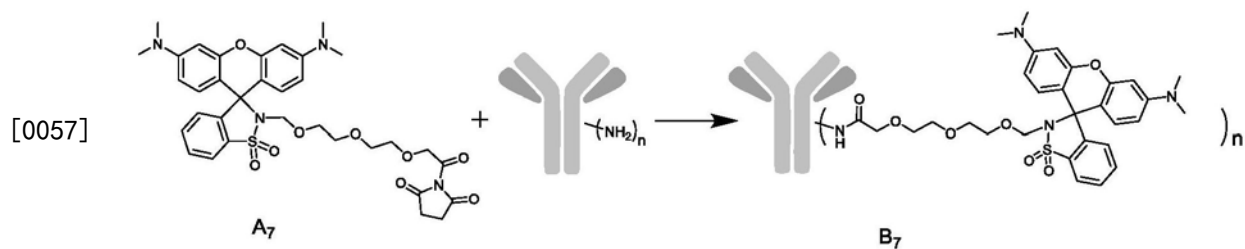
[0052] 将化合物A₆溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₆溶液, 然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG Fab二抗溶液(货号为SA1-19255), 2μL 5mM/L的化合物A₆溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₆溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0053] 实施例13



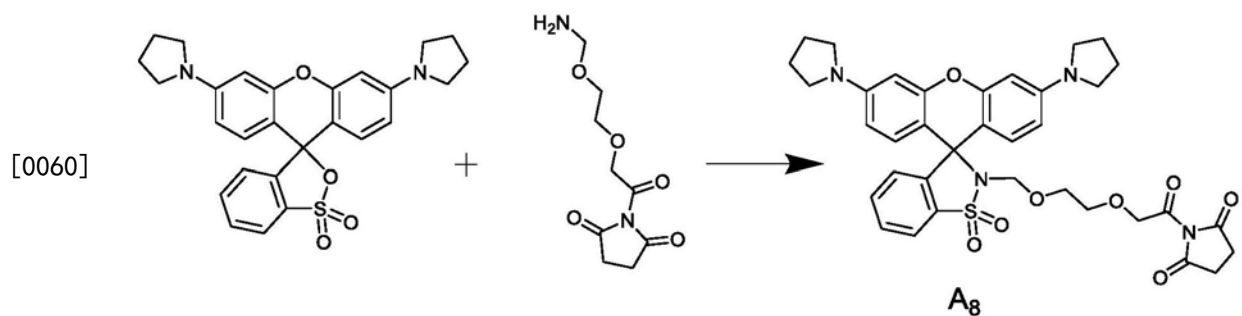
[0055] 合成方法同实施例11。

[0056] 实施例14



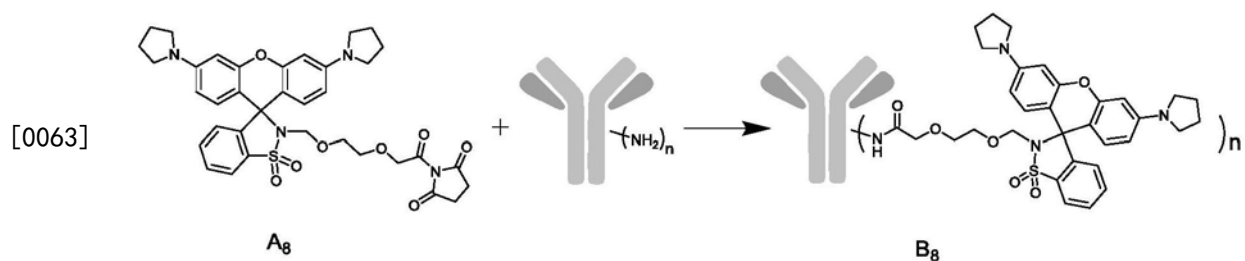
[0058] 合成方法同实施例12。

[0059] 实施例15



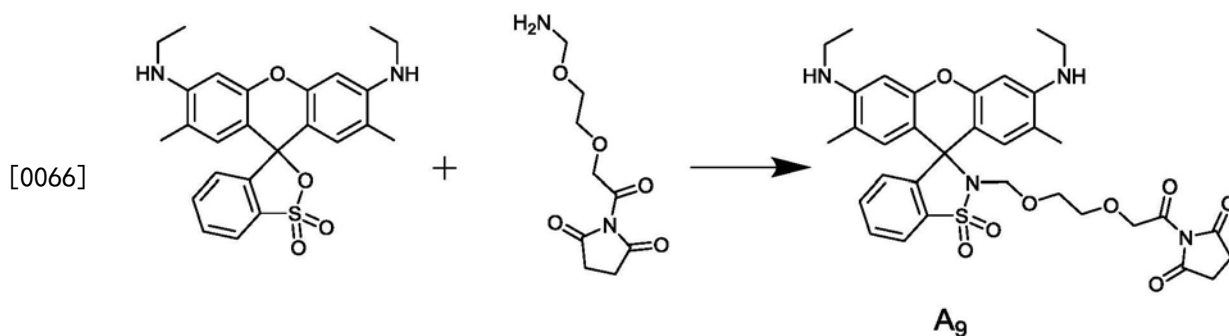
[0061] 合成方法同实施例11。

[0062] 实施例16



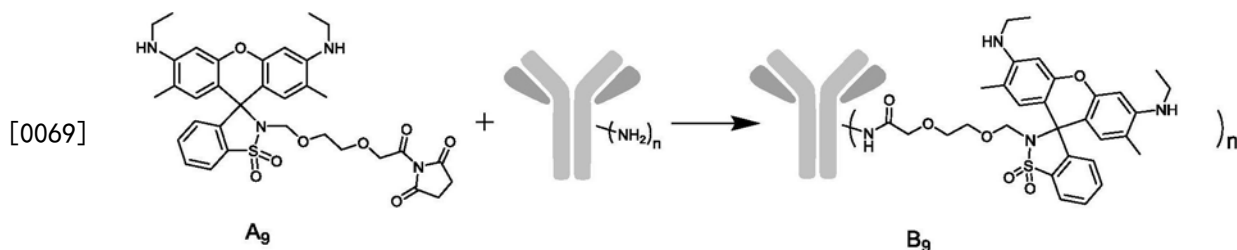
[0064] 合成方法同实施例12。

[0065] 实施例17



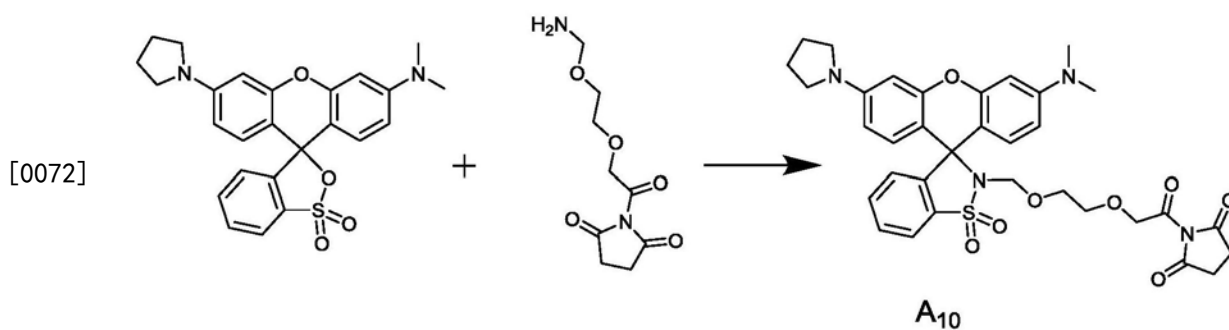
[0067] 称取磺酸罗丹明 (0.90g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入 1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (0.92g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物 A_9 水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过 HRMS 鉴定。

[0068] 实施例 18



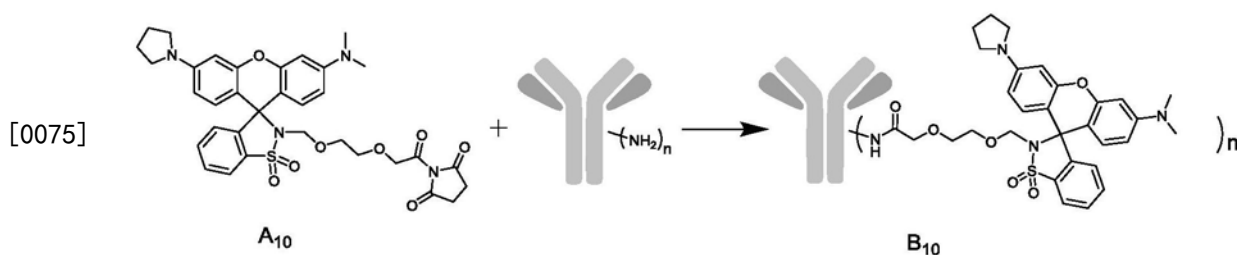
[0070] 将化合物 A_9 溶于 DMSO 溶剂中配制成 5mM/L 的化合物 A_9 溶液, 然后将 14μL 20mg/mL 的兔抗鼠 IgG (H+L) 二抗溶液 (货号为 A27022), 2μL 5mM/L 的化合物 A_9 溶液, 100μL pH 为 7.40 的 PBS 和 28μL 1M/L 的 $NaHCO_3$ 溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌 2 小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得 142μL, 2mg/mL 的 B_9 溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过 HRMS 鉴定。

[0071] 实施例 19



[0073] 合成方法同实施例 17。

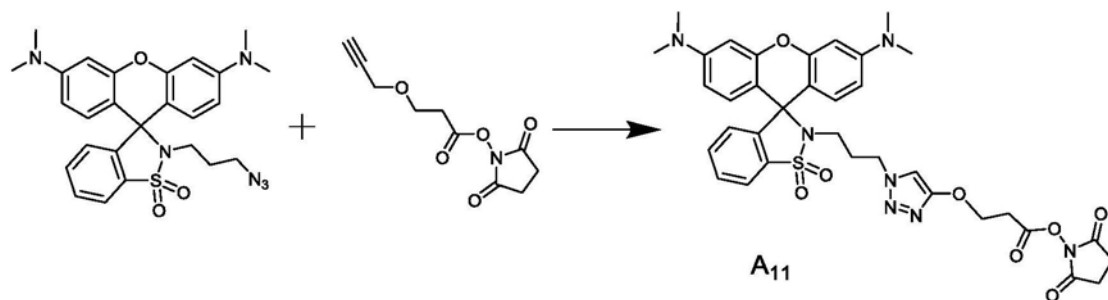
[0074] 实施例 20



[0076] 合成方法同实施例18。

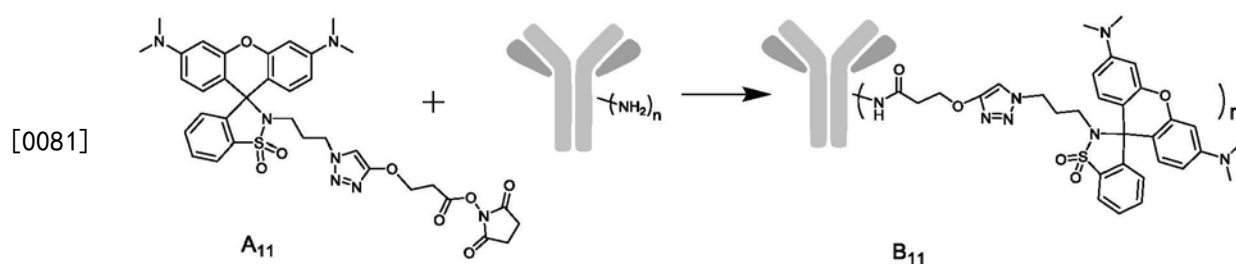
[0077] 实施例21

[0078]



[0079] 合成方法同实施例17。

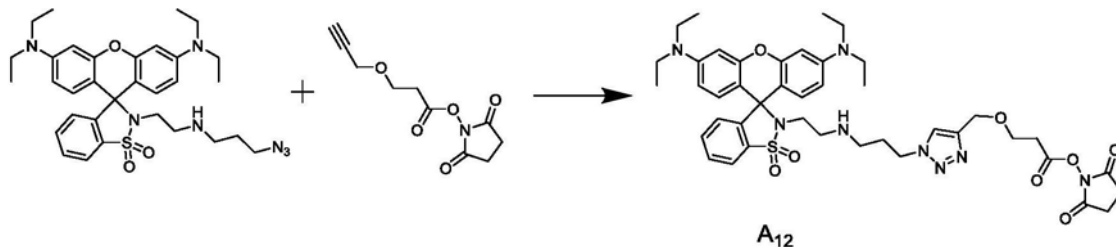
[0080] 实施例22



[0082] 合成方法同实施例18。

[0083] 实施例23

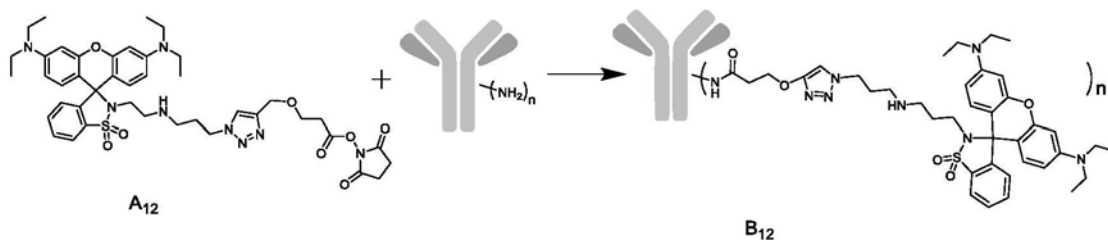
[0084]



[0085] 称取磺酸罗丹明 (1.2g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (0.9g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₁₂水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0086] 实施例24

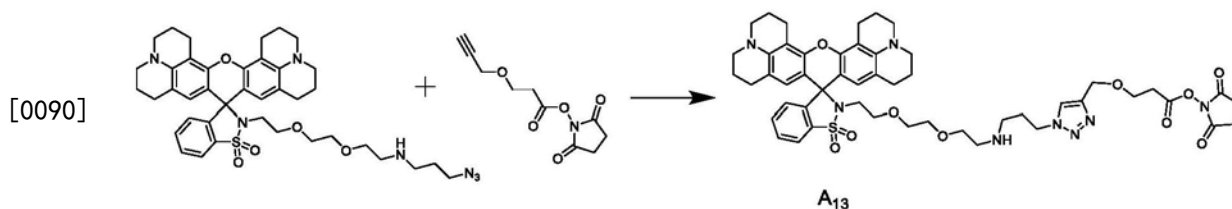
[0087]



[0088] 将化合物A₁₂溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₁₂溶液, 然后将14μL 20mg/mL

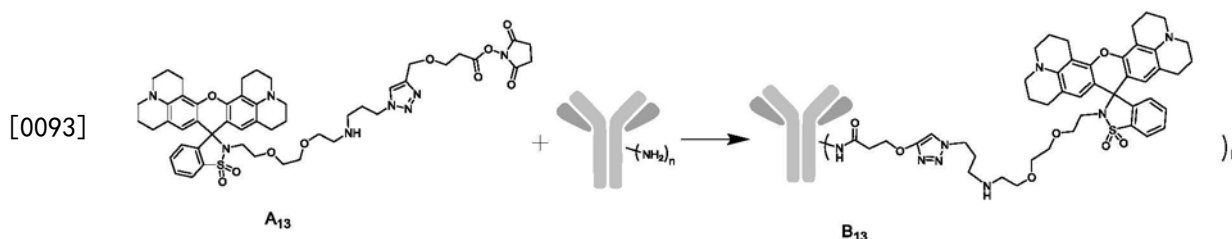
的兔抗人IgG₁二抗溶液(货号为SA5-10202), 2μL 5mM/L的化合物A₁₂溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₁₂溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0089] 实施例25



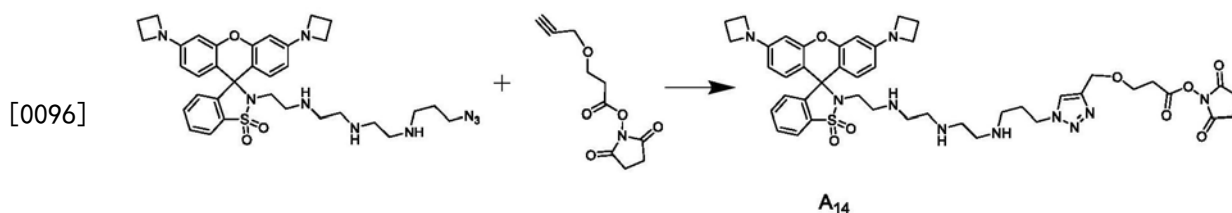
[0091] 合成方法同实施例23。

[0092] 实施例26



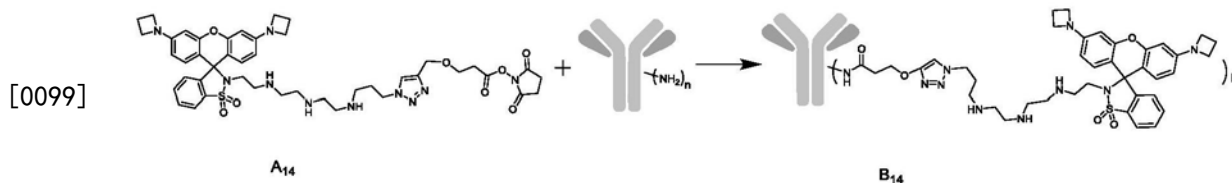
[0094] 合成方法同实施例24。

[0095] 实施例27



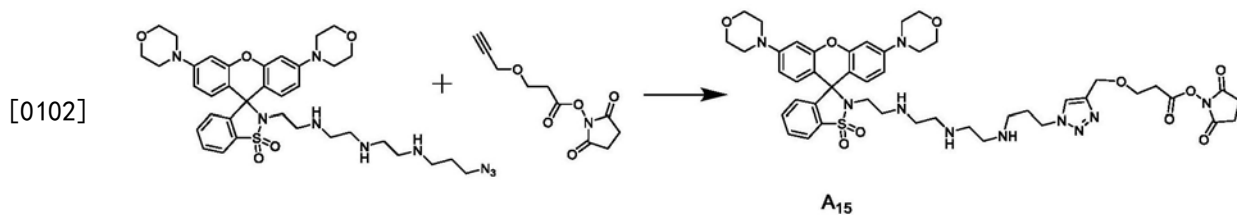
[0097] 称取磺酸罗丹明(1.31g, 2mmol)于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯(0.9g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₁₄水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0098] 实施例28



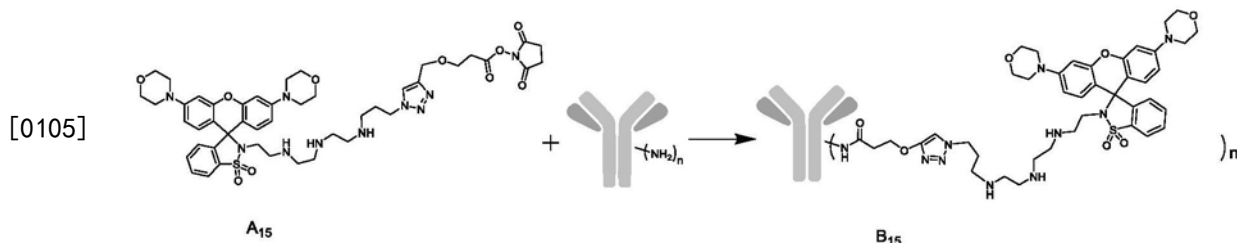
[0100] 将化合物A₁₄溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₁₄溶液, 然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG(H+L)二抗溶液(货号为MA5-14728), 2μL 5mM/L的化合物A₁₄溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₁₄溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0101] 实施例29



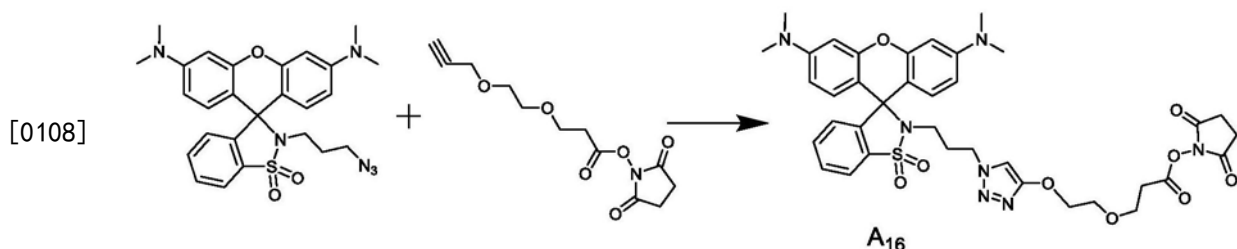
[0103] 合成方法同实施例27。

[0104] 实施例30



[0106] 合成方法同实施例28。

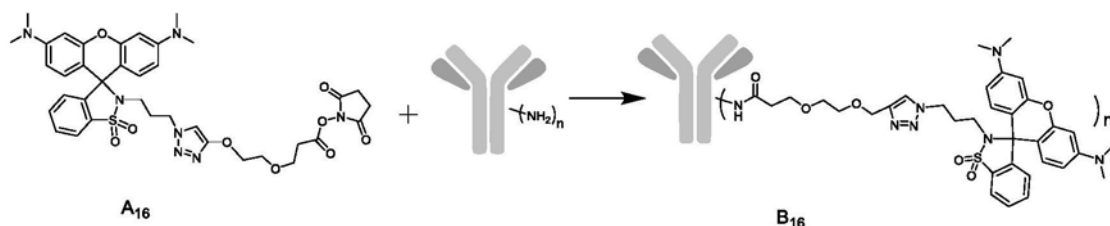
[0107] 实施例31



[0109] 称取磺酸罗丹明 (1.0g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (1.08g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₁₆水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

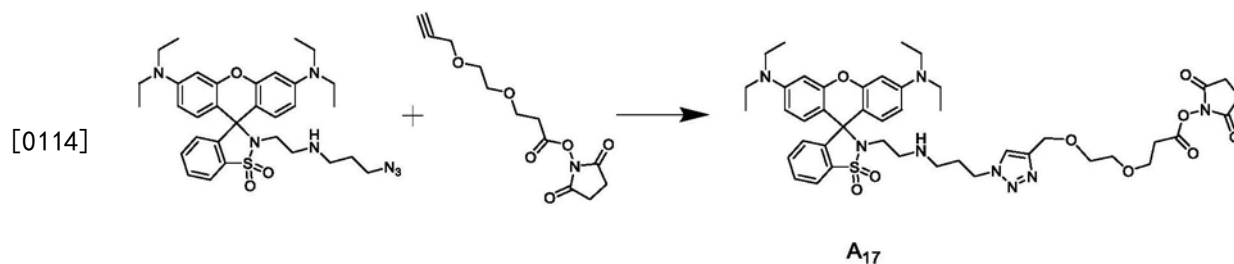
[0110] 实施例32

[0111]



[0112] 将化合物A₁₆溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₁₆溶液, 然后将14μL 20mg/mL的ZO-1多克隆抗体溶液 (货号为61-7300), 2μL 5mM/L的化合物A₁₆溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₁₆溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

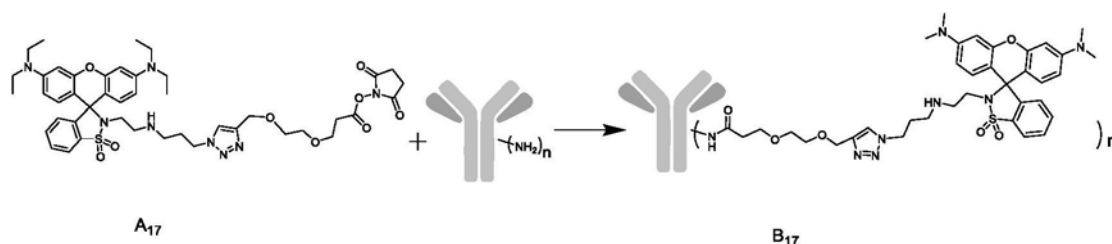
[0113] 实施例33



[0115] 合成方法同实施例31。

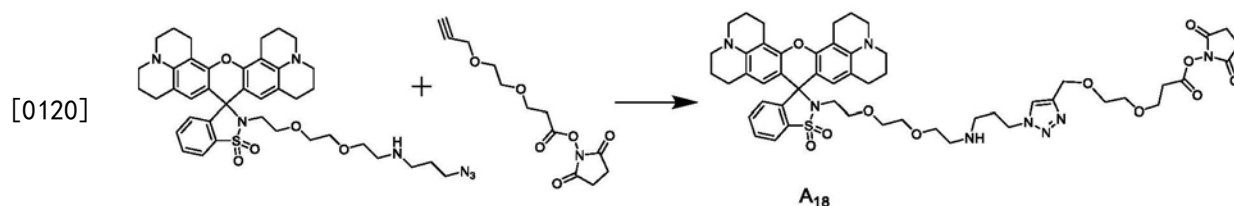
[0116] 实施例34

[0117]



[0118] 合成方法同实施例32。

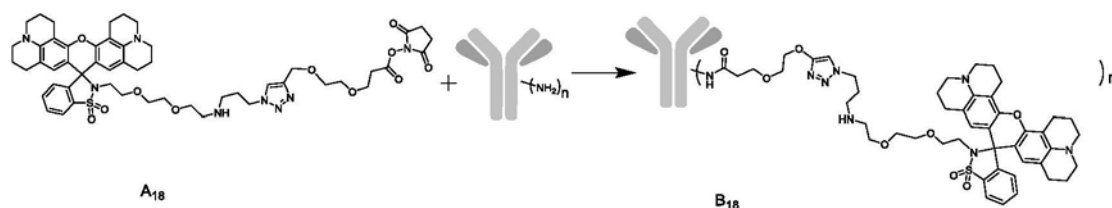
[0119] 实施例35



[0121] 称取磺酸罗丹明 (1.48g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (1.08g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₁₈水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

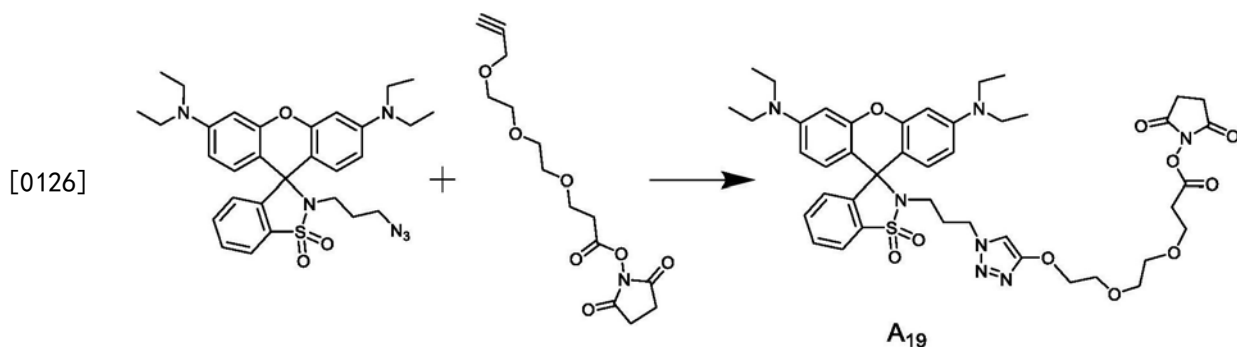
[0122] 实施例36

[0123]



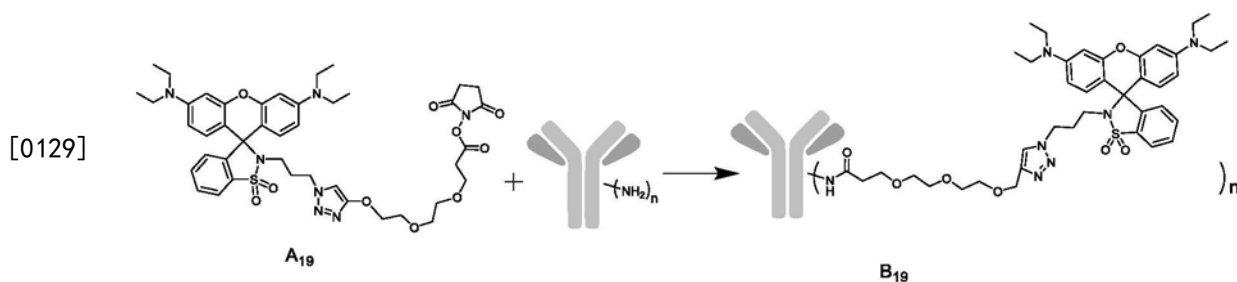
[0124] 将化合物A₁₈溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₁₈溶液, 然后将14μL 20mg/mL的CD11b单克隆抗体溶液 (货号为14-0112-82), 2μL 5mM/L的化合物A₁₈溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₁₈溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0125] 实施例37



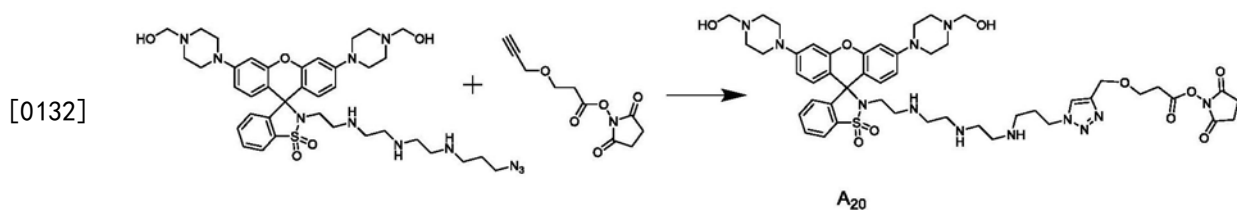
[0127] 合成方法同实施例35。

[0128] 实施例38



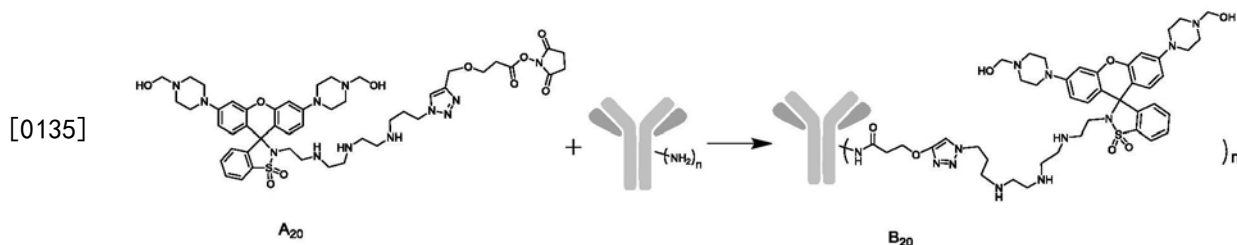
[0130] 合成方法同实施例36。

[0131] 实施例39



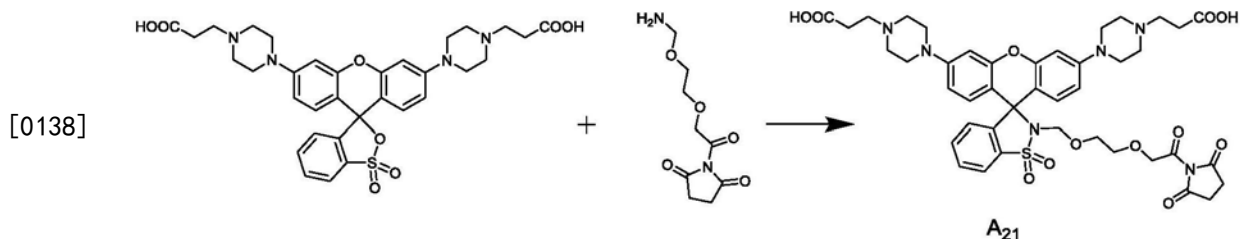
[0133] 称取磺酸罗丹明 (1.55g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (1.08g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₂₀水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0134] 实施例40



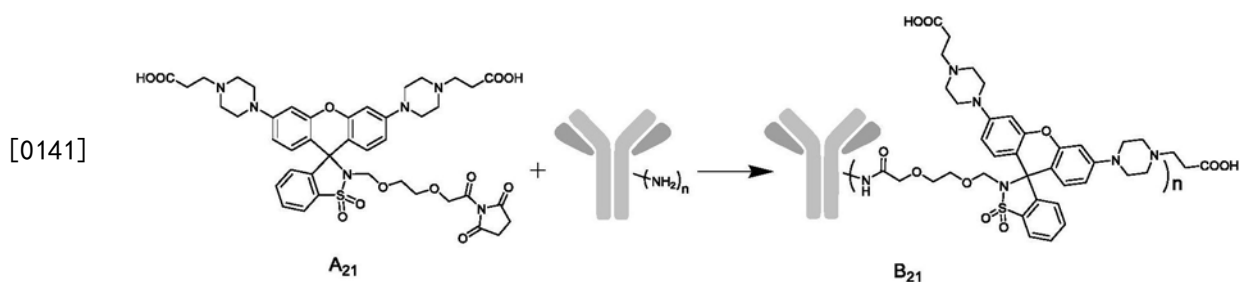
[0136] 将化合物A₂₀溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₂₀溶液, 然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG (H+L) 二抗溶液 (货号为MA5-14728), 2μL 5mM/L的化合物A₂₀溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合, 室温搅拌2小时, 产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₂₀溶液, 冷冻或冷藏备用, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0137] 实施例41



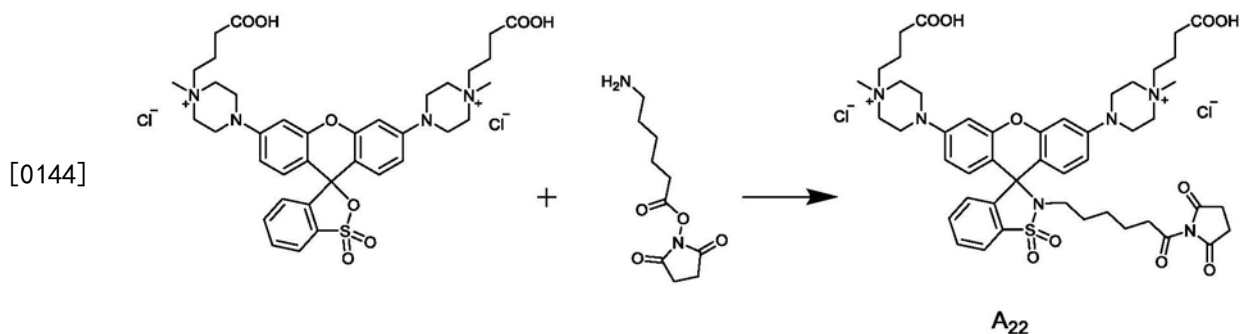
[0139] 称取磺酸罗丹明 (1.30g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (1.08g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₂₁水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0140] 实施例42



[0142] 将化合物A₂₁溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₂₁溶液,然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG (H+L) 二抗溶液(货号为MA5-14728), 2μL 5mM/L的化合物A₂₁溶液,100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合,室温搅拌2小时,产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL,2mg/mL的B₂₁溶液,冷冻或冷藏备用,产物结构通过HRMS鉴定。

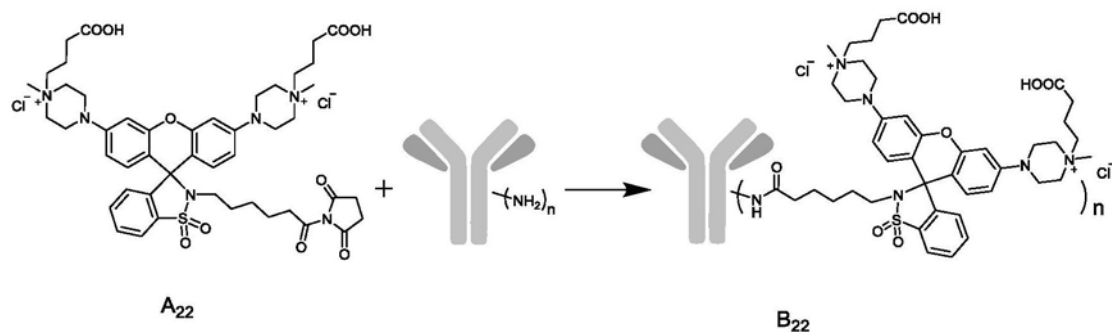
[0143] 实施例43



[0145] 称取磺酸罗丹明 (1.56g, 2mmol) 于反应瓶中, 加入1,2-二氯乙烷充分搅拌, 缓慢滴加三氯氧磷, 95℃回流反应, 硅胶板监测反应进度, 待磺酸罗丹明反应完全后, 冷却、减压蒸出溶剂得罗丹明磺酰氯备用; 将氨基酸吡咯烷基酯 (1.08g, 4mmol)、三乙胺和乙腈加入反应瓶室温搅拌, 将罗丹明磺酰氯溶于乙腈中缓慢加入反应液, 室温反应, 薄层色谱监测反应进度。产物A₂₂水洗萃取, 减压蒸出溶剂, 经柱色谱分离提纯, 产物结构通过HRMS鉴定。

[0146] 实施例44

[0147]



[0148] 将化合物A₂₂溶于DMSO溶剂中配制成5mM/L的化合物A₂₂溶液,然后将14μL 20mg/mL的鼠抗人IgG (H+L) 二抗溶液(货号为MA5-14728), 2μL 5mM/L的化合物A₂₂溶液, 100μL pH为7.40的PBS和28μL 1M/L的NaHCO₃溶液加入反应瓶中混合,室温搅拌2小时,产物通过蛋白质脱盐离心柱提纯得142μL, 2mg/mL的B₂₂溶液,冷冻或冷藏备用,产物结构通过HRMS鉴定。

专利名称(译)	一类荧光标记抗体及应用		
公开(公告)号	CN110229231A	公开(公告)日	2019-09-13
申请号	CN201910644315.2	申请日	2019-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连理工大学		
[标]发明人	肖义 陈令成 张新富		
发明人	肖义 陈令成 张新富		
IPC分类号	C07K16/42 C07K16/28 C07K11/13 C09K11/06 G01N33/533		
CPC分类号	C07K16/28 C07K16/2845 C07K16/42 C09K11/06 C09K2211/145 C09K2211/1466 C09K2211/1475 C09K2211/1483 G01N33/533		
代理人(译)	杨翠翠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一类荧光标记抗体及应用，其属于精细化工领域。这类荧光标记抗体通过连有氨基酸吡咯烷基酯的磺酸罗丹明荧光化合物和抗体在Ph为9的缓冲溶液中脱除N-羟基马来酰亚胺制得。该荧光标记抗体将荧光化合物通过化学键连接到抗体分子中，克服了以往仅用荧光染料浸染抗体而导致荧光染料极易溶于细胞液而导致示踪效果差的问题。同时，本发明选取的磺酸罗丹明具有优异的水溶性和细胞膜穿透性，为研究抗体在生物细胞中的作用机理提供了有利条件。该荧光标记抗体可通过磺酸罗丹明荧光团的荧光显色观察到抗体在生物组织或细胞中作用过程和机理，为研究抗体在发挥抗感染、抗肿瘤、免疫调节与监视等功能的过程提供一种可视化工具。

