

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/533

C07D213/38

C07D401/14

C07D409/14

C07D498/22



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03805523.6

[43] 公开日 2005 年 10 月 19 日

[11] 公开号 CN 1685232A

[22] 申请日 2003. 3. 10 [21] 申请号 03805523. 6

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 8 [33] JP [31] 63961/2002

[32] 2002. 9. 18 [33] JP [31] 271924/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/002774 2003. 3. 10

[87] 国际公布 WO2003/076938 日 2003. 9. 18

[85] 进入国家阶段日期 2004. 9. 8

[71] 申请人 松本和子

地址 日本东京都

共同申请人 袁景利

[72] 发明人 松本和子 袁景利 王桂兰 谭明乾

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 段承恩 田欣

权利要求书 6 页 说明书 46 页 附图 6 页

[54] 发明名称 新型荧光标识化合物

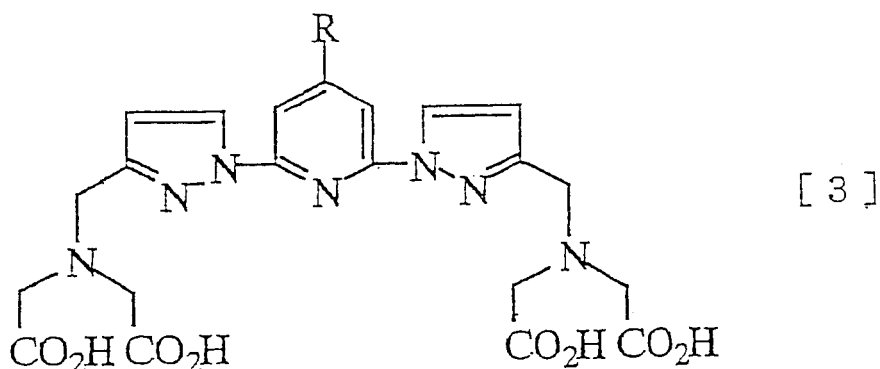
[57] 摘要

本发明提供一种新型的标识试剂，其特征在于具有与被标识物质(例如来自生物体的物质、生理活性物质等)结合的基团，容易与稀土类离子形成络合物，并且该络合物在水溶液中足够稳定，与缓冲剂的种类无关，具有足够的荧光强度和较长的荧光寿命，本发明还提供该标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物、包含该络合物的荧光标识剂，以及采用该荧光标识剂的荧光测定方法等。具体地，提供由具有 2, 2' : 6', 2'' - 三吡啶骨架或者 2, 6 - 二吡啶吡啶骨架，与被标识物质(例如来自生物体的物质、生理活性物质等)结合的基团，以及与稀土类离子形成络合物用的结合基团的化合物形成的标识试剂，以及该标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物，包含该络合物的荧光标识剂，采用该络合物作为标识剂用的荧光标识方法，以及采用该荧光标识剂的荧光测定方法和荧光测定法用试剂。

知识产权出版社出版

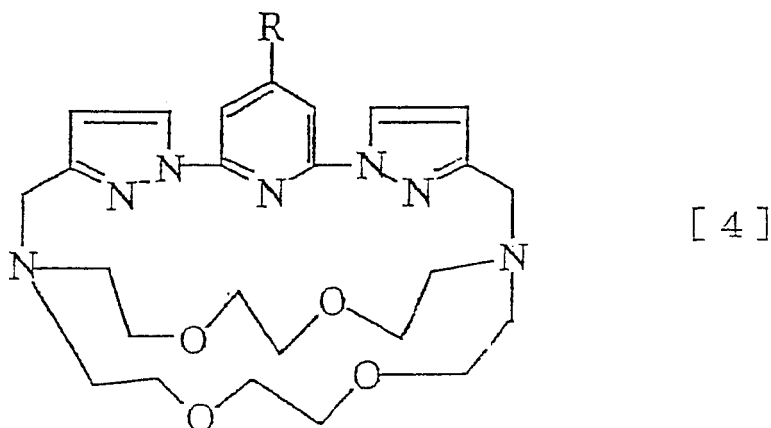
ISSN 1008-4274

6、如权利要求1所述的标识试剂，该化合物为通式[3]所示的化合物。



(式中，R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

7、如权利要求1所述的标识试剂，该化合物为通式[4]所示的化合物。



(式中，R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

8、由权利要求1-7任何一项所述的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物。

9、一种荧光标识试剂，其含有由权利要求1-7任何一项所述的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物。

10、如权利要求9所述的荧光标识试剂，其中稀土类金属离子为三价镧离子、三价钪离子、三价铽离子和三价镱离子的络合物。

11、一种荧光标识方法，其特征为使用权利要求1-7任何一项所述的标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物作为标识试剂。

12、一种荧光标识方法，其特征为使用权利要求1-7任何一项所述的

标识试剂和稀土类金属离子。

13、一种被荧光标识剂标识的来自生物体的物质或生理活性物质，其中该荧光标识剂含有权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物。

14、一种被荧光标识的来自生物体的物质或生理活性物质，其中使用权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂和稀土类金属离子进行标识。

15、如权利要求 13 或 14 所述的被标识的来自生物体的物质或生理活性物质，其中来自生物体的物质或生理活性物质为酶、蛋白质、激素、肽、核酸、核酸探针、寡核苷酸或药物（包含抗生物质）。

16、一种荧光测定方法，其特征为采用权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物作为荧光标识试剂。

17、一种荧光测定方法，其特征为使用权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂和稀土类金属离子。

18、如权利要求 16 或 17 所述的荧光测定方法，其特征为荧光测定方法为时间分辨荧光测定方法。

19、如权利要求 18 所述的荧光测定方法，其特征为时间分辨荧光测定方法为时间分辨荧光免疫测定法、时间分辨荧光 DNA 杂交测定法、时间分辨荧光显微镜成像法、或时间分辨荧光色谱法。

20、一种荧光测定法用试剂，其采用权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物作为荧光标识试剂。

21、一种荧光测定法用试剂，其包含权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂与稀土类金属离子。

22、如权利要求 20 或 21 所述的荧光测定方法用试剂，其特征为测定来自生物体的物质或生理活性物质。

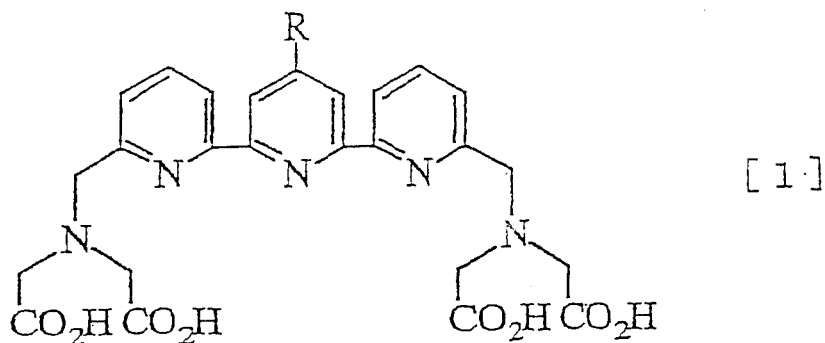
23、如权利要求 22 所述的荧光测定方法用试剂，其特征为来自生物体的物质或生理活性物质为酶、蛋白质、激素、肽、核酸、核酸探针、寡核苷酸或药物（包含抗生物质）。

24、试剂盒，其包含权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂与稀土类

金属离子形成的络合物作为荧光标识剂。

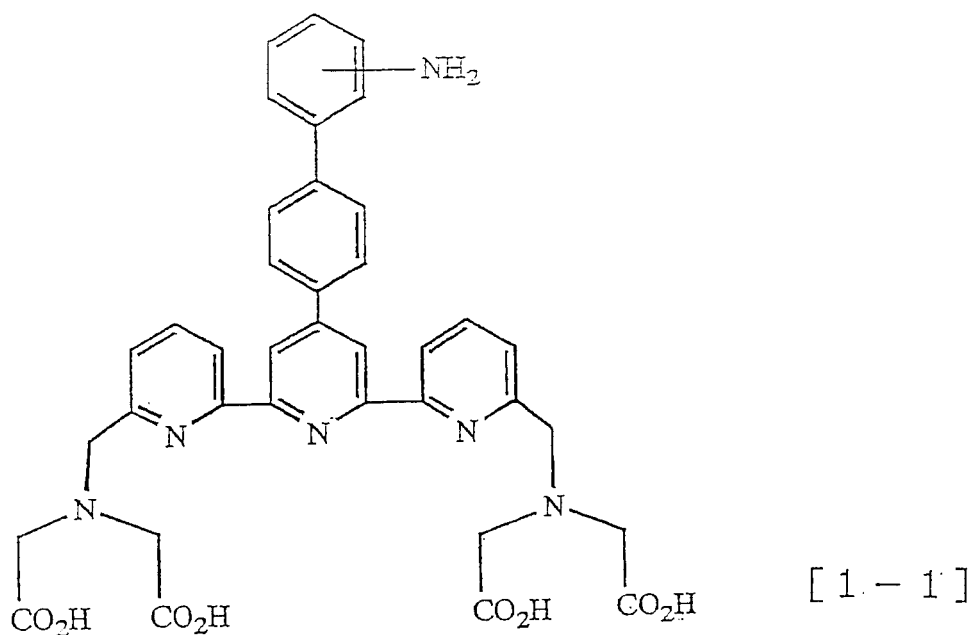
25、试剂盒，其包含权利要求 1-7 任何一项所述的标识试剂与稀土类金属离子。

26、通式[1]所示的化合物或其盐，

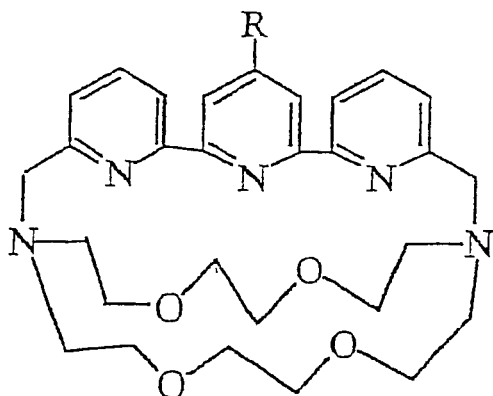


(式中，R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

27、如权利要求 26 所述的化合物或其盐，其如通式[1-1]所示。



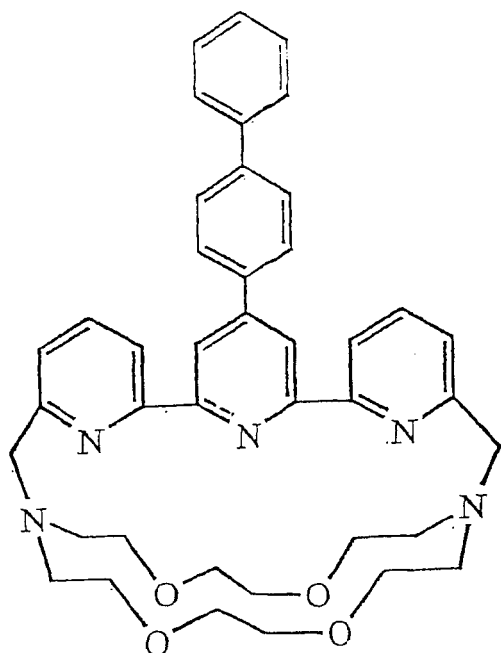
28、通式[2]所示的化合物或其盐，



[2]

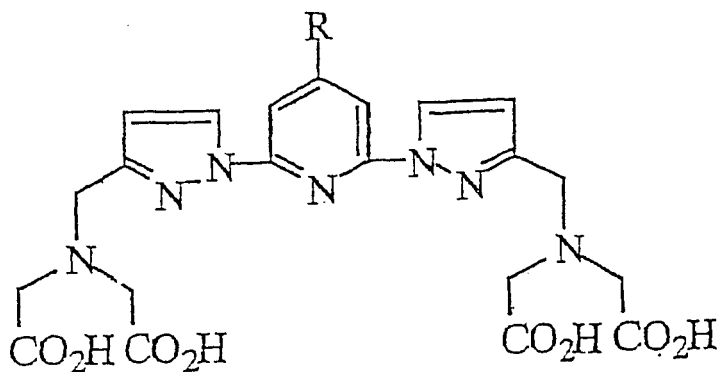
(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

29、如权利要求 28 所述的化合物或其盐, 其如通式[2-1]所示。



[2 - 1]

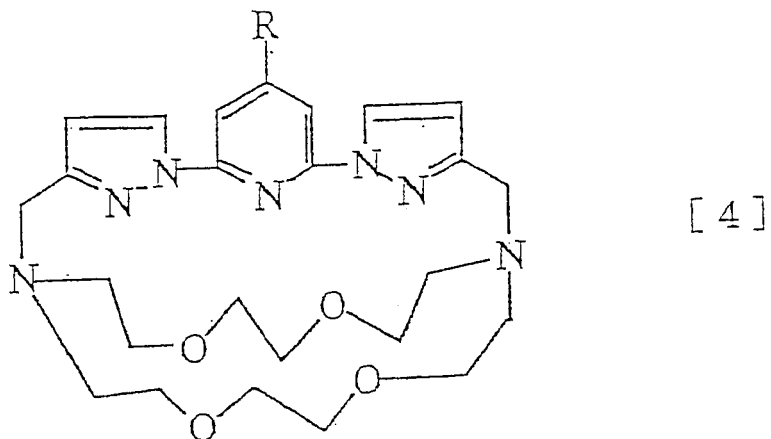
30、通式[3]所示的化合物或其盐,



[3]

(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

31、通式[4]所示的化合物或其盐,



(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

新型荧光标识化合物

技术领域

本发明涉及新型标识试剂、该标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物、包含该络合物的荧光标识剂，采用该络合物作为标识剂的荧光标识方法，采用该荧光标识剂的荧光测定方法以及荧光测定方法用试剂。

背景技术

在现有技术中，作为生物试样中微量物质的分析方法，经常使用的是利用抗体-抗原反应的免疫测定和DNA杂交测定等。在这些分析方法中，需要使用标识抗体、抗原、DNA、DNA碱基衍生物、DNA寡核苷酸等用的标识剂，作为可高灵敏度进行检测的标识剂，经常使用的方式有利用荧光的标识、利用放射性同位素的标识或者利用酶的标识等。

由放射性同位素进行标识的方式虽然具有高灵敏度，但是其缺点是在贮藏、使用和处理时伴有危险。此外，由酶进行的标识时，由于酶的分子量大，存在的问题是容易受温度等外部环境的影响，不稳定，并且再现性较低，由于酶标识剂与被标识物结合，存在酶和被标识物活性下降的问题。

作为由荧光进行的标识方法，已知采用有机荧光色素进行标识的方法（例如荧光素、罗丹明和丹磺酰氯等），但是由于激发光的散射光产生的背景噪音，以及来自试样中存在的其它共存物质的荧光产生的背景噪音，对有机荧光色素的荧光检测产生较大的影响，难以高灵敏度的进行检测。

作为由荧光进行标识的方法，除此以外，还已知由稀土类荧光络合物进行标识的方法。稀土类荧光络合物具有的荧光特性包括：具有较长的荧光寿命（与普通荧光物质具有几个纳秒的荧光寿命相比，稀土类荧光络合物具有几十或几百微秒或其以上的荧光寿命），较大的斯托克斯频移（ストークスシフト）、尖锐的荧光峰。通过活用这些特性，已经开发出将稀

土类荧光络合物作为标识剂的时间分辨荧光测定法。由这些特性，通过采用时间分辨荧光测定法，可除去由激发光或生物试样中产生的短寿命的背景荧光产生的障碍，可进行高灵敏度的测定。

将稀土类络合物作为标识剂使用的时间分辨荧光测定系统的一个实例，为 PerkinElmer Life Sciences 社（旧 Wallac 社）开发的“DELFI A”（Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay）系统。该系统采用异硫代氰酸酯苯基-EDTA 或者异硫代氰酸酯苯基-DTTA（DTTA = 二亚乙基三胺 4 乙酸）和稀土类离子的络合物作为标识剂，标识蛋白质或核酸等，在测定荧光之前，添加包含 β -二酮-三辛基磷氧化物（TOPO）-三酮 X-100 的所谓荧光增强溶液，使稀土类金属离子从非荧光性的络合物游离出来的同时，生成 β -二酮-稀土类离子-TOPO 三元络合物的微胶粒溶液，由此进行荧光测定的方法（E. Soini, T. Lovgren, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1987, 18, 105-154; E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.*, 1990, 62, 1149A-1157A; I. Hemmila, *J. Alloys Compd.*, 1995, 225, 480-485）。但是在该 DELFI A 系统中，由于在测定溶液中存在过量的 β -二酮和 TOPO，如果与环境中的稀土类金属离子发生反应的话，可发出较强的荧光，因此存在所谓非常容易受到稀土类金属离子的污染的较大缺点。此外，由于 DELFI A 系统需要添加荧光增强溶液，存在测定步骤多，以及不能进行固相测定的缺点。

此外，另一采用稀土类络合物作为标识剂的时间分辨荧光测定系统，有加拿大的 Diamandis 等开发出的 FI A gen 系统。（E. P. Diamandis, *Clin. Biochem.*, 1988, 21, 139-150; E. F. G. Dickson, A. Pollak, E. P. Diamandis, *Pharmac. Ther.*, 1995, 66, 207-235）。FI A gen 系统是采用可直接标识蛋白质的荧光性络合物（4, 7-二（氯代磺苯基）-1, 10-菲绕啉）-2, 9-二羧酸（BCPDA）- Eu^{3+} ）。该系统不存在环境中络污染的问题，在固相下也可进行测定。但是该系统的标识剂的荧光强度与上述 DELFI A 系统相比，弱 2 位数或其以上，存在检测灵敏度低，难以进行高灵敏度分析的问题。

作为其它采用稀土类络合物作为标识剂的时间分辨荧光测定系统，有法国的 CIS Bio International 社的 TRACE(time resolved amplified cryptate emission)测定系统 (G. Mathis, Clin. Chem., 1995, 41, 1391-1397; G. Mathis, J.Clin.Ligand Assay,1997, 20, 141-147)。在该系统中，采用镧系荧光标识剂三(联吡啶)穴状化合物 - Eu^{3+} 和有机荧光标识剂别藻蓝蛋白作为荧光能量移动的供体和受体使用，其优点是在均匀的溶液中反应完成后，可直接进行时间分辨荧光测定，不使用固相材料，不用进行 B/F 分离和清洗操作，但是由于存在灵敏度低的缺点，因此不能应用于高灵敏度的测定。

为了克服上述稀土类荧光络合物标识剂以及采用这些标识剂的时间分辨荧光测定方法的缺点，本发明者等开发了一种具有氨基、可直接标识蛋白质的氯代磺酰化 4 座 β - 二酮型的标识剂，并研究了采用这些标识剂的时间分辨荧光测定方法的应用 (特开平 9 - 241233 号公报; 特开 2000 - 111480 号公报; J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto, Anal. Chem., 2001, 73, 1869-1876; S. Sueda, J. Yuan, K. Matsumoto, Bioconjugate Chem., 2000, 11, 827-831; K. Matsumoto, J. Yuan, G. Wang, H. Kimura, Anal. Biochem., 1999, 276, 81-87; J. Yuan, K. Matsumoto, H. Kimura, Anal. Chem., 1998, 70, 596-601; J. Yuan, G. Wang, K. Matsumoto, H. Kimura, Anal. Biochem., 1997, 254, 283-287)。

但是，上述氯代磺酰化 4 座 β - 二酮型的标识剂一般水溶性差，因此在标识较小的生物体物质 (例如具有氨基的分子量较小的核酸碱基或其它的有机化合物) 时，所产生的问题是被标识的生物体水溶性低，从溶液中沉淀出来。此外，由于螯合力不足，因此可使用的缓冲剂的种类也受到限制。因此，将这些物质用于直接标识还存在困难。

以下是与本申请的发明相关的在先技术文献信息。

- 1 特开平 9 - 241233 号公报
- 2 特开 2000 - 111480 号公报
- 3 E. Soini, T. Lovgren, CRC Crit. Rev. Anal. Chem., 1987, 18, 105-154;

- 4 E. P. Diamandis, T. K. Christopoulos, *Anal. Chem.*, 1990, 62, 1149A-1157A;
- 5 I. Hemmila, *J. Alloys Compd.*, 1995, 225, 480-485
- 6 E. F. G. Dickson, A. Pollak, E. P. Diamandis, *Pharmac. Ther.*, 1995, 66, 207-235
- 7 E. P. Diamandis, *Clin. Biochem.*, 1988, 21, 139-150;
- 8 G. Mathis, *Clin. Chem.*, 1995, 41, 1391-1397;
- 9 G. Mathis, *J. Clin. Ligand Assay*, 1997, 20, 141-147
- 10 J. Yuan, G. Wang, K. Majima, K. Matsumoto, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1869-1876;
- 11 S. Sueda, J. Yuan, K. Matsumoto, *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 827-831;
- 12 K. Matsumoto, J. Yuan, G. Wang, H. Kimura, *Anal. Biochem.*, 1999, 276, 81-87;
- 13 J. Yuan, K. Matsumoto, H. Kimura, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 596-601;
- 14 J. Yuan, G. Wang, K. Matsumoto, H. Kimura, *Anal. Biochem.*, 1997, 254, 283-287

发明的公开

本发明鉴于以上所述的现状，目的是提供一种新型标识试剂，其特征包括具有与被标识物质（例如来自生物体的物质、生理活性物质等）结合的基团，容易与稀土类离子形成络合物，并且该络合物在水溶液中足够稳定，与缓冲剂的种类无关，具有足够的荧光强度和长的荧光寿命。本发明还提供该标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物、包含该络合物的荧光标识剂，以及采用该荧光标识剂的荧光测定方法等。

附图的简要说明

图 1 是表示本发明 ATTTA-Eu³⁺ 溶液的荧光光谱的图。其中 [ATTTA-Eu³⁺]=1.0 × 10⁻⁶M, 在 pH 为 9.1 的 0.05M 的硼酸缓冲液中。

图 2 是表示本发明 ATTTA-Eu³⁺ 稀释溶液的时间分辨荧光测定的结果的图。

图 3 是表示通过本发明时间分辨荧光免疫测定所得的检测量曲线的图。

图 4 是表示本发明的具有活性取代基的 ATBTA-Eu³⁺ 络合物的荧光光谱的图。其中 [ATBTA-Eu³⁺]=1.5 × 10⁻⁶M, 在 pH 为 9.1 的 0.05M 的硼酸缓冲液中。

图 5 是表示采用 SA (DTBTA-Eu³⁺)₂₆(□) 以及 SA (BSA)_{0.9}(DTBTA-Eu³⁺)₄₂(○) 的时间分辨荧光免疫测定所得的人 PSA 测定的检测量曲线的图。

图 6 是表示采用 DTBTA-Eu³⁺ 标识的小鼠抗人 PSA 单克隆抗体的时间分辨荧光免疫测定所得的人 PSA 测定的检测量曲线的图。

实施发明的最佳形式

本发明涉及一种标识试剂, 其由具有 2, 2': 6', 2'' - 三吡啶骨架或者 2, 6 - 二吡啶吡啶骨架, 与被标识物质结合的基团, 以及与稀土类离子形成络合物用的结合基团的化合物形成, 更详细地说, 涉及荧光标识试剂。

此外, 本发明还涉及由上述标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物、包含该络合物的荧光标识剂, 以及以采用该络合物作为标识剂为特征的荧光标识方法等。

本发明进一步涉及采用上述荧光标识剂标识的来自生物体的物质或生理活性物质。

本发明进一步涉及以采用上述络合物作为标识剂为特征的荧光测定方法, 包含该络合物作为荧光标识剂的荧光测定方法用试剂, 以及包含该络合物作为荧光标识剂的试剂盒。

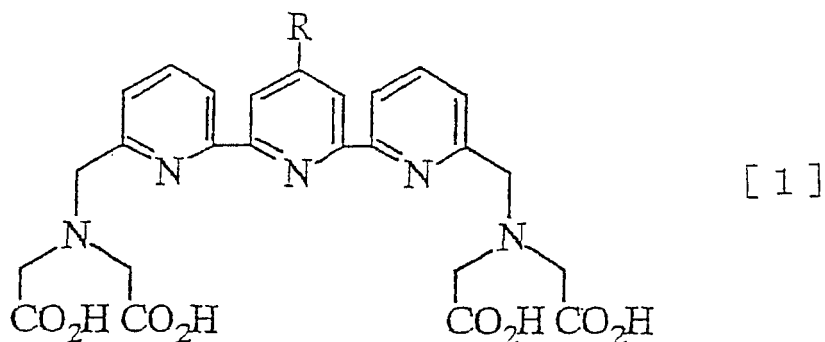
此外, 本发明还涉及以采用上述标识试剂和稀土类金属离子为特征的荧光标识方法。

此外, 本发明还涉及采用上述标识试剂和稀土类金属离子进行了荧光

标识的来自生物体的物质或生理活性物质。

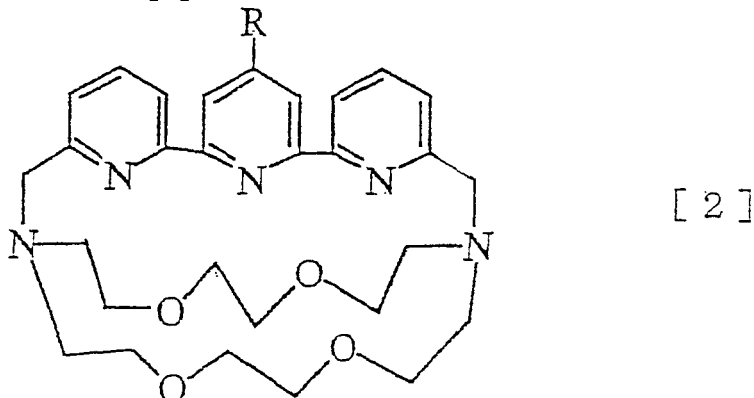
另外，本发明还涉及以采用上述标识试剂和稀土类金属离子为特征的荧光测定方法，包含上述标识试剂和稀土类金属离子的荧光测定方法用试剂，以及包含上述标识试剂和稀土类金属离子的试剂盒。

此外，本发明涉及通式[1]所示的化合物或其盐。



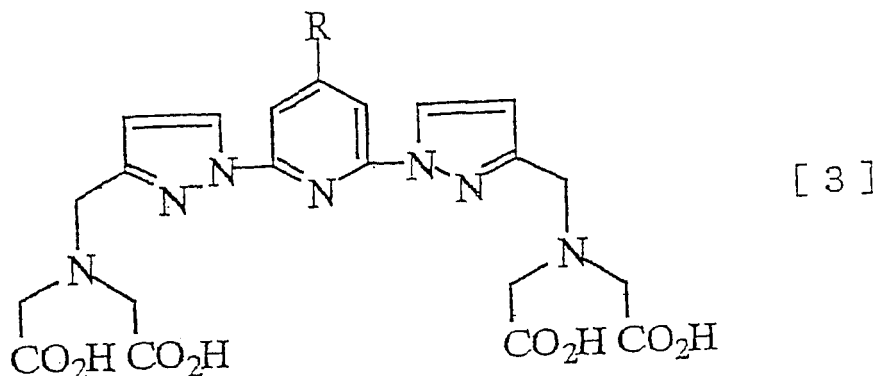
(式中，R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

此外，本发明涉及通式[2]所示的化合物或其盐。



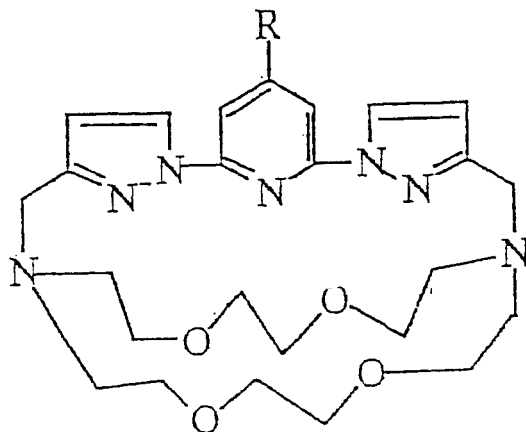
(式中，R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

此外，本发明涉及通式[3]所示的化合物或其盐。



(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

此外, 本发明涉及通式[4]所示的化合物或其盐。



[4]

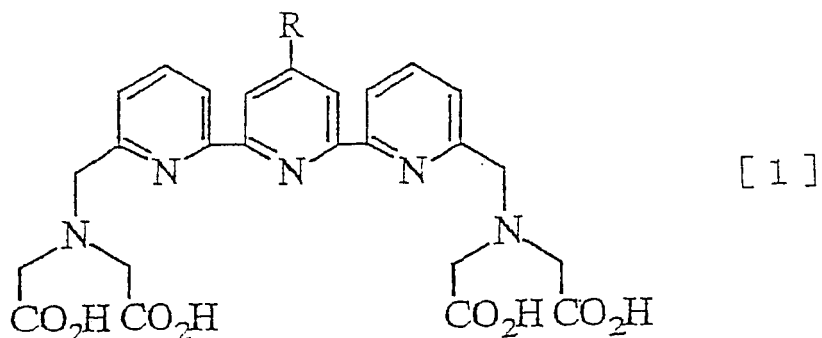
(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

即, 本发明者们为解决上述课题进行了专心研究, 结果发现有机配体分子中具有 2, 2': 6', 2'' - 三吡啶骨架或者 2, 6 - 二吡啶吡啶骨架, 并且一并具有多个羧酸基或冠醚基的化合物容易溶解于水, 并且与稀土类离子可容易地形成稳定的荧光络合物, 此外, 通过向该相同的有机配体分子中导入可与被标识的物质(被标识物质)容易结合的活性取代基, 可在温和的条件下标识蛋白质等的生物体分子, 由此完成了本发明。

可与被标识的物质(被标识物质)结合的活性取代基是这样的基团, 其与这些被标识物质具有的特定取代基反应, 可形成共价键。

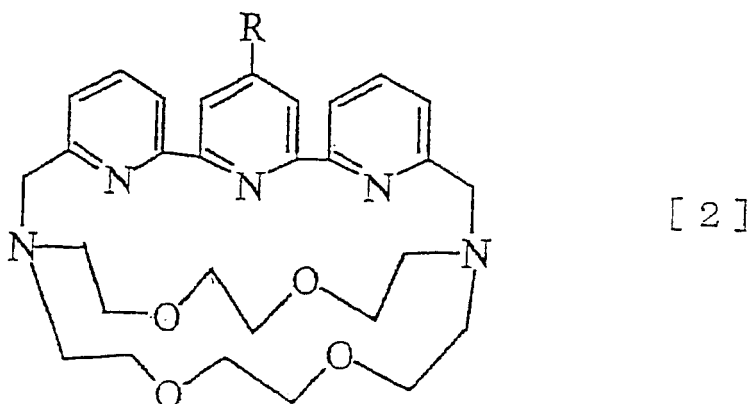
此外, 由于本发明的新型标识试剂容易溶解于水, 因此即使被标识物质为小分子, 在标识后也具有足够的水溶性。

作为本发明中具有 2, 2': 6', 2'' - 三吡啶骨架或者 2, 6 - 二吡啶吡啶骨架, 与被标识物质结合的基团, 以及与稀土类离子形成络合物用的结合基团的化合物的具体实例, 例如为以下通式[1]所示的化合物或其盐,



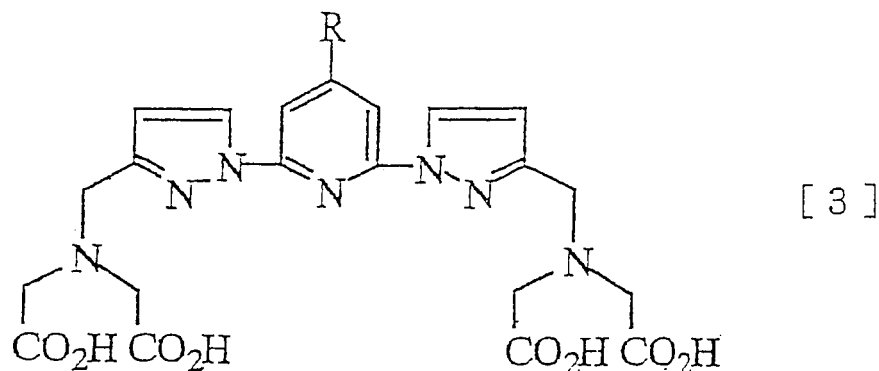
(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

以下通式[2]所示的化合物或其盐,



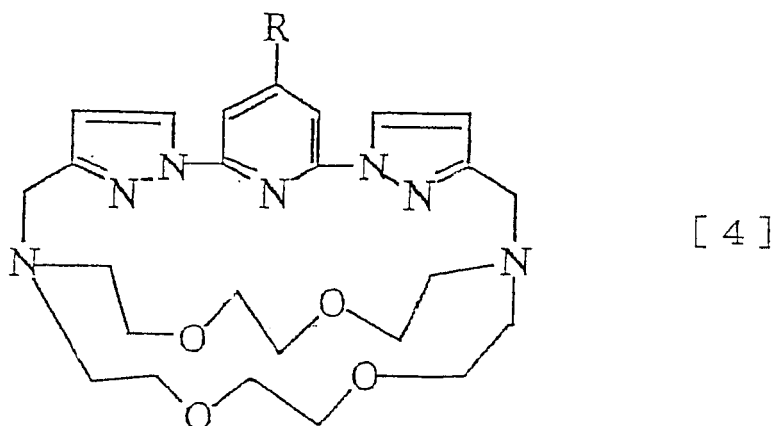
(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

以下通式[3]所示的化合物或其盐,



(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

以下通式[4]所示的化合物或其盐,



(式中, R 表示芳基、具有活性取代基的芳基、杂环基或具有活性取代基的杂环基)。

上述通式 (1) - (4) 所示的化合物均为新化合物。

在上述通式 (1) - (4) 中, 作为 R 所表示的芳基、具有活性取代基的芳基中的芳基, 可例举出例如, 碳原子数为 6 - 30, 优选为 6 - 20, 更优选为 6 - 14 的单环、多环或稠合环式的芳香族烃基, 更具体地可例举出例如, 苯基、甲苯基、二甲苯基、萘基、甲基萘基、蒽基、菲基、2-联苯基、3-联苯基、4-联苯基等。

另外, 作为杂环基或具有活性取代基的杂环基中的杂环基, 可列举其环中至少有一个或其以上氮原子、氧原子或硫原子、1 个环的大小为 5 - 20 元, 优选为 5 - 10 元, 更优选为 5 - 7 元, 可与环烷基、环烯基或芳基等的碳环式基缩合的饱和或不饱和单环、多环或稠合环式基团, 更具体地可例举出例如, 吡啶基、噻吩基、苯基噻吩基、噻唑基、咪唑基、吡喃基、哌啶基、哌嗪基、吡咯基、吗啉基、咪唑基、吡啶基、喹啉基、嘧啶基等。

作为这些芳基和杂环基的活性取代基, 为可与被标识的物质 (被标识物质) 结合的活性取代基, 也可以为与这些被标识物质具有的特定取代基反应, 可形成共价键的基团, 作为优选的基团可例举出例如氨基、异硫代氰酸酯基、卤代乙酰基氨基、胍基、(4, 6-二卤代-1, 3, 5-三氮烯-2-基) 氨基、羧基等。

在此, 作为卤代乙酰基氨基, (4, 6-二卤代-1, 3, 5-三氮烯-2-基) 氨基中的卤代基, 可举出 -Cl、-Br、-I 等。

作为上述通式(1)-(4)中优选的R基,可举出苯基,4-氨基苯基、2-吡啶基、6-氨基-2-吡啶基、2-噻吩基、5-氨基-2-噻吩基、4-联苯基、4'-氨基-4-联苯基等。

作为上述通式(1)-(4)中所示化合物的盐,对于羧基等酸性基团可举出钠、钾等的碱金属的盐等,对于氨基等的碱性基可例示盐酸、硫酸等酸的盐。

对于由如上所述的本发明化合物制成的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物,在其结构上没有限制。作为稀土类离子的种类,通过考虑所形成的络合物的荧光强度、荧光波长、荧光寿命等可容易进行选择。优选为与三价镧系离子的络合物,特别优选与三价镧离子、三价铈离子、三价钇离子和三价镉离子的络合物。

由稀土类金属离子和本发明的标识试剂络合形成的络合物为荧光络合物,因此,本发明的络合物可作为荧光标识剂使用。

作为本发明的荧光标识剂,其包含本发明的络合物,但是本发明的荧光标识剂,包含作为络合物单独分离的,包含该络合物的溶液,以及包含稀土类金属离子和本发明标识试剂形成的溶液中的任何一种。

本发明的荧光标识方法,其采用由本发明的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物作为标识剂,换言之,其通过使用上述本发明的荧光标识剂,或者采用上述本发明的标识试剂和稀土类金属离子,对各种被标识物质进行荧光标识来实施。

在采用标识试剂和稀土类金属离子的情况下,可采用下述任何一种方法:(1)首先使被标识物质与标识试剂反应,此后使适当的稀土类金属离子作用,形成络合物,由此进行荧光标识的方法,(2)使标识试剂、稀土类金属离子和被标识物质同时反应,将络合物的形成和荧光标识同时实施的方法。

对由本发明标识试剂或荧光标识试剂标识的被标识物质没有特别限制,其可广泛地适用于来自生物体的物质,生理活性物质以及其它的化学物质等。此外,对被标识物质的分子尺寸,存在形态(溶液或固相)、为

单独的物质还是组合物等没有特别限制。作为采用本发明的荧光标识剂标识的被标识物质的条件，只要该被标识物质的一部分上具有至少一个可与本发明荧光标识剂共价结合的反应基的话即可。或者可导入这种基团的话即可。

由此，作为可由本发明的荧光标识剂标识的来自生物体的物质、生理活性物质，可例举出例如，酶、蛋白质、肽（寡肽、多肽）、糖、糖蛋白质、激素、脂质、核酸、核酸衍生物、核酸探针、寡核苷酸、细胞、脂肪类化合物、氨基酸、药物（包含抗生物物质）等。

此外，作为蛋白质的具体实例，可举出抗体及其衍生物，抗原及其衍生物、抗生物素蛋白（包含链霉抗生物素蛋白）、血清白蛋白、各种半抗原、激素、蛋白质 A、蛋白质 G 等。

作为其它的化学物质，可例举出农药、日常化学品、化学试剂、工业化学品等。

本发明的荧光测定法的特征为：通过采用以上本发明的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物作为荧光标识剂进行测定，或者通过采用以上本发明的标识试剂和稀土类金属离子，对各种被标识物质进行荧光标识来进行测定。

作为荧光测定法的代表例，可例举出时间分辨荧光测定法。

作为时间分辨荧光测定法的应用实例，可例举出时间分辨荧光免疫测定法、DNA 杂交测定法、色谱法、荧光显微镜法等。

本发明的荧光测定法用试剂，为上述本发明的荧光测定法中所用的试剂，其特征为包含由上述本发明的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物作为荧光标识剂，或者包含上述本发明的标识试剂和稀土类金属离子。

本发明的荧光测定法用试剂可在测定来自生物体的物质、生理活性物质和其它化学物质等时使用，特别是在测定来自生物体的物质、生理活性物质时更加有效。

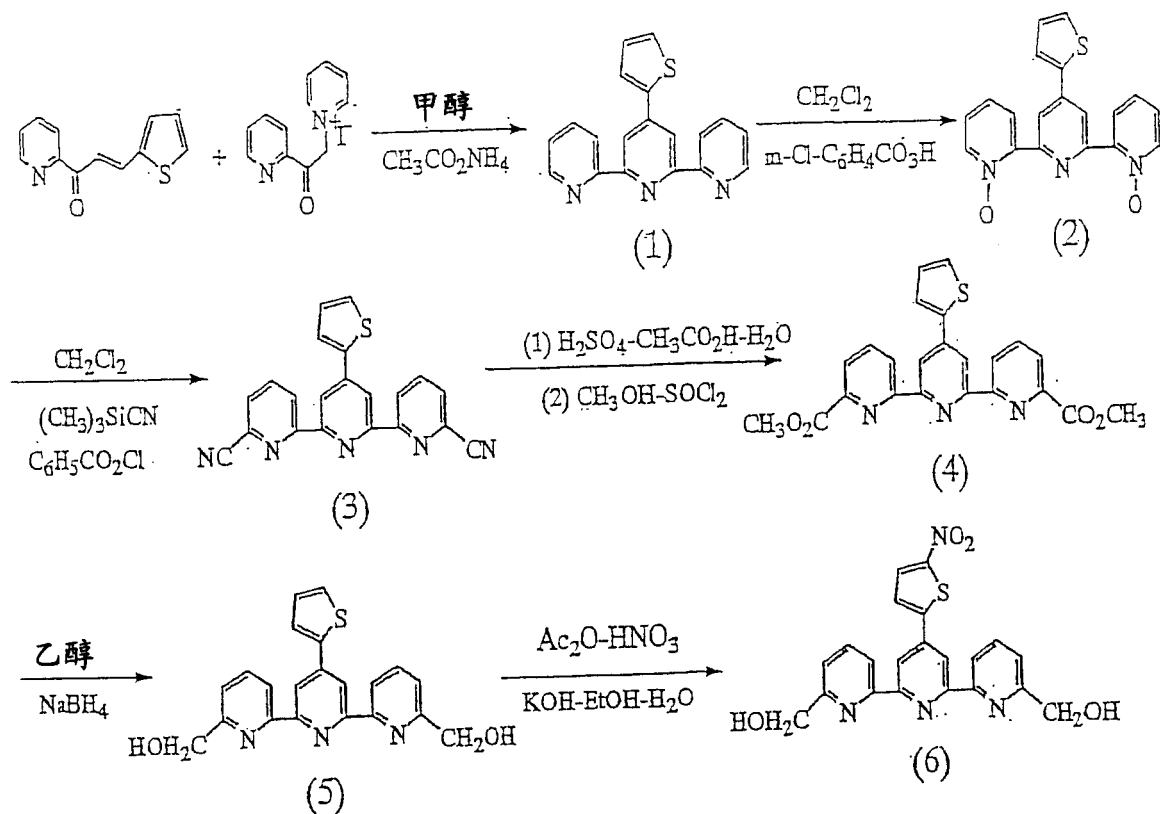
作为来自生物体的物质、生理活性物质的具体例，如上文所记载。

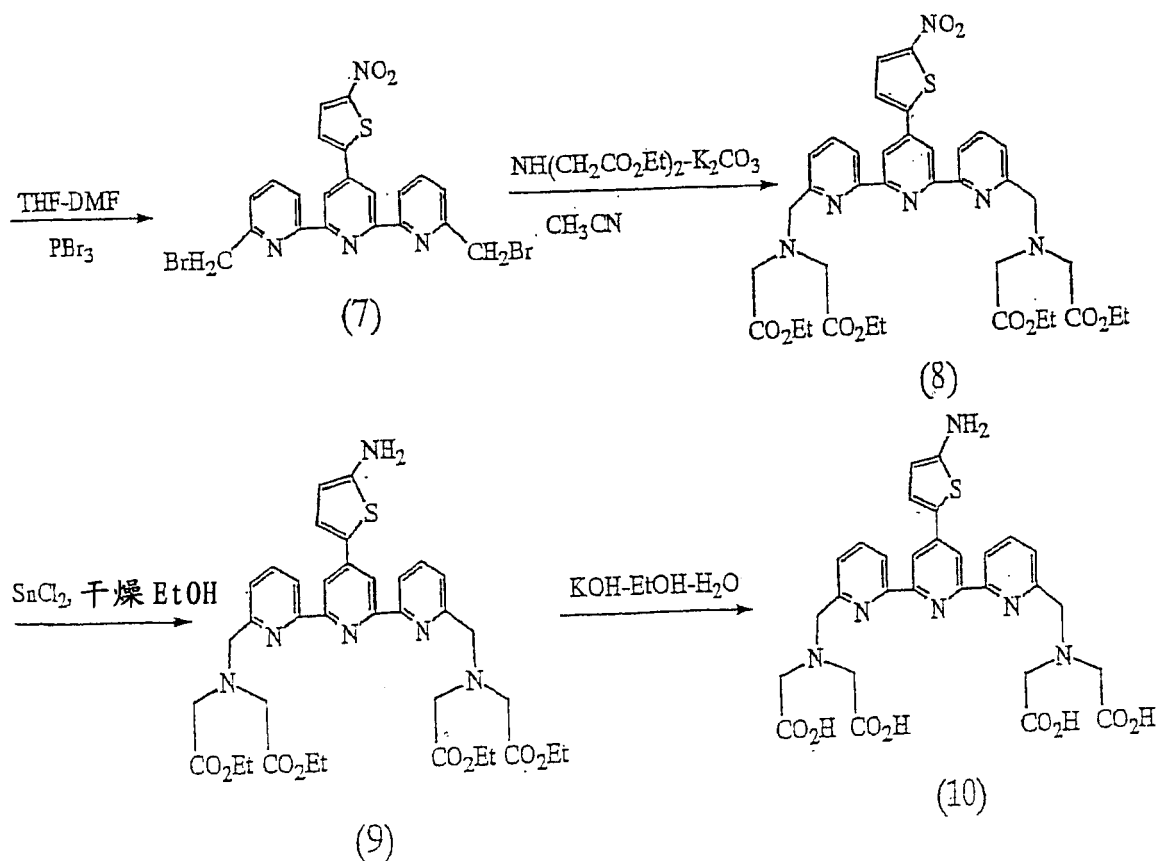
此外，作为本发明的试剂盒，为上述本发明的荧光测定法中所用的试

剂盒，其特征为包含由上述本发明的标识试剂和稀土类金属离子形成的络合物作为荧光标识剂，或者包含上述本发明的标识试剂和稀土类金属离子的试剂盒。

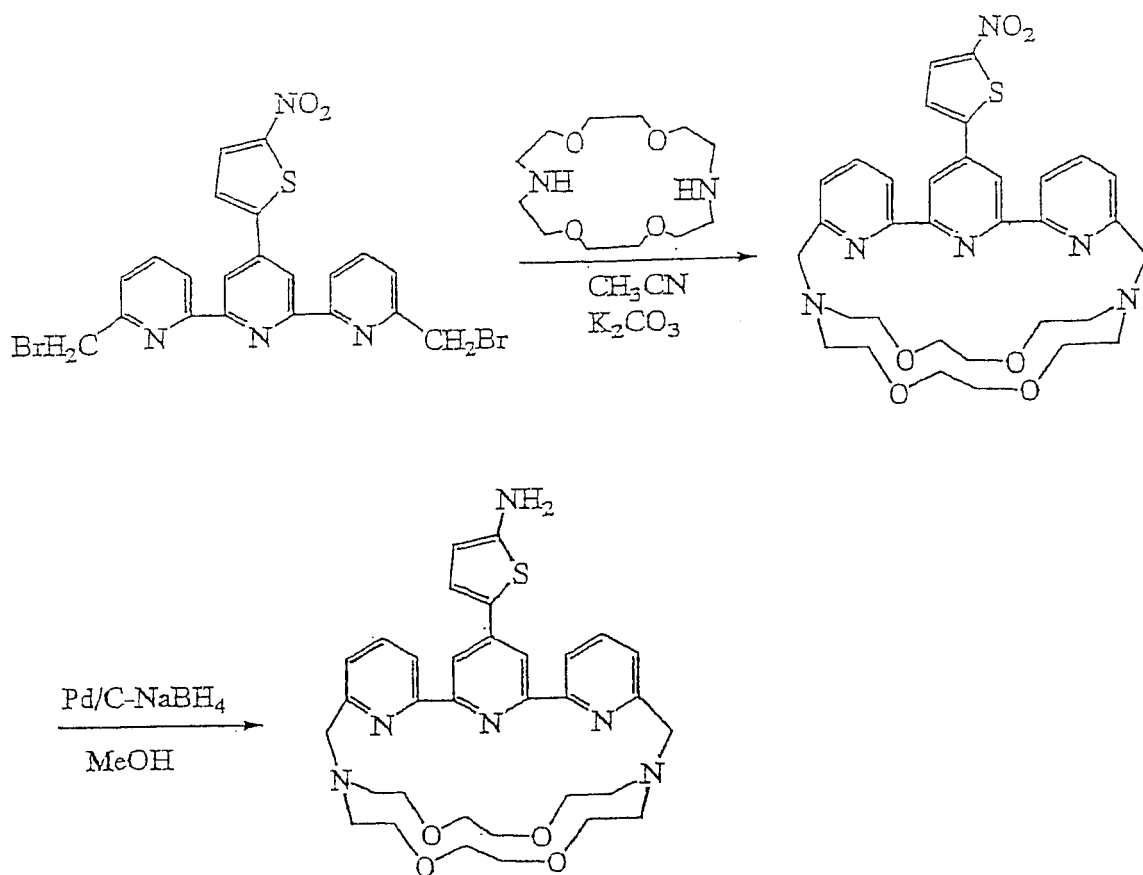
本发明的标识试剂的合成方法，对起始原料没有特别限制，任何标识试剂均可通过适宜地组合通常的有机合成方法合成得到。产物结构的确定可采用通常的有机化合物结构分析法，例如¹H NMR、有机元素分析法等实施。

以下以R为5-氨基-2-噻吩基的情形为例，示出了本发明的通式[1]所示的标识试剂的合成方法的反应流程。

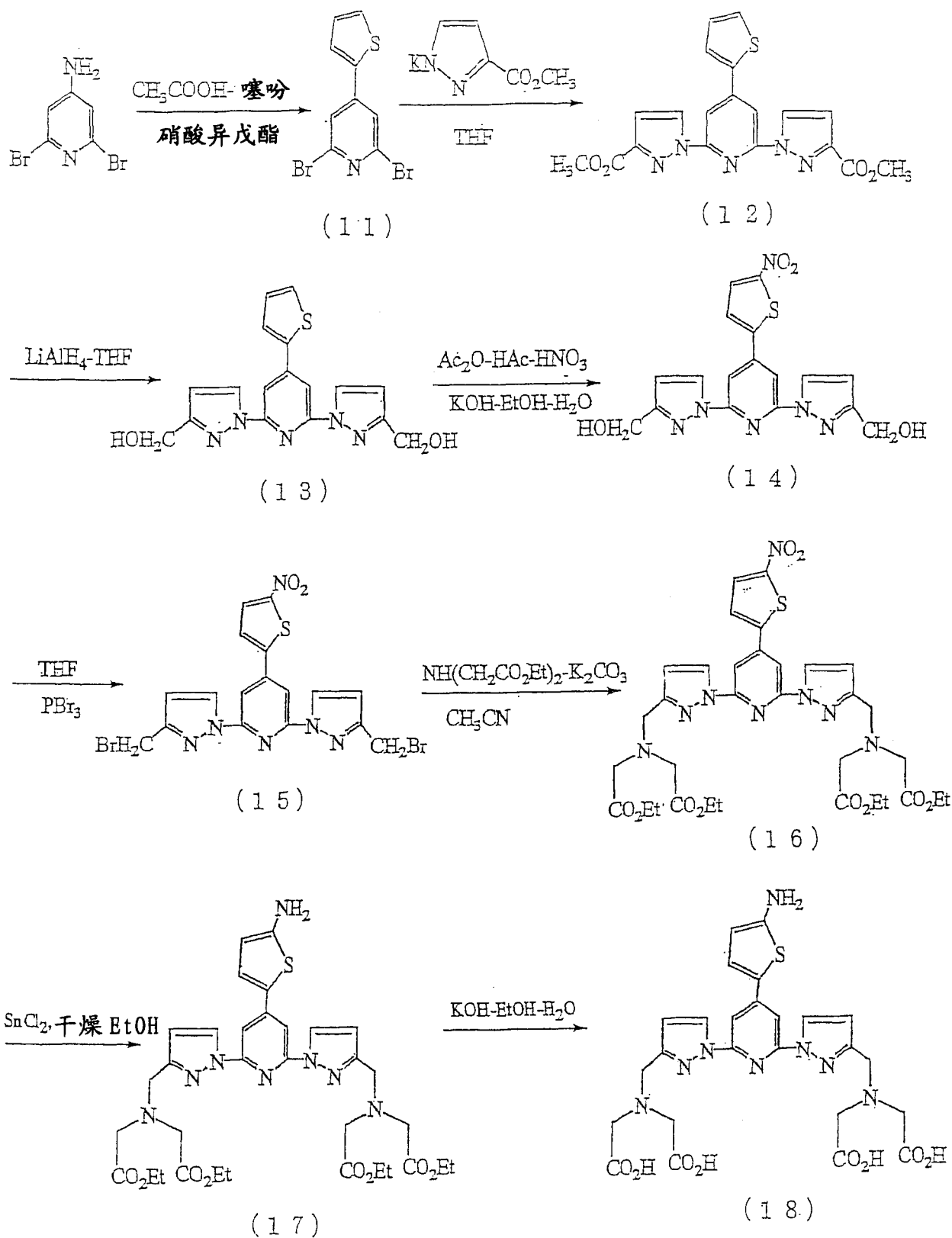




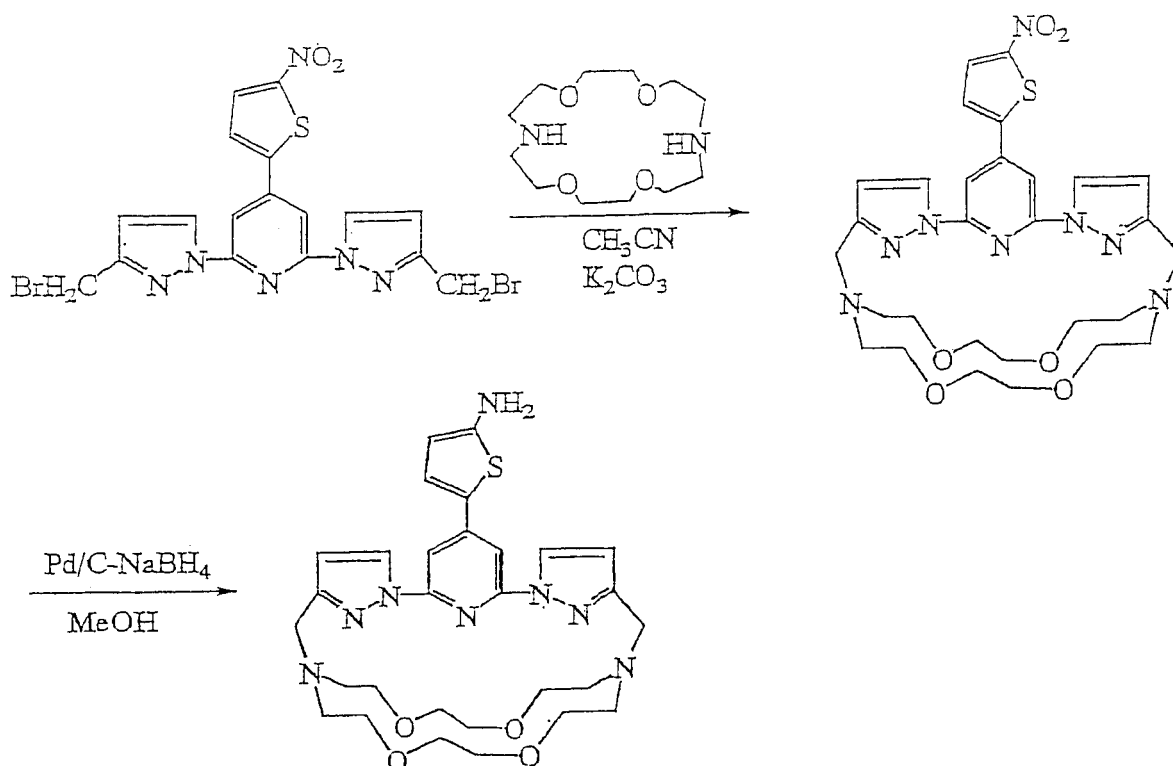
以下以 R 为 5-氨基-2-噻吩基的情形为例, 示出了本发明的通式[2]所示的标识试剂的合成方法的反应流程。



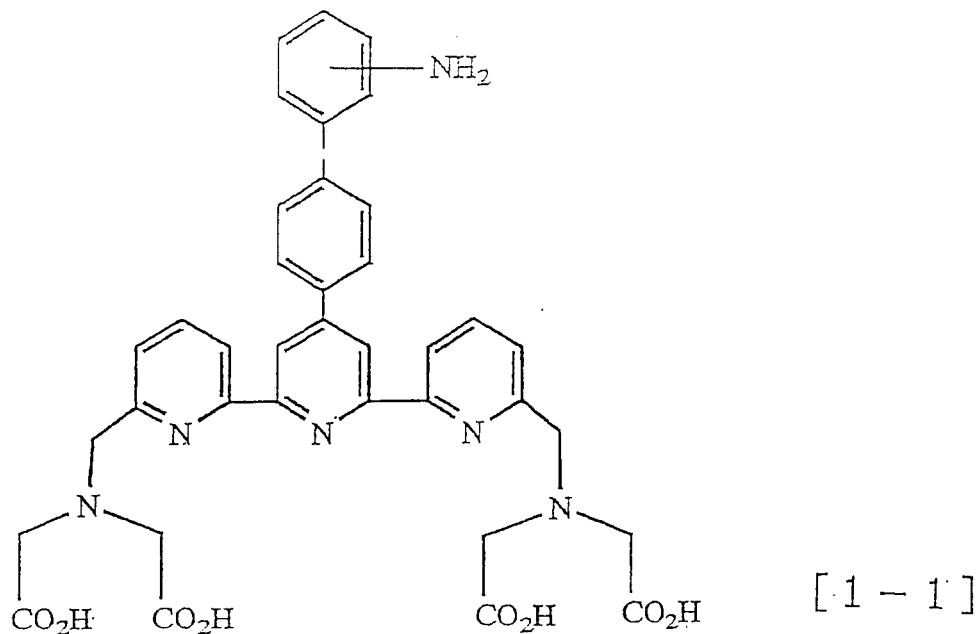
以下以 R 为 5-氨基-2-噻吩基的情形为例, 示出了本发明的通式[3]所示的标识试剂的合成方法的反应流程。



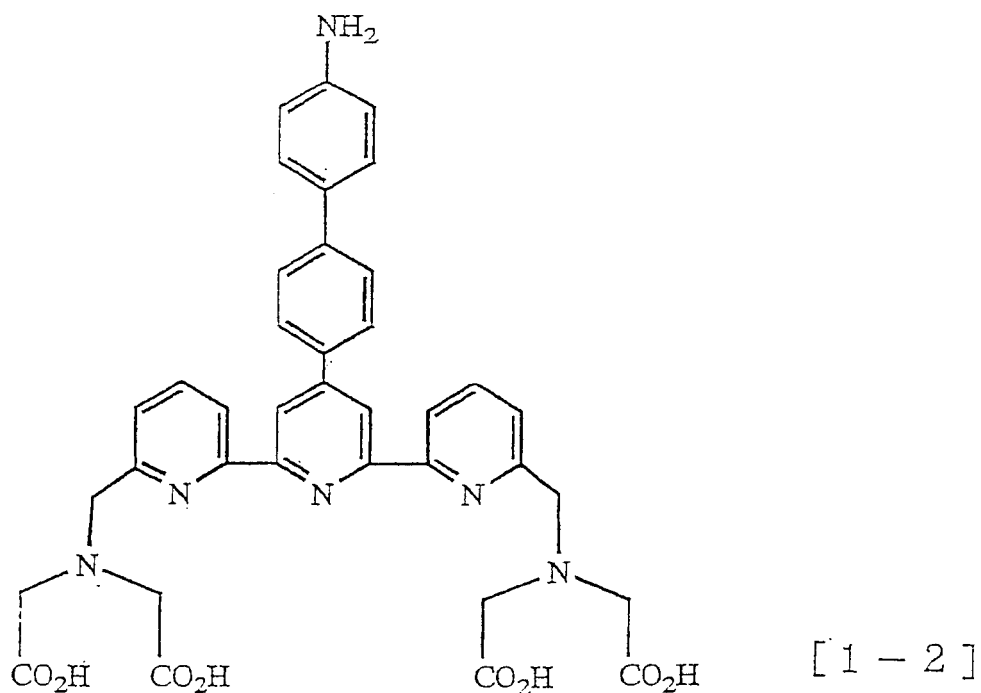
以下以 R 为 5-氨基-2-噻吩基的情形为例, 示出了本发明的通式[4]所示的标识试剂的合成方法的反应流程。



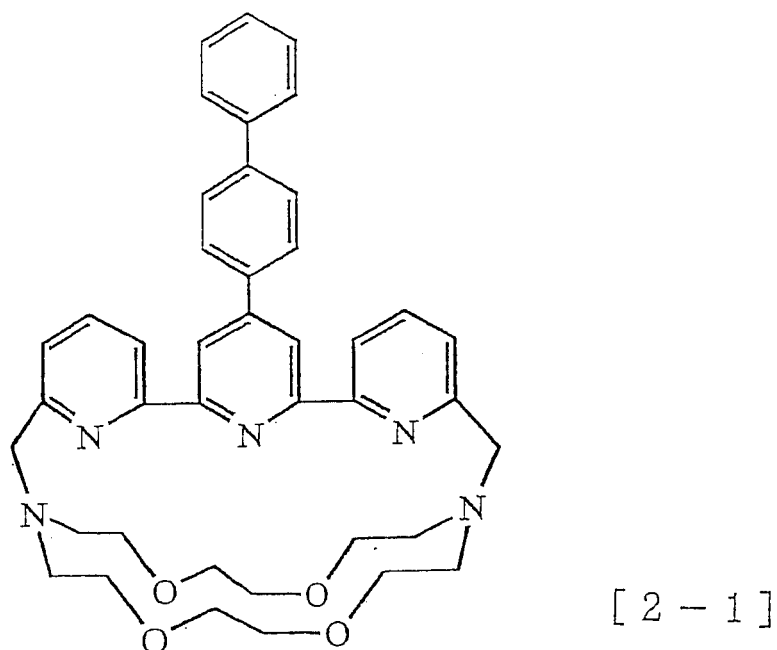
在本发明通式(1) - (4)所示的化合物或其盐中, 优选的化合物的实例除了上述 R 基为 5-氨基-2-噻吩基的化合物以外, 还可举出 R 基为联苯基的化合物以及 R 基为 4'-氨基-4-联苯基的化合物。作为 R 基为联苯基的化合物以及 R 基为 4'-氨基-4-联苯基的化合物的更具体实例, 可举出以下通式[1-1]所示的化合物,



作为更具体的实例可举出以下通式[1-2]所示的化合物,



以及以下通式[2-1]所示的化合物等。



此外, 本发明还将日本专利申请 2002-063961 的说明书以及日本专利申请 2002-271924 的说明书中记载的内容全部引入本说明书中。

实施例

以下根据实施例对本发明进行更具体的说明，但是本发明不受这些实施例的限制。

实施例 1

N,N,N',N'-[(4'-(5'''-氨基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基) 二(亚甲基氮川)]四(乙酸) (简称为 ATTTA) 的合成

(1) 4'-(2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶(化合物(1))的合成

将 N-[2-(吡啶-2'-基)2-氧代乙基]吡啶鎓碘化物(16.3g, 50mmol)、(E)-3-(2''-噻吩基)-1-(吡啶-2'-基)-2-丙烯酮(10.76g, 50mmol)和乙酸铵(23.1g)加入到 500ml 干燥的甲醇中，在搅拌下回流 24 小时。将反应液冷却，并将沉淀过滤，在冷甲醇中充分洗净后，从乙腈中重结晶，得到化合物(1)。真空干燥后的收率为 43.8%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.74 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 8.69 (s, 2H), 8.64 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 7.87 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 7.78 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.44 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 7.38-7.32 (m, 1H)。

(2) 4'-(2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-1,1''-二氧化物(化合物(2))的合成

将化合物 1(12.6g, 40mmol)溶解在 500ml 的 CH_2Cl_2 中后，加入 40g 的 3-氯代过氧化苯甲酸，在室温下搅拌 20 小时。将反应液用 $4 \times 200\text{ml}$ 的 10% 的 Na_2CO_3 水溶液洗净，用 Na_2SO_4 干燥有机层后，减压蒸馏除去溶剂。将生成物溶解在 300ml 的甲醇中，滤去微量的不溶物之后，减压蒸馏除去溶剂。将生成物用乙腈充分清洗，通过真空干燥获得化合物(2)。产率为 61.4%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 9.23 (s, 2H), 8.35 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 2H), 8.23 (d,

$J=7.9\text{Hz}$, 2H), 7.70 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.45 – 7.28 (m, 5H), 7.16-7.13 (m, 1H)

(3) 4'-(2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二腈 (化合物 (3)) 的合成

向 300ml 的 CH_2Cl_2 中加入化合物 (2) (8.69g, 25mmol) 和 $(\text{CH}_3)_3\text{SiCN}$ (24.8g, 250mmol), 在室温下搅拌 20 分钟后, 花费大约 20 分钟慢慢滴加 100mmol 的氯化苯甲酰。在室温下将反应液搅拌 20 分钟后, 减压下馏去溶剂, 直至剩一半的量。向剩余的溶液中加入 600ml 10% 的 K_2CO_3 的水溶液, 在室温下搅拌 1 小时后, 将沉淀过滤, 用水充分洗净, 此后用冷的 CH_2Cl_2 洗净, 之后真空干燥得到化合物 (3)。产率为 98.5%。由 ^1H NMR 确认生成物为目标化合物。

^1H NMR (DMSO-d_6): δ 8.95 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 8.62 (s, 2H), 8.32-8.26(m, 2H), 8.19 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 8.07 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.86 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 7.28-7.31 (m, 1H)

(4) 4'-(2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羧酸二甲基酯 (化合物 (4)) 的合成

向 H_2SO_4 45ml/ CH_3COOH 45ml/ H_2O 12ml 的混合溶剂中加入 4.40g 化合物 (3), 在 75 – 80 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 48 小时。向 400g 冰中加入反应液, 搅拌后, 将沉淀过滤, 用水和乙醇充分洗净后, 真空干燥得到 4.85g 水解产物。

向已用冰水冷却了的 400ml 干燥甲醇中加入 8g SOCl_2 , 搅拌 15 分钟后, 加入如上所得的 4.85g 水解产物, 在搅拌下回流 20 小时。减压蒸馏除去溶剂, 将生成物溶解在 350ml 的 CHCl_3 中, 采用 15% 的 NaHCO_3 水溶液将有机层充分洗净后, 用 Na_2SO_4 干燥。减压蒸馏除去溶剂, 将生成物在硅胶色谱柱 (展开溶剂: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH} = 99: 1$ w/w) 上进行纯化。从甲苯中将该生成物进行重结晶, 得到化合物 (4)。产率为 48.1%。

元素分析结果 ($\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$):

计算值(%)，C=64.03, H=3.97, N=9.74

实测值(%)，C=63.76, H=3.83, N=9.52

进一步由¹H NMR 确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.16 (d, J=7.8Hz, 2H), 8.78 (s, 2H), 8.20 (d, J=7.6Hz, 2H), 8.03 (t, J=7.8Hz, 2H), 7.82 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.49 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.22-7.19 (m, 1H), 4.08 (s, 6H)。

(5) 4'-(2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羟基甲基(化合物(5))的合成

向 200ml 干燥的乙醇中加入化合物(4) (2.89g, 6.7mmol) 和 1.05g NaBH₄, 在室温下搅拌 3 小时后, 回流 1 小时, 减压蒸馏除去溶剂, 将生成物加入到 100ml 的饱和 NaHCO₃ 水溶液中, 搅拌下加热直至沸腾。冷却后, 将沉淀过滤, 用水充分洗净后, 进行真空干燥。将生成物溶解在 200ml 的 THF 中, 过滤除去微量的不溶物后, 减压蒸馏除去溶剂。将生成物用乙腈充分洗净, 真空干燥获得化合物(5)。产率为 72.2%。由¹H NMR 确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8.63 (s, 2H), 8.50 (d, J=7.3Hz, 2H), 8.03 (t, J=7.3Hz, 2H), 7.93 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.82 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.61 (d, J=7.1Hz, 2H), 7.28-7.31 (m, 1H), 4.74 (s, 4H)。

(6) 4'-(5'''-硝基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羟基甲基(化合物(6))的合成

将化合物(5) (1.50g, 4mmol) 加入到 15ml 的乙酸酐中, 在室温下搅拌 1 小时后, 在 60℃ 下进一步搅拌 1 小时。将反应液冷却至室温, 加入 2g 发烟硝酸和 20ml 乙酸的混和溶液后, 在室温下搅拌 24 小时。向反应液中加入 200ml 的水, 搅拌 1 晚后, 用 4 × 50ml 的 CHCl₃ 进行萃取。对 CHCl₃ 溶液进行水洗, 用 Na₂SO₄ 干燥后, 减压蒸馏除去溶剂。将生成物溶解在 100ml 乙醇中, 加入 4g KOH 和 5ml 水, 在室温下搅拌 24 小时。减压蒸馏

除去溶剂。将生成物用水洗后，真空干燥获得化合物(6)。产率为75.1%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.57 (s, 2H), 8.40 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 8.15 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.96(t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 7.89 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 7.57 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 5.50 (sb, 2H), 4.72 (s, 4H)。

(7) 4'-(5'''-硝基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二溴代甲基(化合物(7))的合成

将化合物(6) (1.26g, 3mmol) 加入到 120ml THF-15ml DMF 的混和溶剂中，使其溶解，加入 2.40g 的 PBr_3 ，在搅拌下回流 5 小时。减压蒸馏除去溶剂后，向生成物中加入 200ml 的 CHCl_3 ，用 $4 \times 80\text{ml}$ 10% 的 Na_2CO_3 水溶液对 CHCl_3 溶液进行清洗。有机层用 Na_2SO_4 干燥，减压蒸馏除去溶剂后，向所得的残渣用己烷充分洗净，真空干燥得到化合物(7)。产率为 70.1%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.55 (s, 2H), 8.46 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 8.16 (d, $J=4.4\text{Hz}$, 1H), 7.97(t, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 7.88 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 7.65 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 4.80 (s, 4H)。

(8) N,N,N',N'-[4'-(5'''-硝基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基]二(亚甲基氮川)四乙酸四乙基酯(化合物(8))的合成

将化合物(7) (1.09g, 2mmol) 溶解在 150ml 的 CH_3CN 中，并加入 4.1mmol 的亚胺二乙酸二乙酯和 20mmol 的 K_2CO_3 ，搅拌下回流 24 小时。过滤除去不溶物，减压蒸馏除去溶剂后，向生成物中加入 200ml 的 CHCl_3 ，用 $4 \times 100\text{ml}$ 的饱和 Na_2SO_4 水溶液洗净 CHCl_3 溶液。用 Na_2SO_4 对有机层进行干燥，减压蒸馏除去溶剂，获得油状产物，用硅胶色谱柱(展开溶剂： $\text{CH}_3\text{COOEt}-\text{CH}_3\text{OH}-\text{THF}=90:6:4$ w/w/w) 进行纯化，获得化合物(8)。产率为 50.1%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 8.70 (s, 2H), 8.51 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 2H), 7.99

(d, J=4.4Hz, 1H), 7.87(t, J=7.6Hz, 2H), 7.74 (d, J=4.4Hz, 1H), 7.66 (d, J=7.8Hz, 2H), 4.19 (q, J=7.2Hz, 8H), 4.08(s, 4H), 3.71 (s, 8H), 1.26(t, J=7.2Hz, 12H)

(9) N,N,N',N'-[4'-(5'''-氨基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基]二(亚甲基氮川)]四乙酸四乙基酯(化合物(9))的合成

将化合物(8) (0.76g, 1mmol)溶解在70ml的EtOH中,加入SnCl₂·2H₂O(1.32g, 6mmol)后,在70-80℃下搅拌1小时。冷却至室温后,注入已经用冰水冷却了的100mlH₂O-5gDTPA的溶液中,搅拌后,向该溶液中加入20ml的饱和NaHCO₃水溶液。室温下搅拌30分钟后,用3×100ml的CHCl₃萃取水溶液,用Na₂SO₄对有机层进行干燥。减压蒸馏除去溶剂,对残渣进行真空干燥,获得化合物(9)。产率为93.5%。由¹H NMR确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.44 (s, 2H), 8.41 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.78 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.56 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.38 (d, J=4.2Hz, 1H), 6.17(d, J=4.2Hz, 1H), 4.19 (q, J=7.2Hz, 8H), 4.08(s, 4H), 3.74(s, 8H), 1.26(t, J=7.2Hz, 12H)。

(10) N,N,N',N'-[4'-(5'''-氨基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基]二(亚甲基氮川)]四乙酸四乙基酯[ATTTA, (化合物(10))]的合成

将化合物(9) (586mg, 0.8mmol)溶解在40mlEtOH-5mlH₂O-1.2gKOH的溶液中,在室温下搅拌24小时后,减压蒸馏除去溶剂。将残渣溶解在60ml的水中,在搅拌下慢慢滴加1%的CF₃COOH水溶液,将溶液的pH值调节至约1。在室温下搅拌3小时后,将沉淀过滤,用0.5%的CF₃COOH水溶液充分洗净后,真空干燥获得化合物(10)。产率为90.0%。

元素分析结果(C₂₉H₂₈N₆O₈S):

计算值(%), C=56.13, H=4.55, N=13.54

实测值(%)，C=55.94，H=4.38，N=13.62

进一步由¹H NMR 确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (DMSO-d₃): δ 8.10 (s, 2H), 8.04 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.45 (t, J=7.2Hz, 2H), 7.31 (d, J=7.2Hz, 2H), 7.25 (d, J=4.2Hz, 1H), 6.14(d, J=4.2Hz, 1H), 4.00 (s, 4H), 3.51(s, 8H)。

实施例 2 [(4'-(5'''-氨基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)二(亚甲基氮川)]-N:N',N:N'-二(3,6-二氧杂三亚乙基)(简称为 ATTBB)的合成

(1) [4'-(5'''-硝基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基]二(亚甲基氮川)]-N:N',N:N'-二(3,6-二氧杂三亚乙基)的合成

将 4'-(5'''-氨基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二溴代甲基(1.09g, 2mmol)溶解在 150ml 的 CH₃CN 中后,加入 2.1mmol 的 4,13-二氮杂-18-冠 6-醚和 20mmol 的 K₂CO₃, 搅拌下回流 24 小时。将不溶物过滤除去,减压蒸馏除去溶剂后,用硅胶色谱柱(展开溶剂:CH₂Cl₂-CH₃OH=9:1 w/w)纯化生成物。产率为 65.3%。通过 FAB-MS 确认生成物为目标化合物和 KBr 的络合物(1:1, M.W.=765.727)。

FAB-MS:测定值: 766。

(2) [4'-(5'''-氨基-2'''-噻吩基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基]二(亚甲基氮川)]-N:N',N:N'-二(3,6-二氧杂三亚乙基)(简称为 ATTBB)的合成

将上述(1)所得的 KBr 络合物(765.7mg, 1mmol)溶解在 50ml 干燥的甲醇中,加入 150mg 的 10% 的 Pd/C 催化剂后,加入 40mg 的 NaBH₄。在室温下搅拌 2 小时,将不溶物过滤除去后,减压蒸馏除去溶剂,将生成物溶解在 30ml 的水中。用 4×50ml 的 CHCl₃ 萃取水溶液,用 Na₂SO₄ 干燥后,减压蒸馏除去溶剂,真空干燥。产率为 40.3%。通过 FAB-MS 确认生成物为目标化合物和 KBr 的络合物(1:1, M.W.=735.744)。

FAB-MS:测定值: 736

实施例3 N,N,N',N'-[2,6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5''-氨基-2''-噻吩基)吡啶]四乙酸(简称为BAPTA)的合成

(1) 2,6-二溴代-4-(2'-噻吩基)吡啶(化合物11)的合成
在250ml的乙酸中溶解4-氨基-2,6-二溴代吡啶(3.25g,12.9mmol)和12.9g噻吩,搅拌下加入1.93g硝酸异戊酯,在室温下搅拌24小时后,进一步在大约45℃下搅拌3小时。减压蒸馏除去溶剂,将残渣在40ml的10%K₂CO₃水溶液中中和后,用4×60ml的CHCl₃萃取。用Na₂SO₄干燥有机层后,减压蒸馏除去溶剂,残渣用硅胶色谱柱(展开溶剂:CH₂Cl₂-CH₃OH=9:1 w/w)进行纯化,进一步用甲醇进行2次重结晶,得到化合物(11)。产率为47.9%

元素分析结果(C₉H₅NBr₂S):

计算值(%), C=33.88, H=1.58, N=4.39。

实测值(%), C=33.46, H=1.46, N=4.23。

进一步由¹H NMR确认生成物为目标化合物。

¹H NMR(CDCl₃): δ 7.60(s, 2H), 7.50-7.48(m, 2H), 7.16-7.13(m, 1H)

(2) 2,6-二(3'-甲氧基羰基-1'-吡唑基)-4-(2''-噻吩基)吡啶(化合物12)的合成

向100ml干燥的THF中溶解10.1g 3-甲氧基羰基吡唑,向其中加入3.12g金属钾,在约60℃搅拌,直至金属全部溶解。向该溶液中加入化合物(11)(6.38g, 20mmol),搅拌下回流1小时。减压蒸馏除去溶剂,将残渣用6×150ml的CHCl₃萃取后,再次减压蒸馏除去溶剂。生成物用硅胶色谱柱(展开溶剂:CH₂Cl₂-CH₃OH=9:1 w/w)进行纯化,进一步用苯重结晶,得到化合物(12)。产率为45.5%

元素分析结果(C₁₉H₁₅N₅O₄S):

计算值(%)，C=55.74, H=3.69, N=17.10

实测值(%)，C=55.47, H=3.62, N=16.82

进一步由¹H NMR 确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.60 (d, J=2.7Hz, 2H), 8.22 (s, 2H), 7.79 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.53(d, J=5.0 Hz, 1H), 7.20-7.18(m,1H), 7.03(d, J=2.7Hz, 2H), 4.01(s, 6H)。

(3) 2, 6-二(3'-羟甲基-1'-吡唑基)-4-(2''-噻吩基)吡啶(化合物 13)的合成

向 300ml 干燥的 THF 中加入 1.30g LiAlH₄ 和化合物(12) (2.72g, 6.64mmol)，在室温下搅拌 4 小时后，加入 1.1ml 水，此后慢慢滴加 1.1ml 15% 的 NaOH 和 4.5ml 水。在室温下搅拌 30 分钟后，将沉淀过滤，进一步用少量 THF 清洗沉淀，将其与 THF 溶液合并。减压蒸馏除去溶剂，将残渣用乙腈充分洗净后，真空干燥获得化合物(13)。产率为 71.3%。由¹H NMR 确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 8.88 (d, J=2.6Hz, 2H), 7.96(d, J=3.6Hz, 1H), 7.90 (s, 2H), 7.85 (d, J=5.1Hz, 1H), 7.29-7.26 (m,1H), 6.60(d, J=2.5Hz, 2H), 4.58(s, 4H)

(4) 2, 6-二(3'-羟甲基-1'-吡唑基)-4-(5''-硝基-2''-噻吩基)吡啶(化合物 14)的合成

将化合物(13) (1.59g, 4.5mmol) 加入到 20ml 的乙酸酐中，室温下搅拌 1 小时后，在 60℃ 下进一步搅拌 1 小时。将反应液冷却至室温，加入 1.5g 发烟硝酸和 20ml 乙酸的混和溶液后，在室温下搅拌 24 小时。向反应液中加入 200ml 的水，搅拌 1 晚后，用 4×50ml 的 CHCl₃ 进行萃取。对 CHCl₃ 溶液进行水洗，用 Na₂SO₄ 干燥后，减压蒸馏除去溶剂。将残渣真空干燥后，用硅胶色谱柱(展开溶剂: CH₂Cl₂-CH₃OH =9:1 w/w) 进行纯化。将生成物溶解在 100ml 乙醇中，加入 4gKOH 和 5ml 水，在室温下搅

拌 24 小时。减压蒸馏除去溶剂，将残渣用水洗后，真空干燥获得化合物 (14)。产率为 70.4%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.01 (d, $J=2.6\text{Hz}$, 2H), 8.15 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.89 (s, 2H), 7.84 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 6.71 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 2H) 4.57 (s, 4H)

(5) 2,6-二(3'-溴代甲基-1'-吡唑基)-4-(5''-硝基-2''-噻吩基)吡啶 (化合物 15) 的合成

将化合物 (14) (1.59g, 4mmol) 溶解在 200ml THF 中，向其中加入 3.20g 的 PBr_3 ，在搅拌下回流 4 小时。减压蒸馏除去溶剂后，向残渣中加入 200ml 的 CHCl_3 ，用 $4 \times 80\text{ml}$ 10% NaHCO_3 水溶液对 CHCl_3 溶液进行清洗。有机层用 Na_2SO_4 干燥，减压蒸馏除去溶剂。所得的残渣用己烷充分洗净，真空干燥得到化合物 (15)。产率为 94.1%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 9.04 (d, $J=2.6\text{Hz}$, 2H), 8.17 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.87 (s, 2H), 7.81 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 6.73 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 2H), 4.66 (s, 4H)。

(6) N,N,N',N'-[2,6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5''-硝基-2''-噻吩基)吡啶]四乙酸四乙基酯 (化合物 (16)) 的合成

将化合物 (15) (1.05g, 2mmol) 溶解在 150ml 的 CH_3CN 中，并加入 4.1mmol 的亚胺二乙酸二乙酯和 20mmol 的 K_2CO_3 ，搅拌下回流 24 小时。过滤除去不溶物，减压蒸馏除去溶剂后，向残渣中加入 200ml 的 CHCl_3 ，用 $4 \times 100\text{ml}$ 的饱和 Na_2SO_4 对 CHCl_3 溶液进行清洗，用 Na_2SO_4 对有机层进行干燥，减压蒸馏除去溶剂后，获得油状产物，用硅胶色谱柱 (展开溶剂: $\text{CH}_3\text{COOEt}-\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 9:1$ w/w) 进行纯化，获得化合物 (16)。产率为 50.0%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 9.03 (d, $J=2.6\text{Hz}$, 2H), 8.14 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 7.88 (s, 2H), 7.81 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 6.72 (d, $J=2.5\text{Hz}$, 2H), 4.18 (q, $J=7.2\text{Hz}$, 8H), 4.08 (s, 4H), 3.65 (s, 8H), 1.26 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 12H)。

(7) N,N,N',N'-[2, 6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5"-氨基-2"-噻吩基)吡啶]四乙酸四乙酯(化合物(17))的合成

将化合物(16)(741mg, 1mmol)溶解在70ml的EtOH中, 向其中加入SnCl₂·2H₂O(1.32g, 6mmol)后, 在70-80℃下搅拌1小时。冷却至室温后, 注入已经用冰水冷却了的100mlH₂O-5gDTPA的溶液中, 搅拌后, 向该溶液中加入20ml的饱和NaHCO₃水溶液。室温下搅拌30分钟后, 用3×100ml的CHCl₃萃取水溶液, 用Na₂SO₄对有机层进行干燥。减压蒸馏除去溶剂后, 对生成物进行真空干燥, 获得化合物(17)。产率为91.7%。由¹H NMR确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (CDCl₃): δ 8.81 (d, J=2.6Hz, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.38 (d, J=3.6Hz, 1H), 6.72(d, J=2.5Hz, 2H), 6.52 (d, J=5.1Hz, 1H), 4.18 (q, J=7.2Hz, 8H), 4.08 (s, 4H), 3.65(s, 8H), 1.26 (t, J=7.2Hz, 12H)。

(8) N,N,N',N'-[2, 6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5"-氨基-2"-噻吩基)吡啶]四乙酸(BAPTA、化合物(18))的合成

将化合物(17)(569mg, 0.8mmol)溶解在40mlEtOH-5mlH₂O-1.2gKOH的溶液中, 在室温下搅拌24小时后, 减压蒸馏除去溶剂。将残渣溶解在60ml水中, 在搅拌下慢慢滴加1%的CF₃COOH水溶液, 将溶液的pH值调节至约1。在室温下搅拌3小时后, 将沉淀过滤, 用0.5%的CF₃COOH水溶液充分洗净后, 真空干燥获得化合物(18)。产率为91.3%。

元素分析结果(C₂₅H₂₆N₈O₈S):

计算值(%), C=50.17, H=4.38, N=18.71。

实测值(%), C=50.29, H=4.25, N=18.48。

进一步由¹H NMR确认生成物为目标化合物。

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 9.16 (d, J=2.6Hz, 2H), 7.72 (s, 2H), 7.42 (d, J=3.6Hz, 1H), 6.76(d, J=2.5Hz, 2H), 6.59 (d, J=5.1Hz, 1H), 4.00 (s,

4H), 3.55(s, 8H).

实施例 4 [2, 6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5"-氨基-2"-噻吩基)吡啶]-N:N', N:N'-二(3, 6-二氧杂三亚乙基) (简称为 BAAPB) 的合成

(1) [2, 6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5"-硝基-2"-噻吩基)吡啶]-N:N', N:N'-二(3, 6-二氧杂三亚乙基)的合成

将 2, 6-二(3'-溴代甲基-1'-吡唑基)-4-(5"-硝基-2"-噻吩基)吡啶 (0.80g, 2mmol) 溶解在 100ml 的 CH₃CN 中后, 向其中加入 2.1mmol 的 4, 13-二氮杂-18-冠 6-醚和 20mmol 的 K₂CO₃, 搅拌下回流 24 小时。将不溶物过滤除去, 减压蒸馏除去溶剂后, 生成物(残渣)用二氧化硅凝胶色谱柱(展开溶剂: CH₂Cl₂-CH₃OH =9:1 w/w)进行纯化。产率为 53.8%。通过 FAB-MS 确认生成物为目标化合物和 KBr 的络合物(1: 1, M.W.=743.667)。

FAB-MS:测定值: 744

(2) [2, 6-二(3'-氨基甲基-1'-吡唑基)-4-(5"-氨基-2"-噻吩基)吡啶]-N:N', N:N'-二(3, 6-二氧杂三亚乙基) (BAAPB) 的合成

将上述(1)所得的 KBr 络合物(743.7mg, 1mmol)溶解在 50ml 干燥的甲醇中, 向其中加入 10% 的 Pd/C 催化剂后, 加入 40mg 的 NaBH₄。在室温下搅拌 2 小时, 将不溶物过滤除去后, 减压蒸馏除去溶剂, 将残渣溶解在 30ml 的水中。用 4×50ml 的 CHCl₃ 萃取水溶液, 用 Na₂SO₄ 干燥后, 减压蒸馏除去溶剂, 将残渣真空干燥获得目标化合物(络合物)。产率为 52.4%。通过 FAB-MS 确认生成物为 BAAPB 和 KBr 的络合物(1: 1, M.W.=713.684)。

FAB-MS:测定值: 714.

实施例 5 各种配位体和铕的络合物的合成

实施例 1-4 所得的 4 种配体内的 ATTTA 和 BAPTA 的铕络合物的合成如下:

首先将配体溶解在 pH 为 9.1 的 0.05M 的硼酸缓冲液中,接着加入相同摩尔量的 EuCl_3 , 在室温下搅拌 1 小时, 获得 ATTTA - Eu^{3+} 和 BAPTA - Eu^{3+} 的溶液。

而 ATTBB 和 BAAPB 的铕络合物的合成如下:

首先将 ATTBB · KBr 和 BAAPB · KBr 溶解在乙醇中, 此后加入两倍摩尔量的 EuCl_3 , 在搅拌下回流 2 小时。减压蒸馏除去溶剂, 将残渣溶解在 CHCl_3 中, 过滤除去不溶物后, 减压蒸馏除去溶剂, 将所得的残渣真空干燥, 获得络合物 ATTBB - Eu^{3+} 或 BAAPB - Eu^{3+} 。

实施例 6 4 种铕络合物的荧光特性的评价

将实施例 5 所得的 4 种络合物溶解在 pH 为 9.1 的 0.05M 的硼酸缓冲液中, 配制成 $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$ 的溶液。采用这些溶液, 分别对其 UV 光谱、荧光光谱、荧光量子产率、摩尔吸光系数和荧光寿命进行了测定。结果示于表 1。另外, ATTTA - Eu^{3+} 的荧光光谱示于图 1 中。

表 1

络合物	最大吸收 波长(nm)	摩尔吸光系 数($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	最大荧光 波长(nm)	荧光量 子产率	荧光寿命 (ms)
ATTTA - Eu^{3+}	336	2.50×10^4	615	0.15	1.30
ATTBB - Eu^{3+}	336	2.61×10^4	615	0.16	1.34
BAPTA - Eu^{3+}	324	2.60×10^4	620	0.12	1.40
BAAPB- Eu^{3+}	325	2.66×10^4	620	0.13	1.45

从表 1 可知, 4 种络合物都具有较强的荧光和较长的荧光寿命, 可有效地作为时间分辨荧光测定的标记试剂使用。

实施例7 采用本发明的络合物的时间分辨荧光测定

采用 ATTTA - Eu^{3+} , 通过时间分辨荧光测定对该络合物的测定灵敏度进行测定。络合物稀释用溶剂是 pH 为 7.8 的 0.05M 的 Tris - 盐酸缓冲液, 测定装置为 Victor 1420 时间分辨荧光测定装置(Perkin Elmer Life Science 社制造)。测定条件为: 激励波长 = 340nm, 测定波长 = 615nm, 延迟时间 (Delay time) = 0.2 ms, 窗口时间 (window time) = 0.4ms、循环时间 (Cycle time) = 1.0ms。

图 2 显示了 ATTTA - Eu^{3+} 稀释溶液的时间分辨荧光测定结果。

通过采用背景信号的标准偏差的 2 倍进行计算, 结果为采用 ATTTA - Eu^{3+} 的时间分辨荧光测定的最低检测限度为 $8.0 \times 10^{-13}\text{M}$ 。该结果表示采用 ATTTA - Eu^{3+} 的时间分辨荧光测定具有非常高的灵敏度。

实施例8 采用 ATTTA - Eu^{3+} 对链霉抗生物素蛋白 (SA) 的标识

在进行标识前, 首先采用 2, 4, 6 - 三氯代 - 1, 3, 5 - 三嗪对 ATTTA 的氨基进行活化。该方法如下。

将 ATTTA (124mg, 0.2mmol) 溶解在 5ml pH 为 4.9 的 0.5M 乙酸钠水溶液中, 在搅拌下滴加 1ml 包含 2, 4, 6 - 三氯代 - 1, 3, 5 - 三嗪 (36mg, 0.2mmol) 的丙酮溶液, 在室温下搅拌 30 分钟。用 1MHCl 将反应溶液的 pH 调整至约 1 后, 通过离心分离将沉淀回收, 采用稀释了 100 倍的 HCl 溶液进行清洗后, 真空干燥。采用该方法获得具有活性取代基 (4, 6 - 二氯代 - 1, 3, 5 - 三嗪 - 2 - 基) 的 ATTTA 衍生物。所得物质不需纯化, 可直接用于蛋白质的标识。

将 5mg 的 SA 溶解在 10ml pH 为 9.1 的 0.1M 碳酸钠缓冲液中后, 加入 10mg 具有 (4, 6 - 二氯代 - 1, 3, 5 - 三嗪 - 2 - 基) 的 ATTTA 衍生物, 直接在室温下搅拌 1 小时。将反应溶液进行凝胶过滤, 将未反应的标识试剂和标识的蛋白质分离。使用 $1.0 \times 40\text{cm}$ 的交联葡聚糖 G-50 柱, 采用 0.05M 的 NH_4HCO_3 的水溶液进行展开。获取少量的标识蛋白质溶液, 通过采用

标准 EuCl_3 水溶液进行荧光滴定, 对标识 SA 溶液中的 ATTTA 浓度进行测定, 计算标识 SA 的标识率, 获得 $\text{SA}(\text{ATTTA})_{21}$ 的溶液。向 $\text{SA}(\text{ATTTA})_{21}$ 溶液中加入摩尔量为 ATTTA 摩尔量的 1.5 倍的 EuCl_3 , 搅拌后, 加入 25mg 作为防腐剂的 NaN_3 , 此后加入 50mg 防止标识蛋白质吸附在容器上用的 BSA (牛血清白蛋白), 此后, 在 -20°C 下保存。在时间分辨荧光免疫测试中使用, 用包含 0.2%BSA-0.9%NaCl-0.1% NaN_3 的、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液稀释 1000 倍后进行使用。

实施例 9 采用 $\text{SA}(\text{ATTTA})_{21}$ 对人血清中的 CEA (癌胎儿性抗原) 的时间分辨荧光免疫测试

测试是采用 96 - 孔微量滴定板实施。具体操作方法如下。

(i) 配制生物素化抗体: 将 0.5ml (2.4mg/ml) 的兔抗人 CEA 抗体溶液 (Dako-immunoglobulins, 丹麦) 对 3L 生理盐水在 4°C 下透析 2 次, 每次 24 小时, 之后加入纯水 0.5ml, NaHCO_3 8.4ml, 和 6mg 磺基琥珀酰亚胺基 - 6 - (生物素酰胺基) 己酸酯 (NHS-LC-生物素, Pierce Chem. Co.), 在室温下搅拌 1 小时后, 在 4°C 下进行 24 小时温育。将反应溶液对于包含 0.25g NaN_3 的, 3L 0.1M 的 NaHCO_3 溶液在 4°C 下透析 2 次, 每次 24 小时, 之后加入 10mg 的 BSA, 直至在免疫测试中使用, 一直在 -20°C 下保存。在免疫测试中使用, 用包含 0.2%BSA-0.9%NaCl-0.1% NaN_3 的、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液中稀释 1000 倍后进行使用。

(ii) 对 96 - 孔微量滴定板的包被: 用 pH 为 9.6 的 0.1M 碳酸缓冲液对山羊抗人 CEA 多克隆抗体稀释为 8 微克/ml 后, 在 96 孔的透明聚苯乙烯制得的微量滴定板 (FluoroNunc plate) 上每孔注入 $60\ \mu\text{l}$, 在 4°C 下温育 24 小时。此后, 用包含 0.05% 的 Tween 20、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液 (缓冲液 - 1) 清洗板两次, 进一步用 pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液 (缓冲液 - 2) 清洗一次。

(iii) CEA 的免疫测试: 向已包被的 96 - 孔微量滴定板的孔中各注入 $50\ \mu\text{l}$ 的 CEA 标准溶液 (生化学工业株式会社), 在 37°C 下温育 1 小时后,

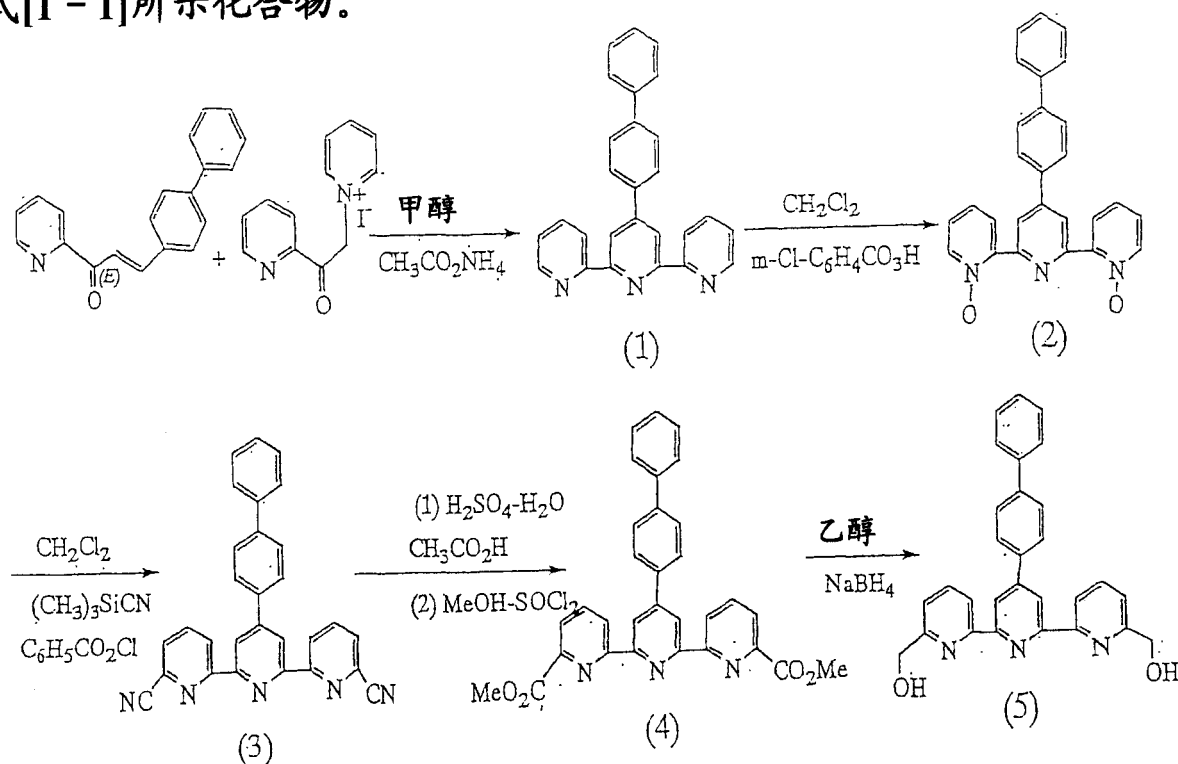
对板采用缓冲液-1清洗2次,采用缓冲液-2清洗1次。向各个孔中每次分别注入50 μ l生物素化的兔抗人CEA抗体,在37 $^{\circ}$ C下温育1小时后,对板采用缓冲液-1清洗2次,采用缓冲液-2清洗1次。向各个孔中每次分别注入50 μ l的SA(ATTTA)₂₁溶液,在37 $^{\circ}$ C下温育1小时后,对板采用缓冲液-1清洗4次,直接在固相时间分辨荧光测定中使用。

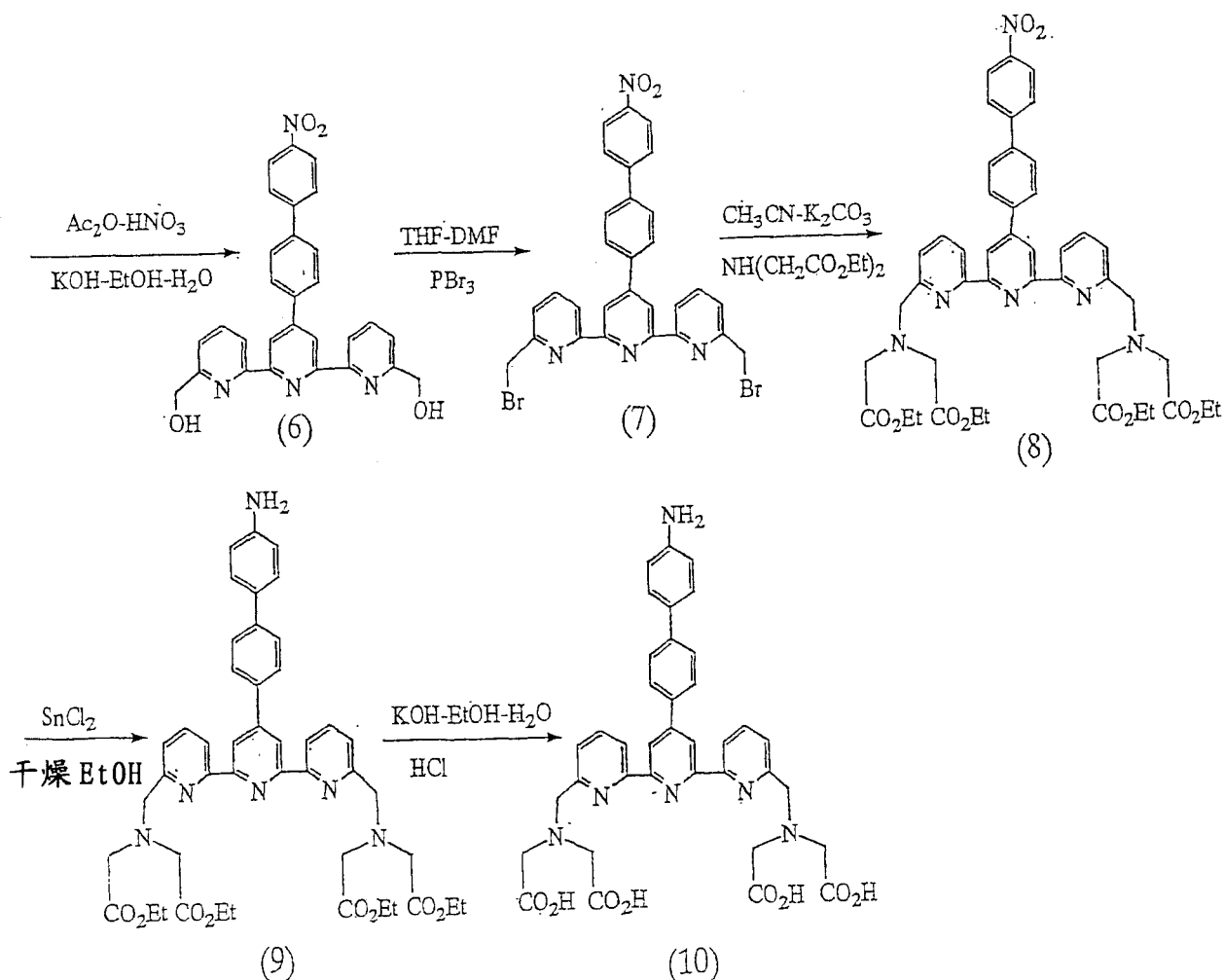
在本测定中使用的时间分辨荧光测定装置为Victor 1420时间分辨荧光测定装置(PerkinElmer Life Science社制造)。测定条件为:激励波长=340nm,测定波长=615nm,延迟时间(Delay time)=0.2ms,窗口时间(window time)=0.4ms、循环时间(Cycle time)=1.0ms。

以上免疫测试所得的检测线如图3所示。如果将背景信号+3SD(标准偏差)作为检测限度的话,该方法中的检测限度为60pg/ml。该值与市售的放射免疫测试或酶免疫测试相比,是约为其2倍的高灵敏度。

实施例10 通式[1-1]所示化合物的制造

通过以下所示的反应流程,制造了R基为4'-氨基-联苯-4-基的通式[1-1]所示化合物。





通式[1-1]所示化合物[(4'-(4'''-氨基-联苯-4''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)二(亚甲基氮川)]四乙酸(以下简称为ATBTA)的合成

(1) 4'-(联苯-4''-基)-2,2':6',2''-三吡啶(上述反应流程中的化合物(1))的合成

将N-[2-(吡啶-2'-基)-2-氧代乙基]吡啶鎓碘化物(16.3g, 50mmol)、(E)-3-(联苯-4''-基)-1-(吡啶-2'-基)-2-丙烯酸(14.26g, 50mmol)和乙酸铵(23.1g)加入到500ml干燥的甲醇中,在

搅拌下回流 24 小时。将反应液冷却，并将沉淀过滤，在冷甲醇中充分洗净后，从乙腈中重结晶，得到化合物 (1)。真空干燥后收率为 49.3%。

元素分析结果 ($C_{27}H_{19}N_3$) :

计算值 (%) , C=84.13, H=4.97, N = 10.90

实测值 (%) , C=84.01, H=4.82, N = 10.88

进一步由 1H NMR 确认生成物为目标化合物。

1H NMR ($CDCl_3$) : δ

8.80 (s, 2H) , 8.75 (d, J=4.6Hz, 2H) , 8.69 (d, J=7.8Hz, 2H) ,

8.01 (d, J=8.6Hz, 2H) , 7.89 (t, J=7.6Hz, 2H) ,

7.75 (d, J=8.2Hz, 2H) , 7.68 (d, J=6.9Hz, 2H) ,

7.48 (t, J=6.9Hz, 2H) , 7.41-7.33 (m, 3H) 。

(2) 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶)-1,1''-二氧化物 (上述反应流程中的化合物 (2)) 的合成

将上述反应流程中的化合物 (1) (19.27g, 50mmol) 溶解在 700ml 的 CH_2Cl_2 中，向其中加入 50g 的 3-氯代过氧化苯甲酸，在室温下搅拌 20 小时。将反应液用 $3 \times 300ml$ 的 10% Na_2CO_3 水溶液洗净，用 Na_2SO_4 干燥有机相后，减压蒸馏除去溶剂。将生成物溶解在 300ml 的甲醇中，滤去微量的不溶物之后，减压蒸馏除去溶剂。将生成物用乙腈充分清洗，通过真空干燥获得化合物 (2)。产率为 91.4%。由 1H NMR 确认生成物为目标化合物。

1H NMR ($CDCl_3$) : δ

9.29 (s, 2H) , 8.38 (d, J=6.6Hz, 2H) , 8.25 (d, J=8.2Hz, 2H) ,

7.94 (d, J=8.6Hz, 2H) , 7.72 (d, J=8.6Hz, 2H) ,

7.66 (d, J=6.9Hz, 2H) , 7.50-7.43 (m, 2H) , 7.41-7.29 (m, 5H) 。

(3) 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二腈 (上述反应流程中的化合物 (3)) 的合成

向 450ml 的 CH_2Cl_2 中加入 25mmol 上述反应流程中的化合物 (2) (15.65g, 37.5mmol) 和 $(\text{CH}_3)_3\text{SiCN}$ (37.2g, 37.5mmol), 在室温下搅拌 20 分钟后, 花费大约 20 分钟慢慢滴加 150mmol 的氯化苯甲酰。在室温下将反应液搅拌 24 小时后, 减压下馏去溶剂, 直至一半量。向剩余的溶液中加入 600ml 10% 的 K_2CO_3 的水溶液, 在室温下搅拌 1 小时后, 将沉淀过滤, 用水充分洗净, 此后用冷的 CH_2Cl_2 洗净, 之后真空干燥得到化合物 (3)。产率为 80.8%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ

8.99 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 8.75 (s, 2H), 8.31 (t, $J=7.9\text{Hz}$, 2H),

8.20 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 8.10 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H),

7.92 (d, $J=8.2\text{Hz}$, 2H), 7.78 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H),

7.54-7.42 (m, 3H)。

(4) 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羧酸二甲基酯 (上述反应流程中的化合物 (4)) 的合成

向 H_2SO_4 90ml/ CH_3COOH 90ml/ H_2O 20ml 的混合溶剂中加入 8.17g(20mmol)的上述反应流程中的化合物 (3), 在 90-100 $^\circ\text{C}$ 下搅拌 24 小时。向 800g 冰中加入反应液, 搅拌后, 将沉淀过滤, 用水和乙醇充分洗净后, 真空干燥得到 9.13g 水解产物。

向已用冰水冷却了的 600ml 干燥甲醇中加入 24g 亚硫酸氯 SOCl_2 , 搅拌 15 分钟后, 加入如上所得的 9.13g 水解产物, 在搅拌下回流 24 小时。减压蒸馏除去溶剂, 将生成物溶解在 1000ml 的氯仿 CHCl_3 中, 采用 15% 的 NaHCO_3 水溶液将有机层充分洗净后, 用 Na_2SO_4 干燥。减压蒸馏除去溶剂, 将生成物在硅胶色谱柱 (展开溶剂: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH} = 99: 1 \text{ w/w}$) 上进行纯化。从甲苯中将该生成物进行重结晶, 得到化合物 (4)。产率为 48.5%。

元素分析结果 ($\text{C}_{31}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$):

计算值 (%), C=74.24, H=4.62, N = 8.38

实测值 (%)，C=74.15, H=4.55, N = 8.38

进一步由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ

8.88 (s, 2H), 8.86 (d, J=7.9Hz, 2H), 8.20 (t, J=7.6Hz, 2H),

8.06 (d, J=7.9Hz, 2H), 8.00 (d, J=7.2Hz, 2H),

7.78 (d, J=6.6Hz, 2H), 7.70 (d, J=6.9Hz, 2H),

7.52-7.30 (m, 3H)

4.07 (s, 6H)。

(5) 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羟基甲基(上述反应流程中的化合物(5))的合成

向 400ml 干燥的乙醇中加入上述反应流程中的化合物(4) (7.02g, 14mmol) 和 3.02g NaBH_4 , 在室温下搅拌 3 小时后, 回流 1 小时, 减压蒸馏除去溶剂, 将生成物加入到 200ml 的饱和 NaHCO_3 水溶液中, 搅拌下加热直至沸腾。冷却后, 将沉淀过滤, 用水充分洗净后, 进行真空干燥, 获得化合物(5)。产率为 92.0%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): δ

8.75 (s, 2H), 8.55 (d, J=7.9Hz, 2H), 8.07 - 8.00 (m, 4H),

7.92 (t, J=8.2Hz, 2H), 7.78 (d, J=7.2Hz, 2H),

7.61 (d, J=7.9Hz, 2H), 7.57-7.50 (m, 2H) 7.46-7.40 (m, 1H)

5.57 (t, J=5.9Hz, 2H), 4.47 (d, J=4.6Hz, 4H)。

(6) 4'-(4''''-硝基-联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羟基甲基(上述反应流程中的化合物(6))的合成

将上述反应流程中的化合物(5) (1.78g, 4mmol) 加入到 30ml 的乙酸酐中, 在 60°C 下搅拌 15 分钟。减压蒸馏除去溶剂, 向生成物中加入 20ml 的乙酸酐, 用冰水进行外部冷却的条件下, 滴加 3ml 发烟硝酸和 20ml 乙酸的混和溶液后, 用冰水进行外部冷却的条件下, 搅拌 2 小时后, 进一步

在室温下搅拌 24 小时。向反应液中加入 250ml 的水，搅拌 1 小时后，用 3 × 100ml 的 CHCl₃ 进行萃取，用 5% 的 NaHCO₃ 水溶液对 CHCl₃ 溶液进行清洗，用 Na₂SO₄ 干燥后，减压蒸馏除去溶剂。将生成物溶解在 150ml 乙醇中，加入 10gKOH 和 15ml 水，在室温下搅拌 36 小时。向反应液中加入 300ml 的水，通过离心分离收集沉淀，真空干燥 5 小时后，用水充分洗净。真空干燥获得化合物 (6)。产率为 90.7%。由 ¹H NMR 确认生成物为目标化合物和 4'-(2''''-硝基-联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二羟基甲基的混合物。

¹H NMR (DMSO-d₆): δ

8.81-8.79 (m, 2H), 8.61 (d, J=7.9Hz, 2H)

8.37 (d, J=7.2Hz, 1H), 8.17-8.03 (m, 6H), 7.88-7.80(m, 1H)

7.75-7.58 (m, 4H), 4.78(s, 1H)。

(7) 4'-(4''''-硝基-联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二溴代甲基 (上述反应流程中的化合物 (7)) 的合成

将上述反应流程中的化合物 (6) (1.78g, 3.63mmol) 加入到 200mlTHF-80mlDMF 的混和溶剂中，使其溶解，加入 3.52g 的 PBr₃，在搅拌下回流 6 小时。减压蒸馏除去溶剂后，向生成物中加入 300ml 的 CHCl₃，用 4 × 200ml 饱和 Na₂SO₄ 水溶液对有机层进行清洗后，进一步用 200ml 10% 的 NaHCO₃ 水溶液进行洗净。有机层用 Na₂SO₄ 干燥，减压蒸馏除去溶剂后，用硅胶色谱柱 (展开溶剂: CH₂Cl₂-CH₃OH=99.5:0.5 v/v) 对生成物进行纯化，减压蒸馏除去溶剂，并真空干燥获得化合物(7)。产率为 56.3%。

元素分析结果 (C₂₉H₂₀Br₂N₄O₂):

计算值 (%), C=56.52, H=3.27, N = 9.09。

实测值 (%), C=56.64, H=3.32, N = 9.10。

质量分析结果 (FAB-MS):

m/e, 617.3(M+H⁺), 571.3(M-NO₂)

进一步由 ¹H NMR 确认生成物为目标化合物和 4'-(2''''-硝基-联苯-

4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二溴代甲基的混合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ

8.70 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 8.57 (d, J=7.9Hz, 2H),

8.33 (d, J=8.8Hz, 1H), 8.10-8.00(m, 6H),

7.95(d, J=8.2Hz, 1H), 7.70-7.55(m, 4H), 4.84(s, 4H)

(8) N,N,N',N' [(4'-(4''''-硝基-联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)-二(亚甲基氮川)]四乙酸四乙酯(上述反应流程中的化合物(8))的合成

将 1.98mmol 上述反应流程中的化合物(7) (1.22 g,) 溶解在 250ml CH_3CN -50ml THF 的混合溶剂中, 并加入 4.1mmol 的亚胺二乙酸二乙酯和 20mmol 的 K_2CO_3 , 搅拌下回流 24 小时。过滤除去不溶物, 减压蒸馏除去溶剂后, 向生成物中加入 250ml 的 CHCl_3 , 用 $2 \times 200\text{ml}$ 的饱和 Na_2SO_4 水溶液对 CHCl_3 溶液进行清洗。用 Na_2SO_4 干燥有机相, 减压蒸馏除去溶剂后, 获得油状产物, 用硅胶色谱柱(展开溶剂: CH_3COOEt) 进行纯化, 减压蒸馏除去溶剂并真空干燥, 获得化合物(8), 产率为 46.1%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物和 4'-(2''''-硝基-联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)-二(亚甲基氮川)]四乙酸四乙酯的混合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) : δ

8.77 (s, 2H), 8.57 (d, J=7.9Hz, 2H), 8.36 (d, J=8.6Hz, 1H),

8.05(d, J=7.9Hz, 1H), 7.98-7.79(m, 6H),

7.66 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.57-7.42(m, 2H), 4.21(s, 4H),

4.17 (q, J=7.3Hz, 8H), 3.71 (s, 8H), 1.24 (t, J=7.3Hz, 12H)。

(9) N,N,N',N' [(4'-(4''''-氨基-联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)-二(亚甲基氮川)]四乙酸四乙酯(上述反应流程中的化合物(9))的合成

将 0.91mmol 上述反应流程中的化合物 (8) (0.76g) 溶解在 60ml 的 EtOH 中, 加入 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.25g, 5.7mmol) 后, 在 70 - 80 °C 下搅拌 1 小时。冷却至室温后, 注入已经用冰水冷却了的 120ml H_2O - 7.85g DTPA 的溶液中, 搅拌后, 向该溶液中加入 20ml 的饱和 NaHCO_3 水溶液。室温下搅拌 30 分钟后, 用 4 × 100ml 的 CHCl_3 萃取水溶液, 用 Na_2SO_4 对有机层进行干燥。减压蒸馏除去溶剂, 生成物用硅胶色谱柱 (展开溶剂: $\text{CH}_3\text{COOEt}-\text{CH}_3\text{OH}=98:2$ v/v) 对生成物进行纯化, 减压蒸馏除去溶剂, 并真空干燥获得化合物 (9)。产率为 79.2%。由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ

8.76 (s, 2H), 8.55 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 8.00-7.84(m, 4H),

7.72-7.62(m, 4H), 7.51 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H),

6.81 (d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 4.21(s, 4H), 4.17 (q, $J=7.3\text{Hz}$, 8H)

3.71(s, 8H), 1.24(t, $J=7.3\text{Hz}$, 12H)。

(10) [(4'-(4'''' - 氨基 - 联苯 - 4''' - 基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)-二(亚甲基氮川)]四乙酸 (ATBTA, 上述反应流程中的化合物 (10)) 的合成

将上述反应流程中的化合物 (9) (580mg, 0.72mmol) 溶解在 100ml EtOH-5ml H_2O -2.2g KOH 的溶液中, 在室温下搅拌 20 小时后, 减压蒸馏除去溶剂。将生成物溶解在 100ml 的水中, 在搅拌下慢慢滴加稀释了 10 倍的盐酸水溶液, 将溶液的 pH 值调节至约 1。在室温下搅拌 3 小时后, 将沉淀离心收集, 用稀释了 100 倍的盐酸水溶液充分洗净后, 真空干燥获得化合物 (10)。产率为 65.9%。

元素分析结果 (ATBTA · 3HCl · 4 H_2O , $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{Cl}_3$):

计算值 (%), C=50.95, H=5.20, N = 9.64。

实测值 (%), C=51.05, H=5.36, N = 9.65。

进一步由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) : δ

8.89 (s, 2H), 8.75 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 8.23-8.05(m, 4H),
7.96-7.80(m, 2H), 7.75 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.60-7.45(m, 4H),
4.68 (s, 4H), 4.24(s, 8H).

将上述 ATBTA · 3HCl · 4H₂O 进一步用纯水和乙腈充分洗净后, 真空干燥获得 ATBTA.

元素分析结果 (C₃₇H₃₄N₆O₈) :

计算值 (%), C=64.34, H=4.96, N = 12.17.

实测值 (%), C=63.89, H=5.11, N = 12.14.

进一步由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) : δ

8.75 (s, 2H), 8.56 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 8.06-8.00(m, 4H),
7.93-7.71(m, 2H), 7.66 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.60-7.40(m, 4H),
4.13 (s, 4H), 3.59(s, 8H).

实施例 11 合成 ATBTA 和铕的络合物

将所述实施例 10 制造出的 ATBTA · 3HCl · 4H₂O (0.2mmol, 164.4mg) 加入到 4.0ml 水中, 采用固体 NaHCO₃ 将溶液的 pH 值调节至 6.5 后, 加入 EuCl₃ · 6H₂O (0.22mmol, 80.6mg) - H₂O 1.5ml 的溶液, 采用 NaHCO₃ 使溶液的 pH 值保持为 6.5, 搅拌 1.5 小时。采用 1M 的 NaOH 溶液将反应液的 pH 值调节至 8.5, 此后, 过滤除去沉淀, 回收滤液。向滤液中加入 80ml 的丙酮, 析出络合物。离心收集络合物, 用丙酮充分洗净后, 真空干燥获得 ATBTA 和铕的络合物。产量为 180mg。

元素分析结果 [Na [C₃₇H₃₀N₆O₈Eu] · (NaHCO₃)₃ · (NaCl)₂ · (H₂O)₄]:

计算值 (%): C = 36.88, H=3.17, N=6.45.

实测值 (%): C = 36.74, H=3.09, N=6.26.

实施例 12 向 ATBTA - Eu³⁺ 络合物中导入氨基反应活性取代基:

将按照实施例 11 中记载的方法制得的 ATBTA - Eu^{3+} 络合物溶解在 3.0ml pH=4.9 的 0.1M 乙酸钠缓冲溶液中，加入 2, 4, 6-三氯代-1, 3, 5-三氮烯 (36mg, 0.2mmol)，在搅拌下加入 2ml 丙酮和 2ml 水。在室温下搅拌 30 分钟后。加入 120ml 的丙酮，析出络合物。通过离心分离收集沉淀，用丙酮充分洗净后，真空干燥，获得具有活性取代基的络合物。产量为 139mg。

实施例 13 具有活性取代基的 ATBTA - Eu^{3+} 络合物的荧光特性

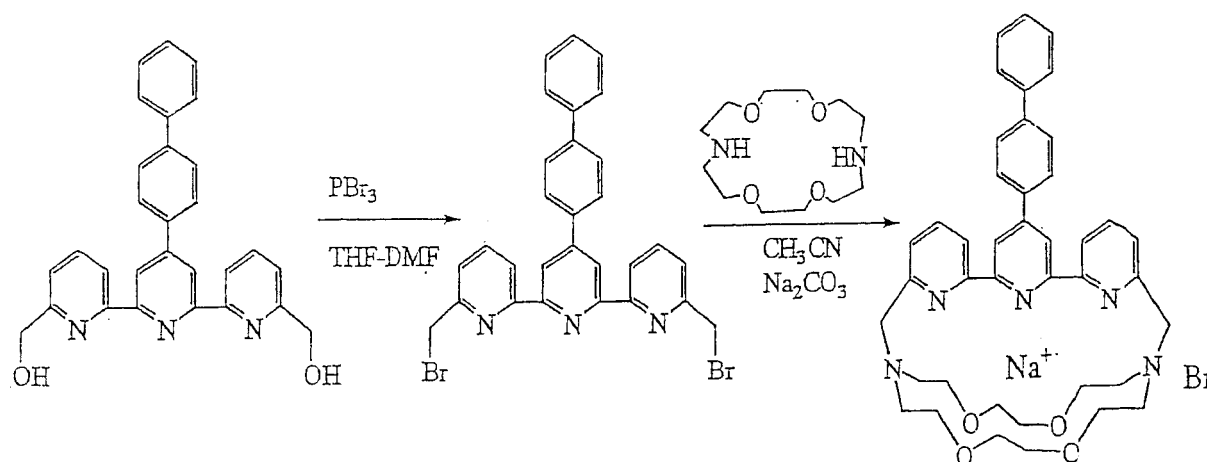
在 $1.5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、pH 为 9.1 的 0.05M 的硼酸缓冲液中，测定实施例 12 制得的具有活性取代基的 ATBTA - Eu^{3+} 络合物的荧光特性。

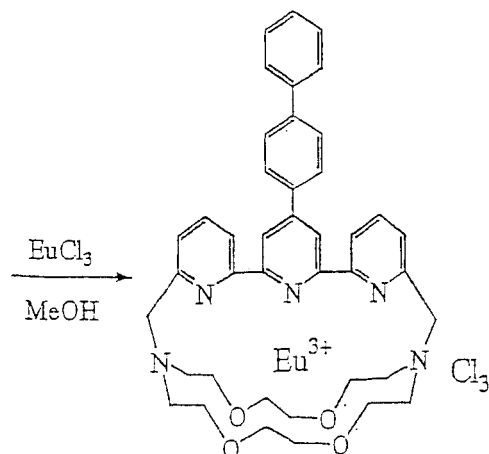
测定结果示于图 4，图 4 的纵轴表示相对荧光强度，横轴表示波长 (nm)。图 4 中的 Ex 表示激励光谱，Em 表示发光光谱，Ex-TR 表示时间分辨激励光谱，Em-TR 表示时间分辨发光光谱。

该物质的荧光特性为：最大吸收波长为 335nm，摩尔吸光系数为 $3.11 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ，最大荧光波长为 616nm，荧光量子产率为 0.091，荧光寿命为 1.02ms。

实施例 14 通式[2-1]所示化合物的制造

通过以下所示的反应流程，制造 R 基为联苯-4-基的通式[2-1]所示的化合物。





通式[2-1]所示化合物的合成

(1) 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6, 6''-二溴代甲基的合成
 将 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6, 6''-二羟基甲基 (4.46g, 10mmol) 加入到 400ml THF-150ml DMF 的混和溶剂中, 使其溶解, 加入 8.1g 的 PBr_3 , 在搅拌下回流 16 小时。减压蒸馏除去溶剂后, 向生成物中加入 400ml 的 CHCl_3 , 用 $4 \times 200\text{ml}$ 饱和 Na_2SO_4 水溶液对有机层进行清洗后, 进一步用 200ml 10% 的 NaHCO_3 水溶液进行洗净。有机层用 Na_2SO_4 干燥, 减压蒸馏除去溶剂后, 用硅胶色谱柱 (展开溶剂: $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}=99:1$ v/v) 对生成物进行纯化, 减压蒸馏除去溶剂, 并真空干燥获得 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6, 6''-二溴代甲基。产率为 80.6%。

元素分析结果 ($\text{C}_{29}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_3$):

计算值 (%), $\text{C}=60.97, \text{H}=3.70, \text{N}=7.35$

实测值 (%), $\text{C}=60.94, \text{H}=3.54, \text{N}=7.33$

进一步由 $^1\text{H NMR}$ 确认生成物为目标化合物。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ

8.81 (s, 2H), 8.59 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 7.99 (d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H),

7.89 (t, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 7.79 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 2H),

7.69 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 2H), 7.55-7.47 (m, 4H), 7.50-7.35 (m, 1H)。

(2) [(4-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6, 6''-二基)二(亚甲基氮川)]-N:N',N:N''-(3,6-二氧杂三亚乙基)的合成

将 0.50mmol 4'-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二溴代甲基 (0.29g) 溶解在 250ml 的 CH₃CN 中, 并加入 0.50mmol 的 4,13-二氮杂-18-冠-6-醚和 5.0mmol 的 Na₂CO₃, 搅拌下回流 24 小时。过滤除去不溶物, 减压蒸馏除去溶剂后, 生成物用铝柱(展开溶剂: CHCl₃-CH₃OH =97:3w/w) 进行纯化。产率为 51%。由 FAB-MS 确定生成物为目标化合物和 NaBr 以 1:1 的络合物(分子量 694.7)。进一步由 ¹H NMR 确认为目标化合物。

¹H NMR (CDCl₃): δ

8.55 (s, 2H), 8.39 (d, J=7.9Hz, 2H), 8.15-8.09 (m, 4H),
7.92 (d, J=8.6Hz, 2H), 7.77 (d, J=8.2Hz, 2H),
7.56-7.49 (m, 4H), 7.47-7.40 (m, 1H), 4.15 (s, 4H),
3.70-3.40 (m, 16H); 3.00-2.55 (m, 8H)。

实施例 15 [(4-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)二(亚甲基氮川)]-N:N',N:N'-(3,6-二氧杂三亚乙基)和铕的络合物的合成

将 0.70mmol 所述实施例 14 制造出的[(4-(联苯-4'''-基)-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基)二(亚甲基氮川)]-N:N',N:N'-(3,6-二氧杂三亚乙基)-NaBr 的络合物(0.54g)溶于 160ml 无水甲醇中, 加入 1mmol 的 EuCl₃·6H₂O, 在搅拌下回流 24 小时。冷却至室温后, 向反应液中加入 80ml 乙醚, 使络合物析出。离心收集络合物, 真空干燥获得目标化合物。产率为 62%。

由 FAB-MS 确定生成物为目标化合物。

m/e : 894.6 [M+Eu+2Cl],
859.7 [M+Eu+Cl],
412.4 [Crown+Eu+Cl]

实施例 16 采用具有氨基反应活性取代基的新型标记试剂 {{4'-[4'''-(4,6-二氯代-1,3,5-三氮烯-2-基)氨基-联苯-4'''-基]-2,2':6',2''-三吡啶-6,6''-二基}二(亚甲基氮川)四(乙酸合)}铕(III) (简称为 DTBTA-Eu³⁺), 根据时间分辨荧光免疫测试测定人血清中的前

列腺特异抗原（简称为 PSA）

1、采用 DTBTA- Eu^{3+} 对链霉抗生物素蛋白（SA）的标识

将 2mg 的 SA 溶解于 1.5ml pH 为 9.1 的 0.1M 碳酸钠缓冲溶液中，此后加入溶解于 0.7ml pH 为 9.1 的 0.1M 碳酸钠缓冲溶液中的 2.8mg 的 DTBTA- Eu^{3+} ，直接在室温下搅拌 3 小时。将反应溶液进行凝胶过滤，将未反应的标识试剂和标识的蛋白质分离（使用 $1.0 \times 40\text{cm}$ 的交联葡聚糖 G-50 柱，采用 0.05M 的 NH_4HCO_3 溶液进行展开）。通过在 335nm 处测定标识 SA 溶液的吸光度，计算标识 SA 溶液中的 DTBTA- Eu^{3+} 浓度（假设在标识前后标识试剂的摩尔吸光系数不发生变化的条件下），计算标识 SA 的标识率，获得 SA (DTBTA- Eu^{3+})₂₆ 的溶液。在 SA (DTBTA- Eu^{3+})₂₆ 的溶液中加入 15mg 作为防腐剂的 NaN_3 ，以及 30mg 防止标识蛋白质吸附在容器上用的 BSA（牛血清白蛋白），此后在 -20°C 下保存。在时间分辨荧光免疫测试中使用，用包含 0.2%BSA-0.9%NaCl-0.1% NaN_3 的、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液稀释 400 倍后进行使用。

2、采用 DTBTA- Eu^{3+} 对 SA-BSA 结合体的标识

将 1mg 的 SA 和 1mg 的 BSA 溶解于 1.0ml 的 pH 为 7.1 的 0.1M 磷酸钠缓冲溶液中后，加入 0.03ml 的 1% 的戊二醛，搅拌后，在 4°C 下放置 24 小时。加入 2mg 的 NaBH_4 ，搅拌后，在室温下放置 2 小时。在 4°C 下对所得的溶液用 3L 0.9% 的 NaCl 溶液透析 2 次后（每 24 小时一次），加入 0.6ml pH 为 9.1 的 0.5M 碳酸钠缓冲液，并加入溶解于 0.82ml pH 为 9.1 的 0.1M 碳酸钠缓冲液中的 1.64mg DTBTA- Eu^{3+} ，直接在室温下搅拌 3 小时。通过对反应溶液进行凝胶过滤，将未反应的标识试剂和标识的蛋白质分离。通过在 335nm 处测定标识 SA - BSA 溶液的吸光度，计算标识 SA-BSA 溶液中的 DTBTA- Eu^{3+} 浓度，计算标识 SA-BSA 的标识率，获得大致为 SA (BSA)_{0.9} (DTBTA- Eu^{3+})₄₂ 的溶液。在 SA (BSA)_{0.9} (DTBTA- Eu^{3+})₄₂ 的溶液中加入 15mg 作为防腐剂的 NaN_3 ，以及 30mg 防止标识蛋白质吸附在容器上用的 BSA，此后在 -20°C 下保存。在时间分辨荧光免疫测试中

使用时，用包含 0.2%BSA-0.9%NaCl-0.1% NaN₃ 的、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液稀释 400 倍后进行使用。

3、采用 DTBTA- Eu³⁺对小鼠抗人 PSA 单克隆抗体的标识

向 0.6ml 透析后的小鼠抗人 PSA 单克隆抗体(OEM Concepts, 0.5mg/ml, 克隆 No: 131-14234) 中加入 0.2ml pH 为 9.1 的 0.5M 碳酸钠缓冲溶液，此后加入溶解于 0.032ml pH 为 9.1 的 0.1M 碳酸钠缓冲溶液中的 0.117mg 的 DTBTA- Eu³⁺，直接在室温下搅拌 2.5 小时。对反应溶液进行凝胶过滤，将未反应的标识试剂和标识的蛋白质分离。通过在 335nm 处测定标识抗体溶液的吸光度，计算标识抗体溶液中的 DTBTA- Eu³⁺ 浓度，计算标识抗体的标识率，获得标识率约为 20 的标识抗体溶液。在溶液中加入 10mg 作为防腐剂的 NaN₃，以及 10mg 防止标识蛋白质吸附在容器上用的 BSA (牛血清白蛋白)，此后在 -20℃ 下保存。在时间分辨荧光免疫测试中使用时，用包含 0.2%BSA-0.9%NaCl-0.1% NaN₃ 的、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液稀释 200 倍后进行使用。

4、采用 SA (DTBTA- Eu³⁺)₂₆ 和 (BSA)_{0.9}SA (DTBTA- Eu³⁺)₄₂ 对人 PSA 的时间分辨荧光测定

在测试中使用 96 - 孔微量滴定板。具体操作方法如下。

(1) 配制生物素化抗体：向透析后的 0.4ml (0.5mg/ml) 的小鼠抗 PSA 单克隆抗体溶液 (OEM Concepts, 克隆 No: 131-14234) 中加入 0.6ml 的纯水、8.4mg 的 NaHCO₃ 和 2mg 的磺基琥珀酰亚胺基 - 6 - (生物素酰胺基) 己酸酯 (NHS-LC-生物素, Pierce Chem. Co.)，在室温下搅拌 1 小时后，在 4℃ 下进行温育 24 小时。将反应溶液采用包含 0.25g NaN₃ 的、3L 0.1M 的 NaHCO₃ 溶液在 4℃ 下每 24 小时进行透析，并透析 2 次后，加入 10mg 的 BSA，直至在免疫测试中使用之前，一直在 -20℃ 下保存。在免疫测试中使用时，用包含 0.2%BSA-0.9%NaCl-0.1% NaN₃ 的、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液中稀释 1000 倍后进行使用。

(2) 对 96-孔微量滴定板的包被: 用 pH 为 9.6 的 0.1M 碳酸缓冲液对小鼠抗人 PSA 单克隆抗体溶液 (OEM Concepts, 克隆 No: 131-11214) 稀释为 $12.5 \mu\text{g/ml}$ 后, 在 96 孔的透明聚苯乙烯制得的微量滴定板 (FluoroNunc plate) 中每孔注入 $50 \mu\text{l}$, 在 4°C 下温育 24 小时。此后, 用包含 0.05% 的 Tween 20、pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液 (缓冲液 - 1) 清洗两次, 进一步用 pH 为 7.8 的 0.05M Tris - 盐酸缓冲液 (缓冲液 - 2) 清洗一次。

(3) PSA 的免疫测试: 向已包被的 96-孔微量滴定板的孔中各孔分别注入 $45 \mu\text{l}$ 的 PSA 标准溶液 (Biogenesis Inc.), 在 37°C 下温育 2 小时后, 对板用缓冲液 - 1 清洗 2 次, 用缓冲液 - 2 清洗 1 次。向各个孔中各注入 $45 \mu\text{l}$ 生物素化抗 PSA 抗体, 在 37°C 下温育 1 小时后, 对板用缓冲液 - 1 清洗 2 次, 用缓冲液 - 2 清洗 1 次。向各个孔中各注入 $45 \mu\text{l}$ 的 SA (DTBTA- Eu^{3+})₂₆ 或 SA (BSA)_{0.9} (DTBTA- Eu^{3+})₄₂ 溶液, 在 37°C 下温育 1 小时后, 对板采用缓冲液 - 1 清洗 4 次, 直接在固相时间分辨荧光测定中使用。

在本测定中使用的时间分辨荧光测定装置为 DELFIA 1234 时间分辨荧光测定装置 (Wallac 社制造)。测定条件为: 激励波长 = 340nm, 测定波长 = 615nm, 延迟时间 (Delay time) = 0.2ms, 窗口时间 (window time) = 0.4ms、循环时间 (Cycling time) = 1.0ms。

以上免疫测试所得的检测线如图 5 所示。如果将背景信号 + 3SD (标准偏差) 作为检测限度的话, 采用 SA (DTBTA- Eu^{3+})₂₆ 的方法中的检测限度为 22pg/ml, 采用 SA (BSA)_{0.9} (DTBTA- Eu^{3+})₄₂ 的方法中的检测限度为 8pg/ml。

5、采用 DTBTA- Eu^{3+} 标识的小鼠抗人 PSA 单克隆抗体的人 PSA 的时间分辨荧光免疫测试

向已经采用小鼠抗人 PSA 单克隆抗体 (OEM Concepts, 克隆 No: 131-11214) 包被的 96-孔微量滴定板的孔中各注入 $45 \mu\text{l}$ 的 PSA 标准溶液, 在 37°C 下温育 2 小时后, 对板用缓冲液 - 1 清洗 2 次, 用缓冲液 - 2

清洗1次。向各个孔中各分别注入45 μ l DTBTA- Eu^{3+} 标识的小鼠抗人 PSA 单克隆抗体 (OEM Concepts, 克隆 No: 131-14234), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 1 小时后, 对板采用缓冲液 -1 清洗 4 次, 直接在固相时间分辨荧光测定中使用。测定条件同上。

以上免疫测试所得的检测线如图 6 所示。如果将背景信号 + 3SD (标准偏差) 作为检测限度的话, 该方法中的检测限度为 41pg/ml。

产业上的可利用性

本发明提供一种具有与被标识物质 (例如来自生物体的物质、生理活性物质等) 的结合基, 可与稀土类金属离子容易地形成络合物的新的标识试剂。该络合物在水溶液中非常稳定, 具有足够的荧光强度和较长的荧光寿命。因此, 通过使用该络合物, 可直接在水溶液中标识具有氨基和巯基等官能基的酶、蛋白质、肽 (寡肽、多肽)、激素、核酸探针、寡核苷酸、药物 (包含抗生物质) 以及其它的有机化合物等。

此外, 本发明的新的标识试剂通过共价键, 与被标识物质 (具体为具有氨基和巯基等官能基的酶、蛋白质、肽 (寡肽、多肽)、激素、核酸探针、寡核苷酸、药物 (包含抗生物质) 以及其它的有机化合物等) 形成非常稳定的标识复合体, 通过使其与稀土类离子反应, 可获得非常稳定的稀土类荧光络合物标识复合体。该标识复合体同样具有非常长的荧光寿命和较强的荧光, 可在时间分辨荧光免疫测试和 DNA 杂交测定等中直接应用。

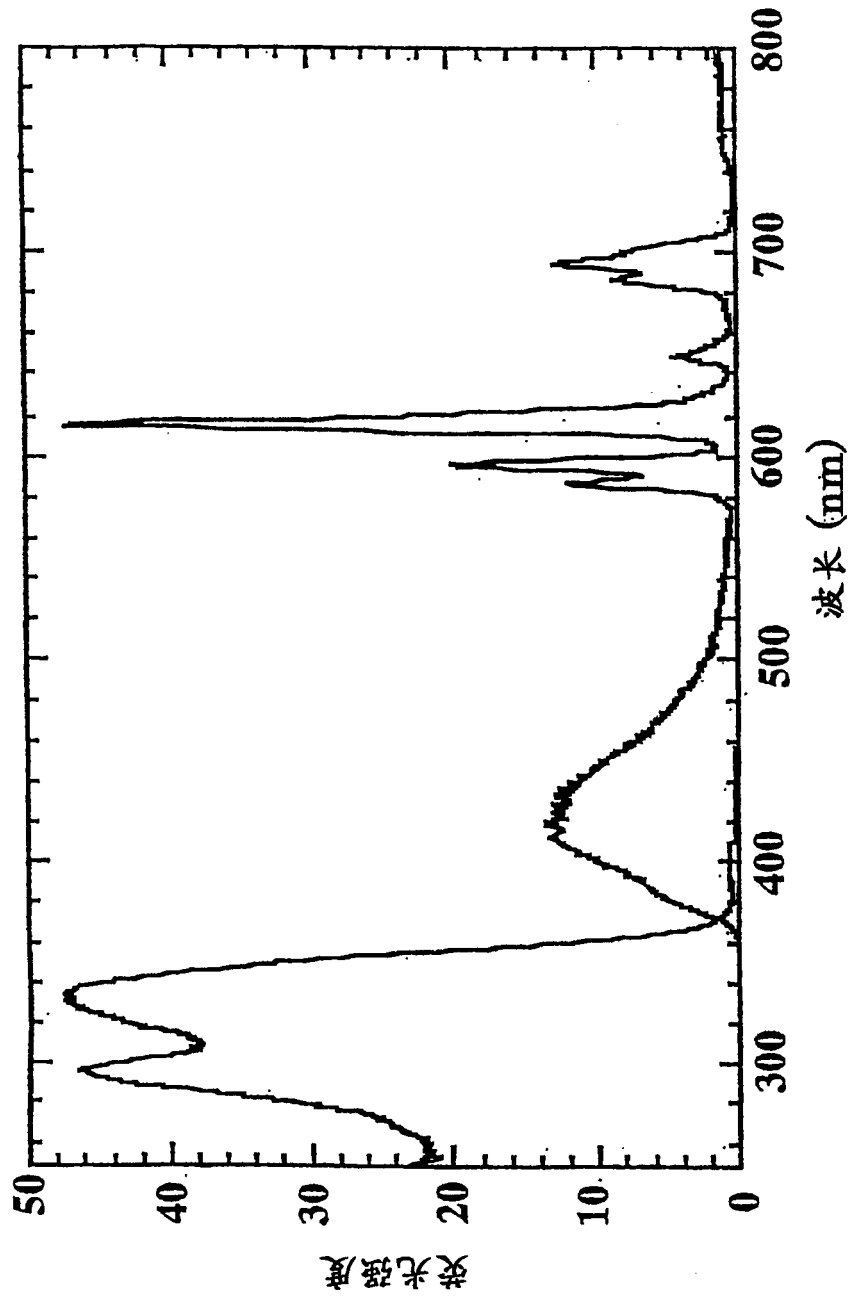


图 1

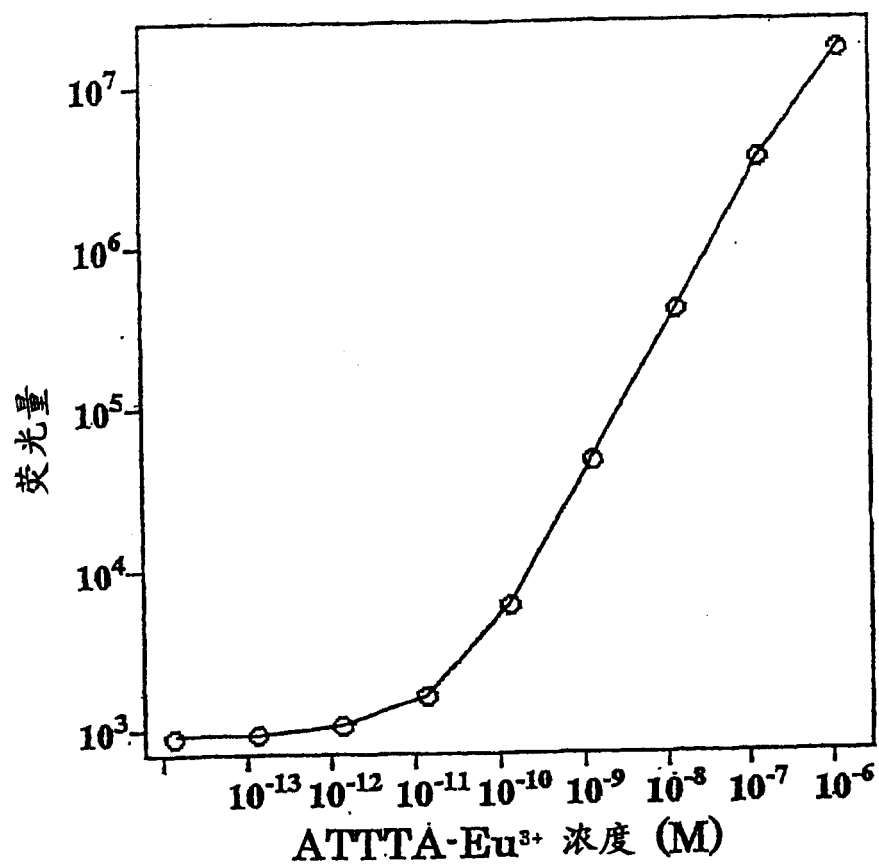


图 2

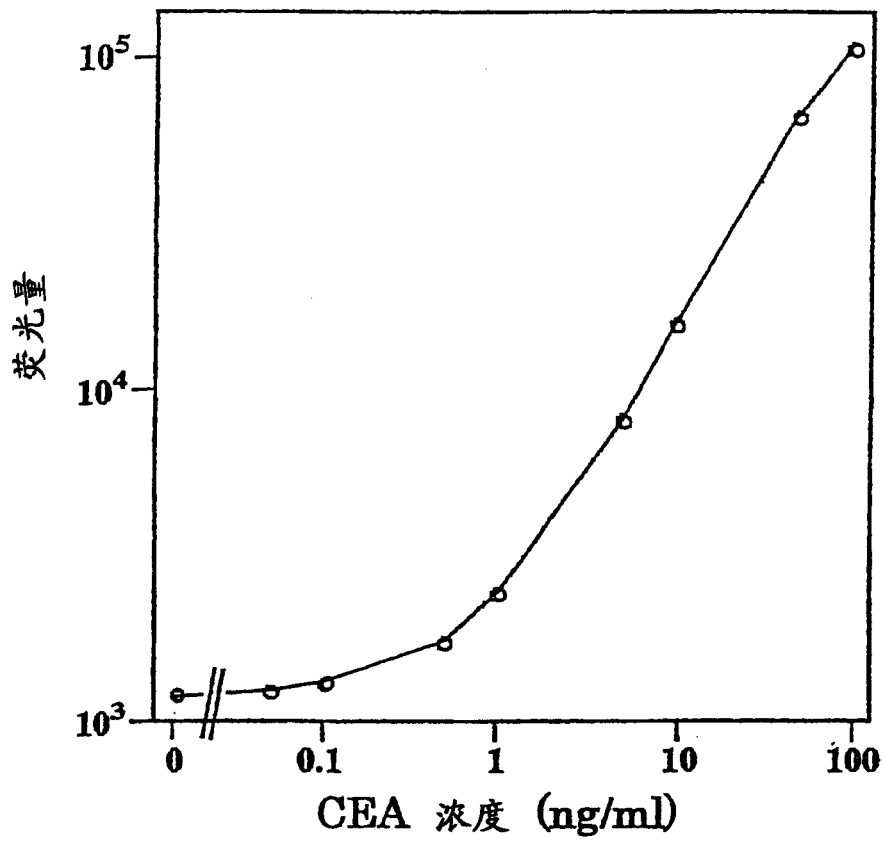


图 3

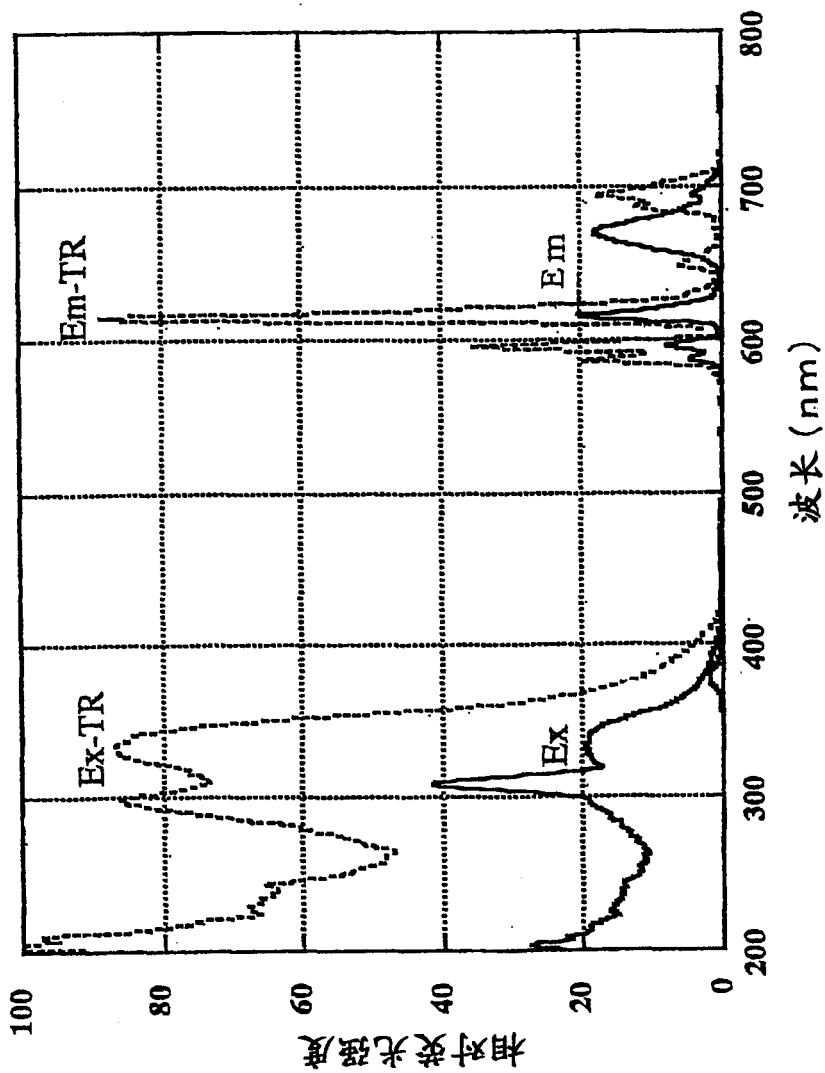


图 4

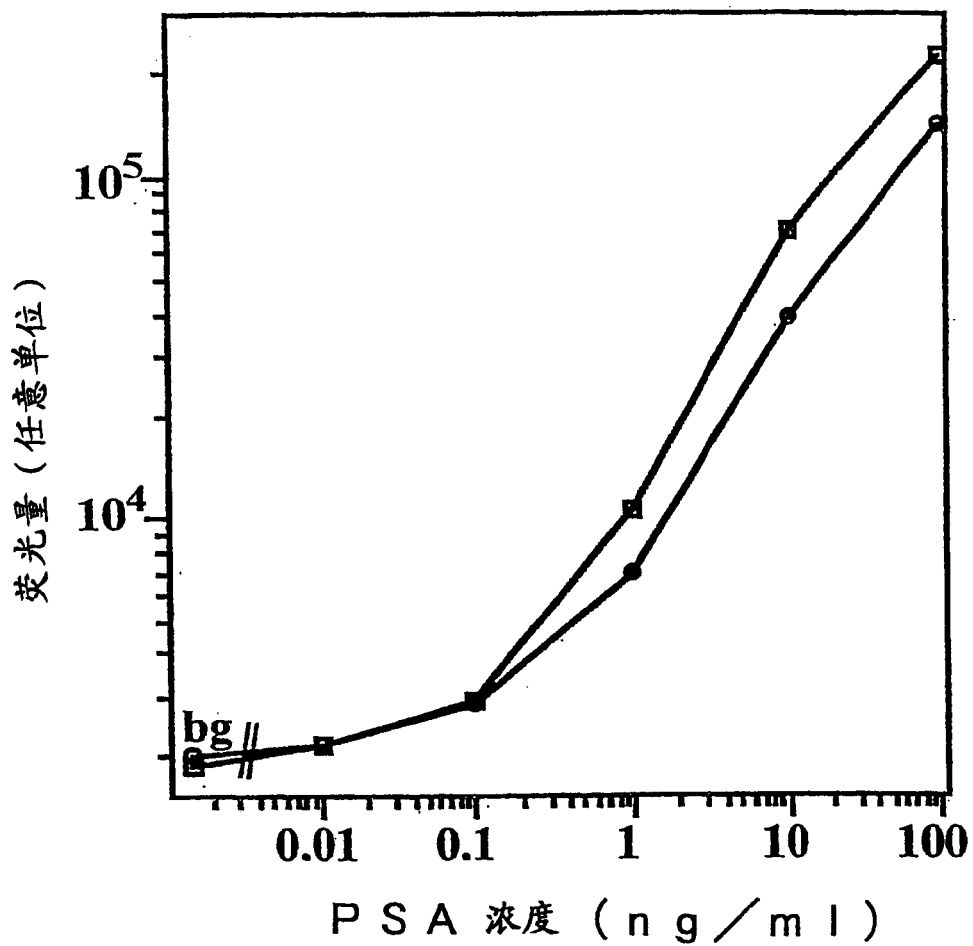


图 5

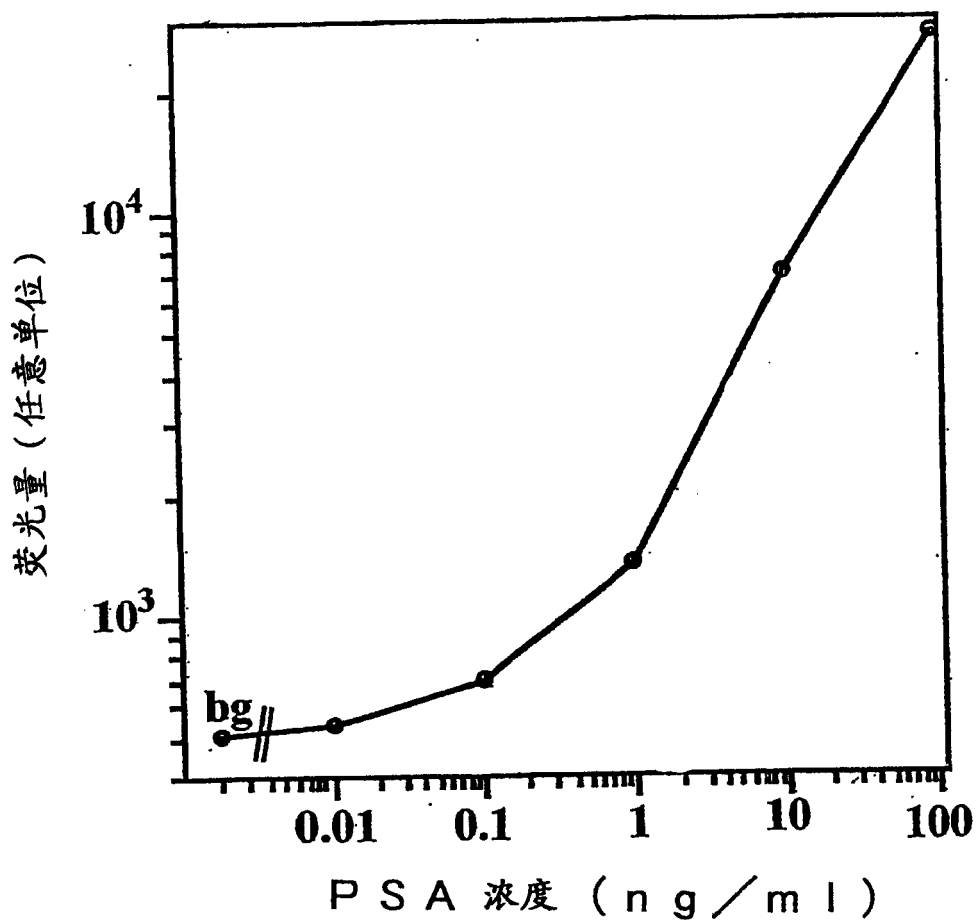


图 6

专利名称(译)	新型荧光标识化合物		
公开(公告)号	CN1685232A	公开(公告)日	2005-10-19
申请号	CN03805523.6	申请日	2003-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	松本和子 袁景利		
申请(专利权)人(译)	松本和子 袁景利		
当前申请(专利权)人(译)	松本和子 袁景利		
[标]发明人	松本和子 袁景利 王桂兰 谭明乾		
发明人	松本和子 袁景利 王桂兰 谭明乾		
IPC分类号	C07D213/36 C07D213/38 C07D401/14 C07D409/14 C07D491/14 C07D498/22 C07F5/00 C12Q1/68 G01N33/533		
CPC分类号	C07D213/36 G01N33/533 C07D401/14		
代理人(译)	段承恩 田欣		
优先权	2002063961 2002-03-08 JP 2002271924 2002-09-18 JP		
其他公开文献	CN100343668C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种新型的标识试剂，其特征在于具有与被标识物质(例如来自生物体的物质、生理活性物质等)结合的基团，容易与稀土类离子形成络合物，并且该络合物在水溶液中足够稳定，与缓冲剂的种类无关，具有足够的荧光强度和较长的荧光寿命，本发明还提供该标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物、包含该络合物的荧光标识剂，以及采用该荧光标识剂的荧光测定方法等。具体地，提供由具有2, 2':6', 2''-三吡啶骨架或者2, 6-二吡啶吡啶骨架，与被标识物质(例如来自生物体的物质、生理活性物质等)结合的基团，以及与稀土类离子形成络合物用的结合基团的化合物形成的标识试剂，以及该标识试剂与稀土类金属离子形成的络合物，包含该络合物的荧光标识剂，采用该络合物作为标识剂用的荧光标识方法，以及采用该荧光标识剂的荧光测定方法和荧光测定法用试剂。

