



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112305227 A

(43)申请公布日 2021.02.02

(21)申请号 201910703584.1

(22)申请日 2019.07.31

(71)申请人 深圳市帝迈生物技术有限公司
地址 518055 广东省深圳市南山区桃源街
道留仙大道4093号南山云谷创新产业
园南风楼2楼B

(72)发明人 邝俊韬 蔡敏

(74)专利代理机构 深圳市威世博知识产权代理
事务所(普通合伙) 44280
代理人 唐双

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

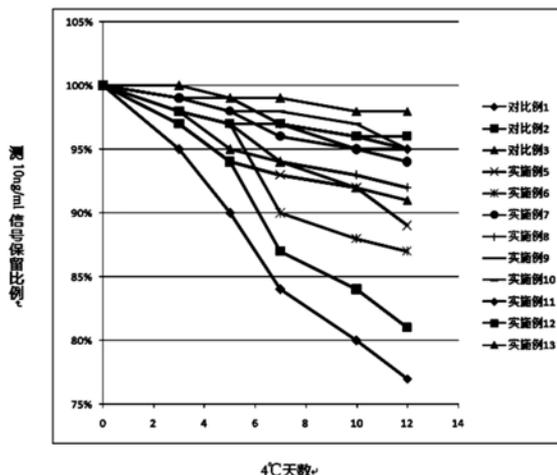
权利要求书4页 说明书17页 附图5页

(54)发明名称

自交联蛋白、配体组合物、制备方法、试剂盒及系统

(57)摘要

本申请公开了一种自交联蛋白、配体组合物、制备方法、试剂盒及系统,该为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种自交联蛋白,包括:至少第一信号蛋白和第二信号蛋白,第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白。能够解决自交联蛋白尺寸过大,导致自交联蛋白与配体结合率不高,标记不稳定、标记效率低的问题。



1. 一种自交联蛋白,其特征在于,包括:

至少第一信号蛋白和第二信号蛋白,所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成所述自交联蛋白。

2. 根据权利要求1所述的自交联蛋白,其特征在于,

所述第一信号蛋白含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种;

所述第二信号蛋白含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种;

其中,所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应连接,以形成所述自交联蛋白。

3. 根据权利要求2所述的自交联蛋白,其特征在于,

所述叠氮反应基团包括:可与所述叠氮基团形成三氮唑环的炔烃、或者与所述叠氮基团形成二氮杂环的环烯烃。

4. 根据权利要求1所述的自交联蛋白,其特征在于,

所述偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法。

5. 根据权利要求4所述的自交联蛋白,其特征在于,

所述偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

6. 根据权利要求1所述的自交联蛋白,其特征在于

所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白均为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、藻红蛋白、藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白或别藻蓝蛋白中的至少一种。

7. 一种配体组合物,其特征在于,包括:

配体;

自交联蛋白,为如权利要求1-6任一项所述的自交联蛋白;

所述配体与所述自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成所述配体组合物。

8. 根据权利要求7所述的配体组合物,其特征在于,

所述配体含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种;

所述自交联蛋白含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种;

其中,所述配体与所述自交联蛋白通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应连接,以形成所述配体组合物。

9. 根据权利要求8所述的配体组合物,其特征在于,

所述叠氮反应基团包括:可与所述叠氮基团形成三氮唑环的炔烃、或者与所述叠氮基团形成二氮杂环的环烯烃。

10. 根据权利要求7所述的配体组合物,其特征在于,

所述偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法。

11. 根据权利要求7所述的配体组合物,其特征在于,
所述配体为抗体、抗原、半抗原-载体偶联物或者亲和素中的至少一种。

12. 根据权利要求11所述的配体组合物,其特征在于,

所述抗体包括血管紧张素I抗体、NT-ProBNP抗体、肌钙蛋白抗体、甲胎蛋白抗体、癌胚抗原抗体、HIV抗原抗体、乙肝表面抗原抗体、甲状腺球蛋白抗体、肌钙蛋白I或T抗体或肌红蛋白抗体中的至少一种;

所述抗原包括:血管紧张素I抗原、NT-ProBNP抗原、肌钙蛋白抗原、甲胎蛋白抗原、癌胚抗原抗原、HIV抗原抗原、乙肝表面抗原抗原、甲状腺球蛋白抗原、肌钙蛋白I或T抗原或肌红蛋白抗原中的至少一种;

所述半抗原-载体偶联物包括醛固酮以及醛固酮半抗原蛋白偶联物、HA透明质酸以及透明质酸半抗原蛋白偶联物、血管紧张素I-载体偶联物、血管紧张素II-载体偶联物或HABP透明质酸结合蛋白中的至少一种。

13. 一种自交联蛋白的制备方法,其特征在于,用于制备如权利要求1-6任一项所述的自交联蛋白,所述方法包括:

提供至少第一信号蛋白和第二信号蛋白;

将所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成所述自交联蛋白。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述将所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接的步骤包括:将所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过点击化学反应连接;

其中,所述将所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过点击化学反应连接的步骤包括:

用第一点击化学试剂对所述第一信号蛋白进行标记,其中,所述第一点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种;

用第二点击化学试剂对所述第二信号蛋白进行标记,其中,所述第二点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种;

将标记后的所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白进行点击化学反应,以使所述第一信号蛋白连接所述第二信号蛋白,形成所述自交联蛋白。

15. 根据权利要求14所述的方法,其特征在于,

所述第一点击化学试剂和第二点击化学试剂包括DBCO试剂、Tetrazine试剂、Azide试剂、Alkyne试剂或TCO试剂中的至少一种。

16. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于,所述将所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接的步骤包括:将所述第一信号蛋白与所述第二信号蛋白通过偶联反应连接;

其中,所述偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法;

所述偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团

之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

17. 一种配体组合物的制备方法,其特征在于,所述方法包括:

提供配体和如权利要求1-6任一项所述的自交联蛋白;

将所述配体与所述自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成所述配体组合物。

18. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述将所述配体与所述自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接的步骤包括:将所述配体与所述自交联蛋白通过点击化学反应连接;

其中,所述将所述配体与所述自交联蛋白通过点击化学反应连接的步骤包括:

用第三点击化学试剂对所述配体进行标记,其中,所述第三点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种;

用第四点击化学试剂对所述自交联蛋白进行标记,其中,所述第四点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种;

将标记后的将所述配体与所述自交联蛋白进行点击化学反应,以使所述配体连接所述自交联蛋白,形成所述配体组合物。

19. 根据权利要求18所述的方法,其特征在于,

所述第三点击化学试剂和第四点击化学试剂包括DBCO试剂、Tetrazine试剂、Azide试剂、Alkyne试剂或TCO试剂中的至少一种。

20. 根据权利要求17所述的方法,其特征在于,所述将所述配体与所述自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接的步骤包括:将所述配体与所述自交联蛋白通过偶联反应连接;

其中,所述偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法;

所述偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

21. 一种试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

试剂盒本体;

第一试剂容纳位,设置在所述试剂盒本体上,用于容置至少一种如权利要求7-12任一项所述的配体组合物;

第二试剂容纳位,设置在试剂盒本体上,用于容置至少一种免疫检测组合物,所述免疫检测组合物与所述配体组合物配合,得到检测复合物。

22. 根据权利要求20所述的试剂盒,其特征在于,

所述配体组合物为标记抗体组合物;

所述免疫检测组合物包括抗体组合物和/或标记抗原。

23. 一种免疫检测分析系统,其特征在于,所述免疫检测分析系统包括:

试剂盒,所述试剂盒为权利要求20-21任一项所述的试剂盒;

样本分析仪,所述样本分析仪通过使用所述试剂盒中的所述免疫检测组合物和所述配体组合物进行待测物的检测,并输出检测结果。

24.如权利要求7-12任一项所述的配体组合物在免疫检测分析中的应用;

其中,所述配体组合物用于心肌检测、肝纤四项检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症监测或肿瘤检测。

自交联蛋白、配体组合物、制备方法、试剂盒及系统

技术领域

[0001] 本申请涉及化学及生物医学技术领域,特别是涉及一种配体组合物、制备方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 探索和发现生物体内及生命过程中蛋白质、核酸、多肽等重要生物分子的高灵敏分析检测方法,是生物医学领域研究的热点和难点。生物标记技术是该领域不可或缺的研究手段。通用的生物标记方法可以分为放射性标记、显色标记、酶标记和荧光标记等。生物标记技术是一项具有挑战性的工作,它要求这类化学反应能够在生理条件下高效特异地进行,不会与生物体系中存在的各种活性物质发生副反应。

发明内容

[0003] 本申请主要解决的技术问题是提供一种配体组合物、制备方法及其试剂盒,能够解决自交联蛋白尺寸过大,导致自交联蛋白与配体结合率不高,标记不稳定、标记效率低的问题。

[0004] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种自交联蛋白,包括:至少第一信号蛋白和第二信号蛋白,第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白。

[0005] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种配体组合物,包括:配体;自交联蛋白,为如前述的自交联蛋白;配体与自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成配体组合物。

[0006] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种自交联蛋白的制备方法,用于制备如前述的自交联蛋白,方法包括:提供至少第一信号蛋白和第二信号蛋白;将第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白。

[0007] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种配体组合物的制备方法,用于制备如前述的配体组合物,方法包括:提供配体和如前述的自交联蛋白;将配体与自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成配体组合物。

[0008] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种试剂盒,试剂盒包括:试剂盒本体;第一试剂容纳位,设置在试剂盒本体上,用于容置至少一种如前述的配体组合物;第二试剂容纳位,设置在试剂盒本体上,用于容置至少一种免疫检测组合物,免疫检测组合物与配体组合物配合,得到检测复合物。

[0009] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种免疫检测分析系统,免疫检测分析系统包括:试剂盒,试剂盒为前述的试剂盒;样本分析仪,样本分析仪通过使用试剂盒中的免疫检测组合物和配体组合物进行待测物的检测,并输出检测结果。

[0010] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供如前述的配体组合物

在免疫检测分析中的应用;其中,配体组合物用于心肌检测、肝纤四项检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症监测或肿瘤检测

[0011] 本申请的有益效果是:区别于现有技术的情况,本申请提供一种基于自交联蛋白,至少第一信号蛋白和第二信号蛋白,第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白,该自交联蛋白具有稳定性高、反应速度快、得率高的优点。同时,解决了现有技术中能够解决自交联蛋白尺寸过大,导致自交联蛋白与配体结合率不高,标记不稳定、标记效率低的问题。

附图说明

[0012] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。其中:

[0013] 图1-4是荧光信号保留比例随放置条件和时间的变化曲线图;

[0014] 图5是实施例1-3的批间差测试结果柱状图。

具体实施方式

[0015] 下面将结合本申请实施例中的附图,对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性的劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本申请保护的范围。

[0016] 本申请研发人员在研发过程中发现,在现有技术中,通常使用配体和大尺寸信号蛋白以1:1-1:3的摩尔比进行投料标记,最后获得的是多种混合比例的交联物,但每个配体实际偶联信号蛋白的个数不会超过实际投料比。另外,为了确保交联标记物的批间差异,通常还会将1:1实际偶联比的产物单独纯化出来作为后续反应物,但是这种做法虽然最大限度地降低了批间差,但对于某些特定的需要高灵敏度的产品来说,可能会造成信号扩大倍数不足,无法达到产品的性能要求。

[0017] 鉴于此,本申请提供一种自交联蛋白,自交联蛋白包括:至少第一信号蛋白和第二信号蛋白,第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白。

[0018] 具体地,第一信号蛋白和第二信号蛋白为相同的信号蛋白。自交联蛋白可以为2个、3个或者多个信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应自交联得到。其中,在信号蛋白个数为3个时,需要先将第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成第一自交联蛋白,再将第一自交联蛋白与第三信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成最终的交联蛋白。

[0019] 在偶联反应交联剂的作用下,第一信号蛋白和第二信号蛋白通过偶联反应连接,偶联反应交联剂可以为异型双功能交联剂和同型双功能交联剂。

[0020] 偶联反应方法:先将待交联的第一信号蛋白A与第一交联剂在一定条件下反应,得

到的第一信号蛋白A-第一交联剂中间体,然后再将待交联的第二信号蛋白B与第二交联剂在一定条件下反应,得到的第二信号蛋白B-第二交联剂中间体。第一信号蛋白A-第一交联剂中间体与第二信号蛋白B-第二交联剂中间体通过偶联反应形成自交联蛋白。

[0021] 偶联反应用到的交联剂包括但不限于:

[0022] 1) 氨基-氨基交联剂:基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂,如:DSG(二琥珀酰亚胺基戊二酸酯)、DST(酒石酸二琥珀酰亚胺酯)、DMA(二甲基己二酰亚胺)等。

[0023] 2) 巯基-糖类交联剂:基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的交联剂,适用于连接巯基和糖类,如:BMPH(N-β-马来酰亚胺基丙酸酰肼)、MPBH(4-(4-N-马来酰亚胺基苯基)丁酸酰肼)、PDPH(3-(2-吡啶基二硫代)丙酰肼)等。

[0024] 3) 巯基-巯基交联剂:基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂,适用于与蛋白或多肽的硫醇(还原型半胱氨酸)进行特异性共价连接,以形成稳定的硫醚键,如:BMOE(双马来酰亚胺乙烷)、BMB(1,4-双马来酰亚胺丁烷)、BMH(双马来酰亚胺己烷)等。

[0025] 4) 氨基-巯基交联剂:异型双功能蛋白交联剂适用于蛋白和其他分子的伯胺(赖氨酸)和巯基(半胱氨酸)基团之间的连接,如:SIA(琥珀酰亚胺基碘乙酸酯)、SPDP(琥珀酰亚胺基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、AMAS(N-α-马来酰亚胺基乙酰氧基琥珀酰亚胺酯)等。

[0026] 5) 羧基-氨基交联剂:适用于羧基(谷氨酸、天冬氨酸、C端)与伯胺(赖氨酸、N端)连接的碳二亚胺交联剂NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)和EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐)等。

[0027] 6) 光反应性交联剂:芳香叠氮、双丫丙啶和其他光反应(光活化)的异型双功能交联剂,如:SDA(琥珀酰亚胺基-4,4'-氮杂戊酸酯)和ANB-NOS(N-5-叠氮基-2-硝基苯甲酰氧基琥珀酰亚胺)。

[0028] 7) 化学选择性连接交联剂,如:ManNAz(N-叠氮基乙酰甘露糖胺四酰化)和GalNAz(N-叠氮基乙酰半乳糖胺四酰化)等。

[0029] 8) 双功能交联剂:如戊二醛的两个醛基分别与配体和蛋白质上的氨基形成schiff键。

[0030] 点击化学是通过小单元的拼接,来快速可靠地完成形形色色分子的化学合成。它属于正交反应的一种,通过高效、高选择性的化学反应来完成模块化的骨架连接,直接点击模块构建各类新化合物的组合化学新方法,具有如下几个特征:(1)符合绿色化学,原料易得、产率高、立体选择性好、易纯化、副产物对环境友好。(2)反应快速、高通量模块化合成,例如无铜点击化学-四嗪和环辛烯衍生物的反应速率常数大约为 $210-2,800,000\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (PBS,37°C)。(3)反应条件温和,对水、温度、氧不敏感,可以在生理条件下进行。(4)其反应模块几乎不与生物分子反应,不干扰细胞正常的生理功能。

[0031] 本实施方式可以采用以下三类点击化学反应:

[0032] 1、铜催化的生物正交反应(Copper catalyzed bioorthogonal reaction, CuAAC),是使用最为广泛的生物正交反应,也是点击化学的代表。叠氮和端炔在绝大多数化学条件下保持稳定,却可以在一价铜催化条件下,高效专一地转换为1,3-取代的三氮唑。

[0033] 2、环张力诱导的环加成反应(Strainpromoted azide-alkyne cyclo addition,

SPAAC),也被称为无铜点击化学,即在无铜条件下,依据含有炔基官能团的八元环的扩环张力,和叠氮化试剂快速高效选择性的反应。

[0034] 3、狄尔斯-阿尔德反应(Diels-Alderreaction),即基于四嗪类化合物的连接反应,这类反应无需催化剂,四嗪可以和环状烯烃或环状炔烃非常快速高效地发生逆电子需求的狄尔斯-阿尔德反应(inverse electron-demand Diels-Alderreaction,IEDDA)生成稳定的产物.这个反应体系的另一个特点是:如果将四嗪修饰到一个染料上,它会淬灭该染料的荧光,而通过与环式烯烃(比如反式环辛烯)发生IEDDA反应,四嗪的结构被破坏,染料的荧光性质就能得到恢复,从而发挥荧光增强的作用。

[0035] 区别于现有技术的情况,本申请提供一种基于自交联蛋白,至少第一信号蛋白和第二信号蛋白,第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白,该自交联蛋白具有稳定性高、反应速度快、得率高的优点。同时,解决了现有技术中能够解决自交联蛋白尺寸过大,导致自交联蛋白与配体结合率不高,标记不稳定、标记效率低的问题。

[0036] 在一实施方式中,第一信号蛋白含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种;第二信号蛋白含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种;其中,第一信号蛋白与第二信号蛋白通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应连接,以形成自交联蛋白。

[0037] 其中,上述叠氮反应基团包括:可与叠氮基团形成三氮唑环的炔烃、或者与叠氮基团形成二氮杂环的环烯烃。

[0038] 具体地,通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应,使得第一信号蛋白与第二信号蛋白连接,得到自交联蛋白。

[0039] 在一实施方式中,偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法。

[0040] 在一实施方式中,偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

[0041] 具体地,第一信号蛋白表面带有的功能基团包括但不限于羧基、氨基、羟基、巯基、醛基、糖基和咪唑基,第一信号蛋白的功能基团与第二信号蛋白上游离的功能基团偶联。偶联反应完毕后通过处理,去除未结合和其他的物质,其中处理方法包括但不限于:透析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤、盐溶与盐析、等电点沉淀法、亲和层析等。然后将得到的自交联蛋白进行使用或将其分散于储存液中进行保存。

[0042] 偶联反应中用到的缓冲液为pH为4.0-6.5的PBS缓冲液、pH为8.0-9.8的碳酸盐缓冲液、pH为7.0-8.0的0.5-5%的戊二醛溶液或pH为4.0-6.0的MES缓冲液。

[0043] 具体地,理论上任何蛋白都可以作为本申请的信号蛋白,优选的,信号蛋白具有以下性质:1)表面带有羧基(-COOH)、氨基(-NH₂)、巯基(-SH)等其他具有化学活性的功能基团的蛋白,以便与叠氮反应基团或叠氮基团偶联。2)具有偶联足够多分子容量的蛋白。3)为防止非特异性结合的产生,信号蛋白应该选用与被检测对象非同源性蛋白。4)应具有足够的

稳定性,且应该是廉价易得的。因此,信号蛋白包括但不限于:辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛IgG、鼠IgG、羊IgG、兔IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶等。

[0044] 优选的,上述第一信号蛋白与第二信号蛋白均为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、藻红蛋白、藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白或别藻蓝蛋白中的至少一种。

[0045] 本申请提供一种配体组合物,该配体组合物包括:配体和自交联蛋白。其中,自交联蛋白为上述实施方式中的自交联蛋白。自交联蛋白与配体通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成配体组合物。

[0046] 其中,偶联反应以及点击化学反应的相关技术请参考上述实施方式中的偶联反应以及点击化学反应,在此不做赘述。

[0047] 区别于现有技术的情况,本申请提供一种配体组合物,配体组合物包括:配体和自交联蛋白,自交联蛋白含有至少两个信号蛋白,其中,通过偶联反应或点击化学反应连接,使得自交联蛋白连接配体,得到含有标记基团的配体组合物,该标记基团具有稳定性高、反应速度快、得率高的优点,且标记基团的数目可调可控。本申请还实现了配体与信号蛋白的双重标记,可用于后续的免疫荧光分析,解决了现有技术中能够解决自交联蛋白尺寸过大,导致自交联蛋白与配体结合率不高,标记不稳定、标记效率低的问题。

[0048] 其中,配体含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种。自交联蛋白含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种。其中,自交联蛋白与配体通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应连接,以形成配体组合物。

[0049] 具体地,通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应,使得自交联蛋白连接配体,得到含有标记基团的配体组合物,该标记基团具有稳定性高、反应速度快、得率高的优点,且标记基团的数目可调可控。本申请还实现了配体与自交联蛋白的双重标记,可用于后续的免疫荧光分析,解决了现有技术中采用异双功能交联剂对两种蛋白质进行标记时,普遍存在标记不稳定、标记效率低、标记批间差异大、标记成本高的问题。

[0050] 其中,上述叠氮反应基团包括:可与叠氮基团形成三氮唑环的炔烃、或者与叠氮基团形成二氮杂环的环烯烃。

[0051] 其中,自交联蛋白与配体通过偶联反应连接。偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法。偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

[0052] 偶联反应方法:先将自交联蛋白C与第三交联剂在一定条件下反应,得到的自交联蛋白C-第三交联剂中间体,然后再配体D与第四交联剂在一定条件下反应,得到的配体D-第四交联剂中间体。自交联蛋白C-第三交联剂中间体与配体D-第四交联剂中间体通过偶联反应形成配体组合物。

[0053] 具体地,自交联蛋白表面带有的功能基团包括但不限于羧基、氨基、羟基、巯基、醛基、糖基和咪唑基,功能基团与配体上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联(由于本发

明已经限定自交联蛋白表面带有的功能基团与配体上游离的氨基、羧基、巯基、醛基或糖基偶联,所以本领域技术人员可以明显排除自交联蛋白上的功能基团与配体上游离的基团均为相同基团不能偶联的情况)。偶联反应完毕后通过处理,去除未结合和其他的物质,其中处理方法包括但不限于:透析、超滤、离子交换层析、凝胶过滤、盐溶与盐析、等电点沉淀法、亲和层析等。然后将得到的标记复合物中间品进行使用或将其分散于储存液中进行保存。

[0054] 偶联反应中用到的缓冲液为pH为4.0-6.5的PBS缓冲液、pH为8.0-9.8的碳酸盐缓冲液、pH为7.0-8.0的0.5-5%的戊二醛溶液或pH为4.0-6.0的MES缓冲液。

[0055] 本申请中,配体为可以与标签特异性识别的分子,例如抗体、抗原、半抗原-载体偶联物或者亲和素中的至少一种。

[0056] 优选地,上述配体为抗体。抗体包括血管紧张素I抗体、NT-ProBNP抗体、肌钙蛋白抗体、甲胎蛋白抗体、癌胚抗原抗体、HIV抗原抗体、乙肝表面抗原抗体、甲状腺球蛋白抗体、肌钙蛋白I或T抗体或肌红蛋白抗体中的至少一种。

[0057] 优选地,上述配体为抗原,抗原包括:血管紧张素I抗原、NT-ProBNP抗原、肌钙蛋白抗原、甲胎蛋白抗原、癌胚抗原抗原、HIV抗原抗原、乙肝表面抗原抗原、甲状腺球蛋白抗原、肌钙蛋白I或T抗原或肌红蛋白抗原中的至少一种。

[0058] 优选地,上述配体为半抗原-载体偶联物半抗原-载体偶联物包括醛固酮以及醛固酮半抗原蛋白偶联物、HA透明质酸以及透明质酸半抗原蛋白偶联物、血管紧张素I-载体偶联物、血管紧张素II-载体偶联物或HABP透明质酸结合蛋白中的至少一种。

[0059] 其中,醛固酮以及醛固酮半抗原蛋白偶联物可以包括醛固酮-BSA,醛固酮-OVA,醛固酮-KLH,醛固酮-各种动物IgG等。HA透明质酸以及透明质酸半抗原蛋白偶联物可以包括透明质酸-BSA,透明质酸-OVA,透明质酸-KLH,透明质酸IgG等。血管紧张素I-载体偶联物可以包括血管紧张素I-BSA,血管紧张素I-OVA,血管紧张素I-KLH,血管紧张素I-各种动物IgG等。血管紧张素II-载体偶联物可以包括血管紧张素II-BSA,血管紧张素II-OVA,血管紧张素II-KLH,血管紧张素II-各种动物IgG等。

[0060] 本申请还提供一种如前述的配体组合物在免疫检测分析中的应用。其中,配体组合物用于心肌检测、肝纤四项检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症监测或肿瘤检测。

[0061] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种自交联蛋白的制备方法,用于制备前述的自交联蛋白,自交联蛋白的制备方法包括以下步骤:

[0062] S10:提供至少第一信号蛋白和第二信号蛋白。

[0063] 具体地,第一信号蛋白和第二信号蛋白包括但不限于:辣根过氧化物酶、牛血清白蛋白、血蓝蛋白、鸡卵白蛋白、牛IgG、鼠IgG、羊IgG、兔IgG、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶或 β -半乳糖苷酶等。优选的,上述信号蛋白包括碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、藻红蛋白、藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白或别藻蓝蛋白中的至少一种。

[0064] S20:将第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成自交联蛋白。

[0065] 其中,偶联反应以及点击化学反应的相关技术请参考上述实施方式中的偶联反应以及点击化学反应,在此不做赘述。

- [0066] 上述步骤S20包括：
- [0067] S21:将第一信号蛋白与第二信号蛋白通过点击化学反应连接。
- [0068] 其中,步骤S21具体如下：
- [0069] S211:用第一点击化学试剂对第一信号蛋白进行标记。
- [0070] 其中,第一点击化学试剂和第一信号蛋白的摩尔比为10:1-120:1。
- [0071]
- [0072] 其中,第一点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种。
- [0073] S212:用第二点击化学试剂对第二信号蛋白进行标记。
- [0074] 其中,第二点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种。
- [0075] 第二点击化学试剂与第二信号蛋白的摩尔比为10:1-120:1。
- [0076] S213:将标记后的第一信号蛋白与第二信号蛋白进行点击化学反应,以使第一信号蛋白连接第二信号蛋白,形成自交联蛋白。
- [0077] 标记后的第一信号蛋白与标记后的第二信号蛋白的摩尔比为1:1。
- [0078] 上述步骤中的第一点击化学试剂和第二点击化学试剂包括DBCO试剂、Tetrazine试剂、Azide试剂、Alkyne试剂或TCO试剂中的至少一种。
- [0079] 具体地,第一点击化学试剂和第二点击化学试剂可以为含有DBCO基团、Tetrazine基团、Azide基团、Alkyne基团或TCO基团修饰的荧光标记物。
- [0080] 其中,含有DBCO基团修饰的荧光标记物可以为与和氨基反应的DBCO-C6-NHS Ester、DBCO-NHS Ester、DBCO-Sulfo-NHS Ester、DBCO-PEG4-NHS Ester、DBCO-PEG5-NHS Ester、DBCO-PEG13-NHS Ester、PC DBCO-NHS Ester;与羧基反应的DBCO-Amine、DBCO-PEG4-Amine、Sulfo DBCO-Amine、Sulfo DBCO-PEG4-Amine;与巯基反应的DBCO-Maleimide、DBCO-PEG4-Maleimide。
- [0081] 含有Tetrazine基团修饰的荧光标记物可以为与和氨基反应的Tetrazine-NHS Ester、Methyltetrazine-NHS Ester、Tetrazine-Sulfo-NHS Ester、Tetrazine-PEG5-NHS Ester、Methyltetrazine-PEG4-NHS Ester、Methyltetrazine-PEG5-NHS Ester、Methyltetrazine-PEG4-Sulfo-NHS Ester、PC Methyltetrazine-NHS Ester;与羧基反应的Methyltetrazine-Amine、Tetrazine-Amine、Methyltetrazine-Propylamine、Methyltetrazine-PEG4-Amine;与巯基反应的Methyltetrazine-PEG4-Maleimide。
- [0082] 含有Azide基团修饰的荧光标记物可以为与和氨基反应的PC Azido-NHS Ester;与羧基反应的Azido-Propylamine。
- [0083] 含有Alkyne基团修饰的荧光标记物可以为与和氨基反应的Propargyl-NHS Ester、PC Alkyne-NHS Ester;与巯基反应的Propargyl-Maleimide。
- [0084] 含有TCO基团修饰的荧光标记物可以为与和氨基反应的TCO-NHS Ester、TCO-PEG4-NHS Ester、TCO-PEG12-NHS Ester;与羧基反应的TCO-PEG3-Amine;与巯基反应的TCO-PEG3-Maleimide。
- [0085] 上述步骤S20包括：
- [0086] S22:将第一信号蛋白与第二信号蛋白通过偶联反应连接。
- [0087] 具体地,偶联反应的过程为:先将待交联的第一信号蛋白A与第一交联剂在一定条件下反应,得到的第一信号蛋白A-第一交联剂中间体,然后再将待交联的第二信号蛋白B与

第二交联剂在一定条件下反应,得到的第二信号蛋白B-第二交联剂中间体。第一信号蛋白A-第一交联剂中间体与第二信号蛋白B-第二交联剂中间体通过偶联反应形成自交联蛋白。

[0088] 其中,第一信号蛋白A与第一交联剂的摩尔比为10:1-120:1。第二信号蛋白B与第二交联剂的摩尔比为10:1-120:1。第一信号蛋白A-第一交联剂中间体与第二信号蛋白B-第二交联剂中间体的摩尔比为1:1。

[0089] 其中,偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法。偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

[0090] 本申请还提供一种配体组合物的制备方法,用于制备前述的配体组合物,制备方法包括以下步骤:

[0091] S30:提供配体和自交联蛋白。

[0092] 自交联蛋白请参见上述实施方式中的自交联蛋白,在此不做赘述。

[0093] 配体为可以与标签特异性识别的分子,例如抗体、抗原、半抗原-载体偶联物或者亲和素中的至少一种。

[0094] 优选地,上述配体为抗体。抗体包括血管紧张素I抗体、NT-ProBNP抗体、肌钙蛋白抗体、甲胎蛋白抗体、癌胚抗原抗体、HIV抗原抗体、乙肝表面抗原抗体、甲状腺球蛋白抗体、肌钙蛋白I或T抗体或肌红蛋白抗体中的至少一种。

[0095] 优选地,上述配体为抗原,抗原包括:血管紧张素I抗原、NT-ProBNP抗原、肌钙蛋白抗原、甲胎蛋白抗原、癌胚抗原抗原、HIV抗原抗原、乙肝表面抗原抗原、甲状腺球蛋白抗原、肌钙蛋白I或T抗原或肌红蛋白抗原中的至少一种。

[0096] 优选地,上述配体为半抗原-载体偶联物半抗原-载体偶联物包括醛固酮以及醛固酮半抗原蛋白偶联物、HA透明质酸以及透明质酸半抗原蛋白偶联物、血管紧张素I-载体偶联物、血管紧张素II-载体偶联物或HABP透明质酸结合蛋白中的至少一种。

[0097] 其中,醛固酮以及醛固酮半抗原蛋白偶联物可以包括醛固酮-BSA,醛固酮-OVA,醛固酮-KLH,醛固酮-各种动物IgG等。HA透明质酸以及透明质酸半抗原蛋白偶联物可以包括透明质酸-BSA,透明质酸-OVA,透明质酸-KLH,透明质酸IgG等。血管紧张素I-载体偶联物可以包括血管紧张素I-BSA,血管紧张素I-OVA,血管紧张素I-KLH,血管紧张素I-各种动物IgG等。血管紧张素II-载体偶联物可以包括血管紧张素II-BSA,血管紧张素II-OVA,血管紧张素II-KLH,血管紧张素II-各种动物IgG等。

[0098] S40:将配体与自交联蛋白通过偶联反应或点击化学反应连接,以形成配体组合物。

[0099] 其中,偶联反应以及点击化学反应的相关技术请参考上述实施方式中的偶联反应以及点击化学反应,在此不做赘述。

[0100] 区别于现有技术的情况,本申请提供一种配体组合物,配体组合物包括:配体和自交联蛋白,自交联蛋白含有至少两个信号蛋白,其中,通过偶联反应或点击化学反应连接,

使得自交联蛋白连接配体,得到含有标记基团的配体组合物,该标记基团具有稳定性高、反应速度快、得率高的优点,且标记基团的数目可调可控。本申请还实现了配体与信号蛋白的双重标记,可用于后续的免疫荧光分析,解决了现有技术中能够解决自交联蛋白尺寸过大,导致自交联蛋白与配体结合率不高,标记不稳定、标记效率低的问题。

[0101] 其中,步骤S40包括:

[0102] S41:将所述配体与所述自交联蛋白通过点击化学反应连接

[0103] 步骤S41具体包括:

[0104] S411:用第三点击化学试剂对配体进行标记。

[0105] 其中,第三点击化学试剂和配体的摩尔比为10:1-120:1。其中,第三点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的一种。

[0106] S412:用第四点击化学试剂对自交联蛋白进行标记。

[0107] 第四点击化学试剂和自交联蛋白的摩尔比为10:1-120:1。其中,第四点击化学试剂含有叠氮基团或叠氮反应基团中的另一种。

[0108] S413:将标记后的配体与标记后的自交联蛋白进行点击化学反应,以自交联蛋白连接配体,形成配体组合物。

[0109] 具体地,标记后的配体与标记后的自交联蛋白进行点击化学反应时,标记后的配体与标记后的自交联蛋白的摩尔比为1:1-1:3。点击化学反应用到的缓冲液包括但不限于:PBS、Tris-HCl、BS、MES、HEPES、MOPS、醋酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、碳酸缓冲液等等。

[0110] 其中,步骤S40包括:

[0111] S42:将配体与自交联蛋白通过偶联反应连接。

[0112] 具体地,偶联反应的过程为:先将自交联蛋白C与第三交联剂在一定条件下反应,得到的自交联蛋白C-第三交联剂中间体,然后再配体D与第四交联剂在一定条件下反应,得到的配体D-第四交联剂中间体。自交联蛋白C-第三交联剂中间体与配体D-第四交联剂中间体通过偶联反应形成配体组合物。

[0113] 其中,自交联蛋白C与第三交联剂的摩尔比为10:1-120:1。配体D与第四交联剂的摩尔比为10:1-120:1。自交联蛋白C-第三交联剂中间体与配体D-第四交联剂中间体的摩尔比为1:1-1:3。

[0114] 其中,偶联反应采用的方法为混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、戊二酸酐法、重氮化法、琥珀酸酐法、羰基二咪唑法或过碘酸钠法。偶联反应中用到的交联剂为基于NHS-酯和亚氨酸酯反应性基团的同型双功能氨基反应性蛋白交联剂、基于马来酰亚胺和酰肼反应基团的巯基-糖类交联剂、基于马来酰亚胺或吡啶二巯基反应基团的同型双功能交联剂、适用于蛋白和其他分子的伯胺和巯基基团之间的连接的异型双功能蛋白交联剂、适用于羧基与伯胺连接的碳二亚胺交联剂、光反应性交联剂中的异型双功能交联剂、化学选择性连接交联剂或双功能交联剂。

[0115] 本申请提供一种试剂盒,该试剂盒包括:试剂盒本体、第一试剂容纳位以及第二试剂容纳位。

[0116] 第一试剂容纳位设置在试剂盒本体上,用于容置至少一种前述的配体组合物。第二试剂容纳位设置在试剂盒本体上,用于容置至少一种免疫检测组合物,免疫检测组合物

与配体组合物配合,得到检测复合物。

[0117] 其中,配体组合物为标记抗体组合物。免疫检测组合物包括抗体组合物和/或标记抗原。

[0118] 本申请提供一种免疫检测分析系统,免疫检测分析系统包括:试剂盒,试剂盒为前述的试剂盒。样本分析仪,样本分析仪通过使用试剂盒中的免疫检测组合物和配体组合物进行待测物的检测,并输出检测结果。

[0119] 具体地,免疫检测分析系统包括:试剂盒;样本分析仪,样本分析仪通过使用试剂盒中的免疫检测组合物和检测抗体组合物进行不同待测物的检测,并输出检测结果。

[0120] 在本实施方式中,样本分析仪使用的检测抗体上连接金属纳米颗粒和荧光标记物,金属纳米颗粒产生的等离子体共振使荧光标记物发出的荧光信号得到增强,能够有效提高检测灵敏度。

[0121] 而免疫荧光分析仪包括流式细胞分析仪、酶标仪或荧光显微镜等通过荧光信号进行定性和/或定量检测的仪器。而试剂盒的具体技术好处和技术细节已经在前文进行了详细阐释,故此处不再赘述。

[0122] 免疫检测分析系统用于心肌检测、肝纤四项检测、高血压检测、甲状腺检测、心血管检测、性腺检测、肾功能检测、骨代谢检测、糖代谢检测、传染病检测、自身免疫性疾病检测、产前筛查、药物检测、肝纤维化检测、EB病毒检测、炎症监测或肿瘤检测。

[0123] 下面通过实施例对本申请的技术方案进行详细阐释

[0124] 实施例1

[0125] 同型双功能制备RPE自交联蛋白

[0126] 实验步骤:

[0127] a) 配制足量含2%的戊二醛0.1M PBS缓冲液备用。

[0128] b) 1.7mg (6.8 μ mol) RPE加入含2%的戊二醛0.1mM PBS缓冲液中,反应终体积为1mL,37 $^{\circ}$ C缓慢振荡反应2h。

[0129] c) 反应结束后用超滤管进行纯化除去戊二醛,加入1mL 0.1M PBS溶液获得RPE自交联蛋白,放置在-20 $^{\circ}$ C保存。

[0130] 实施例2:

[0131] 异型双功能制备RPE自交联蛋白

[0132] 实验步骤:

[0133] a) 取1mg (6.7 μ mol) RPE,不稀释,加入20mM SPDP (使RPE:SPDP摩尔比为1:20),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。用超滤管纯化产物,用1M MOPS (pH 8.0) 将RPE浓度调整至5-10mg/mL。由于SPDP和SMCC反应需要游离巯基,因此上述得到的产物需要用DTT处理。用1M MOPS (pH 8.0) 配制足量10mg/mL DTT溶液,在之前得到的产物中按照每100 μ L加入10 μ L 10mg/ml DTT比例加入DTT,用枪吸打混匀,室温避光处理30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE-SPDP浓度调整至10mg/mL待用。

[0134] b) RPE-SMCC制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 信号蛋白RPE,加入100mM PBS (pH 7.3) 和20mM SMCC (使RPE最终反应浓度为10mg/mL,摩尔比RPE:SMCC=1:10),混匀,避光,37 $^{\circ}$ C 30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE-SMCC浓度调整至10mg/mL待用。

[0135] c) 自交联蛋白制备:将步骤a收集的液体RPE-SPDP加入步骤b获得的RPE-SMCC,混合均匀后离心,37°C反应过夜。将反应完成后的标记物放置-20°C保存。

[0136] 实施例3:

[0137] 点击化学制备RPE自交联蛋白

[0138] 实验步骤:

[0139] a) RPE-Azide制备:取1mg (6.7 μ mol) RPE,不稀释,加入20mM Azide-NHS (使RPE:Azide-NHS摩尔比为1:20) (也可以采用其他偶联方式将Azide标记在RPE上),混匀,避光37°C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE-Azide浓度调整至10mg/mL待用。

[0140] b) RPE-Alkyne制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 信号蛋白RPE,不稀释,加入20mM Alkyne-NHS (使RPE:Alkyne-NHS摩尔比为1:20) (也可以采用其他偶联方式将Alkyne标记在抗体上),混匀,避光37°C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE-Alkyne浓度调整至10mg/mL待用。

[0141] c) 自交联蛋白制备:将步骤a收集的液体RPE-Azide加入步骤b获得的RPE-Alkyne,混合均匀后加入铜催化剂混匀,37°C反应45min。将反应完成后的标记物放置-20°C保存备用。

[0142] 实施例4

[0143] 实施例1-3的批间差测试

[0144] 对实施例1-3均进行三批次的制备,对各自的三批次和AFP以同一方法进行偶联。以另一株AFP抗体进行磁珠偶联,三批次均已此磁珠作为固相,进行三批次的试剂盒测定,实验结果请见表1以及说明书附图5。

[0145] 表1:

[0146]

AFP 浓度 ng/ml	实施例 1			实施例 2			实施例 3		
	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3
0	1425	584	241	84	89	94	81	92	86
10	12452	3256	2145	3595	3658	3895	5669	5789	5987
100	102125	54154	24574	32541	30214	29548	62141	60245	63548
1000	385412	201252	114521	145895	153698	164874	324522	326996	341254
2000	542541	301252	214574	230215	245122	254125	478541	487542	495887

[0147]

[0148] 对比例1

[0149] 异型功能交联制备配体组合物 (配体连接信号蛋白)

[0150] 实验步骤:

[0151] a) b-AFP-SPDP制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM SPDP (使b-AFP:SPDP摩尔比为1:20),混匀,避光37°C反应30min。用超滤管纯化产物,用1M MOPS (pH 8.0) 将Ab浓度调整至5-10mg/mL。由于SPDP和SMCC反应需要游离巯基,因此上述得到的产物需要用DTT处理。用1M MOPS (pH 8.0) 配制足量10mg/mL DTT溶液,在之前得到的产物中按照每100 μ L加入10 μ L 10mg/ml DTT比例加入DTT,用枪吸打混匀,室温避光处理30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将b-AFP-SPDP浓度调整至10mg/mL待用。

[0152] b) RPE-SMCC制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 信号蛋白RPE,加入100mM PBS (pH 7.3) 和20mM SMCC (使RPE最终反应浓度为10mg/mL,摩尔比RPE:SMCC=1:10),混匀,避光,37 $^{\circ}$ C 30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE-SMCC浓度调整至10mg/mL待用。

[0153] c) b-AFP-RPE制备:将步骤a收集的液体b-AFP-SPDP加入步骤b获得的RPE-SMCC,混合均匀后离心,37 $^{\circ}$ C反应过夜。将反应完成后的标记物放置-20 $^{\circ}$ C保存。

[0154] 对比例2

[0155] 同型功能交联制备配体组合物(配体连接信号蛋白)

[0156] 实验步骤:

[0157] a) 配制足量含2%的戊二醛0.1M PBS缓冲液备用。

[0158] b) 取1mg (6.7 μ mol) b-AFP和1.7mg (6.8 μ mol) RPE加入含2%的戊二醛0.1M PBS缓冲液中,反应终体积为1mL,37 $^{\circ}$ C缓慢振荡反应2h。

[0159] c) 反应结束后用超滤管进行纯化除去戊二醛,加入1mL 0.1M PBS溶液获得b-AFP-RPE,放置在-20 $^{\circ}$ C保存。

[0160] 对比例3

[0161] 点击化学制备配体组合物(配体连接信号蛋白)

[0162] 实验步骤:

[0163] a) b-AFP-Azide制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM Azide-NHS (使b-AFP:Azide-NHS摩尔比为1:20) (也可以采用其他偶联方式将Azide标记在抗体上),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将b-AFP-Azide浓度调整至10mg/mL待用。

[0164] b) RPE-Alkyne制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 信号蛋白RPE,不稀释,加入20mM Alkyne-NHS (使RPE:Alkyne-NHS摩尔比为1:20) (也可以采用其他偶联方式将Alkyne标记在抗体上),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE-Alkyne浓度调整至10mg/mL待用。

[0165] c) b-AFP-RPE制备:将步骤a收集的液体b-AFP-Azide加入步骤b获得的RPE-Alkyne,混合均匀后加入铜催化剂混匀,37 $^{\circ}$ C反应45min。将反应完成后的标记物放置-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0166] 实施例5

[0167] 异型功能交联剂制备配体组合物(配体连接实施例1得到的RPE自交联蛋白)

[0168] a) b-AFP-SPDP制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM SPDP (使b-AFP:SPDP摩尔比为1:20),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。用超滤管纯化产物,用1M MOPS (pH 8.0) 将Ab浓度调整至5-10mg/mL。由于SPDP和SMCC反应需要游离巯基,因此上述得到的产物需要用DTT处理。用1M MOPS (pH 8.0) 配制足量10mg/mL DTT溶液,在之前得到的产物中按照每100 μ L加入10 μ L 10mg/ml DTT比例加入DTT,用枪吸打混匀,室温避光处理30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将b-AFP-SPDP浓度调整至10mg/mL待用。

[0169] b) RPE-SMCC制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 实施例1的RPE自交联蛋白,加入100mM PBS (pH 7.3) 和20mM SMCC (使RPE自交联蛋白最终反应浓度为10mg/mL,摩尔比RPE自交联蛋白:SMCC=1:10),混匀,避光,37 $^{\circ}$ C 30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS

(pH7.3)将RPE自交联蛋白-SMCC浓度调整至10mg/mL待用。

[0170] c) b-AFP-RPE自交联蛋白制备:将步骤a收集的液体b-AFP-SPDP加入步骤b获得的RPE自交联蛋白-SMCC,混合均匀后离心,37°C反应过夜。将反应完成后的标记物放置-20°C保存。

[0171] 实施例6

[0172] 同型功能交联制备配体组合物(配体连接实施例1得到的RPE自交联蛋白)

[0173] a) 配制足量含2%的戊二醛0.1M PBS缓冲液备用。

[0174] b) 取1mg (6.7 μ mol) b-AFP和1.7mg (6.8 μ mol) 实施例1的RPE自交联蛋白加入含2%的戊二醛0.1mM PBS缓冲液中,反应终体积为1mL,37°C缓慢振荡反应2h。

[0175] c) 反应结束后用超滤管进行纯化除去戊二醛,加入1mL 0.1M PBS溶液获得b-AFP-RPE自交联蛋白,放置在-20°C保存。

[0176] 实施例7

[0177] 点击化学制备配体组合物(配体连接实施例1得到的RPE自交联蛋白)

[0178] a) b-AFP-Azide制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM Azide-NHS(使b-AFP:Azide-NHS摩尔比为1:20)(也可以采用其他偶联方式将Azide标记在抗体上),混匀,避光37°C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3)将b-AFP-Azide浓度调整至10mg/mL待用。

[0179] b) RPE-Alkyne制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 实施例1的RPE自交联蛋白,不稀释,加入20mM Alkyne-NHS(使RPE自交联蛋白:Alkyne-NHS摩尔比为1:20)(也可以采用其他偶联方式将Alkyne标记在抗体上),混匀,避光37°C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3)将RPE自交联蛋白-Alkyne浓度调整至10mg/mL待用。

[0180] c) b-AFP-RPE制备:将步骤a收集的液体b-AFP-Azide加入步骤b获得的RPE自交联蛋白-Alkyne,混合均匀后加入铜催化剂混匀,37°C反应45min。将反应完成后的标记物放置-20°C保存备用。

[0181] 实施例8

[0182] 异型功能交联剂制备配体组合物(配体连接实施例2得到的RPE自交联蛋白)

[0183] a) b-AFP-SPDP制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM SPDP(使b-AFP:SPDP摩尔比为1:20),混匀,避光37°C反应30min。用超滤管纯化产物,用1M MOPS (pH 8.0)将Ab浓度调整至5-10mg/mL。由于SPDP和SMCC反应需要游离巯基,因此上述得到的产物需要用DTT处理。用1M MOPS (pH 8.0)配制足量10mg/mL DTT溶液,在之前得到的产物中按照每100 μ L加入10 μ L 10mg/ml DTT比例加入DTT,用枪吸打混匀,室温避光处理30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3)将b-AFP-SPDP浓度调整至10mg/mL待用。

[0184] b) RPE-SMCC制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 实施例2的RPE自交联蛋白,加入100mM PBS (pH 7.3)和20mM SMCC(使RPE自交联蛋白最终反应浓度为10mg/mL,摩尔比RPE自交联蛋白:SMCC=1:10),混匀,避光,37°C 30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH7.3)将RPE自交联蛋白-SMCC浓度调整至10mg/mL待用。

[0185] c) b-AFP-RPE自交联蛋白制备:将步骤a收集的液体b-AFP-SPDP加入步骤b获得的RPE自交联蛋白-SMCC,混合均匀后离心,37°C反应过夜。将反应完成后的标记物放置-20°C保存。

[0186] 实施例9

[0187] 同型功能交联制备配体组合物(配体连接实施例2得到的RPE自交联蛋白)

[0188] a) 配制足量含2%的戊二醛0.1M PBS缓冲液备用。

[0189] b) 取1mg (6.7 μ mol) b-AFP和1.7mg (6.8 μ mol) 实施例2的RPE自交联蛋白加入含2%的戊二醛0.1mM PBS缓冲液中,反应终体积为1mL,37 $^{\circ}$ C缓慢振荡反应2h。

[0190] c) 反应结束后用超滤管进行纯化除去戊二醛,加入1mL 0.1M PBS溶液获得b-AFP-RPE自交联蛋白,放置在-20 $^{\circ}$ C保存。

[0191] 实施例10

[0192] 点击化学制备配体组合物(配体连接实施例2得到的RPE自交联蛋白)

[0193] a) b-AFP-Azide制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM Azide-NHS(使b-AFP:Azide-NHS摩尔比为1:20)(也可以采用其他偶联方式将Azide标记在抗体上),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将b-AFP-Azide浓度调整至10mg/mL待用。

[0194] b) RPE-Alkyne制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 实施例2的RPE自交联蛋白,不稀释,加入20mM Alkyne-NHS(使RPE自交联蛋白:Alkyne-NHS摩尔比为1:20)(也可以采用其他偶联方式将Alkyne标记在抗体上),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE自交联蛋白-Alkyne浓度调整至10mg/mL待用。

[0195] c) b-AFP-RPE制备:将步骤a收集的液体b-AFP-Azide加入步骤b获得的RPE自交联蛋白-Alkyne,混合均匀后加入铜催化剂混匀,37 $^{\circ}$ C反应45min。将反应完成后的标记物放置-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0196] 实施例11

[0197] 异型功能交联剂制备配体组合物(配体连接实施例3得到的RPE自交联蛋白)

[0198] a) b-AFP-SPDP制备:取1mg (6.7 μ mol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM SPDP(使b-AFP:SPDP摩尔比为1:20),混匀,避光37 $^{\circ}$ C反应30min。用超滤管纯化产物,用1M MOPS (pH 8.0) 将Ab浓度调整至5-10mg/mL。由于SPDP和SMCC反应需要游离巯基,因此上述得到的产物需要用DTT处理。用1M MOPS (pH 8.0) 配制足量10mg/mL DTT溶液,在之前得到的产物中按照每100 μ L加入10 μ L 10mg/ml DTT比例加入DTT,用枪吸打混匀,室温避光处理30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将b-AFP-SPDP浓度调整至10mg/mL待用。

[0199] b) RPE-SMCC制备:取1.7mg (6.8 μ mol) 实施例3的RPE自交联蛋白,加入100mM PBS (pH 7.3) 和20mM SMCC(使RPE自交联蛋白最终反应浓度为10mg/mL,摩尔比RPE自交联蛋白:SMCC=1:10),混匀,避光,37 $^{\circ}$ C 30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH7.3) 将RPE自交联蛋白-SMCC浓度调整至10mg/mL待用。

[0200] c) b-AFP-RPE自交联蛋白制备:将步骤a收集的液体b-AFP-SPDP加入步骤b获得的RPE自交联蛋白-SMCC,混合均匀后离心,37 $^{\circ}$ C反应过夜。将反应完成后的标记物放置-20 $^{\circ}$ C保存。

[0201] 实施例12

[0202] 同型功能交联制备配体组合物(配体连接实施例3得到的RPE自交联蛋白)

[0203] a) 配制足量含2%的戊二醛0.1M PBS缓冲液备用。

[0204] b) 取1mg (6.7 μ mol) b-AFP和1.7mg (6.8 μ mol) 实施例3的RPE自交联蛋白加入含2%

的戊二醛0.1mM PBS缓冲液中,反应终体积为1mL,37℃缓慢振荡反应2h。

[0205] c) 反应结束后用超滤管进行纯化除去戊二醛,加入1mL 0.1M PBS溶液获得b-AFP-RPE自交联蛋白,放置在-20℃保存。

[0206] 实施例13

[0207] 点击化学制备配体组合物(配体连接实施例3得到的RPE自交联蛋白)

[0208] a) b-AFP-Azide制备:取1mg (6.7μmol) b-AFP抗体,不稀释,加入20mM Azide-NHS (使b-AFP:Azide-NHS摩尔比为1:20) (也可以采用其他偶联方式将Azide标记在抗体上),混匀,避光37℃反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将b-AFP-Azide浓度调整至10mg/mL待用。

[0209] b) RPE-Alkyne制备:取1.7mg (6.8μmol) 实施例3的RPE自交联蛋白,不稀释,加入20mM Alkyne-NHS (使RPE自交联蛋白:Alkyne-NHS摩尔比为1:20) (也可以采用其他偶联方式将Alkyne标记在抗体上),混匀,避光37℃反应30min。反应结束后用超滤管纯化,最终加入0.1M PBS (pH 7.3) 将RPE自交联蛋白-Alkyne浓度调整至10mg/mL待用。

[0210] c) b-AFP-RPE制备:将步骤a收集的液体b-AFP-Azide加入步骤b获得的RPE自交联蛋白-Alkyne,混合均匀后加入铜催化剂混匀,37℃反应45min。将反应完成后的标记物放置-20℃保存备用。

[0211] 实施例14:

[0212] 对比例1-3、实施例5-13试剂盒的反应速率对比

[0213] 结果请参见表2:

[0214] 表2:

反应时间 min	对比例 1	对比例 2	对比例 3	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13
5	2823	563	3457	3698	875	4895	3789	995	5874	4547	1144	7049
10	11265	1150	8761	12541	1458	9452	13584	1689	12155	15425	1821	18541
15	42732	2354	37765	48758	2659	40258	49851	2925	47521	61255	3269	53652
20	83798	4587	57912	104785	5125	63258	112541	5412	73254	125482	6025	85696
30	162284	8769	165723	189561	10214	195621	196321	12361	215622	225412	13652	212562
45	217731	17752	278464	236485	19652	301458	258745	20198	386952	302592	22145	412542
60	286792	27856	283912	344785	29685	321452	345895	33256	395412	421541	39562	452621
120	339299	54124	279436	358411	57485	312589	352641	64125	384512	412541	71452	459562
180	342267	78127	284252	362145	79854	323652	362125	84511	392141	429666	94582	452145
240	343974	90523	295485	374512	112541	321478	374521	112592	398741	420141	130251	459854
360	344216	107881	312541	387458	126584	329658	370125	126596	390256	423698	148952	452898
540	341552	115775	301487	375698	126585	324585	354125	132592	398541	429585	150255	451789
所需 时间 min	120 min	360 min	45 min	60 min	240 min	45 min	60 min	240 min	45 min	60 min	240 min	45 min

[0217] 实施例15:

[0218] 对比例1-3、实施例5-13的稳定性实验

[0219] 具体地,将不同方法得到的b-AFP-RPE标记配体组合物取一部分放到4℃和37℃放置一定天数,用于检测和10ng/mL和1000ng/mL的AFP样本得到荧光信号,根据荧光信号的变

化,比较同一制备方法得到的b-AFP-RPE标记配体组合物的稳定性。

[0220] 稳定性实验结果请参见表3-6以及说明书附图1-4,说明书附图1-4为荧光信号保留比例随放置条件和时间的变化曲线图。

[0221] 表3:4℃测10ng/ml信号保留比例

天数	对比例 1	对比例 2	对比例 3	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	95%	97%	98%	97%	98%	99%	98%	99%	99%	98%	98%	100%
5	90%	94%	95%	94%	97%	98%	97%	99%	98%	97%	97%	99%
7	84%	87%	94%	93%	90%	96%	94%	97%	98%	97%	97%	99%
10	80%	84%	92%	92%	88%	95%	93%	96%	97%	95%	96%	98%
12	77%	81%	91%	89%	87%	94%	92%	95%	95%	95%	96%	98%

[0223] 表4:37℃测10ng/ml信号保留比例

天数	对比例 1	对比例 2	对比例 3	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	95%	97%	95%	98%	98%	99%	99%	99%	99%	97%	99%	99%
5	84%	87%	90%	94%	95%	97%	98%	97%	99%	97%	98%	99%
7	74%	82%	85%	92%	94%	95%	98%	97%	98%	95%	96%	97%
10	65%	80%	80%	91%	92%	93%	95%	96%	97%	94%	95%	96%
12	60%	72%	78%	90%	91%	92%	94%	95%	96%	92%	93%	96%

[0225] 表5:4℃测1000ng/ml信号保留比例

天数	对比例 1	对比例 2	对比例 3	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	96%	96%	97%	98%	99%	99%	99%	99%	100%	97%	99%	100%
5	91%	94%	94%	97%	99%	99%	94%	99%	99%	97%	98%	100%
7	88%	90%	92%	94%	97%	97%	93%	98%	98%	96%	96%	100%
10	84%	87%	90%	92%	92%	95%	92%	98%	98%	95%	95%	99%
12	78%	85%	90%	88%	90%	95%	92%	97%	97%	95%	95%	98%

[0227] 表6:37℃测1000ng/ml信号保留比例

天数	对比例 1	对比例 2	对比例 3	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13
0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
3	96%	95%	95%	98%	99%	99%	99%	99%	98%	99%	99%	99%
5	91%	89%	91%	97%	98%	99%	98%	99%	98%	99%	99%	99%
7	84%	87%	89%	96%	96%	97%	97%	97%	97%	98%	98%	98%
10	74%	84%	87%	94%	95%	95%	94%	93%	95%	98%	98%	98%
12	70%	75%	82%	92%	93%	95%	92%	91%	92%	94%	93%	94%

[0229] 实施例16:

[0230] 对比例1-3、实施例5-13的检测灵敏度实验

[0231] 对10ng/ml的样本用AFP为0的血清进行梯度稀释,进行测试。进行灵敏度测试。灵敏度检测实验结果请参见表7。

[0232] 表7:

AFP 浓度 ng/ml	对比例 1	对比例 2	对比例 3	实施例 5	实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	实施例 11	实施例 12	实施例 13
10	8734	2711	4573	12452	3595	5669	13254	3985	6985	15425	4589	8695
5	4154	1251	3214	9585	2452	4125	9852	2741	5456	12541	3145	6985
2.5	2536	521	1569	7154	1542	2045	7458	1854	4125	7487	2258	4147
1.25	1895	214	714	5154	714	1254	5854	925	2454	5148	1258	2477
0.63	1596	154	354	2141	325	699	2654	412	1496	3854	878	1458
0.31	1548	132	169	1684	145	345	1623	226	744	2458	547	857
0.16	1596	125	142	1598	142	165	1525	201	298	1845	314	454
0.08	1436	98	109	1526	124	112	1714	154	245	1569	165	285
0.04	1548	102	122	1541	98	134	1659	112	185	1658	112	185
0	1530	80	73	1425	84	81	1745	86	95	1584	84	96
灵敏度	1.25	0.63	0.31	0.63	0.31	0.16	0.63	0.31	0.16	0.31	0.08	0.04

[0233]

[0234] 综上所述,本申请配体组合物具有以下优势:

[0235] 1) 对上述对比例1-3、实施例5-13配体组合物的反应速率对比,可以看出:实施例5、8、11反应速率优于对比例1的反应速率,实施例6、9、12反应速率优于对比例2的反应速率,实施例7、10、13反应速率优于对比例3的反应速率,明显地,点击化学的配体组合物的制备反应速率更快;

[0236] 2) 对上述实施例1-3的批间差实验,可以看出:实施例3的批间差明显优于实施例1-2;

[0237] 4) 对上述对比例1-3、实施例5-13配体组合物的稳定性实验,可以看出:实施例5、8、11稳定性优于对比例1的稳定性,实施例6、9、12稳定性优于对比例2的稳定性,实施例7、10、13稳定性优于对比例3的稳定性,明显地,点击化学的配体组合物更稳定;

[0238] 5) 对上述对比例1-2、实施例1-3的检测灵敏度实验,可以看出:对上述对比例1-3、实施例5-13配体组合物的稳定性实验,可以看出:

[0239] 实施例5、8、11检测灵敏度优于对比例1的检测灵敏度,实施例6、9、12检测灵敏度优于对比例2的检测灵敏度,实施例7、10、13检测灵敏度优于对比例3的检测灵敏度,明显地,点击化学的配体组合物检测灵敏度更高。

[0240] 本申请通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应,使得信号蛋白连接配体,得到含有标记基团的配体组合物,该标记基团具有稳定性高、反应速度快、得率高的优点,且标记基团的数目可调可控。本申请还实现了配体与信号蛋白的双重标记,可用于后续的免疫荧光分析,解决了现有技术中采用异双功能交联剂对两种蛋白质进行标记时,普遍存在标记不稳定、标记效率低、标记批间差异大、标记成本高的问题。

[0241] 以上所述仅为本申请的实施方式,并非因此限制本申请的专利范围,凡是利用本申请说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本申请的专利保护范围内。

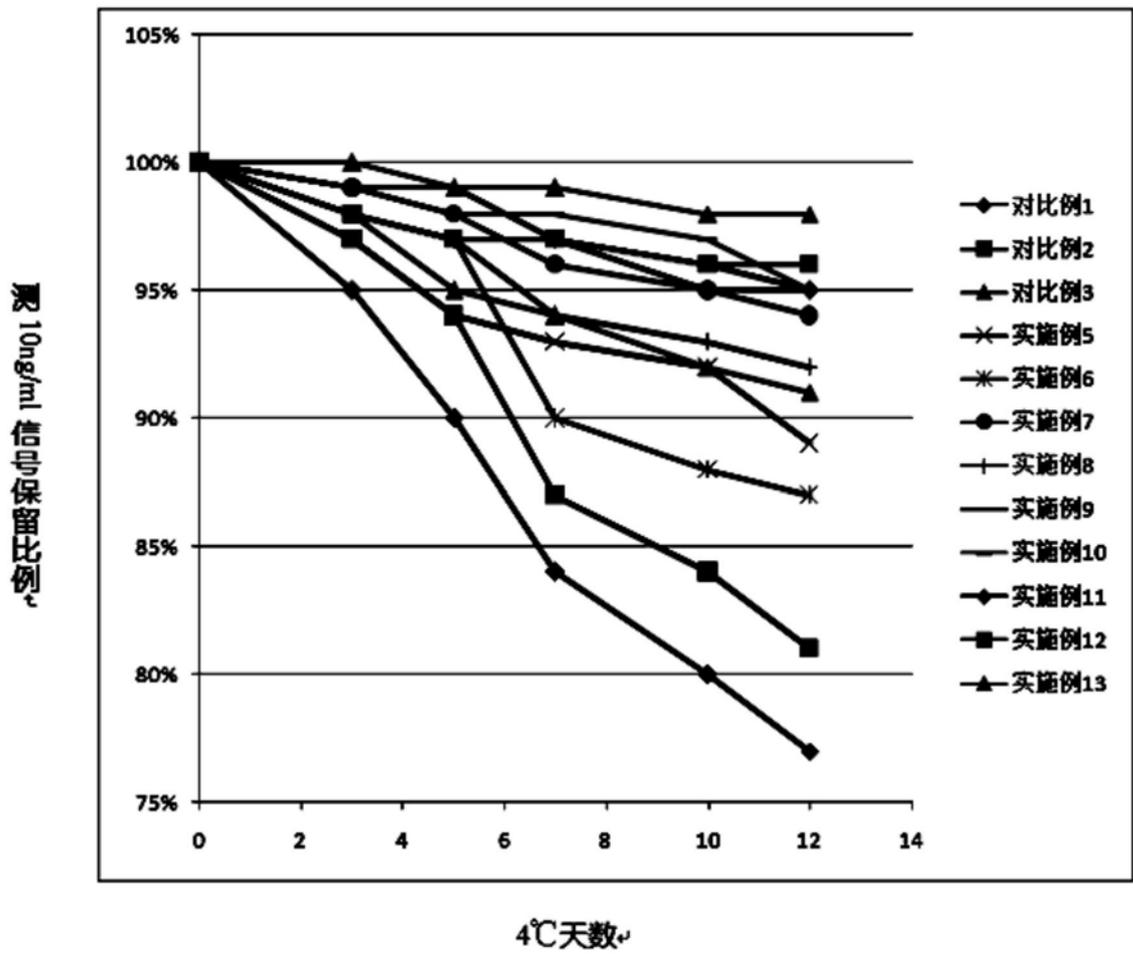


图1

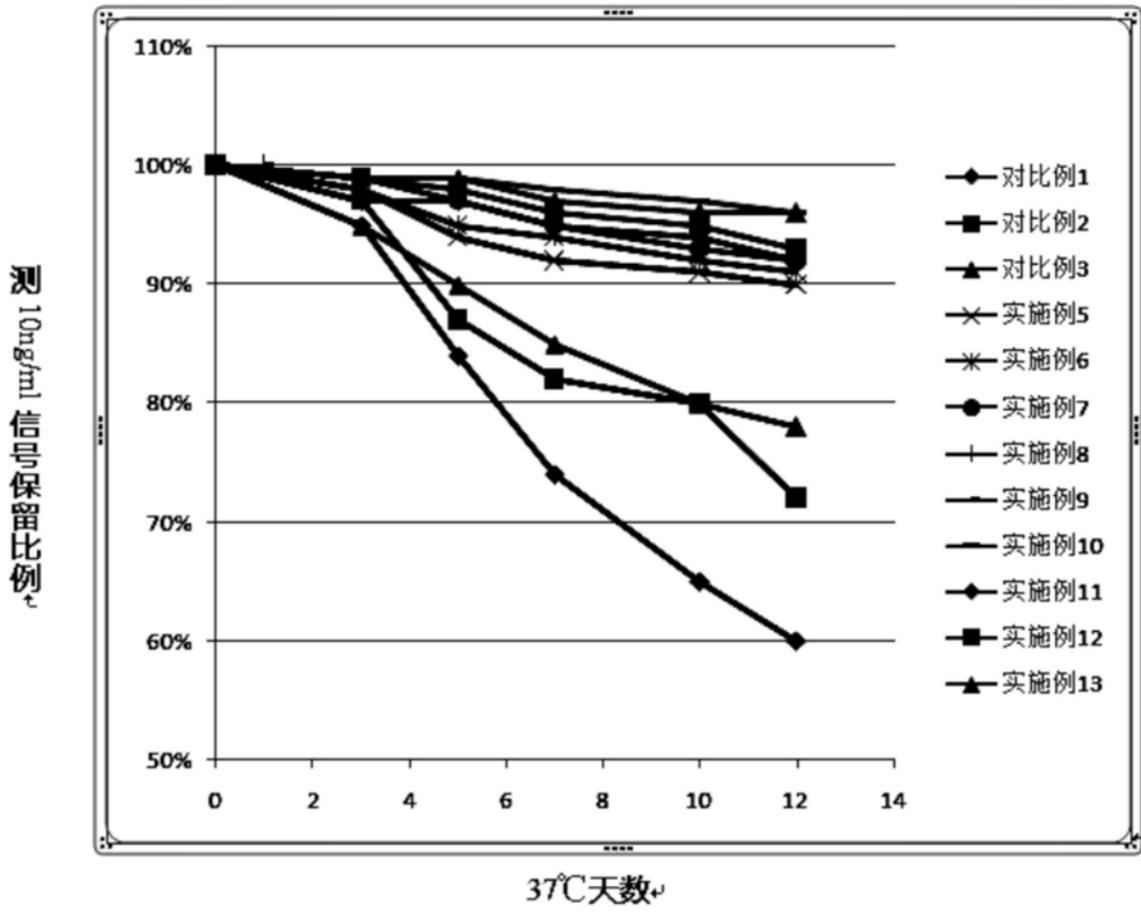


图2

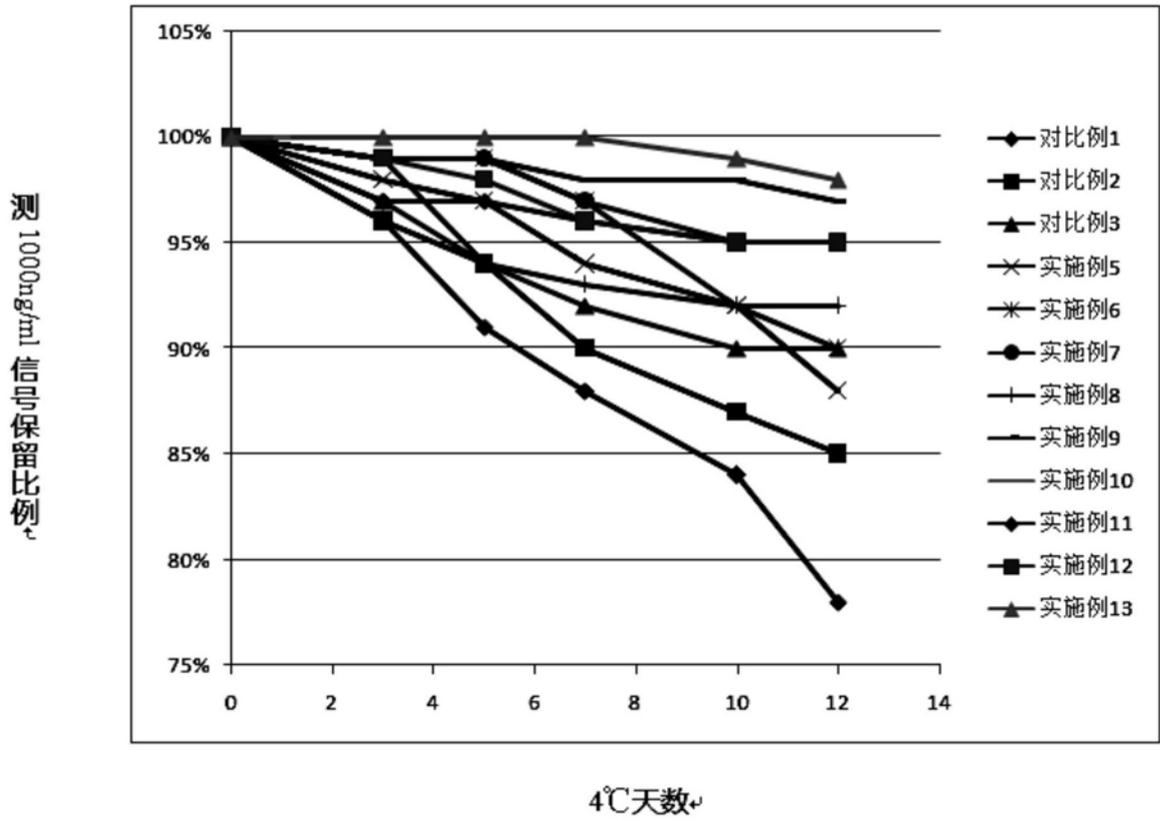


图3

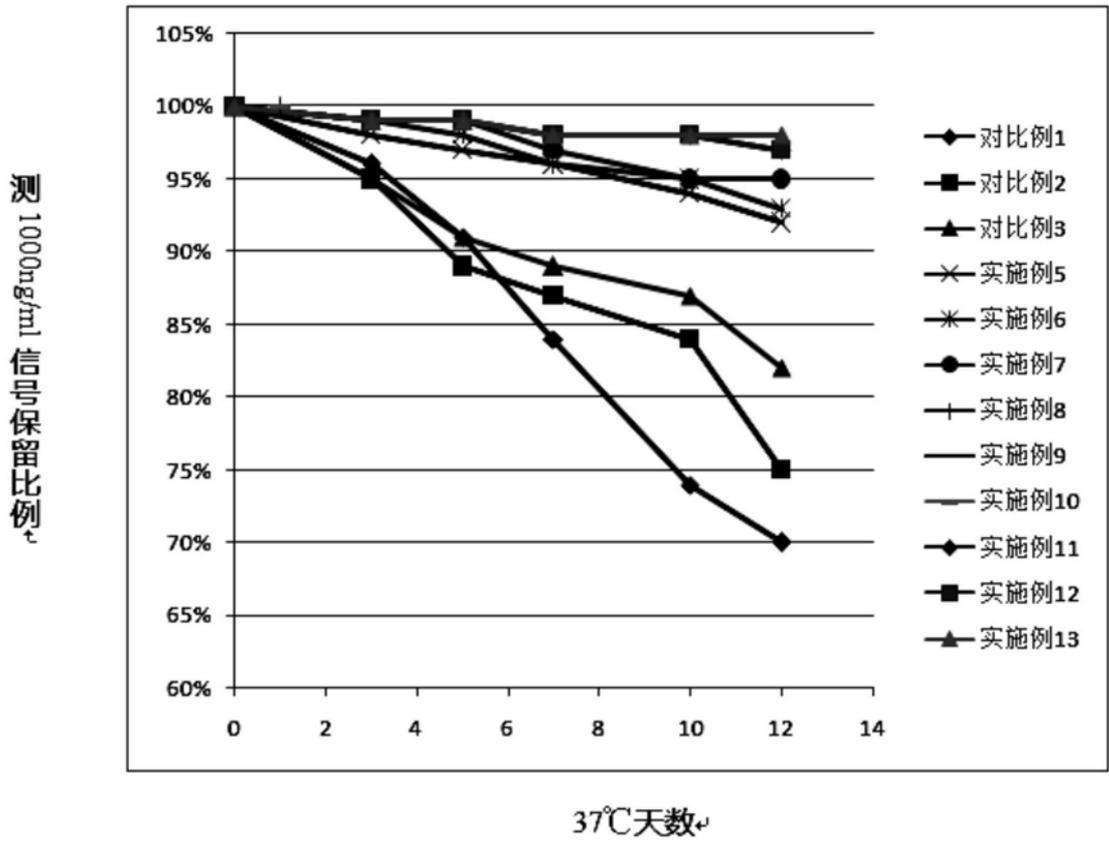


图4

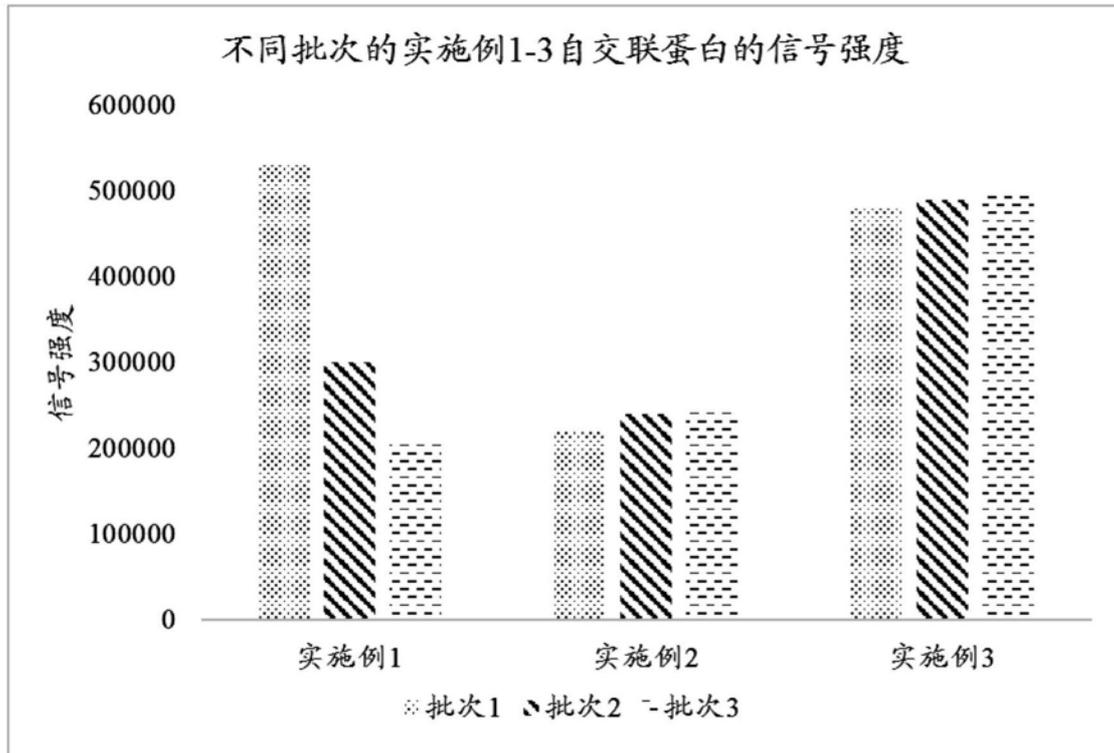


图5