



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102012425 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 201010610282. 9

(22) 申请日 2010. 12. 29

(71) 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路 94 号

(72) 发明人 张奇 白钢 侯洁 白芳 高智慧
潘鹏炜

(74) 专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限公司 12002

代理人 侯力

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

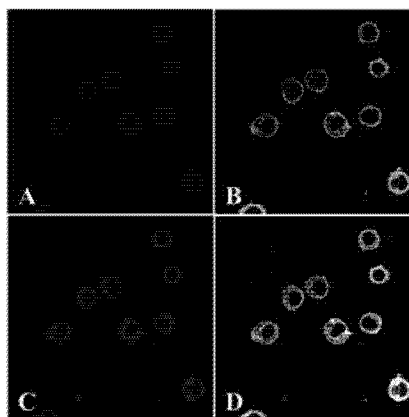
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种新的免疫荧光标记方法

(57) 摘要

一种新的免疫荧光标记方法。本发明分别合成了含有叠氮基团和炔基基团的两个关键化合物,将前者与抗体偶联获得叠氮化 IgG,再与含有荧光基团的后者进行点击化学反应,实现荧光显色。采用该技术,在细胞水平进行染色分析,叠氮标记抗体可有效应用于免疫荧光染色分析;并且采用本发明开发的方法标记的抗体可与其他现有的免疫荧光技术同时使用,且结果互不干扰。本发明通过开发一种新型的抗体标记技术,建立了一种新的免疫荧光抗体分析方法,丰富了免疫荧光抗体检测手段,在未来的免疫研究中具备发展潜力和广泛应用前景。



1. 一种新的免疫荧光标记方法，其特征在于：

以含有活化氨基基团和叠氮基团的双功能化合物作为蛋白质标记物，其中的活化氨基基团能与蛋白质中的氨基反应，从而使被标记蛋白质含有叠氮基团，进而通过叠氮基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应，使蛋白质具备发光功能或偶联可被检测的标签基团。

2. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于所述的叠氮反应基团是能与叠氮基团形成三唑环的炔基化合物，其自身具备发荧光特性或含有标签基团。

3. 根据权利要求2所述的方法，其特征在于所述的具备发荧光特性的基团包括 Cy3、Cy5、FITC、TRITC、PE、DAPI、Texas red、RB200、Indo-1 和量子点。

4. 根据权利要求3所述的方法，其特征在于所述的标签基团包括 His、GST、FLAG、HA 和 Myc 生物素。

5. 权利要求1所述方法在抗体的荧光标记及免疫荧光分析方法中的应用。

一种新的免疫荧光标记方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术应用领域，涉及通过点击化学进行免疫荧光染色分析的方法。

背景技术

[0002] 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。它尤其强调以碳-杂原子键（C-X-C）合成为基础的组合化学新方法，并借助该反应来简单高效地获得分子多样性。由于点击化学产物无毒，且稳定性好，已被广泛用于药物筛选、药物开发、聚合及其它生物体外和体内分析。

[0003] 生物偶联技术是通过小分子化合物对生物大分子进行修饰的一种技术，已经在分子生物学和化学生物学等领域广泛的应用，如蛋白质、核酸等荧光团标记、修饰、配体螯合、放射性同位素标记等。

[0004] 免疫荧光抗体技术是使用一个特殊的荧光标记物共价连接到任何一种抗原或抗体，并通过荧光显微镜进行检测的方法。目前，FITC、罗丹明等荧光标记物已经广泛应用于免疫荧光分析技术中，此外，利用生物素-亲和素系统的免疫检测系统，也被广泛应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的是开发的一种新型的抗体标记技术，建立了一种新的免疫荧光抗体分析方法，丰富了免疫学检测体系和荧光抗体检测手段，为现有的方法提供一种新的免疫荧光标记方法及其应用。

[0006] 本发明首先提供了一种新型免疫荧光标记方法，该方法包括：

以含有活化氨基基团和叠氮基团的双功能化合物作为蛋白质标记物，其中的活化氨基基团能与蛋白质中的氨基反应，从而使被标记蛋白质含有叠氮基团，进而通过叠氮活性基团与叠氮反应基团之间的点击化学反应，使蛋白质具备发光功能或偶联可被检测的标签基团。

[0007] 所述的叠氮反应基团是能与叠氮基团形成三唑环的炔基化合物，其具备发荧光特性或含有标签基团。

[0008] 所述的具备发荧光特性的偶联基团包括 Cy3、Cy5、FITC、TRITC、PE、DAPI、Texas red、RB200、Indo-1 和量子点等。

[0009] 所述的标签基团包括 His、GST、FLAG、HA、Myc 生物素等。

[0010] 本发明同时提供了一种新型免疫荧光标记方法在抗体的荧光标记及免疫荧光分析方法中的应用。

[0011]

本发明涉及两个关键的化合物 6-叠氮-己酸琥珀酰亚胺活性酯（化合物 1）和 4-乙炔基-N-乙基-1,8-萘酰亚胺合成（化合物 2），将合成的化合物 1 与抗 her2 抗体

Anti-HP15 的游离氨基偶联获得叠氮化 IgG，随后通过铜离子催化化合物 2 中的炔基与标记抗体的叠氮基团进行点击化学反应，实现荧光显色，其检测限可达 0.1 μg ，EC50 为 1 μg ，并在细胞水平进行荧光染色分析验证。

[0012] 本发明自行合成了化合物 6-叠氮-己酸琥珀酰亚胺活性酯（化合物 1）和 4-乙炔基-N-乙基-1,8-萘酰亚胺合成（化合物 2），前者拥有与氨基高活性反应的琥珀酰亚胺基团和与炔基反应的叠氮基团，后者含有炔基及发光基团。

[0013] 以上述合成的两个化合物，本发明建立了以抗体为代表的荧光染色分析方法，并通过细胞的免疫荧光染色和点击化学方法进行验证，同时确认了该标记方法的检测灵敏度和检测限。

[0014] 本发明提供的抗体的叠氮标记方法如下：

将 2.4 μL 的 10 mg/mL 的化合物 1 缓慢加入到 1 mL 的 Anti-HP15 抗体溶液（0.1 mol/L，pH=9.0 Na_2CO_3 - NaHCO_3 ，1 mg/mL IgG）中，室温搅拌 1 h 后，5000 r/min 离心 10 min，吸取上清液加入超滤管中，以 PBS 稀释并于 3500 r/min 反复离心洗涤，获得叠氮标记的 Anti-HP15 抗体。

[0015] 本发明提供的点击化学催化反应及荧光基团分析方法如下：

将 0.1~1.0 mmol/L 的化合物 1 加入至含有 0.5 mmol/L 化合物 2、0.2 mmol/L Tris-triazoleamine、1 mmol/L CuSO_4 及 2 mmol/L 抗坏血酸钠的 PBS 溶液中，室温反应 60 min。以 365 nm 波长激发光激发反应产物，扫描 390~550 nm 的发射光谱，确认最大发射波长，并以最大发射波长测定各组荧光强度，绘制叠氮基团浓度相关的标准曲线；同时，以 3 $\mu\text{mol/L}$ 叠氮标记的 Anti-HP15 抗体替代化合物 1 进行点击化学反应，根据反应产物的荧光强度确认抗体的叠氮化标记效率。

[0016]

本发明的有益效果：本发明采用叠氮标记抗体进行免疫荧光分析，该发明可与其他现有的免疫荧光技术同时使用，且结果互不干扰。本发明通过开发一种新型的抗体标记技术，建立了一种新的免疫荧光抗体分析方法，丰富了免疫荧光抗体检测手段，在未来的免疫研究中具备发展潜力和广泛应用前景。

[0017]

附图说明

[0018] 图 1 是依赖点击化学的免疫荧光分析原理；

图 2 是最大发射波长分析，

A：化合物 1 与化合物 2 反应后的产物； B：化合物 2； C：化合物 1

图 3 是叠氮定量曲线；

图 4 是叠氮标记抗体的检测灵敏度；

图 5 是细胞染色分析，

A：阴性对照； B：反应组； C：阳性对照；

图 6 是三通道荧光染色分析，

A：叠氮标记 Her2 抗体染色； B：FITC 标记的 EGFR4 染色； C：生物素化的 GRP94 染色； D：三通道复合分析。

[0019]

具体实施方式

[0020] 实施例 1

Anti-HP15 的荧光标记

将 1 mg NHS-FITC 或 NHS-罗丹明溶解于 100 μ L DMSO 中，随后吸取 4.7 μ L NHS-FITC 或 3.5 μ L NHS-罗丹明逐滴加入 1 mL Anti-HP15 抗体溶液（0.1 mol/L，pH=9.0 Na_2CO_3 - NaHCO_3 ，1 mg/mL IgG）中，于室温下搅拌 1 h 后，5000 r/min 离心 10 min，吸取上清并于 PBS（pH=7.2，0.02 mol/L Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 ，0.15 mol/L NaCl）中充分透析，去除未反应的 NHS-FITC 和 NHS-罗丹明，获得 FITC 或罗丹明标记的 Anti-HP15 抗体，用于阳性对照。

[0021] 实施例 2

关键化合物的合成

两个关键的化合物 6-叠氮-己酸琥珀酰亚胺活性酯（化合物 1）和 4-乙炔基-N-乙基-1,8-萘酰亚胺（化合物 2）合成方法如下：将 6-溴化己酸与叠氮化钠在乙腈溶液中反应，收集产物，向其中加入 N-羟基琥珀酰亚胺和 EDC，在二氯甲烷体系中反应，获得化合物 1；向 4-溴-1,8-萘酰亚胺中加入乙胺，在乙醇溶液中反应后收集产物，加入三甲硅烷基炔，在四氢呋喃体系中经四（三苯基膦）钯和碘化亚铜催化反应，获得化合物 2。

[0022] 实施例 3

Anti-HP15 的叠氮标记

将 2.4 μ L 的 10 mg/mL 的化合物 1 缓慢加入到 1 mL 的 Anti-HP15 抗体溶液（0.1 mol/L，pH=9.0 Na_2CO_3 - NaHCO_3 ，1 mg/mL IgG）中，室温搅拌 1 h 后，5000 r/min 离心 10 min，吸取上清液加入超滤管中，以 PBS 稀释并于 3500 r/min 反复离心洗涤，获得叠氮标记的 Anti-HP15 抗体。

[0023] 实施例 4

抗体叠氮标记量分析

将不同浓度的化合物 1 加入至含有 0.5 mmol/L 化合物 2、0.2 mmol/L Tris-triazoleamine、1 mmol/L CuSO_4 及 2 mmol/L 抗坏血酸钠的 PBS 溶液中，室温 60 min 后，以 365 nm 波长激发光激发反应产物，扫描 390~550 nm 的发射光谱，确认最大发射波长，并以最大发射波长测定各组荧光强度，绘制叠氮基团浓度相关的标准曲线；同时，以 3 μ mol/L 叠氮标记的 Anti-HP15 抗体替代化合物 1 进行点击化学反应，根据反应产物的荧光强度确认抗体的叠氮化标记效率。扫描化合物 1 与 2 反应产物的发色光谱，确定最大发射波长为 465 nm，明显高于化合物 1 和化合物 2（图 2）。根据测定的各反应体系的荧光强度，绘制不同浓度的化合物 1 与 2 反应产物的荧光强度标准曲线（图 3，每个化合物含有一个叠氮基团），换算得知抗体标记效率为每一分子抗体约标记 6 个叠氮基团。

[0024] 实施例 5

叠氮标记抗体的灵敏度分析

采用酶联免疫吸附分析法测定叠氮标记抗体的检测灵敏度。向 96 孔酶标板中加入超声破碎的 100 μ L 膜抗原 5 μ g，37 °C 包被 2 h 后采用 1% BSA 4 °C 封闭过夜，随后

加入 100 μ L 系列稀释的浓度相同的叠氮标记的抗体、FITC 标记的抗体和罗丹明标记的抗体 (10、1、0.1、0.01、0.001、0.001 和 0.0001 μ g/mL)，室温反应 3 h。充分洗涤后，向叠氮标记反应组中加入含有 0.5 mmol/L 化合物 2、0.2 mmol/L Tris-triazoleamine、1 mmol/L CuSO_4 及 2 mmol/L 抗坏血酸钠的 PBS 溶液，洗涤后，测定 365 nm 激发光下每孔的荧光强度，发射波长为实施例 4 中确认的最大发射波长；FITC 标记的抗体和罗丹明标记的抗体以相应激发波长 (488 nm 和 570 nm) 激发并分别测定 518 nm 和 590 nm 下的荧光强度。三者的 EC_{50} 值几乎一致，均约为 1 μ g，其检出限也约为 0.1 μ g，即叠氮标记抗体的检测灵敏度与已有的商品化的标记试剂 NHS-FITC 和 NHS-罗丹明的检测灵敏度相当，检测限一致，能够作为一种有效的补充方法应用于免疫荧光分析中。

[0025] 实施例 6

免疫荧光分析

将人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 于含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养 3 天，然后将 1.25×10^5 细胞转移到激光共聚焦培养板中培养过夜，随后以 4% 多聚甲醛室温固定 30 min，充分洗涤封闭后，加入 1 mg/mL 叠氮标记抗体，室温反应 3 h 后加入含有 0.5 mmol/L 化合物 2、0.2 mmol/L Tris-triazoleamine、1 mmol/L CuSO_4 及 2 mmol/L 抗坏血酸钠的 PBS 溶液催化反应，通过激光共聚焦显微镜在 365 nm 下观察。同时，采用相同的未标记的抗体和对应的 FITC 标记二抗进行细胞荧光染色作为阳性对照，于 488 nm 下进行分析；仅加入催化反应溶液而未加入一抗的细胞作为阴性对照组于 365 nm 下观察。在采用叠氮标记抗体染色分析时，365 nm 下可以明显地观察到蓝色荧光 (图 5B)，而在未加入抗体的阴性对照中几乎没有荧光信号 (图 5A)；在阳性对照中，采用 FITC 标记的二抗进行免疫荧光染色分析，且荧光定位与使用叠氮标记抗体染色结果一致 (图 5C)，即本发明开发的方法无论在检测灵敏度，还是在检测结果的准确性上均与已有的方法相同，可以被广泛应用于免疫荧光检测分析中。

[0026] 实施例 7

复合染色分析

将人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 以含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养 3 d，然后，将 1.25×10^5 细胞转移到激光共聚焦培养皿中，培养过夜，经 PBS 洗涤后加入 4% 的多聚甲醛固定，充分洗涤封闭后同时加入叠氮标记 Anti-HP15、兔抗 EGFR4 抗体和生物素化的抗 GRP94 抗体，室温反应 1 h 后，在培养皿中加入 0.5 mmol/L 化合物 2、0.2 mmol/L Tris-triazoleamine、1 mmol/L CuSO_4 及 2 mmol/L 抗坏血酸钠的 PBS 溶液，室温反应 1 h，充分洗涤后，向培养皿中加入 FITC 标记羊抗兔 IgG 和 streptavidin-CY3，室温 1 h 后，充分洗涤，以激光共聚焦显微镜分别观察 365 nm、488 nm 和 550nm 激发光下的荧光信号。当激发波长为 365 nm 时，在细胞膜的内测可观测到明显的蓝色荧光信号 (图 6A)，即化合物 2 在改变电子分布后产生自发荧光；在 488 nm 激发光下，在细胞膜外侧可观测到明显的 FITC 绿色荧光信号 (图 6B)；在 550 nm 激发光下，可以观测到明显的 Cy3 红色荧光信号 (图 6C)。荧光信号叠加结果如图 6D 显示，3 种荧光信号可以进行有效合并，并且信号互不干扰，即叠氮标记后的荧光抗体分析方法可以与已有的常规方法并用。

[0027] 实施例 8

荧光试剂的合成与显色分析

分别将 Cy3、Cy5、FITC、TRITC、PE、DAPI、Texas red、RB200、Indo-1、量子点等荧光基团进行化学修饰，使之含有炔基基团。随后依据实施例 6 进行点击化学反应，使炔基与抗体上的叠氮基团反应，形成稳定的三唑环，进而使得被检测样品具备发光功能，便于检测。

[0028] 实施例 9

荧光试剂的合成与显色分析

分别将含有 His、GST、FLAG、HA、Myc 生物素等标签基团进行化学修饰，使之含有炔基基团。随后依据实施例 6 进行点击化学反应，使炔基与抗体上的叠氮基团反应，形成稳定的三唑环，随后加入各种标签对应的亲和配体，进而使得被检测样品具备发光功能，便于检测。

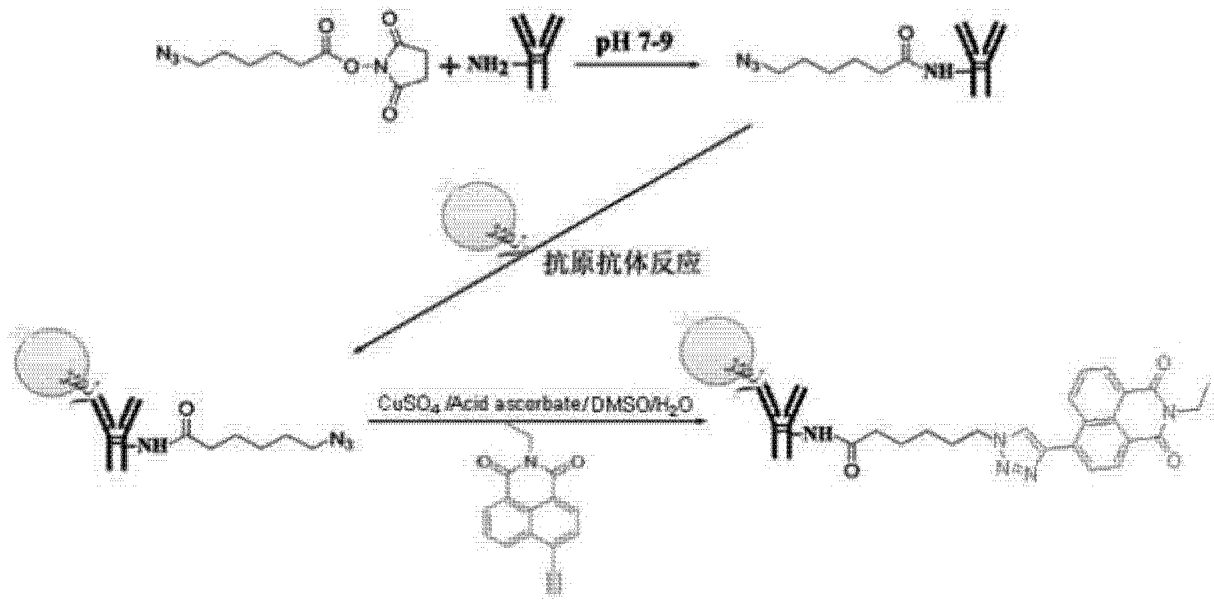


图 1

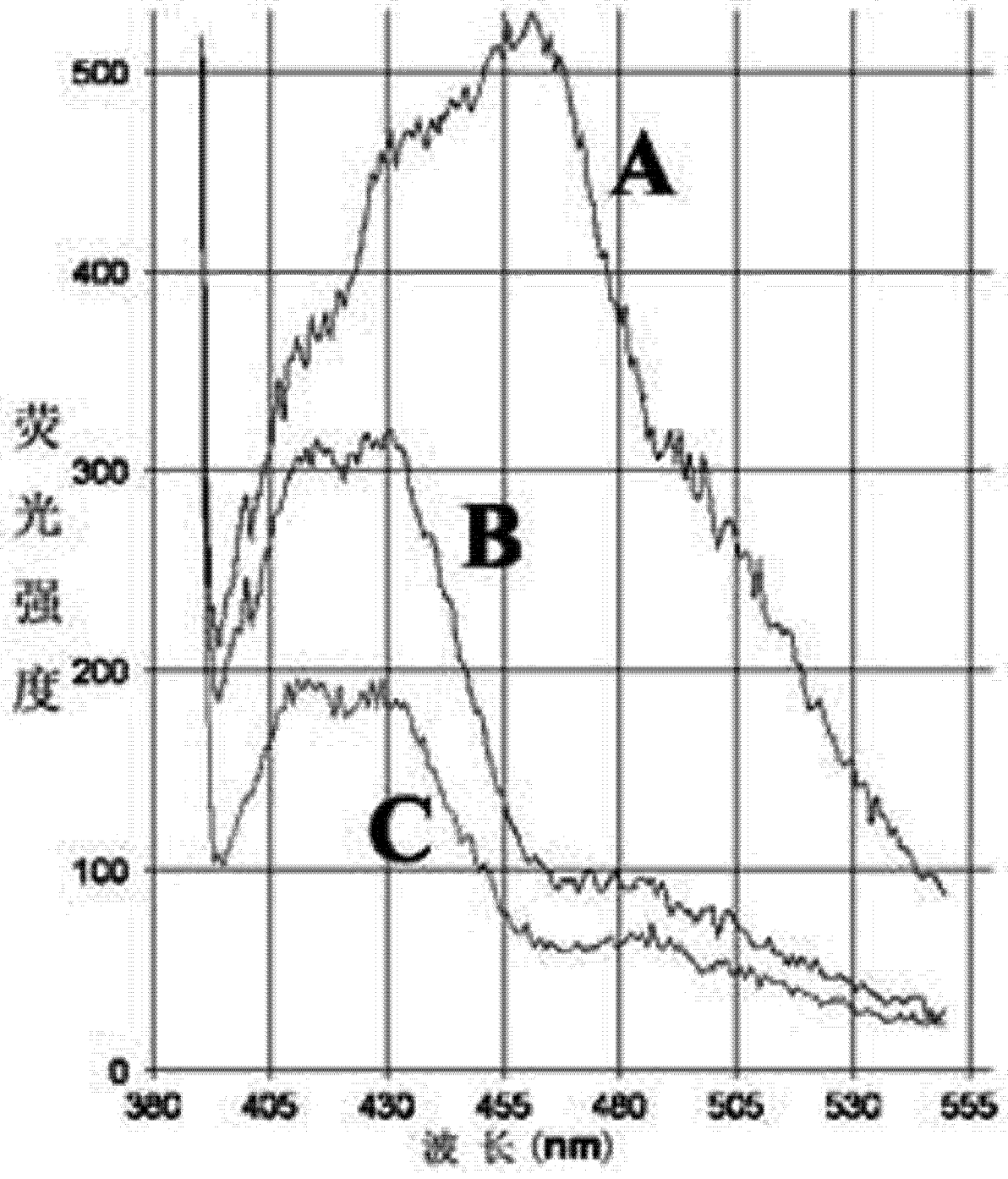


图 2

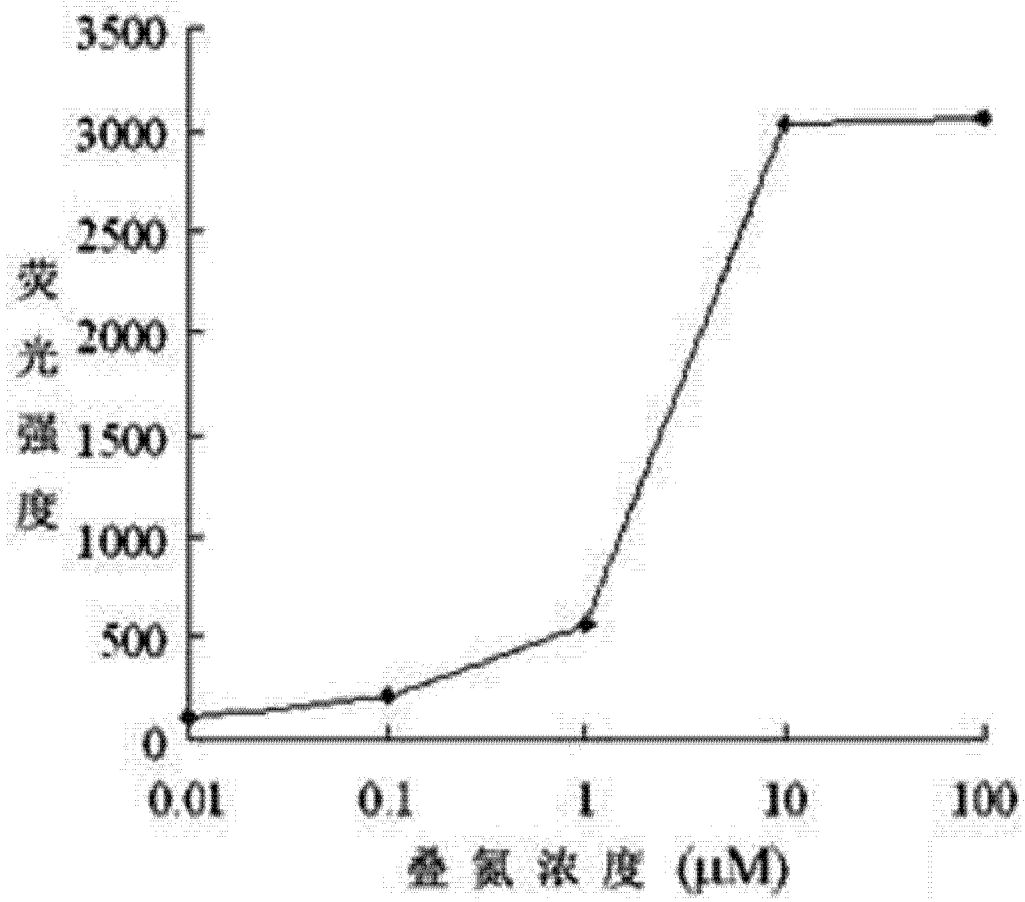


图 3

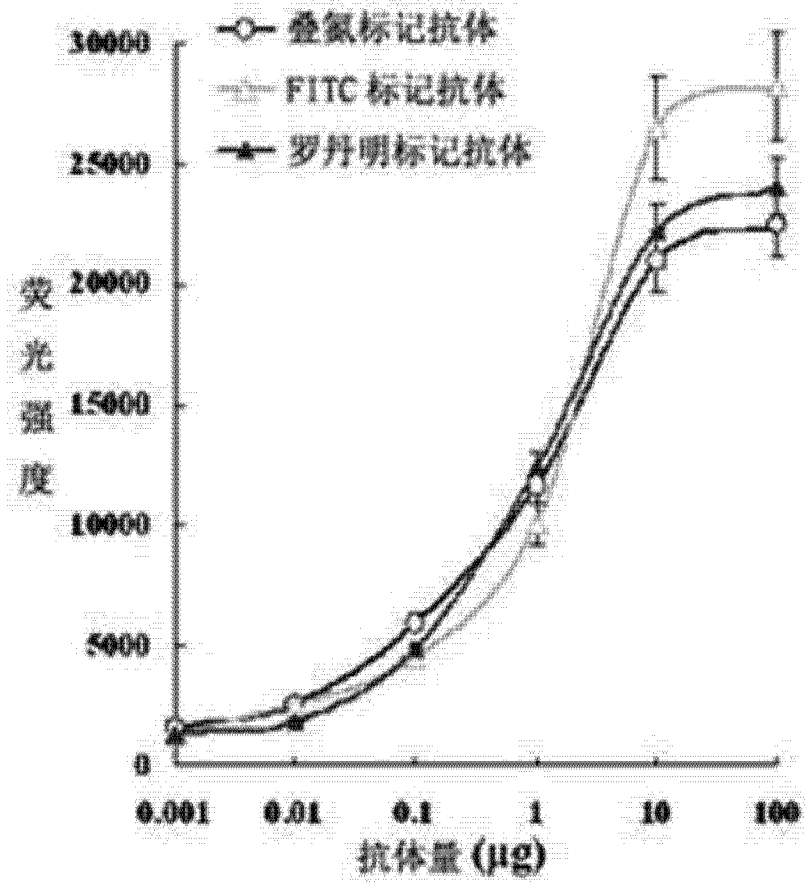


图 4

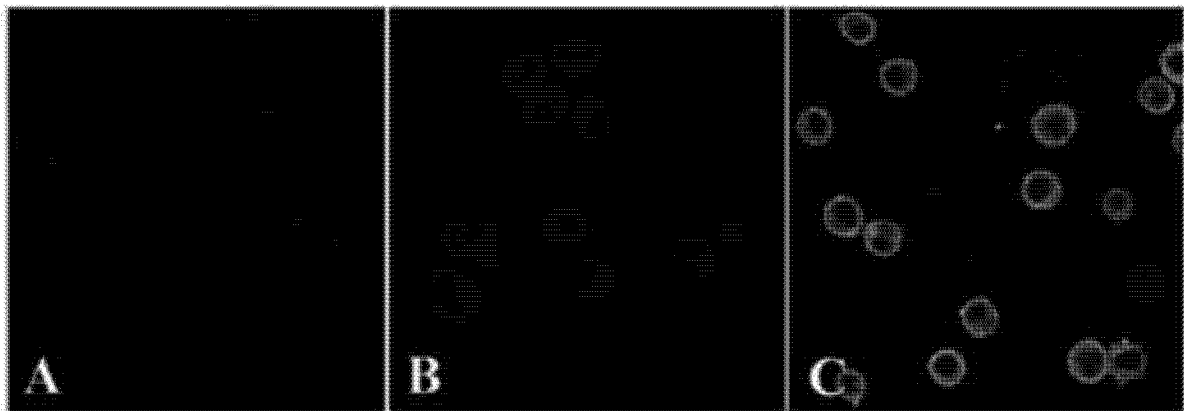


图 5

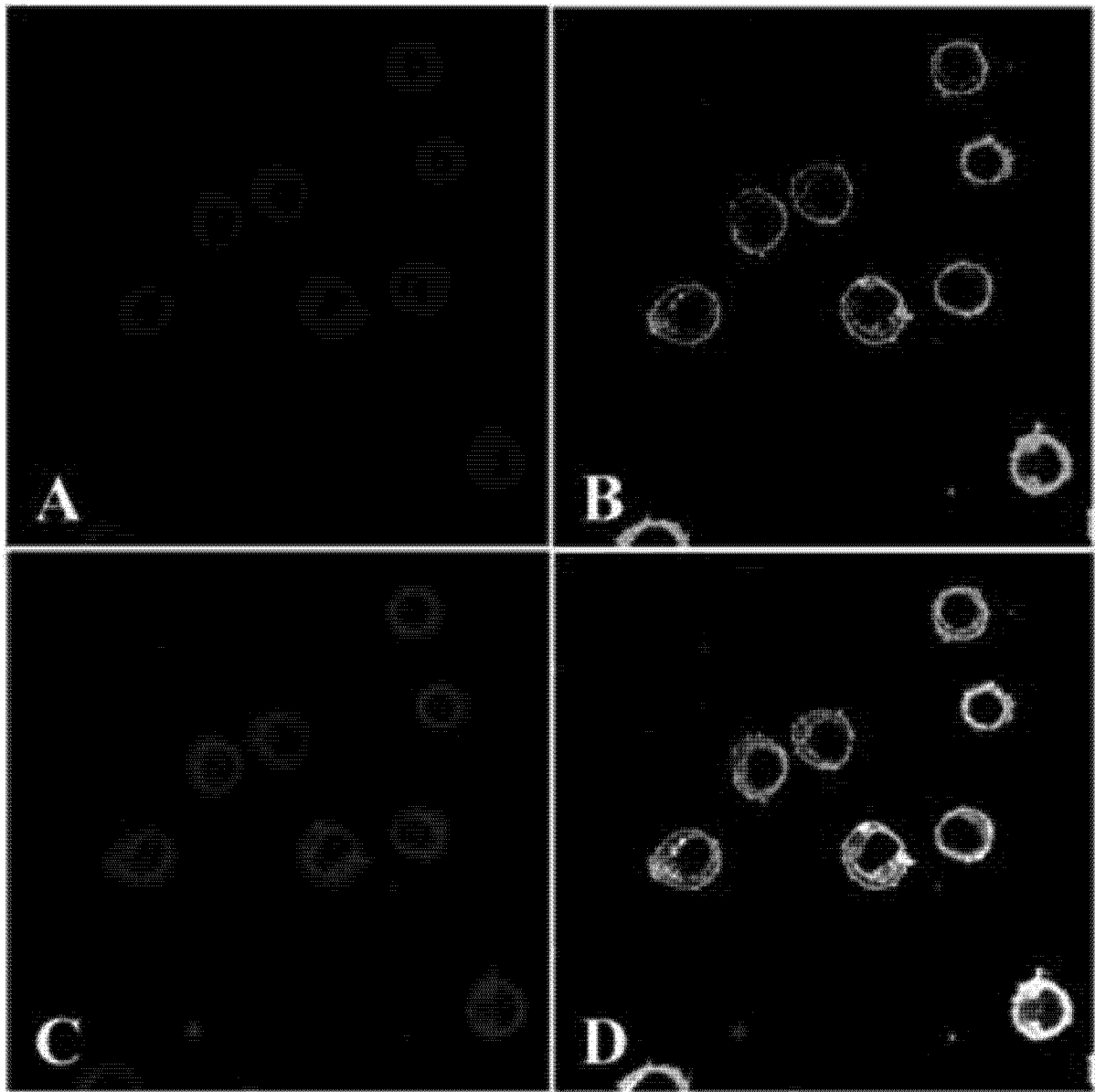


图 6

专利名称(译)	一种新的免疫荧光标记方法		
公开(公告)号	CN102012425A	公开(公告)日	2011-04-13
申请号	CN201010610282.9	申请日	2010-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	张奇 白钢 侯洁 白芳 高智慧 潘鹏炜		
发明人	张奇 白钢 侯洁 白芳 高智慧 潘鹏炜		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N21/76		
代理人(译)	侯力		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种新的免疫荧光标记方法。本发明分别合成了含有叠氮基团和炔基基团的两个关键化合物，将前者与抗体偶联获得叠氮化IgG，再与含有荧光基团的后者进行点击化学反应，实现荧光显色。采用该技术，在细胞水平进行染色分析，叠氮标记抗体可有效应用于免疫荧光染色分析；并且采用本发明开发的方法标记的抗体可与其他现有的免疫荧光技术同时使用，且结果互不干扰。本发明通过开发一种新型的抗体标记技术，建立了一种新的免疫荧光抗体分析方法，丰富了免疫荧光抗体检测手段，在未来的免疫研究中具备发展潜力和广泛应用前景。

