



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103513026 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201310470907. X

(22) 申请日 2011. 12. 30

(62) 分案原申请数据

201110456124. 7 2011. 12. 30

(73) 专利权人 吴坚

地址 310012 浙江省杭州市马腾路
34-1-302 室

(72) 发明人 吴坚 陈春香

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限
公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1904616 A, 2007. 01. 31,

WO 03104424 A2, 2003. 12. 18,

US 2009252731 A1, 2009. 10. 08,

US 2005191646 A1, 2005. 09. 01,

审查员 肖吉

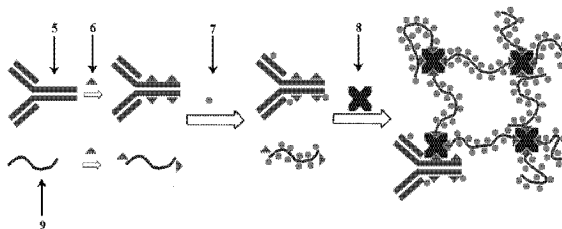
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用。该探针的制备方法包括：在缩合剂的存在下，对苯二胺和均苯三甲酸经缩合反应得到多羧基大分子；多羧基大分子经活化后，依次加入抗体、聚赖氨酸进行反应；再用荧光标记物标记，制得所述的探针。或者，其制备方法包括：将抗体、聚赖氨酸分别加入生物素溶液中反应生成相应的复合物，再用荧光标记物标记；将荧光标记的抗体-生物素复合物与链霉亲和素溶液混合进行反应，再加入荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物继续反应，制得所述的探针。通过上述方法制得的探针，标记有较多荧光标记物，结构稳定，易保藏；用于荧光免疫检测，具有检测灵敏度高、检测时间短、成本低等特点。



1. 一种信号放大型免疫荧光探针的制备方法,包括:

(1) 将抗体加入生物素溶液中,搅拌反应 1-2h, 然后加入荧光标记物进行标记, 制得荧光标记的抗体-生物素复合物;

(2) 将聚赖氨酸加入生物素溶液中,搅拌反应 1-2h, 然后加入荧光标记物进行标记, 制得荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物;

(3) 将步骤(1)制得的荧光标记的抗体-生物素复合物与链霉亲和素溶液混合, 反应 0.5-1h; 然后加入步骤(2)制得的荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物, 继续反应 0.5-1h, 制得信号放大型免疫荧光探针;

步骤(3)中, 所述荧光标记的抗体-生物素复合物、链霉亲和素与荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物的摩尔比为 1:3:10-1:5:15。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(1)中, 所述抗体与生物素的摩尔比为 1:2-1:4。

3. 根据权利要求 1 所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)中, 所述聚赖氨酸与生物素的摩尔比为 1:1-1:2。

4. 一种采用如权利要求 1-3 任一所述的制备方法制得的信号放大型免疫荧光探针。

5. 如权利要求 4 所述的信号放大型免疫荧光探针在荧光免疫检测中的应用。

信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用

[0001] 本申请是申请号为“201110456124.7”，申请日为“2011年12月30日”，发明名称为“信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用”发明专利申请的分案申请

技术领域

[0002] 本发明涉及免疫快速分析技术领域，尤其涉及一种信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用。

背景技术

[0003] 免疫检测技术是目前医学、生物学、食品安全等领域最基本也是最常用的检测技术之一。它广泛应用于医学生物学研究、医学临床、环境检测，以及食品和微生物污染的检测中。免疫检测技术是基于抗体抗原反应的原理对待测物进行定量定性分析的检测方法，具有特异性强、灵敏度高、简便等优点，是现代生命科学的重要研究手段，在生物分析检测领域有着广泛的应用前景。

[0004] 荧光免疫测定是指将免疫学方法(抗原抗体特异结合)与荧光标记技术(荧光标记物对抗体或者抗原进行标记)结合起来，并通过荧光信号进行检测的方法。最终目的是通过将抗体与抗原的特异性反应和荧光信号相结合，达到定量检测的目的。

[0005] 斑点荧光免疫渗透试验，在斑点金免疫渗透试验的基础上发展起来的，后发展为斑点荧光免疫渗透试验，而斑点荧光免疫渗透试验则是用荧光性物质代替了胶体金作为标记物，采用免疫渗透技术、荧光标记物和固相载体相结合的一种检测方法。

[0006] 荧光免疫层析是在胶体金免疫层析的基础上发展起来的，是以 NC 膜为载体，利用微孔膜的毛细管作用，使滴加在膜条一端的液体慢慢向另一端渗移，如同层析一般。

[0007] 目前，FITC、罗丹明、量子点、荧光微球等荧光标记物已经广泛应用于荧光免疫分析技术中。荧光免疫检测方法具有高特异性、敏感性高、速度快的特点。但是该检测方法在应对非常微量的物质时，也存在信号低，噪声干扰大，传统方法难以检出等问题。因此，发展新的免疫检测方法，提高检测的灵敏度是目前分析检测领域发展的迫切要求。

发明内容

[0008] 本发明提供了信号放大型免疫荧光探针的制备方法，将荧光标记物标记在连接有多羧基大分子和聚赖氨酸或者连接有生物素-链霉亲和素和聚赖氨酸的抗体复合物上，使免疫反应的荧光信号大大放大，提高了荧光免疫检测的灵敏度。

[0009] 一种信号放大型免疫荧光探针的制备方法，包括：

[0010] (1)在缩合剂的存在下，将对苯二胺和均苯三甲酸加入有机溶剂中，于 80-100℃ 缩合反应 3-5h，得到多羧基大分子；

[0011] (2)将步骤(1)得到的多羧基大分子加入含有 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺的溶液中进行活化，然后加入抗体，反应 0.5-2h；再加入聚赖氨酸，继续反应 0.5-2h，得到表面连接有抗体和聚赖氨酸的多羧基大分子；

[0012] (3) 用荧光标记物对步骤(2)制得的表面连接有抗体和聚赖氨酸的多羧基大分子进行标记,制得信号放大型免疫荧光探针。

[0013] 步骤(1)中,所述的缩合剂可以为三苯基亚磷酸盐(TPP)与吡啶(Py)的混合物;所述的有机溶剂可以为N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)。

[0014] 所述对苯二胺与均苯三甲酸的摩尔比优选为1:0.8-1:1.2;更优选为1:1。对苯二胺和均苯三甲酸作为反应单体,在缩合剂的存在下能缩合得到多羧基大分子。

[0015] 优选地,每80-100ml N-甲基-2-吡咯烷酮中,所述对苯二胺的加入量为10mmol,均苯三甲酸的加入量为10mmol,三苯基亚磷酸盐的加入量为20-30mmol,吡啶的加入量为5-15ml。

[0016] 所述的缩合反应过程中对溶液进行搅拌,确保混合物互溶成均相。

[0017] 所述的缩合反应完成后,对反应产物进行后处理得到多羧基大分子;所述的后处理可以为:将缩合反应3-5h后的反应产物加入含有盐酸的甲醇溶液中终止反应,分离得到缩合物沉淀,再对缩合物沉淀依次进行重结晶、洗涤和干燥处理。

[0018] 其中,所述含有盐酸的甲醇溶液中盐酸的浓度为10-15mol/L;所述重结晶所用的试剂为N-甲基-2-吡咯烷酮/甲醇混合液;所述洗涤所用的试剂为热的甲醇;所述的干燥处理为:将缩合物沉淀置于80-120℃烘箱中干燥10-15h。

[0019] 步骤(2)中,所述含有1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDAC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的溶液的溶剂可以为磷酸盐缓冲液(PBS)和二甲基亚砷(DMSO)的混合液。

[0020] 所述的抗体可以为单抗或多抗。

[0021] 所述步骤(1)得到的多羧基大分子、抗体和聚赖氨酸的摩尔比优选为1:2:20-1:3:50。

[0022] 所述的活化时间优选为10-15min。

[0023] 步骤(3)中,所述的荧光标记物可以为FITC、罗丹明、量子点或荧光微球。

[0024] 本发明还提供了另一种信号放大型免疫荧光探针的制备方法,包括:

[0025] (1) 将抗体加入生物素溶液中,搅拌反应1-2h,然后加入荧光标记物进行标记,制得荧光标记的抗体-生物素复合物;

[0026] (2) 将聚赖氨酸加入生物素溶液中,搅拌反应1-2h,然后加入荧光标记物进行标记,制得荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物;

[0027] (3) 将步骤(1)制得的荧光标记的抗体-生物素复合物与链霉亲和素溶液混合,反应0.5-1h;然后加入步骤(2)制得的荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物,继续反应0.5-1h,制得信号放大型免疫荧光探针。

[0028] 步骤(1)中,所述抗体与生物素的摩尔比优选为1:2-1:4。

[0029] 所述抗体加入生物素溶液中反应1-2h后,可以进行透析除杂,所述透析除杂为:将反应液装于透析袋中,置于浓度10mmol/L, pH7.4的磷酸盐缓冲液中透析48h。

[0030] 步骤(2)中,所述聚赖氨酸与生物素的摩尔比优选为1:1-1:2。

[0031] 所述聚赖氨酸加入生物素溶液中反应1-2h后,可以进行透析除杂,透析除杂步骤同上。

[0032] 步骤(3)中,所述荧光标记的抗体-生物素复合物、链霉亲和素与荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物的摩尔比优选为1:3:10-1:5:15。

[0033] 本发明还提供了采用上述两种制备方法制得的信号放大型免疫荧光探针,该信号放大型免疫荧光探针标记有较多的荧光标记物,且分子间结合力强,结构稳定,在 4℃ 无菌环境下可以稳定保存一年以上。

[0034] 本发明还提供了所述的信号放大型免疫荧光探针在荧光免疫检测中的应用。试验表明,本发明的信号放大型免疫荧光探针可以用于基于抗体抗原特异性反应的荧光免疫检测,尤其适用于斑点荧光免疫渗透试验或荧光免疫层析试验,检测灵敏度较高,比传统的荧光标记方法要敏感数倍甚至十几倍。

[0035] 本发明将荧光标记物标记在连接有多羧基大分子和聚赖氨酸或者连接有生物素-链霉亲和素和聚赖氨酸的抗体复合物上,使免疫反应的荧光信号大大放大,提高了荧光免疫检测的灵敏度。

[0036] 以多羧基大分子和聚赖氨酸用于免疫荧光探针的信号放大时:对苯二胺和均苯三甲酸可以缩合形成表面带有大量羧基的多羧基大分子,在适当的反应顺序和加量比例下,多羧基大分子能连接抗体和聚赖氨酸,聚赖氨酸的大量氨基基团可用于连接更多的荧光分子,从而形成一个以多羧基大分子为基础,表面连接有一定抗体、大量聚赖氨酸和大量荧光分子的复合物,与抗体、荧光分子直接连接相比,荧光信号大大放大。

[0037] 以生物素-链霉亲和素和聚赖氨酸用于免疫荧光探针的信号放大时:由于生物素和链霉亲和素具有良好的配对关系,在适当的反应顺序和加量比例下,可以与抗体和聚赖氨酸相连接形成一个以抗体为起点,链霉亲和素、生物素和聚赖氨酸相互头尾相连的复合物,使免疫荧光信号放大倍数大大提高。

[0038] 采用本发明,具有如下有益效果:

[0039] (1) 定量检测、灵敏度高:胶体金免疫层析也具有操作方便、快捷的优点,但其更适用于定性检测;而 ELISA 则适用于大量标本数目的检测,所需的实验设备要求高;而荧光免疫层析不仅具有定量检测功能,而且具有所需设备简单、操作方便等优点;而经过信号放大的荧光免疫层析的定量检测,其检测灵敏度更高,可用于极微量物质的检测。

[0040] (2) 检测时间短,成本低:由于信号放大的荧光免疫检测灵敏度更高,可直接应用于荧光免疫层析和斑点荧光免疫渗透试验,相较于 ELISA 检测,大大缩短了检测时间,一般一个标本的检测时间为 10-15min,可以在 1 小时内检测 50-60 个标本;特别适合少量标本数的定量检测,相对于 ELISA 检测,成本更低。

[0041] (3) 探针结构稳定,易保藏:本发明的信号放大型免疫荧光探针分子间结合力强,结构稳定,在 4℃ 无菌环境下可以稳定保存一年以上。

附图说明

[0042] 图 1 为本发明实施例 1 信号放大型免疫荧光探针制备过程的示意图,其中,1 为多羧基大分子,2 为抗体,3 为聚赖氨酸,4 为荧光标记物;NMP 为 N-甲基-2-吡咯烷酮,TPP 为三苯基亚磷酸盐,Py 为吡啶,DMSO 为二甲基亚砷,PBS 为磷酸盐缓冲液,EDAC 为 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺;

[0043] 图 2 为本发明实施例 4 信号放大型免疫荧光探针制备过程的示意图,其中,5 为抗体,6 为生物素,7 为荧光标记物,8 为链霉亲和素,9 为聚赖氨酸。

具体实施方式

[0044] 实施例 1 信号放大型免疫荧光探针的制备

[0045] (1)在三颈瓶中,将单体 1.08g(10mmol) 对苯二胺和 2.10g(10mmol) 均苯三甲酸在搅拌下溶于 80ml N-甲基-2-吡咯烷酮中,再加入缩合剂 7.5ml 吡啶和 20mmol 三苯基亚磷酸盐,不断搅拌加热至 80℃,混合物互溶成均相后,继续搅拌反应 3h;停止反应后,将反应混合物溶于 500ml 含有盐酸的甲醇中(盐酸浓度为 12mol/L),过滤得到沉淀产物;粗产品用 N-甲基-2-吡咯烷酮/甲醇进行重结晶,最后产物用热的甲醇进行洗涤,并在 100℃烘箱中烘干 12h;获得多羧基大分子,命名为 PT 大分子。

[0046] (2)将步骤(1)中 PT 大分子 5mg 溶于 10ml PBS(10mM pH7-8) 和 1ml DMSO 的溶液中;取 30ul PT 大分子溶液,向其中加入 5ul EDAC (10mg/ml) 和 3ul NHS (5mg/ml),室温活化 10min 后,分别先后加入 3ug 抗体和 5ug 聚赖氨酸,室温各反应 1h。将上述反应溶液上凝胶色谱柱 Superdex 分离多余的 EDAC、NHS 和未连接的抗体、聚赖氨酸,并用 0.22 μm 滤孔膜除菌,4℃保存。

[0047] (3)将上述纯化后的溶液 100ul 中加入 10% 的 NaHCO₃,调节 pH 值至约为 8-9,并加入 5ul 荧光标记物,室温反应 1h,并每隔 10-15min,混匀一次。再将以上混合物用纯化树脂(Thermo Scientific Zeba)除去多余的荧光标记物,1100g 离心 5min,收集离心后的溶液,获得抗体-多羧基大分子-聚赖氨酸-荧光标记复合物,即为信号放大型免疫荧光探针。

[0048] 实施例 2 斑点荧光免疫渗透试验检测盒的制备

[0049] (1)将 10ug/ml 浓度的抗体包被在硝酸纤维素膜(NC 膜)上,并用 10mM PBS(pH7-8)清洗 3-5 遍,37℃烘干备用。

[0050] (2)将塑料小盒打开,分为底和盖。安装次序从下到上依次为:底、吸水材料、硝酸纤维素膜、盖。

[0051] 实施例 3 斑点荧光免疫渗透试验检测 AFP (夹心法)

[0052] (1)先用将 AFP 标准品分别配置成浓度的系列标准品 0ppb, 1ppb, 5ppb, 20ppb, 50ppb, 100ppb, 200ppb, 400ppb。

[0053] (2)取实施例 2 制得的检测盒,将 40ul 封闭液(10mM PBS, pH7-8, 含 0.2%BSA 和 0.05%Tween-20)滴在检测盒的 NC 膜上,封闭 NC 膜,待其渗入盒内。

[0054] (3)在 NC 膜上滴加 10ul 标准浓度的 AFP 溶液,并滴加 30ul 洗涤液(50mM PBS, pH7-8);待溶液略干后,再滴加 10ul 稀释 1000 倍的实施例 1 制得的信号放大型免疫荧光探针溶液(稀释液为含 1%BSA 和 1%蔗糖的 10mM PBS 溶液, pH7.2),并滴加 30ul 洗涤液;待溶液略干后,利用荧光定量分析仪进行检测,读取荧光信号(每个样品分别检测 3 次,取平均值);以 AFP 浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标,绘制标准曲线。该荧光免疫试纸条的 AFP 最低检测线为 2ppb。

[0055] (4)在 NC 膜上滴加 10ul 待测 AFP 溶液,并滴加 30ul 洗涤液;待溶液略干后,再滴加 10ul 稀释 1000 倍的实施例 1 制得的信号放大型免疫荧光探针溶液(稀释液为含 1%BSA 和 1%蔗糖的 10mM PBS 溶液, pH7.2),并滴加 30ul 洗涤液;待溶液略干后,利用荧光定量分析仪进行检测,读取荧光信号;将荧光信号值代入步骤(3)制得的标准曲线得出待测标本的 AFP 浓度。

[0056] (5)重复性实验:将 3 份阳性标本在同一时间段测定 20 次,计算批内变异系数:将

同样的 3 份阳性标本连续测定 10 次, 每天一次, 计算批间变异系数。由结果知, 批内变异系数和批间变异系数均小于 10%, 表明该信号放大型免疫荧光探针用于斑点荧光免疫渗透试验, 重复性较好。

[0057] (6) 稳定性实验: 1) 将试剂(实施例 1 制得的信号放大型免疫荧光探针)于 37℃ 温箱放置 12 天, 与放置在 4℃ 冰箱的试剂平行检测 3 份阳性和 1 份阴性标本, 进行热稳定性试验。结果显示, 该试剂至少可以稳定存放 1 年以上。2) 将检测盒中的试纸条密封分别存放于 37℃、25℃ 和 4℃, 观察不同温度对试纸条的影响。保存于 37℃ 的试纸条每个月取出 70 条分别检测标准品; 保存于 25℃ 的试纸条每一个月取出 70 条分别检测标准品。结果显示, 试纸条分别在 25℃ 下保存 12 个月以及 37℃ 保存 6 个月, 检测结果均未发现改变。

[0058] 实施例 4 信号放大型免疫荧光探针的制备

[0059] (1) 将 20mmol 活化的生物素分别与 10mmol 抗体和 10mmol 聚赖氨酸进行反应, 室温搅拌 1h; 然后装于透析袋中置于 PBS 缓冲溶液(10mM, pH7.4)中透析 48h, 制得生物素-抗体、生物素-聚赖氨酸复合物; 再用 0.22 μm 滤孔膜除菌, 4℃ 保存。

[0060] (2) 取 20ul 生物素-抗体和生物素-聚赖氨酸溶液(蛋白浓度 ≥ 1mg/ml), 分别用 10% 的 NaHCO₃, 调节 pH 值至约为 8-9, 加入荧光标记物进行标记, 并轻柔搅拌均匀。室温反应 1h, 并每隔 10-15min, 混匀一次。反应结束后, 用纯化树脂(Thermo Scientific Zeba)除去未反应的荧光标记物, 1100g 离心 5min, 收集离心后的溶液, 获得荧光标记的生物素-抗体、生物素-聚赖氨酸复合物。

[0061] (3) 将步骤(2)制得的荧光标记生物素-抗体复合物与链霉亲和素溶液混合, 室温下反应 1h; 再加入步骤(2)制得的荧光标记生物素-聚赖氨酸复合物, 室温下继续反应 1h, 其中, 荧光标记生物素-抗体复合物、链霉亲和素、荧光标记生物素-聚赖氨酸复合物的摩尔比为 1:5:5; 反应结束后获得抗体-生物素-链霉亲和素-聚赖氨酸-荧光标记复合物, 即为信号放大型免疫荧光探针。

[0062] 实施例 5 荧光免疫层析试纸条的制备

[0063] (1) 样品垫制备: 将样品垫裁成 1.5×30cm, 将其放入处理液(3%BSA+1%Triton X-100)中, 浸泡 30min 后, 37℃ 烘干 3h 备用。

[0064] (2) 结合垫制备: 将结合垫裁成 1.0×30cm, 将实施例 4 制得的信号放大型免疫荧光探针用稀释液(含 1%BSA 和 1% 蔗糖的 PBS, 10mM, pH7-8) 稀释 3000 倍后, 喷于结合垫上, 37℃ 烘干 30min。

[0065] (3) NC 膜制备: 将 NC 膜裁成 2.5×30cm, 用点样仪在 NC 膜不同位置上按照 1ul/cm 的量喷上羊抗鼠 IgG 和抗原, 分别作为质控线和检测限, 37℃ 烘干 30min。

[0066] (4) 荧光免疫试纸条组装: 将样品垫、结合垫、NC 膜和吸水垫分别粘在底板上, 并裁成 4cm 宽的试纸条。

[0067] 实施例 6 荧光免疫层析试纸条检测瘦肉精(竞争法)

[0068] (1) 将瘦肉精标准品配制成不同浓度的系列标准品 0ppb, 0.1ppb, 0.3ppb, 0.9ppb, 2.7ppb, 8.1ppb。

[0069] (2) 将上述系列标准品各取 80ul, 加入到含有实施例 4 制得的信号放大型免疫荧光探针的试管中, 混匀后 2min, 取 70ul 上样, 层析持续 8min, 用荧光检测仪读取数据。利用荧光定量分析仪分别检测 T 线和 C 线的荧光强度(每个样品分别检测 3 次, 取平均值), 制作

抗原浓度的标准曲线;该荧光免疫试纸条的克伦特罗最低检测线为 0.05ppb。

[0070] (3)待测抗原用实施例 5 制得的试纸条进行检测,利用 T/C 的比值代入上述标准曲线求得待测抗原浓度。

[0071] (4)重复性实验:将 3 份阳性标本在同一时间段测定 20 次,计算批内变异系数;将同样的 3 份阳性标本连续测定 10 次,每天一次,计算批间变异系数。由结果知,批内变异系数和批间变异系数均小于 10%,表明该信号放大型免疫荧光探针用于荧光免疫层析,重复性较好。

[0072] (5)稳定性实验:1)将试剂(实施例 4 制得的信号放大型免疫荧光探针)于 37℃温箱放置 12 天,与放置在 4℃冰箱的试剂平行检测 3 份阳性和 1 份阴性标本,进行热稳定性试验。结果显示,该试剂至少可以稳定存放 18 个月以上。2)将试纸条密封分别存放于 37℃、25℃和 4℃,观察不同温度对试纸条的影响。保存于 37℃和 25℃的试纸条每个月取出 70 条分别检测标准品 0ppb,0.05ppb,0.1ppb,0.3ppb,0.9ppb,2.7ppb,8.1ppb。结果显示,试纸条分别在 25℃下保存 12 个月以及 37℃保存 6 个月,检测结果均未发现改变。

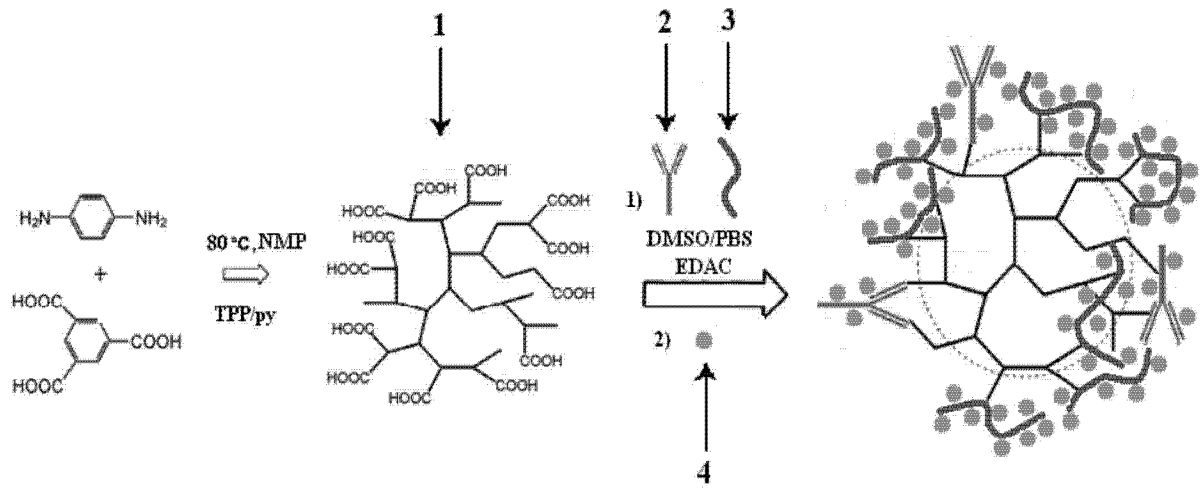


图 1

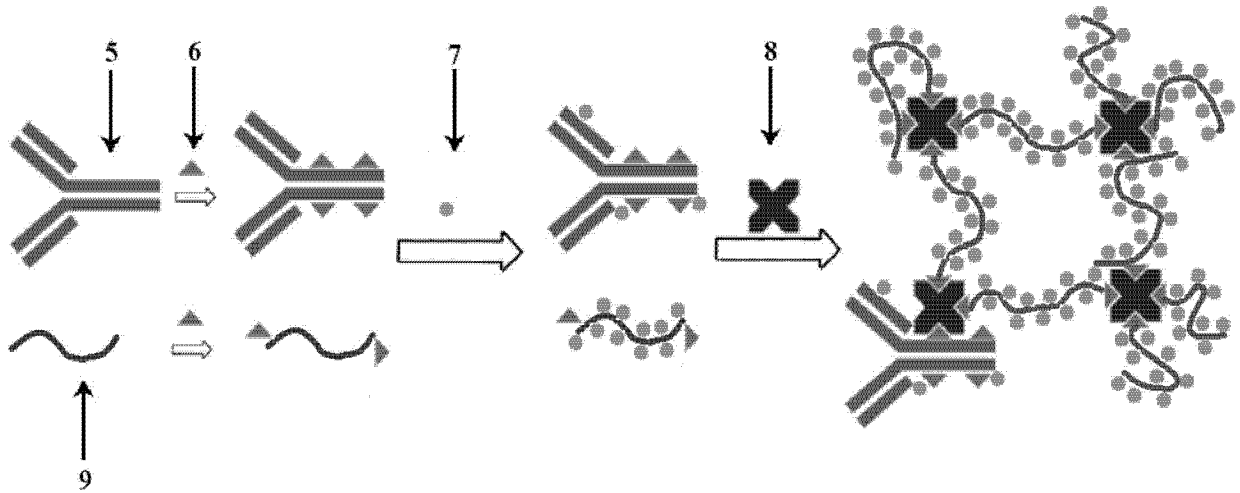


图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用 | | |
| 公开(公告)号 | CN103513026B | 公开(公告)日 | 2015-04-29 |
| 申请号 | CN201310470907.X | 申请日 | 2011-12-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 吴坚 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 吴坚 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 吴坚 | | |
| [标]发明人 | 吴坚 陈春香 | | |
| 发明人 | 吴坚 陈春香 | | |
| IPC分类号 | G01N33/533 G01N21/64 | | |
| CPC分类号 | G01N21/64 G01N33/582 | | |
| 代理人(译) | 胡红娟 | | |
| 审查员(译) | 肖吉 | | |
| 其他公开文献 | CN103513026A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种信号放大型免疫荧光探针及其制备方法和应用。该探针的制备方法包括：在缩合剂的存在下，对苯二胺和均苯三甲酸经缩合反应得到多羧基大分子；多羧基大分子经活化后，依次加入抗体、聚赖氨酸进行反应；再用荧光标记物标记，制得所述的探针。或者，其制备方法包括：将抗体、聚赖氨酸分别加入生物素溶液中反应生成相应的复合物，再用荧光标记物标记；将荧光标记的抗体-生物素复合物与链霉亲和素溶液混合进行反应，再加入荧光标记的聚赖氨酸-生物素复合物继续反应，制得所述的探针。通过上述方法制得的探针，标记有较多荧光标记物，结构稳定，易保藏；用于荧光免疫检测，具有检测灵敏度高、检测时间短、成本低等特点。

