



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109932350 B

(45) 授权公告日 2021.06.25

(21) 申请号 201910290617.4

(22) 申请日 2019.04.11

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109932350 A

(43) 申请公布日 2019.06.25

(73) 专利权人 迪佰(厦门)生物科技有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧区翁角西路2074号生物医药产业园B13号楼第7层02单元

(72) 发明人 肖江群 王保丹 钟乾兴

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务所(特殊普通合伙) 11463

代理人 覃蛟

(51) Int. Cl.

C07D 519/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

C07F 7/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103980274 A, 2014.08.13

CN 108697789 A, 2018.10.23

CN 102796515 A, 2012.11.28

US 8058075 B2, 2011.11.15

CN 106905326 A, 2017.06.30

Sung Ik Yang 等. Synthesis and excited-state photodynamics of perylene-porphyrin dyads Part 3. Effects of perylene, linker, and connectivity on ultrafast energy transfer.《J. Mater. Chem.》.2001,第11卷

审查员 段晓露

权利要求书2页 说明书12页 附图3页

(54) 发明名称

荧光分子、其制备方法和应用、免疫凝聚试剂盒、其制备方法以及检测抗原的方法

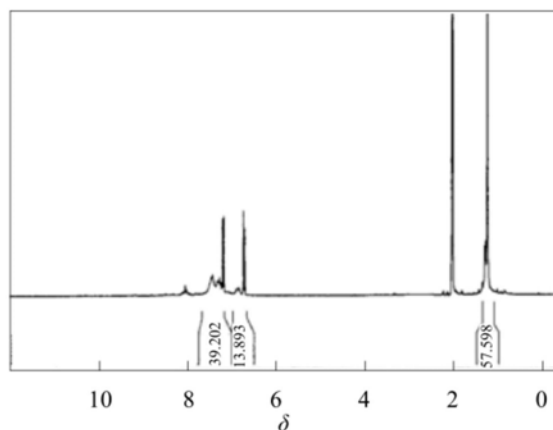
(57) 摘要

本发明涉及生物试剂盒领域,具体而言,涉及一种荧光分子、其制备方法和应用、免疫凝聚试剂盒、其制备方法以及检测抗原的方法。荧光分子为具有式(1)结构的化合物或其盐,式(1)如下:

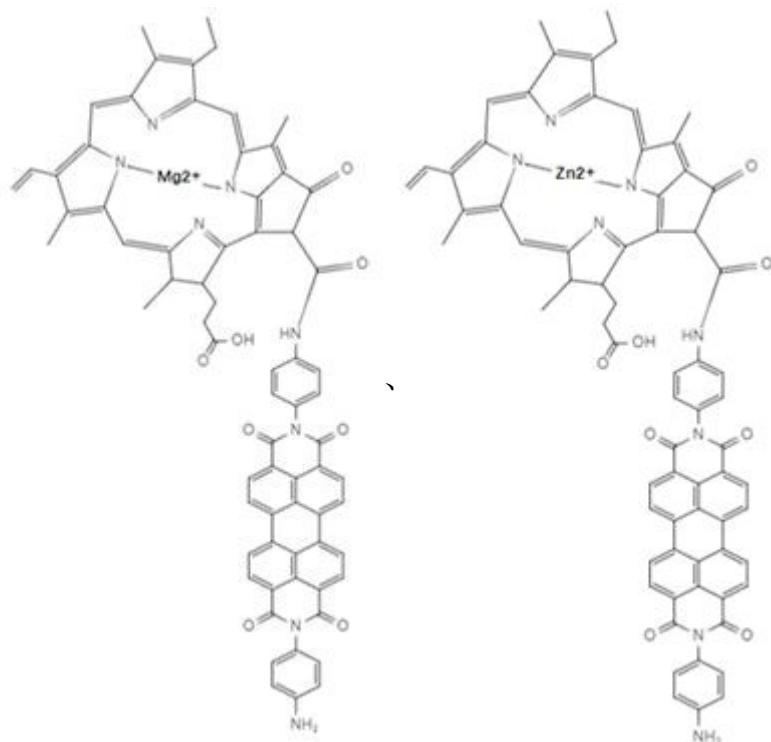
下: 式(1),其中R为

苯环任意位置的氨基,R'为金属卟啉或其类似结构。其具有在一定的范围内自身浓度增加,自身荧光信号快速降低的特性。利用该荧光分子与抗体偶联制备试剂盒,也可利用其自猝灭现象,导致荧光信号快速降低替代浊度的升高,提升检测结果的准确性。且可同时标记多个项目抗体,而后实现不同波长对应不同项目,继而实现同时同管检测多个项目抗原,节约了检测成本和时间,且该荧光物质检测灵敏度高,大大提高了检测试

剂的灵敏度与线性范围。



1. 一种荧光分子在荧光检测中的应用, 其特征在于, 所述应用为采用所述荧光分子检测抗体或者抗原, 将荧光分子之间的距离拉近到一个极小的范围内, 在荧光分子的浓度过大时, 会产生的自淬灭现象, 用荧光分子的荧光信号的降低, 继而可以检测抗体或者抗原的含量, 所述荧光分子的结构式选自下式中的任意一种:



2. 根据权利要求1所述的应用, 其特征在于, 所述荧光分子的制备方法包括以下步骤: 将对苯二胺与茚四羧酸酐反应得到中间体, 而后所述中间体与含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物反应得到所述荧光分子。

3. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于, 将对苯二胺、茚四羧酸酐和催化剂在氮气保护条件下在分阶段反应后利用二氯甲烷分离反应液得到所述中间体; 其中, 所述对苯二胺和所述茚四羧酸酐的摩尔比为2:1-6:1, 所述催化剂与对苯二胺的摩尔比为1: (2-5.45)。

4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述对苯二胺和所述茚四羧酸酐的摩尔比为3:1; 所述催化剂与对苯二胺的摩尔比为1:3.5。

5. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 分阶段反应是在氮气保护下, 对苯二胺、茚四羧酸酐、催化剂和溶剂在105-125℃反应3-5小时, 而后再在150-190℃的条件下回流10-30小时; 其中, 所述溶剂为邻甲基苯酚、间甲基苯酚或者对甲基苯酚中的任意一种。

6. 根据权利要求2所述的应用, 其特征在于, 所述中间体与所述含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物混合反应后固液分离形成固态中间体; 而后所述固态中间体与碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺反应形成活化的所述荧光分子。

7. 根据权利要求6所述的应用, 其特征在于, 所述固态中间体是将所述中间体、所述含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物、偶联剂和DMF在20-50℃条件下反应0.5-3小时后加入水并离心得到的固体; 其中, 所述中间体与所述含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物的质量比为1:1-2; 所述偶联剂为1- (3-二甲氨基丙基) -3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N, N'-二异丙基碳二亚胺或二环己基碳二亚胺中的任意一种。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述中间体与所述含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物的质量比为1:1.25。

9. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述固态中间体、碳二亚胺和所述N-羧基琥珀酰亚胺在30-45℃条件下反应1-4小时后在-5至-80℃条件下保存。

10. 一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其特征在于,其包括抗体和权利要求1所述的荧光分子偶联得到的偶联物;其中,所述抗体与所述荧光分子的摩尔比为1:1-1:10。

11. 根据权利要求10所述的基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其特征在于,所述抗体与所述荧光分子的摩尔比为1:4。

12. 根据权利要求10或11所述的基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其特征在于,所述抗体选自肺炎支原体抗体、胃蛋白酶原I抗体、乙型肝炎病毒抗体、降钙素原抗体和肌钙蛋白I抗体中的任意一种。

13. 一种权利要求10所述的基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒的制备方法,其特征在于,包括:将抗体和权利要求1所述的荧光分子进行偶联反应,在偶联反应之前对所述荧光分子进行活化;其中,按照每毫升抗体溶液对应10-300微升活化后的权利要求1所述的荧光分子的溶液将所述抗体溶液和活化后的荧光分子混合后进行偶联反应;所述偶联反应的温度为20-50℃,反应时间为1-8小时;所述抗体溶液的浓度为0.1-20 mg/ml,所述活化后的荧光分子的溶液的浓度为0.1-20 mg/ml。

14. 根据权利要求13所述的制备方法,其特征在于,所述偶联反应的反应条件为37℃和4小时;所述抗体溶液的浓度为1 mg/ml,所述活化后的荧光分子的溶液的浓度为1 mg/ml。

15. 根据权利要求13所述的制备方法,其特征在于,在偶联反应之后采用G50分子筛对反应产物进行纯化。

16. 根据权利要求15所述的制备方法,其特征在于,纯化包括:将反应产物过G50分子筛,随后采用10mM的PBS溶液作为洗脱液进行洗脱,再收集OD₂₈₀>0.1的组分。

17. 一种利用权利要求10所述的基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒检测抗原的方法,其特征在于,将待检测样本与偶联物混合,而后检测荧光强度。

荧光分子、其制备方法和应用、免疫凝聚试剂盒、其制备方法 以及检测抗原的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物试剂盒领域,具体而言,涉及一种荧光分子、其制备方法和应用、免疫凝聚试剂盒、其制备方法以及检测抗原的方法。

背景技术

[0002] 免疫凝集反应(agglutination)一种血清学反应。颗粒性抗原(完整的病原微生物或红细胞等)与相应抗体结合,在有电介质存在的条件下,经过一定时间,出现肉眼可见的凝集小块。

[0003] 现有技术的免疫比浊法便是利用抗原与抗体在特殊稀释系统中反应而且比例合适(一般规定抗体过量)时,形成的可溶性免疫复合物在稀释系统中的促聚剂(聚乙二醇等)的作用下,自液相析出,形成微粒,使反应液出现浊度。当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着检样中抗原量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。通过测定反应液的浊度与一系列标准品对照,即可计算出检样中抗原的含量。

[0004] 但是受样本中的血脂等颗粒物的影响,尤其是低稀释度时,脂蛋白等物质也可能形成小颗粒可阻挡入射光形成浊度,无法与由于免疫反应导致的浊度升高区别开来,从而使测定结果假性升高。同时,现有技术检测的信号为观全光谱吸收,没有特定波长的限制,无法实现多项目同时检测。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种荧光分子,该荧光分子在含量高过高是会发生自猝灭现象,继而导致特定波长的荧光信号的强度下降,避免了浊度检测的假性升高。

[0006] 本发明提供了一种荧光分子的制备方法,该方法更经济环保、减少废弃物的产生,降低生产成本和时间。

[0007] 本发明提供了一种荧光分子的应用,进一步完善了荧光分子的应用范围,且提升抗体或抗原的检测准确度。

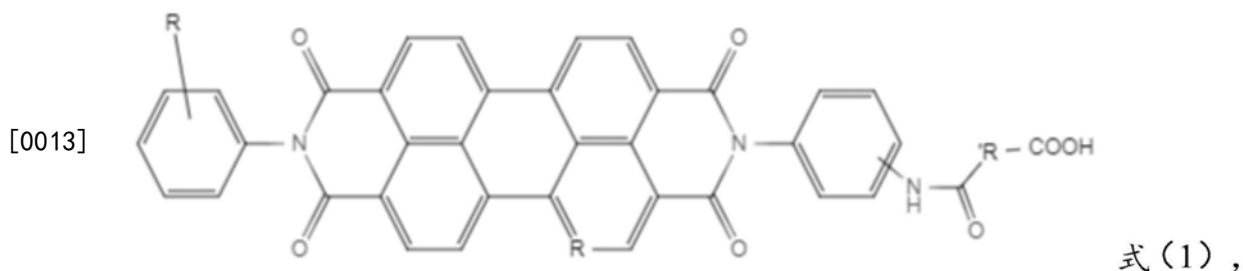
[0008] 本发明提供了一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其有效提升了抗原检测的准确度,避免了脂蛋白等的小颗粒可阻挡入射光形成浊度导致的测定结果假性升高。

[0009] 本发明提供了一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒的制备方法,该方法操作简单,降低了生产成本。

[0010] 本发明提供了一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒检测抗原的方法,该方法操作简单,且检测结果准确。

[0011] 本发明是这样实现的:

[0012] 本发明提供一种荧光分子,为具有式(1)结构的化合物或其盐,式(1)如下:



[0014] 其中,R苯环任意位置的氨基,R'为金属卟啉或其类似结构。

[0015] 本发明提供一种荧光分子的制备方法,将对苯二胺与茚四羧酸酐反应得到中间体,而后中间体与含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物反应得到荧光分子。

[0016] 本发明提供一种上述荧光分子在荧光检测中的应用;优选地,所述应用为采用所述荧光分子检测抗体或者抗原。

[0017] 本发明提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其包括抗体和上述的荧光分子偶联得到的偶联物。

[0018] 本发明提供一种上述基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒的制备方法,包括:将抗体和上述的荧光分子进行偶联反应;

[0019] 本发明提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒检测抗原的方法,将待检测样本加入上述的基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒中,而后检测荧光强度。

[0020] 本发明的有益效果是:本发明提供一种荧光分子其具有在一定的范围内自身浓度增加,自身荧光信号快速降低的特性。利用该荧光分子与抗体偶联制备试剂盒,也可利用其自猝灭现象,导致荧光信号快速降低替代浊度的升高,提升检测结果的准确性。且可以同时标记多个项目抗体,而后实现不同波长对应不同项目,继而实现同时同管检测多个项目抗原,节约了检测成本和时间,且该荧光物质检测灵敏度高,大大提高了检测试剂的灵敏度与线性范围。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0022] 图1为实施例1的提供的中间体的核磁共振图谱;

[0023] 图2为实施例1的提供的中间体的红外图谱;

[0024] 图3为实施例1的荧光分子的荧光图谱;

[0025] 图4为实施例1的荧光分子的核磁共振图谱;

[0026] 图5为实施例1的与抗体偶联物的UV图;

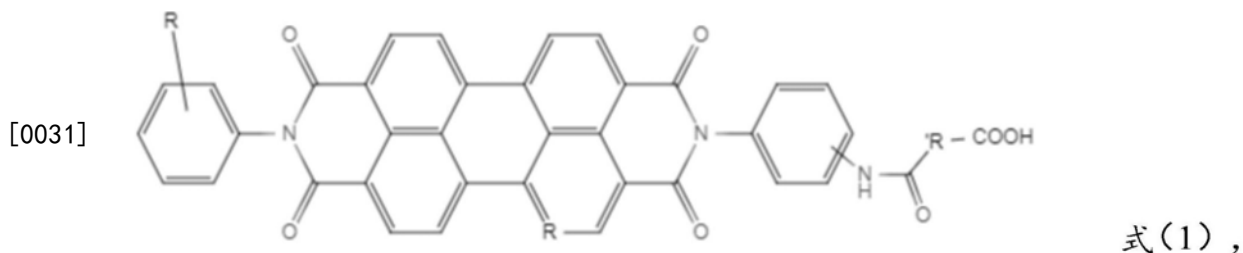
[0027] 图6为对比例1的荧光图谱。

具体实施方式

[0028] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0029] 下面对本发明实施例的荧光分子、其制备方法和应用、免疫凝聚试剂盒、其制备方法以及检测抗原的方法进行具体说明。

[0030] 一种荧光分子,其具有式(1)结构的化合物或其盐,式(1)如下:



[0032] 其中,R为苯环任意位置的氨基,R'为金属卟啉或其类似结构。R的氨基在苯环上的位置,与R'连接酰胺在苯环上的位置相同。

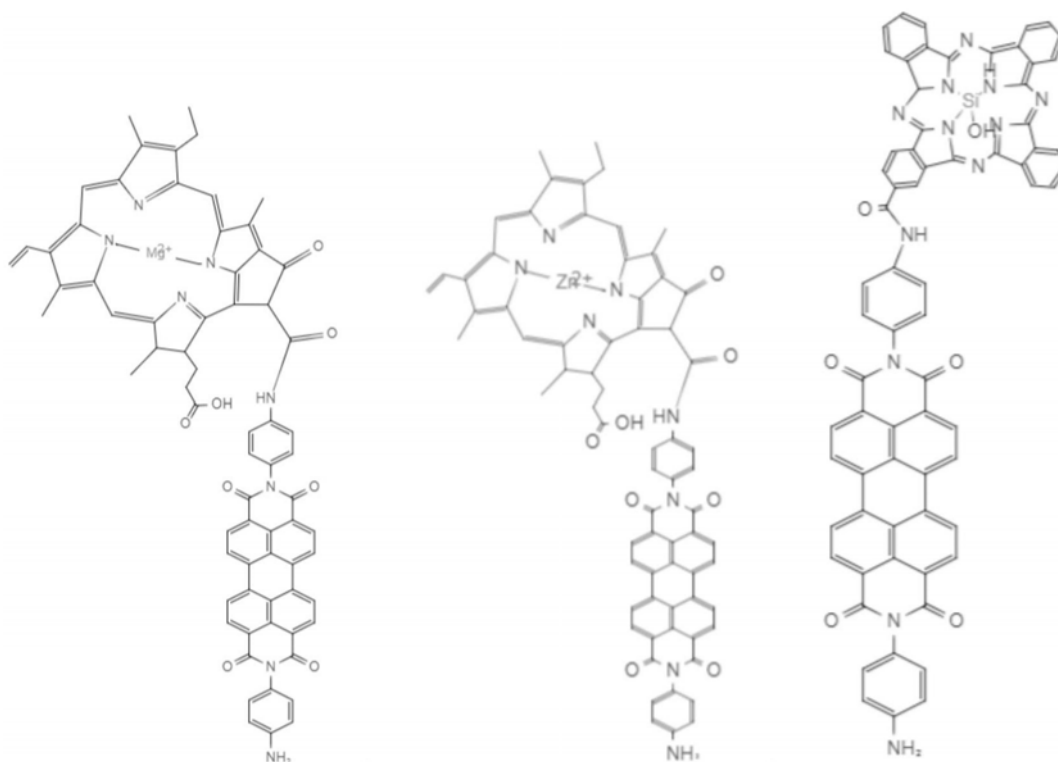
[0033] 该荧光分子采用上述结构能够在高浓度时能够发生自猝灭现象,继而导致特定波长的荧光信号降低。同时,其可以与抗体进行偶联,且偶联得到的偶联物与抗原作用后也可以发生自猝灭现象,继而导致特定波长的荧光信号降低,可以用于检测抗原的含量,继而避免了免疫比浊法中脂蛋白等的小颗粒可阻挡入射光形成浊度,从而是使测定结果假性升高,提升了检测结果的准确性。

[0034] 进一步地,该荧光分子可以与多个项目抗体进行偶联,继而可以导致不同波长的荧光信号降低,实现了不同波长对应不同项目,继而实现多个抗原同时检测,且该荧光分子对检测灵敏度高,大大提高了后期制备得到的检测试剂的灵敏度与线性范围。由于该检测方法不是采用的比浊法,因此可以在高浓度脂蛋白存在的情况进行高效、快速地检测,且检测结果不受影响。

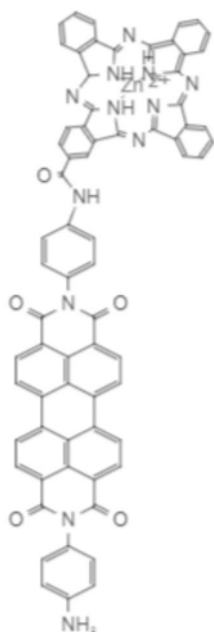
[0035] 进一步地,该荧光分子中R'中的金属卟啉选自锌卟啉或者镁卟啉,R'的金属卟啉类似结构选自硅酞菁或者锌酞菁。采用上述物质形成含有R'的基团,能够保证制备得到的荧光分子可以在高浓度时发生自猝灭,且能够导致特定波长的荧光信号降低。

[0036] 进一步地,荧光分子的结构式选自下式中的任意一种:

[0037]



[0038]



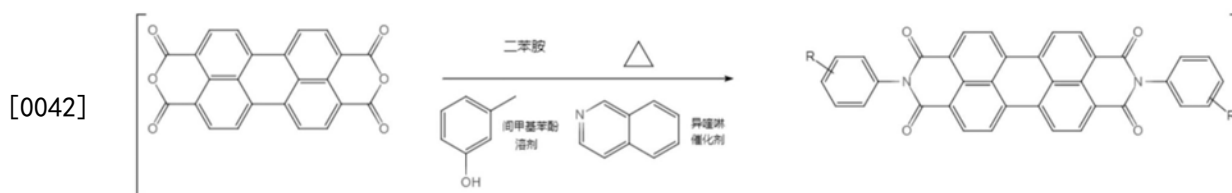
采用上述荧光分子保证在极小的范围内,而在荧光分子的浓度

过大时,会产生的自淬灭现象,用特定波长的荧光信号降低,且该荧光分子可以同时与多个项目的抗体结合,而该多个项目的抗体预先标记不同波长荧光信号,而后利用不同波长同时检测多个项目的抗体。

[0039] 本发明还提供一种荧光分子的制备方法,包括以下步骤:

[0040] S1、制备中间体;

[0041] 按照下述方程式制备中间体:



[0043] 将对苯二胺与酫四羧酸酫反应得到中间体,具体地,将对苯二胺、酫四羧酸酫和催化剂在氮气保护条件下在分阶段反应后利用二氯甲烷分离反应液得到中间体。

[0044] 进一步地,将对苯二胺、酫四羧酸酫和催化剂在氮气保护条件下对苯二胺、酫四羧酸酫、催化剂和溶剂在105-125℃反应3-5小时,而后再在150-190℃的条件下回流10-30小时,而后降温至60℃,接着将反应液加入至二氯甲烷中,最后进行过滤得到中间体。氮气防止对苯二胺被氧化,继而保证中间体的顺利合成。

[0045] 进一步地,对苯二胺和酫四羧酸酫的摩尔比为2:1-6:1,更优选为3:1;催化剂与对苯二胺的摩尔比为1:(2-5.45),更优选为,1:3.5。采用上述比例能够保证中间体的产率,降低杂质含量。

[0046] 进一步地,溶剂为邻甲基苯酚、间甲基苯酚或者对甲基苯酚中的任意一种;而催化剂为异喹啉,采用上述物质能够保证反应顺利进行,中间体能顺利形成。

[0047] 进一步地,每克酫四羧酸酫对应25-100毫升溶剂,采用上述比例能够进一步保证合成效果。

[0048] S2、合成荧光分子;

[0049] 而后中间体与含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物反应得到荧光分子。具体地,中间体与含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物混合反应后固液分离形成固态中间体,也就是说将中间体、含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物、N偶联剂和DMF在20-50℃条件下反应0.5-3小时后加入水并离心得到的固态中间体。

[0050] 进一步地,中间体与含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物的质量比为1:1-2;更优选为,1:1.25。采用上述方法能够保证荧光分子的形成。

[0051] 进一步地,含有两个羧基并具有金属卟啉类似结构的化合物选自叶绿素A、羧基硅酫菁,羧基锌酫菁和羧基锌卟啉中的至少一种。采用上述原料能够形成含有R'的荧光分子。

[0052] 所述偶联剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、N,N'-二异丙基碳二亚胺或二环己基碳二亚胺中的任意一种。

[0053] 而后固态中间体与碳二亚胺和N-羟基琥珀酫亚胺反应形成荧光分子,具体地,固态中间体、碳二亚胺和N-羟基琥珀酫亚胺在30-45℃条件下反应1-4小时后在-5至-80℃条件下保存。其中,固态中间体与碳二亚胺和N-羟基琥珀酫亚胺的摩尔比为1:3:2。

[0054] 本发明还提供了上述荧光分子在荧光检测中的应用,优选,所述应用为采用所述荧光分子检测抗体或者抗原。将荧光分子质检的距离拉近到一个极小的范围内,在荧光分子的浓度过大时,会产生的自淬灭现象,用荧光分子的荧光信号的降低,继而可以检测抗体或者抗原的含量。采用该方法替代浊度的升高,可以避免脂蛋白等的小颗粒可阻挡入射光形成浊度导致的测定结果假性升高。且对多个项目抗体预先标记不同波长荧光分子,实现了不同波长对应不同项目,同管同时检测。

[0055] 本发明还提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其包括抗体和上述的荧光分子偶联得到的偶联物,优选,抗体和荧光分子的摩尔比为1:1-1:10,更优选为1:4。该荧光分

子在高浓度下发生自猝灭,抗体和该荧光分子偶联得到的偶联物与抗原作用后也可以在高浓度下发生自猝灭,继而使得对应波长的荧光信号强度降低,继而实现抗原含量的检测。

[0056] 优选地,所述抗体选自肺炎支原体抗体、乙型肝炎病毒抗体、降钙素原抗体、肌钙蛋白I抗体和胃蛋白酶原I抗体中的任意一种。

[0057] 本发明提供了一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒检测抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0058] S1、活化荧光分子;

[0059] 首先活化荧光分子,按照1毫克荧光分子对应0.5-10ml二甲基亚砜将荧光分子与二甲基亚砜进行混合;而后得到活化后的荧光分子的溶液。也就是说活化后的荧光分子的溶液的浓度为0.1-20mg/ml,更优选为,1mg/ml,采用上述浓度能够更有利于荧光分子与抗体结合。对荧光分子进行活化有利于荧光分子和抗体结合。

[0060] S2、偶联;

[0061] 利用1-100mMPBS将购买得到的抗体进行稀释,购买的抗体浓度较高,不利于与荧光分子作用,因此,现将其进行稀释,有利于后续与荧光分子作用。稀释后的抗体溶液的浓度为0.1-20mg/ml,更优选为,1mg/ml。采用上述浓度更有利于抗体与荧光分子作用,继而有利于保证检测结果的准确性。

[0062] 而后将抗体和荧光分子进行偶联反应,具体地,按照每毫升抗体溶液对应10-300微升上述荧光分子的溶液将抗体溶液和荧光分子进行混合后进行偶联反应,偶联反应的温度为20-50℃,反应时间为1-8小时,也就是说将抗体和上述活化后的荧光分子溶液按照上述比例混合后震荡均匀,并在20-50℃条进行反应1-8小时,优选为37℃反应4小时。采用上述方法能够保证荧光分子和抗体的偶联。

[0063] 在偶联反应之后对反应产物进行纯化,优选,采用G50分子筛进行所述纯化。具体地,纯化包括:将反应产物过G50分子筛,随后采用10mM的PBS溶液作为洗脱液进行洗脱,再收集OD₂₈₀>0.1的组分。

[0064] 也就是偶联后以10mM PBS为洗脱液,用G50分子筛过柱脱盐。收集280nm OD>0.1的组分。完成后2~8℃保存备用。

[0065] 本发明提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒检测抗原的方法,包括以下步骤:

[0066] 将待检测样本加入上述的基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒中,而后检测荧光强度,具体操作如下:

[0067] S1、配制待测样本稀释液;

[0068] 利用5-30mM pH6.86-8.9的硼酸盐缓冲液(含1mM Mg²⁺),NaCl0.5%2%,BSA0.5-2%,曲拉通405 0.01-0.5%,AMPHITOL 24B 0.01-0.05%配制稀释液,而后使用稀释液稀释待测样本,稀释倍数为5-10倍,作为待检测样本液。

[0069] S2、抗体稀释液;

[0070] 利用10mM pH7.4的硼酸盐缓冲液(含1mM Mg²⁺),0.85%NaCl,1%BSA,0.5%蛋白胨,0.01%曲拉通405,0.02%AMPHITOL 55AB配制稀释液,而后将上述抗体和荧光分子偶联得到的偶联物加入上述稀释液中进行稀释,稀释倍数为1千-1万倍作为检测工作液。

[0071] 最后将待检测样本液170微升和50微升检测工作液混合,且15秒后读取该混合液

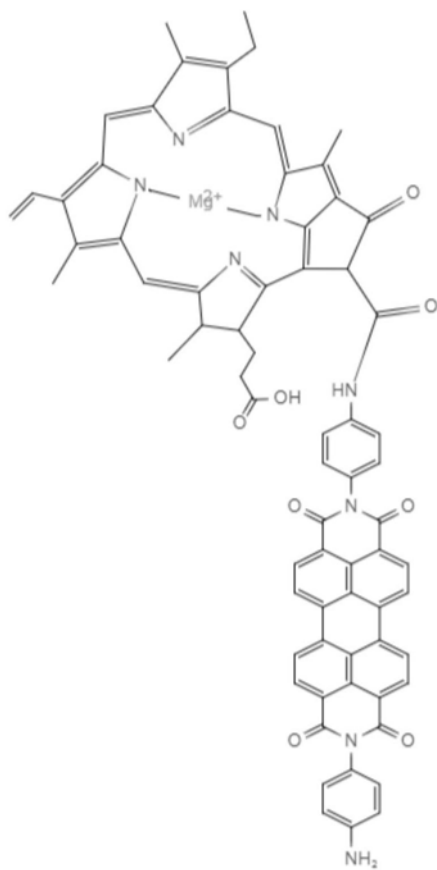
的荧光强度作为第一点,5min后读取混合溶液荧光强度为第二点。第一点与第二点荧光强度变化值与抗原浓度成反比。

[0072] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0073] 实施例1

[0074] 本实施例提供一种荧光分子,其结构是如下:

[0075]

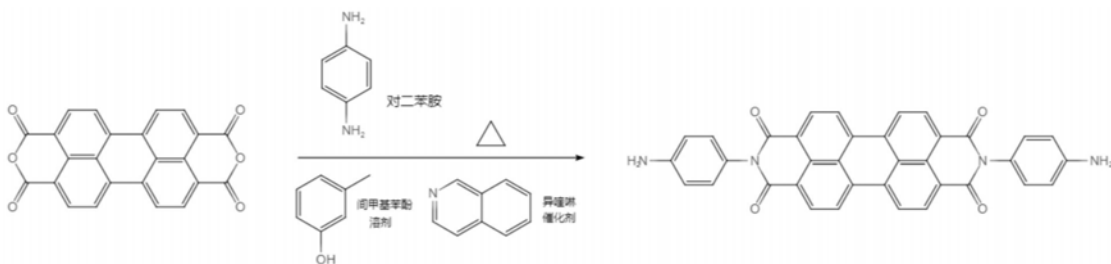


[0076] 本发明还提供一种上述荧光分子的制备方法,包括以下步骤:

[0077] S1、制备中间体;

[0078] 按照下述方程式制备中间体:

[0079]

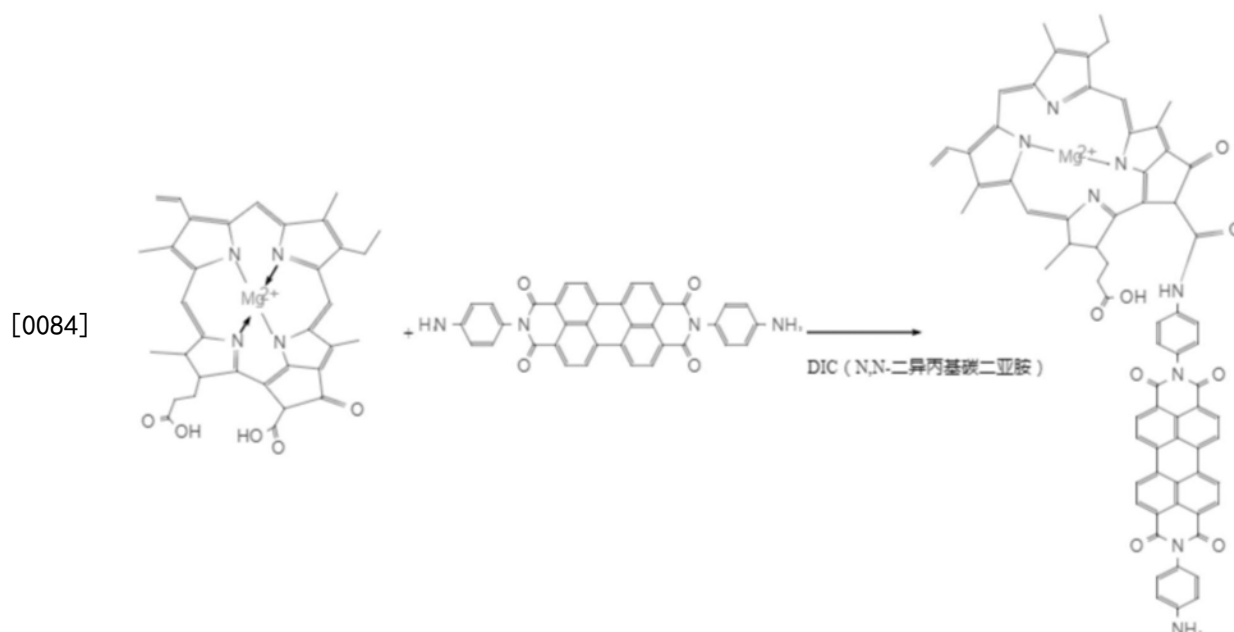


[0080] 具体地,取酞四羧酸酐1.00g,置于100ml三颈瓶中,再加入对苯二胺0.9312g,3.662g异喹啉,50ml间甲基苯酚做溶剂,氮气保护同时搅拌下逐渐缓慢加热至115℃,反应4小时;继续缓慢加热升高温度至180℃回流搅拌反应20小时。降低温度至60℃左右,趁热迅速将反应液倒入300ml二氯甲烷中。此时应有棕红色固体生成。过滤收集固体。用50ml二氯甲烷洗涤固体3次,除去未反应的酸酐。80℃真空干燥3小时,获得棕红色固体花染料基团也就是中间体。

[0081] 该中间体的检测参见图1和图2,图1为核磁共振图谱,图2为红外图谱,根据图1和图2可知,该中间体成功合成。

[0082] S2、合成荧光分子;

[0083] 按照下述方程式制备中间体:



[0085] 50mg叶绿素A粉末加上上述的花染料基团也就是中间体35mg,溶解于1mlDMF中,加入100u1 DIC (N,N'-二异丙基碳二亚胺), 37℃反应2小时。加入1ml水,离心取固体备用。加入1ml DMF溶解固体,加EDC(碳二亚胺)与NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 37℃反应2h分装为100u1一份-20℃保存,每份均为上述荧光分子。

[0086] 该荧光分子的检测参见图3和图4,图3为荧光图谱,图4为核磁共振图谱,根据图3和图4可知,该荧光分子已成功合成。

[0087] 本实施例还提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒,其包括肺炎支原体抗体和上述的荧光分子偶联得到的偶联物,且抗体和荧光分子的摩尔比为1:4。该抗体与荧光分子的偶联物的UV检测图参见图5。

[0088] 本实施例还提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒制备方法,包括以下步骤:

[0089] S1、活化荧光分子;

[0090] 按照1毫克荧光分子对应1ml二甲基亚砷将荧光分子与二甲基亚砷进行混合;而后得到活化后的荧光分子的溶液。也就是说活化后的荧光分子的溶液的浓度为1mg/ml。

[0091] S2、偶联;

[0092] 利用10mMPBS对抗体进行稀释,稀释后的肺炎支原体抗体溶液的浓度为1mg/ml,而后按照每毫升抗体溶液对应100微升上述活化后的荧光分子的溶液将抗体溶液和活化后的荧光分子进行混合,震荡均匀,并在37℃条进行反应4小时。以10mM PBS为洗脱液,用G50分子筛过柱脱盐。收集280nm OD>0.1的组分。完成后2~8℃保存备用。制备得到该偶联物。

[0093] 本实施例还提供一种基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒检测抗原的方法,包括以下步骤:

[0094] S1、配制待测样本稀释液;

[0095] 利用10mM pH7.4的硼酸盐缓冲液(含1mM Mg^{2+}), 0.85%NaCl, 1%BSA, 0.1%曲拉通405, 0.02%AMPHITOL 24B配制稀释液, 而后20微升的血清加入150微升的上述稀释液中, 37℃处理5min, 作为待检测样本液。

[0096] S2、抗体稀释液;

[0097] 利用10mM pH7.4的硼酸盐缓冲液(含1mM Mg^{2+}), 0.85%NaCl, 1%BSA, 0.5%蛋白胨, 0.01%曲拉通405, 0.02%AMPHITOL 55AB配制稀释液, 而后将上述抗体和荧光分子偶联得到的偶联物加入上述稀释液中进行稀释, 稀释倍数为1千倍作为检测工作液。

[0098] 最后将50微升检测工作液加入上述待检测样本液中, 15s读取混合溶液荧光强度为第一点, 5min后读取混合溶液荧光强度为第二点, 并计算抗原浓度, 具体检测结果参见表1。

[0099] 表1检测结果

抗体: 荧光=1: 4 时抗原浓度与荧光强度关系				
		计算方式	未知样本检测信号	未知样本对应浓度
抗原浓度/ng	相对荧光强度	15 秒信号-5 分钟信号		
1000	60	20000-19940		
500	125	20000-19875		
250	250	20000-19750		
125	500	20000-19500		
50	1000	20000-19000	20000-19000=1000	50ng
20	2000	20000-18000		
10	4000	20000-16000		
5	6000	20000-14000	20000-14000=6000	5ng
2	8000	20000-12000		
1	12000	20000-6000		
0.5	16000	20000-4000		
0.25	18000	20000-2000		
0.1	19000	20000-1000		
0	20000	20000-0		

[0101] 实施例2-实施例4

[0102] 实施例2-4提供的荧光分子与实施例1提供的荧光分子结构式相同, 实施例2-实施例4提供的荧光分子的制备方法、基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒制备方法与实施例1提供的制备方法基本一致, 区别在于操作条件不同。

[0103] 实施例2:

[0104] 荧光分子的制备方法——

[0105] S1、制备中间体;

[0106] 临对苯二胺和茈四羧酸酐的摩尔比为4:1, 催化剂的添加量为的茈四羧酸酐的添加量的1:3.5, 分阶段反应时, 第一次加热的温度和时间分别为125℃反应3小时, 第二次加热的温度和时间分别为150℃反应30小时。

[0107] S2、合成荧光分子;

[0108] 中间体与叶绿素A的质量比为1:2, 中间体、叶绿素A、N,N'-二异丙基碳二亚胺和DMF在50℃条件下反应3小时, 而后离心分离, 在加入碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺反应形

成荧光分子。

[0109] 基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒制备方法——

[0110] S1、活化荧光分子；

[0111] 按照1毫克荧光分子对应0.5ml二甲基亚砷将荧光分子与二甲基亚砷进行混合；而后得到活化后的荧光分子的溶液。也就是说活化后的荧光分子的溶液的浓度为2mg/ml。

[0112] S2、偶联；

[0113] 利用10mMPBS对抗体进行稀释，稀释后的抗体溶液的浓度为1mg/ml，而后按照每毫升抗体溶液对应50微升上述活化后的荧光分子的溶液将抗体溶液和活化后的荧光分子进行混合，震荡均匀，并在45℃条进行反应8小时。以10mM PBS为洗脱液，用G50分子筛过柱脱盐。收集280nm OD>0.1的组分。完成后2~8℃保存备用。制备得到该偶联物。抗体为丙型肝炎病毒抗体。

[0114] 实施例3

[0115] 荧光分子的制备方法——

[0116] S1、制备中间体；

[0117] 临对苯二胺和茚四羧酸酐的摩尔比为2:1，催化剂的添加量为的茚四羧酸酐的添加量的1:2，分阶段反应时，第一次加热的温度和时间分别为105℃，8小时，第二次加热的温度和时间分别为150℃，10小时。

[0118] S2、合成荧光分子；

[0119] 中间体与叶绿素A的质量比为1:1，中间体、叶绿素A、二环己基碳二亚胺和DMF在30℃条件下反应1小时，而后离心分离，在加入碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺反应形成荧光分子。

[0120] 基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒制备方法——

[0121] S1、活化荧光分子；

[0122] 按照1毫克荧光分子对应2ml二甲基亚砷将荧光分子与二甲基亚砷进行混合；而后得到活化后的荧光分子的溶液。也就是说活化后的荧光分子的溶液的浓度为0.5mg/ml。

[0123] S2、偶联；

[0124] 利用10mMPBS对抗体进行稀释，稀释后的抗体溶液的浓度为1mg/ml，而后按照每毫升抗体溶液对应10微升上述活化后的荧光分子的溶液将抗体溶液和活化后的荧光分子进行混合，震荡均匀，并在30℃条进行反应8小时。以10mM PBS为洗脱液，用G50分子筛过柱脱盐。收集280nm OD>0.1的组分。完成后2~8℃保存备用。制备得到该偶联物。抗体为降钙素原抗体。

[0125] 实施例4

[0126] 荧光分子的制备方法——

[0127] S1、制备中间体；

[0128] 临对苯二胺和茚四羧酸酐的摩尔比为6:1，催化剂的添加量为的茚四羧酸酐的添加量的1:5.45，分阶段反应时，第一次加热的温度和时间分别为125℃，5小时，第二次加热的温度和时间分别为190℃，10小时。

[0129] S2、合成荧光分子；

[0130] 中间体与叶绿素A的质量比为1:2，中间体、叶绿素A、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基

碳二亚胺盐酸盐和DMF在45℃条件下反应4小时,而后离心分离,在加入碳二亚胺和N-羧基琥珀酰亚胺反应形成荧光分子。

[0131] 基于荧光猝灭的免疫凝聚试剂盒制备方法——

[0132] S1、活化荧光分子;

[0133] 按照1毫克荧光分子对应10ml二甲基亚砷将荧光分子与二甲基亚砷进行混合;而后得到活化后的荧光分子的溶液。也就是说活化后的荧光分子的溶液的浓度为0.1mg/ml。

[0134] S2、偶联;

[0135] 利用10mMPBS对抗体进行稀释,稀释后的抗体溶液的浓度为1mg/ml,而后按照每毫升抗体溶液对应300微升上述活化后的荧光分子的溶液将抗体溶液和活化后的荧光分子进行混合,震荡均匀,并在50℃条进行反应8小时。以10mM PBS为洗脱液,用G50分子筛过柱脱盐。收集280nm OD>0.1的组分。完成后2~8℃保存备用。制备得到该偶联物。抗体为肌钙蛋白I抗体。

[0136] 对比例1:按照实施例1的方式制备免疫凝聚试剂盒,并采用相同方法和条件对抗原进行检测,区别在于抗体和荧光分子的摩尔比为1:1,1:8和1:10,检测得到的荧光图谱参见表2和图6。

[0137] 表2抗体和荧光分子不同比例对免疫的影响

1:1		1:4		1:8		1:10	
抗原浓度/ng	荧光强度	抗原浓度/ng	荧光强度	抗原浓度/ng	荧光强度	抗原浓度/ng	荧光强度
1000	125	1000	60	1000	50	1000	2
500	250	500	125	500	50	500	5
250	500	250	250	250	50	250	6
125	1000	125	500	125	125	125	12.5
50	2000	50	1000	50	250	50	250
20	4000	20	2000	20	500	20	500
10	8000	10	4000	10	1000	10	1000
5	6000	5	6000	5	2000	5	2000
2	9900	2	8000	2	4000	2	4000
1	9970	1	12000	1	6000	1	6000
0.5	9980	0.5	16000	0.5	8000	0.5	8000
0.25	10000	0.25	18000	0.25	20000	0.25	20000
0.1	10000	0.1	19000	0.1	60000	0.1	60000
0	10000	0	20000	0	80000	0	100000

[0139] 根据表2和图6可知,抗体和荧光分子的摩尔比为1:1时,抗原浓度过低时无法检测区分,比例为1:8时,抗原浓度过高时无法检测区分,比例为1:8时,抗原浓度过高时较难检测区分。

[0140] 实验例

[0141] 采用实施例1提供的试剂盒以及方法进行抗原检测,抗体和荧光分子的摩尔比为

1:4,区别在于添加甘油三酯浓度的浓度,检测结果参见表3。

[0142] 表3检测结果

[0143]

添加甘油三酯浓度 (mmol/L)	0	1.4	5.7	17
抗原浓度/ng	荧光强度	荧光强度	荧光强度	荧光强度
1000	60	60	58.8	57
500	125	125	122.5	118.75

[0144]

250	250	250	245	237.5
125	500	500	490	475
50	1000	1000	980	950
20	2000	2000	1960	1900
10	4000	4000	3920	3800
5	6000	6000	5880	5700
2	8000	8000	7840	7600
1	12000	12000	11760	11400
0.5	16000	16000	15680	15200
0.25	18000	18000	17640	17100
0.1	19000	19000	18620	18050
0	20000	20000	19600	19000

[0145] 根据表3可知,即使甘油三酯的添加量达到临床上的重度含量甚至达到临床无法达到的含量,荧光信号也仅下降2-5%,不会干扰检测结果。

[0146] 综上,本发明提供一种荧光分子其具有在一定的范围内自身浓度增加,自身荧光信号快速降低的特性。利用该荧光分子与抗体偶联制备试剂盒,也可利用其自猝灭现象,导致荧光信号快速降低替代浊度的升高,提升检测结果的准确性。且可以同时标记多个项目抗体,而后实现不同波长对应不同项目,继而实现同时同管检测多个项目抗原,节约了检测成本和时间,且该荧光物质检测灵敏度高,大大提高了检测试剂的灵敏度与线性范围。

[0147] 以上仅为本发明的优选实施方式而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

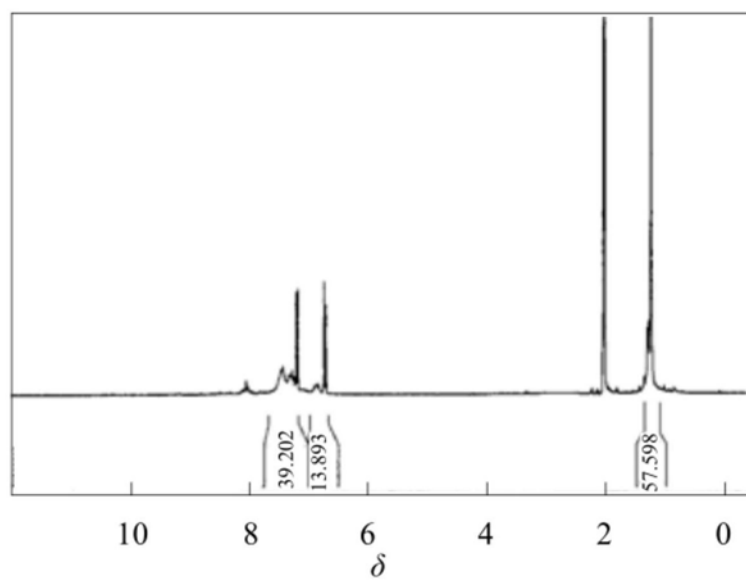


图1

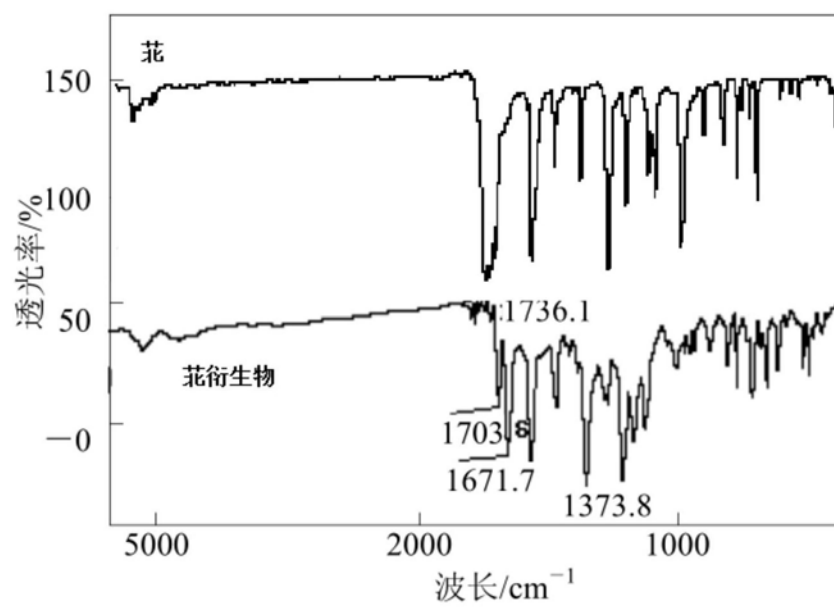


图2

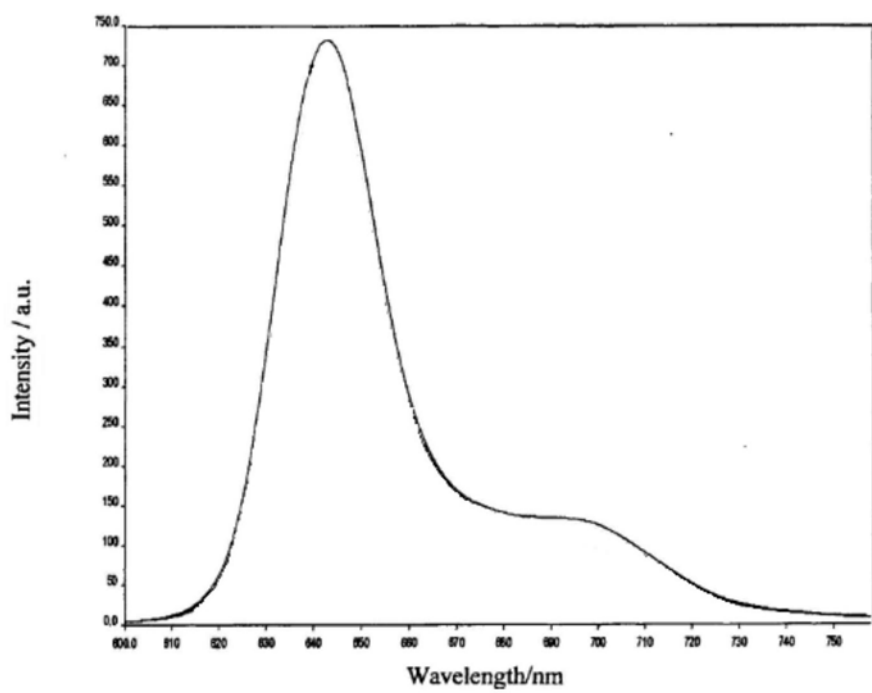


图3

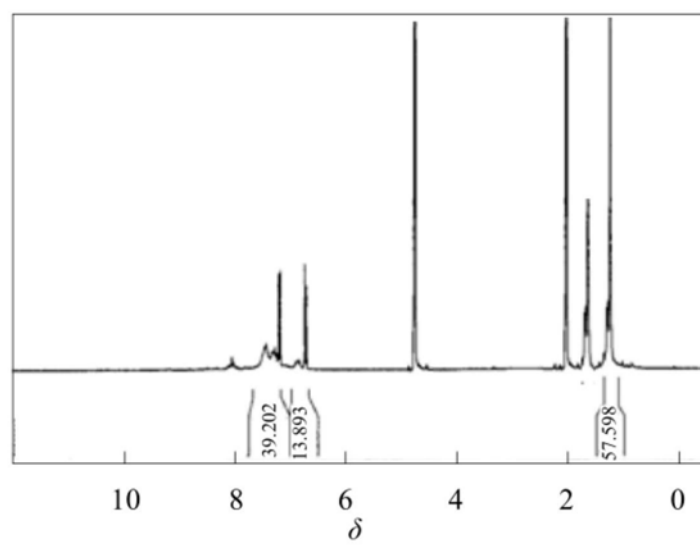


图4

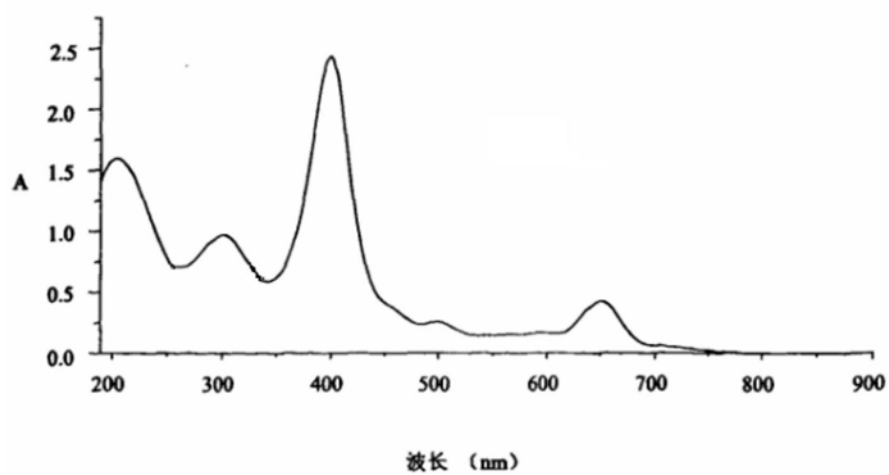


图5

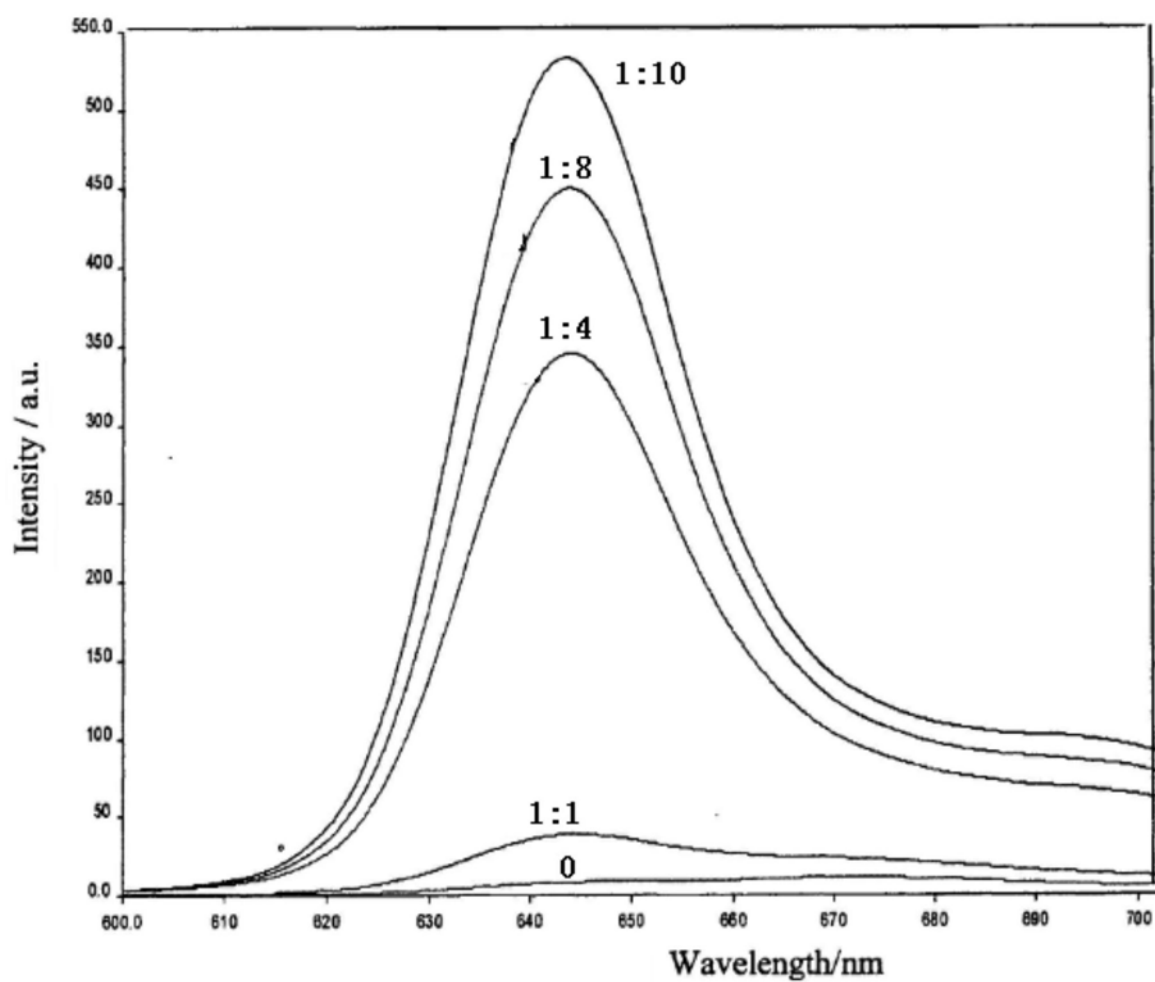


图6