



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113281317 B

(45) 授权公告日 2022.04.29

(21) 申请号 202110546208.3

(22) 申请日 2021.05.19

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113281317 A

(43) 申请公布日 2021.08.20

(66) 本国优先权数据  
202110524729.9 2021.05.14 CN

(73) 专利权人 北京指真生物科技有限公司  
地址 102600 北京市大兴区北京经济技术  
开发区科创十四街20号院1号楼三层  
302

(72) 发明人 刘燕 徐兵 马永波

(74) 专利代理机构 北京维正专利代理有限公司  
11508

代理人 张瑞雪

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111182891 A, 2020.05.19

CN 1289256 A, 2001.03.28

US 2004002110 A1, 2004.01.01

US 2005208095 A1, 2005.09.22

CN 101392172 A, 2009.03.25

审查员 李佩

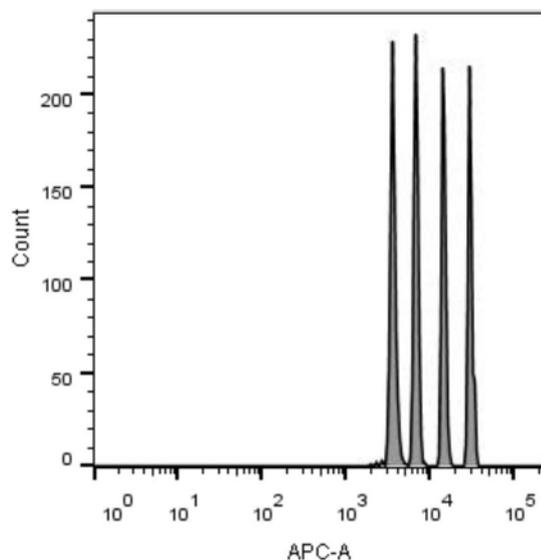
权利要求书1页 说明书20页 附图4页

(54) 发明名称

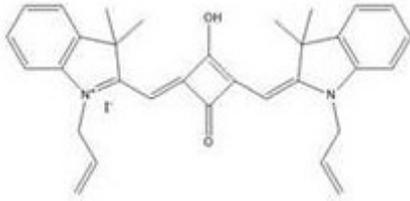
一种含有花菁类化合物的编码微球及其制备方法和应用

(57) 摘要

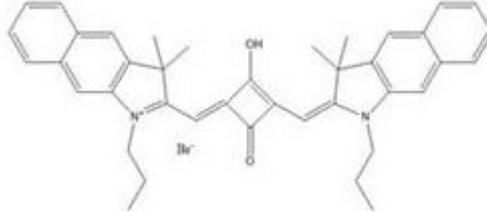
本申请涉及荧光编码微球技术领域,公开了一种含有花菁类化合物的编码微球及其制备方法和应用。一种含有花菁类化合物的编码微球,所述编码微球包括:花菁类化合物、微球、封闭层,花菁类化合物在微球内部,封闭层在最外层。其制备方法,包括以下步骤:将微球分散于溶剂,得到微球悬浮液;将花菁类化合物溶解于溶剂,得到染料溶液;将染料溶液加入微球悬浮液中;包覆封闭层。含有花菁类化合物的编码微球在制备检测抗原/抗体和核酸的生物检测试剂中的应用。本申请通过控制花菁类化合物的加入量或加入化合物的个数,得到一系列荧光强度不同的编码微球,最终制得的编码微球荧光变异系数(CV值)好,编码范围大。



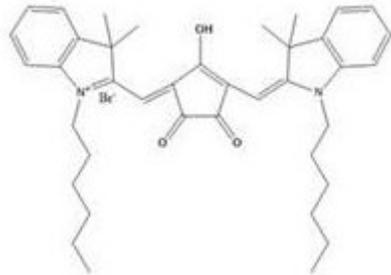
1. 一种含有花菁类化合物的编码微球,其特征在于:所述编码微球包括:花菁类化合物、微球、封闭层,花菁类化合物吸附在微球内部,封闭层包覆在微球的表面;所述封闭层厚度为20-800nm;所述封闭层为硅烷化试剂在微球表面进行缩聚反应形成,所述硅烷化试剂包括原硅酸酯、氨基硅烷、环氧硅烷、醛基硅烷中的任意一种或多种;所述封闭层是经过官能化处理的,所述官能团为羟基、羧基、氨基、醛基、巯基、环氧基、叠氮、炔基中的任意一种;所述花菁类化合物选自:



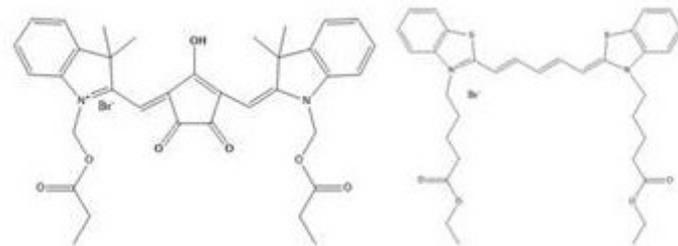
化合物I



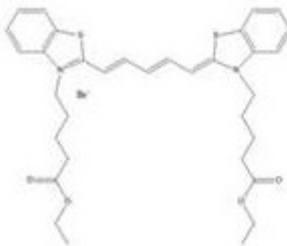
化合物II



化合物IV



化合物V



化合物VI。

2. 根据权利要求1所述的一种含有花菁类化合物的编码微球,其特征在于:所述微球为聚合物微球。

3. 根据权利要求1-2任一所述的含有花菁类化合物的编码微球的制备方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 将微球分散于第一溶剂中,得到微球悬浮液;

2) 将花菁类化合物溶解于第二溶剂中,得到染料溶液;

3) 将染料溶液加入到微球悬浮液中,混合,得到微球和染料的混合溶液;其中,在所述混合溶液中,微球的质量浓度为0.1-10mg/mL,染料的质量浓度为 $1 \times 10^{-6}$ -0.1mg/mL;

4) 包覆封闭层。

4. 根据权利要求1-2任一所述的含有花菁类化合物的编码微球在制备用于检测抗原、抗体或核酸的生物检测试剂中的应用。

## 一种含有花菁类化合物的编码微球及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本申请涉及花菁类化合物的新用途领域,尤其是涉及含有花菁类化合物的编码微球及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 荧光编码微球(又称为荧光标记微球)技术,已被广泛用于在免疫和核酸等项目的多指标联检。其工作原理是:采用高分子微球作为染料的免疫吸附分析的固态载体,通过使用不同波长的荧光物质或用同一荧光物质的不同浓度对微球进行染色标记,使微球具有独特的荧光信号编码,再在微球表面偶联特异性抗原/抗体或DNA片段每种光学信号的微球指向一种特异性的分析物,混合后可用于多重检测。

[0003] 用于编码微球的荧光物质主要有荧光染料和量子点,是现在研发的热点,本申请主要研究的是荧光染料。

[0004] 花菁类化合物(又称为花菁类染料)具有吸收系数高、荧光量子产率高、吸收波长和发射波长能够在红外/近红外相对较长波长光谱区域等优良的光学性能,使得该类化合物广泛用于光盘制作、生物分子标记等领域中。

[0005] 尽管花菁类化合物应用领域很多,但是对于编码微球来说,荧光染料的筛选条件要求很高,比如:

[0006] ①染料能够与微球结合,且在微球制备过程中不会发生明显的光谱变化;

[0007] ②染色均一性好;

[0008] ③染料的光谱特性满足检测需求;

[0009] 包括:最大吸收峰和发射峰与流式检测系统的激光器和滤色通道相匹配,有较窄的发射光谱,与其他滤色通道尤其临近通道有很低的光谱重叠等;

[0010] ④编码微球的生物应用端常用PE作为报告分子(由于PE具有很高的量子效率),因此,编码微球的信号与PE检测通道无串扰为应用端的一个切实需求。

[0011] 由于荧光染料进入微球后,单一或多种不同的荧光染料会产生染料能量转移、重吸收等复杂的现象,造成微球的荧光信号与发光材料之间的荧光信号呈现非正交的关系。因此,编码微球后的编码信号无法预测,无法准确设计,荧光信号的均一性以及编码数量也受到限制,这些都为荧光染料的选择增加了难度。

### 发明内容

[0012] 为了寻求一种编码性能好、光谱匹配以及性能稳定的编码微球,本申请提供了一种含有花菁类化合物的编码微球及其制备方法和应用。

[0013] 第一方面,本申请提供一种含有花菁类化合物的编码微球,采用如下的技术方案:

[0014] 一种含有花菁类化合物的编码微球,所述编码微球包括:花菁类化合物、微球、封闭层,

[0015] 花菁类化合物吸附在微球内部,封闭层包覆在微球的表面。

[0016] 通过采用上述技术方案,花菁类化合物的一种或多种存在于微球内部,以非化学键的方式结合在微球内部,如物理吸附、亲疏水性作用;通过对花菁类化合物加入的量进行调控,能够得到一系列不同荧光信号强度的微球群,从而使每种微球群都有独特的光学信号标记,实现对微球的光学编码;并且微球的整个三维体积中均可结合花菁类化合物,从而微球内结合的花菁类化合物含量范围更大,该编码微球的编码范围更大;

[0017] 本申请的编码微球的最大发射波长在红光/近红外区域,尤其是650-800nm区域。在临近的橙光区域,在560-610nm波长附近串扰低。此外,荧光信号均一性好,信号强度变异系数(CV)的范围在3-15%内;

[0018] 封闭层的作用是将染料包裹在微球内部,避免发生泄漏,并防止与外界环境接触引起染料化学性质或光学性质的变化,微球的稳定性更好。

[0019] 优选的,所述微球为聚合物微球。所述聚合物微球由苯乙烯、丙烯酸、丙烯腈、丙烯酸胺、甲基丙烯酸甲酯、氯乙烯、乙烯基苄基氯、醋酸乙烯酯、乙烯基甲苯、乙烯基吡啶、二乙烯基苯、丁二烯或异戊二烯中的一种或几种单体聚合而成。

[0020] 优选的,所述微球具有介孔结构。

[0021] 可选的,所述微球还可以含有磁性材料,所述磁性纳米材料为 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 或 $\text{MFe}_2\text{O}_4$ 中至少一种,其中M为Co、Ni、Mn、Mg或Zn中至少一种。

[0022] 优选的,所述微球直径为0.5-40 $\mu\text{m}$ 。

[0023] 优选的,所述微球直径为3 $\mu\text{m}$ -15 $\mu\text{m}$ 。

[0024] 优选的,所述微球直径的变异系数为1-5%

[0025] 优选的,所述微球孔径为1-100nm。

[0026] 优选的,所述微球孔径为5-50nm。

[0027] 通过采用上述技术方案,该尺寸适合流式检测系统的检测尺寸范围(0.5 $\mu\text{m}$ -40 $\mu\text{m}$ ),同时能够在溶液中保持一定的悬浮性以及生物检测的灵敏度;微球直径过小,则表面积小,可结合的抗体等生物分子数量少,影响检测灵敏度,而微球直径过大,微球过沉,影响微球的悬浮性。

[0028] 在该微球直径和孔径范围限定下的任一尺寸下,微球群中不同微球的直径和孔径一致性越高,其微球中标记的花菁类化合物的含量一致性越高,信号强度变异系数(CV)越小。

[0029] 优选的,所述封闭层厚度为20-800nm。

[0030] 优选的,所述封闭层厚度为23-750nm。

[0031] 优选的,所述封闭层厚度为50-500nm。

[0032] 优选的,所述封闭层为硅烷化试剂在微球表面进行缩聚反应形成。所述硅烷化试剂包括原硅酸酯、氨基硅烷、环氧硅烷、醛基硅烷中的任意一种或多种。

[0033] 可选的,所述封闭层是经过官能化处理的。

[0034] 可选的,所述官能团为羟基、羧基、氨基、醛基、巯基、环氧基、叠氮、炔基等。

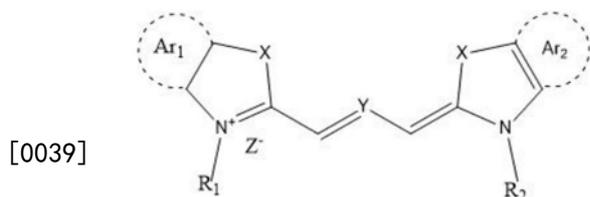
[0035] 可选地,官能团为羧基,能够与抗体中的氨基基团进行共价连接,也可与修饰有氨基的寡核苷酸片段连接。

[0036] 可选的,所述官能团是为了能够与生物分子共价连接用于生物检测。例如官能团为羧基时,其能与抗体或抗原中的氨基基团进行共价连接,也可与修饰有氨基的寡核苷酸

片段连接。

[0037] 例如：常用N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化羧基再进一步与氨基进行共价连接反应。

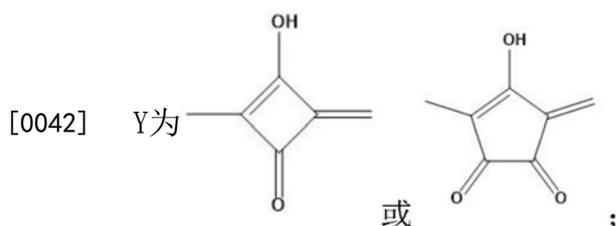
[0038] 可选的，所述花菁类化合物为具有式I结构的化合物：



式 I

[0040] 式I中：

[0041] X选自氧原子、硫原子、硒原子或低级烷基取代的碳原子；



[0043]  $Z^-$  为负离子；

[0044]  $Ar_1, Ar_2$  各自独立为芳香环；

[0045]  $R_1$  和  $R_2$  各自独立为氢原子、烷基、有羟基的烷基链、有醚基的烷基链、有酯基的烷基链、有酰基的烷基链或者有取代基的苄基。

[0046] 优选的，式中：

[0047] X为  $-C(CH_3)_2$ 。

[0048]  $Z^-$  为卤离子、卤化硼离子、磷化物离子、卤氧酸盐离子、氟硫酸离子、甲硫酸离子及苯中有卤原子或卤烷基作为取代基的四苯基硼化物离子；

[0049] 卤离子为  $F^-$ 、 $Cl^-$ 、 $Br^-$  或  $I^-$ ；

[0050] 卤化硼离子为  $BF_4^-$ 、 $BCl_4^-$  或  $BBr_4^-$ 。

[0051]  $Z^-$  优选为  $Br^-$ 、 $I^-$  或  $BF_4^-$ 。

[0052]  $Ar_1$  和  $Ar_2$  各自独立为苯基或萘基。

[0053]  $R_1$  和  $R_2$  各自独立选自直链或支链的  $C_{1-22}$  的烷基， $C_{1-10}COOR_3$ 、 $C_{1-10}$  烷基  $OR_4$ ；

[0054]  $R_3$  和  $R_4$  各自独立为 H、 $C_{1-4}$  烷基或苯基。

[0055] 进一步优选，式中：

[0056]  $Z^-$  为  $Br^-$  或  $I^-$ 。

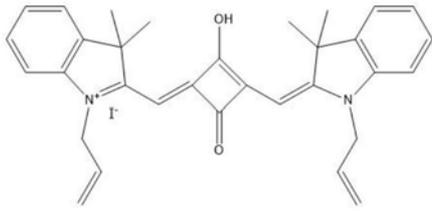
[0057]  $R_1$  和  $R_2$  各自独立选自饱和或不饱和链的  $C_{1-10}$  烷基、 $C_{1-10}$  烷基  $OR_4$ 。

[0058]  $R_4$  为 H 或  $C_{1-4}$  烷基。

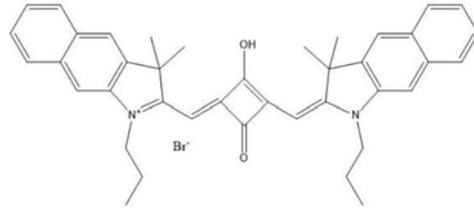
[0059] 通过上述方案，本申请中涉及的花菁类化合物为疏水性染料，在制备溶剂中分散性好，且很容易进入到聚合物微球内部。

[0060] 可选的，花菁类化合物具体为：

[0061]

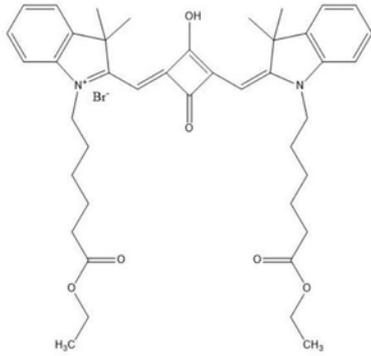


化合物 I

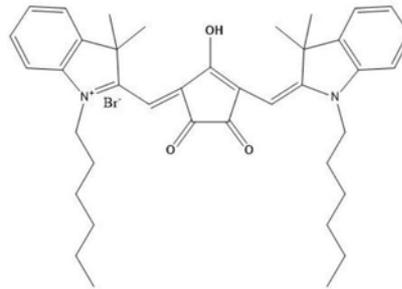


化合物 II

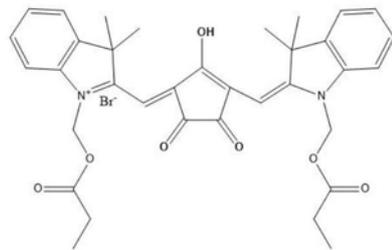
[0062]



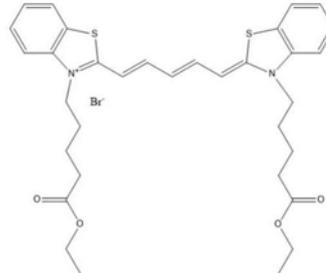
化合物 III



化合物 IV



化合物 V

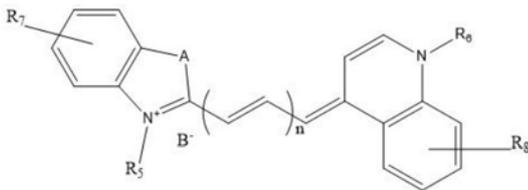


化合物 VI。

[0063] 通过采用上述技术方案,化合物 I - V 编码的微球,其最大发射波长在红光区域,可以被红色激光器(激发波长 633nm/635nm/638nm)、绿色激光器(520nm/532nm)或蓝色激光器(激发波长 488nm)激发。在 650-850 光谱区域,有很强的发射峰;在其它光谱区域,尤其 585nm 波长附近,有很低的背景值。

[0064] 可选的,所述花菁类化合物具有式 II 所示的结构:

[0065]



式 II。

[0066] 式 II 中:

[0067] A选自氧原子、硫原子、硒原子或低级烷基取代的碳原子；

[0068] B<sup>-</sup>为负离子；

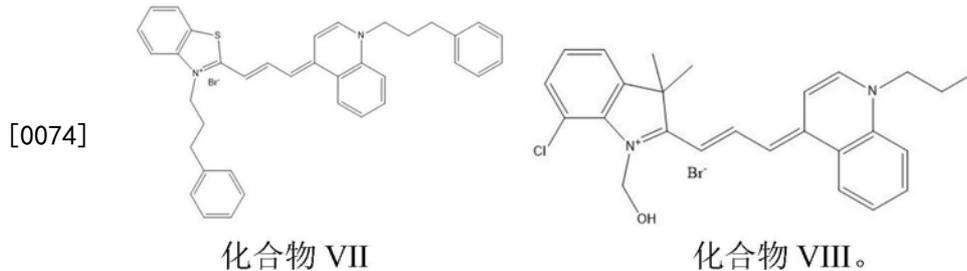
[0069] n为1或2；

[0070] R<sub>5</sub>和R<sub>6</sub>各自独立为氢原子、烷基、有羟基的烷基链、有醚基的烷基链、有

[0071] 酯基的烷基链、有酰基的烷基链或者有取代基的苄基；

[0072] R<sub>7</sub>和R<sub>8</sub>各自独立为氢原子、烷基、有羟基的烷基链、有醚基的烷基链、有酯基的烷基链、有酰基的烷基链或者卤素。

[0073] 优选的,所述花菁类化合物选自:



[0075] 第二方面,本申请提供一种含有花菁类化合物的编码微球的制备方法,采用如下的技术方案:

[0076] 一种含有花菁类化合物的编码微球的制备方法,包括以下步骤:

[0077] 1) 将微球分散于溶剂中,得到微球悬浮液;

[0078] 2) 将花菁类化合物溶解于溶剂中,得到染料溶液;

[0079] 3) 将染料溶液加入到微球悬浮液中,使得花菁类化合物扩散到微球中;

[0080] 4) 再进一步包覆封闭层。

[0081] 进一步的,上述方法中:

[0082] 1) 将微球分散于第一溶剂中,得到微球悬浮液。

[0083] 所述第一溶剂为氯仿、丙酮、甲醇、乙醇、异丙醇、正己烷中的一种或几种。

[0084] 第一溶剂优选为氯仿与异丙醇的组合物,且其体积优选为1:1。

[0085] 所述微球分散于溶剂中的方法为振荡混合、超声法。

[0086] 2) 将花菁类化合物溶解于第二溶剂中,得到染料溶液。

[0087] 所述第二溶剂为甲醇、乙醇、异丙醇、二甲亚砜中的任意一种或多种。

[0088] 微球能分散于第一溶剂中,花菁类化合物溶解于第二溶剂中,以便将两种溶液混合后,花菁类化合物能扩散到微球内部。

[0089] 3) 将步骤2) 中的染料溶液量加入到步骤1) 中的微球悬浮液中,得到微球和染料混合溶液,其中微球的质量浓度为0.1-10mg/mL,染料的质量浓度为 $1 \times 10^{-6}$ -0.1mg/mL;通过搅拌、振荡、超声等方式使微球悬浮液和染料溶液进行充分混合,得到微球悬浮液和染料溶液的混合液,保证染料均匀扩散到微球内部,70℃旋蒸1小时。

[0090] 4) 所述封闭层通过加入硅烷化试剂进行缩聚反应。

[0091] 封闭层的组装步骤为:在步骤3) 的所得的微球悬浮液和染料溶液的混合液中,加入水和硅烷化试剂,水为微球悬浮液和染料溶液的混合液体积的5%-50%,硅烷化试剂为微球悬浮液和染料溶液的混合液体积的0.1-10%,并用氨水或氢氧化钠调节PH至10-13,反应3-24小时后清洗。

[0092] 通过采用上述技术方案,本申请选择花菁类化合物通过扩散进入微球内部,并以吸附的方式结合到微球内部,该制备方法简单可控;

[0093] 在微球和染料混合溶液中微球的浓度范围内,保证一定微球制备量的同时,微球的分散性好,不易产生团聚,一方面使得微球的染色均一性好,CV值更低,另一方面也减少硅烷化包覆过程中微球的聚集,避免微球与微球间发生过多的连接。

[0094] 步骤3)中,染料的质量浓度与所制备微球的荧光信号强度成正相关。通过添加特定质量浓度的染料,对应制得特定荧光信号强度的微球。而一系列不同质量浓度的染料则对应一系列不同荧光信号强度的微球,从而对微球实现光学编码。

[0095] 步骤4)中,硅烷化试剂的浓度范围内,保证微球外层包裹了足够厚度的硅烷化试剂,同时不会产生过量的二氧化硅将微球连成一团。

[0096] 第三方面,本申请还提供了含花菁类化合物的编码微球在制备核酸和免疫的生物检测试剂中的应用。

[0097] 所述生物检测试剂中含有编码微球和免疫蛋白或DNA。

[0098] 综上所述,本申请包括以下至少一种有益技术效果:

[0099] 1.本申请提供的编码微球,由微球和特定的花菁类化合物制成,该类化合物易于进入介孔微球内部,然后微球表面加了封闭层后,其稳定性好;

[0100] 2.本申请提供的编码微球,花菁类化合物的一种或多种包埋在微球的内部,通过控制花菁类化合物的加入量,可以得到一系列不同荧光强度的微球群,从而实现对微球的光学编码,且其荧光信号强,编码范围大;

[0101] 3.信号强度变异系数(CV)是考察编码性能的重要参数,一系列不同信号强度的编码微球中,高信号强度的CV值小,低信号强度的CV值大。同时,信号强度变异系数越低,单个编码微球的信号强度均一性越好,于是在检测仪器的光学信号强度的动态范围内,所能得到的编码的微球数量就越多,本申请CV值为3-15%。

[0102] 4.本申请提供的编码微球,最大发射波长在红光区域,尤其是650-800nm区域,在APC、APC-Cy7通道可以获得非常高的信号值,编码通量大;橙光区域,在560-610nm波长附近,在绿光激发的PE检测通道中有非常低的背景值。同时,所述PE检测通道的低背景值还表示化合物标记的微球在PE通道的荧光相对强度与未经化合物标记的微球相比,信号值没有明显变化。

[0103] 因此,本申请提供的花菁类化合物编码微球的光谱特征更符合流式检测设备及PE作为报告分子的生物分析系统。

## 附图说明

[0104] 图1是实施例1、5-7的化合物I制备的4峰球的流式荧光检测图;

[0105] 图2是实施例8-15的化合物II制备的8峰球的流式荧光检测图;

[0106] 图3是实施例16-19的化合物III制备的4峰球的流式荧光检测图;

[0107] 图4是实施例20-25的化合物IV制备的6峰球的流式荧光检测图;

[0108] 图5是化合物V,VI,VII,VIII四种染料的光谱图;

[0109] 图6是实施例26和27、37-39的编码微球的流式检测图,图A、B、C、D分别对应化合物V,VI,VII,VIII。

### 具体实施方式

[0110] 结合以下内容对本申请作进一步详细说明。

[0111] 介孔聚苯乙烯微球,平均直径为5 $\mu$ m,孔径30nm,直径的变异系数(CV)为1.9%,购自苏州纳微科技有限公司;

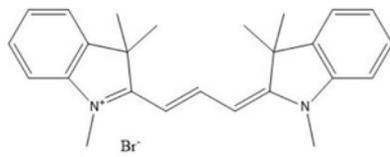
[0112] 表面油酸包覆的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>颗粒,购自西安瑞禧。

[0113] 申请人对染料进行了大量研究,以图找到编码性能好、光谱匹配以及性能稳定性的荧光染料。结果申请人发现:

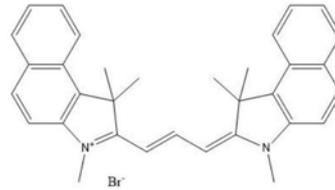
[0114] 目前的荧光染料中,FITC、Rhodamine110、以及常规非特殊官能团结构的花菁类等染料在光谱特征和染色均一性上都不能满足需求。其中亲水性的花菁染料水溶性好,难以进入微球内部。常规疏水性的花菁类染料包括Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7和Cy7.5,具有下面的结构,其中Cy3、Cy3.5仅蓝光激发,Cy7.5最大发射波长在800以上,Cy5、Cy5.5、Cy7加入微球后变异系数大(CV>20%)。

[0115] Cy5、Cy5.5、Cy7加入微球的步骤与实施例1相同,区别仅为加入的花菁类染料不同。检测方法同检测方法1。

	APC 或 APC-Cy7 通道信号值	变异系数 CV (%)
[0116] Cy5	5464	67
	621	29
Cy5.5	10321	23
	1964	20
Cy7	3301	24
	1230	21

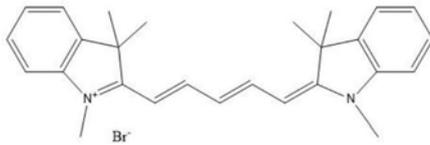


Cy3

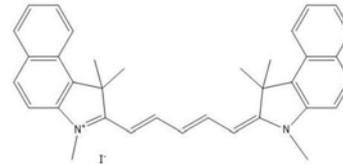


Cy3.5

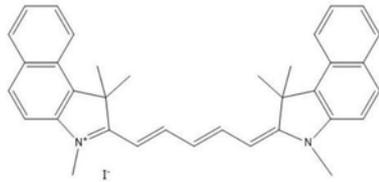
[0117]



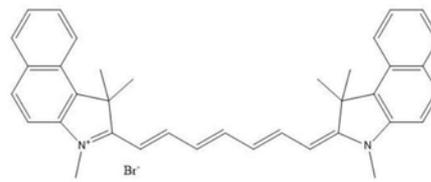
Cy5



Cy5.5



Cy7

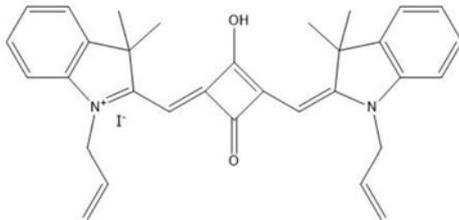


Cy7.5

[0118] 制备例

[0119] 制备例1 (化合物I的制备):

[0120]



化合物 I

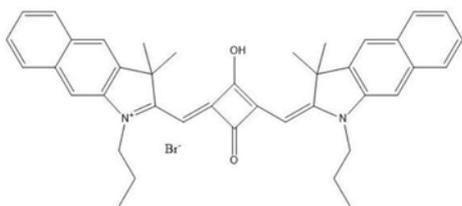
[0121] 40mmol 2,3,3-三甲基吲哚、80mmol 丙烯基碘和20mL二甲苯,在氮气保护下加热至回流,反应24小时,冷却至室温,向其中加入200mL乙醚,过滤,并用适量乙醚清洗,得到固体中间产物;

[0122] 取该固体中间产物6mmol、方酸2mmol和8mL甲苯、6mL正丁醇、6mL吡啶,在氩气保护下搅拌并加热至回流,反应6小时后停止。冷却至室温后减压蒸除适量溶剂。向其中加入200mL乙醚使产物析出,过滤,并用乙醚洗涤后干燥,得到未纯化的固体产物。

[0123] 该未纯化的固体产物通过硅胶柱层析的方法进行纯化,用洗脱液乙酸乙酯:石油醚=5:0~5:1梯度洗脱,收集蓝色组分,旋转蒸发除去溶剂后在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物0.40g。MS (EI)  $C_{32}H_{33}IN_2O_2$  m/z: 477.6 [M-I]<sup>+</sup>。

[0124] 制备例2 (化合物II的制备):

[0125]



化合物II

[0126] 40mmol 1,1,2-三甲基-1H-苯并[e]吲哚、80mmol 1-溴丙烷和25mL邻二氯苯,在氩气保护下加热至回流,反应40小时,冷却至室温,向其中加入200mL乙酸乙酯,超声振荡使产物析出,过滤,清洗,得到固体中间产物;

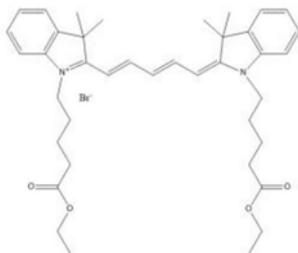
[0127] 取该固体中间产物6mmol、方酸2mmol和8mL甲苯、6mL正丁醇、6mL吡啶,在氩气保护下搅拌并加热至回流,反应6小时后停止。冷却至室温后,减压蒸除部分溶剂。向其中加入200mL乙醚使产物析出,过滤,并用乙醚洗涤后干燥,得到未纯化的固体产物。

[0128] 该未纯化的固体产物通过硅胶柱层析的方法进行纯化,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=10:1梯度洗脱,收集蓝色组分,旋转蒸发除去溶剂后在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物0.35g。

[0129] MS (EI)  $C_{40}H_{41}BrN_2O_2$  m/z: 581.8 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0130] 制备例3(化合物III的制备):

[0131]



化合物III

[0132] 40mmol 2,3,3-三甲基吲哚、80mmol 6-溴己酸乙酯和25mL邻二氯苯,在氩气保护下加热至回流,反应24小时,冷却至室温,向其中加入150mL乙酸乙酯,超声振荡使产物析出,在乙酸乙酯中研磨后过滤,得到深棕红色块状中间产物;

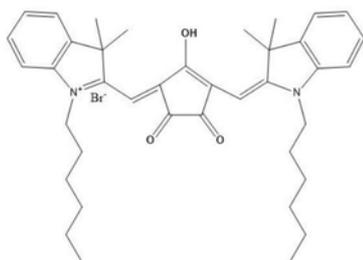
[0133] 取该棕红色中间产物6mmol、方酸2mmol和8mL苯、6mL正丁醇、6mL吡啶,在氩气保护下搅拌并加热至回流,反应6小时后停止。冷却至室温,向其中加入200mL乙醚使产物析出,过滤,并用乙醚洗涤后干燥,得到深蓝色固体。

[0134] 该深蓝色固体通过硅胶柱层析的方法进行纯化,用洗脱液乙酸乙酯:石油醚=5:0~5:1梯度洗脱,收集蓝色组分,旋转蒸发除去溶剂后在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物0.25g。

[0135] MS (EI)  $C_{42}H_{53}BrN_2O_6$  m/z: 681.9 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0136] 制备例4(化合物IV的制备):

[0137]



化合物IV

[0138] 40mmol 2,3,3-三甲基吲哚、100mmol 1-溴己烷和20mL甲苯,在氩气保护下加热至回流,反应36小时,冷却至室温,向其中加入200mL乙醚,超声振荡使产物析出,过滤,并继续用乙醚清洗,得到块状中间产物;

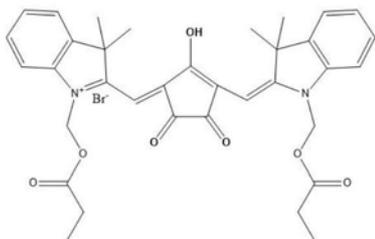
[0139] 取该中间产物10mmol、克酮酸3mmol和8mL甲苯、6mL正丁醇、6mL吡啶,在氩气保护下搅拌并加热至回流,反应8小时后停止。冷却至室温后减压蒸除溶剂。向其中加入150mL乙醚使产物析出,过滤,并用乙醚洗涤后干燥,得到含有目标产物的固体。

[0140] 该含有目标产物的固体通过硅胶柱层析的方法进行纯化,用洗脱液二氯甲烷/甲醇梯度洗脱,收集蓝色组分,旋转蒸发除去溶剂后在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物0.38g。

[0141] MS (EI)  $C_{39}H_{49}BrN_2O_3$  m/z: 593.8 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0142] 制备例5(化合物V的制备):

[0143]



化合物V

[0144] 40mmol 2,3,3-三甲基吲哚、100mmol 溴乙酸乙酯和20mL甲苯,在氩气保护下加热至回流,反应36小时,冷却至室温,向其中加入200mL乙醚,超声振荡使产物析出,过滤,并继续用乙醚清洗,得到块状中间产物;

[0145] 取该中间产物10mmol、克酮酸3mmol和8mL甲苯、6mL正丁醇、6mL吡啶,在氩气保护下搅拌并加热至回流,反应8小时后停止。冷却至室温后减压蒸除溶剂。向其中加入150mL乙醚使产物析出,过滤,并用乙醚洗涤后干燥,得到未纯化的产物。

[0146] 该未纯化的产物通过硅胶柱层析的方法进行纯化,用洗脱液二氯甲烷/甲醇梯度洗脱,收集蓝色组分,旋转蒸发除去溶剂后在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物0.25g。

[0147] MS (EI)  $C_{37}H_{53}BrN_2O_7$  m/z: 597.7 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0148] 实施例

[0149] 实施例1

[0150] 1、在10mg,平均直径为5μm,孔径30nm的介孔聚苯乙烯微球中加入体积比为1:1的异丙醇、氯仿的混合溶液,直到总体积为20mL,超声(功率100W) 5min,得到分散的0.5mg/mL

的微球悬浮液。

[0151] 2、将5mg花菁类化合物(由制备例1制得)溶于50mL二甲亚砜(DMSO)中,配置成0.1mg/mL的染料溶液(标记为1x染料母液);取15.6μL的染料溶液加入到步骤1制备的微球悬浮液中,超声(功率100W)5min。70℃旋蒸1小时,除去低沸点的氯仿溶剂,冷却至室温备用。

[0152] 3、将步骤2得到的编码微球溶液中加入2mL二蒸水、150μL TEOS(原硅酸乙酯)和0.5mL氨水,超声(功率100W)3min,振荡混合反应4小时,1000r/min离心去除上清;

[0153] 用20mL无水乙醇离心清洗两次。

[0154] 4、加入20mL无水乙醇、50μL APTES(氨丙基三乙氧基硅烷),超声(功率100W)3min,振荡反应12小时,1000r/min离心去除上清;

[0155] 用20mL无水乙醇离心或磁力清洗两次。

[0156] 5、清洗后加入20mL,含5mg/mL丁二酸酐溶液的DMF(N N-二甲基甲酰胺),振荡反应4h。用20mL DMF离心或磁力清洗两次,再用无水乙醇清洗两次,得到羧基化的微球。加入10mL的去离子水,放置冰箱2-8℃,避光存储。

[0157] 此时封闭层厚度为190nm。

[0158] 实施例2

[0159] 与实施例1的不同之处在于:

[0160] 步骤3中,在步骤2得到的编码微球溶液中加入1000μLTEOS(原硅酸乙酯)。此时封闭层厚度为750nm。

[0161] 实施例3

[0162] 与实施例1的不同之处在于:去除步骤3的原硅酸酯反应步骤。直接用氨基硅烷进行包覆。

[0163] 在步骤2得到的编码微球中加入2mL二蒸水、500μL APTES(氨丙基三乙氧基硅烷),超声(功率100W)3min,振荡反应12小时。

[0164] 用20mL无水乙醇离心清洗两次。

[0165] 清洗后加入20mL,含5mg/mL丁二酸酐溶液的DMF(NN-二甲基甲酰胺),振荡反应4h。用20mLDMF离心清洗两次,再用无水乙醇清洗两次,得到羧基化的微球。加入10mL的去离子水,2-8℃放置,避光存储。

[0166] 此时封闭层厚度为72nm。

[0167] 实施例4

[0168] 与实施例3的不同之处在于:

[0169] 步骤2中,在步骤2得到的编码微球溶液中加入20μL APTES(氨丙基三乙氧基硅烷)。此时封闭层厚度为23nm。

[0170] 实施例5-7

[0171] 与实施例1的不同之处在于:

[0172] 步骤2中,步骤1制备的微球悬浮液取20mL,取不同体积的染料溶液加入到微球悬浮液中,具体实施例1、实施例5-7中染料溶液加入体积见表a。

[0173] 表a

[0174] 

	染料加入量/μL
--	----------

实施例1	15.6
实施例5	6.2
实施例6	2.5
实施例7	1

[0175] 实施例8-15

[0176] 与实施例1的不同之处在于：

[0177] 花菁类化合物由制备例2制得。

[0178] 步骤2中，步骤1制备的微球悬浮液取20mL，取不同体积的染料溶液加入到微球悬浮液中，具体实施例8-15中染料溶液加入体积见表b。

[0179] 表b

[0180]

	染料加入量/ $\mu\text{L}$
实施例8	610.3
实施例9	244.1
实施例10	97.6
实施例11	39.0
实施例12	15.6
实施例13	6.2
实施例14	2.5
实施例15	1.0

[0181] 实施例16-19

[0182] 与实施例1的不同之处在于：

[0183] 花菁类化合物由制备例3制得。

[0184] 步骤2中，步骤1制备的微球悬浮液取20mL，取不同体积的染料溶液加入到微球悬浮液中，具体实施例16-19中染料溶液加入体积见表c。

[0185] 表c

[0186]

	染料加入量/ $\mu\text{L}$
实施例16	39.0
实施例17	15.6
实施例18	6.2
实施例19	2.5

[0187] 实施例20-25

[0188] 与实施例1的不同之处在于：

[0189] 花菁类化合物由制备例4制得。

[0190] 步骤2中，步骤1制备的微球悬浮液取20mL，取不同体积的染料溶液加入到微球悬浮液中，具体实施例20-25中染料溶液加入体积见表d。

[0191] 表d

[0192]

	染料加入量/ $\mu\text{L}$
实施例20	97.6

实施例21	39.0
实施例22	15.6
实施例23	6.2
实施例24	2.5
实施例25	1.0

[0193] 实施例26-27

[0194] 与实施例1的不同之处在于：

[0195] 花菁类化合物由制备例5制得。

[0196] 步骤2中，步骤1制备的微球悬浮液取20mL，取不同体积的染料溶液加入到微球悬浮液中，具体实施例26-27中染料溶液加入体积见表e。

[0197] 表e

	染料加入量/ $\mu\text{L}$
实施例26	500
实施例27	20

[0199] 实施例28-30

[0200] 与实施例1的不同之处在于：

[0201] 花菁类化合物由制备例5制得。

[0202] 与实施例26-27不同之处在于：

[0203] 通过增加染料的加入量，制备高信号值的微球。

[0204] 步骤2中，将50mg花菁类化合物（由制备例5制得）溶于5mL二甲亚砜中，制得10mg/mL的染料高浓度母液（标记为100x染料母液）。取不同体积的100x染料母液加入到步骤1制备的20mL微球悬浮液中，实施例28-30中染料溶液加入体积见表f。

[0205] 表f

	染料加入量/ $\mu\text{L}$
实施例28	1000 (100x染料母液)
实施例29	200 (100x染料母液)
实施例30	40 (100x染料母液)

[0207] 实施例31-33

[0208] 与实施例1的不同之处在于：

[0209] 花菁类化合物由制备例5制得。

[0210] 与实施例26-27不同之处在于：

[0211] 并通过减少染料的加入量，制备低信号值的微球。

[0212] 步骤2中，将5mg花菁类化合物（由制备例5制得）溶于50mL二甲亚砜中，制得0.1mg/mL的染料母液（标记为1x染料母液）。进一步取500 $\mu\text{L}$  0.1mg/mL的染料母液溶于溶解至50mL二甲亚砜中，制得0.01mg/mL的染料母液（标记为0.1x染料母液）。取不同体积的0.1x染料母液加入到步骤1制备的20mL微球悬浮液中，实施例31-33中染料溶液加入体积见表g。

[0213] 表g

	染料加入量/ $\mu\text{L}$
--	----------------------

实施例31	25 (0.1x染料母液)
实施例32	10 (0.1x染料母液)
实施例33	4 (0.1x染料母液)

[0215] 实施例34

[0216] 与实施例1的不同之处在于：

[0217] 在微球悬浮液中加入500 $\mu$ g直径为10nm,表面油酸包覆的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>颗粒,超声(功率100w)5min,于烧瓶中室温搅拌48小时,使Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>颗粒进入介孔微球内部,磁力架收集微球,去除上清,并用乙醇清洗三次,30 $^{\circ}$ C烘箱中真空干燥12小时,得到含磁性的介孔聚苯乙烯微球。

[0218] 在以上含磁性的介孔聚苯乙烯微球,分散在20mL等体积比的异丙醇、氯仿溶液中,超声(功率100W)5min,得到含磁性的微球悬浮液。

[0219] 取15.6 $\mu$ L的1mg/mL的染料溶液(其中花菁类化合物由制备例1制得)加入20mL的含磁性的微球悬浮液中。

[0220] 实施例35

[0221] 与实施例1的不同之处在于：

[0222] 在2mg介孔聚苯乙烯微球中加入体积比为1:1的异丙醇、氯仿的混合溶液,直到总体积为20mL,超声(功率100W)5min,得到分散的0.1mg/mL的微球悬浮液。

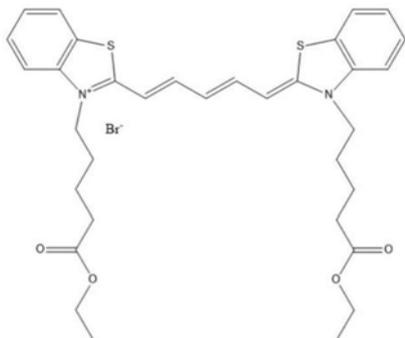
[0223] 实施例36

[0224] 与实施例1的不同之处在于：

[0225] 在200mg介孔聚苯乙烯微球中加入体积比为1:1的异丙醇、氯仿的混合溶液,直到总体积为20mL,超声(功率100W)5min,得到分散的10mg/mL的微球悬浮液。

[0226] 实施例37

[0227] 化合物VI结构如下所示：



[0228]

化合物 VI

[0229] 化合物VI来源:40mmol二甲基苯并噻唑、80mmol 6-溴己酸乙酯和20mL二甲苯,在氩气保护下加热至回流,反应36小时,冷却至室温后静置2小时,去除上层清液。向其中加入乙醚清洗数次,得到灰色块状物;

[0230] 取该产物6mmol,3-丙烯醛缩苯胺2mmol和6mL醋酸酐、6mL吡啶,在氩气保护下搅拌并加热至回流,反应2小时后停止。冷却至室温,向其中加入200mL乙醚使产物析出,过滤,并用乙醚洗涤后干燥,得到深蓝色固体。

[0231] 该深蓝色固体通过硅胶柱层析的方法进行纯化,用洗脱液二氯甲烷:甲醇=5:0~

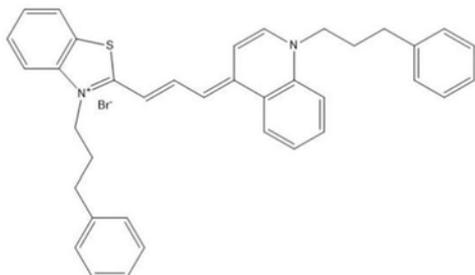
5:1梯度洗脱,收集蓝色组分,旋转蒸发除去溶剂后在45℃条件下真空干燥箱中干燥24小时,得到标题化合物0.25g。

[0232] MS (EI)  $C_{42}H_{53}BrN_2O_6$  m/z: 681.9 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0233] 与实施例1的不同之处在于:将化合物VI配置成0.1mg/mL染料母液,分别取染料母液500μL和20μL添加入20mL的微球悬浮液中,制备成微球群1和2,其中,微球群1的染料母液加入量为500μL,微球群2的染料母液加入量为20μL。

[0234] 实施例38

[0235] 化合物VII结构如下所示:



[0236]

化合物 VII

[0237] 化合物VII来源:40mmol 2-甲基苯并噻唑、80mmol 1-溴-3-苯基丙烷和20mL甲苯,在氩气保护下加热至回流,反应24小时,冷却至室温,过滤沉淀,向其中加入2000mL乙醚清洗滤饼,得到产物A;

[0238] 取产物A,10mmol、15mmol N-苯基甲酰亚胺乙酯和40mL醋酸,在氮气保护下,加热至回流,搅拌2小时。将反应得到的油状物用石油醚清洗三次。再加200mL的乙醚析出固体,过滤,干燥。硅胶柱分离,用二氯甲烷:甲醇=50:1洗脱,收集黄色组分,得到产物B。

[0239] 用40mmol 4-甲基喹啉,80mmol 1-溴-3-苯基丙烷和20mL甲苯,在氩气保护下加热至回流,反应24小时,冷却至室温,过滤沉淀,向其中加入2000mL乙醚清洗滤饼,制得产物C。

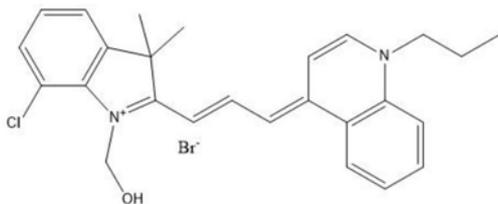
[0240] 取6mmol产物B和9mmol的产物C,加入30mL醋酸中。90℃加热搅拌2小时。将反应得到的油状物用正己烷洗涤三次,再用乙醚清洗,过滤,干燥。硅胶柱分离,用二氯甲烷:甲醇=20:1洗脱,收集蓝色组分,得到产物0.5g。

[0241] MS (EI)  $C_{37}H_{35}BrN_2Sm$  m/z: 539.8 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0242] 与实施例1的不同之处在于:将化合物VII配置成0.1mg/mL染料母液,分别取染料母液500μL和20μL添加入20mL的微球悬浮液中,制备成微球群1和2,其中,微球群1的染料母液加入量为500μL,微球群2的染料母液加入量为20μL。

[0243] 实施例39

[0244] 化合物VIII结构如下所示:



[0245]

化合物 VIII

[0246] 化合物VIII来源:40mmol 5-氯-2,3,3-三甲基吲哚、80mmol 1-溴丙烷和20mL甲

苯,在氩气保护下加热至回流,反应24小时,冷却至室温,过滤沉淀,向其中加入2000mL乙醚清洗滤饼,得到产物D;

[0247] 取产物D10mmol、15mmol N-苯基甲酰亚胺乙酯和40mL醋酸,在氮气保护下,90℃加热搅拌2小时。将反应得到的油状物用石油醚清洗三次。再加2000mL的乙醚析出固体,过滤,干燥。硅胶柱分离,用二氯甲烷:甲醇=50:3洗脱,收集黄色组分,得到产物E。

[0248] 用40mmol 4-甲基喹啉和80mmol 1-溴丙烷和20mL甲苯,在氩气保护下加热至回流,反应24小时,冷却至室温,过滤沉淀,向其中加入2000mL乙醚清洗滤饼,制得产物F。

[0249] 取6mmol产物E和9mmol的产物F,加入30mL醋酸中。90℃加热搅拌2小时。将反应得到的油状物用正己烷洗涤三次。再倒入2000mL乙醚中,过滤,干燥。硅胶柱分离,用二氯甲烷:甲醇=10:1洗脱,收集蓝色组分,得到产物0.4g。

[0250] MS (EI)  $C_{29}H_{34}BrClN_2m/z$ : 446.1 [M-Br]<sup>+</sup>。

[0251] 与实施例1的不同之处在于:将化合物VIII配置成0.1mg/mL染料母液,分别取染料母液500 $\mu$ L和20 $\mu$ L添加入20mL的微球悬浮液中,制备成微球群1和2,其中,微球群1的染料母液加入量为500 $\mu$ L,微球群2的染料母液加入量为20 $\mu$ L。

[0252] 对比例

[0253] 对比例1

[0254] 与实施例1的不同之处在于:未加入花菁类化合物。

[0255] 检测方法:

[0256] 1、编码性能的检测

[0257] 仪器:流式细胞仪

[0258] 将实施例1-39和对比例1所得到的编码微球用miniQ水稀释至浓度为 $\sim 1 \times 10^{-4}$ mg/mL。用流式标准球(Spherotech公司,RCP-30-5A,8峰球)设定各通道的PMT参数,使得不同峰球得到很好地区分(使用Gaugene,CytoFocus流式细胞仪检测时,APC,APC-Cy7,PE三通道PMT设置值分别为200,180,405),APC、APC-Cy7、PE三个通道的滤色片波长分别为660/20nm(中心波长/带宽)、780/60nm、585/40nm。然后将待测微球从流式细胞仪的检测通道通过记录其APC或APC-Cy7通道相对信号强度、信号强度均一性(CV),以及PE通道背景信号值。其中,实施例1-27,实施例34-39在该PMT参数下进行检测。实施例28-30中,则将APC通道的PMT参数设置为最低值1,通过降低检测器的功率测试高信号值的微球。实施例31-33中,将APC通道的PMT参数设置为最高值500,提高检测器的功率以测试低信号值微球。检测结果见表1;

[0259] 记录荧光检测图见图1-4,其中图1为化合物I制备的4峰球的流式荧光检测图;图2为化合物II制备的8峰球的流式荧光检测图;图3为化合物III制备的4峰球的流式荧光检测图;图4为化合物IV制备的6峰球的流式荧光检测图,图5为化合物V、VI、VII、VIII四种染料的光谱图,图6为化合物V、VI、VII、VIII四种染料编码微球的流式检测图,即为实施例26和27、37-39的编码微球的流式检测图,A、B、C、D四个图分别对应化合物V、VI、VII、VIII。

[0260] 图1-4中,横坐标为APC通道相对信号强度,纵坐标为粒子数,即微球采样个数;微球内花菁类化合物越多,其APC通道相对信号强度越大;峰越窄则所体现的信号强度均一性(CV)越小。

[0261] 2、光谱图

[0262] 荧光光谱仪对荧光染料(化合物V、VI、VII、VIII)进行光谱扫描。染料浓度配置为0.01mg/mL于乙醇溶液中。分别用488nm的激光波长,扫描550nm-850nm范围内的发射谱,和633nm激发波长,扫描650-850nm的发射光谱,检测结果见图5。

[0263] 检测结果:

[0264] 实施例1-39和对比例1得到的编码微球的荧光检测结果:

[0265] 表1编码微球的荧光检测结果

[0266]

	染料加入量/ $\mu\text{L}$ *	APC 通道相对 信号强度	APC 通道信号强 度均一性 CV/%	PE 通道背景信号值
实施例 1	15.6	28686	6.1	151
实施例 2	——	25721	6.5	145
实施例 3	——	37290	5.8	142
实施例 4	——	38432	4.9	135
实施例 5	6.2	13866	5.5	138
实施例 6	2.5	6538	5.7	183
实施例 7	1	3488	7.8	153
实施例 8	610.3	209124	3.8	144
实施例 9	244.1	122000	4.2	137
实施例 10	97.6	71560	4.9	128
实施例 11	39.0	40671	5.0	147
实施例 12	15.6	22390	5.2	114
实施例 13	6.2	13004	5.3	113
实施例 14	2.5	7203	6.6	110
实施例 15	1	4111	6.8	108

[0267]

实施例 16	39.0	10688	11.5	95
实施例 17	15.6	5100	11.3	82
实施例 18	6.2	2357	13.1	92
实施例 19	2.5	1211	14.7	180
实施例 20	97.6	112715	5.2	111
实施例 21	39.0	55130	4.5	153
实施例 22	15.6	22284	5.3	123
实施例 23	6.2	11479	5.2	121
实施例 24	2.5	5526	5.4	115
实施例 25	1	2627	7.1	130
实施例 26	500	32175	6.7	149
实施例 27	20	2190	7.9	141
实施例 28	1000(100× 染料母液)	145379	5.9	136
实施例 29	200(100 × 染料母液)	156479	4.1	149
实施例 30	40(100×染 料母液)	69579	5.1	133
实施例 31	25(0.1×染 料母液)	1079	9.5	113
实施例 32	10(0.1×染 料母液)	462	12	109
实施例 33	4(0.1×染 料母液)	230	25	122
实施例 34	15.6	18340	7.2	159
实施例 35	——	22849	5.5	152
实施例 36	——	22805	5.2	144
实施例 37	500	9354	30.2	2453
	20	875	46.6	813
实施例 38	500	4555	17.5	280
	20	370	35.4	159
实施例 39	500	11417	35.0	1402
	20	2223	40.2	295
对比例 1	0	150	40	105

[0268] \*注：表中染料加入量所对应的染料浓度非特殊表明均为1x染料母液，即0.1mg/mL。

[0269] 从表1结果可以看出：

[0270] 实施例1-36得到的编码微球的APC通道信号强度均一性均优于对比例1,实施例37-39在较高染料浓度添加下,APC通道信号强度均一性也由于对比例1,说明本申请的含有花菁类化合物的编码微球的编码性能更好。

[0271] 实施例1-4中,封闭层分别采用了先TEOS(原硅酸乙酯)后APTES(氨丙基三乙氧基硅烷)包覆、以及直接用APTES(氨丙基三乙氧基硅烷)进行包覆的方式。前者多一步包覆,包裹更厚实,在稳定性方面有潜在优势。增加TEOS或APTES的添加量,封闭层能够变厚。实施例1和2中TEOS包覆量不同,实施例3和4中APTES包覆量不同。实施例1的相对荧光信号强度较实施例2强。封闭层有一定的遮光性,光强稍有下降。实施例3和4的光强差别不明显。其染色均一性(CV)、PE通道背景信号值较为接近。在该厚度范围内,不影响编码性能。

[0272] 实施例1、5-7,为不同浓度花菁类化合物(化合物I)编码的4峰球,从其数据并结合图1可以看出,其不同浓度花菁类化合物编码的4峰球的信号群能够有效区分;信号强度均一性CV在5%-8%;PE通道背景相对荧光信号强度为138-183,该背景值与不含染料的空白球信号值相当(138-183的信号强度在仪器检测空白球的噪音区间内)。

[0273] 结合图1,实施例8-15,为不同浓度花菁类化合物(化合物II)编码的8峰球,从其数据并结合图2可以看出,其不同浓度花菁类化合物编码的8峰球的信号群能够有效区分;信号强度均一性CV在3%-7%;PE通道背景相对荧光信号强度为100-150,该背景值与不含染料的空白球信号值相当。

[0274] 实施例16-19,为不同浓度花菁类化合物(化合物III)编码的4峰球,从其数据并结合图3可以看出,其得到的编码微球在APC通道相对荧光信号强度均一性为11%-15%。PE通道背景为82-180。该染料编码CV性能较前两个化合物稍高,低值的两个峰已有部分连接,但尚能区分。该光学编码性能满足需求。

[0275] 结合图2,实施例20-25,为不同浓度花菁类化合物(化合物IV)编码的6峰球,从其数据并结合图4可以看出,其不同浓度花菁类化合物编码的6峰球能够有效区分,信号强度均一性CV在4%-7%;PE通道背景相对荧光信号强度为110-155,该背景值与不含染料的空白球信号值相当。

[0276] 实施例26-27为不同浓度花菁类化合物(化合物V)编码的2峰球从其数据可以看出,CV值分别为6.7%和7.9%,PE背景值分别为141和149,该光学编码性能满足需求。

[0277] 实施例28-30为高浓度花菁类化合物(化合物V)制备的编码微球。每20mL、0.5mg/mL的编码微球悬浮液中加入相应体积的染料,使得该混合液中染料质量浓度分别为0.5mg/mL,0.1mg/mL,0.04mg/mL;该荧光信号值在正常检测条件下(APC通道PMT参数设置为200)发生过曝,不能准确获得微球信号值。进一步降低PMT参数至最低值(PMT参数设置为1)后,三个编码微球信号值分别为145379,156479,69579。其中实施例28中高染料浓度的微球信号反而变低,判断为加入染料过多导致信号淬灭。染料质量浓度0.1mg/mL,0.04mg/mL所制备微球则在低PMT参数下,信号值、CV值和PE背景方面满足要求。因此化合物V的编码浓度不高于0.1mg/mL。

[0278] 实施例31-33为低浓度花菁类化合物(化合物V)制备的编码微球。每20mL,0.5mg/mL的编码微球悬浮液中加入相应量的染料,使得该混合液中,染料质量浓度分别为 $1.25 \times 10^{-5}$ mg/mL, $2.5 \times 10^{-6}$ mg/mL, $1 \times 10^{-6}$ mg/mL。低信号值的微球接近仪器的检测灵敏度,因此调高PMT参数至最高值(PMT参数设置为500),以提高仪器在低信号值区间的灵敏度。三个编码

微球的信号值分别为1079,462,230。CV值分别为9.5%,12%,25%。其中, $1 \times 10^{-6}$ mg/mL浓度染料所制备微球信号接近背景值。因此,在该制备条件下,化合物V的编码浓度不低于 $1 \times 10^{-6}$ mg/mL。

[0279] 实施例34得到了含磁性的编码微球,其APC通道相对荧光信号强度较实施例1的编码微球信号值稍低,说明磁性材料的添加一定程度上影响了染料进入微球内部的量,但CV 7%的荧光信号均一性仍然较好,PE背景也没有明显抬升。说明在编码微球能够含磁性条件下应用。

[0280] 实施例1、35-36对比了不同质量浓度的微球对制备结果的影响,实施例1以及实施例35-36中,微球浓度分别为0.1mg/mL,1mg/mL和10mg/mL。其荧光信号值分别为22849,28686,22805。该信号值略有偏差(并未出现预计的信号递减趋势),CV值和PE性能相当。因此微球浓度0.1mg/mL-10mg/mL均能得到性能很好的编码微球。进一步降低的微球浓度影响制备的产量,过高的微球浓度则容易在后续的封闭过程中产生聚集。

[0281] 从图5的光谱图结果可以看出:化合物V、VI、VII、VIII四种染料在最大发射强度都在660nm波段,但发光效率有差别。同样质量浓度下,化合物V信号值溢出,在该波段的发光效率为化合物V>化合物VII>化合物VIII>化合物VI。在585波段附近,化合物VIII的信号值明显较高外,其它三种化合物正常。该光谱图能够相对指导选用合适波长的染料用于编码微球的制备,但与最终制备出微球的流式检测结果不完全匹配(对比图6流式检测图)。

[0282] 从图6(流式检测图)结果并结合表1中相应的荧光检测数据可以看出:同样质量浓度的四种化合物所制备微球,在APC信号通道的强度为化合物V>化合物VIII>化合物VI>化合物VII,说明染料加入微球后会发生光谱的变化。在CV值上则化合物V明显优于其他化合物。在PE背景值方面,除了化合物V外,化合物VI、VII、VIII均有较高背景值。

[0283] 本具体实施例仅仅是对本申请的解释,其并不是对本申请的限制,本领域技术人员在阅读完本说明书后可以根据需要对本实施例做出没有创造性贡献的修改,但只要在本申请的权利要求范围内都受到专利法的保护。

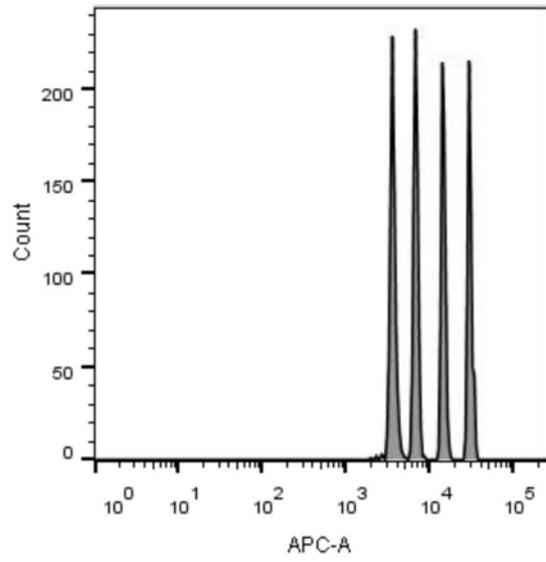


图1

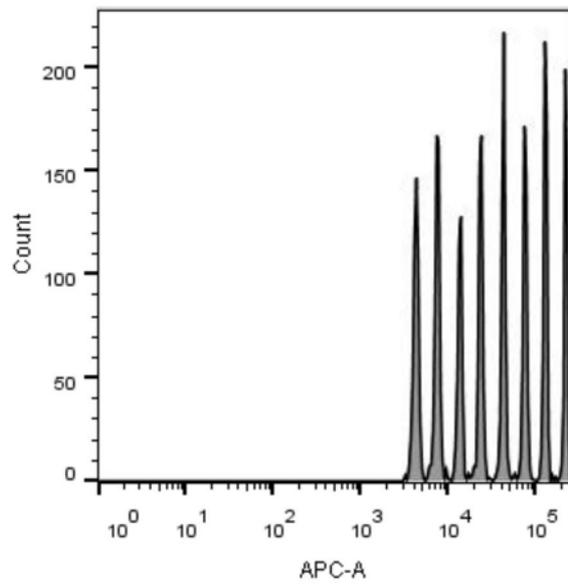


图2

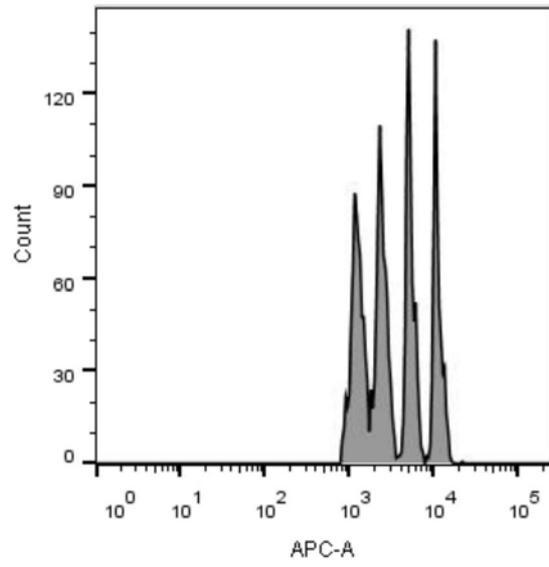


图3

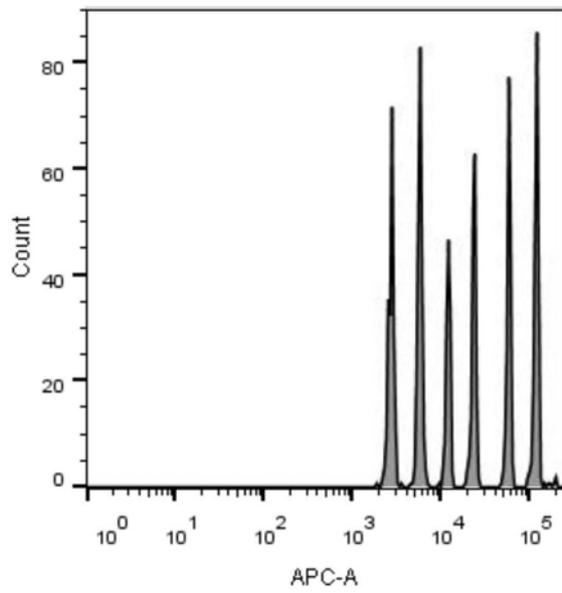


图4

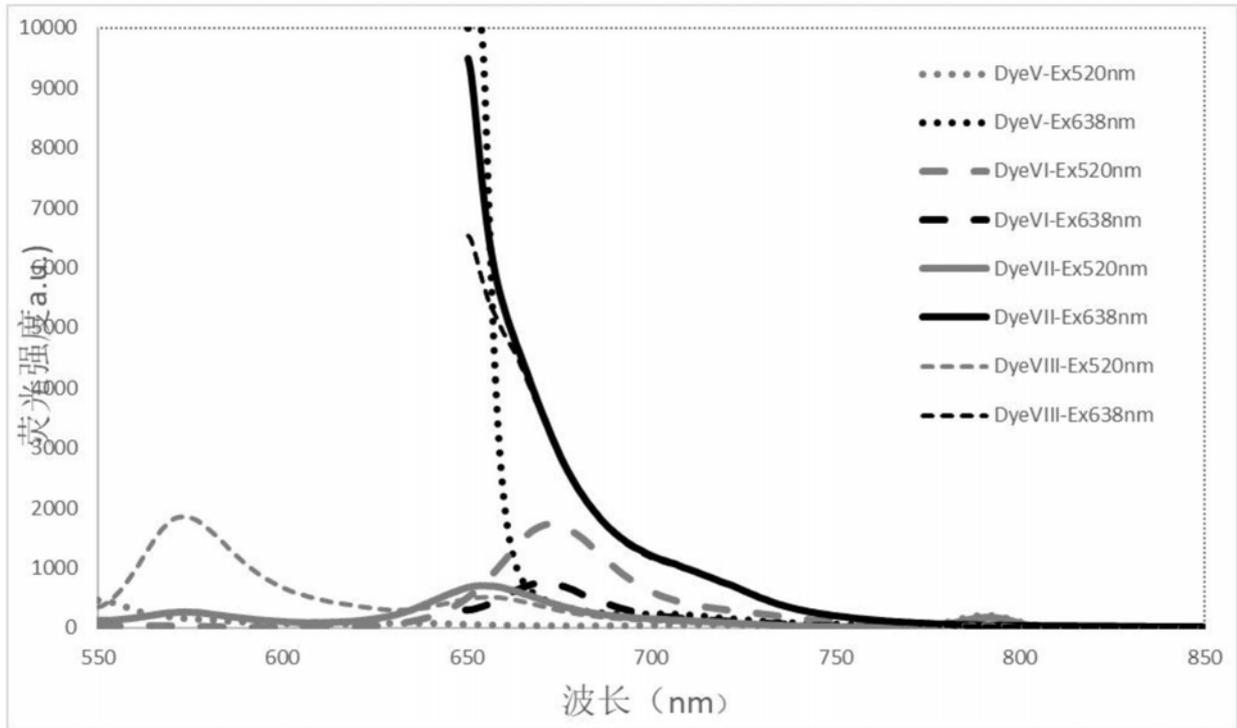


图5

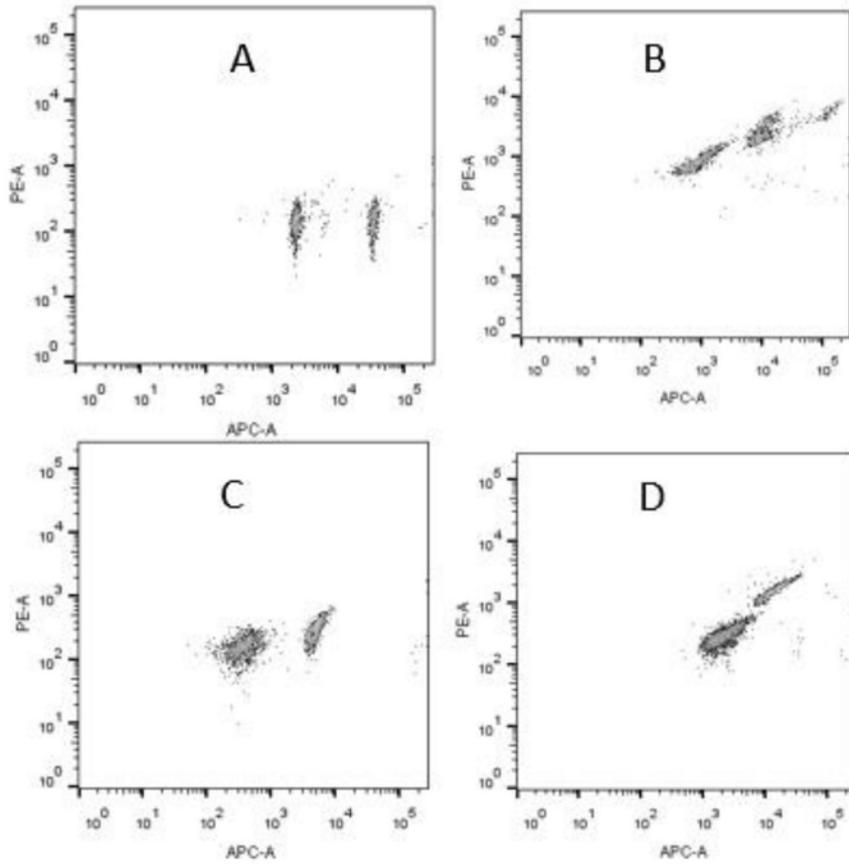


图6