

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023 年 10 月 26 日 (26.10.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/202034 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07H 1/00 (2006.01) *C09K 11/06* (2006.01)
C07H 15/26 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2022/129774
- (22) 国际申请日: 2022 年 11 月 4 日 (04.11.2022)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202210403949.0 2022 年 4 月 18 日 (18.04.2022) CN
- (71) 申请人: 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 许淑琴 (XU, Shuqin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 陈

敬华 (CHEN, Jinghua); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 汪竹群 (WANG, Zhuqun); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 汤晓莉 (TANG, Xiaoli); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理事务所 (普通合伙) (CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路 188 号吴中万达广场 A 座苏州大学国家科技园 2303, Jiangsu 215000 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,

(54) Title: OLIGOSACCHARIDE FLUORESCENT MARKER, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种寡糖荧光标记物及其制备方法与应用

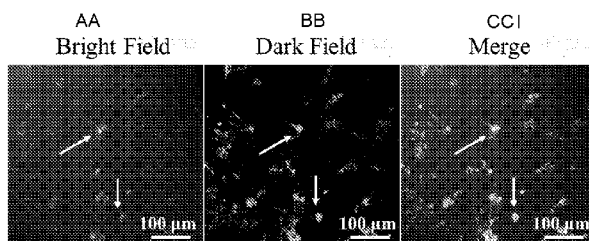


图 7

AA Champ clair
BB Champ sombre
CC Fusion

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of biology, and relates to an oligosaccharide fluorescent marker, a preparation method therefor, and use thereof. The preparation method of the present invention comprises the following steps: reacting an oligosaccharide with a fluorescent agent in a solvent under the action of a reducing agent to obtain the oligosaccharide fluorescent marker. The oligosaccharide fluorescent marker of the present invention can utilize an amino group in the fluorescent agent to undergo a condensation reaction with a hemiacetal group at a reducing end of the oligosaccharide to form an imine or Schiff base, and then the reducing agent is used to reduce the imine or Schiff base into a relatively stable secondary amine, so that the fluorescent marking at the tail end of the oligosaccharide is realized. The fluorescent group marked at the tail end has little influence on the biological activity of the oligosaccharide, and the marker can have a relatively strong fluorescence intensity under physiological conditions and can stably exist. The oligosaccharide fluorescent marker of the present invention is basically free of toxicity to cells, and the oligosaccharide fluorescent marker can be selectively taken up by oligodendrocyte precursor cells, being suitable for microscopic imaging analysis.



LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚
(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR,
HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO,
PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN,
TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 本发明涉及一种寡糖荧光标记物及其制备方法与应用, 涉及生物技术领域。本发明所述的制备方法, 包括以下步骤, 将寡糖与荧光剂在还原剂作用下, 在溶剂中发生反应, 得到所述寡糖荧光标记物。本发明所述的寡糖荧光标记物利用荧光剂中的氨基可与寡糖还原端的半缩醛基发生缩合反应, 形成亚胺或者席夫碱, 再利用还原剂将其还原成相对稳定的仲胺, 从而实现对寡糖末端的荧光标记, 末端标记的荧光基团对寡糖的生物活性影响小, 且该标记物可在生理条件下具有较强的荧光强度并可稳定存在。本发明所述的寡糖荧光标记物对细胞基本没有毒性, 且寡糖荧光标记物能被少突胶质前体细胞选择性摄取, 适用于显微成像分析。

一种寡糖荧光标记物及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，尤其涉及一种寡糖荧光标记物及其制备方法与应用。

背景技术

硫酸软骨素（Chondroitin sulfate, CS）属于糖胺聚糖的一种，参与软骨再生、炎症反应、神经系统发育和损伤修复等多种生物学功能，还参与各类生命活动，如细胞的生长、分化、衰老、免疫应答以及癌变等，其与人类的健康和疾病息息相关，因此研究寡糖的分子结构和作用机理具有十分重要的意义。近年来，以寡糖作为活性成分或者生物材料的研究取得了巨大进展。然而，由于寡糖在体内的药代动力学研究严重不足，限制了寡糖作为活性药物以及生物材料的进一步的开发和应用。迄今为止，荧光标记寡糖已成为体内追踪寡糖最有前途的方法之一，目的是检测和鉴定寡糖、监测它们在体内的新陈代谢、跟踪其在细胞内的分布情况以及研究内源性和合成糖脂的生物活性。

荧光标记寡糖技术表现出灵敏度高、可视化、检测信号强度高等优势，意义在于研究标记分子在生物体内的代谢及定位，以及与细胞、多肽、蛋白质之间的相互作用，有望成为研究糖类物质作用机理和作用机制的有效途径。目前该项技术在核酸和蛋白质的分析检测中已经普遍使用，成为生物大分子在生物学研究中用于分析定位的高灵敏度工具。

目前寡糖荧光标记常用的衍生试剂为 2-氨基吡啶酮（AMAC）、2-氨基吡啶（2-PA）等，但该类衍生标记试剂受量子产率和荧光强度的限制，仅用于糖类物质在色谱中的分离分析，不可用于显微荧光成像研究。

发明内容

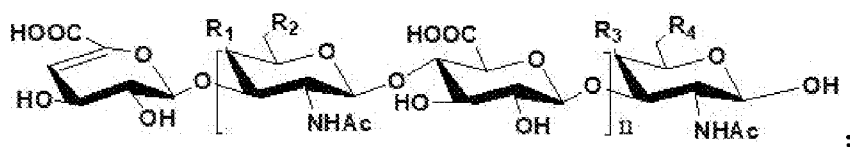
为此，本发明所要解决的技术问题在于克服现有技术中寡糖缺乏荧光基团，

在体内无法示踪的问题，并克服标记过程对糖生物学活性的影响。

为解决上述技术问题，本发明提供了一种寡糖荧光标记物及其制备方法与应用。本发明采用合成的含有氨基的荧光剂作为荧光试剂，利用其带有的氨基与寡糖还原端的醛基或酮基在酸性条件下发生还原胺化反应，通过不影响寡糖活性实现寡糖的荧光标记。

本发明的第一个目的是提供一种寡糖荧光标记物的制备方法，包括以下步骤，将寡糖与荧光剂在还原剂作用下，在溶剂中发生反应，得到所述寡糖荧光标记物。

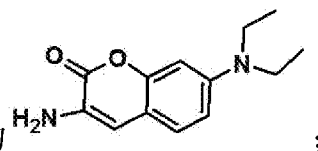
在本发明的一个实施例中，所述寡糖的结构如下：



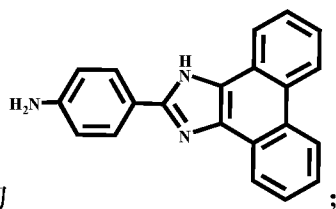
其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地选自 -OH 或 $-SO_3H$ ， n 为 0-3 的整数。

在本发明的一个实施例中，所述荧光剂为 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素、菲并咪唑、4-硝基-1,8-萘酰亚胺和 1-氨基茈中的一种或多种。

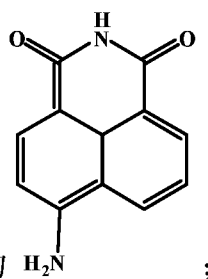
所述 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素结构为

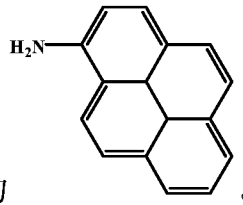


所述菲并咪唑结构为



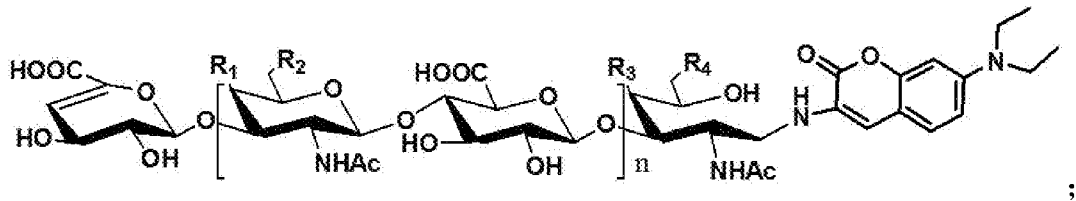
所述 4-硝基-1,8-萘酰亚胺结构为





所述 1-氨基芘结构为

在本发明的一个实施例中，所述寡糖荧光标记物的结构如下：



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地选自 -OH 或 -SO₃H， n 为 0-3 的整数。

在本发明的一个实施例中，所述还原剂为 2-甲基吡啶硼烷、硼氢化钠和氰基硼氢化钠中的一种或多种。

在本发明的一个实施例中，所述溶剂为乙酸和有机溶剂；所述有机溶剂为二甲基亚砜、乙腈和 *N,N*-二甲基甲酰胺中的一种或多种。

在本发明的一个实施例中，所述反应的温度为 40-80 °C，反应的时间为 2-10 h。

在本发明的一个实施例中，所述荧光剂、寡糖和还原剂的摩尔比为 0.5-4: 1: 0.5-4。

在本发明的一个实施例中，还包括从反应液中分离所述的寡糖荧光标记物的步骤，具体包括：离心后加入二氯甲烷萃取得到水相，水相多次加水旋蒸后冻干。

本发明的第二个目的是提供一种所述方法制备的寡糖荧光标记物。

在本发明的一个实施例中，所述寡糖荧光标记物可以制备成纳米材料，所述纳米材料在细胞相容性分析应用中，浓度为 0.25-1.00 mg/mL 时无细胞毒性。

本发明的第三个目的是提供一种所述的寡糖荧光标记物在细胞显微成像分析中的应用，所述应用中寡糖荧光标记物的摩尔浓度为 1-50 μ M。

本发明的技术方案相比现有技术具有以下优点：

(1) 本发明所述的寡糖荧光标记物利用荧光剂中的氨基可与寡糖还原端的半缩醛基发生缩合反应，形成亚胺或者席夫碱，再利用还原剂将其还原成相对稳定的仲胺，从而实现对寡糖末端的荧光标记，末端标记的荧光基团对寡糖的生物活性影响小，且该标记物可在生理条件下具有较强的荧光强度并可稳定存在。

(2) 本发明所述的寡糖荧光标记物对细胞基本没有毒性，因不同硫酸化模式的硫酸软骨素对神经细胞的作用机制尚不明确，因此通过对寡糖进行荧光标记，实现其在少突胶质前体细胞和星形胶质细胞中的检测、跟踪和可视化，且寡糖荧光标记物能被少突胶质前体细胞选择性摄取，适用于显微成像分析。

附图说明

为了使本发明的内容更容易被清楚地理解，下面根据本发明的具体实施例并结合附图，对本发明作进一步详细的说明，其中：

图 1 为本发明实施例 1 的寡糖荧光标记物的合成路线图。

图 2 为本发明实施例 1 的寡糖荧光标记物的荧光光谱图。

图 3 为本发明实施例 1 的软骨素四糖、荧光剂的四糖荧光标记物的红外和紫外分析图；其中，a 为红外图谱，b 为紫外图谱。

图 4 为本发明实施例 1 的四糖荧光标记物的荧光性能分析；其中，a 为荧光强度分析图，b 为荧光稳定性分析图。

图 5 为本发明实施例 1 的四糖荧光标记物对星形胶质细胞的细胞毒性分析图。

图 6 为本发明实施例 1 的四糖荧光标记物在星形胶质细胞中的活细胞成像图。

图 7 为本发明实施例 1 的四糖荧光标记物在少突胶质前体细胞中的活细胞成像图。

图 8 为本发明实施例 2 的四糖荧光标记物在星形胶质细胞中的活细胞成像图。

图9为本发明实施例1的四糖荧光标记物的纳米材料在少突胶质前体细胞和星形胶质细胞共培养中的活细胞成像图。

具体实施方式

下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明，以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施，但所举实施例不作为对本发明的限定。

在本发明中，除非另有说明，目标化合物中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 基团均为-OH，且 n 为0。

实施例1

参照图1所示，一种寡糖荧光标记物及其制备方法，具体包括以下步骤：

(1) 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基)香豆素荧光剂的合成

称取 386 mg 4-二乙氨基-水杨醛，293 mg 硝基乙酸乙酯，30 μ L 哌啶，60 μ L 冰乙酸充分溶解在 50 mL 的正丁醇中，将混合物混匀后放置在 100 $^{\circ}$ C 油浴锅中回流加热 12 h，冰浴冷却后形成橙色针状物，抽滤后所得固体用 10 mL 正丁醇和 10 mL 石油醚洗涤，然后放在真空干燥箱中干燥，得到初产物橙色固体。

取无水氯化亚锡 194 mg 和 6 mL 的浓盐酸加入到 100 mL 的圆底烧瓶中，然后将上一步的产物 300 mg 缓慢加入到 100 mL 圆底烧瓶中，且边加入边混匀直到能充分反应，再将混合溶液在室温条件下避光搅拌反应 6 h，反应结束后用 1 M NaOH 溶液调节 pH 至 13，然后用三倍体积的无水乙醚萃取，上层的有机溶液用无水硫酸钠对其干燥，抽滤后置于真空干燥箱内 40 $^{\circ}$ C 干燥并得到终产物红褐色固体即 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基)香豆素荧光剂。

(2) 四糖荧光标记物的制备

取 30 mg 软骨素四糖（实验室制备），加入 3 mL 1 M 的 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基)香豆素荧光剂（该荧光剂溶解在 DMSO：乙酸=7：3 溶液中），置于振荡器上反应 30 min，然后加入等体积的 1 M 溶解在乙腈中的 2-甲基吡啶硼烷，60 $^{\circ}$ C 水浴中避光反应 6 h。反应结束后 14000 g，20 min 离心处理，离心后加入二氯甲烷萃取除去有机相，水相多次加水旋蒸后冻干得四糖荧光标记物。

实施例 2

一种寡糖荧光标记物及其制备方法，具体包括以下步骤：

(1) 菲并咪唑荧光剂的合成

称取 583 mg 菲醌，393 mg 对硝基苯甲醛，6 g 乙酸铵溶解在 30 mL 的冰醋酸中，将混合物混匀后放置在 100 °C 油浴锅中回流加热 12 h，抽滤后所得固体用水和己烷洗涤，然后放在真空干燥箱中干燥，得到初产物橙色固体。

取无水氯化亚锡 180 mg 和 6 mL 的浓盐酸加入到 100 mL 的圆底烧瓶中，然后将上一步的产物 400 mg 缓慢加入到 100 mL 圆底烧瓶中，且边加入边混匀直到能充分反应，再将混合溶液在室温条件下避光搅拌反应 6 h，反应结束后用 1 M NaOH 溶液调节 pH 至 13，然后用三倍体积的无水乙醚萃取，上层的有机溶液用无水硫酸钠对其干燥，抽滤后置于真空干燥箱内 40 °C 干燥并得到终产物红褐色固体即菲并咪唑荧光剂。

(2) 四糖荧光标记物的制备

取 30 mg 软骨素四糖（实验室制备），加入 2 mL 1 M 的菲并咪唑荧光剂（该荧光剂溶解在 DMF：乙酸=7：3 溶液中），置于振荡器上反应 30 min，然后加入等体积的 1 M 溶解在乙腈中的氰基硼氢化钠，40 °C 水浴中避光反应 10 h。反应结束后 14000 g，20 min 离心处理，离心后加入二氯甲烷萃取除去有机相，水相多次加水旋蒸后冻干。

实施例 3

一种寡糖荧光标记物及其制备方法，具体包括以下步骤：

(1) 4-硝基-1,8-萘酰亚胺荧光剂的合成

取 770 mg 萘与 3 mL 醋酸混合，再加 4 mL 硝酸，80 °C 反应 1 h，冷却后，析出黄色晶体，加入 $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 于 100 °C，反应 3 h，抽滤后所得固体用 30 mL 水洗涤，加 30 mL Na_2CO_3 后过滤，滤液用盐酸调节 pH 为 2 后过滤，并水洗至中性，真空干燥箱中 120 °C 干燥，得到初产物浅黄色固体。

在 250 mL 三口瓶中，加入 500 mg 4-硝基萘酐，搅拌下将 2.4 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$

及 1.3 g NaHCO_3 制成的 10 mL 溶液滴加到反应瓶中(15 min 加完), 加完后控制温度在 80°C 继续反应 40 min。反应完毕, 将溶液煮沸, 以除去生成的 H_2S 后过滤, 滤液先用盐酸调节 pH 值到 5 左右, 放置于冰浴中, 冷却析出浅黄色针状晶体, 过滤, 干燥得 4-硝基-1,8-萘酰亚胺荧光剂。

(2) 四糖荧光标记物的制备

取 30 mg 软骨素四糖 (实验室制备), 加入 3 mL 1 M 的 4-硝基-1,8-萘酰亚胺荧光剂 (该荧光剂溶解在 DMSO : 乙酸=7: 3 溶液中), 置于振荡器上反应 30 min, 然后加入等体积的 1 M 溶解在乙腈中的 2-甲基吡啶硼烷, 80°C 水浴中避光反应 2 h。反应结束后 14000 g, 20 min 离心处理, 离心后加入二氯甲烷萃取除去有机相, 水相多次加水旋蒸后冻干。

实施例 4

一种寡糖荧光标记物及其制备方法, 具体包括以下步骤:

(1) 1-氨基苊荧光剂的合成

取 1 g 苊溶解在 10 mL 醋酸中, 20°C 条件下开始滴加, 缓慢滴加 68% 浓硝酸 11 mL, 1 h 内滴完, 回流加热 2 h。反应结束后, 将 10 mL 水加入到反应体系中, 得到棕红色沉淀, 抽滤后加醋酸重结晶, 放在真空干燥箱中干燥得到棕红色粉末。

取上一步反应产物 800 mg, 加入 Pd/C 催化剂 500 mg, 乙醇 10 mL, 缓慢加热至回流, 并在回流状态下滴加 1 mL 水合肼, 3 h 内滴完。反应完成后热过滤, 滤液冷却至室温, 过滤得到黄色晶体即 1-氨基苊荧光剂。

(2) 四糖荧光标记物的制备

取 40 mg 软骨素四糖 (实验室制备), 加入 3 mL 1 M 的 1-氨基苊荧光剂 (该荧光剂溶解在 DMF : 乙酸=7: 3 溶液中), 置于振荡器上反应 30 min, 然后加入等体积的 1 M 溶解在乙腈中的硼氢化钠, 60°C 水浴中避光反应 10 h。反应结束后 14000 g, 20 min 离心处理, 离心后加入二氯甲烷萃取除去有机相, 水相多次加水旋蒸后冻干。

对比例 1

(1) 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂的合成

称取 386 mg 4-二乙氨基-水杨醛, 293 mg 硝基乙酸乙酯, 30 μ L 哌啶, 60 μ L 冰乙酸充分溶解在 50 mL 的正丁醇中, 将混合物混匀后放置在 100 $^{\circ}$ C 油浴锅中回流加热 12 h, 冰浴冷却后形成橙色针状物, 抽滤后所得固体用 10 mL 正丁醇和 10 mL 石油醚洗涤, 然后放在真空干燥箱中干燥, 得到初产物橙色固体。

取无水氯化亚锡 194 mg 和 6 mL 的浓盐酸加入到 100 mL 的圆底烧瓶中, 然后将上一步的产物 300 mg 缓慢加入到 100 mL 圆底烧瓶中, 且边加入边混匀直到能充分反应, 再将混合溶液在室温条件下避光搅拌反应 6 h, 反应结束后用 1 M NaOH 溶液调节 pH 至 13, 然后用三倍体积的无水乙醚萃取, 上层的有机溶液用无水硫酸钠对其干燥, 抽滤后置于真空干燥箱内 40 $^{\circ}$ C 干燥并得到终产物红褐色固体即 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂。

(2) 四糖荧光标记物的制备

取 30 mg 软骨素四糖 (实验室制备), 加入 3 mL 1 M 的 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂 (该荧光剂溶解在 DMSO 中), 置于振荡器上反应 30 min, 然后加入等体积的 1 M 溶解在乙腈中的 2-甲基吡啶硼烷, 60 $^{\circ}$ C 水浴中避光反应 6 h。反应结束后 14000 g, 20 min 离心处理, 离心后加入二氯甲烷萃取除去有机相, 水相多次加水旋蒸后冻干, 因为未加入乙酸, 所得产物无荧光。

对比例 2

(1) 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂的合成

称取 386 mg 4-二乙氨基-水杨醛, 293 mg 硝基乙酸乙酯, 30 μ L 哌啶, 60 μ L 冰乙酸充分溶解在 50 mL 的正丁醇中, 将混合物混匀后放置在 100 $^{\circ}$ C 油浴锅中回流加热 12 h, 冰浴冷却后形成橙色针状物, 抽滤后所得固体用 10 mL 正丁醇和 10 mL 石油醚洗涤, 然后放在真空干燥箱中干燥, 得到初产物橙色固体。

取无水氯化亚锡 194 mg 和 6 mL 的浓盐酸加入到 100 mL 的圆底烧瓶中, 然

后将上一步的产物 300 mg 缓慢加入到 100 mL 圆底烧瓶中，且边加入边混匀直到能充分反应，再将混合溶液在室温条件下避光搅拌反应 6 h，反应结束后用 1 M NaOH 溶液调节 pH 至 13，然后用三倍体积的无水乙醚萃取，上层的有机溶液用无水硫酸钠对其干燥，抽滤后置于真空干燥箱内 40 °C 干燥并得到终产物红褐色固体即 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂。

(2) 四糖荧光标记物的制备

取 30 mg 软骨素四糖（实验室制备），加入 3 mL 1 M 的 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂（该荧光剂溶解在 DMSO：乙酸=7：3 溶液中），置于振荡器上反应 30 min，然后加入等体积的 1 M 溶解在乙腈中的 2-甲基吡啶硼烷，60 °C 水浴中避光反应 6 h。反应结束后 14000 g，20 min 离心处理，产物通过 Sephadex G-25 进行纯化，荧光吸附在柱子上，缩短了四糖荧光标记物寿命。

测试例 1

对实施例 1 制备的荧光剂和四糖荧光标记物进行荧光光谱分析：

配置 0.25、0.5、1、2、4 µg/mL 的荧光剂和 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 四糖荧光标记物溶液，荧光分光光度计通过激发波长 380 nm，发射波长 400-650 nm 范围内，激发光和发射光带宽为 5 nm 的条件下检测其荧光强度，结果如图 2 所示。结果表明，四糖荧光标记物是以 522 nm 为中心发射带，与荧光剂以 490 nm 为中心发射带相比，具有一定的蓝移，因为与四糖结合的荧光团改变了荧光团的吸光度和发射。根据荧光剂的标准曲线和标记物的荧光强度计算得四糖荧光标记物的平均标记率为 3.64 %。

测试例 2

对实施例 1 制备的软骨素四糖（4mer）、7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂（B）、四糖荧光标记物（4mer-B）进行红外分析和紫外分析：

真空冷冻干燥后的样品软骨素四糖（4mer）、7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光剂（B）、四糖荧光标记物（4mer-B）分别放置在红外光谱探头下，下移探头至样品压实，检测其样品的红外光谱。结果如图 3a 所示，表明 4mer-B

的红外光谱在 1616 cm^{-1} 处出现明显的特征吸收峰，该处是由软骨素四糖的还原性末端与荧光剂上氨基通过还原胺化反应形成 C-N 键的伸缩振动峰，表明软骨素四糖成功修饰上荧光剂。

取 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的软骨素四糖、荧光剂、四糖荧光标记物置于紫外比色皿中，测定 800-200 nm 范围内的紫外可见分光光谱。结果如图 3b 所示，软骨素四糖、四糖荧光标记物均在 232 nm 处有一定的吸收值，同时荧光标记物在 350 nm 处出现了吸收峰，与荧光剂在水溶液中的吸收峰相同，因此 UV-Vis 结果进一步证明软骨素四糖成功修饰上荧光剂。

测试例 3

对实施例 1 制备的四糖荧光标记物（4mer-B）进行 pH 值对荧光强度、荧光稳定性的影响分析：

取四糖荧光标记物分别溶解在 pH 为 2-12 的缓冲液中，终浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ ，采用荧光分光光度计测定不同 pH 值条件下合成的四糖荧光标记物的荧光强度，并考察 pH 值对荧光强度的影响，测定条件为激发波长 380 nm，发射波长 522 nm，并设置激发光和发射光带宽为 5 nm。样品室温避光储存 5 d，每隔 24 h 测各个样品的荧光强度，观察随放置时间的延长，不同 pH 值条件下样品荧光强度的变化，如图 4a 所示，结果表明该标记物对 pH 较敏感，生理条件下荧光强度较高。其荧光稳定性如图 4b 所示，在室温存放 5d 后荧光强度略有降低但幅度有限。

测试例 4

对实施例 1 制备的四糖荧光标记物进行细胞相容性分析：

将软骨素四糖荧光标记物与星形胶质细胞共孵育，通过 MTT 法检测细胞的存活率，结果见图 5。结果表明四糖及四糖荧光标记物在 $0\text{-}300\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内，星型胶质细胞的细胞活力均在 80 % 以上，说明四糖及四糖荧光标记物对星形胶质细胞的毒性较低，不会对实验结果造成影响，可以用于研究细胞摄取情况。

测试例 5

(1) 对实施例 1 制备的四糖荧光标记物进行激光共聚焦成像分析：

取生长状态良好的星形胶质细胞，用适量胰酶消化分散 5 min 制备成细胞悬液，以 5×10^4 个/mL 的密度铺在 PLL 包被过夜的共聚焦皿中，置于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中，培养 24 h，待细胞贴壁后除去上层培养基，加入 100 µg/mL 的四糖 7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基) 香豆素荧光标记物，培养 24 h 后吸除原有的培养基，并加入 4 % 多聚甲醛固定液固定细胞 30 min，PBS 清洗三次，其中 100 µg/mL 的四糖标记物加入适量 DAPI 染色 15-20 min，PBS 清洗三次，置于激光共聚焦显微镜下拍照采集数据。结果如图 6 所示，表明四糖荧光标记物发出强烈的绿色荧光且能有效地被星形胶质细胞内化。

取生长状态良好的少突胶质前体细胞，用适量胰酶消化分散 5 min 制备成细胞悬液，以 5×10^4 个/mL 的密度铺在 PLL 包被过夜的共聚焦皿中，置于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中，培养 24 h，待细胞贴壁后除去上层培养基，加入 100 µg/mL 的四糖荧光标记物，培养 24 h 后吸除原有的培养基，并加入 4 % 多聚甲醛固定液固定细胞 30 min，PBS 清洗三次，其中 100 µg/mL 的四糖标记物加入适量 DAPI 染色 15-20 min，PBS 清洗三次，置于激光共聚焦显微镜下拍照采集数据，结果如图 7 所示，因少突胶质前体细胞表面有丰富的糖结合蛋白受体，可增强与标记的软骨素四糖结合能力，并进一步被细胞摄取。

(2) 对实施例 2 制备的四糖荧光标记物进行激光共聚焦成像分析：

取生长状态良好的星形胶质细胞，用适量胰酶消化分散 5 min 制备成细胞悬液，以 5×10^4 个/mL 的密度铺在 PLL 包被过夜的共聚焦皿中，置于 37 °C, 5 % CO₂ 培养箱中，培养 24 h，待细胞贴壁后除去上层培养基，加入 100 µg/mL 的四糖菲并咪唑荧光标记物，培养 24 h 后吸除原有的培养基，并加入 4 % 多聚甲醛固定液固定细胞 30 min，PBS 清洗三次，其中 100 µg/mL 的四糖标记物加入适量 DAPI 染色 15-20 min，PBS 清洗三次，置于激光共聚焦显微镜下拍照采集数据，结果如图 8 所示，表明四糖荧光标记物发出强烈的蓝色荧光且能有效地被星形胶质细胞内化。

测试例 6

取 8 mg 实施例 1 的四糖荧光标记物, 42 mg EDC 和 60 mg NHS 溶解于 5 mL Tris 溶液, 调节 pH=5.5, 活化 50 min。调整 pH=7.4, 加入氨基化纤维素纳米晶须混悬液 (20 mg/mL, 1 mL), 避光搅拌 24 h。离心洗涤 10000 r/min 10 min, 透析并冻干后获得产物功能化纤维素纳米晶须 (N4B)。

(2) 四糖荧光标记物纳米粒子的细胞相容性分析

96 孔板用 0.05 mg/mL PLL 包被 8 h, PBS 洗 3 次备用; 将少突胶质前体细胞和星形胶质细胞的混合细胞悬液以 10 万/mL 接种于 96 孔板中; 配置含有 0.1 mg/mL、0.25 mg/mL、0.50 mg/mL、0.75 mg/mL 和 1.00 mg/mL N4B 的混合细胞培养液, 每孔添加 100 μ L 相应混合细胞培养液; 培养 1 天、3 天后移除培养基, 每孔加 100 μ L MTT 溶液, 恒温培养箱 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h; 移除 MTT, 加 100 μ L DMSO, 于摇床 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 用酶标仪检测 570 nm 处吸光度。结果表明, 浓度范围在 0.25-1.00 mg/mL 的 N4B 无细胞毒性。

(3) 四糖荧光标记物纳米粒子的激光共聚焦成像分析

用 0.05 mg/mL PLL 包被共聚焦皿, 8 h 后吸除 PLL 溶液并用 PBS 清洗干净共聚焦皿; 将少突胶质前体细胞和星形胶质细胞的混合细胞悬液以 10 万/mL 接种到共聚焦皿上; 配置含有 1.00 mg/mL N4B 的混合细胞培养液, 每个共聚焦皿中添加 1 mL 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C 5 % CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h。吸除培养基, 用 4 % 多聚甲醛溶液固定 10 min, 并用 PBS 清洗干净, 向共聚焦皿中添加 100 μ L PBS 待检测。如图 9 所示, 结果表明孵育 24 h 后, 细胞基本保持正常形态, 说明 N4B 具有一定的生物相容性。在同等情况下, 因少突胶质前体细胞表面有丰富的糖结合蛋白受体, 可增强与标记的软骨素四糖结合能力, 四糖荧光标记物纳米粒子并选择性被少突胶质前体细胞摄取。

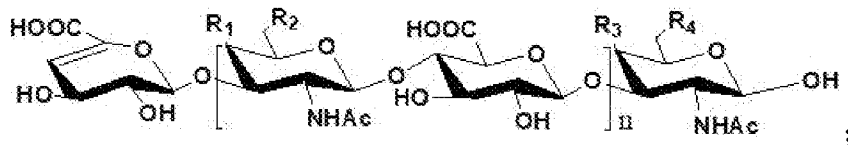
显然, 上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例, 并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说, 在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所

引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，包括以下步骤，将寡糖与荧光剂在还原剂作用下，在溶剂中发生反应，得到所述寡糖荧光标记物。

2、根据权利要求1所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述寡糖的结构如下：



其中， R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 独立地选自-OH或-SO₃H， n 为0-3的整数。

3、根据权利要求1所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述荧光剂为7-二乙基氨基-3-(4-氨基苯基)香豆素、菲并咪唑、4-硝基-1,8-萘酰亚胺和1-氨基芘的一种或多种。

4、根据权利要求1所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述还原剂为2-甲基吡啶硼烷、硼氢化钠和氰基硼氢化钠中的一种或多种。

5、根据权利要求1所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述溶剂为乙酸和有机溶剂。

6、根据权利要求5所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述有机溶剂为二甲基亚砜、乙腈和 N,N -二甲基甲酰胺中的一种或多种。

7、根据权利要求1所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述反应的温度为40-80℃，反应的时间为2-10h。

8、根据权利要求1所述的寡糖荧光标记物的制备方法，其特征在于，所述荧光剂、寡糖和还原剂的摩尔比为0.5-4:1:0.5-4。

9、权利要求1-8任一项所述方法制备的寡糖荧光标记物。

10、权利要求9所述的寡糖荧光标记物在细胞显微成像分析中的应用，其特征在于，所述应用中寡糖荧光标记物的摩尔浓度为1-50 μ M。

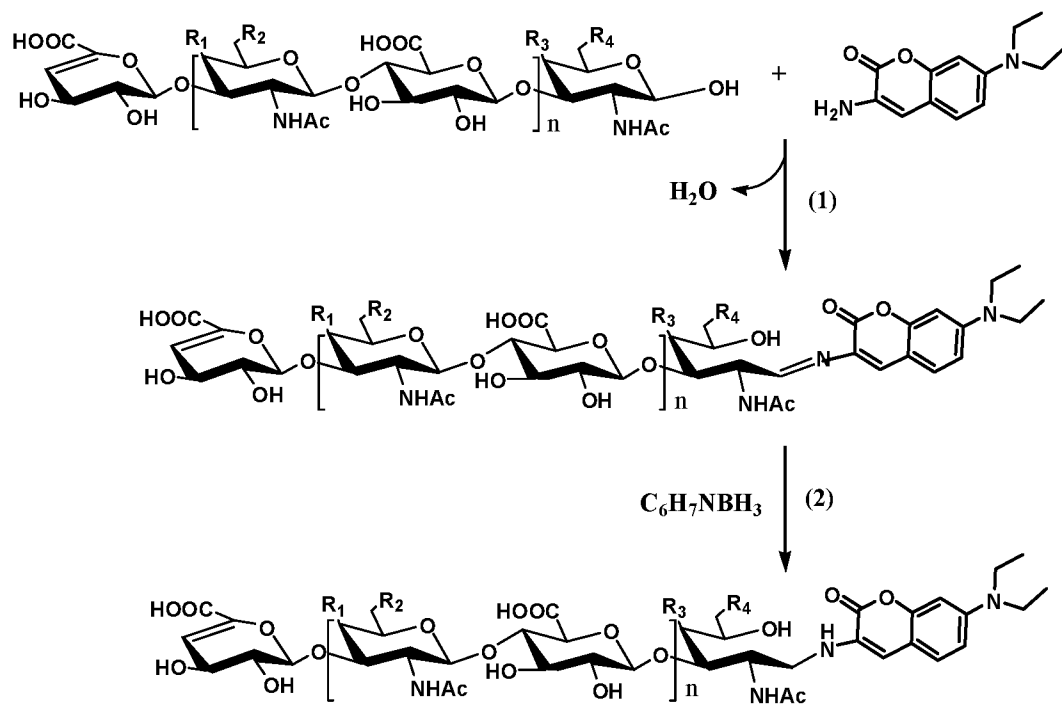


图 1

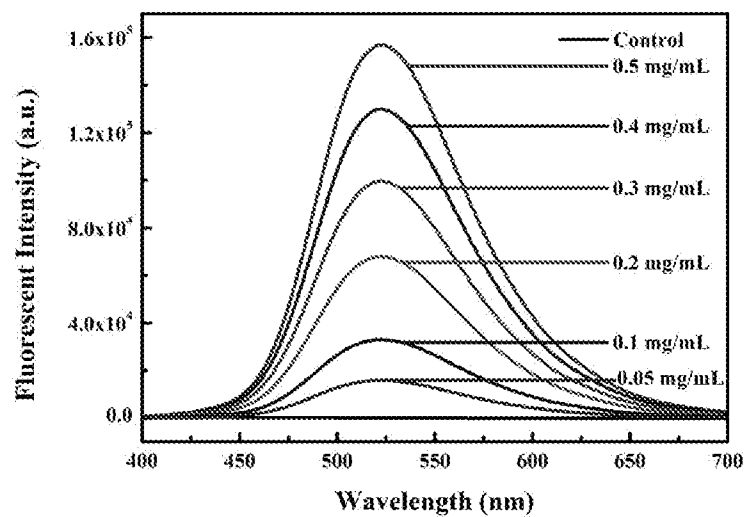


图 2

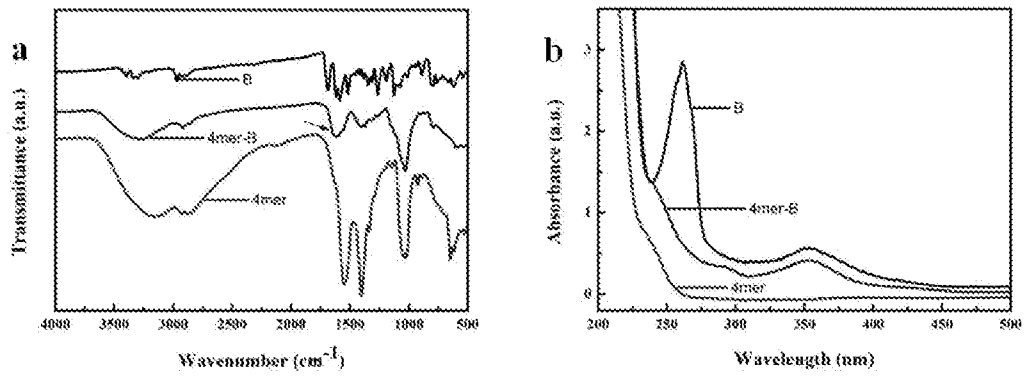


图 3

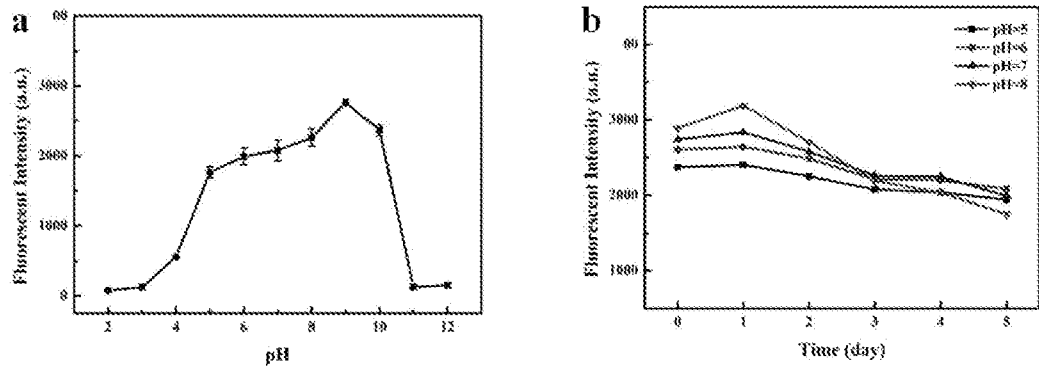


图 4

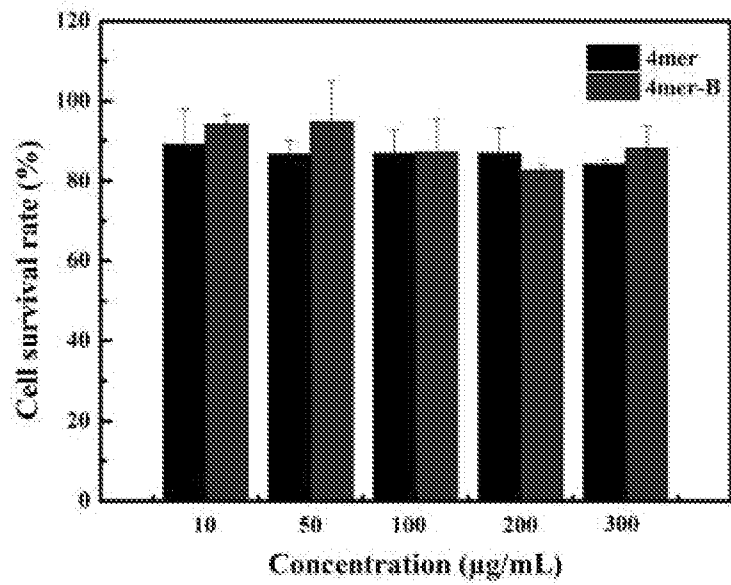


图 5

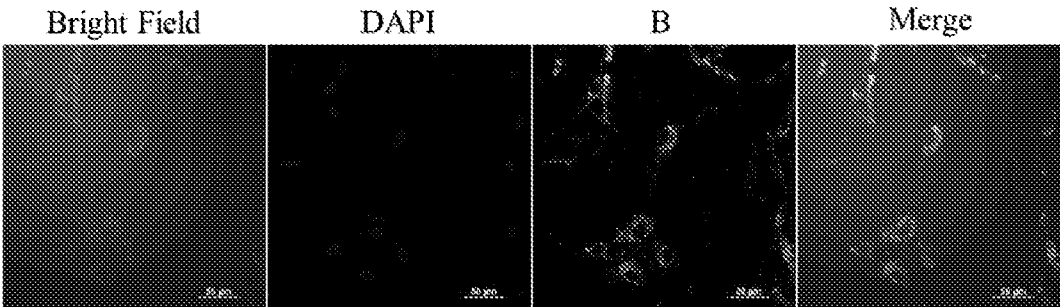


图 6

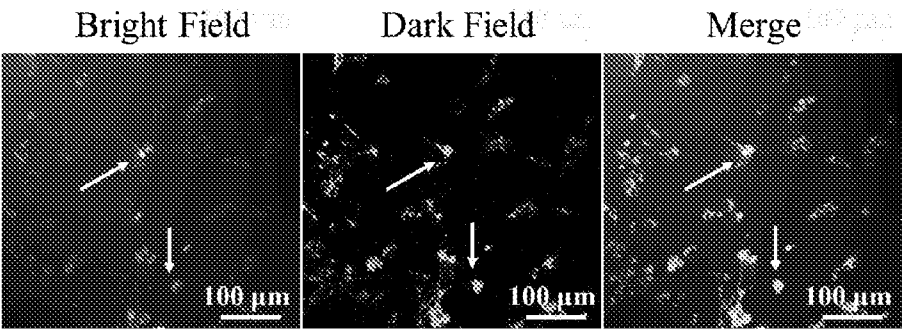


图 7

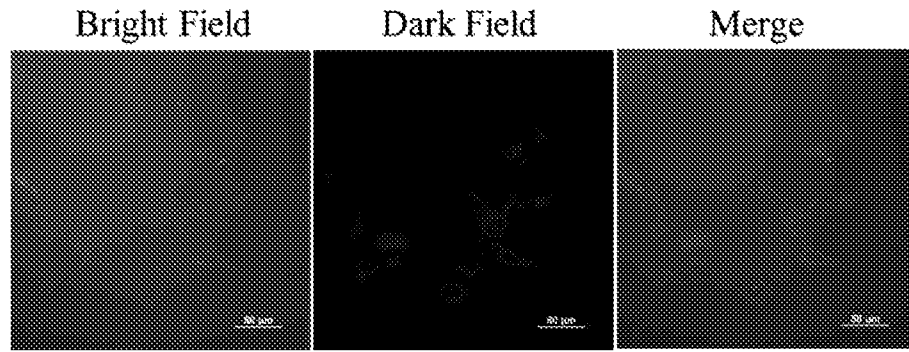


图 8

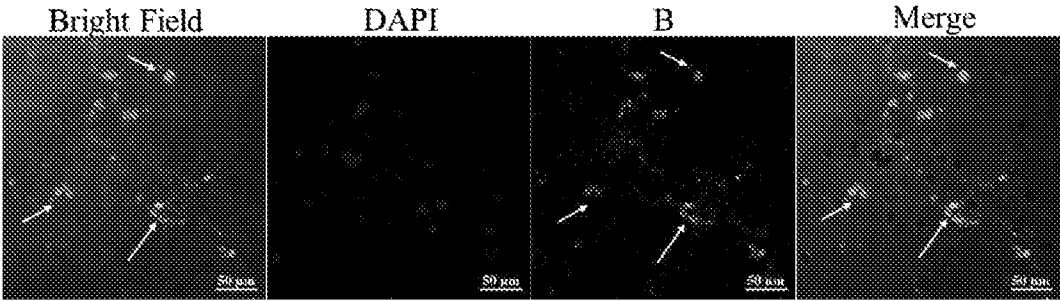


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/129774

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 1/00(2006.01)i; C07H 15/26(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07H,C09K,G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, VEN, STN(CAPLUS, REGISTRY): 许淑琴, 陈敬华, 汪竹群, 汤晓莉, 寡糖, 荧光标记, 软骨素, 糖, 标记, 香豆素, 还原氨化, 有机酸, 乙酸, 酸性条件, oligosaccharide, fluorescent, coumarin, chondroitin, acid, 基于通式化合物进行的结构片段检索, Structural fragment search based on general formula compounds

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 114685571 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 01 July 2022 (2022-07-01) claims 1-10	1-10
Y	EP 2642286 A1 (CELLSEED INC. et al.) 25 September 2013 (2013-09-25) description, embodiment 1, and figure 2	1-10
Y	CN 103380378 A (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD.) 30 October 2013 (2013-10-30) description, page 4	1-10
Y	王维通等 (WANG, Weitong et al.). "寡糖的荧光标记高效液相色谱分析 (High Performance Liquid Chromatography of Fluorescence-Labeled Oligosaccharides)" 生物化学杂志 (<i>Journal of Biological Chemistry</i>), Vol. 4, No. 2, 30 April 1988 (1988-04-30), pages 116-117	1-10
Y	CN 104781674 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HIROSAKI UNIVERSITY) 15 July 2015 (2015-07-15) description, pages 5-8	10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 January 2023

Date of mailing of the international search report

18 January 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/129774

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114685571	A	01 July 2022	None			
EP	2642286	A1	25 September 2013	WO	2012067236	A1	24 May 2012
				JP	2012108056	A	07 June 2012
				US	2013309703	A1	21 November 2013
CN	103380378	A	30 October 2013	JP	WO2012124609	A1	24 July 2014
				KR	20140040109	A	02 April 2014
				US	2013310552	A1	21 November 2013
				EP	2685263	A1	15 January 2014
				WO	2012124609	A1	20 September 2012
CN	104781674	A	15 July 2015	WO	2014054601	A1	10 April 2014
				US	2015369797	A1	24 December 2015
				EP	2905620	A1	12 August 2015
				JP	WO2014054601	A1	25 August 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/129774

A. 主题的分类 C07H 1/00(2006.01)i; C07H 15/26(2006.01)i; C09K 11/06(2006.01)i; G01N 21/64(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07H, C09K, G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNKI, VEN, STN(CAPLUS, REGISTRY):许淑琴, 陈敬华, 汪竹群, 汤晓莉, 寡糖, 荧光标记, 软骨素, 糖, 标记, 香豆素, 还原氨化, 有机酸, 乙酸, 酸性条件, oligosaccharide, fluorescent, coumarin, chondroitin, acid, 基于通式化合物进行的结构片段检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 114685571 A (江南大学) 2022年7月1日 (2022 - 07 - 01) 权利要求1-10	1-10
Y	EP 2642286 A1 (CELLSEED INC等) 2013年9月25日 (2013 - 09 - 25) 说明书实施例1, 附图图2	1-10
Y	CN 103380378 A (住友电木株式会社) 2013年10月30日 (2013 - 10 - 30) 说明书第4页	1-10
Y	王维通等. “寡糖的荧光标记高效液相色谱分析” 《生物化学杂志》, 第4卷, 第2期, 1988年4月30日 (1988 - 04 - 30), 第116-117页	1-10
Y	CN 104781674 A (国立大学法人弘前大学) 2015年7月15日 (2015 - 07 - 15) 说明书第5-8页	10
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2023年1月4日		国际检索报告邮寄日期 2023年1月18日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 李莎莎 电话号码 86-010-62086331

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/129774

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	114685571	A	2022年7月1日	无			
EP	2642286	A1	2013年9月25日	WO	2012067236	A1	2012年5月24日
				JP	2012108056	A	2012年6月7日
				US	2013309703	A1	2013年11月21日
CN	103380378	A	2013年10月30日	JP	W02012124609	A1	2014年7月24日
				KR	20140040109	A	2014年4月2日
				US	2013310552	A1	2013年11月21日
				EP	2685263	A1	2014年1月15日
				WO	2012124609	A1	2012年9月20日
CN	104781674	A	2015年7月15日	WO	2014054601	A1	2014年4月10日
				US	2015369797	A1	2015年12月24日
				EP	2905620	A1	2015年8月12日
				JP	W02014054601	A1	2016年8月25日