

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/52

G01N 33/53 G01N 33/533

G01N 33/58



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02139365.6

[43] 公开日 2004年2月18日

[11] 公开号 CN 1475805A

[22] 申请日 2002.8.15 [21] 申请号 02139365.6

[71] 申请人 陕西西大北美基因股份有限公司

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号  
西北大学 386 号信箱

[72] 发明人 崔亚丽 陈超 王琼

权利要求书 5 页 说明书 15 页

[54] 发明名称 磁性荧光微球及其制备方法和采用该磁性荧光微球进行生物分子检测的方法

[57] 摘要

一种磁性荧光微球及其制备方法和采用该磁性荧光微球进行生物分子检测的方法。本发明是在合成高分子微球时引入磁性纳米粒子制备出磁性微球，在其中掺入荧光染料，使微球具有特征荧光，并能被流式细胞计数器识别分析。磁性荧光微球表面可结合各种生物分子，这些生物分子与样品中相应的靶物分子反应，以荧光标记的测定底物等作为检测生物学反应的报告基团，通过荧光信号的测定值对靶物分子进行定性和定量分析。应用磁性荧光微球进行生物大分子检测，既能对反应物进行快速分离和纯化，又能在一个反应管、孔内对待检样品的多个靶分子同时进行检测，可广泛应用于免疫学检测、核酸杂交、基因型分析等领域。

1. 一种磁性荧光微球，其特征在于：它是包括磁性纳米粒子和高分子微球构成的磁性高分子微球及荧光分子的直径为  $0.7\sim 30\mu\text{m}$  的磁性荧光高分子微球，所述的磁性纳米粒子占磁性荧光高分子微球总重量的  $10\sim 50\%$ ，荧光分子占磁性荧光高分子微球总重量的  $0.01\sim 20\%$ 。

2. 如权利要求 1 所述的磁性荧光微球，其特征在于：所述的磁性纳米粒子通过荧光染料共聚在高分子微球内部掺入荧光分子，或通过吸附或化学键合在微球表面标记荧光分子构成磁性荧光高分子微球。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的磁性荧光微球，其特征在于：所述的磁性纳米粒子的粒径为  $5\sim 12\text{nm}$ 。

4. 如权利要求 3 所述的磁性荧光微球，其特征在于：所述的磁性高分子微球是粒径为  $0.7\sim 2\mu\text{m}$ ，磁含量为磁性高分子微球总重量  $10\sim 20\%$  的磁性高分子种子微球。

5. 一种如权利要求 1 所述磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：该方法的制备包括

1]. 用三价铁和二价过渡金属盐混合水溶液通过化学共沉淀法制备具有超顺磁性的金属氧化物磁性纳米粒子；

2]. 采用高分子聚合法制备高分子微球；

3]. 标记荧光染料；

4]. 最后，得到磁性荧光高分子微球。

6. 如权利要求 5 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：所述制备磁性纳米粒子的二价过渡金属盐为  $\text{Fe(II)}$ 、 $\text{Mn(II)}$ 、 $\text{Ni(II)}$ 、 $\text{Zn(II)}$  或  $\text{Cu(II)}$  金属盐。

7. 如权利要求 5 或 6 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：所述的超顺磁性金属氧化物磁性纳米粒子的制备中包括加入表面活性

剂，形成表面具有疏水性的磁性纳米粒子。

8. 如权利要求 5 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：所述的磁性高分子微球是粒径为 0.7~2 $\mu\text{m}$  的磁性高分子种子微球时，该磁性高分子种子微球的制备方法为微悬浮聚合法，包括

1]. 用分散剂对制备得到的磁性纳米粒子进行表面处理，使其具有疏水性，并分散到溶有单体分子的有机相中，然后将引发剂和交联剂溶入体系中；

2]. 将上述磁性纳米粒子、单体、引发剂、交联剂等混合物加入含有悬浮剂的水中，借助搅拌作用经高速剪切乳化，形成稳定的悬浮液；

3]. 升温，引发聚合，制备出粒径为 0.7~2 $\mu\text{m}$ 、磁含量为 10~20% 的磁性高分子种子微球。

9. 如权利要求 8 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：所述的分散剂为聚乙二醇；所述的引发剂为过氧化苯甲酰（BPO）或十二烷酰过氧化物。

10. 如权利要求 5 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：所述磁性高分子微球采用悬浮聚合法的制备，其包括

1]. 用长链脂肪酸对磁性纳米级粒子进行亲油化处理，使其表面形成一层亲油层；将亲油化处理的磁性纳米级粒子与亲油性单体溶液混合，形成油相；

2]. 溶解至少一种表面活性剂于水溶液中形成水相、分散油相于水相中形成水包油型悬浮液；

3]. 热引发聚合反应，形成磁性高分子微球。

11. 如权利要求 5 或 10 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：所述的高分子微球由有机单体分子聚合或共聚而成，所述的有机单体分子为苯乙烯、丙烯酸、丙烯晴、丙烯酰胺、丙烯醛、丁二烯、乙酸

内酯、对苯二甲酸乙二醇酯、异戊二烯、二乙烯基苯或甲基丙烯酸甲酯。

12. 如权利要求 5 或 8 所述的磁性荧光微球的制备方法, 其特征在于: 所述的对磁性高分子微球标记染料包括

对所述磁性种子高分子微球进行二次溶胀时, 在溶胀剂中掺入两种不同的荧光染料及功能性的共聚单体, 使荧光物质通过共聚掺入磁性微球, 制备出磁性荧光微球。

13. 如权利要求 12 所述的磁性荧光微球的制备方法, 其特征在于: 所述对磁性高分子微球标记荧光染料的方法包括

1]. 首先制备活性溶胀乳剂, 对粒径为  $0.7\sim 2\mu\text{m}$  的磁性种子微球进行第一次溶胀, 形成活性溶胀后的种子乳胶液, 然后加入稳定剂; 所述的稳定剂为碱性金属卤化物溶于溶胀用乳化剂的水性溶液, 浓度为  $0.001\sim 0.1\text{M}$ ; 所述的碱性金属卤化物为钾或铯的氯化物、溴化物或碘化物;

2]. 在含有两种不同比例疏水荧光染料、反应单体和引发剂以及表面活性剂成分存在的条件下, 加入上述种子乳胶液进行二次溶胀, 使单体和引发剂等渗透至种子乳胶颗粒中, 得到含荧光染料的溶胀颗粒混合物; 最后升温, 引发共聚得到粒径均匀分布的磁性荧光微球; 所述的两种荧光染料是具有重叠的激发波长、具有不同发射波长、既可被同一波长的激光所激发、又能分别被流式细胞仪识别的荧光染料。

14. 如权利要求 11 所述的磁性荧光微球的制备方法, 其特征在于: 所述的对磁性高分子微球标记荧光染料是通过物理吸附法制备磁性荧光微球, 其是将磁性高分子微球加入含有两种荧光染料的氯仿溶液, 在  $25\sim 55^\circ\text{C}$  下搅拌 2-5 小时, 至磁球吸附荧光染料达到饱和为止, 抽真空除去有荧光染料溶液, 产物用磷酸盐缓冲液稀释、储存。

15. 如权利要求 11 所述的磁性荧光微球的制备方法, 其特征在于:

所述的对磁性高分子微球标记荧光染料包括

用微乳液聚合法制备纳米级非磁性高分子微球，使两组纳米级微球表面分别吸附两种不同的荧光染料，再将带有荧光染料的纳米微球通过共价结合偶联在制得的磁性微米级微球表面，调节微米级磁性微球表面的两种吸附不同荧光物质的纳米微球的比例，以调节磁性微球的荧光特征；所述的两种荧光染料是具有重叠的激发波长、具有不同的发射波长、既可被同一波长的激光所激发、又能分别被流式细胞仪识别的荧光染料。

16. 如权利要求 15 所述的磁性荧光微球的制备方法，其特征在于：  
所述的对磁性高分子微球标记荧光染料包括

在荧光磁性微球表面具有通过单体共聚形成的带有功能基团的高分子壳层。

17. 一种采用如权利要求 1 所述磁性荧光微球进行生物分子检测的方法，其特征在于：该方法的检测步骤包括

1]. 在磁性荧光微球表面偶联生物活性物质

磁性荧光微球通过其表面的功能基团将多种生物活性物质以共价键偶联在其表面；

2]. 通过磁性荧光微球表面偶联的生物活性物质，将待检样品中相应的分子捕获至微球表面进行反应，使微球成为生物学反应的固相载体；

3]. 通过磁分离器进行磁性分离，对捕获至微球表面的反应物进行富集、分离和纯化；

4]. 通过流式细胞仪识别具有不同荧光特征微球，对每种微球表面所发生的生物学反应进行区分；通过对待检分子或能与待检分子特异结合的分子上标记的第三种荧光物质的检测，得到对待检样品定性及定量的分析检测结果。

18. 如权利要求 17 所述的采用磁性荧光微球进行生物分子检测的方

法，其特征在于：所述在磁性荧光微球表面偶联的生物活性物质为抗体，其偶联的方法是将表面带羧基的磁性荧光微球 30mg 与碳二亚胺（EDC）溶液混和后，加入 1.5mg 抗体，在室温下搅拌 24 小时，加入牛血清白蛋白 30mg/ml，孵育 4 小时终止反应；磁性分离，弃上清，用 PH7.4 的 PBS 洗一次，重新悬浮于 PBS 中保存。

19. 如权利要求 17 所述的采用磁性荧光微球进行生物分子检测的方法，其特征在于：所述在磁性荧光微球表面偶联生物活性物质是寡核苷酸探针，其步骤是用碳二亚胺作为偶联剂，加入 1.5mg 寡核苷酸探针，在室温下搅拌 24 小时，加入牛血清白蛋白 30mg/ml，孵育 4 小时终止反应；磁性分离，弃上清，用 PH7.4 的 PBS 洗一次，重新悬浮于 PBS 中保存。

20. 如权利要求 17 所述的采用磁性荧光微球进行生物分子检测的方法，其特征在于：所述的生物活性物质为抗原-抗体，其检测方法是将待检样品与包被特异抗原的磁性荧光微球混合，避光作用 10 分钟，将相应待检抗体捕获至微球表面；用磁性分离器分离，将微球-抗原-抗体复合物纯化、富集；在上述复合物中加入 FITC 标记的二抗，避光作用 10 分钟，用流式细胞仪检测。

## 磁性荧光微球及其制备方法

### 和采用该磁性荧光微球进行生物分子检测的方法

本发明涉及一种磁性荧光微球及其制备方法和采用该磁性荧光微球进行生物分子检测的方法。

自1977年Horan首次利用流式细胞仪将高分子微球应用于免疫学检测以来，以高分子微球作为载体的生物检测技术已经渗透到细胞生物学、分子生物学、免疫学测定、医学等各个领域，显示出广阔的应用前景。由于流式细胞仪具有可根据微球粒径及所带特征荧光信号对微球进行特异性识别的能力，因此如何利用高分子微球结合流式细胞仪建立高通量、自动化生物大分子的检测技术，已成为目前微球技术新的研究热点。

通过在高分子微球表面或内部掺入一种或多种荧光物质制备成的荧光高分子微球，最初被用作校准流式细胞仪和荧光显微镜的荧光准质微球，并逐渐被应用于细胞标记、生物分子标记及在活性条件下的示踪，也可固定蛋白质分子并跟踪其功能化过程。进入90年代，国外公司不断开发出具有特征荧光标记的微球阵列、能对微球进行特异识别的流式细胞仪及其相应的分析软件系统，并在此基础上产生了具有多重分析能力的荧光微球技术，其应用范围被进一步拓展到抗原-抗体检测、

酶-底物反应、核酸杂交、扩增、测序及核酸的基因型分析等领域。荧光微球可通过三个途径实现：[1]. 通过荧光染料与微球表面功能基团的共价结合使微球表面带有一种或几种荧光物质，参见美国专利U.S.Pat.No.5194300；U.S.Pat.No.4774189；[2]. 在高分子微球共聚过程中

掺入一种或两种荧光物质，参见美国专利 U.S.Pat.No.5073498；U.S.Pat.No.4717655；[3]。微球形成后，通过物理吸附作用使微球标记荧光，参见美国专利 U.S.Pat.NO.5723218。通过前述方法可得到若干组分别具有不同荧光特征的荧光微球阵列，其中每一种微球都能以其特征荧光被流式细胞仪特异识别。根据待检靶分子的不同，利用微球表面的功能基团将抗原、抗体、酶作用底物、受体配基、寡核苷酸等进行固定化，将经过上述处理的微球与待检样品混合，使这些生物分子与样品中相应的靶物分子反应，通过一种荧光物质标记的报告分子与荧光微球-靶物复合物孵育，最后经流式细胞仪检测，可对每一种荧光微球上发生的不同生物学反应进行识别、分析，并给出检测结果，从而使荧光微球具有在同一试管中同步检测多种靶物质的特征。

现有荧光微球技术虽具有较多优点，但仍存在下述缺陷：由于要在同一个反应体系中完成对样品多种靶物质的检测，反应体系复杂，因此需要多步的清洗、离心或酶处理等纯化步骤，除去干扰反应的物质，如二抗、引物、酶等，使得检测步骤较为繁琐，检测周期较长；在多步的清洗、离心过程中，易造成荧光微球的丢失，影响实验或检测结果，甚至会导致实验的失败，在实际应用中只能通过增加微球的用量，使微球的用量远远超过实际检测需要量，以防止微球丢失对结果的影响，但这必然增加了检测成本。

磁性微球是二十世纪八十年代初发展起来的一种用于分离和纯化的新型功能材料，其采用材料复合技术，将有机单体或高分子材料与磁粒子  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  复合在一起，利用高分子直接包埋磁粒子或在磁流体存在下通过单体

的乳液聚合、悬浮聚合、分散聚合等高分子聚合形成磁性高分子微球，即磁性微球。将磁性微球与抗体或抗原用物理吸附、化学偶联等方法形成免疫磁性微球，可广泛用于各种可溶性抗原的检测、分离与纯化、细胞标记与识别、核酸的分离、PCR 检测等。但该技术的缺点是：检测通量不高。

本发明的目的在于避免上述现有技术中的不足之处，而提供一种检测通量大、灵敏度高、特异性强、检测步骤较为简便、检测周期短、检测结果准确、检测成本低的磁性荧光微球的制备方法及其采用其进行生物分子检测的方法。

本发明的目的可通过以下措施来达到：

- 1]. 合成不同组具有特征荧光的磁性荧光高分子微球；
- 2]. 在不同组微球表面固定相应所需的抗体、寡核苷酸等生物分子；
- 3]. 将固定后的微球与待检生物样品反应后，加入荧光标记的报告基团，孵育；
- 4]. 用流式细胞计数器对微球表面发生的反应进行定性或定量分析。

一种磁性荧光微球，其特殊之处在于：它是包括磁性纳米粒子和高分子微球构成的磁性高分子微球及荧光分子的直径为  $0.7\sim 30\mu\text{m}$  的磁性荧光高分子微球，所述的磁性纳米粒子占磁性荧光高分子微球总重量的  $10\sim 50\%$ ，荧光分子占磁性荧光高分子微球总重量的  $0.01\sim 20\%$ 。

上述磁性纳米粒子通过荧光染料共聚在分子微球内部掺入荧光分子，或通过吸附或化学键合在微球表面标记荧光分子即构成磁性荧光高分子微球。

上述磁性纳米粒子的粒径以  $5\sim 12\text{nm}$  为佳。

上述磁性高分子微球可以是粒径为  $0.7\sim 2\mu\text{m}$ 、磁含量为磁性高分子微

球总重量 10~20%的磁性高分子种子微球。

一种如上所述磁性荧光微球的制备方法，其特殊之处在于：该方法的制备包括

- 1]. 用三价铁和二价过渡金属盐混合水溶液通过化学共沉淀法制备具有超顺磁性的金属氧化物磁性纳米粒子；
- 2]. 采用高分子聚合法制备高分子微球；
- 3]. 标记荧光染料；
- 4]. 最后，得到磁性荧光高分子微球。

上述制备磁性纳米粒子的二价过渡金属盐可为 Fe(II)、Mn(II)、Ni(II)、Zn(II)或 Cu(II) 金属盐等。

上述超顺磁性金属氧化物磁性纳米粒子的制备可加入表面活性剂，形成表面具有疏水性的磁性纳米粒子。

上述磁性高分子微球可以是粒径为 0.7~2 $\mu$ m 的磁性高分子种子微球，该磁性高分子种子微球的制备方法可采用微悬浮聚合法，其包括：

- 1]. 用分散剂对制备得到的磁性纳米粒子进行表面处理，使其具有疏水性，并分散到溶有单体分子的有机相中，然后将引发剂和交联剂溶入体系中；
- 2]. 将上述磁性纳米粒子、单体、引发剂、交联剂等混合物加入含有悬浮剂的水中，借助搅拌作用经高速剪切乳化，形成稳定的悬浮液；
- 3]. 升温，引发聚合，制备出粒径为 0.7~2 $\mu$ m、磁含量为 10~20%的磁性高分子种子微球。

上述分散剂可采用聚乙二醇；所述的引发剂可采用过氧化苯甲酰（BPO）或十二烷酰过氧化物。

上述磁性高分子微球可采用悬浮聚合法的制备，其包括：

- 1]. 用长链脂肪酸对磁性纳米级粒子进行亲油化处理，使其表面形成

一层亲油层；将亲油化处理的磁性纳米级粒子与亲油性单体溶液混合，形成油相；

2]. 溶解至少一种表面活性剂于水溶液中形成水相、分散油相于水相中形成水包油型悬浮液；

3]. 热引发聚合反应，形成磁性高分子微球。

上述高分子微球可由有机单体分子聚合或共聚而成，所述的有机单体分子可采用苯乙烯、丙烯酸、丙烯晴、丙烯酰胺、丙烯醛、丁二烯、乙酸内酯、对苯二甲酸乙二醇酯、异戊二烯、二乙烯基苯或甲基丙烯酸甲酯等。

上述对磁性高分子微球标记染料可包括：对所述磁性种子高分子微球进行二次溶胀时，在溶胀剂中掺入两种不同的荧光染料及功能性的共聚单体，使荧光物质通过共聚掺入磁性微球，制备出磁性荧光微球。

上述对磁性高分子微球标记荧光染料的方法可包括：

1]. 首先制备活性溶胀乳剂，对粒径为  $0.7\sim 2\mu\text{m}$  的磁性种子微球进行第一次溶胀，形成活性溶胀后的种子乳胶液，然后加入稳定剂；稳定剂以采用碱性金属卤化物溶于溶胀用乳化剂的水性溶液为宜，浓度可为  $0.001\sim 0.1\text{M}$ ；碱性金属卤化物可以是钾或铯的氯化物、溴化物、碘化物等，以氯化钾为最佳；

2]. 在含有两种不同比例疏水荧光染料、反应单体和引发剂以及表面活性剂、等成分存在的条件下，加入上述种子乳胶液进行二次溶胀，使单体和引发剂等渗透至种子乳胶颗粒中，得到含荧光染料的溶胀颗粒混合物；最后升温，引发共聚得到粒径均匀分布的磁性荧光微球；所述的两种荧光染料是具有重叠的激发波长、具有不同的发射波长、既可被同一波长的激光所激发、又能分别被流式细胞仪识别的荧光染料。

上述对磁性高分子微球标记荧光染料可通过物理吸附法制备磁性荧光微球，将磁性高分子微球加入含有两种荧光染料的氯仿溶液，在 25-55℃ 下搅拌 2-5 小时，直至磁球吸附荧光染料达到饱和为止，抽真空除去有荧光染料溶液，产物用磷酸盐缓冲液稀释、储存。

上述对磁性高分子微球标记荧光染料可包括：用微乳液聚合法制备纳米级的非磁性高分子微球（5-100nm），使两组纳米级微球表面分别吸附两种不同的荧光染料，再将带有荧光染料的纳米微球通过共价结合偶联在制得的磁性微米级微球表面，调节微米级磁性微球表面的两种吸附不同荧光物质的纳米微球的比例，以调节磁性微球的荧光特征；所述的两种荧光染料是具有重叠的激发波长、具有不同的发射波长、既可被同一波长的激光所激发、又能分别被流式细胞仪识别的荧光染料。

上述对磁性高分子微球标记荧光染料可包括：在荧光磁性微球表面具有通过单体共聚形成的带有功能基团的高分子壳层。

一种采用上述磁性荧光微球进行生物分子检测的方法，其特殊之处在于：该方法的检测步骤包括：

1]. 在磁性荧光微球表面偶联生物活性物质

磁性荧光微球通过其表面的功能基团将多种生物活性物质以共价键偶联在其表面；

2]. 通过磁性荧光微球表面偶联的生物活性物质，将待检样品中相应的分子捕获至微球表面进行反应，使微球成为生物学反应的固相载体；

3]. 通过磁分离器进行磁性分离，对捕获至微球表面的反应物进行富集、分离和纯化；

4]. 通过流式细胞仪识别具有不同荧光特征微球，对每种微球表面所发生的生物学反应进行区分；通过对待检分子或能与待检分子特异结合的分子上标记的第三种荧光物质的检测，得到对待检样品定性及定量的分

析检测结果。

上述在磁性荧光微球表面偶联的生物活性物质可为抗体，其偶联的方法是将表面带羧基的磁性荧光微球 30mg 与碳二亚胺（EDC）溶液混和后，加入 1.5mg 抗体，在室温下搅拌 24 小时，加入牛血清白蛋白 30mg/ml，孵育 4 小时终止反应；磁性分离，弃上清，用 PH7.4 的 PBS 洗一次，重新悬浮于 PBS 中保存。

上述在磁性荧光微球表面偶联生物活性物质可以是寡核苷酸探针，其步骤是用碳二亚胺作为偶联剂，加入 1.5mg 寡核苷酸探针，在室温下搅拌 24 小时，加入牛血清白蛋白 30mg/ml，孵育 4 小时终止反应；磁性分离，弃上清，用 PH7.4 的 PBS 洗一次，重新悬浮于 PBS 中保存。

上述生物活性物质可为抗原-抗体，其检测方法是将待检样品与包被特异抗原的磁性荧光微球混合，避光作用 10 分钟，将相应待检抗体捕获至微球表面；用磁性分离器分离，将微球-抗原-抗体复合物纯化、富集；在上述复合物中加入 FITC 标记的二抗，避光作用 10 分钟，用流式细胞仪检测。

本发明与现有荧光微球技术相比具有如下优点：

本发明将具有超顺磁性的纳米粒子引入荧光高分子微球，制备出若干组具有不同荧光特征同时又具备良好磁响应性的磁性荧光高分子微球阵列，简称磁性荧光微球，以其作为生物活性物质和生物学反应的固相载体，能够对待检样品进行多重、定性、定量分析，且自动化程度高。由于微球具备超顺磁性，因而不需经离心及其它纯化步骤，只需通过一步简单的磁性分离，就可对捕获至微球表面的反应物进行富集、分离和纯化，从而提高检测的灵敏度和特异性，同时缩短了检测时间；此外磁性分离还可以避免微球的丢失，节省微球的用量，降低该技术的检测成本。本发明可广泛用于免疫学检测、基因诊断、SNP 基因分型及生物大分子相互作用的研究

等。

下面将结合具体实施例对本发明作进一步详述：

本发明磁性荧光微球的制备方法分为三个步骤：

步骤 1：制备具有超顺磁性的磁性纳米级粒子

磁性纳米级粒子可采用化学共沉淀法制备。该方法用  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  在碱性条件下反应得到  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  晶体沉淀。采用其它二价过渡金属盐，如  $\text{Mn(II)}$ 、 $\text{Ni(II)}$ 、 $\text{Zn(II)}$ 、 $\text{Cu(II)}$  等亦可替代  $\text{Fe(II)}$  用于磁性纳米级粒子的制备。若要使磁性纳米级粒子分散得较好，可在介质中加入表面活性剂或改变水溶液的 pH 值。磁性纳米粒子的粒径以小于 30nm 为宜，以在 5~12nm 之间最佳。

步骤 2：制备磁性高分子微球

方法 1：采用微悬浮聚合法制备磁性高分子种子微球

(1). 用分散剂对步骤 1 得到的磁性纳米粒子进行疏水表面处理后使其具有疏水性，并分散到溶有单体的有机相中，然后将引发剂和交联剂溶入体系中；

(2). 将上述磁性纳米粒子-单体等混合物加入含有悬浮剂的水中，借助搅拌作用经过高速剪切乳化，形成稳定的悬浮液；

(3). 升温，引发聚合，制备出粒径为 0.7~2 $\mu\text{m}$ ，磁含量为 10~20% 的磁性高分子微球。由于该种磁性高分子微球粒径较小，故又称磁性高分子种子微球。

本发明的分散剂可采用聚乙二醇 (PEG)；引发剂可采用过氧化苯甲酰 (BPO)、十二烷酰过氧化物 (LPO) 等。

方法 2：采用悬浮聚合制备磁性高分子微球

(1). 用长链脂肪酸对磁性纳米级粒子进行亲油化处理，使其表面形成一层亲油层；将亲油化处理的磁性纳米级粒子与亲油性单体溶液混合，以形成油相；

(2). 溶解至少一种表面活性剂于水溶液中形成水相、分散油相于水相中形成水包油型悬浮液；

(3). 热引发聚合反应，形成磁性高分子微球。具体可参见中国专利 CN1253147A；专利申请号 98124516.1。

适用于本发明的有机单体：如苯乙烯、丙烯酸、丙烯晴、丙烯酰胺、丙烯醛、丁二烯、乙酸内酯、对苯二甲酸乙二醇酯、异戊二烯、二乙烯基苯、甲基丙烯酸甲酯等。为得到表面含有功能基团如-COOH、-NH<sub>2</sub>、-OH、-CHO、-SO<sub>3</sub>H 等的高分子微球，可采用带有功能基团的两种或两种以上有机单体共聚，如丙烯酸与苯乙烯或甲基丙烯酸甲酯与甲基丙烯酸共聚得到表面具有含羧基的微球；用甲基丙烯酸羟乙酯 HEMA 及丙烯醛分别与苯乙烯共聚得到含羟基-OH 和醛基-CHO 的微球。

### 步骤 3：对磁性高分子微球标记荧光染料

方法 1：对步骤 2-方法 1 中得到的磁性种子高分子微球进行二次溶胀，同时在溶胀剂中掺入两种不同的荧光染料及功能性的共聚单体，使荧光物质通过共聚掺入磁性微球内部，制备出磁性荧光微球。具体步骤如下

(1). 首先用 1-氯十二烷作为一次溶胀剂，对粒径为 2 $\mu$ m 的磁性种子微球进行第一次溶胀，形成活性溶胀后的种子乳胶液，然后加入稳定剂以使种子微球在溶胀和聚合过程中保持稳定。其它可选择的一次溶胀剂包括：1-氯壬烷乳、1-溴十二烷、十六烷醇等。

(2). 在含有两种不同比例疏水荧光染料、有机单体和引发剂以及表面活性剂等成分存在的条件下，加入上述种子微球进行二次溶胀，使单体和引发剂等渗透至种子微球中，得到含荧光染料的溶胀颗粒混合物；最后升温，引发共聚。得到粒径均匀分布的磁性荧光微球。

通过改变两种荧光染料的比例，可得到具有不同荧光特征微球。具

有相同荧光特征的微球构成一组，具有不同荧光特征的微球可构成多组，每组微球可分别包被不同的生物分子。多组微球可满足同步检测不同靶分子的需求。

方法 2：通过物理吸附法制备磁性荧光微球：将磁性高分子微球加入含有两种不同比例荧光染料的有机溶剂中，在 25~55℃ 下搅拌 2-5 小时，直到磁球吸附荧光染料达到饱和为止，用磁式分离器对反应后的混合物进行分离，除去反应中多余的荧光染料和其它有机溶剂，然后将磁性荧光微球用磷酸盐缓冲液清洗并稀释储存于 4℃ 冰箱中。

方法 3：用微乳液聚合法制备纳米级高分子微球（5~100nm），使两组纳米级微球表面分别吸附两种不同的荧光染料，再将带有荧光染料的纳米微球通过共价结合偶联在磁性高分子微球表面，通过调节微米级磁性微球表面的两种吸附不同荧光物质的纳米微球的比例可达到精确调节磁性微球的荧光特征的目的。为防止纳米荧光微球从磁性高分子微球表面脱落，可通过单体共聚在荧光磁性微球表面形成带有功能基团的高分子壳层。

本发明荧光染料的选择：选择油溶性的荧光染料，制备多种具有不同荧光特征的磁性荧光微球阵列，可选用两种荧光染料按不同的比例掺入。这两种荧光染料以具有重叠的激发波长，而具有不同的发射波长为佳，不同的发射波长相差至少大于 10nm，以大于 50nm 最佳，从而使两种荧光物质既可被同一波长的激光光源所激发，而在不同的发射波长处分别测定各自的荧光强度并通过两个强度的比例确认荧光微球。如红色荧光物质 7-Aminoactinomycin D（ $Ex=546$ ， $Em=647nm$ ）和桔黄色荧光物质 PO-PRO™-3 iodide（ $Ex=539$ ， $Em=567nm$ ）。

采用磁性荧光微球进行生物分子检测的方法

步骤 1：磁性荧光微球表面偶联生物活性物质（生物活性分子）

根据检测需要，磁性荧光微球可通过其表面的功能基团将多种生物活

性物质以共价键偶联在其表面，这些生物活性物质包括：抗原、抗体、激素受体、酶、核酸、寡核苷酸、半抗原等。

#### 步骤 2：用磁性荧光微球进行生物学检测

磁性荧光微球表面偶联的生物活性物质，可与待检样品中相应的分子发生反应，使微球成为生物学反应的固相载体；因微球具备超顺磁性，无需离心及其它的纯化步骤，而只通过磁分离器进行一步简单的磁性分离，就可对捕获至微球表面的反应物进行富集、分离和纯化，不但提高了检测的灵敏度和特异性，同时缩短了检测时间；由于磁性微球中按不同的比例掺入两种荧光物质可得到若干组具有不同荧光特征微球阵列，每种微球均可通过自身标记的特征性荧光被流式细胞仪识别，因此流式细胞仪就能对每种微球表面所发生的生物学反应进行区分，这就使得在一个试管或反应孔中使用多组磁性荧光微球对同一样品进行多重分析成为可能；普通的流式细胞仪每秒钟可对 5,000 个微球上的荧光信号进行分析并给出数据，因此通过对待检分子或其它能与待检分子特异结合的分子上标记的第三种荧光物质，如 FITC、PE 等信号强度的检测，可得到对待检样品定性及定量的分析检测结果。

本发明磁性荧光微球制备方法的具体实例：

制备方法实施例一：

#### 步骤 1：化学共沉淀法制备磁性纳米粒子

将 0.5mol/l 的  $Fe^{2+}$  溶液和 0.5mol/l 的  $Fe^{3+}$  液，按 1:2 体积比取样加入到三口烧瓶中，搅拌均匀后，加入适量分散剂聚乙二醇，升温到 70℃，缓慢滴加浓氨水，搅拌，反应 30 分钟，制备出粒径为 20nm 左右的  $Fe_3O_4$  粒子。反应产物经磁性分离后，用蒸馏水反复洗涤至中性，以悬液状态保存。（现有技术）

#### 步骤 2：悬浮聚合法合成聚苯乙烯磁性种子微球

用聚乙二醇分散剂将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  进行表面处理后分散到苯乙烯中，加入引发剂十二烷酰过氧化物 (LPO) 和交联剂二乙烯苯 (DVB)，然后将上述混合液分散在水中，经过高速剪切乳化，形成稳定的悬浮液，倒入装有搅拌器、温度计、回流冷凝管和氮气氛导管的 250ml 四口烧瓶中，将烧瓶移入恒温水槽中进行微乳聚合，聚合温度为  $80^\circ\text{C}$ ，聚合时间为 2.0h。聚合反应结束后。加入 SDS 作为分散剂，然后将滤液经过磁分离后即可得到粒径约  $2\mu\text{m}$  的聚苯乙烯种子磁球。

### 步骤 3：制备带羧基的聚（苯乙烯-丙烯酸甲酯）磁性荧光微球

2ml 1-氯十二烷 (CDD) 与 0.25% 的 SDS 5ml 水溶液混匀作为一次溶胀剂，将 10ml 10% 磁性聚苯乙烯种子微球与 0.25% 50ml SDS 溶液中混匀后，加入已配制好的一次溶胀剂，同时加入 20ml 的 30% 丙酮溶液使 CDD 更容易渗入微球，搅拌 12 小时；取 2ml 上述悬浮液加入 20ml 蒸馏水和 40ml 0.25% SDS，磁性分离，得到一次溶胀的种子微球。400mg 4% 过氧化苯甲酰引发剂溶入 10ml 含苯乙烯 (90%) 和丙烯酸甲酯 (10%) 溶液中，再加入等体积 0.25% SDS，混匀，再按不同比例加入荧光染料 7-氨基放线菌素 D (7-Aminoactinomycin D) 和 PO-PRO™-3 iodide 制成单体-引发剂-荧光染料的均质混合溶液，然后取 20ml 上述混和溶液加入上述经一次溶胀后的种子微球，通入氮气保护，加热  $70^\circ\text{C}$ ，2 小时引发溶胀种子的快速聚合。得到粒径 5— $6\mu\text{m}$  的磁性荧光微球。

制备方法实施例二：

步骤 1：制备磁性纳米粒子，同实施例一的步骤 1。

步骤 2：制备带羧基的磁性聚苯乙烯微球。

将上述  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子 35g 加入苯乙烯 50g、甲基丙烯酸 (MAA) 5g、

二乙烯苯 10g、过氧化苯甲酰 (BPO) 5g 组成的有机相中, 略经搅拌即可形成稳定分散的油相磁性胶体溶液; 在 1 升圆柱形搅拌式反应器中加入 500ml 蒸馏水和 10g 聚乙烯醇, 50℃恒温搅拌 0.5 小时后引入上述油相磁性胶体, 调节搅拌速度至 800rpm, 升温到 80℃反应 6 小时, 再升温到 95℃熟化 4 小时; 冷却后, 经磁性分离、洗涤等工序, 即可得到粒径在 5-15 $\mu\text{m}$  带羧基的磁性聚苯乙烯微球。

### 步骤 3: 通过物理吸附法制备磁性荧光微球

将磁性高分子微球加入含有两种荧光物质的二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 此吸附液中一般荧光分子的浓度为 0.1~1wt%, 将 5~10ml 浓度是 0.5~2wt%磁性微球稀释液加入 0.5ml 荧光分子的 DMSO 中, 在 25-55℃下搅拌 2-5 小时, 直到磁球吸附荧光染料达到饱和为止, 磁性分离出去多余的荧光染料溶液, 产物用磷酸盐缓冲液清洗后稀释、储存。

### 制备方法实施例三:

步骤 1: 制备磁性纳米粒子 同实施例一——步骤 1;

步骤 2: 制备表面带羧基的磁性聚苯乙烯微球 同实施例二——步骤 2;

步骤 3: 制备表面带胺基的纳米级荧光微球

先将少量约 1/3 的苯乙烯等单体、乳化剂 SDS、助乳化剂 1-戊醇、去离子水配成均相微乳液; 将该微乳液搅拌并升温至 25~80℃, 向上述反应体系通氮气 5~10 分钟后, 加入引发剂过硫酸钾 (KPS) 形成反应体系; 同时将剩余单体、含胺基的功能单体甲基丙烯酸胺乙酯 (AEM)、交联剂二乙烯苯 (DVB), 逐滴加入反应体系, 维持 1~6 小时滴完, 伴以 400~650 转/分速度搅拌; 滴加完毕继续反应 0.5~3.5 小时, 即可得到表面带胺基的纳米微球。反应体系中, 乳化剂浓度为 2~40wt%, 单体浓度为 1~50wt%,

功能单体浓度为 0.2~20wt%，引发剂浓度为 0.5~10mM。纳米微球吸附荧光分子的方法同例 2. (3)。

#### 步骤 4：制备磁性荧光微球

表面带羧基的磁性荧光微球 30mg 与碳二亚胺 (EDC) 溶液混和后，加入按一定比例混合的两组表面分别吸附两种不同荧光染料的面带氨基的纳米微球共 3.0mg，在室温下搅拌 24 小时。磁性分离，弃上清。用 PH7.4 的 PBS 洗一次，磁性分离，弃上清。即得到偶联纳米荧光微球的磁性微球。

在上述产物中加入苯乙烯 50g、甲基丙烯酸(MAA)5g、二乙烯苯(DVB) 10g 组成的有机相中作用 1 小时后，将其引入盛有 500ml 蒸馏水圆柱形搅拌式反应器中，加入过硫酸钾 5g，调节搅拌速度至 800rpm 升温至 95℃，升温到 80℃反应 2 小时，再升温到 95℃熟化 2 小时，即可在偶联纳米荧光微球的磁性微球表面形成带有功能基团的高分子壳层。冷却后，经磁性分离、洗涤、等工序，即可得到带羧基的磁性荧光聚苯乙烯微球。

#### 生物分子检测实施例一：磁性荧光微球表面偶联抗体

表面带羧基的磁性荧光微球 30mg 与碳二亚胺 (EDC) 溶液混和后，调节溶液的 pH 为 4.5 左右，加入 1.5mg 抗体，在室温下反应 1~2 小时，加入牛血清白蛋白 (30mg/ml)，孵育 4 小时终止反应。磁性分离，弃上清，用 pH7.4 的 PBS 洗一次，重新悬浮于 PBS 中保存。

#### 生物分子检测实施例二：含羧基的磁性荧光微球表面偶联寡核苷酸探针

仍采用碳二亚胺作为偶联剂，将例 4 中的抗体换为寡核苷酸探针，长度可在 5-500mer，最好为 20-30mer。

#### 生物分子检测实施例三：应用磁性荧光微球技术进行抗原-抗体的免疫学检测

待检样品与包被特异抗原的磁性荧光微球混合，避光作用 10 分钟，以

将相应待检抗体捕获至微球表面。磁性分离器分离，将微球-抗原-抗体复合物纯化、富集。在上述复合物中加入 FITC 标记的二抗，避光作用 10 分钟，流式细胞仪检测。

生物分子检测实施例四：应用磁性荧光微球技术进行 HLA-DNA 分型检测

将 HLA 等位基因序列特异性寡核苷酸探针（SSOP）分别与不同的微球偶联，制备带有不同分型探针的磁性荧光微球。

待检血样收集；DNA 抽提；HLA 特定亚型 DNA 片段扩增，在扩增体系中加入 FITC 标记的 ddNTP，使 PCR 扩增产物标记 FITC；将结合有 SSOP 分型探针的磁性荧光微球与 PCR 扩增产物混合避光孵育 1 小时；磁性分离器分离；流式细胞仪检测，软件分析结果。

本发明未作特殊限定的微球均指高分子微米级微球。

专利名称(译)	磁性荧光微球及其制备方法和采用该磁性荧光微球进行生物分子检测的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1475805A</a>	公开(公告)日	2004-02-18
申请号	CN02139365.6	申请日	2002-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	陕西西大北美基因股份有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 陈超 王琼		
发明人	崔亚丽 陈超 王琼		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/58		
其他公开文献	CN100442052C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种磁性荧光微球及其制备方法和采用该磁性荧光微球进行生物分子检测的方法。本发明是在合成高分子微球时引入磁性纳米粒子制备出磁性微球，在其中掺入荧光染料，使微球具有特征荧光，并能被流式细胞计数器识别分析。磁性荧光微球表面可结合各种生物分子，这些生物分子与样品中相应的靶物分子反应，以荧光标记的测定底物等作为检测生物学反应的报告基团，通过荧光信号的测定值对靶物分子进行定性和定量分析。应用磁性荧光微球进行生物大分子检测，既能对反应物进行快速分离和纯化，又能在一个反应管、孔内对待检样品的多个靶分子同时进行检测，可广泛应用于免疫学检测、核酸杂交、基因型分析等领域。