(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102604305 A
(43)申请公布日 2012.07.25

(21)申请号 201210039875.3

(22)申请日 2012.02.21

(71)申请人 苏州纳诺康生物技术有限公司
地址 215200 江苏省苏州市吴江市经济技术开发区科技创业园A6楼

(72)发明人 李超 张鹏 夏志道

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有限公司 32103
代理人 孙仿卫 汪青

(51)Int.Cl.
C08L 51/00(2006.01)
C08K 5/18(2006.01)
C09K 11/06(2006.01)
C08F 265/06(2006.01)
C08F 2/22(2006.01)
B01J 13/14(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 21/64(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54)发明名称

一种纳米荧光微球，其制备方法及其用作免疫层析方法的标记物的用途

(57)摘要

本发明公开了一种纳米荧光微球及其制备方法和用途，纳米荧光微球具有核壳结构，粒径为200~500nm，其内核为包含有荧光分子的聚合物微球，外壳具有修饰在所述聚合物微球外表面上的一种或多种官能团，聚合物微球为聚甲基丙烯酸甲酯的微球或甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物的微球或者它们的混合物，其中甲基丙烯酸甲酯单元的重量至少占所述纳米荧光微球总重量的50%，荧光分子的重量占所占纳米荧光微球总重量的0.05%~5%。本发明纳米荧光微球粒径稳定、光谱适用于可见发射光，采用该纳米荧光微球作为标记物的免疫层析方法，简便快速、灵敏度高且可进行定量检测。

CN 102604305 A

1. 一种纳米荧光微球，具有核壳结构，其特征在于：所述的纳米荧光微球的粒径为200~500nm，其内核为包含有荧光分子的聚合物微球，外壳具有修饰在所述聚合物微球外表面上的一种或多种官能团，该所述官能团能够直接与配体或生物大分子反应形成微球表面的共价键连接，或在激活后与配体或者生物大分子进行共价标记；所述的聚合物微球为聚甲基丙烯酸甲酯的微球或甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物的微球或者它们的混合物，其中甲基丙烯酸甲酯单元的重量至少占所述纳米荧光微球总重量的50%，所述的荧光分子的重量占所占纳米荧光微球总重量的0.05%~5%。

2. 根据权利要求1所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物中，甲基丙烯酸甲酯与所述其它单体的结构单元数均大于等于50。

3. 根据权利要求2所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述的其它单体为选自氟乙烯、氯乙烯、溴乙烯、乙烯碘化、苯乙烯以及丙烯酸中的一种或多种。

4. 根据权利要求1所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述的官能团为选自羧基，乙醇胺基，羟基，胺基，氨基，亚胺基，环氧基，异氰酸酯基，金属醇盐及聚乙二醇基中的一种。

5. 根据权利要求1至4中任一项权利要求所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述荧光分子为罗丹明、荧光素及其衍生物、肾上腺素染料及氟硼莹中的一种或多种。

6. 根据权利要求5所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述的荧光分子的重量优选为所述纳米荧光微球总重量的0.2%~5%。

7. 根据权利要求1所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述纳米荧光微球的粒径为350~400nm。

8. 根据权利要求1所述的纳米荧光微球，其特征在于：所述纳米荧光微球还包含一种或者一种以上的通过所述官能团共价连接而覆盖在所述微球表面的生物活性物种，该所述的生物活性物种选自抗体、抗原、核酸、配体、受体、人工多肽、蛋白质以及多糖中的一种，所述的生物活性物种能够参与特异性识别和结合反应。

9. 一种如权利要求1所述的纳米荧光微球的方法，其特征在于：包括如下步骤：

(1)、以所述聚合物的微粒和含有所述官能团的烯烃单体为原料，通过微乳液聚合法制备得到外表面上具有所述官能团的聚合物微球；

(2)、向步骤(1)所得外表面上具有所述官能团的聚合物微球中缓慢注入含有所述荧光分子的有机溶剂和水，聚合物微球发生溶胀，荧光分子进入聚合物微球内，然后离心，除去上清液，清洗，加水悬浮，即得所述纳米荧光微球，其中所述有机溶剂为丙酮或二氯甲烷。

10. 权利要求1至8中任一项权利要求所述的纳米荧光微球用作免疫层析方法的标记物的用途。

一种纳米荧光微球，其制备方法及其用作免疫层析方法的标记物的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种适用作免疫层析的标记物的纳米荧光微球及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 在生物和医学检测中，经常用到免疫分析法，它包括放射免疫分析、酶联免疫分析及免疫层析等方法。放射免疫分析和酶联免疫分析法需要昂贵的设备、专业的操作人员和复杂的操作步骤，难以快速得到检测结果。免疫层析法因具有操作简单、快速及成本底等特点，而常用于快速定性或半定量检测。

[0003] 免疫层析技术是出现于 80 年代初期的一种独特的免疫分析方式，它通常以条状纤维层析材料为固相，通过毛细作用使样品溶液在层析条上泳动，并同时使样品中的待测物与层析材料上针对待测物受体（如抗体或抗原）发生高特异、高亲和性的免疫反应。免疫层析技术常见的示踪粒子有胶体金、乳胶、胶体硒、明胶等，其中运用最成功的标记物为胶体金，例如已出现检测盐酸克伦特罗、乙肝表面抗原、黄曲霉毒素和促黄体激素等的胶体金试纸条。

[0004] 然而胶体金免疫层析技术检测灵敏度较低，在实际检测中只能对检测物进行定性或半定量，无法准确定量。目前，已有相关专利报道了以荧光纳米微粒为标记物进行免疫层析检测，如公开号为 CN1645146A 的专利公开了一种用荧光稀土纳米颗粒作为标记物的免疫层析方法及其检测试纸条的制备；公开号为 CN1866012A 的专利公开了一种定量、快速的免疫检测方法及其专用装置，该方法将荧光物质螯合物 Eu^{3+}、$SrTi^{3+}$、Tb^{3+}、Dy^{3+} 与有机高分子纳米微粒结合，制备成荧光微粒，通过荧光检测来进行定量，但是这些纳米荧光微球都是在紫外光源下激发，紫外光源的设置增加了检测仪器的成本。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种粒径稳定、光谱适用于可见发射光的纳米荧光微球，采用该纳米荧光微球作为标记物的免疫层析方法，简便快速、灵敏度高且可进行定量检测。

[0006] 本发明同时还要提供一种纳米荧光微球的制备方法，该方法可获得粒径稳定、光谱适用于可见发射光的纳米荧光微球，并且该方法简单。

[0007] 为解决上述技术问题，本发明采用的一种技术方案是：

一种纳米荧光微球，具有核壳结构，该纳米荧光微球的粒径为 200~500nm，其内核为包含有荧光分子的聚合物微球，外壳具有修饰在所述聚合物微球外表面上的一种或多种官能团，该所述官能团能够直接与配体或生物大分子反应形成微球表面的共价键连接，或在激活后与配体或者生物大分子进行共价标记；所述的聚合物微球为聚甲基丙烯酸甲酯的微球或甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物的微球或者它们的混合物，其中甲基丙烯酸甲酯单元的重量至少占所述纳米荧光微球总重量的 50%，所述的荧光分子的重量占所占

纳米荧光微球总重量的 0.05%~5%。

[0008] 根据本发明，所述甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物中，甲基丙烯酸甲酯与所述其它单体的结构单元数均大于等于 50。所述的其它单体为包括但不限于氟乙烯、氯乙烯、溴乙烯、乙烯碘化、苯乙烯以及丙烯酸等。

[0009] 根据本发明，所述的官能团可以为选自羧基，乙醇胺基，羟基，胺基，氨基，亚胺基，环氧基，异氰酸酯基，金属醇盐，及聚乙二醇基中的一种，其中优选为羧基。

[0010] 根据本发明，所述荧光分子指在适当的激发波长下可发射荧光的物质。本发明中，荧光分子优选为荧光素及其衍生物、罗丹明、肾上腺素染料、氟硼莹等。其中，更优选采用罗丹明例如罗丹明 Red-X 和罗丹明 6G 等作为荧光分子。荧光分子的重量优选为所述纳米荧光微球总重量的 0.2%~5%。

[0011] 优选地，本发明的纳米荧光微球的粒径为 350~400nm，更优选为 370~390nm。

[0012] 根据本发明，纳米荧光微球还可进一步包含一种或者一种以上的通过所述官能团共价连接而覆盖在所述微球表面的生物活性物种，从而成为具有生物活性的荧光微球。选择的生物活性物种可以参与特异性识别反应，包括特异性结合、核酸杂交和酶反应。生物活性物种可通过一个具有明显亲水性的间隔区域来实现共价标记。这种间隔区域可以是诸如乙烯乙二醇低聚物的小分子间隔区域，也可以是诸如肽、蛋白质、聚乙二醇、和多糖的大分子实体。微球表面和生物活性种的结合包括氨基键结合，酯键结合，C-C 键结合，C-N 键结合和包含电荷相互作用的结合。生物活性的例子包括：包含在特定的识别和结合中的分子实体，诸如抗体、抗原、核酸、配体、受体、人工多肽、蛋白质等。该生物活性物种一般都可以采用多种众所周知的技术中的任何一种附着在在表面具有官能团的聚合物微球上。例如，可以使用羧基、氨基、醛基、硫醛基、环氧基和其它活性或者键和功能基、以及剩余的自由基和阳离子自由基将生物活性物种共价附着在微球上，同时也实现了蛋白的耦联反应。一个表面官能团可以作为官能共聚单体的一个组合，因为微球表面可以包含表面浓度相对较高的极性基。此外该发明制备的微球也可以直接共价键连接蛋白质，而不需要进一步的修改，例如用碳化二亚胺激活微球表面的羧基，而被激活的羧基与抗体的氨基反应形成酰胺键。激活和抗体耦联可以发生在诸如磷酸（盐）缓冲液，或者 2-（N- 吗啉）乙烷磺酸的缓冲液中，由此可以形成微球结合物。

[0013] 本发明采取的又一技术方案是：一种上述的纳米荧光微球的方法，其包括如下步骤：

（1）、以所述聚合物的微粒和含有所述官能团的烯烃单体为原料，通过微乳液聚合法制备得到外表面上具有所述官能团的聚合物微球；

（2）、向步骤（1）所得外表面上具有所述官能团的聚合物微球中缓慢注入含有所述荧光分子的有机溶剂和水，聚合物微球发生溶胀，荧光分子进入聚合物微球内，然后离心，除去上清液，清洗，加水悬浮，即得所述纳米荧光微球，其中有机溶剂为丙酮或二氯甲烷。

[0014] 根据本发明，步骤（1）可采用常规的微乳液聚合法来实现，最后获得的聚合物微球为聚合物、用于提供微球表面官能团的含有官能团的烯烃单体、表面活性剂、水以及有机溶剂的乳液，这些均为本领域所属技术人员所熟知。

[0015] 根据本发明，优选的是表面具有羧基的纳米荧光微球。在该情况下，用于提供微球表面官能团的含有官能团的烯烃单体可以为例如甲基丙烯酸。

[0016] 此外，本发明还特别涉及上述的纳米荧光微球用作免疫层析方法的标记物的用途。

[0017] 由于上述技术方案的采用，本发明与现有技术相比具有如下优点：

本发明纳米荧光微球采用基于甲基丙烯酸甲酯的聚合物作为封装基体，其使用寿命长，易于制造，制备稳定且具有良好的单分散性，可以很容易地用各种官能团和生物物种对微球的表面进行改性，每个微球上都能够被连接上大量的荧光分子，是非常好的荧光信号放大的载体，应用于免疫层析检测中，可以大大提高检测灵敏度，且纳米荧光微球非常稳定，受外界影响小，荧光稳定，这为通过荧光进行定量检测提供了良好的条件，因此，本发明纳米荧光微球是荧光检测技术中高灵敏度分析检测和定量测试中的理想标记。此外，本发明纳米荧光微球可用可见光光源激发以及通过简单的方法获得，降低检测分析成本。

[0018] 本发明的纳米荧光微球的方法简单，获得的纳米荧光微球中，荧光分子均匀地分布在聚合物微球中，微球粒径均匀、稳定，可用于制备精确定量免疫层析试纸条，适用于医疗诊断、生物检测、环境检测和食品安全监测以及不同物种的检测技术领域中。

附图说明

[0019] 下面结合附图和具体的实施例对本发明做进一步详细的说明。

[0020] 图 1 为实施例 1 制备的纳米荧光微球的发射和激发光谱图；

图 2 为实施例 1 制备的纳米荧光微球的扫描电镜图。

具体实施方式

[0021] 以下结合具体实施例对上述方案作进一步说明，应理解，这些实施例是用于说明本发明而不限于限制本发明的范围。实施例中所采用的实施条件可以根据具体厂家的条件做进一步调整，未注明的实施条件通常为常规实验中的条件。

[0022] 实施例 1 表面官能团为羧基的纳米荧光微球的制备

根据本实施例，纳米荧光微球的制备包括如下步骤：

(1)、制备表面具有羧基的聚甲基丙烯酸甲酯微球

取 Polysciences 公司产的聚甲基丙烯酸甲酯微粒(2.7%，0.324μm) 5ml，清洗离心后在 10ml 超纯水中悬浮超声，加入含 3mg 甲基丙烯酸单体(用于在微球表面形成羧基)的 1ml 水，混合两 min，加入含 15mg 聚乙烯醇的 0.5ml 水，搅拌 2min，然后加入含 8mg 十二烷基硫酸钠的 0.5ml 水，混合 2min，然后加入 5ml 乙醇，搅拌 5min，得到聚甲基丙烯酸甲酯微球。

[0023] (2)、制备纳米荧光微球

通过注射器向步骤(1)所得聚甲基丙烯酸甲酯微球中，缓慢加入含 1mg 罗丹明的 750μl 二氯甲烷，加入时间可以超过 5min，继续搅拌 5min。通过注射泵以 0.5ml/min 速度加入水 25ml，然后空气气流去除一些溶剂定容到 30ml。对微球进行离心去除上清液，用 90% 乙醇清洗三遍，清洗后的微球用 30ml 水悬浮，即得纳米荧光微球。

[0024] 实施例 2 纳米荧光微球的表征

取实施例 1 制备的 10μl 纳米荧光微球，悬浮在 750μl 水中进行检测，在 610nm 处收集微球的激光光谱，发射光谱在 580nm 处采集，谱图参见图 1。

对微球进行扫描电镜测试，谱图参见图 2，微球粒径在 370~390nm 之间，粒径均匀。

[0025] 实施例 3 纳米荧光微球适用于定量免疫层析检测试纸条的制备

可采用常规的免疫层析检测试纸条的制备方法来制备，具体包括如下步骤：

（1）、荧光微球垫的制备：用将标记待测物单抗的荧光微球按照 4 μL/cm 的量喷涂至玻璃纤维膜（30×0.8 cm）上，25℃真空干燥 1~2h，放于干燥环境备用。

[0026] （2）、硝酸纤维素膜（NC 膜）的制备：用 0.01 M pH 7.4 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 5% 蔗糖和 0.05% 吐温 -20）调节待测物抗体二抗（浓度为 0.4mg/mL），将所得溶液喷涂在 NC 膜上形成检测线；用 0.01M pH 7.2 PBS（磷酸盐缓冲液，其中包含 3% 蔗糖和 0.05% 吐温 -20）调节质控抗体的浓度为 0.5mg/mL，将所溶液喷涂在 NC 膜上形成质控区。质控区距离 NC 膜一端 2mm，37℃烘干过夜后，于室温干燥环境下保存备用。

[0027] （3）、荧光微球免疫层析检测卡的制备：组装试纸条：在 PVC 底板上依次搭接地粘贴：1）滤纸和样本垫，样本垫为一种经过 5%Tween-20 处理的玻璃纤维膜；2）喷涂有荧光微球标记的待测物单抗的荧光微球垫；3）喷涂有检测区和质控区的硝酸纤维素膜；4）吸水纸，组装完成后剪切成 4mm 的宽度，即成为免疫层析试纸条。

[0028] 把一张免疫层析试纸祭固定在塑料底卡上，试纸表面用面卡压紧，面卡在对应试纸条的样本垫和 NC 膜的部位分别预留加样孔和观察窗。免疫层析检测卡组装好后装入铝箔袋中，加入干燥剂后封口保存，于室温干燥环境下至少可以保存一年。

[0029] 实施例 4 样品的定量检测

在样品孔内加入检测血清，15min 后，采用激发光波长为 400~700nm 范围内（可见光）的免疫层析定量检测仪器扫描待待检区和质控区的荧光信号强度，从而得出待测物在血清中的含量，通过本发明的荧光微球，能够提高检测灵敏度，例如对于心衰指标的 PRO-BNP 的检测灵敏可达到 40PG/ML 的水平，优于同类产品（目前国内的同类检测基本只能够达到 100PG/ML）。

[0030] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点，其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施，并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

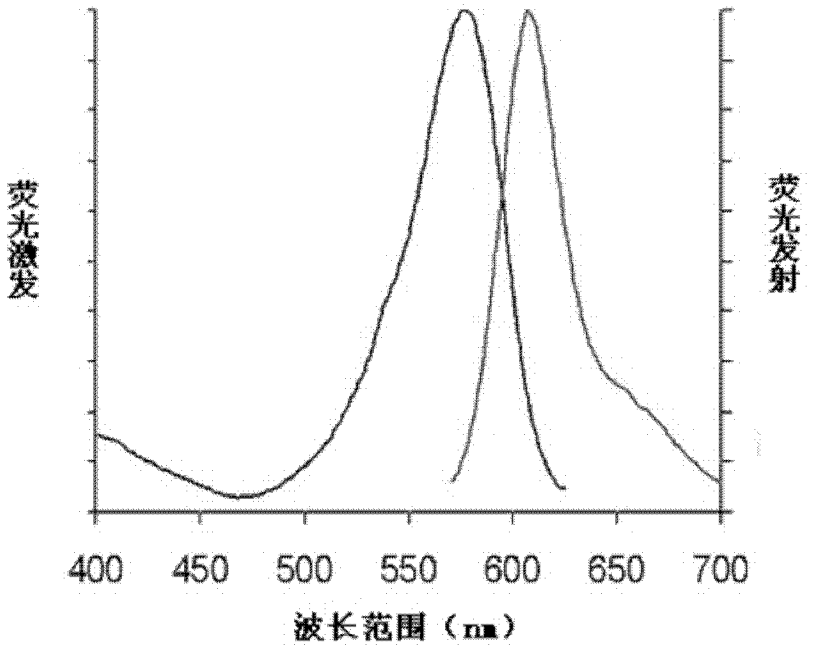

荧光激发
荧光发射
400
450
500
550
600
650
700
波长范围（nm）

图 1

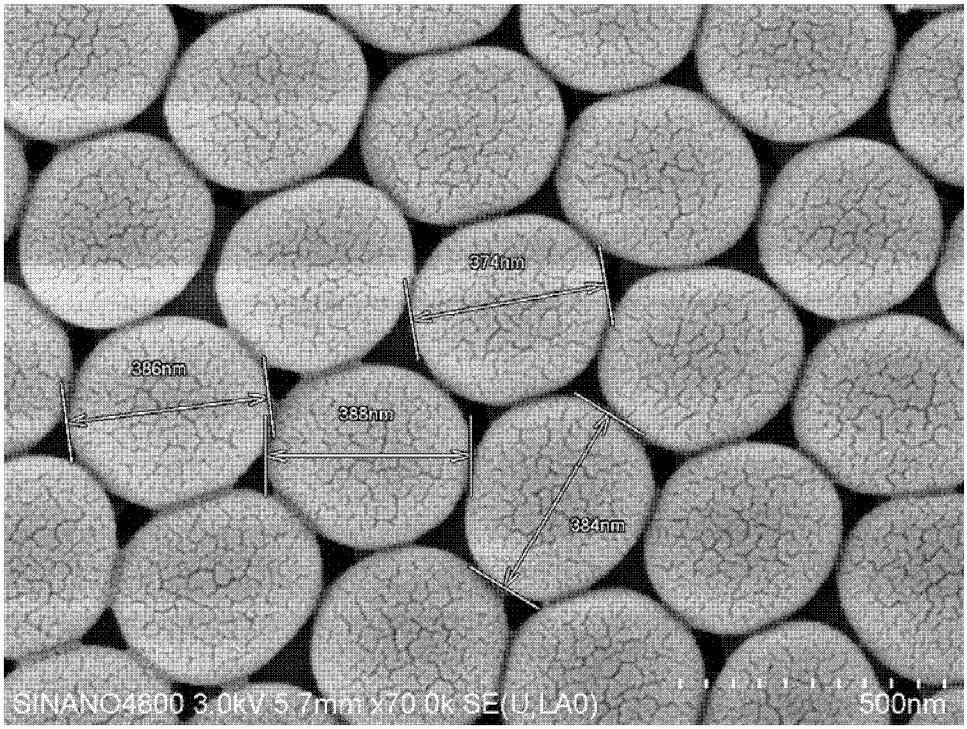
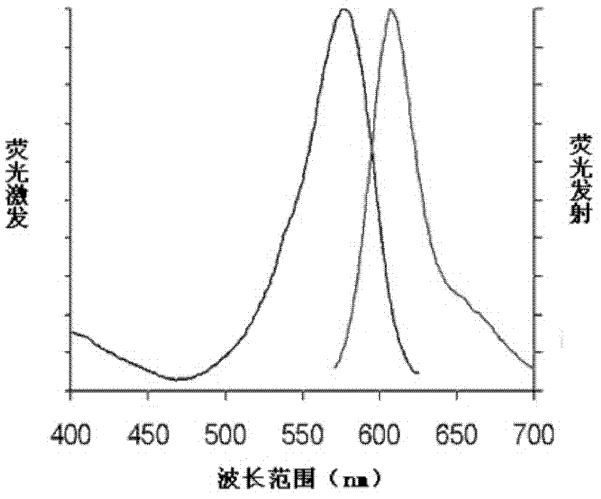

374nm
386nm
388nm
384nm
SiNANO4800 3.0kV 5.7mm X70.0k SE(U,LA0)
500nm

图 2

专利名称(译)	一种纳米荧光微球,其制备方法及其用作免疫层析方法的标记物的用途		
公开(公告)号	CN102604305A	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201210039875.3	申请日	2012-02-21
[标]申请(专利权)人(译)	苏州纳诺康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州纳诺康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州纳诺康生物技术有限公司		
[标]发明人	李超 张鹏 夏志道		
发明人	李超 张鹏 夏志道		
IPC分类号	C08L51/00 C08K5/18 C09K11/06 C08F265/06 C08F2/22 B01J13/14 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	汪青		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种纳米荧光微球及其制备方法和用途，纳米荧光微球具有核壳结构，粒径为 200~500nm ，其内核为包含有荧光分子的聚合物微球，外壳具有修饰在所述聚合物微球外表面上的一种或多种官能团，聚合物微球为聚甲基丙烯酸甲酯的微球或甲基丙烯酸甲酯与其它单体共聚形成的共聚物的微球或者它们的混合物，其中甲基丙烯酸甲酯单元的重量至少占所述纳米荧光微球总重量的 50% ，荧光分子的重量占所占纳米荧光微球总重量的 0.05%~5% 。本发明纳米荧光微球粒径稳定、光谱适用于可见发射光，采用该纳米荧光微球作为标记物的免疫层析方法，简便快速、灵敏度高且可进行定量检测。