



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104422760 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 18

(21) 申请号 201310397734. 3

(22) 申请日 2013. 09. 05

(71) 申请人 窦文超

地址 310002 浙江省杭州市上城区惠民路
74 号 2 单元 605 室

(72) 发明人 窦文超 赵广英 杨磊

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

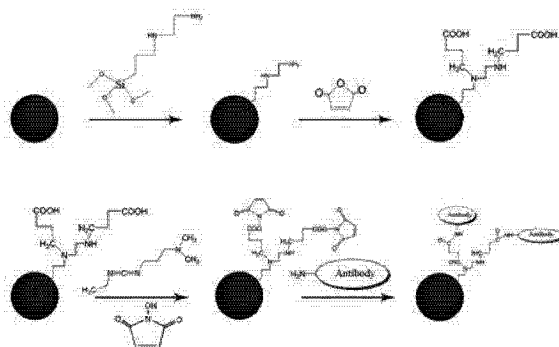
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

免疫彩色二氧化硅微球

(57) 摘要

本发明涉及一种免疫彩色二氧化硅微球, 可以作为免疫胶体金的替代物应用于免疫层析法中, 克服目前同一粒径免疫胶体金只能显示一种颜色只适用于检测一个指标的问题; 同时免疫彩色二氧化硅微球也解决了现有免疫彩色聚苯乙烯微球染料易泄露、合成困难、尺寸难以控制、水溶性和生物相容性差等缺陷。本发明的免疫彩色二氧化硅微球, 使用彩色二氧化硅微球作为彩色标记物, 硅烷偶联剂通过化学键将氨基或其他活性基团修饰到彩色二氧化硅球表面上, 使二氧化硅微球表面具有活性基团, 再通过化学键将抗原或者抗体连接到微球表面制备得到免疫彩色二氧化硅微球。上述的本发明免疫彩色氧化硅微球具有很好的生物活性且粒径均匀、颜色丰富。



1. 免疫彩色二氧化硅微球,其特征是:彩色二氧化硅微球带上抗原或者抗体。
2. 根据权利要求1所述的免疫彩色二氧化硅微球,其特征是:抗体或抗原通过化学键连接到彩色二氧化硅微球上。
3. 根据权利要求1所述的一种免疫彩色二氧化硅微球,其特征是微球粒径为10纳米-10微米。
4. 根据权利要求2所述的抗体,其包括:IgG、IgM、IgA、IgD、IgE。

免疫彩色二氧化硅微球

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫二氧化硅微球。

背景技术

[0002] 免疫彩色微球是一类在化学分析和生物分析领域具有广泛应用前景的高科技纳米材料¹⁻³。所谓的彩色微球就是指那些粒径在 10nm 到 10 μm 之间,且本身具有鲜艳颜色的纳米粒子,当其被修饰上抗原或者抗体以后就是免疫彩色微球。免疫彩色微球具有鲜艳颜色,和无色的微球相比,可以增加检测的灵敏度,同时多种颜色微球可以实现对一个样品中不同待测物的同时检测。目前,唯一两种的免疫彩色微球是免疫胶体金⁴和免疫聚苯乙烯乳胶微球⁵。胶体金是一种金属原子聚集体,它的颜色通常为红色,另外也可以通过改变其粒径而使其显示其他颜色⁶。胶体金修饰抗体或抗原以后就形成免疫胶体金。彩色聚苯乙烯微球,是将有机染料包裹在聚苯乙烯微球当中,而显示出不同的颜色³。当将抗体或者抗原修饰到彩色聚苯乙烯微球后就会得到免疫彩色聚苯乙烯微球⁷。

[0003] 免疫胶体金和免疫彩色聚苯乙烯微球都未能被广泛的应用化学分析和生物分析领域。原因就是由于这两种纳米材料本身的原因造成的。胶体金的缺点是:胶体金的颜色不易控制,原因是胶体金的颜色是由粒径决定,粒径受反应条件和反应时间的影响,胶体金的生成速度很快,经常很难控制其粒径从而得到所需颜色的胶体金。另外不用颜色胶体金的粒径不同,粒径不同会影响胶体金的物理化学性质,这样不同颜色的胶体金就不适合在一个试剂中同时进行检测。彩色聚苯乙烯微球的缺点是:彩色聚苯乙烯微球很容易发生颜料泄露。染料往往是通过溶胀的方法被包裹到聚苯乙烯微球当中,染料与聚苯乙烯微球之间并没有形成牢固的化学键而是通过物理吸附的方式被包裹,染料很容易从微球当中泄露,影响其应用。虽然有文献报道将染料与聚乙烯单体同时聚合,将染料作为单体之一构成聚合物,但是大部分染料都会影响聚合反应的进行,只有极少数实验室自行设计的染料可以用于合成彩色微球,无法利用商品化的染料限制了这种方法的应用。

[0004]

发明内容

[0005] 鉴于免疫彩色微球的广阔应用前景,和目前已有免疫彩色微球的缺点,本发明的目的在于针对以上问题,发明一种免疫彩色二氧化硅微球,这种免疫彩色二氧化硅微球可以替代免疫层析法中的免疫胶体金和间接凝集试验中的免疫聚苯乙烯彩色微球。本发明需要解决的技术问题是:利用抗原或抗体将彩色二氧化硅修饰,得到具有生物活性的免疫彩色二氧化硅微球。本发明针对彩色二氧化硅表面的活性基团,及其与抗原或抗体的连接问题,通过深入研究,发现硅烷偶联剂可以使得二氧化硅微球表面带有活性基团,再在微球体系中依次加入 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)-碳化二亚胺(EDC)和生物活性物质(抗原或者抗体)得到具有生物活性的免疫彩色二氧化硅微球。

[0006] 本发明的技术方案:本发明涉及一种免疫彩色二氧化硅微球,在生物检测盒生物分析领域(如免疫层析法和间接凝集试验)有广阔的应用前景。对于免疫彩色二氧化硅微

球的制备选用分布修饰的方案：选用已经制备好的粒径均匀的彩色二氧化硅微球，首先使用硅烷偶联剂使其表面带上活性基团（如氨基等），使其表面带有可以和的化学基团如氨基等，然后让彩色二氧化硅微球与丁二酸酐反应，使得微球表面的氨基转变成羧基，再采用 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺（EDC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）交联剂将抗原或抗体连接到彩色二氧化硅微球表面进行修饰。

附图说明

[0007] 图 1 实例一中鸡白痢免疫彩色二氧化硅微球的合成步骤示意图。

[0008] 图 2 实例二中阪崎肠杆菌免疫彩色二氧化硅微球的合成步骤示意图。

[0009] 具体实施方式：以下实例可以有助于了解本发明，但本发明内容包括但不限于下列实施例内容

实施例 1

彩色二氧化硅微球的活化：将合成好的彩色二氧化硅微球 100mg 用超纯水清洗三次，分散到 20 mL 水中超声 10 min 使微球均匀分散，分别加入 1.4 mL 冰乙酸和 0.2 mL 的 3-(2-氨基乙基氨基)丙基-三甲氧基硅烷搅拌均匀后持续震荡反应 1h。将反应后的微球用水清洗 3 次，分散到 10 mL 丁二酸酐和 DMF 的混合溶液中在通氮气条件下持续振荡反应 5 h，离心、清洗后的微球在 4 °C 条件下可以保存备用。

[0010] 免疫彩色二氧化硅微球的制备：配制 pH 6.8 浓度为 0.1 mol L⁻¹ 的吗啉乙磺酸缓冲液（MES），在 5 mL MES 缓冲液中分别加入 500 mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和 500 mg 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺（EDC），用于微球表面羧基的活化。离心得到的活化微球分散到 pH 7.3 浓度 0.1 mol L⁻¹ PBS 中。取 10 mL 分散好的活化微球与 10 μL 鸡白痢抗体，孵育 4 h，用 PBS 清洗、离心后得到免疫彩色二氧化硅微球，分散到 5 mL PBS 中，4 °C 条件下保存备用。

[0011] 实施例 2

二氧化硅颗粒的氨基硅烷化及抗体标记 取 100mg 彩色二氧化硅微球悬混于 10mL 甲醇中 加入 0.30mL 3-(2-氨基乙基氨基)丙基-三甲氧基硅烷超声分散 15min 后 再于室温下搅拌反应 6h 离心分离 然后依次采用甲醇和 PBS 溶液（pH7.0）进行超声洗涤 再离心分离 即完成彩色二氧化硅微球的氨基硅烷化。 取 10mL 氨基硅烷化的彩色二氧化硅微球悬浊液 先超声分散 15min 再加入 5.0mL2.5% 戊二醛 于室温下搅拌反应 3h 再离心分离 即完成颗粒的醛基化 将醛基化的彩色二氧化硅微球悬混于 4.0mLPBS 溶液 超声分散 15min 后 加入 1.0mL 阪崎肠杆菌抗体原液 于 37 °C 下温育 1h 离心分离 即制得阪崎肠杆菌抗体-彩色二氧化硅微球然后 将颗粒悬混于 4.0mLPBS 溶液中 加入 1mL 浓度为 10mg/mL 的 BSA 于室温下搅拌反应 1.5h 以封闭阪崎肠杆菌抗体-彩色二氧化硅微球表面非特异性结合 醛基 位点 离心分离 最后以 PBS 溶液超声洗涤 并悬混于 3.0mLPBS 溶液 直接用于分析或于 4 °C 下保存 一般可稳定 2 个月（合成步骤见图 2）

本发明优点：

免疫彩色二氧化硅微球作为免疫胶体金替代品具备以下优势：相同粒径的免疫彩色二氧化硅微球可以具备不同的颜色，免疫胶体金同一种粒径只能显示一种颜色。免疫胶体最常被用于免疫层析领域，以免疫层析领域为例，免疫层析中所用标记粒子要求粒径不能超

过 50nm, 免疫彩色二氧化硅粒径可以小于 50nm, 且具有很好的单分散性。对于相同粒径的免疫彩色二氧化硅微球可以不同颜色微球标记不同抗体, 从而实现免疫层析法, 一次检测多项指标, 这是免疫胶体金所无法实现的。彩色二氧化硅微球表面含有大量的羟基, 很容易进行羧基化和氨基化, 然后通过化学键与各种抗体联接, 因此不同种类免疫彩色微球很容易制得; 免疫彩色二氧化硅微球需要具有很好的亲水性; 免疫彩色二氧化硅微球和免疫胶体金比较, 更加经济, 易于制备。

[0012] 免疫彩色二氧化硅微球与免疫聚苯乙烯彩色微球相比具以下优势: 免疫彩色二氧化硅微球染色更稳定, 免疫聚苯乙烯微球染色多采用包埋法, 在遇到有机溶剂时, 会因溶胀而造成染料泄露, 染色不够牢固, 彩色二氧化硅微球中, 有机染料通过化学键连接到微球上, 彻底克服染料泄露的问题; 免疫彩色二氧化硅微球具有更好的亲水性和生物相容性; 免疫彩色二氧化硅微球更易制备, 二氧化硅微球表面的羟基可以通过与硅烷偶联剂等反应实现氨基和羧基化, 从而通过化学键与各种抗体联接; 二氧化硅密度也比聚苯乙烯大, 因此, 免疫彩色二氧化硅微球比免疫聚苯乙烯微球更易通过离心方式进行分离和清洗。

[0013] 基于以上的论述, 免疫彩色二氧化硅微球在免疫学检测领域有广阔的应用前景。

[0014] 参考文献:

[1] Pichot, C., Surface-functionalized latexes for biotechnological applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2004, 9, (3-4), 213-221.

[2] Kalogianni, D. P.; Litos, I. K.; Christopoulos, T. K.; Ioannou, P. C., Dipstick-type biosensor for visual detection of DNA with oligonucleotide-decorated colored polystyrene microspheres as reporters. *Biosensors and Bioelectronics* 2009, 24, (6), 1811-1815.

[3] Li, B.; Shen, J.; Liang, R.; Ji, W.; Kan, C., Synthesis and characterization of covalently colored polymer latex based on new polymerizable anthraquinone dyes. *Colloid Polym Sci* 2012, 290, (18), 1893-1900.

[4] Sun, X.; Dong, S.; Wang, E., High-Yield Synthesis of Large Single-Crystalline Gold Nanoplates through a Polyamine Process. *Langmuir* 2005, 21, (10), 4710-4712.

[5] Hu, Z. K.; Xue, M. Z.; Zhang, Q.; Sheng, Q. R.; Liu, Y. G., Controlled preparation of nanocolorants via a modified miniemulsion polymerization process. *Journal of Applied Polymer Science* 2007, 104, (5), 3036-3041.

[6] Huang, T.; Xu, X.-H. N., Synthesis and characterization of tunable rainbow colored colloidal silver nanoparticles using single-nanoparticle plasmonic microscopy and spectroscopy. *Journal of Materials Chemistry* 2010, 20, (44), 9867-9876.

[7] Hahn, Y. K.; Chang, J.-B.; Jin, Z.; Kim, H.-S.; Park, J.-K., Magnetophoretic position detection for multiplexed immunoassay using colored microspheres in a microchannel. *Biosensors and Bioelectronics* 2009, 24, (7), 1870-1876.

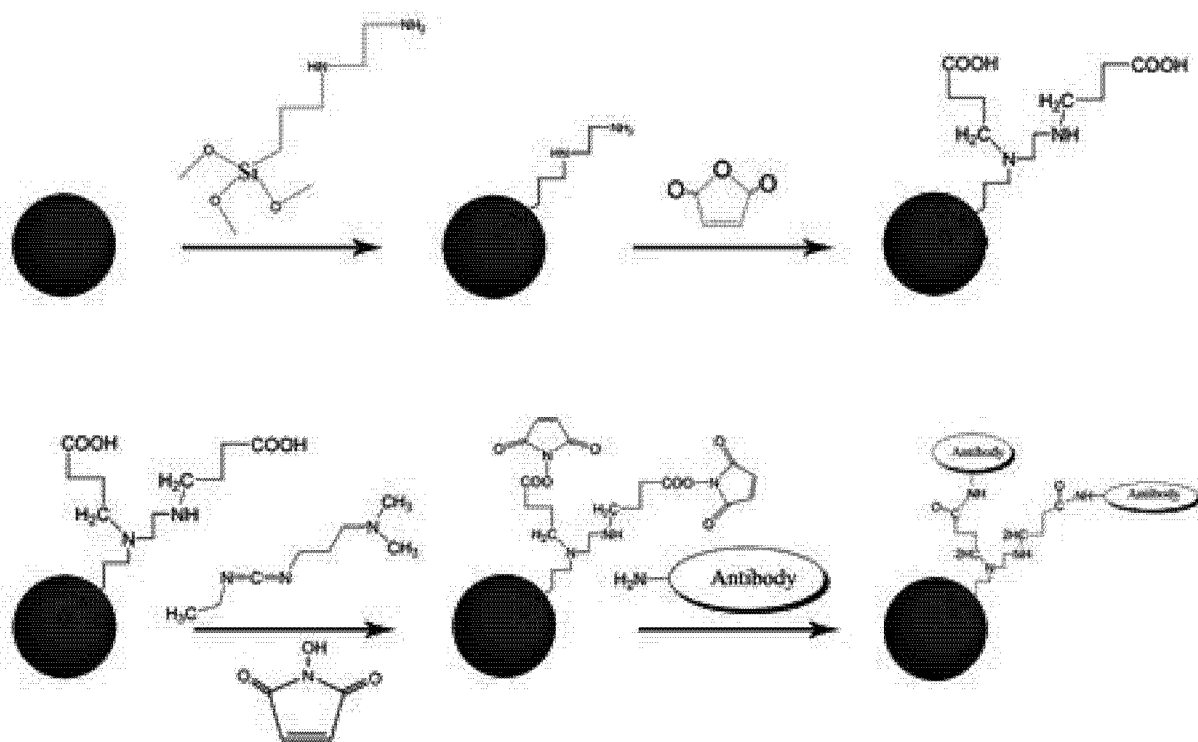


图 1

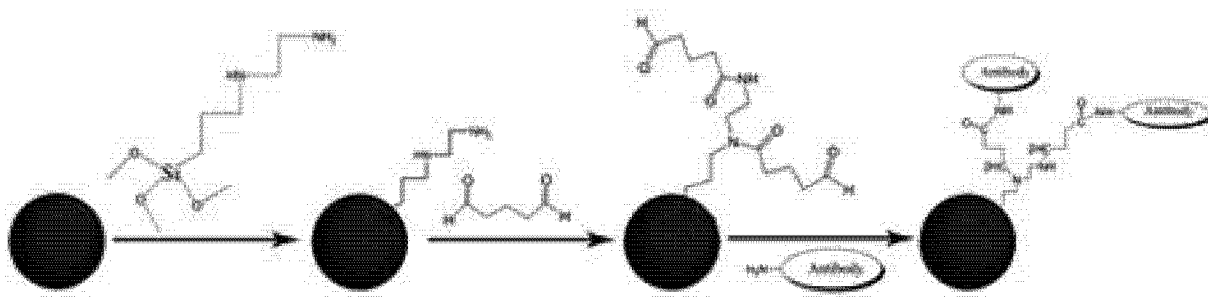


图 2

专利名称(译)	免疫彩色二氧化硅微球		
公开(公告)号	CN104422760A	公开(公告)日	2015-03-18
申请号	CN201310397734.3	申请日	2013-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	窦文超		
申请(专利权)人(译)	窦文超		
当前申请(专利权)人(译)	窦文超		
[标]发明人	窦文超 赵广英 杨磊		
发明人	窦文超 赵广英 杨磊		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/552		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种免疫彩色二氧化硅微球，可以作为免疫胶体金的替代物应用于免疫层析法中，克服目前同一粒径免疫胶体金只能显示一种颜色只适用于检测一个指标的问题；同时免疫彩色二氧化硅微球也解决了现有免疫彩色聚苯乙烯微球染料易泄露、合成困难、尺寸难以控制、水溶性和生物相容性差等缺陷。本发明的免疫彩色二氧化硅微球，使用彩色二氧化硅微球作为彩色标记物，硅烷偶联剂通过化学键将氨基或其他活性基团修饰到彩色二氧化硅球表面上，使二氧化硅微球表面具有活性基团，再通过化学键将抗原或者抗体连接到微球表面制备得到免疫彩色二氧化硅微球。上述的本发明免疫彩色氧化硅微球具有很好的生物活性且粒径均匀、颜色丰富。

