



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102604637 A

(43) 申请公布日 2012.07.25

(21) 申请号 201210030464.8

(22) 申请日 2012.02.10

(71) 申请人 中国科学院福建物质结构研究所  
地址 350002 福建省福州市杨桥西路 155 号

(72) 发明人 陈学元 涂大涛 周山勇 刘永升  
李仁富 朱浩淼

(51) Int. Cl.

C09K 11/85(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

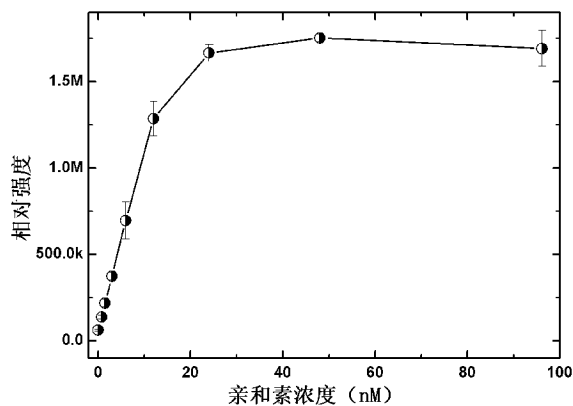
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 3 页

## (54) 发明名称

生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法

## (57) 摘要

本发明公开一种生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法。利用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU) 以及 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA) 为活化剂, 在无水 N,N-二甲基甲酰胺的溶剂中, 将生物素的羧基进行活化, 然后与纳米颗粒的氨基反应形成酰胺键, 从而实现稀土掺杂无机荧光纳米颗粒表面的生物素修饰。采用本方法制备的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒可与亲和素进行迅速而稳定的连接, 同时由于纳米颗粒内掺杂的稀土离子特定发光可以对这一连接进行灵敏的响应, 表明了通过这一制备方法得到的纳米材料应用于生物标记和免疫分析领域的潜力。



1. 生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,其特征在于:利用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯以及N,N-二异丙基乙胺为活化剂,在无水N,N-二甲基甲酰胺的溶剂中,将生物素的羧基进行活化,然后与纳米颗粒的氨基反应,从而实现稀土掺杂无机荧光纳米颗粒表面连接生物素。

2. 如权利要求1的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,其特征在于反应物的加入摩尔量比例:纳米颗粒:1份;苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯:1~5份;N,N-二异丙基乙胺:1~10份;生物素:0.5~5份。

3. 如权利要求1或2的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,采用的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒,所掺杂的稀土元素为Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb,纳米颗粒表面为氨基。

4. 如权利要求1或2的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,其特征在于:利用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯以及N,N-二异丙基乙胺在无水N,N-二甲基甲酰胺中使稀土掺杂氟化钇钠纳米颗粒表面进行生物素修饰,纳米颗粒组分为: $x\text{Ln}^{3+}-(1-x)\text{NaYF}_4$ ,其中 $\text{Ln}^{3+} = \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}, \text{Tm}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Eu}^{3+}, \text{Gd}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Sm}^{3+}, \text{Nd}^{3+}, \text{pr}^{3+}$ ,  $0 < x \leq 50\text{atom}\%$ 。

5. 如权利要求1或2的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,其特征在于:利用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯以及N,N-二异丙基乙胺在无水N,N-二甲基甲酰胺中使稀土掺杂氟化钆纳米颗粒表面进行生物素修饰,纳米颗粒组分为: $y\text{Ln}^{3+}-(1-y)\text{GdF}_3$ ,其中 $\text{Ln}^{3+} = \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}, \text{Tm}^{3+}, \text{Ho}^{3+}, \text{Eu}^{3+}, \text{Tb}^{3+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Sm}^{3+}, \text{Nd}^{3+}, \text{pr}^{3+}$ ,  $0 < x \leq 50\text{atom}\%$ 。

6. 权利要求1或2的制备方法所得到的生物素修饰的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒用于生物标记和免疫分析。

## 生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物素修饰无机纳米材料的制备方法,尤其是涉及一种生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法。

### 背景技术

[0002] 近年来稀土掺杂的无机荧光纳米颗粒以其较高的物理化学稳定性、优异的发光性能等特点而受到人们的重视,被广泛应用于信息显示、绿色照明、生物标记、太阳能电池等领域。尤其是在应用于生物标记时,相比于目前常用的荧光染料和半导体量子点,由于无机稀土纳米发光材料具有发光效率高、毒性低、线宽窄、荧光寿命长和发射波长可调谐等综合优势,是目前普遍被看好的新一代荧光生物标记材料。而在生物标记和免疫分析领域,生物素 (biotin) 和亲和素 (avidin) 或链霉亲和素 (streptavidin) 的高亲和力 (结合常数  $K_a = 10^{15} M^{-1}$ ) 使两者可在较低的浓度下快速结合并保持复合体的稳定,此结合过程几乎是不可逆的。以生物素和亲和素具有的独特结合特性为基础,结合二者即可偶联抗原抗体等生物活性物质进行检测,此种特性使生物素-亲和素系统成为近年来发展迅速的一门生物分析系统。因此,将稀土掺杂无机荧光纳米颗粒与生物素-亲和素系统结合起来有利于进行灵敏、高效的生物标记检测甚至生物成像,这一领域也越来越受到国内外学者的关注。而进行该领域研究的基础就是如何将生物素或者亲和素连接到纳米颗粒表面,目前已有的研究成果通常是采用 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) 为交联剂,在缓冲溶液的“水相”环境中进行生物素和表面含有氨基或羧基等官能团的无机纳米颗粒的连接,在这一连接过程中,生物素、亲和素和纳米颗粒在缓冲溶液中的溶解度是影响反应产率的重要因素;同时 EDC 还存在中间产物水解的问题,这些都限制了这一连接反应的产率。(参考文献:Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2nd edition, Academic Press, Inc., (2008); Chun-Hua Yan et al, J. Phys. Chem. C, Vol. 112, No. 17, 6589-6593, (2008))。本发明采取有机反应中酰胺合成常用的“固相合成法”,使用苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU) 为缩合剂以及 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA) 为活化剂,在无水 N,N-二甲基甲酰胺的“油相”溶剂中,将生物素的羧基进行活化,然后与纳米颗粒的氨基反应形成酰胺键,可以成功实现对多种无机纳米颗粒的生物素修饰,体现出了本方法的广泛适用性。通过该方法制备的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米晶,可以与亲和素进行迅速而稳定的连接,同时利用纳米颗粒内掺杂的稀土离子的特定发光对这一连接进行响应,即可应用于异相或均相荧光免疫分析。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提出一种使稀土掺杂无机纳米晶表面修饰生物素的制备方法。

[0004] 本发明采用如下技术方案:

[0005] 1. 一种稀土掺杂无机纳米晶表面修饰生物素的制备方法。其特征在于:称量苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯 (HBTU) 和 N,N-二异丙基乙胺 (DIEA) 以及生

物素,在无水 N, N- 二甲基甲酰胺的“油相”溶剂中,将生物素的羧基进行活化,然后与纳米颗粒的氨基反应数小时后形成酰胺键,然后用 N, N- 二甲基甲酰胺和去离子水洗涤反应产生的纳米颗粒多次,在真空干燥箱中干燥,即得到表面修饰生物素的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒。

[0006] 2. 一种如项 1 所述的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,其特征在于反应物的加入摩尔量比例:

[0007] 纳米颗粒:1 份;

[0008] 苯并三氮唑-N, N, N', N' - 四甲基脲六氟磷酸酯:1 ~ 5 份;

[0009] N, N- 二异丙基乙胺:1 ~ 10 份;

[0010] 生物素:0.5 ~ 5 份。

[0011] 3. 一种采取如项 1 和 2 所述的制备方法,所采用的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒,所掺杂的稀土元素为 Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb,纳米颗粒表面为氨基。

[0012] 4. 为了证实如项 1 和 2 所述的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒表面进行生物素修饰的制备方法的可行性,本发明选取稀土掺杂氟化钇钠 ( $\text{NaYF}_4$ ) 纳米颗粒和氟化钆 ( $\text{GdF}_3$ ) 纳米颗粒为实施例子,本发明具有广泛适用性,并非仅限于以上两个实施例子。

[0013] 5. 稀土掺杂无机纳米颗粒修饰生物素的检测与验证。通过傅立叶变换红外光谱检测表明,在经过 HBTU/DIEA 的作用,纳米颗粒表面修饰生物素后,产生了两个新的红外振动吸收峰: $1217\text{cm}^{-1}$  和  $1153\text{cm}^{-1}$ ,这是对应于生物素的 C-N 振动吸收峰;同时纳米颗粒对应于氨基的 N-H 的振动吸收峰  $1635\text{cm}^{-1}$  消失,产生了一个新的吸收峰  $1685\text{cm}^{-1}$ ,这是酰胺键中 C=O 的振动吸收峰,说明颗粒表面的氨基已经与生物素的羧基发生反应生成了酰胺键,即生物素已经被成功连接到纳米颗粒表面。

[0014] 另外,将修饰前的  $\text{GdF}_3$  纳米颗粒与按照如项 1 和 2 所述的方法制备好的表面修饰生物素的  $\text{GdF}_3$  纳米颗粒分别溶解于磷酸盐缓冲液中,向其中加入相同量的连接了罗丹明异硫氰酸酯的亲合素 (Avidin-RhB1TC),培养一段时间后离心分离,用磷酸盐缓冲液清洗数次,再将清洗后的纳米颗粒分别溶解于磷酸盐缓冲液中,在荧光读板机上进行测试。未修饰生物素的  $\text{GdF}_3$  纳米颗粒由于其只能在表面吸附少量的荧光染料 RhB1TC,溶液对应的发射峰强度也较弱;而修饰有生物素的  $\text{GdF}_3$  纳米颗粒可以通过 Biotin-Avidin 反应连接上 RhB1TC,其溶液可以检测到对应于 RhB1TC 的较强的发射峰。

[0015] 6. 一种采用如项 1 和 2 所述的制备方法所得到的生物素修饰的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的用途,其特征在于:用于生物标记和免疫分析。将亲合素溶解于碳酸盐缓冲液中,并稀释成不同浓度加入到高亲和性的 96 微孔板中,培养一段时间使亲合素通过物理吸附标记到微孔板上,然后用碳酸盐缓冲液清洗数次以除去游离的亲合素,接着将已制备的生物素标记的纳米颗粒溶解于磷酸盐缓冲溶液中,取相同体积相同浓度的纳米颗粒溶液加入到标记不同浓度亲合素的微孔内,培养一段时间后用磷酸缓冲液清洗数次,在荧光读板机上进行光谱检测。

[0016] 由于纳米颗粒表面已经修饰上了生物素,在荧光读板机上进行检测,结果显示随着微孔板标记的亲合素浓度的增大,所连接到的表面修饰有生物素的纳米颗粒越多,检测到对应的稀土离子荧光强度也越大,亲合素浓度与荧光强度之间存在着较好的线性关系,说明利用纳米颗粒的荧光可以检测亲合素或亲或素偶联的蛋白质浓度,这一检测可以达到

较高的灵敏度,其极限可达到 nM,表明了这种生物素标记的荧光纳米颗粒应用于生物标记领域的前景。

[0017] 通过本发明制备的生物素标记稀土掺杂无机荧光纳米颗粒,制备过程简单、重复性好。本发明与目前国内外通常采用的在水溶液中进行生物素修饰纳米晶的方法相比,由于反应在“油相”溶剂中进行,对颗粒及生物素的水溶性要求较低,同时避免了中间产物的水解,因而反应产率较高。我们得到的这种生物素修饰的稀土掺杂无机荧光纳米颗粒,可以与亲和素进行迅速而稳定的连接,同时纳米颗粒内掺杂的稀土离子特征发光也可对这一连接进行灵敏的响应,表明了通过这一方法制备得到的材料应用于生物标记领域的潜力。

#### 附图说明

[0018] 附图 1:(a) 生物素与氨基化的纳米颗粒在 HBTU/DIEA 作用下结合的反应机理。

[0019] 附图 2:(a) 未经修饰的与 (b) 生物素修饰后的  $\text{NaYF}_4:5\% \text{Ce}, 5\% \text{Tb}$  纳米颗粒在水溶液中的荧光光谱及发光照片。

[0020] 附图 3:(a) 未经修饰的与 (b) 生物素修饰后的  $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}, 2\% \text{Er}$  纳米颗粒的傅里叶变换红外光谱。

[0021] 附图 4:(a) 未经修饰的与 (b) 生物素修饰后的  $\text{GdF}_3$  纳米颗粒与 Avidin-RhB1TC 反应后的荧光光谱。

[0022] 附图 5:生物素修饰后的纳米颗粒对亲和素进行荧光检测的步骤。

[0023] 附图 6:生物素修饰后的  $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}, 2\% \text{Er}$  纳米颗粒与标记在微孔板上的不同浓度亲和素连接后的荧光测试分析结果。

#### 具体实施方式

[0024] 本发明所提供的生物素标记稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法,其实质特点和显著优点可以通过以下实施例进一步予以证实,但本发明并非仅限于实施例。

[0025] 实例 1: $\text{NaYF}_4:5\% \text{Ce}, 5\% \text{Tb}$  纳米颗粒表面连接生物素的制备。称取 30mg 苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)以及 30mg 生物素溶解于 0.9mL 的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF),加入 0.1mL 的 N,N-二异丙基乙胺(DIEA)将生物素的羧基进行活化 12 小时,然后加入 30mg 表面带有氨基的  $\text{NaYF}_4:5\% \text{Ce}, 5\% \text{Tb}$  纳米颗粒,震荡反应 12 小时后,用 DMF 和去离子水洗涤反应产生的纳米颗粒多次,在真空干燥箱中干燥,即可得到表面修饰生物素的  $\text{NaYF}_4:5\% \text{Ce}, 5\% \text{Tb}$  无机纳米颗粒。

[0026] 实例 2: $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}, 2\% \text{Er}$  纳米颗粒表面连接生物素的制备。称取 75mg 的 HBTU 以及 50mg 生物素溶解于 1.8mL 的 DMF,加入 0.2mL 的 DIEA 将生物素的羧基进行活化 8 小时,然后加入 50mg 表面带有氨基的  $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}, 2\% \text{Er}$  纳米颗粒,震荡反应 8 小时后,用 DMF 和去离子水洗涤反应产生的纳米颗粒多次,在真空干燥箱中干燥,即可得到表面修饰生物素的  $\text{NaYF}_4:20\% \text{Yb}, 2\% \text{Er}$  无机纳米颗粒。

[0027] 实例 3: $\text{NaYF}_4:1\% \text{Dy}$  纳米颗粒表面连接生物素的制备。称取 10mg 的 HBTU 以及 20mg 生物素溶解于 0.9mL 的 DMF,加入 0.1mL 的 DIEA 将生物素的羧基进行活化 24 小时,然后加入 15mg 表面带有氨基的  $\text{NaYF}_4:1\% \text{Dy}$  纳米颗粒,震荡反应 24 小时后,用 DMF 和去离子水洗涤反应产生的纳米颗粒多次,在真空干燥箱中干燥,即可得到表面修饰生物素的

NaYF<sub>4</sub>:1% Dy 无机纳米颗粒。

[0028] 实例 4 :GdF<sub>3</sub>:5% Tb 纳米颗粒表面连接生物素的制备。称取 50mg 的 HBTU 以及 50mg 生物素溶解于 0.8mL 的 DMF,加入 0.2mL 的 DIEA 将生物素的羧基进行活化 10 小时,然后加入 50mg 表面带有氨基的 GdF<sub>3</sub>:5% Tb 纳米颗粒,震荡反应 10 小时后,用 DMF 和去离子水洗涤反应产生的纳米颗粒多次,在真空干燥箱中干燥,即可得到表面修饰生物素的 GdF<sub>3</sub>:5% Tb 无机纳米颗粒。

[0029] 实例 5 :GdF<sub>3</sub>:50% Eu 纳米颗粒表面连接生物素的制备。称取 100mg 的 HBTU 以及 100mg 生物素溶解于 3mL 的 DMF,加入 0.3mL 的 DIEA 将生物素的羧基进行活化 8 小时,然后加入 20mg 表面带有氨基的 GdF<sub>3</sub>:50% Eu 纳米颗粒,震荡反应 12 小时后,用 DMF 和去离子水洗涤反应产生的纳米颗粒多次,在真空干燥箱中干燥,即可得到表面修饰生物素的 GdF<sub>3</sub>:50% Eu 无机纳米颗粒。

[0030] 实例 6 :将 1mg 亲和素溶解于碳酸盐缓冲液中,并稀释成不同浓度加入到高清合性的 96 微孔板中,培养一段时间使亲和素通过物理吸附标记到微孔板上,接着用碳酸盐缓冲液清洗数次以除去游离的亲和素,然后将实例 2 中制备的生物素标记的 NaYF<sub>4</sub>:20% Yb,2% Er 纳米颗粒溶解于磷酸盐缓冲溶液中,取相同体积相同浓度的纳米颗粒溶液加入到不同浓度亲和素标记的微孔内,培养一段时间后用磷酸盐缓冲液清洗数次,在 980nm 激发下,在荧光读板机上进行荧光光谱检测。

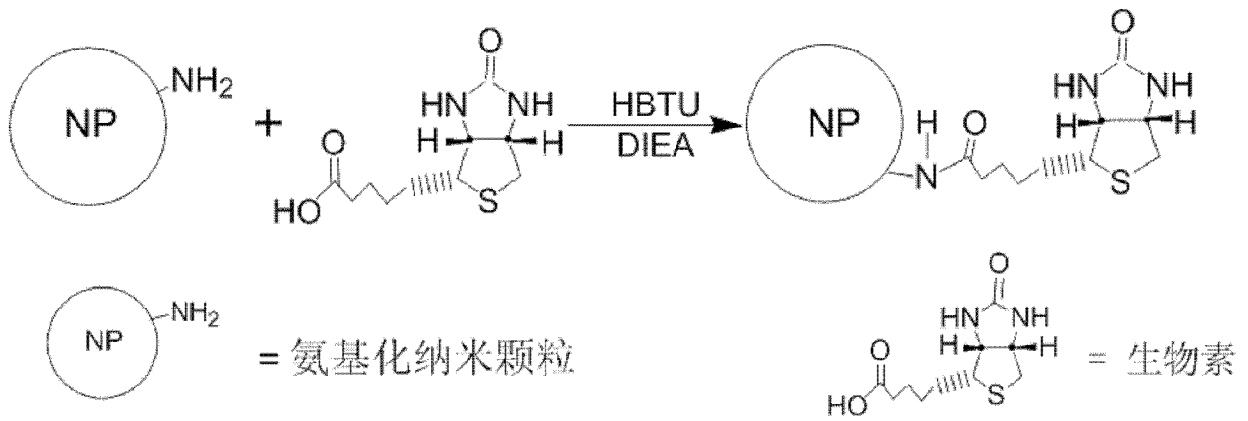


图 1

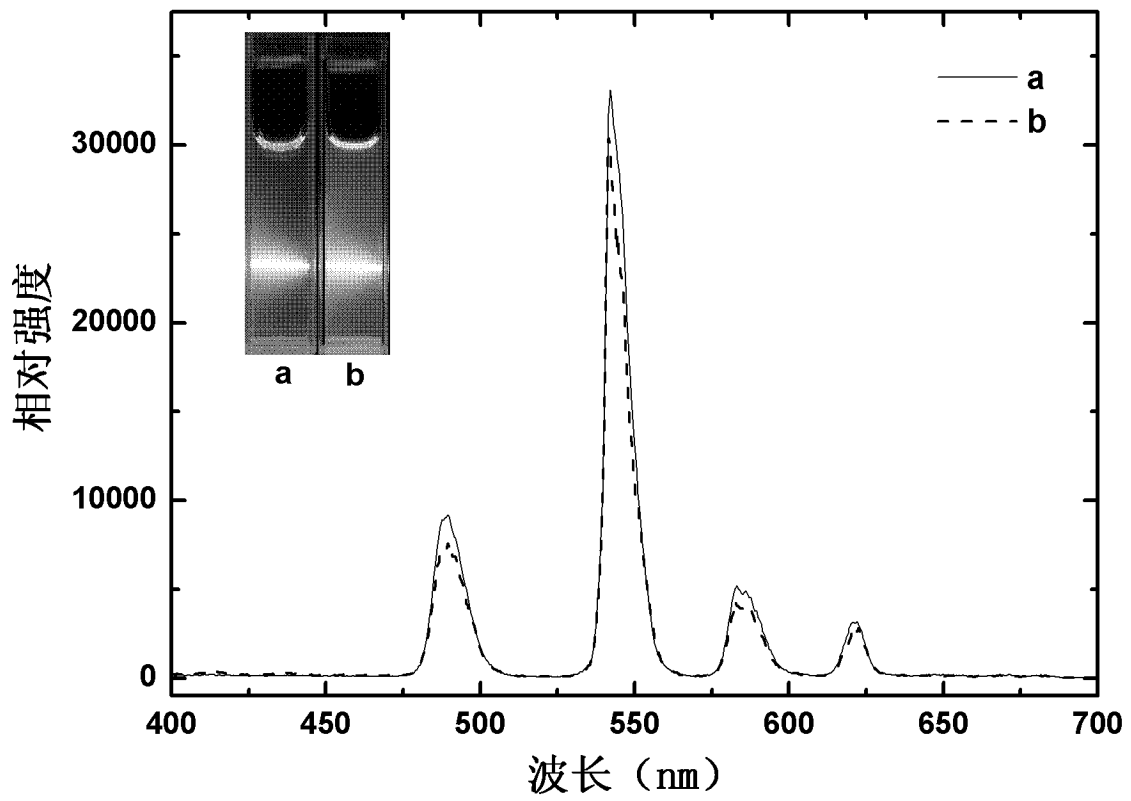


图 2

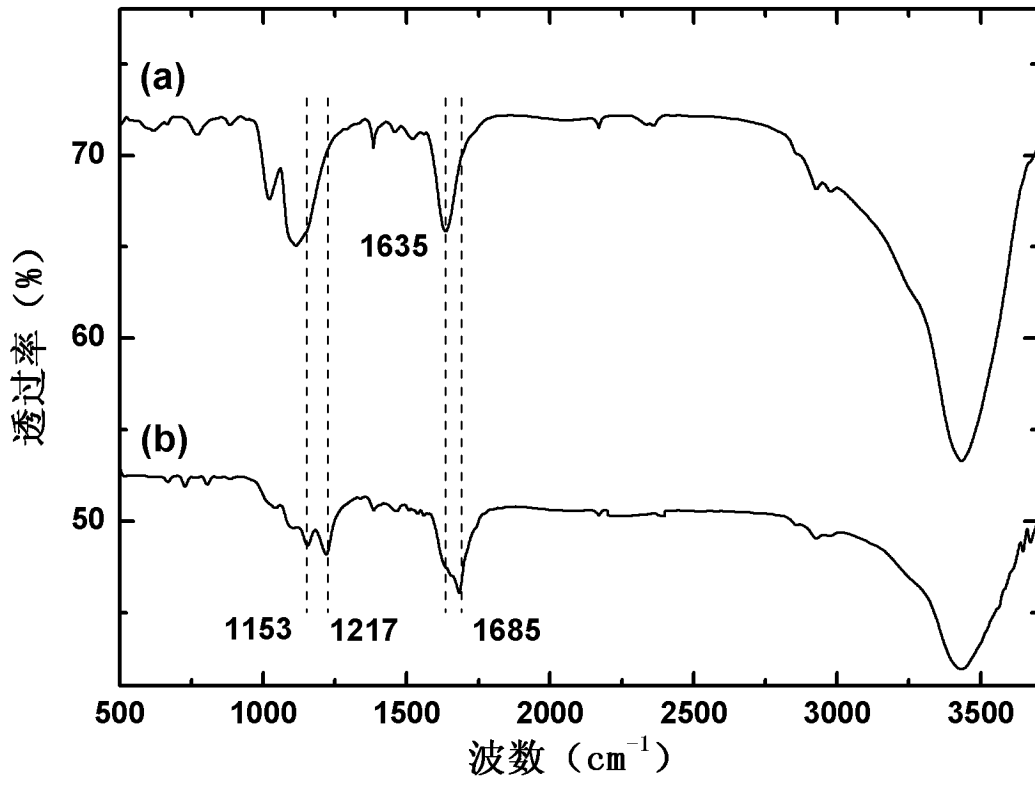


图 3

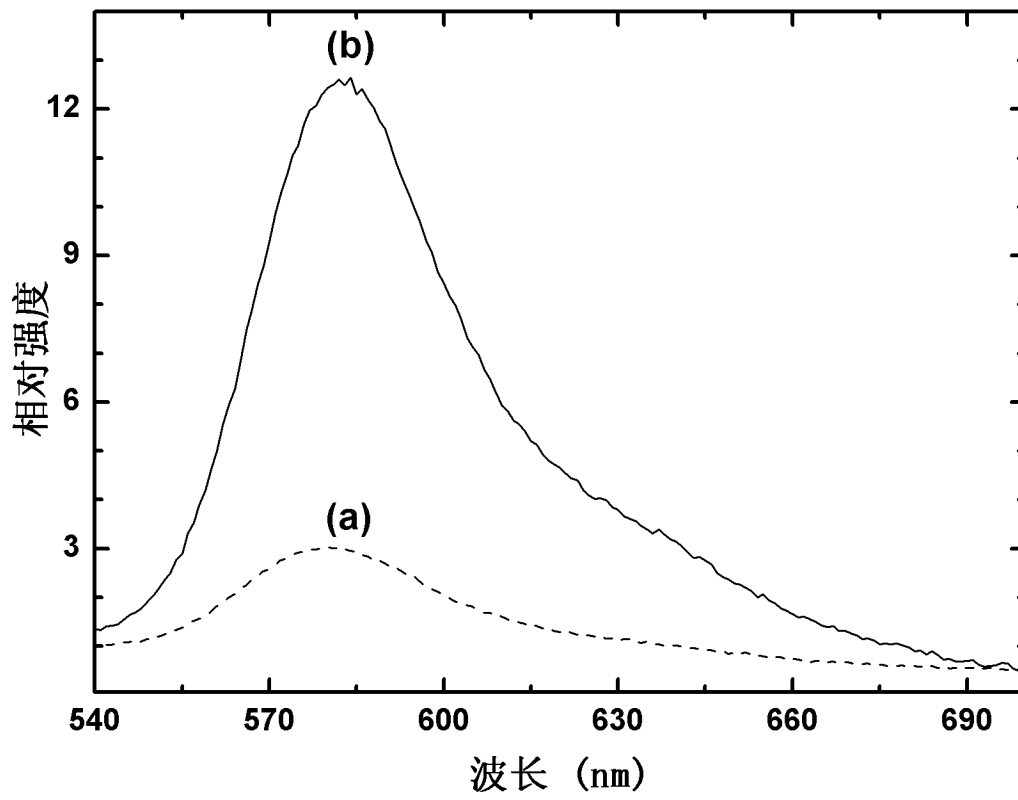


图 4

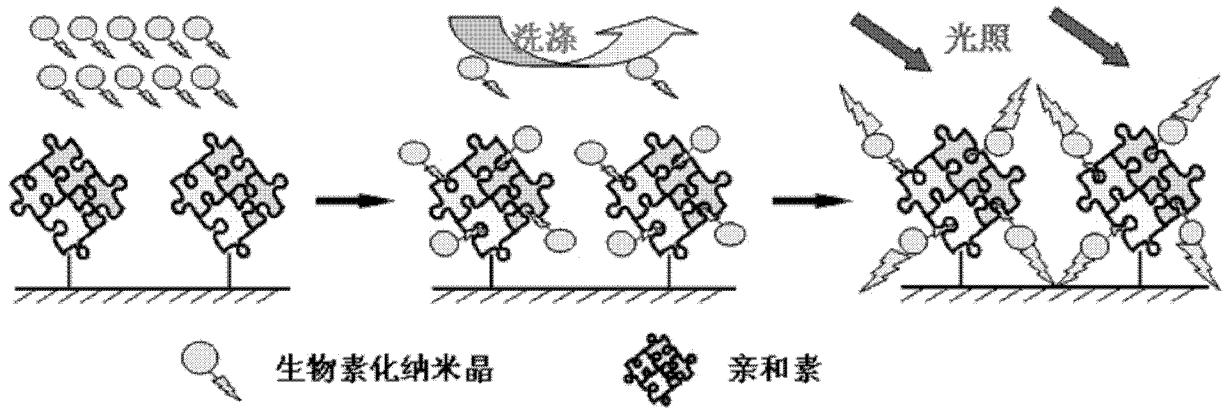


图 5

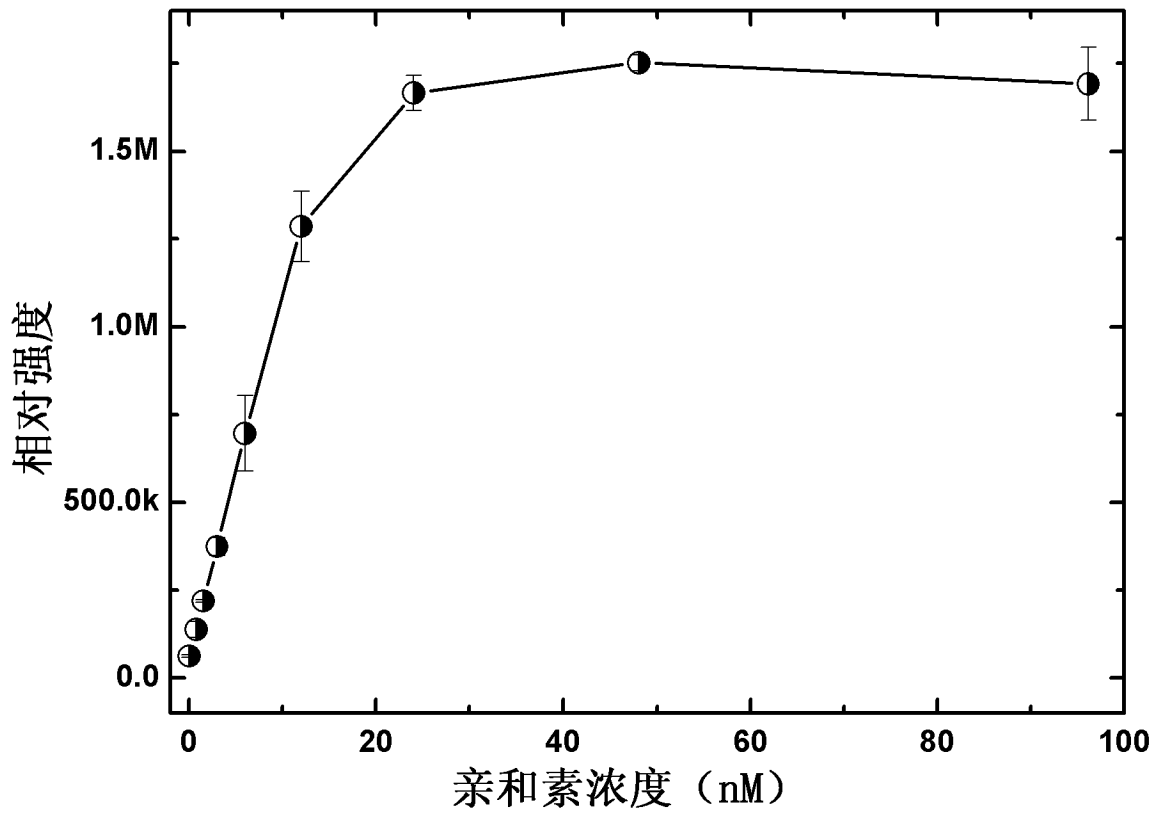


图 6

专利名称(译)	生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102604637A</a>	公开(公告)日	2012-07-25
申请号	CN201210030464.8	申请日	2012-02-10
申请(专利权)人(译)	中国科学院福建物质结构研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院福建物质结构研究所		
[标]发明人	陈学元 涂大涛 周山勇 刘永升 李仁富 朱浩淼		
发明人	陈学元 涂大涛 周山勇 刘永升 李仁富 朱浩淼		
IPC分类号	C09K11/85 G01N33/53		
其他公开文献	CN102604637B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开一种生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒的制备方法。利用苯并三氮唑-N, N, N', N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)以及N, N-二异丙基乙胺(DIEA)为活化剂, 在无水N, N-二甲基甲酰胺的溶剂中, 将生物素的羧基进行活化, 然后与纳米颗粒的氨基反应形成酰胺键, 从而实现稀土掺杂无机荧光纳米颗粒表面的生物素修饰。采用本方法制备的生物素修饰稀土掺杂无机荧光纳米颗粒可与亲和素进行迅速而稳定的连接, 同时由于纳米颗粒内掺杂的稀土离子特定发光可以对这一连接进行灵敏的响应, 表明了通过这一制备方法得到的纳米材料应用于生物标记和免疫分析领域的潜力。

