



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105018075 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201510429445. 6

(22) 申请日 2015. 07. 21

(71) 申请人 湖北工业大学

地址 430068 湖北省武汉市武昌区南湖李家墩1村1号

(72) 发明人 孙宏浩 柯鹏 郑立 王甜甜

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 汪俊锋

(51) Int. Cl.

C09K 11/06(2006. 01)

B82Y 40/00(2011. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页

(54) 发明名称

一类荧光纳米球及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一类荧光纳米球及其制备方法,属于生物检测领域。为SiO₂荧光纳米球、PAM荧光纳米球或SiO₂@PAM荧光纳米球,所述SiO₂荧光纳米球为粒径80-150nm的SiO₂表面通过酰胺键偶联荧光分子,所述PAM荧光纳米球为粒径70-150nm的聚丙烯酰胺表面通过酰胺键偶联荧光分子,所述SiO₂@PAM荧光纳米球以SiO₂为内核,外层为聚丙烯酰胺偶联荧光分子,其粒径为100-200nm,外层厚度为5-20nm。本发明的荧光纳米球,可以与不同的荧光分子偶联,从而可以对各个环节进行综合评价,更好的用于生物检测。

1. 一类荧光纳米球,为 SiO₂ 荧光纳米球、PAM 荧光纳米球或 SiO₂@PAM 荧光纳米球,所述 SiO₂ 荧光纳米球为粒径 80-150nm 的 SiO₂ 表面通过酰胺键偶联荧光分子,所述 PAM 荧光纳米球为粒径 70-150nm 的聚丙烯酰胺表面通过酰胺键偶联荧光分子,所述 SiO₂@PAM 荧光纳米球以 SiO₂ 为内核,外层为聚丙烯酰胺偶联荧光分子,其粒径为 100-200nm,外层厚度为 5-20nm。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光纳米球,其特征在于,所述荧光分子为罗丹明 B,罗丹明 X,或荧光素;荧光分子的质量含量为 0.1%-3%。

3. 权利要求 1 所述的荧光纳米球的制备方法,其特征在于,制备 SiO₂ 荧光纳米小球的方法,包括如下步骤:

(1) 制备 SiO₂ 纳米小球

以无水乙醇为共溶剂,氨水为催化剂,将超纯水、氨水和无水乙醇置于烧瓶中,搅拌均匀,另将正硅酸四乙脂与无水乙醇混合物置于烧杯中,搅拌均匀后倒入烧瓶中,室温搅拌 16h,12000rpm 离心 10min,再用超纯水和乙醇反复洗涤,去掉表面没有聚合的材料,最后悬浮于乙醇中;

(2) 制备羧基功能化的 SiO₂ 纳米小球

取一定量顺丁烯二酸酐溶于二氯甲烷中,在冰浴情况下逐滴加入等摩尔量的氨基硅烷偶联剂,搅拌 4h,用旋转蒸发仪旋干二氯甲烷,得到白色粉末状固体,为羧基硅烷偶联剂;

将 5-10mL 10mg/ml 的 SiO₂ 纳米小球分散到由 1-10mL 水、5-30mL 乙醇和 0.1-1mL 26 wt % 氨水组成的混合溶液,室温下搅拌均匀,加入 0.05-0.9mmol 的羧基硅烷偶联剂,室温搅拌 7h-24h,离心洗涤 4-5 遍,即得羧基功能化的 SiO₂ 纳米小球;

(3) 制备荧光 SiO₂ 纳米小球

将 1-10mg 的荧光染料溶于 1-5ml 的乙醇中,加入 0.3-30 μL 的氨基硅烷偶联剂,避光搅拌 2-24h,得到修饰有荧光分子的硅烷偶联剂;

将 5-10mL 羧基功能化的 SiO₂ 纳米小球置于由 1-15mL 水、5-30mL 乙醇和 0.1-1mL 26 wt % 氨水组成的混合溶液,室温下搅拌均匀,加入 10-500 μL 的修饰有荧光分子的硅烷偶联剂,室温搅拌 7h-24h,离心洗涤 4-5 遍,透析一天,即得 SiO₂ 荧光纳米小球。

4. 权利要求 1 所述的荧光纳米球的制备方法,其特征在于,制备 PAM 荧光纳米小球的方法,包括如下步骤:

(1) 制备羧基功能化的 PAM 纳米小球

将 1.03-2.10g 丙烯酰胺,0.25-0.50g 甲基双丙烯酰胺,10-100 μL 丙烯酸溶于超纯水中作为水相;取 25-48ml 正己醇,8-15ml TX-100,120-250ml 环己烷混匀作为油相;在缓慢搅拌下,将水相逐滴加入油相,搅拌 15-60min 后,用液氮冷冻-真空-解冻反复 4-6 次除氧;在通保护气体的情况下,加入 30-90 μL 的 30wt% 的过硫酸铵和 20-60 μL 的四甲基乙二胺,室温搅拌 4-6h;加入乙醇和氯化钠溶液,静置 10-24h;收集沉淀,用乙醇离心清洗 4-6 次,最后溶于超纯水中,再次离心去除不溶物和大颗粒;透析三天,冷冻干燥后,用超纯水配成 50mg/mL 羧基功能化的 PAM 纳米小球溶液;

(2) 制备荧光 PAM 纳米小球、

取 1-10mg 的荧光染料加入 pH 9~11 的缓冲液中,加入 0.2-15 μL 的乙二胺,避光搅拌过夜,得氨基改性的荧光染料;

将 5-10mL 制备的羧基功能化的 PAM 纳米小球溶液加入到 pH 5~7 的缓冲液中,加入 10 倍羧基摩尔量的 EDC 和 NHS,室温活化 0.5-2h 后加入氨基改性的荧光染料,搅拌 2-4h;透析三天,冷冻干燥后,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液,即得 PAM 荧光纳米球溶液。

5. 权利要求 1 所述的荧光纳米球的制备方法,其特征在于,制备 SiO_2 @PAM 荧光纳米小球的方法,包括如下步骤:

(1) 制备 SiO_2 纳米小球

以无水乙醇为共溶剂,氨水为催化剂,将超纯水、氨水和无水乙醇至于圆底烧瓶中,磁力搅拌混合均匀,另将 TEOS 与无水乙醇混合物置于烧杯中,搅拌均匀后迅速倒入烧瓶中,室温搅拌 16h,12000rpm 离心 10min,再用超纯水和乙醇反复洗涤,去掉表面没有聚合的材料,最后悬浮于乙醇中;

(2) 制备 SiO_2 @PAM 纳米小球

将 5-10mL 10mg/ml 的 SiO_2 纳米小球分散到由 1-10mL 水、5-30mL 乙醇和 0.1-1mL 26 wt % 氨水组成的混合溶液,室温下搅拌均匀,加入 10-100 μL 的 3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷,回流搅拌 7h-24h,离心洗涤 4-5 遍,最后溶于超纯水中,制得 SiO_2 @MPS 溶液;

取 10-20ml 的 SiO_2 @MPS 溶液,加入 0.10-0.20g 丙烯酰胺,0.05-0.10g 亚甲基双丙烯酰胺,10-100 μL 丙烯酸,在通保护气体的情况下,加入 30-60 μL 的 30 wt % 的过硫酸铵和 20-40 μL 的四甲基乙二胺,室温搅拌 4-6h;离心清洗 4-6 次,即得羧基功能化的 SiO_2 @PAM 纳米小球溶液;

(3) SiO_2 @PAM 荧光纳米小球

制备氨基改性的荧光染料:取 1-10mg 的荧光染料加入到一定量的 pH 9~11 的缓冲液中,缓慢加入 0.2-15 μL 的乙二胺,避光搅拌过夜,制得氨基改性的荧光染料;

(4)将 5-10mL 制备的羧基功能化的 SiO_2 @PAM 纳米小球加入到一定量 pH 5~7 的缓冲液中,加入 10 倍羧基摩尔量的 EDC 和 NHS,室温活化 0.5-2h 后加入 1-10mL 的氨基改性的荧光染料,搅拌 2-4h;离心清洗 5-8 次,透析一天,即制得 SiO_2 @PAM 荧光纳米小球。

6. 权利要求 1 或 2 所述的三种荧光纳米球在免疫检测中的应用。

一类荧光纳米球及其制备方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及一类荧光纳米球及其制备方法,属于生物检测领域。

背景技术

[0003] 临床检验医学是医学专业的一个重要分支。随着科学技术的进步,现代医学对于各种疾病的诊断越来越依赖各项临床检验数据。临床检验数据已经成为现代医学诊断疾病、治疗监测的重要工具。目前在我国,临床检验工作基本都是在正规医院的检验科来完成的。他们检测的结果准确,所用的仪器设备正在向大型化和自动化方向发展。医院检测科的标本都是人工从各临床科室收集上来的,检测完成之后,检测报告也是人工送到各临床科室。这整个过程最快也要 4-5 个小时,通常是今天送标本,明天出结果,发报告的周期至少为 24 小时。但是临床科室对某些特殊疾病是需要很快知道检测结果的,如心肌梗塞的检测(心肌标志物的检测),肺栓塞等,目前的检测周期可能让病人错过最佳抢救时间。

[0004] 目前国内的体外快速诊断市场已经发展到了每年 100-150 亿人民币的销售额,而且每年还会有高达 15%-20% 的增长率。荧光免疫检测,作为体外快速诊断的一种检测方法极具潜力。荧光纳米球作为荧光免疫检测的具体工具,市场上对其的需求也越来越多。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的不足,本发明所要解决的技术问题在于提供一类荧光纳米球及其制备方法。

[0006] 本发明提供的一类荧光纳米球,为 SiO_2 荧光纳米球、PAM 荧光纳米球或 SiO_2 @PAM 荧光纳米球,所述 SiO_2 荧光纳米球为粒径 80-150nm 的 SiO_2 表面通过酰胺键偶联荧光分子,所述 PAM 荧光纳米球为粒径 70-150nm 的聚丙烯酰胺表面通过酰胺键偶联荧光分子,所述 SiO_2 @PAM 荧光纳米球以 SiO_2 为内核,外层为聚丙烯酰胺偶联荧光分子,其粒径为 100-200nm,外层厚度为 5-20nm。

[0007] 上述的荧光纳米球中,纳米球至少偶联一种荧光分子,如罗丹明 B,罗丹明 X,荧光素等;荧光分子的质量含量为 0.1%-3%,优先 0.5% (wt)。

[0008] 本发明基于二氧化硅和聚丙烯酰胺纳米材料,提供了三种荧光纳米球。该类荧光小球荧光强度高,分散性好,稳定性高,与抗体的偶联效率高。

[0009] 本发明还提供上述三种荧光纳米球的制备方法。

[0010] 一、制备 SiO_2 荧光纳米小球的方法,包括如下步骤:

(1) 制备 SiO_2 纳米小球

以无水乙醇为共溶剂,氨水为催化剂,将超纯水、氨水和无水乙醇置于烧瓶中,搅拌均匀,另将正硅酸四乙脂 (TEOS) 与无水乙醇混合物置于烧杯中,搅拌均匀后倒入烧瓶中,室温搅拌 16h,12000rpm 离心 10min,再用超纯水和乙醇反复洗涤,去掉表面没有聚合的材

料,最后悬浮于乙醇中;

(2) 制备羧基功能化的 SiO_2 纳米小球

取一定量顺丁烯二酸酐溶于二氯甲烷中,在冰浴情况下逐滴加入等摩尔量的氨基硅烷偶联剂,搅拌 4h,用旋转蒸发仪旋干二氯甲烷,得到白色粉末状固体,为羧基硅烷偶联剂;

将 5-10mL 10mg/ml 的 SiO_2 纳米小球分散到由 1-10mL 水、5-30mL 乙醇和 0.1-1mL 26 wt % 氨水组成的混合溶液,室温下搅拌均匀,加入 0.05-0.9mmol 的羧基硅烷偶联剂,室温搅拌 7h-24h,离心洗涤 4-5 遍,即得羧基功能化的 SiO_2 纳米小球;

(3) 制备荧光 SiO_2 纳米小球

将 1-10mg 的荧光染料溶于 1-5ml 的乙醇中,加入 0.3-30 μL 的氨基硅烷偶联剂,避光搅拌 2-24h,得到修饰有荧光分子的硅烷偶联剂;

将 5-10mL 羧基功能化的 SiO_2 纳米小球置于由 1-15mL 水、5-30mL 乙醇和 0.1-1mL 26 wt % 氨水组成的混合溶液,室温下搅拌均匀,加入 10-500 μL 的修饰有荧光分子的硅烷偶联剂,室温搅拌 7h-24h,离心洗涤 4-5 遍,透析一天,即得 SiO_2 荧光纳米小球。

[0011] 二、制备 PAM 荧光纳米小球的方法,包括如下步骤:

(1) 制备羧基功能化的 PAM 纳米小球

将 1.03-2.10g 丙烯酰胺,0.25-0.50g 甲基双丙烯酰胺,10-100 μL 丙烯酸溶于超纯水中作为水相;取 25-48ml 正己醇,8-15ml TX-100,120-250ml 环己烷混匀作为油相;在缓慢搅拌下,将水相逐滴加入油相,搅拌 15-60min 后,用液氮冷冻-真空-解冻反复 4-6 次除氧;在通保护气体的情况下,加入 30-90 μL 的 30wt% 的过硫酸铵和 20-60 μL 的四甲基乙二胺 (TEMED),室温搅拌 4-6h;加入乙醇和氯化钠溶液,静置 10-24h;收集沉淀,用乙醇离心清洗 4-6 次,最后溶于超纯水中,再次离心去除不溶物和大颗粒;透析三天,冷冻干燥后,用超纯水配成 50mg/mL 羧基功能化的 PAM 纳米小球溶液;

(2) 制备荧光 PAM 纳米小球、

取 1-10mg 的荧光染料加入 pH 9~11 的缓冲液中,加入 0.2-15 μL 的乙二胺,避光搅拌过夜,得氨基改性的荧光染料;

将 5-10mL 制备的羧基功能化的 PAM 纳米小球溶液加入到 pH 5~7 的缓冲液中,加入 10 倍羧基摩尔量的 EDC 和 NHS,室温活化 0.5-2h 后加入氨基改性的荧光染料,搅拌 2-4h;透析三天,冷冻干燥后,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液,即得 PAM 荧光纳米球溶液。

[0012]

三、制备 SiO_2 @PAM 荧光纳米小球的方法,包括如下步骤:

(1) 制备 SiO_2 纳米小球

以无水乙醇为共溶剂,氨水为催化剂,将超纯水、氨水和无水乙醇至于圆底烧瓶中,磁力搅拌混合均匀,另将 TEOS 与无水乙醇混合物置于烧杯中,搅拌均匀后迅速倒入烧瓶中,室温搅拌 16h,12000rpm 离心 10min,再用超纯水和乙醇反复洗涤,去掉表面没有聚合的材料,最后悬浮于乙醇中;

(2) 制备 SiO_2 @PAM 纳米小球

将 5-10mL 10mg/ml 的 SiO_2 纳米小球分散到由 1-10mL 水、5-30mL 乙醇和 0.1-1mL 26 wt % 氨水组成的混合溶液,室温下搅拌均匀,加入 10-100 μL 的 3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷 (MPS),回流搅拌 7h-24h,离心洗涤 4-5 遍,最后溶于超纯水中,制得 SiO_2 @MPS 溶液;

取 10-20ml 的 $\text{SiO}_2\text{@MPS}$ 溶液, 加入 0.10-0.20g 丙烯酰胺, 0.05-0.10g 亚甲基双丙烯酰胺, 10-100 μL 丙烯酸, 在通保护气体的情况下, 加入 30-60 μL 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 20-40 μL 的四甲基乙二胺 (TEMED), 室温搅拌 4-6h; 离心清洗 4-6 次, 即得羧基功能化的 $\text{SiO}_2\text{@PAM}$ 纳米小球溶液;

(3) $\text{SiO}_2\text{@PAM}$ 荧光纳米小球

制备氨基改性的荧光染料: 取 1-10mg 的荧光染料加入到一定量的 pH 9~11 的缓冲液中, 缓慢加入 0.2-15 μL 的乙二胺, 避光搅拌过夜, 制得氨基改性的荧光染料;

(4) 将 5-10mL 制备的羧基功能化的 $\text{SiO}_2\text{@PAM}$ 纳米小球加入到一定量 pH 5~7 的缓冲液中, 加入 10 倍羧基摩尔量的 EDC 和 NHS, 室温活化 0.5-2h 后加入 1-10mL 的氨基改性的荧光染料, 搅拌 2-4h; 离心清洗 5-8 次, 透析一天, 即制得 $\text{SiO}_2\text{@PAM}$ 荧光纳米小球。

[0013] 以上氨基硅烷偶联剂可以为 3-氨丙基甲氧基硅烷 (APTMS), 3-氨丙基乙氧基硅烷 (APTES) 等; 以上荧光染料可以为罗丹明 B, 罗丹明 X 或荧光素等; 以上保护气体可以为氮气, 氩气等。

[0014] 本发明还提供上述三种荧光纳米球在荧光快速检测中的应用。三种荧光纳米球与抗体偶联的方法为: 将荧光纳米球加入到 pH 5~7 的缓冲液中, 加入 10 倍羧基量的 EDC 和 NHS, 室温活化 0.5-2h 后, 加入一定量的抗体温育 0.5-4h 后, 在加入盐酸羟氨温育一个小时, 离心清洗 5 次, 4℃ 保存。

[0015] 本发明的荧光纳米球, 可以与不同的荧光分子偶联, 从而可以对各个环节进行综合评价, 更好的用于生物检测。

[0016] 二氧化硅纳米材料是一种生物相容性良好的材料, 采用修饰过的改性剂对其进行改性不仅使其能很好的偶联抗体, 还可以提高材料的酸碱稳点度; 聚丙烯酰胺具有极好的亲水性, 在水中分散极其稳定; $\text{SiO}_2\text{@PAM}$ 荧光纳米小球综合二氧化硅和聚丙烯酰胺两者的优点。

[0017] 综上所述, 本发明的优点和有益效果为:

1. 采用 Stober 法制备硅纳米球, 工艺简单, 成本低;
2. 制备的羧基荧光硅纳米球比直接用氨基改性剂制备氨基荧光会纳米球稳定性要好, 且羧基修饰过的硅在水中分散性有所改善;
3. 反相微乳法制备聚丙烯酰胺, 制备方法简单, 制备出来的纳米球在水中分散性好, 极其稳定;
4. $\text{SiO}_2\text{@PAM}$ 纳米球, 是在二氧化硅纳米球表面包埋一层聚丙烯酰胺, 能改善二氧化硅在水中的分散性和稳定性。

具体实施方式

[0018] 实施例 1 硅纳米球的制备

Stober 法制备 80nm SiO_2 纳米小球:

1. 取 1ml TEOS 加入到 25ml 乙醇中, 之后再加入 1.2ml 的氨水和 1ml 的超纯水, 室温搅拌 16h;

2. 12000rpm 离心 10min, 再用超纯水和乙醇反复洗涤, 最后悬浮于乙醇中。

[0019] 实施例 2 3-氨丙基甲氧基硅烷 (APTMS) 的羧基改性:

1. 90g (50mmol) 顺丁烯二酸酐溶于一定量的二氯甲烷中,在冰浴情况下逐滴加入 8.95g (50mmol) 的 APTMS, 搅拌 4h, 用旋转蒸发仪旋干二氯甲烷, 得到白色粉末状固体, 即得 APTMS-COOH。

[0020] 实施例 3 3- 氨丙基乙氧基硅烷 (APTES) 的羧基改性

1. 90g (50mmol) 顺丁烯二酸酐溶于一定量的二氯甲烷中,在冰浴情况下逐滴加入 9.65g (50mmol) 的 APTMS, 搅拌 4h, 用旋转蒸发仪旋干二氯甲烷, 得到白色粉末状固体, 即得 APTES-COOH。

[0021] 实施例 4 羧基硅小球的制备

取实施例 1 制备的 SiO_2 纳米小球 5ml 加入 5ml 乙醇, 1ml 的超纯水和 0.1ml 氨水, 搅拌均匀后加入 0.05mmol 实施例 2 制备的 APTMS-COOH, 室温搅拌 7h。

[0022] 得到的纳米小球用乙醇和水交替清洗 4 遍, 最后配置成 10mg/ml 溶液。

[0023] 实施例 5 羧基硅小球的制备

取实施例 1 制备的 SiO_2 纳米小球 10ml 加入 10ml 乙醇和 2ml 的超纯水和 0.5ml 氨水, 搅拌均匀后加入 0.5mmol 实施例 2 制备的 APTMS-COOH, 室温搅拌 10h。

[0024] 得到的纳米小球用乙醇和水交替清洗 4 遍, 最后配置成 10mg/ml 溶液。

[0025] 实施例 6 羧基硅小球的制备

取实施例 1 制备的 SiO_2 纳米小球 10ml 加入 30ml 乙醇, 5ml 的超纯水和 1ml 氨水, 搅拌均匀后加入 0.9mmol 实施例 3 制备的 APTES-COOH, 室温搅拌 24h。

[0026] 得到的纳米小球用乙醇和水交替清洗 4 遍, 最后配置成 10mg/ml 溶液。

[0027] 实施例 7 羧基荧光硅小球的制备

1. 取 1mg 异氰酸根罗丹明 B 加入到 1ml 乙醇中, 混合均匀后加入 0.3 μL 的 APTMS, 避光搅拌 10h, 制得 APTMS-Rh B ;

2. 取实例 4 制备的羧基硅小球 10ml 加入 10ml 乙醇、1ml 超纯水、0.2ml 氨水搅拌均匀后, 加入上一步制备的 APTMS-Rh B 1mL, 避光搅拌 10h ;

3. 得到荧光纳米球离心清洗后, 透析一天。

[0028] 实施例 8 羧基荧光硅小球的制备

1. 取 2mg 罗丹明 X 加入到 3ml 乙醇中, 混合均匀后加入 1 μL 的 APTES, 0.5 μL 三乙胺, 避光搅拌 16h, 制得 APTES-Rh X

2. 取实例 6 制备的羧基硅小球 10ml 加入 30ml 乙醇、1ml 超纯水、0.5ml 氨水搅拌均匀后, 加入上一步制备的 APTES-Rh X 3mL, 避光搅拌 16h ;

3. 得到荧光纳米球离心清洗后, 透析一天。

[0029] 实施例 9 羧基荧光硅小球的制备

1. 取 5mg 荧光素加入到 5ml 乙醇中, 混合均匀后加入 1 μL 的 APTES, 0.5 避光搅拌 16h, 制得 APTES-FS

2. 取实例 6 制备的羧基硅小球 10ml 加入 30ml 乙醇、1ml 超纯水、0.5ml 氨水搅拌均匀后, 加入上一步制备的 APTES-FS5mL, 避光搅拌 24h ;

3. 得到荧光纳米球离心清洗后, 透析一天。

[0030] 实施例 10 羧基功能化 PAM 纳米小球的制备

1. 取 1.03g 丙烯酰胺, 0.5g 亚甲基双丙烯酰胺, 10 μL 的丙烯酸溶于 3ml 的水中, 作为

水相；

2. 取 25ml 正己醇, 8ml TX-100, 120ml 环己烷混匀作为油相；

3. 将水相逐滴加入油相水相逐滴加入油相, 搅拌 15min 后, 用液氮冷冻 - 真空 - 解冻反复 4 次除氧; 在通保护气体的情况下, 加入 30% 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 20 μ L 的 TEMED, 室温搅拌 4h；

4. 加入一定量的乙醇和氯化钠溶液, 静置 10-h; 收集沉淀, 用乙醇离心清洗 4-6 次, 最后溶于超纯水中, 再次离心去除不溶物和大颗粒; 透析三天, 冷冻干燥后, 用超纯水配成 50mg/mL 的溶液；

实施例 11 羧基功能化 PAM 纳米小球的制备

1. 取 1.50g 丙烯酰胺, 0.75g 亚甲基双丙烯酰胺, 80 μ L 的丙烯酸溶于 5ml 的水中, 作为水相；

2. 取 40ml 正己醇, 10ml TX-100, 200ml 环己烷混匀作为油相；

3. 将水相逐滴加入油相水相逐滴加入油相, 搅拌 40min 后, 用液氮冷冻 - 真空 - 解冻反复 5 次除氧; 在通保护气体的情况下, 加入 40 μ L 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 25 μ L 的 TEMED, 室温搅拌 5h；

4. 加入一定量的乙醇和氯化钠溶液, 静置 16h; 收集沉淀, 用乙醇离心清洗 4-6 次, 最后溶于超纯水中, 再次离心去除不溶物和大颗粒; 透析三天, 冷冻干燥后, 用超纯水配成 50mg/mL 的溶液；

实施例 12 羧基功能化 PAM 纳米小球的制备

1. 取 2.06g 丙烯酰胺, 0.25g 亚甲基双丙烯酰胺, 100 μ L 的丙烯酸溶于 5ml 的水中, 作为水相；

2. 取 48ml 正己醇, 15ml TX-100, 200ml 环己烷混匀作为油相；

3. 将水相逐滴加入油相水相逐滴加入油相, 搅拌 60min 后, 用液氮冷冻 - 真空 - 解冻反复 4 次除氧; 在通保护气体的情况下, 加入 60 μ L 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 40 μ L 的 TEMED, 室温搅拌 6h；

4. 加入一定量的乙醇和氯化钠溶液, 静置 24h; 收集沉淀, 用乙醇离心清洗 6 次, 最后溶于超纯水中, 再次离心去除不溶物和大颗粒; 透析三天, 冷冻干燥后, 用超纯水配成 50mg/mL 的溶液；

实施例 13 PAM 荧光纳米小球的制备

1. 取 1mg 的异氰酸根罗丹明 B 加入到 1ml 的 pH 9.0 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液中, 加入 0.2 μ L 的乙二胺, 避光搅拌过夜, 制得氨基改性的罗丹明 B；

2. 将 5mL 实例 10 中制备的羧基功能化的 PAM 纳米小球加入到一定量 pH 5~7 的缓冲液中, 加入 26.5mg EDC 和 16.0mg NHS, 室温活化 0.5h 后加入 1mL 的氨基改性的罗丹明 B, 避光搅拌 2h；

3. 透析三天, 冷冻干燥后, 用超纯水配成 10mg/mL 的溶液。

[0031] 实施例 14 PAM 荧光纳米小球的制备

1. 取 5mg 的罗丹明 X 加入到 1ml 的 pH 10.5 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液中, 加入 5 μ L 的乙二胺, 避光搅拌过夜, 制得氨基改性的罗丹明 X；

2. 将 7.5mL 实例 11 中制备的羧基功能化的 PAM 纳米小球加入到一定量 pH 5~7 的缓

冲液中,加入 353.7mgEDC 和 279.6mgNHS,室温活化 1h 后加入 1mL 的氨基改性的罗丹明 X,避光搅拌 3h;

3. 透析三天,冷冻干燥后,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液。

[0032] 实施例 15 PAM 荧光纳米小球的制备

1. 取 10mg 的荧光素加入到 5ml 的 pH 10.5 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,加入 5 μ L 的乙二胺,避光搅拌过夜,制得氨基改性的荧光素;

2. 将 10mL 实例 12 中制备的羧基功能化的 PAM 纳米小球加入到一定量 pH 5~7 的缓冲液中,加入 666.8mg EDC 和 527.2mg NHS,室温活化 1h 后加入 1mL 的氨基改性的荧光素,避光搅拌 4h;

3. 透析三天,冷冻干燥后,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液。

[0033] 实施例 16 SiO₂@PAM 纳米小球的制备

1. 取 5mL 实施例 1 中 SiO₂纳米小球加入 1mL 水、5mL 乙醇和 0.1mL 氨水,室温下搅拌均匀,加入 10 μ L 的 3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS),回流搅拌 7h,离心洗涤 4 遍,最后溶于超纯水中;

2. 取 10mL 的 SiO₂@MPS 溶液,加入 0.10g 丙烯酰胺,0.05g 亚甲基双丙烯酰胺,10 μ L 丙烯酸,在通保护气体的情况下,加入 30 μ L 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 20 μ L 的四甲基乙二胺(TEMED),室温搅拌 4h;

3. 离心清洗 6 次,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液。

[0034] 实施例 17 SiO₂@PAM 纳米小球的制备

1. 取 8mL 实施例 1 中 SiO₂纳米小球加入 5mL 水、8mL 乙醇和 0.2mL 氨水,室温下搅拌均匀,加入 80 μ L 的 3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS),回流搅拌 10h,离心洗涤 4 遍,最后溶于超纯水中;

2. 取 16mL 的 SiO₂@MPS 溶液,加入 0.15g 丙烯酰胺,0.08g 亚甲基双丙烯酰胺,70 μ L 丙烯酸,在通保护气体的情况下,加入 40 μ L 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 30 μ L 的四甲基乙二胺(TEMED),室温搅拌 6h;

3. 离心清洗 6 次,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液。

[0035] 实施例 18 SiO₂@PAM 纳米小球的制备

1. 取 10mL 实施例 1 中 SiO₂纳米小球加入 10mL 水、30mL 乙醇和 1mL 氨水,室温下搅拌均匀,加入 100 μ L 的 3-(异丁烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS),回流搅拌 24h,离心洗涤 4 遍,最后溶于超纯水中;

2. 取 20mL 的 SiO₂@MPS 溶液,加入 0.20g 丙烯酰胺,0.10g 亚甲基双丙烯酰胺,100 μ L 丙烯酸,在通保护气体的情况下,加入 60 μ L 的 30% (wt) 的过硫酸铵和 40 μ L 的四甲基乙二胺(TEMED),室温搅拌 5h;

3. 离心清洗 6 次,用超纯水配成 10mg/ml 的溶液。

[0036] 实施例 19 SiO₂@PAM 荧光纳米小球的制备

1. 取 1mg 的异氰酸根罗丹明 B 加入到 1ml 的 pH 9.0 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中,加入 0.2 μ L 的乙二胺,避光搅拌过夜,制得氨基改性的罗丹明 B;

2. 取 5ml 实施例 16 中 SiO₂@PAM 纳米小球加入 0.1mL pH 5.0 MES 缓冲液,搅拌均匀后加入 265mg EDC 和 260mg NHS,室温活化 0.5h,加入 1ml 氨基改性的罗丹明 B,搅拌 2h;

3. 离心清洗 5 次,透析 24h,配置成 10mg/ml 溶液。

[0037] 实施例 20 SiO₂@PAM 荧光纳米小球的制备

1. 取 5mg 的罗丹明 X 加入到 1ml 的 pH 9.0 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液中,加入 8 μL 的乙二胺,避光搅拌过夜,制得氨基改性的罗丹明 X;

2. 取 5ml 实施例 17 中 SiO₂@PAM 纳米小球加入 0.5mL pH 5.0 MES 缓冲液,搅拌均匀后加入 385mg EDC 和 240mg NHS,室温活化 1h,加入 1ml 氨基改性的罗丹明 X,搅拌 3 h;

3. 离心清洗 8 次,透析 24h,配置成 10mg/ml 溶液。

[0038] 实施例 21 SiO₂@PAM 荧光纳米小球的制备

1. 取 10mg 的荧光素加入到 20ml 的 pH 9.0 的碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液中,加入 15 μL 的乙二胺,避光搅拌过夜,制得氨基改性的荧光素;

2. 取 10ml 实施例 18 中 SiO₂@PAM 纳米小球加入 1mL pH 5.0 MES 缓冲液,搅拌均匀后加入 574mg EDC 和 340mg NHS,室温活化 2h,加入 1ml 氨基改性的荧光素,搅拌 4h;

3. 离心清洗 6 次,透析 24h,配置成 10mg/ml 溶液。

[0039] 实施例 22 荧光硅小球耦联抗体

1. 取 1ml 实施例 7 中的荧光硅小球,用 0.1M pH 5.0 的 MES 缓冲液离心清洗两遍,加入 9.5mg EDC 和 8.6mg NHS,室温活化 0.5h;

2. 用 0.01M pH 7.4 的 PBS 缓冲液离心清洗两次,加入 10 μg 抗体,室温温育 0.5h;

3. 加入 10mg 盐酸羟胺,室温反应 1h,0.01M pH 7.4 的 PBS 缓冲液离心清洗两次,加入 1ml 封闭液(0.01M PBS, 1% 牛血清白蛋白),室温反应 1h;

4. 离心清洗两次,加入 1ml 保存液(0.01M PBS,0.1%BSA,0.05%Tween-20,0.02%NaN₃),4℃保存。

[0040] 实施例 23 荧光硅小球耦联抗体

1. 取 1ml 实施例 14 中的 PAM 荧光纳米小球,用 0.1M pH 5.0 的 MES 缓冲液离心清洗两遍,加入 5.0mg EDC 和 4.8mg NHS,室温活化 1h;

2. 用 0.01M pH 7.4 的 PBS 缓冲液离心清洗两次,加入 10 μg 抗体,室温温育 0.5h;

3. 加入 5.2mg 盐酸羟胺,室温反应 1h,0.01M pH 7.4 的 PBS 缓冲液离心清洗两次,加入 1ml 封闭液(0.01M PBS, 1% 牛血清白蛋白),室温反应 1h;

4. 离心清洗两次,加入 1ml 保存液(0.01M PBS,0.1% 牛血清白蛋白,0.05%Tween-20,0.02%NaN₃),4℃保存。

[0041] 实施例 24 荧光硅小球耦联抗体

1. 取 1ml 实施例 21 中的 SiO₂@PAM 荧光纳米小球,用 0.1M pH 5.0 的 MES 缓冲液离心清洗两遍,加入 8.9mg EDC 和 7.6mg NHS,室温活化 4h;

2. 用 0.01M pH 7.4 的 PBS 缓冲液离心清洗两次,加入 10 μg 抗体,室温温育 0.5h;

3. 加入 8.5mg 盐酸羟胺,室温反应 1h,0.01M pH 7.4 的 PBS 缓冲液离心清洗两次,加入 1ml 封闭液(0.01M PBS, 1% 牛血清白蛋白),室温反应 1h;

4. 离心清洗两次,加入 1ml 保存液(0.01M PBS,0.1% 牛血清白蛋白,0.05%Tween-20,0.02%NaN₃),4℃保存。

专利名称(译)	一类荧光纳米球及其制备方法		
公开(公告)号	CN105018075A	公开(公告)日	2015-11-04
申请号	CN201510429445.6	申请日	2015-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	湖北工业大学		
申请(专利权)人(译)	湖北工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	湖北工业大学		
[标]发明人	孙宏浩 柯鹏 郑立 王甜甜		
发明人	孙宏浩 柯鹏 郑立 王甜甜		
IPC分类号	C09K11/06 B82Y40/00 G01N33/533		
代理人(译)	汪俊锋		
其他公开文献	CN105018075B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一类荧光纳米球及其制备方法，属于生物检测领域。为SiO₂荧光纳米球、PAM荧光纳米球或SiO₂PAM荧光纳米球，所述SiO₂荧光纳米球为粒径80-150nm的SiO₂表面通过酰胺键偶联荧光分子，所述PAM荧光纳米球为粒径70-150nm的聚丙烯酰胺表面通过酰胺键偶联荧光分子，所述SiO₂PAM荧光纳米球以SiO₂为内核，外层为聚丙烯酰胺偶联荧光分子，其粒径为100-200nm，外层厚度为5-20nm。本发明的荧光纳米球，可以与不同的荧光分子偶联，从而可以对各个环节进行综合评价，更好的用于生物检测。