

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/533

G01N 21/64 G01N 33/543

G01N 33/84 C30B 29/48



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310110001.3

[43] 公开日 2004 年 11 月 3 日

[11] 公开号 CN 1542452A

[22] 申请日 2003.11.6

[21] 申请号 200310110001.3

[71] 申请人 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所

地址 130031 吉林省长春市东南湖大路 16 号

[72] 发明人 单桂晔 孔祥贵 冯力蕴

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公  
司

代理人 李恩庆

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法

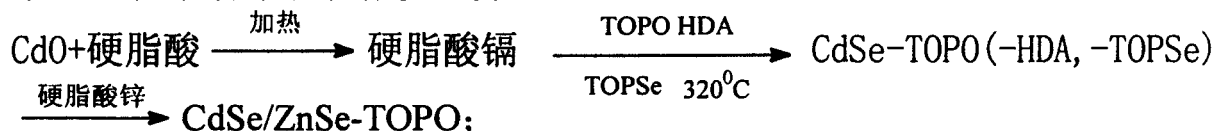
[57] 摘要

本发明属于纳米材料和生物技术领域，是一种用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法。通过合成高荧光特性的半导体材料，选用具有双亲集团的物质并且与生物组织相接近的磷脂类化合物对纳米材料进行包覆，合成用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡。本发明包括制备油性 CdSe 半导体纳米晶，复合油性纳米晶囊泡的合成及通过改变 pH 值来调节表面电位从而使囊泡与生物蛋白通过静电连接等三个步骤。本发明主要是利用免疫层析试纸如硝酸纤维素膜对乙肝病毒，蔬菜中残留农药，以及对毒品的检测。试纸条证明了这种复合荧光囊泡能够用于生物检测，将亲脂性表面 CdSe 纳米晶进行了相转移并构建使之具有生物相容性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，包括制备具有荧光特性的纳米晶，该纳米晶与蛋白的氨基端通过缩合反应偶连等过程，其特征是在制备 CdSe 纳米晶的过程中，注入过量的 Se 配体，对 CdSe 纳米晶的表面进行修饰，注入 Se 的量比 Cd 多 20%~30%，形成结构为 CdSe/ZnSe-TOPO 的脂溶性 CdSe 荧光纳米晶；用反相胶束法包覆 CdSe 荧光纳米晶合成囊泡；通过改变上述囊泡溶液的 PH 来调节囊泡的表面电位，得到不同表面电位的囊泡。

2、根据权利要求 1 所述的用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，其特征是在合成核壳纳米晶的基础上，直接向体系中注入硬脂酸锌甲苯溶液，使 Se 比 Cd 过量，其过程可表示为：



所述的反相胶束法包覆过程是，将脂溶性的荧光纳米晶与磷脂、胆固醇、高分子材料共同溶在非极性有机溶剂中，混合体系用常规的方法在氮气条件下吹干，在容器表面形成薄的单层膜，单层膜继续在通氮的条件下干燥 1-2 小时，然后将上述形成的单层膜加入上述非极性的有机溶剂，使单层膜溶解，再加入 10~40ml PB 缓冲溶液，溶液中形成水油两相，在磁力搅拌器上剧烈搅拌使之乳化，乳化后进一步超声，形成分散的、尺寸均一的复合荧光囊泡。

3、根据权利要求 2 所述的用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，其特征是所述的磷脂是电中性的卵磷脂(PC)、磷脂酰胺(PE)和带负电性的磷脂，高分子材料可以是聚乙烯醇(PEG)、也可以是聚丙烯酰胺，非极性有机溶剂为氯仿、乙醚或正己烷。

4、根据权利要求 3 所述的用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，其特征是所述的磷脂是电中性的卵磷脂(PC)、磷脂

酰胺 (PE)。

5、根据权利要求 3 所述的用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，其特征是带负电性的磷脂为磷脂酰甘油 (PG) 或磷脂酰肌醇 (PI)。

6、根据权利要求 4 所述的用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，其特征是所用的蛋黄卵磷脂 PC 重量比 50-70%，胆固醇 Ch 重量比 20-30%，磷脂酰氨 PE 重量比 5-10%，聚乙烯醇 PEG 重量比 0.5-1%；将上述材料溶在 3ml 氯仿中并放入一反应容器中，同时取 0.5-3mg 的 CdSe/ZnSe 核壳纳米晶溶入上述体系中；混合溶液吹干，再次向瓶中加入体积比为 40:1 的水和氯仿混合液，接下来剧烈搅拌 2 小时；选取 PH 为 8-9 的磷酸缓冲溶液 (PBS) 作为囊泡的母液，调节囊泡溶液的 PH 从 6-9。

7、根据权利要求 5 所述的用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法，其特征是选用中性卵磷脂 PC 与负电性的磷脂酰甘油 PG 作为磷脂，其中卵磷脂 PC 的重量含量为 70-80%，磷脂酰甘油 PG 为 9-20%，胆固醇 Ch 为 9-20%，聚乙烯醇 PEG 为 0.5-1%。

## 用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法

### 技术领域

本发明属于纳米材料和生物技术领域，涉及纳米生物技术，具体地说是一种用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法。

### 背景技术

对于生物和生物医学检测，荧光纳米晶是一种具有潜在应用价值的荧光探针，传统的荧光探针一般使用的是有机染料。有机染料作为生物检测探针，它存在着许多弊端，主要表现在有机染料所发射的荧光光谱的半峰宽是荧光纳米晶发射荧光光谱半峰宽的 3-5 倍左右，这将带来光谱的重叠，影响检测的灵敏度，同时有机染料的激发波长要比荧光纳米晶要窄，这就限制了激发光源的范围，也就是一种染料必须用一种特定波长的光激发，而具有广泛的激发光谱，所以可以用一个宽范围内的光作为激发光源而能使荧光纳米晶均能发射荧光。另外，有机染料在光辐射下是不稳定的，一般荧光纳米晶的荧光寿命大约是有机染料的 20 倍。

对于纳米晶用于荧光免疫检测国际上最早使用的是金纳米晶，并且现在已经商品化。它的基本原理主要利用金的金属反射颜色。首先用化学溶胶-凝胶方法合成表面带有负电荷的金纳米晶，然后通过静电相互作用使这种纳米金与抗体的正电区连接。最后让这种带有抗体的纳米金通过带有抗原的层析试纸，抗体与抗原的特异性识别将抗体截住，金纳米晶聚集而显色。这种金标的探针可以满足一种抗体的检测，但是对于多种抗体同时检测是不能够实现的。

荧光纳米晶（主要是 CdSe 纳米晶）由于在达到纳米尺寸范围内，其尺寸的变化会带来发射荧光波长的改变，因此通过控制合成条件，可以得到不同尺寸的 CdSe 纳米晶，也就得到了在可见光范围内的发射不同波长的纳

米晶，由此人们将 CdSe 纳米晶开发作为生物多色标记的潜在的材料，但是对于解决它与生物的相容性问题确是现在国际上所面临一难点。早在 1998 年，聂书明和 Alivasatos 就在 Science 上发表了将 CdSe 纳米晶用于生物检测的文章，前者利用 CdSe 纳米晶表面带的巯基乙酸的羧基端与蛋白的氨基端通过缩合反应偶连到一起，然后在 HeLa 细胞中培养带有转铁蛋白的和不带蛋白的荧光纳米晶，然后通过荧光显微镜观察，发现带有转铁蛋白的荧光纳米晶被带进了细胞中，细胞中出现了荧光纳米晶的荧光。同时 Alivasatos 也用带有表面功能团的  $\text{SiO}_2$  对 CdSe 进行了表面修饰，再与生物连接，在检测的过程中也得到了同样的结果。但是这两种方法的缺点在于荧光纳米晶在与蛋白偶连的过程中，将带来荧光纳米晶和蛋白的聚集和沉降。另外，对于巯基修饰的量子点，巯基是过量的，这样蛋白在与巯基乙酸的作用过程会造成蛋白与溶液中游离的巯基乙酸结合，这会影响检测的灵敏度。接着在 2000 年聂又用聚苯烯小球对荧光纳米晶进行了包覆，但由于聚苯烯小球在溶液中会出现溶胀问题，结果使得荧光纳米晶泄漏，这也限制了纳米晶的应用。因此发明能够有效的包覆量子点，并且具有生物相容性的复合体系是解决目前问题的关键。

#### 发明内容：

本发明通过合成高荧光特性的半导体材料，选用具有双亲集团的物质并且与生物组织相接近的磷脂类化合物对纳米材料进行包覆，目的是提供一种用于荧光免疫检测的 CdSe 纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法。

在结合国际上进行量子点包覆的基础上，本发明从两个方面来考虑这个问题，第一，合成的量子点表面带有的配体是一种疏水基团，这使得合成出的量子点必须在有机相中存在，但对于生物检测则要求合成出的荧光纳米晶应转移到水相，这就涉及到相转移的过程。第二，荧光纳米晶要与生物连接，那么所选用的荧光纳米晶表面包覆材料必须是生物相容性的。基于这两点，本发明在合成高荧光特性的半导体材料的基础上，选用了具有双亲集团的并且与生物组织相接近的磷脂类化合物对纳米材料进行包

覆。这种通过微乳反应的包覆一方面解决了相转移的问题，另一方面包覆之后的复合材料表面会带有很强的负电荷，形成一种可直接与蛋白相连接的条件，通过静电作用可以直接将囊泡与蛋白连接到一起。本发明对于油相合成 CdSe 的纳米晶的相转移及其与生物偶连等问题提出具体的解决方案。

### 一、制备具有高荧光特性的 CdSe 半导体纳米晶

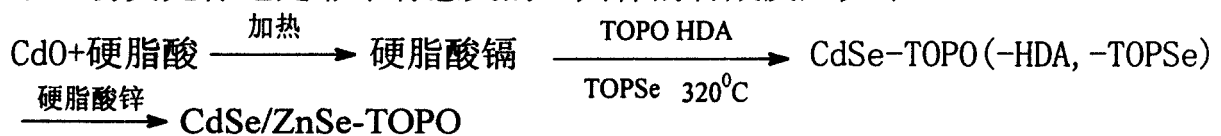
半导体纳米晶是由数目极少的原子或分子组成的原子或原子团簇。对于油相合成的 CdSe 纳米粒子，通过改变反应的实验条件可以获得不同尺寸的纳米晶，因为晶体的尺寸是与发光相关的，不同发射波长对应不同的粒子尺寸，也就是对应不同尺寸的纳米晶，因此可以通过控制反应条件在可见区内得到不同发射颜色的纳米晶。

本发明合成半导体 CdSe 纳米晶经过如下过程。首先将 CdO 与硬脂酸同时放入到一个反应容器中，混合搅拌并加热，生成硬脂酸镉，再将温度降至室温，使硬脂酸镉固化。另将三辛基氧化磷（TOPO）和十六烷基胺（HDA）放入到上述反应容器中，并同时升温，在此温度下向反应容器中注入 Se 的配体溶液。这些是常规的合成胶体的方法，彭笑刚等在 2002 年已在美国化学学会杂志（JACS）发表过具体的合成方法。

由于 CdSe 纳米晶的发光是在可见光范围内，不同尺寸的纳米晶会发出不同波长的荧光。这些使得人们致力于开发 CdSe 纳米晶用于生物荧光标记，这种荧光纳米晶用于荧光标记与传统的荧光染料相比具有许多的优越性，例如窄的发射波长，宽的激发波长，光化学的稳定性。但是，按上述方法合成的 CdSe 由于其表面有悬键，这些悬键构成了无辐射发射的中心，因此降低了 CdSe 发射荧光的效率。为了提高纳米晶的荧光效率，要对 CdSe 纳米晶的表面进行修饰。本发明是在传统的两步法合成核壳纳米晶的基础上，提出了一步法控制合成不同荧光效率的核壳纳米晶的方法。具体作法是在按上述方法合成 CdSe 纳米晶的过程中，注入的 Se 配体是过量，注入 Se 的量比 Cd 多 20%~30%。在完成 CdSe 纳米晶的生长之后，直接向体系中注入硬脂酸锌甲苯溶液，由于体系中 Se 是过量的并吸附在 CdSe 表面，当

硬脂酸锌注入后，锌将直接与 Se 结合形成具有 ZnSe 壳层结构为 CdSe/ZnSe-TOPO 脂溶性 CdSe 荧光纳米晶，ZnSe 层抑制了无辐射发射，提高了 CdSe 晶体的荧光效率。

对于晶体尺寸的控制，主要是利用晶体的生长过程是一个吸热的过程，控制 Se 溶液的注入温度，并选定在注入温度之下的一定范围内的生长温度，就可以得到一系列尺寸的 CdSe 纳米晶，反应在光谱上是对应着不同波长的荧光光谱，它们所发射的荧光颜色主要是从兰色到红色共八种。这对于生物荧光标记是非常有意义的。具体的合成反应如下：



## 二、制备复合有 CdSe/ZnSe 纳米晶的荧光囊泡

为了获得生物兼容性的半导体材料荧光复合体，需要将脂溶性的荧光纳米晶由有机相转移到水相，囊泡对荧光纳米晶的包覆完成了相转移，并同时使其具有生物相溶性。囊泡的荧光发光性质由囊泡中纳米晶的性质及不同种类的荧光纳米晶的配比决定。本发明采用的是反相胶束法制备囊泡包覆的荧光纳米晶。

反相胶束法包覆荧光纳米晶合成囊泡的具体步骤如下：

(1) 首先将脂溶性的荧光纳米晶与磷脂、胆固醇、高分子材料共同溶在非极性有机溶剂中，然后将混合体系用常规的方法在氮气条件下吹干，在容器表面形成薄的单层膜，单层膜需继续在通氮的条件下干燥 1-2 小时。所述的磷脂是电中性的卵磷脂(PC)、磷脂酰胺(PE)和带负电性的磷脂，如磷脂酰甘油(PG)、磷脂酰肌醇(PI)。在形成囊泡的过程中，磷脂是主要成分，电中性的磷脂可以单独使用，也可以将电中性的磷脂与负电性的磷脂混合使用，不同做法最终决定所形成囊泡的表面电势。胆固醇是一种中性脂质，主要作用是与磷脂相结合，阻止磷脂凝结成晶体结构。所述的高分子材料主要的作用是阻止囊泡之间的非特异性吸附，从而导致的囊泡聚集。高分子材料可以是聚乙烯醇(PEG)，也可以是聚丙烯酰胺。有机溶

剂采用的是非极性的溶剂，如氯仿，乙醚，正己烷等。

(2)将上述形成的单层膜加入上述非极性的有机溶剂，使单层膜溶解，然后再加入 10~40ml 磷酸缓冲溶液 (PBS)，此时溶液中形成水油两相。为了使两相乳化从而形成复合荧光纳米晶的囊泡，需将此溶液在磁力搅拌器上剧烈搅拌使之乳化。向乳化后的材料中再次加入 20~30ml PBS 缓冲溶液并进一步搅拌，从而形成分散的、尺寸均一的复合荧光囊泡。

乳化之前形成的单层膜主要是荧光纳米晶与磷脂，胆固醇等形成的单层有序排列，这是一种反相的排列，即在非极性有机相中，亲油端朝外的反相胶束排列。但在乳化之后，这种有序的排列被打破，在加入水之后，形成磷脂类的亲水端朝外的双脂质层结构，此时荧光纳米晶被包覆在双层中间，既形成所需的复合荧光囊泡。

通过上述方法，合成了尺寸均一，荧光效率达到 50%~70%的不同尺寸的 CdSe/ZnSe 半导体纳米晶。将这些有机相合成的 CdSe/ZnSe 纳米晶通过磷脂类的材料对其进行表面修饰包覆，得到了生物相容性的复合荧光囊泡。

### 三、复合荧光囊泡与蛋白的偶连

通过改变囊泡溶液的 PH 来调节囊泡的表面电位，得到不同表面电位的囊泡。通过静电作用可以使囊泡与蛋白或核酸的带电区结合从而形成荧光生物探针。利用这种生物探针可以实施对病毒，毒品，多基因片段的生物免疫检测。

本发明主要是利用免疫层析试纸如硝酸纤维素膜对乙肝病毒，蔬菜中残留农药，以及对毒品的检测。试纸条证明了这种复合荧光囊泡能够用于生物检测。这一发明首次选用囊泡作为包覆材料，并通过层析试纸进行免疫检测的方法。它将亲脂性表面 CdSe 纳米晶进行了相转移并构建使之具有生物相容性。

### 附图说明

图 1 为通过在不同的温度下生长而得到不同尺寸的 CdSe 纳米晶所对应的不同波长的发射光谱。

图 2 为用于免疫检测的层析试纸条基本构造的示意图。

图 3 为带有纳米晶抗体与抗原的特异性识别的示意图。

### 具体实施方式

#### 1、制备 CdSe/ZnSe 核壳结构的纳米晶

选取 99.9% 的 CdO: 0.0128-0.0150g, Se 粉: 0.079-0.158g, 硬脂酸: 0.114-0.328g。

在 140-150<sup>0</sup>C 之间, CdO 与硬脂酸反应生成硬脂酸镉, 再将生成物的反应容器降至室温, 并在室温的条件下向容器中加入 TOPO、HDA, 然后将反应器的温度升至 300-320<sup>0</sup>C, 在此温度下向体系中注入 TOPSe, 注入之后迅速降温, 降温区间为 250~280<sup>0</sup>C, 不同降温时间可以得到不同尺寸的纳米晶, 即得到了尺寸从 3~5nm 的纳米晶。晶体的荧光颜色随着时间的加长逐渐红移, 即从绿色逐渐变为红色。图 1 显示了在上述条件下合成的不同尺寸的荧光光谱。在合成不同 CdSe 纳米晶的基础上, 向体系中直接注入 Zn, Zn 与 CdSe 表面上过量的 Se 结合生成 CdSe/ZnSe 核壳结构。

#### 2、制备复合荧光纳米晶囊泡

选用的材料是 90%蛋黄卵磷脂 (PC)、磷脂酰氨 (PE), 胆固醇 (Ch) 和聚乙烯醇 (PEG)。首先按重量比蛋黄卵磷脂 PC: 50-70%, 胆固醇 Ch: 20-30%, 磷脂酰氨 PE: 5-10%, 聚乙烯醇 PEG: 0.5-1% 的比例关系称取, 并将这些材料溶在 3ml 氯仿中并放入一反应容器中, 同时取 0.5-3 毫克的 CdSe/ZnSe 核壳纳米晶溶入上述体系中。将混合溶液吹干, 然后再次向瓶中加入体积比为 40:1 的水和氯仿混合液, 接下来剧烈搅拌 2 小时得到乳白色的粘稠液体。向体系中再次加入 25 毫升 PBS 缓冲溶液继续搅拌直至形成分散的乳液; 通过电镜可以确定所形成的囊泡的尺寸为 50~200 纳米, 比较复合前后的发光光谱可以认为半导体纳米晶在复合前后的发光特性没有改变。在调节囊泡溶液的 PH 从 6-9 的变化过程中, 囊泡表面的电位也发生改变, 既随着 PH 增加, 表面的负电势将增大。

本发明选取 PH 为 8-9 的 PBS 作为囊泡的母液, 用电位分析仪测定表面

电势平均为 $-30\sim-48\text{mev}$ 。

### 3、复合荧光囊泡同蛋白的偶连

#### (1) 复合荧光囊泡用于乙肝病毒免疫检测。

这里分三个步骤进行：a) 将带有抗乙肝单抗的硝酸纤维素膜的干的试纸条的低部吸水区（试纸条的结构如图 2 所示）放入到合成的荧光复合囊泡溶液中，由于毛吸作用，囊泡被吸附到试纸条上，同时在检测限位置由静电作用被检测限上的抗体拦截而使囊泡非特异性吸附在试纸条上。这样在检测线上用荧光分光光度计可以探测到有荧光。这一步的目的是检测囊泡与试纸条上的孔隙的匹配性。b) 采用 1%牛血清白蛋白（BSA）溶液使其与囊泡在  $4^{\circ}\text{C}$  的冰柜中搅拌 12 小时，此时 BSA 作为封闭剂已与囊泡结合，这样囊泡的表面完全被 BSA 所包覆。然后在将同样的试纸条侵入到此溶液中，发现在检测限上无荧光，这可以认为泡囊与 BSA 结合，并被封闭上了。c) 最后将泡囊与乙肝抗原在  $4^{\circ}\text{C}$  冰柜中再反应 12 小时，然后用 BSA 封闭，再重复将相同的试纸条侵入到此溶液中，这时在检测限观察到荧光，由此可确定囊泡已与抗体偶连，并可以用此来进行乙肝病毒的检测。

#### (2) 蔬菜中残留农药的高灵敏度检测。

将培植的抗农药单抗 1 毫克/毫升，滴加于硝酸纤维素膜上 3 微升，空气干燥后采用 1%PEG 封闭，将封闭后的侵入待检测的蔬菜的洗液中，侵入大约 1 小时，经 4 次洗涤后，烘干。再制备的抗农药抗原-荧光复合囊泡偶连体。将含有抗农药单抗的硝酸纤维素膜侵入到上述得到的荧光偶连体物溶液中，在侵 1 小时，再用 PBS 缓冲溶液洗涤 5 次，采用荧光分光光度计探测膜上的荧光强度，以判定蔬菜中农药的含量。

(3) 本发明另一种实施方式是，在制备囊泡的过程中选用了中性磷脂 PC 与负电性的磷脂酰甘油 PG 结合，并按上述制备囊泡的过程制备囊泡，得到的囊泡表面带负电，这种方法直接通过调节 PG 的含量，并不需要调节 PH 即可得到表面带负电的囊泡。其中 PC 的重量含量为 70-80%，PG 为 9-20%，Ch 为 9-20%，PEG 为 0.5%-1%。

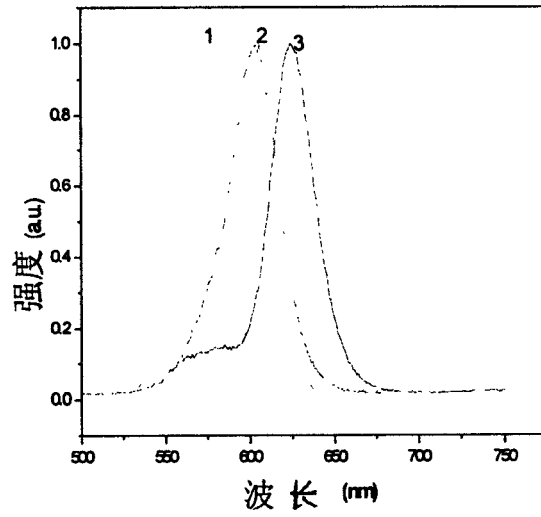


图 1

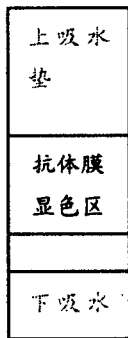


图 2

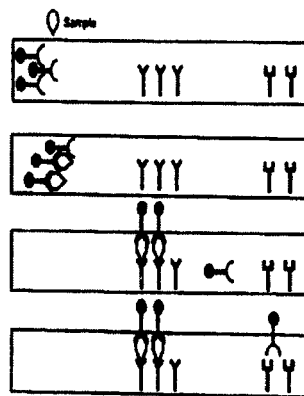


图 3

专利名称(译)	用于荧光免疫检测的CdSe纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1542452A</a>	公开(公告)日	2004-11-03
申请号	CN200310110001.3	申请日	2003-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院长春光学精密机械与物理研究所		
[标]发明人	单桂晔 孔祥贵 冯力蕴		
发明人	单桂晔 孔祥贵 冯力蕴		
IPC分类号	C30B29/48 G01N21/64 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/84		
代理人(译)	李恩庆		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于纳米材料和生物技术领域，是一种用于荧光免疫检测的CdSe纳米晶复合脂质体微囊泡的制备方法。通过合成高荧光特性的半导体材料，选用具有双亲集团的物质并且与生物组织相接近的磷脂类化合物对纳米材料进行包覆，合成用于荧光免疫检测的CdSe纳米晶复合脂质体微囊泡。本发明包括制备油性CdSe半导体纳米晶，复合油性纳米晶囊泡的合成及通过改变pH值来调节表面电位从而使囊泡与生物蛋白通过静电连接等三个步骤。本发明主要是利用免疫层析试纸如硝酸纤维素膜对乙型肝炎病毒，蔬菜中残留农药，以及对毒品的检测。试纸条证明了这种复合荧光囊泡能够用于生物检测，将亲脂性表面CdSe纳米晶进行了相转移并构建使之具有生物相容性。