



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101805483 B

(45) 授权公告日 2012.07.18

(21) 申请号 201010116181.6

(22) 申请日 2010.02.26

(73) 专利权人 光景生物科技(苏州)有限公司
地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街
218 号生物纳米园 A3 楼 224 室

(72) 发明人 何爱民

(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 范晴

(51) Int. Cl.

C08L 33/12(2006.01)

C08L 25/06(2006.01)

C08K 5/56(2006.01)

C08K 5/1545(2006.01)

C08K 5/18(2006.01)

C08K 5/17(2006.01)

C09K 11/02(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/25(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101233191 A, 2008.07.30, 全文.

CN 101316879 A, 2008.12.03, 全文.

CN 101225299 A, 2008.07.23, 全文.

WO 0233419 A1, 2002.04.25, 全文.

US 5958296 A, 1999.09.28, 全文.

审查员 周芳宇

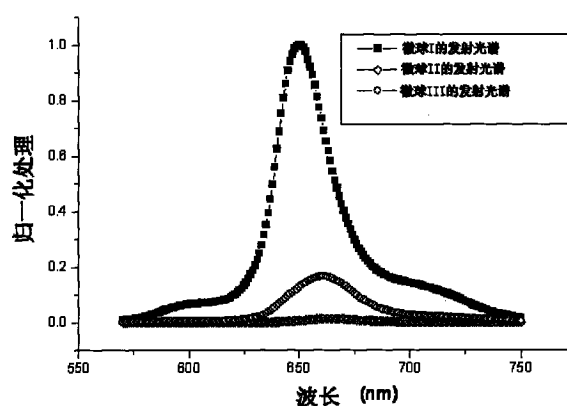
权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 2 页

(54) 发明名称

表面功能化的共振发光微球、含共振发光微球的试剂盒及应用

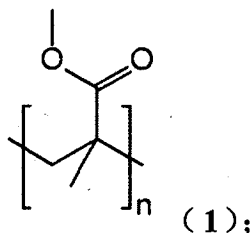
(57) 摘要

本发明公开了一种表面功能化的共振发光微球,包括聚甲基丙烯酸甲酯的聚合物或共聚体、至少两种光致发光分子的混合物;所述微球表面具有一种或一种以上的官能团,所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接,所述表面官能团也可以激活后与配体或生物学大分子进行共价标记。所述共振发光微球的粒径在 40 纳米到 10 微米之间。这些磷光微粒有效地抑制在外界环境下三重态氧与受激发的三重态磷光分子之间的直接相互作用,从而具有强磷光性,甚至在室温条件下,这些微球也能保持相当长时间的磷光性,可以应用于医疗诊断、生物检测、环境监测和食品安全监测以及不同物种检测技术领域。



1. 一种表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述微球包括以下组成:

聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物,所述聚合物形成封装基体,且甲基丙烯酸甲酯单体单元至少占所述共振发光微球的总重量的 50%;所述聚甲基丙烯酸甲酯具有式 (1) 的结构通式:



式 (1) 中, $n > 50$;

所述甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物具有式 (2) 的结构通式:

$A_n B_m$ (2);

式 (2) 中 n, m 大于 50, A 为甲基丙烯酸甲酯单体, B 选自与甲基丙烯酸甲酯单体连接且不包括甲基丙烯酸甲酯单体本身的任何单体;

至少两种光致发光分子的混合物;所述光致发光分子选自磷光分子和荧光分子,所述磷光分子在无氧或低氧环境下产生磷光,所述荧光分子在适当的波长激发下发射荧光,所述混合物中光致发光分子的光谱共振实现能量转移,且光致发光分子均匀分布在所述的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物形成的封装基体中;

所述微球表面具有一种或一种以上的官能团,所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接,或者所述表面官能团激活后与配体或生物学大分子进行共价标记

所述共振发光微球的粒径在 40 纳米到 10 微米之间。

2. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述共振发光微球为核-壳结构的微球;所述共振发光微球的核心包括封装有磷光分子的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物。

3. 根据权利要求 2 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述共振发光微球的外壳包括封装有荧光分子的聚苯乙烯聚合物。

4. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的磷光分子包括有机磷光分子、磷光金属螯合物。

5. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的磷光分子选自与配体螯合的铂,钯,钌,铱,铟,钼,钨,铜,铁,铬,钨,锌,铈螯合物;所述配体选自卟啉及其衍生物,卟吩及其衍生物,多吡啶及其衍生物,吡啶,吡嗪,异烟酰胺,咪唑,双联吡啶,三联吡啶,邻菲罗啉和双吡啶吩嗪;所述配体可为以下有机基团任选取代:烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、羧基、甲酰基、羧胺基、氰基、氨基、羟基、亚氨基、醇羰基、氨羰基、脒、胍、酰胺、含官能团的硫基、含官能团磷基和 N-羟基琥珀酰亚胺羧酸酯基。

6. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的磷光分子选自双[(4,4'-甲氧基)-2,2'联吡啶]2-[3-(4-甲基-2,2'-联吡啶-4基)丙烷基]-1,3-二氧戊环钌(II)、双(2,2'联吡啶)[4-(丁醛)-4'-甲基-2,2'-双吡啶]钌(II)、

双(2,2' 联吡啶)[4-(4' - 甲基 -2,2' - 联吡啶 4' - 基) 丁酸] 钕(II)、三(2,2' 联吡啶) 钕(II)、(2,2' 联吡啶)[双二(1,2- 二苯基膦基) 乙烯]2-[3-(4- 甲基 -2,2' - 联吡啶 4' - 基) 丙基]-1,3- 二氧戊环钐(II)、双(2,2' 联吡啶)[4-(4' - 甲基 -2,2' - 联吡啶 4' - 基) 丁基] 钕(II)、双(2,2' - 联吡啶)[1- 溴 -4(4' - 甲基 -2,2' - 联吡啶 -4- 基) 丁烷] 钕(II)、双(2,2' - 联吡啶) 马来酰亚胺基己酸,4- 甲基 -2,2' - 联吡啶 4' - 丁酰胺钕(II)、铂(二) 四 - 氟苯基卟吩,钯(II) 四 - 氟苯基卟吩。

7. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的磷光分子占所述微球总重量的 0.05%~5%。

8. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的荧光分子选自荧光素及其衍生物、若丹明及其衍生物、Alexa Fluor 系列染料。

9. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述共振发光微球包括以下组成:

聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物,所述聚合物形成封装基体,且甲基丙烯酸甲酯单体单元至少占所述共振发光微球的总重量的 50%;

两种磷光分子的混合物;所述磷光分子在无氧或低氧环境下产生磷光,所述混合物均匀分布在所述的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物形成的封装基体中;

所述微球表面具有一种或一种以上的官能团,所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接,或者所述表面官能团激活后与配体或生物学大分子进行共价标记。

10. 根据权利要求 9 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述两种磷光分子的混合物中第一磷光分子与第二磷光分子的重量比在 0.1~10 范围内。

11. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述共振发光微球包括以下组成:

聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物,所述聚合物形成封装基体,且甲基丙烯酸甲酯单体单元至少占所述共振发光微球的总重量的 50%;

一种磷光分子和一种荧光分子的混合物;所述磷光分子在无氧或低氧环境下产生磷光,所述荧光分子在适当的波长激发下发射荧光,所述混合物均匀分布在所述的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物形成的封装基体中;所述荧光分子的吸收光谱和所述的磷光分子的磷光光谱显著的交叠实现能量转移;

所述微球表面具有一种或一种以上的官能团,所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接,或者所述表面官能团激活后与配体或生物学大分子进行共价标记。

12. 根据权利要求 11 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述一种磷光分子和一种荧光分子的混合物中磷光分子与荧光分子的重量比在 0.1~10 范围内。

13. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的表面官能团选自一种或一种以上的以下基团:羧基,乙醇胺基,羟基,胺基,氨基,亚胺基,环氧基,异氰酸酯基,三聚氰胺基,金属醇盐,水解类甲硅烷基, β -酮酸酯基和聚乙二醇基。

14. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球,其特征在于所述的共振发光

微球还包括一种或一种以上的交联两个或两个以上的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物的交联剂；所述的交联剂占微球总质量的 0.5%~25%。

15. 根据权利要求 14 所述的表面功能化的共振发光微球，其特征在于所述的交联剂选自双功能交联丙烯酸单体、多功能交联丙烯酸单体和双反应丙烯酸单体；所述的双功能交联丙烯酸单体选自乙烯基乙二醇二甲基丙烯酸酯和 1,10-癸烷二甲基丙烯酸酯；所述的多功能交联丙烯酸单体选自季戊四醇三丙烯酸酯和三甲基色氨酸丙烷三丙烯酸酯；所述的双反应丙烯酸单体选自 2-氨基乙基甲基丙烯酸盐氯化物和 2-氰乙基丙烯酸盐。

16. 根据权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球，其特征在于所述共振发光微球还包括一种或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。

17. 根据权利要求 16 所述的表面功能化的共振发光微球，其特征在于所述的生物活性物种选自抗体、抗原、半抗原、核酸、配体、受体、人工多肽、蛋白质、多糖和酶反应物，所述生物活性物种能参与特异性识别和结合反应。

18. 一种权利要求 1 所述的表面功能化的共振发光微球在分析检测和成像方面的应用。

19. 一种试剂盒，其特征在于所述试剂盒包括权利要求 1 所述的共振发光微球，作为分析检测用的探针或标记物。

20. 一种权利要求 19 的试剂盒在免疫检测技术、核酸杂交技术和酶检测技术方面的应用。

21. 一种权利要求 19 的试剂盒在湿化学领域或干化学领域方面的应用。

表面功能化的共振发光微球、含共振发光微球的试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明属于检测技术领域,具体涉及一种利用荧光或磷光的特性进行定性和定量检测的技术,更具体的涉及一种表面功能化的共振发光微球、含共振发光微球的试剂盒和检测装置及应用。

背景技术

[0002] 由于荧光光谱具有高探测灵敏度,目前荧光光谱技术已广泛应用于化学、生物检测和成像等行业。荧光聚合物微球还可以放大信号,使检测灵敏度进一步提高,从而在商业上有非常广泛的应用。然而,传统的荧光检测技术中所用的作为探针的荧光分子和微球具有很多局限性。比如,许多荧光探针和发射器承受着严重的光褪色。大多数的有机荧光探针具有较窄的斯托克频移 (Stoke shifts),从而很难从背景中区分出荧光信号。荧光检测试验往往需要昂贵的光学元件如带通滤波器。这些限制使得传统的荧光检测技术在一些需要非常高探测灵敏度的应用中不尽人意。近 10 年来,时间分辨的荧光检测技术得到了很多的关注,并已被证明在化学检测和生物样品检测领域能提供高灵敏度探测,这是因为与传统的荧光检测技术相比,时间分辨的荧光检测技术具有更低的背景要求和更高的信噪比 (Merio, L. ;Pattersson, K. ;Lovgren, T. Clin. Chem. 1996,42,1513-1517. Harma, H. ;Soukka T. ;Lovgren, T. Clin. Chem. 2001,47,561-568). (Qin, Q. ;Peltola, O. ;Pettersson, K. Clin. Chem. 2003,49,1105-1113. Wang, G. ;Yuan, J. ;Matsumoto, K. ;Hu, Z. Anal. Biochem. 2001,299,169-172. Hai, X. ;Tan, M. ;Wang, G. ;Ye, Z. ;Yuan, J. ;Matsumoto, K. Anal. Sciences, 2004,2,245)。

[0003] 目前只发现了有限种的荧光探针具有足够长的荧光寿命足以明显区分典型背景荧光和散射光。对于构造简单、低成本的时间分辨的荧光检测仪器来说,长荧光寿命也是一个决定性的条件。最为人熟知的适合时间分辨荧光检测技术的荧光探针是铕 (Eu) 螯合探头。铕螯合物和封装有螯合物的纳米微球具有高荧光输出,大斯托克频移 (Stoke shifts) 以及较长的使用寿命,已成功地用于生物化验和医疗诊断中。(Qin,Q. ;Peltola, O. ;Pettersson, K. Clin. Chem. 2003,49,1105-1113. Wang, G. ;Yuan, J. ;Matsumoto, K. ;Hu, Z. Anal. Biochem. 2001,299,169-172. Hai, X. ;Tan, M. ;Wang, G. ;Ye, Z. ;Yuan, J. ;Matsumoto, K. Anal. Sciences, 2004,2,245)。

[0004] 但是,现有的铕螯合物只能在 270 ~ 370nm 被激发。在这个波长范围的强紫外光源并不便宜,而且铕螯合物存在着严重的光褪色现象。此外,大部分的生物样本、食物样本及环境样品对这个波长范围具有很强的吸收,会大大干扰测量。另外,大多数的生物样品能被该范围内紫外线破坏。最近,一些新类型的采用束缚的配体的铕螯合物被合成出来,以增加它们的结合常数和提高荧光的输出。尽管如此,他们仍然有光褪色问题,仍然需要昂贵的紫外线激发光源。铕螯合物也被封装在聚合物微球中来增强化学稳定性和进行信号放大。铕螯合物的聚苯乙烯微球已被商业应用。然而,他们仍然有严重的光褪色问题,以及需要昂

贵的紫外激发光源。

[0005] 相对于普遍应用在分析化学、生物检测、生物成像、医学诊断、食品监测和环境监测领域的荧光检测技术,虽然磷光检测技术也具有很多优点,但磷光光谱还没有应用在这些领域。例如,磷光一般有很长的荧光寿命,对理想的时间分辨发光检测来说消除背景噪声和提高信噪比方面非常理想,可大幅度提高检测灵敏度。有以下两个主要原因导致磷光光谱的应用不足。首先,只发现了有限数量的强磷光发射器;第二,磷光很容易被氧猝灭。氧猝灭磷光对荧光检测技术的实际应用来说是非常不利的,特别是定量分析来说。然而,磷光已被广泛研究其在化学和生物检测和分析上的潜在应用。(Papkovsky, D. B. ;O' Riordan, T. ;Soini, A. Biochem. Soc. Transactions, 2000, 28, 74-77. Hendrix, J. L. U. S. Patent 5, 464, 741 (1995). Sagner, G. ;De Hass, R. ;Gijlswijk. R. ;Tanke, H. U. S. Patent 6, 004, 530 (1999). Sun, B. ;Yi, G. ;Zhao, S. ;Chen, D. ;Zhou., Y. ;Cheng, J. Anal. Lett., 2001, 34, 1627-1637. Scholl, P. F. ;Barger, C. B. ;Phillips, T. E. ;Wong, T. ;Abubaker, S. ;Groopman, J. D. ;Strickland, P. T. ;Benson, R. C. in in-Vitro Diagnostic Instrumentation of Proceedings of SPIE, 2000, 3913, 204-213. Christopoulos, T. K. ;Diamandis, E. P. Anal. Chem. 1992, 64, 342-346. Phimphivong, S. ;Saavedra, S. S. Bioconjugate Chem. 1998, 9, 350-357. Matveeva, E. G. ;Gribkova, E. V. ;Sanborn, J. R. ;Gee, S. J. ;Hammock, B. D. ;Savitsky, A. P. Anal. Lett. 2001, 34, 2311-2320)。令人遗憾的是产生强磷光无一例外都需要无氧的环境。

[0006] 把磷光分子封装在低氧或无氧的基体内也许可以解决氧猝灭的问题。已经发现含卤聚合物可以作为非常好的一个封装磷光分子的基体,以防止明显的磷光猝灭。但是,还没有可以简单地制造单分散的磷光微球的可靠、稳定的方法。聚丙烯腈也被报道是一个封装磷光分子的很好的选择,可以在室温条件下得到强磷光性,这是由于它的低氧渗透性。报道中它们的磷光强度和寿命和相应的无氧环境的磷光分子很相似。O' Riordan, T. C. ;Soini, A. E. ;Papkovsky, D. B. Anal. Biochem. 2001, 290, 366-375. O' Riordan, T. C. ;Soini, A. E. ;Soini, J. T. ;Papkovsky, D. B. Anal. Chem. 2002, 74, 5845. Ponomarev, G. V. ;Vladimirovich, D. ;Meltola, J. J. ;Soini, A. E. U. S. Patent 6, 582, 930 B1 (2003). Kuerner, J. M. ;Klimant, I. ;Krause, C. ;Preu, H. ;Kunz, W. ;Wolfbeis, O. S. Bioconjugate Chemistry, 2001, 12, 883-889. 然而,报道中聚丙烯腈磷光微球非常小,非常容易聚集而难以制造。这些聚丙烯腈磷光微球不交联,并经常有稳定性问题。聚苯乙烯的磷光微球已经商用。然而,聚苯乙烯的磷光微球的磷光性很弱,寿命也较短,这是因为它相对较高的氧渗透性和溶解性。聚苯乙烯的磷光微球不适合用于高灵敏度检测。

[0007] 对时间分辨发光探测技术来说,一种在室温条件下具有长寿命强磷光性,能制造成形状和大小都单分散的,可以具有使生物和化学分子共价标记的表面官能团,并能在紫外线以外的区域被有效激发,以及具有化学和光化学稳定性的磷光分子需求十分迫切。本发明因此而来。

发明内容

[0008] 本发明目的在于提供一种表面功能化的共振发光微球,解决了现有技术中荧光分子发光寿命时间短以及磷光分子易被氧猝灭导致在通常环境下较短寿命的强磷光性以及

荧光分子化学稳定性差等问题。

[0009] 为了解决现有技术中的这些问题,本发明提供的技术方案是:

[0010] 一种表面功能化的具有较长使用寿命的共振发光微球,其特征在于所述微球包括以下组成:

[0011] 聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物,所述聚合物或共聚体形成封装基体,且甲基丙烯酸甲酯单体至少占所述共振发光微球的总重量的 50% ;

[0012] 至少两种光致发光分子的混合物;所述光致发光分子选自磷光分子和荧光分子,所述磷光分子在无氧或低氧环境下产生磷光,所述荧光分子在适当的波长激发下可发射荧光,所述混合物中光致发光分子的光谱共振实现能量转移,且光致发光分子均匀分布在所述的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物形成的封装基体中;

[0013] 所述微球表面具有一种或一种以上的官能团,所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接,所述表面官能团也可以激活后与配体或生物学大分子进行共价标记。

[0014] 本发明也涉及一种共振发光微球,包含作为封装基体的 PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 聚合物和共聚物、至少一个磷光分子和至少一个荧光分子。磷光分子可以在缺氧环境下发射出长寿命的强磷光;荧光分子在适当的波长激发下可发射强荧光。该磷光分子的磷光光谱和荧光分子的吸收光谱有显著的重叠,从而可以允许有效的磷光共振能量转移。磷光分子和荧光分子非常均匀地分布在 PMMA 聚合物基体内。

[0015] 该微球可以至少包含一种能够在低氧气浓度的条件下产生长寿命强磷光的磷光分子。在某些情况下,两种或多种类型的磷光分子被封装入一个微球基体中。磷光分子在整个包含 PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 的基体微球中非常均匀地分布,通常,微球包含占总重量的 0.05%~10% 的磷光分子。

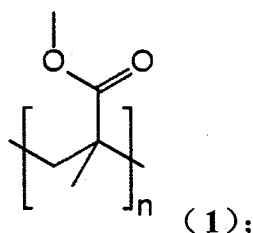
[0016] 优选的,磷光分子占总微球的重量的 0.2%~5%。

[0017] 优选的,所述共振发光微球的粒径在 40 纳米到 10 微米之间。

[0018] 优选的,所述共振发光微球为球形微球。

[0019] 优选的,所述聚甲基丙烯酸甲酯具有式 (1) 的结构通式:

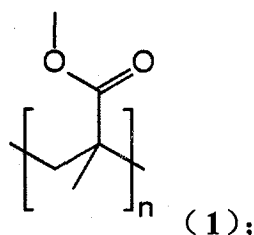
[0020]



[0021] 其中, $n > 50$ 。

[0022] 优选的,所述聚甲基丙烯酸甲酯具有式 (1) 的结构通式:

[0023]



[0024] 其中, $n > 100$ 。

[0025] 优选的,所述甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物具有式(2)的结构通式:

[0026] $A_n B_m$ (2);

[0027] 其中 n, m 大于 50, A 为甲基丙烯酸甲酯单体, B 选自与甲基丙烯酸甲酯单体连接且不包括甲基丙烯酸甲酯单体本身的任何单体。

[0028] 优选的,所述共振发光微球为核-壳结构的微球。

[0029] 优选的,所述共振发光微球的核心包括封装有磷光分子的聚甲基丙烯酸甲酯聚合物。

[0030] 优选的,所述共振发光微球的外壳包括封装有荧光分子的聚苯乙烯聚合物。

[0031] 优选的,所述的磷光分子包括有机磷光分子和有机/无机混合材料、磷光金属螯合物。

[0032] 优选的,所述的磷光分子选自与配体螯合的铂,钯,钌,铱,铟,钼,钨,铜,铁,铬,钨,锌,铈螯合物;所述配体选自卟啉及其衍生物,卟吩及其衍生物,多吡啶及其衍生物,吡啶,吡嗪,异烟酰胺,咪唑,双联吡啶,三联吡啶,邻菲罗啉和双吡啶吩嗪;所述配体可为以下有机基团任选取代:烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、羧基、甲酰基、羧胺基、氰基、氨基、羟基、亚氨基、醇羰基、氨羰基、脒、胍、酰脲、含官能团的硫基、含官能团磷基和 N-羟基琥珀酰亚胺羧酸酯基。

[0033] 优选的,所述的磷光分子选自双[(4,4'-甲氧基)-2,2'联吡啶]2-[3-(4-甲基-2,2'-联吡啶-4-基)丙烷基]-1,3-二氧戊环钌(II)、双(2,2'联吡啶)[4-(丁醛)-4'-甲基-2,2'-双吡啶]钌(II)、双(2,2'联吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-联吡啶-4'-基)丁酸]钌(II)、三(2,2'联吡啶)钌(II)、(2,2'联吡啶)[双二(1,2-二苯基膦基)乙烯]2-[3-(4-甲基-2,2'-联吡啶-4'-基)丙基]-1,3-二氧戊环铱(II)、双(2,2'联吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-吡啶)丁基]钌(II)、双(2,2'-联吡啶)[1-溴-4(4'-甲基-2,2'-联吡啶-4-基)丁烷]钌(II)、双(2,2'-双吡啶)马来酰亚胺基己酸,4-甲基-2,2'-联吡啶-4'-丁酰胺钌(II)、铂(二)四-氟苯基卟吩,钯(II)四-氟苯基卟吩。

[0034] 优选的,所述的磷光分子占所述微球总重量的 0.05%~5%。

[0035] 优选的,所述磷光分子占所述微球总重量的 0.2%~5%。

[0036] 优选的,所述的荧光分子选自荧光素及其衍生物、若丹明(rhodamine)及其衍生物、肾上腺素染料、Alexa Fluor 系列染料。

[0037] 优选的,所述共振发光微球包括以下组成:

[0038] 聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物,所述聚合物或共聚体形成封装基体,且甲基丙烯酸甲酯单体至少占所述共振发光微球的总重量的 50%;

[0039] 两种磷光分子的混合物;所述磷光分子在无氧或低氧环境下产生磷光,所述混合

物均匀分布在所述的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物形成的封装基体中；

[0040] 所述微球表面具有一种或一种以上的官能团，所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接，所述表面官能团也可以激活后与配体或生物学大分子进行共价标记。

[0041] 优选的，所述两种磷光分子的混合物中第一磷光分子与第二磷光分子的重量比在 0.1 ~ 10 范围内。

[0042] 优选的，所述共振发光微球包括以下组成：

[0043] 聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物，所述聚合物或共聚体形成封装基体，且甲基丙烯酸甲酯单体至少占所述共振发光微球的总重量的 50%；

[0044] 一种磷光分子和一种荧光分子的混合物；所述磷光分子在无氧或低氧环境下产生磷光，所述荧光分子在适当的波长激发下可发射荧光，所述混合物均匀分布在所述的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物形成的封装基体中；

[0045] 所述微球表面具有一种或一种以上的官能团，所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接，所述表面官能团也可以激活后与配体或生物学大分子进行共价标记，所述荧光分子的吸收光谱和所述的磷光分子的磷光光谱显著的交叠。

[0046] 优选的，所述一种磷光分子和一种荧光分子的混合物中磷光分子与荧光分子的重量比在 0.1 ~ 10 范围内。

[0047] 优选的，所述的表面官能团选自一种或一种以上的以下基团：羧基，乙醇胺基，羟基，胺基，氨基，亚胺基，环氧基，异氰酸酯基，三聚氰胺基，金属醇盐，水解类甲硅烷基， β -酮酸酯基和聚乙二醇基。

[0048] 优选的，所述的共振发光微球还包括一种或一种以上的交联两个或两个以上的聚甲基丙烯酸甲酯或甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物的交联剂。

[0049] 优选的，所述的交联剂选自双功能交联丙烯酸单体、多功能交联丙烯酸单体和双反应丙烯酸单体。

[0050] 优选的，所述的双功能交联丙烯酸单体选自乙烯基乙二醇二甲基丙烯酸酯和 1,10-癸烷二甲基丙烯酸酯。

[0051] 优选的，所述的多功能交联丙烯酸单体选自季戊四醇三丙烯酸酯和三甲基色氨酸丙烷三丙烯酸酯。

[0052] 优选的，所述的双反应丙烯酸单体选自 2-氨基乙基甲基丙烯酸盐氢氯化物和 2-氰乙基丙烯酸盐。

[0053] 优选的，所述的交联剂占微球总质量的 0.5% ~ 25%。

[0054] 优选的，所述共振发光微球还包括一种或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。

[0055] 优选的，所述的生物活性物种选自抗体、抗原、半抗原、核酸、配体、受体、人工多肽、蛋白质和多糖，所述生物活性物种能参与特异性识别和结合反应。

[0056] 优选的，所述的生物活性物种选自酶反应物。

[0057] 本发明的另一目的在于提供了一种所述表面功能化的共振发光微球在分析检测和成像方面的应用。

[0058] 本发明的又一目的在于提供了一种试剂盒,其特征在於所述试剂盒包括权利要求 1 所述的共振发光微球,作为分析检测用的探针或标记物。

[0059] 本发明的又一目的在于提供了一种试剂盒在免疫检测技术、核酸杂交技术和酶检测技术方面的应用。

[0060] 本发明的又一目的在于提供了一种试剂盒在湿化学领域方面的应用。

[0061] 本发明的又一目的在于提供了一种试剂盒在干化学领域方面的应用。

[0062] 本发明的又一目的在于提供了一种检测装置,其特征在於所述装置内设置共振发光微球为探针或标记物。

[0063] 本发明的又一目的在于提供了一种所述的检测装置在免疫层析方面的应用。

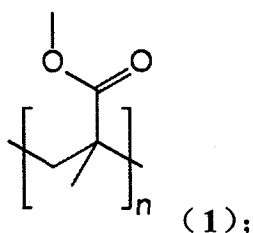
[0064] 封装基体的选择

[0065] 本发明技术方案中所述的封装是指将磷光分子和 / 或荧光分子非常均匀地嵌入在基体中。PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的聚合物和共聚物可指甲基丙烯酸甲酯单体重量超过 50% 的任意聚合物。

[0066] 由于现有技术中还没有理想的磷光微球可以应用于时间分辨磷光检测技术。本发明人经长期研究开发发现了基于 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的共振发光微球,该微球是非常理想的检测器,可以用于时间分辨磷光检测技术。发明人发现,基于 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的共振发光微球除了环境条件下的长使用寿命,还可以很容易地被制造,且具有制备稳定性和良好的单分散性。此外,基于 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的共振发光微球可以很容易用各种官能团和生物物种对微球的表面进行改性,使微球在时间分辨磷光检测技术中成为高灵敏度分析检测和定量测试中的理想标记。

[0067] 本发明涉及的表面功能化共振发光微球中,多种磷光分子和 / 或荧光分子被封装入主要是 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)聚合物或 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)共聚物的聚合物基体中。PMMA 的聚合物和共聚物作为一个封装基体。微球中的 PMMA(甲基丙烯酸甲酯)单体重量占微球总重量的比例从 50% 至 99%。磷光分子被充分均匀地置入微球基体的中心,磷光分子的成分占总体的比例为 10% 或更低。这里的总体是指两个或多个直接物理连接的磷光微球形成的簇。所述聚甲基丙烯酸甲酯具有式 (1) 的结构通式:

[0068]



[0069] 其中, n 为大于 50 的自然数。更优选的, n 为大于 100 的自然数。所述甲基丙烯酸甲酯与其他单体的共聚物具有式 (2) 的结构通式:

[0070] $A_n B_m$ (2);

[0071] 其中 n, m 大于 50, A 为甲基丙烯酸甲酯单体, B 选自与甲基丙烯酸甲酯单体连接且不包括甲基丙烯酸甲酯单体本身的任何单体。

[0072] 当然,本发明人经研究发现,除了 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)聚合物和 / 或 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)共聚物,微球可能还包含 50% 或更少的其他类的基体成分。一

些基体成分也可以采用丙烯酸和甲基丙烯酸的聚合物和共聚物 ;而另一些基体成分可以采用包括具有以下单体的聚合物和共聚物 :氟乙烯,氯乙烯,溴乙烯和乙烯碘化,苯乙烯和丙烯酸。

[0073] 磷光分子的选择

[0074] 可用于封装的磷光分子可以有不同的结构。它们可以是有机化合物、有机 / 无机混合材料, 以及具有有机配体的金属螯合物。适合封装的磷光分子包括、但不局限于与各种配体络合的铂, 钯, 钌, 铱, 铕, 钆, 镱, 铜, 铁, 铬, 钨, 锌, 铈络合物。与这些金属络合的配体包括卟啉及其衍生物, 卟吩及其衍生物, 多吡啶及其衍生物, 吡啶, 吡嗪, 异烟酰胺, 咪唑, 双联吡啶, 三联吡啶, 邻菲罗啉和双吡啶吩嗪。

[0075] 合适的配体可用烷基、取代烷基、芳基、取代芳基、芳烷基、取代芳烷基、羧基、甲醛基、羧胺基、氰基、氨基、羟基、亚氨基、醇羰基、氨羰基、脒、胍、酰脲、含官能团的巯基、含官能团磷基和 N- 羟基琥珀酰亚胺羧酸酯基取代。卟啉及卟吩金属络合物具有耦合成亚甲基桥的吡咯基, 从而形成 具有金属螯合内部空穴的环状结构。许多这样的分子在室温情况下、在适当的溶剂(例如水)中和无氧的环境中能表现出强烈的磷光特性。一些能够表现出磷光特性的卟啉络合物包括但不限于: 铂(II) 粪卟啉 I 和 III、钯(II) 粪卟啉、钌粪卟啉、锌(II) 粪卟啉 I 及其衍生物等等。同样, 一些能够表现出磷光特性的卟吩络合物包括但不限于: 铂(II) 四-氟苯基卟吩, 和钯(II) 四-氟苯基卟吩。

[0076] 如上所述,双吡啶金属络合物也可以用于本发明。一些合适的双吡啶络合物的例子包括但不限于:双[(4,4'-甲酯基)-2,2'-双吡啶]2-[3-(4-甲基-2,2'-双吡啶-4-基)丙基]-1,3-钇(II);双(2,2'-双吡啶)[4-(丁醛)-4'-甲基-2,2'-双吡啶]钇(II);双(2,2'-双吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-双吡啶4'-基)丁酸]钇(II);三(2,2'-双吡啶)钇(II);(2,2'-双吡啶)[双二(1,2-二苯基膦基)乙烯]2-[3-(4-甲基-2,2'-双吡啶4'-基)丙基]1,3-二氧戊环钇(II);双(2,2'-双吡啶)[4-(4'-甲基-2,2'-吡啶)丁基]钇(II);双(2,2'-双吡啶)[1-溴-4(4'-甲基-2,2'-双吡啶-4-基)丁烷]钇(II),双(2,2'-双吡啶)马来酰亚胺基己酸,4-甲基-2,2'-双吡啶4'-丁酰胺钇(II)等等。

[0077] 本发明的技术方案中两种或两种以上的磷光分子在同一微球中,这两种磷光分子要不会相互影响。这两种磷光分子各自独立地发射出磷光。它们可以由相同波长或不同波长的光子激发,可能会放出相同波长或不同波长的光子。它们放射磷光的时长可能相同或明显不同。在许多情况下,优选采用放射磷光的寿命和发射波长有很大不同的情况,从而使它们的磷光放射性可以通过不同的波长和/或寿命来区分出来。例如,光学过滤器可用于分离不同波长的光放射。时间闸技术也可用于分离不同寿命的光放射。在某些情况下,光学过滤器和时间闸技术可以同时使用,以实现不同波长和寿命的光放射分离。

[0078] 荧光分子的选择

[0079] 除了嵌在包含 PMMA 的基体中的磷光分子,微球可能进一步包含一个或多个荧光分子。荧光分子的吸收光谱和上述的磷光分子的吸收光谱有明显的交叠部分,从而能够在荧光分子和磷光分子一同嵌入在微球中时能有效地 进行磷光共振能量转移。为使荧光分子能在微球基体中均匀分布,荧光分子首选采用疏水性的、并与 PMMA 基体相容性良好的荧光分子。有用的荧光分子如:荧光素及其衍生物,若丹明及其衍生物,氟硼荧,由 Molecular

Probes 公司出售的商品名为 Alexa 的荧光染料, Oregon 绿色染料, Texas 红染料, 香豆素染料。

[0080] 表面官能团的选择

[0081] 存在于微球表面的官能团可直接与配体或生物高分子反应, 使这些配体 或生物高分子附着在微球的表面形成共价连接, 或者被激活后和这些分子共价标记。表面官能团优选采用选自羧酸基、乙醇胺基、羟基, 胺基, 氨基, 亚胺基及其它们的组合物组成的亲水性基团。

[0082] 此外, 微球可以有一个以上的表面官能团。这些基团包括, 但不限于: 硫酸盐, 磷酸盐, 羟(基)氢氧基, 羧基, 酯, 酰胺, 脒, 胺, 巯基和乙醛。这些表面基团在修饰该微球的物理性质方面很重要。

[0083] 交联剂的选择和交联方法

[0084] 虽然非交联的 PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 微球已足够适用于一些应用。但在某些应用中, 使用更稳定的交联 PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 微球是更优的选择。在本发明中, 微球可进一步地包含至少一种可以交叉结合两个或更多 PMMA 聚合物的交联剂, 从而使这些微球可以更稳定, 即使在相对恶劣的条件下, 如高温、存在有机溶剂和表面活性剂的情况下也难以降解。这种交联剂通常占微球总重量的 0.5% ~ 25%。

[0085] 目前存在许多可以用于交联 PMMA 聚合物、共聚物或微球其他组分的交联剂, PMMA (聚甲基丙烯酸甲酯) 聚合物和共聚物可通过聚合物部分和部分之间的连接实现直接交联, 或者通过其他单独的桥接或交联材料来实现交联。例如, 包括但不限于: 由比如顺丁烯二酸酐、顺丁烯二酸、反丁烯二酸和甲叉丁二酸等不饱和二酸制成的不饱和聚合物; 或是如聚乙二醇-二(烯丙基碳酸盐)、聚酰亚胺、聚马来酰亚胺的不饱和聚合物; 或是有两个完全相同的反应终点的同源双功能交联剂, 比如双(磺基琥珀酰亚胺)辛二酸盐、双琥珀酰亚胺基酒石酸盐和双磺基琥珀酰亚胺基酒石酸盐; 或是有两个不同的反应终点的异源双功能交联剂, 比如 m-顺丁烯酰胺苯甲酸-N-羟基丁二酰亚胺酯, [N-(E-马来酰亚胺己酸)-琥珀酰亚胺], 以及马来酰亚胺顺丁烯二酰亚胺 PEG 酰肼聚合物, 或是能够交叉连接包含卤素的聚合物的小分子, 其他的连接单元可以包含乙醇胺基、羟基、胺基、氨基、亚胺基、或聚乙二醇基。另一种交联方法是, 通过利用两个或多个 PMMA 共聚物, 其中一个作为主封装基体, 另一个或其他的作为交叉连接用聚合物, 这样的结构同样能产生非常稳定的微球。

[0086] 在本发明的范围内还有一种交联方法, 由包含嵌段共聚物和一个或多个 交联的小分子的一个或多个 PMMA (甲基丙烯酸甲酯嵌段) 共聚物组成的聚合物系统, 嵌段共聚物可为随机嵌段。嵌段共聚物可以从两嵌段、三嵌段、星形嵌段、多嵌段中选择。嵌段和嵌段之间的排列可以是头对尾、头对头、尾对尾这些形式, 且尾端基团连接。其中至少有一个共聚物要有能提供生物制剂结合的亲水基聚合物。例如, 包括但不限于: 甲基异丁烯酸盐[酯]单体和顺丁烯二酸酐单体组成的共聚物, 或是顺丁烯二乙酯单体和反丁烯二乙酯单体组成的共聚物。

[0087] 另一种交联微球的方法是通过磷光材料的交联形成(比如共价耦合的方式), 这种磷光材料可以用包含卤原子的聚合物封装起来。另一种方法是使用含卤原子的磷光材料和一个单独的交联材料。例如采用包括但不限于: 独立使用的主要是基于基础胺反应的交联剂, 如酰亚胺酯和 N-羟基-琥珀酰亚胺酯, 基于巯基反应的交联剂如马来酰亚胺(顺

丁烯二酰亚胺), 卤代乙酰化合物和吡啶基二硫化物; 羰基反应交联剂如等酰肼, 碳化二亚胺, 以及光反应交联剂如 p- 叠氮苯甲酰肼, 4-(p- 叠氮水杨酰胺) 丁胺和 N- 羟基琥珀酰亚胺-4- 叠氮水杨酸。最后, 可以使用一种交联的、含有卤原子的磷光材料。微球的交联可以采用本领域熟知的方法来实现, 比如通过热、光引发和自由基交联。

[0088] 生物活性共振发光微球及其制备

[0089] 本发明涉及的一种生物活性共振发光微球, 可以以共价键形式、也可以物理形式包覆在化学和生物物种表面, 这些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。

[0090] 要么只包含磷光分子, 要么包含作为发射源的磷光分子和荧光分子的微球以微球表面的生物活性物种进行共价标记。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、sacharrides 和多糖的大分子实体。微球表面和生物活性物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整合。这里所指的生物活性物种包括可以参与特定的结合反应或酶反应的任何化学实体。生物活性物种的例子包括: 包含在特定的识别和结合中的分子实体, 比如抗体、抗原 / 半抗原、核酸、配体、受体、人工多肽、蛋白质、多糖。生物活性物种的例子还包括参与酶反应的化学实体, 比如酶作用物。酶作用物的例子包括多肽、核酸、蛋白质、小分子脂、糖和多糖。

[0091] 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表面功能化的微球上。例如, 可以通过使用羧基、氨基、醛、溴乙酰、碘乙酰、硫醇、环氧和其他活性或键合功能基、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, 同时也实现了蛋白质的耦合反应。一个表面官能团也可以作为官能共聚单体的一个组合, 因为微球的表面可以包含表面浓度相对较高的极性基。此外, 虽然微球往往合成被功能化, 在某些情况下, 如聚(苯硫酚)微球可以直接共价键连接蛋白质, 而不需要进一步的修改。例如, 共价键结合生物活性物种到微球上的第一步是用碳化二亚胺激活微球表面的羧基。第二步, 激活的羧基与抗体的氨基反应形成酰胺键。激活和 / 或抗体耦合可以发生在诸如磷酸(盐)缓冲液(PBS)(例如, pH 值 7.2)或 2-(N-吗啉)乙烷磺酸(MES)(例如, pH 值 5.3)的缓冲剂中。由此产生的微球可以与乙醇胺嵌段, 例如, 形成微球结合物。

[0092] 共振发光微球的结构及其制备

[0093] 正于发明人所发现的, 该共振发光微球也可能有核壳结构。核-壳的化学成分可能相同或不同。核可以只装入磷光分子, 壳里面嵌有荧光分子, 反之亦然。一种具体的实现为: 一个核主要包含封装有磷光分子的 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)聚合物和共聚物, 外壳由聚苯乙烯构成。另一种实现为: 核主要包含封装有荧光分子的聚苯乙烯, 壳主要包含封装有磷光分子的 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)聚合物和共聚物。核和壳的相对质量可以改变。优选的方案是所述微球的核心包括封装有磷光分子的聚甲基丙烯酸甲酯聚合物。优选的, 所述微球的外壳包括封装有荧光分子的聚苯乙烯聚合物。

[0094] 目前存在着许多技术可以制作表面功能化的 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的微球。可以采用现知的很多方法将磷光分子和 / 或荧光分子一同纳入到基于 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)的微球中, 比如甲基丙烯酸甲酯单体和包含染料的共聚单体的共聚合, 或在聚合物微球水悬浮液中添加在合适的有机溶剂中的合适的染料衍生物。例如, PMMA(聚甲基丙烯

酸甲酯)的 微球可以自由激发的、单一不饱和的单体的悬液的无氧或低氧性共聚合产生,可能包含或可能不包含如羧基、氨基或羟(基)氢氧基的共价键组,和含有荧光单体的混合物占由适当数量的磷光分子和/或荧光分子的单体总重量的至少 10%。磷光聚甲基丙烯酸甲酯微球也可以通过以下方法来得到:往搅拌的 PMMA 微球的水悬浮液中逐步增加泡在合适的溶液中的荧光染料溶液。

[0095] 表面功能化的共振发光微球可以通过分散聚合技术产生。典型的,甲基丙烯酸甲酯单体、提供表面官能团的其他如甲基丙烯酸的单体、引发剂、诸如 12- 羟基硬脂酸的稳定剂、可能或者可能没有如乙烯基的聚合体的磷光分子和/或荧光分子在一个溶剂系统中都是分散的。排除分散系统的氧气后通过温度升高开始聚合形成微球。当然,分散系统也可以包含可导致的交叉连接的表面功能化微球的交联剂。具体制造微球的分散聚合过程可能会有所不同,这取决于所需要的微球的大小、该磷光分子和荧光分子的溶解性。

[0096] 表面功能化 PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)微球也可由众所周知的乳液聚合来产生。典型的包括,形成含有丙烯酸甲酯单体、其他如提供表面官能团的甲基丙烯酸的单体,可能包含或可能不包含聚合体的磷光和/或荧光分子、如 p- 苯乙烯酯的乳化稳定剂,如过硫酸钾水溶液之类的引发剂的乳液。如果想得到交联微球,乳化系统也可以包含如乙烯乙二醇二甲基丙烯酸酯的交联剂。乳剂聚合反应通过加热进行,得到微球。

[0097] 表面功能化的聚甲基丙烯酸甲酯的微球也可以由将脂溶性的、但微溶于水的磷光分子和/或荧光分子封装入预先制成的表面功能化的空聚甲基丙烯酸甲酯微球中,或通过膨胀技术使它要么不交叉连接,要么交叉连接。这种方法的一大好处是可以预先准备具有预期特性的统一的聚合体微球,通过仔细地优化程序,然后加入精选的荧光染料系列。此外,基于溶液的添加程序提供了很大的灵活性,可以调整染料的相对浓度,相对浓度是实现高效率的能量转移时的一个关键参数。在某些情况下,这可能是得到理想的微球的首选方法。这种技术的典型步骤包括,首先通过使用一个包括水和诸如丙酮和二氯甲烷的有机溶液的溶剂系统,使要么不交联要么交联的空白表面功能化聚甲基丙烯酸甲酯的微球溶胀。溶胀系统可能还包含其他物种,如用以保护溶胀的 PMMA 微球的表面活性剂。在 PMMA 微球溶胀后,加入磷光分子和/或荧光分子,使分子能穿透进入到溶胀的微球内。去除溶胀溶剂驱动磷光分子和/或荧光分子进入微球内。另一种驱动磷光分子和/或荧光分子到微球内的方法为在反应体系中加入水等溶剂降低溶剂与磷光分子和/或荧光分子的亲性(亲脂性)。

[0098] 无论封装的微球是以何种技术形成的,它们的形状一般不同。具体的可以是,例如微球呈球形。但是,应了解,其他形状也是可能的,如平板状、棒状、圆盘状、条状、管状、和其他不规则形状等,此外,微球的大小可能也不同。例如微球的平均大小(比如直径)可以从纳米到 0.1 微米到约 100 微米,一种具体的情况是从大约 0.1 微米到 50 微米左右,另一种具体的情况是从约 1 微米到大约 10 微米。例如,微米级微球通常是人们想要得到的。当利用时,这样的“微米尺度”微球可能具有约 1 微米到 1000 微米的平均尺寸,在某种具体的情况时,从约 1 微米至 100 微米左右,在某种具体的情况时,从 1 微米到 10 微米。同样,纳米微球也可以被利用。这种纳米级微球可能具有约 0.1 纳米至约 10 纳米的平均尺寸,在某种具体的情况时,从大约 0.1 纳米到 5 纳米,而且在某种具体的情况时,约 1 纳米至 5 纳米大小。

[0099] 共振发光微球的用途

[0100] 由于长寿命的磷光分子具有强磷光性,可以应用于时间分辨磷光检测技术,这种表面功能化微球是检测核酸(如 RNA 和 DNA)、蛋白质、多肽、微生物、酶、抗原、抗体、病毒、半抗原、和其他化学物质的理想试剂。使用微球的时间分辨磷光检测技术可以匹敌同位素放射性检测试剂的检测灵敏度,还具有最小的毒性和高稳定性。这个检测技术的灵敏度高于传统的荧光检测,这是因为时间分辨磷光检测技术具有较低的背景干扰,显著提高信号/噪声比,特别是非常复杂的样品,诸如检测生物样本,包括组织、食物样本、血样和环境样品。

[0101] 该微球可以作为结合试验中的检测任何物种的标记物。多种多样的结合试验中使用的各种标记物,包括放射性同位素、荧光分子、荧光微球、酶和有色微球。这些标签可以用本发明的微球取代。采用微球后可以提高许多不同类型的结合试验的检测灵敏度,包括核酸杂交化验,抗体抗原结合试验,抗体半抗原为基础的化验,和糖蛋白-凝集素结合化验。为了提供一个检测信号,在结合反应中一个或多个微球被附着于物种上,形成微球标记探针。或者一个或多个结合的组分附着到一个单一的微球上。附着一项结合组分到微球上通常通过使用特异性识别并紧密结合的成对分子来实现。比如,特异性结合成对的部分(如抗生物素蛋白和生物素,或地高辛和抗地高辛抗体)。其中的一个组分要么直接耦合或者通过连接分子耦合到另一个结合组分上。微球标记的探针可以用于很宽范围的结合检验试验中,包括夹心法检测和竞争法检测。

[0102] 一个典型的用微球标记探针的夹心结合实验包括:(1)固定一个结合的部分(例如,一个抗体或一个核酸低聚物)特别是为了在固体基质上的感兴趣的分析物(如抗原或基因组 DNA 或 RNA)的情况。(2)孵化一个含有分析物的样本,以便与固定的部分结合。(3)去除留下来的样本的非结合的其他组成部分;(4)孵化微球标记探针,使在微球上的一个结合部分(例如,抗体识别抗原的一个不同的抗原决定基,或其他核酸低聚物补充与分析物的 DNA 或 RNA 不同的序列)与分析物结合;(5)去除没有结合的微球标记探针;(6)用脉冲激发光测量从结合微球标记探针中发出的时间分辨的磷光信号;(7)与标准曲线比较,从而得到分析物的浓度和数量的信息。当然,其他类型的夹心结合实验形式和程序也适用于使用微球标记探针。

[0103] 微球标记探针也可以用于取代通常用于荧光竞争结合试验的荧光探针,例如竞争免疫检测。与用荧光探针测量荧光信号不同,从捕获的微球标记探针中测量得到时间分辨的磷光,与标准曲线相比,获得样本中分析物的数量。

[0104] 除了应用于溶液的结合化验,微球标记探针也可用于干化学的结合化验。例如,微球标记的探针可以在基于膜的横向流动免疫测定中取代有色微球联合(如金微球或乳胶微球)。微球标记的探针也可以在得到分析物量化情况的基于膜的横向流动免疫测定中取代荧光微球联合。胜于在侧流试验装置的检测线上测量被捕获的有色微球或被捕获的荧光微球的荧光的吸收率或是反射率,时间分辨荧光用于被捕获的微球探针的测量。

附图说明

[0105] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

[0106] 图 1 为在室温环境条件下,悬浮在水中的 PMMA 铂微球(微球 I)和 悬浮在水中的

PMMA 荧光微球（微球 II）的激发光谱和发射光谱；在 650nm 处收集微球 I 的激发光谱，在 680nm 处收集微球 II 的激发光谱。微球 I 的发射光谱在 395nm 处收集，微球 II 的发射光谱在 630nm 处采集；

[0107] 图 2 为实施例 1～3 制备的三种微球的时间分辨发射光谱，以 650nm 处收集的微球 I 的发射强度作为相对发光强度进行均一化处理。

具体实施方式

[0108] 以下结合具体实施例对上述方案做进一步说明。应理解，这些实施例是用于说明本发明而并不限于限制本发明的范围。实施例中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。

[0109] 实施例 1 含有磷光分子的磷光微球（微球 I）的制备

[0110] 取 Polysciences 公司产的聚甲基丙烯酸甲酯微粒（2.7%，0.324 μm）5ml，清洗离心后在 10 毫升超纯水中悬浮超声。加入含聚乙烯醇 15 毫克的 0.5 毫升水，搅拌 2 分钟。然后，加入含 8 毫克的十二烷基硫磺酸钠的 0.5 毫升水，并混合 2 分钟。然后加入 20 毫升乙醇，搅拌 5 分钟。

[0111] 通过注射器缓慢加入含 1 毫克的 Pt-TMFPP (platinum(II) tetra-meso-fluorophenylporphine) 750ul 二氯甲烷，加入时间可以超过 5 分钟，继续搅拌 5 分钟。通过注射泵以 0.5ml/minute 速度加入水 25 毫升，然后空气气流去除一些溶剂定容到 30 毫升。对微球进行离心去除上清液，用 90% 醇清洗 3 遍，清洗后的微球用 50 毫升水悬浮。

[0112] 实施例 2 含有荧光受体的荧光微球（微球 II）的制备

[0113] 取 Polysciences 公司产的聚甲基丙烯酸甲酯微粒（2.7%，0.324 μm）5ml，清洗离心后在 10 毫升超纯水中悬浮超声。加入含聚乙烯醇 15 毫克的 0.5 毫升水，搅拌 2 分钟。然后，加入含 8 毫克的十二烷基硫磺酸钠的 0.5 毫升水，并混合 2 分钟。然后加入 5 毫升乙醇，搅拌 5 分钟。通过注射器缓慢加入含 1 毫克的荧光分子 (6-(((4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-yl)styryloxy)acetyl)amino)hexanoic acid) 的 750ul 二氯甲烷，加入时间可以超过 5 分钟，继续搅拌 5 分钟。通过注射泵以 0.5ml/minute 速度加入水 25 毫升，然后空气气流去除一些溶剂定容到 30 毫升。对微球进行离心去除上清液，用 90% 醇清洗 3 遍，清洗后的微球用 30 毫升水悬浮。

[0114] 实施例 3 共振发光微球的制备（聚甲基丙烯酸甲酯钯微球）：

[0115] 取 Polysciences 公司产的聚甲基丙烯酸甲酯微粒（2.7%，0.324 μm）5ml，清洗离心后在 10 毫升超纯水中悬浮超声。加入含聚乙烯醇 15 毫克的 0.5 毫升水，搅拌 2 分钟。然后，加入含 8 毫克的十二烷基硫磺酸钠的 0.5 毫升水，并混合 2 分钟。然后加入 5 毫升乙醇，搅拌 5 分钟。通过注射器缓慢加入含 1 毫克的 1 毫克荧光分子 (6-(((4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-yl)styryloxy)acetyl)amino)hexanoic acid) 和 1 毫克 Pt-TMFPP (platinum(II) tetra-meso-fluorophenylporphine) 的 750ul 的二氯甲烷，加入时间可以超过 5 分钟，继续搅拌 5 分钟。通过注射泵以 0.5ml/minute 速度加入水 25 毫升，然后空气气流去除一些溶剂定容到 30 毫升。对微球进行离心去除上清液，用 90% 乙醇清洗 3 遍，清洗后的微球用 30 毫升水悬浮。

[0116] 实施例 4 微球的物性检测

[0117] 1、微球 I 和微球 II 的激发和发射光谱：

[0118] 取实施例 1 和 2 制备的 10 μ l 微球 I、II，悬浮在 750 μ l 水中进行检测，在 650nm 处收集微球 I 的激发光谱，在 680nm 处收集微球 II 的激发光谱。微球 I 的发射光谱在 395nm 处收集，微球 II 的发射光谱在 630nm 处采集，如图 1 所示。

[0119] 2、微球 I、II、III 的时间分辨发射光谱

[0120] 取 20 μ l 实施例 1, 2 和 3 制备的微球 I、微球 II 和微球 III，分别悬浮在 750 μ l 水中进行检测，得到的参数绘制成时间 - 发射光谱变化曲线。检测的条件是：样品的激发波长为 395nm，延迟的时间为 0.04ms，样本窗口为 2 μ s，每闪时间是 50 μ s，收集 10 个脉冲的发射光谱，收集 5 次取其均值。用 650nm 处收集的微球 I 的发射强度作为相对发光强度进行均一化处理。如图 2 所示，微球 I 在 650nm 处延迟后 40 μ s 明显产生强烈发射的谱峰。微球 II 在 665nm 处延迟 40 μ s 基本上没有发射强度。微球 III 在 661nm 处延迟 40 μ s 后产生强烈发射的谱峰。在延迟 40 μ s 后磷光分子将能量转移给荧光分子产生微球 III 所示的谱峰。

[0121] 上述实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是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做的等效变换或修饰，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

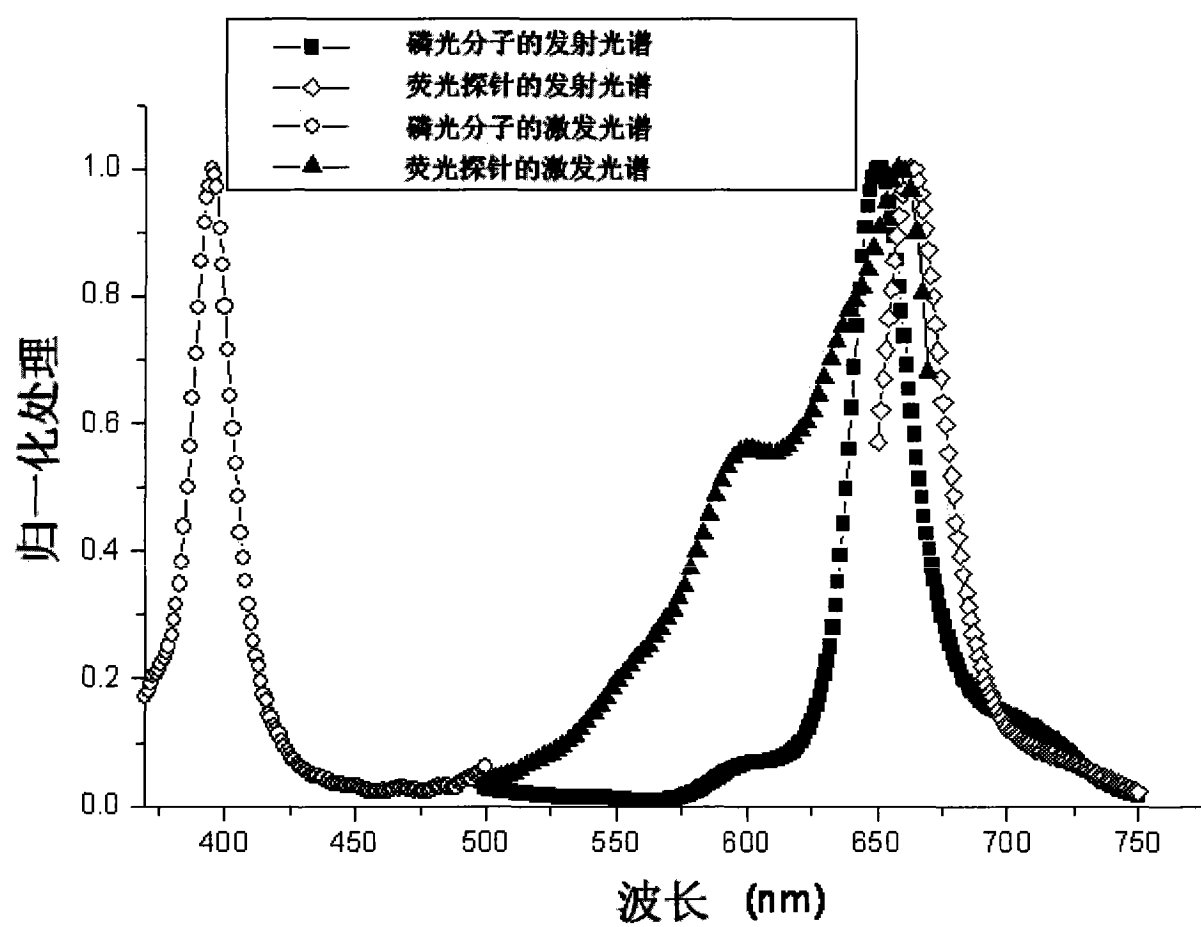


图 1

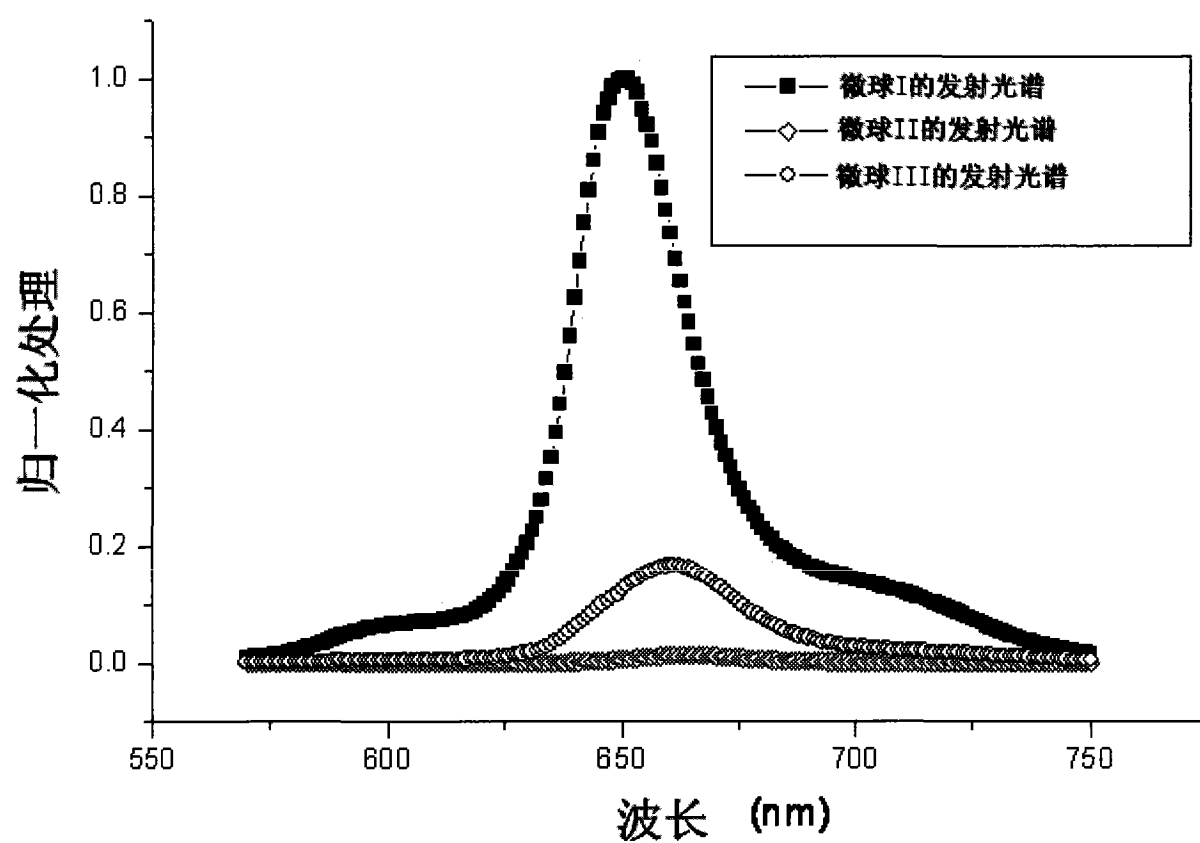


图 2

专利名称(译)	表面功能化的共振发光微球、含共振发光微球的试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN101805483B	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201010116181.6	申请日	2010-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	光景生物科技(苏州)有限公司		
申请(专利权)人(译)	光景生物科技(苏州)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	光景生物科技(苏州)有限公司		
[标]发明人	何爱民		
发明人	何爱民		
IPC分类号	C08L33/12 C08L25/06 C08K5/56 C08K5/1545 C08K5/18 C08K5/17 C09K11/02 C09K11/06 G01N21/64 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/25		
代理人(译)	范晴		
其他公开文献	CN101805483A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种表面功能化的共振发光微球，包括聚甲基丙烯酸甲酯的聚合物或共聚体、至少两种光致发光分子的混合物；所述微球表面具有一种或一种以上的官能团，所述官能团直接与配体或生物学大分子反应形成微球表面的共价键连接，所述表面官能团也可以激活后与配体或生物学大分子进行共价标记。所述共振发光微球的粒径在40纳米到10微米之间。这些磷光微粒有效地抑制在外界环境下三重态氧与受激发的三重态磷光分子之间的直接相互作用，从而具有强磷光性，甚至在室温条件下，这些微球也能保持相当长时间的磷光性，可以应用于医疗诊断、生物检测、环境监测和食品安全监测以及不同物种检测技术领域。

