



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105324667 A

(43) 申请公布日 2016.02.10

(21) 申请号 201480034863.9

(22) 申请日 2014.04.23

(30) 优先权数据

2013-128412 2013.06.19 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015.12.18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2014/061407 2014.04.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/203614 JA 2014.12.24

(71) 申请人 柯尼卡美能达株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 乡田秀树 高桥优 高梨健作

冈田文德

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

代理人 张涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

B82Y 5/00(2006.01)

B82Y 30/00(2006.01)

B82Y 40/00(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页 附图1页

(54) 发明名称

生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法

(57) 摘要

本发明提供一种生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法,其包括:若 pH7.0 下的 Zeta 电位为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的荧光纳米粒子或 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  范围的荧光纳米粒子,则可在通常带负电的生物体分子和荧光纳米粒子之间产生适度的电排斥力。其结果,可抑制荧光纳米粒子和生物体分子的非特异性结合,可通过超过所述电排斥力的相互作用使荧光纳米粒子和染色对象的生物体分子特异性地结合,可提高特定的染色对象的生物体分子的可视性。另外,荧光纳米粒子彼此之间也产生适度的电排斥力,因此,可抑制它们的凝聚,也可维持染色液的分散性。

1. 一种荧光纳米粒子,其是用于对生物体分子进行荧光染色的荧光纳米粒子,其具备:具有荧光色素的色素树脂粒子、和待与染色对象的生物体分子发生特异性结合的生物体分子识别分子,所述荧光纳米粒子在 pH7.0 的水中的 Zeta 电位为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$ 。

2. 一种荧光纳米粒子,其是用于对生物体分子进行荧光染色的荧光纳米粒子,其具备:具有荧光色素的色素树脂粒子、和待与染色对象的生物体分子发生特异性结合的生物体分子识别分子,所述荧光纳米粒子在 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的范围。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的荧光纳米粒子,其中,具有荧光色素的色素树脂粒子的表面使用能够调节所述 Zeta 电位的化合物进行了化学修饰。

4. 根据权利要求 3 所述的荧光纳米粒子,其中,所述化学修饰如下进行:使用具有氨基的化合物向所述色素树脂粒子导入氨基后,使 PEG 结合于该氨基,再使生物体分子识别分子结合于该 PEG。

5. 根据权利要求 4 所述的荧光纳米粒子,其中,所述具有氨基的化合物在与所述色素树脂粒子结合的状态下具有 1 个或 2 个以上游离的氨基。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的荧光纳米粒子,其中,所述 PEG 的氧亚乙基单元 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ ) 的个数为 4  $\sim$  24。

7. 根据权利要求 4  $\sim$  6 中任一项所述的荧光纳米粒子,其中,所述具有氨基的化合物为 1,2-双(2-氨基乙氧基)乙烷(BAEE)或三(2-氨基乙基)胺(TAEA)。

8. 根据权利要求 3  $\sim$  7 中任一项所述的荧光纳米粒子,其中,所述色素树脂粒子的树脂为三聚氰胺树脂。

9. 根据权利要求 8 所述的荧光纳米粒子,其中,经由与 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫基乙酸酯(SATA)或 2-亚氨基四氢噻吩的反应而得到的链霉亲和素作为所述生物体分子识别分子结合在所述色素树脂粒子上。

10. 根据权利要求 1  $\sim$  9 中任一项所述的荧光纳米粒子,其中,所述染色为免疫染色。

11. 一种荧光纳米粒子的染色液,其经由使权利要求 1  $\sim$  10 中任一项所述的荧光纳米粒子分散于缓冲液的工序而得到。

12. 根据权利要求 11 所述的染色液,其还含有蛋白质或表面活性剂的至少任一方。

13. 根据权利要求 1  $\sim$  10 中任一项所述的荧光纳米粒子,其平均粒径为 40nm 以上且 200nm 以下。

14. 一种荧光纳米粒子的制造方法,其是权利要求 1  $\sim$  10 中任一项所述的荧光纳米粒子的制造方法,其具有如下工序:通过对内包有荧光色素或表面固定有荧光色素的色素树脂粒子的表面进行化学修饰,对所述色素树脂粒子赋予在 pH7.0 的水中以荧光纳米粒子整体计为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的 Zeta 电位。

15. 一种荧光纳米粒子的制造方法,其是权利要求 1  $\sim$  10 中任一项所述的荧光纳米粒子的制造方法,其具有如下工序:通过对内包有荧光色素或表面固定有荧光色素的色素树脂粒子的表面进行化学修饰,对所述色素树脂粒子赋予在 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中以荧光纳米粒子整体计为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的 Zeta 电位。

## 生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法。

### 背景技术

[0002] 在病理诊断中,实施被称为免疫染色的用于确认标本的分子信息表达的分子靶染色来进行诊断基因或蛋白的表达异常这样的功能异常的免疫观察。免疫染色使用例如使用了酶的色素染色法(DAB染色等)。然而,DAB染色这样的利用酶标记进行的染色存在如下技术问题:染色浓度主要受温度、时间等环境条件影响,因此,难以由染色浓度估计实际的抗体等的量。因此,在病理诊断的免疫观察中,进行使用荧光标记体的荧光标记法代替利用酶标记的染色。该方法与DAB染色相比,具有定量性优异的特征。荧光标记法使用经过荧光色素修饰的抗体对作为对象的抗原进行染色来进行观察,由此,测量抗原量。

[0003] 作为用于荧光标记的染色液已知:含有使作为生物体分子识别分子的链霉亲和素与三聚氰胺树脂粒子直接结合的荧光纳米粒子的染色液(例如参照专利文献1、2)。该荧光纳米粒子被用于生物体分子的检测。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特表2008-543982号公报

[0007] 专利文献2:国际公开W02013/035703

### 发明内容

[0008] 发明所要解决的技术问题

[0009] 但是,在使用专利文献1、2的荧光纳米粒子进行免疫染色的情况下,存在不论组织上的抗原量,荧光纳米粒子均非特异性地结合于细胞核等这样的问题。特别是若为了进行高灵敏度的免疫染色而以高浓度使用荧光纳米粒子,则容易产生这样的非特异性的结合。

[0010] 本发明的目的在于提供一种可抑制与染色对象外的生物体分子发生非特异性结合的生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法。

[0011] 用于解决技术问题的技术方案

[0012] 为了实现上述目的中的至少一个,反映本发明的一方面的荧光纳米粒子为用于对生物体分子进行染色的荧光纳米粒子,其具备具有荧光色素的色素树脂粒子和待与染色对象的生物体分子发生特异性结合的生物体分子识别分子,所述荧光纳米粒子在pH7.0的水中的Zeta电位为 $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$ 。

[0013] 为了实现上述目的中的至少一个,反映了本发明的一方面的另一荧光纳米粒子为用于对生物体分子进行荧光染色的荧光纳米粒子,其具备具有荧光色素的色素树脂粒子、和待与染色对象的生物体分子发生特异性结合的生物体分子识别分子,所述荧光纳米粒子在pH6.0~8.0的缓冲液中的Zeta电位为 $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$ 的范围。

[0014] 为了实现上述目的中的至少一个,反映了本发明的一方面的上述荧光纳米粒子的制造方法具有如下工序:通过对内包有或表面固定有荧光色素的色素树脂粒子的表面进行化学修饰,对所述色素树脂粒子赋予在 pH7.0 的水中以荧光纳米粒子计为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的 Zeta 电位。

[0015] 为了实现上述目的中的至少一个,反映了本发明的一方面的上述荧光纳米粒子的制造方法具有如下工序:通过对内包有或表面固定有荧光色素的色素树脂粒子的表面进行化学修饰,对所述色素树脂粒子赋予在 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中以荧光纳米粒子整体计为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的 Zeta 电位。

[0016] 发明的效果

[0017] 根据本发明,通过将荧光纳米粒子的 Zeta 电位调节至特定范围的负值,与通常带负电的生物体分子之间可产生适度的电排斥力。其结果,可抑制荧光纳米粒子与生物体分子的非特异性结合,可通过超过所述电排斥力的相互作用使荧光纳米粒子和染色对象的生物体分子特异性结合,可提高特定的染色对象的生物体分子的可视性。另外,荧光纳米粒子彼此之间也产生适度的电排斥力,因此,可抑制它们的凝聚,也可维持染色液的分散性。

#### 附图说明

[0018] 图 1(A) 是使用了比较例 1 的荧光纳米粒子的非特异性结合的评价试验的图像。确认到大量亮点,表示大量产生荧光纳米粒子向细胞核的非特异性结合。(B) 为表示使用了实施例 1 的荧光纳米粒子的非特异性结合的评价试验的结果的图像。未确认到亮点,表示荧光纳米粒子向细胞核及组织整体的非特异性结合得到抑制。(C) 为使用了实施例 7 的荧光纳米粒子的免疫染色图像。可以确认在抑制向细胞核的非特异性结合的同时荧光纳米粒子适当地结合于目标生物体分子 (HER2)。(D) 为使用了实施例 6 的荧光纳米粒子的免疫染色图像。与 (c) 同样,可以确认在抑制向细胞核的非特异性结合的同时荧光纳米粒子适当地结合于目标生物体分子 (HER2),但其亮点数稍少于 (C)。

#### 具体实施方式

[0019] 本发明的荧光纳米粒子为用于对生物体分子进行荧光染色的荧光纳米粒子,其具备具有荧光色素的色素树脂粒子、和会与染色对象的生物体分子发生特异性结合的生物体分子识别分子,所述荧光纳米粒子在 pH7.0 的水中的 Zeta 电位为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$ 。

[0020] 另外,本发明的另一荧光纳米粒子为用于对生物体分子进行荧光染色的荧光纳米粒子,其具备具有荧光色素的色素树脂粒子和与染色对象的生物体分子特异性结合的生物体分子识别分子, pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的范围。

[0021] (荧光纳米粒子)

[0022] 本发明中所使用的荧光纳米粒子如上所述包含具有染色用的荧光色素且表面经过化学修饰的色素树脂粒子和对作为染色对象的生物体分子进行分子识别并进行特异性结合的生物体分子识别分子,且在染色环境 pH 下具有特定的范围的负的 Zeta 电位。

[0023] “生物体分子”包含细胞核、核糖体、高尔基体等细胞器和存在于细胞内或细胞表面的其它的各种蛋白质等。这些通常通过核酸(核苷酸)所具有的磷酸基或氨基酸的侧链中含有的带电的官能团而在中性 pH 区域带负电。因此,具有负的 Zeta 电位的荧光纳米粒

子和带负电的生物体分子互相电排斥,不易产生非特异性结合。

[0024] 另一方面,荧光纳米粒子通过具备会与作为染色对象的生物体分子发生特异性结合的生物体分子识别分子,其能够以超过上述的电排斥力的较强的相互作用,与作为染色对象的生物体分子结合。

[0025] 因此,通过将 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位调节为特定的负的范围(-10mV ~ -60mV),能够防止荧光纳米粒子与生物体分子发生非特异性结合,并且与作为染色对象的生物体分子发生特异性地结合,可提高荧光染色的可视性。另外,通过将 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位调节为特定的负的范围(0mV ~ -10mV),也可以提高荧光染色的可视性。

[0026] 如上所述由于采用“在染色环境 pH 下具有特定的范围的负的 Zeta 电位的”荧光纳米粒子,因此,本发明中所使用的荧光纳米粒子的 Zeta 电位设定为在中性、即 pH7.0 的水中的环境下为 -10mV ~ -60mV 的范围,或设定为在 pH6.0 ~ 8.0 的 PBS 等 pH 缓冲液中的环境下为 0mV ~ -10mV。作为缓冲液,例如可以举出:选自磷酸缓冲生理盐水(PBS)、Tris-HCl 缓冲液、及磷酸缓冲液(除 PBS 以外)中的 1 种以上。

[0027] 具有如上所述范围的 Zeta 电位的荧光纳米粒子对于进行生物体分子的染色的 pH 环境下,例如 pH 为 6.0 ~ 8.0、优选 pH 为 6.9 ~ 7.6 的范围下的使用而言是优选的。

[0028] 若 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位大于 -10mV 则与染色对象外的生物体分子(例如细胞核)之间发生作用的排斥力弱,无法充分地防止非特异性结合,因此,改善可视性的效果不足。另外,由于在荧光纳米粒子彼此之间起作用的电排斥力也变弱,因此,试剂的分散性也变差。若 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位小于 -60mV,则由于与带正电的生物体分子发生非特异性结合等而导致向组织整体的吸附(亮点数)过度,改善可视性的效果也不足。

[0029] 另一方面,若 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位为 0mV ~ -10mV 的范围外,则即使进行染色也无法得到足够的亮点。需要说明的是,荧光纳米粒子的 Zeta 电位可使用一般的 Zeta 电位测定装置(例如“Zetasizer Nano”、Malvern 公司制造)测定。

[0030] 通常,存在多种有可能引起非特异性结合的染色对象外的生物体分子,但带负电的程度根据生物体分子的种类或 pH 环境的不同而不同,根据染色对象(组织切片等),适当调节荧光纳米粒子的 Zeta 电位,使防止非特异性结合、提高可视性的效果变得极高。例如,在染色对象外的生物体分子中非特异性结合特别成为问题的细胞核的关系中,最优选调节荧光纳米粒子的 Zeta 电位,使得能够抑制非特异性结合。

[0031] pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位如后述的荧光纳米粒子的制造方法的添加工序中所示,优选通过在色素树脂粒子的表面添加可调节该表面的 Zeta 电位的化合物的化学修饰来将该表面的 Zeta 电位设定为上述的范围。此时,pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位除色素树脂粒子及生物体分子识别分子以外,还基于为了上述化学修饰而使用的试剂、例如氨基导入试剂及 PEG 化试剂的电荷或分子尺寸等而总体地调整。

[0032] 但是,本发明并不限于这样的实施方式,若可仅通过色素树脂粒子及生物体分

子识别分子就能够将 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位设定为上述范围,则无需使用这样的化学修饰。

[0033] 另一方面,pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位可通过相对于缓冲液含有指定量蛋白质 (BSA 等)、表面活性剂 (吐温 20 (注册商标) 等)、防腐剂 (叠氮化钠等) 等可调节 Zeta 电位的其它化合物中的 1 种或 2 种以上来进行总体的调节,使其落入 0mV ~ -10mV 的范围。但是,若上述 Zeta 电位落入 0mV ~ -10mV 的范围,则无需使用这样的化合物。

[0034] < 色素树脂粒子 >

[0035] 作为构成本发明的荧光纳米粒子的要素之一的色素树脂粒子是粒子中内包有荧光色素或粒子表面上固定有荧光色素并且直径为纳米级的树脂粒子。

[0036] 作为以色素树脂粒子为主而构成的树脂,可以使用如下所述的热塑性树脂或热固性树脂。作为热塑性树脂,例如可优选使用聚苯乙烯、聚丙烯腈、聚吡喃、或与其相似的树脂。作为热固性树脂,例如可以举出:聚二甲苯、聚乳酸、甲基丙烯酸缩水甘油酯、聚三聚氰胺、聚脲、聚苯并胍胺、聚酰胺、酚醛树脂、多糖类或与其相似的树脂。从通过使用二甲苯等有机溶剂的脱水、澄清、封入等处理,可抑制色素树脂中内包的色素的溶出方面出发,热固性树脂特别优选三聚氰胺树脂。

[0037] 色素树脂粒子需要具备用于使其表面至少直接或间接地与生物体分子识别分子结合的官能团;或者具备用于使色素树脂粒子与为了进一步调节 pH7.0 的水中荧光纳米粒子的 Zeta 电位或 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位的通常的化合物 (化学修饰剂) 结合的官能团。

[0038] 作为这样的指定的官能团,可利用与本发明所属的技术领域中使各种生物体分子彼此结合的情况同样的官能团,但优选例如环氧基及氨基。

[0039] 用于使生物体分子识别分子结合的官能团和用于调节 Zeta 电位的化合物 (化学修饰剂) 结合的官能团可以为相同的种类,也可以为不同的种类。

[0040] 具有上述指定的官能团的色素树脂粒子的制备方法没有特别限定,但可以使用如下方法:例如,可以使用预先在侧链具有上述指定的官能团的 (共) 单体作为用于合成构成色素树脂粒子的热塑性树脂或热固性树脂的单体,并进行 (共) 聚合;或者,在合成热塑性树脂或热固性树脂后,对构成其的树脂单体单元所具有的官能团进行试剂处理而转换成上述指定的官能团的方法。

[0041] 在制造热塑性的色素树脂粒子的情况下,可以举出下列实施方式:使用甲基丙烯酸缩水甘油酯作为单体并与苯乙烯一起进行共聚来制造在表面上具有环氧基的聚苯乙烯类树脂的色素树脂粒子;或者,使苯乙烯羧酸或苯乙烯磺酸与苯乙烯一起进行共聚来制造在表面具有羧酸、磺酸的聚苯乙烯类树脂的色素树脂粒子的实施方式;或者,使氨基磺酸与苯乙烯一起进行共聚来制造在表面具有氨基的聚苯乙烯类树脂的色素树脂粒子。另外,上述甲基丙烯酸缩水甘油酯具有的环氧基可通过指定的处理转换为氨基。

[0042] 另一方面,在制造热固性的色素树脂粒子的情况下,可以列举通过使用三聚氰胺树脂原料 (例如三和 chemical 株式会社制造的 MX035) 作为单体并进行共聚来制造在表面具有氨基的三聚氰胺类树脂的色素树脂粒子的实施方式。

[0043] ( 荧光色素 )

[0044] 在一边对上述树脂单体进行聚合而摄入荧光色素一边形成色素树脂粒子时,作为粒子中内包的或固定于粒子的表面的荧光色素,例如可使用以下的罗丹明类色素分子、BODIPY(氟化硼络合二吡咯甲川, Boron-dipyrromethene) 类色素分子、方酸类色素分子、芳香族烃类色素分子、或它们的组合。

[0045] 罗丹明类色素分子等荧光色素的耐光性较高,故优选,其中,优选属于芳香族烃类色素分子的苝(perylene)或芘(Pyrene)、苝二酰亚胺(perylene diimide)。

[0046] 作为罗丹明类色素分子的具体例,可以举出:5-羧基-罗丹明、6-羧基-罗丹明、5,6-二羧基-罗丹明、罗丹明6G、四甲基罗丹明、X-罗丹明、德克萨斯红、Spectrum Red、LD700PERCHLORATE、它们的衍生物等。

[0047] 作为BODIPY类色素分子的具体例,可以举出:BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665(以上为Invitrogen公司制造)、它们的衍生物等。

[0048] 作为方酸鎏类色素分子的具体例,可以举出:SRfluor 680-Carboxylate、1,3-双[4-(二甲基氨基)-2-羟苯基]-2,4-二羟基环丁烯二鎏二氢氧化物,双1,3-双[4-(二甲氨基)苯基]-2,4-二羟基环丁烯二鎏二氢氧化物,双2-(4-(二乙氨基)-2-羟苯基)-4-(4-(二乙氨基)-2-羟基环己-2,5-二烯亚基)-3-氧环丁-1-烯醇化物、2-(4-(二丁氨基)-2-羟苯基)-4-(4-(二丁氨基)-2-羟基环己基-2,5-二烯亚基)-3-氧代环丁基-1-烯醇化物、2-(8-羟基-1,1,7,7-四甲基-1,2,3,5,6,7-六氢吡啶[3,2,1-基]喹啉-9-基)-4-(8-羟基-1,1,7,7-四甲基-2,3,6,7-四氢-1H-吡啶并[3,2,1-基]喹啉鎏-9(5H)-亚基)-3-氧代环丁基-1-烯醇化物、以及它们的衍生物等。

[0049] 作为芳香族烃类色素分子的具体例,可以举出:N,N-双-(2,6-二异丙基苯基)-1,6,7,12-(4-叔丁基-苯氧基)-苝-3,4,9,10-四碳二酰亚胺、N,N'-双(2,6-二异丙基苯基)-1,6,7,12-四苯氧基苝-3,4:9,10-四碳二酰亚胺、N,N'-双(2,6-二异丙基苯基)苝-3,4,9,10-双(二碳酰亚胺)、16,N,N'-双(2,6-二甲基苯基)苝-3,4,9,10-四羧基二酰亚胺、4,4'-[(8,16-二氢-8,16-二氧代二苯并[a,j]苝-2,10-二基)二氧]二丁酸、2,10-二羟基-二苯并[a,j]苝-8,16-二酮、2,10-双(3-氨基丙氧基)二苯并[a,j]苝-8,16-二酮、3,3'-[(8,16-二氢-8,16-二氧二苯并[a,j]苝-2,10-二基)二氧]二丙胺、17-双(辛氧基)葱[9,1,2-cde]苯并[rst]五苯-5-10-二酮、硬脂酸5,10-二氢-5,10-二氧代葱并[9,1,2-cde]苯并[rst]五苯-16,17-二基酯、二羟基二苯并葱酮、苯磺酸4,4',4'',4'''-[[2,9-双[2,6-双(1-甲基乙基)苯基]-1,2,3,8,9,10-六氢-1,3,8,10-四氧葱并[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']二异喹啉-5,6,12,13-四基]四(氧)]四苯乙胺鎏盐、4,4',4'',4'''-[[2,9-双[2,6-双(1-甲基乙基)苯基]-1,2,3,8,9,10-六氢-1,3,8,10-四氧代葱并[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']二异喹啉-5,6,12,13-四基]四(氧)]四[N,N,N-三甲基]、以及它们的衍生物等。

[0050] (色素树脂粒子的平均粒径)

[0051] 从即使为通用的荧光显微镜也可以合适地进行亮点观察的方面考虑,色素树脂粒子的平均粒径优选为30~300nm,更优选为40nm~200nm。这是因为在平均粒径超过300nm的情况下,在进行染色后的观察时,每1个细胞的亮点数减少而不易进行亮点观察,相反,

在平均粒径低于 30nm 的情况下,每 1 个细胞的亮点数增加而不易进行亮点观察。

[0052] (化学修饰剂)

[0053] 作为色素树脂粒子的表面的化学修饰中所使用的化学修饰剂,可使用如下所述的氨基导入试剂及 PEG 化试剂。这样的化学修饰剂可发挥如下作用:可调节 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位,并且使生物体分子识别分子结合于色素树脂粒子。

[0054] (氨基导入试剂)

[0055] 作为氨基导入试剂,可使用根据色素树脂粒子的种类能够适当地导入氨基的公知的各种试剂。例如可优选使用乙醇胺、具有氨基烷基的三乙氧基硅烷类(3-氨基丙基三乙氧基硅烷:APS 等)、具有氨基烷基的仲或叔胺(三(2-氨基乙基)胺:TAEA 等)、经过 2 个以上的氨基烷氧基取代的烷烃(1,2-双(2-氨基乙氧基)乙烷:BAEE、1,11-二氨基-3,6,9-三氧杂十一烷、2,2'-氧双(乙基胺))等。

[0056] 在热固性树脂的色素树脂粒子的情况下,氨基导入试剂的硅烷醇基或氨基与色素树脂粒子的羟基或醚进行脱水、脱醇反应而导入氨基。另一方面,在热塑性树脂的色素树脂粒子的情况下,通过甲基丙烯酸缩水甘油酯的环氧基和氨或多官能性胺的反应或羧基或磺基和多官能性胺的反应来导入氨基。

[0057] (PEG 化试剂)

[0058] 作为 PEG 化试剂,可使用根据色素树脂粒子和 / 或上述氨基导入试剂的种类而能够适当地添加 PEG 链的公知的各种试剂。

[0059] 关于 PEG 的长度,从容易将荧光纳米粒子在 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位调节至  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的范围的方面、容易将 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位调节至  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的方面考虑,优选氧亚乙基单元( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ )的个数为 4 ~ 24 的 PEG。若氧亚乙基单元( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ )的个数低于 4,则难以使荧光纳米粒子的 Zeta 电位降低,相反,若超过 24,则 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位或 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位有可能过度降低。

[0060] 另外,通过经由如上所述的适当长度的 PEG 使生物体分子识别分子结合于色素树脂粒子,与使生物体分子识别分子不经由 PEG(直接地)结合于色素树脂粒子的情况相比,可提高染色对象对生物体分子的结合性,可提高染色精度。

[0061] 在使 PEG 链结合于色素树脂粒子的氨基(也可以为由氨基导入试剂导入的氨基)的情况下,可优选使用 PEG 中具有琥珀酰亚胺酯基的 PEG 化试剂。此时,琥珀酰亚胺酯基与色素树脂粒子的氨基反应从而在色素树脂粒子上添加 PEG。

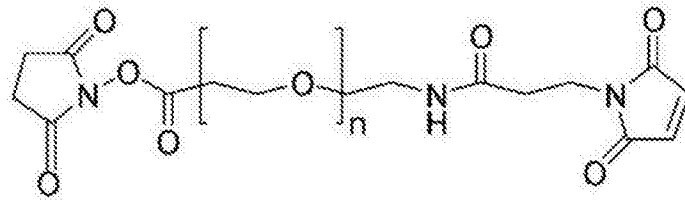
[0062] 在使 PEG 链结合于色素树脂粒子的巯基(SH 基)的情况下,可优选使用具有马来酰亚胺基的 PEG 化试剂。此时,PEG 的马来酰亚胺基与色素树脂粒子的 SH 基反应从而在色素树脂粒子上添加 PEG。作为这样的 SH 基,将色素树脂粒子的氨基由 S 巯基乙基胺盐酸盐或 S-乙酰基硫代乙醇酸-N-琥珀酰亚胺酯(SATA)或 2-亚氨基四氢噻吩转换为 SH 基时的 SH 基符合。

[0063] 另外,在经由 PEG 使后述的生物体分子识别分子结合于色素树脂粒子的情况下,优选使用在 PEG 的一端侧具有可与色素树脂粒子和 / 或氨基导入试剂连接的反应基团,并且在另一端侧也具有可与生物体分子识别分子连接的反应基团(马来酰亚胺基等)的化合

物 (PEG 连接子) 作为 PEG 化试剂。作为这样的 PEG 连接子, 例如可以举出: 下述 [ 化学式 1 ] 所示的 SM(PEG)<sub>n</sub> (n = 2 ~ 24, Thermo Fisher Scientific 公司制造) 等。

[0064] [ 化学式 1 ]

[0065]



[0066] (生物体分子识别分子)

[0067] 作为构成本发明的荧光纳米粒子的另一个要素的生物体分子识别分子为特异性结合于作为染色对象的生物体分子的分子, 使其结合于如上所述的色素树脂粒子而使用。作为“特定的生物体分子”及会与其特异性结合的“生物体分子识别分子”的组合, 例如可以举出: 生物素-(链霉)亲和素、抗原-抗体、糖链-凝集素的组合。“特异性结合”可以对应于这样的组合以本发明所属的技术领域中一般的术语进行解释, 但也可由结合常数 ( $K_A$ ) 或作为其倒数的解离常数 ( $K_D$ ) 定义 (参照下述表 1)。

[0068] 即, 本发明中所使用的生物体分子识别分子可定义为与作为染色对象的生物体分子之间的结合常数 ( $K_A$ ) 在  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$  的范围的生物体分子。在结合常数 ( $K_A$ ) 在该范围内的情况下, 该生物体分子可作为与作为染色对象的生物体分子进行“特异性结合的”生物体分子识别分子进行处理, 相反, 在不在该范围内 (低于  $1 \times 10^5$ ) 的情况下, 该生物体分子不能说与生物体分子进行“特异性结合”, 无法作为本发明中的生物体分子识别分子操作。同样, 本发明中所使用的生物体分子识别分子也可定义为与作为染色对象的生物体分子之间的解离常数 ( $K_D$ ) 在  $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-12}$  的范围的生物体分子。

[0069] [ 表 1 ]

[0070]

	解离常数	结合常数
定义	$\frac{(A)(B)}{(AB)} = \frac{K_d}{K_a}$	$\frac{(AB)}{(A)(B)} = \frac{K_a}{K_d}$
单位	[M]	[M <sup>-1</sup> ]
说明	$K_D$ 越高, 亲和性越低	$K_A$ 越高, 亲和性越高
标准范围	$1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-12}$	$1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^{12}$

[0071] (从 GE Healthcare Japan 的 HP 引用)

[0072] 作为满足该条件的生物体分子-生物体分子识别分子的结合例, 可以举出结合常数 ( $K_A$ ) =  $1 \times 10^9$  的细胞内的抗原和抗体的结合和以结合常数 ( $K_A$ ) =  $1 \times 10^{12}$  进行结合的生物素和链霉亲和素的结合, 但除此以外, 也可选择具有与上述同等程度的结合常数 ( $K_A$ ) 而结合的生物体分子-生物体分子识别分子的组合。另外, 相对于某种抗原作为可通过一般的方法 (免疫法) 制作的抗体、优选的市售抗体通常具有上述范围的结合常数 ( $K_A$ ), 并且可以将该抗原作为染色对象的生物体分子的实施方式中的生物体分子识别分子的形式进行利用。结合常数 ( $K_A$ ) 可通过公知的方法测定。

[0073] 如上所述的具有较强的结合常数 ( $K_A$ ) 的生物体分子识别分子通过根据需要经由 PEG 链结合于色素树脂粒子,能够以超过由荧光纳米粒子所具有的特定范围的负的 Zeta 电位产生的排斥力的结合力键合于作为染色对象的生物体分子。

[0074] 在使用抗体作为生物体分子识别分子的情况下,可使用包括构成抗体医药的抗体的各种抗体。在此,在本发明中,“抗体”这样的术语以包括任意的抗体片段或衍生物的含义使用,包含 Fab、Fab' 2、CDR、人源化抗体、多功能抗体、单链抗体 (ScFv) 等各种抗体。

[0075] 作为代表的生物体分子识别分子,可以举出有关各种癌症的用药选定的针对癌细胞的增殖控制因子受体及转移控制因子受体的抗体。例如存在于细胞表面的 HER2 (人表皮生长因子受体 2, human epidermal growth factor receptor type 2) 为作为用于乳癌的用药选定的免疫染色对象重要的蛋白质,与其特异性结合的抗 HER2 抗体适合作为结合于色素树脂粒子的生物体分子识别分子。另外,与形成细胞骨架的肌动蛋白特异性结合的抗肌动蛋白抗体等也可作为生物体分子识别分子举出。此外,可相对于特定的生物体分子使用如上所述的具有较高的结合力的生物体分子识别分子。

[0076] 相反而言,只要存在如上所述的具有较高的结合力的生物体分子识别分子,则可以将多种多样的生物体分子作为染色对象。例如,可以举出可制备作为生物体分子识别分子的代表例的抗体的作为抗原的各种生物体分子。“抗原”一般而言为蛋白质(多肽、寡肽等)、氨基酸(也包含修饰氨基酸),核酸(可以为单链也可以为双链的 DNA、RNA、多核苷酸、寡核苷酸)、PNA(肽核酸)等、或核苷、核苷酸及它们的修饰分子)、糖类(寡糖糖、多糖类、糖链等)、脂质、或它们的修饰分子、复合体等也可成为抗原。

[0077] 除如上所述的 HER2 的关于癌症的抗原以外, TNF- $\alpha$  (肿瘤坏死因子  $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ )、IL-6 (白细胞介素 -6, Interleukin-6) 受体等炎症性细胞因子、RSV 蛋白质等病毒相关分子等也可成为染色对象的生物体分子。可根据目的选定作为染色对象的生物体分子及与其特异性结合的生物体分子识别分子的组合。

[0078] 但是,在本发明中,“作为染色对象的生物体分子”并不限定于有关上述的癌症的用药选定的受容体那样的作为检测对象的蛋白质本身,可间接地使荧光纳米粒子结合于作为检测对象的蛋白质的生物体分子也可作为染色对象的生物体分子进行操作。例如在作为检测对象的蛋白质上结合以该蛋白质作为抗原识别的抗体(一次抗体)这样的实施方式的免疫染色法中,该一次抗体相当于“作为染色对象的生物体分子”,荧光纳米粒子可以具有以该一次抗体作为抗原识别的抗体(二次抗体)作为生物体分子识别分子。或者,与上述同样,首先在作为检测对象的蛋白质上结合以该蛋白质作为抗原识别的抗体(一次抗体),接着,使以该一次抗体作为抗原与其识别的抗体(二次抗体)和生物素形成的复合体发生结合这样的实施方式的免疫染色法中,该生物素相当于“作为染色对象的生物体分子”,荧光纳米粒子可以具有与该生物素特异性结合的链霉亲和素作为生物体分子识别分子。

[0079] (生物体分子识别分子与色素树脂粒子的结合)

[0080] 使生物体分子识别分子结合于色素树脂粒子的实施方式没有特别限定,但与直接与色素树脂粒子结合相比,优选经由如上所述的 PEG 连接子间接地结合于色素树脂粒子。生物体分子识别分子的结合可以使用共价键、离子键、氢键、配位键、物理吸附及化学吸附等,但从结合的稳定性考虑,优选共价键等结合力较强的结合。

[0081] 在经由 PEG 使生物体分子识别分子和色素树脂粒子结合的情况下,例如可以通过

使添加于色素树脂粒子的 PEG 连接子的马来酰亚胺基与生物体分子识别分子的硫醇基进行反应,使它们以共价键结合。

[0082] 在使生物体分子识别分子结合于色素树脂粒子时,优选将色素树脂粒子侧的反应基团转换为其它的反应基团,且优选不将生物体分子识别分子原本所具有的反应基团转换为其它的反应基团。例如在生物体分子识别分子为抗体等蛋白质的情况下,通过转换抗体所具有的 SH 基等反应基团,分子的立体结构发生变化而有可能损伤生物体分子识别分子原本的结合能力。

[0083] 例如,可以举出通过如下进行反应的例子:如上所述利用氨基导入试剂使色素树脂粒子的反应基团变为氨基,在该氨基上添加 PEG 连接子后,使生物体分子识别分子的 SH 基结合于该 PEG 连接子的游离的马来酰亚胺基。

[0084] 在生物体分子识别分子为蛋白质的情况下,SH 基通常成为二硫基(S-S),以 SH 基的形式存在的一部分的基团采用与金属离子结合的结构,而成为反应的中心等,对蛋白质功能造成较大影响,无法用于上述结合。为了将生物体分子识别分子的 SH 基用于上述结合;需要(1)将二硫结构(S-S)还原而以 SH 基的形式用于结合或(2)导入 SH 基而用于结合。

[0085] 二硫的还原可使用巯基乙基胺盐酸盐(MEA)、 $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME)和二硫苏糖醇等。若将蛋白质中的二硫全部还原而形成硫醇基(-SH),则有可能丧失蛋白质功能,因此,需要调整还原剂的浓度而将二硫的一部分还原为 SH 基来使用。另一方面,作为导入 SH 基的试剂,可以举出 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰巯基乙酸酯(SATA)、2-亚氨基四氢噻吩等,向 SH 基的还原和 SH 基的导入本身可通过公知的方法进行。

[0086] < 荧光纳米粒子的制造方法 >

[0087] 本发明的荧光纳米粒子可通过具有如下工序的制造方法制造:通过对内包有或表面固定有荧光色素的色素树脂粒子的表面进行化学修饰,对上述色素树脂粒子赋予在 pH7.0 的水中以荧光纳米粒子整体计为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的 Zeta 电位或在 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的 Zeta 电位。该工序优选包括在使具有氨基的化合物结合于上述色素树脂粒子而对上述色素树脂粒子赋予氨基后,将 PEG 及生物体分子识别分子结合于该氨基这样的化学修饰。这样的荧光纳米粒子的制造方法具体而言例如可采用包含以下的各工序的实施方式:(1)混合工序、(2)聚合工序、(3)清洗工序、及(4)添加工序。其中,(4)的附加工序为关于如上所述的化学修饰的工序。

[0088] (1) 原料制备、混合工序

[0089] 混合工序为混合如上所述的荧光色素和 1 种或 2 种以上的色素树脂粒子形成用的单体或低聚物的工序。作为该混合的物质,可任意地含有质子供给剂和聚合反应促进剂。

[0090] 通过预先混合荧光色素和树脂单体,可使荧光色素和单体或低聚物的 1 种或 2 种以上结合而容易地在色素树脂粒子内摄入荧光色素。该结合可通过荧光色素和树脂单体具有相反的电荷的取代基或化学部位发生相互离子键合,也可通过经由取代基或化学部位进行共价键键合。

[0091] 作为离子键的具体例,可以举出:在树脂为三聚氰胺树脂、荧光色素为磺基罗丹明的情况下,经由该树脂中的带正电的氮原子(=NH<sup>+</sup>等)和该荧光色素所具有的磺基(SO<sub>3</sub>)的离子键键合的例子。另外,作为共价键的具体例,可以举出:使 4-氨基苯乙烯和磺

基罗丹明 101 酰氯反应,形成共价键 ( $-\text{NH}_2-\text{SO}_2-$ ) 的(将该反应物用作苯乙烯系纳米粒子的共聚单体)例子。

[0092] 上述结合方法没有特别限定,除在使荧光色素结合于作为树脂原料的单体后使单体聚合的方法以外,还可使用使荧光色素结合于聚合物的方法,此外,只要使用符合目的的方法即可。

[0093] (质子供给剂)

[0094] 在使树脂单体和荧光色素离子键合的情况下,可使用向正电荷的树脂单体(三聚氰胺等)的取代基( $\text{NH}_2$ 等)或荧光色素的取代基积极地供给  $\text{H}^+$ 而形成正电荷的质子供给剂。例如可以举出:甲酸或乙酸、对甲苯磺酸等、与它们类似的物质。

[0095] 在附于荧光色素的取代基为羧酸或磺酸等酸的情况下,解离的质子被赋予于荧光色素的取代基( $\text{NH}_2$ 等)而使其带正电,因此,这些酸可作为质子供给剂发挥作用。相反,也可以使用从树脂单体的成为负电荷的取代基或荧光色素的取代基积极地夺取  $\text{H}^+$ 的质子接受剂。例如在氢氧化钠等碱的情况下,其作为质子受容剂发挥作用。

[0096] (聚合反应促进剂)

[0097] 作为热塑性树脂的反应促进剂,例如可使用金属等公知的聚合催化剂。另一方面,作为热固性树脂的反应促进剂,例如可使用酸。已知三聚氰胺树脂或尿素树脂、二甲苯树脂、酚醛树脂均可通过酸催化剂促进反应。作为酸,例如已知有甲酸、乙酸、硫酸、盐酸、硝酸、对甲苯磺酸、十二烷基苯磺酸等。热固性树脂的反应仅通过加温即可进行,但若加入反应促进剂,则在更低温度下进行,因此,可以在能够控制反应和性能的范围添加。

[0098] (2) 聚合工序

[0099] 聚合工序为通过使与荧光色素进行电结合或者共价键合的树脂单体或低聚物发生热固化或自由基聚合、或者一边摄入荧光色素一边使其发生热固化或自由基聚合来形成色素树脂粒子的工序。聚合工序的反应条件(温度、时间)可由聚合的单体或低聚物的组成确定,可依据公知的方法进行。

[0100] 例如内包有荧光有机色素的聚苯乙烯类的纳米粒子可通过美国专利第 4326008 号(1982)中所记载的具有聚合性官能团的有机色素的共聚法、或者或美国专利第 5326692 号(1992)中所记载的向聚苯乙烯纳米粒子的荧光有机色素的含浸法等进行聚合。

[0101] (3) 清洗工序

[0102] 清洗工序为从得到的色素树脂粒子的分散液中除去剩余的树脂原料或荧光色素、乳化剂等杂质的工序。例如从反应液中对树脂成分进行离心分离,除去上清液后,加入超纯水进行超声波照射使其再次分散,由此进行清洗。离心分离、上清液除去、在超纯水中的再分散这一系列清洗操作优选重复进行多次直至上清液中不会见到源自树脂或色素的吸光/荧光。

[0103] (4) 添加工序

[0104] 添加工序为对来自清洗工序(3)的色素树脂粒子的表面实施适当的化学修饰,将 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位调节至  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  或将 pH6.0  $\sim 8.0$  的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位调整至  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的工序。例如通过在使上述的 SATA、TAEA 等具有氨基的化合物结合于上述色素树脂粒子而对上述色素树脂粒子赋予氨基后,将 PEG 结合于该氨基,并且将生物体分子识别分子结合于 PEG 来进行。

[0105] (氨基导入)

[0106] 可使用如上所述的氨基导入试剂通过公知的方法向色素树脂粒子导入氨基。

[0107] 具体而言,使聚合工序中得到的色素树脂粒子分散于纯水中,使上述的氨基导入试剂与其反应。反应结束后,可通过离心分离或过滤得到在表面导入有氨基的荧光纳米粒子。

[0108] 使用的氨基导入试剂的种类或添加量、反应温度及反应时间等条件只要一边考虑色素树脂粒子的性状等一边使最终可得到 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位满足指定条件的荧光纳米粒子来在适当的范围进行调整即可。

[0109] (PEG 附加)

[0110] 可使用上述的 PEG 化试剂通过公知的方法向色素树脂粒子导入 PEG。例如使 PEG 化试剂 N-羟基琥珀酰亚胺基酯基与导入于色素树脂粒子的上述氨基反应而被添加。具体而言,在含有 2mM(摩尔浓度)EDTA 的 PBS 中,对 PEG 化试剂琥珀酰亚胺 [(N-马来酰亚胺基丙酰胺基)-十一缩十二乙二醇]酯 (Thermo Fisher Scientific 公司制造的“SM(PEG)<sub>12</sub>”(商标)) 进行调整,使其最终浓度为 10mM,使其与调整至 3nM 的粒子在室温下反应 30 分钟,由此可导入 PEG。

[0111] 使用的 PEG 化试剂的种类或添加量、反应温度及反应时间等条件只要一边考虑色素树脂粒子和 / 或氨基导入试剂或生物体分子识别分子的性状等一边以最终可得到 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位满足指定条件的荧光纳米粒子在适当的范围进行调整即可。

[0112] (生物体分子识别分子的添加)

[0113] 例如使添加于色素树脂粒子的 PEG 的马来酰亚胺基和添加于生物体分子识别分子的硫醇基反应而结合;或者,使导入于色素树脂粒子的氨基、或色素树脂粒子中的荧光色素或树脂单体单元原本具有的氨基与生物体分子识别分子中的羧基通过公知的方法反应而结合,由此可使抗体与荧光纳米粒子结合。作为具体例,对链霉亲和素使用 2-亚氨基四氢噻吩或 SATA 进行硫醇基添加处理,通过凝胶过滤柱除去过量的反应试剂,由此得到可结合于二氧化硅粒子的链霉亲和素溶液。

[0114] 将上述得到的添加了 PEG 的色素树脂粒子和链霉亲和素混合于含有 EDTA 为 2mM 的 PBS 中,并使其反应 1 小时,由此可以将色素树脂粒子和链霉亲和素结合。

[0115] 使用的生物体分子识别分子的种类或添加量、反应温度及反应时间等条件只要一边考虑色素树脂粒子和 / 或氨基导入试剂的形状或荧光纳米的用途等一边以可得到 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位、或 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位满足指定的条件且可充分地结合于作为染色对象的生体分子的荧光纳米粒子在适当的范围进行调整即可。

[0116] 在外部调节 pH6.0 ~ pH8.0 的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位的情况下,可调整缓冲液的 pH 或任意地含有指定量的蛋白质、表面活性剂、防腐剂等可调节 Zeta 电位的其它化合物的 1 种或 2 种以上,由此,进行总体的调节使得落入 0mV ~ -10mV 的范围。

[0117] 作为蛋白质,只要可调节上述 Zeta 电位就可没有特别限制地使用,例如可以举出:BSA 等一般作为阻断剂已知的蛋白质或酪蛋白等。优选相对于缓冲液整体蛋白质含有

10 重量%以下（例如 1 ~ 10 重量%的范围）的蛋白质。

[0118] 作为表面活性剂，只要可调节上述 Zeta 电位即可，可以没有特别限制地使用，例如可以举出：吐温 20（注册商标）等。优选相对于缓冲液整体在 0.1 重量%以下的范围含有表面活性剂。

[0119] 作为防腐剂，只要可调节上述 Zeta 电位就可没有特别限制地使用，例如可以举出：叠氮化钠（NaN<sub>3</sub>）。防腐剂优选在缓冲液中以 0.015N 以下含有。

[0120] [染色及观察生物体分子的方法]

[0121] 以下，对染色及观察生物体分子的方法进行描述。

[0122] 生物体分子的染色方法为使用上述的荧光纳米粒子染色及观察生物体分子的方法，具体而言，包含如下工序：(a) 使用荧光纳米粒子对细胞进行染色的工序；(b) 对由经过染色的细胞的荧光色素发出的荧光在同一视野进行拍摄的工序；及 (c) 对仅对工序 (b) 中得到的图像中检测到的像素识别为有效亮点的工序。

[0123] 1. 关于工序 (a)

[0124] 工序 (a) 为如下工序：使具有生物体分子识别分子的荧光纳米粒子与细胞的生物体分子反应，通过荧光纳米粒子的生物体分子识别分子和生物体分子之间的特异性结合（抗原抗体反应或链霉亲和素 - 生物素结合等）对染色对象的生物体分子进行染色。上述染色方法或组织切片的制备没有特别限定，可通过公知的方法进行。

[0125] 例如在将作为病理切片通用的石蜡包埋切片用作组织细胞的情况下，只要通过如下所述的步骤进行工序 (a) 即可。

[0126] (1) 脱石蜡处理工序

[0127] 使病理组织细胞的切片浸渍于放入了二甲苯的容器，除去石蜡。此时的温度没有特别限定，例如可在室温下进行。浸渍时间优选为 3 分钟以上且 30 分钟以下。另外，可以根据需要在浸渍途中更换二甲苯。

[0128] 接着，使切片浸渍于放入了乙醇的容器而除去二甲苯。此时的温度没有特别限定，可在室温下进行。浸渍时间优选为 3 分钟以上且 30 分钟以下。可以根据需要在浸渍途中更换乙醇。

[0129] 使切片浸渍于放入了水的容器而除去乙醇。温度没有特别限定，可在室温下进行。浸渍时间优选为 3 分钟以上且 30 分钟以下。另外，可以根据需要在浸渍途中更换水。

[0130] (2) 活化处理工序

[0131] 依据公知的方法进行染色对象的生物体分子的活化处理。活化条件没有特别限定，作为活化液，可以使用 0.01M 的柠檬酸缓冲液 (pH6.0)、1mM 的 EDTA 溶液 (pH8.0)、5% 的尿素、0.1M 的 Tris 盐酸缓冲液等。加热设备可使用高压釜、微波、压力锅、水浴等。可以在温度为 50 ~ 130°C、时间为 5 ~ 30 分钟下进行。

[0132] 接着，使活化处理后的切片浸渍于放入了 PBS 的容器进行清洗。温度没有特别限定，可在室温下进行。浸渍时间优选为 3 分钟以上且 30 分钟以下。可以根据需要在浸渍途中更换 PBS。

[0133] (3) 使用荧光纳米粒子的染色

[0134] 将如上制备的荧光纳米粒子的 PBS 分散液（染色液）载置于病理切片并使其与作为检测对象的生物体分子反应。此时的温度没有特别限定，可在室温下进行。反应时间优

选为 30 分钟以上且 24 小时以下。

[0135] 荧光纳米粒子的分散液的浓度通常可以为  $1 \sim 0.005\text{nM}$ ，优选为  $0.5 \sim 0.02\text{nM}$ 。本发明的荧光纳米粒子即使以较高浓度使用，也可抑制向细胞核或组织中的其它部位进行非特异性结合或荧光纳米粒子彼此的凝聚。

[0136] 接着，使染色后的切片浸渍于放入了 PBS 的容器中，除去未反应的荧光纳米粒子。温度没有特别限定，可在室温下进行。浸渍时间优选为 3 分钟以上且 30 分钟以下。另外，也可以根据需要在浸渍途中更换 PBS。另外，为了观察组织的形态，也可以进行苏木精 - 伊红染色。然后，将盖玻片载置于切片进行封入。也可以根据需要使用市售封入剂。

[0137] 2. 关于工序 (b)

[0138] (b) 进行将工序 (a) 中经过染色的细胞的荧光色素发出的荧光在同一视野拍摄的工序。可使用共焦点的荧光显微镜以包含三维信息的图像的形式获得。在拍摄时，选择与使用的荧光物质的吸收最大波长及荧光波长对应的激发光源及荧光检测用光学滤波器。

[0139] 3. 关于工序 (c)

[0140] 工序 (c) 为仅将工序 (b) 中得到的图像中检测出的像素识别为有效的亮点的工序。具体而言，进行如下工序：(i) 测量工序 (b) 的拍摄图像中的像素数、发光亮度，(ii) 仅以确认为发光的发光亮度以上的图像中的像素作为亮点进行计数并进行演算处理而得到亮点数据。可由亮点数或发光亮度测量染色对象的生物体分子的表达水平。亮点数或发光亮度的测量可使用市售图像分析软件，例如株式会社 G-Angstrom 制造的全亮点自动测量软件“g-Count”进行。

[0141] 以下，对本发明的荧光纳米粒子的作用、效果进行说明。

[0142] (1) 若为具有 pH7.0 下为  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的 Zeta 电位、或 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位为  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的 Zeta 电位的荧光纳米粒子，则在对细胞（细胞内的 pH 为中性）进行染色时，生物体分子和荧光纳米粒子发生电排斥，不易产生荧光纳米粒子和生物体分子的非特异性结合。而且，荧光纳米粒子由于具备与作为染色对象的生物体分子特异性结合的生物体分子识别分子，因此，能够以超过上述的电排斥力的较强的相互作用于作为染色对象的生物体分子结合。

[0143] (2) 若具有荧光色素的色素树脂粒子的表面使用可调节 Zeta 电位的化合物进行化学修饰，则可利用例如用于将生物体分子识别分子和色素树脂粒子结合的化合物将 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位或 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位调节至上述范围。

[0144] (3) 若在对上述色素树脂粒子导入氨基后，将 PEG 结合于该氨基，并且，对该 PEG 结合生物体分子识别分子进行上述化学修饰，则容易通过上述化合物的种类和 PEG 的种类（PEG 的链长）的组合来调节 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位或 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位。

[0145] (4) 若上述具有氨基的化合物在与色素树脂粒子结合的状态下具有 1 个游离的氨基，则可以赋予添加 PEG 的立足点。另外，若具有 2 个以上的游离的氨基，则可增加添加 PEG 的立足点，可增加每 1 个细胞的亮点数。另外，由于能够支链状地添加 PEG，因此，容易调节 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位或 pH6.0  $\sim$  8.0 的缓冲液中的 Zeta 电位。

[0146] (5) 若上述 PEG 的氧亚乙基单元 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ ) 的个数为  $4 \sim 24$ ，则容易将 pH7.0

的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位调节至  $-10\text{mV} \sim -60\text{mV}$  的范围,另外,容易将  $\text{pH}6.0 \sim 8.0$  的缓冲液中的 Zeta 电位调节至  $0\text{mV} \sim -10\text{mV}$  的范围。

[0147] (6) 若上述具有氨基的化合物为 1,2-双(2-氨基乙氧基)乙烷(BAEE),则由于具有氧亚乙基单元( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-$ ),因此可与 PEG 同样地有助于 Zeta 电位的调节。另外,若上述具有氨基的化合物为三(2-氨基乙基)胺(TAEA),则在分支的 3 个末端分别具有氨基,经由其中的 1 个氨基将 TAEA 添加于色素树脂粒子,因此,使 PEG 附加的立足点数为 2 倍,可增加每 1 个细胞的亮点数。

[0148] (7) 若上述色素树脂粒子为热固性树脂、特别是三聚氰胺树脂,则在通过使用该热固化性树脂的单体和荧光色素的聚合形成色素树脂粒子时,在所形成的热固化性树脂的网眼结构中封入荧光色素,因此,即使为使用有机溶剂的体系也不会发生荧光色素的溶出,可进行染色的组织切片的脱水、澄清、封入。

[0149] (8) 若为经由 N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫基乙酸酯(SATA)或 2-亚氨基四氢噻吩的反应而得到的链霉亲和素作为上述生物体分子识别分子并结合于上述色素树脂粒子而得到的荧光纳米粒子,则由于生物体分子识别分子被氨基或 SH 基修饰,因此,通过该修饰也可调节荧光纳米粒子的 Zeta 电位。

[0150] (9) 若上述缓冲液进一步含有蛋白质或表面活性剂的至少任一者,则容易通过蛋白质或表面活性剂的量或种类调节染色液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位。

[0151] (10) 若上述染色为免疫染色,则生物体分子和荧光纳米粒子通过抗原抗体反应以上的非常高的结合力而结合,因此,可在低于该结合力的广范围进行生物体分子和荧光纳米粒子的基于 Zeta 电位发生的电排斥。该结果,即使在制造荧光纳米粒子时在各粒子间产生 Zeta 电位的不均,也可更可靠地进行荧光纳米粒子与染色对象的生物体分子的特异性结合,可进行精度高的免疫染色。

[0152] (11) 在荧光纳米粒子的平均粒径超过  $300\text{nm}$  的情况下,在染色后的观察时,每 1 个细胞的亮点数减少而难以进行亮点观察,相反,在荧光纳米粒子的平均粒径低于  $30\text{nm}$  的情况下,每 1 个细胞的亮点数增加而难以进行亮点观察。因此,若荧光纳米粒子的平均粒径为  $30 \sim 300\text{nm}$ ,则即使为通用的荧光显微镜也可合适地进行亮点观察。并且,若荧光纳米粒子的平均粒径为  $40 \sim 200\text{nm}$ ,则可更合适地进行亮点观察。

[0153] 实施例

[0154] 以下,参照附图对本发明的实施例和其比较例进行说明。

[0155] 通过以下的方法对实施例及比较例的荧光纳米粒子的下述表 2 的项目进行测量或评价。

[0156] (Zeta 电位的测定)

[0157] 关于  $\text{pH}7.0$  的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位,制备以  $2\text{mg/mL}$  的浓度含有荧光纳米粒子的水分散液( $\text{pH}7.0$ ),利用 Zeta 电位测定装置(“ZetasizerNano”、Malvern 公司制造)测定其 Zeta 电位。

[0158] 关于  $\text{pH}6.0 \sim 8.0$  的缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位,制备含有  $2\text{mg/mL}$  浓度的荧光纳米粒子的  $\text{pH}6.0 \sim \text{pH}8.0$  的各缓冲液(PBS、Tris-HCl、磷酸缓冲液(不包括 PBS)),利用 Zeta 电位测定装置(“ZetasizerNano”、Malvern 公司制造)测定其 Zeta 电位。

[0159] (荧光纳米粒子的试剂分散性的评价方法)

[0160] 制备 1.5mL 将制造的荧光纳米粒子分散在含有 1% BSA 的 PBS (磷酸缓冲液生理的食盐水) 中并使其最终浓度为 0.1nM 的溶液, 利用荧光光度测定装置 (“F-7000”, 日立株式会社制造) 测量该溶液在 580nm 激发下的发光。并且, 将该溶液在 4℃ 下静置 1 天后, 与上述同样地测量吸光度。由测量结果通过下式算出荧光纳米粒子的试剂分散维持率, 将试剂分散维持率为 95% 以上的荧光纳米粒子评价为 “○”, 将低于 95% 的荧光纳米粒子评价为 “×” (参照表 1)。

[0161] 试剂分散维持率 = 放置 1 天后的吸光度 / 刚分散后的吸光度 (×100%)

[0162] (荧光纳米粒子向细胞核的非特异性吸附的评价方法)

[0163] 使用具有链霉亲和素的荧光纳米粒子的分散液 (0.2nM, 0.005nM) 分别对抗原抗体反应的组织阵列载片进行染色, 所述抗原抗体反应的组织阵列载片未对利用添加了生物素的抗体得到的细胞抗原 (染色对象的生物体分子) 进行抗原抗体反应, 然后, 在对其进行观察时, 对于任意地选择的 60 个细胞, 通过 ImageJ FindMaxima 法测量存在于细胞核的亮点数, 算出每 1 个细胞核的平均亮点数 (= 观察的细胞核的亮点数 / 观察的细胞核数), 以该值是否为 1 个以上为基准进行评价。另外, 在表 2 中, 将该值在评价项目 “向细胞核的吸附” 中为 1 个以上的情况记为 “×”, 将低于 1 个的情况极记为 “○”。

[0164] (荧光纳米粒子向组织整体的非特异性结合的评价方法)

[0165] 使用具有链霉亲和素的荧光纳米粒子的分散液 (0.2nM) 对抗原抗体反应的组织阵列载片进行染色, 所述组织阵列载片未对利用添加了生物素的抗体得到的细胞抗原 (染色对象的生物体分子) 进行抗原抗体反应, 然后, 在对其进行观察时, 对于任意地选择的 60 个细胞, 通过 ImageJ FindMaxima 法测量存在于细胞整体的亮点数, 算出每 1 个细胞的平均亮点数 (= 观察的细胞的亮点数 / 观察的细胞数), 以该值是否为 1 个以上为基准进行评价。另外, 在表 2 中, 将该值在评价项目 “向组织的吸附” 中为 1 个以上的情况记为 “×”, 将低于 1 个的情况极记为 “○”。

[0166] (色素从荧光纳米粒子溶出的评价方法)

[0167] 对利用添加了生物素的抗体得到的组织阵列载片的细胞抗原 (染色对象的生物体分子) 进行抗原抗体反应, 使用具有链霉亲和素的荧光纳米粒子的分散液 (0.2nM) 对该反应后的组织阵列载片进行染色 (免疫染色), 然后, 对其进行观察, 评价有无荧光色素的渗出。在表 2 中, “○” 表示没有荧光色素的渗出, “×” 表示因荧光色素的渗出而无法确认到亮点。

[0168] (每 1 个细胞的亮点数 (平均细胞亮点数))

[0169] 对利用添加了生物素的抗体得到的组织阵列载片的细胞抗原 (染色对象的生物体分子) 进行抗原抗体反应, 使用具有链霉亲和素的荧光纳米粒子的分散液 (0.2nM) 对反应后的组织阵列载片进行染色 (免疫染色), 然后, 对其进行观察时调查 60 个细胞的亮点数, 算出每 1 个细胞的平均亮点数 (平均细胞亮点数)。

[0170] (荧光纳米粒子的平均粒径的测量方法)

[0171] 使用扫描型电子显微镜 (SEM) 拍摄荧光纳米粒子, 对充分数目的粒子测量截面积, 求出与该测量值相当面积的圆的直径作为粒径。在本申请中, 将 1000 个的粒子的粒径的算术平均作为平均粒径。

[0172] [实施例 1]

[0173] 以下,对制造(制备)本发明的三聚氰胺类粒子的例子进行说明。需要说明的是,“三聚氰胺类粒子”是指主要含有三聚氰胺的树脂粒子。

[0174] (1) 原料制备、混合工序

[0175] 将荧光色素的磺基罗丹明 101 (“Sulforhodamine 101”、Sigma-Aldrich 公司制造、TexasRed 色素) 2.5mg 溶剂于纯水 22.5mL 中。将该溶液用热搅拌器一边维持为 70°C 一边搅拌 20 分钟。接着,将水溶性三聚氰胺树脂“NIKALAC MX-035”(日本 Carbide 工业株式会社制造) 1.5g 溶解于上述溶液,此外,在该条件下进一步加热搅拌 5 分钟。

[0176] (2) 聚合工序

[0177] 在加热搅拌的溶液中加入甲酸 100  $\mu$ L,将溶液温度一边维持为 60°C 一边进一步加热搅拌 20 分钟。然后,放置该溶液并冷却至室温。

[0178] (3) 清洗工序

[0179] 将冷却的溶液移至离心用管,用离心分离机以 12000rpm 离心分离 20 分钟。除去离心分离的溶液的上清液并仅回收沉淀物。对回收的沉淀物进行使用乙醇进行冲洗的清洗后,使用水同样地进行清洗。

[0180] (4) 添加工序

[0181] 如以下所示,对三聚氰胺类粒子的表面进行化学修饰而调节 Zeta 电位。

[0182] 首先,将上述清洗后的调整至 1nM 的三聚氰胺类粒子(色素树脂粒子) 1mL 与乙醇胺 20  $\mu$ L 混合,使其在温度 70°C 下反应 1 小时。即,向三聚氰胺类粒子导入氨基。将得到的三聚氰胺类粒子使用含有 2mM 的 EDTA(乙二胺四乙酸)的 PBS(磷酸缓冲液生理盐水)调整至 3nM。

[0183] 在该三聚氰胺类粒子的溶液中混合 SM(PEG)<sub>4</sub>(Thermo Fisher Scientific 公司制造的琥珀酰亚胺[(N-马来酰亚胺基丙酰胺基)-十一缩十二乙二醇]酯),使其最终浓度成为 10mM,在室温°C 下反应 1 小时。即,使位于 SM(PEG)<sub>4</sub>的一端侧的琥珀酰亚胺酯与如上所述导入于三聚氰胺类粒子的氨基反应,由此使 SM(PEG)<sub>4</sub>结合于上述三聚氰胺类粒子。

[0184] 将该反应液以 10000G 离心分离 20 分钟,除去上清液并仅回收沉淀物。然后,加入含有 2mM 的 EDTA 的 PBS 使沉淀物分散。然后,再次以 10000G 离心分离 20 分钟,除去上清液并仅回收沉淀物。进一步对通过从沉淀物的分散处理至离心分离这一系列的操作而得到的三聚氰胺类粒子进行 3 次清洗。然后,得到位于上述 SM(PEG)<sub>4</sub>的另一端侧的马来酰亚胺基存在于粒子表面,且内包有德克萨斯红色素的三聚氰胺类粒子。另外,使用电子显微镜通过上述的方法对该三聚氰胺类粒子的平均粒径进行测量,结果平均粒径为 150nm。

[0185] 另一方面,如下制备可结合于该三聚氰胺类粒子的链霉亲和素。

[0186] 首先,使调整至 64mg/mL 的 2-亚氨基四氢噻吩(pierce 公司制造) 70  $\mu$ L 在室温下与调整至 1mg/mL 的链霉亲和素(和光纯药工业公司) 40  $\mu$ L 进一步反应 1 小时。即,向链霉亲和素的氨基导入被保护的硫醇基(-NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-CO-CH<sub>3</sub>)。

[0187] 然后,通过公知的羟胺处理,由被保护的硫醇基生成游离的硫醇基(-SH),从而对链霉亲和素进行添加硫醇基(-SH)的处理。

[0188] 将该链霉亲和素溶液通过凝胶过滤柱(Zaba Spin Desalting Columns: Funakoshi)进行脱盐,得到可结合于上述三聚氰胺类粒子的链霉亲和素。

[0189] 使用该链霉亲和素总量和含有 2mM 的 EDTA 的 PBS 与上述调整至 1nM 的三聚氰胺

类粒子 1mL 混合,在室温下进行 1 小时使两分子结合的反应。然后,使用含有 2mM 的 EDTA 的 PBS 进行离心、清洗,仅回收链霉亲和素所结合的三聚氰胺类粒子(荧光纳米粒子)。

[0190] 对回收的荧光纳米粒子在 pH7.0 的水中的 Zeta 电位进行测定,结果为 -14mV。

[0191] (非特异性结合の確認)

[0192] 使该三聚氰胺类粒子在 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中以成为 0.2nM 或 0.005nM 的方式分散,涂布于组织阵列载片,在室温下静置 2 小时后,利用 PBS 缓冲液进行清洗。然后,对均未进行免疫染色和形态观察染色的组织阵列载片照射碘基罗丹明 101 的激发光,使荧光色素发光。利用荧光显微镜 (BX-53, 奥林巴斯公司制造) 对该状态的组织阵列载片进行观察及拍摄,确认到几乎不会观察到三聚氰胺类粒子向生物体分子的非特异性吸附产生的荧光。另外,亮点测量利用 ImageJ FindMaxima 法进行测量(参照表 2- 实施例 1 “向细胞核的吸附”, “向组织整体的吸附” 及图 1(B))。

[0193] (免疫染色)

[0194] 使用上述三聚氰胺类粒子如下进行人乳房组织的免疫染色和形态观察染色。作为染色用的组织切片,使用组织阵列载片 (CB-A712 系列, Cosmo Bio 株式会社制造)。对该组织阵列载片进行脱石蜡处理后,进行更换为水的清洗。将清洗的组织阵列载片在 10mM 柠檬酸缓冲液 (pH6.0) 中进行 121°C、15 分钟高压釜处理,由此进行抗原的活化处理。

[0195] 将活化处理后的组织阵列切片使用 PBS 缓冲液进行清洗后,在湿润箱中使用含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液进行 1 小时阻断处理。阻断处理后,使用含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液稀释至 0.05nM 的抗 HER2 兔单克隆抗体 (4B5) (Ventana 公司制造) 与组织切片反应 2 小时。将其用 PBS 缓冲液清洗后,与用含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液稀释至 2 μg/mL 的结合于 4B5 的生物素标记抗兔单克隆抗体反应 30 分钟。进行该反应后,使用含有 1% BSA 的 PBS 缓冲液稀释至 0.2nM 的上述的三聚氰胺类粒子与组织切片在中性的 pH 环境 (pH6.9 ~ 7.4)、室温的条件下反应 3 小时。反应后,将组织阵列切片使用 PBS 缓冲液进行清洗。

[0196] (形态观察染色)

[0197] 免疫染色后,进行苏木精 - 伊红染色 (HE 染色)。将经过免疫染色的切片用迈尔氏苏木精溶液染色 5 分钟进行苏木精染色。然后,将该切片以 45°C 的流水清洗 3 分钟。接着,用 1% 的伊红溶液染色 5 分钟进行伊红染色。然后,进行 4 次在纯乙醇中浸渍 5 分钟的操作,进行清洗、脱水。接着,进行 4 次在二甲苯中浸渍 5 分钟的操作,进行澄清。最后,使用封入剂 (“Entellan new”, Merck 公司制造) 封入组织切片,作为观察用的样品载片。

[0198] (观察)

[0199] 如上所述,使上述的三聚氰胺类粒子在 PBS 缓冲液 (pH7.4) 中以成为 0.2nM 的方式分散而制造染色液,将该染色液涂布于组织阵列载片,在室温下静置 2 小时后,利用 PBS 缓冲液进行清洗。然后,对免疫染色及形态观察染色了的组织切片照射规定的激发光,使荧光发光。将该状态的组织切片利用荧光显微镜 (BX-53, 奥林巴斯公司制造) 进行观察及拍摄。另外,亮点测量通过 ImageJ FindMaxima 法测量。

[0200] 上述激发光通过在光学滤波器通过而设定为 575 ~ 600nm。另外,关于观察的荧光的波长 (nm) 的范围,也通过在光学滤波器通过而设定为 612 ~ 682nm。

[0201] 显微镜观察、图像取得时的激发波长条件为在 580nm 的激发下视野中心部附近的照射能量为 900W/cm<sup>2</sup>。图像取得时的曝光时间以图像的亮度不饱和的方式任意地设定(例

如设定为 4000  $\mu$  秒) 进行拍摄。然后,如上所述,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价。将该结果示于表 2。

[0202] [ 实施例 2]

[0203] 以下,对制造本发明的聚苯乙烯类粒子的例子进行说明。需要说明的是,“聚苯乙烯类粒子”是指主要含有聚苯乙烯的树脂粒子。

[0204] 在氩鼓泡的纯水中 5mL 加入甲基丙烯酸缩水甘油酯(甲基丙烯酸缩水甘油酯)(东京化成工业株式会社制造)0.18g、二乙烯基苯 0.05g、荧光色素 Sulforhodamine 101(Sigma-Aldrich 公司制造、德克萨斯红色素)0.002g 及 4-氨基苯乙烯(东京化成工业社制造)0.05g。一边搅拌一边升温至 70 $^{\circ}$ C,加入作为水溶性偶氮聚合引发剂的 V-50(和光纯药株式会社制造)0.012g,反应 12 小时。将反应液以 10000G 离心分离 20 分钟,回收粒子。将回收的粒子分散于纯水,通过再次离心分离而回收,由此进行精制。将得到的粒子加入于过量的氨水,将粒子末端(源自甲基丙烯酸缩水甘油酯)的环氧基变换为氨基,得到末端结合有具有氨基的德克萨斯红色素的聚苯乙烯纳米粒子。

[0205] 使用含有 2mM 的 EDTA(乙二胺四乙酸)的 PBS(磷酸缓冲液生理盐水)将得到的色素结合纳米粒子调整至 3nM,在该溶液中混合 SM(PEG)<sub>4</sub>(Thermo Fisher Scientific 公司制造的琥珀酰亚胺[(N-马来酰亚胺基丙酰胺基)-十一缩十二乙二醇]酯),使其最终浓度成为 10mM,反应 1 小时。将该混合液以 10,000G 进行 20 分钟离心分离,除去上清液后,加入含有 2mM 的 EDTA 的 PBS,使沉淀物分散,再次进行离心分离。进行 3 次通过同样的步骤进行的清洗,由此得到在末端附有马来酰亚胺基的色素内包纳米粒子。

[0206] 另一方面,与实施例 1 同样地得到可结合于该聚苯乙烯类粒子的链霉亲和素。使用该链霉亲和素总量和含有 2mM 的 EDTA 的 PBS 与上述调整至 1nM 的粒子 1mL 混合,在室温下进行 1 小时使两分子结合的反应。然后,使用含有 2mM 的 EDTA 的 PBS 进行离心、清洗,仅回收链霉亲和素结合的聚苯乙烯类粒子(荧光纳米粒子)。利用 Zeta 电位测定装置(“ZetasizerNano”、Malvern 公司制造)测定回收的聚苯乙烯系粒子的 pH7.0 的水中的 Zeta 电位,结果为 -22mV。

[0207] (免疫染色、形态观察染色、观察)

[0208] 使用本实施例 2 中制造的聚苯乙烯类粒子代替实施例 1 的三聚氰胺类粒子,除此以外,与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。

[0209] [ 实施例 3]

[0210] 使用 20  $\mu$ L 的 1,2-双(2-氨基乙氧基)乙烷(BAEE,关东化学株式会社制造)代替实施例 1 中的乙醇胺制造三聚氰胺类粒子(荧光纳米粒子),除此以外,与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。

[0211] [ 实施例 4]

[0212] 使用 20  $\mu$ L 的三(2-氨基乙基)胺(TAEA,关东化学株式会社制造)代替实施例 1 中的乙醇胺制造三聚氰胺类粒子(荧光纳米粒子),除此以外,与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。

[0213] [ 实施例 5]

[0214] 使用 20  $\mu$ L 的 1, 2- 双 (2- 氨基乙氧基) 乙烷 (BAEE, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 16mg 的 SM(PEG)<sub>12</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>制造三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ), 除此以外, 与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。

[0215] [ 实施例 6]

[0216] 使用 20  $\mu$ L 的三 (2- 氨基乙基) 胺 (TAEA, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 32mg 的 SM(PEG)<sub>24</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>制造三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ), 除此以外, 与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。另外, 将调查了非特异性结合的观察时的照片示于图 1(D)。

[0217] [ 实施例 7]

[0218] 使用 20  $\mu$ L 的 1, 2- 双 (2- 氨基乙氧基) 乙烷 (BAEE, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 16mg 的 SM(PEG)<sub>12</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>制造三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ), 除此以外, 与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。另外, 将调查了非特异性结合的观察时的照片示于图 1(C)。

[0219] [ 实施例 8]

[0220] 使用 20  $\mu$ L 的 1, 2- 双 (2- 氨基乙氧基) 乙烷 (BAEE, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 3mg 的 SM(PEG)<sub>2</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>制造三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ), 除此以外, 与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价。将该结果示于表 2。

[0221] [ 实施例 9]

[0222] 使用 20  $\mu$ L 的 1, 2- 双 (2- 氨基乙氧基) 乙烷 (BAEE, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 59mg 的 SM(PEG)<sub>44</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>制造三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ), 除此以外, 与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。

[0223] [ 实施例 10]

[0224] 使用 20  $\mu$ L 的三 (2- 氨基乙基) 胺 (TAEA, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 32mg 的 SM(PEG)<sub>24</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>将三聚氰胺类粒子制造成平均粒径 28nm, 除此以外, 与实施例 1 同样地进行三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ) 的制造、免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价。将该结果示于表 2。

[0225] [ 实施例 11]

[0226] 使用 20  $\mu$ L 的三 (2- 氨基乙基) 胺 (TAEA, 关东化学株式会社制造) 代替实施例 1 中的乙醇胺、且使用 32mg 的 SM(PEG)<sub>24</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>将三聚氰胺类粒子制造成平均粒径 310nm, 除此以外, 与实施例 1 同样地进行三聚氰胺类粒子 ( 荧光纳米粒子 ) 的制造、免疫染色、形态观察染色及观察, 分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价。将该结果示于表 2。

[0227] [比较例 1]

[0228] 未进行在实施例 1 中的利用乙醇胺的氨基导入及利用 SM(PEG)<sub>4</sub>的 PEG 附加,使链霉亲和素直接结合于色素树脂粒子而制造三聚氰胺类粒子,除此以外,与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价。将该结果示于表 2。另外,将调查了非特异性结合的观察时的照片示于图 1(A)。

[0229] 另外,关于对刚聚合后的三聚氰胺类粒子直接结合链霉亲和素的方法如下进行。

[0230] 作为 1mL 的悬浮液,将含有 10% 的三聚氰胺粒子群的物质 (= 100mg 的固体) 称量放入 Eppendorf 帽中,使其悬浮于 1mL 的 50mM 的 MES 缓冲液 (2- 吗啉乙磺酸 (Merck) pH5.5),接着利用超离心机以 60,000rpm 进行离心分离。废弃上清液,重复清洗操作。接着,使粒子群再悬浮于 1mL 的 MES 缓冲液中并移至可密封的玻璃管。添加 100  $\mu$ L 的 EDC/NHS 溶液 (100mg/mL 的 EDC、16mg/mL 的 N- 羟基琥珀酰亚胺 (Merck) 存在于 MES 缓冲液中)。在室温下旋转 1 小时而保持三聚氰胺粒子群的悬浮状态。在此期间,NHS 与粒子表面上的羧基偶联。将样品再次离心,废弃上清液。使用 1mL 的 MES 缓冲液再次进行混合物的清洗。使粒子群再悬浮于 1mL 的蛋白质 (链霉亲和素) 溶液中,在室温下旋转一晚。使对应的样品再悬浮于 1mL 的 MES 缓冲液 (未添加 EDC/NHS 及蛋白质溶液) 中,在室温下旋转一晚。对样品进行离心分离,添加 1mL 的乙醇胺溶液后,进一步旋转样品 1 小时,进行再次离心。乙醇胺与残留的活化酯反应,生成酰胺。接着,每次使用 1mL 的 PBS 缓冲液进行 3 次混合物的清洗。最后,使粒子群再悬浮于 PBS 缓冲液,使其可在冰箱中在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

[0231] [比较例 2]

[0232] 使用 20  $\mu$ L 的 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS) 代替实施例 1 中的乙醇胺而进行氨基的添加及使用 16mg 的 SM(PEG)<sub>12</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>,除此以外,与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价等。将该结果示于表 2。

[0233] 另外,APS (H<sub>2</sub>N-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-Si (OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>) 用于降低三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,使 APS 分子的乙氧基发生水解,产生的反应性硅烷醇基 (-SiOH) 与三聚氰胺类粒子的氨基反应而将 APS 分子添加于三聚氰胺类粒子。

[0234] [比较例 3]

[0235] 添加 20  $\mu$ L 的 3- 氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS) 和 4  $\mu$ L 的四乙氧基硅烷 (TEOS) 代替实施例 1 中的乙醇胺及使用 16mg 的 SM(PEG)<sub>12</sub>代替 SM(PEG)<sub>4</sub>,除此以外,与实施例 1 同样地进行免疫染色、形态观察染色及观察,分别进行试剂分散性、向核的吸附及向组织整体的吸附的评价。将该结果示于表 2。

[0236] 另外,除上述 APS 以外,TEOS (Si (OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>) 用于降低三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,将 APS 分子的乙氧基水解而产生的反应性硅烷醇基 (-SiOH) 与三聚氰胺类粒子的氨基反应而将 TEOS 分子添加于三聚氰胺类粒子。

[0237] (考察)

[0238] 在免疫染色时的环境 pH 即中性的 pH 环境 (pH6.9 ~ 7.4) 下,选择对树脂粒子的表面进行化学修饰的乙醇胺、TAEA、及 BAEE 等导入氨基的化合物,或变更同样地进行化学修饰的 PEG 的链长而将三聚氰胺类粒子或聚苯乙烯类粒子的 pH7.0 的水中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位设定为 -14mV ~ -60mv,进一步使其分散于 pH7.4 的缓冲液而用作染色液,可抑

制荧光纳米粒子向上述细胞内的生物体分子的非特异性结合,同时仅引起链霉亲和素和生物素的特异性结合(生物体分子识别)(参照表 1、图 1)。该结果,可仅将作为染色对象的细胞内的生物体分子特异性地染色(对比参照图 1 的实施例 6 或 7)。

[0239] [表 2]

[0240]

	粒子构成(*1)	Zeta 电位	试剂的分散性(*2)	向细胞核的吸附(*3)		向组织的吸附(*4)	色素的溶出(*5)	平均细胞亮点数(评价)*6
				粒子浓度(nm)				
				0.2	0.005			
比较例 1	三聚氰胺类粒子(150nm)+SA	28 mV	○	×	×	○	○	吸附多,无法分离亮点,无法测量
比较例 2	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG12(APS)+SA	-6mV	×	×	○	○	○	吸附多,无法分离亮点,无法测量
比较例 3	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG12(APS+TEOS)+SA	-66mV	○	○	○	×	○	吸附多,无法分离亮点,无法测量
实施例 1	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG4(乙醇胺)+SA	-14mV	○	○	○	○	○	14(Δ)
实施例 2	聚苯乙烯类粒子(100nm)+PEG4(BAEE)+SA	-22mV	○	○	○	○	×	34(○*7)
实施例 3	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG4(BAEE)+SA	-23mV	○	○	○	○	○	38(○)
实施例 4	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG4(TAEA)+SA	-22mV	○	○	○	○	○	36(○)
实施例 5	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG24(BAEE)+SA	-33mV	○	○	○	○	○	39(○)
实施例 6	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG24(TAEA)+SA	-38mV	○	○	○	○	○	34(○)
实施例 7	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG12(BAEE)+SA	-48mV	○	○	○	○	○	42(○)
实施例 8	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG2(BAEE)+SA	-28mV	○	○	○	○	○	13(Δ)
实施例 9	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG44(BAEE)+SA	-58mV	○	○	○	○	○	18(Δ)
实施例 10	三聚氰胺类粒子(28nm)+PEG24(TAEA)+SA	-23mV	○	○	○	○	○	无法测量,仅可测量亮度
实施例 11	三聚氰胺类粒子(310nm)+PEG24(TAEA)+SA	-28mV	○	○	○	○	○	9(Δ)

[0241] APS :3-氨基丙基三乙氧基硅烷、PEG :聚乙二醇、TEOS :四乙氧基硅烷、

[0242] BAEE :1, 2-双(2-氨基乙氧基)乙烷、SA :链霉亲和素、TAEA :三(2-氨基乙基)胺

[0243] \*1 :粒子构成的括号内所示的长度表示荧光纳米粒子的平均粒径。

[0244] \*2 :保存 1 天后的沉淀 :有“×”,无“○”

[0245] \*3 :每 1 细胞核的平均亮点数 :“×”=1 个以上、○”=低于 1 个

[0246] \*4 :每 1 细胞的平均亮点数 :“×”=1 个以上、○”=低于 1 个

[0247] \*5 :观察时的荧光色素的渗出 :“×”=有、○”=无

[0248] \*6 :关于 60 个细胞的每 1 个细胞的平均亮点数

[0249] \*7 :其中,观察通过水性封入剂进行

[0250] [ 实施例 13]

[0251] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在 PBS (pH7.4) 中,使其为 2mg/mL,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -6.7mV。然后,将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制备染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0252] [ 实施例 14]

[0253] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在 Dako 稀释液 (Dako • Japan 株式会社制造“Antibody Diluent, Background Reducing”、产品编号 S3022) (pH7.8) 中,使其为 2mg/mL,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -7.8mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0254] [ 实施例 15]

[0255] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 1 重量% BSA 的 PBS (pH7.2) 中,使其为 2mg/mL,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -7.3mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0256] [ 实施例 16]

[0257] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 5 重量% BSA 的 PBS (pH7.1) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -7.0mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0258] [ 实施例 17]

[0259] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 10 重量% BSA 的 PBS (pH7.0) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -6.6mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0260] [ 实施例 18]

[0261] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 20 重量% BSA 的 PBS (pH7.0) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -4.6mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0262] [ 实施例 19]

[0263] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在具有 1 重量%的 BSA、0.1 重量%的吐温 20 (注册商标) 及 0.015N 的叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ ) 作为组成的 PBS (pH7.3) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -2.4mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0264] [实施例 20]

[0265] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在具有 5 重量%的 BSA、0.1%的吐温 20(注册商标)及 0.015N 的  $\text{NaN}_3$  作为组成的 PBS (pH7.2) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -2.0mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0266] [实施例 21]

[0267] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在具有 10 重量%的 BSA、0.1 重量%的吐温 20(注册商标)及 0.015N 的  $\text{NaN}_3$  作为组成的 PBS (pH7.2) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -2.2mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0268] [实施例 22]

[0269] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 10 重量% BSA 的 50mM 的 Tris-HCl (pH7.5) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -9.6mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0270] [实施例 23]

[0271] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 10 重量% BSA 的 50mM 的 Tris-HCl (pH7.5) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -9.6mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0272] [实施例 24]

[0273] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 1 重量% BSA 的 50mM 的磷酸缓冲液 (pH6.2) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -6.9mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0274] [实施例 25]

[0275] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 5 重量% BSA 的 50mM 的磷酸缓冲液 (pH6.1) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -6.6mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

## [0276] [实施例 26]

[0277] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 10 重量% BSA 的 50mM 的磷酸缓冲液 (pH6.0) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -6.5mV。将该分

散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 3。

[0278] [表 3]

[0279]

例	粒子构成(*1)	缓冲液	添加剂	缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位	试剂分散性(*2)	向细胞核的吸附		向组织整体的吸附(*4)	缓冲液的 pH	色素溶出(*5)	有无亮点(○=有、×=无)
						粒子浓度(nm)					
						0.2	0.005				
实施例 13	三聚氰胺类粒子(150nm)+PEG 12(BAEE)+SA	PBS	-	-6.7mV	○	○	○	○	7.4	○	○
实施例 14		Dako 稀释液	-	-7.8mV	○	○	○	○	7.8	○	○
实施例 15		PBS	1%BSA	-7.3mV	○	○	○	○	7.2	○	○
实施例 16		PBS	5%BSA	-7.0mV	○	○	○	○	7.1	○	○
实施例 17		PBS	10%BSA	-6.6mV	○	○	○	○	7.0	○	○
实施例 18		PBS	20%BSA	-4.6mV	○	○	○	○	7.0	○	○
实施例 19		PBS	1%BSA 0.1%吐温 20 0.015%N <sub>3</sub>	-2.4mV	○	○	○	○	7.3	○	○
实施例 20		PBS	5%BSA 0.1%吐温 20 0.015%N <sub>3</sub>	-2.0mV	○	○	○	○	7.2	○	○
实施例 21		PBS	10%BSA 0.1%吐温 20 0.015%N <sub>3</sub>	-2.2mV	○	○	○	○	7.2	○	○
实施例 22		Tris-HCl	10%BSA	-9.6mV	○	○	○	○	7.5	○	○
实施例 23		Tris-HCl	10%BSA 0.1%吐温 20 0.015%N <sub>3</sub>	-7.6mV	○	○	○	○	7.1	○	○
实施例 24		磷酸	1%BSA	-6.9mV	○	○	○	○	6.2	○	○
实施例 25		磷酸	5%BSA	-6.6mV	○	○	○	○	6.1	○	○
实施例 26		磷酸	10%BSA	-6.5mV	○	○	○	○	6.0	○	○

[0280] [比较例 4]

[0281] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在 50mM 的 Tris-HCl (pH7.8) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -12.2mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0282] [比较例 5]

[0283] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 1 重量% BSA 的 50mM 的

Tris-HCl (pH7.8) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -12.6mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0284] [比较例 6]

[0285] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 5 重量% BSA 的 50mM 的 Tris-HCl (pH7.6) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -11.9mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0286] [比较例 7]

[0287] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 1 重量%的 BSA、0.1 重量%的吐温 20 (注册商标)、0.015N 的  $\text{NaN}_3$  作为组成的 50mM 的 Tris-HCl (pH7.5) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -14.0mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0288] [比较例 8]

[0289] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 5 重量%的 BSA、0.1 重量%的吐温 20 (注册商标)、0.015N 的  $\text{NaN}_3$  作为组成的 50mM 的 Tris-HCl (pH7.2) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -10.1mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0290] [比较例 9]

[0291] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在以 0.1 重量%含有吐温 20 (注册商标) 的 50mM 的 Tris-HCl (pH5.2) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -28.2mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0292] [比较例 10]

[0293] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 0.1 重量% DISPERBYK-2010 (注册商标) (BYK-CHEMIE Japan 株式会社制造) 的 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH5.8) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -32.2mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0294] [比较例 11]

[0295] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散在含有 0.1 重量% DISPERBYK-2015 (注册商标) (BYK-CHEMIE Japan 株式会社制造) 的 50mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH5.4) 中,在该状态下测定该三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位,结果为 -27.7mV。将该分散液中的上述三聚氰胺类粒子的浓度调整为 0.2nM、0.005nM 而分别制造染色液,与实施例 1 同样地进行非特异

性结合的确证、免疫染色、形态观察染色、及观察等。将该结果示于表 4。

[0296] [表 4]

[0297]

例	粒子构成	缓冲液	添加剂	缓冲液中的荧光纳米粒子的 Zeta 电位	试剂分散性 (*2)	向细胞核的吸附 (*3)		向组织整体的吸附 (*4)	缓冲液的 pH	色素溶出 (*5)	有无亮点 (○=有, ×=无)
						粒子浓度 (nm)					
						0.2	0.005				
比较例 4	三聚氰胺类粒子 (150 nm)+ PEG 12(BAEE)+SA	Tris-HCl	-	-12.2mV	○	○	○	○	7.8	○	×
比较例 5		Tris-HCl	1%BSA	-12.6mV	○	○	○	○	7.8	○	×
比较例 6		Tris-HCl	5%BSA	-11.9mV	○	○	○	○	7.6	○	×
比较例 7		Tris-HCl	1%BSA 0.1%吐温 20 0.015%N <sub>3</sub>	-14.0mV	○	○	○	○	7.5	○	×
比较例 8		Tris-HCl	5%BSA 0.1%吐温 20 0.015%N <sub>3</sub>	-10.1mV	○	○	○	○	7.2	○	×
比较例 9		Tris-HCl	0.1%吐温 20	-28.2mV	○	○	○	○	5.2	○	×
比较例 10		Tris-HCl	0.1DISPERBY K-2010	-32.2mV	○	○	○	○	5.8	○	×
比较例 11		Tris-HCl	0.1DISPERBY K-2015	-27.7mV	○	○	○	○	5.4	○	×

[0298] (结果、考察)

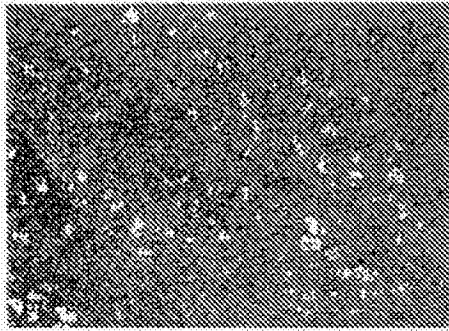
[0299] 使实施例 7 中制备的三聚氰胺类粒子分散于 pH6.0 ~ 8.0 的 PBS 缓冲液, 使该 pH 缓冲液中的 Zeta 电位为 0mV ~ -10mV, 由此三聚氰胺类粒子的试剂分散性优异, 可抑制向细胞核或组织整体的非特异性吸附, 并且平均细胞亮点数的评价均为“○”(实施例 13)。即使加入对上述 Zeta 电位的值造成影响的 BSA 或吐温 20 (注册商标) 等作为组成成分, 若缓冲液中的三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位在上述范围内, 则也可得到同样的效果 (实施例 15 ~ 21)。并且, 即使将 PBS 缓冲液变更为 Dako 稀释液、Tris-HCl、或磷酸缓冲液, 若缓冲液中的三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位在上述范围内, 则也可得到同样效果 (实施例 14、22 ~ 26)。

[0300] 并且, 在使用具有缓冲能力的 Tris-HCl 的情况下, 在缓冲液中的三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位未落入 0mV ~ -10mV 时, 无法得到亮点 (比较例 4 ~ 11)。

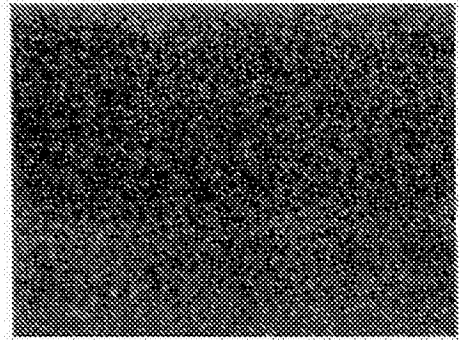
[0301] 根据这些结果, 认为作为染色液, 使三聚氰胺类粒子分散于 pH6.0 ~ 8.0 的缓冲液且该缓冲液中的三聚氰胺类粒子的 Zeta 电位为 0mV ~ -10mV 是得到亮点所必需的。另外, 如上所述, 关于与实施例 7 粒子构成不同的实施例 1-6、8-11 的三聚氰胺类粒子 (参照表 2), 可由利用与实施例 13 同样地分散于 PBS 缓冲液 (pH7.4) 而得到的染色液的染色来得到亮点的情况理解上述内容 (参照表 2)。

[0302] 以上, 参照附图对本发明的实施方式及实施例进行说明, 但本发明并不限于这些实施方式及实施例, 只要不脱离其主旨则允许设计变更等。

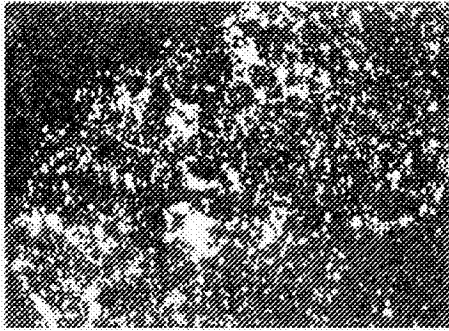
(A)



(B)



(C)



(D)

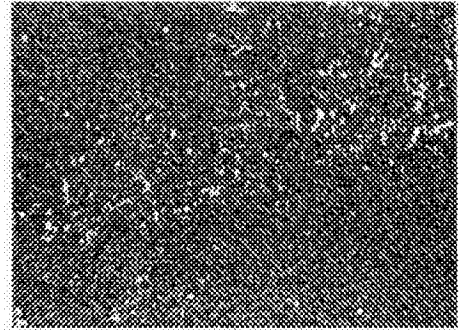


图 1

专利名称(译)	生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105324667A</a>	公开(公告)日	2016-02-10
申请号	CN201480034863.9	申请日	2014-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达株式会社		
[标]发明人	乡田秀树 高桥优 高梨健作 冈田文德		
发明人	乡田秀树 高桥优 高梨健作 冈田文德		
IPC分类号	G01N33/543 B82Y5/00 B82Y30/00 B82Y40/00 G01N33/533 G01N33/536		
CPC分类号	G01N33/54346 B82Y5/00 B82Y15/00 B82Y30/00 B82Y40/00 C09B67/0013 C09B68/41 C09B68/444		
代理人(译)	张涛		
优先权	2013128412 2013-06-19 JP		
其他公开文献	CN105324667B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种生物体分子染色用的荧光纳米粒子及其制造方法，其包括：若pH7.0下的Zeta电位为-10mV ~ -60mV的荧光纳米粒子或pH6.0 ~ 8.0的缓冲液中的Zeta电位为0mV ~ -10mV范围的荧光纳米粒子，则可在通常带负电的生物体分子和荧光纳米粒子之间产生适度的电排斥力。其结果，可抑制荧光纳米粒子和生物体分子的非特异性结合，可通过超过所述电排斥力的相互作用使荧光纳米粒子和染色对象的生物体分子特异性地结合，可提高特定的染色对象的生物体分子的可视性。另外，荧光纳米粒子彼此之间也产生适度的电排斥力，因此，可抑制它们的凝聚，也可维持染色液的分散性。

