



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101650998 B

(45) 授权公告日 2013.02.06

(21) 申请号 200910159275.9

G01N 27/72(2006.01)

(22) 申请日 2006.01.19

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

WO 9109141 A1, 1991.06.27, 全文.

60/645,549 2005.01.20 US

GB 2017125 A, 1979.10.03, 全文.

(62) 分案原申请数据

WO 9720214 A1, 1997.06.05, 全文.

200680002382.5 2006.01.19

审查员 孙重清

(73) 专利权人 卢米尼克斯股份有限公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 D·J·钱德勒 J·伯德瑞

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 项丹

(51) Int. Cl.

H01F 1/11(2006.01)

H01F 1/06(2006.01)

B22F 1/02(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/49(2006.01)

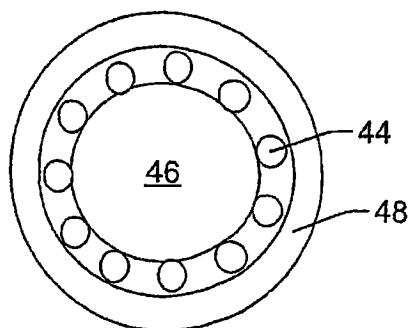
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

(54) 发明名称

微球、包含其的微球群、以及分析试验样品的方法

(57) 摘要

本发明涉及微球、包含其的微球群、以及分析试验样品的方法，提供了一种微球，包括：核微球；耦联到所述核微球表面的磁性材料，其中，50%或更少的所述核微球表面被所述磁性材料覆盖，并且所述磁性材料包括粒度为10-1000纳米的颗粒或颗粒的聚集体；以及包敷所述磁性材料和所述核微球的聚合物层。本发明还提供了包含该微球的微球群、以及分析试验样品的方法。



1. 一种被配置成呈现荧光和磁性特性的微球，该微球是根据包括以下步骤的方法形成的：

将磁性颗粒按大小分成第一组和第二组，其中所述第一组中的所述磁性颗粒大于所述第二组中的所述磁性颗粒，所述第一组中相当部分的所述磁性颗粒的粒度大于 10 纳米，所述第二组中相当部分的所述磁性颗粒的粒度小于 10 纳米；

组合核微球与仅仅所述第一组中的所述磁性颗粒，使得所述磁性颗粒耦联于所述核微球的表面以形成磁化核微球，其中 50% 或更少的所述核微球表面被所述第一组中的所述磁性颗粒覆盖；以及

组合所述磁化核微球与一种或多种可聚合材料，使得所述一种或多种可聚合材料形成包敷所述磁化核微球的聚合物层，

其中，所述微球包含一种或多种荧光染料。

2. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述核微球包括耦联于所述核微球表面的一个或多个官能团。

3. 如权利要求 2 所述的微球，其特征在于，所述一个或多个官能团在核微球形成的过程中通过与包括所述一个或多个官能团的一种或多种可聚合材料聚合耦联到该核微球表面。

4. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒包括粒度为 50-300 纳米的颗粒或颗粒的聚集体。

5. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒包括磁石单晶。

6. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒包括混合金属磁性材料。

7. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒是铁磁性、反磁性、顺磁性或超顺磁性的。

8. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述核颗粒包括苯乙烯聚合物、二乙烯苯聚合物、二氧化硅聚合物或丙烯酰胺聚合物。

9. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，它还包括耦联于所述聚合物层外表面的一个或多个官能团。

10. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，所述聚合物层在没有表面活性剂和稳定剂的情况下形成。

11. 如权利要求 1 所述的微球，其特征在于，它还包括耦联于所述聚合物层外表面的附加磁性材料和包敷所述附加磁性材料的附加聚合物层。

12. 如权利要求 11 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒和所述附加磁性材料具有相同的成分。

13. 如权利要求 11 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒和所述附加磁性材料具有不同的成分。

14. 如权利要求 11 所述的微球，其特征在于，所述磁性颗粒和所述附加磁性材料的至少之一包括混合金属磁性材料。

15. 如权利要求 11 所述的微球，其特征在于，所述聚合物层和所述附加聚合物层由相同的可聚合材料形成。

16. 如权利要求 11 所述的微球，其特征在于，所述聚合物层和所述附加聚合物层由不

同的可聚合材料形成。

17. 如权利要求 11 所述的微球, 其特征在于, 它还包括耦联于所述附加聚合物层外表面的一个或多个官能团。

18. 一种被配置成呈现荧光和磁性特性的微球群, 包括: 被配置成呈现不同磁性特性的两个或多个微球子集, 其中所述两个或多个子集中的单独微球是权利要求 1 所述的微球。

19. 如权利要求 18 所述的微球群, 其特征在于, 所述两个或多个微球子集进一步被配置成呈现不同的 90° 光散射特性。

微球、包含其的微球群、以及分析试验样品的方法

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为 PCT/US2006/002257, 国际申请日为 2006 年 1 月 19 日, 进入中国国家阶段的申请号为 200680002382.5, 发明名称为“用于基于荧光应用的磁性微球”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明一般涉及用于基于荧光应用的磁性微球。某些实施方式涉及包括耦联到核微球表面的磁性材料与包敷该磁性材料和核微球的聚合物层的微球。

背景技术

[0003] 以下描述和示例不应由于包含在本节中而被视为现有技术。

[0004] 目前, 磁性微球广泛用于各种应用中, 包括: 瘤的升温处理; 将治疗物质直接传送到生活系统的靶位置; 细胞、多核苷酸和蛋白质分离; 以及生物分子的临床分析。适于这种用途的微球可从许多经销商处购得, 并具有许多不同构造。这些微球通常包括磁性敏感物质以及诸如有机聚合物或二氧化硅的球形基质材料。微球可具有若干构造, 诸如由基质包敷的磁核、散布在基质中的小磁粒、和球性基质外侧上的磁性涂层。这些微球构造各具优点和缺点, 且适当构造的选择取决于微球的期望用途。

[0005] 对于许多用途, 适当的微球呈现顺磁性或超顺磁性而非铁磁性。这种微球在磁场不存在时磁性可忽略, 但是施加磁场可引起微球内磁畴的对齐, 从而产生从微球向场源的引力。当去除磁场时磁畴恢复随机取向, 从而不存在粒子间的磁引力和斥力。在超顺磁性情况下, 这种磁畴随机取向的恢复几乎是瞬时的, 而顺磁性材料在去除磁场之后会将磁畴对齐保持一个时间段。磁畴对齐的保持会导致在没有外部磁场时的微球聚集, 这通常是不期望的。铁磁材料具有永久对齐的磁畴, 所以包括这种磁性材料的微球很容易聚集。

[0006] 与磁性材料关联的基质材料也取决于微球的期望用途改变, 而二氧化硅和聚合物乳胶是最常用的基质材料。这两种材料可用于产生直径范围宽泛的基本上均匀的磁性微球。磁性二氧化硅微球通常比由诸如聚苯乙烯的有机聚合物制成的微球在更宽温度范围内更加稳定, 而这两种材料可在诸如酸性溶剂或芳香族溶剂的某些环境中分解。此外, 二氧化硅微球通常比乳胶微球密度更大, 这在选择磁性微球基质时是要重点考虑的。

[0007] 磁性微球的一种重要且不断增长的用途是在生物试验领域。蛋白质和低核苷酸的试验可在微球的表面上进行, 然后该微球可在微球特征被测量之前从反应混合物磁性分离。测量之前分离试验微球减少了非靶分子的干扰, 从而测量可产生更加精确的结果。

[0008] 在对用于生物试验的磁性微球越来越感兴趣的同时, 在荧光微球上进行的试验得到了发展。使用耦联到微球表面或结合到微球中的荧光标签或荧光材料允许制备可基于不同染料发射谱和 / 或信号强度分辨的许多微球集。在生物试验中, 这些微球的荧光和光散射可通过流式细胞仪 (flow cytometer) 或成像系统测量, 且测量结果可用于确定微球的大小和荧光、以及与正在研究的试验系统相关联的荧光 (例如“夹心捕获”试验中荧光标签抗体), 如 Lee 等人的美国专利 No. 5, 948, 627 所述, 该专利通过引用全部结合于此。通过改

变微球中所结合的多种染料的浓度,可产生百、甚至上千的可分辨微球集。在试验中,每个微球集可与不同靶相关联从而允许对单个容器内的单个样品进行许多测试,如 Chandler 等人的美国专利 No. 5, 981, 180 所述,该专利通过引用全部结合于此。

[0009] 可荧光分辨的微球可通过给予这些微球磁性响应而得以改进。形成荧光磁性微球的方法示例在 Wang 等人的美国专利 No. 5, 283, 079 中描述,该专利通过引用全部结合于此。由 Wang 等人描述的方法包括用磁石和附加聚合物涂布荧光核微球,或者将核微球与磁石、染料和可聚合单体混合并引发聚合以产生涂布微球。这些方法是比荧光磁性微球的合成相对简单的方法,但是不适于产生在诸如 Chandler 等人的美国专利 No. 5, 981, 180 中所述的相对较大的多重试验 (multiplex assay) 中使用的大量精确染色微球。

[0010] Wang 等人方法的局限是由于大多数荧光染料分子对在自由基引发的聚合反应过程中产生的基团的攻击非常灵敏的事实。如果这些自由基使哪怕相对少量的染料分子失活,则不能在微球中实现精确的染料量。此外,如果 Wang 等人的方法用于合成非荧光磁性微球,且通过使用 Chandler 等人的美国专利 No. 6, 514, 295 (通过引用全部结合于此) 中描述的溶剂溶胀方法尝试对微球进行染色,则由于磁性材料并没有与微球化学键合,相对大量的磁性材料将在染色过程中从微球释放。特别地,微球中磁性材料的物理包埋将被溶胀过程中断,且磁性材料将释放到溶液中。

[0011] 荧光磁性微球也在 Chandler 等人的美国专利 No. 6, 268, 222 中描述,该专利通过引用全部结合于此。在该方法中,纳米球耦联到聚合物核微球,且荧光和磁性材料与核微球或纳米球相关联。该方法产生具有期望特征的微球,但是纳米球 - 微球键合在剧烈反应条件下容易分裂。包敷微球和键合其上的纳米球的涂层可用于改进该关联,但是再一次,使用自由基引发剂形成该涂层可损害微球的荧光发射分布。

[0012] 荧光磁性微球的更合需要构造是使用在诸如 Chandler 等人的美国专利 No. 6, 514, 295 描述的构建技术进行染色的磁性响应微球。通常该方法使用溶胀微球的溶剂,从而允许荧光材料迁移到微球中。这些染色溶剂包括一种或多种有机溶剂。因此,微球必须能够耐有机溶剂而不损失其成分完整性。此外,自由磁石干扰许多生物反应。因此,容易损失相对少量磁石的微球是不可接受的。这样,磁性微球应构建成磁性材料紧密地键合到微球,从而防止在溶胀过程中损失磁性材料。

[0013] 磁性微球在 Wang 等人的美国专利 No. 5, 091, 206、Sutor 的美国专利 No. 5, 648, 124 和 Wang 等人的美国专利 No. 6, 013, 531 中描述,这些专利通过引用全部结合于此。然而,由于磁性材料未被化学固定,因此由 Wang 等人的这些专利中描述的方法产生的微球可在有机溶剂中处理时损失磁性材料。在各个这些专利中,将相当小的磁性材料颗粒涂布在聚合物核微球上,且聚合物壳作为外涂层。磁性颗粒被合成并处理以使粒度最小化。诸如 Fe_3O_4 的一些磁性材料随着粒度的减小从铁磁性变成顺磁性再变成超顺磁性。因此,具有最小可能粒度的磁石颗粒可用于形成微球,使所产生的微球几乎不呈现顽磁性。

[0014] 然而,如果产品微球也被构建成从核微球中的染料物质发射荧光信号,则微球核表面上磁性颗粒层的厚度需要重点考虑。例如,由于大多数磁性物质是不透光的,微球表面上的相对较厚的磁性颗粒涂层会导致额外的光散射或者遮挡光子传播。使用本发明的方法,其中磁性组分被设计成具有最小粒度,磁性成分将不得不受限为允许光透射通过磁性组分。事实上,为了提供具有 7 微米直径和 5% 的磁性成分的磁性微球,核微球的整个表面

需要涂布厚度为 15 纳米的磁石层。该厚度导致大大降低的荧光信号。即使一些磁性颗粒较大,如 Sutor 所述,相对大量的较小磁性颗粒的出现将大大影响微球的发射分布。Sutor 发明的一个目的是提供比已知微粒每克材料具有更多电磁单位 (EMU) 的磁性响应微粒。

[0015] 目前使用的方法在制备外涂层时也使用表面活性剂和稳定剂。出于许多目的,这些分子在微球表面上的出现是可接受的。然而,当用于生物试验时,表面活性剂能导致生物分子键合到微球表面的效率的非预期干扰和变化。清洗过程可减少与微球表面关联的表面活性剂和稳定剂的量,但是完全去除表面活性剂和稳定剂极其困难。

[0016] 因此,比现有技术显著改进的是提供用于形成含有大于约 2 总量% 的磁性响应材料的微球、而不显著妨碍光传播进出微球的方法。进一步的改进在于:该磁性响应材料与微球强关联从而减少染色过程中磁性响应材料的损失、并且该磁性响应材料包敷有聚合物以基本上防止磁性响应材料与感兴趣的生物分子相互作用。此外,如果最外面的聚合物层在没有表面活性剂和稳定剂出现的情况下形成,则目前使用的方法可得到改进。

发明内容

[0017] 以下对微球、微球群和用于形成微球的方法的各个实施方式的描述并不旨在以任何方式解释成对所附权利要求的主题进行限制。

[0018] 一实施方式涉及配置成呈现荧光和磁性特性的微球。该微球包括核微球和耦联到核微球表面的磁性材料。核微球表面的约 50% 或更少被磁性材料覆盖。此外,微球包括包敷磁性材料和核微球的聚合物层。

[0019] 在一实施方式中,核微球包括耦联到核微球表面的一个或多个官能团。在另一实施方式中,微球包括一种或多种荧光染料。在一不同实施方式中,微球包括两种或多种不同荧光染料。在一些实施方式中,微球中含有的荧光染料被结合到聚合物层以及核微球中。

[0020] 在一些实施方式中,磁性材料包括粒度为约 10 纳米至约 1000 纳米的颗粒。在一较佳实施方式中,磁性材料包括粒度为约 50 纳米至约 300 纳米的颗粒。在一些实施方式中,磁性材料包括磁石单晶。在再一实施方式中,磁性材料包括颗粒聚集体。例如,磁性材料可以是比上述那些更小的颗粒聚集体,使得该聚集体的大小在上述范围之一内。在另一实施方式中,磁性材料包括混合金属磁性材料。在一附加实施方式中,微球包括耦联到聚合物层外表面的一个或多个官能团。

[0021] 在一实施方式中,微球包括耦联到聚合物层的外表面的附加磁性材料、以及包敷该附加磁性材料的附加聚合物层。很容易意识到:磁性材料和聚合物的交替层可在微球中重复直到实现期望的微球磁性成分。这样,微球可包括一个或多个磁性材料 / 聚合物层,各个层配置成核微球的小于约 50% 的表面覆盖有磁性材料。

[0022] 在一个这样的实施方式中,磁性材料和附加磁性材料具有基本上相同的成分。在不同实施方式中,磁性材料和附加磁性材料具有不同的成分。在再一实施方式中,磁性材料和附加磁性材料的至少之一包括混合金属磁性材料。在另一个这样的实施方式中,聚合物层和附加聚合物层由基本上相同的可聚合材料形成。在其它实施方式中,聚合物层和附加聚合物层由不同的可聚合材料形成。在一些实施方式中,微球包括耦联到附加聚合物层外表面的一个或多个官能团。各个上述微球实施方式可进一步如本文所述地配置,并根据本文所述的方法实施方式形成。

[0023] 上述微球实施方式提供优于目前使用的具有磁性和荧光特性的微球的若干优点。例如，上述微球包括重量比大于约 2% 的磁性材料而并不显著妨碍光传播进出微球。特别地，已经确定了当核微球的大于约 50% 的表面被磁性材料覆盖时，微球的荧光发射受到显著影响（即荧光发射大大降低）。此外，磁性材料可与本文进一步描述的微球强关联，使得磁性材料在染色过程中不从微球释放。磁化核微球也涂布有聚合物层，该聚合物层基本上防止了磁性材料与感兴趣生物分子之间的相互作用。此外，聚合物层可在不存在表面活性剂和稳定剂的情况下形成。

[0024] 另一实施方式涉及配置成呈现荧光和磁性特性的微球群。该群包括被配置成呈现不同荧光特性、不同磁性特性、或者不同荧光和磁性特性的两个或多个微球子集。两个或多个子集中的单独微球包括核微球和耦联到该核微球表面的磁性材料。约 50% 或更少的核微球表面覆盖有磁性材料。单独微球还包括包敷磁性材料和核微球的聚合物层。单独微球和上述群可进一步如本文所述地配置。

[0025] 一附加实施方式涉及形成呈现磁性特性的微球的方法。该方法包括组合核微球与磁性材料使得磁性材料耦联到核微球表面以形成磁化核微球。约 50% 或更少的核微球表面覆盖有磁性材料。该方法也包括组合磁化核微球与一种或多种可聚合材料，使得一种或多种可聚合材料形成包敷磁化核微球的聚合物层，从而形成呈现磁性特性的微球。

[0026] 在一实施方式中，该方法包括按照大小将磁性颗粒分成第一组和第二组。第一组中相当部分的磁性颗粒具有约 10 纳米或更大的粒度。第二组中相当部分的磁性颗粒具有约 10 纳米或更小的粒度。在一个这样的实施方式中，与核微球组合的磁性材料包括第一组磁性颗粒。在另一实施方式中，该方法包括组合所形成的微球与附加磁性材料使得附加磁性材料耦联到聚合物层外表面、以及形成包敷附加磁性材料的附加聚合物层。

[0027] 在一些实施方式中，该方法包括使形成的微球在含有荧光染料的溶剂中溶胀，使得荧光染料迁移到形成的微球中。这种方法也包括改变含有荧光染料的溶剂的一个或多个特性，使得所形成的微球收缩从而将荧光染料包埋在形成的微球中。在一不同实施方式中，该方法包括在组合核微球与磁性材料之前将一种或多种荧光染料结合在核微球中。在另一实施方式中，该方法包括将一个或多个官能团耦联到聚合物层外表面。上文所述方法的各个实施方式可包括本文所述的任何其它步骤。

[0028] 一方面，本发明提供了一种被配置成呈现荧光和磁性特性的微球，包括：

[0029] 核微球；

[0030] 耦联到所述核微球表面的磁性材料，其中，50% 或更少的所述核微球表面被所述磁性材料覆盖，并且所述磁性材料包括粒度为 10–1000 纳米的颗粒或颗粒的聚集体；以及

[0031] 包敷所述磁性材料和所述核微球的聚合物层。

[0032] 在一个优选的实施方式中，所述核微球包括耦联于所述核微球表面的一个或多个官能团。

[0033] 在另一个优选的实施方式中，所述一个或多个官能团在核微球形成的过程中通过与包括所述一个或多个官能团的一种或多种可聚合材料聚合耦联到该核微球表面。

[0034] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料包括粒度为 50–300 纳米的颗粒或颗粒的聚集体。

[0035] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料包括磁石单晶。

- [0036] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料包括混合金属磁性材料。
- [0037] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料是铁磁性、反磁性、顺磁性或超顺磁性的。
- [0038] 在另一个优选的实施方式中，所述核颗粒包括苯乙烯聚合物、二乙烯苯聚合物、二氧化硅聚合物或丙烯酰胺聚合物。
- [0039] 在另一个优选的实施方式中，它还包括耦联于所述聚合物层外表面的一个或多个官能团。
- [0040] 在另一个优选的实施方式中，所述聚合物层在没有表面活性剂和稳定剂的情况下形成。
- [0041] 在另一个优选的实施方式中，它还包括耦联于所述聚合物层外表面的附加磁性材料和包敷所述附加磁性材料的附加聚合物层。
- [0042] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料和所述附加磁性材料具有基本上相同的成分。
- [0043] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料和所述附加磁性材料具有不同的成分。
- [0044] 在另一个优选的实施方式中，所述磁性材料和所述附加磁性材料的至少之一包括混合金属磁性材料。
- [0045] 在另一个优选的实施方式中，所述聚合物层和所述附加聚合物层由基本上相同的可聚合材料形成。
- [0046] 在另一个优选的实施方式中，所述聚合物层和所述附加聚合物层由不同的可聚合材料形成。
- [0047] 在另一个优选的实施方式中，它还包括耦联于所述附加聚合物层外表面的一个或多个官能团。
- [0048] 另一方面，本发明提供了一种被配置成呈现荧光和磁性特性的微球群，包括：被配置成呈现不同磁性特性的两个或多个微球子集，其中所述两个或多个子集中的单独微球是上述微球。
- [0049] 在一个优选的实施方式中，所述两个或多个微球子集进一步被配置成呈现不同的90°光散射特性。

附图说明

- [0050] 得益于以下较佳实施方式的详细描述并参照附图，本发明的其它优点对本领域技术人员而言将变得显而易见，在附图中：
- [0051] 图1是示出可用于以本文所述的微球和群实施方式进行测量、实验和试验的系统的一个示例的示意图；
- [0052] 图2是示出包括耦联到核微球表面的磁性材料的磁化核微球的一个实施方式的横截面图的示意图；
- [0053] 图3是示出包括包敷有聚合物层的图2的磁化核微球的微球的一个实施方式的横截面图的示意图；
- [0054] 图4是示出图3微球的一个实施方式的横截面图的示意图，该微球包括耦联到聚

合物层外表面的附加磁性材料；

[0055] 图 5 是示出图 4 微球的一个实施方式的横截面图的示意图，该微球包括包敷附加磁性材料的附加聚合物层。

[0056] 虽然本发明易于有各种更改和替换形式，但其具体实施方式作为示例在附图中示出并在本文中详细描述。附图可不必按比例地绘制。然而，应该理解附图和详细描述并不旨在将本发明限制于所公开的特定形式，相反本发明旨在覆盖落在如所附权利要求限定的本发明的精神和范围内的所有更改、等效方案和替换方案。

具体实施方式

[0057] 本文所述的微球实施方式可用作分子反应的载体。其中可使用本文所述的微球实施方式的这些分子反应和实验、测量、和试验的示例在 Fulton 的美国专利 No. 5,736,330、Chandler 等人的美国专利 No. 5,981,180、Chandler 等人的美国专利 No. 6,449,562、Chandler 等人的美国专利 No. 6,524,793、Chandler 的美国专利 No. 6,592,822 和 Chandler 等人的美国专利 No. 6,939,720，这些专利通过引用全部结合于此。本文中使用的术语“微球”通常定义为可以为球形或者可以不为球形的复合结构。术语“微球”、“颗粒”和“珠”通常可由本领域普通技术人员互换使用。因此，本文使用的术语“微球”可由“颗粒”或“珠”代替而不改变本文所述的实施方式的范围。

[0058] 图 1 示出可用于以本文所述的微球和群实施方式进行测量、实验和试验的系统的一个示例。注意，本文所述的附图并未按比例绘制。特别地，附图中一些元件的比例被显著放大以强调该元件的特征。此外，附图中使用相同的标号来指示类似配置的元件。

[0059] 在图 1 中，该系统沿着通过微球 10 所流经的试管 12 的横截面的平面示出。试管可以是诸如在流式细胞仪中使用的石英或熔融二氧化硅试管。然而，也可使用任何其它适当类型的观测腔或运输腔来运输测量的样品。微球 10 可根据本文所述的实施方式配置。

[0060] 该系统包括光源 14。光源 14 可包括本领域中公知的任何适当光源，诸如激光器。光源可被配置成发射具有诸如蓝光或绿光的一个或多个波长的光。光源 14 被配置成在微球流经试管时照亮它们。这种照亮可使得微球发射具有一个或多个波长或波带的荧光。在一些实施方式中，该系统包括被配置成将来自光源的光聚焦在微球或流程上的一个或多个透镜（未示出）。该系统也可包括一个以上的光源。在一实施方式中，光源可被配置成用具有不同波长或波带（例如蓝光和绿光）的光照亮微球。在一些实施方式中，光源可被配置成在不同方向照亮微球。

[0061] 从微球向前散射的光被折叠式反射镜 18 或另一适当的导光部件引导到检测系统 16。或者，检测系统 16 可直接置于向前散射光的路径上。这样，折叠式反射镜或其它导光部件可不被包括在该系统中。在一实施方式中，向前散射光是由微球散射的与光源 14 的照亮方向成约 180° 角的光，如图 1 所示。向前散射光的角度可以不与照亮方向成精确的 180°，使得来自光源的入射光不入射到检测系统的光敏表面。例如，向前散射光可以是由微球散射的与照亮方向成小于或大于 180° 角的光（例如以约 170°、约 175°、约 185° 或者约 190° 的角度散射的光）。

[0062] 也可聚集由微球散射的与照亮方向成约 90° 角的光。在一实施方式中，该散射光被一个或多个分束器或二向色镜分成一个以上的光束。例如，与照亮方向成约 90° 角的散

射光可由分束器 20 分成不同的两束光。不同的两束光又被分束器 22 和 24 分离以形成不同的四束光。各束光被引导到包括一个或多个探测器的不同检测系统。例如，四束光之一可被引导到检测系统 26。检测系统 26 可配置成检测由微球散射的光。

[0063] 由检测系统 16 和 / 或检测系统 26 检测的散射光通常与由光源照亮的微球体积成比例。因此，检测系统 16 和 / 或检测系统 26 的输出信号可用于确定微球的直径或大小。此外，检测系统 16 和 / 或检测系统 26 的输出信号可用于识别粘在一起或几乎同时通过照亮区域的一个以上的微球。因此，这些微球可与其它样品微球和校准微球区分开。

[0064] 另外三束光可被引导到检测系统 28、30 和 32。检测系统 28、30 和 32 可被配置成检测由微球发射的荧光。各个检测系统可被配置成检测不同波长或不同波长范围的荧光。例如，检测系统之一可被配置成检测绿色荧光。另一检测系统可被配置成检测黄橙色荧光，而再一检测系统可被配置成检测红色荧光。

[0065] 在一些实施方式中，滤光器 34、36 和 38 可分别耦联到系统 28、30 和 32。滤光器可被配置成遮挡除了所配置的检测系统要检测的波长之外的波长的荧光。此外，一个或多个透镜（未示出）可光学耦合到各个检测系统。这些透镜可被配置成将散射光或发射荧光聚焦到探测器的光敏表面上。

[0066] 探测器的输出电流与入射荧光成比例并产生电流脉冲。电流脉冲可被转换成电压脉冲，经过低通过滤，然后通过模数（A/D）转换器数字化。诸如数字信号处理器（DSP）的处理器 40 对脉冲下的区域进行积分以提供表示荧光幅度的数字。如图 1 所示，处理器 40 可通过传输介质 42 耦联到检测系统 26。传输介质 42 可包括本领域已知的任何适当传输介质。处理器 40 也可以通过传输介质 42 和诸如 A/D 转换器的一个或多个其它部件（未示出）间接耦联到检测系统 26。处理器可通过类似方式耦联到系统中的其它检测系统。

[0067] 在一些实施方式中，响应于由微球发射的荧光的输出信号可用于确定微球的同一性（identity）和关于在微球表面正在发生或已经发生的反应的信息。例如两个检测系统的输出信号可用于确定微球的同一性，而其它检测系统的输出信号可用于确定微球表面上正在发生或已经发生的反应。因此，检测系统和滤光器的选择可取决于结合或者键合到微球和 / 或待测量反应中的染料类型而改变（即结合或者键合到反应所涉及的反应物中的染料）。

[0068] 用于确定样品微球的同一性的检测系统（即检测系统 28 和 30）可以是雪崩光电二极管（APD）、光电信增管（PMT）或其它光探测器。用于鉴别在微球表面上正在发生或已经发生的反应的检测系统（例如检测系统 32）可以是 PMT、APD 或另一形式的光探测器。该系统可如本文所述地进一步配置。

[0069] 虽然图 1 的系统被示为包括具有用于分辨具有不同染料特征的微球的两个不同检测窗口的两个检测系统，但是应该理解，该系统可包括两个以上的这种检测窗口（即 3 个检测窗口、4 个检测窗口等）。在这些实施方式中，系统可包括附加分束器和具有其它检测窗口的附加检测系统。此外，滤光器和 / 或透镜可被耦合到各个附加检测系统。

[0070] 在另一实施方式中，系统包括被配置成分辨在微球表面上发生反应的不同材料的两个或多个检测系统。不同的反应材料可具有与微球的染料特征不同的染料特征。

[0071] 如图 1 所述的系统也可包括用于测量微球的一个或多个磁性特性的多个其它部件（未示出）。例如，该系统可被配置成磁性以及光学地激发微球。微球可通过向微球施加

外部磁场而得以磁性激发。可使用本领域中公知的任何适当装置将外部磁场施加到微球。系统也可包括本领域中公知的可用于检测微球磁场的任何适当磁性探测器。通过磁性探测器检测的由微球的诱导磁化导致的磁场与微球的磁化成比例，微球的磁化又与所施加的磁场成比例。所检测的微球磁场可用于确定微球的同一性和 / 或微球表面上正在发生或已经发生的反应。

[0072] 呈现可测量磁性特性的微球提供优于非磁性微球的优点。例如，微球的磁性性质随着时间的流逝基本上保持稳定，尤其在磁性材料受到保护免于暴露在诸如反应物的其它材料（例如通过本文所述的聚合物层）下时并且自磁性标签没有经受测量系统的光漂白起。此外，基本磁性的背景通常不在使用微球分析的样品中出现。这样，该样品不会对微球磁性特性测量中的噪声有贡献。此外，磁场的施加和检测不会受水溶反应物或生物材料妨碍。此外，磁力可用于远程操纵微球（例如用于分离样品中的特定分析物）。此外，多个适于生物技术应用的相对敏感的磁场检测装置可购得并且可以结合在本文所述的任一系统中。

[0073] 可用于以本文所述的微球和群实施方式进行的测量、实验和试验的系统的附加示例在 Chandler 等人的美国专利 No. 5, 981, 180、Chandler 的美国专利 No. 6, 046, 807、Chandler 的美国专利 No. 6, 139, 800、Chandler 的美国专利 No. 6, 366, 354、Chandler 的美国专利 No. 6, 411, 904、Chandler 等人的美国专利 No. 6, 499, 562 和 Chandler 等人的美国专利 No. 6, 524, 793，这些专利通过引用全部结合于此。本文所述的系统可如这些专利中所述地进一步配置。此外，可用于进行本文所述微球和群实施方式的测量的系统包括 Roth 在 2005 年 9 月 21 提交的序列号为 60/719, 010 的美国专利申请和 Phillips 在 2005 年 12 月 16 日提交的序列号为 11/305, 805 的美国专利申请中描述和示出的系统，这些专利通过引用全部结合于此。这些专利和专利申请中描述的系统可包括如上所述的部件，使得该系统可以测量微球的一个或多个磁性特性。

[0074] 根据一实施方式，用于形成呈现磁性特性的微球的方法包括组合核微球与磁性材料使得磁性材料耦联到核微球表面以形成磁化（或者“磁性响应”）核微球。适用于本文所述实施方式的核微球可从许多生产商处购得并且可由与所选磁性材料键合的任何材料形成。核微球与磁性材料之间的键可以是共价键、离子键、静电键或本领域中已知的任何其它适当的键形式。可用于核微球的一些适当材料包括但不限于苯乙烯聚合物、二乙烯苯聚合物、二氧化硅聚合物、或丙烯酰胺聚合物。核微球的大小（即球形核微球情形中的直径）可根据使用该微球的测量系统和 / 或方法选择。核微球的适当大小在直径上的范围是从约 1 微米到约 100 微米，但是其它大小也起作用。还应注意：核微球大小的更加均匀导致所摄取的染料（例如荧光染料或荧光基团）和键合的磁性材料更加均匀。

[0075] 在一实施方式中，核微球包括耦联到核微球表面的一个或多个官能团。表面功能可从诸如胺、硫醇、羧酸、肼、卤化物、乙醇、醛及其任意组合的许多不同反应部分中选择。该功能列表不表示完全的功能列表，且微球功能可包括本领域中公知的任何其它功能。一个或多个官能团可在核微球形成的过程中耦联到该核微球表面（例如通过与包括一个或多个官能团的一种或多种可聚合材料聚合）。或者，一个或多个官能团可在核微球形成之后附加到该核微球表面。一个或多个官能团的这种附加可使用本领域中公知的任何适当方法实现。

[0076] 在一实施方式中,如上所述的核微球与磁性材料的组合包括用含有磁性响应材料的溶液处理核微球溶液。在一实施方式中,该方法包括将磁性颗粒按大小分成第一组和第二组。第一组中的相当部分磁性颗粒具有约 10 纳米或更大的粒度。第二组中的相当部分磁性颗粒具有约 10 纳米或更小的粒度。在一个这种实施方式中,与核微球组合的磁性材料包括第一组磁性颗粒。在这种实施方式中,与核微球组合的磁性材料不包括第二组磁性颗粒。这样,磁性响应材料可在处理核微球之前进行处理,以从用来处理核微球的溶液去除相对细小的颗粒。

[0077] 磁性颗粒大小的选择可通过例如磁性材料的部分酸解(虽然该步骤是可任选的),随后过滤或离心以将较大颗粒与较小颗粒分离。保留较大颗粒用于与核微球耦联,并丢弃更细的颗粒。已经示出反复清洗磁性颗粒是有益的,因为反复清洗能更加有效地将细粒从较大磁石的溶液中去除。可用于只去除细粒(例如小于约 10 纳米的颗粒或小于约 20 纳米的颗粒)的其它方法也可用于提供适于本文所述实施方式的磁性颗粒。然后,经清洗的磁性颗粒在与核微球组合之前较佳地在含乙醇溶液中再次悬浮。含乙醇溶液对再次悬浮是较佳的,因为含水溶剂与磁性材料的反应可在磁性材料表面上产生氢氧化物或其它还原物质,其中一些已知能发射荧光,这对于可使用本文所述的微球和群实施方式的许多应用是不合需要的。

[0078] 本文所述实施方式的一些优点通过在磁性材料合成之后且在耦联于核微球之前处理磁性材料来提供。诸如 Wang 等人的美国专利 No. 5, 283, 079 和 Sutor 的美国专利 No. 5, 648, 124(通过引用全部结合于此)中描述的现有技术方法使用多种技术来最小化粒度并分离最小颗粒。例如,原始磁石通常用酸部分酸解,且通过保留所有粒度的磁性倾析或者通过确保只保留最小粒度的离心且保留上层清液而使磁石与溶液分离。然而,本文所述实施方式中使用的磁性材料较佳地不包括这种细粒。

[0079] 基本上去除这些最小磁性颗粒允许在使磁性材料对核微球的表面覆盖率最小的同时形成具有相对较高的磁石成分的微球。例如,如果相对较小的磁性颗粒被耦联到核微球表面,则这些颗粒有效地在基本上整个核微球表面形成相对较薄的层,从而使得微球具有较低的磁性响应、以及因颗粒对光的吸收导致几乎不能从核发射光。在一特定示例中,用 5 纳米直径的磁石完全涂布直径 7 微米微球的表面提供只具有 1% 磁石成分的微球。此外,光子传输进出该微球可被磁石严格抑制。

[0080] 因此,在一较佳实施方式中,较大颗粒或颗粒团(即聚集体)散布在核微球表面使得并非整个核微球表面都被磁性颗粒覆盖。因此,微球可因为相对较大粒度而具有相对较高的磁性成分,并因为磁性颗粒对核微球的部分表面覆盖率而具有相对较高的光透射。例如,通过处理磁石以基本上排除较小颗粒并保留大小在约 10 纳米至 1000 纳米范围内、较佳地在约 50nm 至约 300 纳米范围内的颗粒或团,有可能形成磁石成分为约 5% 而磁性材料对核微球的表面覆盖率仅约为 20% 的微球。因此,根据本文所述实施方式形成的微球有利地具有比诸如 Wang 等人和 Sutor 公开的方法(其中目的是最大化磁性成分而不考虑磁性颗粒的表面覆盖率或遮光程度)形成的磁性微球更高的磁性成分和更高的光透射。

[0081] 如上所述地处理核微球产生磁化核微球,如图 2 所示它包括耦联到核微球 46 表面的磁性材料 44。较佳地,约 50% 或更少的核微球表面被磁性材料 44 覆盖。换言之,磁性材料只耦联到核微球表面的一部分,从而造成磁性材料对表面的部分覆盖。磁性材料到核微

球的这种耦联是有益的,因为磁性材料对核微球的超过约 50% 的表面覆盖率已被示为显著影响(即减少)来自荧光染色核微球的荧光发射。

[0082] 磁性材料 44 可包括颗粒。在一实施方式中,磁性材料 44 包括粒度(例如直径)约为 10 纳米至 1000 纳米的颗粒。在一较佳实施方式中,磁性材料包括粒度约为 50 纳米至约 300 纳米的颗粒。磁性颗粒的粒度可基于核微球的大小、磁性颗粒对核微球的选定表面覆盖率、和选定微球磁性成分来选择。通常,磁性颗粒的粒度可小于核微球的大小,使得多个磁性颗粒在磁性颗粒不完全覆盖该表面的情况下可耦联到核微球表面。

[0083] 在一些实施方式中,磁性材料包括磁石单晶。在一不同实施方式中,磁性材料包括颗粒聚集体。形成该聚集体的颗粒可比磁石单晶更小。此外,形成该聚集体的颗粒可将粒度取为使得聚集体自身具有诸如上述范围内的大小。在再一实施方式中,磁性材料包括混合金属磁性材料。

[0084] 磁性材料可取为多种形式,诸如铁磁性、反磁性、顺磁性或超顺磁性。在这些形式中,最后两种形式是对本文所述的实施方式最有用的,并且由于超顺磁性是顺磁性的子类,因此它们在本讨论中同等对待。通用的磁性材料是氧化铁磁石, Fe_3O_4 。当通过产生相对较小粒度的方法制备这种磁石时,该磁石是顺磁性的。一种这样的方法包括加热具有诸如氢氧化钠的相对较强盐基(base)的铁盐溶液。可将诸如钴和锰的一种或多种其它二价金属添加到铁盐中以形成具有不同特性的混合金属磁性材料。许多这些混合金属化合物可用于形成磁性微球。其它磁性金属氧化物适于在本文所述实施方式中使用。虽然本文中针对磁石描述了一些实施方式,但是任何其它适当磁性材料可用于本文所述的实施方式。

[0085] 该方法实施方式也包括组合磁化核微球与一种或多种可聚合材料使得该一种或多种可聚合材料形成包敷磁化核微球的聚合物层,从而形成呈现磁性特性的微球。例如,在将磁石耦联到核微球表面之后,聚合物保护层可在磁化核微球上形成。这样,磁性“涂布”的核微球基本上涂布有聚合物材料。聚合物层可被配置成提供阻挡层以防止(或至少显著减少)磁性材料与所形成微球可在后续步骤(例如染色)或使用(例如试验)过程中接触的诸如溶剂、反应物、分析物等外部环境接触。例如,如图 3 所示,聚合物层 48 包敷磁性材料 44 和核微球 46。虽然聚合物层 48 在图 3 中被示为完全包敷磁性材料和核微球,但是实际上该聚合物层可以不完全地包敷磁化核微球。然而,聚合物层较佳地形成为使得聚合物层基本上防止磁性材料与接触聚合物层外表面的其它材料之间的接触。

[0086] 该聚合物层可通过将磁化核微球悬浮在诸如水或乙醇的适当溶液中、并将诸如苯乙烯、丙烯酸或本领域中已知的其它适当可聚合分子的一种或多种单体以及聚合引发剂和适当的其它可能分子添加到该悬浮液中而形成。虽然并非必需,但是单体混合物较佳地包括能与磁石配位、并且能与诸如但不限于丙烯酸或乙烯基吡啶的其它单体共聚的物质。聚合物层与磁石的配位将在聚合物层与磁化核微球之间形成更强的耦联。引发剂可以是自由基形成化合物、氧化还原对、或本领域中已知的任何其它适当引发剂。不存在引发剂时,聚合可通过诸如超声或光化学引发的本领域中已知的任何适当方法引发。聚合物层较佳地在不存在表面活性剂和聚合物稳定剂的情况下形成,即使这不是本文所述实施方式的要求。

[0087] 如上所述,一个或多个官能团(未示出)可耦联于核微球 46 的表面。此外 / 或者,微球可包括耦联到聚合物层 48 外表面的一个或多个官能团(未示出)。特别地,在一些实施方式中,该方法包括将一个或多个官能团耦联到聚合物层 48 的外表面。该一个或多个官

能团可在一种或多种可聚合材料聚合过程中耦联到聚合物层的外表面（例如通过使用包括一个或多个官能团的一种或多种可聚合材料）。或者，一个或多个官能团可在聚合物层已形成之后附加到聚合物层的外表面。这种附加可使用本领域中已知的任何适当方法实现。耦联到聚合物层的外表面的一个或多个官能团可包括以上所述的任何官能团。此外，如果一个或多个官能团被耦联到核微球表面和聚合物层的外表面，则耦联到核微球表面的一个或多个官能团可与耦联到聚合物层外表面的一个或多个官能团基本上相同或不同。

[0088] 在一实施方式中，微球包括一种或多种荧光染料（未示出）。在另一实施方式中，微球包括两种或多种不同的荧光染料（未示出）。本文所述的微球实施方式的适当荧光染料的示例在通过引用结合于此的专利中描述。荧光染料可包含在核微球、聚合物层或核微球和聚合物层两者中。

[0089] 在一实施方式中，该方法包括在组合核微球与磁性材料之前将一种或多种荧光染料结合到核微球中。因此，荧光染料可在聚合物层形成之前被结合在核微球中。此外 / 或者，一种或多种荧光染料可附加到核微球表面。荧光染料可在聚合物层形成之前附加到核微球表面。

[0090] 此外 / 或者，荧光染料可被结合到聚合物层中并且 / 或者附加到聚合物层的外表面。这样，荧光染料可在聚合物层形成之后结合到微球中。结合到聚合物层并且 / 或者附加到聚合物层外表面的荧光染料可与结合到核微球并且 / 或者附加到核微球表面的荧光染料相同或不同。例如，不同的荧光染料可在不同步骤中附加到核微球表面和聚合物层的外表面。在另一示例中，相同的荧光染料可在同一步骤中被结合到核微球和聚合物层中。可使用本领域中已知的任何适当方法将荧光染料结合到并且 / 或者附加到核微球表面和 / 或聚合物层。

[0091] 在一实施方式中，该方法包括在含有荧光染料的溶剂中使所形成的微球溶胀，从而荧光染料迁移进入所形成的微球中。这种方法也包括改变含有荧光染料的溶剂的一个或多个特性，使得所形成的微球收缩并因此将荧光染料包埋在所形成的微球中。可用于如上所述地将荧光染料结合到微球中的方法示例在 Chandler 等人的美国专利 No. 6, 514, 295、Chandler 等人的美国专利 No. 6, 599, 331、Chandler 等人的美国专利 No. 6, 632, 526 和 Chandler 等人的美国专利 No. 6, 929, 859，这些专利通过引用全部结合于此。含有荧光染料的溶剂可包括一种或多种荧光染料或者两种或多种不同的荧光染料。荧光染料可被包埋在核微球中以及有可能包埋在聚合物层中。例如，荧光染料是否被包埋在聚合物层中可取决于荧光染料的特征（可基于核微球的特征和使用所形成微球的测量系统和 / 或方法来选择）、染色溶剂的特征和聚合物层的特征而改变。

[0092] 在一些实施方式中，该方法包括组合所形成的微球与附加磁性材料，使得附加磁性材料被耦联到聚合物层的外表面。这种实施方式也可包括形成包敷附加磁性材料的附加聚合物层。在一个这种实施方式中，附加磁性材料 50 可耦联到聚合物层 48 的外表面，如图 4 所示。在这种实施方式中，如图 5 所示，附加聚合物层 52 可包敷附加磁性材料 50。聚合物层 52 可如上所述地“包敷”附加磁性材料。这样，所形成的微球可任选地涂布有耦联到聚合物层 48 外表面的磁性材料 50，如图 4 所示，以及随后的另一聚合物涂层（例如图 5 所示的附加聚合物层 52）以增加所形成微球的磁性成分。该过程可按需频繁重复以提供具有期望水平的光 / 荧光透射和磁性特性的所形成微球。

[0093] 磁性材料 50 可包括任何上述磁性材料。磁性材料 50 也可如上所述地形成。此外，磁性材料 44 和 50 可具有基本上相同的成分或不同的成分。附加聚合物层 52 可由任何上述可聚合材料形成。附加聚合物层 62 也可如上所述地形成。此外，聚合物层 48 和附加聚合物层 52 可由基本上相同的可聚合材料或不同的可聚合材料形成。此外，如图 4 和 5 所示，聚合物层 48 的外表面只由磁性材料 50 部分地覆盖。例如，约 50% 或更少的聚合物层 48 被附加磁性材料覆盖，使得所形成微球的光透射 / 荧光发射特性并未被附加磁性材料 50 大大降低。

[0094] 如上所述，一个或多个官能团（未示出）可耦联到核微球 46 的表面和 / 或聚合物层 48 的外表面。此外 / 或者，微球可包括耦联到附加聚合物层 52 外表面的一个或多个官能团（未示出）。特别地，在一些实施方式中，该方法包括将一个或多个官能团耦联到附加聚合物层的外表面。一个或多个官能团可在一种或多种可聚合材料的聚合过程中耦联到附加聚合物层的外表面（例如通过使用包括一个或多个官能团的一种或多种可聚合材料）。或者，一个或多个官能团可在附加聚合物层已形成之后附加到附加聚合物层的外表面。一个或多个官能团的这种附加可使用本领域中已知的任何适当方法实现。耦联到附加聚合物层外表面的一个或多个官能团可包括任何上述官能团。此外，如果一个或多个官能团耦联到核微球的表面和附加聚合物层的外表面，则耦联到核微球的表面的一个或多个官能团可与耦联到附加聚合物层外表面的一个或多个官能团基本上相同或不同。如果一个或多个官能团耦联到聚合物层和附加聚合物层的外表面，则耦联到聚合物层外表面的一个或多个官能团可与耦联到附加聚合物层外表面的一个或多个官能团基本上相同或不同。

[0095] 如上所述，荧光染料可被结合到核微球和 / 或聚合物层 48 中并且 / 或者附加到核微球的表面和 / 或聚合物层 48 的外表面。此外 / 或者，荧光染料可被结合到附加聚合物层中并且 / 或者附加到附加聚合物层的外表面。结合到附加聚合物层并且 / 或者附加到附加聚合物层外表面的荧光染料可与结合到核微球中并且 / 或者附加到核微球表面的荧光染料相同或不同。结合到附加聚合物层中并且 / 或者附加到附加聚合物层外表面的荧光染料也可与结合到聚合物层并且 / 或者附加到聚合物层外表面的荧光染料相同或不同。可使用本领域中已知的任何适当方法将染料结合到附加聚合物层中并且 / 或者附加到附加聚合物层外表面。上述方法的各个实施方式可包括本文所述的任何其它方法的任何其它步骤。

[0096] 图 3 示出被配置成呈现荧光和磁性特性的微球的一实施方式。该微球包括如上所述地配置的核微球 46。在一实施方式中，核微球包括耦联到核微球表面的一个或多个官能团（未示出）。该一个或多个官能团包括本文所述的任何官能团。

[0097] 微球也包括耦联到核微球 46 表面的磁性材料 44。该磁性材料可包括本文所述的任何磁性材料并如本文所述地配置。例如，在一实施方式中，磁性材料包括粒度（直径）为约 10 纳米至 1000 纳米的颗粒。在一较佳实施方式中，磁性材料包括粒度为约 50 纳米至 300 纳米的颗粒。在另一实施方式中，磁性材料包括磁石单晶。在再一实施方式中，磁性材料包括颗粒的聚集体。在一些实施方式中，磁性材料包括混合金属磁性材料。较佳地，约 50% 或更少的核微球表面被磁性材料覆盖。

[0098] 微球还包括包敷磁性材料和核微球的聚合物层 48。该聚合物层可如上所述地配置。在一实施方式中，微球包括耦联到聚合物层外表面的一个或多个官能团（未示出）。这些一个或多个官能团可包括本文所述的任何官能团。此外，如果官能团耦联到核微球的表

面和聚合物层的外表面，则耦联到核微球表面的官能团可与耦联到聚合物层外表面的官能团相同或不同。

[0099] 在一实施方式中，微球包括耦联到聚合物层外表面的附加磁性材料和包敷附加磁性材料的附加聚合物层。例如，如图 5 所示，微球可包括耦联到聚合物层 48 外表面的附加磁性材料 50 和包敷附加磁性材料的附加聚合物层 52。附加磁性材料包括本文所述的任何磁性材料。此外，附加磁性材料可如本文所述地配置。例如，较佳地，磁性材料和附加磁性材料的组合覆盖 50% 或更少的核微球表面。在一实施方式中，磁性材料和附加磁性材料具有基本上相同的成分。在另一实施方式中，磁性材料和附加磁性材料具有不同的成分。在再一实施方式中，磁性材料和附加磁性材料的至少之一包括混合金属磁性材料。

[0100] 附加聚合物层 52 可由本文所述的任何可聚合材料形成。此外，附加聚合物层可如本文所述地配置。此外，在一实施方式中，聚合物层和附加聚合物层由基本上相同的可聚合材料形成。在另一实施方式中，聚合物层和附加聚合物层由不同的可聚合材料形成。

[0101] 在一实施方式中，微球包括耦联到附加聚合物层外表面的一个或多个官能团（未示出）。这些一个或多个官能团可包括本文所述的任何官能团。此外，如果官能团耦联到核微球的表面和附加聚合物层的外表面，则耦联到核微球表面的官能团可与耦联到附加聚合物层外表面的官能团相同或不同。此外，如果官能团耦联到聚合物层和附加聚合物层的外表面，则耦联到聚合物层外表面的官能团可与耦联到附加聚合物层外表面的官能团相同或不同。

[0102] 在一些实施方式中，微球包括一种或多种荧光染料。在另一实施方式中，微球包括两种或多种不同的荧光染料。例如，在一实施方式中，一种或多种荧光染料（未示出）或者两种或多种不同的荧光染料（未示出）可耦联到核微球表面并且 / 或者结合到核微球中。耦联到核微球表面 / 并且或者结合到核微球中的荧光染料可包括本文所述的任何荧光染料。在另一实施方式中，一种或多种荧光染料（未示出）或者两种或多种不同的荧光染料（未示出）可耦联到聚合物层的外表面并且 / 或者结合到聚合物层中。耦联到聚合物层外表面并且 / 或者结合到聚合物层中的荧光染料可包括本文所述的任何荧光染料。在再一实施方式中，一种或多种荧光染料（未示出）或者两种或多种不同的荧光染料（未示出）可耦联到附加聚合物层外表面并且 / 或者结合到附加聚合物层中。耦联到附加聚合物层外表面并且 / 或者结合到附加聚合物层中的荧光染料可包括本文所述的任何荧光染料。此外，荧光染料可附加到核微球、聚合物层、附加聚合物层及其部分组合的表面并且 / 或者结合其中。上述的各个微球实施方式可进一步如本文所述地配置。

[0103] 上述微球实施方式提供优于其它目前使用的微球的优点。例如，上述微球可包括重量比大于 2% 的磁性材料且并不显著妨碍光传输进出微球。特别地，已经确定当大于约 50% 的核微球表面被磁性材料遮盖，微球的荧光发射受到显著影响（即荧光发射显著降低）。此外，磁性材料可与核微球表面如本文进一步描述地强关联，使得微球的磁性成分在染色操作中并不减少。磁性核微球也基本上被聚合物层包敷，这基本上防止了磁性材料与感兴趣的生物分子以及与所形成微球接触的其它材料相互作用。此外，聚合物层可在不存在表面活性剂和稳定剂的情况下形成。因此，当本文所述的微球实施方式用于生物试验时，由表面活性剂和稳定剂导致的生物分子与微球表面的键合效率的不期望干扰和变化得以消除。上述微球实施方式也具有本文所述其它实施方式的所有优点。

[0104] 本文所述微球可包括在被配置成呈现荧光和磁性特性的微球群中。例如，被配置成呈现荧光和磁性特性的微球群的一个实施方式包括两个或多个微球子集。两个或多个微球子集被配置成呈现不同的荧光特性、不同的磁性特性或不同的荧光和磁性特性。子集的荧光和 / 或磁性特性较佳地在子集之间充分不同而在子集内充分统一，使得在测量时荧光和 / 或磁性特性可用于将子集彼此区分开（例如以确定微球所属的子集）。

[0105] 两个或多个子集中的单独微球可如本文所述地配置。例如，单独微球可包括核微球。磁性材料被耦联到核微球表面。较佳地，约 50% 或更少的核微球表面被磁性材料覆盖。单独微球也包括包敷磁性材料和核微球的聚合物层。单独微球和群可如本文所述地进一步配置。微球群的该实施方式具有本文所述的其它实施方式的所有优点。

[0106] 以下实施方式不应视为限制本发明的实施方式，而仅为示例目的包括在此。

[0107] **示例 1：磁石的制备**

[0108] 将 0.2 摩尔的六水合氯化铁 (III) 和 0.1 摩尔的四水合氯化铁 (II) 通过上方搅拌在三颈圆底烧瓶中溶解于 400 毫升去离子水中。将该混合物在连续搅拌的情况下加热到 90°C。将 520 毫升的 6N NaOH 在 1 小时内逐滴添加。允许反应继续 24 小时。

[0109] **示例 2：磁石和聚合物的涂层**

[0110] 将经官能羧基化表面改性的 10.2 克的可购得的聚苯乙烯核微球悬浮在总体积 100 毫升的甲醇中。将 12.4 毫升制备好的磁石溶液用去离子水清洗，随后在 1M HCl 中清洗两次，最后用甲醇清洗两次。各个清洗步骤之后进行约 4000xg 的离心分离以使较大磁石颗粒与较小磁石颗粒分离。使磁石在总体积 100 毫升的甲醇中再次形成悬浮液。磁石和核微球可组合并混合 3 小时。然后，用去离子水清洗该混合物四次，之后在总体积 375 毫升的水中再次形成悬浮液并倒入 500 毫升的三颈圆底烧瓶中。制备 12.6 克馏出苯乙烯、0.768 克馏出二乙烯苯、0.173 克过氧化苯甲酰和 1.47 克丙烯酸的混合物并倒入 500 毫升的三颈圆底烧瓶中。然后，将反应混合物加热到 60°C 维持 24 小时。用甲醇、四氢呋喃清洗涂层微球，随后用甲醇进行三次额外清洗、用水进行一次清洗，最后在去离子水中再次形成悬浮液。

[0111] 根据本说明书，本发明各个方面进一步更改和可选实施方式对本领域技术人员是显而易见的。例如，提供了被配置成呈现荧光和磁性特性的微球和微球群。因此，本说明书被解释成仅仅是说明性的，并且是为了向本领域技术人员示教实践本发明的一般方法。应该理解，本文所示出和描述的本发明的形式可视为目前的较佳实施方式。多种元件和材料可代替本文所示出并描述的那些元件和材料，各部分和过程可被颠倒，且本发明的某些特征可被单独使用，所有这些对本领域技术人员在得益于本发明的描述之后是显而易见的。可在不背离所附权利要求书所述的本发明的精神和范围的情况下对本文所述的要素进行改变。

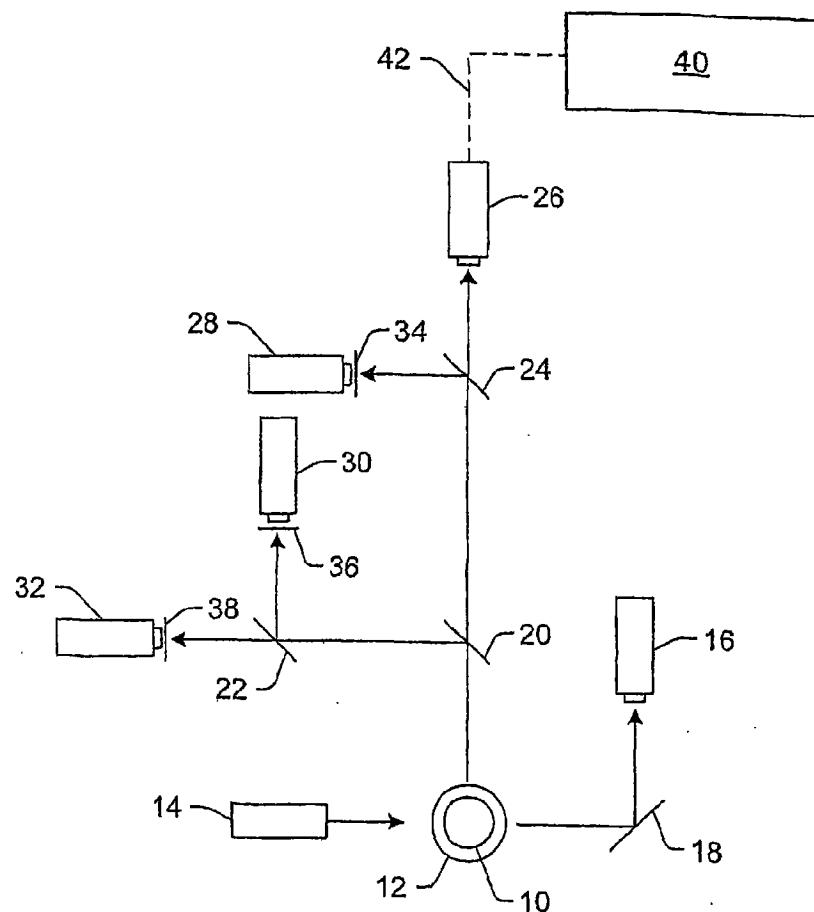


图 1

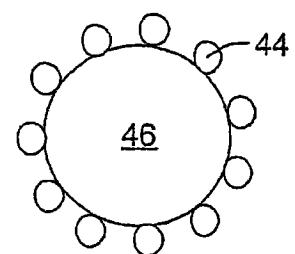


图 2

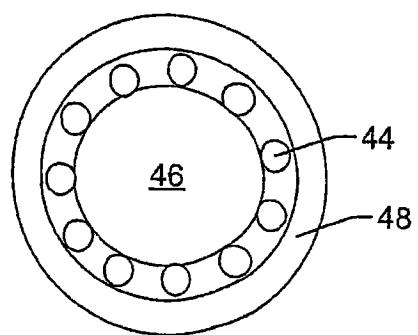


图 3

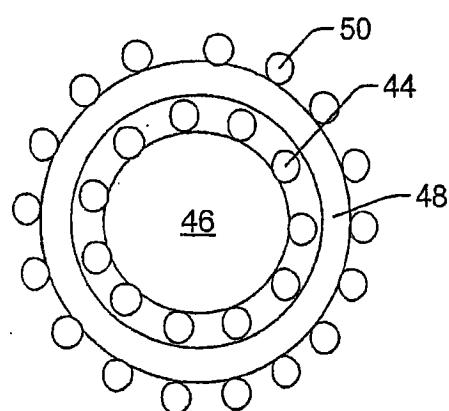


图 4

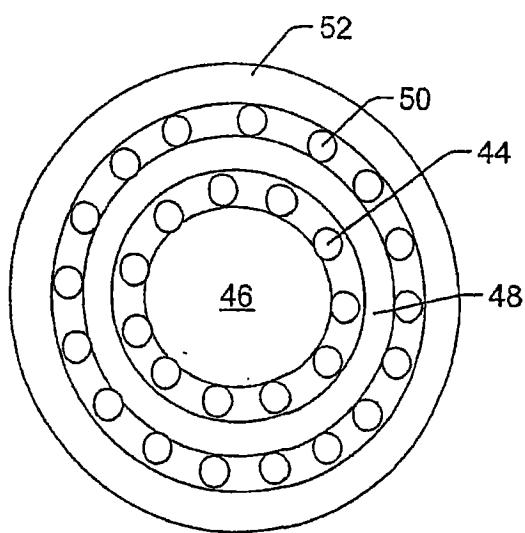


图 5