

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C09K 11/02 (2006.01)

C09K 11/81 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480011635.6

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100378191C

[22] 申请日 2004.4.29

[21] 申请号 200480011635.6

[30] 优先权

[32] 2003.4.30 [33] EP [31] 03009704.2

[86] 国际申请 PCT/EP2004/004574 2004.4.29

[87] 国际公布 WO2004/096944 英 2004.11.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.31

[73] 专利权人 纳米技术应用中心 (CAN) 股份有限公司

地址 德国汉堡

[72] 发明人 克里斯蒂亚娜·梅耶 马库斯·哈泽
维尔纳·霍艾泽尔 克斯廷·博曼

[56] 参考文献

US2003/0032192A1 2003.2.13

US6207229B1 2001.3.27

US2003/0017264A1 2003.1.23

DE10131173A1 2003.1.16

CdSe/CdS 核/壳型纳米晶的光谱特性. 刘舒曼等. 光谱学与光谱分析, 第 22 卷第 6 期. 2002

水热法合成 CdS/ZnO 核壳结构纳米微粒. 付雪峰等. 高等学校化学学报, 第 22 卷第 6 期. 2001

审查员 贺 芳

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 郭国清 樊卫民

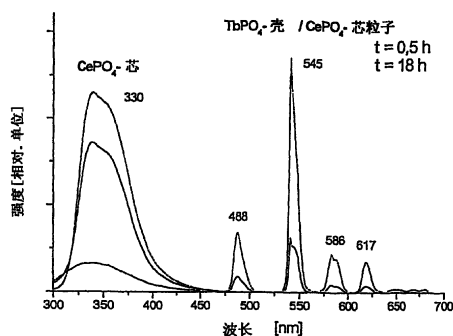
权利要求书 4 页 说明书 57 页 附图 7 页

[54] 发明名称

适于 (F)RET - 分析的芯/壳纳米粒子

[57] 摘要

本发明涉及发光无机纳米粒子, 包括 (a) 由第一金属盐或氧化物制成的芯, 其被 (b) 由第二金属盐或氧化物制成的壳所包围, 该壳可发光并具有非半导体性能。这些粒子可用于 (荧光) 共振能量转移 ((F)RET) 基生物分析中, 因为它们具有较高的 (F)RET 效率。



1. 发光无机纳米粒子，包括(a)由第一金属盐或氧化物制成的芯，其被
(b)由第二金属盐或氧化物制成的壳所包围，该壳可发光并具有非半导体性能。
2. 如权利要求 1 所述的发光无机纳米粒子，其中芯和壳的盐包括相同阴离子。
3. 如权利要求 2 所述的发光无机纳米粒子，其中所述阴离子选自磷酸盐、硫酸盐或氟化物。
4. 如权利要求 1 所述的发光无机纳米粒子，按最长轴计其平均直径小于 30 nm。
5. 如权利要求 1 所述的发光无机纳米粒子，其中壳的平均厚度不超过芯的平均直径。
6. 如权利要求 1~4 中任一项所述的发光无机纳米粒子，其中芯是非发光的，及壳包括掺杂发光金属原子。
7. 如权利要求 6 所述的发光无机纳米粒子，其中所述掺杂发光金属原子选自镧系元素 Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb 或其组合，或选自 Cr 和 Mn。
8. 如权利要求 6 所述的发光无机纳米粒子，其中壳包括作为主要金属成分的所述金属。
9. 如权利要求 8 所述的发光无机纳米粒子，其中壳包括作为唯一

金属成分的所述金属。

10. 如权利要求 6 所述的发光无机纳米粒子, 其中壳包括作为非发光主体材料掺杂剂的所述金属。

11. 如权利要求 1 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯由 LaPO_4 组成, 壳由 TbPO_4 组成。

12. 如权利要求 1~5 中任一项所述的发光无机纳米粒子, 其中芯包括第一金属盐或氧化物, 在激发后能够将激发能量转移至可发出相同光的第二发光金属盐或氧化物。

13. 如权利要求 9 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯金属和壳金属选自 Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, 或 Yb。

14. 如权利要求 12 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯金属选自 Ce, 壳金属选自 Nd、Dy 或 Tb。

15. 如权利要求 12 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯金属是 Yb, 壳金属是 Er。

16. 如权利要求 12 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯和/或壳包括作为主要金属成分的所述金属。

17. 如权利要求 16 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯和/或壳包括作为唯一金属成分的所述金属。

18. 如权利要求 12 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯和/或壳包括作为主体材料掺杂剂的所述金属。

19. 如权利要求 12 所述的发光无机纳米粒子, 其中芯由 LaPO_4 : Ce 或 CePO_4 组成, 壳由 TbPO_4 组成。

20. 制备权利要求 1 所述的纳米粒子的方法, 包括如下步骤
在有机介质中制备第一混合物, 其包括第一金属盐或氧化物的纳米粒子,

在 $50\sim 350^\circ\text{C}$ 的温度下, 使所述第一混合物、待形成壳用的阴离子源、包括形成壳的金属离子的第二混合物和所述金属离子用的有机络合剂反应, 直到在所述第一金属盐或氧化物的纳米粒子芯周围形成壳。

21. 如权利要求 20 所述的方法, 其中第一混合物中的有机介质和第二混合物中的有机络合剂相同。

22. 如权利要求 20 所述的方法, 其中有机介质和络合剂选自其中烷基具有 4~20 个碳原子的单或二烷基胺、磷有机化合物、多元醇或亚砷。

23. 如权利要求 20 所述的方法, 包括如下步骤: 在所述有机介质中合成纳米粒子芯, 然后未经预分离使这些芯反应的步骤。

24. 如权利要求 20 所述的方法, 其中按与形成壳的金属原子反应所需的化学计量量计, 使用的阴离子源摩尔量过量。

25. 如权利要求 24 所述的方法, 其中所述阴离子源选自磷酸盐、硫酸盐和氟化物源。

26. 含有权利要求 1~19 任一项的纳米粒子的流体或固体介质。

27. 如权利要求 26 所述的流体介质, 选自有机或水性分散介质、涂料组合物、油墨或染料、聚合物组合物或气溶胶。

28. 如权利要求 26 所述的固体介质, 选自涂料、油墨、染料和聚合物组合物。

29. 如权利要求 1~19 中任一项所述的纳米粒子在(F)RET 基生物分析中的用途。

30. 如权利要求 29 所述的用途, 用于检测核酸的(F)RET 基生物分析。

31. 如权利要求 1~19 中任一项所述的纳米粒子或权利要求 26~28 中任一项所述的介质在产生光、印刷或标记物品和材料中的用途。

适于(F)RET-分析的芯/壳纳米粒子

本申请涉及发光纳米粒子,尤其是具有金属盐或氧化物芯并被发光壳包围的光致发光的纳米粒子,这些粒子的合成,及它们在(F)RET-分析、尤其是生物分析中的用途。

申请背景

在过去十年中,纳米粒子(即尺寸小于1微米的粒子)由于其独特的性质,而在研究和工业上吸引了极大的关注。光电子领域中的研究和发展集中于发光粒子,其可能的应用包括光发射二极管(LED),显示器,纳米尺寸的光电子,或在低阈值激光器中作为光源。

在发光材料中,经常分成半导体和非半导体材料两类。

半导体纳米粒子(通常称作"量子点"),如可以掺杂或未掺杂的II-VI或III-V半导体,其特征是电子和空穴在全部三维空间中受到量子限制,从而使得随结晶尺寸的减小,有效能带隙增加。因此,随着纳米粒子尺寸变小,可以将半导体纳米粒子的光学吸收和发射转移至蓝光(高能量)。

水可溶的芯/壳半导体纳米晶体例如公开于WO 00/17655中。

如果与量子点相比,纳米结晶非半导体基发光材料具有特殊的吸引力,尤其是镧系元素掺杂的金属氧化物或盐,它们的荧光发射相对较窄,在很大程度上不取决于主体材料和纳米粒子的尺寸。只有镧系元素金属的种类决定发射颜色。本申请人所有的PCT/DE01/03433公开了镧系元素掺杂的纳米粒子的常用合成方法。这些纳米粒子的尺寸(小于30 nm)不再与可见光波长相互作用,从而例如在有机或水性溶剂中

形成透明分散体。

涉及镧系元素掺杂的非半导体基发光纳米粒子的其他出版物，例如是：

K. Riwotzki 等人: *Angewandte Chemie, Int. Ed.* 40, 2001, 第 573-576 页, 关于 LaPO_4 : Ce, Tb;

K. Riwotzki, M. Haase, *J. Phys. Chem. B*; Vol. 102, 1998, 第 10129-10135 页, 关于 YVO_4 : Eu, YVO_4 : Sm 和 YVO_4 : Dy;

H. Meyssamy 等人, *Advanced Materials*, Vol. 11, Issue 10, 1999, 840-844 页, 关于 LaPO_4 : Eu, LaPO_4 : Ce 和 LaPO_4 : Ce, Tb;

K. Riwotzki 等人, *J. Phys. Chem. B* 2000, Vol. 104, 第 2824-2828 页, «Liquid phase synthesis doped nanoparticles: colloids of luminescent LaPO_4 : Eu and CePO_4 : Tb particles with a narrow particle size distribution»;

M. Haase 等人, *Journal of Alloys and Compounds*, 303-304 (2000) 第 191-197 页, "Synthesis and properties of colloidal lanthanide-doped nanocrystals";

Jan W. Stouwdam 和 Frank C. J. M. van Veggel, *Nano Letters*, ASAP 论文, 网页公开 2002 年 5 月 15 日, "Near-infrared emission of redispersible Er^{3+} , Nd^{3+} and Ho^{3+} doped LaF_3 nanoparticles"; 和

G. A. Hebbink 等人, *Advanced Materials* 2002, 14, No. 16, 第 1147-1150 页, "Lanthanide (III)-doped nanoparticles that emit in the near-infrared".

半导体基纳米粒子("量子点")已被用于生物分析。Bawendi 等人, *Physical Review Letters*, 76, 1996, 1517-1520 页, 报道了在具体标记的生物体系中的 FRET 作用。此外, WO 00/29617 公开了蛋白或核酸可以借助于(F)RET 分析中的"量子点"作为标记来检测。US 6,468,808 B1 和 US 6,326,144 B1 中也公开了量子点的生物分子共轭物及它们在荧光光谱中的用途。

(F)RET(荧光共振能量转移)和相关的共振能量转移(RET)是基于将能够发出荧光的供体中的激发能量转移至邻近的受体。使用这种技术,例如通过生物体系中的适合荧光标记,在分子水平上测得的距离约为 1~8 nm。转移至受体的能量在没有内部转换的发射下会松弛(RET),然后仅取消(猝灭)供体荧光。可选择地,受体也发出荧光(FRET)形式的可接受能量。这些现象很好理解,并且在供体和受体之间偶极-偶极相互作用的情况下也能通过 Förster 理论解释(例如, J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic Press, New York, 1990, 368-445 页)。能量转移降低了供体荧光的强度及其寿命,同时引发、敏化或提高受体荧光。能量转移的效率取决于分子间分离的反转第 6 次能量,按比例降低到 $R_0^6/(R_0^6+R^6)$ 。 R_0 是所谓的 Förster 半径,其特征是供体和受体间的距离,此时能量转移效率是 50%。

F(RET)效率可通过分别在有受体(Q_{DA})和没有受体(Q_D)的情况下的供体荧光强度来测定,方程式为 $1-(Q_{DA}/Q_D)$,或在受体探针存在下(T_{DA})和不存在下(T_D)比较供体寿命,方程式为 $1-(T_{DA}/T_D)$ 。

然而,在生物分析中使用"量子点"具有多种缺点。由于荧光"量子点"的发射波长取决于粒子尺寸,因此仅有极窄尺寸的分布可以使用。这对合成和/或尺寸选择技术提出了难题。此外,"量子点"通常表现出相对较低的量子效率,这会使发射自由的电子-空穴对复合。为了克服这些缺陷,提出 CdSe/CdS 芯/壳结构,其中 CdS 涂层保护并增强发光 CdSe 芯的光稳定性(X. Peng 等人, J. Am. Chem. Soc. 119, 1997, 7019-7029 页)。

通常,使用有机染料分子进行(F)RET 基分析,如荧光素或若丹明。对于多种应用而言,与这些有机荧光染料相关的一般缺点是它们对入射光的稳定性不够。在密封环境下,它们的光学毒性会进一步损害生

物材料。其他不需要的性能是它们较宽的发射能带和较小的斯托克迁移，即激发和发射最大值间的差，及相对较窄的光谱激发能带，这样通常需要使用几个光源和/或复杂的光学体系。

因此，本发明的一个目的是提供荧光无机材料，其特别适合于(F)RET-分析，尤其是生物分析，并可克服上述缺点。

本发明的另一目的是提高(F)RET 效率。较高的(F)RET 效率可以提高方法的灵敏度，并改进例如信/噪比。

此外，(F)RET 基分析需要高量子产率(发射与吸收光子的比例)的供体分子，以提高分析的总体灵敏度。因此，本发明的另一目的是提供高量子产率的无机荧光粒子，它们也特别适用于生物分析之外的应用中。

本发明的再一个目的是提供一种制备这些荧光材料的具体方法。

最后的目的是基于无机纳米粒子材料提供生物分析。

发明概述

上述技术目的可由发光无机纳米粒子及其制备方法来解决，该粒子包括

- (a)由第一金属盐或氧化物制成的芯，其被
- (b)由第二金属盐或氧化物制成的壳所包围，该壳可发光并具有非半导体性能。

附图简要说明

图1表明均匀 CePO_4 芯粒子和本发明的 $\text{CePO}_4/\text{TbPO}_4$ 芯/壳粒子的荧光光谱。

图2是一个 $\text{CePO}_4:\text{Tb}/\text{LaPO}_4$ 芯/壳粒子的各种能量过滤透射电子

显微照片。

图 3 表明本发明 $\text{CePO}_4/\text{TbPO}_4$ 芯/壳粒子的两种荧光衰减曲线，它们分别被改变及与荧光素化学结合。其也表明了作为参考的未与荧光素结合的 $\text{CePO}_4/\text{TbPO}_4$ 芯/壳粒子的荧光衰减曲线。

图 4 表明与荧光素结合的均匀 $\text{LaPO}_4:\text{Ce}, \text{Tb}$ 粒子(比较例 1)的荧光衰减曲线。

图 5a 分别表明本发明的 $\text{CePO}_4/\text{TbPO}_4$ 芯/壳粒子按时间闸(TGF)方式测得的两种荧光光谱，它们没有进一步被改变或与荧光素结合。

图 5b 表明均匀 $\text{LaPO}_4:\text{Ce}, \text{Tb}$ 纳米粒子(比较例 1)分别在 520 nm 和 542 nm 按时间闸方式测得的荧光光谱。

图 6a: 用与一个分子结合的(F)RET 配偶体进行的均匀激酶分析。

图 6b: 用与一个分子结合的(F)RET 配偶体进行的均匀免疫分析。

图 7: 用与一个分子(抗原决定部位)结合的(F)RET 配偶体进行的竞争免疫分析。

图 8: 用与单独分子结合的(F)RET 配偶体进行的均匀饱和免疫分析。

图 9: 用与单独分子结合的(F)RET 配偶体进行的均匀竞争免疫分析。

图 10: 用与一个分子结合的(F)RET 配偶体进行的均匀分析。

图 11: 按分子信标方法进行的分析。

发明详细说明

I. 发光纳米粒子

本发明的发光、尤其是光致发光粒子(a)由第一金属盐或氧化物制成的芯，其被(b)由第二金属盐或氧化物制成的发光非半导体壳所包围。

"发光"是指待保护的纳米粒子具有吸收能量的性能(例如，光子形式(IR, 可见光, UV), 电子射线, X-射线等), 然后以低能量的光发射出。应该理解, 在说明书和权利要求书中, 术语"发光"包括更具体和优选的含义"光致发光"。

"光致发光", 应理解成是指无机金属盐在一定时间内, 吸收具体能量的光子(例如 UV, 可见光)和并发出低能量光(较长波长, 例如 UV, 可见光, IR)。发光时间可以相应于激发态的寿命 10^{-7} 或 10^{-8} sec, 这通常称为荧光, 但也可以更长。对于镧系元素掺杂的盐, 例如硫酸盐、磷酸盐或氟化物, 通常激发态寿命是毫秒级(例如 1-20 ms)。

根据本发明, 优选的是壳和芯材料都没有表现出半导体性能。

壳和芯优选也由结晶材料组成。这可以由 X-射线粉末衍射图确定。

待保护的芯/壳粒子形状例如可以是针状、椭圆或球形, 后两种形状是优选的。

待保护的芯/壳纳米粒子优选沿其最长轴测量的平均尺寸为 1~100 nm, 更优选 1~50 nm。更优选平均尺寸最大为 30 nm, 最大为 20 nm, 最大为 10 nm, 例如 2~8 nm, 或 4-6 nm。在各种情况下, 标准偏差优选小于 30%, 尤其是小于 10%。

粒子尺寸和分布可根据 K. Riwotzki 等人和 M. Haase 等人所公开的技术来测量, 例如, 通过透射电子显微镜(TEM)。也可以使用凝胶渗透色谱和超离心法来测定尺寸。

壳厚度优选是至少两个单层。壳厚度的优选上限是 2 个芯直径(对于非球状粒子沿最长轴测量), 更优选 1 个芯直径, 例如其 2/3。

根据本发明第一实施方案, 芯(a)由金属盐或氧化物制成, 在电子激发后, 其不会从壳接受能量, 尤其是非发光金属盐或氧化物, 壳(b)由发光、尤其是掺杂的金属盐或氧化物制成。

在本申请中, "掺杂"应按最广泛意义理解。所用掺杂剂的上限应足够低, 从而产生的发光不会因浓度猝灭现象而降低。相应地, 此上限取决于各种因素, 如掺杂离子类型, 晶格中掺杂剂金属离子间的距离, 每种芯材料具有特定的晶格。优选地, 主体材料由其量为 50 mol%、优选 0.1~45 mol%(例如 0.5~40 mol%)或 1~20 mol%的掺杂剂代替。

对于待混合的掺杂剂金属类型也没有特殊的限制, 只要其能将吸收的光子转化成光发射。因此, 例如, 可以使用各种金属, 如 Ag, Cu, Co 或 Mn (例如, 与作为主体金属的锌混合)。然而, 由于镧系元素金属的发光与其晶格环境特别无关, 因此用镧系元素金属掺杂是优选的。通常, 优选使用二价或三价掺杂剂, 尤其是镧系元素掺杂剂。二价镧系元素(+II 氧化态)的特征是具有相对较强的吸收, 但具有相对较宽的发射谱带。为此, 它们适于用作感光剂, 将能量转移至其他发光金属(例如 Eu^{2+} 至 Mn^{2+})。三价镧系元素(氧化态+III)具有发射相对较尖锐谱带的光的能力, 这使它们成为特别有吸引力的单独使用的掺杂剂, 尽管如下所述, 也存在适合的三价镧系元素掺杂剂体系组合。

适于壳的掺杂剂材料包括 Al, Cr, Ti, Mn, Ag, Cu, As, Nb, Ni, Ti, In, Sb, Ga, Si, Pb, Bi, Zn, Co, 它们取决于所用的主体材料而具有发光性能, 尤其是 Mn, Ag, Cu, Bi, Cr, Sn, Sb, 并优选镧系元素, 尤其是 Ce (58), Pr (59), Nd (60), Sm (62), Eu (63), Gd (64), Tb (65), Dy (66), Ho (67), Er (68), Tm (69), Yb (70)或其组合。

由于镧系元素金属的发光与其晶格环境特别无关, 因此用镧系元素金属掺杂是优选的。

从实用观点来看(荧光类型, 强度等), Ce, Tb, Eu, Nd, Dy, Th, Sm, Gd, Ho, Er 和 Yb 表现出最令人感兴趣的发光性能。

Er^{3+} , Nd^{3+} 和 Ho^{3+} 在通信领域中受到了特别关注, 这是由于它们

在 1300~1600 nm 间发光。Ce 优选与另一种掺杂剂材料一起使用，如 Nd, Dy 或 Tb。公知的是 Ce 可强烈地吸收波长为 250~300 nm 的 UV 辐射，但是取决于主晶格(例如磷酸盐)，它们在 330 nm 周围表现出相当宽的发光谱带。如果与能够转移吸收能量的其他掺杂剂混合，那么可以得到极有效的发光体系。掺杂剂金属另一种有吸引力的组合是 Yb 和 Er，在 Er^{3+} 掺杂的光学放大器中这一点很重要，其中 Er^{3+} 通过 Yb^{3+} 间接抽运，与 Er^{3+} 相比， Yb^{3+} 有 10 倍高的吸收横截面并且在 980 nm 有更宽的峰。 Nd^{3+} 和 Gd^{3+} 也可组合。

如前所述，可以使用这些镧系元素金属组合作为壳的掺杂剂。同样可用作主体金属，其中镧系元素金属离子(例如 Ce^{3+} , Yb^{3+} , Nd^{3+})具有较高的吸收横截面，并用较少量的其他金属(例如 Tb^{3+} , Er^{3+} , Gd^{3+})代替其一部分。为此，镧系元素盐(例如 Ce^{3+} , Yb^{3+} , Nd^{3+} 盐)也可用作壳的主体材料。

在水性介质用于生物分析的应用中，最优选的掺杂剂是在可见光区域发光的那些(例如 Tb, Dy, Tm, Sm)，从而最小化与水的相互作用，而水可以吸收发射的光。

没有具体限制壳的主体材料，并可选自公知的非发光金属氧化物或盐，如硫化物，硒化物，硫硒化物，氧硫化物，磷酸盐，卤代磷酸盐，砷酸盐，硫酸盐，硼酸盐，铝酸盐，镓酸盐，硅酸盐，锆酸盐，氧化物，钒酸盐，铌酸盐，钽酸盐，钨酸盐，钼酸盐，碱性卤化物，其他卤化物，尤其是氟化物，磷化物，或氮化物。特别优选的是使用硫酸盐、磷酸盐或氟化物。

这些盐的金属优选属于主族 1、2、13 或 14，副族 3、4、5、6、7，或镧系元素。因为大多数发光掺杂剂是二价或三价金属离子，因此优选使用的壳的相反电荷离子是非发光二价或三价金属原子，如族 2 金属(碱土金属，如 Mg, Ca, Sr, 或 Ba)，或族 3 金属(Sc, V 或 La)或族

13 金属(例如, Al, Ga 或 In)或 Zn。

主体金属盐的优选实施方案包括:

相应数量金属(以确保电荷中性)的磷酸盐, 选自主族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(元素 58~71, 即 Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb 和 Lu);

相应数量金属的硫酸盐, 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属的硼酸盐, 选自主族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或族 13 (Al, Ga, In, Tl)或镧系元素(如上所述);

相应数量金属的氟化物, 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 副族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属原子的铝酸盐(例如 Al_5O_{12} 或 AlO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属原子的镓酸盐(例如 Ga_5O_{12}), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属的硅酸盐(例如 SiO_3 或 SiO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 族 12 (例如 Zn, Cd)或镧系元素(如上所述);

相应数量金属原子的钒酸盐(例如 VO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属原子的钨酸盐(例如 WO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属原子的钼酸盐(例如 MoO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述);

相应数量金属原子的钽酸盐(例如 TaO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述); 或

相应数量金属原子的砷酸盐(例如 AsO_4), 选自族 2 (例如 Mg, Ca, Sr, Ba), 族 3 (例如 Sc, Y, La), 或镧系元素(如上所述)。

当针对特定掺杂剂选择适合的主体材料时,本领域中公知需要进一步考虑的是,主体和掺杂剂金属优选应该有相同的化合价和相似的(容差例如 $\pm 20\%$)或相同的离子直径。同时,若这些掺杂剂和主体金属能够与特定阴离子形成相同或相似晶格类型的晶体,并具有相同或相似的晶格常数(容差例如 $\pm 20\%$),那么通常会提高掺杂剂和主体金属的相容性。

上述标准通常可以使用 Ba 和 La 作为芯主体材料金属来满足,因为这些金属的离子直径与二价(+II)镧系元素极相似。由于同样原因,La 和 Y 盐代表三价(+III)镧系元素掺杂剂的适合的主体材料。

发光壳材料的具体实例例如是: LiI: Eu; NaI: Tl; CsI: Tl; CsI: Na; LiF: Mg; LiF: Mg, Ti; LiF: Mg, Na; KMgF₃: Mn; Al₂O₃: Eu; BaFCl: Eu; BaFCl: Sm; BaFBr: Eu; BaFCl_{0.5}Br_{0.5}: Sm; BaY₂F₈: A (A=Pr, Tm, Er, Ce); BaSi₂O₅: Pb; BaMg₂Al₁₆O₂₇: Eu; BaMgAl₁₄O₂₃: Eu; BaMgAl₁₀O₁₇: Eu; BaMgAl₂O₃: Eu; Ba₂P₂O₇: Ti; (Ba, Zn, Mg)₃Si₂O₇: Pb; Ce(Mg, Ba)Al₁₁O₁₉; Ce_{0.65}Tb_{0.35}MgAl₁₁O₁₉: Ce, Tb; MgAl₁₁O₁₉: Ce, Tb; MgF₂: Mn; MgS: Eu; MgS: Ce; MgS: Sm; MgS: (Sm, Ce); (Mg, Ca)S: Eu; MgSiO₃: Mn; 3.5MgO • 0.5MgF₂ • GeO₂: Mn; MgWO₄: Sm; MgWO₄: Pb; 6MgO • As₂O₅: Mn; (Zn, Mg)F₂: Mn; (Zn₄Be)SO₄: Mn; Zn₂SiO₄: Mn; Zn₂SiO₄: Mn, As; Zn₃(PO₄)₂: Mn; CdBO₄: Mn; CaF₂: Mn; CaF₂: Dy; CaS: A (A 镧系元素, Bi); (Ca, Sr)S: Bi; CaWO₄: Pb; CaWO₄: Sm; CaSO₄: A (A=Mn, 镧系元素); 3Ca₃(PO₄)₂ • Ca(F, Cl)₂: Sb, Mn; CaSiO₃: Mn, Pb; Ca₂Al₂Si₂O₇: Ce; (Ca, Mg)SiO₃: Ce; (Ca, Mg)SiO₃: Ti; 2SrO • 6(B₂O₃)-SrF₂: Eu; 3Sr₃(PO₄)₂ • CaCl₂: Eu; A₃(PO₄)₂ • ACl₂: Eu(A=Sr, Ca, Ba); (Sr, Mg)₂P₂O₇: Eu; (Sr, Mg)₃(PO₄)₂: Sn; SrS: Ce; SrS: Sm, Ce; SrS: Sm; SrS: Eu; SrS: Eu, Sm; SrS: Cu, Ag; Sr₂P₂O₇: Sn; Sr₂P₂O₇: Eu; Sr₄Al₁₄O₂₅: Eu; SrGa₂S₄: A (A=镧系元素, Pb); SrGa₂S₄: Pb; Sr₃Gd₂Si₆O₁₈: Pb, Mn; YF₃: Yb, Er; YF₃: Ln (Ln=镧系元素); YLiF₄:

Ln (Ln=镧系元素); $Y_3Al_5O_{12}$: Ln (Ln=镧系元素); $YAl_3(BO_4)_3$: Nd, Yb; (Y, Ga) BO_3 : Eu; (Y, Gd) BO_3 : Eu; $Y_2Al_3Ga_2O_{12}$: Tb; Y_2SiO_5 : Ln (Ln=镧系元素); Y_2O_3 : Ln (Ln=镧系元素); Y_2O_2S : Ln (Ln=镧系元素); YVO_4 : A (A=镧系元素, In); $Y(P, V)O_4$: Eu; $YTaO_4$: Nb; $YAlO_3$: A (A=Pr, Tm, Er, Ce); $YOCl$: Yb, Er; $LnPO_4$: Ce, Tb (Ln=镧系元素或镧系元素混合物); $LuVO_4$: Eu; $GdVO_4$: Eu; Gd_2O_2S : Tb; $GdMgB_5O_{10}$: Ce, Tb; $LaOBr$: Tb; La_2O_2S : Tb; LaF_3 : Nd, Ce; $BaYb_2F_8$: Eu; $NaYF_4$: Yb, Er; $NaGdF_4$: Yb, Er; $NaLaF_4$: Yb, Er; LaF_3 : Yb, Er, Tm; $BaYF_5$: Yb, Er; Ga_2O_3 : Dy; GaN : A (A=Pr, Eu, Er, Tm); $Bi_4Ge_3O_{12}$; $LiNbO_3$: Nd, Yb; $LiNbO_3$: Er; $LiCaAlF_6$: Ce; $LiSrAlF_6$: Ce; $LiLuF_4$: A (A=Pr, Tm, Er, Ce); $Li_2B_4O_7$: Mn, SiO_x : Er, Al ($0 \leq x \leq 2$); Y_2O_3 : Ln (Ln=镧系元素, 尤其是 Eu), Y_2O_2S : Eu, Y_2SiO_5 : Eu, SiO_2 : Dy, SiO_2 : Al, Y_2O_3 : Tb, $CaSiO_3$: Ln, CaS : Ln, CaO : Ln, 其中 Ln 为一种、两种或多种镧系元素。

如果根据主晶格类型进行分类, 那么可以列举出下面的优选实施方案。

1. 卤化物: 例如 XY_2 (X=Mg, Ca, Sr, Ba; Y=F, Cl, I), CaF_2 : Eu(II), BaF_2 : Eu; $BaMgF_4$: Eu; $LiBaF_3$: Eu; SrF_2 : Eu; $SrBaF_2$: Eu; $CaBr_2$: Eu- SiO_2 ; $CaCl_2$: Eu; $CaCl_2$: Eu- SiO_2 ; $CaCl_2$: Eu, Mn- SiO_2 ; CaI_2 : Eu; CaI_2 : Eu, Mn; $KMgF_3$: Eu; SrF_2 : Eu(II), BaF_2 : Eu(II), YF_3 , $NaYF_4$, : MgF_2 : Mn; MgF_2 : Ln (Ln=镧系元素)。

2. 碱土硫酸盐: 例如 XSO_4 (X=Mg, Ca, Sr, Ba), $SrSO_4$: Eu, $SrSO_4$: Eu, Mn, $BaSO_4$: Eu, $BaSO_4$: Eu, Mn, $CaSO_4$, $CaSO_4$: Eu, $CaSO_4$: Eu, Mn, 及混合的碱土硫酸盐, 也包括与镁的组合物, 例如 Ca , $MgSO_4$: Eu, Mn。

3. 磷酸盐和卤代磷酸盐: 例如 $CaPO_4$: Ce, Mn, $Ca_5(PO_4)_3Cl$: Ce, Mn, $Ca_5(PO_4)_3F$: Ce, Mn, $SrPO_4$: Ce, Mn, $Sr_5(PO_4)_3Cl$: Ce, Mn, $Sr_5(PO_4)_3F$: Ce, Mn, 后者也与 Eu(II)或与 Eu, Mn 共掺杂, α - $Ca_3(PO_4)_2$:

Eu; β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: Eu, Mn; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$: Eu; $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$: Eu; $\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}$: Eu; $\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}$: Eu, Mn, $\text{Ca}_2\text{Ba}_3(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$: Eu; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$: $\text{Eu}^{2+}\text{X}^{3+}$; $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$: $\text{Eu}^{2+}\text{X}^{3+}$ ($\text{X}=\text{Nd}, \text{Er}, \text{Ho}, \text{Tb}$); $\text{Ba}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$: Eu; β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: Eu; $\text{CaB}_2\text{P}_2\text{O}_9$: Eu; $\text{CaB}_2\text{P}_2\text{O}_9$: Eu; $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$: Eu; $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$: Eu, Mn; $\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$: Eu; $(\text{Sr}, \text{Ca}, \text{Ba}, \text{Mg})_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$: Eu; LaPO_4 : Ce; CePO_4 : LaPO₄: Eu, LaPO₄: Ce, LaPO₄: Ce, Tb, CePO₄: Tb。

4. 硼酸盐: 例如 LaBO_3 ; LaBO_3 : Ce; ScBO_3 : CeYAlBO₃: Ce; YBO₃: Ce; $\text{Ca}_2\text{B}_5\text{O}_9\text{Cl}$: Eu; $x\text{EuO} \cdot y\text{Na}_2\text{O} \cdot z\text{B}_2\text{O}_3$ 。

5. 钒酸盐: 例如 YVO₄, YVO₄: Eu, YVO₄: Dy, YVO₄: SmYVO₄: Bi; YVO₄: Bi, Eu, YVO₄: Bi, Dy, YVO₄: Bi, Sm, YVO₄: Tm, YVO₄: Bi, Tm GdVO₄, GdVO₄: Eu, GdVO₄: Dy, GdVO₄: Sm GdVO₄: Bi; GdVO₄: Bi, Eu, GdVO₄: Bi, Dy, GdVO₄: Bi, Sm; YVO₄: Eu, YVO₄: Sm, YVO₄: Dy。

6. 铝酸盐: 例如 MgAl_2O_4 : Eu; CaAl_2O_4 : Eu; SrAl_2O_4 : Eu; BaAl_2O_4 : Eu; $\text{LaMgAl}_{11}\text{O}_{19}$: Eu; $\text{BaMgAl}_{10}\text{O}_{17}$: Eu; $\text{BaMgAl}_{10}\text{O}_{17}$: Eu, Mn; CaAl_2O_4 : Eu; SrAl_2O_4 : Eu; $\text{SrMgAl}_{10}\text{O}_{17}$: Eu; $\text{Ba}(\text{Al}_2\text{O}_3)_6$: Eu; $(\text{Ba}, \text{Sr})\text{MgAl}_{10}\text{O}_{17}$: Eu, Mn; CaAl_2O_4 : Eu, Nd; SrAl_2O_4 : Eu, Dy; $\text{Sr}_4\text{Al}_{14}\text{O}_{25}$: Eu, Dy。

7. 硅酸盐: 例如 $\text{BaSrMgSi}_2\text{O}_7$: Eu; $\text{Ba}_2\text{MgSiO}_7$: Eu; $\text{BaMg}_2\text{Si}_2\text{O}_7$: Eu; $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$: Eu; SrBaSiO_4 : Eu; $\text{Sr}_2\text{Si}_3\text{O}_8$ 。 SrCl_2 : Eu; $\text{Ba}_5\text{SiO}_4\text{Br}_6$: Eu; $\text{Ba}_5\text{SiO}_4\text{Cl}_6$: Eu; $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$: Eu; $\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$: Eu; $\text{Ca}_{1.5}\text{Sr}_{0.5}\text{MgSi}_2\text{O}_7$: Eu; $(\text{Ca}, \text{Sr})_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$: Eu, $\text{Sr}_2\text{LiSiO}_4\text{F}$: Eu。

8. 钨酸盐和钼酸盐: 例如 X_3WO_6 ($\text{X}=\text{Mg}, \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}$), X_2WO_4 ($\text{X}=\text{Li}, \text{Na}, \text{K}, \text{Rb}, \text{Cs}$), XMoO_4 ($\text{X}=\text{Mg}, \text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}$), 及多钼酸盐或多钨酸盐, 或相应于杂或同多酸的盐。

9. 锗酸盐: 例如 Zn_2GeO_4

10. 此外, 下面的类别: AlnO_2 : Yb, Er ($\text{A}=\text{Li}, \text{Na}$; $\text{Ln}=\text{Gd}, \text{Y}, \text{Lu}$); Ln_2O_3 : Yb, Er ($\text{Ln}=\text{La}, \text{Gd}, \text{Y}, \text{Lu}$); LnAO_4 : Yb, Er ($\text{Ln}=\text{La}, \text{Y}$; $\text{A}=\text{P}, \text{V}, \text{As}, \text{Nb}$); $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{Ge}_3\text{O}_{12}$: Er; $\text{Gd}_2\text{O}_2\text{S}$: Yb, Er; La_2S : Yb, Er。

根据本发明第一实施方案，芯材料，即金属盐或氧化物，在其电子激发态时，不接受从发光壳转移的能量。

这种要求总是可通过仅具有电子态的芯金属盐或氧化物来满足，其中电子基态和第一电子激发态间的能量距离大于选择的发光壳的第一电子激发态和其基态间的距离。在这种情况下，壳吸收的能量(例如 UV，可见光，IR)不能转移至芯金属原子或阴离子。由此得到的壳中能量定位会增强表面猝灭现象，并被认为可以提高粒子的整体(F)RET 效率。根据一个优选实施方案，芯盐或氧化物是非发光的，从而缺少吸收能带(UV-可见光或 IR)，而能量可从激发的壳转移至吸收能带。由于非发光材料通常比发光材料便宜，因此也具有经济价值。

优选地，芯材料相应于掺杂的壳主体材料。

形成芯的适合阴离子与上述相同，包括但不限于磷酸盐，卤代磷酸盐，砷酸盐，硫酸盐，硼酸盐，铝酸盐，镓酸盐，硅酸盐，锆酸盐，氧化物，钒酸盐，铌酸盐，钽酸盐，钨酸盐，钼酸盐，碱性卤化物，其他卤化物，或氮化物。这种类型的纳米粒子金属盐公开于 PCT/DE01/03433 中。

选择芯金属原子的唯一依据是用光子辐射后，它们缺少从壳接收光的能力。适用于此的优选金属离子与上述对壳主体材料所述相同。它们包括但不限于族 2 金属(碱土金属，如 Mg，Ca，Sr 或 Ba)，族 3 金属(如 Sc，Y 或 La)，锌，或族 13 金属(如 Al，Ga，或 In)。为提高壳材料在芯材料表面上生长的倾向，更优选但不绝对必须的是，选择与构成掺杂的壳的主体相同的盐作为芯材料。如果这种需求不能满足，优选的是，芯和壳材料的主体材料属于相同晶格类型，并表现出极相似(容差例如 $\pm 20\%$)或相同的晶格常数。

根据第二实施方案, (a)芯包括第一金属盐或氧化物("供体"), 在激发后能够将激发能量转移至(b)可发出相同光的形成壳的第二发光金属盐或氧化物("受体")。

可以在上述掺杂剂中(尤其是镧系元素中选择)适合的供体-受体金属组合, 并且通常在供体金属的电子基态和第一激发态之间需要一定距离, 这样包括比受体金属相应的距离更高的能量。

在本发明第二实施方案中用作芯材料的适合光子能量吸收体(供体)的例子是具有相对较高吸收横截面的镧系元素离子, 如 Ce^{3+} , Yb^{3+} , Nd^{3+} 或 Eu^{2+} 。 Ce^{3+} 优选与 Tb^{3+} , Dy^{3+} 或 Nd^{3+} 一起用作壳材料金属和受体, 例如以相应硫酸盐、磷酸盐或氟化物的形式。

Yb^{3+} 盐(如磷酸盐, 硫酸盐或氟化物)作为芯材料优选分别与作为壳材料的 Er^{3+} 盐(如硫酸盐、磷酸盐或氟化物)结合。这样可以通过 Yb^{3+} 间接抽运 Er^{3+} 。

在壳结构方面, 受体原子可以用作本发明第一实施方案所述主体材料的高浓度掺杂剂材料。然而, 全部壳也可以由相应的受体盐组成, 例如金属硫酸盐、磷酸盐或氟化物, 从而可以提高芯到壳的能量转移效率。

第二实施方案的芯材料可以包括用作上述主体材料的高浓度掺杂剂的供体金属。可选择地和优选地, 芯由相应的供体金属盐构成。

芯盐的阴离子可以自由选自可相容的阴离子, 其可使选择的壳材料生长。适合的阴离子的例子在第一实施方案中给出, 硫酸盐、磷酸盐或氟化物是优选的。

在第二实施方案中一个特别优选的例子是 $\text{CePO}_4/\text{TbPO}_4$ 芯/壳粒

子。

根据第二实施方案,也可以使用钒酸盐,钼酸盐,钨酸盐或锆酸盐作为芯材料(供体),因为相应的阴离子也能够吸收能量并将能量转移至适合的壳材料(受体),然后以光形式发射能量。这些也可以与掺杂剂金属混合,从而用作发光中心并增强发光,如对于钒酸盐使用 Bi^{3+} 和/或 Eu^{3+} 。芯可以例如包括或由族 3 金属(如 Sc, Y 或 La)或族 13 金属(如 Al, Ga, 或 In)的钒酸盐,钼酸盐,钨酸盐或锆酸盐组成。优选与镧系元素盐结合,优选磷酸盐,钒酸盐,钼酸盐,钨酸盐或镓酸盐作为壳材料,其中镧系元素用作能量受体。具体实例包括如下芯/壳组合 $\text{LaVO}_4/\text{EuPO}_4$, $\text{LaVO}_4/\text{NdPO}_4$, $\text{YVO}_4/\text{DyPO}_4$ 。

II. 合成芯/壳纳米粒子

本发明的上述芯/壳纳米粒子按下述和权利要求书中的方法合成,包括至少下面两个步骤:

1. 在有机介质中制备所谓的"第一混合物",其包括第一金属盐或氧化物的纳米粒子,例如金属硫酸盐、磷酸盐或氟化物纳米粒子(芯)。

2. 在 $50\sim 350^\circ\text{C}$ 的温度下,使所述第一混合物、待形成壳用的阴离子源(尤其是磷酸盐,硫酸盐或氟化物源)、包括形成壳的金属离子的"第二混合物"和所述金属离子用的有机络合剂反应,直到在所述纳米粒子芯周围形成壳。

II.1 第一步骤和合成芯粒子

用作芯材料并且在所谓的"第一混合物"中存在的纳米粒子可通过本领域中公知的方法来合成。

通常,湿法合成技术比干法形成方法优选。因为前者方法可以更好地控制粒子尺寸。此外,在湿法合成技术中,可以更容易防止形成的纳米粒子结块。

可以使用公知的湿法合成技术, 例如溶胶-凝胶法, 水热合成, 或用络合剂来调节晶体生长的有机合成方法。此外, 可以使用 J. W. Stouwdam 和 F. C. J. M. Van Veggel 论文中所述的合成技术来具体制备氟化物。因此, 可以通过加热二(正十八烷基)二硫代磷酸铵和 NaF 在乙醇/水中的溶液制备 LaF_3 纳米粒子和其他氟化物。随后, 滴加相应金属硝酸盐在水中的溶液, 然后在 75°C 下搅拌溶液 2 小时, 再冷却至室温。然而, 这种技术的缺点是生成的粒子仍表现出相对较宽的粒子尺寸分布, 从而必须再进行离心纯化步骤。

镧系元素掺杂的磷酸盐的"水热合成"例如公开于"Wet-chemical synthesis of doped colloidal nanomaterials: particles and fibres of LaPO_4 : Eu, LaPO_4 : Ce and LaPO_4 : Ce, Tb", H. Meyssamy 等人, Advanced Materials (1999), Vol. 11, No. 10, 840 页, 等。

作为原料使用硫酸盐、磷酸盐或氟化物纳米粒子, 优选金属氯化物, 硝酸盐或醋酸盐。反应用水作为反应介质在高压釜中进行, 以保持较高压力, 优选反应中压力为 10-20 bar。

水热合成法得到相对较大的粒子, 通常是针状。此外, 产物的特征是通常具有相对较宽的粒子尺寸分布。在 H. Meyssamy 等人所述的上述方法中, 直径小于 25 nm 的纳米粒子的百分比例如仅占约 20%。这些可通过随后的离心步骤分离。

水热合成的其他实例也公开于 PCT/DE01/03433 中。该文献在更一般意义上和具体实施例公开了在高压(高压釜)下在水中合成纳米粒子硅酸盐, 钒酸盐, 钨酸盐, 钼酸盐, 钽酸盐等。此外, 该文件属于在 1,6-己二醇中合成铝酸盐或镓酸盐的相关技术(也称为"甘油热反应(glycothermal)"合成)。

此外, 在环境压力下在选自多元醇和亚砷的有机介质中可以选择

性地制备掺杂的硫酸盐，有机介质被认为可以通过金属-配合活动调节晶体生长。下面将这种技术称为"多元醇或亚砷合成"。

所使用的多元醇优选具有两个或三个羟基，如甘油，乙二醇或聚乙二醇，优选使用低分子量聚乙二醇(优选乙二醇单元的平均数是4)。作为亚砷，可以使用二甲基亚砷(DMSO)。这种合成技术优选用于制备作为掺杂的主体材料的碱土金属硫酸盐，如镁，钙，锶或钡硫酸盐。

优选的金属原子源是相应的氯化物及其水合物。作为硫酸盐原料，优选使用具有有机阳离子的碱金属硫酸盐，硫酸铵或硫酸盐。同样可以使用相应的硫酸氢盐。

有机阳离子优选选自碱性含N-脂肪族、芳香族和脂肪族/芳香族物质，它们优选具有4~30、优选4~20个碳原子。适合的阳离子包括例如，

- 季铵或膦，其中四个取代基独立地选自优选具有1~10个碳原子(优选1~5)的烷基或苄基，或
- 质子化的芳香族碱，如胍，金刚烷胺，吡啶或三甲基吡啶。

相应地，硫酸盐纳米粒子可从原料制备，如四丁基硫酸氢铵，四甲基硫酸铵，双四丁基硫酸铵，或三乙基硫酸氢铵。其他适合的原料是硫酸氢铵，硫酸铵，碱金属硫酸氢盐，硫酸金刚烷铵，乙二胺硫酸盐和胍硫酸盐。

作为掺杂硫酸盐主体材料，可以使用相应掺杂剂的硝酸盐或卤化物，尤其是相应的金属氯化物。

如果原料中包括硫酸氢盐，优选向反应介质加入有机碱如咪唑作为除酸剂。反应优选在温度50~240°C下进行，其中甘油优选的低温范围是50~100°C，其他多元醇或亚砷溶剂最适合高温范围是160~240°C，尤其是160~180°C。得到的粒子其平均直径为0.2~50 nm，并容易在水

性介质中分散。

通过溶胶-凝胶法、水热合成法、甘油热反应合成或所谓的"多元醇或亚砷合成法"得到的纳米粒子芯有时在所保护方法第一步中所用的有机介质中不能分散，特别是本发明方法芯和壳合成所用的反应介质的极性明显不同时。为此，需要用适合的极性有机化合物对纳米粒子进行后处理，以提高其分散度。优选地，在与壳合成所用的相同有机介质(络合剂)或相似极性的有机介质中进行这种后处理。

例如，如果在含 N-或含 P 介质中进行壳合成，那么后处理包括用含 N-或含 P 介质对在溶胶-凝胶方法、甘油热反应或水热合成或所谓的"多元醇或亚砷合成"中得到的粒子进行后处理。

这种后处理包括在相应的有机化合物中加热纳米粒子。发生的作用是水或结合在纳米粒子表面上的其他亲水性残基被极性有机化合物置换。由于上述原因，对于金属离子而言，极性有机化合物优选选自含 N-或含 P 的络合剂，这将在下文中"有机合成"和第二步骤中说明。然而，也可以使用其他功能化的极性有机化合物。

如果随后的制备步骤在多元醇和/或亚砷中进行，那么按"多元醇或亚砷"合成制备的硫酸盐不需要进行后处理。

根据其他和优选的技术，下文中称作"有机合成"，用于制备纳米粒子芯的方法包括如下步骤：

- a) 在包括至少一种金属络合剂和任选至少一种其他溶剂的有机反应介质中，使反应介质可溶解的或可分散的金属源和反应介质可溶解的或可分散的阴离子源反应，尤其是磷酸盐，硫酸盐或氟化物源，
- b) 任选地从由此形成的纳米粒子金属盐(例如磷酸盐，硫酸盐或氟化物)中除去反应介质，及
- c) 任选地回收纳米粒子盐。

作为"有机介质", 应理解除了不可避免的痕量水外不含有水的有机溶剂。有机介质的沸点优选高于下述的反应温度。例如 150~400°C, 优选高于 180°C, 尤其是高于 210°C (环境压力下)。

取决于金属源被氧化的敏感性, 优选在惰性气体如氮气或氩气中进行反应。

关于原料的纯度, 推荐使用纯度至少为 99.9%的金属盐。使用的所有反应试剂和溶剂优选无水和/或在使用前干燥。然而, 常以水合物使用的金属氯化物优选不进行长时间干燥过程, 因为这会增加反应介质不可溶解的氧氯化物的形成。

反应优选在 50~350°C 的温度下进行, 例如 120°~320°C, 尤其是 180°~290°C。技术人员可以通过逐渐提高温度来监测反应试剂的反应, 从而确定反应进行足够快的合成最小温度, 这样很容易测定适合的温度。为此, 纳米粒子例如可以从反应介质的样本中沉淀出来, 这样可以通过提高反应时间来研究粒子的生长。

适合的反应时间可以按相同方式确定, 并优选为 10 分钟~48 小时, 尤其是 30 分钟~20 小时。

反应完成后, 反应混合物可以冷却至室温。如果在反应中或冷却后, 纳米粒子仍没有完全沉淀, 那么可以将甲醇加到反应介质中, 或进行相反操作, 以得到最大的产率。

尽管不限于理论, 但是可以认为"有机合成"中所用的金属络合剂与形成的纳米粒子的表面金属原子配位, 并在原料反应后停止生长。可以认为金属络合剂与粒子表面保持结合, 按这种方式阻止或降低凝结及粒子间的交换过程, 如 Oswald 熟化。有机合成形成相当小的粒子,

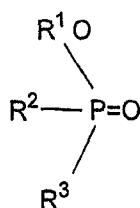
其中在最长轴测得的平均直径优选为 1-10 nm，尤其是 2-8 nm，例如 4-6 nm，尺寸分布较窄(标准偏差<30%，尤其是<10%)。金属络合剂的特征是存在能够使金属离子与至少一种第二分子部分(低极性，优选疏水性)配位的极性基团，例如优选具有 4~20、尤其是 6~14 个碳原子的脂肪族、芳香族/脂肪族、或纯芳香族分子部分。

金属络合剂优选是磷有机化合物或单或二取代的胺。

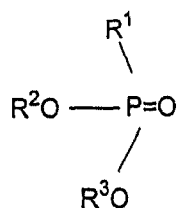
在后者中，最优选的实施方案是单或二烷基胺，其中烷基残基优选具有 4~20，尤其是 6~14 个碳原子，如十二烷基胺或双(乙基己基)胺。

关于磷有机化合物，优选使用下面物质中的至少一种：

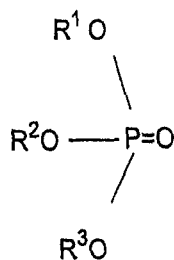
a) 次磷酸的酯



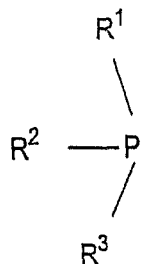
b) 磷酸的二酯



c) 磷酸的三酯，最优选磷酸三烷基酯，如磷酸三丁基酯或磷酸三(乙基己基)酯，

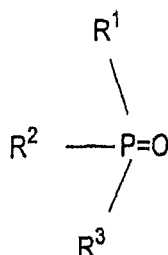


d) 三烷基磷，如三辛基磷(TOP)，



或

e) 三烷基磷氧化物, 如三辛基磷氧化物(TOPO)



其中 R^1 , R^2 和 R^3 独立地选自具有 4~20、更优选 4~14、尤其是 4~10 个碳原子的支链或直链脂肪族(优选烷基), 脂肪族/芳香族或芳香族残基。芳香族残基例如是苯基, 脂肪族/芳香族残基例如是甲基、二甲苯基或苄基。

使用(a)~(c)和(e)的磷有机化合物, 尤其(a)~(c)是特别优选的。

金属络合剂可以是有机反应介质中的唯一溶剂。如果其为唯一溶剂, 那么按用作金属源的金属原子摩尔量计, 优选用量至少为 10 mol。优选的上限约为 1000 mol。

取决于选择的金属络合剂及尤其是疏水性分子部分的长度, 使用较大量是不方便的, 因为这会阻碍形成的纳米粒子完全沉淀。

因此, 优选的是另外使用"至少一种其他溶剂"。在此实施方案中, 按 1 mol 金属离子(用作金属源)计, 金属络合剂("第一溶剂")优选使用的摩尔量小于 10 mol, 更优选 0.9~6 mol。按 1 mol 金属原子(用作金属源)计, "其他溶剂"的量优选为 5~100 mol。

"其他溶剂"应该与金属络合剂混溶, 其沸点高于合成最小温度, 优选沸点高于 150°C, 更优选高于 180°C, 最优选高于 210°C。不希望沸点高于 400°C。

"其他溶剂"可以是烃基溶剂或具有至少一个极性基团。如果在金属盐原料中存在结晶水, 并且所述水被能够与金属配位的溶剂所置换, 那么使用具有至少一个极性基团的溶剂是优选的。"其他溶剂"优选选自

- 具有至少一个醚官能团的溶剂; 尤其是, 每个烷基基团具有 5~10 个碳原子的二烷基醚, 如二戊基醚, 二己基醚, 二庚基醚, 二辛基醚, 或二异戊基醚; 总共有 12~18 个碳原子的二芳基醚或二芳烷基醚, 如二苯基醚或二苄基醚; 或单或聚乙二醇(PEG)二烷基醚(其中每个烷基优选具有 1~4 个碳原子, PEG 单元的平均数优选为 10), 如二甘醇二丁基醚, 三甘醇二丁基醚, 和/或四甘醇二甲基醚;

- 支链或非支链烷烃, 优选具有 10~18 个碳原子, 尤其是 12~16 个碳原子, 如十二烷或十六烷; 和/或

- 有机高沸点碱, 优选含 N 脂肪族碱, 最优选三取代的胺, 尤其是每个烷基基团具有 5~10 个碳原子的三烷基胺化合物, 如三辛基胺或三(2-乙基己基)胺, 或优选具有 3~20 个碳原子的含 N 芳香族碱, 如咪唑。

这些溶剂也可以组合使用。有机高沸点碱不仅可以用作溶剂, 而且可以用作除酸剂。例如, 如果使用酸如磷酸或 HF 作为阴离子源, 那么优选使用相对于酸的氢原子约等摩尔量(例如约 0.6~1.4 mol)的碱。

"阳离子源"可以选自任何适合的(足够反应性的)金属盐, 并优选金属氯化物, 金属醇盐(其中醇盐优选具有 1~6 个碳原子, 尤其是 1~4 个碳原子), 金属硝酸盐或金属乙酸盐。使用金属氯化物是特别优选的。也可以使用水合的金属盐。然而, 优选在反应之前除去结晶水。

"阴离子源"优选选自 PCT/DE01/03433 中所公开的原料。为合成纳米粒子硫酸盐、磷酸盐，硼酸盐，氟化物，硫化物，砷酸盐或硅酸盐，下列化合物是适合的：

- a. 硫酸，磷酸，硼酸或 HF，
- b. 在合成混合物中可以溶解或至少分散的硫化物，砷酸盐，磷酸盐，硼酸盐，硫酸盐，硅酸盐或氟化物盐，尤其是具有有机阳离子的盐或碱金属盐，或
- c. 在高温下分解的酯，如硼酸烷基酯，硫酸烷基酯，砷酸烷基酯或硅酸烷基酯(例如四乙基原硅酸酯)。

对于 b 项，阳离子优选选自碱性含 N 脂肪族，芳香族和脂肪族/芳香族物质，优选具有 4~30、优选 4~20 个碳原子。适合的阳离子包括例如上述季铵或膦盐或质子化的芳香族碱，如吡啶或三甲基吡啶。为制备磷酸盐纳米粒子，四丁基磷酸二氢铵，四甲基磷酸二氢铵，或三乙基磷酸二氢铵可以用作阴离子源。相应地，硫酸盐纳米粒子可以从原料中制备，如四丁基硫酸氢铵，四甲基硫酸氢铵，硫酸双四丁基铵，或三乙基硫酸氢铵。为制备含氟阴离子的纳米粒子，可以使用三乙基胺-三氢氟化物，四丁基铵氟化物，四丁基铵氢二氟化物，十二烷基胺氢氟化物或不易溶解的吡啶氢氟化物，或三甲基吡啶氢氟化物。

如果金属离子(阳离子源)在有机介质中溶解很慢，那么在加入金属-络合剂和反应溶剂之前优选在低级醇中溶解，优选甲醇。然后通过蒸馏除去甲醇和结晶水，干燥，然后加入其他反应试剂。

根据要保护的方法，根据上述一种合成技术得到的纳米粒子在有机介质中成为分散体(所谓的"第一混合物")。

有机介质优选基于一种或多种沸点超过 120°C、尤其是超过 180°C 但小于 400°C 的极性溶剂。优选选自"金属-络合剂"，尤其是所述的单或二烷基胺，其中烷基残基具有 4~20 个碳原子，磷有机化合物，多元

醇和亚砷。优选地，有机介质含有金属-络合剂及任选地在有机合成部分中所述的"至少一种其他溶剂"。

相应地，可以并优选使用未经分离的要保护方法的第一步骤在"有机"合成或"多元醇或亚砷"中制备的纳米粒子。

应该注意到，有机介质用作纳米粒子芯的分散介质。因此，由于有机介质具有与金属原子配位的能力，在其上生长壳之前，纳米粒子保持在其胶体(非溶解)态。

II. 2. 第二步骤

在第二步骤中

- 上述第一混合物，
- 待形成壳用的阴离子源，尤其是磷酸盐，硫酸盐或氟化物源，

及

- 所谓的"第二混合物"，包括形成壳的金属离子(及其相反电荷离子)和所述金属离子用的有机络合剂

在 50~350°C 的温度下反应，直到在所述纳米粒子周围形成发光壳。

通常，优选保持阴离子源与第一混合物分开，从而避免过早反应。

第二步骤可以按照下面的三种实施方案(A)，(B)和(C)进行：

方法(A)包括如下步骤

在有机介质中制备第一混合物，包括金属盐或氧化物纳米粒子，例如金属硫酸盐、磷酸盐或氟化物纳米粒子，

加热所述第一混合物至温度为 50~350°C，

在此温度下向第一混合物中分别滴加待形成壳用的阴离子源和第二混合物，包括形成壳的金属离子和所述金属离子用的有机络合剂，及

在此温度下使得到的混合物反应，直到在所述纳米粒子周围形成发光壳。

分别但同时加入的阴离子源和第二混合物，例如可以通过两个滴液漏斗加入，它们可以降低壳的活性原料的浓度，从而通过降低单独粒子从壳原料生成来提高反应的选择性。

方法(B)包括如下步骤

在有机介质中制备第一混合物，包括第一金属盐或氧化物的纳米粒子，例如金属硫酸盐、磷酸盐或氟化物纳米粒子，

将形成壳的阴离子源加到所述第一混合物中，

加热得到的混合物至温度为 50~350°C，

向其中滴加第二混合物，包括形成壳的金属离子和所述金属离子用的有机络合剂，及

在此温度下使得到的混合物反应，直到在所述纳米粒子周围形成发光壳。

方法(A)和(B)易于形成更均匀的粒子，从而进一步含有较少百分比的形成壳材料的独立生长粒子。

方法(C)包括如下步骤

在有机介质中制备第一混合物，包括第一金属盐或氧化物的纳米粒子，例如金属硫酸盐、磷酸盐或氟化物纳米粒子，

混合所述第一混合物，待形成壳用的阴离子源和第二混合物，包括形成壳的金属离子和所述金属离子用的有机络合剂，优选是将所述第一混合物和所述阴离子源加到所述第二混合物中，及

加热得到的混合物至温度为 50~350°C，直到在所述纳米粒子周围形成发光壳。

令人惊讶的是，发现逐渐加入原料，例如滴加，不是绝对需要的。

尽管根据方法(C)，可以通过混合完成部分来混合原料，但是所需的芯/壳材料以高选择性和较少独立粒子生长的方式形成。因此，方法(C)比方法(A)和(B)更易于控制。

除非另有所指，下面优选的实施方案适用于所有三种方法(A)，(B)和(C)。

作为金属离子源，可以使用任何足够反应性的金属盐，优选壳金属离子的氯化物或醇盐。醇盐基团优选具有 1~4 个碳原子。

可以使用任何适合的阴离子源，只要它们能够在第一步骤中制备的芯粒子周围形成壳即可。

形成壳的适合阴离子包括但不限于磷酸盐，卤代磷酸盐，砷酸盐，硫酸盐，硼酸盐，铝酸盐，镓酸盐，硅酸盐，锆酸盐，氧化物，钒酸盐，铌酸盐，钽酸盐，钨酸盐，钼酸盐，碱性卤化物，其他卤化物，氮化物，硫化物，硒化物，硫硒化物或氧硫化物。

优选使用的壳形成阴离子适于在 PCT/DE01/03433 中所述的相似或相同条件下在有机介质中反应。实例包括硅酸盐，硼酸盐，砷酸盐，硫化物，硫酸盐、磷酸盐，及氟化物，尤其是硫酸盐、磷酸盐和氟化物。该文献也教导了那些阴离子源可用于产生相应的纳米粒子材料。

关于适合的硅酸盐，硼酸盐，砷酸盐，硫化物，硫酸盐、磷酸盐和氟化物源，也参考要保护方法第一步骤中所述的阴离子源，尤其是在"多元醇或亚砷"和/或"有机"合成中所用的那些。

阴离子源优选以"多元醇或亚砷"或"有机"合成中所述的至少一种溶剂中的细分散体或溶液方式加入。

阴离子源,尤其是磷酸盐,氟化物或硫酸盐源,按与所有加入的形成壳的金属原子反应所需的化学计量摩尔量计,优选用量为 0.75~3 mol,尤其是 0.75~2。在二元盐(AB)情况下,B(阴离子)与 A(金属)的比例为 0.75: 1~2: 1。

在从磷酸盐或氟化物制备的芯或芯/壳粒子"有机"合成中,磷酸盐和氟化物源,如磷酸或 HF,优选使用过量。按所需的化学计量摩尔量计,过量的摩尔量优选至少为 1.05 mol,更优选 1.1~2 mol,尤其是 1.2~1.6 mol。

相似地,在硫酸盐芯或芯/壳粒子的"多元醇或亚砷"合成中优选使用过量的硫酸盐源,如季铵硫酸(氢)盐。按所需的化学计量摩尔量计,过量的摩尔量优选至少为 1.05 mol,更优选 1.1~3 mol,尤其是 1.2~2 mol。

第二混合物中所含的有机络合剂也可以选自在纳米粒子有机合成中所述的有机络合剂或在"多元醇或亚砷合成"中所述的溶剂。

通常,需要保持形成壳的离子的有效浓度尽可能低。根据本发明,这可通过使用金属络合剂来实现。尽管不限于理论,但是可以认为,仅有小浓度的反应性(未络合的)金属离子有利于壳生长,从而独立形成新粒子。

根据优选的实施方案,第一混合物中所用的有机介质和第二混合物中存在的络合剂是一种磷有机化合物,单/二取代的胺,前面提到的多元醇或亚砷。更优选使用相同极性的有机化合物作为有机介质和络合剂。

此外,优选以与有机络合剂相同的比例使用上述"至少一种其他溶剂"。这样可以使用较少量金属络合剂,好象其是唯一的溶剂。那么金

属络合剂和形成壳的金属离子的摩尔比再优选为 0.9: 1~6: 1。

如果壳材料的阴离子源具有酸性氢原子，那么优选使用上述碱。在所述条件下，上述的有机高沸点碱(例如三烷基胺)例如优选用作阴离子源(如磷酸或 HF)的除酸剂。通常如果使用具有酸性氢原子的阴离子源，那么这种有机高沸点碱也可以在硅酸盐，硼酸盐，砷酸盐，或硫酸盐的合成过程中加入。根据方法(A)或(B)，碱优选加入作为包括金属源和络合剂的"第二混合物"的成分。

包括金属络合剂的溶剂总量可由技术人员容易地确定，因为通常优选均匀溶解或分散所有原料。在方法(A)和(B)中，优选使用约相同量的溶剂以溶解阴离子源和金属源(第二混合物)。

通常，除非另有所指，反应优选在与项 II. 1 "多元醇或亚砷"或"有机"合成中所述的相同或相似条件下进行。这也适于保护惰性气体和干燥反应试剂的使用。

没有特别限制与其余原料混合的纳米粒子芯的量，主要是取决于目标壳厚度。

根据本发明方法，反应介质从温度 50°C 加热至 350°C，尤其是从 120°C 加热至 320°C，直到发光壳形成在按第一步骤制得的纳米粒子芯周围。

对于氟化物和磷酸盐而言反应优选在温度 160°C~240°C 下进行，尤其是 180°C~220°C，对于硫酸盐而言在 160°C~180°C 下进行。在甘油中形成硫酸盐壳也可以是更低温(例如，50~100°C)。技术人员可以通过逐渐提高温度来监测壳生长，从而确定反应进行足够快但没有不需要的副反应(如从壳原料形成新粒子)时的合成最小温度，这样很容易测定适合的温度。

在滴加原料的方法(A 和 B)中, 加入时间优选为 0.5~10 小时, 尤其是 1~5 小时。

优选的反应时间为 30 反应~48 小时, 尤其是 1 小时~20 小时, 特别是 1.5~16 小时。此外, 监测反应可以确定适合的反应时间, 例如通过从反应介质样本中沉淀纳米粒子并用 TEM 显微方法研究粒子尺寸分布。一旦观察到 Oswald 熟化, 即当较小粒子损耗而较大粒子开始生长时, 必须终止反应, 例如通过冷却。

反应完成后, 反应介质冷却至室温。这样可以增强形成的芯/壳纳米粒子的沉淀。如果沉淀未完成, 那么可以将沉淀溶剂(例如甲醇)加到反应介质中, 或相反加入, 从而完成回收反应产物。可选择地, 可以蒸馏掉过量的有机溶剂(包括有机络合剂), 或用孔尺寸优选与 5000~10000 Dalton 值相应的膜进行超滤。这些值相应于约 3 nm 的截流, 在许多情况下该尺寸大至足以使溶剂通过, 小至足以防止纳米粒子穿过并损耗。通常, 需要压力为 2~5 bar, 以在相应的超滤孔中交换溶剂。

此外, 优选例如用甲醇、乙醇或异丙醇洗涤得到的纳米粒子。

关于氧化物壳材料、荧光合成、掺杂的金属氧化物, 例如公开在 US 6,309,701 中, 包括主体金属氧化物如 Y_2O_3 , ZrO_2 , CuO , CuO_2 , Gd_2O_3 , Pr_2O_3 , La_2O_3 , 及混合的氧化物, 用至少一种稀土金属(Sc, Y, La 和元素 58~71)掺杂, 尤其是 Eu, Ce, Nd, Sm, Tb, Gd, Ho, 和/或 Tm。

在下述方式和实施例, 可以证实壳生长实际上已发生了。

一种选择包括通过沉淀小样本并在例如 TEM 显微镜中分析其粒

度分布, 来连续监测反应。按这种方式得到的样本表明在全部反应时间内是否壳生长, 或也可观察到独立形成较小粒子。EDX 分析(能量-分散性 X-射线分析)可以确定纳米粒子的总组成。如果以不同激发能量进行 XPS, 那么 XPS 光谱可以为粒子从外部到内部的组成分布提供额外的信息。此外, 芯/壳粒子的发光光谱通常可以容易地与反应中所用的芯纳米粒子相区分, 这也表明在下面的实施例中。

III. 芯/壳粒子的用途

III. 1 生物分析中的用途

本发明的芯/壳粒子由于其发光性能可以用在生物分析中。当前芯/壳粒子特别令人感兴趣的应用是(F)RET 基分析("(荧光)共振能量转移", 如上所述)。

在生物体系中, (F)RET 经常用于确定相应标记的生物分子或分子组的空间接近度。此方法可用于证实各种生物反应或相互作用, 例如蛋白-蛋白相互作用, 免疫反应中的抗原-抗体反应, 受体-配体相互作用, 核酸杂交或蛋白与核酸的结合。

通过测量供体或受体发光的强度或光谱变化, 或通过测量供体发光衰减时间的变化, 可以对(F)RET 发生过程进行测定。

这些技术的多种应用公开于文献中, 这些文献用于本发明中, 但不构成对本发明限制: 在免疫荧光分析中测定特效抗原(US 3,996,345; US 4,160,016; US 4,174,384; US 4,199,559), 在蛋白表面的特定局部面积上测定静电势(Yamamoto 等人, J. mol. Biol. 241, 1994, 714-731 页)或高产量筛选方法(Boisclair 等人, J. of Bio molecular Screening 5, 2000, 319-328 页)。

此外, (F)RET 体系也可以分别测定两种生物分子间或一个生物分子部分内的绝对距离。这种技术也已成功地应用到蛋白或 DNA 结构分

析中(Heyduk 等人, SPIE, Vol. 3256,1998, 218-222 页), 测量多肽内的距离(Lakowicz 等人, Biophys. Chem. 36, 1990, 99-115 页), 蛋白(K. Cai 等人, J. Biol. Chem. 271, 1996, 27311-27320 页), 多核苷酸(Hochstrasser 等人, Biophys. Chem. 45, 1992, 133-141 页和 Ozaki 等人, Nucl. Acids Res. 20, 1992, 5205-5214 页)或其他大分子, 膜和膜蛋白及其结构分析(S. Wang 等人, Biochemistry 27, 1988, 2033-2039 页), 检测(US 4,996,143; US 5,532,129; US 5,565,332)和通过 PCR(聚合酶链反应)定量放大的核酸 (US 5,538,848; US 5,723,591), 例如, 在体外诊断, 基因分析, 法医鉴定, 食物和农业化学测试或亲子鉴定。可以直接即没有其他分离步骤检测或定量 DNA 或 RNA。

用(F)RET 体系通过实时 PCR 定量核酸检测是 TaqMan[®]分析(Applied Biosystems Division of Perkin-Elmer Corp., Foster City, USA), 称为 5'-核酸酶分析(US 5,538,848; US 5,210,015; Holland 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1991, 7276-7280 页; Lee 等人, Nucleic Acids Res. 21, 1993, 3761-3766 页)。分子信标方法(Tyagi 和 Kramer, Nature Biotechnology 14, 1996, 303-306 页; US 5,312,728)基于相似的机理。

近来对"生物化学中 FRET"的评述由 S. Brakmann 和 N. Nöbel 在 Nachrichten aus der Chemie, 51, 2003 年 3 月公开, 319-322 页, 其中公开了 FRET 基生物分析的其他变型, 其中也可以使用本发明的芯/壳粒子。

因此, 本发明的芯/壳粒子可用于(F)RET 基生物分析中, 包括可以用至少一种能量供体(供体)标记的第一分子组 A 和用至少一种能量受体(受体)标记的至少一个第二分子组 B, 其中

供体包括分子或粒子, 其可以被外部辐射源积极地激发并能够发光, 及

受体包括分子或粒子, 其可以受从供体转移的能量激发, 从而部分或完全猝灭供体发光, 及

供体和/或受体包括本发明的芯/壳粒子, 优选沿最长轴测得的平均直径不超过 50 nm 的那些, 尤其是不超过 30 nm 等。

这种分析可以以两种方式进行。(F)RET 基分析要求受体也能够发光。如果在没有辐射下受体松弛, RET 体系也可起作用。

优选地, 本发明的芯/壳粒子用作供体。由于这些供体在受能量激发后发出斯托克或反斯托克迁移的电磁辐射, 在激发源和发光辐射间产生光谱可区分的差异。

本发明的芯/壳粒子在上述类型的生物分析中表现出极高性能, 因为它们的发光可更有效地被猝灭。尽管不希望限于理论, 但是可以认为与均匀粒子相比, 位于或接近表面的发光中心的较高百分比可解释该现象。较高的易猝灭性为(F)RET 基生物分析带来各种优点, 如较高的灵敏度。

在衰减曲线(发光强度对时间)中, 可以将较高的易猝灭性标注为供体的较短半值(半衰期)。在时间分辨荧光光谱中(TGF 方式), 因为受体体系的极高效能量转移, 供体发光(芯/壳粒子)几乎完全消失, 这将在实施例中进一步详细说明。

关于用作供体和/或受体的芯/壳粒子的优选实施方案, 优选仅作为供体, 可以参考说明书的项 I。

当选择适合的供体/受体对, 通常推荐使用具有较高量子产率的供体探针。此外, 需要供体探针的发射光谱必须相当程度地与受体探针的吸收光谱重叠。进一步需求, 供体和受体跃迁偶极方向的适当对齐(约平行), 通常在生物体系中不存在问题, 从而不会限制供体和受体的各向同性移动。此外, 如前所述, 需要考虑 Förster 距离, 从而供体和受体优选彼此相距 $1 \pm 0.5 R_0$ (Förster 距离)。Förster 距离是能量转移效

率为 50%时的距离。本领域中公知的是可以从供体和受体的光谱性能进行计算。

除了本发明的芯/壳粒子外，通常的供体和/或受体体系是有机染料，如荧光素，四甲基若丹明，IAEDANS，EDANS，Dabcyl，BODIPY FL，QSY 7 和 QSY 9。适合光谱约 350~750 nm 的其他商业上可得到的发光有机染料包括 Alexa Fluor 染料(由 Molecular Probes 制造)或 Cy 染料(Amersham Pharmacia)。在这些染料中，在较高波长(可见光至近 IR)下吸收和发射的染料是特别有吸引力的，因为它们不会损害生物体系。

根据本发明，优选的是使用本发明的芯/壳粒子作为供体，而结合的适合受体选自上述有机荧光染料。

包括 Eu^{3+} 掺杂的壳的粒子作为供体，例如可以与作为受体的 Alexa Fluor 680 混合，或含有 Tb^{3+} 的粒子与 Dabcyl 或荧光素混合。这些含 Tb 芯/壳粒子的实例例如是芯/壳体系，其具有被 Tb^{3+} 或 Ce^{3+} 包围的惰性(非发光)芯，且 Tb^{3+} 掺杂的金属盐或氧化物作为壳，及基于铈(Ce^{3+})盐或氧化物芯的芯/壳体系，其并被铽(Tb^{3+})盐或氧化物壳包围。

由于空间相互作用或在生物分析中的沉淀，与较大粒子相比，平均直径低于 50 nm 的芯/壳粒子具有更小的电压。此外，可以预期，待测定的生物化学方法对结合反应(例如，免疫反应或 DNA 杂交)动力学影响较小。

通常用两种不同的分光方式测量(F)RET 基体系中的能量转移(WO 87/07955; EP 242 527; EP 439 036; WO 92/01225; US 4,822,733; US 5,279,943; US 5,622,821; US 5,656,433; US 5,998,146; US 6,239,271)，即时间闸荧光测定法(TGF)和/或时差式荧光测定法(TRF)。根据 TGF 方式，用脉冲光源(例如激光，闪光灯)激发荧光供体，然后在特定时间窗预定延迟后测量光发射。相对较短时间仍可以以足够高强度测量镧系

元素离子的长持续时间发光。通过生物材料固有自身荧光引起的相对较短持续时间的背景荧光(通常小于 $1\mu\text{s}$)，溶剂杂质或周围的生物材料几乎完全由延迟来区分。

与 TGF 方式相比，TRF 方式在恒定波长下以发光作为时间的函数进行测量。供体也由以不同方式调制的脉冲光源或光源激发。

直径不超过 50 nm 的芯/壳粒子适用于 TRF 方式，因为对于较大粒子而言，大部分粒子体积与受体接近程度不足以参与能量转移，从而降低有效强度。

根据本发明，至少一种(F)RET 配偶体，即供体或受体，表现出相对较长的发光衰减时间，而其他(F)RET 配偶体的特征是衰减时间短。

优选地，使用发光半值为 1 微秒~50 毫秒，更优选 100 微秒~10 毫秒的芯/壳粒子作为供体。

如果这些供体与通常具有更短衰减时间的常规有机荧光染料混合，那么供体变得敏感，并将受体发光延长超出其固有发光。以 TGF 方式测量这种体系可以排除短时间固有受体发光，并以高灵敏度测定敏感的受体发光。

其他适合的受体可以选自电导材料，如金，银，铂，或导电金属氧化物，如 In-Sn 氧化物(ITO)或导电聚合物。

为使本发明的芯/壳粒子与分析所针对的生物分子结合，可以使用下面的技术。

可通过下述产生结合

- 化学改变芯/壳粒子，通常包括在表面上产生"官能团"，所述官

能团能够与生物分子结合，和/或

• 使可任选地化学改变的芯/壳粒子表面与共价或非共价结合的所谓的"连接分子"连接，然后使生物分子与得到的粒子反应。

术语"连接分子"指能够与本发明的芯/壳粒子连接并与亲合性分子或一个分子或分子部分连接的物质，分子部分作为竞争亲合性分子相同结合点的目标分子，例如抗原决定部位。

术语"目标分子"指一种实体或基团，其在材料如生物样本中存在或不存在可以使用本发明的芯/壳粒子来确定。

术语"亲合性分子"指可以选择性地结合待分析材料(例如生物材料)中的目标分子(如果存在)的生物分子。

下文中所用的术语"官能团"没有限制到形成共价键的反应性化学基团，而且包括与生物分子形成离子相互作用或氢键的化学基团。此外，应该注意到，严格区别在表面产生的"官能团"和带有"官能团"的连接分子是不可能的，因为有时改变表面需要使较小连接分子如乙二醇与纳米粒子表面反应。

官能团或带有官能团的连接分子可以选自氨基，羧酸基团，硫醇，硫醚，二硫化物，胍基，羟基，胺基团，邻二醇，醛， α -卤代乙酰基，汞有机物，酯基，酸卤化物，酸硫醚，酸酐，异氰酸酯，异硫代氰酸酯，磺酸卤化物，咪唑酯，重氮乙酸盐，重氮盐，1,2-二酮，膦酸，磷酸酯，磺酸，吡咯，咪唑，吡啶，N-马来酰亚胺， α - β -不饱和的羰基化合物，芳基卤化物或其衍生物。

高分子量其他连接分子的非限制性实例是核酸分子，聚合物，共聚物，聚合的偶联剂，二氧化硅，蛋白，及带有表面的链状分子，相对于芯/壳粒子具有相反极性。核酸可以对本身含有核酸分子的亲合性

分子提供连接，尽管相对于连接分子而言具有互补序列。

聚合的偶联剂的实例是丁二炔，苯乙烯丁二烯，乙酸乙烯酯，丙烯酸酯，丙烯酰胺，乙烯基化合物，苯乙烯，硅树脂氧化物，氧化硼，氧化磷，硼酸酯，吡咯，聚吡咯和磷酸酯。

下面进一步详细说明连接技术：

1. 芯/壳纳米粒子表面可被化学改变，例如通过结合具有反应性官能团的磷酸衍生物。这些磷酸或磷酸酯衍生物的一个实例是亚氨基-二(亚甲基磷酰基)碳酸，其可使用"Mannich-Moedritzer"反应(Moedritzer和Irani, J. Org. Chem., 1966, 31, 1603)来合成。这种结合反应可以使用直接从本发明制备方法制得的或预处理后(例如用三甲基甲硅烷基溴化物)的芯/壳粒子进行。在第一种情况下，磷酸(酯)衍生物可以例如转移仍与表面结合的反应介质的组分。这种转移在高温下可被进行。另一方面，三甲基甲硅烷基溴化物被认为可以脱去本发明方法中使用的含烷基磷基络合剂的烷基，从而为磷酸(酯)衍生物产生新结合点。磷酸(酯)衍生物，或与其连接的连接分子，可以带有上述相同的官能团。

2. 芯/壳纳米粒子表面处理的另一个实例包括在二醇如乙二醇中加热粒子。应该注意到，如果在二醇中已经进行了芯/壳粒子的合成，那么这种处理也许是多余的。在这种情况下，直接得到的合成产物可能带有必须的官能团。然而，这种处理适于在上述含 N-或含 P 络合剂中制备的芯/壳粒子。如果用乙二醇对这种芯/壳粒子进行后处理，那么仍与表面结合的反应介质(例如络合剂)的成分可以由二醇替换，和/或可以被脱去烷基。用二醇处理得到水可溶的粒子。相似地，上述带有反应性第二官能团的伯醇可用于后处理。仍与粒子表面结合的含 N 络合剂可以由具有选自上述例子中的第二官能团的伯胺衍生物代替。

3. 本发明芯/壳粒子的表面可以用氧化硅涂覆。氧化硅可以使有机分子形成相对简单的化学结合，因为氧化硅易于与有机连接剂反应，

如三乙氧基硅烷或氯硅烷。粒子表面也可以用均聚物或共聚物涂覆。聚合的偶联剂的实例是 N-(3-氨基丙基)-3-巯基苄脒, 3-(三甲氧基甲硅烷基)丙基酰肼和 3-三甲氧基甲硅烷基)丙基马来酰亚胺。聚合的偶联剂的其他实例如上所述。这些偶联剂可以单独使用或混合使用, 这取决于作为纳米粒子涂层的共聚物类型。

4. 根据另一种表面改性技术, 含有氧化过渡金属化合物的芯/壳粒子可以通过氯气或有机氯化剂转化成相应的氧氯化物。这些氧氯化物可以与亲核试剂反应, 如在生物分子中经常存在的羟基或氨基。这种技术使得可以与蛋白直接连接, 例如通过赖氨酸侧链的氨基。用氧氯化物表面改性后与蛋白连接也可以通过使用双功能连接剂来进行, 如马来酰亚氨基丙酸酰肼。

5. 对于非共价连接技术, 具有与芯/壳粒子表面相反的极性或电荷的链型分子特别适合。可以与芯/壳纳米粒子非共价连接的连接分子例子包括阴离子、阳离子或两性离子表面活性剂, 酸性或碱性蛋白, 聚胺, 聚酰胺, 聚砜或聚羧酸。纳米粒子和具有反应性官能团的两性试剂间的疏水性相互作用可以产生必须的连接。尤其适用的是具有两性特性的链型分子, 如磷脂或衍生的多糖, 它们可以相互交联。在芯/壳粒子表面上吸收这些分子可以通过共孵育进行。在亲合性分子和芯/壳粒子间的结合也基于非共价的自组键。一个例子包括简单地检测探针, 其中生物素作为连接分子和抗生物素或 streptavidine 连接的亲合性分子。

官能团与生物分子的连接反应的方法公开于文献中, 例如 "Bioconjugate Techniques" (Greg T. Hermanson, Academic Press 1996)。生物分子, 尤其是亲合性分子可以与连接分子以共价或非共价方式根据有机化学中的标准方法连接, 如氧化, 卤化, 烷基化, 酰化, 加成, 取代或氨化。连接生物分子和共价或非共价结合的连接分子的这些方法可以在使连接分子与芯/壳纳米粒子连接之前或之后使用。此外, 可

以通过孵育使亲合性分子与相应预处理的芯/壳纳米粒子直接结合(例如通过 三甲基甲硅烷基溴化物),由于这种预处理而表现出改性的表面(例如较高电荷或极性表面)。分别用供体或受体标记的分子组 A 和 B 可以代表一部分相同分子,并且例如与相同亲合性分子连接。这些分子组的空间距离变化例如可以由确认变化或分子裂解引起。这种确认变化或分子的裂解是亲合性分子和目标分子间相互作用的结果。

可选择地,分子组 A 和 B 可以位于不同分子上,所述分子组 A 和 B 每一个与自己的亲合性分子连接。空间距离的变化可以由亲合性分子的相互作用引起,而亲合性分子用连接目标分子或彼此间被分派到分子组 A 和 B。这种相互作用例如可以是蛋白间的相互作用,如抗原和抗体的免疫反应,核酸的杂交或核酸和蛋白间的相互作用。

生物分析例如可以是用于检测身体样本中分析物的均匀免疫分析(例如药签,唾液,器官斑点,活组织切片,分泌物,体液,胆汁,血液,淋巴液,尿,粪)。均匀分析不需要洗涤或分离步骤。

使用本发明芯/壳粒子的生物分析也可以是不均匀分析。

在分析中待检测的分析物(通常是目标分子)可以是例如单克隆或多克隆抗体,蛋白,肽,寡核苷酸,核酸,寡或多糖,半抗原或低分子合成或天然抗原。

相似地,亲合性分子的非限制性例子是蛋白,肽,寡核苷酸,或其他核酸分子或相关物质,如 PNA 或吗啉及寡或多糖,半抗原,如生物素或地高辛,或低分子合成或天然抗原,或抗原决定部位。

分析可用于溶液中,及固相基或阵列基体系,其中寡核苷酸或多核苷酸链或者抗体或抗原分别固定在表面上。

可以按各种方式使用本发明的芯/壳粒子进行分析。

根据一种应用, (F)RET 配偶体位于相同分子上, 即两个(F)RET 配偶体通过相应的连接分子(部分未示)与相同的亲合性分子结合(图 6a, 6b, 7, 10 和 11)。目标分子与亲合性分子的结合包括亲合性分子的确认改变, 从而使标记相对于彼此的空间位置改变, 从而在(F)RET 中产生可测量的差值。

对于其他应用, (F)RET 配偶体位于不同分子上, 每一个连接到各自的亲合性分子上(图 8), 或连接到分析物和亲合性分子(图 9)。可以选择各亲合性分子, 使得供体和受体间发生相互作用, 这种相互作用可由目标分子的反应产生或取消, 从而使能量转移发生变化。

下面结合图 6~11 解释在(F)RET 基生物分析中本发明芯/壳纳米粒子的用途。

图 6a 示意性表明在均匀激酶分析中, 位于相同分子上的(F)RET 配偶体的相互作用。lad-纳米粒子 1 (lad = 发光无机掺杂的)和发色团 2 通过肽序列 3 连接。肽序列含有激酶-特效识别序列 4。如果肽序列 3 在此位置被激酶 5 磷酸化, 那么存在的磷酸盐 6 可以改变肽序列 3 的确认。这样可以测量(F)RET 配偶体、纳米粒子 1 和发色团 2 之间的相互作用。

图 6b 示意性表明位于一个分子上的(F)RET 配偶体的均匀免疫分析, 从而可以确定蛋白-蛋白相互作用, 例如抗原-抗体反应。纳米粒子 1 和发色团 2 通过肽序列 3 连接。肽序列含有抗原决定部位 14。如果可特效识别抗原决定部位 14 的抗体 15 与抗原决定部位 14 结合, 那么肽序列 3 的确认改变。这样可以测量(F)RET 配偶体、纳米粒子 1 和发色团 2 间的相互作用。

如图 6a 和图 6b 所示,待检测的分子可以直接与亲合性分子结合。然而,也可以使分子与亲合性分子间接结合。一个例子是测量活体细胞中的 Ca^{2+} 浓度。为此,利用无横纹肌肉中钙调素与肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的钙依赖性结合。MLCK 的钙调素结合区用作亲合性分子,并与(F)RET 配偶体连接。取决于 Ca^{2+} 浓度,钙调素与结合区结合,并引起了检测探针的确认变化。由此引起可测量(F)RET 的变化。

图 7 示意性表明用位于一个分子上的(F)RET 配偶体进行的竞争免疫分析,用于测定身体样本中的分析物 26 浓度。纳米粒子 1 和发色团 2 通过与抗原决定部位 27 结合的连接分子 29 连接。根据待检测的分析物 26 的一个抗原决定部位设计抗原决定部位 27。亲合性分子 28 与抗原决定部位 27 特效结合。通过加入含有待检测的分析物 26 的样本(例如身体样本),仍与抗原决定部位 27 结合的亲合性分子 28 从抗原决定部位 27 移位。这样引起亲合性分子 29 的确认变化,并使(F)RET 配偶体、纳米粒子 1 和发色团 2 间的相互作用发生可测量的变化。这种(F)RET 变化用于确定分析物 26 浓度。

图 8 示意性表明用不同分子上的(F)RET 配偶体进行的均匀饱和免疫分析。纳米粒子 110 的亲合性分子和发色团 120 分别可以识别相同目标分子 130 的不同抗原决定部位,从而在目标分子 130 存在下发生可测量的能量转移。供体和受体位于不同分子上的均匀免疫分析的一个例子是检测血清中的 hCG (人绒毛膜促性腺激素)。因此,供体和受体与可以识别 hCG 不同抗原决定部位的抗体连接。如果身体样本中存在 hCG,那么供体和受体探针与分析物结合。可测量的 FRET 可用于借助校准曲线确定身体样本中的分析物浓度。

图 9 示意性表明用在不同分子上的(F)RET 配偶体 210 和 220 进行的均匀竞争免疫分析。一个或多个发色团 220 与分子 222 连接,其部分或完全相应于待检测的分子 224。lad 纳米粒子 210 与亲合性分子 212 连接,其与待检测的分子 222 和分子 224 发生特别的相互作用。在亲

合性分子 212 和分子 222 间发生结合, 从而能够进行(F)RET。如果向其中含有待检测分子 224 的样本(例如身体样本), 取决于所述样本中待检测的分子 224 的浓度, 发生移位反应。这样会产生可测量的变化, 在这种情况下(F)RET 降低, 从而可以借助校准曲线测量待检测的分子的浓度。

图 10 示意性表明用一个分子上的(F)RET 配偶体进行的均匀分析。Lad 纳米粒子 310 和发色团 320 通过作为亲合性分子的肽 330 连接。这种肽可由待检测的酶 340 裂解。裂解后, 不能再观察到(F)RET。

图 10 的分析可用于确定样本或细胞中的特效酶活性, 例如蛋白酶对 HI-病毒的特效性。两个(F)RET 配偶体都通过这种蛋白酶的短识别序列连接, 并通过这种蛋白酶的活性彼此空间分离, 从而肽裂解。待检测的酶活性可源于限制核酸内切酶。然后两个(F)RET 配偶体都通过核酸连接。

图 11 示意性表明按分子信标方法进行的分析。分子信标是 DNA 分子, 其可通过分子间互补序列复制成所谓的茎环或发夹结构。一个 lad 纳米粒子 410 与 DNA 序列 430 的一个端部连接。另一个端部与作为荧光取消剂或猝灭剂的发色团 420 结合。在发夹结构中, 两个(F)RET 配偶体 410 和 420 靠近排列。因此, 供体 410 的荧光完成猝灭。目标分子 440 表现出与 DNA 序列 430 的环区域互补的序列。由于目标分子 440 的结合在能量上更有利, 因此发夹确认消失, 发色团 420 和 lad 纳米粒子 410 彼此分离, 并且因为(F)RET 不再引起荧光猝灭, 所以发出可测量的荧光。可以调节杂交性能, 使得在分子信标 430 和目标 DNA 440 间不匹配的单碱基对不会打开发夹结构。这样可以检测单碱基的差别(例如 SNP, 单核苷多态性)。

图 11 所示的技术也可用于商标保护和/或产品的防伪标记。如果产品用 DNA(片断)标记, 两端有短的互补结构, 其中一端与本发明的

芯/壳粒子连接,另一端与上述受体连接,在得到的分子信标(发夹结构)内可观察到(F)RET。一旦这种 DNA(片断)与互补结构接触,杂交将取消发夹结构,从而阻止(F)RET。这样可以对商业产品进行特效识别和保护。基于合成 DNA 识别的商标保护也已商业化,例如 November AG, Germany。

III. 2 其他用途

独立于它们在生物分析中的用途,要保护的芯/壳粒子如果与适合的发光受体组合,通常可以对生物或其他体系中的纳米距离进行(F)RET 基测量。这种测量对于纳米材料科学中的光谱方法具有重要意义。

此外,要保护的芯/壳粒子可用于要求优异(光)发光性能的各种工业装置和产品。

为此,它们通常制备成流体或固体介质中的分散体。

适合的流体介质包括例如有机或水性分散介质,涂覆组合物,油墨或染料,聚合物组合物,或气溶胶。适合的有机分散介质包括但不限于甲苯, CHCl_3 或 CH_2Cl_2 。

用上述含 N-或含 P 介质/络合剂合成可确保本发明的芯/壳粒子易于在有机介质中分散。

制备水性分散体需要进行后处理,其中合成中所用的有机材料残渣将被溶剂取代,该溶剂具有一个与粒子的表面和一个分子部分结合的官能团,从而确保在水中所必需的相容性,可任选地与水易混溶溶剂一起使用。

固体分散介质可以选自涂料,油墨或染料,聚合物组合物,尤其

是聚合物膜。

纳米粒子或通常含有纳米粒子的流体或固体介质例如可用于产生光、印刷或标记物品和材料。

这种应用例如是发光二极管，显示器，光电子装置(例如 nm 尺寸的放大器)和零阈值激光器中的光源。它们也可以用作印刷装置中的油墨，这在文件或纸币防伪中有重要意义。

IV. 实施例

实施例 1: 具有 TbPO_4 壳的 CePO_4 纳米粒子芯

在带有高效回流冷凝管、温度探针和加热套的 100 ml 圆底烧瓶中，将 3.72 g (10 mmol) $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在约 4 ml 甲醇中，然后向得到的溶液中加入 40 ml 三-2-乙基己基磷酸酯(TEHP)。首先在室温下(1~2 小时)，然后在 50°C 下(约 1.5 小时)减压圆底烧瓶，除去甲醇和结晶水。

在第二烧瓶中，将干正磷酸(20 mmol)溶解在 5 ml 四甘醇二甲基醚中。在氮气中于 50°C 下，13.1 ml (30.0 mmol)三辛基胺和 2.5 ml 正磷酸/四甘醇二甲基醚混合物加到 CeCl_3 在 TEHP 中的溶液中。随后混合物加热 15 小时到 200°C。这段时间后，得到 CePO_4 粒子(平均直径 5nm)的透明分散体("第一混合物")。

在带有高效回流冷凝管、温度探针和加热套的第二 100 ml 圆底烧瓶中，将 3.72 g (10 mmol) $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解在约 4 ml 甲醇中，然后向溶液中加入 40 ml 三-2-乙基己基磷酸酯(TEHP)。首先在室温下(1~2 小时)，然后在 50°C 下(约 1.5 小时)减压圆底烧瓶，除去甲醇和结晶水。在氮气中于 50°C 下，13.1 ml (30.0 mmol)三辛基胺和 2.5 ml (10 mmol 磷酸)正磷酸/四甘醇二甲基醚及 14 ml CePO_4 分散体(冷却至约 20-30°C)加到 TbCl_3 溶液("第二混合物")中，随后加热 12 小时到 200°C。冷却至室温，反应混合物倒入甲醇中，以沉淀芯/壳纳米粒子。离心沉淀物(5500

upm), 用甲醇洗涤得到的粒子, 并干燥。

图 2 所示的这些粒子的光致发光光谱证实了芯/壳结构。

TEM 测量进一步表明这些粒子的平均直径(沿最长轴)约为 6 nm。

图 1 表明均匀 CePO_4 粒子(线 1)和本发明芯/壳粒子(线 2 和 3)的荧光光谱, 其中 TbPO_4 壳在 CePO_4 粒子周围生长。线 2 反映的光谱反应时间为 0.5 小时, 而线 3 表明 CePO_4 芯的荧光, 该芯具有完全长成的 TbPO_4 壳(反应时间 18 小时)。以相同的光学密度(10^{-3} wt-%)在异丙醇中记录光谱($\lambda_{\text{exc}} = 274 \text{ nm}$)。

从图 1 中可以看出, 均匀 CePO_4 粒子的特征是在 330 nm 周围有强荧光发射, 但在可见光范围内没有发射。这种情况因 TbPO_4 涂层而明显变化。 Ce^{3+} 强烈吸收激发的辐射, 将吸收的能量转移至 Tb^{3+} , Tb^{3+} 在 488 nm, 545 nm, 586 nm 和 617 nm 处以四个强特征能带形式发光。这种能量转移降低 Ce 发射, 并剧烈提高 Tb 发射。

实施例 2: 具有 TbPO_4 壳的 LaPO_4 纳米粒子芯

在带有高效回流冷凝管、温度探针和加热套的 100 ml 圆底烧瓶中, 将 3.2 g (8.6 mmol) $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶解在约 10 ml 甲醇中, 然后向得到的溶液中加入 39 ml 三-2-乙基己基磷酸酯(TEHP)。首先在室温下(1~2 小时), 然后在 50°C 下(几小时)减压圆底烧瓶, 除去甲醇和结晶水。

在第二烧瓶中, 将干正磷酸(20 mmol)溶解在 5 ml 四甘醇二甲基醚中。

在氮气中于 50°C 下, 11.5 ml (26.3 mmol)三辛基胺和 2.3 ml 正磷酸/四甘醇二甲基醚混合物加到 LaCl_3 在 TEHP 中的溶液中。随后混合物加热 16 小时到 200°C。这段时间后, 得到 LaPO_4 粒子的透明分散体

("第一混合物")。

在带有高效回流冷凝管、温度探针和加热套的第二 100 ml 圆底烧瓶中, 将 2.97 g (8 mmol) $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解在约 10 ml 甲醇中, 然后向溶液中加入 35.2 ml 三-2-乙基己基磷酸酯(TEHP)。首先在室温下(1~2 小时), 然后在 50°C 下(几小时)减压圆底烧瓶, 除去甲醇和结晶水。在氮气中于 50°C 下, 10.5 ml (24 mmol) 三辛基胺和 2.0 ml (8 mmol 磷酸) 正磷酸/四甘醇二甲基醚及全部量的 LaPO_4 分散体(冷却至约 20-30°C) 加到 TbCl_3 溶液("第二混合物")中, 随后加热 16 小时到 200°C。冷却至室温, 反应混合物倒入甲醇(300 ml)中, 以沉淀芯/壳纳米粒子。离心沉淀物(5500 upm), 用甲醇洗涤得到的粒子, 并干燥。

参考例 1: 分析芯/壳粒子

下面参考例描述了对具有 LaPO_4 壳的 CePO_4 : Tb 纳米粒子芯的化学组成、芯直径和壳厚度的测量。即使这些粒子没有被权利要求所覆盖, 但是这种分析技术也完全适用于本发明。

为此, 将粒子放在带有孔的碳膜上, 并在 Philipps CM300UT 显微镜下研究。

EELS(电子能量损耗光谱)表明阳离子的平均化学组成是 $\text{Ce/La} = 0.34 \pm 0.05$, $\text{Tb/La} = 0.12 \pm 0.03$, 这意味着 $\text{La/Ce} = 3.0 \pm 0.4$, $\text{Ce/Tb} = 2.8 \pm 0.8$, 后面值近似相应于所用的摩尔比 Ce/Tb (3.14/1)。

HREM(高分辨率电子显微镜方法)证实了得到的芯/壳粒子的结晶度。

此外, 用扫描速率为 0.48 nm/图像点的弱焦点得到 Hellfeld 图像, 从而也覆盖较小的粒子。图像分析表明占大部分体积的主要粒子直径为 5~9 nm。对 6 个这样的粒子进行 EFTEM(能量过滤透射电子显微镜

方法), 所谓的"光谱图像方法"用"Landeszentrum für Hochleistungsspektroskopie, Institut für Anorganische Chemie" in Bonn, Germany 进行显影, 以进行定量分析。为此, 6个结晶粒子以极高放大倍率集中在图像能量过滤器后的 CCD 照相机上。然后插入最小的物镜屏(4.6 mrad)和最大的进入屏(3mm), 以光谱方式使用能量过滤器。从而通过进入屏的全部强度在检测器上形成一条条图像。由于透镜的像差, 这种方法成像仅在约 $\pm 40\text{eV}$ 时, 并且尖锐(低于 nm), 因此在 832, 849, 884 和 902 eV 时聚焦在 $\text{La}_{\text{M}5,4}$ 和 $\text{Ce}_{\text{M}5,4}$ 边缘。在选择主放大倍数为 99K 时, 进入屏直径总是 11.2 nm。

图 2 表明(D)被 LaPO_4 壳(直径约 7 nm)包围的一个 CePO_4 : Tb 纳米粒子的 Hellfeld 图像(带有进入屏), (E)在 860 eV 能量损耗时的光谱图像, 及通过粒子表面(A, C)和中心(B)的外形。外形(A, B 和 C)表明 $\text{La}_{\text{M}5,4}$ 和 $\text{Ce}_{\text{M}5,4}$ 峰, 其相对强度近似相应于局部组成。

不同形状证实存在富 Ce 的芯和富 La 的壳的芯/壳结构。6个选择的粒子其平均直径为 $7.5 \pm 1.9\text{ nm}$, 由直径为 $4.0 \pm 1.1\text{ nm}$ 的富 Ce 的芯和厚度为 $1.9 \pm 0.7\text{ nm}$ 的富 La 的壳组成(在分析中没有测定 Tb)。

实施例 3: 将荧光素与实施例 1 的芯/壳粒子($\text{CePO}_4/\text{TbPO}_4$)连接

3-1: 用亚氨基-二(亚甲基膦酰基)-十一酸和 1,4-二(3-氨基丙氧基)-丁烷对芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-纳米粒子进行氨基功能化

通过加热至 50°C 达 30 min 用 1.5 ml 乙二醇和 0.51 g (2.5 mmol) 1,4-二(3-氨基丙氧基)-丁烷溶解 0.388 g (1 mmol) 亚氨基-二(亚甲基膦酰基)十一酸。得到的溶液略带黄色。将实施例 1 中得到的 25 mg (= 71.5 nmol) 芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-纳米粒子加到溶液中, 搅拌, 并加热至 $\sim 120^\circ\text{C}$ 达 4h。分散体变混浊, 并略带黄色。用 $2 \times 2\text{ l } 10\text{ mM Na-碳酸盐}$ 缓冲液(pH 8.5)过夜透析后(透析管 Spectra/Por, 5-6.000 MWCO, Spektrum, Netherlands), 沉淀粒子。

3-2: 将荧光素与氨基-官能化的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-纳米粒子连接

在 5000 rpm 下将 5mg (25 nmol)氨基-官能化的纳米粒子(上述)离心 10 min, 小球再悬浮在 500 μl 0.2M Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)中, 浓度为 10 mg/ml。FITC(荧光素异硫代氰酸酯)溶解在 DMF 和 0.2m Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)的 1: 1 溶液中, 浓度 5mmol/ml。向粒子中加入 17-倍过量的($87\mu\text{l} = 429 \text{ nmol}$), 混合物在室温下旋转孵育 4.5 h。使用葡聚糖凝胶 G-25 M PD 10 柱(Amersham Bioscience)和 10 mM Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)作为洗脱缓冲液分离未结合的 FITC。3.9 ml 的洗脱部分含有荧光素连接的纳米粒子。

比较例 1: 将荧光素与均匀 LaPO_4 : Ce, Tb 粒子连接

CE1-1: 制备 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子

用干氮气流使 300 ml TEHP (三(2-乙基己基)磷酸酯)脱气。然后, 将 7.43 g $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20mmol), 8.38 g $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22.5 mmol), 及 2.8 g $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mmol)溶解在 100 ml 甲醇中, 并加到 TEHP 中。然后在温度 30~40°C 下减压除去水和甲醇。然后加入 4.9 g 干正磷酸 (50mmol)溶解在 66.5 ml 三辛基胺和 150 ml TEHP 的混合物中的新制溶液。减压下放置, 立即得到清澈溶液, 充入氮气以最小化当温度升高时 Ce^{3+} 的氧化。然后, 溶液加热至 200°C。如果沸腾温度降至 175°C (约 30~40 小时后), 那么停止加热。冷却至室温后, 加入 4-倍过量的甲醇以沉淀粒子。分离粒子, 用甲醇洗涤, 干燥。

CE1-2: 用溴代三甲基硅烷脱烷基化

将 CE1-1 中得到的 300 mg LaPO_4 : Ce, Tb-纳米粒子(约 850 nmol)与 100ml 氯仿中的 2.3 g 溴代三甲基硅烷(15 mmol)回流 4 小时。除去过量溴代三甲基硅烷和挥发性中间产物, 减压分离。在 6ml 水和 100 μl 氨水(25%)的混合物中搅拌下水解含有纳米粒子的残渣过夜。得到的粒子形成乳状悬浮液, 几小时后部分沉淀。可以通过离心进行分离。

CE1-3: 用亚氨基-二(亚甲基磷酰基)己酸对脱烷基的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子进行氨基功能化

通过加热至 50°C 达 30 min 将 0.5 g (1.75 mmol) 亚氨基-二(亚甲基磷酰基)己酸(KBD9267)和 0.894 g (4.375 mmol) 1,4-二(3-氨基丙氧基)-丁烷(Fluka)溶解在 2 ml 乙二醇中。得到的溶液略带黄色。将 CE1-2 中得到的 35 mg (= 175 nmol) LaPO_4 : Ce, Tb-纳米粒子加到溶液中, 搅拌, 并加热至 $\sim 120^\circ\text{C}$ 达 4h。冷却至室温后, 分散体透明并呈褐色。用 2×2 l 10mM Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)透析后, 溶液略带黄色, 透明。

CE1-4: 将荧光素与氨基-官能化的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子连接
CE1-3 的氨基官能化的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子溶液减压浓缩至 ~ 4.8 mg/ml。FITC(荧光素异硫代氰酸酯)溶解在 DMF 和 0.2m Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)的 1: 1 溶液中, 浓度 5mmol/ml。向 5mg (~ 1 ml = 25 nmol)的纳米粒子中加入 17-倍过量的($87\mu\text{l} = 429$ nmol), 混合物在室温

下旋转孵育 4.5 h。使用葡聚糖凝胶 G-25 M PD 10 柱(Amersham Bioscience)和 10 mM Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)作为洗脱缓冲液分离未结合的 FITC。3.5 ml 的洗脱部分含有荧光素连接的纳米粒子。

实施例 4: 用荧光素连接的纳米粒子测量 FRET

对实施例 3 的荧光素连接的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子和比较例 1 的均匀 LaPO_4 : Ce, Tb 进行各种光谱分析以确定 FRET 效率。

用 Jobin Yvon 制造的 FL3-22 分光计进行测量, 在宽度和深度为 1cm 的光学室中使用样本的水性分散体。选择浓度使光学密度不超过 0.3。

图 3 表明在 280 nm 脉冲激发后以 TRF 方式测量的两种类型的粒子的衰减曲线:

- 虚线代表实施例 1 得到的未改性的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子在 542 nm (Tb 发射)的衰减曲线; 半值 1.4 ms。
- 粗线代表实施例 3 得到的荧光素连接的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子在 542 nm 的衰减曲线; 半值 0.02~0.1 ms。
- 细线代表实施例 3 得到的荧光素连接的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子在 520 nm(荧光素发射)的衰减曲线; 半值 0.02~0.06 ms。

图 4 表明比较例 1 的荧光素连接的均匀 LaPO_4 : Ce, Tb 粒子的衰减曲线, 在 280 nm 脉冲激发后以 TRF 方式测量:

- 粗线代表在 542 nm 的衰减曲线(半值约 1.7 ms)。
- 细线代表相同粒子在 520 nm 的衰减曲线(半值约 1.0~1.5 ms)。

与比较例 1 的粒子相比(约 1.7 ms), 实施例 3 的荧光素连接的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子表现出更短荧光半值(在 542 nm 处 0.02~0.1 ms)。这表明本发明粒子的芯/壳结构对受体分子(荧光素)有更有效的能量转移, 从而增大 FRET 效率。未改性的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子的荧光半值(约 1.4 ms)比实施例 3 的荧光素连接的芯/壳粒子至少高 14 倍。

未改性的均匀 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子(未与荧光素连接)的荧光半值约 2.4 ms, 即比较例 1 中相应荧光素连接的粒子(在 542 nm 处约 1.7 ms)高约 1.5 倍。如果将此比值(约 1.5/1)与图 3 的比值(约 14/1)相比, 可以更清楚本发明对 FRET 效率的改进。

图 5a 表明在 280 nm 脉冲激发后并在最后激发脉冲 40 μs 后以 TGF 方式测量的荧光光谱:

- 粗线代表实施例 1 得到的未改性的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子的光谱, 及
- 细线代表实施例 3 得到的荧光素连接的芯(CePO_4)-壳(TbPO_4)-粒子的光谱。

左侧强度标尺相应于粗线，右侧强度标尺相应于细线。改性的芯/壳粒子(实施例 3)的发射光谱其特征在于，在 545 nm 特征 Tb^{3+} 带强度极低(降低至约 1/40)，在 520 nm 周围出现源于荧光素发射的新宽带。在激发能量(280 nm)从 Ce^{3+} (芯)能量转移 Tb^{3+} (壳)发光中心后，后者通过 FRET 使荧光素发光。

图 5b 表明在 280 nm 脉冲激发后并在对比较例 1 中荧光素连接的均匀 $\text{LaPO}_4\text{: Ce, Tb}$ 最后激发脉冲 40 μs 后以 TGF 方式测量的荧光光谱：

此光谱也证实了 FRET 的出现，因为观察到源于荧光素的 520 nm 周围的相对较宽发射谱带。然而，供体发射(以 545 nm 的特征 Tb^{3+} 带表示)仍比图 4a(细线)强，这证实了较低 FRET 效率。

参考例 2：生物分析

下面的参考例证实了使均匀纳米粒子与生物分子结合的特效方法，并在生物分析中使用相应标记的生物分子。尽管所用的纳米粒子不是本发明的，但是这些参考例都可完全转换成要保护的芯/壳粒子。在本文中，技术人员可以认识到，下面针对均匀纳米粒子所述的表面改性技术优选用于以相似方法合成的芯/壳粒子，尤其是相对于选择的溶剂而言，溶剂通常与得到的纳米粒子表面结合。

RE 2-1: $\text{LaPO}_4\text{: Ce, Tb}$ 纳米粒子的羧基官能化

按比较例 CE1-1 中所述制备 $\text{LaPO}_4\text{: Ce, Tb}$ 粒子。

在搅拌下和惰性气体中，将 50mg 这些纳米粒子(约 140 nmol)和 5ml 乙二醇(约 180 mmol)、5 μl 硫酸(96-98%)于 3 小时加热至 210 $^{\circ}\text{C}$ 。可选择地，可以使用其他二醇，优选各种链长度的聚乙二醇，最优选 $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{OH}$ ，其中 $n=2-9$ 。在约 135 $^{\circ}\text{C}$ 时粒子开始溶解在乙二醇中。处理完成，使用约 1.5 mbar 的真空，然后除去约一半量的乙

二醇。从而得到透明残液。然后用水对残渣进行透析(透析管 Spectra/Por, 5-6.000 MWCO, Spectrum, Netherlands)。

100 mg(约 300 nmol)得到的纳米粒子在 20 mL 水的溶液中加入 0.5mL 硫酸(96-98%)。向得到的混合物中滴加 1mM KMnO_4 溶液,直到不再观察到紫罗兰色脱色。然后再加入相同量的 KMnO_4 溶液,搅拌过夜(>12 h)。通过滴加新制的 1mM 亚硫酸钠溶液还原过量的高锰酸盐。用 0.1M MES, 0.5M NaCl, pH 6.0 对得到的混合物进行透析过夜(透析管 Spectra/Por, 5-6.000 MWCO, Spectrum, Netherlands)。

RE 2-2: 用溴代三甲基硅烷脱烷基化

按与比较例 CE1-2 相同方式处理按比较例 CE1-1 制备的 300 mg(约 850 nmol) LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子。

RE 2-3: 用 11-二(磷酰基甲基)氨基-十一酸和 1,4-二(3-氨基丙氧基)丁烷连接 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子。

通过将 201g 11-氨基-十一酸, 170g 磷酸, 200 mL 浓盐酸和 200 mL 水的混合物加热至 100°C , 然后于 1 小时内滴加 324g 甲醛(37%), 并在 100°C 下搅拌 1 小时, 制备 11-二(磷酰基甲基)氨基-十一酸。冷却至室温后, 通过真空辅助过滤来分离沉淀的产物, 并在真空下干燥。得到 334g 11-二(磷酰基甲基)氨基十一酸。相似地, 可以使用具有 2-18 个碳原子的相应酸。

将 0.5 g (1.85 mmol) 11-二(磷酰基甲基)氨基-十一酸溶解在 2mL 乙二醇中, 然后加入 0.894g (4.375 mmol) 1,4-二(3-氨基丙氧基)丁烷。形成透明溶液后(放热反应), 在 50°C 下加入在 RE 2-2 中得到的 35 mg (100 nmol) LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子, 然后加热至 125°C 。在约 120°C 下, 粒子完全溶解。4 小时后, 得到略呈褐色的溶液, 在冷却至室温后仍保持透明。用 2×2 L 10mM Na-碳酸盐缓冲液(pH 8.5)对反应混合物进行透

析(透析管 Spectra/Por, 5-6.000 MWCO, Spektrum, Netherlands)。透析液中含有沉淀的纳米粒子。

RE 2-4: RE 2-3 的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子的生物素化

通过旋转蒸发仪减小 RE 2-3 中得到的 6.2 mL (=5 mg 或 ~15 nmol) 纳米粒子混合物的体积, 并浓缩至 4.81 mg/mL。保持旋转, 将得到的分散体用 20 倍摩尔量过量的生物素-X-NHS (硫代-生物素-氨基己酸-N-羟基-琥珀酰亚胺酯, Calbiochem, Schwalbach, Germany) 孵育 4 小时, 然后用 PBS 缓冲液透析 (8 mM K_2HPO_4 ; 150 mM NaCl; 2 mM Na_2HPO_4 ; pH 7.4) (透析管 Spectra/Por, 5-6000 MWCO, Spectrum, Netherlands)。得到的透析液略微混浊。

RE 2-5: 将 DNA 寡核苷酸与 RE 2-3 的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子连接。

用 40-倍过量的硫代-SIAB(硫代琥珀酰亚氨基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酯, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland)活化在 RE 2-3 中得到的纳米粒子; 通过 Centricon 过滤单元(MW-exclusion at 50000, Millipore, Eschborn, Germany)在 TSMZ-缓冲液 pH 7.3 (0.1M NaCl; 0.1 M 三乙醇胺-HCl; 0.02M NaOH; 0.27 mM ZnCl_2 ; 0.1% Tween 20; 1mM MgCl_2)中重新缓冲 7.5 mg (~25 nmol)氨基-功能化的纳米粒子, 并调节至浓度约 7 mg/mL。50 μ l 20 mM 硫代-SIAB 的水溶液加到粒子分散体中, 然后在 25°C 孵育 15 分钟。加入 12 μ l 1M 甘氨酸(12-倍过量)终止反应, 用葡聚糖凝胶 G25 PD 10 柱(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)分离游离的硫代-SIAB。用 Interactiva (Ulm, Germany)对 DNA 寡核苷酸排序, 其包括序列 5'-CCACGCTTGTGGGTCAACCCCCGTGG-3'和用探针在 5'-端的硫醇改性物和在 3'-端 dabcyI-改性物(4-(4-二甲基氨基苯基重氮)苯甲酰基), 及区别仅在于在 3'-端缺少 dabcyI 分子的对照 DNA 寡核苷酸。混合等摩尔量的 DNA 寡核苷酸和 SIAB 活化的纳米粒子, 在 25°C 下孵育 3

小时, 在 4°C 下孵育过夜。与 DNA 寡核苷酸连接的纳米粒子通过 FPLC(快速液相色谱)与非连接的粒子和游离 DNA 寡核苷酸分离。连接的粒子保存在 4°C 的 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0.1% BSA 中。只要不存在目标 DNA, 得到的分子就折叠成发夹结构, 从而分子的两端相互接近, 发生 FRET。在这种情况下, 纳米粒子荧光被 dabcyI 猝灭。

RE 2-6: 将抗- β -hCG 单克隆抗体与 RE 2-3 的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子连接

首先, 用 30-倍过摩量的 2-Iminothiolan (2-IT, Traut 试剂, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)活化 RE 2-3 中得到的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子; 2 mL (~25 nmol, 4 mg/mL)这些粒子转移进 TSE-缓冲液 pH 8.5 (0.04M NaCl; 0.05 M 三乙醇胺-HCl; 0.04M NaOH; 0.5 mM EDTA; 0.1% Tween 20; pH 8.5)中。为此, 它们以 3000g 离心三次, 每次 15 min, 倾出上清液, 每次残液放进 700 μl TSE-缓冲液 pH 8.5 中。这些粒子用 75 μl 10mM 2-IT (TSE-缓冲液 pH 8.5)在 25°C 下孵育 1 小时, 反应用 9 μl (12-倍过量的) 1 M 甘氨酸终止。为分离过量的 2-IT, 得到的混合物以 3000g 再离心三次, 每次 15 min, 然后倾析出上清液, 在 1 mL TSE-缓冲液 pH 7.3 (0.1M NaCl; 0.1 M 三乙醇胺-HCl; 0.02M NaOH; 1mM EDTA; 0.1% Tween 20; pH 7.3)中再悬浮沉淀 2 次, 在 250 μl TSE-缓冲液 pH 7.3 中第三次离心。同时, 等摩尔量单克隆小鼠抗体对 β -hCG (克隆 F199C1, Perkin-Elmer Life Sciences-Wallac Oy, Finland)具有特效, 并用 40-倍过量的 SMCC (N-琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基-甲基)-环己烷-1-羧酸酯-Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn)活化, 通过 Centricon 过滤单元(MW 为 50 000)在 TSMZ-缓冲液 pH 7.3 (0.1M NaCl; 0.1 M 三乙醇胺-HCl; 0.02M NaOH; 0.27 mM ZnCl_2 ; 0.1% Tween 20; 1mM MgCl_2)中再缓冲 750 μl 抗- β -hCG 抗体(= 25 nmol, 浓度 of 5 mg/mL), 并调节至浓度约 7 mg/mL。50 μl 20 mM SMCC-溶液在 DMF(=1mmol)中的溶液加到抗体溶液中, 然后在 25°C 孵育 30 分钟。加入 12 μl 1M 甘氨酸(12-倍过量)终止反应, 用葡聚糖凝胶 G25 PD 10 备用柱(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)

分离游离的 SMCC。最后，混合等摩尔量的 2-IT-活化的纳米粒子分散体和 SMCC-活化的抗体溶液，在 25°C 下孵育 3 小时，然后在 4°C 下孵育过夜。抗体连接的纳米粒子在 Superdex 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) 上通过凝胶渗透色谱与非连接的粒子和游离抗体分离。0.1M MES, 0.5M NaCl, pH 6.0 用作缓冲洗脱液。连接的纳米粒子的保留时间为约 2 小时。

RE 2-7: 用 hIL-2 连接 LaPO_4 : Eu^{3+} 纳米粒子

按文献(J. Phys. Chem. B 2000, 104, 2824-2828)所述，在 TEHP 中制备 LaPO_4 : Eu^{3+} 纳米粒子，与文献不同处仅在于，使用 1.76g $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 代替文献中所述的硝酸盐。将 300 mg ($\sim 1\mu\text{mol}$) 这些纳米粒子与 2.23g (15 mmol) 溴代三甲基硅烷在 125 ml 氯仿中一起加热回流 4 小时。蒸馏掉大部分过量的溴代三甲基硅烷和形成的中间产物，然后在略微氨性条件下水解残液。为此，用其中加有 100 μl 氨水的(25%) 的 6 mL 水处理残液，并搅拌过夜。得到的粒子形成乳状分散体，几

小时后部分沉淀。将 5 mg (= 25 μmol , 106 μl) 溴代三甲基硅烷处理的纳米粒子在 37°C 下孵育 1 小时，并与 10 mM 碳酸钠-缓冲液(pH 8.5) 中的重组人 IL-2 蛋白(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)以摩尔比 2: 1 一起摇动。随后以 3000g 离心得到的混合物 6 次，每次 10 min，来分离过量的蛋白，然后在 1mL 10 mM 碳酸钠缓冲液(pH 8.5)中再悬浮。 LaPO_4 : Eu^{3+} /IL-2 共轭物储存在 4°C 下。

RE 2-8: 用 RE 2-6 的抗体连接的纳米粒子作为供体和荧光连接的抗体作为受体来检测 β -hCG 的均匀能量转移分析

将抗- β -hCG 抗体与荧光素连接:

按照制造者说明，用 Molecular Probes 制备的 Fluororeporter[®] FITC 蛋白标记试剂盒用于连接荧光素与抗-(β -hCG 抗体(M15294, Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy, Finland)。用 Centricon 过滤单元(MW 为 50 000)在 0.2 M 碳酸氢盐缓冲液(pH 9.0)中再缓冲 0.5 mg 抗

体。然后用 25-倍过量的 5 mM 荧光素异硫代氰酸酯(FITC)溶液(溶解在同体积的 DMF 和 0.2 M 碳酸氢盐缓冲液 pH 9.0 的混合物中)孵育抗体溶液,并在室温下孵育 3 小时。用备用的葡聚糖凝胶 G25 PD 10 柱(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany)分离过量 FITC,用光谱测定抗体浓度和荧光素/抗体比例。0.01%叠氮化钠和 0.1% BSA 加到储存在 4°C 下的共轭物中。

进行分析:

在 UV 可透过的 96-孔微升板中(UVStar, Greiner),在 25°C 下孵育源于从商业上可得到的用于测量血清中游离 β -hCG 的试剂盒(A007-101, Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy, Finland)的 50 μ l β -hCG 标准液、在 RE 2-6 中得到的 100 nmol 纳米粒子-抗体共轭物、200 μ L tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中的 100 nmol 荧光素连接的抗- β -hCG 抗体达 60 min。这两种抗- β -hCG 抗体直接靠着 β -hCG 亚单元的不同抗原决定部位。然后用荧光分光计(Jobin Yvon, Fluorolog 3 制备)在下列条件下测量样本:波长为 280 nm 的脉冲激发,发射:542 nm,缝宽:5 nm,积分时间 0.1 ms。将不同 β -hCG 浓度的结果绘制进校准曲线。通过以校准曲线为基础测定浓度,可以以与血清样本相似的方式测定身体样本的 β -hCG 含量。

RE 2-9: 用 RE 2-7 的 hIL-2 连接的纳米粒子($\text{LaPO}_4: \text{Eu}^{3+}$)和 Alexa Fluor 680 连接的抗-hIL-2R α -链抗体来检测 hIL-2 的均匀竞争能量转移分析

用 Alexa Fluor 680 连接的单克隆抗-hIL-2R α -链抗体:

用 PBS 渗析可特效识别人白细胞介素-2 受体 α -链(hIL-2 α -链)(ATCC, Rockville, USA)的 1 mg 单克隆抗体 7G7B6,调节浓度为 2 mg/mL,根据制造者指示,用 Alexa Fluor 680 蛋白标记试剂盒(Molecular 探针 Europe BV, Netherlands)进行标记。使用 0.1 M 碳酸氢钠缓冲液 pH 8.3 作为反应缓冲液,在室温下孵育 1 小时。使用含有 0.2 mM 的 Na-叠氮化物的 PBS-缓冲液作为洗脱缓冲液,用含在试剂盒中

的柱纯化连接的抗体。在 1 cm 光学室中,测量 280 和 679 nm 的吸收(A),以测定连接的抗体的蛋白浓度,然后用下式计算:

$$M = (A_{280} - (A_{679} \times 0.05)) \times \text{稀释因子} / 2030000$$

其中 203000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 代表 IgG 的摩尔消光系数,0.05 是染料在 280 nm 吸收时的校正因子。连接的抗体的浓度是 1.27,并可以用 PBS, 0.2 mM Na-叠氮化物调节到 1 mg/mL (~6.5 μM)。连接的抗体储存在 4°C 下。标记效率计算如下。

每摩尔抗体的摩尔染料数 = $(A_{679} \times \text{稀释因子}) / 184000 \times \text{蛋白浓度 M}$

其中 184000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ 代表 Alexa Fluor 680 染料在 679 nm 的摩尔消光系数。抗体/染料共轭物的比例是 3.2。

进行分析:

用 50 mM TSA-缓冲液(50 mM Tris-HCl pH 7.75; 0.9% NaCl; 0.05% NaN_3)得到各组分需要的稀释液。首先,40 孔 UV-可透过的微升板(UVStar, Greiner)用 BSA-溶液(0.5%)在室温下孵育 1 小时,以饱和和非特效结合,然后加入实施例 RE 2-7 的 $\text{LaPO}_4: \text{Eu}^{3+}/\text{IL-2}$ 共轭物、Alexa Fluor 680-标记的抗-hIL-2 α -链抗体和重组 hIL-2sR α 蛋白(人 IL-2 可溶解的受体 α , R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)的混合物,每种最终浓度为 40 nM。20 个这些孔中充入不同浓度的非标记的 hIL-2 蛋白,剩余 20 个孔中充入与分析不相关的蛋白。每个浓度提高到 50 nM,以测试 0-950 nM 的连续浓度。在每种情况下,反应的终体积为 200 μL 。在黑暗、室温的摇动器中孵育 45 min。用 Wallac 1420 VictorTM 多标记计数器(Perkin-Elmer Life Sciences, Wallac Oy, Finland)在下列条件下记录信号:激发: 340 nm,发射: 665 nm,时间延迟: 50 μs ,时间窗: 200 μs ,循环时间: 1000 μs 。每个值测定两次,并基于用非相关蛋白得到的非特效结合的结果进行校正。以测量值相对于蛋白浓度制图,得到校准曲线,通过校准曲线可以测定人白细胞介素-2 的浓度。对于人身体样本可以使用相似方法。

RE 2-10: 用 RE 2-5 的 DNA 寡核苷酸连接的 LaPO_4 : Ce, Tb 纳米粒子通过分子内能量转移进行细菌 DNA 的定量 PCR 检测

特别选择用于 *Mycobacterium tuberculosis* 的 RNA 聚合酶基因的定量 DNA 检测的引物和探针, 并由 Interactiva (Ulm, Germany) 制备。引物包括下述序列: 前端 5'-GGCCGGTGGTCGCCGCG-3' 后端 5'-ACGTGACAGACCGCCGGGC-3'。

细菌 DNA 的定量测定分析

对于 50 μL PCR 反应, 混合作为探针的 RE 2-5 的 50 nM 纳米粒子 (dabcyl-寡核苷酸连接的)、500 nM 每种引物, 2 U Amplitaq Gold DNA 聚合酶(Perkin-Elmer)、250 μM dATP、250 μM dCTP、250 μM dGTP、500 μM dUTP、4 mM MgCl_2 、50 mM KCl 和 10 mM Tris-HCl pH 8.0。用相同引物将基因组 *M. tuberculosis* DNA 放大成为 DNA 模板, 并利用 Invitrogen Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒(Invitrogen BV/NOVEX, the Netherlands)在质粒中克隆。为得到标准曲线, 使用 5 个不同浓度的 1 pg~100 ng 的 DNA 质粒, 反应未使用 DNA 模板。对于每种浓度进行 30 次反应, 在第 15 次循环开始后, 在每次附加循环后用光谱分析测量样本。反应体积是 50 μL , 用 Thermocycler (PCR-System 2400, Perkin-Elmer)在下列反应条件下进行放大: 在 95°C 下 10 min; 在 95°C 下 30 s 的 15~45 循环, 在 56°C 下 45 s, 在 72°C 下 30 s。用荧光分光计(Jobin Yvon, Fluorolog 3 制备)在下列条件下测样本: 波长为 280 nm 的脉冲激发, 发射: 542 nm, 缝宽: 4 nm, 时间延迟: 50 μs , 重复速率约 25 Hz。以相同方式可以检测铽发射线的半值。为此使用下列条件: 激发: 280 nm, 发射: 542 nm, 缝宽: 5 nm, 积分时间: 0.1 ms。在探针和目标 DNA 的杂交过程中, 在连接的纳米粒子和 dabcyl 间未发生分子内 FRET。随着目标 DNA 浓度增大, 因此相对于没有模板的对照样本而言, 纳米粒子的 Tb-荧光增强。同时, 与没有模板 DNA 的对照样本相比, 纳米粒子荧光寿命时间的半值更长。两种参数间的差别都可以相对于循环次数制图, 从而对于每个 DNA 模板浓度得到校准曲线。

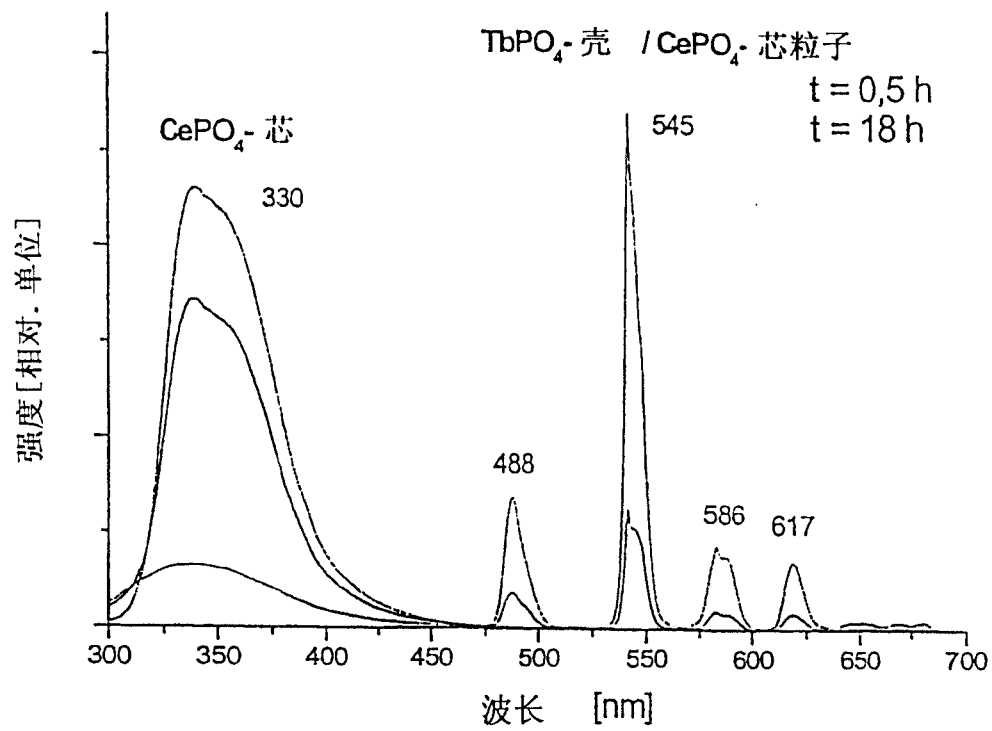


图1

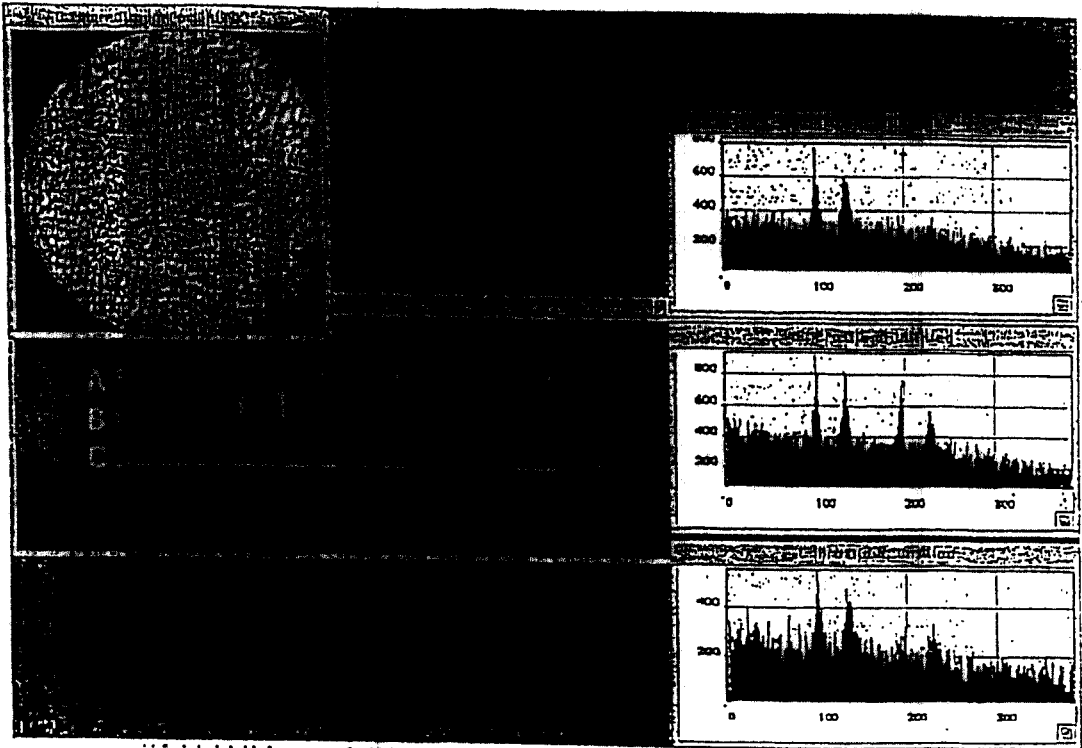


图2

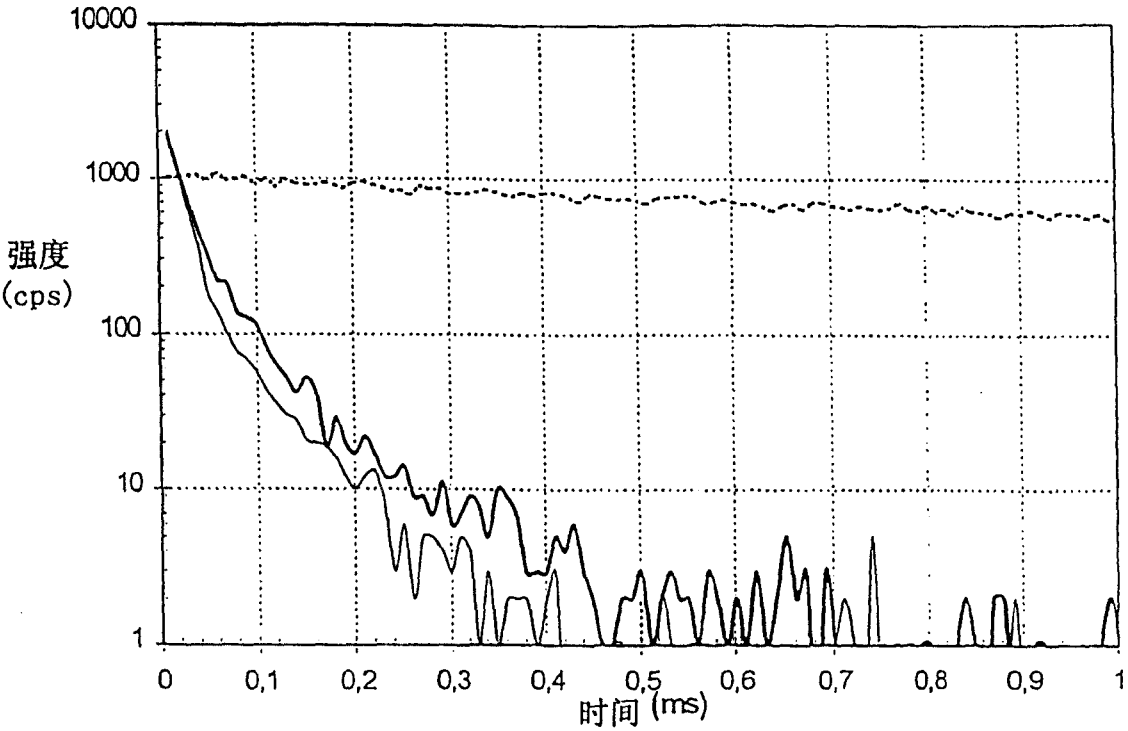


图3

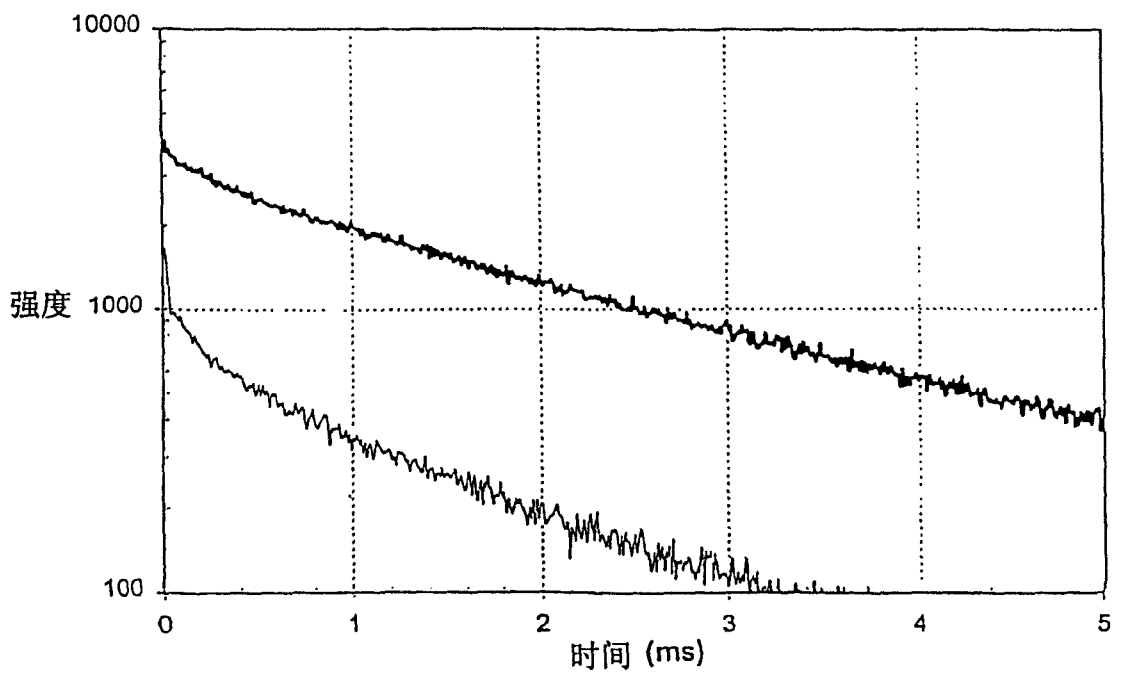


图4

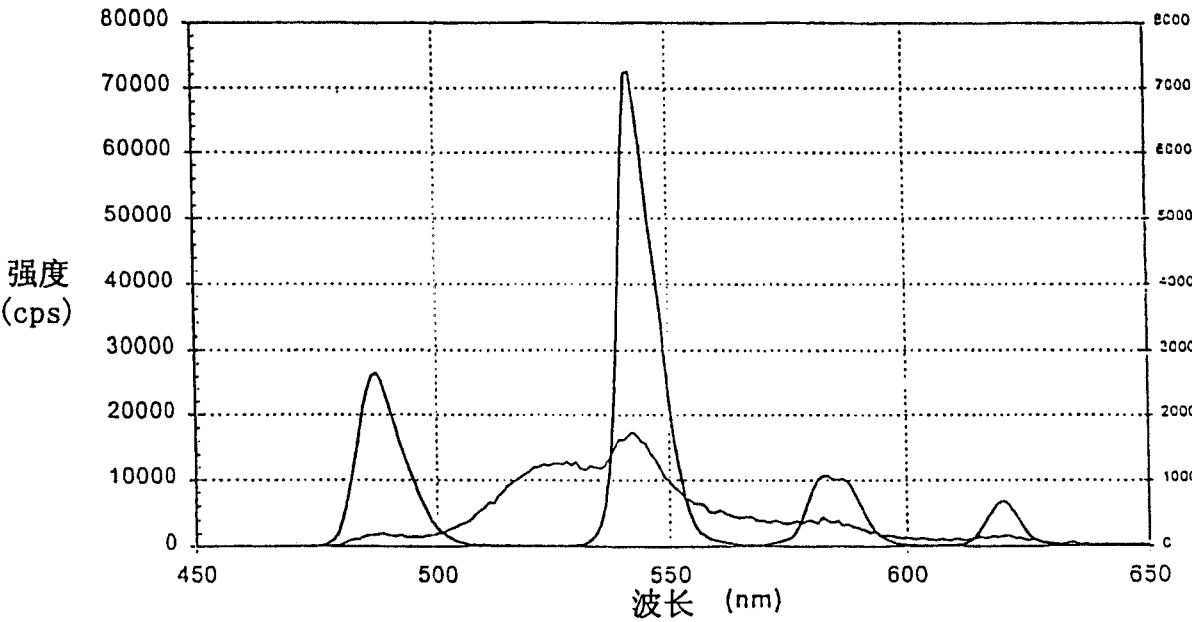


图5a

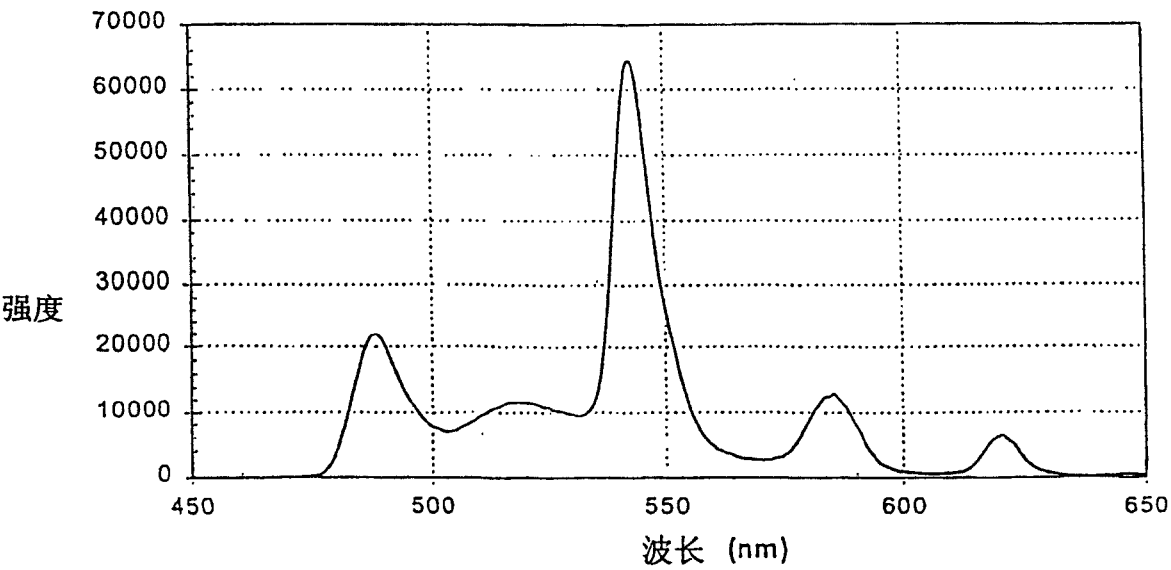


图5b

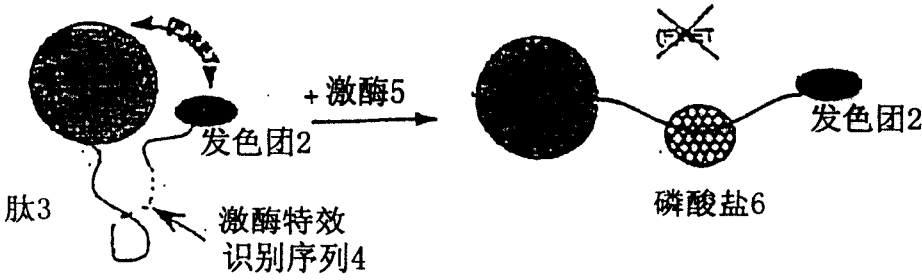


图6a

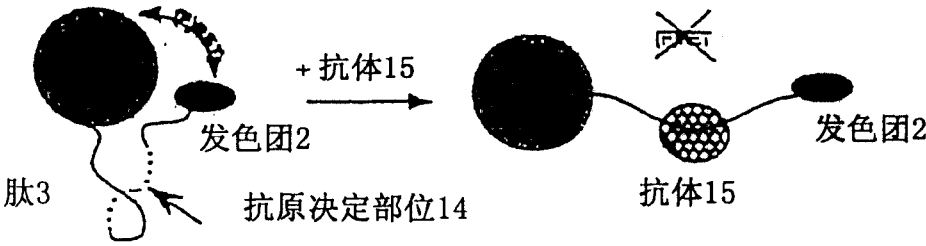


图6b

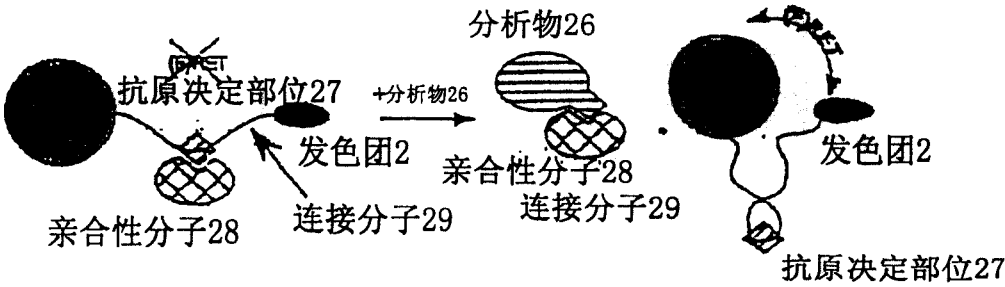


图7

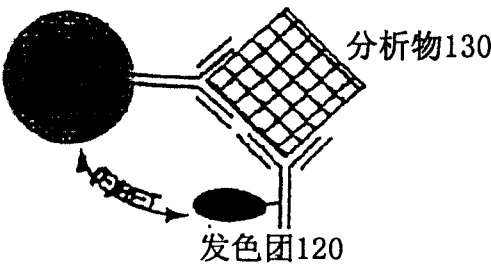


图8

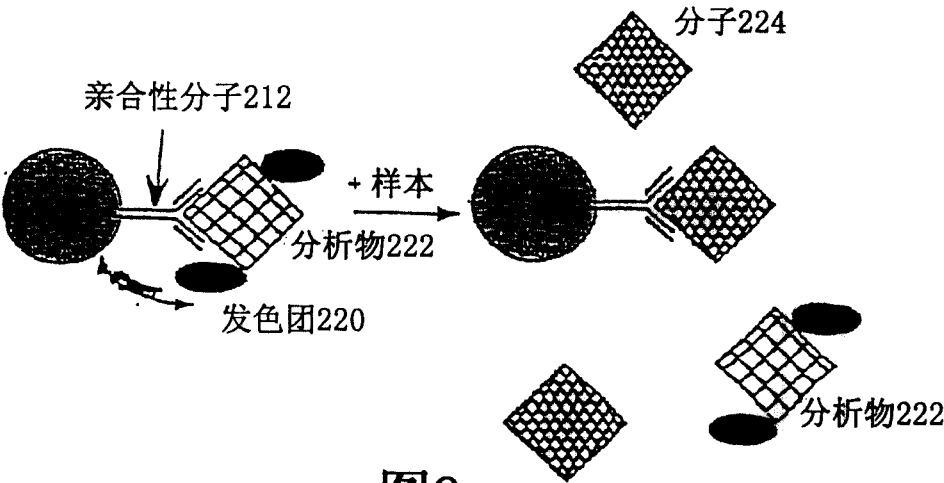


图9

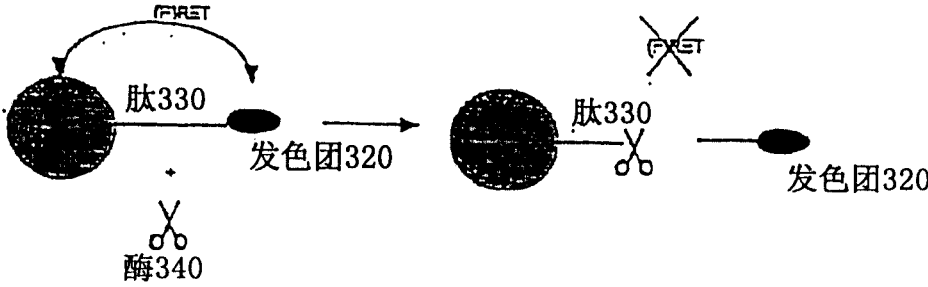


图10

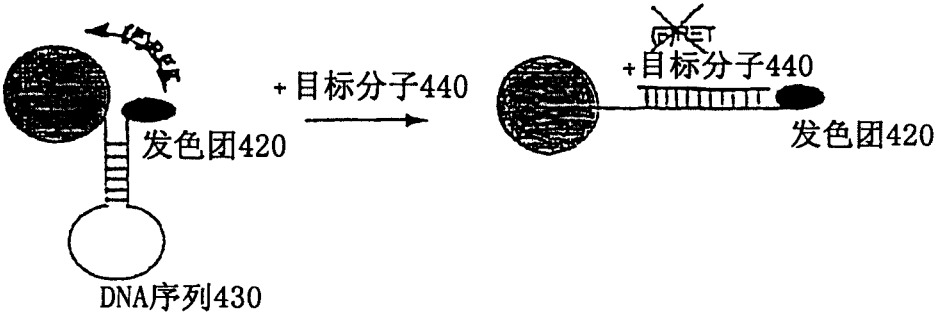


图11