



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104903706 B

(45)授权公告日 2018.12.28

(21)申请号 201380052601.0

(22)申请日 2013.10.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104903706 A

(43)申请公布日 2015.09.09

(30)优先权数据
61/710,851 2012.10.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/063917 2013.10.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/058903 EN 2014.04.17

(73)专利权人 华盛顿大学商业中心
地址 美国华盛顿州

(72)发明人 D·T·邱 孙伟 于江波 吴长锋

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 郭辉 江磊

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

B82B 1/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2011/0014473 A1,2011.01.20,

W0 2011/057295 A2,2011.05.12,

US 2004/0209376 A1,2004.10.21,

US 2011/0130616 A1,2011.06.02,

CN 101616950 A,2009.12.30,

CN 101148495 A,2008.03.26,

Yang-Hsiang等.Hybrid Semiconducting
Polymer Dot-Quantum Dot with Narrow-Band
Emission, Near-Infrared Fluorescence, and
High Brightness.《Journal of the American
Chemical Society》.2012,(第134期),

Yang-Hsiang等.Hybrid Semiconducting
Polymer Dot-Quantum Dot with Narrow-Band
Emission, Near-Infrared Fluorescence, and
High Brightness.《Journal of the American
Chemical Society》.2012,(第134期),

审查员 刘欢

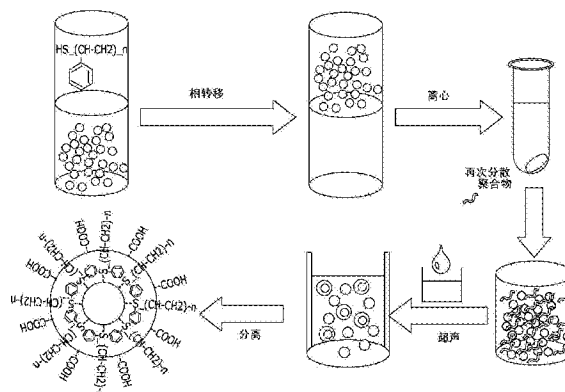
权利要求书2页 说明书14页 附图11页

(54)发明名称

包含金属的半导体聚合物点、它的制备方法
和应用

(57)摘要

本发明提供含金属的(MC)半导体(SC)P点
(MC-SC-P点),其中其具有对细胞成像和操作都
有益的功能。所述P点包括含至少一种金属的至
少一种纳米颗粒,和与纳米颗粒结合的半导体聚
合物。



1. 一种含金属的半导体聚合物点,其包括:
 - (i) 包括金属的纳米颗粒,其中:
 - (a) 所述金属是Au;或
 - (b) 所述纳米颗粒是磁性纳米颗粒且所述金属选自:
Ni、Co、Ga或Fe;或者
Ni、Co、Ga或Fe的氧化物;或
Ni、Co、Ga或Fe的络合物;或
Ni、Co、Ga或Fe的合金;或
下述物质的任何组合:Ni、Co、Ga或Fe, Ni、Co、Ga或Fe的氧化物, Ni、Co、Ga或Fe的络合物,或Ni、Co、Ga或Fe的合金,和
 - (ii) 封装纳米颗粒的半导体聚合物,
其中半导体聚合物是荧光团,并且其中该半导体聚合物包括至少50%体积/体积含金属的半导体聚合物点或其中一组含金属的半导体聚合物点的平均直径为小于80nm。
2. 如权利要求1所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,纳米颗粒由一种金属颗粒组成。
3. 如权利要求2所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,所述一种金属颗粒包括Au或Fe。
4. 如权利要求2所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,所述一种金属颗粒包括 FeO_x ,其中x等于a/b,其中a是1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10,b是1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10。
5. 如权利要求1所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,半导体聚合物形成至少50%体积/体积含金属的半导体聚合物点,以及其中一组含金属的半导体聚合物点的平均直径为小于80nm。
6. 如权利要求1所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,半导体聚合物形成至少80%体积/体积含金属的半导体聚合物点。
7. 如权利要求1所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,纳米颗粒连接到疏水性聚合物以形成疏水性核。
8. 如权利要求1所述的含金属的半导体聚合物点,其特征在于,其吸收波长为350nm-850nm。
9. 一种纳米沉淀权利要求1所述含金属的半导体聚合物点的方法,所述方法包括:
在水性溶液中混合疏水性、相转移的含金属的纳米颗粒以及半导体聚合物,由此将纳米颗粒卡在半导体聚合物基质之内,由此形成含金属的半导体聚合物点。
10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,纳米颗粒由一种金属颗粒组成。
11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,使用蔗糖步进梯度将含金属的半导体聚合物点与空聚合物点分离。
12. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,使用离心将含金属的半导体聚合物点与空聚合物点进一步分离。
13. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,各含金属的半导体聚合物点只包括一种纳米颗粒。
14. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,还包括使纳米颗粒接触甲苯以形成所述疏

水性、相转移的纳米颗粒。

15. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,甲苯包括具有硫醇-封端的官能团的半导体聚合物。

16. 如权利要求14所述的方法,其特征在于,还包括使用离心将所述疏水性、相转移的纳米颗粒与甲苯分离。

17. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述混合借助超声来进行。

18. 如权利要求10所述的方法,其特征在于,在混合时半导体聚合物的浓度比疏水性、相转移的纳米颗粒的浓度高。

19. 一种使用磁性操作目标细胞的方法,所述方法通过将权利要求1所述的含金属的半导体聚合物点和目标细胞结合并在目标细胞的区域施加磁场来操作该目标细胞。

20. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,含金属的半导体聚合物点纳米颗粒由一种金属颗粒组成。

21. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,所述一种金属颗粒包括Fe, Ni, Co, Ga, 它们的氧化物,它们的合金,它们的络合物,它们的组合,以及与非磁性金属的组合和络合物。

22. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述一种金属颗粒包括Fe或其氧化物。

23. 如权利要求21所述的方法,其特征在于,所述一种金属颗粒是 FeO_x ,其中 x 等于 a/b ,其中 a 是1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或10, b 是1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或10。

24. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,所述半导体聚合物包括羧酸封端的聚苯乙烯-聚(乙二醇)聚合物。

25. 如权利要求24所述的方法,其特征在于,所述羧酸封端的聚苯乙烯-聚(乙二醇)聚合物上的羧酸基团与生物活性化合物进行生物共轭。

26. 如权利要求25所述的方法,其特征在于,所述生物活性化合物是链霉亲和素。

27. 如权利要求19所述的方法,其特征在于,所述目标细胞是癌细胞。

包含金属的半导体聚合物点、它的制备方法和应用

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2012年10月8日提交的美国临时专利申请号61/710,851的权益,其全部内容通过引用纳入本文。

发明领域

[0003] 本发明提供包括至少一种金属的半导体聚合物点(P点)、它们的制造方法和应用方法。

[0004] 发明背景

[0005] 聚合物点(P点)最近新兴称为新型荧光纳米探针,其在成像应用中前途光明。与小荧光染料和量子点(Q点)相比,P点具有高亮度、快速发射速率和良好的光稳定性。还可改变P点的尺寸而不大量影响它们的发射光谱,增加了它们在宽范围中的应用。

发明内容

[0006] P点混合物可提供额外的功能,而单独的P点不能提供这些功能。例如,通过下述制备了具有量子点(Q点)嵌入P点的P点混合物(P点-Q点):将用胺基功能化的半导体聚合物共价地连接到Q点的表面。这些P点混合物显示具有高亮度的窄带和近IR荧光发射。陈(Chan)等,J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 7309-7312。

[0007] 除了Q点以外,存在许多其它无机纳米颗粒(NP)和颗粒并可用来制备用于广泛应用的P点-混合物。本发明使用金属来制备含金属的(MC)半导体(SC)P点(MC-SC-P点)。如下文所更加详细描述,各种金属和聚合物可用来实现与这些混合MC-SC-P点相关的有益效果。例如,金(Au)颗粒或包括Au的NP已用于暗场显微镜中长期观察和单一颗粒追踪的对比试剂,因为Au不会发生光褪色。但是,在暗场显微镜中,难以将Au和其它细胞内微米-和纳米-特征区分,它们也强烈的散射光并由此产生类似于Au的信号。本发明的解决了这个问题,在具体实施方式中,在MC-SC-P点中提供Au以提供具有双模成像能力的P点混合物。这样,Au-MC-SC-P点可容易地与其它细胞内特征区分,因为它们可同时产生强烈的暗场和荧光信号。这里,使用荧光来帮助确定真实的Au-MC-SC-P点探针,随后使用暗场利用Au的光学稳定性来实施长期成像。

[0008] 在另一实施例中,金属是铁(Fe)或铁氧化物(FeO_x)。在这些实施方式中,MC-SC-P点可同时用于生物成像和样品制备。例如,用磁铁吸引和浓缩Fe或者 FeO_x -MC-SC-P点;当用UV光激发时,这些混合 FeO_x -MC-SC-P点发射强烈的荧光。可使用永磁铁操作和富集 FeO_x -MC-SC-P点标记的细胞。在一些实施方式中,包含铁氧化物的P点可用于多模成像例如荧光成像和磁共振成像。

[0009] 部分地基于上述,本文所述的是MC-SC-P点,其可用于包括细胞标记和操作(体外和体内)的各种应用。

[0010] 附图简要说明

[0011] 图1显示用于生产本文所述的MC-SC-P点的步骤,其在各P点中具有嵌入的单一金

(Au) 颗粒 (Au-MC-SC-P点)。

[0012] 图2A-C显示将包含Au或FeO_x的P点与空P点分离。(A) 使用具有步进蔗糖梯度的离心的纯化过程的示意性地显示。从蔗糖溶液以上的馏分重新获得的空P点的透射电子显微镜 (TEM) (左边) 和来自管底部馏分的Au-MC-SC-P点的空P点的透射电子显微镜 (TEM) (右边)。插图柱形图显示Au-MC-SC-P点的尺寸分布。平均直径是64nm。(B) 包含单一Au颗粒的MC-SC-P点的TEM图像, 且柱形图显示在各MC-SC-P点中Au颗粒的数目。平均尺寸是28nm。插图柱形图是Au-MC-SC-P点的尺寸分布。(C) FeO_x-MC-SC-P点的TEM图像。平均尺寸是52nm。所用的嵌入在混合P点内侧的FeO_x颗粒的平均直径是40nm。插图柱形图是FeO_x-MC-SC-P点的尺寸分布。标尺条表示50nm。

[0013] 图3A-D显示如本文所述制备的MC-SC-P点的光学表征。(A) 是Au-MC-SC-P点吸收 (吸收) 光谱和 (B) 是Au-MC-SC-P点的发射 (荧光) 光谱。激发波长是380nm, 和SC聚合物是聚(9,9-二辛基芴基-2,7-二基) (PFO)。(B) 是FeO_x-MC-SC-P点的吸收光谱, (D) 是FeO_x-MC-SC-P点的发射光谱。激发波长是457nm, 和SC聚合物是聚[(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)-共聚-(1,4-苯并-{2,1,3}-噻二唑)] (PFBT)。

[0014] 图4A-C显示Au-MC-SC-P点的暗场和荧光显微镜图像。固定在玻璃盖玻片上的Au-MC-SC-P点的 (A) 暗场 (左边) 和 (B) 荧光 (右边) 图像。(C) 细胞内侧的Au-MC-SC-P点的暗场和荧光图像。(i) 整个细胞的暗场图像; (ii) 是 (i) 中红色矩形区域的放大图像; (iii) (ii) 对应的荧光图像。Au-MC-SC-P点和图2所示的那些相同。标尺条表示1微米。

[0015] 图5A-C显示用FeO_x-MC-SC-P点标记的细胞的免疫磁性分离。(A) 使用永磁铁把FeO_x-MC-SC-P点分散于水性溶液中的操作。(B) 示意性地显示将FeO_x-MC-SC-P点生物共轭到链霉亲和素, 用于标记细胞-表面蛋白质, EpCAM。(C) 使用永磁铁免疫磁性分离用FeO_x-MC-SC-P点标记的细胞。右边图像显示分离的细胞。标尺条表示5微米。

[0016] 图6A-B显示合成Au-MC-SC-P点的特征。(A) Au-MC-SC-P点的TEM图像。(B) Au-MC-SC-P点的尺寸柱形图。平均尺寸是6.5nm。标尺条表示20nm。

[0017] 图7A-B显示嵌入磁性NP的PFO-P点 (FeO_x-MC-SC-P点) 的TEM图像。A) 包含10nm磁性NP的FeO_x-MC-SC-P点。B) 包含20nm磁性NP的FeO_x-MC-SC-P点。标尺条表示100nm。

[0018] 详细描述

[0019] 聚合物点 (P点) 最近新兴称为新型荧光纳米探针, 其在成像应用中前途光明。基于P点的混合物可提供额外的功能, 而单独的P点不能提供这些功能。本发明提供含金属的 (MC) 半导体 (SC) P点 (MC-SC-P点), 其中其具有对细胞成像和操作都有益的功能。在具体实施方式中, P点包括含至少一种金属的至少一种NP, 和与NP结合的聚合物。在其他实施方式中, 聚合物基质可环绕NP。在其他具体实施方式中, NP包括下述, 由下述组成或主要由下述组成: 一种金属颗粒。在其他实施方式中, 包括至少一种金属或由一种金属颗粒组成的NP具有疏水性或亲水性聚合物或连接到NP的其它疏水性或亲水性分子以形成MC-SC-P点的“疏水性核”或“亲水性核”。然后, 用其中具有SC聚合物的聚合物基质环绕这种疏水性核或亲水性核。如本文所使用, “环绕”包括完全的包封以及80%包封, 85%包封; 90%包封, 95%包封或99%包封。

[0020] NP、疏水性核或亲水性核以及聚合物基质之间的结合可为通过物理或化学结合的结合。物理结合可源自各种力, 包括但不限于范德华力、静电力、 π -堆积作用力、疏水作用

力、熵力及其组合。化学结合可通过化学键。

[0021] 取决于特定应用,本文所述的多组MC-SC-P点可具有不同平均直径。在具体实施方式中,MC-SC-P点的平均直径为5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、11nm、12nm、13nm、14nm、15nm、16nm、17nm、18nm、19nm、20nm、21nm、22nm、23nm、24nm、25nm、26nm、27nm、28nm、29nm、30nm、31nm、32nm、33nm、34nm、35nm、36nm、37nm、38nm、39nm、40nm、41nm、42nm、43nm、44nm、45nm、46nm、47nm、48nm、49nm、50nm、51nm、52nm、53nm、54nm、55nm、56nm、57nm、58nm、59nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、120nm、140nm、150nm、160nm、180nm、或200nm、平均直径为小于100nm、小于80nm、小于60nm、小于40nm、小于30nm、小于20nm、或小于10nm、平均直径为5nm-100nm、20nm-100nm、20nm-60nm、20nm-40nm、20nm-80nm、40nm-80nm、50nm-80nm、60nm-80nm、70nm-80nm、10nm-40nm、或由这些所列数值限定的任何范围或者在这些所列数值之间的任何范围。

[0022] 如本文所述的MC-SC-P点可包括金属或具有至少一种金属的金属化合物、金属合金,金属盐和/或金属络合物。NP可包括或主要由金属和其它非-金属组分组成,或者可主要由金属颗粒(只有金属)组成或者由金属颗粒(只有金属)组成。金属可包括,但不限于,Na、Li、Zn、Mg、Fe、Mn、Co、Ni、Cu、In、Si、Ga、Al、Pt、Pd、Ru、Rh、Re、Os、Ir、Ag、或Au。此外,还可将氧化物,络合物,和这些金属的组合用于所述MC-SC-P点。在一种实施方式中,把Au用作金属。在另一种实施方式中,把FeO_x用作金属,其中x等于a/b,且其中a是1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10,b是1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10。

[0023] 金属颗粒可为单一金属原子,金属原子簇,金属原子晶格,空间不同的金属原子簇或晶格,或者金属化合物,合金和/或氧化物的簇或晶格(在具体实施方式中,空间不同的簇或晶格)。金属原子簇可包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、50、100、200、500、1,000、10,000、100,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000、100,000,000、1,000,000,000、5,000,000,000、1,000,000,000,000、或更多原子。在一些实施方式中,MC-SC-P点中只包括单一金属颗粒。

[0024] 本文所述的NP可具有连接的疏水性聚合物,连接的亲水性聚合物,或连接的两性聚合物以形成MC-SC-P点的疏水性核,亲水性核或两性核。这些核可有助于制造、排布和/或使用MC-SC-P点。在具体实施方式中,用于连接的疏水性聚合物可包括,但不限于,聚(甲基)丙烯酸酯、聚丙烯酰胺、聚异丁烯、聚二烯、聚亚苯基、聚乙烯、聚交酯、聚苯乙烯、聚硅氧烷、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚氨酯、它们的嵌段共聚物、它们的无规或交替共聚物等。在具体实施方式中,用于连接的亲水性聚合物可包括,但不限于,聚(乙二醇)、聚(乙烯基吡啶)、聚亚烷基二醇、聚(环氧乙烷)、聚丙二醇、聚氧化烯、淀粉、聚碳水化合物、聚唾液酸等。在一个实施方式中,所述亲水性聚合物是聚亚烷基二醇。在更具体的实施方式中,所述亲水性是聚乙二醇(PEG)。

[0025] 使用本文所述的方法制备的MC-SC-P点包括高百分比或含量SC聚合物或半导体聚合物和其它聚合物的共混物以形成聚合物基质,该聚合物基质环绕含金属的NP,疏水性核,亲水性核或两性核。高百分比SC聚合物在需要从所述MC-SC-P点形成高荧光亮度的生物学应用是重要的,因为较高百分比的SC聚合物转变成更亮的MC-SC-P点。

[0026] 例如,在MC-SC-P点中存在的所有聚合物中,SC聚合物存在的百分比可高于10%,高于30%,高于50%,高于80%,高于90%,高于95%,或高于99%体积/体积的MC-SC-P点。

在具体实施方式中,SC聚合物可占MC-SC-P点的40%,50%,60%,70%,80%,90%,95%,或99%体积/体积,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%体积/体积或至少99%体积/体积或50%-80%,40%-90%,或60%-80%体积/体积。在另一种实施方式中,SC聚合物基质可占MC-SC-P点的50%,60%,70%,80%,90%,95%,或99%体积/体积,至少50%,至少60%,至少70%,至少80%,至少90%,至少95%或至少99%体积/体积,50%-80%,50%-90%,或60%-80%体积/体积。SC聚合物或SC聚合物基质的体积/体积百分比还可包括由这些所列数值限定的任何范围或者在这些所列数值之间的任何范围。体积比或百分比(体积/体积)可基于TEM成像或基于动态光散射以获得金属NP相对于MC-SC-P点的平均直径来确认。

[0027] 与P点结合的SC聚合物或SC聚合物和非-SC聚合物的聚合物共混物可定制成满足特定应用,并可制备成疏水性,亲水性或两性。半导体聚合物可源自多种有利特征的特征亮度,包括它们的大吸收横截面、快速的发射速率和高荧光量子产率。半导体聚合物包括聚合物,其包括具有离域 π -电子的结构单元。

[0028] 用于形成聚合物基质的合适的SC聚合物可包括SC均聚合物,包括但不限于:芴聚合物、亚苯基-亚乙烯基聚合物、亚苯基聚合物、亚苯基亚乙炔基聚合物、苯并噻唑聚合物、噻吩聚合物、呋喃芴聚合物、荧光酮(fluorone)聚合物、茈聚合物、罗丹明聚合物、花青(cyanine)聚合物、方酸(squaraine)聚合物、卟啉聚合物、酞菁聚合物、香豆素聚合物、咕吨(xanthene)聚合物、基于硼-二吡咯亚甲基的聚合物、基于金属络合物的聚合物,和它们的衍生物。还可使用所述聚合物的组合或杂聚物。

[0029] 适用于本文所述的MC-SC-P点的SC聚合物的更具体的实施例见下文的表1。

[0030] 表1.SC聚合物的非限制性例子

[0031]

芴聚合物: 聚(9,9-二己基芴基-2,7-二基)(PDHF); 聚(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)(PF0)

基于芴的共聚物: 聚[{9,9-二辛基-2,7-二亚乙烯基-亚芴基}-交替-共聚-{2-甲氧基-5-(2-乙基己基氧)-1,4-亚苯基}](PFPV); 聚[(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)-共聚-(1,4-苯并-{2,1,3}-噻二唑)](PFBT); 聚[(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)-共聚-(4,7-二-2-噻吩基-2,1,3-苯并噻二唑)](PFTBT); 聚[(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)_{0.9}-共聚-(4,7-二-2-噻吩基-2,1,3-苯并噻二唑)_{0.1}](PF-0.1TBT)

亚苯基亚乙烯基聚合物: 聚[2-甲氧基-5-(2-乙基己基氧)-1,4-亚苯基

[0032]

亚乙烯基] (MEH-PPV) ;

亚苯基亚乙炔基聚合物: 聚 (2, 5-二 (3', 7' -二甲基辛基) 亚苯基-1, 4-亚乙炔基 (PPE)

基于硼-二吡咯亚甲基 (BODIPY) 的共聚合物: 聚 [(BODIPY)_{0.02}-芴], 聚 [(BODIPY)_{0.05}-芴], 聚 [(BODIPY)_{0.10}-芴], 聚 [(BODIPY)_{0.25}-芴], 聚 [(BODIPY)_{0.50}-芴]

[0033] 在具体实施方式中, SC聚合物是包括至少两种不同SC单元的共聚物。例如, SC共聚物可同时包括以给定比例存在的芴和苯并噻唑SC单元。用于合成SC共聚物的典型SC单元包括, 但不限于: 芴单元、亚苯基亚乙烯基单元、亚苯基单元、亚苯基亚乙炔基单元、苯并噻唑单元、噻吩单元、呋喃单元、硼-二吡咯亚甲基单元, 和它们的衍生物。不同的SC单元可分段, 如在嵌段共聚物中, 或者掺杂。如本文所使用, SC共聚物通过写出主要SC物质的名称来表示。例如, PFBT是以一定比例包含芴和苯并噻唑单元的SC聚合物。在一些情况下, 短横线用来表示微量SC物质的百分比, 且后面的内容表示微量SC物质的名称。例如, PF-0.1BT是包含90%PF和10%BT的SC共聚物。在另一种实施方式中, SC聚合物是包括至少3、4、5、6、7或更多不同SC单元的共聚物。

[0034] 在其他实施方式中, 可使用SC聚合物的共混物。共混物可包括SC均聚物、共聚物和低聚物的任意组合。可选择用来形成MC-SC-P点的半导体聚合物共混物, 从而调节所得MC-SC-P点的性质, 例如, 来取得所需的MC-SC-P点激发或发射光谱。

[0035] 本文所述的MC-SC-P点可具有特征吸收光谱, 其包括一个或多个吸收峰。在一种实施方式中, P点可具有在下述的吸收峰: 350nm、360nm、370nm、380nm、390nm、400nm、410nm、420nm、430nm、440nm、450nm、460nm、470nm、480nm、490nm、500nm、520nm、525nm、530nm、540nm、550nm、560nm、570nm、580nm、590nm、600nm、610nm、620nm、630nm、640nm、650nm、660nm、670nm、680nm、690nm、700nm、720nm、740nm、750nm、760nm、770nm、780nm、790nm、800nm、810nm、820nm、830nm、840nm、850nm、860nm、520nm-530nm、400nm-640nm、650nm-850nm、350nm-600nm、350nm-850nm、或400nm-600nm。在其他实施方式中, 吸收可在405nm、488nm、532nm、560nm、633nm、和650nm-850nm, 且还可包括由这些所列数值限定的任何范围或者在这些所列数值之间的任何范围。

[0036] 当供应能量时, P点还可发荧光。荧光可在400nm-700nm的可见区波长发生。荧光可在300nm-400nm的近紫外区波长发生。荧光还可在电磁谱的近红外或红外区波长发生。近红外发射指波长为700nm-1500nm的电磁辐射。

[0037] 形成MC-SC-P点的方法

[0038] 为了制备MC-SC-P点, 描述了两种主要方法。一种基于微乳液, 第二种基于纳米沉淀。

[0039] 1. 微乳液形成方法

[0040] 可使用两性表面活性剂分子来形成水互溶的胶束, 其包括疏水性SC聚合物。但是, 根据这种微乳液方法形成的MC-SC-P点包括相当小百分比的荧光SC聚合物 (1.2%-8%聚合

物基质),且它们还可相当大,平均直径或尺寸为120nm-180nm或更大。

[0041] 2.纳米沉淀形成方法

[0042] 比用微乳液方法制备的那些更小的MC-SC-P点是更理想的,因为它们可具有更好的细胞标记和生物分布性质。与微乳液方法相比,用纳米沉淀制备的P点可更小,可易于通过共价地连接共轭到生物分子,例如链霉亲和素。此外,使用纳米沉淀方法,可将多种嵌入的NP减少到单一的一种例如包括、主要由下述或甚至由下述组成的NP:单一金属颗粒。

[0043] 在示例纳米沉淀过程中,在水性溶液中把疏水性、相转移的含金属的NP与至少一种SC聚合物混合以形成MC-SC-P点。

[0044] 相转移的NP可通过使NP接触疏水性溶剂来形成。即,为了把NP从水性环境转移到疏水性溶剂,NP可在本质上为或可制成疏水性,例如,具有疏水性涂层或由疏水性聚合物或分子形成。在一种实施方式中,NP可与疏水性、反应性化合物反应,来涂覆NP的表面,从而将它分割进入疏水性溶剂。这种疏水性、反应性化合物可为具有硫醇-封端的官能团的SC聚合物。这种聚合物可为但不限于:硫醇-封端的聚苯乙烯、硫醇-封端的聚(乙烯基吡咯烷酮)、硫醇-封端的聚(4-乙烯基吡啶)或硫醇-封端的聚(丁二烯)。

[0045] 一旦将NP表面变成疏水性,它们可均匀地分散于疏水性溶剂中。合适的疏水性溶剂包括,但不限于,醚、甲苯、四氢呋喃(THF)、甲烷、丁烷、丙烷、戊烷、己烷等。在一个实施方式中,溶剂可为甲苯。

[0046] 一旦相转移,可在水性环境中将NP与SC聚合物混合。这种混合可使用物理方法来实现,例如搅拌棒、涡旋、超声等。在一个实施方式中,混合是通过超声。

[0047] 为了适当地形成MC-SC-P点,提供的SC聚合物的浓度可大于NP的浓度SC聚合物和NP的比例可为但不限于,1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、大于1:1、大于2:1、大于3:1、大于4:1、或大于5:1。

[0048] 在一些情况下,可通过形成空P点或者不含至少一种NP的P点,来实现形成MC-SC-P点。可使用步进梯度例如蔗糖步进梯度或者任何其它合适的步进梯度,把所述包括至少一种NP的MC-SC-P点与空P点分离。还可使用离心把所述MC-SC-P点与空P点分离。在一些实施方式中,可同时使用步进梯度步骤和离心步骤,把MC-SC-P点与空P点分离。

[0049] Au-MC-SC-P点和FeO_x-MC-SC-P点的形成&描述

[0050] 提供形成Au-MC-SC-P点和FeO_x-MC-SC-P点,作为如上所述的方法更具体的示例。通常,首先在水性溶液中合成Au-NP,然后通过硫醇-封端的聚苯乙烯辅助地相转移进入甲苯在表面上修饰变成疏水性。相转移之后,离心上层甲苯溶液来收集疏水性Au-NP。把NP小块与疏水性SC聚合物一起,在THF中再次分散。然后,在超声时将THF溶液注入纯水中来制备Au-MC-SC-P点(图1)。

[0051] 在其他实施方式中,可购买FeO_x-NP,其已具有疏水性表面且良好分散于甲苯中。因此,可直接离心NP,并将在TFT中再次分散它和SC聚合物。

[0052] 为了帮助确保溶液中存在的所有Au和/或FeO_x-NP包封在P点之内,通常将溶液中SC聚合物的浓度保持高于NP的浓度。因为Au-MC-SC-P点和FeO_x-MC-SC-P点的密度比空P点大得多,所以可将它们与空P点分离。图2A显示了纯化过程,其中使用了蔗糖步进梯度。较重的MC-SC-P点穿透蔗糖层并沉淀到离心管的底部,而较轻的空P点仍然在蔗糖层上面。

[0053] 图2A还显示了蔗糖层上方的溶液重新获取的、以及在离心管底部获得的P点的透

射电子显微镜 (TEM) 图像。在 TEM 图像中, 在小块中没有观察到空 P 点, 或者在顶部馏分中观察到任何 Au-MC-SC-P 点。这个结果表明成功地将 Au-MC-SC-P 点从空 P 点提纯, 且产率几乎为 100%。在其他实施方式中, 大于 80%, 大于 85%, 大于 90%, 大于 95%, 大于 96%, 大于 97%, 大于 98%, 或大于 99% 的产率可为可接受的。在一种实施方式中, 使用高浓度的 Au-NP, 这导致大的 P 点 (直径为 64nm) 并包括多个 Au-NP。

[0054] 当降低嵌入的 Au-NP 数目时, 还可进一步减小 Au-MC-SC-P 点的尺寸。例如, 当初次加入的 Au-NP 的浓度足够地时, 每个 P 点占据的 Au-NP 降低。制备了只包含单一 Au-NP 的 P 点 (见图 2B)。单一占据的 Au-MC-SC-P 点的所测平均尺寸为 28nm。如本文所述, 可取得其它平均尺寸。用于制备具有单一包封 NP 的 P 点的这种策略, 对 FeO_x -MC-SC-P 点 (见图 2C) 也适用。

[0055] 还可表征 Au-MC-SC-P 点和 FeO_x -MC-SC-P 点混合物的光学性质。Au-MC-SC-P 点的吸收光谱在 525nm 处有新的峰, 这与纯 PFOP 点获得的峰不同 (图 3A)。这个新的峰来自 Au-NP 的特征定域表面等离子体共振 (LSPR)。与分散于水中的纯 Au-NP 相比, Au-MC-SC-P 点的 LSPR 峰稍微红移。据信, 这种红移是由 Au-MC-SC-P 点和绕着 Au-MC-SC-P 点局部环境改变之间的紧密靠近造成的, 因为 P 点的折射率比水高。Au-MC-SC-P 点和纯 PFOP 点的发射光谱也类似。如图 3B 所示, 因为 FeO_x -NP 的宽带吸收 FeO_x -MC-SC-P 点的吸收峰稍微宽化, SC 聚合物的荧光发射光谱的形状不受 FeO_x -NP 影响。

[0056] MC-SC-P 点中的 NP 潜在地淬灭 MC-SC-P 点的荧光。为了测定这种潜在问题的程度, 可测量不同 MC-SC-P 点的量子产率 (QY) 值。纯 PFOP 点的 QY 值是 37%; 具有多个 Au-NP 的 Au-MC-SC-P 点的 QY 值是 7%。当把每个 MC-SC-P 点的 Au-NP 数目降低到 1 时, MC-SC-P 点的 QY 增加到 18%。考虑到各 MC-SC-P 点可比 Q 点亮 30 倍的事实, QY 增加 2-5 倍是可管理的。还应指出, 如本文所述制备的 MC-SC-P 点的荧光团密度显著高于用微乳液方法制备的 MC-SC-P 点的。例如, 本文所述的 MC-SC-P 点, 90% (10 份 SC 聚合物, 1 份 PS-PEG-COOH) 的聚合物基质是荧光 SC 聚合物。因此, 使用所述纳米沉淀方法制备的 MC-SC-P 点保留了许多它们的有利的光学特征。

[0057] 所述方法可用于形成其它 MC-SC-P 点, 用于形成其它多功能 MC-SC-P 点探针。在一种实施方式中, 这些方法可制备具有下述组成的 MC-SC-P 点: 其包括高百分比或含量的荧光 SC 聚合物, 这进而导致高亮的 MC-SC-P 点。

[0058] 示例性 MC-SC-P 点应用和相关考虑

[0059] 本文所述的 MC-SC-P 点可用于许多不同的诊断情况和/或治疗过程。在一实施例中, 可将 Au-MC-SC-P 点用于双模态成像, 其中使用来自 Au-MC-SC-P 点的荧光的共定位和来自 Au 的散射, 来确定 Au-MC-SC-P 点探针, 用于下游的单一颗粒追踪和细胞成像。

[0060] 在其他实施方式中, 披露了使用磁性操控目标细胞的方法。在这实施方式中, 把磁性 NP 嵌入到 MC-SC-P 点中, 并将 P 点与目标细胞结合。应用磁场可操控目标细胞。操控可包括, 但不限于: 吸引、分离、排斥、定位、纯化、转移等。在具体实施方式中, 磁性 NP 可包括 Fe, Ni, Co, Ga, 它们的氧化物, 它们的络合物, 它们的组合以及与非磁性金属的络合物。在一种实施方式中, 金属颗粒是 FeO_x , 其中 x 等于 a/b, 其中 a 是 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10, b 是 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或 10。

[0061] 为了使 P 点变得能连接到目标细胞或其它物质, P 点可首先用合适的聚合物涂覆或可包括合适的聚合物基质。合适的聚合物涂层或聚合物基质可包括端基易于与目标分子反

应的聚合物。在一种实施方式中,用来形成聚合物基质的聚合物可包括所涉封端的聚合物例如聚苯乙烯-聚(乙二醇)。

[0062] 一旦P点具有活性表面例如具有游离的羧酸基团,可连接生物活性的目标分子。生物活性的化合物可根据具体目标细胞,细胞系,或物质来定制。例如,生物活性的化合物可为链霉亲和素,其可靶向和连接到癌细胞。

[0063] 一旦连接到目标细胞,细胞系或物质,可施加磁场来移动或以其它方式操控目标细胞,细胞系,或物质到远离它原始位置的位置,其中在具体实施方式中,可将它与体或其它囊泡分离或以其它方式去除。

[0064] 具体来说,对于 FeO_x -MC-SC-P点,可制备各种尺寸的具有磁性NP的 FeO_x -MC-SC-P点。制备 FeO_x -MC-SC-P点时,将高分子量聚合物PS-PEG-COOH共混进入混合P点。MC-SC-P点表面的羧酸基团使得能方便地与链霉亲和素生物共轭。然后,目标细胞系生物共轭的 FeO_x -MC-SC-P点共轭,由此标记细胞。然后,将标记的细胞连接到磁铁。因此,在本文所述的实施方式中,在样品制备中使用 FeO_x -MC-SC-P点,其中用外部磁铁分离 FeO_x -MC-SC-P点标记的细胞。还可基于 FeO_x -MC-SC-P点的强度荧光,检测和成像细胞。

[0065] 考虑到基于本发明的方法可开发更强的磁铁和磁性NP,可进一步提高细胞分离效率。

[0066] 示例性实施方式:

[0067] 1.一种含金属的(MC)半导体(SC)聚合物点(P点),其包括下述、主要由下述组成或者由下述组成:

[0068] (i) 包括金属的纳米颗粒(NP)和

[0069] (ii) 与NP结合的SC聚合物,

[0070] 其中SC聚合物包括至少50%体积/体积MC-SC-P点或其中一组MC-SC-P点的平均直径为小于80nm。

[0071] 2.如实施方式1所述的MC-SC-P点,其特征在于,所述NP基本由一种金属颗粒组成,或者由一种金属颗粒组成。

[0072] 3.如实施方式1或2所述的MC-SC-P点,其特征在于,所述金属或者一种金属颗粒包括下述,主要由下述或由下述组成:Na、Li、Zn、Mg、Fe、Mn、Co、Ni、Cu、In、Si、Ga、Al、Pt、Pd、Ru、Rh、Re、Os、Ir、Ag、Au、它们的氧化物,它们的络合物,它们的合金或者它们的组合。

[0073] 4.如实施方式1、2或3所述的MC-SC-P点,其特征在于,所述金属或一种金属颗粒包括下述、主要由下述或由下述组成: Au或Fe。

[0074] 5.如实施方式1、2或3所述的MC-SC-P点,其特征在于,所述金属或一种金属颗粒包括下述、主要由下述或由下述组成: FeO_x , 其中x等于a/b, 其中a是1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或10, b是1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 或10。

[0075] 6.如实施方式1, 2, 3, 4或5所述的MC-SC-P点,其特征在于,所述SC聚合物形成至少50%体积/体积MC-SC-P点,以及其中一组MC-SC-P点的平均直径为小于80nm。

[0076] 7.如实施方式1, 2, 3, 4, 5或6所述的MC-SC-P点,其特征在于,SC聚合物形成至少约80%体积/体积MC-SC-P点。

[0077] 8.如实施方式1, 2, 3, 4, 5, 6或7所述的MC-SC-P点,其特征在于,NP连接到疏水性聚合物以形成疏水性核。

[0078] 9.如实施方式1,2,3,4,5,6,7或8所述的MC-SC-P点,其特征在于,其吸收波长为350nm-850nm。

[0079] 10.一种纳米沉淀如实施方式1,2,3,4,5,6,7,8或9所述MC-SC-P点的方法,所述方法包括下述、主要由下述或甚至由下述组成:

[0080] 在水性溶液中混合疏水性、相转移的含金属的NP以及SC聚合物,由此将NP卡在SC聚合物基质之内,由此形成MC-SC-P点。

[0081] 11.如实施方式10所述的方法,其特征在于,所述NP主要由一种金属颗粒组成或者由一种金属颗粒组成。

[0082] 12.如实施方式10或11所述的方法,其特征在于,使用蔗糖步进梯度将MC-SC-P点与空P点分离。

[0083] 13.如实施方式12所述的方法,其特征在于,还使用离心将MC-SC-P点与空P点分离。

[0084] 14.如实施方式10,11,12或13所述的方法,其特征在于,各MC-SC-P点包括下述、主要由下述或由下述组成:一种NP。

[0085] 15.如实施方式10,11,12或13所述的方法,其特征在于,还包括使NP接触甲苯以形成所述疏水性、相转移的NP。

[0086] 16.如实施方式15所述的方法,其特征在于,甲苯包括具有硫醇-封端的官能团的半导体聚合物。

[0087] 17.如实施方式15或16所述的方法,其特征在于,还包括下述、主要由下述或甚至由下述组成:使用离心将所述疏水性、相转移的NP与甲苯分离。

[0088] 18.如实施方式10,11,12,13,14,15,或16所述的方法,其特征在于,所述混合借助超声来进行。

[0089] 19.如实施方式10,11,12,13,14,15,16或17所述的方法,其特征在于,在混合时SC聚合物的浓度比疏水性、相转移的NP的浓度高。

[0090] 20.一种使用磁性操作目标细胞的方法,所述方法通过将如实施方式1,2,3,4,5,6,7,8或9所述的MC-SC-P点和目标细胞结合并在目标细胞的区域施加磁场来操作该目标细胞。

[0091] 21.如实施方式20所述的方法,其特征在于,所述MC-SC-P点NP主要由一种金属颗粒组成或者由一种金属颗粒组成。

[0092] 22.如实施方式20或21所述的方法,其特征在于,所述金属或一种金属颗粒包括下述、主要由下述或由下述组成:Fe,Ni,Co,Ga,它们的氧化物,它们的合金,它们的络合物,它们的组合,以及与非磁性金属的组合和络合物。

[0093] 23.如实施方式20、21或22所述的方法,其特征在于,所述金属或一种金属颗粒包括下述、主要由下述或由下述组成:Fe或者它的氧化物。

[0094] 24.如实施方式20、21或22所述的方法,其特征在于,所述一种金属颗粒包括下述、主要由下述或由下述组成: FeO_x ,其中x等于a/b,其中a是1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10,b是1,2,3,4,5,6,7,8,9,或10。

[0095] 25.如实施方式20,21,22,23或24所述的方法,其特征在于,所述SC聚合物包括羧酸封端的聚苯乙烯-聚(乙二醇)聚合物。

[0096] 26.如实施方式25所述的方法,其特征在于,所述羧酸封端的聚苯乙烯-聚(乙二醇)聚合物上的羧酸基团与生物活性化合物进行生物共轭。

[0097] 27.如实施方式20,21,22,23,24,25或26所述的方法,其特征在于,所述生物活性的化合物是链霉亲和素。

[0098] 28.如实施方式27所述的方法,其特征在于,所述目标细胞是癌细胞。

实施例

[0099] 1.材料

[0100] 用二甲基苯基封端的聚(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)(PF0,MW120000Da),和聚[(9,9-二辛基芴基-2,7-二基)-共聚-(1,4-苯并-(2,10,3)-噻二唑)](PFBT,MW 157000 Da)购自美国染料来源公司(American Dye Source Inc.)(加拿大魁北克)。硫醇-封端的聚苯乙烯(PSSH,MW 1000Da)购自聚合物来源公司(Polymer Source Inc.)(加拿大魁北克)。四氯金酸氢(HAuCl_4),硼氢化钠(NaBH_4),碳酸钾(K_2CO_3),1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳化二亚胺盐酸盐(EDC),和磁性NP(10nm,20nm平均尺寸,甲苯中5mg/mL)获自西格玛(Sigma)(密苏里州圣路易斯市)。磁性NP(40nm平均尺寸,油酸涂覆,氯仿中25mg/mL)购自海洋纳米技术公司(Ocean NanoTech)(阿肯色州斯普林代尔)。用羧基功能化的聚苯乙烯-接枝的环氧乙烷(PS-PEG-COOH;MW 21,700 Da的PS部分;1200 Da的PEG-COOH;多分散性,1.25)购自聚合物来源公司(Polymer Source Inc.)(加拿大魁北克)。蔗糖购自阿凡达性能材料公司(Avantor Performance Materials)(新泽西州菲利普斯堡)。

[0101] 2.合成Au-NP

[0102] 向冰浴中的100mL密立Q(MilliQ)水中加入4mL的1.0%四氯金酸氢(HAuCl_4)水性溶液和1.3mL的0.2M K_2CO_3 。剧烈搅拌溶液,然后添加1.0mL的1.54mg/mL硼氢化钠溶液(保持在冰浴中)。将该步骤重复5次(共计5毫升)。然后,将溶液在4℃下搅拌过夜。

[0103] 3.制备Au-MC-SC-P点

[0104] 向含1mg/mL PSSH的4-mL甲苯加入2mL的AuNP溶液并混合。在剧烈摇晃之后,将混合物置于台子上,并允许相分离。在AuNP相转移到上层甲苯溶液之后,丢弃底部的水溶液。添加无水硫酸钠来干燥甲苯。然后,在14000rpm下将含Au-NP的甲苯溶液离心40分钟。将小块在2毫升的四氢呋喃(THF)中再次分散。把500 μL 的1mg/mL PF0和50 μL 的1mg/mL PS-PEG-COOH溶液添加到含Au-NP的THF溶液。添加额外量的THF,把最终体积调节为5毫升。然后,在强烈声波处理下,将5毫升的混合物快速注射到10mL的MilliQ水中。通过在90℃下向溶液中鼓入氮气去除THF。然后,将不含THF的P点超声1-2分钟,并通过0.2微米的纤维素膜过滤器进行过滤。

[0105] 4.纯化Au-MC-SC-P点

[0106] 向离心管加入1.5mL的1.5M蔗糖-水性溶液,然后将如上所述制备的2mL的Au-MC-SC-P点溶液置于蔗糖层顶部。把离心管放入贝克曼(Beckman)Optima™Max-E超离心机并在45000rpm下旋转45分钟。收集蔗糖层以上的溶液,并标记为“纯P点”。在超声下,把蔗糖层底部形成的小块再次分散于2毫升的水中,并标记为“Au-NP-P点”。用动态光散射(DLS)光谱仪测量Au-NP-P点的流体动力学直径(马尔文(Malvern)Zetasizer Nano ZS,英国伍斯特郡)。使用积分球(型号C9920-02,滨松光子公司(Hamamatsu Photonics))收集荧光量子产率,激

发光来自150WCW氙灯。分别使用DU720扫描光谱仪(贝克曼库尔特公司(Beckman Coulter, Inc.)加利福尼亚)和Fluorolog-3荧光光谱仪(霍力巴约宾凡公司(HORIBA JobinYvon),新泽西州)测定Au-MC-SC-P点的吸收光谱和荧光光谱。

[0107] 5. Au-NP-PFOP点的暗场和荧光显微镜成像

[0108] 为了对在盖玻片上的Au-NP-P点进行成像,将一滴包含Au-NP-P点的溶液置于透明的盖玻片上,其表面用(3-氨基丙基)三乙氧基硅烷(APTES)进行修饰。为了对细胞内的Au-NP-P点进行成像,步骤如下:当培养瓶中的HeLa细胞聚集达到合适的浓度,通过简单地用培养基淋洗然后与3mL的胰蛋白酶-EDTA溶液(0.25%重量/体积胰蛋白酶,0.53mM EDTA)在37℃培养5分钟,来从培养瓶收集细胞。完全分离后,淋洗细胞,离心并在培养基中再次悬浮。将100微升的悬浮细胞溶液置于有盖培养皿的干净的玻璃盖玻片顶部。将盖玻片在细胞培养箱中放置1小时,以使细胞连接到玻璃表面。然后,向有盖培养皿添加1.5毫升的细胞培养基以浸没盖玻片。将有盖培养皿在细胞培养箱中放置1天。然后,将合适量的Au-NP-P点溶液添加到有盖培养皿,并将细胞培养约4小时。然后,将玻璃盖玻片在三聚乙醛溶液中放置15分钟,从而在实施显微镜实验之前固定细胞。使用尼康(Nikon) TE2000倒置显微镜来成像。当显微镜在暗场模式下操作时,安装数值孔径(NA) 1.3的油冷凝器和具有可调NA(0.7-1.3)的100倍物镜。使用100W卤素灯作为光源。当显微镜在外荧光(epi-fluorescence)模式下操作时,使用405-nm作为激发光源,使用410-nm二向色镜和460/80nm带通过滤器来过滤来自P点的荧光发射。暗场和荧光图像都使用Prosilica照相机(GC1380和GC660,马萨诸塞州纽波里波特市)来拍摄。

[0109] 为了测试Au-NP-P点是否能用作暗场和荧光显微镜的双模成像探针,使用装配了暗场光学器件的荧光显微镜对它们进行成像。对单个Au-NP-P点进行成像,在暗场和荧光模式下都具有优异的信噪比(图4A)。在两个图像中所有Au-NP-P点的位置都是对应的。还对在代表更加复杂环境的哺乳动物细胞中的Au-NP-P点进行成像(图4B)。在暗场模式下,许多细胞的细胞器也强烈地散射光,使得难以将它们与Au-NP区分。当切换到荧光模式时,亮点的数目下降(图4B)。在荧光图像中的每一个亮点,都在暗场图像中具有相应的亮点。考虑到只有Au-NP-P点能同时产生强的荧光和散射信号,我们能精确地找到暗场图像中出现的亮点中来自Au-NP-P点的6个点(用箭头表示)。因为在正常暗场显微镜的照射光下,共轭的聚合物不侵蚀或损害Au-NP, Au-NP的暗场散射光稳定性不应变化。因为Au-NP不会光褪色,它们适于在暗场模式的长期颗粒追踪和成像;来自P点的荧光有助于将这些P点纳米复合材料和散射光的其它纳米尺度的细胞特征区分开。

[0110] 6. 制备FeO_x-MC-SC-P点

[0111] 将两毫升在有机溶剂中的磁性NP在14,000rpm下旋转适当的时间(10-nm和20-nm磁性NP为1小时,40-nm磁性NP为15分钟)。在超声下,于含PFBT和PS-PEG-COOH的THF中再次分散小块。然后以与Au-NP相同的方式,处理溶液。通过蔗糖梯度浓度法,将含磁性NP的P点与纯P点分离。

[0112] 7. 链霉亲和素和FeO_x-MC-SC-P点的共轭

[0113] 在共轭反应中,将80μL的聚乙二醇(5%重量/体积PEG, MW3350)和80μL的HEPES缓冲液(1M, PH7.3)添加到4mL的Fe₃O₄-MC-SC-P点溶液。然后,将链霉亲和素(1mg/mL, 30μL)添加到溶液并良好混合。

[0114] 然后,将80 μ L的新鲜配置的EDC溶液(5mg/mL,在密立Q(MilliQ)水中)添加到溶液。把上述混合物室温下搅拌4小时。用(100K MW)吸附柱浓缩所得P点共轭物,并用Bio-Rad Econo-Pac 10DG柱(赫拉克勒斯(Hercules),加利福尼亚)纯化。纯化之后,添加适当量的牛血清蛋白(BSA),使得最终浓度为1%(重量/重量)。

[0115] 8.制备用于链霉亲和素共轭的FeO_x-MC-SC-P点进行实验的细胞培养

[0116] 人宫颈癌细胞系(Hela)和乳癌细胞系(MCF-7)订购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC)[美国弗吉尼亚州马纳萨斯市(Manassas, VA, USA)]。37℃下在5%CO₂中,用添加了10%牛血清蛋白(FBS)和1%Pen Strep(5000单位/mL盘尼西林G,50 μ g/mL链霉亲和素硫酸盐,在0.85%NaCl中)的Eagles最低主要培养基培养细胞。在实验之前预培养细胞,直至达到聚集。通过简单地用培养基淋洗然后与3mL的胰蛋白酶-EDTA溶液(0.25%重量/体积胰蛋白酶,0.53mM EDTA)在37℃培养5分钟,来从培养瓶收集细胞。完全分离后,淋洗细胞,离心并在培养基中再次悬浮。借助显微镜,利用血细胞计数器测定细胞浓度。

[0117] 9.用FeO_x-NP-PFBTP点进行细胞标记

[0118] 为了用IgG共轭物标记细胞表面,将在100- μ L标记缓冲液(1 $\times$ PBS,2mMEDTA,1%BSA)中的百万MCF-7细胞与0.3 μ L的0.5mg/mL生物素化主抗-人体CD326EpCAM抗体(e-生物科学公司(eBioScience),加利福尼亚圣迭戈)在旋转振动器上于暗中和室温下培养30分钟,然后使用标记缓冲液进行洗涤步骤。然后,用在BlockAid™阻断缓冲液(英杰(Invitrogen),俄勒冈州尤金市)中的链霉亲和素共轭的P点与细胞在暗中和室温下培育30分钟,然后使用标记缓冲液进行两个洗涤步骤。然后,通过把在500 μ L固定缓冲液(1 $\times$ PBS,2mMEDTA,1%BSA,1%多聚甲醛)中离心获得的细胞小块进行溶解来固定细胞。

[0119] 10.用FeO_x-NP-PFBT P点进行细胞成像

[0120] 使用尼康(Nikon)TE2000倒置显微镜来成像。当显微镜在相差干扰(DIC)模式下操作时,安装数值孔径(NA)1.3的油冷凝器、具有NA1.4的100倍物镜、两个极化器和诺马斯基(Nomarski)棱镜。使用100W卤素灯作为光源。当显微镜在外荧光(epi-fluorescence)模式下操作时,使用488-nm作为激发光源,使用505-nm二向色镜和550/60nm带通过滤器来过滤来自P点的荧光发射。DIC和荧光图像都使用Prosilica照相机(GC1380和GC660,马萨诸塞州纽波里波特市)来拍摄。

[0121] 11.MC-SC-P点和磁性

[0122] 对于FeO_x-MC-SC-P点,测试了它们在生物成像和样品制备中的潜在应用。成功的制备了包括具有不同尺寸的磁性NP(10nm,20nm和40nm)(见图7)的FeO_x-MC-SC-P点。用磁铁吸引和浓缩这些FeO_x-MC-SC-P点;当用UV光激发时,这些混合FeO_x-MC-SC-P点发射强烈的荧光。制备FeO_x-MC-SC-P点时,将高分子量聚合物PS-PEG-COOH共混进入混合P点。FeO_x-MC-SC-P点表面上的羧酸基团使得能通过样品EDC反应(图5B)促进与链霉亲和素的生物共轭。然后用链霉亲和素-共轭的FeO_x-MC-SC-P点对抗EpCAM的生物素化主抗体(通常用于分离循环肿瘤细胞的细胞表面蛋白)标记MCF-7。可使用永磁铁操作和富集FeO_x-MC-SC-P点标记的细胞(图5C)。在图5C中,可知大多数标记的细胞成功的吸引到磁铁。考虑到可使用更强的磁铁和磁性NP,如有需要,可进一步概述细胞分离效率。为了进一步确认用磁铁浓缩的细胞具有FeO_x-MC-SC-P点,使用荧光显微镜对分离的细胞进行成像,这确认在细胞表面上存在

FeO_x-MC-SC-P点(图5C)。这样,FeO_x-MC-SC-P点可用于富集和分离细胞,类似于将FeO_x-NP用于免疫-标记分离,以及通过利用来自P点的强烈荧光信号可用于细胞成像和检测。

[0123] 如本领域普通技术人员所理解,本文所述的各实施方式可包括下述、主要由下述组成或者由下述组成:它的所述特定元件、步骤、成分或组分。如本文所使用,过渡术语“包括”或者“包含”指包括,但不限于,且允许包含未具体化的元件、步骤、成分或组分,甚至大量包含。过渡词语“由……组成”排除了未具体化的任何元件、步骤、成分或组分。过渡词语“主要由……组成”将实施方式的范围限定到具体化的任何元件、步骤、成分或组分以及不实质性影响实施方式的那些。如本文所使用,实质性影响将负面影响MC-SC-P点在细胞成像或操作的功能应用,或者在制备过程中将制备显著更不适用于细胞成像或操作的MC-SC-P点。如本文所使用,“显著更不适于”指P点的细胞成像或操作性能中存在统计学显著差异。

[0124] 除非另有说明,否则本说明书和权利要求书所用的表示各成分含量、诸如分子量等性质、反应条件等等的所有数值应理解为在所有情况下均被术语“约”修饰。因此,除非另有说明,否则,在本说明书和权利要求书中所用的数值参数是约数,可根据本发明希望实现的理想性质而变化。并非试图限制等同原则应用于权利要求的范围,最起码的,每个数值参数至少应根据所记录的有效数字的位数并考虑到运用了常用的取整规则进行解释。当需要更加清楚时,术语“约”与数值或范围联用时具有本领域普通技术人员归于它的合理的含义,即表示大于或小于所述数值或范围,在下述范围:±20%所述数值;±19%所述数值;±18%所述数值;±17%所述数值;±16%所述数值;±15%所述数值;±14%所述数值;±13%所述数值;±12%所述数值;±11%所述数值;±10%所述数值;±9%所述数值;±8%所述数值;±7%所述数值;±6%所述数值;±5%所述数值;±4%所述数值;±3%所述数值;±2%所述数值;或±1%所述数值

[0125] 虽然限定本发明宽泛范围的数值范围和参数是近似值,但是具体实施例中列出的数值是尽可能准确记录的。然而,任何数值不可避免地包含由其各自的测量过程中存在的标准偏差所必然造成的某些误差。

[0126] 描述本发明的内容时使用的术语“一个”、“一种”、“该”等类似表达(尤其在权利要求书的内容中)应解释为涵盖单数和复数,除非另有说明或者清楚指出相反。本文中对数值范围的引用仅仅是一种速记方法,单独表示落在该范围内的各个独立的值。除非另有说明,否则,各个独立的值包括在说明书范围内,如同它们被单独引用。所有本文所述的方法可以任何合适的顺序进行,除非另有说明或者清楚指出相反。本文涉及的任何和所有实施例,或者示例性的语言(例如,“例如”)的使用仅仅是为了更好地阐述本发明,而不是对本发明范围的限制。说明书中的所有语言都不应解释为指示对本发明实践所必需的非要求的元素。

[0127] 本文所述本发明可选的要素或实施方式的分组不应解释为限制性的。各组成员分别单独表示或要求,或者与本文所述的其他组成员或其他要素形成任意组合。预计出于便利和/或专利性的原因,组中可以包括或者删除一个或多个成员。在发生任何这种包括或者删除时,认为说明书包括经修饰的组,因而满足所附权利要求书中使用的所有马库什组(Markush group)的书写描述。

[0128] 本文描述了本发明的某些实施方式,包括本发明人己知的实施本发明所需的最佳模式。当然,阅读以上说明书后,所述实施方式的变型将是本领域普通技术人员所明白的。本发明人预期,普通技术人员将适当地利用这些变型,本发明人旨在使本发明在本文具体

描述之外以其他方式进行实施。因此,根据申请原则,本发明包括所附权利要求书所涉及主题的所有改进和等同形式。而且,所有可能的变型中上述要素的任意组合包括在本发明范围内,除非另有说明或者清楚指出相反。

[0129] 而且,整篇说明书可参考专利和印刷出版物等许多参考文献。上述参考文献和印刷出版物各自的全部内容分别包括在此作为参考。

[0130] 最后,应该理解,本文所述本发明的实施方式仅仅是对本发明原理的举例。可采用的其他改进也包括在本发明的范围内。因此,举例而非限制性地,根据本文内容可采用本发明的可选构型。因此,本发明并不限于具体所示和所述的内容。

[0131] 本文所述的细节只作为示例,并只是为了阐述讨论本发明的优选地实施方式,并因为据信它们对于理解本发明的各种实施方式的原理和概念方面的描述最有用和方便才提供。就这一点而言,试图显示的结构细节只是对本发明的基本理解所必须的,没有更详细地显示,说明书和附图和/或实施例使得可怎样实际实施方式本发明的几种形势对本领域普通技术人员而言是显而易见的。

[0132] 本发明所用的定义和解释指和用于在任何未来构造中通用,除非在下面的实施例中有清楚和毫无意义的改变,或者当采用这些意思使得任何构造无意义或实质上无意义。当术语的构造使它变得无意义或实质上无意义时,定义应取自《韦氏词典》(Webster)第三版或者本技术领域所公知的词典,例如《生物化学和分子生物学牛津词典》(Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology) (编辑安东尼史密斯 (Anthony Smith),牛津大学出版社 (Oxford University Press),牛津,2004)。

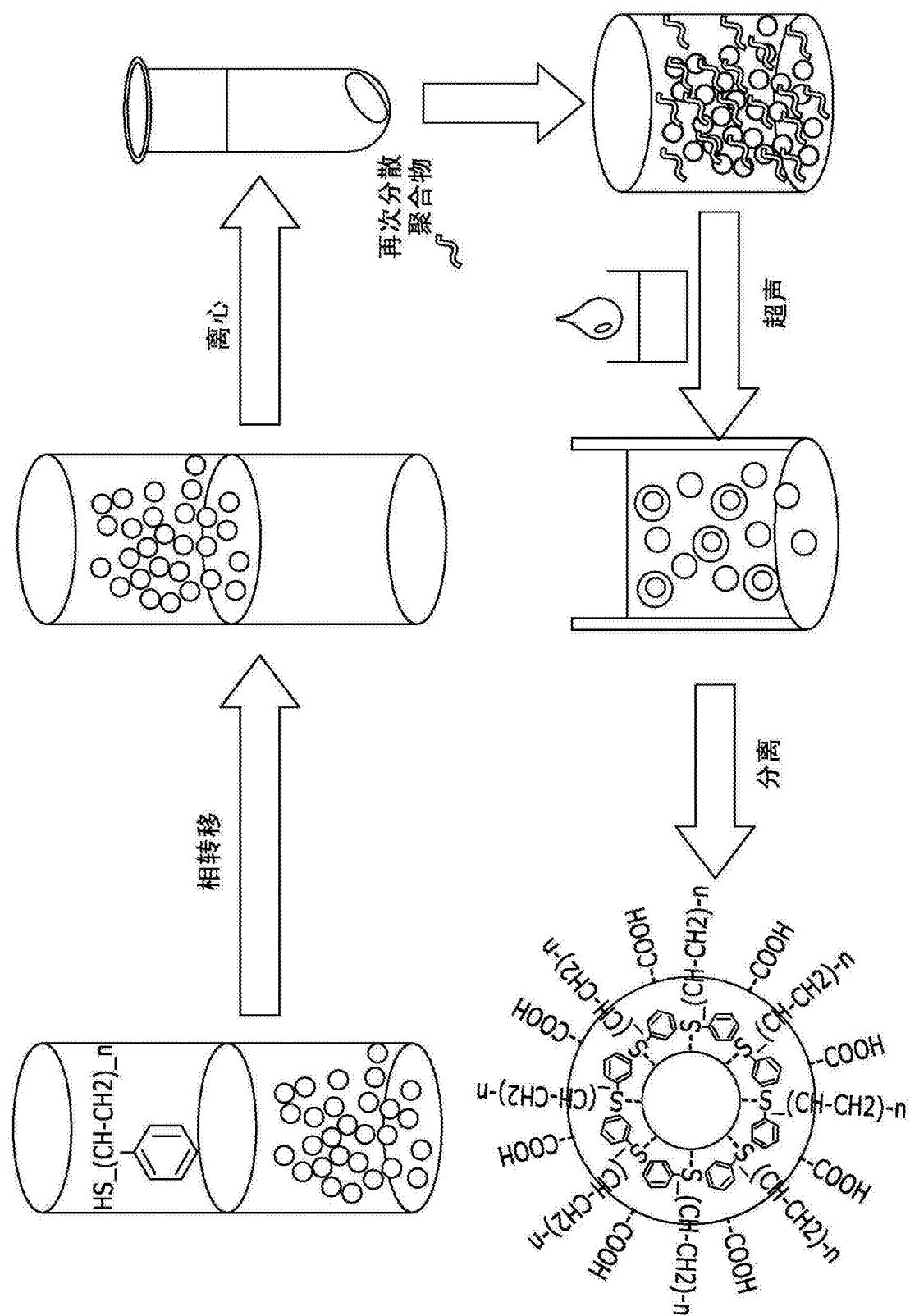


图1

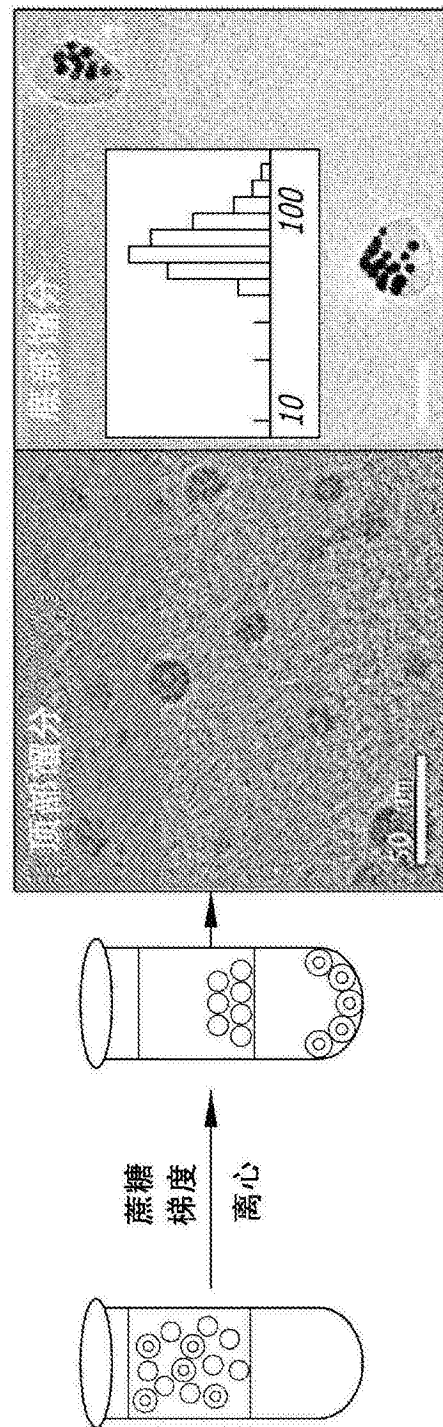


图2A

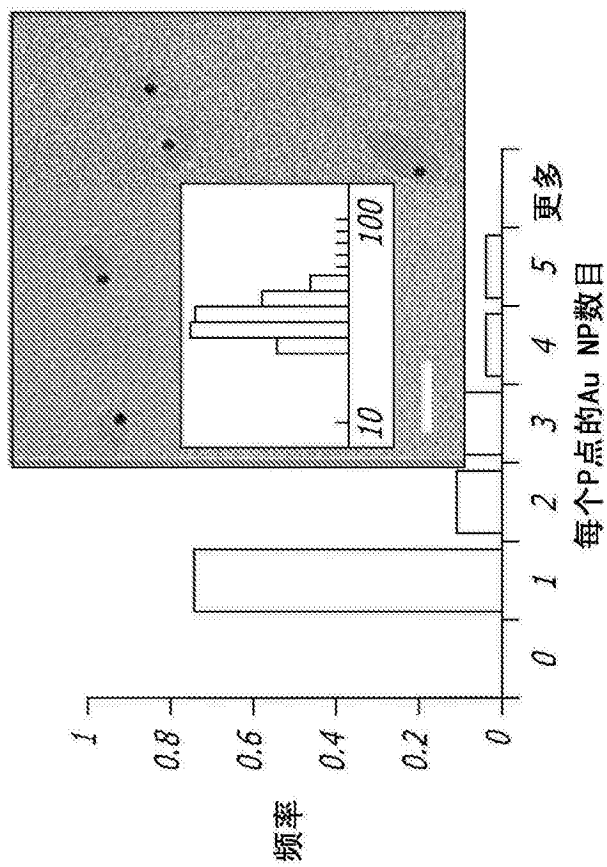


图2B

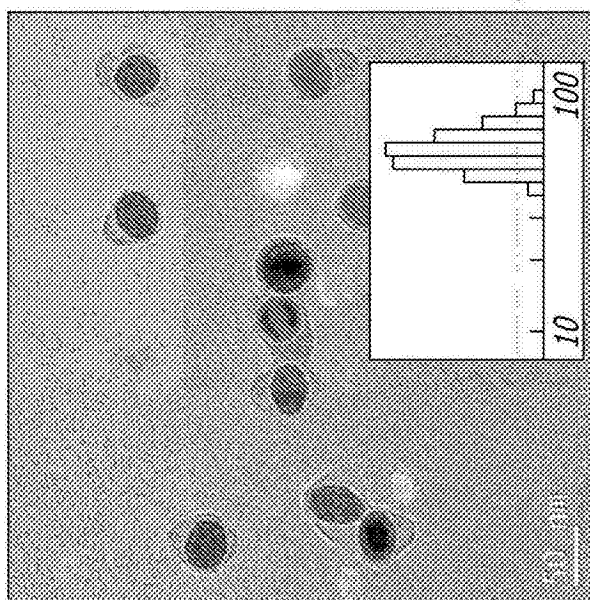


图2C

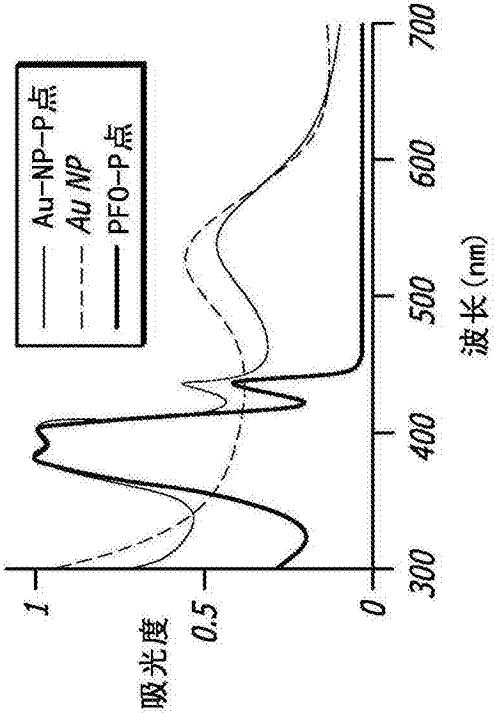


图3A

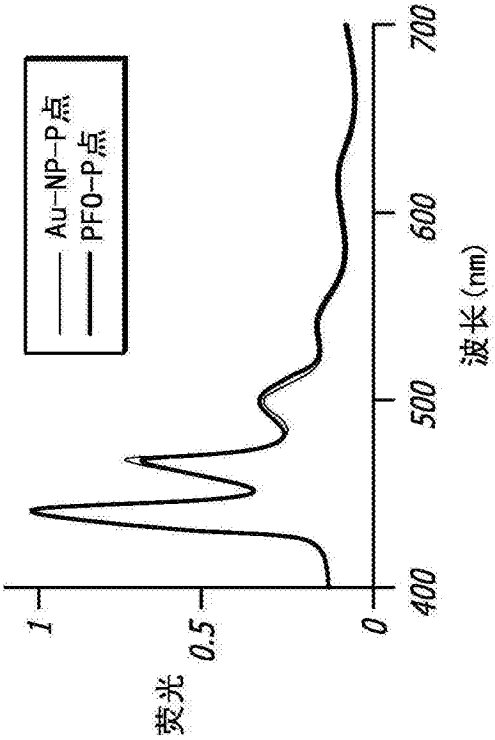


图3B

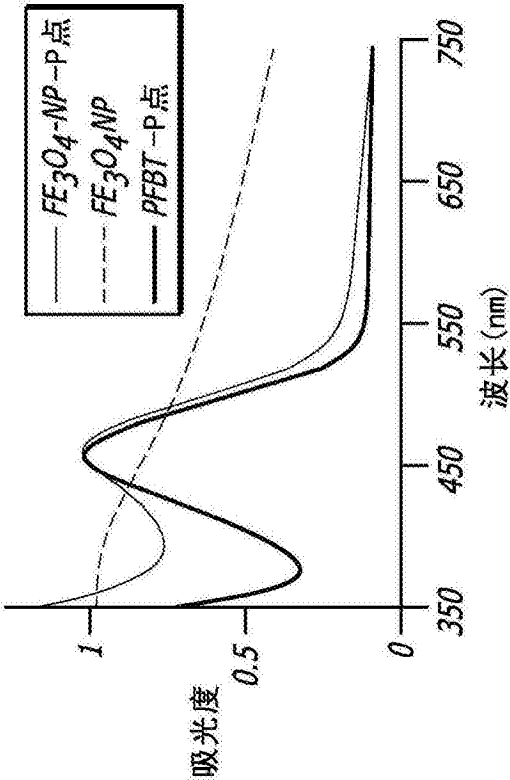


图3C

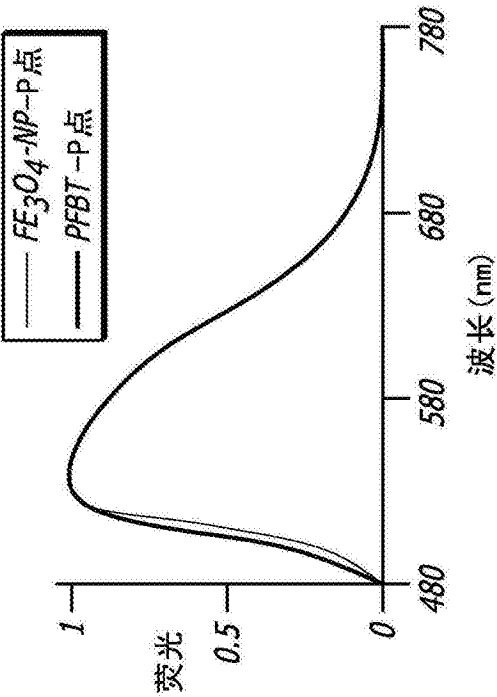


图3D

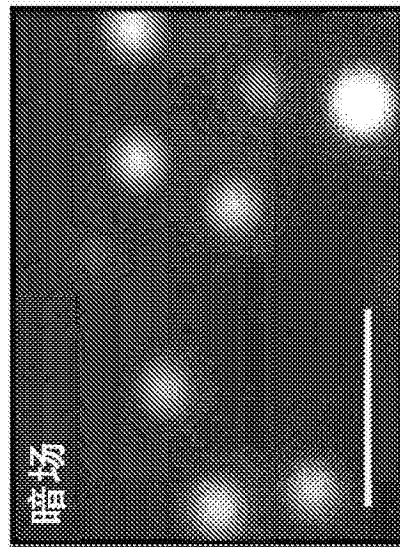


图4A

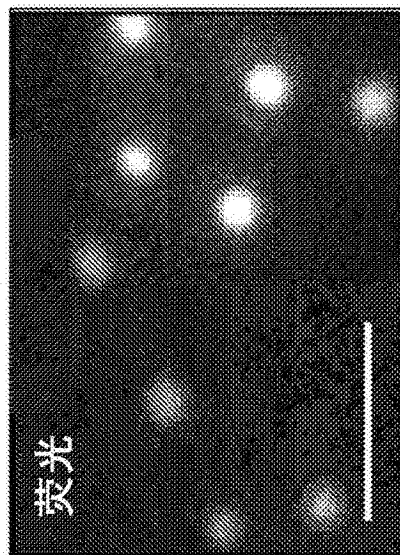


图4B

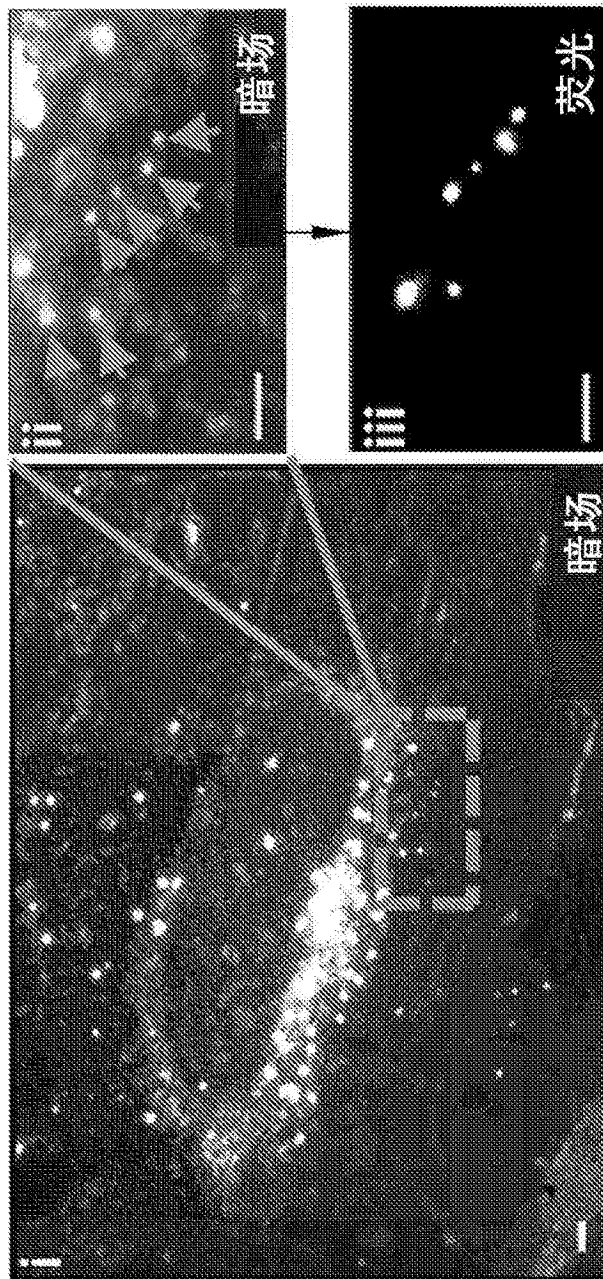


图4C

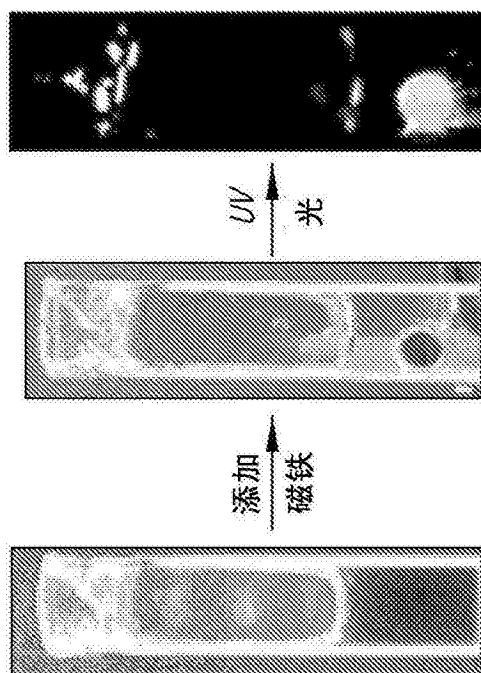


图5A

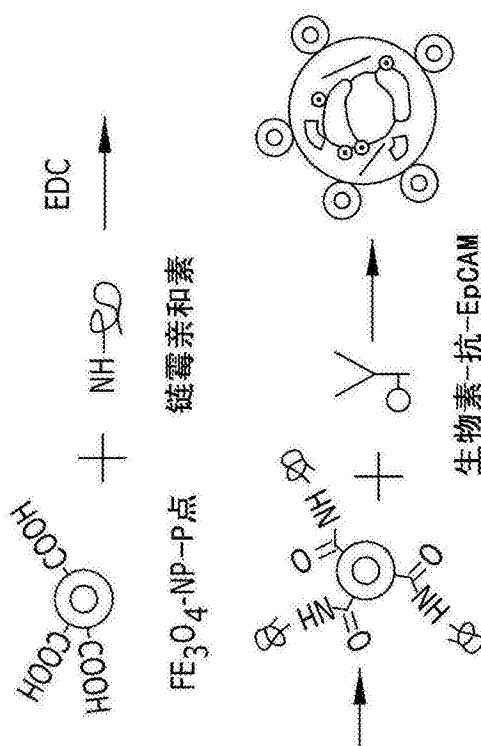


图5B

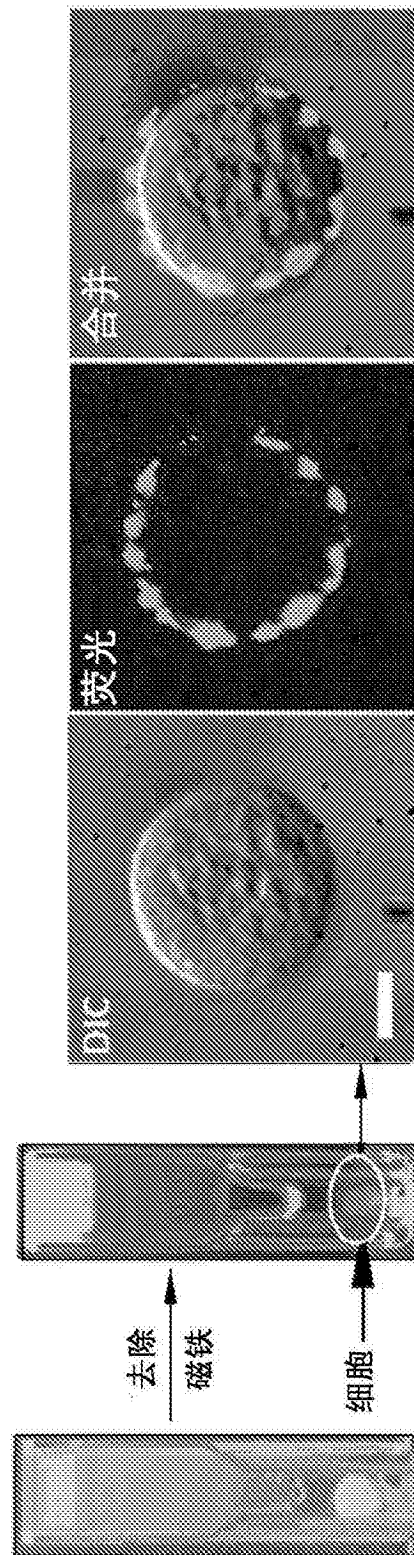


图5C

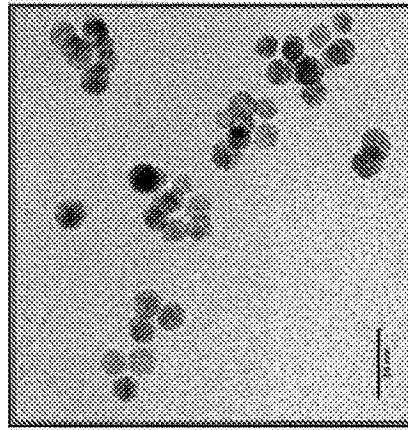


图6A

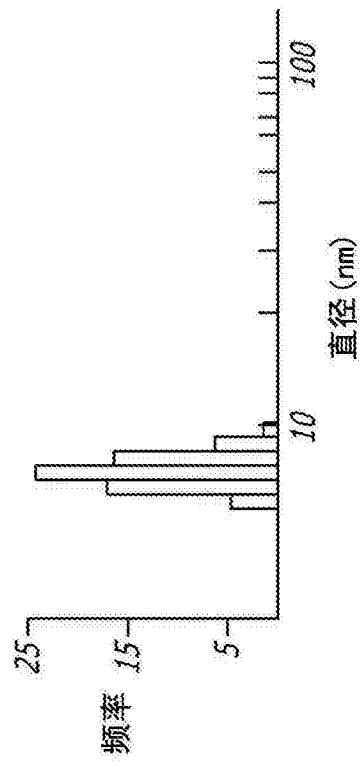


图6B

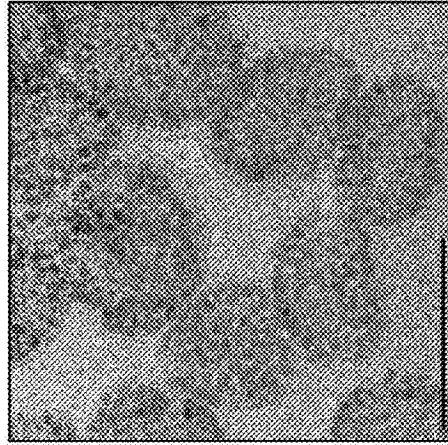


图7A

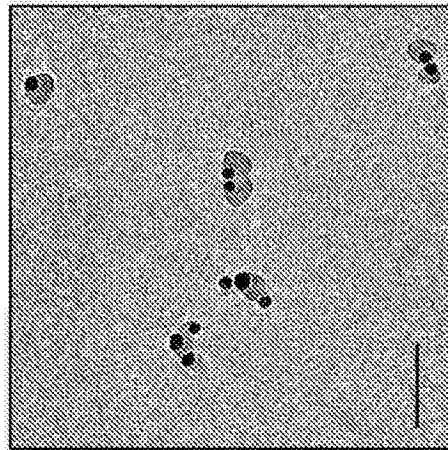


图7B