



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110146693 A

(43)申请公布日 2019.08.20

(21)申请号 201910388410.0

(22)申请日 2019.05.09

(71)申请人 汕头伊能膜业有限公司

地址 515063 广东省汕头市大学路荣升科
技园内润和生物医药科技(汕头)有限
公司厂房一层

(72)发明人 郑永第 李久彤 周浩 杨明京

(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理
有限公司 11250

代理人 李红团

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

C09K 11/06(2006.01)

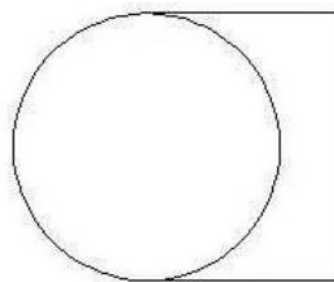
权利要求书3页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种带有荧光染料的硝酸纤维素膜及其生
产方法

(57)摘要

本发明提供了一种含有荧光染料的硝酸纤
维素微孔膜及其制备方法。将提供供体荧光分子
的荧光染料直接加到铸膜液中,经相转换直接生
产出一种带荧光的硝酸纤维素微孔膜,微孔膜中
的荧光强度可以通过添加不同剂量的荧光素来
控制调节,该微孔膜适用于生产荧光淬灭免疫层
析装置。



1. 一种硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述微孔膜含有荧光染料。
2. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述荧光染料选自:荧光素类染料、罗丹明类染料、Cy系列菁染料、菁类染料或Alexa系列染料中的任意一种或以上的组合。
3. 根据权利要求2所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述荧光素类染料,选自:异硫氰酸荧光素(FITC)、羟基荧光素(FAM)、四氯荧光素(TET)、2-甲氧基荧光素或4,5-二甲氧基荧光素等及其类似物中的任意一种或以上的组合。
4. 根据权利要求2所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述罗丹明类染料,选自:红色罗丹明(RBITC)、四甲基罗丹明(TAMRA)、罗丹明B(TRITC)、罗丹明6G、或罗丹明123中的任意一种或以上的组合。
5. 根据权利要求2所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述Cy系列菁染料,菁类染料,选自: Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5或Cy7及其类似物中的任意一种或以上的组合。
6. 根据权利要求2所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述Alexa系列染料,选自: AlexaFluor350、405、430、488、532、546、555、568、594、610、633、647、680、700、750中的任意一种或以上的组合。
7. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述硝酸纤维素微孔膜带有背衬或不带背衬。
8. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述硝酸纤维素微孔膜孔径在0.1微米到15微米之间。
9. 根据权利要求1所述的硝酸纤维素微孔膜,其特征在于,所述硝酸纤维素微孔膜的荧光强度位于500—10000范围内。
10. 根据权利要求1—9任一项所述的硝酸纤维素微孔膜的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - (1) 配制硝酸纤维素铸膜液;
 - (2) 配制荧光染料溶液;
 - (3) 将配制好的荧光染料溶液按所需比例混入配制好的硝酸纤维素铸膜液中并搅拌均匀,过滤静置后备用;
 - (4) 将混有含荧光染料的液体硝酸纤维素铸膜液直接涂布在不锈钢输送带表面上,或涂布在透明的聚酯膜片表面上;
 - (5) 将涂布后铸膜液层通过钢带运转到控温,控湿且控制进出风量的烘道进行相转换反应,形成带有背衬或不带背衬含有荧光染料的硝酸纤维素微孔膜。
11. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述硝酸纤维素铸膜液按如下方法配制:
 - a) 将一定重量份硝酸纤维素溶解在酮类化合物或酯类化合物溶剂中,所述的酮类化合物或酯类化合物溶剂选自:甲酸乙酯,乙酸甲酯,乙酸乙酯,丙酮或丁酮中的任意一种或以上的组合;
 - b) 然后依次加入助溶剂、非溶剂和润湿剂于15—30℃下搅拌均匀,脱泡过滤后,熟化,得硝酸纤维素铸膜液备用;所述助溶剂选自:甲醇、乙醇中的任意一种或一种以上的组合;所述非溶剂选自:正丙醇,异丙醇,正丁醇,异丁醇或无离子水中的任意一种或一种以上的

组合;所述润湿剂选自:甘油,曲拉通X-100,吐温20,聚乙二醇400,烷基硫酸盐,烷基磺酸盐等表面活性剂中的任意一种或以上的组合。

12. 根据权利要求11所述的制备方法,其特征在于,所述的硝酸纤维素铸膜液具体的配方比例为:硝酸纤维素2-20重量份,溶剂15-60重量份,助溶剂15-80重量份,非溶剂2-25重量份,润湿剂0.003-2重量份。

13. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述荧光染料溶液按如下方法配制:将一定重量份荧光染料溶于1至6个碳原子的低碳醇单独或按一定比例混入酮类化合物或酯类化合物制成混合溶液中;所述的荧光染料选自:荧光素类染料、罗丹明类染料、Cy系列菁染料或Alexa系列染料中的任意一种或以上的组合;所述的1至6个碳原子的低碳醇选自:甲醇,乙醇,异丙醇中的任意一种或一种以上的组合;优选为乙醇;所述酮类化合物或酯类化合物选自:乙酸甲酯,乙酸乙酯,丙酮,丁酮中的任意一种或一种以上的组合;优选的酮类化合物为丙酮,优选的酯类化为乙酸甲酯。

14. 根据权利要求12所述的制备方法,其特征在于,所述荧光染料的加入量为:每500mL荧光染料溶液中含荧光染料1-50g,优选5-20g,最优选10g。

15. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(4)中所述含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液涂布的厚度为100-800 μm ;优选的涂布厚度为400-600 μm 。

16. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(5)中所述相转换反应中,流延时,含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液自身温度控制在10 $^{\circ}\text{C}$ -35 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,烘道外空气与含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液接触处理时间控制在10秒至30分钟范围内,烘道内温度控制在15 $^{\circ}\text{C}$ -30 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,空气的相对湿度控制在40%至95%范围内,空气风速控制在0.1米/秒-7米/秒范围内。

17. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,步骤(5)之后还包括以下步骤:

(6) 将步骤(5)获得的成型的含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜浸入水中进行残留溶剂的清洗及膜表面除尘处理;随后进入后含有表面活性剂的后处理溶液中进行连续浸泡处理。

(7) 经过后处理后含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜通过加热辊筒及吹风烘干,烘干温度控制在在30 $^{\circ}\text{C}$ -85 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,得到含荧光染料硝酸纤维素微孔背衬膜或不带背衬的微孔膜。

18. 根据权利要求10所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括以下步骤:

(1) 将9.2重量份硝酸纤维素溶解在47.8重量份甲酸乙酯中;然后依次加入21.6重量份乙醇、12.3重量份异丁醇、9重量份无离子水和0.1重量份甘油于20-23 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀,脱泡过滤后,得硝酸纤维素铸膜液备用;

(2) 称取荧光染料罗丹明6G10g溶于500mL乙醇中,储于棕色瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用,如溶液有沉淀,可以过滤;

(3) 将配制好的荧光剂溶液按每3000ml铸膜液加入15 μl 的比例混入配制好的硝酸纤维素铸膜液中并搅拌均匀;

(4) 将配制好含染料罗丹明6G的硝酸纤维素铸膜液直接涂布在透明的聚酯膜片表面上,涂布厚度为450 μm ;

(5) 涂布后的铸膜液层被立即运转到控温,控湿且控制进出风量的烘道进行相转换反

应,铸膜液温度控制在20℃-23℃范围内,烘道内温度控制在22℃-24℃范围内,空气的相对湿度控制在55%至70%范围内,空气风速控制在0.1米/秒-2.5米/秒范围内,空气与铸膜液接触处理时间控制在10秒至2分钟范围内,得到带背衬的硝酸纤维素微孔膜;

(6) 将离开烘道后带背衬的硝酸纤维素微孔膜浸入水中进行残留溶剂的清洗及膜表面除尘处理,随后进入后含有表面活性剂的后处理溶液中进行连续浸泡处理;

(7) 经过后处理后带背衬的硝酸纤维素微孔膜通过加热辊筒及吹风烘干,烘干温度控制在在35℃-65℃的条件下,得到含荧光剂硝酸纤维素微孔背衬膜成品。

19. 根据权利要求1-9任一项所述的硝酸纤维素微孔膜的用途,其特征在于,用于生产荧光淬灭免疫层系试纸条。

一种带有荧光染料的硝酸纤维素膜及其生产方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种含有荧光染料的硝酸纤维素微孔膜及其制备方法,该微孔膜适用于生产荧光淬灭免疫层系试纸条。

背景技术

[0002] 自1971年Faulk和Taylor将胶体金引入免疫化学后,胶体金标记技术作为一种新的免疫标记技术在生物医学特别是免疫学研究领域各领域得到了日益广泛的应用。成为继荧光标记、酶标记和放射性免疫标记之后的又一重要的免疫标记技术。

[0003] 1990年,BEGGS M等人首次将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起,以NC膜作为反应载体,建立了胶体金免疫层析法(GICA),用于检测人尿和血清中的HCG。由于胶体金免疫层析法(GICA)具有开发成本低,使用简便、快速,储藏相对稳定,应用范围较广等特点,该方法被人们熟识并被大量运用到其它各种样品的检测。GICA法成为现阶段较经济实用的免疫层析技术,特别适合即时检验、大批量时间紧的检测和大面积普查等领域。此后20年,人们在GICA的基础上,开发出了用于病原体(CN 03115143.4)、激素(CN 200610014168.3)、心脏标志物(CN 200410011165.5)、肿瘤标志物(CN 200510104796.6)、自身免疫病标志物(CN 200410027291.X)等的检测试剂;同时也应用到食品、环境(CN 03116692.X)和兽医(CN 02139704.X)等领域。

[0004] GICA装置通常由样品垫、胶体金结合垫、微孔层析膜、吸收垫组成,通过压敏粘合剂被组装在背衬底板上。检测时,将样品加到试纸端的样品垫上,通过毛细管作用前移,样品中的分析物与结合垫上的免疫胶体金相互作用并形成复合物。复合物继续通过毛细管作用前移至微孔层析膜检测线,与其上的抗体(或抗原)特异性结合而被截留,在检测线上聚集,当复合物积聚到一定数量便显示出胶体金特征的红色。而未结合分析物的免疫胶体金则不被检测线捕获,迁移至质控线并与其上的抗体结合而显示红色,达到与复合物分离的目的,并且说明GICA装置工作正常。

[0005] 尽管以胶体金为代表的层析技术在许多领域得到了广泛应用,但由于只能用于定性或半定量的检测,难以满足临床检测指标量化的要求;同时检测结果靠肉眼判断,灵敏度较低,特别是在检测结果呈弱阳性时,极易造成人为漏检现象,需要进一步发展完善。

[0006] 背景荧光淬灭-免疫层析法(background fluorescence quenching immunochromatographic assay,bFQICA)是在胶体金免疫层析技术(GICA)基础上建立起来的一种分析技术。该技术在胶体金免疫层析的微孔层析膜下添加一层均匀一致的荧光染料,在检测线(T线)、质控线(C线)及两者之间产生“背景荧光”,利用待测物抗体所标记的胶体金作为荧光受体,微孔层析膜下的荧光素提供供体荧光分子,根据两种分子在10nm范围之内会产生荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer,FRET)即淬灭的原理,当标记胶体金的抗体结合在T线处时,抗体所携带的胶体金会使T线处微孔层析膜的背景荧光发生淬灭进而导致荧光强度的衰减。如能对GICA装置的背景荧光和检测线(T线)的相对荧光强度进行测量比较,就能达到定量检测的目的。

[0007] 但是,由于目前市场并没有任何含有荧光染料的微孔层析膜可以提供,也没有任何有关这方面的发明应用,目前在使用背景荧光猝灭-免疫层析法(bFQICA)时,荧光染料仅能通过额外的装置附加在GICA装置中微孔层析膜的下方,微孔层析膜不仅遮蔽干扰了荧光染料强度背景荧光猝灭-免疫层析法(bFQICA)的灵敏度,也增加了装置的人工成本,还导致了产品的均一性也难以控制。如能将提供供体荧光分子的荧光染料直接加到铸膜液中,经相转换直接生产出一种带荧光的硝酸纤维素微孔膜,将会对克服背景荧光猝灭-免疫层析法(bFQICA)中所面临的灵敏度及均一性等问题有所帮助。

发明内容

[0008] 发明人经研究发现如能将提供供体荧光分子的荧光染料直接加到铸膜液中,经相转换直接生产出一种带荧光的硝酸纤维素微孔膜,将会对克服背景荧光猝灭-免疫层析法(bFQICA)中所面临的灵敏度及均一性等问题有所帮助。发明人进一步研究发现可以采用将荧光染料加入到硝酸纤维素铸膜液中直接涂布,然后通过相转换一次性生产出带有荧光的硝酸纤维素微孔膜,微孔膜中的荧光强度可以通过添加不同剂量的荧光素来控制调节,该微孔膜适用于生产荧光猝灭免疫层析装置。

[0009] 本发明的一个方面提供了一种含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜。

[0010] 在本发明所提供的的一个优选方案中,所述荧光染料选自:荧光素类染料、罗丹明类染料、Cy系列菁染料或Alexa系列染料中的任意一种或以上的组合。

[0011] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述荧光素类染料,选自:异硫氰酸荧光素(FITC)、羟基荧光素(FAM)、四氯荧光素(TET)、2-甲氧基荧光素或4,5-二甲氧基荧光素等及其类似物中的任意一种或以上的组合。

[0012] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述罗丹明类染料,选自:红色罗丹明(RBITC)、四甲基罗丹明(TAMRA)、罗丹明B(TRITC)、罗丹明6G、或罗丹明123中的任意一种或以上的组合。

[0013] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述Cy系列菁染料,菁类染料,选自: Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5或Cy7及其类似物中的任意一种或以上的组合。

[0014] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述Alexa系列染料,选自:AlexaFluor 350、405、430、488、532、546、555、568、594、610、633、647、680、700、750中的任意一种或以上的组合。

[0015] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述硝酸纤维素微孔膜带有背衬或不带背衬。

[0016] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述硝酸纤维素微孔膜孔径在0.1微米到15微米之间。

[0017] 在本发明所提供的的另一个优选方案中,所述硝酸纤维素微孔膜的荧光强度位于500-10000范围内。

[0018] 本发明的第二个方面提供了一种带荧光染料的硝酸纤维素微孔膜的制备方法,包括以下步骤:

[0019] (1) 配制硝酸纤维素铸膜液;

[0020] (2) 配制荧光染料溶液;

[0021] (3) 将配制好的荧光染料溶液按所需比例混入配制好的硝酸纤维素铸膜液中并搅拌均匀,过滤静置后备用;

[0022] (4) 将混有含荧光染料的液体硝酸纤维素铸膜液直接涂布在不锈钢输送带表面上,或涂布在透明的聚酯膜片表面上;

[0023] (5) 将涂布后铸膜液层通过钢带运转到控温,控湿且控制进出风量的烘道进行相转换反应,形成带有背衬或不带背衬含有荧光染料的硝酸纤维素微孔膜。

[0024] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(1)中所述硝酸纤维素铸膜液按如下方法配制:

[0025] a) 将一定重量份硝酸纤维素溶解在酮类化合物或酯类化合物溶剂中,所述的酮类化合物或酯类化合物溶剂选自:甲酸乙酯,乙酸甲酯,乙酸乙酯,丙酮或丁酮中的任意一种或以上的组合。

[0026] b) 然后依次加入助溶剂、非溶剂和润湿剂于15-30℃下搅拌均匀,脱泡过滤后,熟化,得硝酸纤维素铸膜液备用;所述助溶剂选自:甲醇、乙醇中的任意一种或一种以上的组合;所述非溶剂选自:正丙醇,异丙醇,正丁醇,异丁醇或无离子水中的任意一种或一种以上的组合;所述润湿剂选自:甘油,曲拉通X-100,吐温20,聚乙二醇400,烷基硫酸盐,烷基磺酸盐等表面活性剂中的任意一种或以上的组合。

[0027] 在本发明所提供的另一个优选方案中,所述的硝酸纤维素铸膜液具体的配方比例为:硝酸纤维素2-20重量份,溶剂15-60重量份,助溶剂15-80重量份,非溶剂2-25重量份,润湿剂0.003-2重量份。

[0028] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(2)中所述荧光染料溶液按如下方法配制:将一定重量份荧光染料溶于1至6个碳原子的低碳醇单独或按一定比例混入酮类化合物或酯类化合物制成混合溶液中;所述的荧光染料选自:荧光素类染料,包括异硫氰酸荧光素(FITC)、羟基荧光素(FAM)、四氯荧光素(TET)等及其类似物;罗丹明类染料,包括红色罗丹明(RBITC)、四甲基罗丹明(TAMRA)、罗丹明B(TRITC),罗丹明6G,罗丹明123等;Cy系列菁染料,菁染料通常有两个杂环体系组成,包括Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7及其类似物;Alexa系列染料,包括AlexaFluor350、405、430、488、532、546、555、568、594、610、633、647、680、700、750。所述的1至6个碳原子的低碳醇选自:甲醇,乙醇,异丙醇中的任意一种或一种以上的组合;优选为乙醇;所述酮类化合物或酯类化合物选自:乙酸甲酯,乙酸乙酯,丙酮,丁酮中的任意一种或一种以上的组合;优选的酮类化合物为丙酮,优选的酯类化为乙酸甲酯。

[0029] 在本发明所提供的另一个优选方案中,每500mL荧光染料溶液中含荧光染料1-50g,优选5-20g,最优选10g。配制好的荧光染料溶液可储于棕色瓶中,4℃避光保存,如溶液有沉淀,可以过滤。

[0030] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(3)中所述的荧光染料溶液与硝酸纤维素铸膜液的混合比例为1:12000-200000(V/V)。

[0031] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(3)中所述的荧光染料溶液边搅拌边缓慢加入到事先配制好的硝酸纤维素铸膜液中,直至完全溶解到溶液中,搅拌时间优选为2-3小时。搅拌好的含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液静置时间优选为一天,溶液然后进行过滤;把过滤好的铸膜液需进一步静置熟化一段时间才能生产,静置时间优选为三天。

[0032] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(4)中所述含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液涂布的厚度为100-800 μm ;优选的涂布厚度为400-600 μm 。

[0033] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(5)中所述相转换反应中,流延时,含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液自身温度控制在10 $^{\circ}\text{C}$ -35 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,烘道外空气与含荧光染料的硝酸纤维素铸膜液接触处理时间控制在10秒至30分钟范围内,烘道内温度控制在15 $^{\circ}\text{C}$ -30 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,空气的相对湿度控制在40%至95%范围内,空气风速控制在0.1米/秒-7米/秒范围内。

[0034] 在本发明所提供的另一个优选方案中,步骤(5)之后还包括以下步骤:

[0035] (6)将步骤(5)获得的成型的含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜浸入水中进行残留溶剂的清洗及膜表面除尘处理;随后进入后含有表面活性剂的后处理溶液中进行连续浸泡处理。

[0036] (7)经过后处理后含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜通过加热辊筒及吹风烘干,烘干温度控制在在30 $^{\circ}\text{C}$ -85 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,得到含荧光染料硝酸纤维素微孔背衬膜或不带背衬的微孔膜。

[0037] 本发明的第三个方面提供了一种含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜的用途,该微孔膜适用于生产荧光淬灭免疫层系试纸条。

[0038] 本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0039] (1)本发明制备工艺相对简单易行。

[0040] (2)膜的荧光强度可以根据添加不同剂量的荧光染料溶液来加以调节,方便灵活,完全可以满足背景荧光猝灭-免疫层析法(bFQICA)的要求试验要求。

附图说明

[0041] 图1所示为含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜生产工艺流程图。

[0042] 图2所示为含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜生产示意图。

[0043] 图3所示为含荧光染料的硝酸纤维素背衬微孔膜生产示意图。

[0044] 图4所示为硝酸纤维素微孔膜所组装的试条(GICA装置)示意图。

[0045] 图5所示为实施例4中制备的标准曲线。

[0046] 图6所示为实施例5中制备的标准曲线。

[0047] 图7所示为实施例6中制备的标准曲线。

具体实施方式

[0048] 实施例1

[0049] (1)将10.3重量份硝酸纤维素溶解在50.8重量份丙酮中;然后依次加入20.5重量份乙醇、10.4重量份正丁醇、7.98重量份无离子水和0.02重量份吐温20于15-30 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀,脱泡过滤后,得硝酸纤维素铸膜液备用。

[0050] (2)称取10g荧光染料罗丹明6G溶于500mL丙酮中,储于棕色瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用,如溶液有沉淀,可以过滤。

[0051] (3)将配制好的荧光染料溶液按每3000ml铸膜液加入30 μl 的比例混入配制好的硝酸纤维素铸膜液中并搅拌均匀。

[0052] (4) 将配制好含荧光染料罗丹明6G硝酸纤维素铸膜液直接流延在不锈钢带表面上(见图2),铸膜液流延厚度为450 μm ,铸膜液与空气接触时间控制在10秒至2分钟范围内。

[0053] (5) 流延后的铸膜液层随不锈钢带的运转被立即运转到控温,控湿且控制进出风量的烘道进行相转换反应,铸膜液温度控制在20 $^{\circ}\text{C}$ -23 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,烘道内温度控制在22 $^{\circ}\text{C}$ -24 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,空气的相对湿度控制在55%至70%范围内,空气风速控制在0.1米/秒-2.5米/秒范围内,得到硝酸纤维素微孔膜。

[0054] (6) 将离开烘道后的硝酸纤维素微孔膜浸入水中进行残留溶剂的清洗及膜表面除尘处理,随后进入后含有表面活性剂的后处理溶液中进行连续浸泡处理。

[0055] (7) 经过后处理后的硝酸纤维素微孔膜通过加热辊筒及吹风烘干,烘干温度控制在在35 $^{\circ}\text{C}$ -65 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,得到含荧光染料硝酸纤维素微孔膜成品。

[0056] (8) 将含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜切成25mm X 5mm样品,用纯净水润湿后放入荧光检测仪检测强度。得到硝酸纤维素微孔膜的荧光强度位于1000-3000范围内。

[0057] 实施例2

[0058] (1) 将9.2重量份硝酸纤维素溶解在47.8重量份乙酸甲酯中;然后依次加入21.6重量份乙醇、12.3重量份异丁醇、9重量份无离子水和0.1重量份甘油于20-23 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀,脱泡过滤后,得硝酸纤维素铸膜液备用。

[0059] (2) 称取10g荧光染料罗丹明6G溶于500mL乙酸甲酯中,储于棕色瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用,如溶液有沉淀,可以过滤。

[0060] (3) 将配制好的荧光染料溶液按每3000ml铸膜液加入15 μl 的比例混入配制好的硝酸纤维素铸膜液中并搅拌均匀。

[0061] (4) 将配制好含荧光染料罗丹明6G硝酸纤维素铸膜液流延到附着在不锈钢带表面上作为背衬材料的透明聚酯薄膜上(见图3),流延厚度为450 μm 。铸膜液与空气接触时间控制在10秒至2分钟范围内。

[0062] (5) 流延后的铸膜液层连同作为背衬材料的透明聚酯薄膜随不锈钢带的运转被立即运转到控温,控湿且控制进出风量的烘道进行相转换反应,铸膜液温度控制在20 $^{\circ}\text{C}$ -23 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,烘道内温度控制在22 $^{\circ}\text{C}$ -24 $^{\circ}\text{C}$ 范围内,空气的相对湿度控制在55%至70%范围内,空气风速控制在0.1米/秒-2.5米/秒范围内,得到带背衬的硝酸纤维素微孔膜。

[0063] (6) 将离开烘道后带背衬的硝酸纤维素微孔膜浸入水中进行残留溶剂的清洗及膜表面除尘处理,随后进入后含有表面活性剂的后处理溶液中进行连续浸泡处理。

[0064] (7) 经过后处理后带背衬的硝酸纤维素微孔膜通过加热辊筒及吹风烘干,烘干温度控制在在35 $^{\circ}\text{C}$ -65 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,得到含荧光染料硝酸纤维素微孔背衬膜成品。

[0065] (8) 将含荧光染料硝酸纤维素微孔背衬膜切成25mm X 5mm样品,用纯净水润湿后放入荧光检测仪检测强度。得到带背衬的硝酸纤维素微孔膜的荧光强度位于500-1000范围内。

[0066] 实施例3

[0067] (1) 将8.8重量份硝酸纤维素溶解在50.8重量份丙酮中;然后依次加入15.5重量份乙醇、3.5重量份异丙醇、11.0重量份异丁醇、10.39重量份无离子水、和0.01重量份曲拉通X-100于15-30 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌均匀,脱泡过滤后,得硝酸纤维素铸膜液备用。

[0068] (2) 称取10g荧光染料罗丹明6G溶于500mL乙醇中,储于棕色瓶中,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备

用,如溶液有沉淀,可以过滤。

[0069] (3) 将配制好的荧光染料溶液按每3000ml铸膜液加入250 μ l的比例混入配制好的硝酸纤维素铸膜液中并搅拌均匀;

[0070] (4) 将配制好含荧光染料硝酸纤维素铸膜液直接流延在透明的聚酯膜片表面上,流延厚度为450 μ m。铸膜液与空气的接触时间控制在10秒至2分钟范围内。

[0071] (5) 流延后的铸膜液层连同作为背衬材料的透明聚酯薄膜随不锈钢带的运转被立即运转到控温,控湿且控制进出风量的烘道进行相转换反应,铸膜液温度控制在20 $^{\circ}$ C-23 $^{\circ}$ C范围内,烘道内温度控制在22 $^{\circ}$ C-24 $^{\circ}$ C范围内,空气的相对湿度控制在55%至70%范围内,空气风速控制在0.1米/秒-2.5米/秒范围内,空气与铸膜液接触处理时间控制在10秒至2分钟范围内,得到带背衬的硝酸纤维素微孔膜。

[0072] (6) 将离开烘道后带背衬的硝酸纤维素微孔膜浸入水中进行残留溶剂的清洗及膜表面除尘处理,随后进入后含有表面活性剂的后处理溶液中进行连续浸泡处理,

[0073] (7) 经过后处理后带背衬的硝酸纤维素微孔膜通过加热辊筒及吹风烘干,烘干温度控制在35 $^{\circ}$ C-65 $^{\circ}$ C的条件下,得到含荧光染料硝酸纤维素微孔背衬膜成品。

[0074] (8) 含荧光染料带背衬的硝酸纤维素微孔膜切成25mm X 5mm样品,用纯净水润湿后放入荧光检测仪检测强度。得到带背衬的硝酸纤维素微孔膜的荧光强度位于5000-10000范围内。

[0075] 实施例4:血清中降钙素原(PCT)的检测(采用实施例2所述的荧光强度为500~1000带背衬的硝酸纤维素微孔膜)

[0076] 1、金标抗体的制备

[0077] 1.1胶体金-抗体保存液

[0078]	四硼酸钠	0.1g
--------	------	------

[0079]	小牛血清白蛋白(BSA)	0.25g
	NaN ₃	0.025g

[0080] 加水溶解后用6N HCl调pH至7.4,补水至250ml,用0.45 μ m滤膜过滤后,4~8 $^{\circ}$ C保存。

[0081] 1.2工作液

[0082]

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6.1g
NaCl	8.5g
PVP40	5.0g
硼酸	2.1g
PEG	1.0g
10%BSA	50ml
NaN ₃	0.2g

[0083] 加水溶解后用6N HCl调pH至7.0~7.5补水至1000ml,用0.45 μ m滤膜过滤后,4~8 $^{\circ}$ C保存。

[0084] 1.3金标抗体 (Gold-Ab1) 的制备

[0085] 1.3.1取20~30nm颗粒胶体金液20ml,在磁力搅拌下缓慢加入已纯化的Ab1抗体1.0ml (0.6mg/ml),在室温下搅拌30min;

[0086] 1.3.2加10%的BSA 0.8ml (终浓度0.4%),室温搅拌5min;

[0087] 1.3.3加10%的PEG 0.4ml (终浓度0.2%),室温搅拌5min;

[0088] 1.3.4 12000~1500r/min离心60~40min,小心吸离心上清,沉淀溶于0.5ml保存液中,金标抗体的光密度 (O.D) 约为1000.D,其中Ab1抗体的浓度为1mg/ml,置4℃保存备用;

[0089] 2.biotin标记Ab2

[0090] 2.1Ab2预处理

[0091]

Ab2 中含有叠氮钠、甘氨酸等含氨基的小分子和其它小分子	用 pH7.4 的 1×PBS 充分透析
Ab2 中含有牛血清白蛋白等大分子	Protein A 柱或其它柱子纯化
Ab2 抗体浓度标定	分光光度计测其 OD280 (10D280 相当于

[0092]

	0.7mg/ml 单克隆抗体) Ab2 抗体浓度为 0.4mg/ml
--	---------------------------------------

[0093] 2.2取上述预处理的Ab2 10μL,加入25μL的1mg/ml NHSS-Biotin DMSO溶液,混匀,4℃冰箱避光反应2小时,透析过夜备用。

[0094] 3.SA点膜与上载Gold-Ab1、biotin-Ab2

[0095] 取SA 1mg/ml的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 0.5μl点在附图4所示检测线位置,避光室温干燥;

[0096] 取Gold-Ab1、biotin-Ab2 0.5μl滴加在附图4所示的结合垫片上。

[0097] 4.标准曲线制备

[0098] 4.1用工作液配制PCT系列标准溶液 (浓度见表1);

[0099] 4.2取7根带有实例2所述的荧光强度为500~1000的带背衬的硝酸纤维素微孔膜所组装的试条 (附图4),水平放置,分别在各样品垫上加7种浓度的50μl标准溶液;

[0100] 4.3 10min后,测定各测试片上检测线处580nm的荧光强度F1及检测线与质控线中间处580nm的荧光强度F2,计算F2/F1的值数据见表1,标准曲线见图5。

[0101] 表1:PCT标准系列浓度与相应荧光强度及F2/F1比值

标准系列浓度 (ng/ml)	荧光强度 (F1)	荧光强度 (F2)	F2/F1
0	908	926	1.0198
0.1	946	1001	1.0581
0.5	814	992	1.2187
1.0	697	989	1.4189
5	229	1006	4.393
10	113	976	8.6372
20	56	968	17.2857

[0102] 5、样本检测

[0104] 用血清样本替代标准系列溶液,重复4.2、4.3步骤,将F2/F1代入标准曲线,测得6个样本的PCT值见表2。

[0105] 表2:500~1000荧光强度的带背衬的硝酸纤维素微孔膜检测结果与罗氏电化学发光法检测结果比较

样本号	含荧光染料的硝酸纤维素微孔膜 (ng/ml)	罗氏电化学发光法 (ng/ml)
1	18.5	19.17
2	4.64	3.00
3	0.36	0.40
4	1.23	1.80
5	0.64	0.54
6	0.06	0.07

[0107] 本发明方法检测结果与罗氏电化学发光法检测结果的相关性良好, $R^2=0.9883$ 。

[0108] 实施例5:血清中降钙素原(PCT)的检测(采用实施例1中所述的荧光强度为1000~3000的硝酸纤维素微孔膜)

[0109] 采用实施例1中所述的荧光强度为1000~3000的硝酸纤维素微孔膜重复实施例4中的实验。步骤1-3同实施例4。

[0110] 4.标准曲线制备

[0111] 4.1用工作液配制PCT系列标准溶液(浓度见表3);

[0112] 4.2取7根带有实施例1所述的荧光强度为1000~3000的硝酸纤维素微孔膜所组装

的试条,水平放置,分别在各样品垫上加7种浓度的50 μ l标准溶液;

[0113] 4.3 10min后,测定各测试片上检测线处580nm的荧光强度F1及检测线与质控线中间处580nm的荧光强度F2,计算F2/F1的值数据见表3,标准曲线见图6。

[0114] 表3:PCT标准系列浓度与相应荧光强度及F2/F1比值

[0115]	标准系列浓度	荧光强度	荧光强度	F2/F1
	(ng/ml)	(F1)	(F2)	
	0	1627	1652	1.0154
	0.1	1574	1666	1.0584
[0116]	0.5	1369	1686	1.2316
	1.0	1141	1691	1.4820
	5	412	1735	4.2112
	10	204	1702	8.3431
	20	106	1714	16.1698

[0117] 5、样本检测

[0118] 用血清样本替代标准系列溶液,重复4.2、4.3步骤,将F2/F1代入标准曲线,测得6个样本的PCT值见表4:

[0119] 表4:1000~3000荧光强度的硝酸纤维素微孔膜检测结果与罗氏电化学发光法检测结果

[0120]

样本号	本发明方法 (ng/ml)	罗氏电化学发光法 (ng/ml)
1	19.5	19.17
2	3.64	3.00
3	0.46	0.40
4	1.53	1.80
5	0.60	0.54
6	0.05	0.07

[0121] 本发明方法检测结果与酶联免疫法检测结果的相关性良好, $R^2=0.9985$ 。

[0122] 实施例6:血清中降钙素原(PCT)的检测(采用荧光强度为5000~10000的带背衬的硝酸纤维素微孔膜)

[0123] 换用实施例3制备的膜面荧光强度为5000~10000的带背衬的硝酸纤维素微孔膜重复实施例4中的实验。

[0124] 步骤1-3同实施例4。

[0125] 4.标准曲线制备

[0126] 4.1用工作液配制PCT系列标准溶液(浓度见表5);

[0127] 4.2取7根带有实施例3所述的荧光强度为5000~10000的带背衬的硝酸纤维素微

孔膜所组装的试条,水平放置,分别在各样品垫上加7种浓度的50 μ l标准溶液;

[0128] 4.3 10min后,测定各测试片上检测线处580nm的荧光强度F1及检测线与质控线中间处580nm的荧光强度F2,计算F2/F1的值数据见表5,标准曲线见图7。

[0129] 表5:PCT标准系列浓度与相应荧光强度及F2/F1比值

标准系列浓度 (ng/ml)	荧光强度 (F1)	荧光强度 (F2)	F2/F1
0	5904	6040	1.023
0.1	5709	6043	1.0585
0.5	4702	5685	1.2091
1.0	4085	5932	1.4521
5	1549	5916	3.8192
10	825	6393	7.7491
20	457	6493	14.2079

[0131] 5、样本检测

[0132] 用血清样本替代标准系列溶液,重复4.2、4.3步骤,将F2/F1代入标准曲线,测得6个样本的PCT值见表6:

[0133] 表6:5000~10000荧光强度的带背衬的硝酸纤维素微孔膜检测结果与罗氏电化学发光法检测结果

样本号	本发明方法 (ng/ml)	罗氏电化学发光法 (ng/ml)
1	16.5	19.17
2	5.24	3.00
3	0.56	0.40
4	1.33	1.80
5	0.40	0.54
6	0.09	0.07

[0136] 本发明方法检测结果与罗氏电化学发光法检测结果的相关性良好, $R^2=0.971$ 。

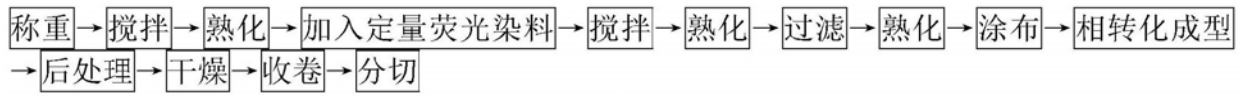


图1



图2

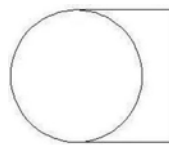


图3

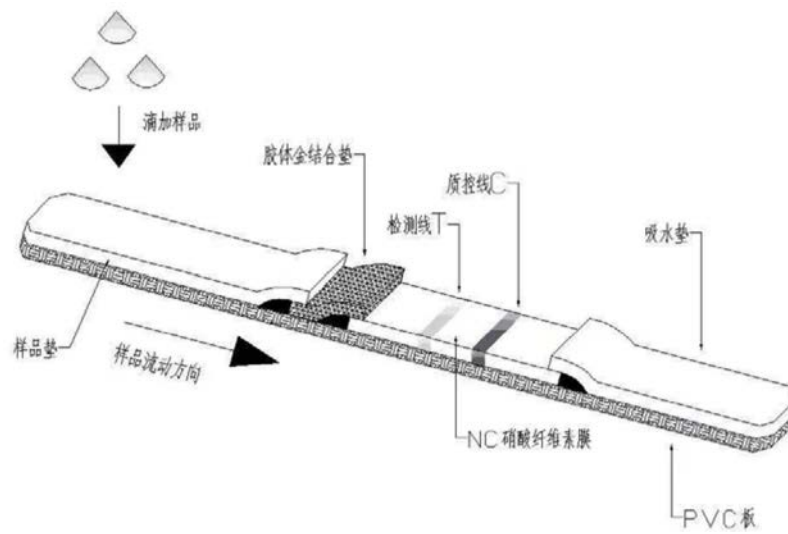


图4

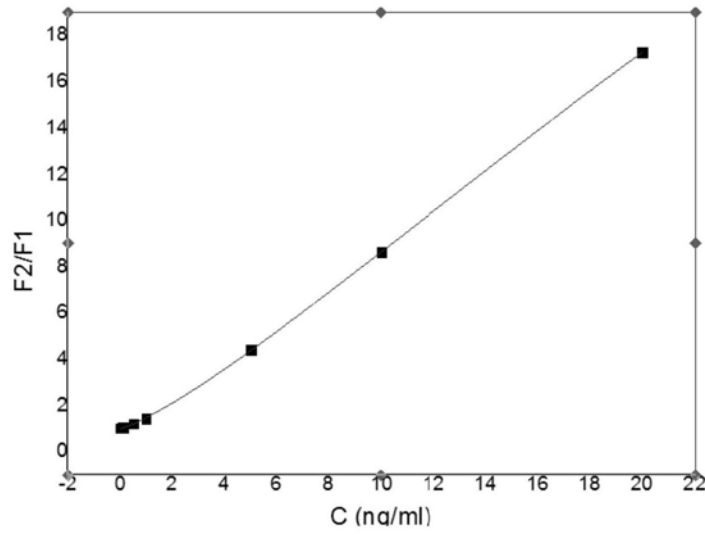


图5

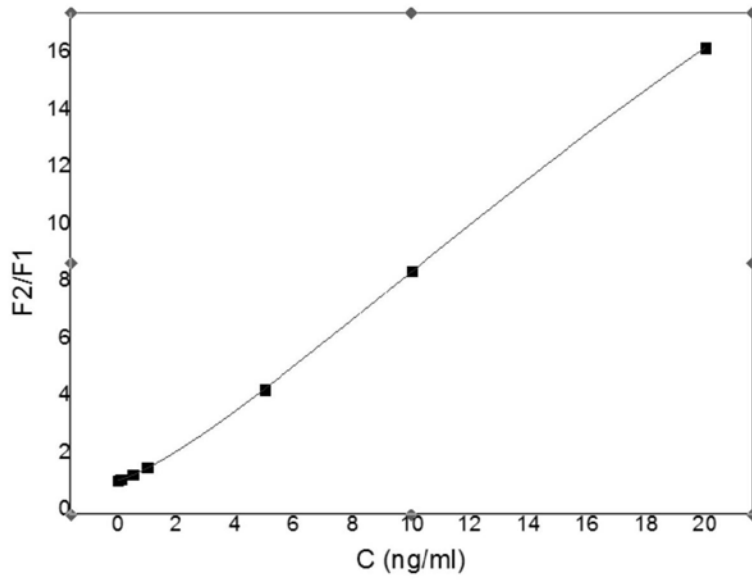


图6

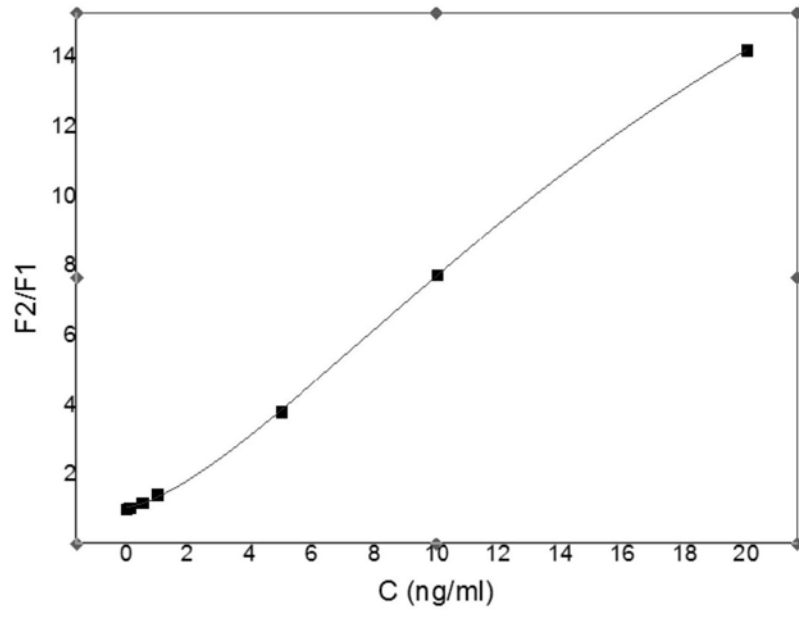


图7

专利名称(译)	一种带有荧光染料的硝酸纤维素膜及其生产方法		
公开(公告)号	CN110146693A	公开(公告)日	2019-08-20
申请号	CN201910388410.0	申请日	2019-05-09
[标]发明人	李久彤 周浩 杨明京		
发明人	郑永第 李久彤 周浩 杨明京		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 C09K11/06		
CPC分类号	C09K11/06 G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	李红团		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种含有荧光染料的硝酸纤维素微孔膜及其制备方法。将提供供体荧光分子的荧光染料直接加到铸膜液中，经相转换直接生产出一种带荧光的硝酸纤维素微孔膜，微孔膜中的荧光强度可以通过添加不同剂量的荧光素来控制调节，该微孔膜适用于生产荧光淬灭免疫层析装置。

