



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1851462 B

(45) 授权公告日 2010.12.08

(21) 申请号 200610050833.4

(22) 申请日 2006.05.18

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38号

(72) 发明人 陈欢林 孙海翔 刘圣南 张林

(74) 专利代理机构 杭州天勤知识产权代理有限公司 33224

代理人 胡红娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

EP 1587504 A, 2005.10.26, 全文.

CN 1112396 C, 2003.06.25, 全文.

陈兆安, 等. 两步法制备醋酸纤维素微滤膜

的研究. 膜科学与技术 23 3. 2003, 23(3), 11-13
页.

审查员 边昕

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 6 页

(54) 发明名称

一种纤维素吸附与转印膜的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种网络状大孔结构纤维素吸附与转印膜的制备方法,其步骤为:1) 将纤维素溶于有机溶剂中,加入添加剂和非溶剂水,室温下搅拌均匀,静置脱泡后,得纤维素制膜液,静置待用;2) 将制膜液用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上,膜液厚度为 400 ~ 600 μm ;3) 在制膜室密闭环境条件下自然挥发溶剂,直至固化成膜;4) 将上述膜浸入去离子水中浸泡;彻底交换出溶剂和添加剂后取出,自然晾干。本发明工艺可不经后处理直接制备出性能稳定、孔径较大、高蛋白质吸附量的纤维素平板多孔膜,此膜可广泛用于生化、食品、发酵、医药、生物免疫检测多种工业领域中。

1. 一种纤维素吸附与转印膜的制备方法,其步骤为:
 - 1) 将纤维素溶于有机溶剂中,加入添加剂和非溶剂水,室温下搅拌均匀,静置脱泡后,得纤维素制膜液,静置待用;
 - 2) 将制膜液用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上,膜液厚度为 400 ~ 600 μm ;
 - 3) 在制膜室密闭环境条件下自然挥发溶剂,直至固化成膜,所述的制膜室的操作条件为:温度 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40 ~ 90%;
 - 4) 将上述膜浸入去离子水中浸泡,交换出溶剂和添加剂后取出,自然晾干。
2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:所述的膜在去离子水中浸泡时间至少 20 小时。
3. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:加入原料的量以重量百分比计,为:纤维素 5 ~ 10%,有机溶剂 40 ~ 70%,添加剂 20 ~ 50%,非溶剂水 4 ~ 10%。
4. 根据权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于:所述的纤维素为二醋酸纤维素、三醋酸纤维素或二硝酸纤维素。
5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述的有机溶剂为醋酸酯、丙酮、二甲基酰胺、二甲基乙酰胺或二甲基亚砷中的一种或其混合物。
6. 根据权利要求 3 所述的制备方法,其特征在于:所述的添加剂为醇类溶剂。
7. 根据权利要求 6 所述的制备方法,其特征在于:所述的醇类溶剂为乙醇、丙醇、甘油、正丁醇、异丁醇的一种或其混合物。
8. 根据权利要求 1 或 3 所述的制备方法,其特征在于:所述的非溶剂水为去离子水。
9. 根据权利要求 1 ~ 8 任一权利要求所述的制备方法制备的纤维素微孔膜。

一种纤维素吸附与转印膜的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及应用于蛋白质转印以及免疫测试的纤维素微孔膜的制备方法,具体地说,是涉及一种网络状大孔结构纤维素吸附与转印膜的制备方法。

背景技术

[0002] 纤维素主链是由 β -1,4-糖苷键连接起来的脱水葡萄糖组成,如图 1 所示。由于纤维素的线性结构,使其本身虽然亲水但不溶于水,可溶于比较便宜的有机溶剂,如丙酮、醋酸酯,微溶于醇类。同时纤维素上的羟基的存在使其带有一定的电荷。纤维素作为分离用膜材料具有来源广泛、成膜性能良好、价格低廉等特点,但耐热性差,易于发生化学及生物降解,为避免降解,在室温下使用时 pH 应在 4 至 6.5 之间,另外,对生物降解也很敏感。

[0003] 纤维素膜的最早研究始于 1855 年 Fick 以陶瓷管浸入纤维素乙醚溶液中制成袋型半透膜,1907 年 Bechhold 发表了的一篇系统研究滤膜性质的报告,他指出用改变纤维素溶液的方法控制和改变膜的孔径的大小,从而制出不同孔径系列的平板膜,用以透析生物流体溶液。1918 年 Zsigmondy 等人首先提出以商品化规模生产硝化纤维滤膜的方法,并于 1921 年获得专利。1925 年在德国哥丁根成立了世界上第一家膜公司专门生产和经销滤膜。第二次世界大战,美英等国得到德国滤膜公司的资料,于 1947 年相继成立了工业生产机构,开始生产纤维素膜,用于水质和化学武器的检验。随着技术的发展和纤维素本身的缺点,促使人们进一步寻找新性质优良的膜。从 60 年代开始逐渐出现了聚乙烯和醋酸纤维素等其它材质的滤膜,接着又出现了硝酸纤维素和醋酸纤维素混合酯滤膜,由于它容易制备,性能优良,已成为应用最广的滤膜类型。60 年代后随着制膜技术的成熟,人们开始研究将纤维素进一步改进得到微滤膜和超滤膜。

[0004] 80 年代 Masahiro 等将纤维素溶解于甲酰胺与甲醇混合溶剂中,配制成一定浓度的纤维素制膜液,静置后,将制膜液涂覆于聚对苯二甲酸乙二醇酯布上,在空气中蒸发一定时间后,置于水溶液中,固化成膜,并彻底交换出溶剂和添加剂,获得了较好强度与水通量的纤维素膜,用于人工肾的研究。并考察了制膜条件对膜渗透性、水通量、吸附性的影响。由于纤维素膜的强度较低,90 年代德国的 Beer 等人将纤维素溶解于醋酸甲酯、乙醇和异丁醇的溶剂和非溶剂的混合液中,并添加一定量的非溶剂水,配制成一定浓度的制膜液,然后将制膜液涂于聚酯膜上,于室温下自然蒸发,使制膜液发生相分离,制得了孔径为 0.45 ~ 10.00 μm 的纤维素-聚酯复合微孔膜,从而增强了膜的强度,用于化学分析和医药诊断实验,但其强度仍不理想。

[0005] 纤维素膜上负电荷的存在使其对蛋白质和核酸分子具有极强的非特异性吸附能力,目前已经在分子杂交、免疫印迹、细胞培养和医疗诊断等领域中得到广泛应用。1965 年, Nygaard 第一次报道了硝酸纤维素 (NC) 膜对单链 DNA 的吸附性能;1975 年, Southern 采用电泳的方法将 DNA 转印到 NC 膜上,称为“Southern blotting”;1977 年, Alwine 同样采用电泳的方法将 RNA 转印到 NC 膜上,称为“Northern blotting”;1979 年, Towbin 等将蛋白质分子从 SDS-PAGE 上转印到 NC 膜上,称之为“Western blotting”,至此,纤维素膜在生物领

域的应用得到了飞速发展。

[0006] 对抗原物质进行凝胶电泳,再利用纤维素和抗原物质之间的静电作用和疏水相互作用,将抗原转印到纤维素膜表面,然后利用抗原和抗体之间的免疫作用,可对多克隆抗体进行分离纯化。目前此项技术已经在国内外得到广泛应用。如 Kurien 等用 NC 膜分离纯化抗体,将 SDS-PAGE 上的 12 条抗原转印到 NC 膜上,放入不同的免疫血清中,就能分离纯化不同的抗体。国内骆爱玲等将抗原结合到 NC 膜上,用其对甜菜碱醛脱氢酶抗体进行分离纯化,取得了很好的效果。丁铲等用纤维素膜免疫吸附法纯化鸡 IgM,重复再生使用 5 次,从 10ml IgM 阳性血清中,分别获得 1.37,1.32,1.26,1.20 和 1.17mg IgM 纯品。

[0007] 在生物学检测上的应用主要是酶联免疫斑点法,其原理是利用纤维素膜对蛋白质的强吸附能力,使抗原抗体结合在膜上,结合在纤维素膜上的酶标抗体通过将底物降解成不溶性的产物沉淀,在纤维素膜上形成斑点。而待检测抗原或抗体含量可以通过膜上斑点颜色的深浅来判断。这项技术 80 年代开始兴起。该方法精度高,不需要特殊的仪器,且做好的膜可以在一定的条件下保存而不失效,已被应用多种临床医学中。如 Sironi 等研究发现微管蛋白羧肽酶可以与吸附在纤维素膜上的微管蛋白反应,释放出酪氨酸。随着酶与底物的反应,溶液中的酪氨酸含量与反应时间且呈线性关系,可以用来测量酶的含量,这种方法比直接在水溶液中的灵敏度高 2.65 倍。Mary 等以带有 IgM 捕获酶的纤维素膜来作为登革热病毒传染的病因检测仪,其准确率达到 99%。国内王秀华用纤维素膜印迹法测定日本对虾血淋巴碱性磷酸酶 (ALP) 的相对活性,此方法比原来的试剂盒精确 100 倍。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种不需要经过复杂后处理工艺,直接通过干法制取高透过通量、可控孔径的纤维素平板膜的制膜方法,制备出性能稳定、孔径较大、高蛋白质吸附量的纤维素平板多孔膜。

[0009] 一种网络状大孔结构纤维素吸附与转印膜的制备方法,其步骤为:

[0010] 1) 将纤维素溶于有机溶剂中,加入添加剂和非溶剂水,室温下搅拌均匀,静置脱泡后,得纤维素制膜液,静置待用;

[0011] 2) 将制膜液用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上,膜液厚度为 400 ~ 600 μm ;

[0012] 3) 在制膜室密闭环境条件下自然挥发溶剂,直至固化成膜;

[0013] 4) 将上述膜浸入去离子水中浸泡;交换出溶剂和添加剂后取出,自然晾干。

[0014] 所述的制膜室的操作条件为:温度 15 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40 ~ 90%。膜在去离子水中浸泡时间至少 20 小时。

[0015] 所述的制备方法中,加入原料的量以重量百分比计,为:纤维素 5 ~ 10%,溶剂 40 ~ 70%,添加剂 20 ~ 50%,非溶剂水 4 ~ 10%。

[0016] 其中纤维素为二醋酸纤维素、三醋酸纤维素或二硝酸纤维素,有机溶剂为醋酸酯、丙酮、二甲基酰胺、二甲基乙酰胺或二甲基亚砷中的一种或其混合物,添加剂为醇类溶剂,优选为乙醇、丙醇、甘油、正丁醇、异丁醇的一种或其混合物,非溶剂水为去离子水。

[0017] 本发明方法通过适当的含量比例,充分利用添加剂进行溶胀分散、增稠作用,使制膜液有适当的分散性和稳定性,有效控制制膜液的成膜速度,从而可不经后处理直接制备出性能稳定、孔径较大、高蛋白质吸附量的纤维素平板多孔膜,此膜可广泛用于生化、食品、

发酵、医药、生物免疫检测多种工业领域中。

[0018] 本发明的优点是：

[0019] 1) 制备工艺过程简单、容易产业化。

[0020] 2) 溶剂为常见的醋酸酯、丙酮、二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺和二甲基亚砷，溶胀剂为乙醇、丙醇、甘油、正丁醇和异丁醇等，非溶剂为纯水，环境温度为 10 ~ 40℃，这就节省了高温环境所需要的能耗，这些都大大降低了生产成本。

[0021] 3) 该法制备的纤维素没有支撑层，且膜的强度较高，孔径大，分布窄，这些都大大降低了纤维素膜在应用过程中的阻力。

附图说明：

[0022] 图 1 为纤维素的分子结构式；

[0023] 图 2、图 3 分别为孔径为 0.7 μm 的纤维素膜表面和截面的电镜照片；

[0024] 图 4、图 5 分别为孔径为 6.5 μm 的纤维素膜表面和截面的电镜照片；

[0025] 图 6、图 7 分别为孔径为 8.5 μm 的纤维素膜表面和截面的电镜照片；

[0026] 图 8、图 9 分别为孔径为 13.7 μm 的纤维素膜表面和截面的电镜照片；

[0027] 图 10、图 11 分别为孔径为 18.7 μm 的纤维素膜表面和截面的电镜照片；

[0028] 图 12 为蛋白质在孔径为 0.7 μm 的纤维素膜的转印条带。

具体实施方式

[0029] 本发明将一定比例的纤维素、溶剂、添加剂及去离子水在室温下于三角瓶中充分搅拌溶解，至纤维素完全溶解，溶液保持澄清。将脱泡完毕的制膜液用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上，膜液厚度为 400 ~ 600 μm。调节制膜室的温度和相对湿度，在此条件下自然挥发溶剂，直至固化成膜。然后将初生态的膜在室温下用蒸馏水漂洗一段时间，彻底交换出溶剂和添加剂。将漂洗后的膜在室温下晾干，得到一定孔径分布的微孔膜。

[0030] 实施例 1

[0031] 将 10 克纤维素溶解在丙酮：乙醇：正丁醇 = 5 : 3 : 2 的 100 克溶剂和添加剂的混合液中，往溶液中添加 5 克去离子水，在室温下搅拌溶解，静置脱泡后用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上，膜液厚度大约 400 ~ 600 μm。调节制膜室的温度在 35℃，相对湿度为 50%，在此条件下自然挥发溶剂，直至固化成膜。然后将初生态的膜在室温下用蒸馏水漂洗 20 小时以上，彻底交换出溶剂。将漂洗后的膜在室温下晾干，得到一定孔径分布的微孔膜，膜的结构如图 2、3 所示。

[0032] 剪取直径为 7cm 的圆形膜片，放入超滤杯中，该膜首先在 0.15MPa 下 预压 30 分钟直到水通量基本稳定，然后在 0.1MPa 下测量。膜的表面形态由干膜镀金后用扫描电镜观察，膜的表面形态见附图 2。将干燥后的微孔膜放入一定浓度的蛋白质溶液中，静态吸附 1h，检测吸附前后溶液中蛋白质的变化量，算出单位面积膜的蛋白质吸附量。所得结果见表 1。

[0033] 表 1 实例 1 所制备膜的各项性能

	膜性质	平均孔径 (μm)	孔隙率 (%)	水通量 (l/h.m^2)	蛋白质吸附量 ($\mu\text{g/cm}^2$)
[0034]	实施例 1	0.7	54.97	2.07×10^3	119.17

[0035] 实施例 2

[0036] 保持溶剂和非溶剂的种类不变,改变非溶剂添加量。将 10 克纤维素溶解在丙酮:乙醇:正丁醇=5:3:2 的 100 克溶剂和添加剂的混合液中,往溶液中添加 7 克水,在室温下搅拌溶解,静置脱泡后用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上,膜液厚度大约 400 ~ 600 μm 。调节制膜室的温度在 20 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 80%。以下步骤同实例 1。所得结果见表 2 和附图 4、5。

[0037] 表 2 实例 2 所制备膜的各项性能

[0038]

	膜性质	平均孔径 (μm)	孔隙率 (%)	水通量 (l/h.m^2)	蛋白质吸附量 ($\mu\text{g/cm}^2$)
	实施例 2	6.5	80.26	10.34×10^3	64.17

[0039] 实施例 3

[0040] 将 7 克纤维素溶解在二甲基甲酰胺:甘油:异丁醇=3:4:3 的 100 克溶剂和添加剂的混合液中,往溶液中添加 8 克水,在室温下搅拌溶解,静置脱泡后用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上,膜液厚度大约 400-600 μm 。调节制膜室的温度在 35 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 80%。以下步骤同实例 1。所得结果见表 3 和附图 6、7。

[0041] 表 3 实例 3 所制备膜的各项性能

	膜性质	平均孔径 (μm)	孔隙率 (%)	蛋白质吸附量 ($\mu\text{g/cm}^2$)
[0042]	实施例 3	8.5	76.81	60.90

[0043] [0043] 实施例 4

[0044] 将 5 克纤维素溶解在醋酸酯:丙醇:正丁醇=4:4:2 的 100 克溶剂和添加剂的混合液中,往溶液中添加 7 克水,在室温下搅拌溶解,静置脱泡后用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上,膜液厚度大约 400 ~ 600 μm 。调节制膜室的温度在 20 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 70%。以下步骤同实例 1。所得结果见表 4 和附图 8、9。

[0045] 表 4 实例 4 所制备膜的各项性能

	膜性质	平均孔径 (μm)	孔隙率 (%)	蛋白质吸附量 ($\mu\text{g/cm}^2$)
[0046]	实施例 4	13.7	75.98	57.50

[0047] 实施例 5

[0048] 将 7 克纤维素溶解在二甲基亚砷:乙醇:正丁醇=4:3:3 的 100 克溶剂和添加剂的混合液中,往溶液中添加 6 克水,在室温下搅拌溶解,静置脱泡后用刮刀刮在洁净平

整的玻璃板上,膜液厚度大约 400-600 μm 。调节制膜室的温度在 30 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 70%。以下步骤同实例 1。所得结果见表 5 和附图 10、11

[0049] 表 5 实例 5 所制备膜的各项性能

	膜性质	平均孔径 (μm)	孔隙率 (%)	蛋白质吸附量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
[0050]	实施例 5	18.7	75.15	54.50

[0051] 将重组别藻蓝蛋白 (rAPC) 做电泳分析,然后转印到实施例 1 制备的孔径为 0.7 μm 的纤维素膜上,附图 12 为 rAPC 在膜上的转印条带。

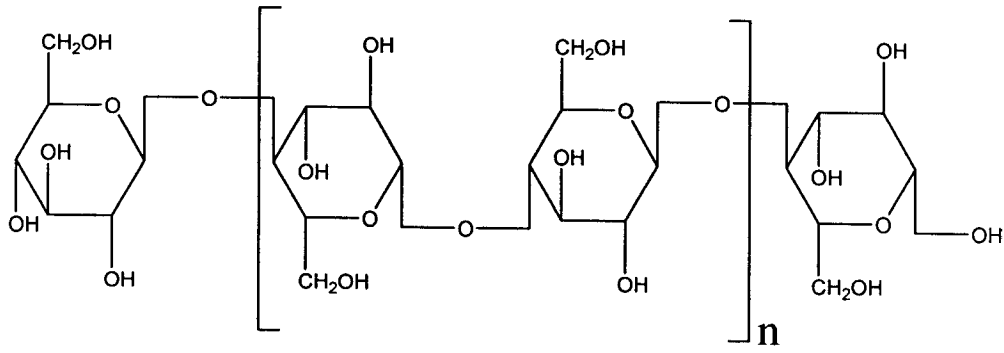


图 1

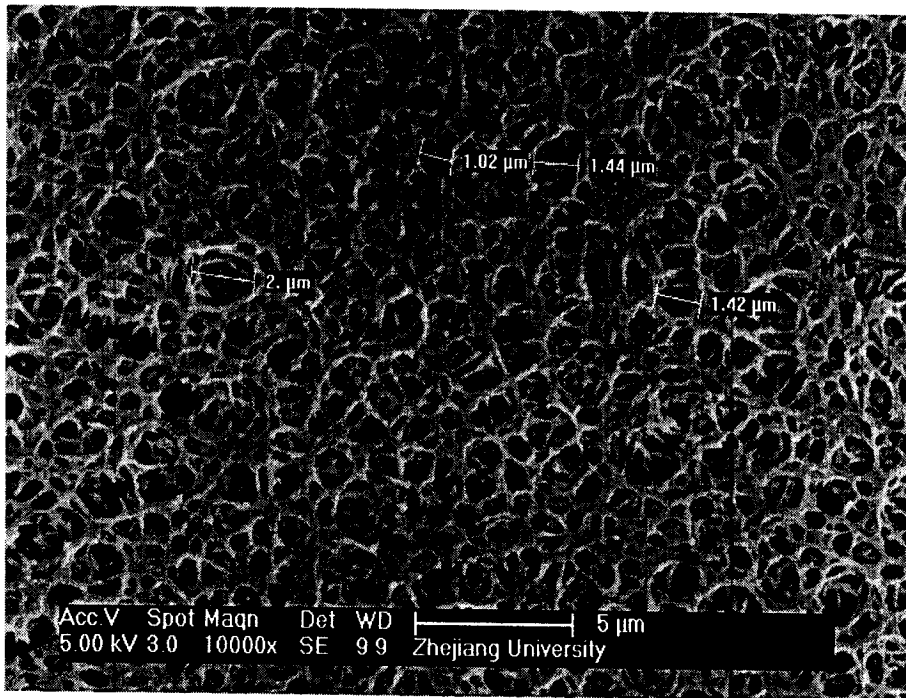


图 2

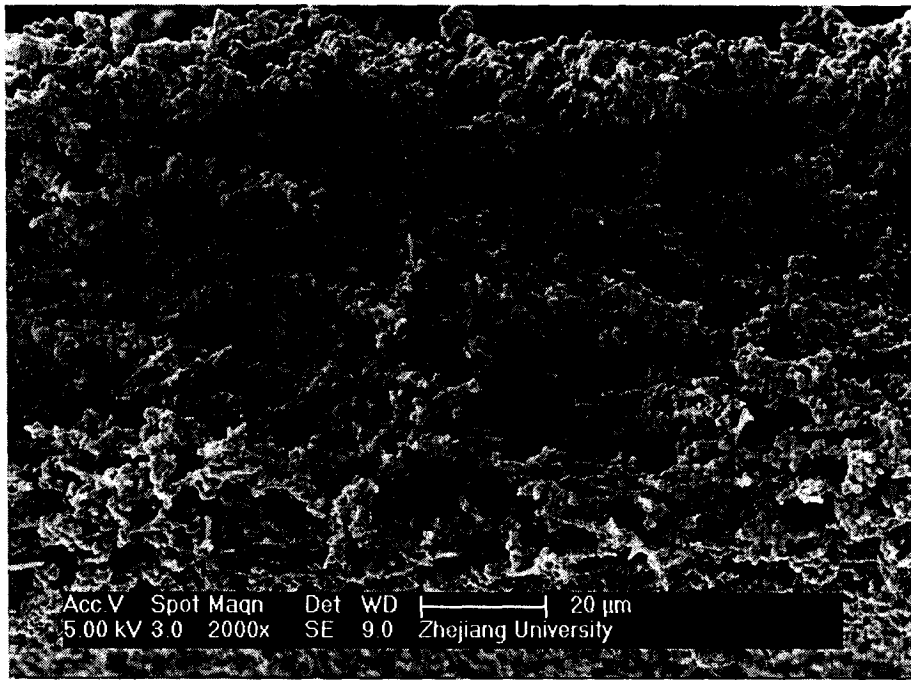


图 3

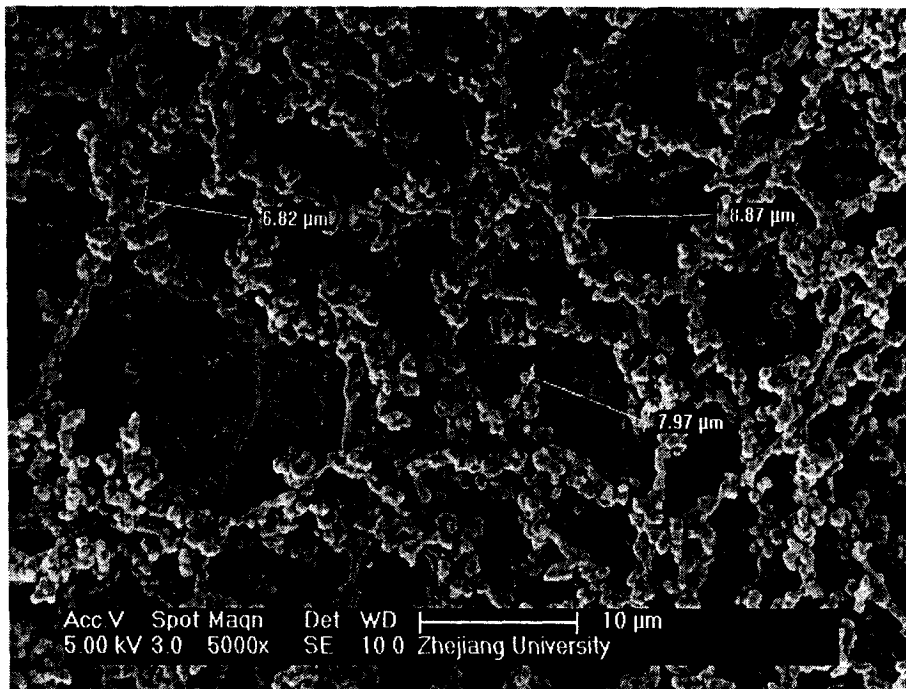


图 4

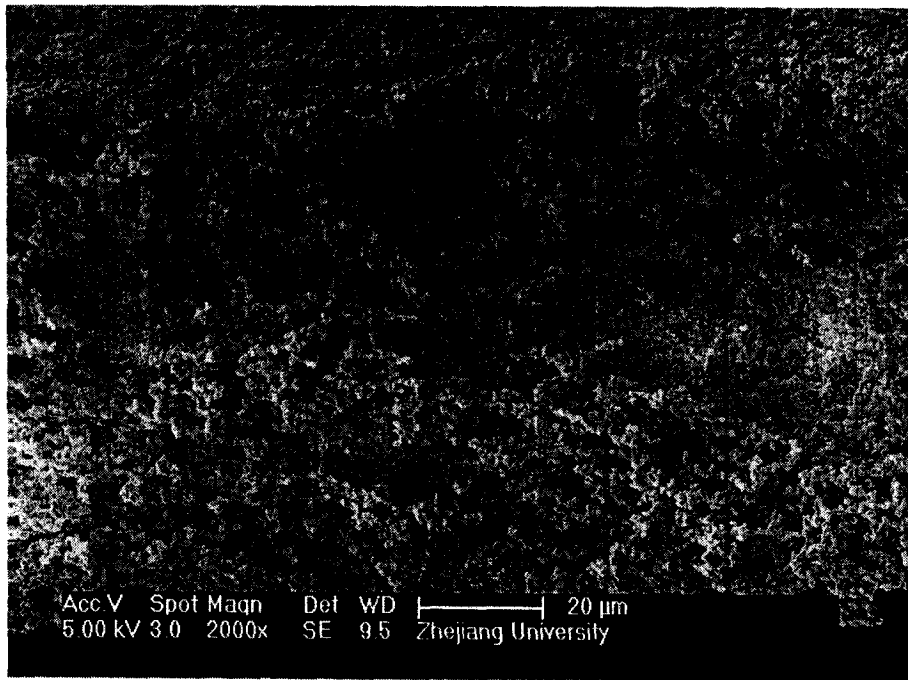


图 5

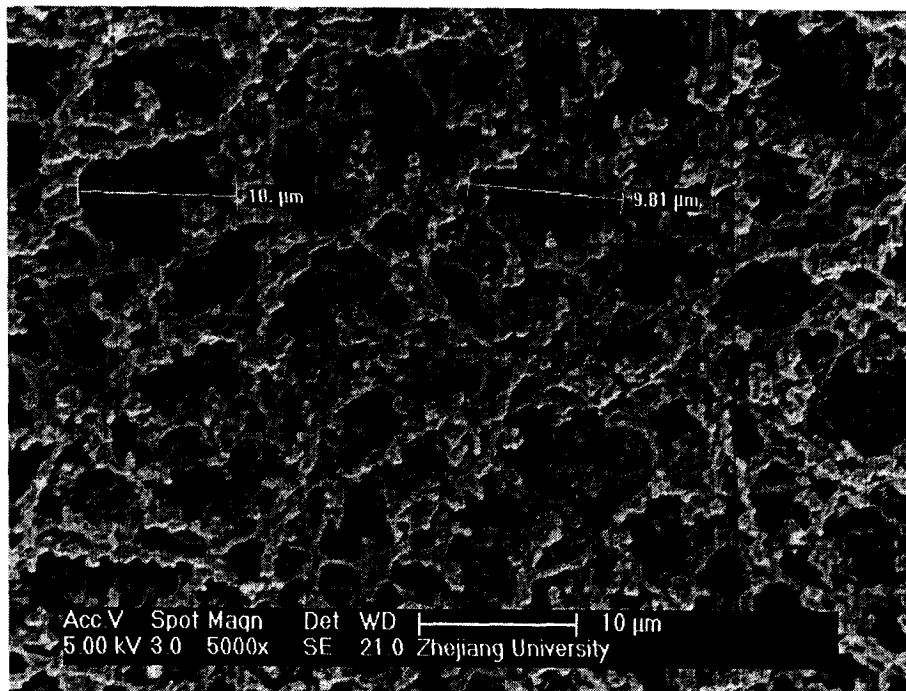


图 6

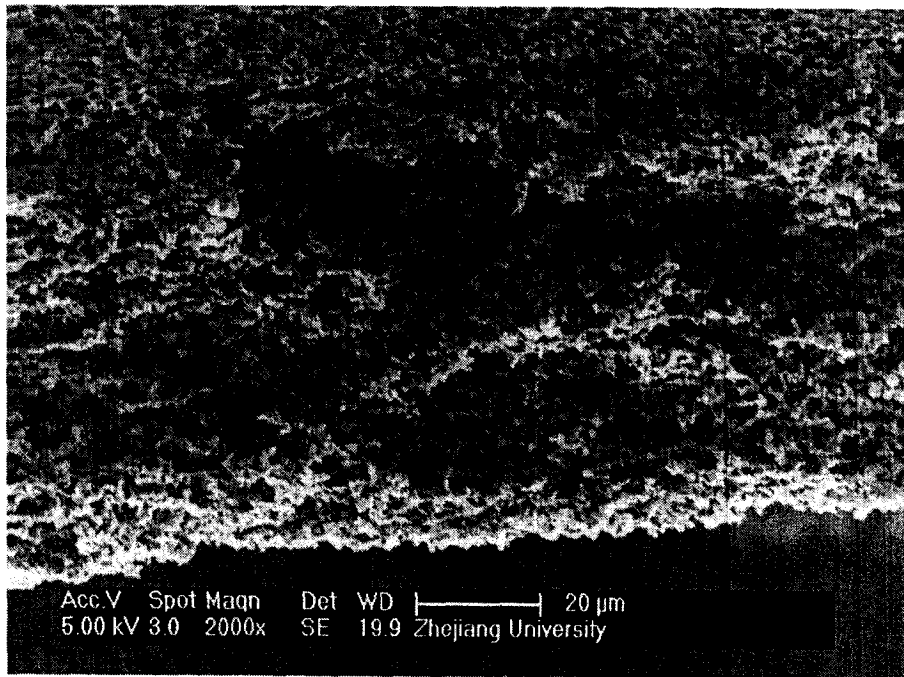


图 7

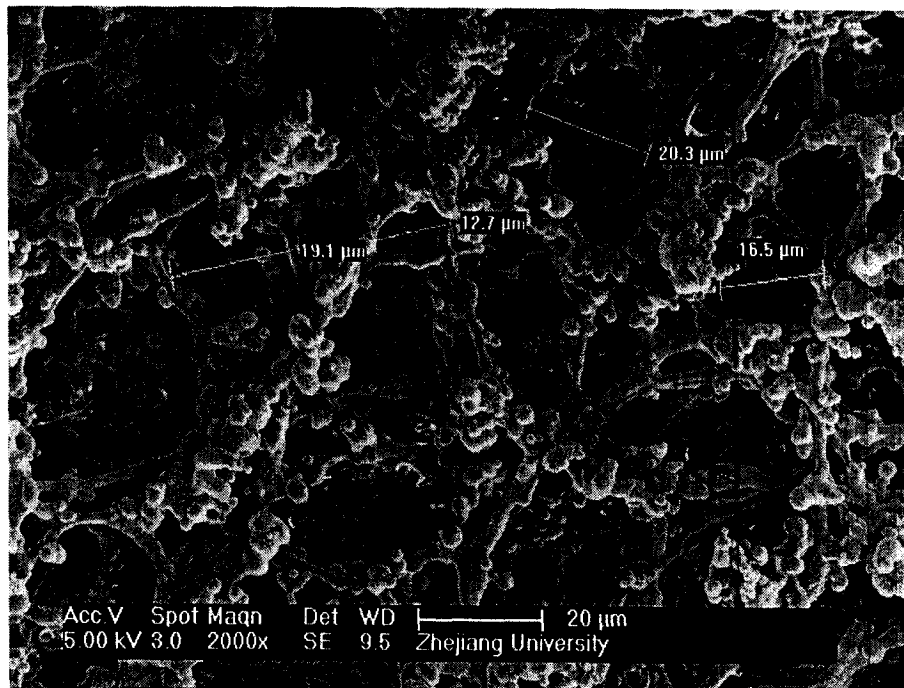


图 8

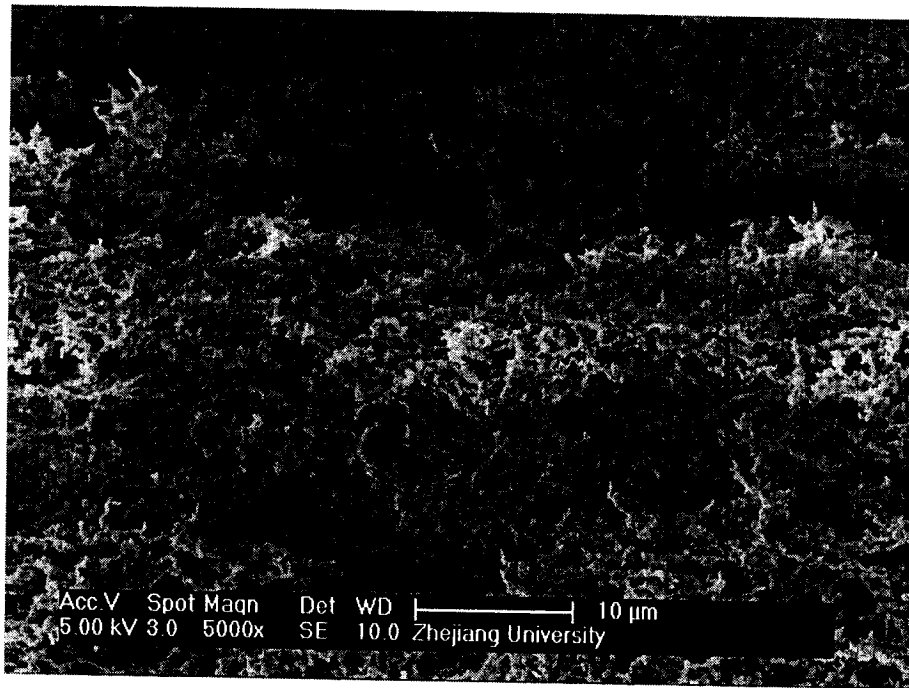


图 9

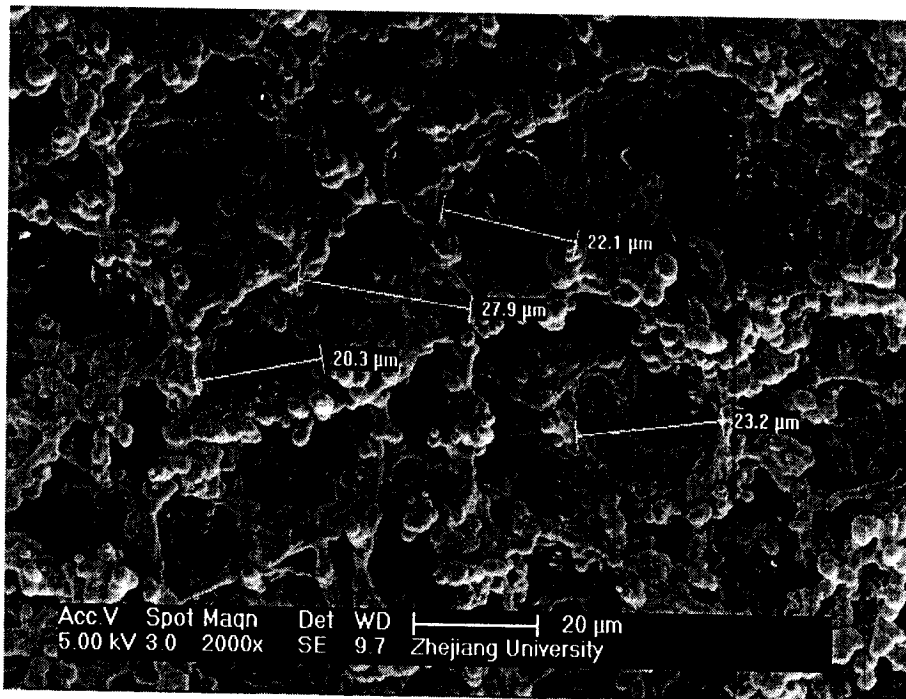


图 10

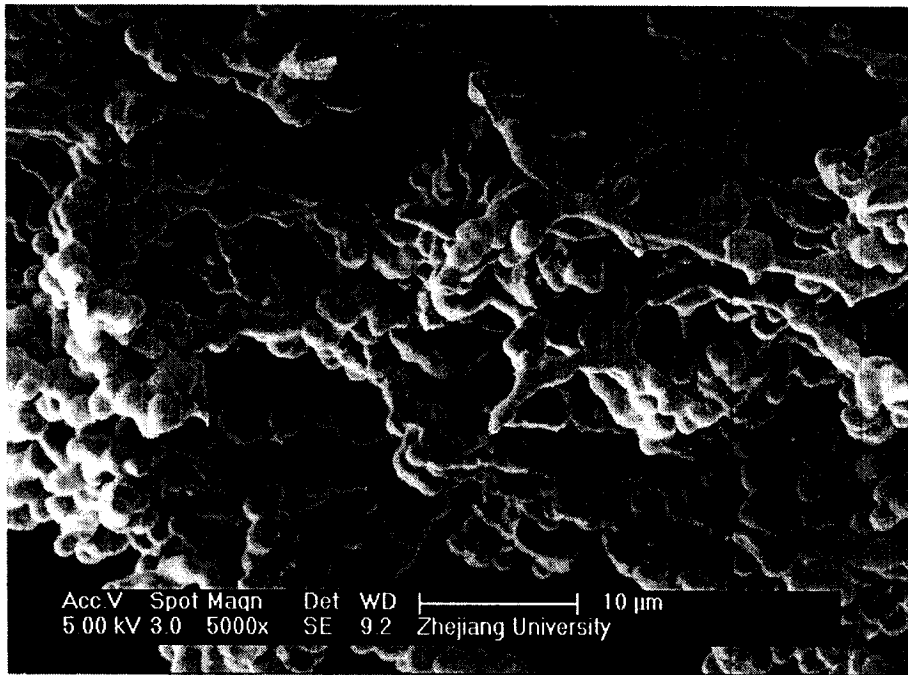


图 11

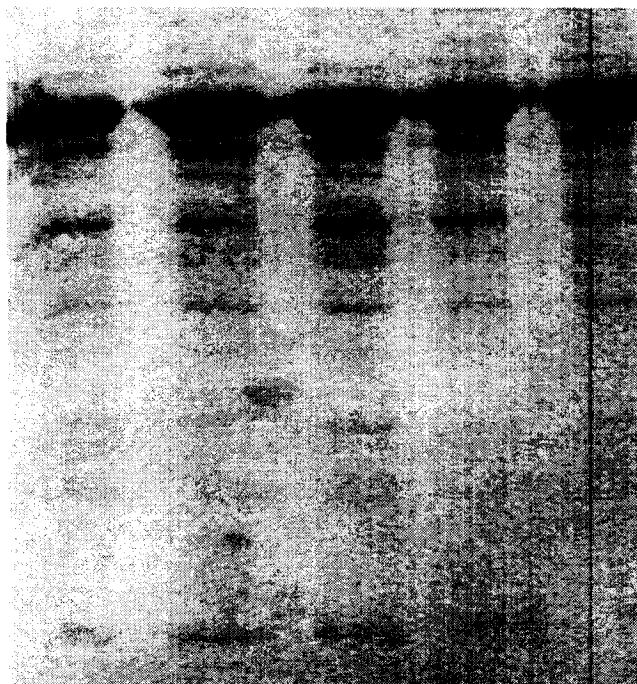


图 12

专利名称(译)	一种纤维素吸附与转印膜的制备方法		
公开(公告)号	CN1851462B	公开(公告)日	2010-12-08
申请号	CN200610050833.4	申请日	2006-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	陈欢林 孙海翔 刘圣南 张林		
发明人	陈欢林 孙海翔 刘圣南 张林		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/531		
代理人(译)	胡红娟		
其他公开文献	CN1851462A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种网络状大孔结构纤维素吸附与转印膜的制备方法，其步骤为：1)将纤维素溶于有机溶剂中，加入添加剂和非溶剂水，室温下搅拌均匀，静置脱泡后，得纤维素制膜液，静置待用；2)将制膜液用刮刀刮在洁净平整的玻璃板上，膜液厚度为400~600μm；3)在制膜室密闭环境条件下自然挥发溶剂，直至固化成膜；4)将上述膜浸入去离子水中浸泡；彻底交换出溶剂和添加剂后取出，自然晾干。本发明工艺可不经后处理直接制备出性能稳定、孔径较大、高蛋白质吸附量的纤维素平板多孔膜，此膜可广泛用于生化、食品、发酵、医药、生物免疫检测多种工业领域中。

膜性质	平均孔径	孔隙率	水通量	蛋白质吸附量
	(μm)	(%)	(l/h.m ²)	(μg/cm ²)
实施例1	0.7	54.97	2.07×10 ³	119.17