



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113125390 A

(43)申请公布日 2021.07.16

(21)申请号 201911406553.6

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 暨南大学

地址 510632 广东省广州市天河区黄埔大道西601号

(72)发明人 尹芝南 付强强 吴扬哲

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 苏运贞

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

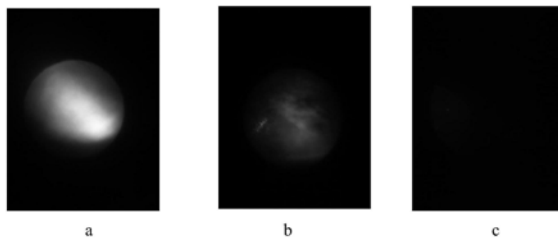
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种背景荧光消除的核孔膜及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种背景荧光消除的核孔膜及其制备方法与应用。本发明通过将核孔膜浸入染料溶液中染色,加热,然后冷却至室温;随后,去除染色后的核孔膜表面残余的染料,然后洗涤核孔膜,得到背景荧光消除的核孔膜。本发明通过控制染色的温度、时间等因素,使染料扩散进入核孔膜内部,在不影响核孔膜的平整度及孔径的情况下,有效地消除核孔膜的背景荧光,为开发基于核孔膜的新型荧光生物学传感器奠定了基础,本发明适用于不同孔径,材料和厚度的背景荧光消除核孔膜的制备。本发明提供的背景荧光消除的核孔膜可应用于免疫荧光分析中。



1. 一种背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于包括如下步骤:
  - (1) 染色:将核孔膜浸入染料溶液中,加热,然后冷却至室温;
  - (2) 清洗:去除染色后的核孔膜表面残余的染料,然后洗涤核孔膜,得到背景荧光消除的核孔膜。
2. 根据权利要求1所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的加热的条件为120~140℃加热30~120min;进一步为130℃加热60min。
3. 根据权利要求1所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
步骤(2)中所述的去除的方法为无水乙醇处理和还原清洗剂处理中的至少一种;进一步为先用无水乙醇处理,接着用还原清洗剂处理。
4. 根据权利要求3所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
所述的无水乙醇处理的步骤为:用无水乙醇初步清洗,接着置于无水乙醇中超声处理;  
所述的还原清洗剂清洗方法为将核孔膜放入还原清洗剂中水浴。
5. 根据权利要求4所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
所述的超声处理的条件为35~45KHz处理20~40min;进一步为于40KHz处理30min;  
所述的还原清洗剂的pH为3.5~5.0;  
所述的水浴条件为70~90℃水浴18~22min;进一步为80℃水浴20min。
6. 根据权利要求1所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的染料的颜色包括但不限于黑色、紫色、蓝色、青色,所述的染料的颜色与荧光分析的激发光相应:当荧光分析使用波长为405nm的激发光时,所述的染料的颜色为黑色;当荧光分析使用波长为450nm的激发光时,所述的染料的颜色为紫色;当荧光分析使用波长为488nm的激发光时,所述的染料的颜色为蓝色;当荧光分析使用波长为532nm的激发光时,所述的染料的颜色为青色。
7. 根据权利要求1所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的染料溶液通过如下方法制备:将染料加入水中,然后加入酸调节pH,加热,搅拌,使染料溶解于水中;  
所述的染料溶液的浓度为质量体积比1%~10%;进一步为质量体积比1.2%;所述的水为超纯水;  
所述的pH为4~7;进一步为6.4。
8. 根据权利要求1~7中任一项所述的背景荧光消除的核孔膜的制备方法,其特征在于:  
步骤(1)中所述的核孔膜为水平放置;  
步骤(1)中所述的核孔膜在加热过程中为静止状态;  
步骤(1)中所述的冷却为自然冷却;  
步骤(1)中所述的室温为16~30℃;进一步为24~26℃。
9. 一种背景荧光消除的核孔膜,其特征在于:通过权利要求1~8中任一项所述的制备方法制备得到。
10. 权利要求9所述的背景荧光消除的核孔膜在免疫荧光分析中的应用。

## 一种背景荧光消除的核孔膜及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于核孔膜技术领域,尤其涉及一种背景荧光消除的核孔膜及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 核孔膜是高分子透明薄膜经加速器重离子束流辐照后再经化学蚀刻处理制备出的一种优质微孔膜,是一种筛孔型过滤材料,具有微孔近似圆柱形且孔型圆整,孔径均匀,微孔尺寸和密度可按需求严格控制等优点。核孔膜在电子、食品、化学、制药等工业和生物、医学、环境科学、分析检测等领域有着广泛的应用。核孔膜制备材料主要是近似透明的聚碳酸酯(PC)和聚对苯二甲酸(PET)等材料。对核孔膜实现特异性的染色,使其对一定的波长范围波长的光产生截止效果,在开发新的生物学传感器,食品加工和化学工艺等领域具有重要的意义。然而,由于核孔膜的原材料PET和PC等在激发光下会有明显的背景荧光,现有的核孔膜很难应用于免疫荧光分析。因此,急需一种背景荧光消除的核孔膜。

### 发明内容

[0003] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供一种背景荧光消除的核孔膜。

[0004] 本发明的另一目的在于提供上述背景荧光消除的核孔膜的制备方法。该方法适用于不同孔径,材料和厚度的背景荧光消除核孔膜的制备,且对核孔膜表面平整度,孔径大小没有影响。

[0005] 本发明的再一目的在于提供上述背景荧光消除的核孔膜的应用。

[0006] 为实现上述目的,本发明通过下述技术方案实现:

[0007] 一种背景荧光消除的核孔膜的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 染色:将核孔膜浸入染料溶液中,加热,然后冷却至室温;

[0009] (2) 清洗:去除染色后的核孔膜表面残余的染料,然后洗涤核孔膜,得到背景荧光消除的核孔膜。

[0010] 步骤(1)中所述的核孔膜优选为水平放置。

[0011] 步骤(1)中所述的核孔膜在加热过程中优选为静止状态,以防止核孔膜表面出现裂纹。

[0012] 步骤(1)中所述的染料优选为分散染料。

[0013] 步骤(1)中所述的染料的颜色包括但不限于黑色、紫色、蓝色、青色,所述的染料的颜色与荧光分析的激发光相应:当荧光分析使用波长为405nm的激发光时,所述的染料的颜色为黑色;当荧光分析使用波长为450nm的激发光时,所述的染料的颜色为紫色;当荧光分析使用波长为488nm的激发光时,所述的染料的颜色为蓝色;当荧光分析使用波长为532nm的激发光时,所述的染料的颜色为青色。

[0014] 步骤(1)中所述的染料溶液优选通过如下方法制备:将染料加入水中,然后加入酸

调节pH,加热,搅拌,使染料溶解于水中。

[0015] 所述的染料溶液的浓度为质量体积比(g:mL)1%~10%;更优选为质量体积比(g:mL)1.2%。

[0016] 所述的水优选为超纯水。

[0017] 所述的酸优选为冰醋酸(98%)。

[0018] 所述的pH优选为4~7,更优选为6.4。

[0019] 所述的加热温度优选为加热至50~70℃;更优选为加热至60℃。

[0020] 步骤(1)中所述的加热的条件优选为120~140℃加热30~120min;更优选为130℃加热60min。

[0021] 步骤(1)中所述的冷却优选为自然冷却。

[0022] 步骤(1)中所述的室温优选为16~30℃;更优选为24~26℃。

[0023] 步骤(2)中所述的去除的方法优选为无水乙醇处理和还原清洗剂处理中的至少一种;更优选为先用无水乙醇处理,接着用还原清洗剂处理。

[0024] 所述的无水乙醇处理的步骤优选包括先用无水乙醇初步清洗,接着置于无水乙醇中超声处理。

[0025] 所述的超声处理的的条件优选为35~45KHz处理20~40min;更优选为于40KHz处理30min。

[0026] 所述的还原清洗剂处理的步骤优选为将核孔膜放入还原清洗剂中水浴。

[0027] 所述的还原清洗剂的pH优选为3.5~5.0;更优选为3.5~4.0。

[0028] 所述的水浴条件优选为于70~90℃水浴18~22min;更优选为80℃水浴20min。

[0029] 步骤(2)中所述的洗涤优选为用清水洗涤。

[0030] 一种背景荧光消除的核孔膜,通过上述方法制备得到。

[0031] 所述的背景荧光消除的核孔膜在免疫荧光分析中的应用。

[0032] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0033] 1、本发明提供了一种背景荧光消除的核孔膜的制备方法,包括染色、清洗等步骤,通过控制染色的温度、时间等因素,使染料扩散进入核孔膜内部,在不影响核孔膜的平整度及孔径的情况下,有效地消除核孔膜的背景荧光,为开发基于核孔膜的新型荧光生物学传感器奠定了基础。

[0034] 2、本方法提供的制备方法操作简便,适用于不同孔径,材料和厚度的背景荧光消除核孔膜的制备。

## 附图说明

[0035] 图1是染色温度对核孔膜背景荧光强度的影响结果图:其中,a是未染色的核孔膜(原膜)的背景荧光图;b是对比例1制备(99℃染色)的核孔膜的背景荧光图;c是实施例1制备(130℃染色)的核孔膜的背景荧光图。

[0036] 图2是荧光光谱仪分析染色温度对核孔膜背景荧光强度的影响结果图。

[0037] 图3是标尺为10μm时核孔膜的扫描电镜图:其中,a是未染色的核孔膜(原膜)的扫描电镜图;b是实施例1制备(130℃染色)的核孔膜的扫描电镜图。

[0038] 图4是核孔膜用于免疫荧光分析时的背景荧光图:其中,a是对比例1制备(99℃染

色)的核孔膜用于免疫荧光分析时的背景荧光图;b是实施例1制备(130℃染色)的核孔膜用于免疫荧光分析时的背景荧光图。

### 具体实施方式

[0039] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0040] 实施例1黑色背景荧光消除的核孔膜的制备

[0041] (1)取黑色分散染料(TERASIL BLACK BFE,亨斯迈化工贸易(上海)有限公司)12g,加入超纯水1L,加入1.2mL冰醋酸(98%),调节pH至6.4,得到质量体积分数为1.2%、pH为6.4的黑色分散染料溶液,然后,加热至60℃,搅拌,使黑色分散染料溶解于水中;

[0042] (2)将核孔膜(武威科近新发技术有限责任公司,PET272603)水平置于高温反应釜中,加入步骤(1)得到的黑色分散染料溶液,加热至130℃,保持1h,自然冷却至24~26℃;

[0043] (3)取出核孔膜,用无水乙醇初步清洗后,置于无水乙醇中超声处理(40KHz)30min;

[0044] (4)取出步骤(3)得到的核孔膜放入pH为3.5~4.0(150毫升还原清洗剂加入2mL冰醋酸98%)的还原清洗剂(东莞市洁威实业有限公司,JV-810)中,80℃水浴20min;

[0045] (5)取出核孔膜,用水洗涤,得到背景荧光消除的核孔膜。

[0046] 实施例2蓝色背景荧光消除的核孔膜的制备

[0047] (1)取蓝色分散染料(分散蓝2B,绍兴正吉染料有限公司)12g,加入超纯水1L,加入1.2mL冰醋酸(98%)调节pH至6.4,得到质量体积分数为1.2%、pH为6.4的蓝色分散染料溶液,然后,加热至60℃,搅拌,使蓝色分散染料溶解于水中;

[0048] (2)将核孔膜(武威科近新发技术有限责任公司,PET272603)水平置于高温反应釜中,加入步骤(1)得到的蓝色分散染料溶液,加热至130℃,保持1h,自然冷却至24~26℃;

[0049] (3)取出核孔膜,用无水乙醇初步清洗后,置于无水乙醇中超声处理(40KHz)30min;

[0050] (4)取出步骤(3)得到的核孔膜,放入pH 3.5~4.0(150毫升还原清洗剂加入2mL冰醋酸98%)的还原清洗剂(东莞洁威化工有限公司,JV-810)中,80℃水浴20min;

[0051] (5)取出核孔膜,用清水洗涤,得到背景荧光消除的核孔膜。

[0052] 对比例1黑色背景荧光消除的核孔膜的制备

[0053] 对比例1的制备方法与实施例1相同,区别仅在于步骤(2)中染色温度由130℃变为99℃。

[0054] 效果实施例1背景荧光消除的核孔膜的质量监控

[0055] (1)质量监控方法:

[0056] ①采用原子力显微镜对实施例1、实施例2、对比例1制备的核孔膜染色前和染色后的表面平整度及孔径进行测量;

[0057] ②使用游标卡尺对实施例1、实施例2、对比例1制备的核孔膜染色前和染色后的厚度进行测量;

[0058] ③使用荧光光谱仪对实施例1、实施例2、对比例1制备的核孔膜的背景荧光进行测量;

[0059] ④使用分光光度计对实施例1、实施例2、对比例1制备的核孔膜的吸光度进行测量。

[0060] (2)、结果:

[0061] ①实施例1制备的核孔膜表面保持光滑;核孔膜的孔径保持不变(染色前的孔径为 $3\pm 0.2\mu\text{m}$ ,染色后的孔径为 $3\pm 0.2\mu\text{m}$ );核孔膜的厚度保持不变(染色前为 $20\pm 0.2\mu\text{m}$ ,染色后为 $20\pm 0.2\mu\text{m}$ );405nm激发光照射核孔膜,其背景荧光强度如图2所示:小于11;400~700nm范围内,核孔膜的吸光度大于1.6;

[0062] ②实施例2制备的核孔膜表面保持光滑;核孔膜的孔径保持不变(染色前的孔径为 $3\pm 0.2\mu\text{m}$ ,染色后的孔径为 $3\pm 0.2\mu\text{m}$ );核孔膜的厚度保持不变(染色前为 $20\pm 0.2\mu\text{m}$ ,染色后为 $20\pm 0.2\mu\text{m}$ );488nm激发光照射核孔膜,其背景荧光强度小于8;500~700nm范围内,核孔膜的吸光度大于1.7;

[0063] ③对比例1制备的核孔膜表面保持光滑;核孔膜的孔径保持不变(染色前的孔径为 $3\pm 0.2\mu\text{m}$ ,染色后的孔径为 $3\pm 0.2\mu\text{m}$ );核孔膜的厚度保持不变(染色前为 $20\pm 0.2\mu\text{m}$ ,染色后为 $20\pm 0.2\mu\text{m}$ );405nm激发光照射核孔膜,其背景荧光强度在800左右;400~700nm范围内,核孔膜的吸光度小于0.9。

[0064] 效果实施例2核孔膜的扫描电子显微镜测试

[0065] 对未染色的核孔膜(原膜)以及实施例1制备的核孔膜进行扫描电子显微镜测试,结果如图3所示:表明实施例1制备的背景荧光消除的核孔膜平整度、孔径和厚度和原膜一致。

[0066] 效果实施例3核孔膜用于免疫荧光反应测试背景荧光干扰

[0067] 将实施例1以及对比例1制备的核孔膜用于免疫荧光反应,检测核孔膜的背景荧光,结果如图4所示,表明:染色温度为130℃时的染色效果显著好于染色温度为99℃时,对比例1制备的核孔膜由于染色温度过低从而降低染料扩散到核孔膜纤维的速度和染色深度,导致无法消除核孔膜的背景荧光。

[0068] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

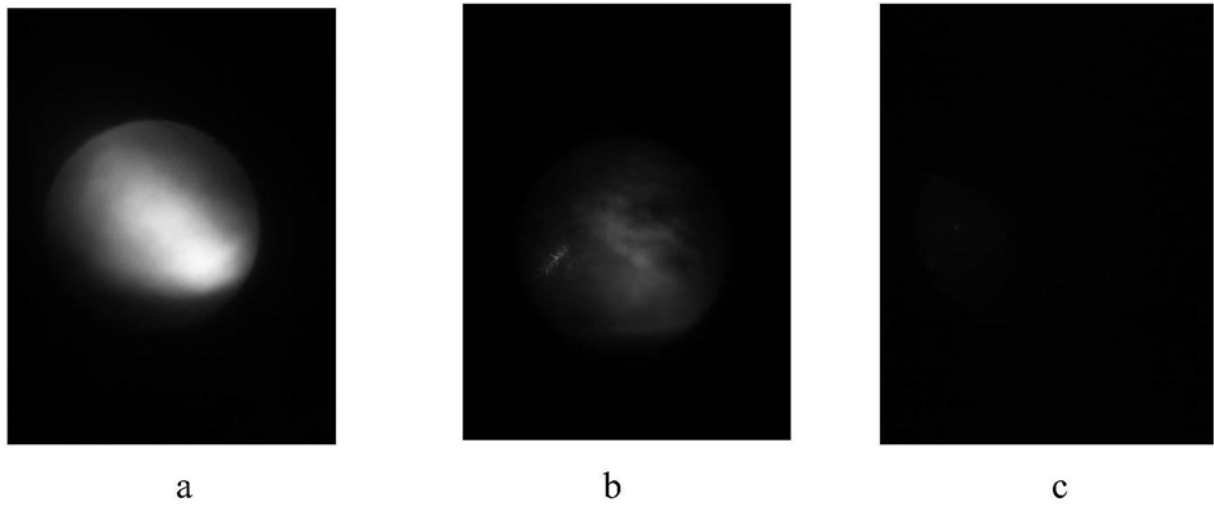


图1

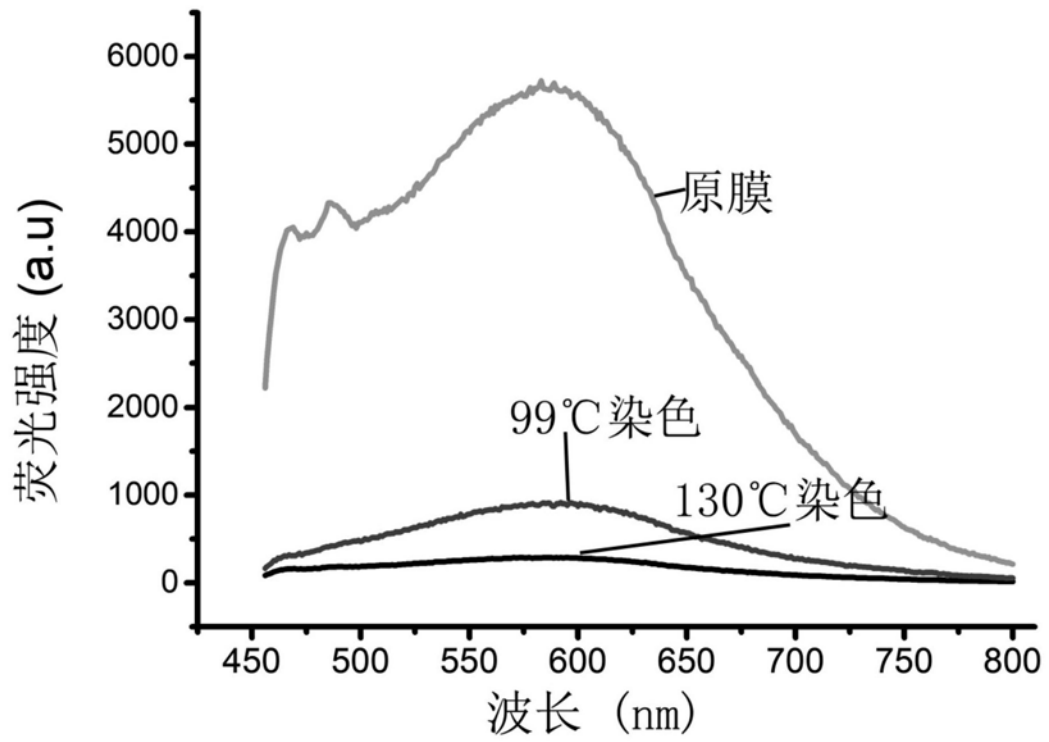
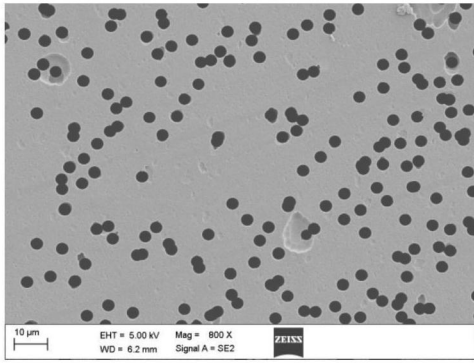
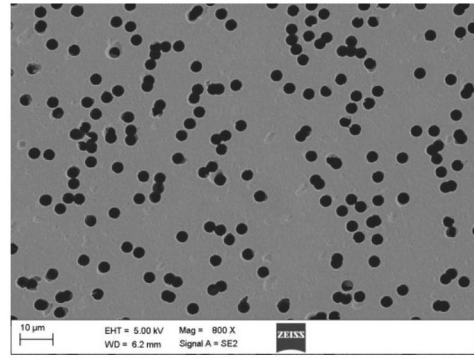


图2

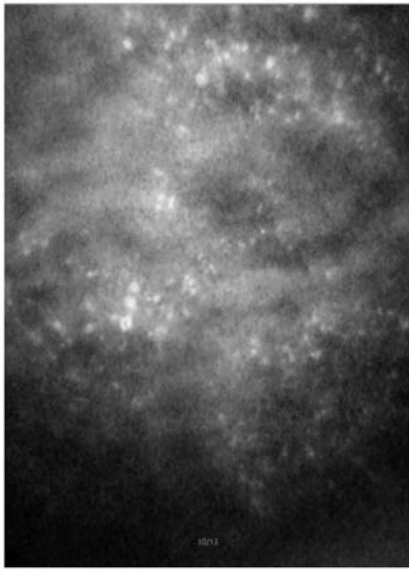


a



b

图3



a



b

图4