



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107991478 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201610954689.0

(22)申请日 2016.10.27

(71)申请人 广东交通职业技术学院

地址 510650 广东省广州市天河区天源路
789号

(72)发明人 齐攀 李莹 钟金钢 马骁 徐超
朱强 邬志锋 徐操喜

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 杨炳财 屈慧丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

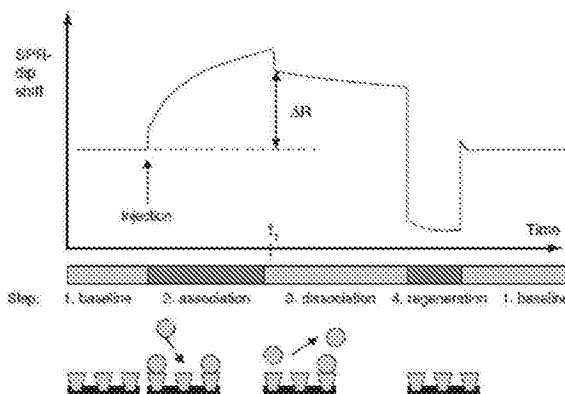
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法

(57)摘要

本发明属于生物样品检测领域,尤其涉及一种SPR生物传感器及其应用于玉米赤霉烯酮免疫检测的方法。本发明提供了一种SPR生物传感器,包括:生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统;所述光路系统和所述电路系统集成在一起。本发明还提供了一种利用上述SPR生物传感器对玉米赤霉烯酮的免疫检测方法。本发明提供的技术方案中,用电压控制型高精度振镜进行角度扫描,由光电池对反射光强进行检测,检测过程中不需要样品标记、抗体纯化等步骤,方法简单、快速,装置便携,解决了传统的玉米赤霉烯酮检测方法仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂的技术缺陷,满足了现场快速检测研究的要求。



CN 107991478 A

1. 一种SPR生物传感器,其特征在于,所述SPR生物传感器包括:生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统;

所述光路系统和所述电路系统集成在一起。

2. 根据权利要求1所述的SPR生物传感器,其特征在于,所述软件平台包括:进样控制单元、定量检测单元、数据分析单元和动力学检测单元;

所述进样控制单元控制待检测物质的进样量,所述定量检测单元和所述动力学检测单元对待检测物质进行检测后,所述数据分析单元接收检测结果并进行分析。

3. 根据权利要求1所述的SPR生物传感器,其特征在于,所述数据分析单元包括:定量检测数据分析单元、动力学检测数据分析单元和降噪单元。

4. 根据权利要求1所述的SPR生物传感器,其特征在于,所述光路系统包括:电压控制型振镜和光电池;

所述电压控制型振镜扫描所述生物传感芯片后,所述光电池接受反射光进行检测。

5. 一种利用权利要求1至4任意一项所述的SPR生物传感器对玉米赤霉烯酮的免疫检测方法,其特征在于,所述免疫检测方法包括:

步骤一、预处理:生物传感芯片依次进行基准调零、表面自组修饰和活化;

步骤二、探针固定:在完成预处理的所述生物传感芯片表面固定生物探针;

步骤三、酯键封闭;

步骤四、竞争抑制免疫检测。

6. 根据权利要求5所述的免疫检测方法,其特征在于,所述表面自组修饰的方法为:所述生物传感芯片的表面浸泡在巯基十一酸乙醇溶液和巯基乙酸乙醇溶液的混合液中2h;

所述巯基十一酸乙醇溶液和巯基乙酸乙醇溶液的质量比为1:9,所述巯基十一酸乙醇溶液和巯基乙酸乙醇溶液的浓度均为1mol/L;

所述芯片活化的方法为:基准调零完成的生物传感芯片浸泡在NHS溶液和EDC溶液的混合液中约20min;

所述NHS溶液和EDC溶液的体积比为1:1,所述NHS溶液和EDC溶液的浓度均为0.1mol/L。

7. 根据权利要求5所述的免疫检测方法,其特征在于,所述生物探针为ZEN衍生物,所述ZEN衍生物为ZEN-BSA;

所述生物探针的浓度为100mg/L,所述探针固定的时间约为30min。

8. 根据权利要求5所述的免疫检测方法,其特征在于,所述酯键封闭的方法为:完成探针固定的所述生物传感芯片浸泡在pH为8.5的1mol/L的乙醇胺溶液中3~5min后,用PBS冲洗所述生物传感芯片。

9. 根据权利要求5所述的免疫检测方法,其特征在于,所述免疫检测方法还包括:芯片再生,所述芯片再生步骤在所述免疫检测步骤后进行;

用解离液将完成免疫检测步骤的所述生物传感芯片与抗原-抗体结合物解离。

10. 根据权利要求9所述的免疫检测方法,其特征在于,所述解离液为SDS-HCl。

一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物样品检测领域,尤其涉及一种SPR生物传感器及其应用于玉米赤霉烯酮免疫检测的方法。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)是自然界中常见的真菌毒素之一,1962年Stob等首先从发霉的玉米中分离得到,并将其命名为玉米赤霉烯酮。ZEN具有较强生殖毒性和致畸作用,可通过污染的谷物及其制品、污染的肉、奶、蛋等动物性食品进入动物或人体内,会引起动物发生雌激素亢进症,导致动物不孕或流产,对猪、家禽、反刍动物影响较大,给畜牧业带来很大经济损失;在急性中毒的条件下,对人体神经系统、心脏、肾脏、肝和肺具有有毒害作用,严重威胁人类健康。因此,对食物中ZEN的检测是防止其危害食品安全的重要手段。

[0003] 传统的ZEN检测研究方法包括:高效液相-质谱联用色谱法(High performance liquid chromatography-Mass sepectrum, HPLC-MS)、酶联免疫吸附检测技术(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)以及胶体金免疫层析检测方法等。传统的ZEN检测方法虽然检测限低,但是存在仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂的技术缺陷,难以满足现场快速检测研究的要求。

[0004] 因此,研发出一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法,解决传统的ZEN检测方法存在的技术缺陷,使其满足现场快速检测研究的要求,具有重要的现实意义。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法,用于解决现有技术中,传统的ZEN检测方法具有的检测限低、仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂等技术缺陷,有效满足了现场快速检测研究的要求。

[0006] 本发明提供了一种SPR生物传感器,所述SPR生物传感器包括:生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统;

[0007] 所述光路系统和所述电路系统集成在一起。

[0008] 优选地,所述软件平台包括:进样控制单元、定量检测单元、数据分析单元和动力学检测单元;

[0009] 所述进样控制单元控制待检测物质的进样量,所述定量检测单元和所述动力学检测单元对待检测物质进行检测后,所述数据分析单元接收检测结果并进行分析。

[0010] 优选地,所述数据分析单元包括:定量检测数据分析单元、动力学检测数据分析单元和降噪单元。

[0011] 优选地,所述光路系统包括:电压控制型振镜和光电池;

[0012] 所述电压控制型振镜扫描所述生物传感芯片后,所述光电池接受反射光进行检测。

[0013] 本发明还提供了一种利用以上任意一项所述的SPR生物传感器对ZEN的免疫检测

方法,所述免疫检测方法包括:

[0014] 步骤一、预处理:生物传感芯片依次进行基准调零、表面自组修饰和活化;

[0015] 步骤二、探针固定:在完成预处理的所述生物传感芯片表面固定生物探针;

[0016] 步骤三、酯键封闭;

[0017] 步骤四、抑制竞争免疫检测。

[0018] 优选地,所述表面自组修饰的方法为:所述生物传感芯片的表面浸泡在巯基十一酸乙醇溶液和巯基乙酸乙醇溶液的混合液中2h;

[0019] 所述巯基十一酸乙醇溶液和巯基乙酸乙醇溶液的质量比为1:9,所述巯基十一酸乙醇溶液和巯基乙酸乙醇溶液的浓度均为1mol/L;

[0020] 所述芯片活化的方法为:基准调零完成的生物传感芯片浸泡在NHS溶液和EDC溶液的混合液中15min;

[0021] 所述NHS溶液和EDC溶液的体积比为1:1,所述NHS溶液和EDC溶液的浓度均为0.1mol/L。

[0022] 优选地,所述生物探针为ZEN-BSA,所述生物探针的浓度为300ppm,所述探针固定的时间为30min。

[0023] 优选地,所述酯键封闭的方法为:完成探针固定的所述生物传感芯片浸泡在pH为8.5的1mol/L的乙醇胺溶液中3~5min后,用PBS冲洗所述生物传感芯片。

[0024] 优选地,所述免疫检测方法还包括:芯片再生,所述芯片再生步骤在所述免疫检测步骤后进行;

[0025] 用解离液将完成免疫检测步骤的所述生物传感芯片与抗原-抗体结合物解离。

[0026] 优选地,所述解离液为SDS-HCl。

[0027] 综上所述,本发明提供了一种SPR生物传感器,所述SPR生物传感器包括:生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统;所述光路系统和所述电路系统集成在一起。本发明还提供了一种利用上述SPR生物传感器对ZEN的免疫检测方法,包括:预处理、探针固定、酯键封闭和免疫检测。本发明提供的技术方案中,用电压控制型高精度振镜进行角度扫描,由光电池对反射光强进行检测,检测过程中不需要对样品标记、抗体纯化等步骤,方法简单、装置便携,同时,还可以有效提高检测限。解决了现有技术中,传统的ZEN检测方法仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂的技术缺陷,满足了快速检测研究的要求。

附图说明

[0028] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0029] 图1为本发明提供的一种ZEN的免疫检测方法的免疫检测过程示意图;

[0030] 图2为本发明提供的一种ZEN的免疫检测的生物芯片制备的过程记录曲线;

[0031] 图3为利用ZEN的免疫检测方法所得ZEN的动力学曲线;

[0032] 图4为利用ZEN的免疫检测方法所得ZEN的标准曲线;

[0033] 其中,图2中:1为基准调零、2为活化、3为活化后PBS冲洗、4为探针固定、5为探针固定后PBS冲洗、6为剩余酯键灭活、7为酯键灭活后PBS冲洗。

具体实施方式

[0034] 本发明提供了一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法,用于解决现有技术中,传统的ZEN检测方法仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂等技术缺陷,有效满足了快速检测研究的要求。

[0035] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0036] 为了更详细说明本发明,下面结合实施例对本发明提供的一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法,进行具体地描述。

[0037] (1)、用1mmol/L的 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ (巯基十一酸)和 $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ (巯基己酸)的乙醇溶液,质量比为1:9,对生物传感芯片表面进行自组装修饰2h。

[0038] (2)、用折射率为1.51~1.52的香柏油作为匹配液将修饰后的生物传感芯片贴合在SPR仪圆柱形棱镜上,安装流路系统;设置SPR扫描参数为:扫描起点 -1° ,扫描范围 2° ,扫描步长 0.01° ,完成单次扫描用时约11s。向芯片表面泵入PBS缓冲液,开始记录SPR响应值,以此时PBS的共振角度作为基准。PBS缓冲液由2mmol/L NaH_2PO_4 , 2mmol/L Na_2HPO_4 和150mmol/L NaCl 组成,PBS缓冲液的pH为7.4。

[0039] (3)、基线稳定后,加入0.1mol/L的NHS和0.1mol/L的EDC混合液(1:1,V/V),活化生物传感芯片表面15min,这时的SPR响应值升高,用PBS缓冲液冲洗2min后排空。

[0040] (4)、在生物芯片表面固定浓度为100mg/L的ZEN抗原衍生物(ZEN-BSA)作为生物探针,此时SPR响应值明显升高,30min后通入PBS冲洗2min,响应值只有小幅下降,说明探针固定效果较好。

[0041] (5)、加入1mol/L的乙醇胺(pH8.5)3~5min,封闭灭活剩余的酯键,PBS冲洗后,生物传感芯片制备完成,可用于下一步的免疫检测。

[0042] (6)、用PBS缓冲液将ZEN的抗体稀释为5mg/L的工作浓度,ZEN小分子的终浓度为32 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、16 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和0 $\mu\text{g}/\text{L}$,不同浓度的ZEN小分子与抗体混合5min后,将混合溶液依次加到芯片表面,记录SPR的动态变化。免疫反应350s后通入SDS-HCl溶液洗脱抗原抗体结合物,4min后,通入PBS缓冲液清洗,SPR响应值可回到初始的基线,然后加入下一浓度的样品,继续检测。不同浓度ZEN与抗原的免疫反应速度都为先快后慢,逐渐趋于饱和,反应过程呈近似对数关系,符合免疫反应规律。当样品中ZEN浓度大时,可与芯片表面探针结合的ZEN抗体数量少,免疫反应速度慢,SPR响应值低,ZEN小分子浓度与SPR响应值成反比。

[0043] (7)、以通入样品免疫反应350s时的相对响应值为纵坐标,样品中抗体的浓度的对数为横坐标,绘制ZEN抑制竞争免疫检测的标准曲线,则由未知浓度的待测样品SPR响应值,查询标准曲线,可得出样品中ZEN的浓度,可用于食品质量监控和现场实时检测。

[0044] 其中,图3为利用ZEN的免疫检测方法所得ZEN的动力学曲线,图4为利用ZEN的免疫检测方法所得ZEN的标准曲线。

[0045] 本发明的检出限小于 $2\mu\text{g}/\text{L}$ ，低于HPLC的检出限 $3\mu\text{g}/\text{L}$ 和胶体金免疫层析检测法的检测限 $2.5\mu\text{g}/\text{L}$ ，略高于ELISA的检出限 $1\mu\text{g}/\text{L}$ 。并且，本发明提出的ZEN检测法，完成单一样品的检测耗时约10min，在实际应用过程中，根据单次测量的SPR响应值，由标准曲线可得到ZEN的抗体浓度。相比于ELISA等传统检测法，其快速定量是一大优势，可满足现场快速检测的需求。

[0046] 从上述具体实施方式可以得出，本发明提供的计数方案，具有以下优点：

[0047] (1)、本发明提供一种SPR生物传感器，包括：生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统；用电压控制型高精度振镜进行角度扫描，由光电池对反射光强进行检测，方法简单、装置便携。发明提供的光路和电路系统都集成在统一的机械框架中，尺寸为 $550\text{mm}\times 200\text{mm}\times 330\text{mm}$ ，大小与普通个人计算机主机相当。

[0048] (2)、本发明的软件系统采用Lab VIEW编程环境开发，包括进样控制、定量检测、定量检测数据分析、动力学检测和动力学数据分析等5个功能模块。为了提高SPR传感器的精度和抗干扰能力，除了在硬件方面进行优化外，在数据处理方面采用了高频滤波、数据拟合等方法抑制电噪声等干扰信号。

[0049] (3)、本发明提供的免疫检测方法中，使不同浓度的ZEN样品与ZEN-BSA免疫反应结合，记录动态检测曲线，每个样品检测完后使抗原-抗体结合物从芯片表面解离，实现芯片再生；对记录的动态检测曲线数据进行分析，研究ZEN抗原与抗体的亲和力及动力学反应过程。

[0050] 综上所述，本发明提供了一种SPR生物传感器，所述SPR生物传感器包括：生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统；所述光路系统和所述电路系统集成在一起。本发明还提供了一种利用上述SPR生物传感器对ZEN的免疫检测方法，包括：预处理、探针固定、酯键封闭和免疫检测。本发明提供的技术方案中，用电压控制型高精度振镜进行角度扫描，由光电池对反射光强进行检测，检测过程中不需要对样品标记、抗体纯化等步骤，方法简单、快速，装置便携，解决了现有技术中，传统的ZEN检测方法仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂的技术缺陷，满足了现场快速检测研究的要求。

[0051] 以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

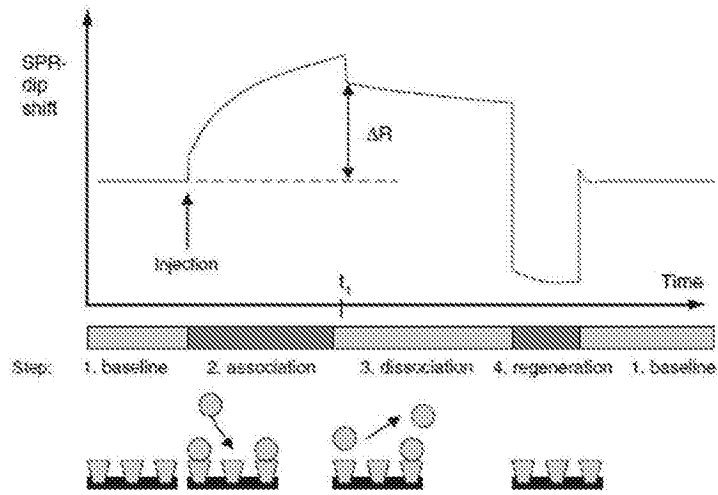


图1

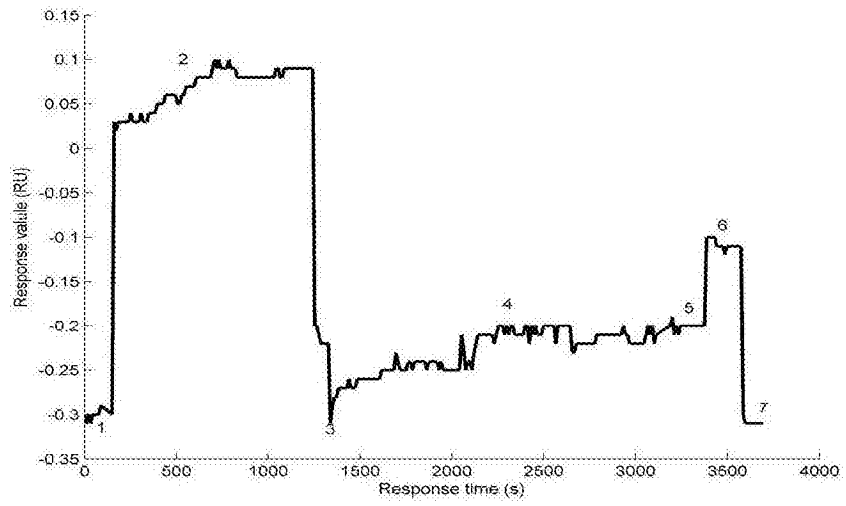


图2

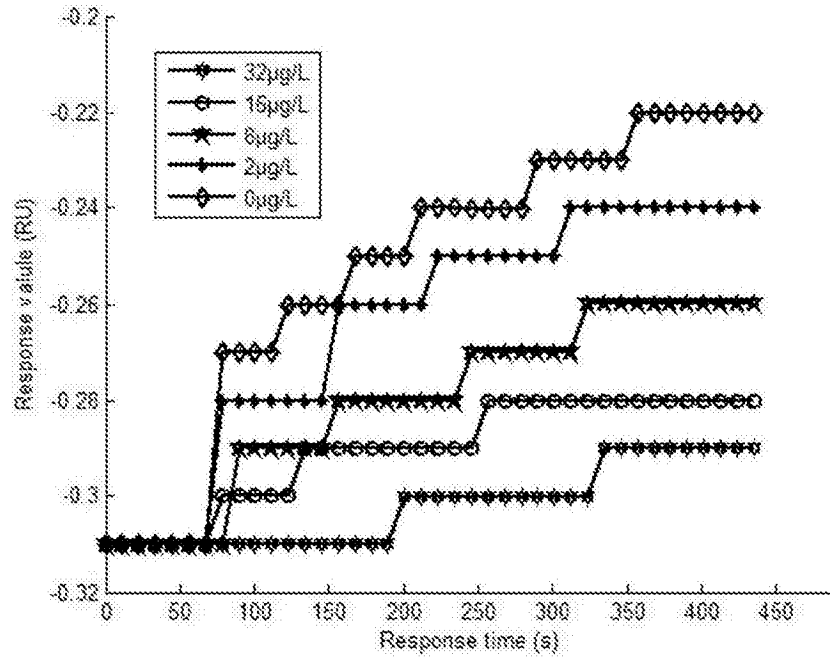


图3

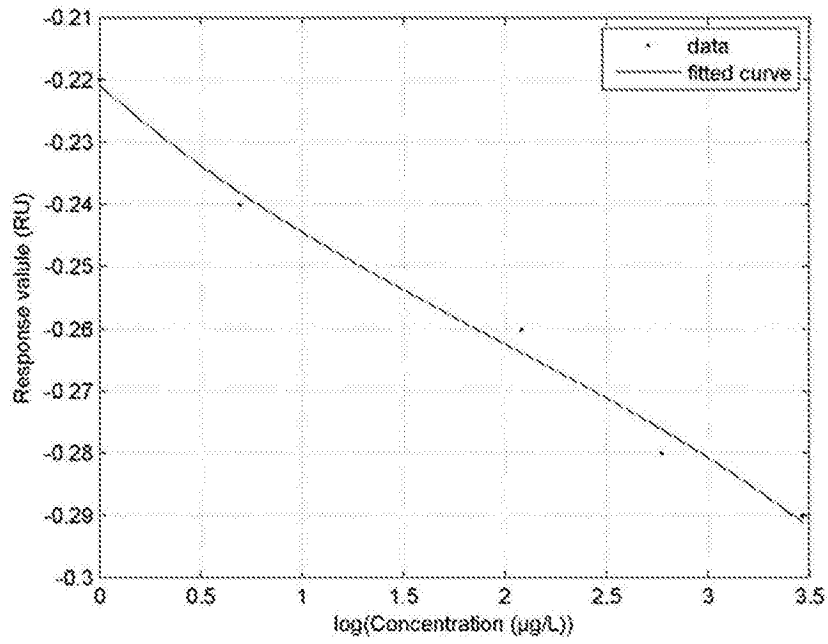


图4

专利名称(译)	一种SPR生物传感器及其应用于ZEN免疫检测的方法		
公开(公告)号	CN107991478A	公开(公告)日	2018-05-04
申请号	CN201610954689.0	申请日	2016-10-27
[标]申请(专利权)人(译)	广东交通职业技术学院		
申请(专利权)人(译)	广东交通职业技术学院		
当前申请(专利权)人(译)	广东交通职业技术学院		
[标]发明人	齐攀 李莹 钟金钢 马骁 徐超 朱强 邬志锋 徐操喜		
发明人	齐攀 李莹 钟金钢 马骁 徐超 朱强 邬志锋 徐操喜		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5308		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物样品检测领域，尤其涉及一种SPR生物传感器及其应用于玉米赤霉烯酮免疫检测的方法。本发明提供了一种SPR生物传感器，包括：生物传感芯片、光路系统、电路系统、流路系统和软件系统；所述光路系统和所述电路系统集成在一起。本发明还提供了一种利用上述SPR生物传感器对玉米赤霉烯酮的免疫检测方法。本发明提供的技术方案中，用电压控制型高精度振镜进行角度扫描，由光电池对反射光强进行检测，检测过程中不需要样品标记、抗体纯化等步骤，方法简单、快速，装置便携，解决了传统的玉米赤霉烯酮检测方法仪器价格昂贵、样品处理步骤复杂、检测周期长、操作复杂的技术缺陷，满足了现场快速检测研究的要求。

