



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110186881 A

(43)申请公布日 2019.08.30

(21)申请号 201910412766.3

(22)申请日 2019.05.17

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 雷红涛 关甜 李向梅 沈兴
杨金易 肖治理 徐振林 孙远明

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

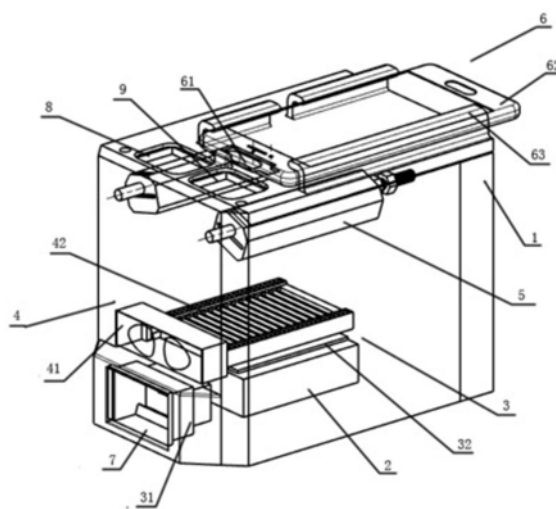
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法。所述生物传感器包括生物传感器壳体,设于生物传感器壳体内部的电源模块、孵育模块、免疫反应模块、荧光激发模块和设于生物传感器壳体顶部的信号采集模块;所述电源模块设于生物传感器壳体底部,分别与孵育模块和荧光激发模块相连接;所述孵育模块设于免疫反应模块的下方;所述荧光激发模块设于生物传感器壳体顶部内侧。本发明所述生物传感器具有结构简单、成本低廉、携带方便和操作简单等优点,能够对微囊藻毒素进行实时实地、高精度的快速检测,适用于MC-LR的现场检测,有很好的应用前景。



1. 一种检测微囊藻毒素的生物传感器,其特征在于,包括生物传感器壳体(1),设于生物传感器壳体(1)内部的电源模块(2)、孵育模块(3)、免疫反应模块(4)、荧光激发模块(5)和设于生物传感器壳体(1)顶部的信号采集模块(6);所述电源模块(2)设于生物传感器壳体(1)底部,分别与孵育模块(3)和荧光激发模块(5)相连接;所述孵育模块(3)设于免疫反应模块(4)的下方;所述荧光激发模块(5)设于生物传感器壳体(1)顶部内侧。

2. 根据权利要求1所述生物传感器,其特征在于,所述孵育模块(3)由智能温控器(31)和恒温加热器(32)相连接组成。

3. 根据权利要求2所述生物传感器,其特征在于,所述生物传感器壳体(1)的一侧设有温度显示屏(7),温度显示屏(7)与智能温控器(31)相连接。

4. 根据权利要求1所述生物传感器,其特征在于,所述免疫反应模块(4)由芯片托盘(41)和设于芯片托盘(41)内的微流控芯片(42)组成。

5. 根据权利要求1所述生物传感器,其特征在于,所述荧光激发模块(5)由LED阵列、激发滤光片、发射滤光片组成。

6. 根据权利要求5所述生物传感器,其特征在于,所述LED阵列与生物传感器壳体(1)顶部成45°夹角。

7. 根据权利要求1所述生物传感器,其特征在于,所述信号采集模块(6)由信号采集孔(61)、手机(62)和固定支架(63)组成,信号采集孔(61)设于生物传感器壳体(1)顶部与手机(62)的摄像头相配合,固定支架(63)设于生物传感器壳体(1)顶部外侧用于固定手机(2)。

8. 根据权利要求1所述生物传感器,其特征在于,所述生物传感器壳体(1)顶部还设有用于控制孵育模块(3)的第一开关(8)和用于控制荧光激发模块(5)的第二开关(9)。

9. 一种检测微囊藻毒素的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. 制备基于纳米磁珠的微囊藻毒素免疫传感器;

S2. 采用权利要求1至8任一项所述生物传感器测定标准系列微囊藻毒素浓度下,生物传感器产生的荧光强度,绘制微囊藻毒素浓度与荧光强度的线性关系曲线;

S3. 使用权利要求1至8任一项所述生物传感器检测水中的微囊藻毒素,利用步骤S2绘制的线性关系曲线计算得到样品中微囊藻毒素的浓度。

10. 根据权利要求9所述方法,其特征在于,步骤S1中所述的纳米磁珠与其表面所包被的微囊藻毒素抗原的比例为1:1。

一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微囊藻毒素检测技术领域,具体地,涉及一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法。

背景技术

[0002] 微囊藻毒素(Microcystins,MCs)是蓝藻水华,如鱼腥藻、束丝藻等爆发所产生的一种环状七肽化合物,具有较强的肝毒性,可以强烈抑制细胞蛋白磷酸酯酶1(PP1)和2A(PP2A)的活性,损害其在胞内的调节功能,从而触发原发性肝癌。有研究表明,25%~70%的蓝藻水华会释放毒素,其中的微囊藻毒素毒性强烈,可通过饮用水或者蓄积在水产品中进入食物链,从而直接或间接进入人体,对人类健康构成极大威胁。微囊藻毒素在自然水域中分布广泛,爆发呈季节性,这就要求检测方法可以连续分析以达到监测预警的作用,同时,还需具备高度便携性来满足自然水域的检测需求。

[0003] 目前对微囊藻毒素的检测方法主要有生物鉴定法、细胞毒性分析法、仪器分析法、免疫检测法和生物传感器法。其中高效液相色谱(HPLC)和酶联免疫分析(ELISA)是应用最广泛的两种检测方法,但是存在测试费用高昂、前处理复杂、操作费时等缺点,而且要求实验室具备大型设备,无法满足MCs的原位检测需求。这严重地制约了MCs的实时监测,难以发挥检测方法的监测预警作用。

[0004] 生物传感检测技术是一门多学科交叉的新型技术,具有灵敏度高、检测成本低、方便快捷等优点。与先进的人工智能技术结合,可开发出微型、高通量、适于原位检测的智能检测装备。随着人们对便捷分析方法和检测终端设备的需求,小型化、智能化的检测设备必然成为重要的发展趋势。因此,需要研发一种新的适用于检测微囊藻毒素的生物传感器及方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术中检测微囊藻毒素时存在测试费用高昂、前处理复杂、操作费时、难以实现微囊藻毒素原位实时检测等缺点,提供一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法。本发明利用3D打印技术,研发出一款包括电源模块、孵育模块、免疫反应模块、荧光激发模块和信号采集模块的便携式荧光分析装置——即生物传感器,能够对微囊藻毒素进行实时实地、高精度的快速检测,适用于MC-LR的现场检测。

[0006] 为了实现上述目的,本发明是通过以下方案予以实现的:

[0007] 一种检测微囊藻毒素的生物传感器,包括生物传感器壳体,设于生物传感器壳体内部的电源模块、孵育模块、免疫反应模块、荧光激发模块和设于生物传感器壳体顶部的信号采集模块;所述电源模块设于生物传感器壳体底部,分别与孵育模块和荧光激发模块相连接;所述孵育模块设于免疫反应模块的下方;所述荧光激发模块设于生物传感器壳体顶部内侧。

[0008] 本发明所提供的生物传感器包括电源模块、孵育模块、免疫反应模块、荧光激发模

块和信号采集模块,通过电源模块为孵育模块和荧光激发模块提供稳定的电源,孵育模块可为免疫反应模块提供恒温加热环境,荧光激发模块用于底物的荧光激发,信号采集模块保证采集荧光信号位置的一致性,降低批间差异,提高检测的准确性。通过本发明生物传感器能够对微囊藻毒素进行实时实地、高精度的快速检测。

[0009] 优选地,所述电源模块为可循环使用的电池盒,可采用12V电池盒,用于整个生物传感器各用电模块的供电。

[0010] 优选地,所述孵育模块由智能温控器和恒温加热器相连接组成。

[0011] 更优选地,所述恒温加热器为12V微型加热板,用于孵育免疫反应模块。

[0012] 更优选地,所述生物传感器壳体的一侧设有温度显示屏,温度显示屏与智能温控器相连接。通过温度显示屏实时显示孵育温度,便于控制恒温加热器。

[0013] 优选地,所述免疫反应模块由芯片托盘和设于芯片托盘内的微流控芯片组成。

[0014] 具体地,采用15通道的PDMS微流控芯片作为免疫反应场所,免疫反应在各个通道内并列进行。将包被有微囊藻毒素抗原的纳米磁珠作为免疫传感元件,在外部磁铁的牵引下可灵活通过微流控芯片通道内的各反应池。

[0015] 更优选地,所述芯片托盘为抽屉式托盘,可用于微流控芯片的输送,其手柄的设计还考虑了人体力学因素,可以提升用户的舒适感。

[0016] 优选地,所述荧光激发模块由LED阵列、激发滤光片、发射滤光片组成。

[0017] 具体地,荧光底物Amplex Red和 H_2O_2 在HRP标记微囊藻毒素抗体催化下、进一步经荧光激发模块的LED灯激发,可产生荧光。

[0018] 更优选地,所述LED阵列与生物传感器壳体顶部成 45° 夹角,LED阵列为 $60 \times 15\text{mm}$ 、2W的绿光LED阵列,激发波长为525nm。

[0019] 优选地,所述信号采集模块由信号采集孔、手机和固定支架组成,信号采集孔设于生物传感器壳体顶部与手机的摄像头相配合,固定支架设于生物传感器壳体顶部外侧用于固定手机。

[0020] 优选地,所述手机包括图像信息采集模块、比色模块与浓度显示模块,用于检测信号的采集、处理以及结果的显示,要求Android 4.3及以上版本。

[0021] 优选地,所述生物传感器壳体顶部还设有用于控制孵育模块的第一开关和用于控制荧光激发模块的第二开关。

[0022] 具体地,所述第一开关用于控制恒温加热器,所述第二开关用于控制LED阵列。

[0023] 本发明还请求保护一种检测微囊藻毒素的方法,包括如下步骤:

[0024] S1. 制备基于纳米磁珠的微囊藻毒素免疫传感器;

[0025] S2. 采用上述生物传感器测定标准系列微囊藻毒素浓度下,生物传感器产生的荧光强度,绘制微囊藻毒素浓度与荧光强度的线性关系曲线;

[0026] S3. 使用上述生物传感器检测水中的微囊藻毒素,利用步骤S2绘制的线性关系曲线计算得到样品中微囊藻毒素的浓度。

[0027] 优选地,步骤S1中所述的纳米磁珠与其表面所包被的微囊藻毒素抗原的比例为1:1。

[0028] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0029] (1) 本发明所提供的生物传感器包括电源模块、孵育模块、免疫反应模块、荧光激

发模块和信号采集模块,通过电源模块为孵育模块和荧光激发模块提供稳定的电源,孵育模块可为免疫反应模块提供恒温加热环境,荧光激发模块用于底物的荧光激发,信号采集模块保证采集荧光信号位置的一致性,降低批间差异,提高检测的准确性。

[0030] (2) 本发明所提供的生物传感器具有结构简单、成本低廉、携带方便和操作简单等优点,能够对微囊藻毒素进行实时实地、高精度的快速检测,适用于MC-LR的现场检测,有很好的应用前景。

附图说明

[0031] 图1为实施例1生物传感器的整体结构示意图。

[0032] 图2为实施例1生物传感器的整体结构拆分示意图。

[0033] 图3为酶标抗体的紫外扫描结果。

[0034] 附图标记:1-生物传感器壳体;2-电源模块;3-孵育模块;4-免疫反应模块;5-荧光激发模块;6-信号采集模块;7-温度显示屏;8-第一开关;9-第二开关;31-智能温控器;32-恒温加热器;41-芯片托盘;42-微流控芯片;61-信号采集孔;62-手机;63-固定支架。

具体实施方式

[0035] 下面结合说明书附图及具体实施例对本发明作出进一步地详细阐述,所述实施例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法;所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为可从商业途径得到的试剂和材料。

[0036] 实施例1

[0037] 一种检测微囊藻毒素的生物传感器,如图1、图2所示,包括生物传感器壳体1,设于生物传感器壳体1内部的电源模块2、孵育模块3、免疫反应模块4、荧光激发模块5和设于生物传感器壳体1顶部的信号采集模块6;电源模块2设于生物传感器壳体1底部,分别与孵育模块3和荧光激发模块5相连接;孵育模块3设于免疫反应模块4的下方,由智能温控器31和恒温加热器32相连接组成;生物传感器壳体1的一侧设有温度显示屏7,温度显示屏7与智能温控器31相连接;免疫反应模块4由芯片托盘41和设于芯片托盘41内的微流控芯片42组成;荧光激发模块5设于生物传感器壳体1顶部内侧,由LED阵列、激发滤光片、发射滤光片组成,LED阵列与生物传感器壳体1顶部成45°夹角;信号采集模块6由信号采集孔61、手机62和固定支架63组成,信号采集孔61设于生物传感器壳体1顶部与手机62的摄像头相配合,固定支架63设于生物传感器壳体1顶部外侧用于固定手机62;生物传感器壳体1顶部还设有用于控制孵育模块3的第一开关8和用于控制荧光激发模块5的第二开关9。

[0038] 其中,电源模块2为可循环使用的电池盒,可采用12V电池盒,用于整个生物传感器各用电模块的供电。恒温加热器32为12V微型加热板,用于孵育免疫反应模块4。通过温度显示屏7实时显示孵育温度,便于控制恒温加热器32。采用15通道的PDMS微流控芯片42作为免疫反应场所,免疫反应在各个通道内并列进行。将包被有微囊藻毒素抗原的纳米磁珠作为免疫传感元件,在外部磁铁的牵引下可灵活通过微流控芯片42通道内的各反应池。芯片托盘41为抽屉式托盘,可用于微流控芯片42的输送,其手柄的设计还考虑了人体力学因素,可以提升用户的舒适感。LED阵列为60*15mm、2W的绿光LED阵列,激发波长为525nm。手机62包

括图像信息采集模块、比色模块与浓度显示模块,用于检测信号的采集、处理以及结果的显示,要求Android 4.3及以上版本。第一开关8用于控制恒温加热器32,第二开关9用于控制LED阵列。

[0039] 本实施例所提供的生物传感器包括电源模块2、孵育模块3、免疫反应模块4、荧光激发模块5和信号采集模块6,通过电源模块2为孵育模块3和荧光激发模块5提供稳定的电源,孵育模块3可为免疫反应模块4提供恒温加热环境,荧光激发模块5用于底物的荧光激发,信号采集模块6保证采集荧光信号位置的一致性,降低批间差异,提高检测的准确性。通过该生物传感器能够对微囊藻毒素进行实时实地、高精度的快速检测。

[0040] 实施例2

[0041] 一种检测微囊藻毒素的方法,包括如下步骤:

[0042] S1.制备基于纳米磁珠的微囊藻毒素免疫传感器;

[0043] S2.采用上述生物传感器测定标准系列微囊藻毒素浓度下,生物传感器产生的荧光强度,绘制微囊藻毒素浓度与荧光强度的线性关系曲线;

[0044] S3.使用上述生物传感器检测水中的微囊藻毒素,利用步骤S2绘制的线性关系曲线计算得到样品中微囊藻毒素的浓度。

[0045] 通过该方法能准确、快速、便捷地检测待测样品中微囊藻毒素的浓度,所述检测微囊藻毒素的方法具体包括以下步骤,见实施例3~5。

[0046] 实施例3基于纳米磁珠的微囊藻毒素免疫传感器制备

[0047] 1、磁珠的活化

[0048] 取500 μ L磁珠置于1.5mL EP管中,置于磁分离架,富集磁珠,去除上清液;加入1mL4 $^{\circ}$ C预冷的1mM盐酸溶液,涡旋震荡15s后,置于磁分离架富集磁珠,去除上清液。

[0049] 2、蛋白偶联

[0050] 加入500 μ L蛋白溶液(浓度为250 μ g/mL的MC-LR抗原),涡旋30s,使其混合均匀。将EP管架于涡旋振荡器上,调至最低挡位,自动模式,振荡1~1.5h。

[0051] 其中,纳米磁珠与其表面所包被的微囊藻毒素抗原的比例为1:1。

[0052] 3、分离

[0053] 采用磁分离架富集磁珠,保存流穿液。

[0054] 4、清洗

[0055] 加入1mL封闭液(3M乙醇胺,pH 9.0),涡旋15s后,弃上清,重复此操作4次。

[0056] 5、封闭

[0057] 加入1mL封闭液,振荡混合2h。

[0058] 其中,所使用的封闭剂为乙醇胺或5%脱脂奶粉。

[0059] 6、分离

[0060] 采用磁分离架富集磁珠,弃上清。

[0061] 7、清洗

[0062] 加入1mL纯净水,涡旋15s,弃上清。

[0063] 8、保存

[0064] 加入1mL保存液(含0.05%叠氮化钠的PBS溶液),涡旋15s,弃上清。重复此操作两次。再加入500 μ L保存液,充分混合,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0065] 实施例4酶标抗体的制备

[0066] 1、HRP标记微囊藻毒素抗体的制备

[0067] HRP标记微囊藻毒素抗体是通过高碘酸钠法合成,具体如下:

[0068] (1) 称取5mg HRP溶于500 μ L CH₃COONa-CH₃COOH (0.2mol/L, pH 5.6) 缓冲液中,加入100 μ L 0.1mol/L的NaIO₄溶液,4℃下避光搅拌反应30min。

[0069] (2) 逐滴加入500 μ L 2.5%乙二醇,室温下反应30min。

[0070] (3) 滴加入210 μ L待标记抗体,4℃搅拌30min,用NaHCO₃-Na₂CO₃ (0.05mol/L, pH 9.6) 缓冲溶液透析过夜。

[0071] (4) 次日取出抗体,加入100 μ L 5mg/mL NaBH₄溶液,4℃下搅拌2h。

[0072] (5) 加入等量的饱和硫酸铵溶液,4℃下反应30min后,再静置1h。

[0073] (6) 4℃下4000r/min离心20min,弃上清,沥干。将沉淀溶于少量PBS (0.01mol/L, pH 7.4) 中,装入透析袋中,用PBS (0.01mol/L, pH 7.4) 透析过夜。

[0074] (7) 第三日取出,收集透析液的上清液即为酶标抗体,混匀分装,置于-20℃保存备用。

[0075] 2、鉴定

[0076] 取酶标抗体进行紫外扫描,结果如图3所示。抗体、HRP和HRP标抗体分别进行紫外(230~600nm)扫描鉴定,由于HRP在400nm处有特征吸收峰,并通过比较标记前后的各物质在此处的最高吸光值,发现HRP与HRP标记抗体在400nm处均有特征峰,而抗体在此处无特征峰,故说明反应产物是HRP与抗体的复合物,标记成功。

[0077] 实施例5微囊藻毒素浓度与荧光强度的线性关系的绘制方法

[0078] 1、将某系列浓度的MC-LR溶液分别与酶标抗体溶液混合后,抽取30 μ L混合液注入芯片第一个液池中,再加入1.5 μ L免疫磁珠,37℃孵育15分钟。

[0079] 2、利用磁铁将磁珠牵引至洗液池,往复清洗磁珠。

[0080] 3、将磁珠进一步牵引到荧光底物液池,再次37℃孵育5分钟。

[0081] 其中,荧光底物Amplex Red和H₂O₂的混合比例为6:1。

[0082] 4、关闭恒温加热器,打开LED光源;同时操作手机端,找到对应的检测APP。

[0083] 5、检测APP使用方法如下:

[0084] (1) 获取图像照片;

[0085] (2) 点击“New test”进入检测界面;

[0086] (3) 点击“Take Picture”获取图像,并点击“√”,将图像转换为灰度值图像;

[0087] (4) 框定样品点后,点击“Analyse”,算出各点的灰度值;

[0088] (5) 输入各点对应的分析物浓度,点击“Fitting”,出现拟合后的标准曲线;

[0089] (6) 点击“Testing with the curve”,将以上标准曲线设定为规则后,重新出现图像拍摄界面;

[0090] (7) 点击“Take Picture”,获取样品图像,并点击“√”,将图像转换为灰度值图像;

[0091] (8) 框定样品点后,点击“Analyse”,算出各个未知浓度样品的灰度值;

[0092] (9) 点击“Testing”,根据灰度值和所建立的标准曲线得出样品点的实际浓度,并命名文件以保存记录。

[0093] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保

护范围的限制,对于本领域的普通技术人员来说,在上述说明及思路的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动,这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明权利要求的保护范围之内。

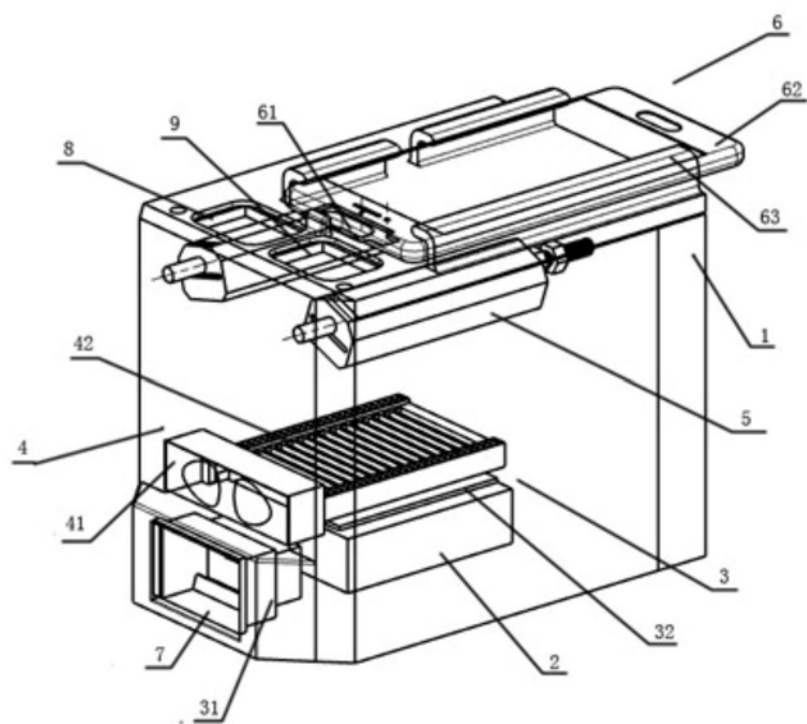


图1

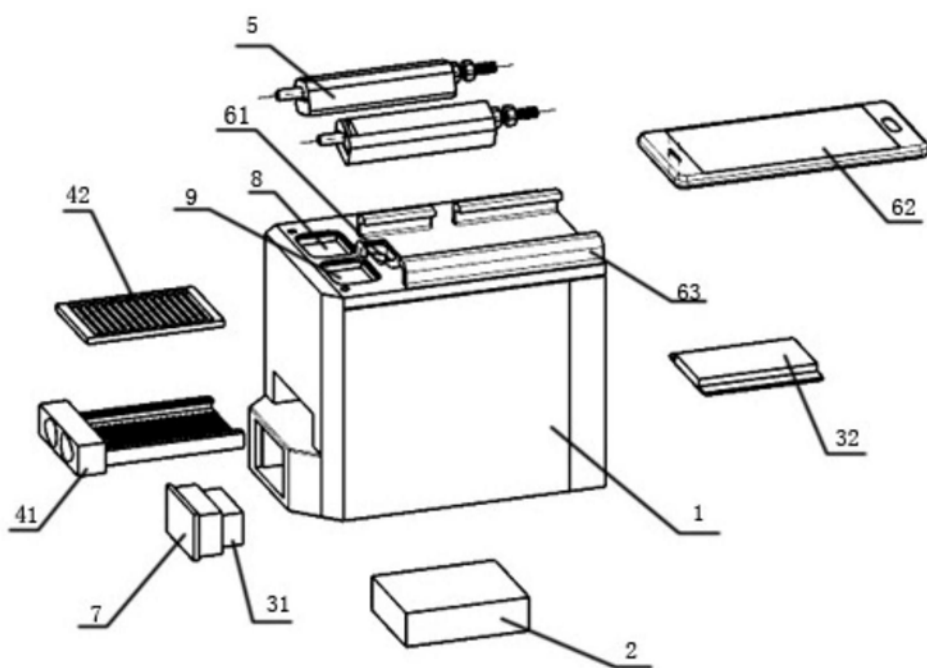


图2

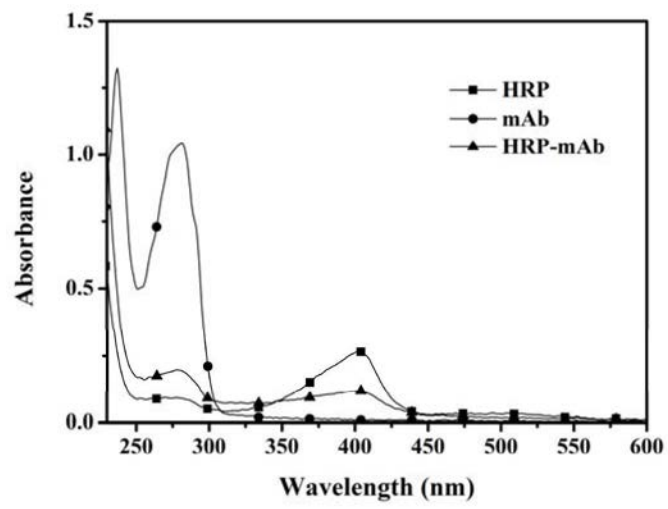


图3

专利名称(译)	一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法		
公开(公告)号	CN110186881A	公开(公告)日	2019-08-30
申请号	CN201910412766.3	申请日	2019-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	雷红涛 李向梅 沈兴 杨金易 肖治理 徐振林 孙远明		
发明人	雷红涛 关甜 李向梅 沈兴 杨金易 肖治理 徐振林 孙远明		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N33/535 G01N33/54326		
代理人(译)	林丽明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测微囊藻毒素的生物传感器及方法。所述生物传感器包括生物传感器壳体，设于生物传感器壳体内部的电源模块、孵育模块、免疫反应模块、荧光激发模块和设于生物传感器壳体顶部的信号采集模块；所述电源模块设于生物传感器壳体底部，分别与孵育模块和荧光激发模块相连接；所述孵育模块设于免疫反应模块的下方；所述荧光激发模块设于生物传感器壳体顶部内侧。本发明所述生物传感器具有结构简单、成本低廉、携带方便和操作简单等优点，能够对微囊藻毒素进行实时实地、高精度的快速检测，适用于MC-LR的现场检测，有很好的应用前景。

