



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109001269 A

(43)申请公布日 2018.12.14

(21)申请号 201811093563.4

(22)申请日 2018.09.19

(71)申请人 重庆大学

地址 400030 重庆市沙坪坝区沙正街174号

(72)发明人 徐溢 崔飞云 陈李

(74)专利代理机构 重庆华科专利事务所 50123

代理人 康海燕

(51) Int. Cl.

G01N 27/26(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

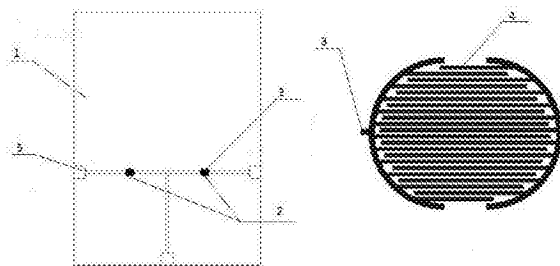
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

集成DEP分离、磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片及其检测方法

(57)摘要

本发明属于生化分析技术领域,具体涉及集成DEP分离、糖基化磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片及其检测方法。其由集成有微电极阵列的基片和集成有微通道的PDMS盖片键合,该细菌芯片集DEP分离、糖基化磁性微球富集和EIS原位检测三种功能为一体,能够快速高效的测定沙氏门菌的浓度,其检测限为100CFU/mL;提供的检测方法具有选择性,其中甘露糖类衍生物修饰的磁性微球能够选择性标记沙氏门菌、大肠杆菌、霍乱弧菌或肺炎克雷伯菌;DEP可富集混悬液中被标记的沙氏门菌、大肠杆菌、霍乱弧菌或肺炎克雷伯菌,而其它未被标记的细菌和多余的磁性微球将随溶液被出样通道排出,以此保证了检测方法的选择性。



1. 集成DEP分离、磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片,其特征在于,由集成有微电极阵列(2)的基片(1)和集成有微通道(12)的PDMS盖片(6)键合,所述微通道(12)设有依次连通的进样通道(7)、混合通道(8)、检测区(9)和出样通道(10);进样通道(7)为两条且与混合通道(8)连通呈“Y”型,两条进样通道(7)的夹角为 $60\sim 180^\circ$,所述进样通道(7)始端分别设有进样口(701),进样通道(7)长度为 $10\sim 25\text{mm}$,宽度为 $300\sim 1000\mu\text{m}$,深度为 $50\sim 100\mu\text{m}$;混合通道(8)集成有 $10\sim 100$ 个呈Tesla构型的微单元(11),总长度为 $10\sim 100\text{mm}$;检测区(9)的构型为圆形,直径为 $1000\sim 5300\mu\text{m}$,深度与进样通道相同;出样通道(10)为直通通道,其长度为 $1\sim 10\text{mm}$,宽度和深度与进样通道(7)相同,出样通道(10)的末端设有出样口(101);所述微电极阵列(2)由 $2\sim 20$ 组叉指电极(3)组成,每组叉指电极(3)由两个圆弧形的叉指微电极(4)组成,其与检测区(9)的构型和位置相对应,可被完全浸没于检测区(9)内;所述每个圆弧形叉指微电极(4)的直径为 $100\sim 5000\mu\text{m}$,设有 $10\sim 100$ 个叉指,叉指的长度为 $200\sim 1000\mu\text{m}$,宽度为 $10\sim 30\mu\text{m}$,厚度为 $50\sim 200\text{nm}$,每组叉指电极中相邻叉指的间距为 $10\sim 30\mu\text{m}$ 。

2. 如权利要求1所述的细菌芯片,其特征在于,所述PDMS盖片的制备方法为:通过MEMS(micro electro mechanical systems)加工技术制备得到含微通道的SU8阳膜,通过热塑法将材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS)与固化剂的混合物浇注到SU8阳膜上,待气泡除完, $60\sim 100^\circ\text{C}$ 下固化 $20\sim 60\text{min}$,将凝固的PDMS从阳膜上剥离,得到带有微通道的PDMS盖片。

3. 如权利要求1所述的细菌芯片,其特征在于,所述基片(1)的材料为玻璃、石英、硅或聚合物。

4. 如权利要求1所述的细菌芯片,其特征在于,所述叉指电极(3)的材料为金、铂、铜、铝或钯,所述叉指电极是采用MEMS加工的磁控溅射技术制备得到。

5. 利用权利要求1~4任一项所述的微流控细菌芯片的检测方法,具体包括以下步骤:

(1) 取 $10\sim 1000\mu\text{L}$ 细菌菌液从进样通道的一个进样口进样,取 $10\sim 1000\mu\text{L}$ $0.1\sim 1\text{mg/mL}$ 糖基化磁性微球的水溶液另一进样口同时进样,进样方式为蠕动泵注射进样或负压进样,细菌菌液和糖基化磁性微球的水溶液流进混合通道充分混合,完成糖基化磁性微球对细菌的标记得糖基化磁性微球标记的细菌和多余的糖基化磁性微球的混悬液;

(2) 所述步骤(1)得到的混悬液进入检测区时,开始DEP(介电泳),电压为 $2\sim 10\text{V}$,频率为 $400\sim 600\text{kHz}$,DEP时间为 $1\sim 30\text{min}$,关停蠕动泵,继续DEP至混合通道流速为0,停止DEP,所述被糖基磁性微球标记的细菌被富集在检测池中的叉指电极间;

(3) 停止DEP后,立即切换至EIS检测模式,EIS的交流扰动信号为 $50\sim 500\text{mV}$,频率为 $10\sim 50\text{kHz}$,记录阻抗信号值 Z ;

(4) 取不同浓度的细菌菌液和糖基化磁性微球溶液重复上述步骤(1)~(3),记录不同细菌浓度的混悬液的信号值 Z_n , $n\geq 5$,减去空白信号值,得到 ΔZ_n 。以 ΔZ_n 纵坐标,以混悬液中细菌浓度为横坐标作关系图 $\Delta Z-[C]$;

(5) 取待测样品X,按步骤(1)~(3)测定信号至 Z_x ,并按关系图 $\Delta Z-[C]$ 得到待测样品混悬液的细菌浓度,然后根据待测样品的进样体积和糖基化磁性微球水溶液的进样体积计算出待测样品X中细菌浓度;所述糖基化磁性微球是指甘露糖类衍生物修饰的磁性微球。

6. 如权利要求5所述的检测方法,其特征在于,所述糖基化磁性微球的制备方法为: $15\sim 30^\circ\text{C}$ 下,取 $60\sim 6000\mu\text{L}$ 超声后的 $0.5\sim 2\text{mg/mL}$ 的羧基化磁性微球,用磁铁富集羧基化磁性

微球,除去上清液,然后加入300~3000 μ L 100~300mmol/L的EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和300~3000 μ L 100~300mmol/L的NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),避光振荡反应30~60min,随后加入300~3000 μ L 0.2~2mg/mL的新配甘露糖类衍生物,避光振荡40~120min,再加入300~3000 μ L 1~5%的牛血清蛋白溶液,避光振荡10~120min,停止反应,磁铁富集,去除上清液,缓冲液洗涤,得到糖基化磁性微球。

7.如权利要求6所述的检测方法,其特征在于,所述甘露糖类衍生物是4-氨基苯基- α -吡喃甘露糖苷、甘露二糖、甘露三糖或以甘露糖为主体结构的甘露糖树枝状大分子化合物。

8.权利要求1~4任一项所述的细菌芯片和/或如权利要求5~7任一项所述的检测方法在检测鼠伤寒沙门氏菌、表达1型菌毛的大肠杆菌、霍乱弧菌或/和肺炎克雷伯菌中的应用。

集成DEP分离、磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生化分析技术领域,具体涉及集成DEP分离、糖基化磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片及其检测方法。

背景技术

[0002] 随着社会经济的发展和人们生活水平的提升,人们对环境安全、食品安全以及快速诊疗等的要求越来越高,针对特定致病菌的快速检测技术成为国内外关注和研究的热点。目前致病菌常用的检测方法有:平板菌落计数法、PCR、酶联免疫法等,但它们都存在耗时长、程序复杂等缺点。微流控芯片(microfluidic chip)以其易于快速、准确、灵敏度高和易于集成化、便携化等优点,成为细菌快速检测的新平台。

[0003] 集成有功能微通道和微电极阵列的微流控细菌检测芯片是备受关注的研发领域。专利CN 101788515 A报道了一种基于电化学阻抗(EIS)检测细菌的微流控芯片及其方法,其不涉及样品的预处理等可操作性的实验方法,虽检测限为 10^3 CFU/mL,不能与国家标准中不得检出的要求匹配;专利CN 101694476 A报道了一种细菌阻抗检测方法,其采用了简化的芯片制备工艺,但其缺乏细菌的分离富集处理,难以用于实际样本中数量较少的致病菌的有效检测,也未有提供细菌检测限等重要的细菌测试指标。可以看到,由于实际样本中致病菌含量较少且往往含有多种细菌,致病菌快速、灵敏、特异性检测的难点之一是样本的预处理。基于磁性微球或磁性纳米粒子的磁富集技术以其富集效率高、方法简单的优点,得到了广泛的应用。识别受体(Recognition receptor)是磁性微球选择性捕获致病菌的必备要素,目前报道的识别受体主要有核酸适配体和抗体。专利106053805A报道了一种利用适配体捕获沙门氏菌的方法,专利CN 106702016 A报道了一种免疫磁珠捕获沙门氏菌的方法,但适配体和抗体均存在筛选耗时长、步骤繁琐和人力财力成本高的缺点。因此,目前已报到的微流控细菌芯片检测的技术和方法尚难以满足对环境监测、食品安全监测以及临床快速诊疗等的应用领域中对致病菌选择性检测的需求。

发明内容

[0004] 为解决上述问题,本发明提供一种DEP(介电泳)分离、糖基化磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片,其集成了DEP分离、选择性富集和EIS原位检测三项功能于一体,能够实现沙门氏菌的快速和灵敏检测,检测限低至100CFU/mL。

[0005] 集成DEP分离、磁性微球选择性富集和EIS原位检测的微流控细菌芯片,其由含微电极阵列的玻璃基片和含有微通道的PDMS(聚二甲基硅氧烷)盖片键合而成。其特征在于,所述微通道设有依次连通的进样通道、混合通道、检测区和出样通道;进样通道为两条且与混合通道连通呈“Y”型,两条进样通道的夹角为 $60\sim 180^\circ$,所述进样通道始端分别设有进样口,进样通道长度为 $10\sim 25$ mm,宽度为 $300\sim 1000\mu\text{m}$,深度为 $50\sim 100\mu\text{m}$;混合通道集成有 $10\sim 100$ 个呈Tesla构型的微单元,总长度为 $10\sim 100$ mm;检测区的构型为圆形,直径为 $1000\sim$

5300 μm ,深度与进样通道相同;出样通道为直通道,其长度为1~10mm,宽度和深度与进样通道相同;出样通道的末端设有出样口。

[0006] 所述微电极阵列由2~20组叉指电极组成,每组叉指电极由两个圆弧形叉指微电极组成,其与检测区的构型和位置相对应,可被完全浸没于检测区内;所述圆弧形叉指微电极的直径为100~5000 μm ,设有10~100个叉指,叉指的长度为200~1000 μm ,宽度为10~30 μm ,厚度为50~200nm,每组叉指电极中相邻叉指的间距为10~30 μm 。

[0007] 优选的,所述PDMS盖片的制备方法为:通过MEMS(micro electromechanical systems)加工技术制备得到含微通道的SU8阳膜,通过热塑法将材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS)与固化剂的混合物浇注到SU8阳膜上,待气泡除完,60~100 $^{\circ}\text{C}$ 下固化20~60min,将凝固的PDMS从阳膜上剥离,得到带有微通道的PDMS盖片。

[0008] 优选的,所述基片材料为玻璃、石英、硅或聚合物。

[0009] 优选的,所述叉指电极材料为金、铂、铜、铝或钯,所述叉指电极是采用MEMS加工的磁控溅射技术制备得到。

[0010] 本发明还提供利用上述细菌芯片的检测方法,具体包括以下步骤:

[0011] (1)取10~1000 μL 细菌菌液从进样通道的Y型通道的一侧进样,取10~1000 μL 0.1~1mg/mL糖基化磁性微球的水溶液从另一侧同时进样,进样方式为蠕动泵注射进样或负压进样,细菌菌液和糖基化磁性微球的水溶液流进混合通道充分混合,完成糖基化磁性微球对细菌的标记得到糖基化磁性微球标记的细菌和多余的糖基化磁性微球的混悬液;

[0012] (2)所述步骤(1)得到的混悬液进入检测区时,开始DEP(介电泳),电压为2~10V,频率为400~600kHz,DEP时间为1~30min,关停蠕动泵,继续DEP至混合通道流速为0,停止DEP,所述被糖基化磁性微球标记的细菌被富集在检测池中的叉指电极间;

[0013] (3)停止DEP后,立即切换至EIS检测模式,EIS的交流扰动信号为50~500mV,频率为10~50kHz,记录信号值Z;

[0014] (4)取不同浓度的细菌菌液和糖基化磁性微球溶液重复上述步骤(1)~(3),记录不同细菌浓度的混悬液的信号值 Z_n , $n \geq 5$,减去空白信号值,得到 ΔZ_n 。以为 ΔZ_n 纵坐标,以混悬液中细菌浓度为横坐标作关系图 $\Delta Z-[C]$;

[0015] (5)取待测样品X,按步骤(1)~(3)测定信号至 Z_x ,并按关系图 $\Delta Z-[C]$ 得到待测样品混悬液的细菌浓度,然后根据待测样品的进样体积和糖基化磁性微球水溶液的进样体积计算得出待测样品X中细菌浓度;

[0016] 所述糖基化磁性微球是指甘露糖类衍生物修饰的磁性微球。

[0017] 优选的,所述糖基化磁性微球的制备方法为:15~30 $^{\circ}\text{C}$ 下,取60~6000 μL 超声后的0.5~2mg/mL的羧基化磁性微球,用磁铁富集羧基化磁性微球,除去上清液,然后加入300~3000 μL 100~300mmol/L的EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐)和300~3000 μL 100~300mmol/L的NHS(N-羟基琥珀酰亚胺),避光振摇反应30~60min,随后加入300~3000 μL 0.2~2mg/mL的新配甘露糖类衍生物,避光振摇40~120min,再加入300~3000 μL 1~5%的牛血清蛋白溶液,避光振摇10~120min,停止反应,磁铁富集,去除上清液,缓冲液洗涤,得到糖基化磁性微球。

[0018] 上述甘露糖类衍生物是指4-氨基苯基- α -吡喃甘露糖苷、甘露二糖、甘露三糖、甘露糖树枝状大分子等主体结构为甘露糖的化合物。

[0019] 上述缓冲液是指的磷酸盐缓冲液 (PBS)。

[0020] 上述DEP (介电泳) 分离、糖基化磁性微球选择性富集和EIS原位检测的细菌芯片和/或上述利用芯片的检测方法在检测鼠伤寒沙门氏菌、表达1型菌毛的大肠杆菌、霍乱弧菌或/和肺炎克雷伯菌中的应用。

[0021] 本发明的有益效果在于：

[0022] 1. 本发明提供的细菌芯片集DEP分离、糖基化磁性微球富集和EIS原位检测三种功能为一体，能够快速高效的测定沙氏门菌的浓度，其检测限低至100CFU/mL；

[0023] 2. 本发明提供的检测方法具有良好选择性，其中甘露糖类衍生物修饰的磁性微球能够选择性标记沙氏门菌、大肠杆菌、霍乱弧菌或肺炎克雷伯菌，经由DEP可富集混悬液中被标记的沙氏门菌、大肠杆菌、霍乱弧菌或肺炎克雷伯菌，多余的磁性微球将随溶液被出样通道排除，以此保证了目标菌的高效检测。

附图说明

[0024] 图1是本发明的细菌芯片的基片结构示意图 (左) 和阵列叉结构示意图示意图 (右)；

[0025] 图2是本发明的细菌芯片的PDMS盖片结构示意图 (左) 和混合通道 (右) 部分结构示意图；

[0026] 图3是实施例3得到的关系图 $\Delta Z-[C]$ 。

[0027] 图中：1-基片、2-微电极阵列、3-叉指电极、4-叉指微电极、5-叉指焊盘、6-PDMS盖片、7-进样通道、701-进样口、8-混合通道、9-检测区、10-出样通道、101-出样口、11-微单元、12-微通道。

具体实施方式

[0028] 以下将结合附图对本发明进行进一步的说明。

[0029] 本发明中所用试剂和设备若无特殊说明均可通过市场购买获得。本发明中的“Tesla构型”为化学工程领域的微混合器的常用构型，具体参见文献“Shakhawat Hossain, et al. Analysis and optimization of a micromixer with a modified Tesla structure[J], Chemical Engineering Journal 158 (2010), 305-314”。

[0030] 以下为本发明提供的细菌芯片结构，对于本发明中叉指电极和微电路集成数量的改变，仍属于本发明的保护范围。同样，本领域普通技术人员无需通过创造性劳动获得技术方案 (如对叉指个数、叉指间隔、混合区微单元个数等改进) 仍属于本发明的保护范围。

[0031] 实施例1

[0032] 本发明提供的细菌芯片由集成有微电极阵列的玻璃基片1和含微通道12的PDMS (聚二甲基硅氧烷) 盖片6键合得到，玻璃基片1上集成有两组叉指电极3 (图1)，叉指电极3由两个圆弧形的叉指微电极4组成，其直径为700 μm ，各含有10个叉指，每个叉指长度在500~800 μm 范围，宽度均为20 μm ，厚度均为100nm，每组叉指电极的相邻叉指的间距为10 μm 。聚二甲基硅氧烷 (PDMS) 盖片6上集成有两组微通道12 (图2)，依次设有进样通道7、混合通道8、检测区9和出样通道10。进样通道7为两条且与混合通道8呈“Y”型结构，两条进样通道7的夹角为60°，所述进样通道始端分别设有进样口，进样通道7的长度为10mm，宽度为300 μm ，深度为

50 μm ;混合通道8为集成有10个呈Tesla构型的微单元11,总长度为10mm,深度为50 μm ;检测区9的构型为圆形,其直径为1000 μm 、深度为50 μm 的圆形区域;出样通道10为直通道,其长度为3mm,宽度和深度与进样通道7相同;出样通道10的末端设有出样口101。

[0033] 实施例2

[0034] 糖基化磁性微球的制备方法如下:在室温下,取60 μL 1mg/mL的羧基化磁性微球(使用前超声)于5mL的玻璃瓶中,用磁铁富集磁性微球,去上清液。加入300 μL EDC (200mM)和300 μL NHS (50mM)的混合溶液,活化磁性微球上的羧基,连续避光振摇反应30min。随后加入300 μL (1mg/ml)新配制的4-氨基苯基 α -D-吡喃甘露糖苷,避光振摇1h。加入300 μL 1%牛血清蛋白溶液,避光振荡2h,停止反应。磁铁富集糖基化磁性微球,去除上清液与使其与游离的甘露糖分离,用200 μL 缓冲液洗涤3次,最终重悬至300 μL ,得到约为0.2mg/mL的糖基化磁性微球,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。所述缓冲液为磷酸缓冲液(PBS)。

[0035] 实施例3

[0036] 用接种环挑取鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)菌种于60mL灭菌乳糖肉汤培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养16h。取1ml,6000rpm离心3min,重悬于超纯水中,重复3次。用超纯水稀释,得到10⁵CFU/mL、5 \times 10⁴CFU/mL、10⁴CFU/mL、5 \times 10³CFU/mL、10³CFU/mL、10²CFU/mL和50CFU/mL系列浓度的沙门氏菌标准液。

[0037] 使用实施例1中细菌芯片,利用上述标准液建立沙门氏菌检测标准曲线。首先,分别取1mL上述标准液,从一个进样口进样;取1mL实施例2中制备的糖基化磁性微球(0.5mg/mL),从另一进样口以1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速进样。经芯片上混合通道充分混合后,得到糖基化磁性微球标记的细菌和多余的磁性微球混悬液,进而进入检测区。在检测区进行DEP操作20min,采用电压为10V,频率为500kHz。此时,叉指电极上捕获糖基化磁性微球标记的细菌,而不捕获多余的糖基化磁性微球。之后,立即切换到原位阻抗检测模式,采用的交流扰动信号为100mV,频率为40kHz,得到 ΔZ 与细菌浓度的关系图 ΔZ -[C](参见图3),得到的线性回归方程为 $\Delta Z = 15831g[C] - 15155$,相关系数为0.9826,检测限可达到100CFU/mL。取正常人尿液样本,加入200CFU/mL的沙门氏菌菌液,按上述方法实验,检测结果为189CFU/mL,回收率为96%,相对标准偏差为6.45(n=5)。

[0038] 实施例4

[0039] 选择浓度为5 \times 10⁴CFU/mL的*S. typhimurium* ATCC14028、*E. coli* JM109、*E. coli* DH5 α 、*S. aureus*、*P. aeruginosa*等五种致病菌按实施例3进行实验,结果显示,表达1型菌毛(含FimH粘附素)的*S. typhimurium* ATCC14028和*E. coli* JM109具有良好响应,阻抗变化标准化值(Normalized impedance change, NIC)达到-124 \pm 18%和-91 \pm 9%,与另外三种细菌(NIC值分别是-8.5 \pm 0.5%、-7.8 \pm 1.8%、-9.0 \pm 1.9%)具有显著性差异。结果显示,本发明所述检测方法可选择性识别表达1型菌毛(含FimH粘附素)的细菌,而不识别其它细菌。

$$[0040] \quad NIC = \frac{Z_{(Bacteria)} - Z_{(Control)}}{Z_{(Control)}} \times 100\% \quad (1)$$

[0041] NIC为40kHz时阻抗值Z的标准化值;Z_(Bacteria)为上述细菌溶液按照实施例3实验后得到的阻抗值;Z_(Control)为不含细菌的超纯水按照实施例3实验后得到的阻抗值。

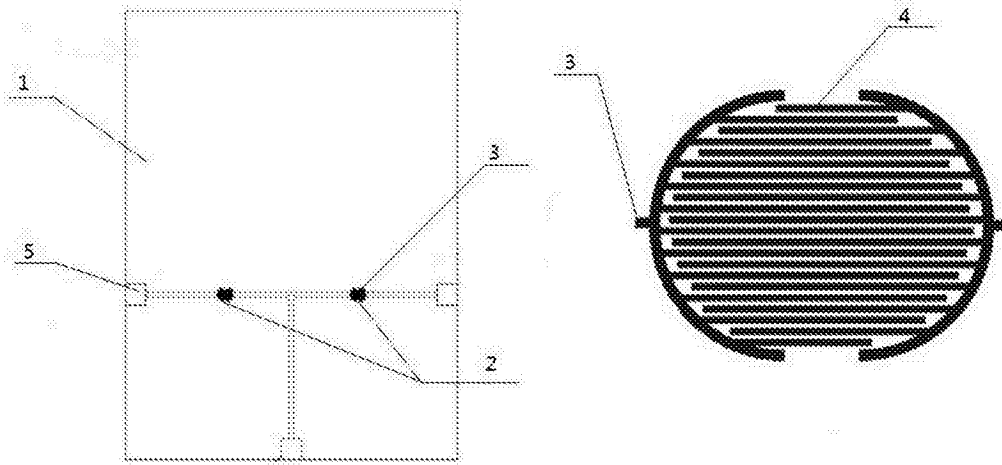


图1

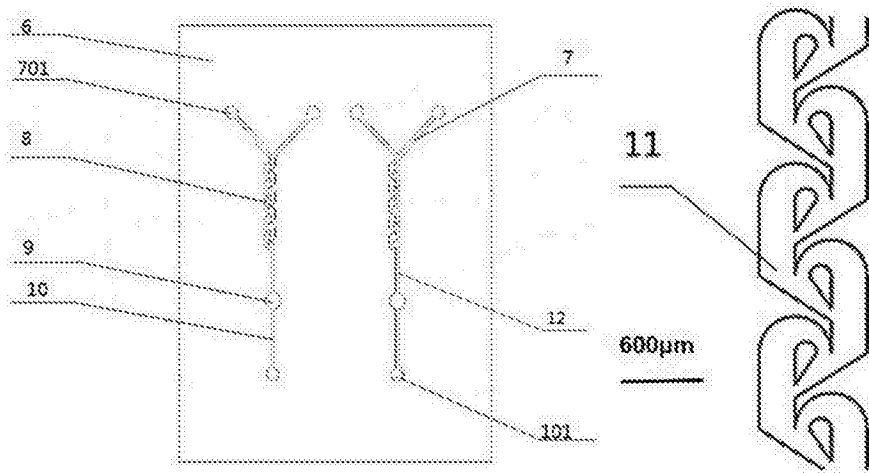


图2

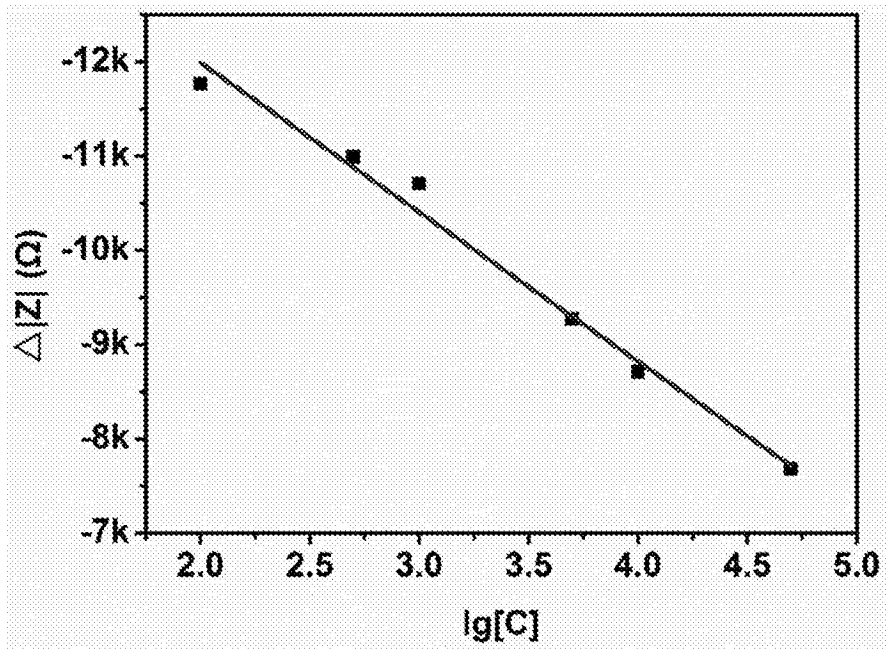


图3