



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103558192 B

(45)授权公告日 2017. 10. 13

(21)申请号 201310350128.6

CN 202794038 U, 2013.03.13,

(22)申请日 2013.08.13

审查员 陶颖

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103558192 A

(43)申请公布日 2014.02.05

(73)专利权人 兴旺投资有限公司

地址 100083 北京市学院路30号科大天工

大厦B座14层1403

专利权人 彩虹集团公司

(72)发明人 李早霞 曹春雷 蒲鹏鹏

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/01(2006.01)

(56)对比文件

CN 101688843 A, 2010.03.31,

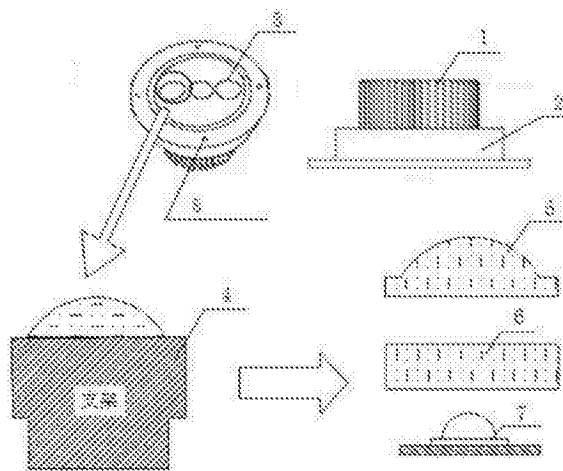
权利要求书1页 说明书4页 附图5页

(54)发明名称

一种检测红色荧光蛋白种子的装置

(57)摘要

本发明专利公开了一种检测含红色荧光蛋白植物种子的光学系统,包括有散热器1,发光套件3,灯具外壳9和分选仓10。发光套件3位于分选仓10上方部位,由一组共三颗LED灯组成,每颗LED灯珠前加装有550 nm滤波片6,滤出光波为545-555 nm,再通过聚光透镜5聚光,使形成的光斑均匀。散热器1紧贴发光组件,维持发光套件3正常工作条件。分选仓10由观测窗口12和操作室11组成,观测窗口12被红色滤色片覆盖。本发明利用合适的光源结合滤波片,获得一定波长的光线,激发农作物种子中含有的特定红色蛋白发出红色荧光,再通过红色滤色片过滤背景光线,分拣出含有特定红色蛋白的植物种子。



1. 一种红色荧光种子分拣装置,所述装置含有一个梯形立方体的灯具外壳(9),在灯具外壳(9)的顶部有一个圆形孔,所述圆形孔中嵌有一套30W的散热器(1),在散热器的下方连有一个LED光源套件(3),LED光源套件(3)的下面直到灯具外壳的底部为操作仓(11),其特征在于所述LED光源套件(3)发白色光,其下面还安装有一块波长通过能力为550nm的滤波片(6),所述滤波片(6)的下面还装有一个聚光透镜(5),所述聚光透镜(5)的透镜弧度为2.16,使光源发出的光线呈120°广角,灯具外壳(9)上有一个观测窗口(12),窗口上覆盖有红色滤色片,灯具外壳(9)下半部正面底座以上138 mm处至底座的部分全部切除,灯具外壳两侧面也切出138 mm×150 mm 矩形开口。

2. 权利要求1所述的分拣装置,其中所述的滤波片(6)厚度为6mm,面积为506 mm²。

3. 权利要求1-2之任一所述的分拣装置,其中所述的观测窗口(12)为矩形。

4. 权利要求1-2之任一所述的分拣装置,其中所述的LED光源套件(3)含有3颗10 W的LED灯珠(7),呈直线排列,灯珠间距为26 mm。

5. 权利要求4所述的分拣装置,其中所述LED灯珠(7)的底部与散热器(1)通过导热硅胶直接连接。

6. 权利要求1-2之任一所述的分拣装置,其中所述的散热器(1)为铝制太阳花散盘散热器,直径为120 mm,高60 mm,散热器效果为温升≤25℃。

一种检测红色荧光蛋白种子的装置

技术领域

[0001] 本发明涉及到用于检测含红色荧光蛋白种子的方法和装置,具体涉及一种用于检测红色荧光蛋白种子的LED灯具及其装置。

背景技术

[0002] 利用转基因技术能够将具有优良性状的目的基因导入植物基因组中,从而使植物的遗传性状得到改良。然而转化过程中只有少数植物细胞能够吸收外源DNA并整合进植物基因组中,大多数细胞是未转化的。因此,目的基因的引入常常需要借助于筛选标记基因,赋予转化细胞以特定的选择性标记,以便识别和鉴定转基因植物。

[0003] 随着转基因产品的商业化,转基因的生物安全尤其是筛选标记的生物安全受到广泛关注。荧光蛋白由于其具有荧光的发生不需要任何底物和辅助因子,其表达产物也对细胞没有任何毒性,不会影响细胞的正常生长和功能,且利用荧光的强度可以分辨出转基因植物的纯合性以及杂合性等特性被视作一种安全的筛选标记。第一个广泛应用的荧光蛋白是绿色荧光蛋白(GFP),GFP用于植物转化中的筛选标记已经申请专利(US6486382,EP0904371B1)。但是绿色蛋白本身还是有很多缺点的,它的发射波普限制在440~529nm,激发和发射波谱太短,能够激发细胞内某些物质发生荧光,造成细胞内荧光成像背景较高。

[0004] 红色荧光蛋白与绿色荧光蛋白相比,由于其激发和发射波长更长,细胞内成像背景低,因此迅速被关注。不同野生型的红色荧光蛋白经过一系列分子修饰,得到各种不同发射波长的突变体,极大地丰富了荧光蛋白的光谱多样性,为细胞内的多色标记提供了更多的荧光标签。利用红色荧光蛋白作为转基因植物筛选标记的方法见中国专利“一种利用红色荧光蛋白用做水稻转化筛选标记的转化方法(201010563552.5)”。

[0005] 在转基因植物的研究和生产实践过程中,经常需要将植物种子中的转基因种子和非转基因种子区分开。对于运用红色荧光标记的转基因植物,其种子中含有红色荧光蛋白,在特定波长的激发光下能发射出红色荧光,根据这一特点,能够区分转基因种子和非转基因种子。

[0006] 目前,在实验室小规模实验中通常使用荧光共聚焦显微镜进行红色荧光蛋白检测,荧光显微镜检测准确率高,除红色荧光外还可检测多种荧光表达,可观察植物种子各部分荧光表达情况,但同时也存在费用高昂,使用不便,检测通量低等缺点,不适合较大量的种子筛选和检测。市面上现有一些以汞灯激发光为光源,配合合适的滤波片获得激发光的产品,可以支持小规模种子分拣,但受限于光源系统,这类产品能耗高,检测光斑小,使用寿命短,费用较高。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是针对上述含红色荧光蛋白的种子分拣问题,提供一种检测效率更高、准确率更高的检测方法和分拣仪。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明利用LED光源技术具有体积小、使用寿命长、光效

高、能耗低、发光纯度高的优点,利用合适光波的LED灯具,配合滤波片,作为含红色荧光蛋白种子的理想检测光源。

[0009] 为了获得特定波长光源,采用三个10W的LED灯珠直线排列,灯珠间距26mm,每颗灯珠前安装一块波长通过能力为550nm滤波片,滤波片厚度为6mm,面积为506mm²,使滤出的光线波长在545-555nm区间之内。为了使光线集中而且均匀,滤波片前方装有聚光透镜,透镜弧度为2.16,使光源发出的光线呈120°广角,在操作仓中形成约300cm²的均匀光斑。

[0010] 为了解决LED灯珠7的散热问题,灯珠底部与散热器通过导热硅胶直接连接,散热器为铝制太阳花散盘散热器,直径为120mm,高60mm,散热器效果为温升≤25℃。

[0011] 灯具外壳为梯形立方体,高400mm,下底面为400mm×300mm矩形,上底面为250mm×150mm矩形。灯具外壳顶部切出一个直径为100mm的圆形孔。LED光源从灯具外壳顶部的内侧安装在圆形孔下方,散热器部分从灯具外壳顶部的外侧安装在圆形孔上方,并利用一个圆盘形支架将其固定在灯具外壳外,LED灯珠、滤波片和聚光透镜部分则卡在灯具外壳内部。散热器和LED光源通过圆形孔连接。

[0012] 为了便于种子分选时的观察,灯具外壳正面中部切出一个200mm×150mm的矩形开口作为观测窗口,窗口上覆盖有红色滤色片,滤除所有的反射光线,仅保留红色荧光蛋白被激发后发射的红色荧光通过,从而能够分辨含有红色荧光蛋白的种子和不含有红色荧光蛋白的种子。

[0013] 为了使分选种子时操作者双手可自由活动,灯具外壳下半部正面底座以上138mm部分全部切除,灯具外壳两侧面也切出138mm×150mm矩形开口,便于放入和取出植物种子以及分选操作。

[0014] 本发明提供了一种利用LED光源检测植物种子中红色荧光蛋白的方法,筛选出的红色荧光种子经分子检测,正确率达100%。因此,本发明为筛选和检测含红色荧光蛋白的植物种子提供了一种快速便捷的方法。

[0015] 本发明的优点在于,(1)所使用的光源为LED光源,光效高,能耗低,使用寿命长,从而降低了检测成本;(2)利用滤波片滤除杂波,保证了激发光源的纯度,降低了背景噪点;(3)采用红色滤光片过滤背景光线,分辨出反射的红色荧光,提高了筛选的准确性。

[0016] 本发明是通过下列技术方案实现的:当红色荧光蛋白受到特定波长光源激发时,会激发出红色荧光。LED白色光源发出的光线,通过550nm滤波片后,得到550nm黄绿光,该波长的光线可以激发红色荧光蛋白发出红色荧光。利用红色滤色片遮挡反射光线,仅允许红色荧光蛋白发出的发射光线通过,即可通过肉眼可见的红色荧光分析筛选含有红色荧光转基因标记的种子。

附图说明

[0017] 图1:实施例1中光源套件及散热器组件示意图,其中1为散热器,2为圆盘形支架,3为LED光源套件,4为光源支架,5为聚光透镜,6为滤波片,7为LED灯珠,8为螺钉。

[0018] 图2:实施例1中LED光源发光能力与波长的曲线示意图。

[0019] 图3:实施例1中滤波片波长通过能力曲线示意图。

[0020] 图4:实施例1中灯具外壳俯视图,9为灯具外壳。

[0021] 图5:实施例1中灯具外壳侧视图,10为分选仓。

[0022] 图6:实施例1中灯具外壳正视图,11为操作室,12为观测窗口。

[0023] 图7:实施例2中水稻种子分选示意图,其中13为含红色荧光蛋白的水稻种子,14为不含红色荧光蛋白的水稻种子。

[0024] 图8:实施例2中拟南芥种子分选示意图,其中15为含红色荧光蛋白的拟南芥种子,16为不含红色荧光蛋白的拟南芥种子。

[0025] 图9:实施例3中水稻红色荧光种子PCR分子检测示意图(M:DNA分子量标准;-:阴性对照;+:阳性对照)。

[0026] 图10:实施例3中水稻非红色荧光种子PCR分子检测示意图(M:DNA分子量标准;-:阴性对照;+:阳性对照)。

具体实施方式

[0027] 下文结合实施例和附图具体描述本发明的技术方案。

[0028] 实施例1:装置构成

[0029] 图1为光源套件及散热器组件示意图。LED光源套件3是实现灯具功能的主要器件,如图1所示,主要包括光源支架4,聚光透镜5,滤波片6,LED灯珠7,螺钉8来组装而成。LED灯珠7选择白色光,在本实施例中,3颗10W的LED灯珠7组成发光光源,呈直线排列,灯珠间距为26mm,采用高精度恒流驱动,确保LED光源套件3在工作过程中亮度均匀一致。LED灯珠7前装有根据红色荧光蛋白激发光波长选择的滤波片6,滤波片6厚度为6mm,面积为506mm²,在本实施例中,滤波片6通过波长为550nm,光线通过滤波片6后为波长区间为545-555nm。LED光源套件3外部为聚光透镜5,聚光透镜5弧度为2.16,选用透光率大于93%的PMMA材料制作。通过聚光透镜5对光线进行聚光之后,光源套件发光角度为120度广角。操作室11距LED光源套件3距离为400mm,聚光后的光线在操作室11上的有效光斑面积为300cm²,中心区域照度为4000lux。聚光透镜5,滤波片6,LED灯珠7通过螺钉8被固定在了支架4上。LED光源套件3与散热器1相连,散热器1由导热材料制成,例如可选用直径为120mm,高为60mm的铝制太阳花散热盘,散热效率为温升≤25℃。

[0030] 由图2可知,由LED灯珠7发出的光线,在环境温度为25.3Deg,环境湿度为65%的条件下进行测试。其光谱覆盖390nm-740nm范围,CIE 1931色品检测结果为:相关色温T_c=7667K,主波长λ_d=479.6nm,色纯度Purity=14.0%,峰值波长λ_p=440nm,色品坐标x=0.2996,y=0.3046。光参数检测结果为:光通量Φ=737.8lm,光效为0.01lm/W,辐射通量Φ_e=2.487W,光子数为1.093e+000umol/s,荧光蓝光比为1.812,电流I=2A。

[0031] 本实施例根据红色荧光蛋白的激发光特性选择滤波片6。由图3可知,该滤波片6对于波长为550nm的光线透光能力最强,对于波长在550nm以外的光线具有良好的阻挡效果。

[0032] 图4为本发明灯具外壳俯视图,图5为本发明灯具侧视图,图6为本发明灯具外壳正视图。灯具外壳9为梯形立方体,高400mm,下底面为400mm×300mm矩形,上底面为250mm×150mm矩形。灯具外壳9由ABS材料制作,灯具外壳顶部切出一个直径为100mm的圆形孔。LED光源套件3从灯具外壳9顶部的内侧安装,散热器1部分从灯具外壳9顶部的外侧安装,并利用一个圆盘形支架2将其固定在灯具外壳外,LED灯珠7、滤波片6和聚光透镜5部分则固定在灯具外壳9顶部内侧。散热器1与LED光源套件3通过圆形孔连接。LED光源套件3位于分选仓10的顶部,分选仓10由操作室11和观测窗口12组成。

[0033] 如图6所示,为了便于种子分选时的观察,灯具外壳中部切出一个200mm×150mm的矩形开口作为观测窗口12,窗口上覆盖有红色滤色片,滤除所有的反射光线,仅保留红色荧光蛋白被激发后发射的红色荧光通过,从而能够分辨含有红色荧光蛋白的种子和不含红色荧光蛋白的种子。为了使分选种子时操作者双手可自由活动,灯具外壳9下半部正面底座以上138mm部分全部切除,灯具外壳两侧面也切出138mm×150mm矩形开口,形成操作室11便于放入和取出植物种子以及分选操作。

[0034] 实施例2:含红色荧光蛋白转基因植物种子检测

[0035] 当LED光源套件3处于工作状态时,操作室11底面出现一个面积约300cm²的绿色光斑,中心区域照度为4000lux。将待检测的植物种子从灯具外壳正前方开口放入操作室11内。在绿色光线的照射下,含有红色荧光蛋白的植物种子发射出红色荧光,而不含红色荧光蛋白的植物种子则不发荧光。

[0036] 通过观测窗口12观察,在经过红色滤色片的过滤后,红色荧光与背景光线区分开来,含红色荧光蛋白的水稻种子13呈现出亮红色,而不含红色荧光蛋白的水稻种子14不发荧光,如图7所示。

[0037] 通过观测窗口12观察,在经过红色滤色片的过滤后,红色荧光与背景光线区分开来,含红色荧光蛋白的拟南芥种子15呈现出亮红色,而不含红色荧光蛋白的拟南芥种子16不发荧光,如图8所示。

[0038] 在本实施例中,通过转基因技术获得的含有红色荧光蛋白的种子与不含红色荧光蛋白的种子,在理论上是1:1分离的。利用本发明的装置对于混杂的种子进行检测,两种种子的分离比例与理论值相符,为1:1分离。

[0039] 实施例3:筛选后种子PCR分子检测

[0040] 在实际生产过程中,红色荧光种子要与非红色荧光种子完全区分开,检测准确性需达到99.95%以上。因此,需要对本发明的检测准确性用分子生物学的方法做进一步的验证。以实施例2中检测出来的红色荧光水稻种子和非红色荧光水稻种子作为样本进行PCR分子检测,验证本发明的准确性。

[0041] 取实施例2中的红色荧光水稻种子,抽取总DNA,提取方法按按中华人民共和国农业行业标准NY/T674操作。以红色荧光蛋白基因序列为模板设计引物,对红色荧光蛋白水稻种子基因组DNA进行PCR扩增。扩增产物片段为526bp。扩增程序为:94℃5min;94℃1min,60℃1min,72℃1min,重复30个循环;72℃10min。正向引物序列为5'-GGACTTGA ACTCCACCAGG-3';反向引物序列为:5'-CGAGAACGTCATCACCGAGT-3'。附图9为部分红色荧光水稻种子PCR扩增结果,所有样品均扩增出了目的条带,大小与阳性对照一致,说明这些红色荧光种子中含有红色荧光蛋白基因,检测正确率达到100%。

[0042] 取实施例2中的非红色荧光水稻种子,抽取总DNA,提取方法按按中华人民共和国农业行业标准NY/T674操作。PCR分子检测步骤同红色荧光种子检测,附图10为部分非红色荧光水稻种子PCR扩增结果,所有样品均未扩增出目的条带,说明这些非红色荧光种子中不含有红色荧光蛋白基因,检测正确率达到100%。

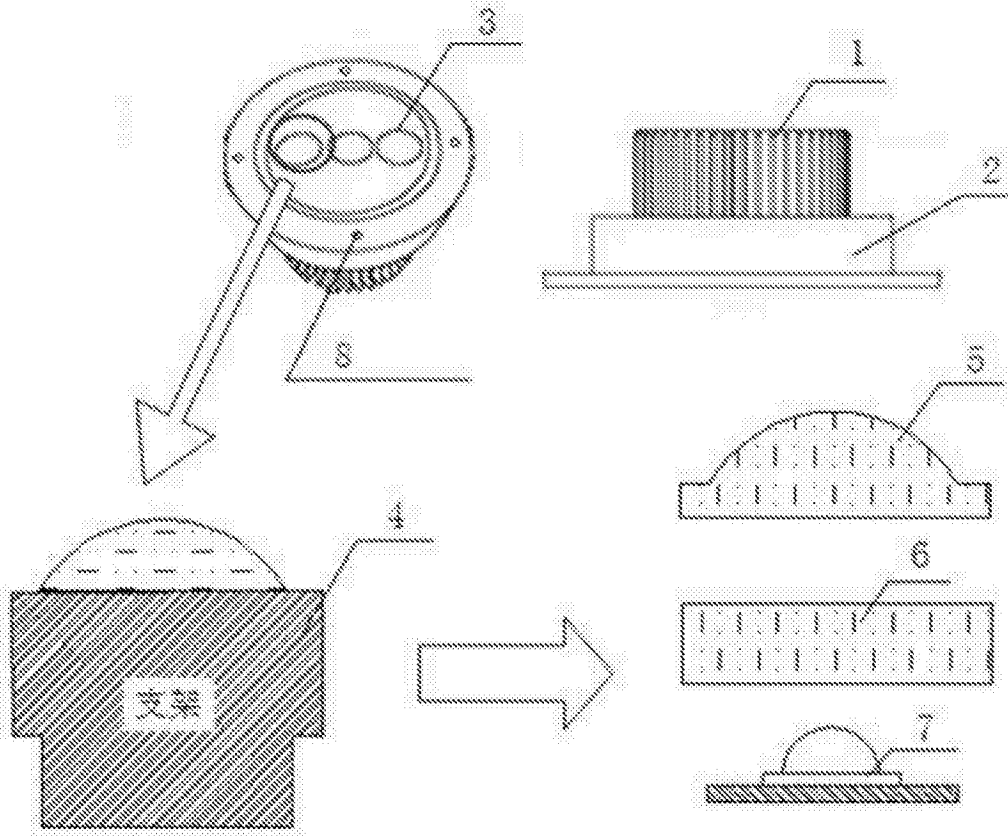


图1

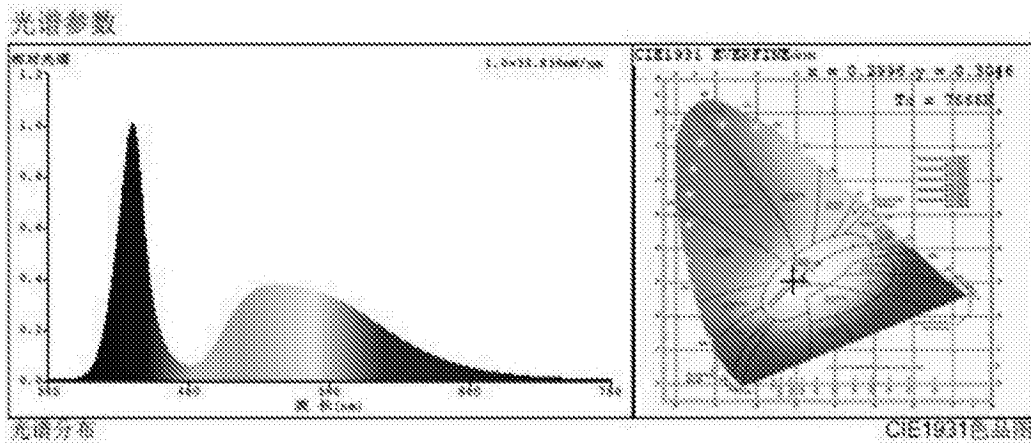


图2

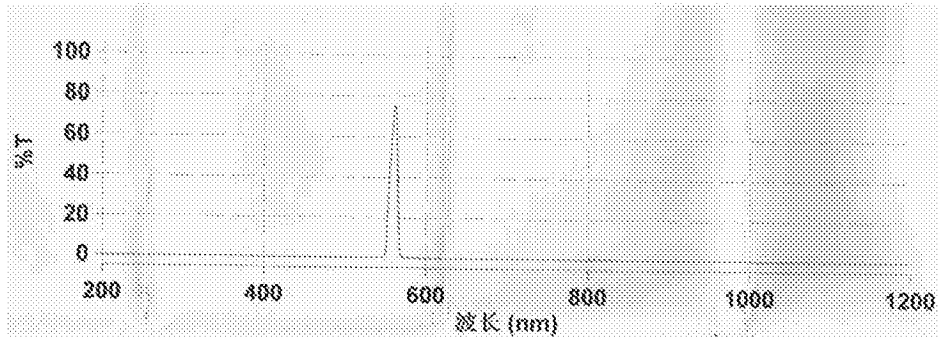


图3

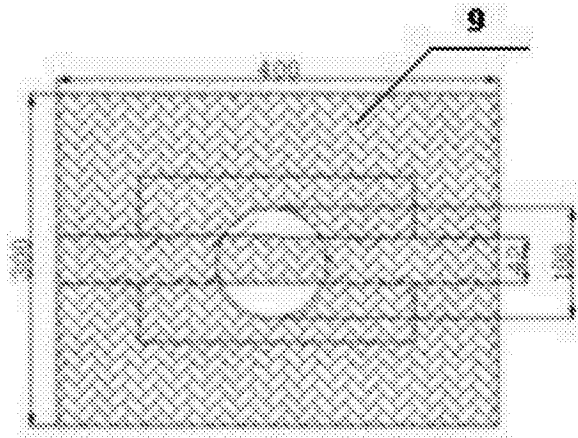


图4

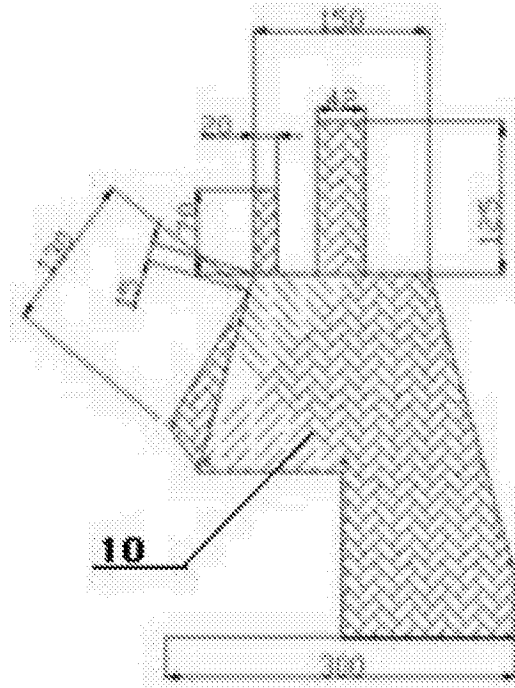


图5

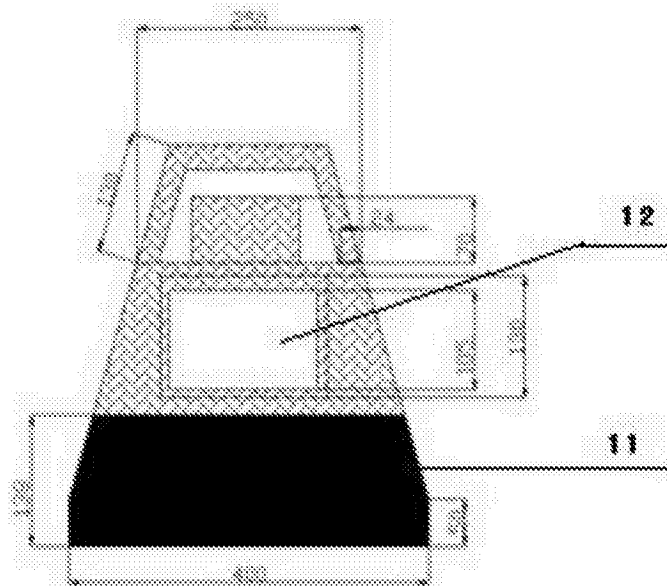


图6

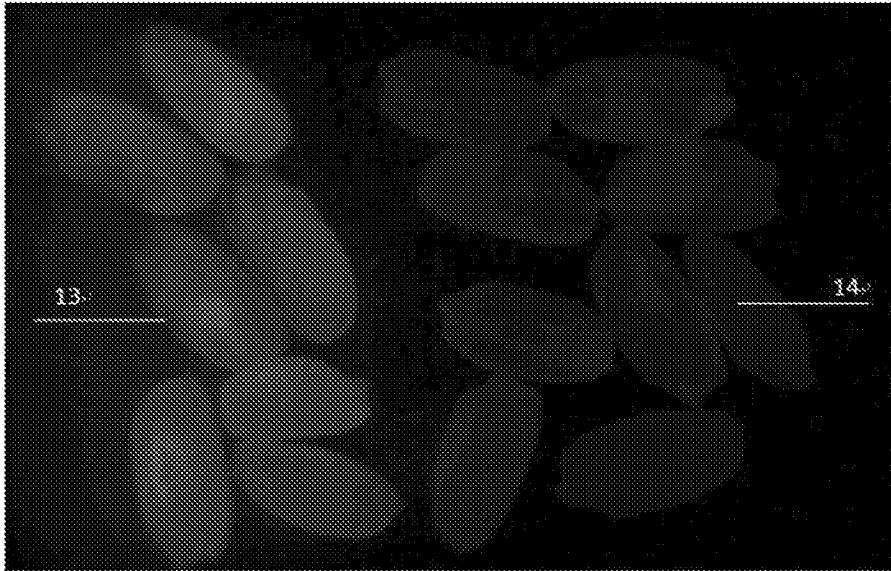


图7

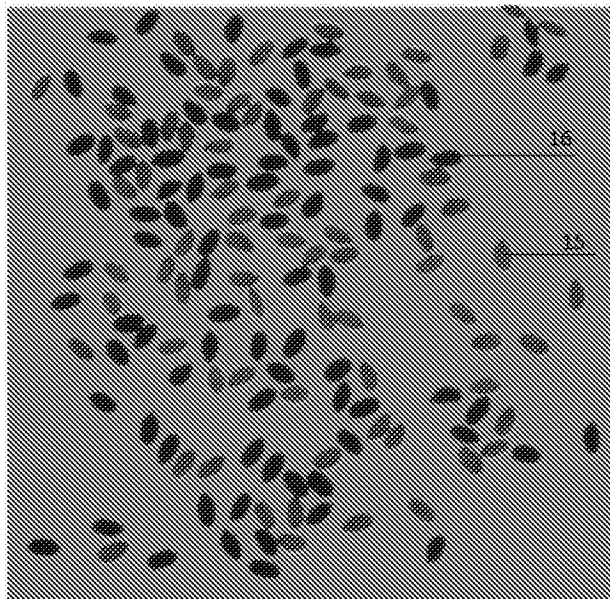


图8

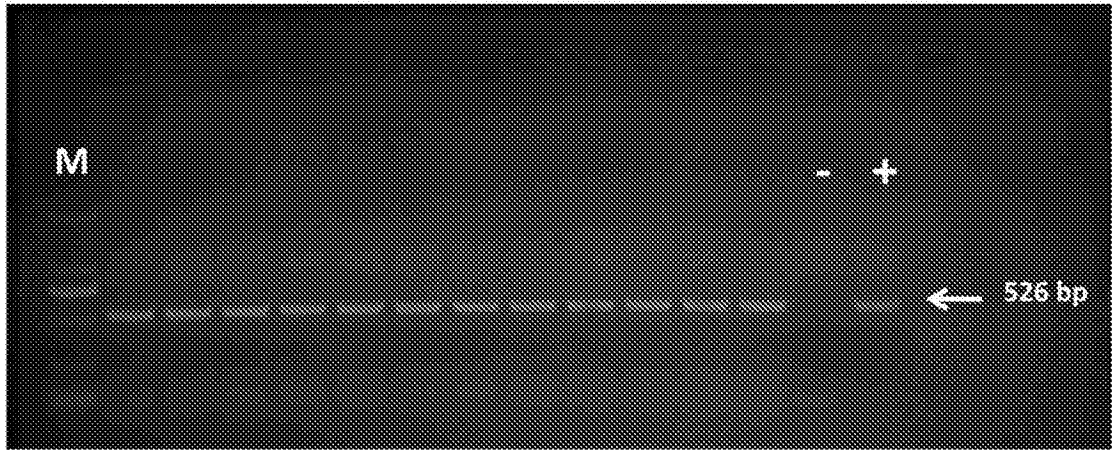


图9

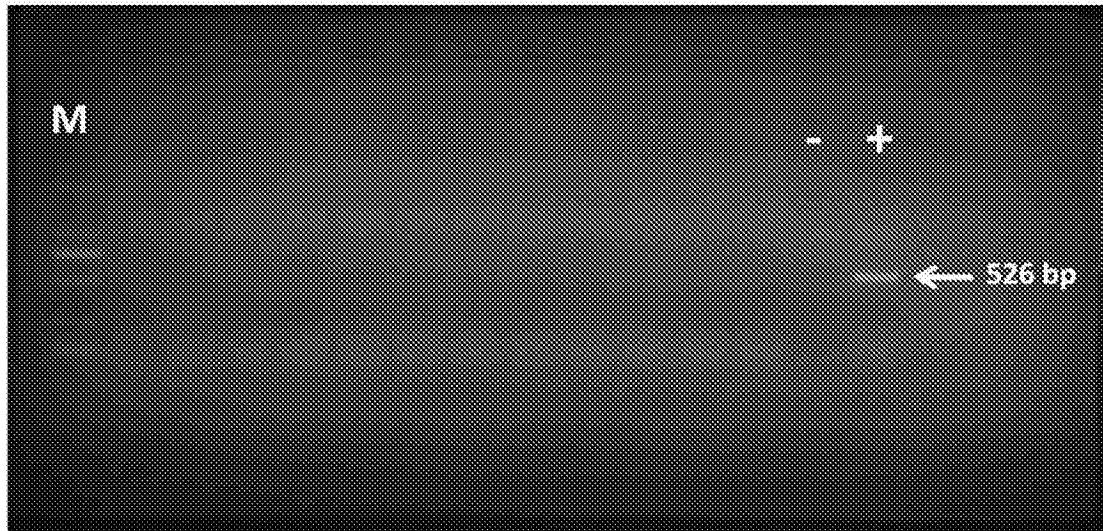


图10