



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116297359 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(21) 申请号 202310090823.7

(22) 申请日 2023.02.09

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 何柳 龚晚君 王志明  
刘勇

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理人 刘远

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

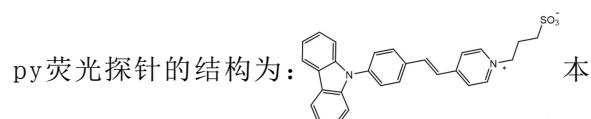
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

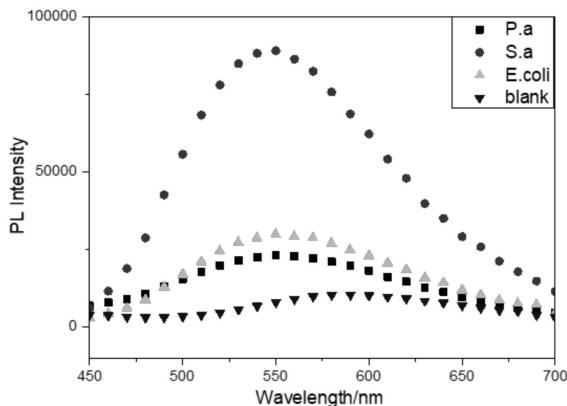
一种快速检测细菌浓度的方法

(57) 摘要

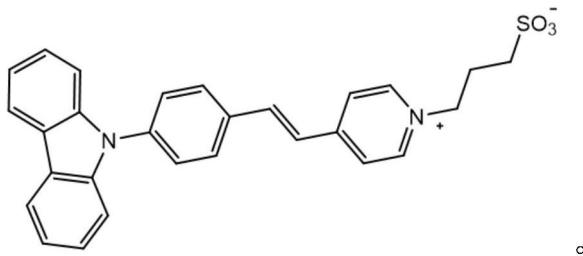
本发明公开了一种快速检测细菌浓度的方法；本发明将Car-py荧光探针与含有细菌的待测溶液混合，静置得混合溶液；检测混合溶液在紫外光下的荧光强度，得到细菌的浓度；所述Car-py荧光探针的结构为：



发明基于AIE荧光探针(Car-py)与多种细菌结合引起的聚集诱导发光特性，对细菌具有灵敏的荧光响应，其聚集发光效率高，光稳定性好，荧光强度与细菌量成正比，并且该检测过程操作简单，无需进行细菌培养阶段，耗时短，对检测样本形式的包容性较强，能实现快速、准确的细菌浓度检测，实用性高。



1. 一种快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,将Car-py荧光探针与含有细菌的待测溶液混合,静置得混合溶液;检测混合溶液在紫外光下的荧光强度,得到细菌的浓度;  
所述Car-py荧光探针的结构如下:



2. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述细菌为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的一种。

3. 根据权利要求2所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述革兰氏阳性菌为金黄色葡萄球菌;所述革兰氏阴性菌为大肠杆菌或铜绿假单胞菌。

4. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述荧光强度通过酶标仪检测。

5. 根据权利要求4所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述酶标仪的发射波长范围为450-700nm。

6. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述紫外光的波长为390-410nm。

7. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述细菌的浓度根据标准曲线计算;当细菌为金黄色葡萄球菌时,标准曲线方程为 $y=43594x+8276$ ,当细菌为大肠杆菌时,标准曲线方程为 $y=41758x-23026$ ,其中x为细菌的OD值,y为酶标仪所测得的最大发射波长处的荧光强度值。

8. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述含有细菌的待测溶液中细菌的浓度为 $OD=0.5-1.5$ 。

9. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述混合溶液中Car-py荧光探针的浓度为 $5-10\mu M$ 。

10. 根据权利要求1所述的快速检测细菌浓度的方法,其特征在于,所述静置的时间至少10分钟。

## 一种快速检测细菌浓度的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测技术领域,尤其涉及一种快速检测细菌浓度的方法。

### 背景技术

[0002] 细菌存在我们生活的每一个角落,广泛分布在土壤、水和植物中,人体身上也带有相当多的细菌。细菌对环境、人类和动物既有用处又有危害,一些细菌成为病原体,导致了破伤风、伤寒、肺炎、梅毒、霍乱和肺结核。在植物中,细菌导致叶斑病、火疫病和萎蔫等。所以细菌检测的应用范围相对广泛,已经覆盖临床感染性疾病诊断、药物研发、化妆品工业、农业食品检测及环保等各个方面,比如食品安全方面就有许多国标对细菌检测进行相关规定。但是细菌的个体非常小,目前已知最小的细菌只有0.2微米长,并且种类众多,所以对于细菌检测还是存在一定的难点。目前主要的检测方法包括平板培养菌落计数法 (Townsend D E, Ali N. Comparison of SimPlate Total Plate Count test with plate count agar method for detection and quantitation of bacteria in food. [J]. Journal of Aoac International, 1998 (3) :563-569)、分子生物学相关方法(如PCR) (Schmalz, G., Tsigaras, S., Rinke, S., Kottmann, T., Haak, R., & Ziebolz, D. (2016) . Detection of five potentially periodontal pathogenic bacteria in peri-implant disease: A comparison of PCR and real-time PCR. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 85 (3) , 289-294) 和免疫学相关方法(如ELISA) (Ferguson, C. M. J., Booth, N. A., & Allan, E. J. (2000) . An ELISA for the detection of *Bacillus subtilis* L-form bacteria confirms their symbiosis in strawberry. Letters in Applied Microbiology, 31 (5) , 390-394) 但它们都存在一些不足,比如平板培养菌落计数法检测时间较长(一般在5-7天左右)并且操作步骤多。分子生物学相关方法及免疫学相关方法则需要专业的设备和操作人员,成本较高并且检测结果容易出现假阳性。因此,需要开发一种操作简单、快速且灵敏的识别方法来进行细菌的检测。

[0003] 荧光检测法因具有快速、简单、灵敏、能够实时监测等优点而被开发应用于细菌的检测。然而,传统的荧光探针具有刚性平面结构,通常具有很强的荧光背景,不利于可视化的检测细菌,并且光稳定性较差,不能长时间的监测细菌,当浓度较大时还会发生聚集诱导猝灭效应,极大的降低了检测的灵敏度。不同于传统的荧光分子,具有聚集诱导发光(aggregation induced emission, AIE)特性的荧光分子,由于具有多转子结构,通常在溶液中不发光或弱发光,但当其分子内运动受到周围环境限制时,发出强烈荧光,所以当AIE分子聚集在细菌表面或者大量进入细菌内,其分子内运动受到限制时,会发出聚集而发出强烈的荧光,具有荧光背景低、光稳定性好等优点,能够实现对细菌的快速且可视化检测。

### 发明内容:

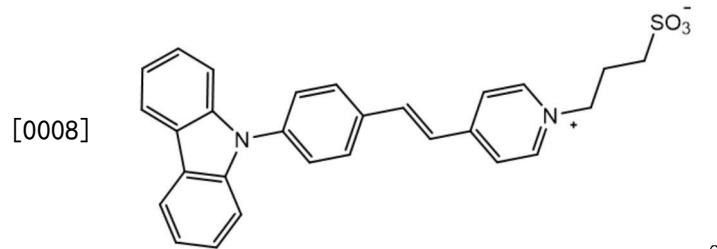
[0004] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种利用AIE荧光探针快速且可视化检测细菌浓度的方法;这一探针通过荧光增强来检测革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌,对细

菌具有敏感的荧光响应,其聚集态发光效率高,光稳定性高,荧光强度与细菌量呈正比例,是一种能实现快速且肉眼可视化检测细菌的方法。

[0005] 本发明的目的通过如下技术方案实现。

[0006] 一种快速检测细菌浓度的方法,将Car-py荧光探针与含有细菌的待测溶液混合,静置得混合溶液;检测混合溶液在紫外光下的荧光强度,得到细菌的浓度;

[0007] 所述Car-py荧光探针的结构如下:



[0009] 优选地,所述细菌为革兰氏阳性菌和阴性菌中的一种。

[0010] 进一步优选地,所述革兰氏阳性菌为金黄色葡萄球菌;所述革兰氏阴性菌为大肠杆菌或铜绿假单胞菌。

[0011] 优选地,所述荧光强度通过酶标仪检测。

[0012] 在无菌溶液中,探针的最大发射波长在600-620nm,而当有菌存在时,探针的最大发射波长发生蓝移,在550-580nm左右。

[0013] 进一步优选地,所述酶标仪的发射波长范围为450-700nm。

[0014] 优选地,所述紫外光的波长为390-410nm。

[0015] 优选地,所述测细菌的浓度根据标准曲线计算;当细菌为金黄色葡萄球菌时,标准曲线方程为 $y=43594x+8276$ ,当细菌为大肠杆菌时,标准曲线方程为 $y=41758x-23026$ ,其中x为细菌的OD值,y为酶标仪所测得的最大发射波长处的荧光强度值。

[0016] 优选地,所述含有细菌的待测溶液中细菌的浓度为OD=0.5-1.5。

[0017] 优选地,所述混合溶液中Car-py荧光探针的浓度为5-10μM。

[0018] 优选地,所述静置的时间至少10分钟。

[0019] 本发明实施例以最常见的三种细菌大肠杆菌(G-菌)、铜绿假单胞菌(G-)菌和金黄色葡萄球菌(G+菌)为代表进行Car-py对细菌浓度检测试验。为了满足肉眼可视化鉴定要求,以10μM作为Car-py在磷酸缓冲液(PBS)溶液中的试验浓度。

[0020] (1) Car-py在PBS中具有弱的红色荧光,满足细菌可视化鉴定基本需求。在紫外灯照射下,Car-py在PBS溶液中的荧光为很弱的红色荧光,当分别加入三种细菌后,出现明显的黄绿色荧光。用酶标仪进一步验证其染色效果,从荧光光谱上能看出,Car-py在PBS中最大发射波长在600-620nm左右,而在加入菌的情况下,Car-py探针的最大发射波长蓝移至550-580nm范围内,三种细菌溶液相比于PBS缓冲溶液中的荧光强度显著增强,进一步证明Car-py荧光探针可以通过酶标仪检测荧光强度来实现对细菌的检测。

[0021] (2) 借用共聚焦荧光显微镜,实现在细胞水平上检测细菌。在显微镜下能清楚的看到,大肠杆菌和铜绿假单胞菌具有较低的染色效率,而金黄色葡萄球菌具有较高的染色效率(结果与酶标仪检测的荧光强度相匹配),表明Car-py对三种细菌具有不同的结合亲和力,对金黄色葡萄球菌亲和力大于大肠杆菌和铜绿假单胞菌。这主要是因为G+细菌的细胞

膜只被一层疏松多孔的细胞壁覆盖,所以荧光探针很容易进入细菌里面,聚集在细菌中而发出强烈的荧光,而G-细菌细胞壁拥有额外的外膜,能够发挥屏障功能,荧光探针很难进入细菌内部,只在细菌表面聚集,从成像效果上也能看出,G-细菌只在细菌表面层发光,而G+细菌整个内部都发出强烈的荧光。

[0022] (3)接下来对细菌检测的最低限度进行研究,通过荧光强度与细菌的量来进行线性拟合,确定了Car-py荧光探针对各种细菌检测的标准曲线以及最低检测限度,探针能检测到浓度较低的革兰氏阳性菌,并且具有较好的线性关系,而对于革兰氏阴性菌,Car-py也能检测到,因为Car-py对革兰氏阴性菌的染色效率较低,所以只在高浓度菌范围内具有较好的线性关系。

[0023] (4)进行Car-py聚集诱导发光性质的测试,在两种不同溶剂中进行荧光光谱测试,在DMSO良溶剂中,Car-py荧光探针的最大发射波长在620nm左右,而在H<sub>2</sub>O不良溶剂中,Car-py荧光探针的最大发射光谱发生蓝移,在580nm左右,这结果和Car-py荧光探针与细菌结合前后的荧光光谱相同,进一步证明了Car-py荧光探针检测细菌探针的基本原理是通过聚集在菌表面或者菌内而发出强烈的荧光。

[0024] 本发明具有如下优点及有益效果:

[0025] 本发明基于AIE荧光探针(Car-py)与多种细菌结合引起的聚集诱导发光特性,对细菌具有灵敏的荧光响应,其聚集发光效率高,光稳定性好,荧光强度与细菌量成正比,并且该检测过程操作简单,无需进行细菌培养阶段,耗时短,对检测样本形式的包容性较强,能实现快速、准确的细菌浓度检测,实用性高。

## 附图说明

- [0026] 图1是在紫外灯照射下,Car-py荧光探针在PBS和不同菌悬液中的对比照片。
- [0027] 图2是Car-py荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。
- [0028] 图3是共聚焦显微镜下,Car-py荧光探针与不同细菌结合后成像图片。
- [0029] 图4a-图4d是Car-py荧光探针在不同细菌中荧光强度和菌OD值的线性关系图。
- [0030] 图5是Car-py荧光探针在不同溶剂中的荧光发射光谱。
- [0031] 图6是BMTAP荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。
- [0032] 图7是BMTAP荧光探针与不同细菌结合后成像图片。

## 具体实施方式

[0033] 以下结合具体实施例及附图对本发明的技术方案作进一步详细的描述,但本发明的保护范围及实施方式不限于此。

[0034] 实施例1:

[0035] 步骤(1):将经过过夜培养的大肠杆菌(E.coli)用PBS缓冲溶液配置成OD<sub>600</sub>=1的菌悬液;

[0036] 步骤(2):取1mL步骤(1)中的菌悬液加入1uL的Car-py(10mM)荧光探针,摇匀,制得混合液,静置10分钟;

[0037] 步骤(3):取200μL步骤(2)所得的混合液加入一次性无菌96孔板中,用酶标仪检测荧光强度。设置激发波长400nm,发射范围450-700nm;

[0038] 步骤(4):取2 $\mu$ L步骤(2)所得的混合液滴加在载玻片上,盖上盖玻片,在共聚焦显微镜下成像,激发波长405nm,发射范围450-600nm;

[0039] 步骤(5):取200 $\mu$ L  $OD_{600}=1$ 的大肠杆菌加入一次性无菌96孔板中,用PBS进行等比稀释,并用酶标仪测定稀释后 $OD_{600}$ 值。加入Car-py (10mM) 荧光探针使终浓度在10 $\mu$ M,静置10min后,用酶标仪测荧光强度,设置激发波长400nm,发射范围450-700nm。

[0040] 实施例2:

[0041] 步骤(1):将经过过夜培养的金黄色葡萄球菌(S.a)用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液;

[0042] 步骤(2):取1mL步骤(1)中的菌悬液加入1uL的Car-py (10mM) 荧光探针,摇匀,制得混合液,静置10分钟;

[0043] 步骤(3):取200 $\mu$ L步骤(2)所得的混合液加入一次性无菌96孔板中,用酶标仪检测荧光强度。设置激发波长400nm,发射范围450-700nm;

[0044] 步骤(4):取2 $\mu$ L步骤(2)所得的混合液滴加在载玻片上,盖上盖玻片,在共聚焦显微镜下成像,激发波长405nm,发射范围450-600nm;

[0045] 步骤(5):取200 $\mu$ L  $OD_{600}=1$ 的金黄色葡萄球菌加入一次性无菌96孔板中,用PBS进行等比稀释,并用酶标仪测定稀释后 $OD_{600}$ 值。加入Car-py (10mM) 荧光探针使终浓度在10 $\mu$ M,静置10min后,用酶标仪测荧光强度,设置激发波长405nm,发射范围450-600nm。

[0046] 实施例3:

[0047] 步骤(1):将经过过夜培养的铜绿假单胞菌(P.a)用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液;

[0048] 步骤(2):取1mL步骤(1)中的菌悬液加入1uL的Car-py (10mM) 荧光探针,摇匀,制得混合液,静置10分钟;

[0049] 步骤(3):取200 $\mu$ L步骤(2)所得的混合液加入一次性无菌96孔板中,用酶标仪检测荧光强度。设置激发波长400nm,发射范围450-700nm;

[0050] 步骤(4):取2 $\mu$ L步骤(2)所得的混合液滴加在载玻片上,盖上盖玻片,在共聚焦显微镜下成像,激发波长405nm,发射范围450-600nm;

[0051] 步骤(5):取200 $\mu$ L  $OD_{600}=1$ 的铜绿假单胞菌加入一次性无菌96孔板中,用PBS进行等比稀释,并用酶标仪测定稀释后 $OD_{600}$ 值。加入Car-py (10mM) 荧光探针使终浓度在10 $\mu$ M,静置10min后,用酶标仪测荧光强度,设置激发波长405nm,发射范围450-600nm。

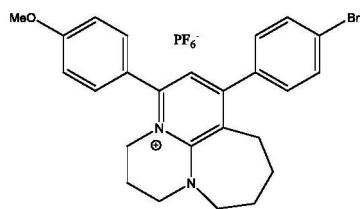
[0052] 实施例4:

[0053] 步骤(1):取2uL的Car-py (10mM) 荧光探针加入2mL的DMSO溶液中,用荧光分光光度计测定荧光强度,设置激发波长400nm,发射范围480-770nm。

[0054] 步骤(2):取2uL的Car-py (10mM) 荧光探针加入2mL的H<sub>2</sub>O溶液中,用荧光分光光度计测定荧光强度,设置激发波长400nm,发射范围480-770nm。对比例1:

[0055] 步骤(1):将经过过夜培养的大肠杆菌(E.coli)和金黄色葡萄球菌(S.a)用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液;

[0056] 步骤(2):取1mL步骤(1)中的菌悬液加入1uL的BMTAP (10mM)



荧光探针,摇匀,制得混合液,静置10分钟;

[0057] 步骤(3):取200 $\mu\text{L}$ 步骤(2)所得的混合液加入一次性无菌96孔板中,用酶标仪检测荧光强度。设置激发波长400nm,发射范围450-700nm;

[0058] 步骤(4):取2 $\mu\text{L}$ 步骤(2)所得的混合液滴加在载玻片上,盖上盖玻片,在共聚焦显微镜下成像,激发波长405nm,发射范围450-600nm。

[0059] 数据分析:

[0060] (1)从图1中可以看出,在紫外灯照射下,和PBS缓冲溶液进行对照,两种不同种类的病原体中都能看到明显的荧光,能实现裸眼对细菌的检测。从图2的荧光图谱也能看出,加入Car-py后,在550nm处,三种细菌溶液相比于PBS缓冲溶液中的荧光强度显著增强。

[0061] (2)图3是共聚焦显微镜下观察到的三种细菌,能看到细菌发出强烈的荧光,实现细胞水平上对细菌的检测,并且具有较好的光稳定性。

[0062] (3)图4a-图4d是在不同菌含量的情况下,荧光探针的荧光强度和菌OD值之间有良好的线性关系,对菌的检测具有较低的检测限度。

[0063] (4)图5是Car-py荧光探针在不同溶剂中的荧光强度,在DMSO良溶剂中,Car-py的最大发射波长在620nm左右,而在 $\text{H}_2\text{O}$ 不良溶剂中,最大发射波长发生蓝移,在580nm左右,和图2荧光光谱相对应,Car-py荧光探针只有和细菌表面或进入细菌内发生聚集时,发射光颜色和强度才能发生变化。

[0064] (5)图6是对比例1的BMTAP荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。图7是对比例1共聚焦显微镜下,BMTAP荧光探针与不同细菌结合后成像图片。将BMTAP加入细菌溶液后,酶标仪和显微镜下细菌都没有发生变化,同样是AIE分子,相比于Car-py,BMTAP不能实现对细菌浓度的检测。

[0065] 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,其它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。

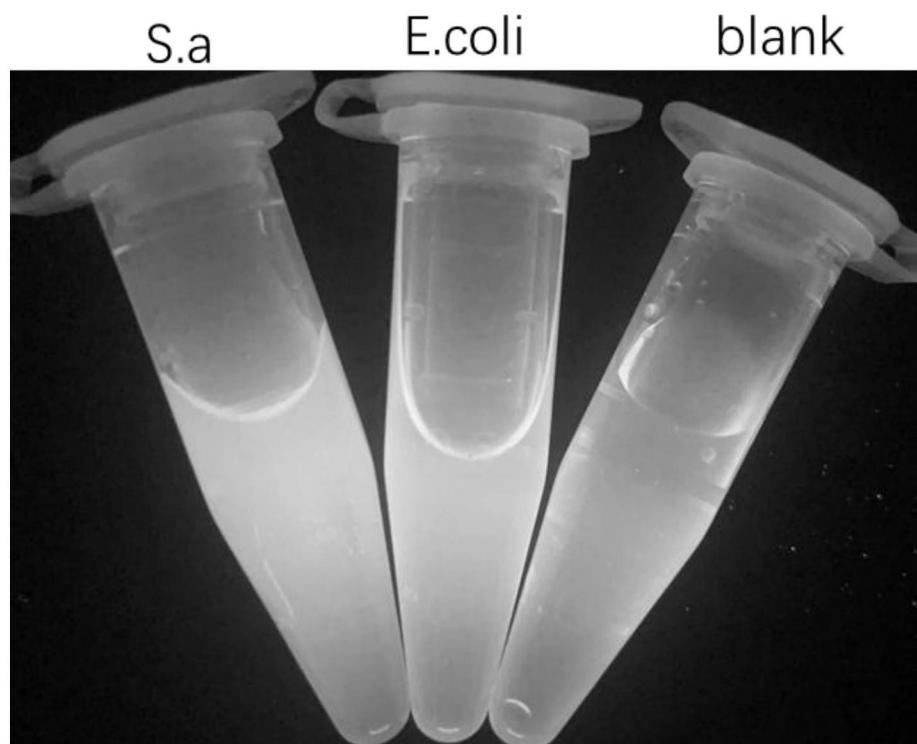


图1

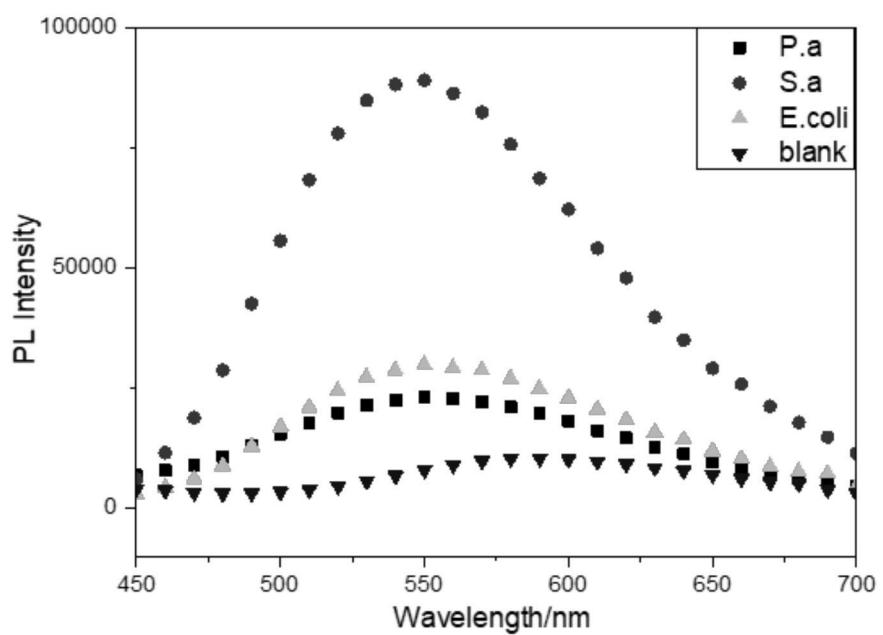


图2

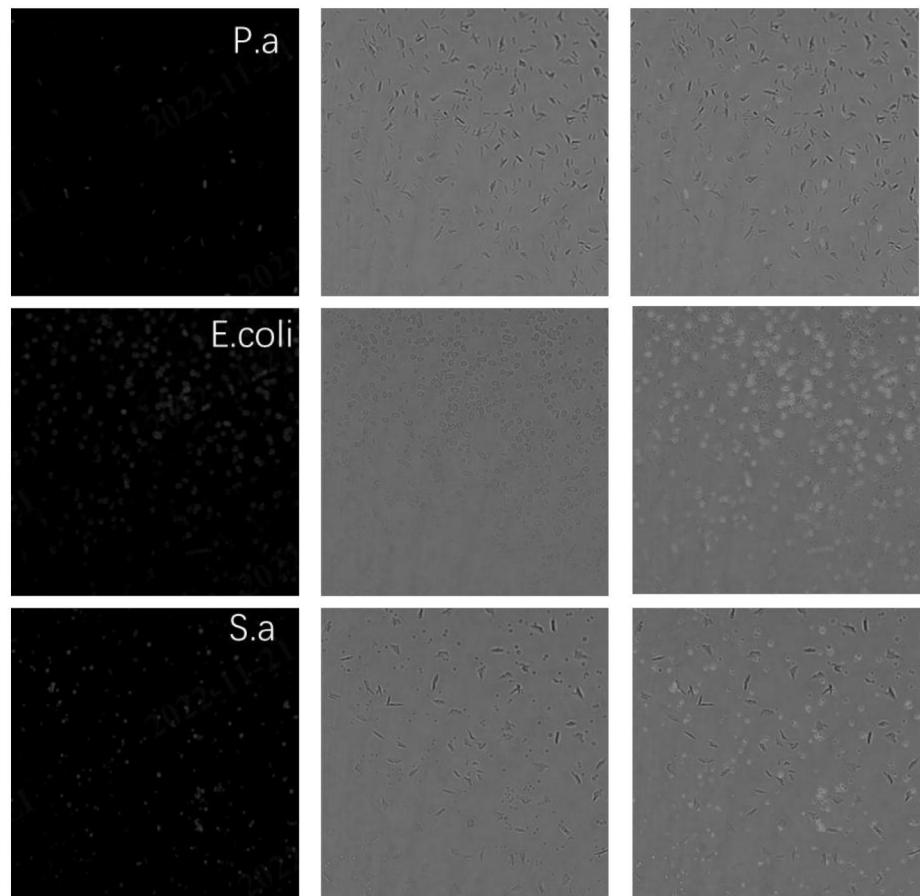


图3

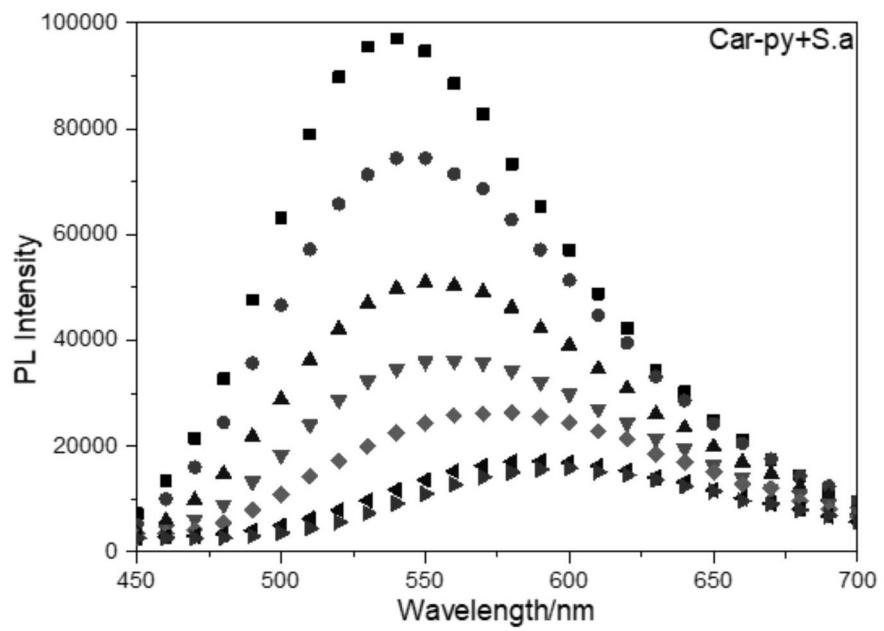


图4a

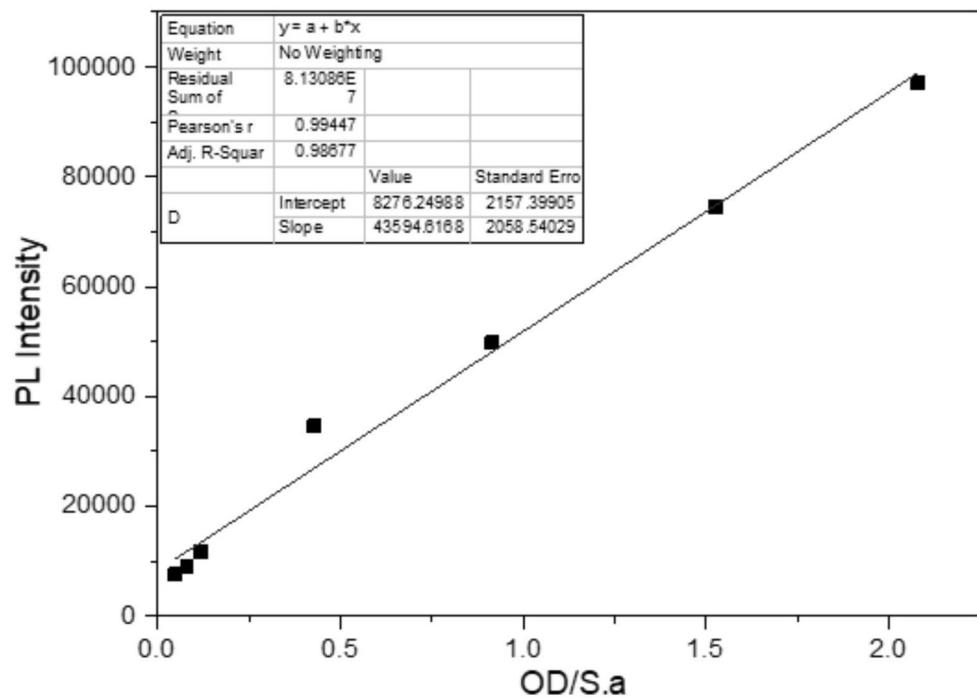


图4b

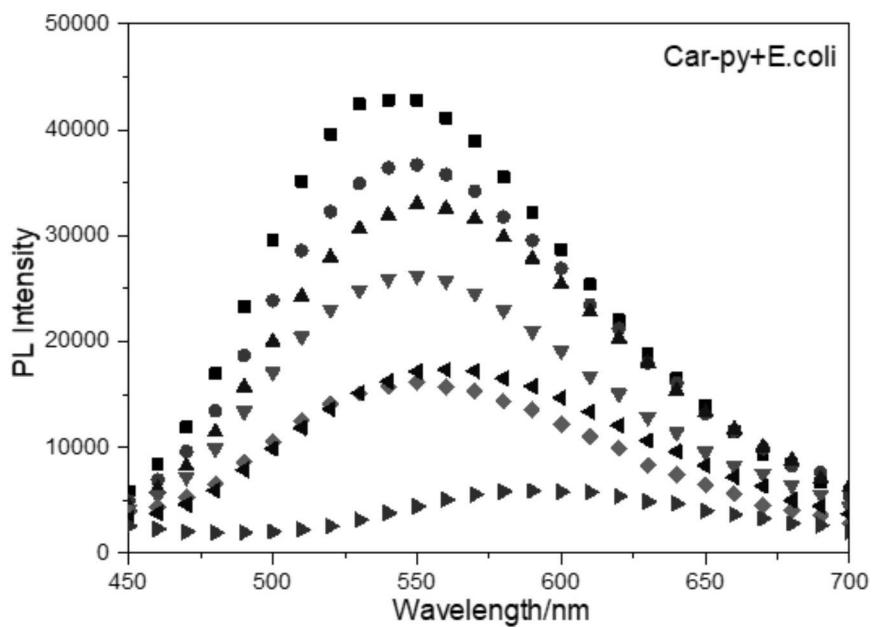


图4c

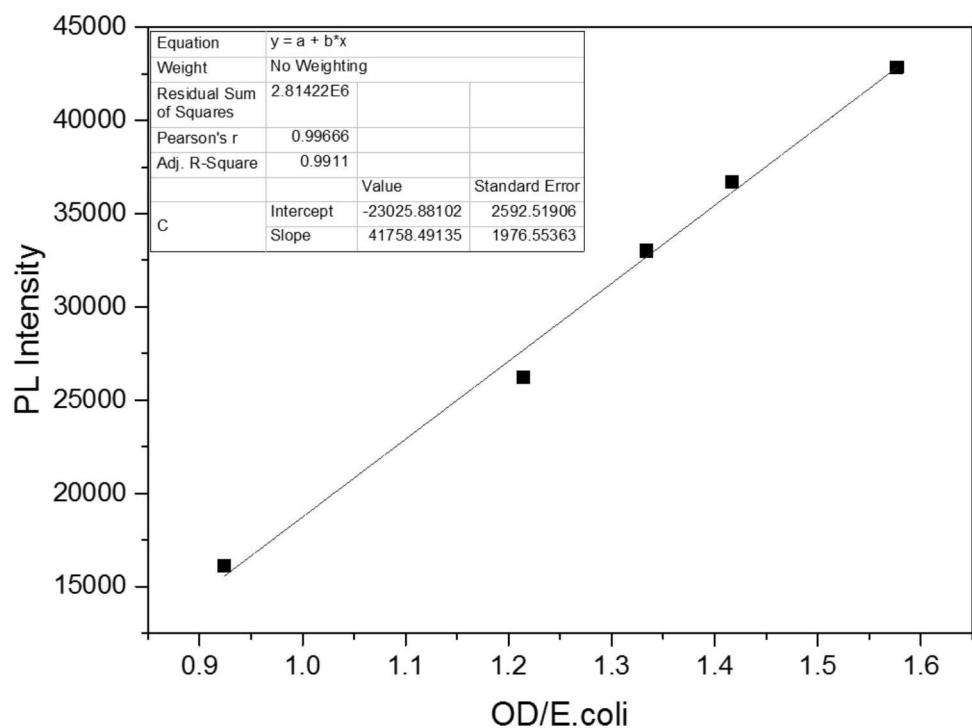


图4d

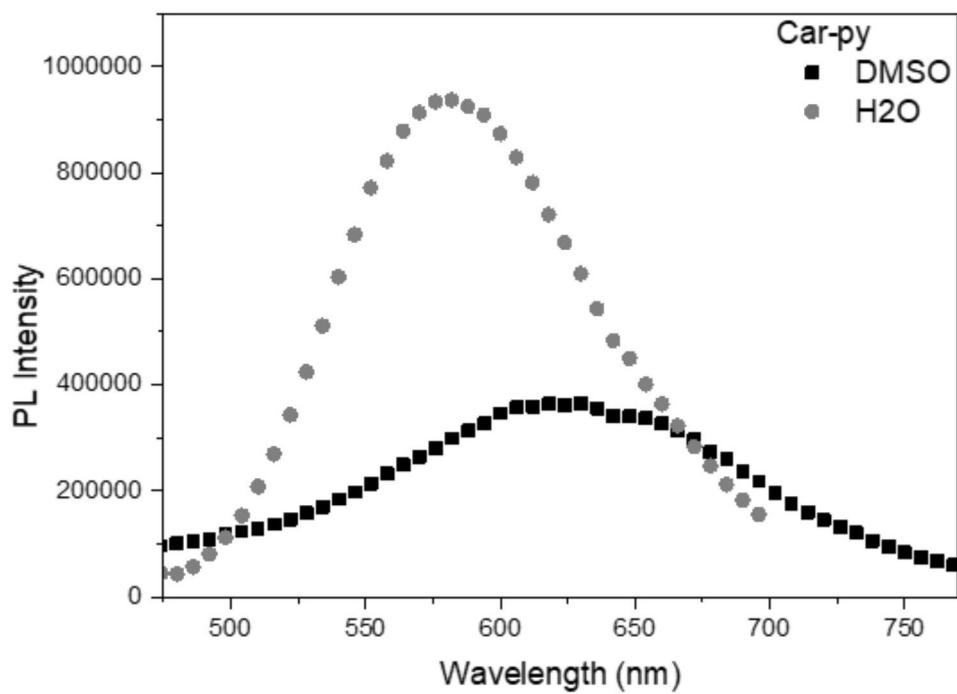


图5

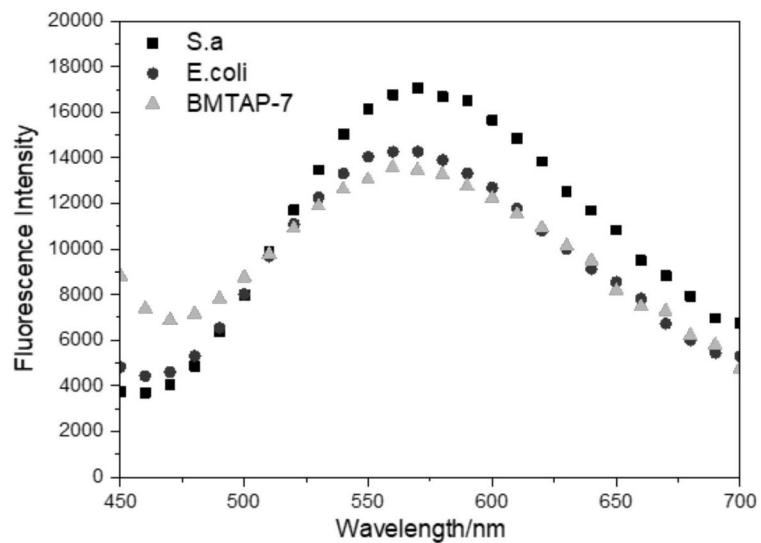


图6

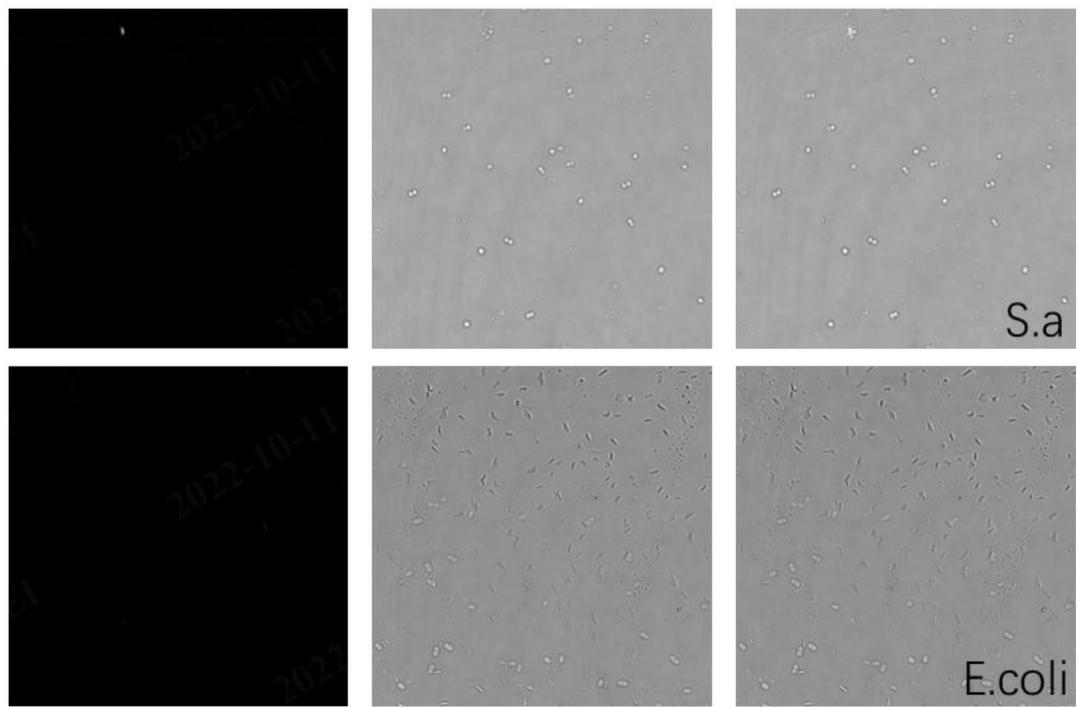


图7