



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118421307 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 02

(21) 申请号 202410888517.2

(22) 申请日 2024.07.04

(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 赵雪健 王志明
刘勇 龚晚君

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 江裕强

(51) Int. Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

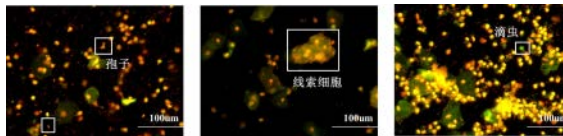
权利要求书4页 说明书10页 附图3页

(54) 发明名称

一种AIE阴道分泌物双重荧光染色液及其应用

(57) 摘要

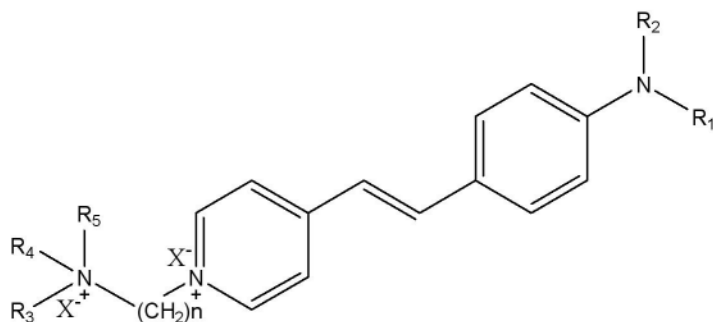
本发明公开了一种AIE阴道分泌物双重荧光染色液及其应用;所述AIE阴道分泌物双重荧光染色液包括荧光剂;所述荧光剂包括第一荧光剂和第二荧光剂;第一荧光剂与第二荧光剂的摩尔比为1:(1-6)。本发明AIE阴道分泌物双重荧光染色液中的第一荧光剂和第二荧光剂能够协同作用,实现双重染色的效果,并且能增加染色的强度和清晰度,提高染色效果,进而有助于增加检测的稳定性和灵敏度;两种荧光剂都是AIE荧光染料,具有背景低和光稳定性好的优势,无需添加其他辅助染料和抗猝灭剂,成分简单,成本低。



1. 一种AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在于,包括荧光剂;所述荧光剂包括第一荧光剂和第二荧光剂;

第一荧光剂与第二荧光剂的摩尔比为1:(1-6);

第一荧光剂选自式1中的一种或多种;



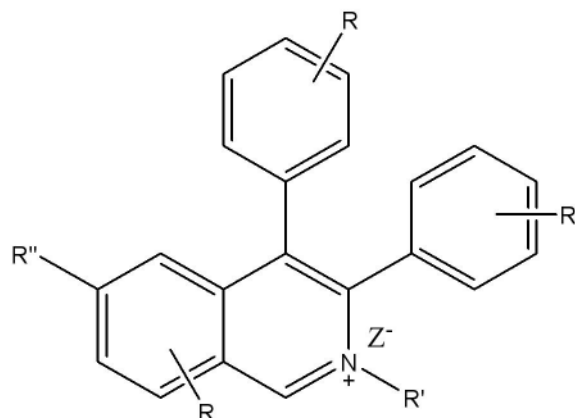
式1

式1中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基;

n 为2-10的整数;

X^- 为阴离子;

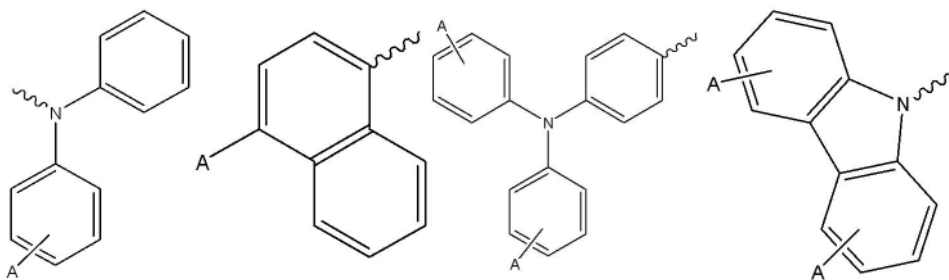
第二荧光剂选自式2中的一种或多种;



式2

式2中, R 、 R' 各自独立的选自氢、氨基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的烯基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的炔基、取代或未取代的具有6~30个碳原子的芳基、取代或未取代的具有3~30个碳原子的杂芳基;

R' 选自以下结构中的一种:



A各自独立的选自氢、氨基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的烯基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的炔基、取代或未取代的具有6~30个碳原子的芳基、取代或未取代的具有3~30个碳原子的杂芳基；

Z⁻为阴离子。

2. 根据权利要求1所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在於,第一荧光剂与第二荧光剂的摩尔比为1:(2-6)。

3. 根据权利要求1所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在於,式1和式2中,所述阴离子为卤离子、NO₂⁻、BF₄⁻、BF₆⁻、NO₃⁻、PO₄³⁻、SO₃²⁻中的至少一种;

式2中,所述取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基为取代或未取代的具有1~20个碳原子的烷氧基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的烷氨基。

4. 根据权利要求1所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在於,式1中,R₁、R₂、R₃、R₄、R₅各自独立的选自取代或未取代的具有1~6个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~6个碳原子的支链烷基;

式1中,n为2-3的整数;

式2中,R、R'各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~8个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~8个碳原子的支链烷基;

式2中,A各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~6个碳原子的杂烷基。

5. 根据权利要求4所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在於,式2中,A各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~6个碳原子的烷氧基。

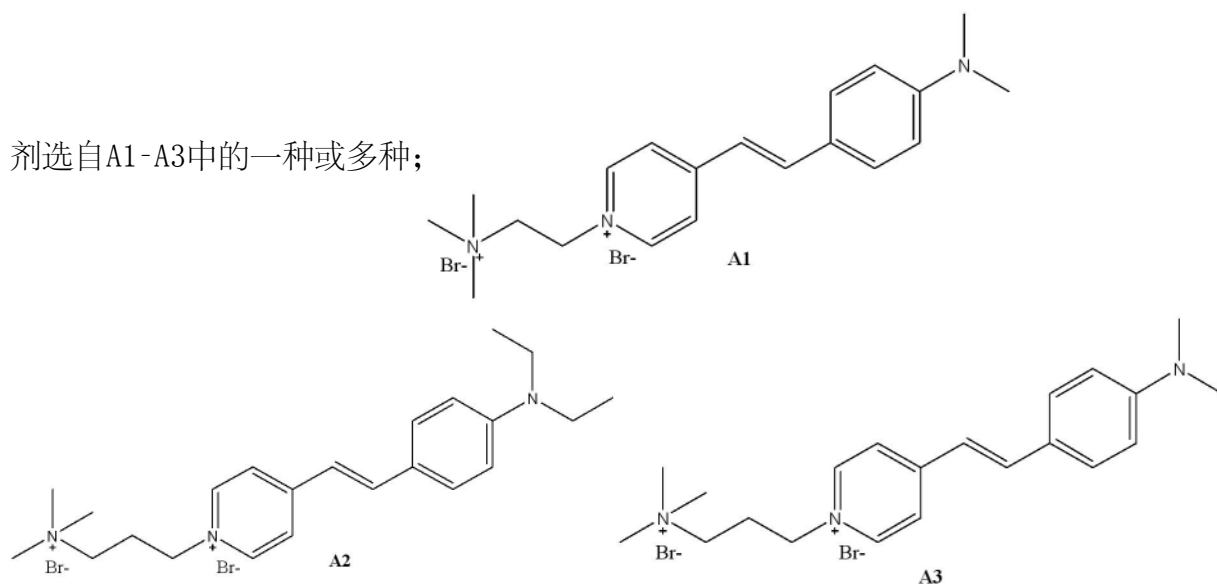
6. 根据权利要求1所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在於,式1中,所述取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代的具有3~20个碳原子的环烷基中的取代基为-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN、-NO₂;

式2中,所述取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代的具有3~20个碳原子的环烷基、取代的具有1~20个碳原子的杂烷基、取代的具有2~20个碳原子的烯基、取代的具有2~20个碳原子的炔基、取代的具有6~30个碳原子的芳基、取代的具有3~30个碳原子的杂芳基中的取代基为-COOH、-OH、-NH₂、-CHO、-CN、-NO₂;

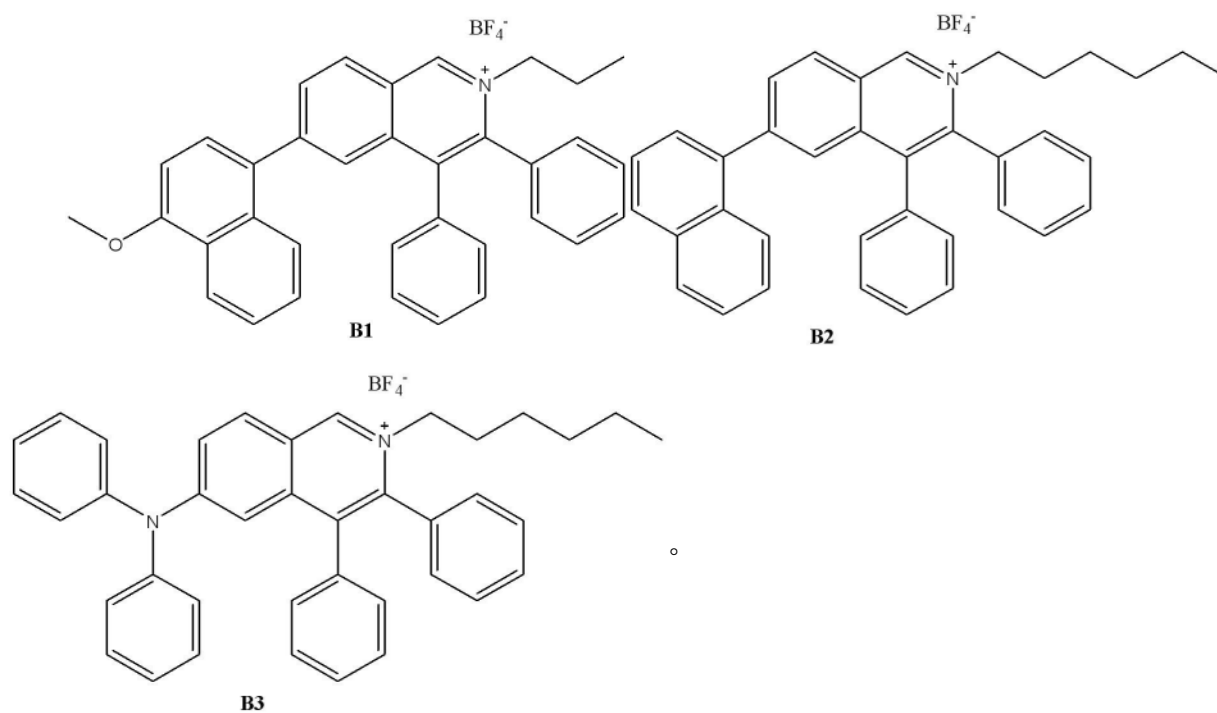
式2中,所述具有3~30个碳原子的杂芳基为噻吩环、吡咯环、吡啶环。

7. 根据权利要求1所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液,其特征在於,所述第一荧光

剂选自A1-A3中的一种或多种；



第二荧光剂选自B1-B3中的一种或多种；



8. 根据权利要求1所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液, 其特征在于, 所述荧光染色液还包括抑菌剂;

所述荧光染色液的溶剂为有机溶剂和水的混合溶剂;

所述第一荧光剂的浓度为10-25 μ M; 第二荧光剂的浓度为10-100 μ M。

9. 根据权利要求8所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液, 其特征在于, 所述抑菌剂选自 Proclin 300、叠氮钠、山梨酸钾、异噻唑啉酮、庆大霉素、甲醛和多聚甲醛中的至少一种;

所述有机溶剂选自二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺中的一种或多种; 所述有机溶剂和水的体积比为1:(2~3)。

10. 权利要求1-9任一项所述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液用于制备阴道分泌物检

测产品的应用。

一种AIE阴道分泌物双重荧光染色液及其应用

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AIE阴道分泌物双重荧光染色液及其应用。

背景技术

[0002] 女性下生殖道共生着许多微生物菌群,对病原体的侵入有自然防御功能,但是当阴道的微生态失调、自然防御功能遭到破坏,病原体则易侵入,导致阴道炎、宫颈炎、盆腔炎等疾病的发生,增加了艾滋病和宫颈癌的风险。阴道分泌物检查是妇科检查的常规项目,主要是对白细胞、上皮细胞、线索细胞、真菌、细菌、滴虫进行观察,判断属于细菌性阴道病、念珠菌性阴道病、滴虫性阴道病还是需氧性阴道病。传统的检测方法主要有两种,盐水湿片法和革兰氏染色法,这两种方法都有一定的局限性,盐水湿片法操作简单但是主观性太强,因为整个涂片背景较复杂,没有染色有时候较难观察识别一些微小的微生物。革兰氏染色也是目前部分医院采用的镜检染色方法之一,该方法可以清晰观察到样本中的微生物情况,但是该方法操作复杂,一般需进行4步染色方法,且染色过程中对于染色的技术要求较高,如过度脱色,则会造成结果的不准确,所以对医技人员要求较高。因此,开发一种操作简单、便于识别、准确性高的阴道分泌物检查方法具有现实意义。

发明内容

[0003] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的是提供一种AIE阴道分泌物双重荧光染色液及其应用。

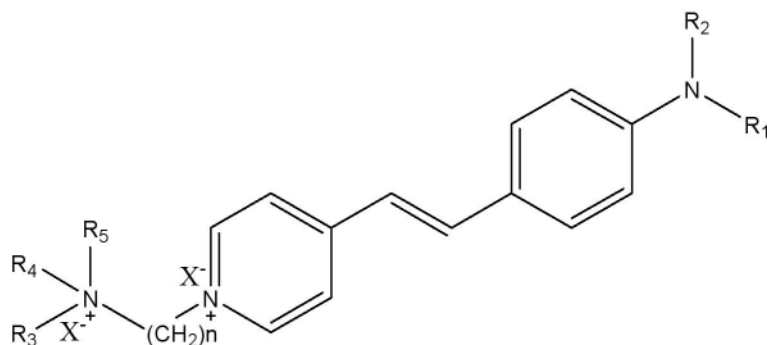
[0004] 本发明的染色液成分简单,只需要一步染色就能实现对阴道分泌物中的所有组分进行颜色区分,成本较低,操作简单。并且染色液具有聚集诱导发光特性,相比于传统的荧光染料,具有较低的荧光背景,较好的光稳定性,染料能长期保存。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

一种AIE阴道分泌物双重荧光染色液,包括荧光剂;所述荧光剂包括第一荧光剂和第二荧光剂;

第一荧光剂与第二荧光剂的摩尔比为1:(1-6);

第一荧光剂选自式1中的一种或多种;



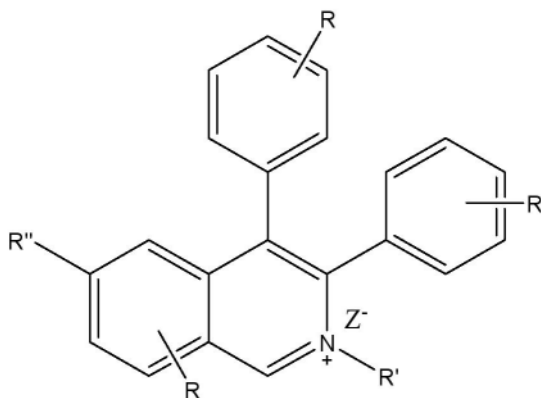
[0006] 式1

式1中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基;

n 为2-10的整数(2、3、4、5、6、7、8、9、10);

X^- 为阴离子;

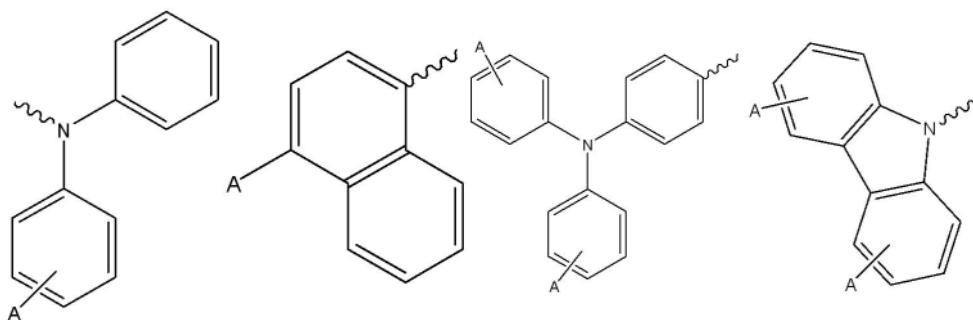
第二荧光剂选自式2中的一种或多种;



[0007] 式2

式2中, R 、 R' 各自独立的选自氢、氨基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的烯基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的炔基、取代或未取代的具有6~30个碳原子的芳基、取代或未取代的具有3~30个碳原子的杂芳基;

R' 选自以下结构中的一种:



[0008] A 各自独立的选自氢、氨基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的烯基、取代或未取代的具有2~20个碳原子的炔基、取代或未取代的具有6~30个碳原子的芳基、取代或未取代的具有3~30个碳原子的杂芳基;

Z^- 为阴离子。

[0009] 优选的,第一荧光剂与第二荧光剂的摩尔比为1:(2-6);

优选的,所述荧光剂由第一荧光剂和第二荧光剂组成。

[0010] 优选的,式1和式2中,所述阴离子为卤离子、 NO_2^- 、 BF_4^- 、 BF_6^- 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 SO_3^{2-} 中的至少一种。

[0011] 进一步优选的,卤离子为氟离子、氯离子、溴离子、碘离子。

[0012] 优选的,所述具有3~20个碳原子的环烷基为环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷。

[0013] 优选的,式2中,所述取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基为取代或未取代的具有1~20个碳原子的烷氧基、取代或未取代的具有1~20个碳原子的烷基氨基。

[0014] 优选的,式1中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基。

[0015] 优选的,式1中, R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 各自独立的选自取代或未取代的具有1~6个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~6个碳原子的支链烷基;

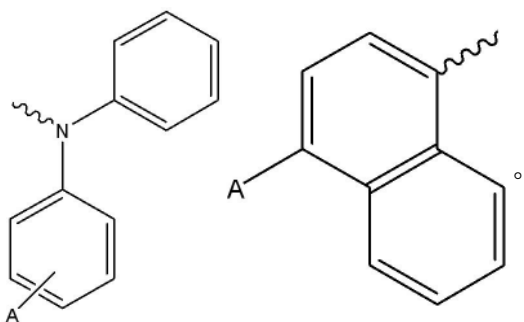
优选的,式1中,n为2-3的整数;

优选的,式1中,所述取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代的具有3~20个碳原子的环烷基中的取代基为 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$;

优选的,式2中, R 、 R' 各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~8个碳原子的支链烷基。

[0016] 优选的,式2中, R 、 R' 各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~8个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~8个碳原子的支链烷基。

[0017] 优选的,式2中, R' 选自以下结构中的一种:



[0018] 优选的,式2中,A各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~20个碳原子的杂烷基;

优选的,式2中,A各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~6个碳原子的杂烷基;

进一步优选的,式2中,A各自独立的选自氢、取代或未取代的具有1~6个碳原子的烷氧基;

优选的,式2中,所述取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代的具有3~20个碳原子的环烷基、取代的具有1~20个碳原子的杂烷基、取代的具有2~20个碳原子的烯基、取代的具有2~20个碳原子的炔基、取代的具有6~30个碳原子的芳基、取代的具有3~30个碳原子的杂芳基中的取代基为 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 。

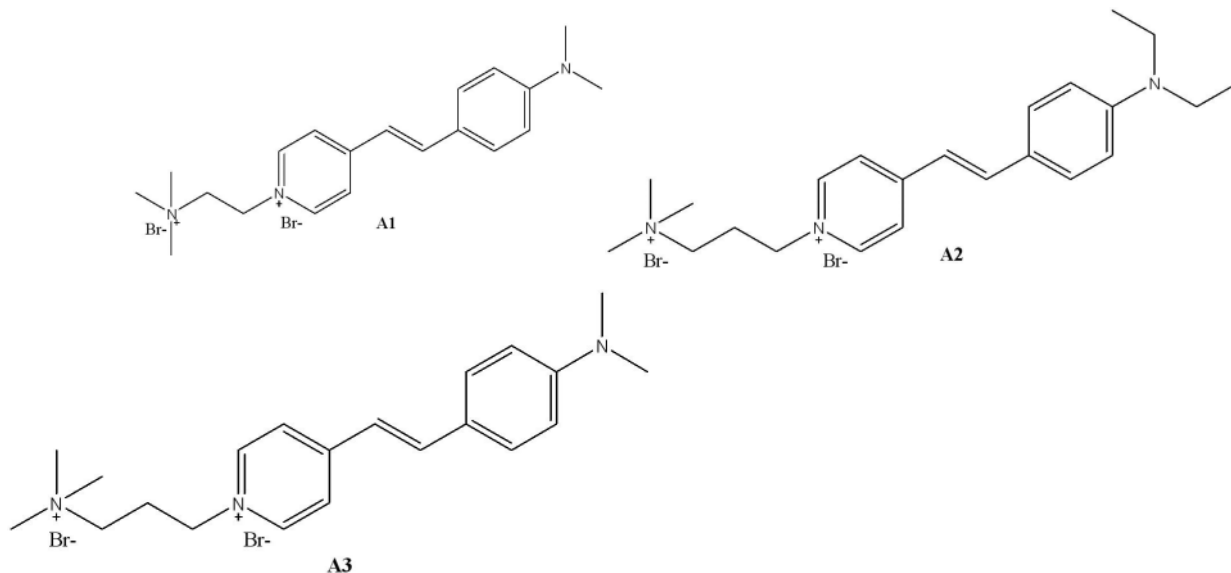
[0019] 优选的,式2中,所述具有3~30个碳原子的杂芳基为噻吩环、吡咯环、吡啶环。

[0020] 优选的,式2中,杂烷基包括直链杂烷基、支链杂烷基。

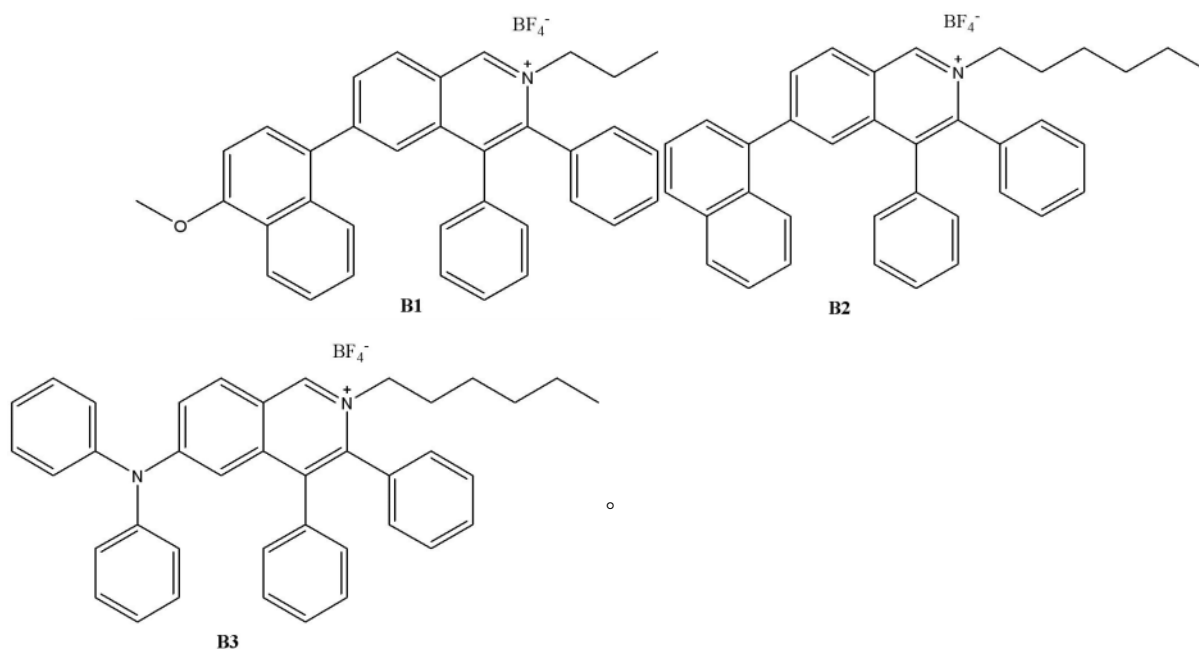
[0021] 优选的,式1和式2中,1~20个碳原子为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个碳原子;3~20个碳原子为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

18、19、20个碳原子；2~20个碳原子为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个碳原子；6~30个碳原子为6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个碳原子；3~30个碳原子为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个碳原子。

[0022] 优选的,所述第一荧光剂选自A1-A3中的一种或多种;



[0023] 第二荧光剂选自B1-B3中的一种或多种;



[0024] 优选的,所述荧光染色液还包括抑菌剂。抑菌剂能够减少荧光染色液中的微生物污染的情况,提高荧光染色液的稳定性,此外也能减少微生物污染带来的对待测样本的检测结果的干扰。

[0025] 进一步优选的,所述抑菌剂选自 Proclin 300、叠氮钠、山梨酸钾、异噻唑啉酮、庆大霉素、甲醛和多聚甲醛中的至少一种。

[0026] 优选的,所述荧光染色液还包括溶剂;所述荧光染色液的溶剂为有机溶剂和水的混合溶剂;

进一步优选的,所述有机溶剂选自二甲基亚砷、N,N-二甲基甲酰胺中的一种或多种;所述有机溶剂和水的体积比为1:(2~3)。

[0027] 优选的,所述第一荧光剂的浓度为10-25 μ M;第二荧光剂的浓度为10-100 μ M。

[0028] 上述的AIE阴道分泌物双重荧光染色液用于制备阴道分泌物检测产品的应用

本发明的荧光染色液中,荧光剂包括第一荧光剂和第二荧光剂。第一荧光剂和第二荧光剂能够协同作用,实现双重染色的效果,并且能增加染色的强度和清晰度,提高染色效果,进而有助于增加检测的稳定性和灵敏度。两种主要荧光剂都是AIE荧光染料,具有背景低和光稳定性好的优势,无需添加其他辅助染料和抗猝灭剂,成分简单,成本低。

[0029] 本发明还提供一种简单、快速的检测阴道分泌物的方法:将泡在生理盐水中的阴道分泌物样本,用棉签涂抹在载玻片上,自然干燥后,滴加本发明提供的荧光染色液对阴道分泌物样本进行染色,直接盖上盖玻片,就可在荧光显微镜下进行观察。荧光显微镜选择激发波长为460 \pm 20nm,长通滤光片即可。

[0030] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

本发明的双重荧光染色优点在于染色后成分清晰,不同成分呈现不同颜色易于识别区分。AIE荧光染色液具有聚集诱导发光特性,只有在特定结构上结合才会发出荧光,所以背景较低,并且具有较好的光稳定,有利于样本的长期保存。

[0031] 本发明操作简便;测定快速,染色2-3秒就能完成;组分简单,成本低;能准确区分BV细菌性阴道病、TV阴道毛滴虫、VVC外阴阴道假丝酵母菌病;临床符合率高。清晰的提供细菌、真菌、滴虫、线索细胞依据;对混合感染区分比湿片法更准确,判断孢子更有优势;不受滴虫失活的影响,降低漏诊率;比革兰氏染色法更准确,操作更简单、快速。

附图说明

[0032] 图1为实施例1中,采用AIE双重荧光染色液对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0033] 图2为实施例2中,采用AIE双重荧光染色液对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0034] 图3为实施例3中,采用AIE双重荧光染色液对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0035] 图4为实施例4中,临床应用染色效果对比图,示出盐水湿片法、革兰氏染色和双重荧光染色效果。

[0036] 图5为对比例1中,单独采用第一荧光剂对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0037] 图6为对比例2中,单独采用第二荧光剂对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0038] 图7为对比例3中,采用第一荧光剂和其他AIE分子搭配对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0039] 图8为对比例4中,采用第一荧光剂和其他AIE分子搭配对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0040] 图9为对比例5中,采用第二荧光剂和其他AIE分子搭配对外阴阴道假丝酵母菌感

染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

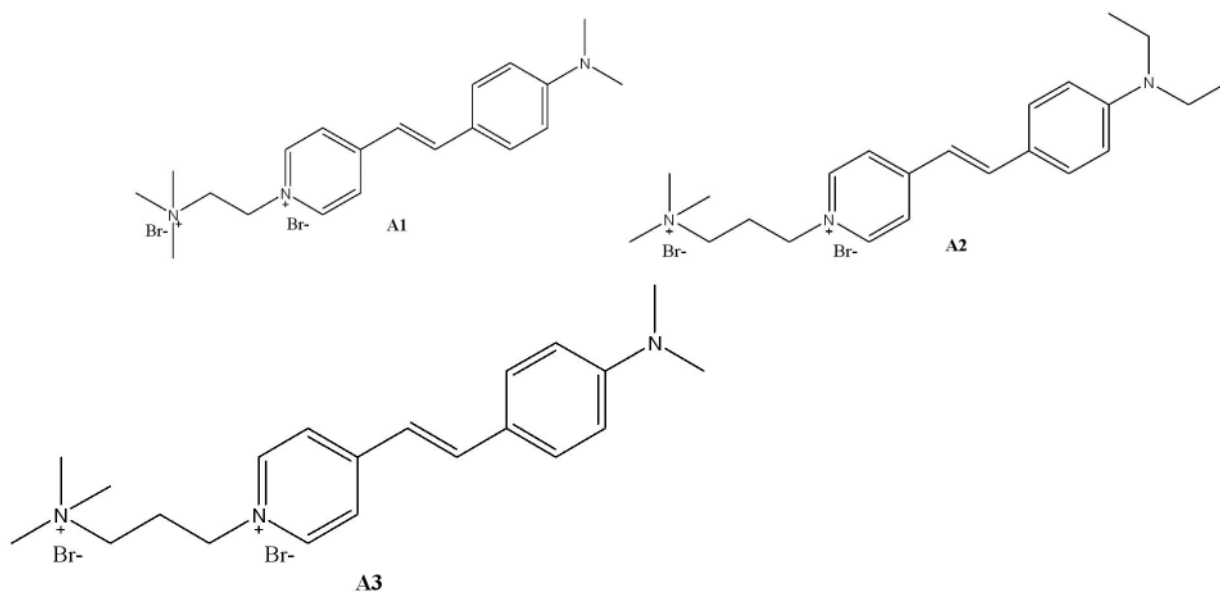
[0041] 图10为对比例6中,采用A1和B2(1:8)对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

[0042] 图11为对比例7中,采用A1和B2(1:0.5)对外阴阴道假丝酵母菌感染(左)、细菌性感染(中)、滴虫感染(右)样本染色效果图。

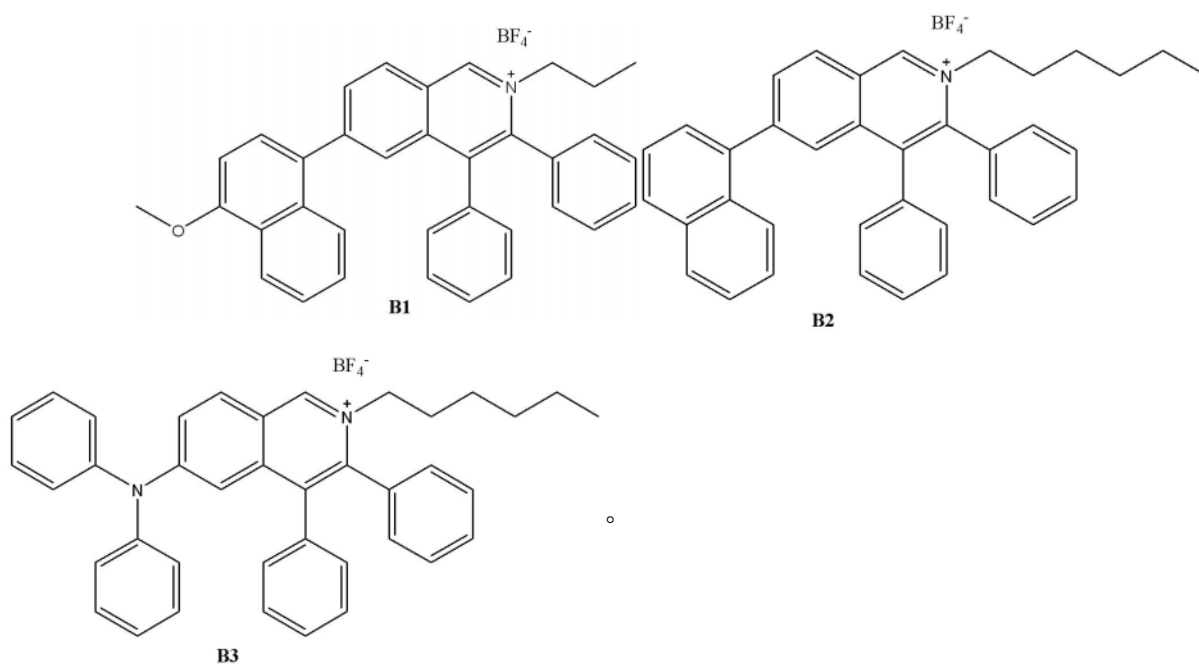
具体实施方式

[0043] 下面结合实施例对本发明进行具体地描述,但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。

[0044] 第一荧光剂包含以下具体分子结构之一:



[0045] 第二荧光剂包含以下具体分子结构之一:



[0046] 在一个实施例中,所述第一荧光剂和第二荧光剂的比例包含几种,分别是1:2、1:

4、1:6。

[0047] 实施例1:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0048] 染色液配制:取A3和B1的10mM母液,按照浓度比为A3:B1=1:2 (15 μ M:30 μ M) 的搭配,溶解在二甲基亚砷和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砷和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0049] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0050] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图1所示。

[0051] 实施例2:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0052] 染色液配制:取A2和B3的10mM母液,按照浓度比为A2:B3=1:4 (15 μ M:60 μ M) 的搭配,溶解在二甲基亚砷和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砷和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0053] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0054] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图2所示。

[0055] 实施例3:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0056] 染色液配制:取A1和B2的10mM母液,按照浓度比为A1:B2=1:6 (15 μ M:90 μ M) 的搭配,溶解在二甲基亚砷和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砷和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0057] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0058] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图3所示。

[0059] 实施例4:

100例临床标本检测阳性率对比

对100例临床标本(临床确诊其中有5例外阴阴道假丝酵母菌病患者、2例滴虫性阴道病患者、7例细菌性阴道病患者)分别采用盐水湿片法、革兰氏染色法和上述AIE双重荧光染色液(采用A3和B1作为第一、第二荧光剂按浓度比为1:4搭配,15 μ M:60 μ M,溶剂为体积比例为1:3的二甲基亚砷和水的混合溶剂)进行染色,结果如下表1所示。

[0060] 其中1例线索细胞样本的盐水湿片法、革兰氏染色法和上述AIE双重荧光染色液的染色效果如图4所示。

[0061] 表1

	荧光染色法	湿片法	革兰氏染色法
假丝酵母菌检出率 (%)	5	4	5
滴虫检出率 (%)	2	2	2
线索细胞检出率 (%)	7	5	6
阴性率 (%)	86	89	87

[0062] 对比例1:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0063] 染色液配制:取A3的10mM母液,按照浓度15 μ M溶解在二甲基亚砜和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砜和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0064] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0065] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图5所示。

[0066] 对比例2:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0067] 染色液配制:取B1的10mM母液,按照浓度30 μ M溶解在二甲基亚砜和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砜和水的体积比例为1:3,混合均匀。

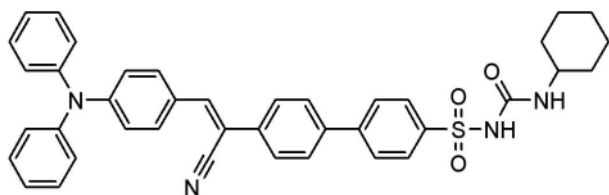
[0068] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0069] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图6所示。

[0070] 对比例3:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0071] 染色液配制:取A3和其他A1E 分子(结构式如下所示



的10mM母液,按照按照浓度比为A3:其他A1E分

子=1:2 (15 μ M:30 μ M) 溶解在二甲基亚砜和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砜和水的体积比例为1:3,混合均匀。

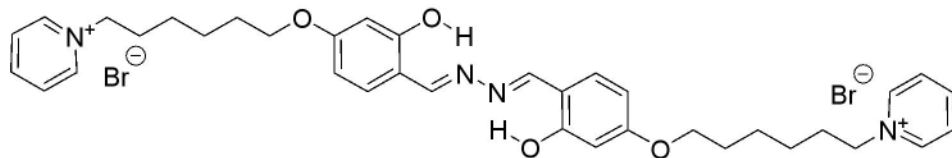
[0072] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0073] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图7所示。

[0074] 对比例4:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50 $^{\circ}$ C加热1分钟。

[0075] 染色液配制:取A3和其他AIE 分子(结构式如下所示



)的10mM母液,按照

按照浓度比为A3:其他AIE分子=1:2 (15 μ M:30 μ M) 溶解在二甲基亚砜和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砜和水的体积比例为1:3,混合均匀。

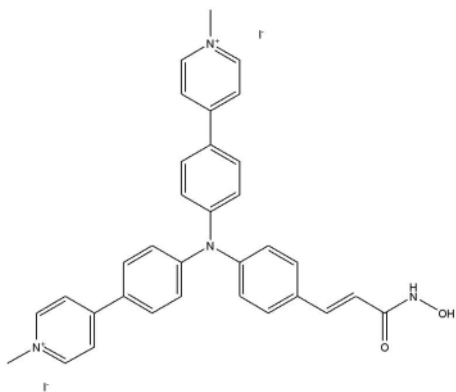
[0076] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0077] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图8所示。

[0078] 对比例5:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50 $^{\circ}$ C加热1分钟。

[0079] 染色液配制:取B2和其他AIE 分子(结构式如下所示



的10mM母液,按照按照浓度比为其他AIE分子:B2=1:6 (15 μ

M:90 μ M) 溶解在二甲基亚砜和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砜和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0080] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0081] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40 \times 物镜下,进行直接镜检。染色效果如图9所示。

[0082] 对比例6:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000 μ L的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50 $^{\circ}$ C加热1分钟。

[0083] 染色液配制:取A1和B2的10mM母液,按照浓度比为A1:B2=1:8 (5 μ M:40 μ M) 的搭配,溶解在二甲基亚砜和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砜和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0084] 滴染色液:取上述染色液20 μ L直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0085] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40×物镜下,进行直接镜检。染色效果如图10所示。

[0086] 对比例7:

取样:选取三例分别确诊的外阴阴道假丝酵母菌病、细菌性阴道病、滴虫性阴道病样本,向样本中滴加500-1000μL的生理盐水,用棉签混匀后,将棉签涂抹在载玻片上,晾干5分钟或用加热板50℃加热1分钟。

[0087] 染色液配制:取A1和B2的10mM母液,按照浓度比为A1:B2=1:0.5(30μM:15μM)的搭配,溶解在二甲基亚砷和水的混合溶剂中,其中二甲基亚砷和水的体积比例为1:3,混合均匀。

[0088] 滴染色液:取上述染色液20μL直接滴加到样本上,盖上盖玻片。

[0089] 结果观察:选择激发光波长为460nm激发,置于生物(荧光)显微镜40×物镜下,进行直接镜检。染色效果如图11所示。

[0090] 数据分析:

(1)从图1-3中可以看出,阴道分泌物中的假丝酵母菌(包括孢子和菌丝)被染成橘黄色、上皮细胞细胞质为黄绿色,细胞核为橙红色,白细胞为橙红色,细菌为橙黄色,滴虫能被染成绿色,每个组分之间都有清晰的颜色区分。

[0091] (2)从图4中能看出,湿片法镜下结果杂质较多,真菌孢子不好辨认,查找效率低。革兰氏染色法比湿片效果好,但是没有荧光染色成像效果清晰,特别是对滴虫和线索细胞,荧光染色能清晰的看到内部核。从实施例4的检出效果(表1)也能看出,荧光染色法在真菌和线索细胞上的检出率都要高于湿片法,荧光染色法在线索细胞上的检出率高于革兰氏染色法,并且在染色步骤上会比革兰染色法简单。

[0092] (3)从图5、6中可以看出,单独选用第一或者第二荧光剂,阴道微生物中所有组分包括滴虫、真菌等都只会出现一种荧光颜色,很难区分其中的病原体。

[0093] (4)从图7、8中能看出,选用第一荧光剂和其他AIE荧光分子进行搭配作为染色液,细胞核和细胞质会出现同一种颜色,滴虫和白细胞较难区分。

[0094] (5)从图9中能看出,选用第二荧光剂和其他AIE荧光分子进行搭配作为染色液,通过明场确认存在某些组分,但是荧光场下这些组分没有染上颜色,比如说真菌、滴虫,无法在视野下找到。

[0095] (6)从图10和11中能看出,选用第一荧光剂和第二荧光剂的摩尔比例不在要求范围1:(1-6)内,难以准确分辨各组分,无法辅助区分样本感染类型。

[0096] 以上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,其他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。

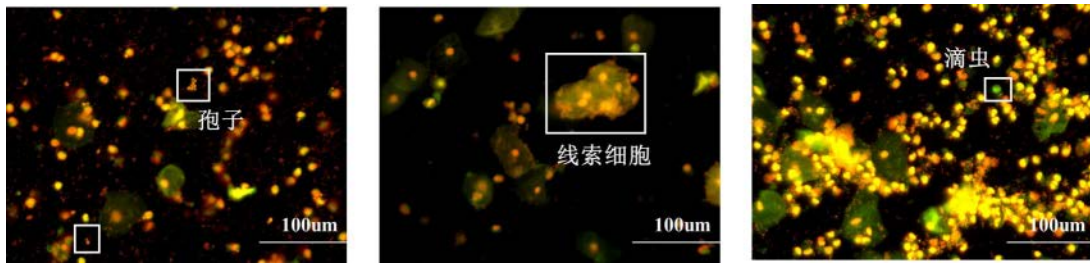


图1

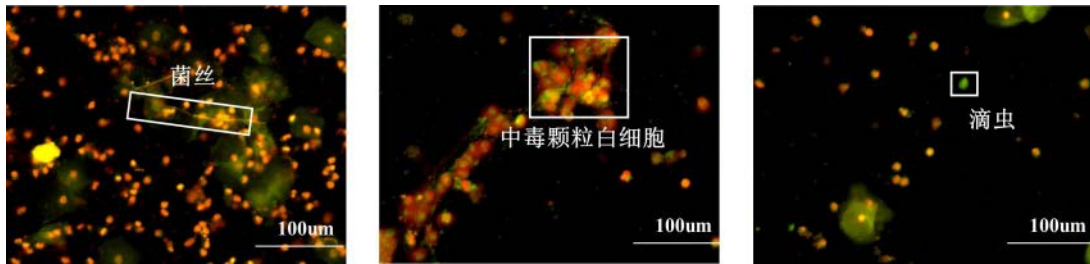


图2

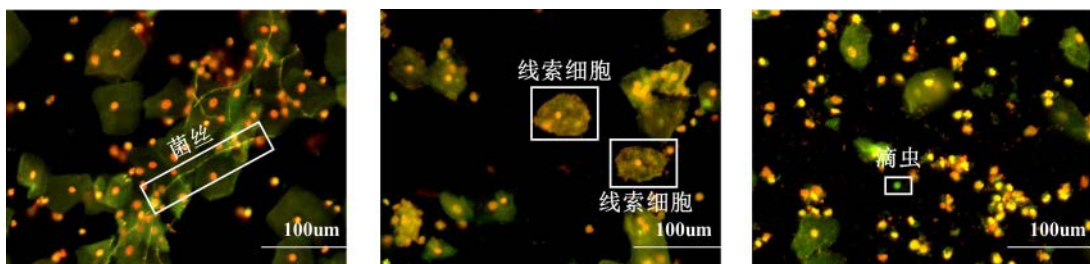
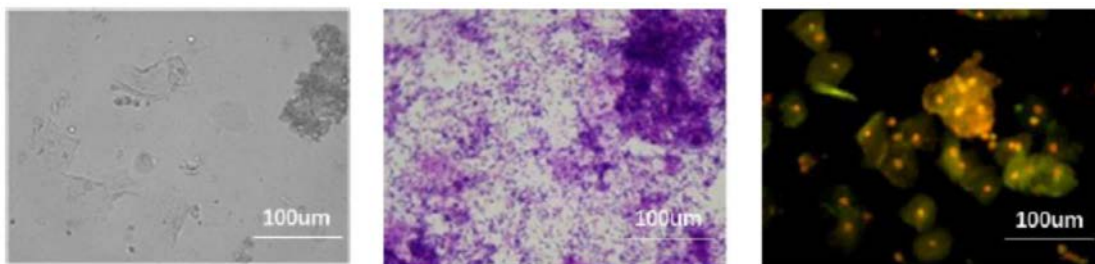


图3



盐水湿片法

革兰氏染色法

荧光染色法

图4

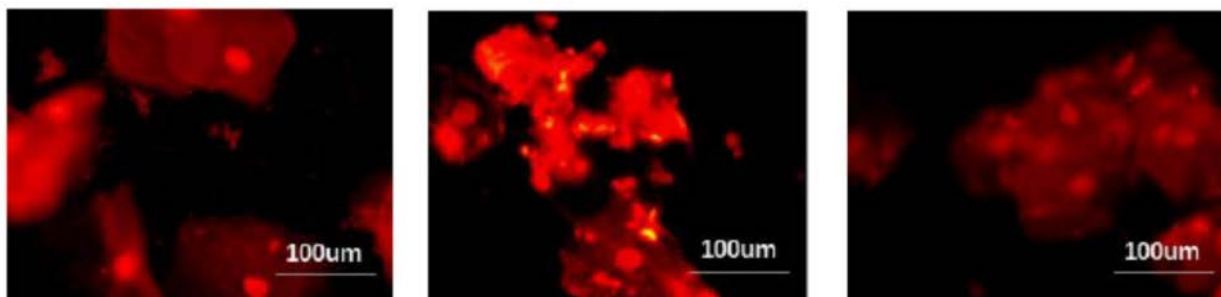


图5

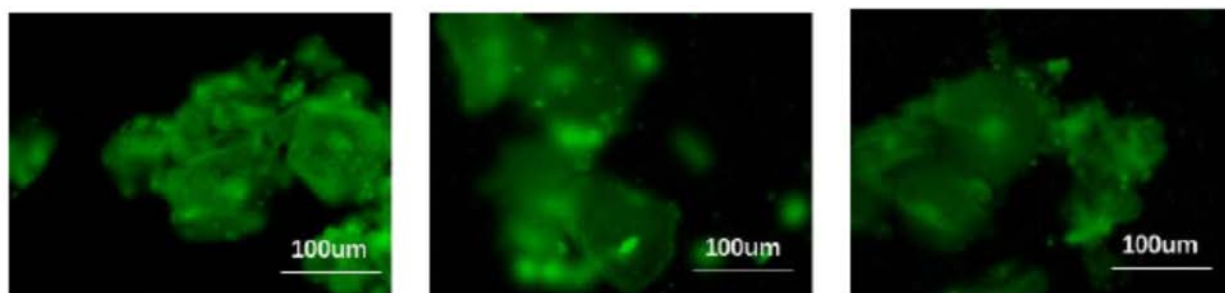


图6

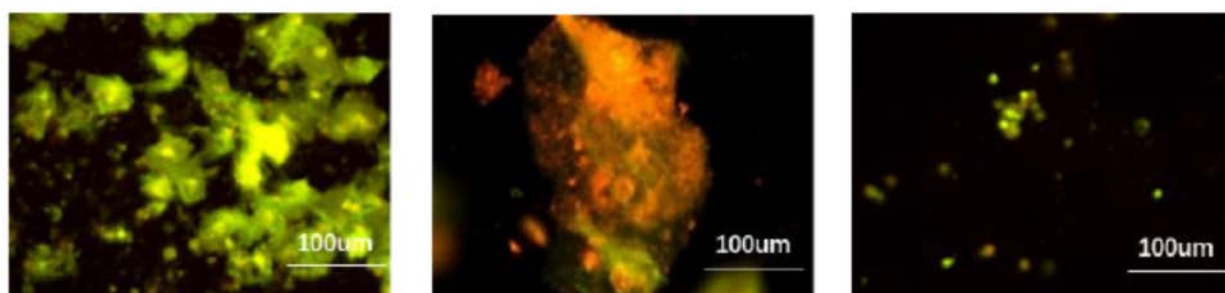


图7

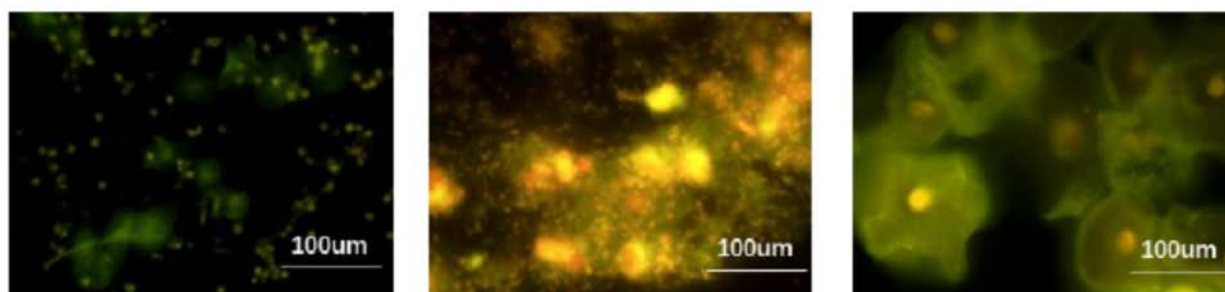


图8

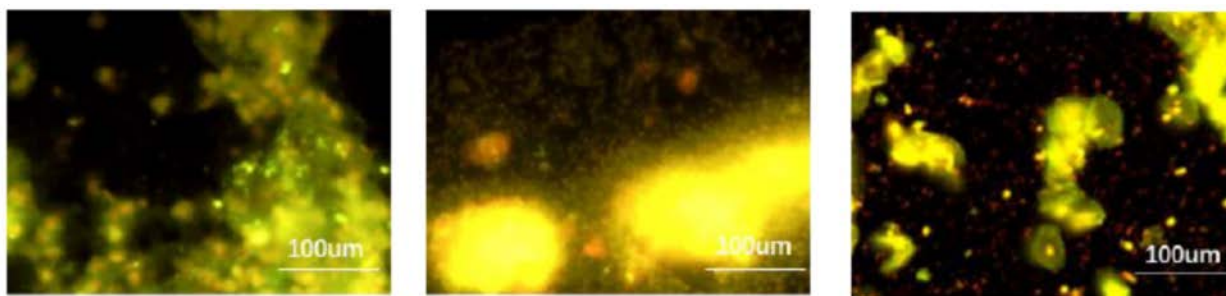


图9

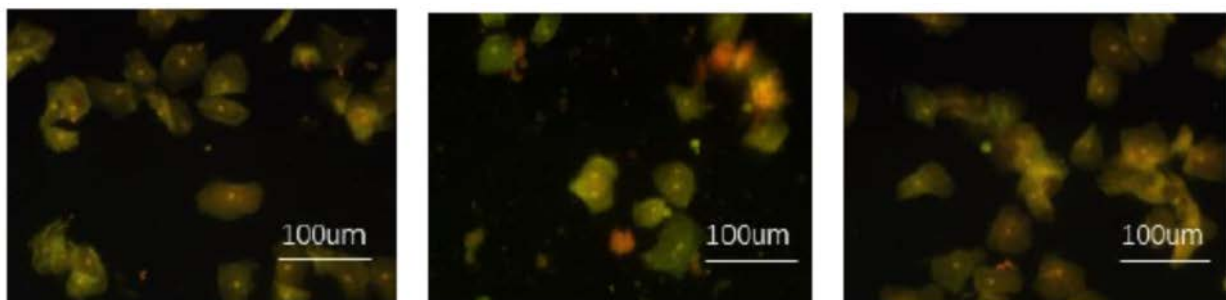


图10

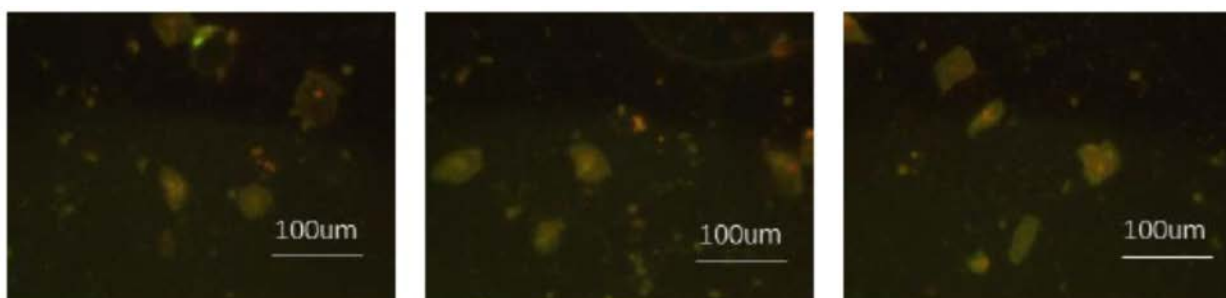


图11