



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118777019 A

(43) 申请公布日 2024.10.15

(21) 申请号 202411260908.6

(22) 申请日 2024.09.10

(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 倪志强 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 江裕强

(51) Int.Cl.

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

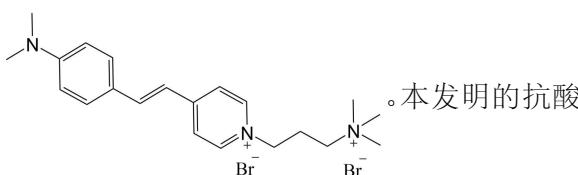
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

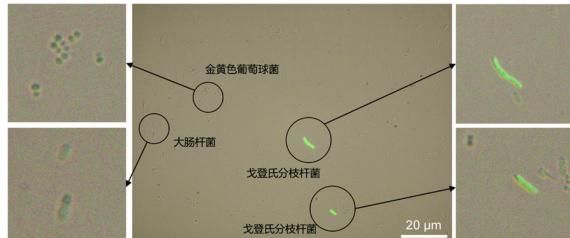
一种基于AIE荧光探针的抗酸染色液及其应用

(57) 摘要

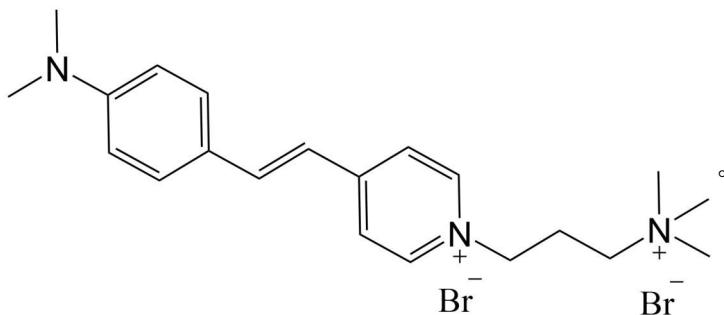
本发明公开一种基于AIE荧光探针的抗酸染色液及其应用；本发明的抗酸染色液包括AIE染色液和酸性脱色液；所述AIE染色液包括MASPB分子和水，MASPB分子的结构式如下：



染色液用于分枝杆菌的检测，准确率高、抗干扰性强、时间短。



1. 一种基于AIE荧光探针的抗酸染色液,其特征在于,包括AIE染色液和酸性脱色液;所述AIE染色液包括MASPB分子和水,MASPB分子的结构式如下:



2. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光探针的抗酸染色液,其特征在于,所述AIE染色液中MASPB分子的浓度为50-70 μM。

3. 根据权利要求1所述的基于AIE荧光探针的抗酸染色液,其特征在于,所述酸性脱色液包括盐酸和乙醇。

4. 根据权利要求3所述的基于AIE荧光探针的抗酸染色液,其特征在于,所述酸性脱色液中盐酸的体积比例为3-6%;所述盐酸的质量浓度为30-40%。

5. 权利要求1~4任一项所述的基于AIE荧光探针的抗酸染色液在检测分枝杆菌中的应用。

6. 一种检测分枝杆菌的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 将待检样本涂布在载玻片上,固定,形成涂膜;

(2) 滴加AIE染色液直至覆盖涂膜,50-70°C温度下染色2-4 min,冲洗;

(3) 滴加酸性脱色液直至覆盖涂膜,静置脱色,冲洗,盖上盖玻片;

(4) 通过荧光显微镜的B通道对涂片进行观察;B通道的激发波长460-490 nm,发射波长510-550 nm;

其中,所述AIE染色液和酸性脱色液为权利要求1~4任一项所述的基于AIE荧光探针的抗酸染色液中的AIE染色液和酸性脱色液。

7. 根据权利要求6所述的检测分枝杆菌的方法,其特征在于,步骤(3)中所述静置脱色的时间为2-3 min。

8. 根据权利要求6所述的检测分枝杆菌的方法,其特征在于,步骤(1)中所述固定为50-70 °C加热固定。

9. 根据权利要求6所述的检测分枝杆菌的方法,其特征在于,步骤(4)中荧光显微镜的放大倍数为400-1000倍。

10. 根据权利要求6所述的检测分枝杆菌的方法,其特征在于,步骤(4)中通过观察是否具有明亮的荧光判断待检样本是否含有分枝杆菌。

一种基于AIE荧光探针的抗酸染色液及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于小分子生物学诊断技术领域,尤其涉及一种基于AIE荧光探针的抗酸染色液及其应用。

背景技术

[0002] 结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*),俗称结核杆菌,是引起结核病的病原菌。

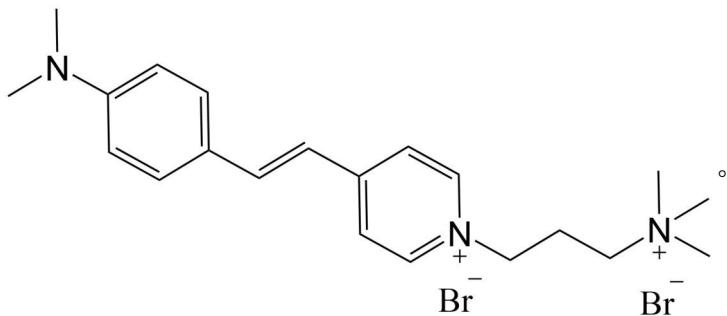
[0003] 目前,结核分枝杆菌的鉴定主要有涂片镜检、结核免疫学、结核培养、分子生物学等手段,其中涂片镜检是最常开展的基础方法,具有操作简单、检测迅速、对硬件设施要求不高等优点,适合基层开展,主要包括两种常用方法,萋-尼抗酸染色及金胺O荧光染色,利用分枝杆菌与染料结合并且不易被酸性脱色液脱色的特性,达到染色效果。其中,金胺O法相较于萋-尼抗酸染色法,由于其荧光特性,染色明显,显色鲜艳,容易观察和识别结核菌,可通过低倍镜进行观察,有利于提高镜检筛查效率,然而其染色时间较长,酸性脱色液脱色后需再进行复染操作(利用高锰酸钾的强氧化性去除背景染色,提高对比度),通常在15-20分钟内完成染色过程,且金胺O光稳定性较差,通常需避光操作,步骤繁琐且时间成本较高。因此开发出一款快速简易准确的荧光抗酸染色液对于提高鉴定效率具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明的目的在于提供了一种基于AIE(Aggregation-induced emission)荧光探针的抗酸染色液及其用于分枝杆菌鉴定的应用。本发明通过AIE荧光分子的快速染色及脱色液对于非分枝杆菌组分的选择性脱色达到分枝杆菌的鉴定目的,旨在克服传统金胺O方法染色时间长、步骤繁琐、光稳定性差、准确性低的缺点,为荧光抗酸染色领域提供更多选择。

[0005] 本发明的目的通过以下技术方案实现。

[0006] 本发明提供一种基于AIE荧光探针的抗酸染色液,包括AIE染色液和酸性脱色液;所述AIE染色液包括MASPB分子和水,MASPB分子的结构式如下:



[0007] 优选地,所述AIE染色液中MASPB分子的浓度为50-70 μM 。

[0008] 优选地,所述水为超纯水。

[0009] 优选地,所述酸性脱色液包括盐酸和乙醇。

[0010] 进一步优选地,所述酸性脱色液中盐酸的体积比例为3-6%;所述盐酸的质量浓度

为30-40%。

[0011] 本发明提供一种上述基于AIE荧光探针的抗酸染色液在检测分枝杆菌中的应用。

[0012] 本发明提供一种检测分枝杆菌的方法,包括以下步骤:

- (1) 将待检样本涂布在载玻片上,固定,形成涂膜;
- (2) 滴加AIE染色液直至覆盖涂膜,50-70 °C温度下染色2-4 min,冲洗;
- (3) 滴加酸性脱色液直至覆盖涂膜,静置脱色,冲洗,盖上盖玻片;
- (4) 通过荧光显微镜的B通道对涂片进行观察;B通道的激发波长460-490 nm,发射波长510-550 nm;

其中,所述AIE染色液和酸性脱色液为上述的基于AIE荧光探针的抗酸染色液中的AIE染色液和酸性脱色液。

[0013] 优选地,步骤(3)中所述静置脱色的时间为2-3 min。

[0014] 优选地,步骤(1)中所述固定为50-70 °C加热固定。

[0015] 优选地,步骤(2)中所述染色为置于加热板加热染色。

[0016] 优选地,步骤(2)和(3)中所述冲洗为蒸馏水冲洗;

优选地,步骤(4)中荧光显微镜的放大倍数为400-1000倍;

优选地,步骤(4)中通过观察是否具有明亮的荧光判断待检样本是否含有分枝杆菌。

[0017] 优选地,所述分枝杆菌为结核分枝杆菌。

[0018] 在检测分枝杆菌的过程中,染料会与多种其它非分枝杆菌成分结合,因此会受到其它成分(比如一些球菌、杆菌,人体组织细胞)的干扰,造成假阳性;为准确检测分枝杆菌,并且降低假阳性,染料的选择至关重要,染料既需要与分枝杆菌稳定结合(防止被脱色降低准确性),又不能与其它组分结合过于稳定(防止不能脱色造成假阳性),最后还需要低的背景便于观察;虽然现有技术具有大量染料,但大多数都不能用于检测分枝杆菌,本发明通过实验发现具有聚集诱导发光特性的MASPB可应用于分枝杆菌的抗酸染色,设计一种基于AIE荧光探针MASPB的抗酸染色液,可与分枝杆菌快速结合,经酸性脱色液处理后,能够有效消除非分枝杆菌组分的显色干扰,而与分枝杆菌仍能稳定结合并发出明亮荧光,且背景干净无荧光,无需再进行复染操作,检测时间短、准确性高。

[0019] 相对于现有技术,本发明具有如下的优点及有益效果:

(1) 本发明的抗酸染色液,仅需两步即可完成抗酸染色,相较于传统的金胺O抗酸染色,有效简化了染色步骤,染色时间大幅缩短;且对分枝杆菌的检出率更高。

[0020] (2) 本发明所用的AIE染色液为AIE分子的水溶液,可以消除萋-尼染色法及金胺O荧光染色法中苯酚毒害的危险,更为安全。

[0021] (3) 本发明采用MASPB制备抗酸染色液,由于其聚集诱导发光特性及良好的水溶性,染色后荧光明显,光稳定性良好,背景荧光低,相较于金胺O法可有效避免镜检过程中导致的光漂白。

[0022] (4) 本发明的检测分枝杆菌的方法,采用基于MASPB的抗酸染色液,通过在温度50-70°C条件下染色,使得本发明抗酸染色液的检出率显著提升,检出率高于金胺O染色法;染色温度条件较温和,通过采用用于涂片样本固定的加热板即能实现。

附图说明

- [0023] 图1为AIE抗酸染色及金胺0抗酸染色步骤对比图；
图2为实施例1的AIE抗酸染色对于混菌的染色荧光图(局部图放大4倍)；
图3为实施例2的AIE抗酸染色对于痰液样本(含戈登氏分枝杆菌)的染色荧光图(左:荧光场,中:明场,右:叠加场)；
图4为实施例3的AIE抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌的检出图(局部图放大10倍)；
图5为实施例4的AIE抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌的连续拍摄荧光图；
图6为对比例1的无脱色步骤下AIE抗酸染色对于混菌的染色荧光图(局部图放大4倍)；
图7为对比例2的常温染色下AIE抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌的检出图(局部图放大10倍)；
图8为对比例3的以DENPB作为AIE分子的AIE抗酸染色对于混菌的染色荧光图(局部图放大4倍)；
图9为对比例4的金胺0抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌的检出图(局部图放大10倍)；
图10为对比例5的金胺0抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌的连续拍摄荧光图。

具体实施方式

[0024] 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。

[0025] 本发明AIE抗酸染色及金胺0抗酸染色步骤对比如图1。

[0026] 实施例1:

AIE染色液配制:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将MASPB母液用超纯水稀释至60μM;

酸性脱色液配制:取无水乙醇和浓盐酸(37wt%)配制,浓盐酸的体积比例为5%;

样本准备:挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到上述三种菌的菌液,将上述三种菌液混合摇匀,得到混菌样本;

涂片:棉签蘸取上述混菌样本涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,在加热板上60°C加热染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、100×物镜观察,进行直接镜检。染色效果如图2所示。

[0027] 实施例2:

AIE染色液配制:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将MASPB母液用超纯水稀释至60μM;

酸性脱色液配制:取无水乙醇和浓盐酸(37wt%)配制,浓盐酸的体积比例在5%;

样本准备:挑取戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到菌液,将戈登氏分枝杆菌菌液加入到痰液样本中,混匀,得到含戈登氏分枝杆菌的痰液样本;

涂片:棉签挑取上述痰液样本,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,在加热板上60°C加热染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、40×物镜观察,进行直接镜检。染色效果如图3所示。

[0028] 实施例3:

AIE染色液配制:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将MASPB母液用超纯水稀释至60μM;

酸性脱色液配制:取无水乙醇和浓盐酸(37wt%)配制,浓盐酸的体积比例为5%;

样本准备:挑取戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到菌液;

涂片:棉签蘸取上述菌液涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,在加热板上60°C加热染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、40×物镜观察,进行直接镜检,统计检出结果,结果如图4所示。

[0029] 实施例4:

AIE染色液配制:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将MASPB母液用超纯水稀释至60μM;

酸性脱色液配制:取无水乙醇和浓盐酸(37wt%)配制,浓盐酸的体积比例在5%;

样本准备:挑取戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到菌液;

涂片:棉签蘸取上述菌液涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,在加热板上60°C加热染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、40×物镜观察,在激光照射下,连续拍摄荧光图片,结果如图5所示。

[0030] 对比例1:

AIE染色液配制:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将MASPB母液用超纯水稀释至60μM;

样本准备:挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到上述三种菌的菌液,将上述三种菌液混合摇匀,得到混菌样本;

涂片:棉签蘸取上述混菌样本涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,在加热板上60°C加热染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、100×物镜观察,进行直接镜检。染色效果如图6所示。

[0031] 对比例2:

AIE染色液配制:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将MASPB母液用超纯水稀释至60μM;

酸性脱色液配制:取无水乙醇和浓盐酸(37wt%)配制,浓盐酸的体积比例为5%;

样本准备:挑取戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到菌液;

涂片:棉签蘸取上述菌液样本涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

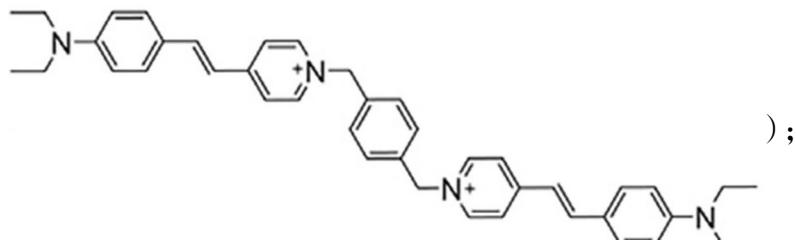
染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,常温染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、40×物镜观察,进行直接镜检。染色效果如图7所示。

[0032] 对比例3:

AIE染色液配制:DENPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,将DENPB母液用超纯



水稀释至60μM(结构式:

酸性脱色液配制:取无水乙醇和浓盐酸(37wt%)配制,浓盐酸的体积比例在5%;

样本准备:挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到上述三种菌的菌液,将上述三种菌液混合摇匀,得到混菌样本;

涂片:棉签蘸取上述混菌样本涂抹于载玻片上,晾干5分钟或用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加AIE染色液至覆盖涂膜,在加热板上60°C加热染色2-4min后,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗,盖上盖玻片;

结果观察:在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、100×物镜观察,进行直接镜检。染色效果如图8所示。

[0033] 对比例4:

采用传统金胺0抗酸染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司的G1217抗酸染色试剂盒(金胺0法))进行抗酸染色,

样本准备:挑取戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到菌液;

涂片:棉签蘸取上述菌液涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加金胺0染色液至覆盖涂膜,避光染色 10-15min,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗;

复染:滴加复染液至覆盖涂膜,等待2min后,蒸馏水小心冲洗;

在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、40×物镜观察,进行直接镜检,统计检出结果,结果如图9所示。

[0034] 对比例5:

采用传统金胺0抗酸染色试剂盒进行抗酸染色,

样本准备:挑取戈登氏分枝杆菌菌落于培养基中摇菌得到菌液;

涂片:棉签蘸取上述菌液涂抹于载玻片上,用加热板50°C加热1分钟固定;

染色:滴加金胺O染色液至覆盖涂膜,避光染色 10-15min,蒸馏水小心冲洗;

脱色:滴加酸性脱色液至覆盖涂膜,等待2-3min后,蒸馏水小心冲洗;

复染:滴加复染液至覆盖涂膜,等待2min后,蒸馏水小心冲洗;

在荧光显微镜B通道(激发:460-490nm;发射:510-550nm)下,10×目镜、40×物镜观察,激光照射下,连续拍摄荧光图片,结果如图10所示。

[0035] 结果分析:

(1) 从图1中可以看出,本发明所述的AIE抗酸染色步骤更少(无需复染)且染色所需时间更短,有利于快速检测,节省时间成本;

(2) 从图2中可以看出,本发明所述的AIE抗酸染色对于混菌样本具有良好的检出效果:短杆状的大肠杆菌和球状的金黄色葡萄球菌几乎不显示荧光,整体背景荧光低,分枝状的戈登氏分枝杆菌显示出明亮的荧光,形态结构清晰,易于分辨,可用于分枝杆菌的鉴别;

(3) 从图3中可以看出,本发明所述的AIE抗酸染色适用于实际痰液样本的分枝杆菌检测,痰液中的非分枝杆菌组分(细胞、球菌等)几乎不显示荧光,整体背景荧光低,分枝状的戈登氏分枝杆菌显示出明亮的荧光,在40×物镜下观察,分枝杆菌的形态结构清晰,易于分辨,有利于镜检时的快速筛查;

(4) 从图4中可以看出,本发明所述的AIE抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌具有良好的检出率,检出率在80%以上;

(5) 从图5中可以看出,本发明所述的AIE抗酸染色具有良好的光稳定性,连续拍摄至10min无明显的荧光衰减;

(6) 从图6中可以看出,无脱色步骤下,AIE染色液染色后,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和戈登氏分枝杆菌均显示出明亮的荧光,与实施例的结果比较,表明酸性脱色液脱色处理后,能够有效消除非分枝杆菌组分的显色干扰,而与分枝杆菌仍能稳定结合并显示出明亮荧光;

(7) 从图7中可以看出,AIE抗酸染色液对于戈登氏分枝杆菌的检测,对比例2的常温条件下染色相较于实施例3的加热板上60°C条件下染色,染色效果差,分枝杆菌检出率仅在50%左右,表明本发明50-70°C条件下染色有利于提高AIE抗酸染色分枝杆菌的检出率;

(8) 从图8中可以看出,采用AIE分子DENPB制备抗酸染色液对样本进行染色,经酸性脱色液脱色处理后,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌仍显示出明亮的荧光,存在很大的非分枝杆菌组分显色干扰,无法用于分枝杆菌的鉴别;

(9) 从图9中可以看出,金胺O抗酸染色对于戈登氏分枝杆菌检出率相较于AIE抗酸染色较差,检出率仅在70%左右;

(10) 从图10中可以看出,金胺O抗酸染色的光稳定性较差,连续拍摄至3min即有明显的荧光衰减。

[0036] 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。

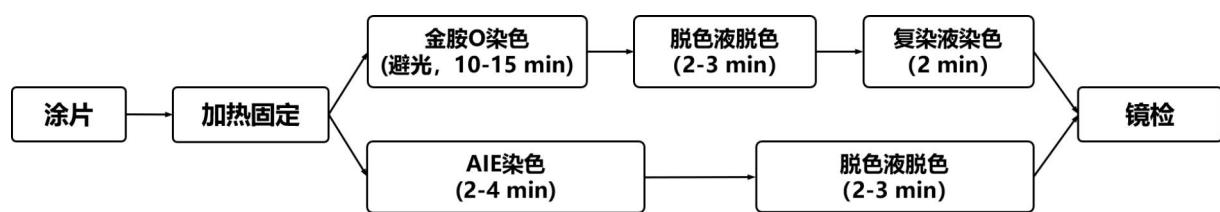


图1

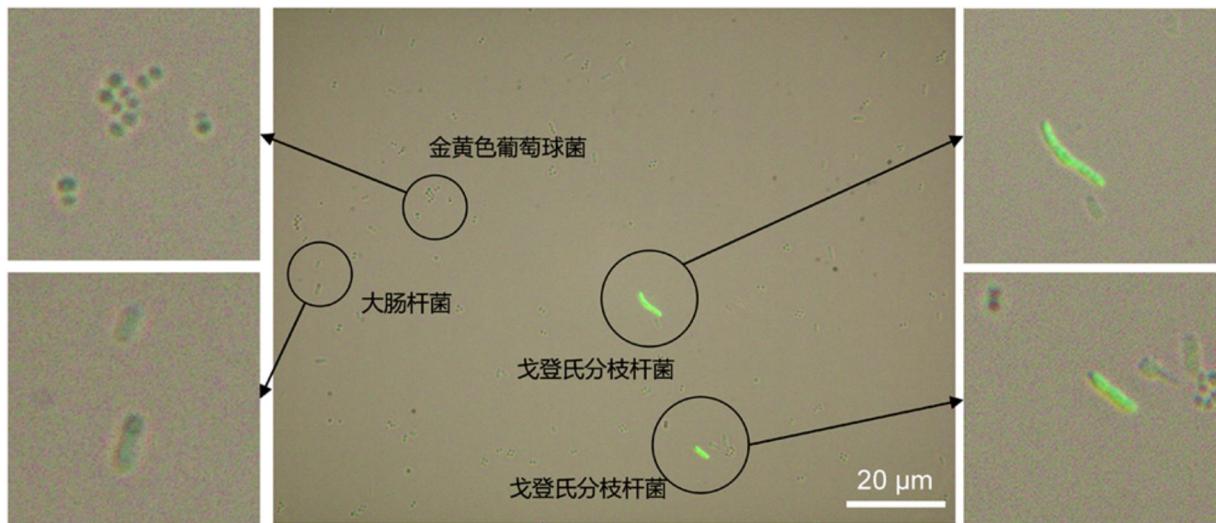


图2

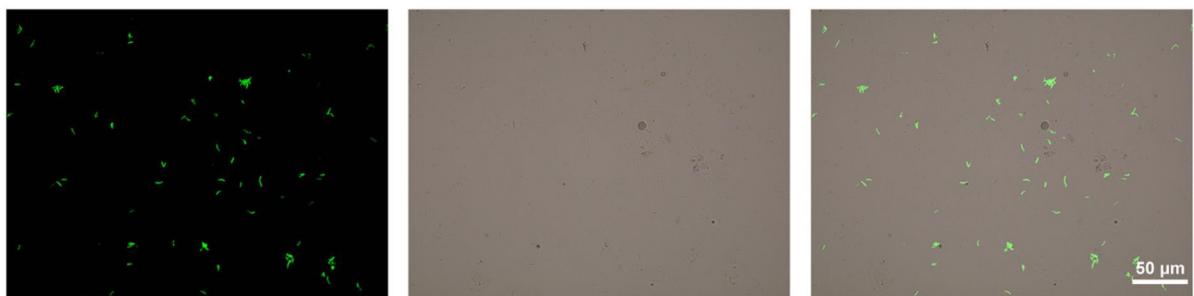


图3

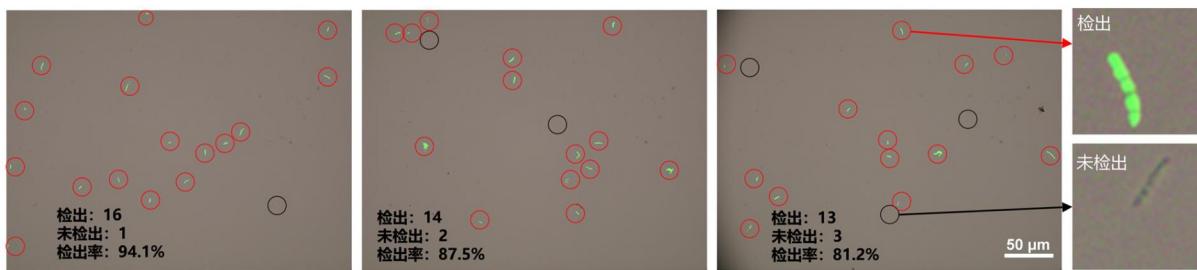


图4

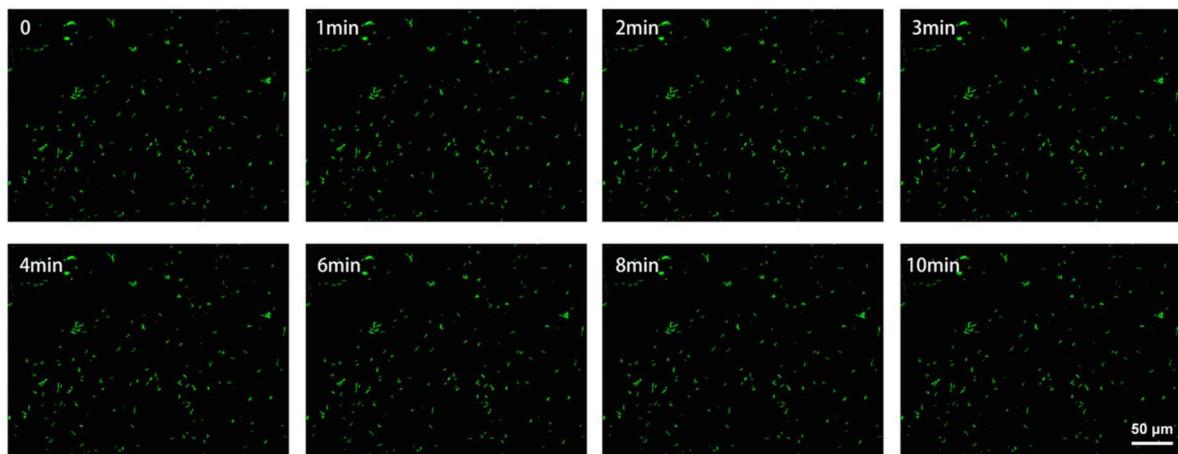


图5

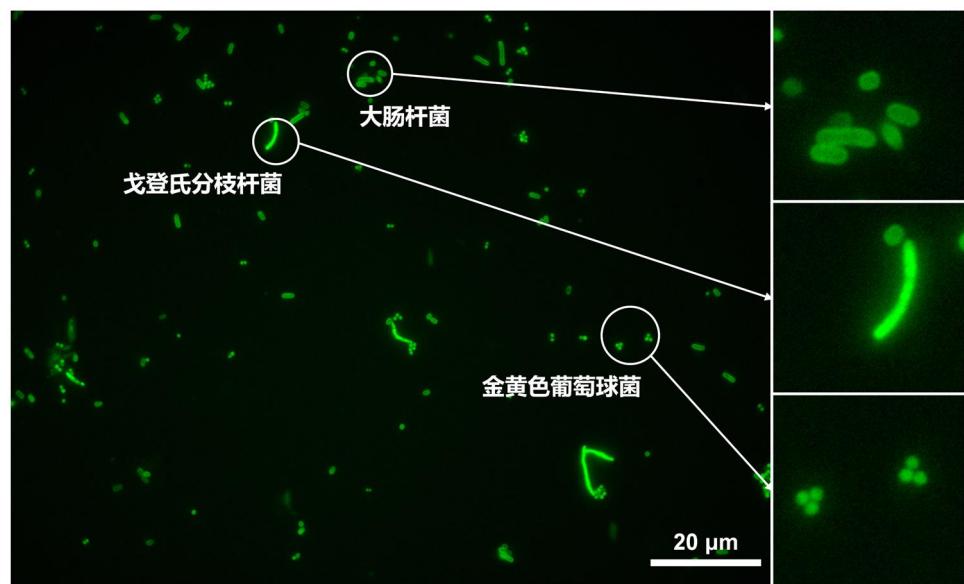


图6

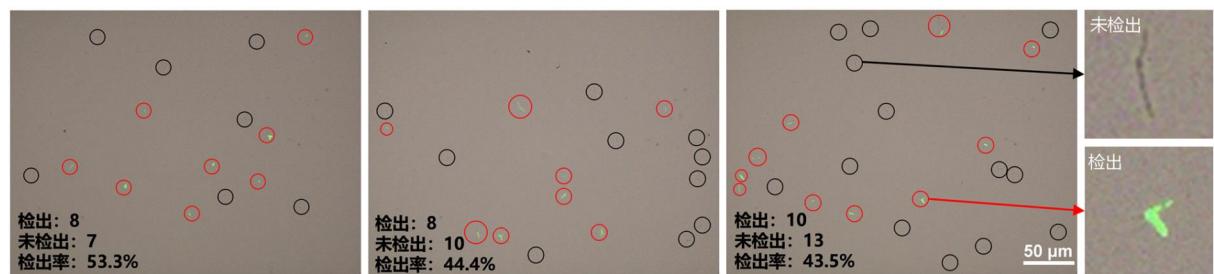


图7

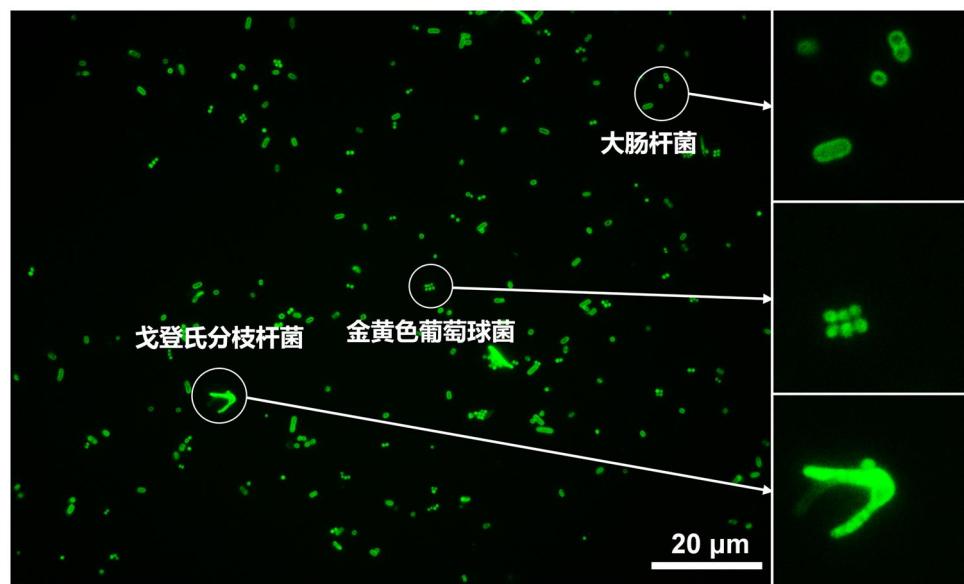


图8

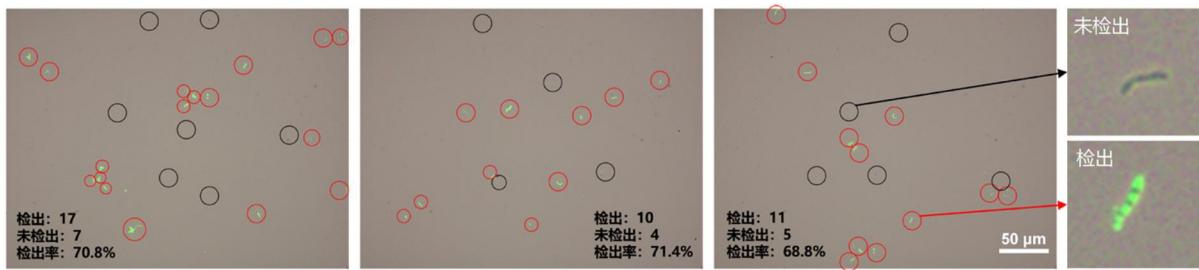


图9

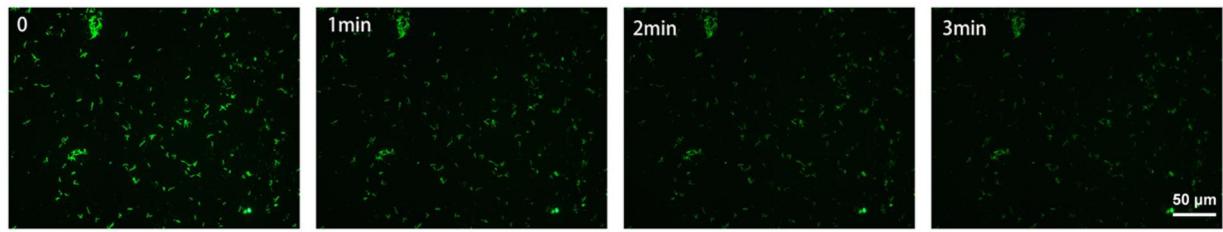


图10