



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116297358 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(21) 申请号 202310090821.8

(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

专利代理师 刘远

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

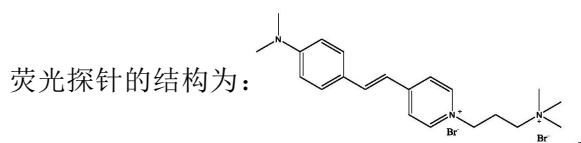
权利要求书1页 说明书5页 附图7页

(54) 发明名称

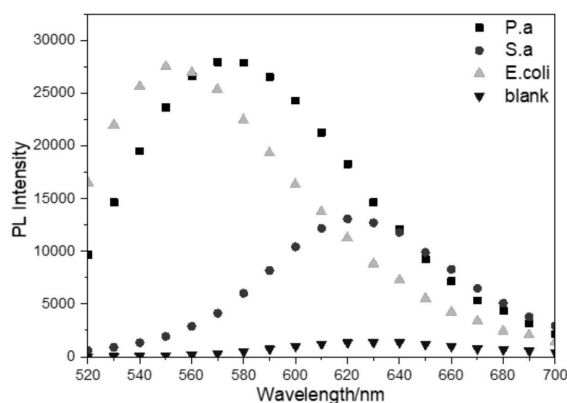
一种检测细菌的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测细菌的方法。本发明将MASPB荧光探针与含有细菌的待测溶液混合，静置得混合溶液；混合溶液在紫外光下检测待测溶液中细菌的种类或浓度；所述细菌为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的至少一种；所述MASPB

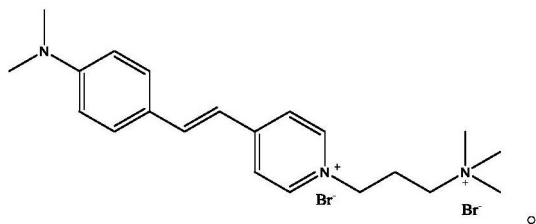


本发明的MASPB荧光探针与不同的菌种具有不同的结合位点，能够进行肉眼和细胞水平上对不同细菌进行区分，实现快速、准确的对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的区分，荧光强度与细菌量呈现良好的线性关系，可以检测细菌的浓度，实用性较高。



1. 一种检测细菌的方法,其特征在于,将MASPB荧光探针与含有细菌的待测溶液混合,静置得混合溶液;混合溶液在紫外光下检测待测溶液中细菌的种类或浓度;所述细菌为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的至少一种;

所述MASPB荧光探针的结构如下:



2. 根据权利要求1所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述检测待测溶液中细菌的种类具体有三种方法:(1)肉眼观法;(2)荧光光谱法;(3)细胞成像法。

3. 根据权利要求2所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述肉眼观法通过观察混合溶液在紫外光下的颜色进行判断,混合溶液含革兰氏阳性菌,混合溶液呈现增强的红色荧光;混合溶液含革兰氏阴性菌,混合溶液呈现黄色荧光。

4. 根据权利要求2所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述荧光光谱法通过酶标仪检测混合溶液在紫外光下的荧光光谱进行判断,混合溶液含革兰氏阳性菌,荧光光谱最大发射波长在610-630nm;混合溶液含革兰氏阴性菌,荧光光谱最大发射波长在540-580nm范围内。

5. 根据权利要求2所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述细胞成像法通过共聚焦荧光显微镜观察混合溶液中的细菌在紫外光下的细胞染色进行判断,混合溶液含革兰氏阴性菌,细菌外表面出现一圈荧光;混合溶液含革兰氏阳性菌,细菌整个细胞质发出荧光。

6. 根据权利要求1所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述检测待测溶液中细菌的浓度通过酶标仪检测混合溶液在紫外光下的荧光强度,根据标准曲线计算细菌的浓度,当细菌浓度OD范围在0.2-1.2,对于革兰氏阴性菌大肠杆菌,标准曲线方程为 $y=21418x-986$,革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌的标准曲线方程为 $y=23366x-828$,革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的标准曲线方程为 $y=83132x-1156$,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;所述细菌为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的一种,且已知具体种类。

7. 根据权利要求4或6所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述酶标仪的发射波长范围为520-700nm。

8. 根据权利要求1所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述紫外光的波长为470-490nm。

9. 根据权利要求1所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述含有细菌的待测溶液中细菌的浓度为OD=0.2-1.2;所述混合溶液中MASPB荧光探针的浓度为5-10 μ M;所述静置的时间至少3分钟。

10. 根据权利要求1所述的检测细菌的方法,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和铜绿假单胞菌。

一种检测细菌的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测技术领域,尤其涉及一种检测细菌的方法。

背景技术

[0002] 细菌无处不在,广泛分布在土壤、水、植物和动物中,且种类繁多。革兰氏染色法的主要原理是利用革兰氏阳性细菌与阴性细菌在细胞壁的结构与组成上的不同,通过直接观察细菌染色后的颜色把众多的细菌分为两大类,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌(Coico,R.(2006),Gram Staining.Current Protocols in Microbiology,00:A.3C.1-A.3C.2)。大多数化脓性球菌都属于革兰氏阳性菌,它们能产生外毒素使人致病,而大多数肠道菌多属于革兰氏阴性菌,它们产生内毒素,靠内毒素使人致病,对两种菌进行区分在菌种检测中具有很重要的意义。革兰氏染色法可以克服平板法耗时长的缺点,但操作步骤繁杂、比色法灵敏度低,且会出现脱色不够造成假阳性,脱色过度造成假阴性的问题。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和区分。

[0003] 荧光技术是一种快速、可视化鉴定细菌的理想工具。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,差的光稳定性和聚集诱导猝灭效应,极大的降低了检测的灵敏度,并且不利于可视化的检测细菌。不同于传统的荧光分子,聚集诱导发光特性的荧光分子,通常在溶液中不发光或弱发光,但当其分子内运动受到限制时,会发出强烈的荧光,具有荧光背景低、光稳定性好等优点。

发明内容

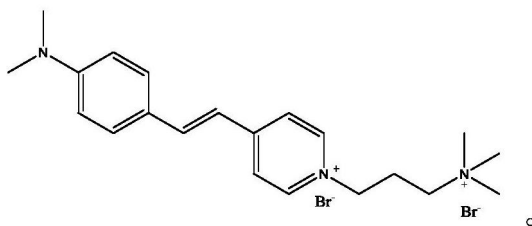
[0004] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种检测细菌的方法,将MASPB荧光探针用于在肉眼和细胞水平上快速可视化区分鉴定革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌,MASPB荧光探针与不同的菌种具有不同的结合方式,能发出了两种肉眼可辨别的发光颜色(革兰氏阳性菌为红色,革兰氏阴性菌为黄色),并且对细菌具有敏感的荧光响应,其聚集态发光效率高,光稳定性高,通过共聚焦显微镜下观察,在细胞水平上也能实现对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的区分,是一种能实现快速且肉眼可视化检测细菌的方法。同时,荧光强度与细菌量呈正比例,可通过荧光强度和标准曲线计算细菌的浓度。

[0005] 本发明的目的通过如下技术方案实现。

[0006] 一种检测细菌的方法,将MASPB荧光探针与含有细菌的待测溶液混合,静置得混合溶液;混合溶液在紫外光下检测待测溶液中细菌的种类或浓度;所述细菌为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的至少一种;

[0007] 所述MASPB荧光探针的结构如下:

[0008]



[0009] 所述检测待测溶液中细菌的种类为区分细菌为革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌。

[0010] 所述检测待测溶液中细菌的浓度为检测已知细菌种类的待测溶液中细菌的浓度，且细菌为一种。

[0011] 优选地，所述检测待测溶液中细菌的种类具体有三种方法：(1)肉眼观法；(2)荧光光谱法；(3)细胞成像法。

[0012] 进一步优选地，所述肉眼观法通过观察混合溶液在紫外光下的颜色进行判断，混合溶液含革兰氏阳性菌，混合溶液呈现增强的红色荧光(相对对照组)；混合溶液含革兰氏阴性菌，混合溶液呈现黄色荧光。

[0013] 进一步优选地，所述荧光光谱法通过酶标仪检测混合溶液在紫外光下的荧光光谱进行判断，混合溶液含革兰氏阳性菌，荧光光谱最大发射波长在610-630nm；混合溶液含革兰氏阴性菌，荧光光谱最大发射波长在540-580nm。

[0014] 更优选地，所述酶标仪的发射波长范围为520-700nm。

[0015] 进一步优选地，所述细胞成像法通过共聚焦荧光显微镜观察混合溶液中的细菌在紫外光下的细胞染色进行判断，混合溶液含革兰氏阴性菌，细菌外表面出现一圈荧光；混合溶液含革兰氏阳性菌，细菌整个细胞质发出荧光。

[0016] 更优选地，所述共聚焦荧光显微镜的发射波长范围为520-700nm。

[0017] 优选地，所述检测待测溶液中细菌的浓度通过酶标仪检测混合溶液在紫外光下的荧光强度，根据标准曲线计算细菌的浓度，当细菌浓度OD范围在0.2-1.2，对于革兰氏阴性菌大肠杆菌，标准曲线方程为 $y=21418x-986$ ，革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌的标准曲线方程为 $y=23366x-828$ ，革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌的标准曲线方程为 $y=83132x-1156$ ，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；所述细菌为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌中的一种，且已知具体种类。

[0018] 进一步优选地，所述酶标仪的发射波长范围为520-700nm。

[0019] 优选地，所述紫外光的波长为470-490nm。

[0020] 优选地，所述含有细菌的待测溶液中细菌的浓度为 $OD=0.2-1.2$ ；所述混合溶液中MASPB荧光探针的浓度为5-10 μ M；所述静置的时间至少3分钟。

[0021] 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和铜绿假单胞菌。

[0022] 本发明实施例以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MASPB对细菌识别鉴定试验。为了满足肉眼可视化鉴定要求，以10 μ M作为MASPB在磷酸缓冲液(PBS)溶液中的试验浓度。

[0023] (1)MASPB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，MASPB在PBS溶液中的荧光为很弱的红色荧光，当分别加入两种细菌后，能明显的看到革兰氏阳性菌(S.a)中的红色荧光增强，而革兰氏阴性菌(E.coli)中出现了很强的黄色荧

光。用酶标仪进一步验证其染色效果,从荧光光谱上能看出,加入MASPB后,革兰氏阴性菌(E.coli)的最大发射波长在540-580nm范围内,而革兰氏阳性菌(S.a)的最大发射波长在620nm处,因此,从肉眼和酶标仪仪器上来看,探针都能对革兰氏阴性菌和阳性菌进行区分。

[0024] (2)借用共聚焦荧光显微镜,实现在细胞水平上区分两种细菌。在显微镜下能清楚的看到,大肠杆菌和铜绿假单胞菌外表面出现一圈荧光,而金黄色葡萄球菌整个细胞质都发出很强的荧光。将两种菌混合在一起进行共染,也都能同时染上,通过用不同的波长接收范围去观察,可以实现混合菌种在细胞水平上对两种不同菌种的区分。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。MASPB对两种细菌具有不同的作用位点,从而使得两类细菌在细胞水平和肉眼水平上产生了不同的、可区分的荧光发射颜色。

[0025] (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MASPB荧光探针对于各种细菌检测的标准曲线以及最低检测限度,MASPB对不同的两种细菌都有较好的线性关系和较低的检测限。

[0026] 本发明具有如下优点及有益效果:

[0027] 本发明基于AIE荧光探针(MASPB)与不同的菌种具有不同的结合位点,能够进行肉眼和细胞水平上对不同细菌进行区分。探针对细菌具有高的灵敏性,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、准确的对革兰氏阳性菌和阴性菌的区分,荧光强度与细菌量呈现良好的线性关系,可以检测细菌的浓度,实用性较高。

附图说明

[0028] 图1是实施例1在紫外灯照射下,MASPB荧光探针在PBS和不同菌悬液中的对比照片。

[0029] 图2是实施例1的MASPB荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。

[0030] 图3是实施例1共聚焦显微镜下,MASPB荧光探针与不同细菌结合后成像图片。

[0031] 图4是实施例2共聚焦显微镜下,MASPB荧光探针在混合细菌中的成像图片。

[0032] 图5a-f是实施例3的MASPB荧光探针在不同细菌中荧光强度和菌OD值的线性关系图。

[0033] 图6是对比例1的DENPB荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。

[0034] 图7是对比例1共聚焦显微镜下,DENPB荧光探针与不同细菌结合后成像图片。

具体实施方式

[0035] 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。

[0036] 实施例1:

[0037] 步骤(1):将过夜培养的大肠杆菌(E.coli)、铜绿假单胞菌(P.a)和金黄色葡萄球菌(S.a)分别用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液;

[0038] 步骤(2):取1mL步骤(1)中的菌悬液加入1 μ L的MASPB(10mM)荧光探针,摇匀,制得

混合液,静置5分钟,用紫外灯观察;

[0039] 步骤(3):取200 μ 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480nm,发射波长范围520-700nm;

[0040] 步骤(4):取2 μ 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480nm,发射波长范围520-700nm。

[0041] 实施例2:

[0042] 步骤(1):将过夜培养的大肠杆菌(E.coli)、铜绿假单胞菌(P.a)和金黄色葡萄球菌(S.a)分别用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液;

[0043] 步骤(2):将大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌按1:1混合;

[0044] 步骤(3):取1mL步骤(2)中的混合菌悬液加入1 μ L的MASPB(10mM)荧光探针,摇匀,制得混合液,静置5分钟;

[0045] 步骤(4):取2 μ L步骤(3)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480nm,发射波长范围520-600nm(green),发射波长范围605-700nm(red)。

[0046] 实施例3:

[0047] 步骤(1):将过夜培养的大肠杆菌(E.coli)、铜绿假单胞菌(P.a)和金黄色葡萄球菌(S.a)分别用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1.2$ 的菌悬液。

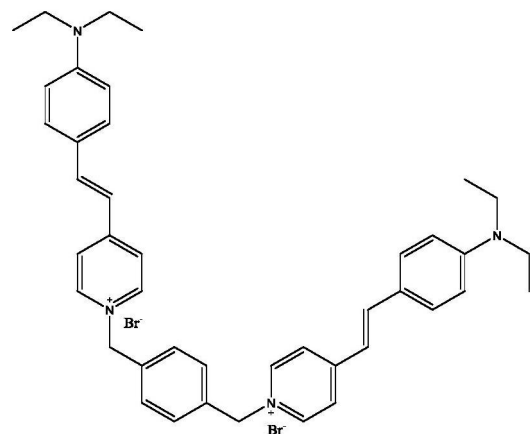
[0048] 步骤(2):取步骤(1)制的菌悬液,用PBS等比例稀释到96孔板里,每个孔依次加入MASPB(10mM)荧光探针至10 μ M。

[0049] 步骤(3):用酶标仪检测荧光强度。设置激发波长480nm,发射波长范围520-700nm。

[0050] 对比例1:

[0051] 步骤(1):将过夜培养的大肠杆菌(E.coli)、铜绿假单胞菌(P.a)和金黄色葡萄球菌(S.a)分别用PBS缓冲溶液配置成 $OD_{600}=1$ 的菌悬液;

[0052] 步骤(2):取1mL步骤(1)中的菌悬液加入1 μ L的DENPB(10mM)(结构:



)荧光探针,摇匀,制得混合液,静置5分钟;

[0053] 步骤(3):取200 μ 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405nm,发射波长范围500-700nm;

[0054] 步骤(4):取2 μ 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,发射波长范围500-700nm。

[0055] 数据分析:

[0056] 图1是实施例1在紫外灯照射下,MASPB荧光探针在PBS和不同菌悬液中的对比照片。

[0057] 图2是实施例1的MASPB荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。

[0058] 图3是实施例1共聚焦显微镜下,MASPB荧光探针与不同细菌结合后成像图片。

[0059] 图4是实施例2共聚焦显微镜下,MASPB荧光探针在混合细菌中的成像图片。

[0060] 图5a-f是实施例3的MASPB荧光探针在不同细菌中荧光强度和菌OD值的线性关系图。

[0061] 图6是对比例1的DENPB荧光探针与不同细菌结合后的荧光强度图。

[0062] 图7是对比例1共聚焦显微镜下,DENPB荧光探针与不同细菌结合后成像图片。

[0063] (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,两种不同种类的细菌能看到不同的发光颜色,在革兰氏阳性菌中发红色荧光,革兰氏阴性菌中发黄色荧光,能实现裸眼对不同细菌的鉴定。从图2的荧光图谱也能看出,加入MASPB后,革兰氏阳性菌的最大发射波长在620nm处,而革兰氏阴性菌最大发射波长在540-580nm范围处,从荧光光谱上也能进行革兰氏阴性和阳性菌的区分。

[0064] (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,表明MASPB能实现细胞水平上对细菌的检测,并且具有较好的光稳定性。

[0065] (3)图4是革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌混合后,在共聚焦显微镜下的染色效果图,从图中可以看出,在发射接受范围为500-600nm处,能看到两种菌都能发出荧光,而在620-700nm的接受范围里,只能看到革兰氏阳性菌的红色荧光,说明探针能够在细胞水平上实现对不同细菌的区分。

[0066] (4)图5a-f可以看出,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,表明探针能实现对不同量的菌的检测,并可以检测细菌浓度。

[0067] (5)图6和图7可以看出,DENPB能进行革兰氏阴性菌和阳性菌的染色,但是在发光颜色上并没有区分,荧光光谱上最大发射波长都在600nm。表明其他类型的AIE探针,结构相似,但染菌效果不同。

[0068] 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。

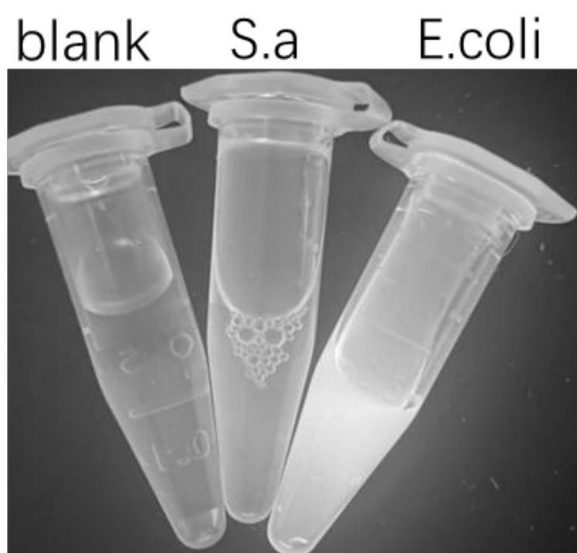


图1

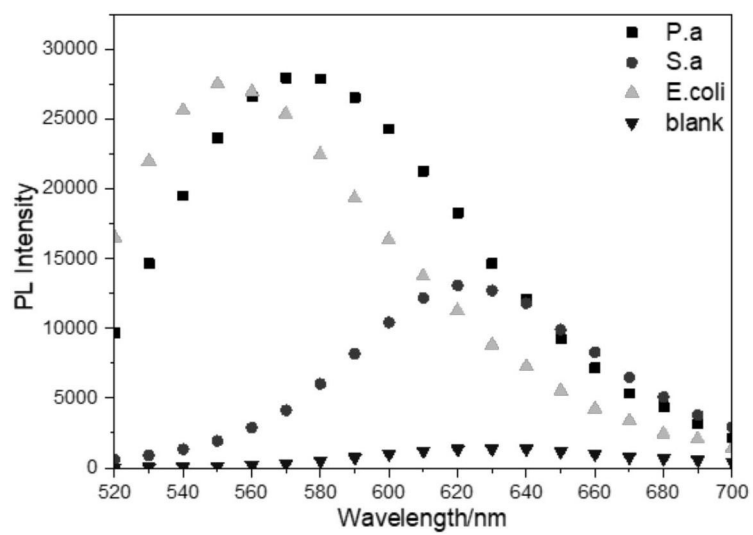


图2

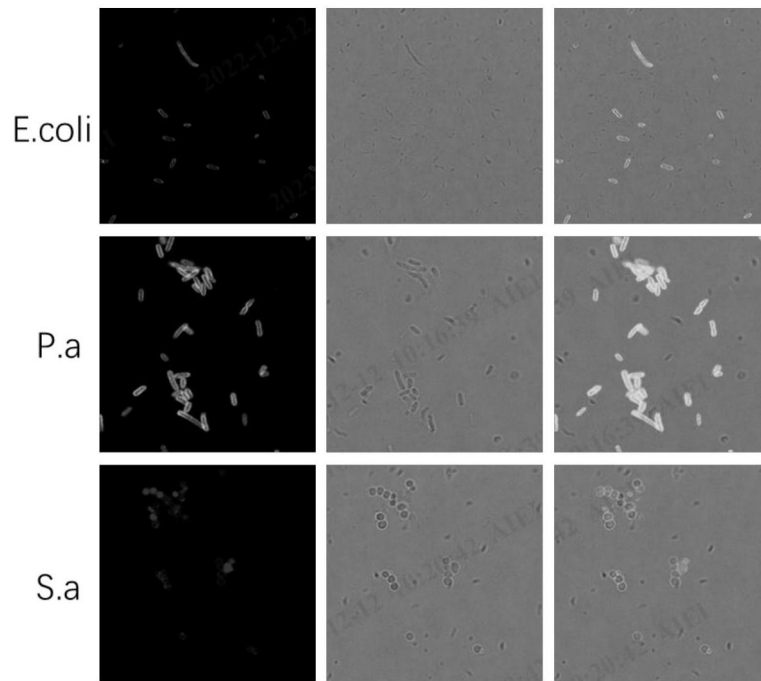


图3

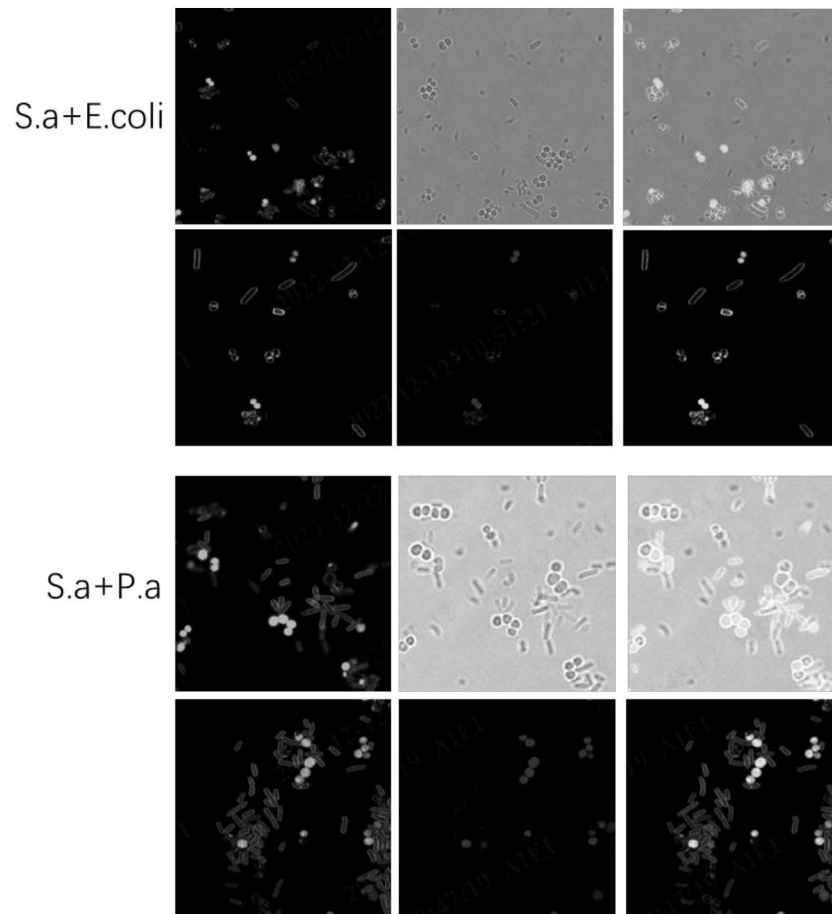


图4

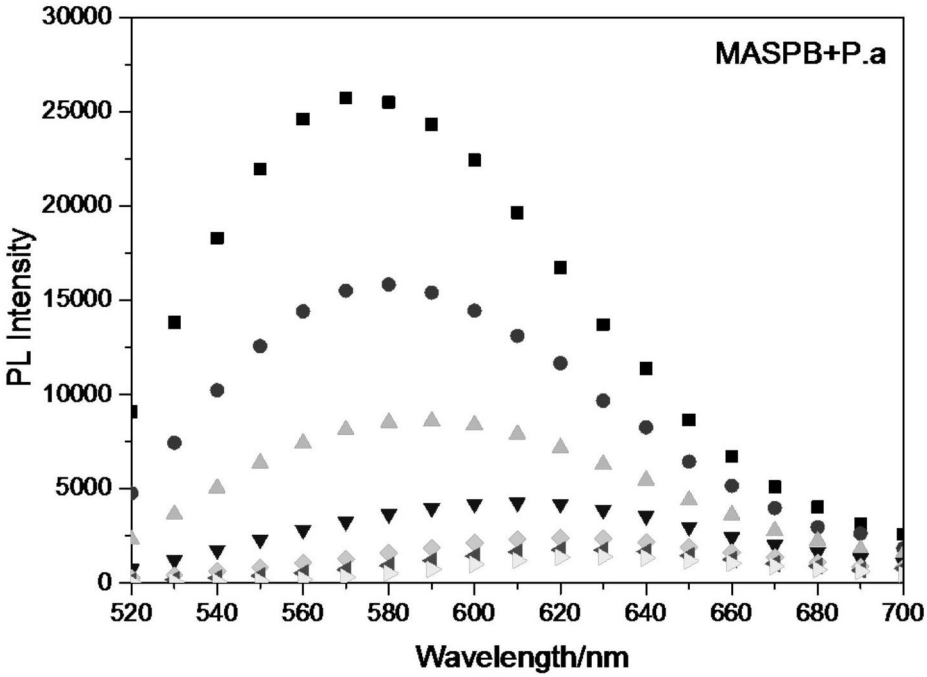


图5a

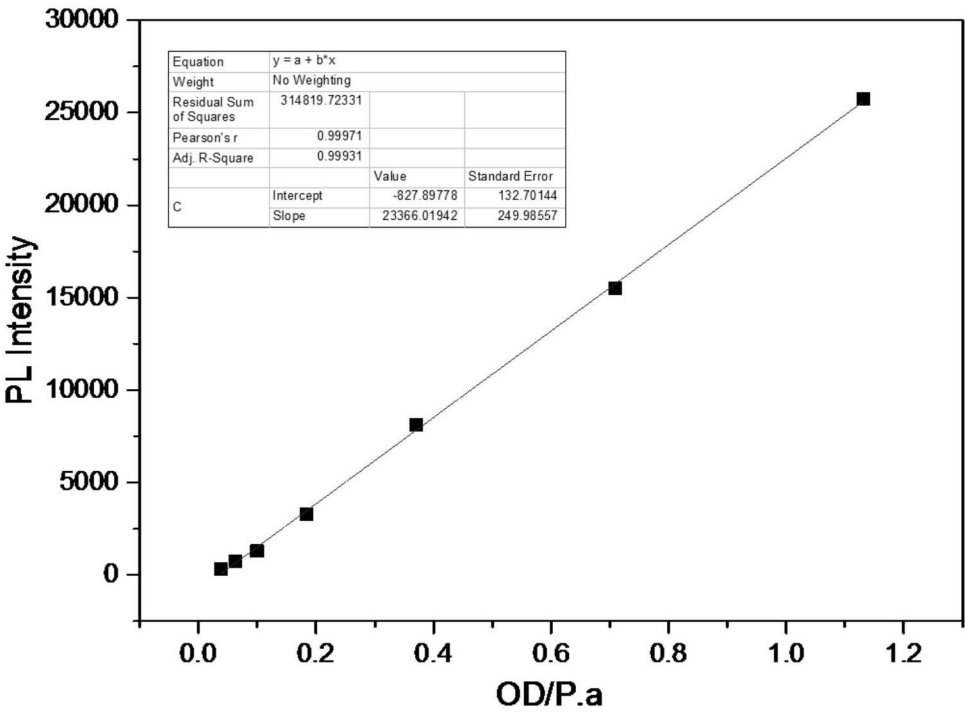


图5b

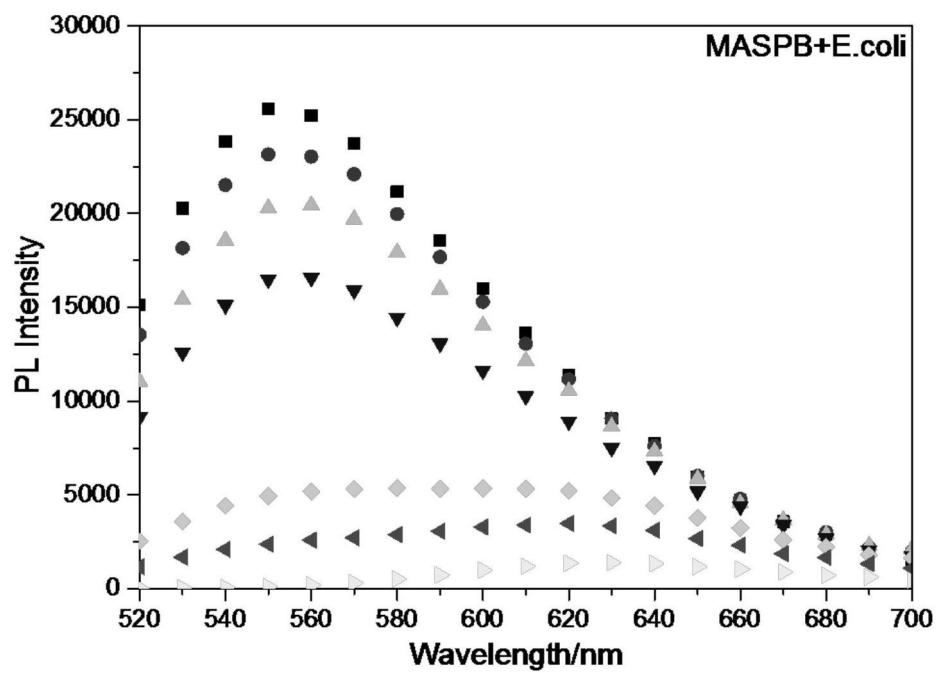


图5c

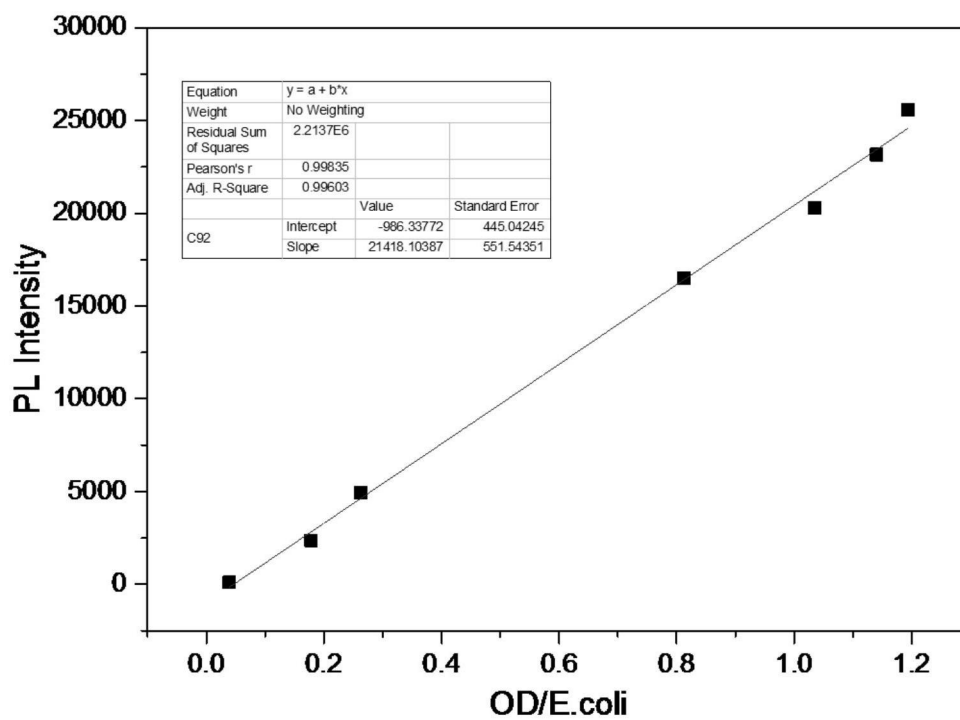


图5d

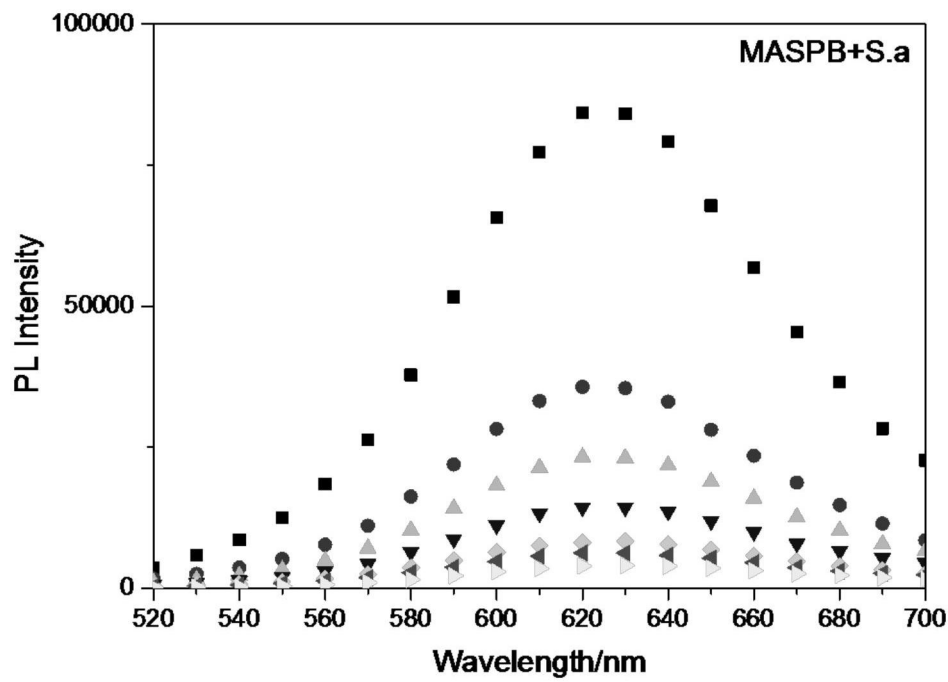


图5e

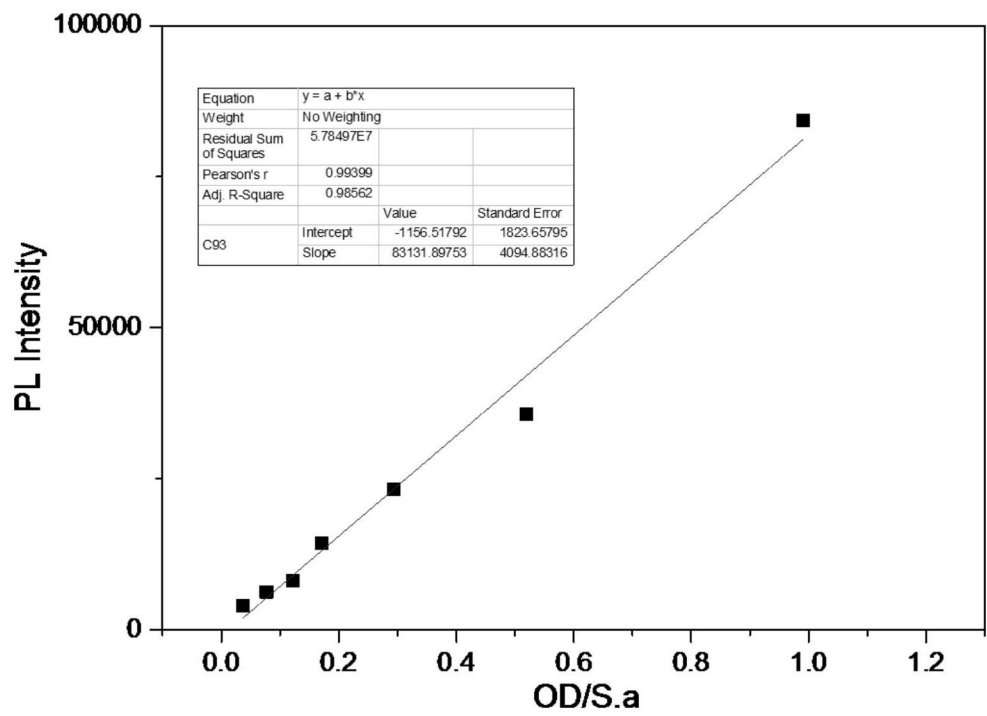


图5f

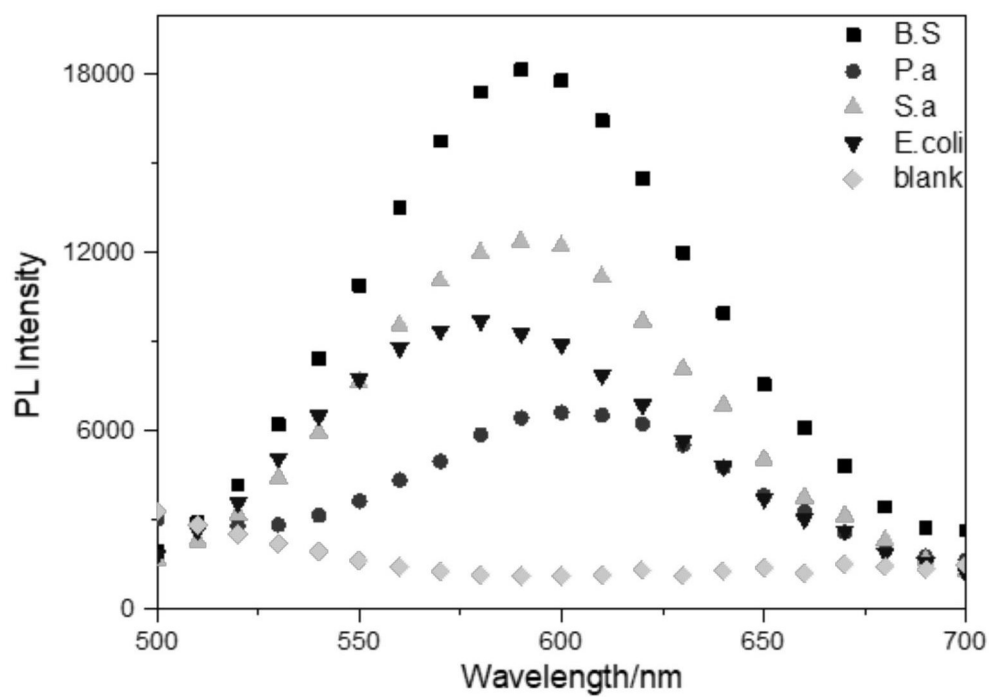


图6

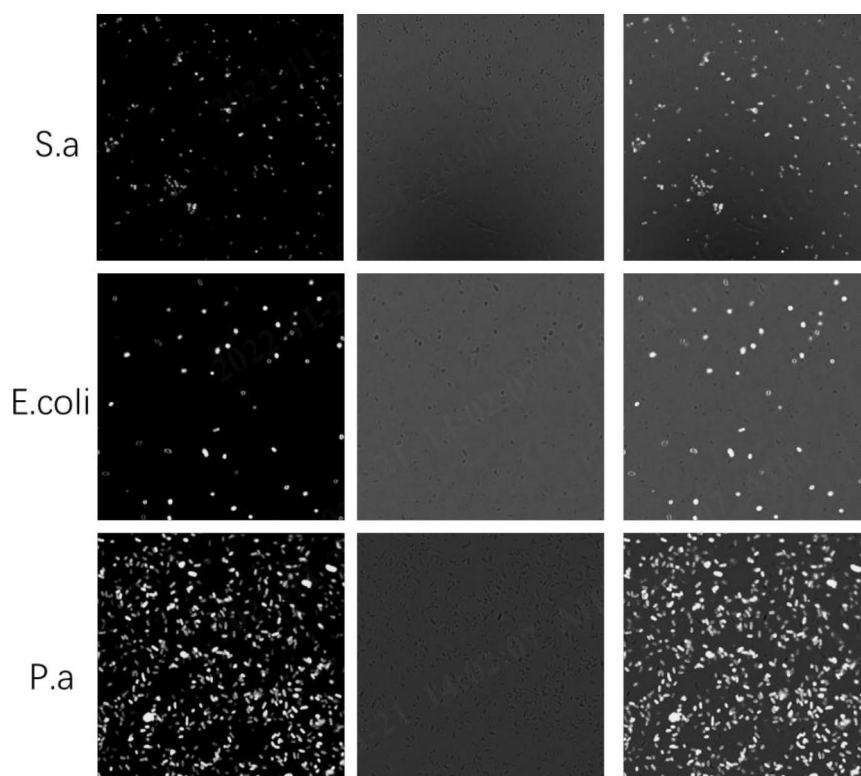


图7