



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119935978 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 06

(21) 申请号 202510432168.8

(22) 申请日 2025.04.08

(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 龚晚君 唐本忠 赵雪健 何柳 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 江裕强

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

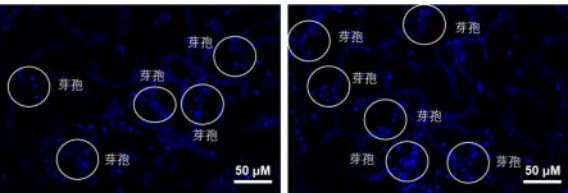
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

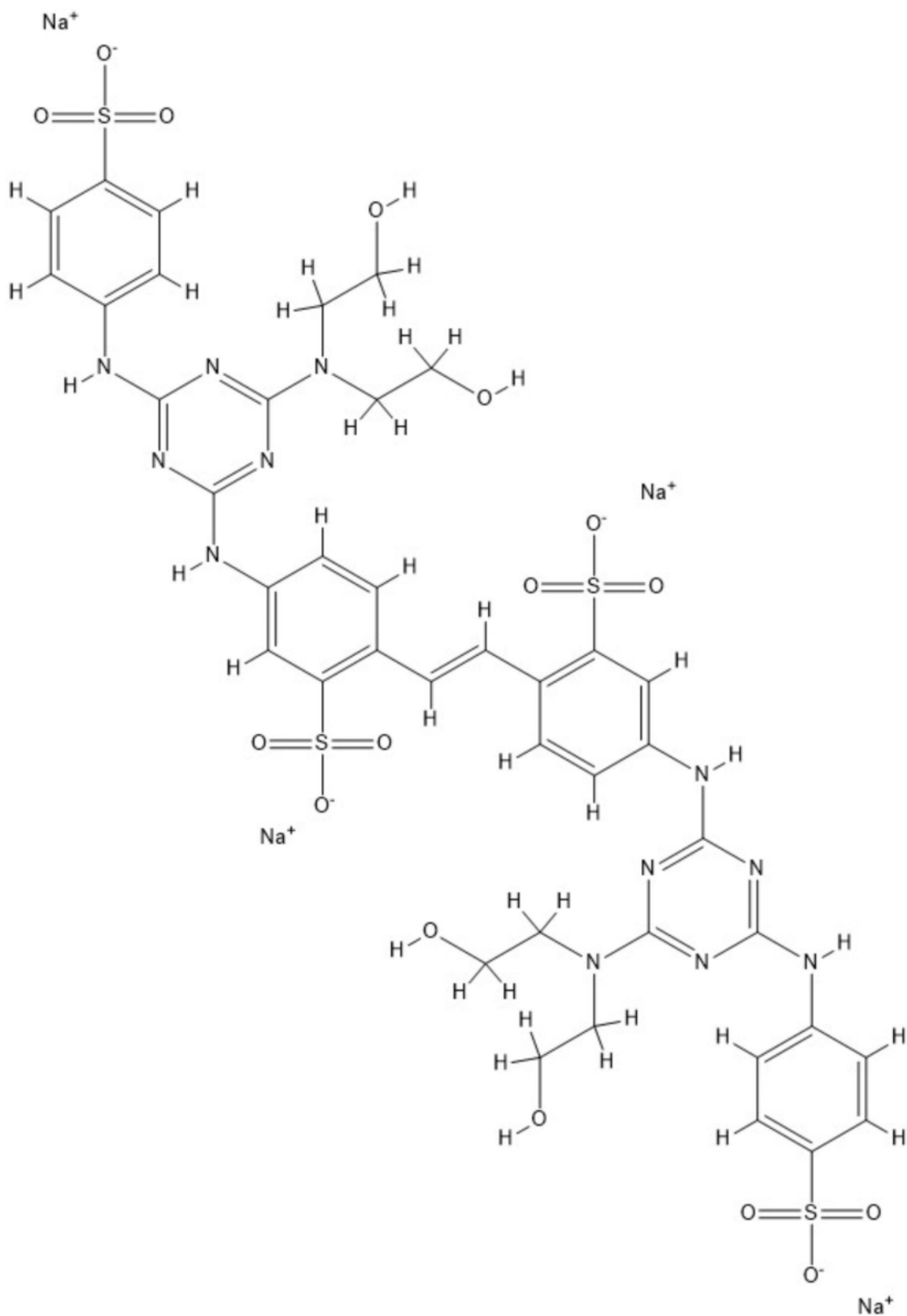
一种芽孢荧光染色液及其应用

(57) 摘要

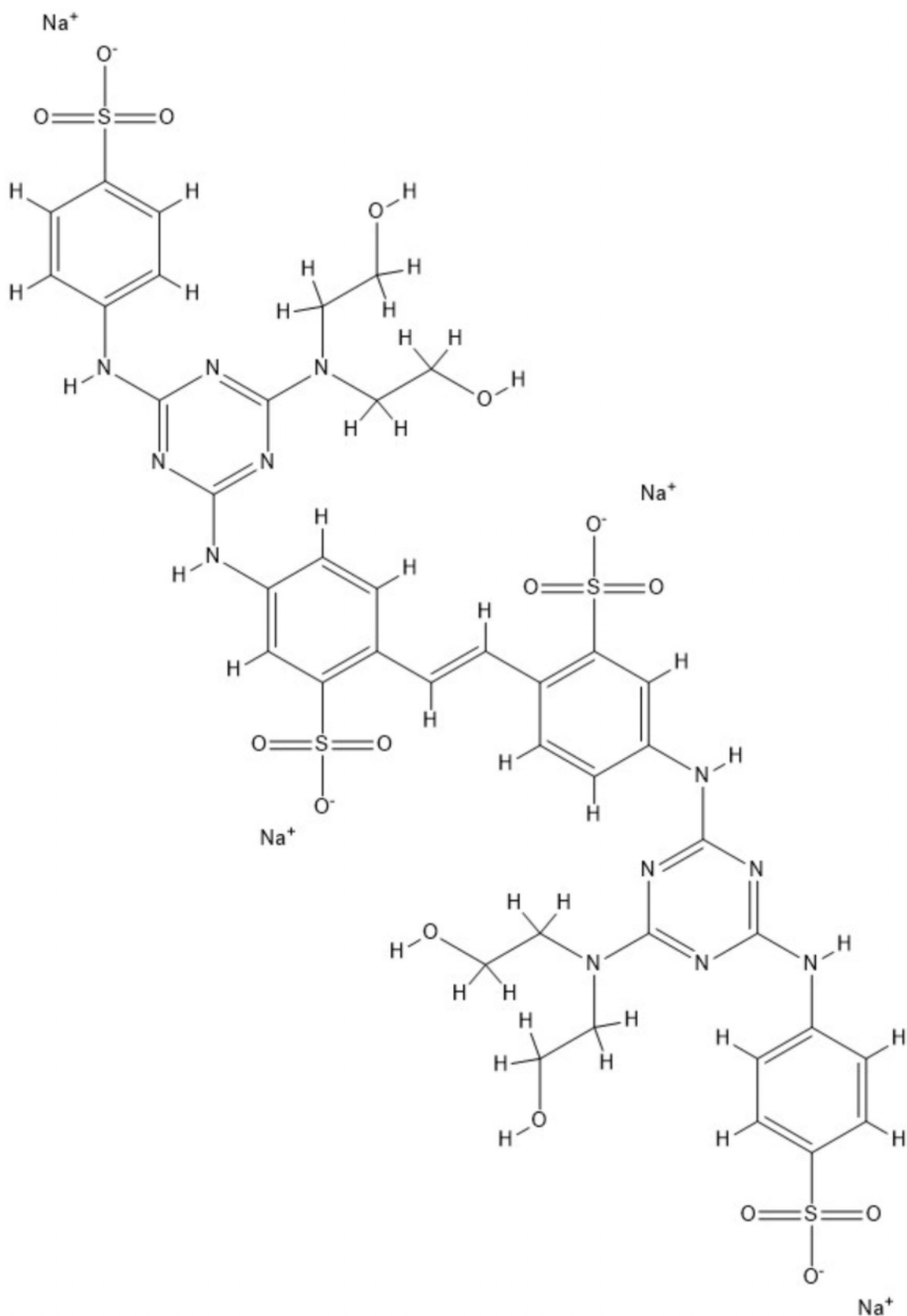
本发明公开一种芽孢荧光染色液及其应用；本发明将荧光增白剂220用于检测芽孢；本发明的芽孢荧光染色液包括荧光增白剂220。本发明芽孢荧光染色液组分简单，成本低，能准确检测待测样本中的芽孢，且毒性低，对环境影响小；本发明的检测方法操作简便，测定快速，一步操作就能完成。



1. 荧光增白剂220在检测芽孢中的应用,其特征在于,所述荧光增白剂220的结构式如下:



2. 一种芽孢荧光染色液,其特征在于,包括荧光增白剂220,荧光增白剂220的结构式如下:



3. 根据权利要求2所述的芽孢荧光染色液,其特征在于,所述芽孢荧光染色液还包括缓冲溶液或水。

4. 根据权利要求3所述的芽孢荧光染色液,其特征在于,所述芽孢荧光染色液中荧光增白剂220的浓度为10~100 $\mu$ M。

5. 根据权利要求3所述的芽孢荧光染色液,其特征在于,所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶

液,pH为7.2~7.4。

6.根据权利要求5所述的芽孢荧光染色液,其特征在于,所述磷酸盐为无水磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,无水磷酸二氢钠的质量浓度为0.1~50g/L,十二水合磷酸氢二钠的质量浓度为0.1~200g/L。

7.一种检测芽孢的方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 将待检样本涂抹在载玻片上,形成涂片;
- (2) 滴加权利要求2~6任一项所述的芽孢荧光染色液,加热染色2~10 min;
- (3) 盖上盖玻片,吸去多余染色液;
- (4) 荧光显微镜下进行镜检。

8.根据权利要求7所述的检测芽孢的方法,其特征在于,加热染色的温度为40~70℃。

9.根据权利要求7所述的检测芽孢的方法,其特征在于,镜检通过观察是否具有明亮的荧光判断待检样本是否含有芽孢。

10.根据权利要求7所述的检测芽孢的方法,其特征在于,荧光显微镜的激发波长为330~380nm。

## 一种芽孢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,尤其涉及一种芽孢荧光染色液及其应用。

### 背景技术

[0002] 某些细菌(如芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌、少数球菌等)在其生长发育后期,在细胞内形成的一个圆形或椭圆形,厚壁,含水量低,抗逆性强的休眠体构造,称为芽孢。在不同细菌中,芽孢所处的位置不同,有的在中部,有的在偏端,有的在顶端。芽孢一般呈圆形、椭圆形、圆柱形。在一些细菌中,芽孢的直径小于菌体直径,这些细菌被称为芽孢杆菌,为好氧细菌;在另一些细菌中,芽孢的直径大于菌体直径,使整个菌体呈梭形或鼓槌形,这些细菌则被称为梭状芽孢杆菌,为厌氧菌,梭状芽孢杆菌的芽孢位于菌体中间。破伤风杆菌的芽孢位于菌体的一端,使菌体呈鼓槌状。好氧芽孢杆菌属(*Bacillus*)和厌氧的梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)的所有细菌都具有芽孢。在球菌和螺菌中,只有少数种类有芽孢,球菌中只有芽孢八叠菌(*Sporosarcina*)属产芽孢。芽孢的结构相当复杂,芽孢具有多层厚而致密的胞膜,由内向外依次为核心、内膜、芽孢壁、皮质、外膜、芽孢壳和芽孢外衣。特别是芽孢壳,无通透性,有保护作用,能阻止化学品渗入。芽孢形成时能合成一些特殊的酶,这些酶较之繁殖体中的酶具有更强的耐热性。芽孢核心和皮质层中含有大量吡啶二羧酸(dipicolinic acid,DPA),占芽孢干重的5~15%,是芽孢所特有的成分,在细菌繁殖体和其他生物细胞中都没有。DPA与钙结合生成的盐能提高芽孢中各种酶的热稳定性。由于芽孢在结构和化学成分上均有别于营养细胞,所以芽孢也就具有了许多不同于营养细胞的特性。芽孢最主要的特点就是抗性强,对高温、紫外线、干燥、电离辐射和很多有毒的化学物质都有很强的抗性,因此,芽孢难以在食品加工过程、医疗器械灭菌过程中中被杀灭,因此食品加工后,残存的未灭活芽孢待外界环境适宜时可迅速萌发成为细菌营养体,致使食品腐败、变质,在造成经济损失的同时,还会产生腹泻型与呕吐型等毒素,引起食源性疾病的爆发。因此,芽孢检测是食品及医疗器械等领域灭菌效果测试的主要项目之一。

[0003] 然而,芽孢具有高度的折光性,外膜致密,渗透性低,着色和脱色均较为困难,常规染色无法染出。目前,传统的芽孢检测主要有两种:复红美兰染色液或者是孔雀绿番红O染色液,这两种方法都有一定的局限性,复红美兰染色液操作复杂,在染色时要将涂片放置在酒精灯时加热,保持染色液冒蒸汽且不沸腾,并维持4~5分钟,此后还需要用酒精脱色、水洗、复染、水洗等多个步骤,对检测人员要求较高。而孔雀绿番红O染色液操作较复红美兰染色液简单,但也需要涂片加热染色,水洗,复染,水洗四个步骤,且关键染料孔雀绿的半数致死量为80mg/kg(小鼠,经口),对环境毒害作用大。

[0004] 因此,需要一种操作简便、安全环保、准确高效的芽孢检测方法。

### 发明内容

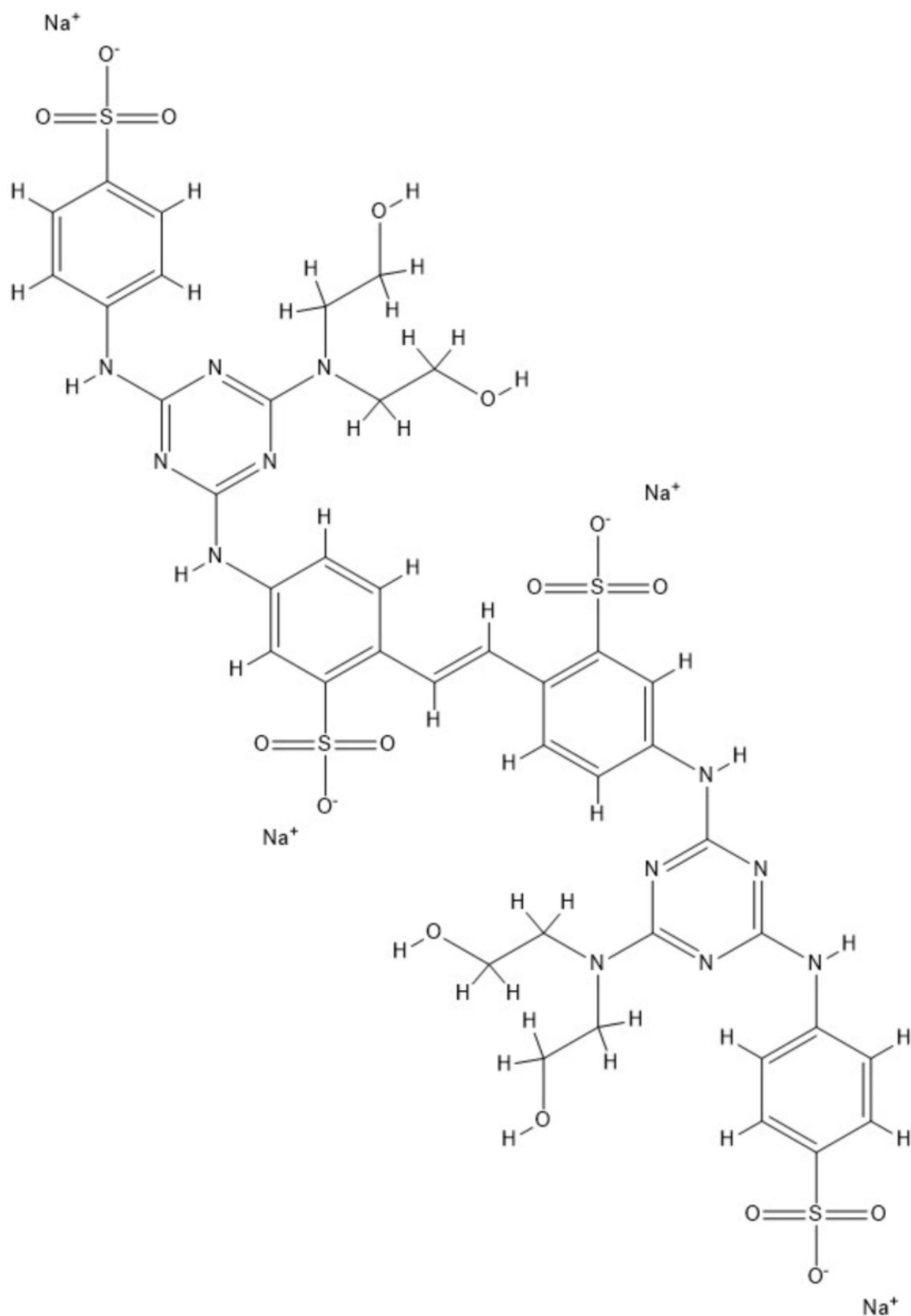
[0005] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的是提供一种芽孢荧光染色液及其应用;相比于现有的染色液,本发明染色液成分简单,只需要一种荧光染料就能实现对芽孢的高

亮荧光染色,成本较低,且关键原材料荧光增白剂220半数致死量为5300 mg/kg(大鼠,经口),毒性低,对环境影响小。

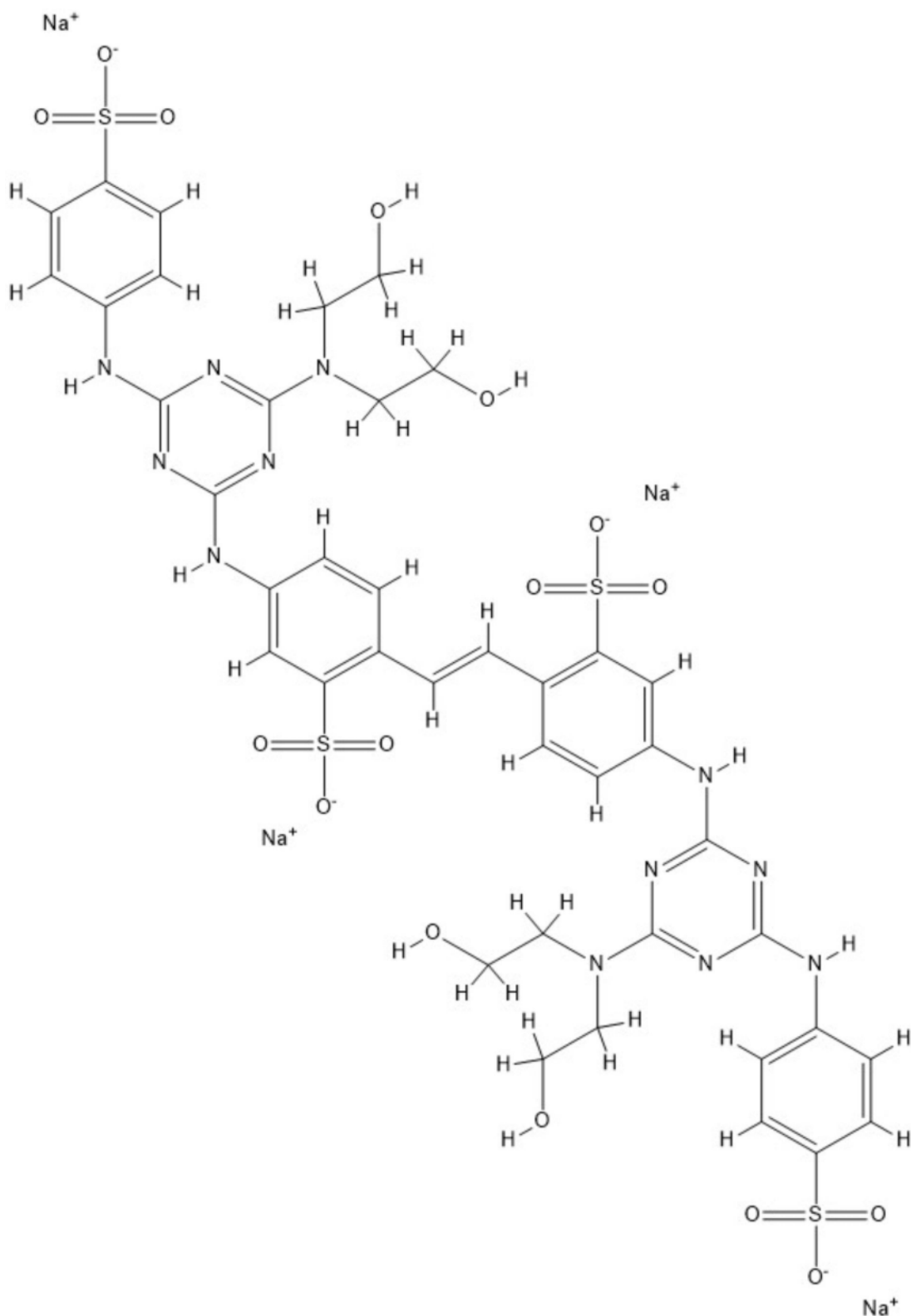
[0006] 本发明芽孢荧光染色方法的优点主要体现在操作简便,只需一步操作即可完成成像,无需复杂的水洗步骤,染色后芽孢发出明亮的蓝色荧光,可以方便快速的判断芽孢的有无。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

本发明提供一种荧光增白剂220在检测芽孢中的应用,所述荧光增白剂220的结构式如下:



[0008] 本发明提供一种芽孢荧光染色液,包括荧光增白剂220,荧光增白剂220的结构式如下:



[0009] 本发明的芽孢荧光染色液采用了荧光增白剂220,它具有荧光特性,可发射出蓝光,具有光稳定性好的优点。它能与芽孢结合发出明亮的蓝色荧光,能观察到待测细菌中是否存在芽孢,提高芽孢检出率。

[0010] 优选地,所述芽孢荧光染色液还包括缓冲溶液或水。

[0011] 进一步优选地,所述芽孢荧光染色液中荧光增白剂220的浓度为10~100 $\mu\text{M}$ 。



- [0012] 更优选地,所述芽孢荧光染色液中荧光增白剂220的浓度为20~40 $\mu$ M。
- [0013] 进一步优选地,所述缓冲溶液为磷酸盐缓冲溶液,pH为7.2~7.4。
- [0014] 更优选地,所述磷酸盐为无水磷酸二氢钠和十二水合磷酸氢二钠,无水磷酸二氢钠的质量浓度为0.1~50g/L,十二水合磷酸氢二钠的质量浓度为0.1~200g/L。
- [0015] 本发明提供一种上述的芽孢荧光染色液在检测芽孢中的应用。
- [0016] 本发明提供一种检测芽孢的方法,包括以下步骤:
- (1) 将待检样本涂抹在载玻片上,形成涂片;
  - (2) 滴加上述的芽孢荧光染色液,加热染色2~10 min;
  - (3) 盖上盖玻片,吸去多余染色液;
  - (4) 荧光显微镜下进行镜检。
- [0017] 优选地,加热染色的温度为40~70℃。
- [0018] 进一步优选地,加热染色的温度为40℃。
- [0019] 优选地,加热染色的时间为2~4 min。
- [0020] 优选地,镜检通过观察是否具有明亮的荧光判断待检样本是否含有芽孢。
- [0021] 优选地,荧光显微镜的激发波长为330~380nm。
- [0022] 进一步优选地,荧光显微镜的激发波长为365nm。
- [0023] 优选地,荧光显微镜的发射波长为410nm~490nm。
- [0024] 优选地,荧光显微镜的物镜倍数为40 $\times$ ~100 $\times$ 。
- [0025] 本发明通过含荧光增白剂220的芽孢荧光染色液对待测样本中的芽孢进行特殊染色,实现对芽孢快速的荧光检测;本发明操作流程非常简单,只需要将细菌样本均匀涂抹在盖玻片上,滴加一滴荧光染色液并加热3分钟左右至染液微干,盖上盖玻片就可直接进行结果观察。
- [0026] 相对于现有技术,本发明具有如下的优点及有益效果:
- (1) 本发明的荧光增白剂220可以实现芽孢的特异性明亮染色,而对菌体不染色或低亮度染色,并且荧光背景低,可以实现快速、准确检测待测样本中的芽孢。
- [0027] (2) 本发明的芽孢荧光染色液组分简单,成本低,能准确检测待测样本中的芽孢,且关键原料较孔雀绿毒性低,对环境影响小。
- [0028] (3) 本发明的检测方法操作简便,测定快速,一步操作就能完成;比复红美兰染色法和孔雀绿番红O法的操作更为方便快捷。

## 附图说明

- [0029] 图1为实施例1中,采用不同浓度芽孢荧光染色液对可以产生芽孢的枯草芽孢杆菌染色效果图。
- [0030] 图2为实施例2中,采用芽孢荧光染色液孵育不同时间后,对可以产生芽孢的枯草芽孢杆菌染色效果图。
- [0031] 图3为实施例3中,采用芽孢荧光染色液对不同时间段的可以产生芽孢的枯草芽孢杆菌染色效果图。
- [0032] 图4为实施例4中,采用芽孢染色液对不产生芽孢的金黄色葡萄球菌和沙门氏菌的染色效果图。

[0033] 图5为实施例5中,采用芽孢荧光染色液、孔雀绿番红O染色液和番红O染色液的染色效果对比图。

### 具体实施方式

[0034] 以下结合附图和实施例对本发明的具体实施作进一步说明,但本发明的实施和保护不限于此。需指出的是,以下若有未特别详细说明之过程,均是本领域技术人员可参照现有技术实现或理解的。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,视为可以通过市售购买得到的常规产品。

[0035] 实施例1:

一种芽孢荧光染色液及其染色方法。

[0036] (1) 将荧光增白剂220溶解在纯化水中,得到浓度为20 $\mu$ M和40 $\mu$ M的芽孢荧光染色液。

[0037] (2) 选取培养一天的枯草芽孢杆菌,挑取单菌落于少量水中溶解。取10 $\mu$ L涂抹在载玻片上,制作适当厚度的细菌涂片,取上述芽孢荧光染色液200 $\mu$ L分别直接滴加到样本上,于加热台40 $^{\circ}$ C加热3min至染液微干,盖上盖玻片,使用吸水纸吸去多余染色液。选择激发光波长为365nm激发,发射波长为410nm~490nm,置于荧光显微镜物镜下(40 $\times$ ),进行直接镜检。染色效果如图1所示。

[0038] 实施例2:

一种芽孢荧光染色液及其染色方法。

[0039] (1) 将荧光增白剂220溶解在纯化水中,得到浓度为20 $\mu$ M的芽孢荧光染色液。

[0040] (2) 选取培养一天的枯草芽孢杆菌,挑取单菌落于少量水中溶解。取10 $\mu$ L涂抹在载玻片上,制作适当厚度的细菌涂片,取上述芽孢荧光染色液200 $\mu$ L直接滴加到样本上,于加热台40 $^{\circ}$ C分别加热30秒、1分钟、2分钟、3分钟、5分钟、10分钟至染液微干,盖上盖玻片,使用吸水纸吸去多余染色液。选择激发光波长为365nm激发,发射波长为410nm~490nm,置于荧光显微镜物镜下(40 $\times$ ),进行直接镜检。染色效果如图2所示。

[0041] 实施例3:

一种芽孢荧光染色液及其染色方法。

[0042] (1) 将荧光增白剂220溶解在纯化水中,得到浓度为20 $\mu$ M的芽孢荧光染色液。

[0043] (2) 选取培养一天、两天、三天的枯草芽孢杆菌,分别挑取单菌落于少量水中溶解。取10 $\mu$ L涂抹在不同的载玻片上,制作适当厚度的细菌涂片,取上述芽孢荧光染色液200 $\mu$ L分别滴加到样本上,于加热台40 $^{\circ}$ C加热3min至染液微干,盖上盖玻片,使用吸水纸吸去多余染色液。选择激发光波长为365nm激发,发射波长为410nm~490nm,置于荧光显微镜物镜下(40 $\times$ ),进行直接镜检。染色效果如图3所示。

[0044] 实施例4:

一种芽孢荧光染色液及其染色方法。

[0045] (1) 将荧光增白剂220溶解在纯化水中,得到浓度为20 $\mu$ M的芽孢荧光染色液。

[0046] (2) 选取培养一天的金黄色葡萄球菌以及沙门氏菌,分别挑取单菌落于少量水中溶解,取10 $\mu$ L涂抹在不同的载玻片上,制作适当厚度的细菌涂片,取上述芽孢荧光染色液200 $\mu$ L分别滴加到样本上,于加热台40 $^{\circ}$ C加热3min至染液微干,盖上盖玻片,使用吸水纸吸

去多余染色液。选择激发光波长为365nm激发,发射波长为410nm~490nm,置于荧光显微镜物镜下(40×),进行直接镜检。染色效果如图4所示。

[0047] 实施例5:

一种芽孢荧光染色液及其染色方法。

[0048] (1) 将荧光增白剂220溶解在纯化水中,得到浓度为20μM的芽孢荧光染色液。

[0049] (2) 选取培养一天的枯草芽孢杆菌,挑取单菌落于少量水中溶解,取10μL涂抹在不同的载玻片上,制作适当厚度的细菌涂片,用芽孢荧光染色液和孔雀绿番红O染色液以及番红O染色液进行染色,对不同染色法检测步骤、时间及效果进行对比,染色效果如图5,检测步骤和时间对比如表1所示。

[0050] 对于芽孢荧光染色,取上述芽孢荧光染色液200μL滴加到样本上,于加热台40℃加热3min至染液微干,盖上盖玻片,使用吸水纸吸去多余染色液。选择激发光波长为365nm激发,发射波长为410nm~490nm,置于生物(荧光)显微镜物镜下(40×),进行直接镜检。

[0051] 对于孔雀绿番红O染色,取孔雀绿染色液200μL滴加到样本上,于加热台40℃加热10min,水洗样本至无染色液脱出约1min,随后滴加番红O染色液200μL于室温染色样本3min,再次水洗至无染色液脱出约1min,盖上盖玻片,使用吸水纸吸去多余水。置于生物(荧光)显微镜物镜下,用明场进行直接镜检。

[0052] 对于番红O染色,滴加番红O染色液200μL于室温染色样本3min,水洗至无染色液脱出约1min,盖上盖玻片,使用吸水纸吸去多余水。置于生物(荧光)显微镜物镜下,置于生物(荧光)显微镜物镜下,用明场进行直接镜检。

[0053] 表1 染色步骤和时间对比

染色方法	步骤	时间
芽孢荧光染色	1、涂片 2、滴染色液,在加热台上40℃染色3min 3、观察	3min
孔雀绿番红O染色	1、涂片 2、滴加孔雀绿染色液于加热台上40℃染色10min 3、水洗至无染色液脱出约1min 4、滴加番红O染色液室温染色3min 5、水洗至无染色液脱出约1min 6、观察	15min
番红O染色	1、涂片 2、滴加番红O染色液室温染色3min 3、水洗至无染色液脱出约1min 4、观察	4min

[0054] 结果分析：

(1) 从图1中可以看出,不同浓度的芽孢染色液均可以将芽孢染成明亮蓝色荧光,细菌菌体(非芽孢)被染成浅蓝色(左图为20 $\mu$ M,右图为40 $\mu$ M)。

[0055] (2) 从图2中可以看出,当染色液孵育不同时间后,孵育2分钟以后的芽孢均可被染成明亮蓝色荧光。

[0056] (3) 从图3中可以看出,培养不同时间的芽孢均被染成明亮蓝色荧光。

[0057] (4) 从图4中可以看出,不产生芽孢的革兰氏阳性的金黄色葡萄球菌及革兰氏阴性的沙门氏菌均不会被芽孢荧光染色液染出荧光。

[0058] (5) 从图5中能看出,芽孢荧光染色液和孔雀绿番红0染色液均可染出芽孢,而不使用毒性较高的孔雀绿时,番红0只能染出菌体,芽孢不着色,不易于观察。但从表1可看出,孔雀绿番红0染色液较芽孢荧光染色液步骤复杂,所需时间长。

[0059] 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。

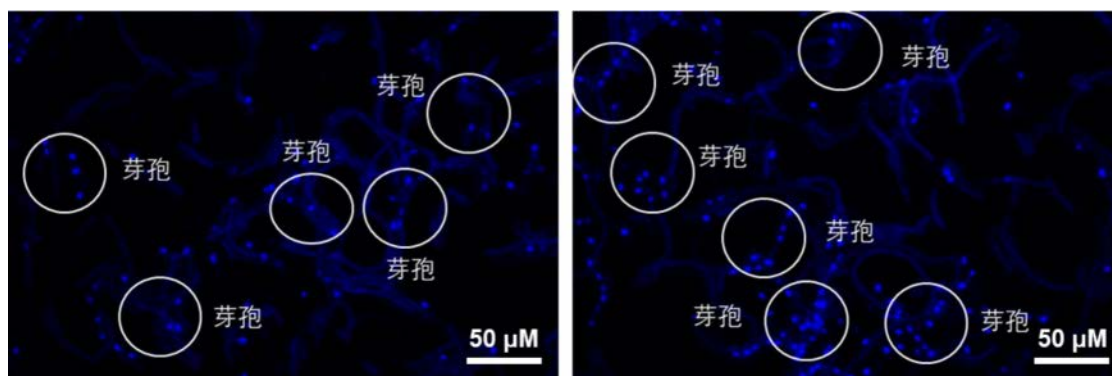


图1

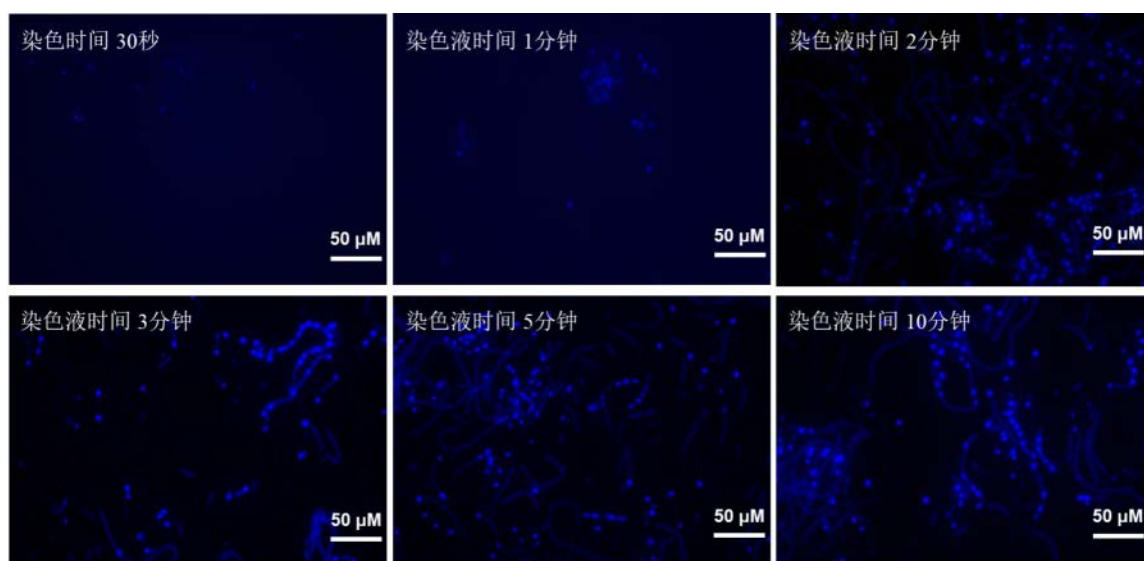


图2

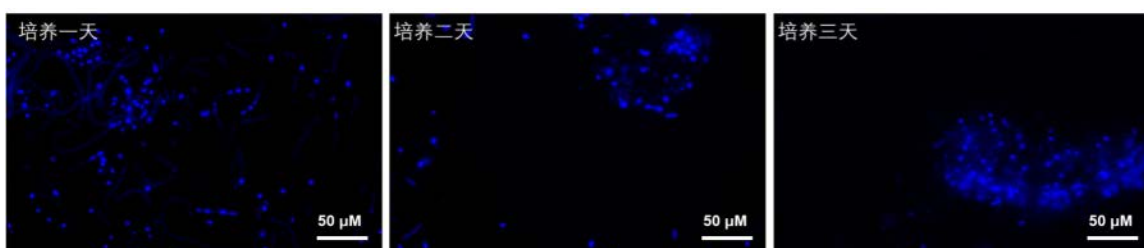


图3

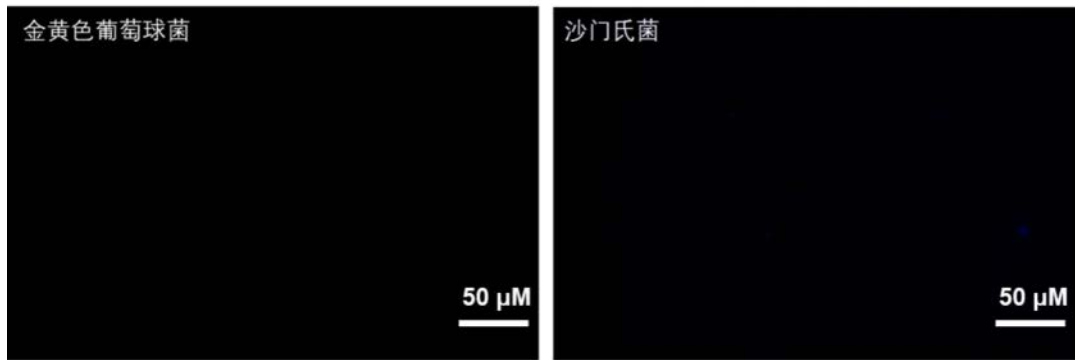


图4



图5