



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119286801 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 10

(21) 申请号 202411820435.0

G01N 21/64 (2006.01)

(22) 申请日 2024.12.11

C12R 1/92 (2006.01)

(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 高源 何柳 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.

C12N 7/00 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

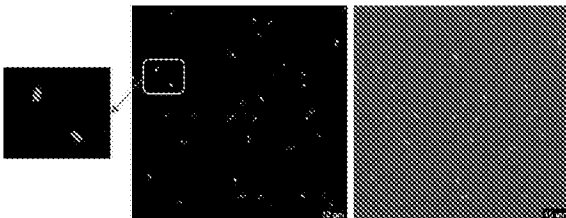
权利要求书1页 说明书8页 附图8页

(54) 发明名称

一种AIE分子标记的噬菌体及其制备方法与应用

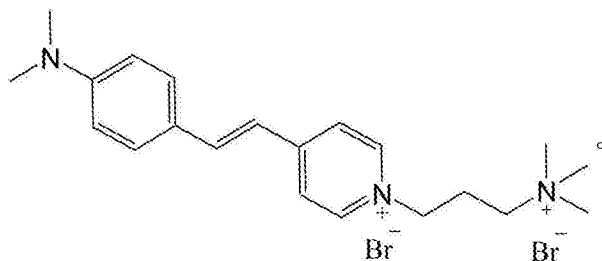
(57) 摘要

本发明公开一种AIE分子标记的噬菌体及其制备方法与应用;本发明的AIE分子标记的噬菌体包括MASPB和噬菌体,MASPB与噬菌体内部的遗传物质结合。本发明的MASPB可以进入噬菌体内部对噬菌体的遗传物质进行标记,形成AIE分子标记的噬菌体,从而对目标细菌进行快速准确地检测。



1. 一种AIE分子标记的噬菌体,其特征在于,包括MASPB和噬菌体,MASPB与噬菌体内部的遗传物质结合;

所述MASPB为带正电荷的AIE分子,所述MASPB的结构如下:



2. 根据权利要求1所述的AIE分子标记的噬菌体,其特征在于,所述噬菌体选自沙门氏菌噬菌体、大肠杆菌噬菌体、铜绿假单胞菌噬菌体、巴氏杆菌噬菌体、肺炎克雷伯菌噬菌体、霍乱弧菌噬菌体、痢疾杆菌噬菌体、鲍曼不动杆菌噬菌体、变形杆菌噬菌体、阴沟肠杆菌噬菌体、志贺氏菌噬菌体、葡萄球菌属噬菌体、链球菌噬菌体、产气荚膜梭菌噬菌体、分枝杆菌噬菌体、粪肠球菌噬菌体中的一种以上。

3. 权利要求1-2任一项所述的AIE分子标记的噬菌体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将MASPB和噬菌体混合避光孵育,MASPB进入噬菌体内部与其遗传物质结合,纯化,得到AIE分子标记的噬菌体。

4. 一种细菌检测试剂,其特征在于,包括权利要求1-2任一项所述的AIE分子标记的噬菌体。

5. 根据权利要求4所述的细菌检测试剂,其特征在于,所述细菌检测试剂中AIE分子标记的噬菌体效价为 $\geq 5 \times 10^{10}$  PFU/mL。

6. 权利要求4-5任一项所述的细菌检测试剂的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

取MASPB溶解于水中配制得到MASPB母液,取MASPB母液加入噬菌体液中避光孵育,孵育结束后,加入BSA以结合剩余未标记的MASPB,制得细菌检测试剂。

7. 根据权利要求6所述的细菌检测试剂的制备方法,其特征在于,所述MASPB母液中MASPB的浓度为10-20mM;所述噬菌体液的噬菌体效价为 $\geq 10^{11}$  PFU/mL;

所述MASPB母液和噬菌体液的用量比为3-5 $\mu$ L:1mL。

8. 权利要求1-2任一项所述的AIE分子标记的噬菌体或权利要求4-5任一项所述的细菌检测试剂在检测细菌中的应用。

9. 一种检测细菌的方法,其特征在于,包括以下步骤:

将权利要求1-2任一项所述的AIE分子标记的噬菌体或权利要求4-5任一项所述的细菌检测试剂与待测菌液混合,孵育,制片,共聚焦显微镜下观察荧光。

10. 根据权利要求9所述的检测细菌的方法,其特征在于,所述孵育的时间为20-30min;所述共聚焦显微镜的激发波长470-490nm,发射波长550-750nm。

## 一种AIE分子标记的噬菌体及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,尤其涉及一种AIE分子标记的噬菌体及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 细菌检测能够快速、准确地识别致病菌,从而为临床医生提供关键的信息,以选择合适治疗方式,减少不必要的用药和抗生素耐药性的产生。

[0003] 现有的检测技术在不同方面提供了有效的解决方案,但仍然存在一些不足之处:传统培养法时间较长,PCR(聚合酶链式反应)和实时PCR技术需要昂贵的设备和复杂的操作,而ELISA(酶联免疫吸附反应)在灵敏度和特异性上有所欠缺。

[0004] 荧光成像技术是一种广泛应用于生物医学、材料科学和化学领域的成像方法。其基本原理是利用荧光分子在受到激发光照射后发出荧光来进行成像,可以提供高灵敏度、高分辨率的图像,在复杂的生物样品中精确定位和定量分析目标分子。

[0005] AIE(聚集诱导发光)分子相较于传统荧光分子具有显著的优势,其核心在于聚集态下的显著发光增强。传统荧光分子在高浓度或固体状态下常因光淬灭效应而发光强度降低,而AIE分子在这些条件下却能显著提高荧光量子产率,表现出优异的亮度和稳定性。此外,AIE分子对光照和化学环境的稳定性较高,使其在生物成像、传感器和光电子器件等应用中表现出优越的性能。这种特性使得AIE分子在实际应用中具有更广泛的适用性和可靠性。

[0006] 噬菌体能够精准识别和靶向特定细菌,相较于传统方法,噬菌体检测通常具有较低的背景干扰和成本,同时环境友好,无需使用有害化学试剂。这些优点使得噬菌体在细菌检测领域具有广泛的应用前景。目前主要通过化学偶联法对噬菌体的蛋白质外壳进行荧光标记,该方法操作复杂,需要对荧光分子进行修饰,并且荧光强度低。

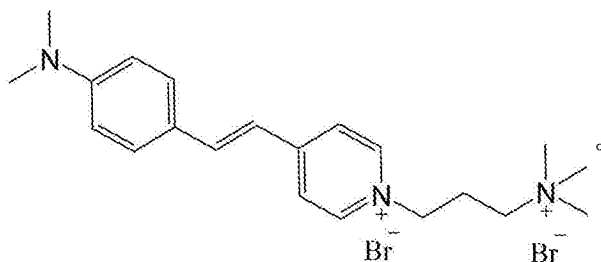
### 发明内容

针对现有技术存在的不足,本发明的目的是提供一种AIE分子标记的噬菌体及其制备方法与应用;本发明的AIE分子可以进入噬菌体内部对噬菌体的遗传物质进行标记,形成AIE分子标记的噬菌体,从而对目标细菌进行快速准确地检测。

[0007] 本发明的目的通过如下技术方案实现。

[0008] 一种AIE分子标记的噬菌体,包括MASPB和噬菌体,MASPB与噬菌体内部的遗传物质结合;

所述MASPB的结构如下:



[0009] 本发明的MASPB为带正电荷的AIE分子,可以进入噬菌体内部与其遗传物质结合并保存在噬菌体内部保持活性;

本发明的MASPB水溶性良好,可以与噬菌体液充分混合,标记的噬菌体染色后背景较低;

本发明的MASPB标记后的噬菌体在与目标细菌结合后,结合MASPB的遗传物质通过噬菌体的作用进入细菌内部,大量MASPB聚集在细菌内聚集后发出强烈荧光,可在共聚焦显微镜观察到,细菌形状清晰。

[0010] 噬菌体可以与特定的细菌结合并注入遗传物质;具有特异性识别功能。

[0011] 优选的,所述噬菌体选自沙门氏菌噬菌体、大肠杆菌噬菌体、铜绿假单胞菌噬菌体、巴氏杆菌噬菌体、肺炎克雷伯菌噬菌体、霍乱弧菌噬菌体、痢疾杆菌噬菌体、鲍曼不动杆菌噬菌体、变形杆菌噬菌体、阴沟肠杆菌噬菌体、志贺氏菌噬菌体、葡萄球菌属噬菌体、链球菌噬菌体、产气荚膜梭菌噬菌体、分枝杆菌噬菌体、粪肠球菌噬菌体。

[0012] 上述的AIE分子标记的噬菌体的制备方法,包括以下步骤:

将MASPB和噬菌体混合避光孵育,MASPB进入噬菌体内部与其遗传物质结合,纯化,得到AIE分子标记的噬菌体。

[0013] 优选的,孵育的溶剂为SM缓冲液;所述MASPB的浓度为30-50 $\mu$ M;所述噬菌体的效价为 $\geq 10^{11}$ PFU/mL。

[0014] 进一步优选的,所述噬菌体的效价为 $\geq 10^{12}$ PFU/mL。

[0015] 优选的,所述孵育在室温(20-30 $^{\circ}$ C)下进行。

[0016] 优选的,所述孵育的时间为 $\geq 3$ h。

[0017] 优选的,所述纯化为加入蛋白质以结合剩余未标记的游离MASPB。

[0018] 进一步优选的,所述蛋白质为BSA(牛血清白蛋白);所述蛋白质的加入量为终浓度为10-20wt%。

[0019] 一种细菌检测试剂,包括上述的AIE分子标记的噬菌体。

[0020] 优选的,所述细菌检测试剂中AIE分子标记的噬菌体效价为 $\geq 5 \times 10^{10}$ PFU/mL。

[0021] 进一步优选的,所述细菌检测试剂中AIE分子标记的噬菌体效价为 $\geq 5 \times 10^{11}$ PFU/mL。

[0022] 优选的,所述细菌检测试剂还包括溶剂。

[0023] 进一步优选的,所述溶剂为水或SM缓冲液。

[0024] 上述的细菌检测试剂的制备方法,包括以下步骤:

取MASPB溶解于水中配制得到MASPB母液,取MASPB母液加入噬菌体液中避光孵育,孵育结束后,加入BSA以结合剩余未标记的MASPB,制得细菌检测试剂。

[0025] 优选的,所述MASPB母液中MASPB的浓度为10-20mM;所述噬菌体液的噬菌体效价为

$\geq 10^{11}$  PFU/mL。

[0026] 进一步优选的,所述噬菌体液的噬菌体效价为 $\geq 10^{12}$  PFU/mL。

[0027] 优选的,所述MASPB母液和噬菌体液的用量比为3-5 $\mu$ L:1mL。

[0028] 优选的,所述孵育在室温(20-30℃)下进行。

[0029] 优选的,所述孵育的时间为 $\geq 3$ h。

[0030] 上述的AIE分子标记的噬菌体或上述的细菌检测试剂在检测细菌中的应用。

[0031] 一种检测细菌的方法,包括以下步骤:

将上述的AIE分子标记的噬菌体或上述的细菌检测试剂与待测菌液混合,孵育,制片,共聚焦显微镜下观察荧光。

[0032] 孵育后待测溶液中可以与噬菌体结合的目标细菌可以观察到明亮荧光,非目标细菌无荧光。

[0033] 优选的,所述孵育的时间为20-30min;

优选的,所述孵育在避光下进行;

优选的,所述共聚焦显微镜的激发波长470-490nm,发射波长550-750nm。

[0034] 进一步优选的,所述共聚焦显微镜的激发波长488nm,发射波长600-700nm。

[0035] 优选的,混合后AIE分子标记的噬菌体的浓度为 $\geq 2.5 \times 10^{10}$  PFU/mL。

[0036] 进一步优选的,混合后AIE分子标记的噬菌体的浓度为 $\geq 2.5 \times 10^{11}$  PFU/mL。

[0037] 优选的,混合后细菌的浓度为 $10^7$ - $10^8$  CFU/mL。

[0038] 优选的,取孵育后的液体滴加于载玻片上,盖上盖玻片制片。

[0039] 本发明的作用原理:MASPB对光照和化学环境的稳定性较高,使其在生物成像、传感器和光电子器件等应用中表现出优越的性能,噬菌体可以特异性识别并快速结合到宿主菌,对其他菌株不识别。MASPB标记噬菌体的遗传物质,随着噬菌体特异性结合到沙门氏菌等宿主菌,将其遗传物质注射到细菌内部,MASPB也进入细菌内部,随着MASPB在细菌内部越聚越多,则显示荧光增强,可以被观测。

[0040] 本发明的有益效果如下:

检测速度快:对于样本中的细菌检测,传统的培养法需对样本进行单菌纯化后,再通过生化鉴定的方式确定检测结果,此过程需要5d左右;PCR法同样需要进行单菌纯化后,再通过PCR及凝胶电泳的方式进行结果判定,此过程需要2d左右。本发明AIE标记的噬菌体,仅需要和样本混合,20min即可对结果进行判定(图1)。

[0041] 操作简单:传统培养法及PCR法需要专业人员在严格的无菌操作环境中进行操作,且操作复杂,需要平板划线、挑取单菌落培养、复杂的PCR加样等。偶联法标记噬菌体的纯化方式复杂。本方法无需严格的无菌操作环境,仅需简单的混合操作,即可完成检测过程。

[0042] 准确度高:传统培养法及PCR法由于操作复杂及方法学原因,可能造成假阳/假阴结果。本方法利用噬菌体的高度特异性,只会识别样本中的目的细菌,保证了检测的高度准确性。另外,偶联法标记噬菌体由于荧光分子被固定,只能在细菌表面通过噬菌体聚集,聚集程度难以进一步提高,荧光强度较低,本申请MASPB与遗传物质结合,未被固定,进入细菌内部后,可以进一步聚集,在细菌内部形成明亮的荧光,荧光强度更高,具有更高的识别度和准确性。

[0043] 样本要求低:因为噬菌体具有特异性识别功能,所以无论是单一菌液样本、混合菌

液样本还是复杂成分的真实样本,都可以进行准确的识别。

[0044] 保存时间长:AIE分子进入噬菌体内部,噬菌体对外界环境具有较强抵抗力,故标记后的噬菌体可以进行长时间保存。

### 附图说明

[0045] 图1是本发明与传统培养法、PCR法检测细菌的流程图。

[0046] 图2是实施例1沙门氏菌检测液检测沙门氏菌孵育20min的染色镜检图。

[0047] 图3是实施例2沙门氏菌检测液检测沙门氏菌孵育不同时间的染色镜检图。

[0048] 图4是实施例3沙门氏菌检测液分别检测不同细菌的染色镜检图。

[0049] 图5是实施例4沙门氏菌检测液检测沙门氏菌和金黄色葡萄球菌混合菌液的染色镜检图。

[0050] 图6是实施例5沙门氏菌检测液检测模拟粪便中沙门氏菌的染色镜检图。

[0051] 图7是实施例6大肠杆菌检测液分别检测不同细菌的染色镜检图。

[0052] 图8是实施例7大肠杆菌检测液检测大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌混合菌液的染色镜检图。

[0053] 图9是实施例8沙门氏菌检测液在4℃保存下,噬菌体效价变化曲线。

[0054] 图10是实施例9确定MASPB标记噬菌体的时间的染色镜检图。

[0055] 图11是对比例1筛选不同AIE分子进行噬菌体标记的染色镜检图。

### 具体实施方式

[0056] 下面结合实施例,对本发明作进一步详细说明,但本发明的实施方式不限于此。

[0057] 实施例中所用的浓缩后的沙门氏菌噬菌体液和浓缩后的大肠杆菌噬菌体液的制备方法如下:

沙门氏菌噬菌体SHBCC D24898、大肠杆菌噬菌体SHBCC D24555购于上海保藏微生物中心。将相应的宿主菌接种于200mL TSB液体培养基中,37℃、180r/min培养至对数生长期后,加入初始噬菌体液,37℃、180r/min培养4-6h后室温(20-30℃)静置过夜,7000r/min、15min离心后取上清,使用0.22μm过滤器过滤,得培养后的噬菌体液。培养后的噬菌体液中加入10%PEG8000、2%NaCl,充分溶解后4℃过夜,次日11000r/min 4℃离心40min,弃上清留沉淀,加入10mL SM缓冲液充分溶解沉淀后,加入10mL氯仿涡旋混匀,再7000r/min、15min离心后取上清(即上层溶液),即得到浓缩后的噬菌体,提高噬菌体效价 $10^{12}$ - $10^{15}$ PFU/mL。

[0058] 实施例中所用的单菌落的制备方法如下:

将甘油保存于-80℃冰箱的菌种室温解冻后,使用接种环于TSA平板上分区划线,倒置于37℃培养箱过夜培养;

挑取平板上的单菌落于培养基中,37℃、180r/min培养至对数生长期,得到菌液;

再使用接种环蘸取培养后处于对数增长期的菌液,于TSA平板上分区划线,倒置于37℃培养箱过夜培养,平板中的单菌落即为后续实验中所使用的单菌落。

[0059] 实施例1:检测液检测沙门氏菌

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的沙门氏菌噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进

行纯化后,制得检测液;

样本制备:挑取沙门氏菌单菌落于培养基中,37℃、180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本(OD600的值为0.6-0.8);

染色:取100μL菌液与100μL 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检。染色效果如图2所示的沙门氏菌检测液检测沙门氏菌孵育20min的染色镜检图(左:局部放大图;中:荧光场;右:叠加场)。

#### [0060] 实施例2:检测时间的确定

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的沙门氏菌噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:挑取沙门氏菌单菌落于培养基中,37℃ 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本(OD600的值为0.6-0.8);

染色:分别取100μL菌液与100μL 检测液混匀,设置孵育时间分别为5min、10min、15min、20min、25min、30min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检,染色效果如图3所示沙门氏菌检测液检测沙门氏菌孵育不同时间的染色镜检图(每个时间点的染色镜检图中,左:荧光场;右:叠加场)。

#### [0061] 实施例3:沙门氏菌特异性检测验证

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的沙门氏菌噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:分别挑取沙门氏菌、大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌单菌落于培养基中,37℃ 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本(OD600的值为0.6-0.8);

染色:每组分别取100μL菌液与100μL 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检,染色效果如图4所示的沙门氏菌检测液分别检测不同细菌的染色镜检图(左:荧光场;右:叠加场)。

#### [0062] 实施例4:检测液检测混合菌液

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的沙门氏菌噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:分别挑取沙门氏菌、金黄色葡萄球菌单菌落于培养基中,37℃ 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本,将两种菌液等体积混合(OD600的值为0.6-0.8);

染色:取100μL混合菌液与100μL 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检,染色效果如图5所示沙门氏菌检测液检测沙门氏菌和金黄色葡萄球菌混合菌液的染色镜检图(左:荧光场;中:叠加场;右:局部放大图)。

**[0063] 实施例5:粪便中沙门氏菌检测**

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:挑取沙门氏菌单菌落于培养基中,37℃ 180r/min培养至对数生长期,得到菌液(OD600的值为0.6-0.8)。将采集的粪便样本分为两组,每组5g,其中一组加入100μL沙门氏菌菌液。两组粪便分别加入5mL PBS,滤纸过滤得待检样本液体;

染色:每组分别取100μL待检液体样本与100μL 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检,染色效果如图6所示沙门氏菌检测液检测模拟粪便中沙门氏菌的染色镜检图(A:阳性组,粪便中加入沙门氏菌; B阴性组,粪便中未加入沙门氏菌)(左:荧光场;中:叠加场;右:局部放大图)。

**[0064] 实施例6:检测液检测大肠杆菌**

大肠杆菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的大肠杆菌噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:分别挑取大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌单菌落于培养基中,37℃ 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本(OD600的值为0.6-0.8);

染色:每组分别取100μL菌液与100μL 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检,染色效果如图7所示大肠杆菌检测液分别检测不同细菌的染色镜检图(左:荧光场;右:叠加场)。

**[0065] 实施例7:大肠杆菌特异性检测验证**

大肠杆菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3μL加入1mL浓缩后的大肠杆菌噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:分别挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌单菌落于培养基中,37℃ 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本,将三种菌液等体积混合(OD600的值为0.6-0.8);

染色:取100μL混合菌液与100μL 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2μL孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100×物镜观察,直接镜检,染色效果如图8所示大肠杆菌检测液检测大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌混



合菌液的染色镜检图(左:荧光场;中:叠加场;右:局部放大图)。

[0066] 实施例8:检测液保存期测定

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3 $\mu$ L加入1mL浓缩后的噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

材料:制备TSA下层固体培养基、TSB上层半固体培养基以及其他常用设备耗材;

菌液制备:挑取沙门氏菌单菌落于培养基中,37 $^{\circ}$ C 180r/min培养至对数生长期,得到菌液(OD600的值为0.6-0.8)。

[0067] 效价测定:使用双层平板法进行噬菌体效价测定。检测液倍比稀释 $10^{10}$ 倍,分别取 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 共五个稀释梯度组,每组取100 $\mu$ L加入7mL离心管中,再加入100 $\mu$ L菌液,颠倒混匀后加入5mL半固体培养基,平铺于已有TSA下层固体培养基的平板中,待凝固后倒置于37 $^{\circ}$ C培养箱中过夜,第二天计数,每组3个平行对照,取平均值。

[0068] 4 $^{\circ}$ C保存的检测液每隔一段时间进行一次效价测定,结果如图9。

[0069] 实施例9:MSAPB标记时间的确定

沙门氏菌检测液的配置:取MASPB固体溶解于超纯水中配制成10mM母液,取3 $\mu$ L加入1mL浓缩后的噬菌体液中,分别室温避光孵育1、3、5、7h进行标记,加入1mL 20wt%BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:挑取沙门氏菌单菌落于培养基中,37 $^{\circ}$ C 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本(OD600的值为0.6-0.8);

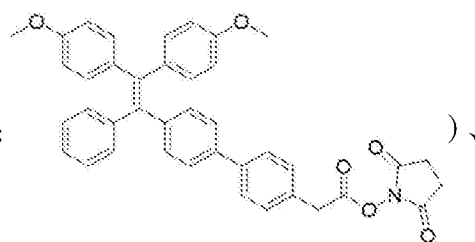
染色:每个时间组分别取100 $\mu$ L菌液与100 $\mu$ L 检测液混匀,孵育时间20min;

制片:取2 $\mu$ L孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

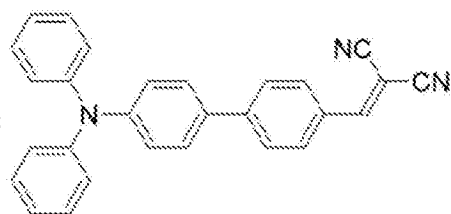
结果观察:在共聚焦显微镜(激发:488nm;发射:600-700nm)下,100 $\times$ 物镜观察,直接镜检,染色效果如图10所示确定MASPB标记噬菌体的时间的染色镜检图(每个标记时间点的染色镜检图中,左:荧光场;右:叠加场)。

[0070] 对比例1:标记分子的筛选

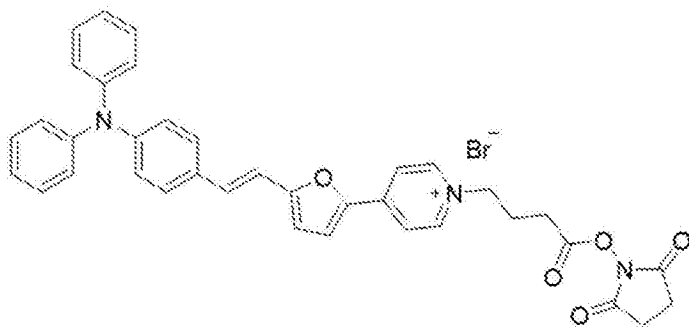
标记分子的选择:选择AIE分子A0174(结构式:



A0178(结构式:



)、A0188(结构式:



)、MASPB,分别溶解于超纯水中配制成

10mM母液,取3 $\mu$ L加入1mL浓缩后的噬菌体液中,室温避光孵育3h进行标记,加入1mL 20wt% BSA溶液进行纯化后,制得检测液;

样本制备:分别挑取沙门氏菌、金黄色葡萄球菌单菌落于培养基中,37 $^{\circ}$ C 180r/min培养至对数生长期,得到菌液样本,将两种菌液等体积混合(OD600的值为0.6-0.8);

染色:取100 $\mu$ L菌液与100 $\mu$ L 检测液混匀,于室温暗处孵育20min;

制片:取2 $\mu$ L孵育后溶液滴加于载玻片上,放置盖玻片制片;

结果观察:在共聚焦显微镜下(激发:488nm;发射:600-700nm),100 $\times$ 物镜观察,直接镜检,染色效果如图11所示对比例1筛选不同AIE分子进行噬菌体标记的染色镜检图(左:荧光场;中:叠加场;右:局部放大图)。

#### [0071] 结果分析

(1)从图1中可以看出,本发明AIE分子标记的噬菌体用于检测细菌的步骤更少、操作更加简单且检测所需时间更短,有利于结果的快速输出;

(2)从图2、3中可以看出,本发明AIE分子标记的沙门氏菌噬菌体在20min即可准确地识别出沙门氏菌并对其进行染色,镜检观察呈短杆状的明亮的荧光,形态结构清晰,易于观察粪便;

(3)从图4、5中可以看出,对于不同菌液样本或者是混合菌液样本,AIE分子标记的沙门氏菌噬菌体均能在20min内准确识别出沙门氏菌并对其进行染色,样本中的沙门氏菌呈短杆状的明亮的荧光,而大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌均无荧光,说明本发明具有很强的特异性,可以对沙门氏菌作出准确的荧光标记,准确度高;

(4)从图6中可以看出,面对模拟的真实粪便样本此类复杂环境,AIE分子标记的沙门氏菌噬菌体仍可以准确识别出样本中的沙门氏菌,呈短杆状的明亮的荧光,而其他细菌及杂质均无荧光,说明本发明在复杂样本中仍具有很好的检测性能;

(5)从图7、8中可以看出,使用该分子对大肠杆菌噬菌体进行标记后,可以对大肠杆菌进行特异性检测,说明该方法在标记噬菌体进行细菌检测方面应用范围较广;

(6)从图9中可以看出,AIE分子标记的沙门氏菌噬菌体在4 $^{\circ}$ C冰箱保存6个月后,噬菌体效价仍保持在较高水平,可以进行长时间保存;

(7)从图10中可以看出,经过标记时间筛选,MASPB标记噬菌体 $\geq 3$ h即可获得很好的标记效果;

(8)从图11中可以看出,经过多种AIE分子筛选,MASPB标记噬菌体后检测效果最好,最终选定该分子为标记分子。

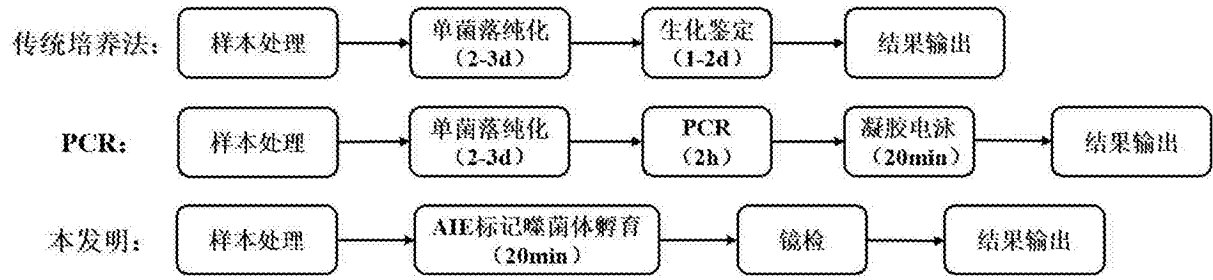


图1

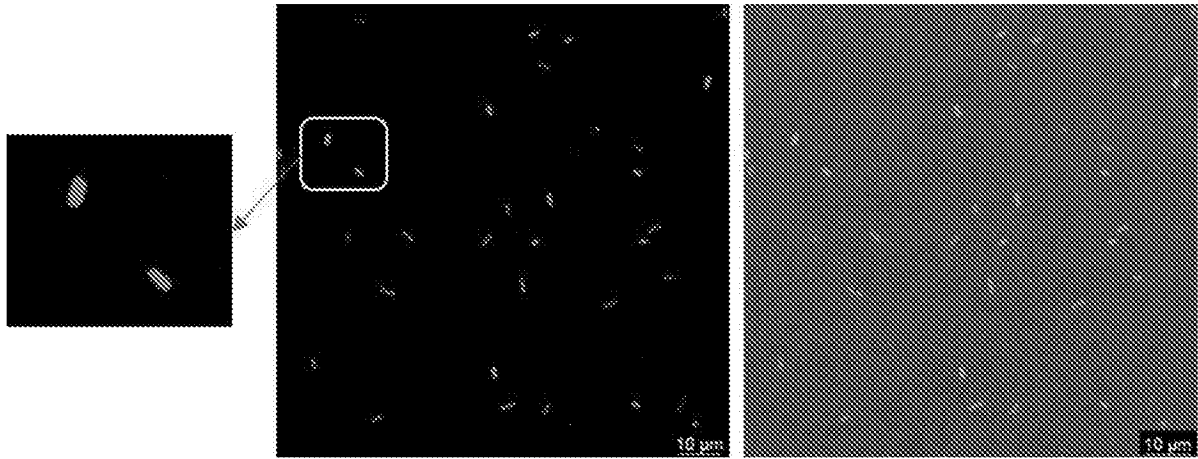


图2

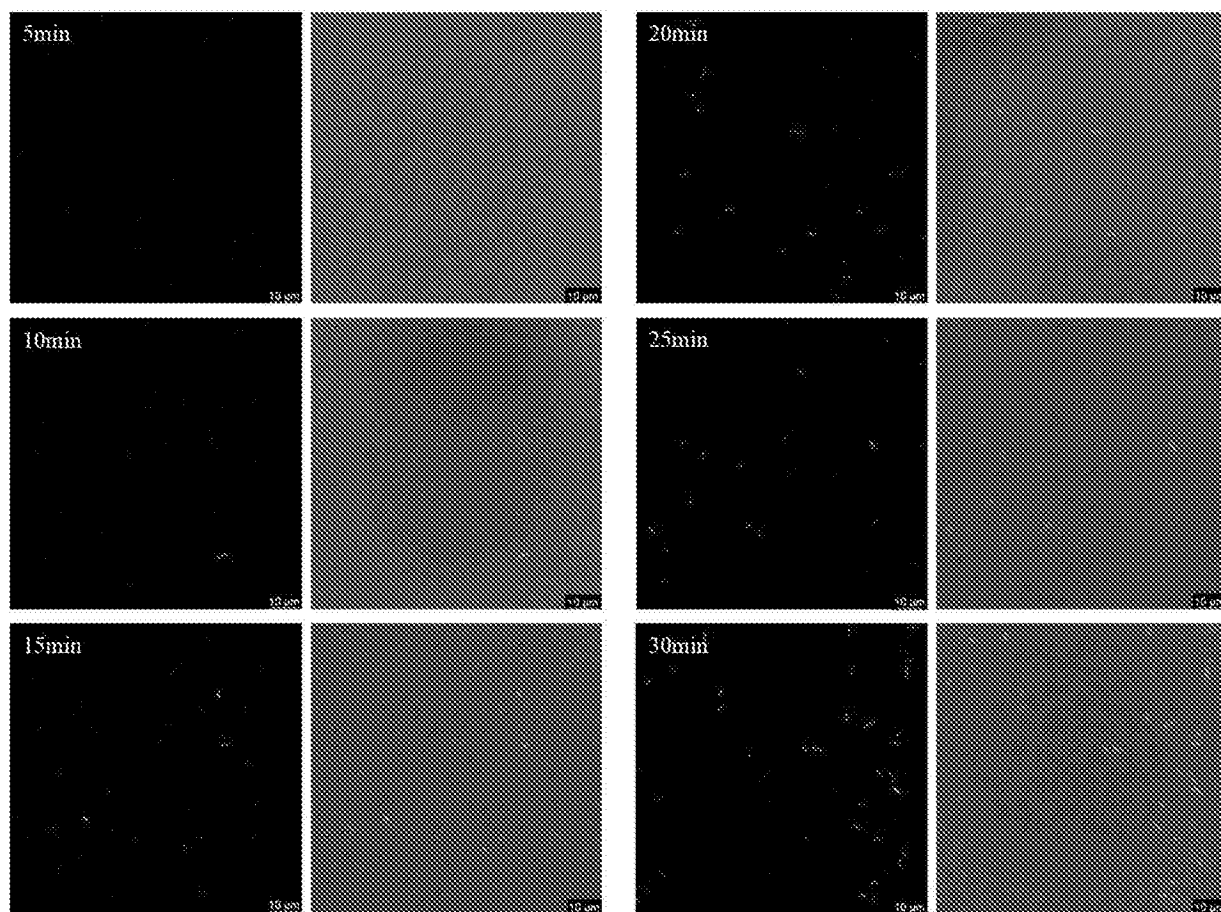


图3

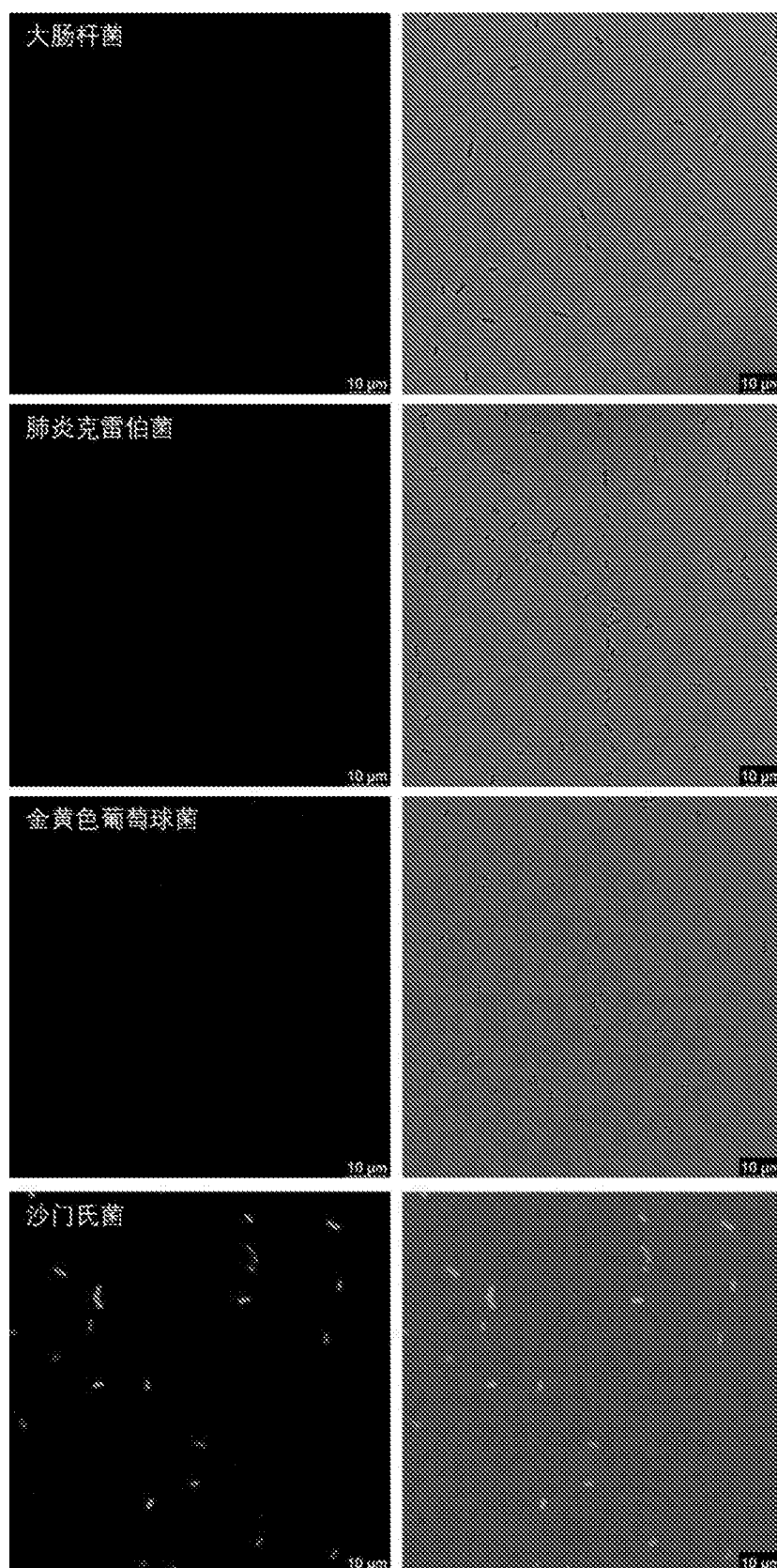


图4

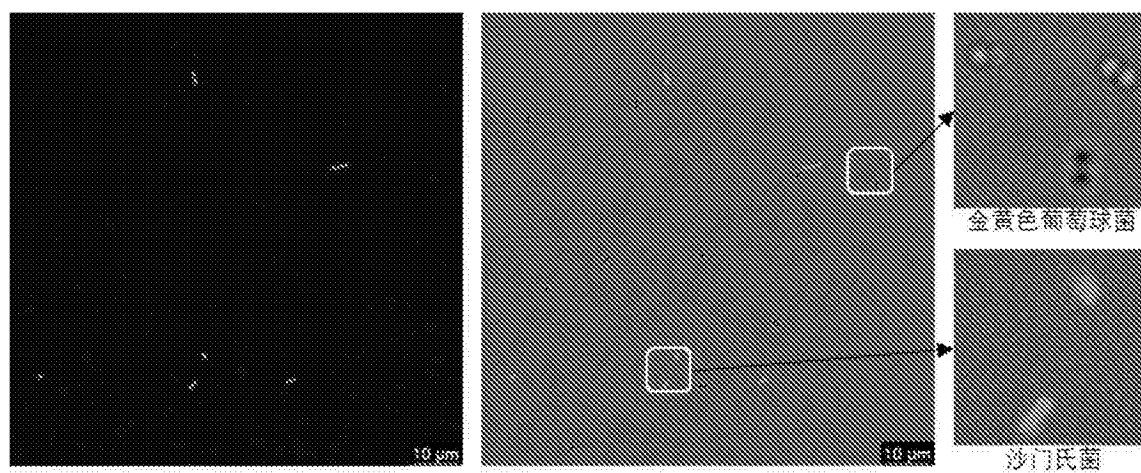


图5

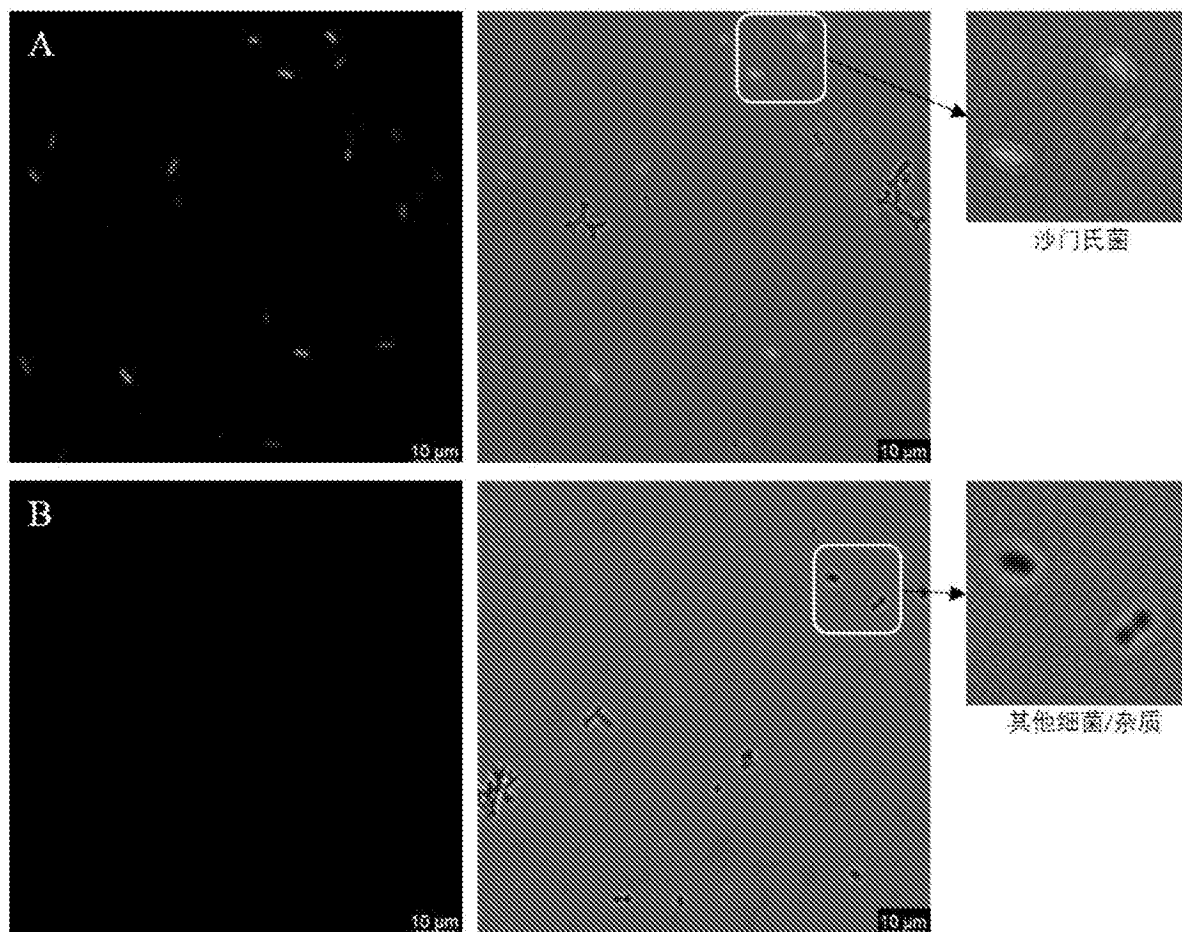


图6

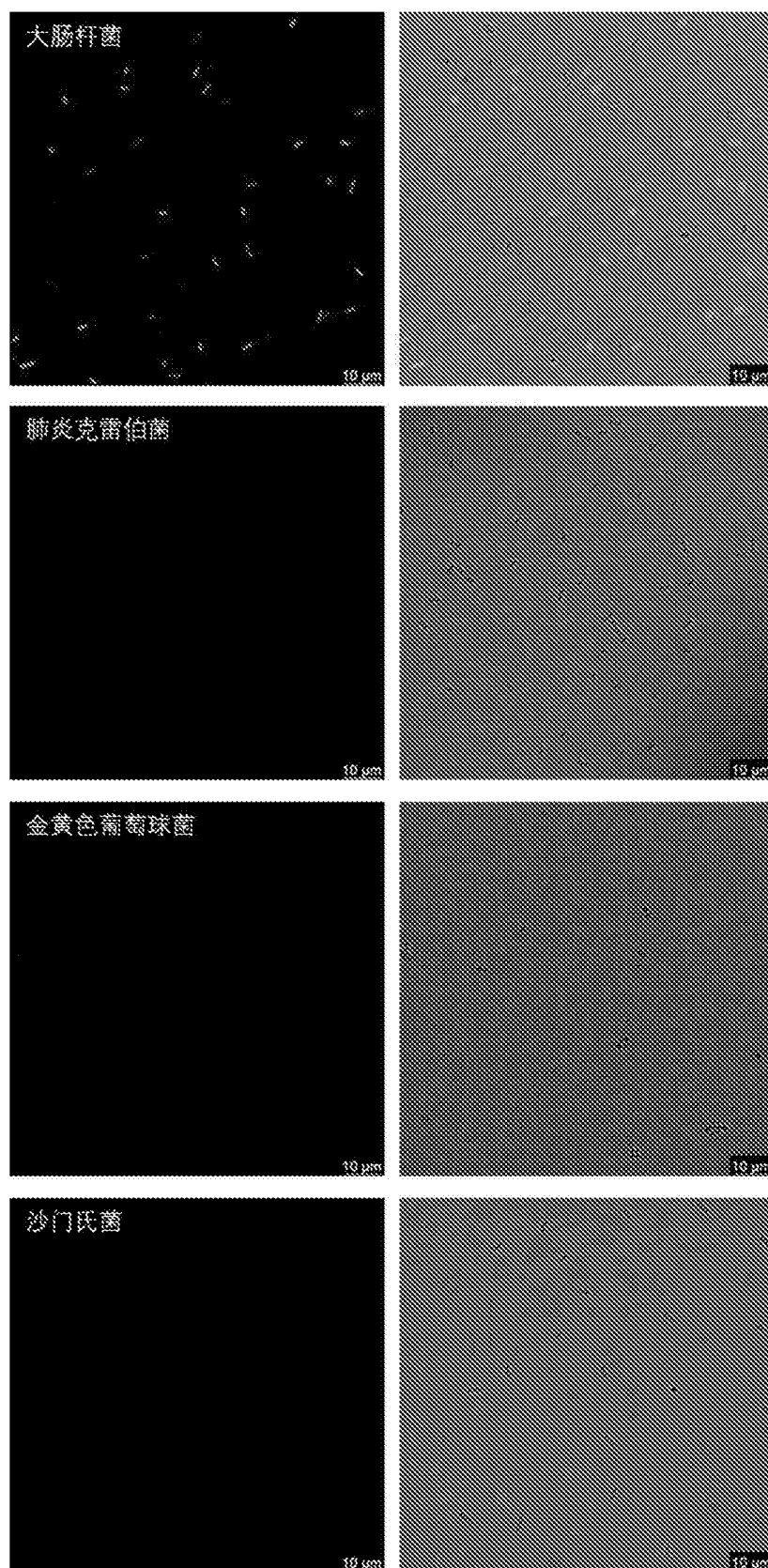


图7

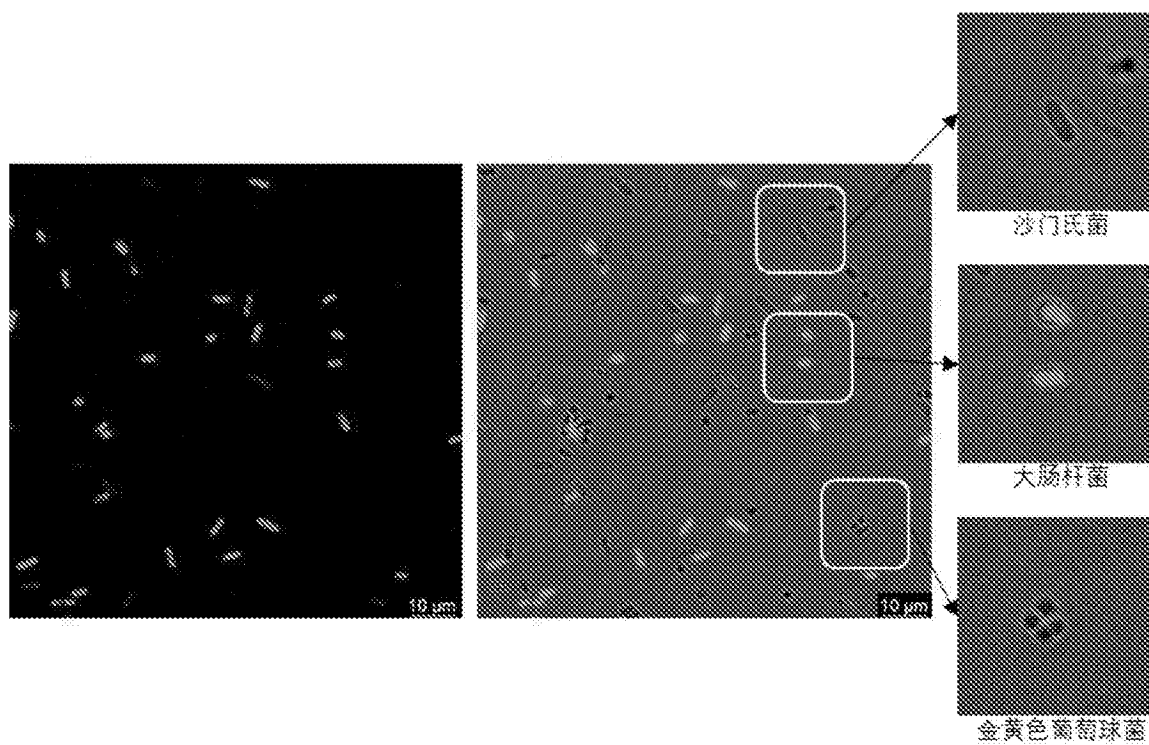


图8

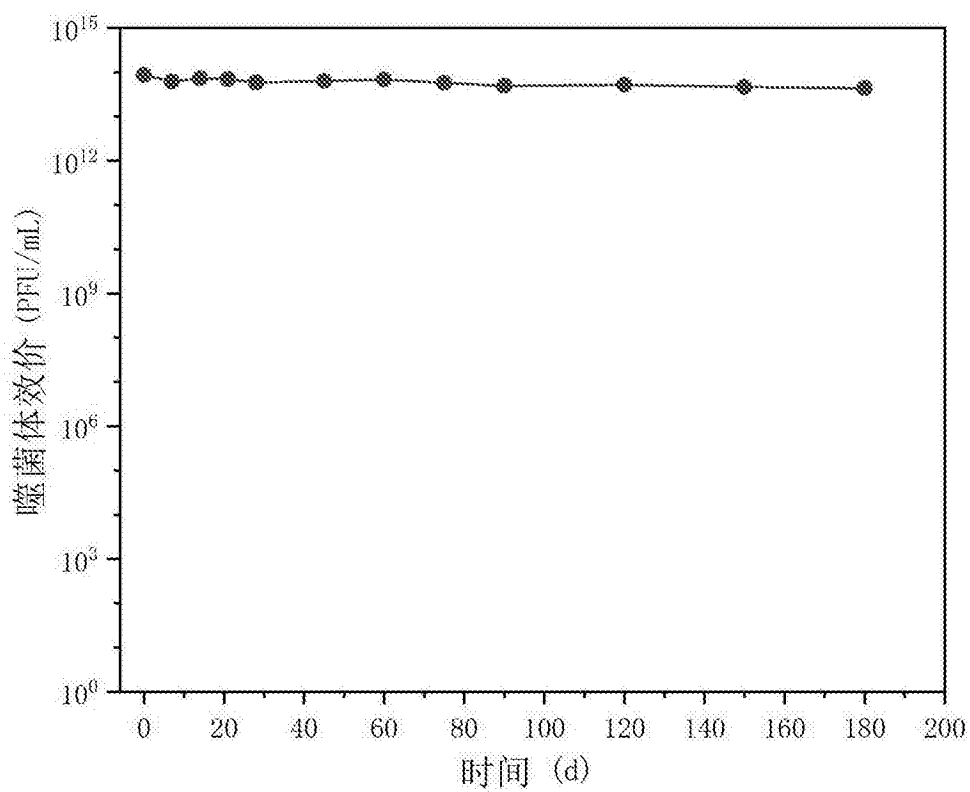


图9



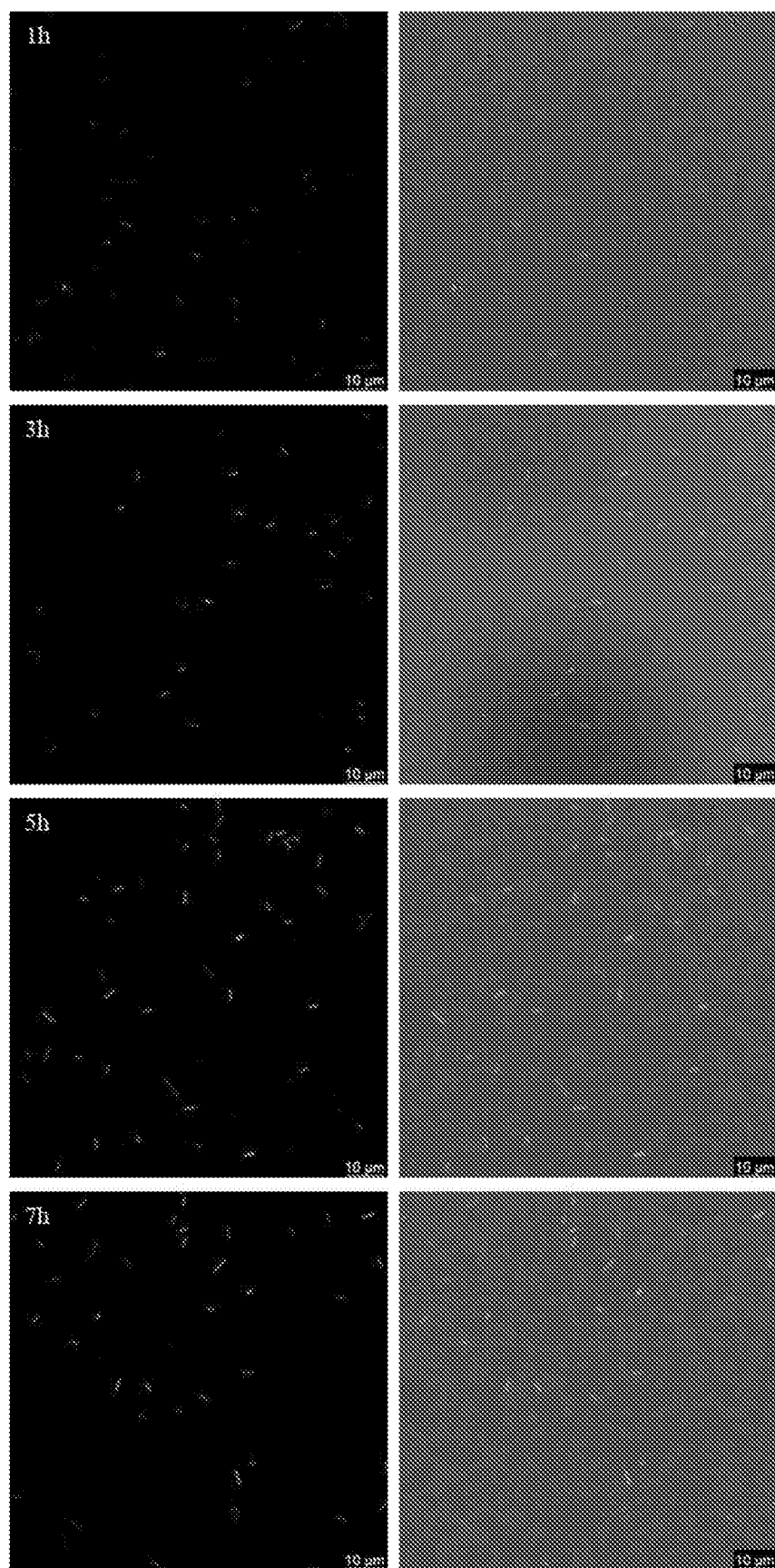


图10

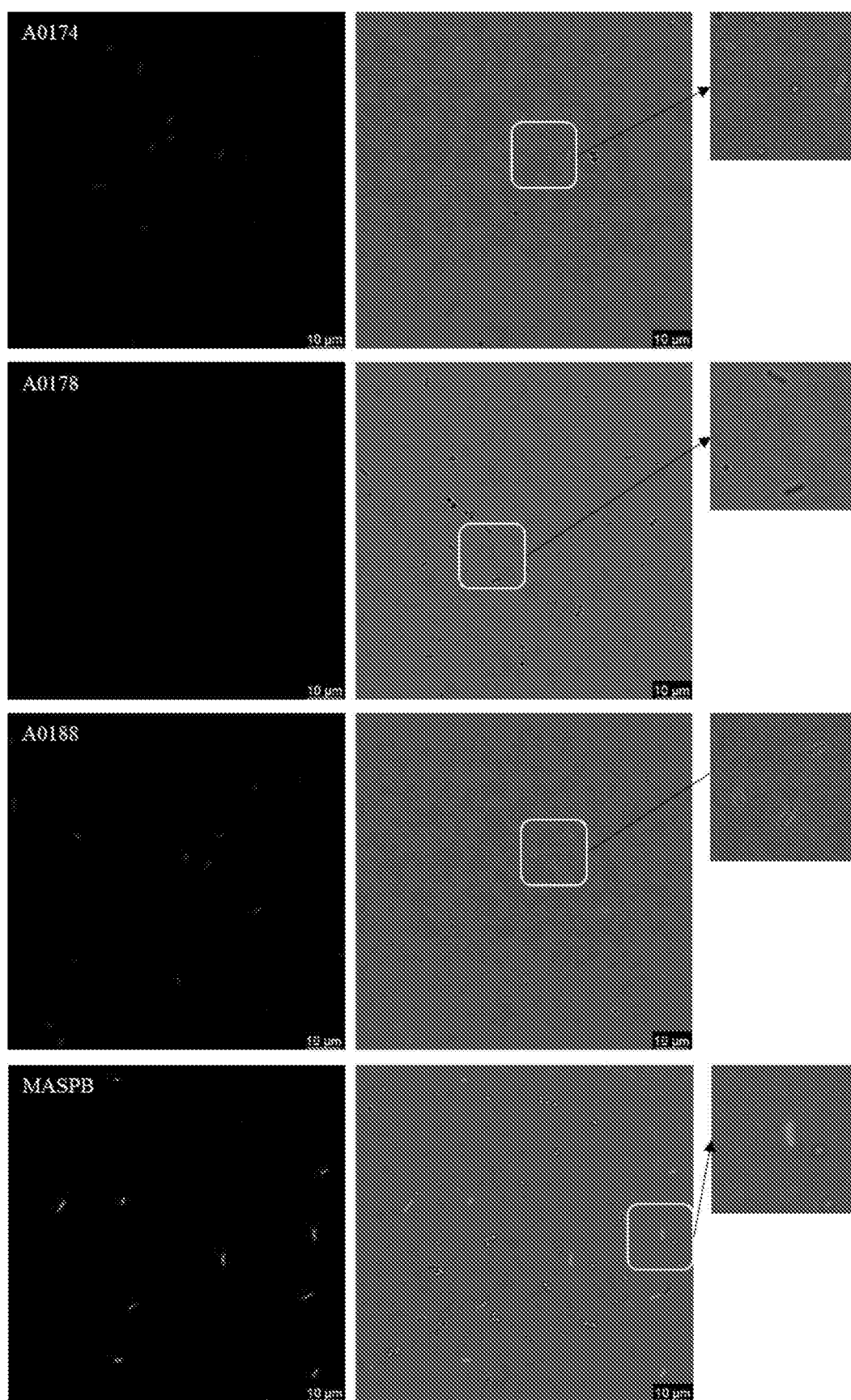


图11