



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107064101 B

(45)授权公告日 2020.03.31

(21)申请号 201710155376.3

(22)申请日 2017.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107064101 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(73)专利权人 东南大学  
地址 211189 江苏省南京市江宁区东南大  
学路2号

(72)发明人 赵祥伟 王德龙 顾忠泽

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所  
(普通合伙) 32204

代理人 柏尚春

(51)Int.Cl.  
G01N 21/65(2006.01)

(56)对比文件

CN 106048537 A,2016.10.26,  
JP 2014055825 A,2014.03.27,  
CN 202661383 U,2013.01.09,  
US 9080981 B2,2015.07.14,  
CN 103600082 A,2014.02.26,  
CN 104330397 A,2015.02.04,  
Xianglin Li et al.Ordered Array of  
Gold Semishells on TiO<sub>2</sub> Spheres: An  
Ultrasensitive and Recyclable SERS  
Substrate.《ACS Appl. Mater. Interfaces》  
.2012,  
王小龙.基于微孔滤膜SERS活性基底的构  
建、研究及应用.《中国优秀硕士学位论文全文数  
据库 华工程科技I辑》.2014,(第9期),

审查员 高本州

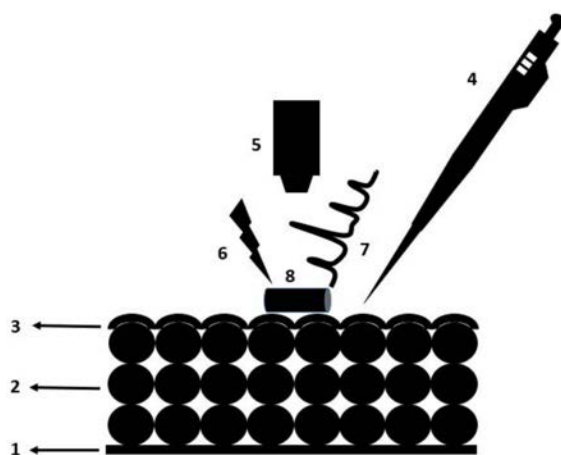
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

## (54)发明名称

一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底及其  
制备和使用方法

## (57)摘要

本发明提供了一种检测链霉菌菌丝的增强  
拉曼基底及其制备和使用方法。该检测基底由下  
至上分别为滤膜层(1)、单分散纳米粒子层(2)、  
镀金属层(3),该检测基底检测快速、灵敏度高,  
其制备过程如下:1)在滤膜层(1)上自组装得到  
单分散纳米粒子层(2);2)在单分散纳米粒子层  
(2)上制备金纳米粒子层;3)以该金纳米粒子层  
中的金纳米粒子为核生长镀金属层(3),得到所  
述的检测基底;该制备方法简单快捷。该检测基  
底可以用于检测样品中是否含有链霉菌菌丝,通  
过采集样品溶液的拉曼光谱,可以检测样品中是  
否有链霉菌菌丝以及菌丝的含量;该方法在临床  
检测、检验检疫、环境监测等领域具有广泛的应  
用前景。



CN 107064101 B

1. 一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的制备方法,其特征在于:该基底由下至上分别为滤膜层(1)、单分散纳米粒子层(2)和镀金属层(3),且各层之间以自然堆叠方式进行连接;其中所述的单分散纳米粒子层(2)中纳米粒子的粒径为100~500nm,且比滤膜层(1)的滤孔孔径大;所述的单分散纳米粒子层(2)为单层或多层;所述的单分散纳米粒子层(2)中的纳米粒子为二氧化硅纳米粒子、聚苯乙烯纳米粒子、聚甲基丙烯酸甲酯纳米粒子、二氧化钛纳米粒子、硅纳米粒子或水凝胶纳米粒子;所述的滤膜层(1)的滤孔孔径为100~450nm,其材料是尼龙微孔滤膜、硝酸纤维素滤膜或普通滤纸;所述的镀金属层(3)为镀银层、镀金层或者镀铜层,该方法包括以下步骤:

步骤一、以滤膜层(1)为底层,通过可拆卸滤器将纳米粒子溶液过滤至滤膜层(1)上,纳米粒子在滤膜层(1)上自组装形成有序结构,得到单分散纳米粒子层(2);

步骤二、将金纳米粒子溶液利用可拆卸滤器过滤至步骤一得到的单分散纳米粒子层(2)上,在单分散纳米粒子层(2)表面上通过物理吸附作用得到金纳米粒子层;

步骤三、以上述金纳米粒子层中金纳米粒子为核,通过电镀沉积法、无电解电镀沉积法或电子束蒸镀沉积法在其上生长金属,制得镀金属层(3),得到检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底;其中,当镀金属层(3)为镀金层和镀银层时,采用电镀沉积法、无电解电镀沉积法或电子束蒸镀沉积法,当镀金属层(3)为镀铜层时采用电镀沉积法。

2. 如权利要求1所述的一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的制备方法,其特征在于:所述的可拆卸滤器的直径为1~10cm,所述的滤膜层(1)的直径为1~10cm,且比可拆卸滤器的直径小;所述金纳米粒子溶液中的金纳米粒子的粒径为1~50nm,所述的纳米粒子溶液为二氧化硅纳米粒子溶液、聚苯乙烯纳米粒子溶液、聚甲基丙烯酸甲酯纳米粒子溶液、二氧化钛纳米粒子溶液、硅纳米粒子溶液或水凝胶纳米粒子溶液。

3. 如权利要求1所述的一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的制备方法,其特征在于:步骤一所述过滤的具体步骤如下:将滤膜层(1)置于可拆卸滤器中,通过注射器将纳米粒子溶液注入可拆卸滤器中,在滤膜层(1)上自组装形成有序结构,得到单分散纳米粒子层(2)。

4. 如权利要求1所述的一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的制备方法,其特征在于:步骤三所述的无电解电镀沉积法的具体步骤为:取出覆盖有金纳米粒子层的滤膜层(1),烘干后将其浸入等体积混合有无电解电镀A液和无电解电镀B液的混合液中反应1~60min,以金纳米粒子层中金纳米粒子为核生长金属,制得镀金属层(3),得到检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底;当镀金属层(3)为镀金层时,无电解电镀A液由0.1~10g/mL的氯化钠溶液与0.1~10wt%的氯金酸溶液按照体积比1:1~1:10混匀而成,无电解电镀B液每100mL中含有0.1~10g酒石酸钾钠、1~20g氢氧化钠、1~30mL乙醇,剩余成分为去离子水;当镀金属层(3)为镀银层时,无电解电镀A液为硝酸银与1~10vol%氨水按照质量体积比1:1~1:100混合得到的溶液,无电解电镀B液1~50wt%酒石酸钾钠溶液。

5. 一种如权利要求1~4任一所述制备方法制备得到的检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的使用方法,其特征在于:将上述检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底用于检测那西肽成品中的链霉菌菌丝,具体步骤如下:

步骤1、将那西肽预混剂置于1000~10000rpm的条件下离心1~30min,或者室温下静置0.5~5h,得到样品溶液;

步骤2、将步骤1得到的样品溶液滴加在所述的检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底上,静

置反应1~60min,得到待检测样品(8);

步骤3、用拉曼光谱仪(5)对待检测样品(8)进行拉曼检测,当分析激光(6)照射待检测样品(8)后得到拉曼光谱(7),之后对拉曼光谱(7)进行分析,得出检测结果。

6.如权利要求5所述的一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的使用方法,其特征在于:所述的拉曼光谱仪为手持式拉曼光谱仪、共聚焦显微拉曼光谱仪或共振显微拉曼光谱仪。

## 一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底及其制备和使用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底及其制备和使用方法,属于细菌检测领域。

### 背景技术

[0002] 那西肽又名诺西肽、诺肽菌素或诺肽霉素,是含硫多肽类抗生素,由法国科学家于1961年在Streptomyces actinosus ZS 40037发酵液中首次发现,随后在阿根廷的土壤中获得一株合成那西肽的菌株,它对大多数革兰氏阳性菌,特别是金葡萄菌、链球菌和魏氏梭状芽孢杆菌敏感,通过阻碍细菌的蛋白质合成,阻抑了细菌生长,因此可防治呼吸道疾病和坏死性肠炎。目前,很多国家和地区(如欧盟、日本、中国台湾等地区)允许把那西肽作为饲料添加剂使用,1998年我国批准那西肽为国家三类新兽药,它具有明显的促进畜禽生长及改善饲料利用率的作用,在肠道内不易吸收,排除体外可迅速分解,而且用量低,残留量少,对环境影响小,属于安全性较高的环保型饲料添加剂。目前,合成那西肽的方法主要分为活跃链霉菌发酵法和化学合成法,两者相比,发酵法成本低廉,纯度低,那西肽成品中混有链霉菌菌丝,而化学合成法成本较高,纯度也高,成品中不含链霉菌菌丝。有厂家为了节约成本,用链霉菌发酵生产那西肽,以次充好,谎称是化学合成法合成的那西肽。因此,发明一种可用于检测链霉菌菌丝的方法来区分发酵法和化学合成法合成的那西肽刻不容缓。

[0003] 目前,微生物的检测方法主要有培养染色观察法、免疫学方法、分子生物学方法和质谱法,传统的微生物培养法一般需要经过富集、分离培养、染色或者生化鉴定等步骤,整个检测过程繁琐、耗时长、工作量大,一般需要4~7天才能出检测结果,免疫学方法具有特异性好、敏感度高的优点,但由于微生物血清型复杂,检测中常出现假阳性结果,阳性结果需要其他试验进一步确认。近年来,基于聚合酶链式反应(PCR)技术的分子生物学技术由于特异性强、灵敏度高等优点发展非常迅速,但是某些微生物会产生腐殖酸,抑制PCR反应,造成假阳性的结果。质谱的方法进行微生物检测特异性强,灵敏度高,但是成本较高,不适合进行大批量样品的检测。

[0004] 针对上述问题的解决方案是发明一种成本低廉、检测快速、简单可行的检测基底及检测方法,鉴于上述微生物检测技术研究进展,本发明提出一种那西肽预混剂中链霉菌菌丝的检测基底及其制备和使用方法。它不仅使试剂的消耗降低,且使实验速度提高,费用降低,充分体现了当今实验室设备微型化的发展趋势。

### 发明内容

[0005] 技术问题:本发明的目的是提供一种链霉菌菌丝的增强拉曼检测基底,该基底成本低廉、样品需要量少、检测速度快、灵敏度高、检测简单。

[0006] 本发明的另一个目的是提供一种链霉菌菌丝的检测基底的制备方法,该方法制备简单。

[0007] 本发明的另一目的是提供一种链霉菌菌丝的增强拉曼检测的使用方法,用于链霉

菌菌丝的快速检测,操作方便,成本低廉。

[0008] 技术方案:本发明提供了一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底,该基底由下至上分别为滤膜层、单分散纳米粒子层和镀金属层,且各层之间以自然堆叠方式进行连接。

[0009] 其中:

[0010] 所述的滤膜层的滤孔孔径为100~450nm,其材料是尼龙微孔滤膜、硝酸纤维素滤膜或普通滤纸;所述的镀金属层为镀银层、镀金层或者镀铜层。

[0011] 所述的单分散纳米粒子层中纳米粒子的粒径为100~500nm,且比滤膜层的滤孔孔径大;所述的单分散纳米粒子层为单层或多层。

[0012] 所述的单分散纳米粒子层中的纳米粒子为二氧化硅纳米粒子、聚苯乙烯纳米粒子、聚甲基丙烯酸甲酯纳米粒子、二氧化钛纳米粒子、硅纳米粒子或水凝胶纳米粒子。

[0013] 本发明还提供了一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的制备方法,包括以下步骤:

[0014] 步骤一、以滤膜层为底层,通过可拆卸滤器将纳米粒子溶液过滤至滤膜层上,纳米粒子在滤膜层上自组装形成有序结构,得到单分散纳米粒子层;

[0015] 步骤二、将金纳米粒子溶液利用可拆卸滤器过滤至步骤一得到的单分散纳米粒子层上,在单分散纳米粒子层表面上通过物理吸附作用得到金纳米粒子层;

[0016] 步骤三、以上述金纳米粒子层中金纳米粒子为核,通过电镀沉积法、无电解电镀沉积法或电子束蒸镀沉积法在其上生长金属,制得镀金属层,得到检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底;其中,当镀金属层为镀金层和镀银层时,采用电镀沉积法、无电解电镀沉积法或电子束蒸镀沉积法,当镀金属层为镀铜层时采用电镀沉积法。

[0017] 其中:

[0018] 所述的可拆卸滤器的直径为1~10cm,所述的滤膜层的直径为1~10cm,且比可拆卸滤器的直径小;所述金纳米粒子溶液中的金纳米粒子的粒径为1~50nm,所述的纳米粒子溶液为二氧化硅纳米粒子溶液、聚苯乙烯纳米粒子溶液、聚甲基丙烯酸甲酯纳米粒子溶液、二氧化钛纳米粒子溶液、硅纳米粒子溶液或水凝胶纳米粒子溶液。

[0019] 步骤一所述过滤的具体步骤如下:将滤膜层置于可拆卸滤器中,通过注射器将纳米粒子溶液注入可拆卸滤器中,在滤膜层上自组装形成有序结构,得到单分散纳米粒子层。

[0020] 步骤三所述的无电解电镀沉积法的具体步骤为:取出覆盖有金纳米粒子层的滤膜,烘干后将其浸入等体积混合有无电解电镀A液和无电解电镀B液的混合液中反应1~60min,以金纳米粒子层中金纳米粒子为核生长金属,制得镀金属层,得到检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底;当镀金属层为镀金层时,无电解电镀A液由0.1~10g/mL的氯化钠溶液与0.1~10wt%的氯金酸溶液按照体积比1:1~1:10混匀而成,无电解电镀B液每100mL中含有0.1~10g酒石酸钾钠、1~20g氢氧化钠、1~30mL乙醇,剩余成分为去离子水;当镀金属层为镀银层时,无电解电镀A液为硝酸银与1~10vol%氨水按照质量体积比1:1~1:100混合得到的溶液,无电解电镀B液1~50wt%酒石酸钾钠溶液。

[0021] 本发明还提供了一种检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的使用方法,将上述检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底用于检测那西肽成品中的链霉菌菌丝,具体步骤如下:

[0022] 步骤1、将那西肽预混剂置于1000~10000rpm的条件下离心1~30min,或者室温下静置0.5~5h,得到样品溶液;

[0023] 步骤2、将步骤1得到的样品溶液滴加在所述的检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底上,静置反应1~60min,得到待检测样品;

[0024] 步骤3、用拉曼光谱仪对待检测样品进行拉曼检测,当分析激光照射待检测样品后得到拉曼光谱,之后对拉曼光谱进行分析,得出检测结果。

[0025] 所述的拉曼光谱仪为手持式拉曼光谱仪、共聚焦显微拉曼光谱仪或共振显微拉曼光谱仪。

[0026] 所述将样品溶液滴加在所述的检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底上使用的工具为微量移液器。

[0027] 所述分析激光的波长为785nm。

[0028] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0029] 1、基底制备简单,与一般的链霉菌菌丝检测方法相比,该基底制备简单、成本低廉,避免了抗体检测、PCR检测和质谱检测中存在的抗体易失活、PCR假阳性和质谱检测成本昂贵等缺点。

[0030] 2、样品需要量少、检测速度快、灵敏度高:由于检测反应只在基底上进行,基底对样品溶液有过滤浓缩的效果,因此,检测前样品无需浓缩预处理,需要的待测样品较少,缩短检测时间;同时,检测反应以具有镀有金属层的单分散纳米粒子层为载体,比表面积大,检测灵敏度高;镀金属层与菌丝之间的间隙在亚微米级,在亚微米级的间隙内形成热点,对菌丝的拉曼光谱有增强效果,可以显著提高菌丝的拉曼信号。

[0031] 3、检测简单、操作方便、成本低廉:由于基底可以剪裁成任意大小,将基底剪裁成共聚焦显微拉曼的光斑大小,就可以实现对光斑大小范围内样品所含菌丝的检测,不用在基底上寻找菌丝确切位置,简化了操作难度;可扩展性高:由于采用了可剪裁的滤膜基底,可以方便地进行不同样品检测基底的集成,可以一次性同时检测多个样品,促进了分析系统的微型化和集成化。

## 附图说明

[0032] 图1为本发明中检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底的制备流程图;

[0033] 图2为本发明中检测链霉菌菌丝的增强拉曼基底工作原理示意图;

[0034] 图中有:滤膜层1、单分散纳米粒子层2、镀金属层3、微量移液器4、拉曼光谱仪5、分析激光6、拉曼光谱7、待检测样品8。

## 具体实施方式

[0035] 本发明提出了一种那西肽预混剂中链霉菌菌丝的检测基底及其制备和使用方法,该检测基底由下至上分别为滤膜层1、单分散纳米粒子层2、和镀金属层3;该检测基是通过过滤的方法在滤膜上组装光子晶体基底,然后通过电镀在基底表面镀金属制备,基底通过共聚焦显微拉曼进行那西肽预混剂中的链霉菌菌丝特征拉曼光谱的检测。

[0036] 实施例1:制备尼龙微孔滤膜多层二氧化硅镀银拉曼检测基底

[0037] 1、首先,将1~100mL的100~500nm直径的二氧化硅纳米粒子溶液通过注射器注入到直径大小为1~10cm的可拆卸滤器中,在可拆卸滤器内的直径1~10cm、滤孔孔径为100~450nm(比二氧化硅纳米粒子粒径小)之间的尼龙微孔滤膜上组装成多层有序结构,得到单

分散二氧化硅纳米粒子层；

[0038] 2、将1~50mL事先制备的粒径为1~50nm的金纳米粒子溶液注入到滤器内,过滤到二氧化硅纳米粒子表面,得到金纳米粒子层；

[0039] 3、取出覆盖有金纳米粒子层的尼龙微孔滤膜,置于热台上烘干,之后将其浸入无电解电镀银A液(1~20g硝酸银,1~50mL氨水,10~1000mL去离子水)和B液(1~100g酒石酸钾钠,1~1000mL去离子水)等体积混合的溶液中镀银1~60min,得到检测链霉菌菌丝的尼龙微孔滤膜多层二氧化硅镀银基底。

[0040] 实施例2:检测染料4-ATP的拉曼光谱

[0041] 1、将事先制备的尼龙微孔滤膜多层二氧化硅镀银基底剪裁成尺寸为3mm×3mm的基底；

[0042] 2、用微量移液器取5 $\mu$ L、 $10^{-3}$ ~ $10^{-12}$ M的4-ATP染料,滴加到上述基底上,接着共聚焦显微拉曼进行4-ATP特征拉曼光谱的检测,得到染料4-ATP的拉曼光谱；

[0043] 3、反应完毕,将使用过的基底丢弃,基底为一次性使用基底。

[0044] 实施例3:检测染料R6G的拉曼光谱

[0045] 1、将事先制备的尼龙微孔滤膜多层二氧化硅镀银基底剪裁成尺寸为3mm×3mm的基底；

[0046] 2、用微量移液器取5 $\mu$ L、 $10^{-3}$ ~ $10^{-12}$ M的R6G染料,滴加到上述基底上,接着共聚焦显微拉曼进行R6G特征拉曼光谱的检测,得到染料R6G的拉曼光谱；

[0047] 3、反应完毕,将使用过的基底丢弃,基底为一次性使用基底。

[0048] 实施例4:分别检测发酵方法、化学方法制备的那西肽预混剂中是否含有链霉菌菌丝

[0049] 1、将事先制备的尼龙微孔滤膜多层二氧化硅镀银基底剪裁成尺寸为3mm×3mm的基底；

[0050] 2、用微量移液器取5 $\mu$ L在10000rpm条件下离心10min的发酵方法制备(或者化学方法制备)的那西肽预混剂样品,滴加到上述基底上,接着共聚焦显微拉曼进行链霉菌菌丝特征拉曼光谱的检测,得到发酵方法制备(或者化学方法制备)的那西肽预混剂的拉曼光谱,通过与链霉菌菌丝特征光谱比对得到分析结果；

[0051] 3、反应完毕,将使用过的基底丢弃,基底为一次性使用基底。

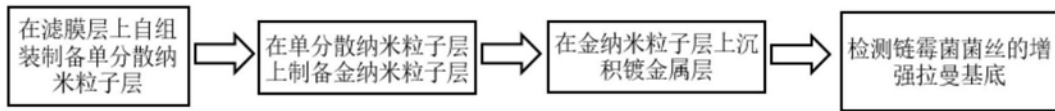


图1

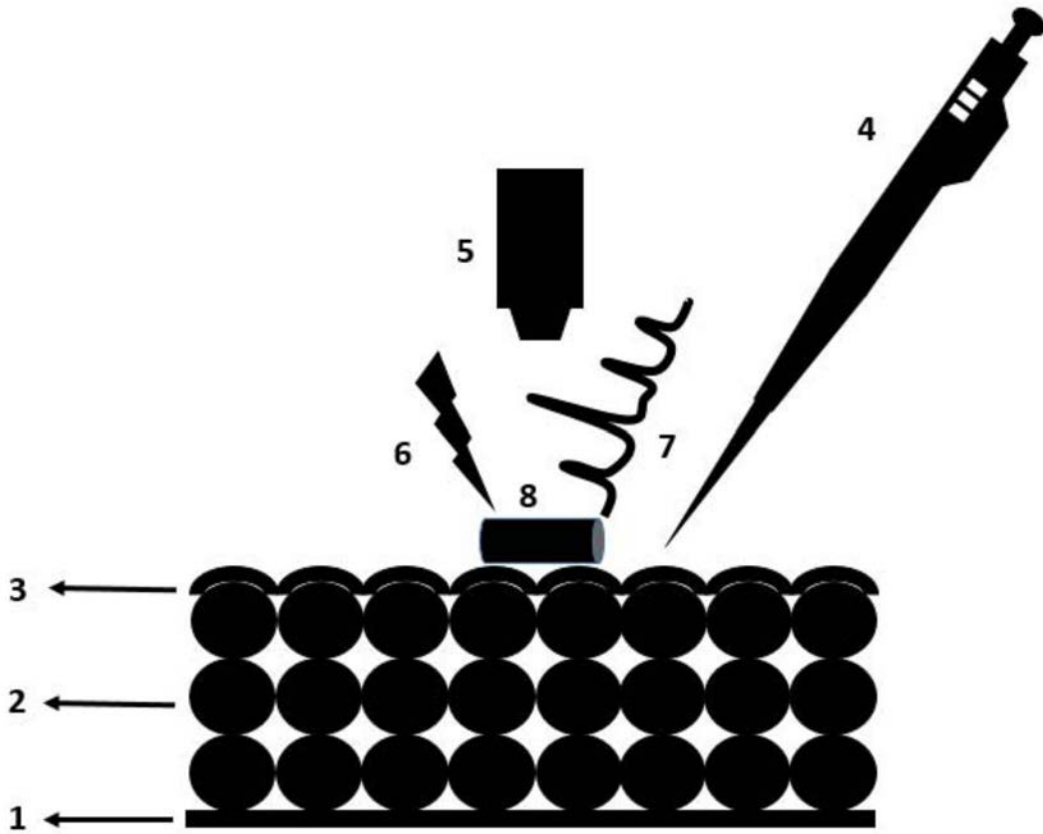


图2