



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106857504 A

(43)申请公布日 2017.06.20

(21)申请号 201710073483.1

(22)申请日 2017.02.10

(71)申请人 中国科学院化学研究所

地址 100190 北京市海淀区中关村北一街2号

(72)发明人 王树 张鹏博 刘礼兵 吕凤婷

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

代理人 刘依云 严政

(51)Int.Cl.

A01N 25/00(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

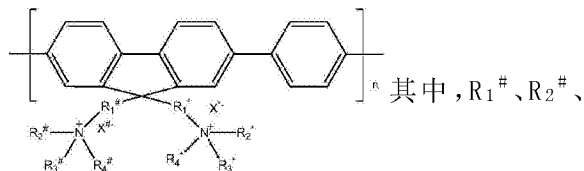
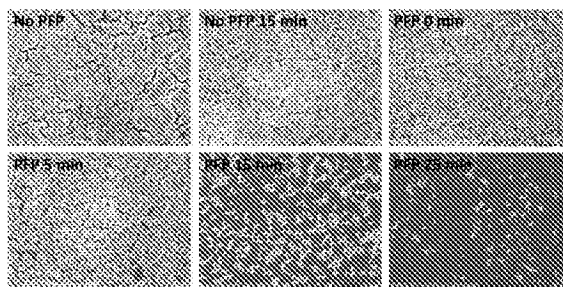
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

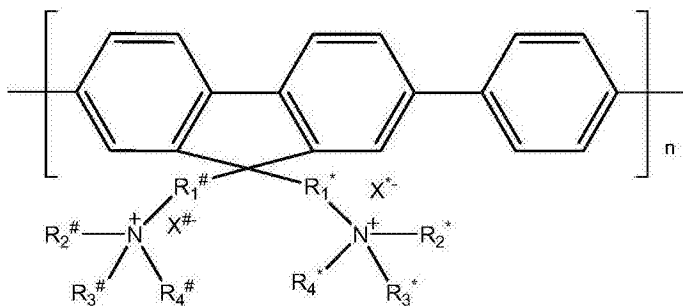
一种抑制和/或破坏生物膜的方法

(57)摘要

本发明涉及生物膜领域,公开了一种抑制和/或破坏生物膜的方法。所述该方法包括:将式(I)所示的化合物与样品进行接触,所述样品为含有生物膜的样品和/或能够形成而未形成生物膜的样品。采用本发明提供的方法,能够抑制生物膜的形成,还能够破坏成熟的生物膜。



1. 一种抑制和/或破坏生物膜的方法,其特征在于,该方法包括:将式(I)所示的化合物与样品进行接触,所述样品为含有生物膜的样品和/或能够形成而未形成生物膜的样品;



式(I)

其中, $R_1^\#$ 、 $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_1^* 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 各自独立地为 C_1 - C_{12} 的烷基, $X^\#$ 和 X^* 各自独立地表示卤素; n 为8-15的整数;所述式(I)所示的化合物的数均分子量为5000-10000。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 相同,均为 C_1 - C_5 的烷基; $R_1^\#$ 和 R_1^* 相同,为 C_3 - C_8 的烷基; $X^\#$ 和 X^* 各自独立地选自氯、溴和碘中的至少一种,优选均为溴;

优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正己基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正己基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正戊基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正戊基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丁基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丁基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丙基;优选地, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基,所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丙基。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述样品为能够形成而未形成生物膜的样品时,所述接触的条件包括:温度为 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$,时间为10分钟以上,优选为20-30小时。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述能够形成而未形成生物膜的样品为含有细菌的液体样品,且所述接触体系中,细菌的数量为 10^4 - 10^7 个/mL,式(I)所示的化合物的用量为1-100 μM 。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述细菌为金黄色葡萄球菌,优选为金黄色葡萄球菌ATCC 6538、金黄色葡萄球菌ATCC 25923、金黄色葡萄球菌ATCC 29213、金黄色葡萄球菌V 329和金黄色葡萄球菌SA 113中的至少一种。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述样品为含有生物膜的样品时,所述方法还包括:将接触之后的体系进行光照。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述接触的条件包括:温度为 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$,时间为10-30分钟;所述光照的条件包括:温度为 15 - 30°C ,时间为5-25分钟,光强为20-100 mW/cm^2 ,光照所使用的光为白光,光照的波长为400-800nm。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述含有生物膜的样品为含有细菌形成的生物膜的液体样品,所述含有生物膜的样品是由包括以下步骤的方法制备得到的:控制细菌的起始数量为 10^4 - 10^7 个/mL,经过18-30小时的培养形成。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述接触体系中,式(I)所示的化合物的用量为1-100 μM 。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中,所述细菌为金黄色葡萄球菌,优选为金黄色

葡萄球菌ATCC 6538、金黄色葡萄球菌ATCC 25923、金黄色葡萄球菌ATCC 29213、金黄色葡萄球菌V 329和金黄色葡萄球菌SA 113中的至少一种。

一种抑制和/或破坏生物膜的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物膜领域,具体地,涉及一种抑制和/或破坏生物膜的方法。

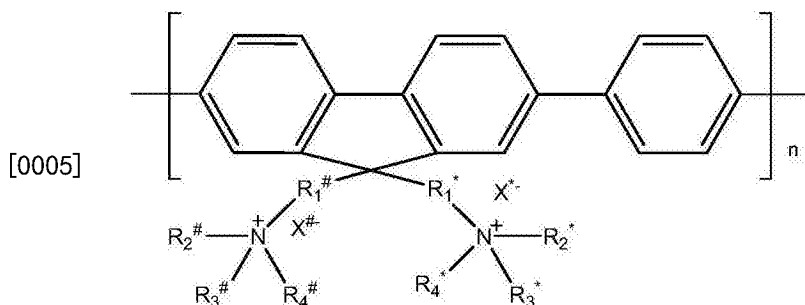
背景技术

[0002] 生物膜是指微生物为了适应环境,粘附于非生物或活性组织表面,分泌大量的多糖、蛋白质和核酸等不均一的胞外基质,将菌体自身包裹在其中而形成的大量菌体聚集膜样物,是菌体在自然界中一种常见的生存状态。生物膜的形成分为以下几个阶段:1、初始粘附,游离的细菌粘附在固体基质表面,并分泌胞外核酸促进粘附。2、微菌落的形成,粘附的细菌经过繁殖扩增形成微菌落,并分泌胞外蛋白促进粘附。3、生物膜成熟,菌体进一步生长并分泌大量的胞外基质,主要成分为胞外多糖,蛋白质,胞外核酸和脂类,形成成熟的生物膜。4、生物膜凋亡,生物膜成熟后,膜内细菌仍然增殖,在微菌落生长后期,生物膜破裂,释放出游离的细菌,可进入下一个生物膜形成周期。相对于游离细菌,生物膜内菌体被胞外基质包裹,形成一层厚厚的生物屏障,阻碍抗菌药物的渗透,增强菌体对不良环境的耐受性。即使抗菌药物渗透到生物膜内部,内部的细菌由于营养物质缺乏、氧气不足等因素生长缓慢或处于休眠期,对抗生素极不敏感,这是导致生物膜无法根除的主要原因。基于耐药性的原因,寻找新的治疗策略以期抑制生物膜的形成同时破坏成熟生物膜是具有挑战性的。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术中生物膜引发的耐药性的缺陷,本发明提供了一种抑制和/或破坏生物膜的方法,采用本发明提供的方法,能够抑制生物膜的形成,还能够破坏成熟的生物膜。

[0004] 具体的,本发明提供了一种抑制和/或破坏生物膜的方法,该方法包括:将式(I)所示的化合物与样品进行接触,所述样品为含有生物膜的样品和/或能够形成而未形成生物膜的样品;



[0006] 其中, $R_1^\#$ 、 $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_1^* 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 各自独立地为 C_1 - C_{12} 的烷基, $X^\#$ 和 X^* 各自独立地表示卤素; n 为8-15的整数;所述式(I)所示的化合物的数均分子量为5000-10000。

[0007] 本发明的方法能够抑制和破坏生物膜的原因可能为:细菌表面的主要成分为多糖、蛋白质、脂类等,带有负电荷,而式(I)所示化合物带有正电荷,所以细菌通过静电作用和疏水作用与化合物紧密结合。在抑制生物膜形成过程中,将式(I)所示化合物加入到稀释

后的细菌溶液中,式(I)所示化合物通过静电作用和疏水作用与细菌结合到一起。当式(I)所示化合物浓度足够高时,过量的式(I)所示化合物能够包裹细菌,削弱细菌与细菌之间、细菌与基底之间的相互作用,导致生物膜形成能力变弱,达到抑制生物膜形成的效果。在破坏成熟生物膜过程中,将式(I)所示化合物加入到成熟的生物膜中,静电作用和疏水作用使式(I)所示化合物结合到细菌及生物膜表面。这样可以使式(I)所示化合物在光照条件下产生的活性氧与细菌及生物膜足够近,进而有效地破坏生物膜。

[0008] 本发明提供的抑制生物膜形成及破坏成熟生物膜的方法,克服了现有的破坏生物膜方法容易产生耐药性的难题。在抑制生物膜形成过程中,式(I)所示化合物通过静电和疏水作用将细菌包裹起来,削弱细菌与细菌之间、细菌与基底之间的相互作用,而不是杀死细菌,从源头抑制了耐药性的产生。在破坏成熟生物膜过程中,利用式(I)所示化合物在光照条件下产生的活性氧直接破坏细菌细胞膜,同样避免了耐药性的产生。本发明为建立有效的生物膜去除和预防策略奠定了基础。

[0009] 本发明的其它特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

附图说明

[0010] 附图是用来提供对本发明的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本发明,但并不构成对本发明的限制。在附图中:

[0011] 图1是实施例3中的生物膜形成能力曲线图;

[0012] 图2是实施例4中荧光强度与时间的关系图;

[0013] 图3是实施例5中的生物膜抑制率曲线图;

[0014] 图4是实施例6中不同光照时间下死活菌染色荧光比率图;

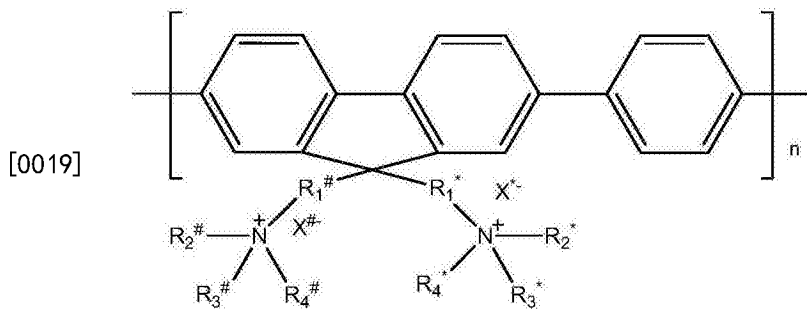
[0015] 图5是实施例7中不同光照时间下的电镜成像图。

具体实施方式

[0016] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0017] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0018] 本发明提供了一种抑制和/或破坏生物膜的方法,该方法包括:将式(I)所示的化合物与样品进行接触,所述样品为含有生物膜的样品和/或能够形成而未形成生物膜的样品;



[0020] 其中, $R_1^\#$ 、 $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_1^* 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 各自独立地为 C_1 - C_{12} 的烷基, $X^\#$ 和 X^* 各自独立地表示卤素; n 为8-15的整数; 所述式 (I) 所示的化合物的数均分子量为5000-10000。

[0021] 术语“生物膜”是微生物(特别是细菌)粘附于接触的物体表面, 分泌胞外多糖、蛋白质和核苷酸等物质, 并将自身包被于其中的大量微生物群聚膜样物。

[0022] 根据本发明的一种优选的实施方式, 在式 (I) 中, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 相同, 均为 C_1 - C_5 的烷基; $R_1^\#$ 和 R_1^* 相同, 为 C_3 - C_8 的烷基; $X^\#$ 和 X^* 各自独立地选自氯、溴和碘中的至少一种, 优选均为溴。

[0023] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正己基。

[0024] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正己基。

[0025] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正戊基。

[0026] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正戊基。

[0027] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丁基。

[0028] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丁基。

[0029] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为甲基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丙基。

[0030] 根据本发明的一种具体的实施方式, $R_2^\#$ 、 $R_3^\#$ 、 $R_4^\#$ 、 R_2^* 、 R_3^* 和 R_4^* 均为乙基, 所述 $R_1^\#$ 和 R_1^* 均为正丙基。

[0031] 本发明所述抑制和/或破坏生物膜的方法优选为体外和/或非治疗目的的方法。

[0032] 在本发明中, 所述抑制和/或破坏生物膜的方法具体可以分为抑制生物膜的方法和破坏生物膜的方法。所述抑制生物膜的方法指的是抑制生物膜的形成的方法, 所述破坏生物膜的方法指的是对于已经形成的成熟的生物膜的破坏方法。

[0033] 具体的, 所述样品为能够形成而未形成生物膜的样品时, 所述抑制生物膜的方法可以包括: 将式 (I) 所示的化合物与能够形成而未形成生物膜的样品进行接触。所述能够形成而未形成生物膜的样品指的是具有形成生物膜的能力而还未形成生物膜的样品, 例如可以为含有细菌的液体样品和/或含有真菌的液体样品。所述含有细菌的液体样品和/或含有真菌的液体样品中还未形成生物膜。本发明所述的细菌指的是能够形成生物膜的细菌, 具

体种类没有特别的限定,例如可以为革兰氏阴性菌和/或革兰氏阳性菌,具体可以为金黄色葡萄球菌,进一步优选为金黄色葡萄球菌ATCC 6538、金黄色葡萄球菌ATCC 25923、金黄色葡萄球菌ATCC 29213、金黄色葡萄球菌V 329和金黄色葡萄球菌SA 113(金黄色葡萄球菌V 329和金黄色葡萄球菌SA 113的来源可参考Di Poto A,Sbarra M S,Provenza G,et al.The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on Staphylococcus aureus biofilms [J].Biomaterials, 2009,30 (18) :3158-3166)中的至少一种。本发明所述的真菌指的是能够形成生物膜的真菌,具体种类也没有特别的限定,例如可以为白色念珠菌,具体可以为白色念珠菌3153A或SC5314(上述两种白色念珠菌的来源可参考Ramage G,Saville S P,Wickes B L,et al.Inhibition of Candida albicans biofilm formation by farnesol,a quorum-sensing molecule [J].Applied and environmental microbiology,2002,68(11):5459-5463)。

[0034] 优选地,所述能够形成而未形成生物膜的样品为含有细菌的液体样品。所述接触体系中,细菌的数量可以为 10^4 - 10^7 个/mL。此时进行接触的所述式(I)所示的化合物的用量可以在较大范围内变动,例如,可以为1-100 μ M(μ mol/L),优选为20-50 μ M。

[0035] 在本发明中,所述样品为能够形成而未形成生物膜的样品时,所述接触的条件包括:温度可以为 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$,时间可以10分钟以上,优选为20-30小时。

[0036] 本发明对上述抑制生物膜的作用强度可以通过结晶紫染色法进行定量检测,并根据式(II)计算生物膜的存活率(VR):

$$[0037] \quad VR = \frac{A}{A_0} \times 100\%, \quad \text{式 (II)},$$

[0038] 其中, A_0 为未与式(I)所示的化合物接触的细菌样品在590nm处的吸光值(空白对照), A 为与式(I)所示的化合物接触过的细菌样品在590nm处的吸光值。

[0039] 在本发明中,所述结晶紫染色法可以为本领域的常规选择。所述结晶紫是一种三苯甲烷类染料。电离后,该分子的染色部分带正电荷,可与带负电荷的分子,包括细菌细胞膜表面的分子以及成熟生物膜分泌的胞外基质中的多糖、核酸、蛋白质等结合,使生物膜染色,所以可以用来定量生物膜。

[0040] 在本发明中,所述样品为含有生物膜的样品时,所述方法还包括:将接触之后的体系进行光照,可以破坏生物膜。此时所述接触的条件没有特别的限定,例如可以包括:温度可以为 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$;时间可以为10分钟以上,优选10-30分钟。所述光照的条件可以包括:温度可以为 15 - 30°C ,时间可以为5-25分钟,光强可以为20-100mW/cm²,光照所使用的光为白光,光照的波长可以为400-800nm。由于白光为复合光,所以波长并不是一个固定数值。

[0041] 在本发明中,所述含有生物膜的样品可以为含有细菌形成的生物膜的液体样品和/或含有真菌形成的生物膜的液体样品。本发明所述的细菌指的是能够形成生物膜的细菌,具体种类没有特别的限定,例如可以为革兰氏阴性菌和/或革兰氏阳性菌,具体可以为金黄色葡萄球菌,进一步优选为金黄色葡萄球菌ATCC 6538、金黄色葡萄球菌ATCC 25923、金黄色葡萄球菌ATCC 29213、金黄色葡萄球菌V 329和金黄色葡萄球菌SA 113中的至少一种。本发明所述的真菌指的是能够形成生物膜的真菌,具体种类也没有特别的限定,例如可以为白色念珠菌,具体可以为白色念珠菌3153A或SC5314。

[0042] 将接触的时间控制在上述范围内再配合以光照,特别有利于实现破坏生物膜的目的。对于破坏效果,可以通过培养计数的方式进行定量。例如,对细菌而言,所述破坏生物膜的效果可以通过将光照后的体系中的细菌进行培养计数,根据式(III)计算生物膜的抑制率IR:

$$[0043] \quad IR = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%, \quad \text{式 (III)},$$

[0044] 其中,C为与式(I)所示的化合物接触的细菌培养后形成的菌落数,C₀为未与式(I)所示的化合物接触的细菌培养后形成的菌落数。

[0045] 根据本发明一种具体的实施方式,所述破坏生物膜的效果检测步骤可以为:将式(I)所示的化合物与含有生物膜的样品(例如菌液)进行接触并光照之后,超声震荡使生物膜分散;将分散后的细菌稀释一定倍数后,取100μL稀释液铺在固体培养基上,37℃培养20h后数平板上的菌落数;然后根据式(III)计算生物膜的抑制率IR。稀释倍数可以根据细菌数目进行确定,使得固体培养基上的菌落数便于统计。

[0046] 在本发明中,与式(I)所示的化合物接触的含有生物膜的样品的量可以在较大范围内变动,当所述含有生物膜的样品为含有细菌的液体样品时,所述含有生物膜的样品是由包括以下步骤的方法制备得到的:控制细菌的起始数量为10⁴-10⁷个/mL,经过18-30小时的培养形成。温度可以为37±0.5℃。所述接触体系中,式(I)所示的化合物的用量可以在较大范围内变动,例如,可以为1-100μM,优选为20-50μM。

[0047] 在本发明中,所述式(I)所述的化合物在光照条件下产生活性氧,可以通过活性氧探针进行检测,所述活性氧探针的种类可以为本领域的常规选择,例如具体可以为还原态2,7-二氯荧光素(DCFH)。

[0048] 本发明还可以通过荧光显微成像实验对式(I)所示的化合物对生物膜的破坏作用进行检测。根据本发明的一种的具体实施方式,可以通过BacLight死活菌染色试剂盒(购自Invitrogen厂家,货号为L13152)进行染色。BacLight死活菌染色试剂盒包含两种染料:PI和SYTO9。检测原理为:SYTO9可以同时死菌和活菌染色,而PI只能对死菌染色,同时淬灭SYTO9的荧光。最终结果为死菌发红光,活菌发绿光。通过对与式(I)所示的化合物接触和光照之后的生物膜样品进行检测,就可以得出对细菌生物膜的破坏作用的变化情况。例如,未光照组视野中全为绿色,表明细菌全为活菌。随着光照时间的延长,视野中红色增多,则表明式(I)所示的化合物产生的活性氧对生物膜中细菌的破坏作用增强。

[0049] 另外需要说明的是,对式(I)所示的化合物与能够形成而未形成生物膜的样品进行接触后,也可以再进行光照进一步破坏细菌和/或真菌的细胞膜。光照的条件与和式(I)所示的化合物与含有生物膜的样品接触之后的光照的条件可以相同。

[0050] 以下将通过实施例对本发明进行详细描述。

[0051] 在以下实施例中,

[0052] 金黄色葡萄球菌ATCC 6538购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),编号为:CGMCC No.1.2386。

[0053] BacLight死活菌染色试剂盒购自Invitrogen厂家,货号为L13152。

[0054] 2,7-二氯荧光素二乙酯(DCFH-DA)购自Sigma-Aldrich厂家,货号为D6883。

[0055] TSB培养基购自美国BD公司,货号为211825。TSBg培养基为TSB培养基中添加0.25

质量%的葡萄糖的培养基。

[0056] PBS为购自Hyclone厂家的货号为SH30256.01的产品。

[0057] 结晶紫购自Sigma-Aldrich厂家,货号为C0775。

[0058] 荧光成像在激光共聚焦扫描显微镜(购自Olympus厂家,型号为FV1000-IX81)仪器上进行。

[0059] 电镜成像在扫描电子显微镜(购自Hitachi厂家,型号为S-4800)上进行。

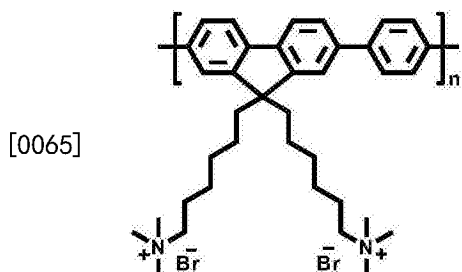
[0060] 其余的化学和生物试剂均为商购获得。

[0061] NB液体培养基组成成分按质量体积比(质量体积比指的是质量与体积的比值,单位g/mL,下同)计:1.0%胰蛋白胨(100mL的NB液体培养基中含有1.0g胰蛋白胨),0.3%牛肉浸取物,0.5%氯化钠,98.2%蒸馏水;NB固体培养基配方为:向NB液体培养基中加入1.5重量%的琼脂。

[0062] 实施例1

[0063] 本实施例用于说明式(I)所示化合物PFP的合成

[0064] PFP的具体结构为:



[0066] 9,9-二(6'-溴己基)-2,7-二溴芴:1,6-二溴己烷(97.6g,400mmol)加入100ml150%的氢氧化钾溶液中,加入1.28g相转移催化剂四丁基溴化铵(TBAB),反应液温度升至75℃,然后加入2,7-二溴芴(12.96g,40mmol)搅拌15min。反应停止并冷却至室温后,二氯甲烷萃取(100ml×3),合并有机相,并分别用1M盐酸溶液和蒸馏水洗涤,无水硫酸镁干燥,过滤,浓缩。粗产物硅胶柱层析分离纯化,展开剂为二氯甲烷/石油醚(v/v=1/9),得白色固体产物9,9-二(6'-溴己基)-2,7-二溴芴21.4g,产率82%。¹H-NMR:(300MHz,CDCl₃,ppm)δ:0.58(m,4H),1.08(m,4H),1.21(m,4H),1.66(m,4H),1.91(m,4H),3.29(m,4H),7.43(s,4H),7.53(s,2H);¹³C-NMR:(100MHz,CDCl₃,ppm)δ:23.53,27.80,29.00,32.67,33.92,40.06,55.06,121.30,126.17,130.38,139.09,152.23.EI(m/z):650(100%)[M⁺]Anal.Calcd for C₂₅H₃₀Br₄(650.15):C,46.14,H,4.614.Found:C,45.95,H,4.61.

[0067] 氮气保护下,将9,9-二(6'-溴己基)-2,7-二溴芴(260mg,0.4mmol)与2',2'-二甲基-1',3'-丙二醇-1,4-苯二硼酸酯(120mg,0.4mmol)加入到6.4mL的THF中,溶解后加入1.6mL碳酸钾溶液(2M)与催化量的钯催化剂PdCl₂(dppf)(20mg),混合液升温至80℃反应2d。反应液冷却至室温后,将THF减压除去,加入氯仿,洗涤两次,将有机相浓缩,滴加到甲醇中沉淀,离心、干燥后得固体产物(115mg,52%)。

[0068] ¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.83(m,6H),7.74-7.62(m,4H),3.30(m,4H),2.10(b,4H),1.81(m,4H),1.39-1.13(m,8H),0.79(b,4H)。

[0069] PFP:将上一步得到的固体产物(57mg,0.1mmol)溶解在5mL的二氯甲烷溶液中,加入过量的三甲胺的甲醇溶液,室温反应5h。将反应生成的沉淀过滤、洗涤,干燥后得目标产

物(60mg,88%)。

[0070] ^1H NMR(400MHz,DMSO-6): δ (ppm) 7.91-7.79(m,10H),3.18(b,4H),2.96(b,>15H),2.18-1.91(m,4H),1.47(b,4H),1.09(b,8H),0.67(b,4H)。

[0071] 实施例2

[0072] 本实施例用于说明金黄色葡萄球菌的复苏培养

[0073] 以金黄色葡萄球菌ATCC 6538为模板,在超净工作台中用75体积%酒精脱脂棉对所购装有金黄色葡萄球菌ATCC 6538的安瓿瓶外表面进行消毒后,用火焰加热其顶端,滴400 μL 无菌水至加热的安瓿瓶顶端使之破裂。吸取300 μL 适宜的液体培养基(可用无菌水代替),滴入安瓿瓶内,轻轻振荡吹打,使冻干菌体溶解呈悬浮状,吸取全部菌悬液,分别移植于两个NB固体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养20小时。用接种环刮取适量菌体画Z型接种到新的NB固体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,如此连续传3-4代培养,获得稳定的菌株,放4 $^{\circ}\text{C}$ 作菌种备用。

[0074] 实施例3

[0075] 本实施例用于说明抑制生物膜的方法

[0076] (1) 生物膜的形成和抑制

[0077] 挑取固体培养基中适量ATCC 6538菌体于NB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下转速180rpm震荡培养10h。用NB培养基调OD₆₀₀值为1.0,取少量菌液(10 μL)稀释100倍于TSBg培养基中。取90 μL 稀释后的菌液与10 μL 不同浓度的PFP混合,置于96孔板中,孔板中PFP的终浓度分别为1 μM 、5 μM 、10 μM 、20 μM 、50 μM 和100 μM 。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中放置24小时。空白对照为加入10 μL 灭菌水,其余操作与实验组一致。

[0078] (2) 抑制生物膜效果的检测

[0079] 取出96孔板,弃去培养基,并用PBS洗三次除去游离的细菌。加入100 μL 的95体积%乙醇固定15分钟,除去乙醇后,放置至板干。加入100 μL 的0.1质量体积%结晶紫染色5分钟,除去结晶紫,用灭菌水洗三次。加入110 μL 的10体积%乙酸溶解结晶紫,检测每孔590nm处吸收值。空白对照记为A₀,加入不同浓度PFP的记为A,金黄色葡萄球菌生物膜存活率(VR)根据式(II)计算,并绘制生物膜形成能力曲线,如图1所示。

[0080]
$$VR = \frac{A}{A_0} \times 100\%, \text{ 式 (II),}$$

[0081] 从图1中可以看出,加入PFP后,金黄色葡萄球菌形成生物膜的能力减弱,且随着PFP浓度的升高,PFP对金黄色葡萄球菌生物膜形成的抑制作用增强。说明PFP能有效抑制金黄色葡萄球菌生物膜的形成。

[0082] 实施例4

[0083] 本实施例用于说明PFP光照后产生的活性氧的检测方法

[0084] 还原态2,7-二氯荧光素(DCFH)的活化:在500 μL 的2,7-二氯荧光素二乙酯(DCFH-DA)中加入2mL的0.01M的NaOH后室温放置30min,再加入10mL磷酸缓冲液(25mM,pH=7.4),混匀冰上暗处储存待用。

[0085] 向90 μL 活化后的DCFH溶液(40 μM)加入10 μL 不同浓度PFP(终浓度分别为5 μM 、10 μM 和20 μM),用光密度为3mW/cm²白光光源照射样品5min,每隔1min测525nm处的荧光值,激发波长为488nm。空白对照为90 μL 活化后的DCFH溶液加入10 μL 灭菌水在光密度为3mW/cm²的白光光源照射5min,每隔1min测525nm处的荧光值,激发波长为488nm,所得525nm处荧光强度

与时间的关系见图2。

[0086] 从图2中可以看出,PFP有很强的产生活性氧的能力,并且随着PFP浓度的升高,产生活性氧的能力变强,可用于光照杀伤周围细菌。

[0087] 实施例5

[0088] 本实施例用于说明PFP破坏生物膜的方法

[0089] (1) 生物膜的形成

[0090] 挑取固体培养基中适量ATCC 6538菌体于NB液体培养基中,37℃下转速180rpm震荡培养10h。用NB培养基调OD₆₀₀值为1.0,取少量菌液(10μL)稀释100倍于TSBg培养基中。取100μL稀释后的菌液置于96孔板中,37℃培养箱中放置24小时。

[0091] (2) 破坏生物膜效果的检测

[0092] 形成生物膜后,弃去96孔板中培养基,用PBS洗3次除去游离的细菌。加入100μL的PFP溶液(终浓度20μM),放入37℃培养箱中放置15min。空白对照为加入100μL的PBS溶液,其余操作与实验组一致。将96孔板于75mW/cm²光强下光照5-25min,超声震荡使生物膜分散。将分散后的细菌稀释3000倍后,取100μL稀释液铺在NB固体培养基上,37℃培养20h后数平板上的菌落数。空白对照组记为C₀,实验组记为C,抑制率(IR)根据式(III)计算,并绘制曲线,如图3所示,

[0093]
$$IR = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100\%, \text{ 式 (III)},$$

[0094] 从图3中可以看出,随着光照时间的延长,PFP对生物膜的破坏作用增强。

[0095] 实施例6

[0096] 本实施例通过荧光显微成像法证明PFP对生物膜破坏作用

[0097] 生物膜的形成过程与实施例5的方法相同。

[0098] 形成生物膜后,弃去96孔板中培养基,用PBS洗3次除去游离的细菌。加入100μL的PFP溶液(终浓度20μM),放入37℃培养箱中放置15min。空白对照为加入100μL的PBS溶液,其余操作与实验组一致。将96孔板于75mW/cm²光强下光照5-25min后,弃去PFP溶液,用PBS洗两次后,用BacLight死活菌染色试剂盒进行染色。最后进行CLSM表征,采集样品的明场和荧光场,对于SYT09激发波长为488nm,PI为559nm。统计每个视野中绿色荧光和红色荧光的数值,用绿色荧光值除以红色荧光值得到活菌与死菌的比率,结果如图4所示。

[0099] 从图4中可以看出,加入PFP后,随着光照时间的延长,活菌数逐渐减少,死菌数逐渐增多,表明PFP对生物膜的破坏作用于光照时间呈正相关。

[0100] 实施例7

[0101] 本实施例通过电镜说明PFP对生物膜破坏作用

[0102] (1) 生物膜的形成

[0103] 挑取固体培养基中适量ATCC 6538菌体于NB液体培养基中,37℃下转速180rpm震荡培养10h。用NB培养基调OD₆₀₀值为1.0,取少量菌液稀释100倍于TSBg培养基中。取500μL稀释后的菌液于24孔板中(提前放置好Thermanox塑料盖玻片),37℃培养箱中放置24小时。

[0104] (2) 电镜成像

[0105] 形成生物膜后,弃去24孔板中培养基,用PBS洗3次除去游离的细菌。加入500μL的PFP溶液(终浓度20μM),放入37℃培养箱中放置15min。空白对照为加入500μL的PBS溶液,其

余操作与实验组一致。将24孔板于75mW/cm²光强下光照5-25min后,弃去PFP溶液,用PBS洗两次后,加入含有0.5体积%戊二醛的PBS溶液,4℃固定过夜。样品用超纯水洗涤2次后,依次用体积百分含量分别为20%、40%、50%、70%、90%和100%乙醇梯度脱水,每次5min。待样品自然干燥后,真空冷冻干燥2h,样品喷金处理后可进行表征。结果如图5所示。

[0106] 从图5中可以看出,没有光照条件下,可以看到细菌成团且被胞外基质紧密包裹。随着光照时间的延长,细菌团块变小,并且能观察到明显的细菌脱落,进一步证明了PFP产生的活性氧对生物膜有破坏作用。

[0107] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0108] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合。为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0109] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。

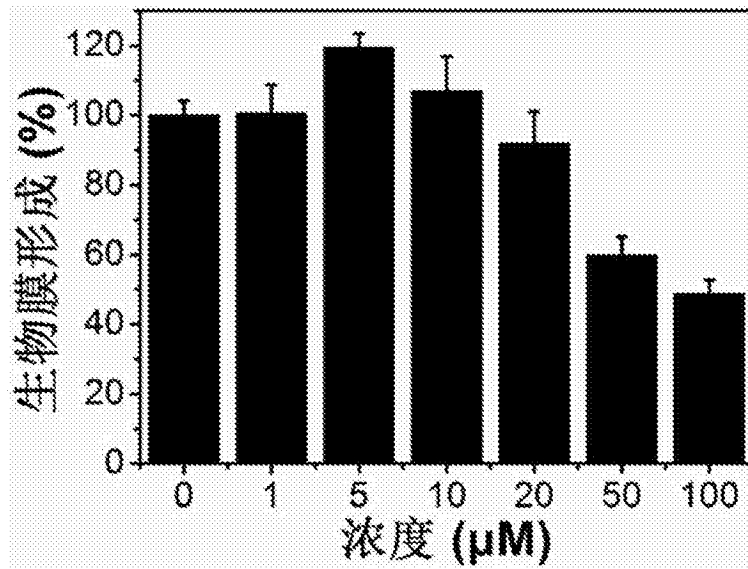


图1

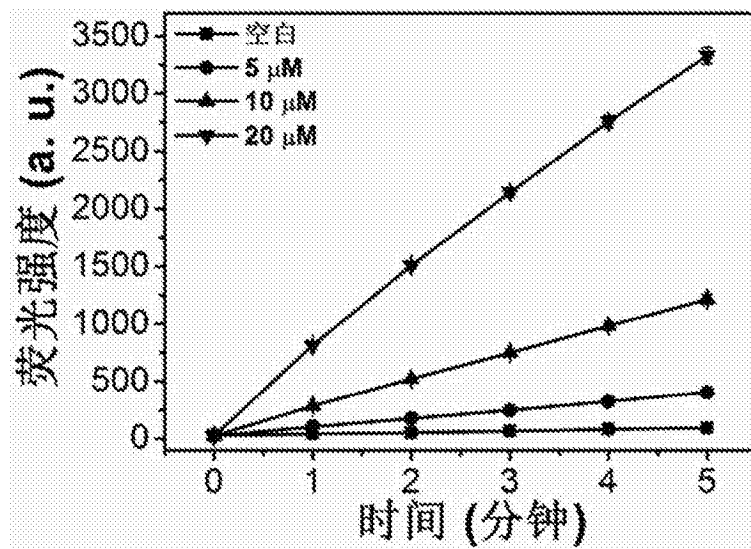


图2

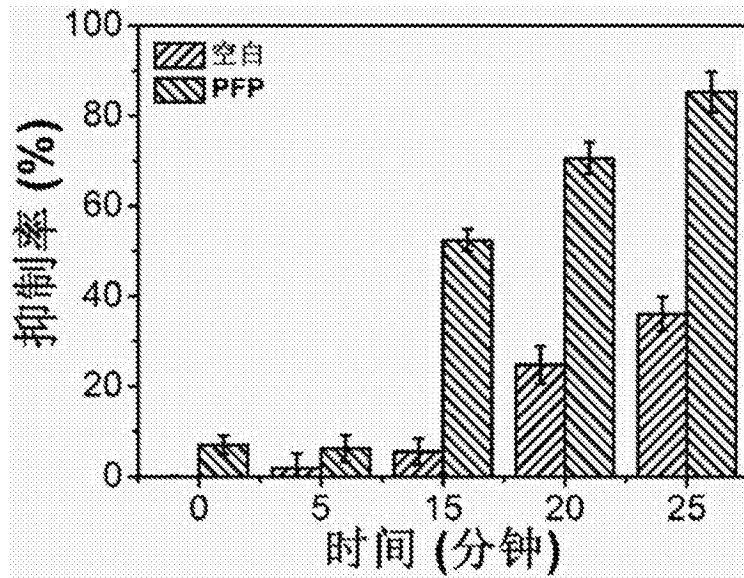


图3

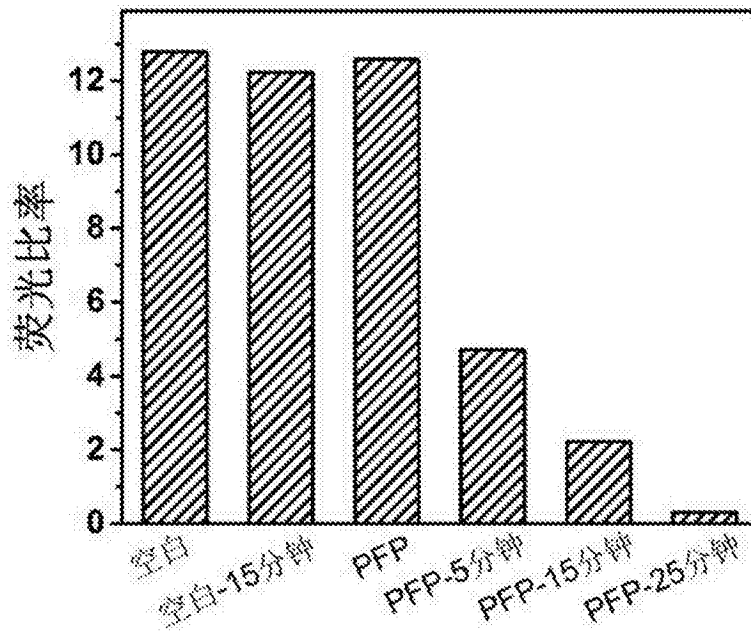


图4

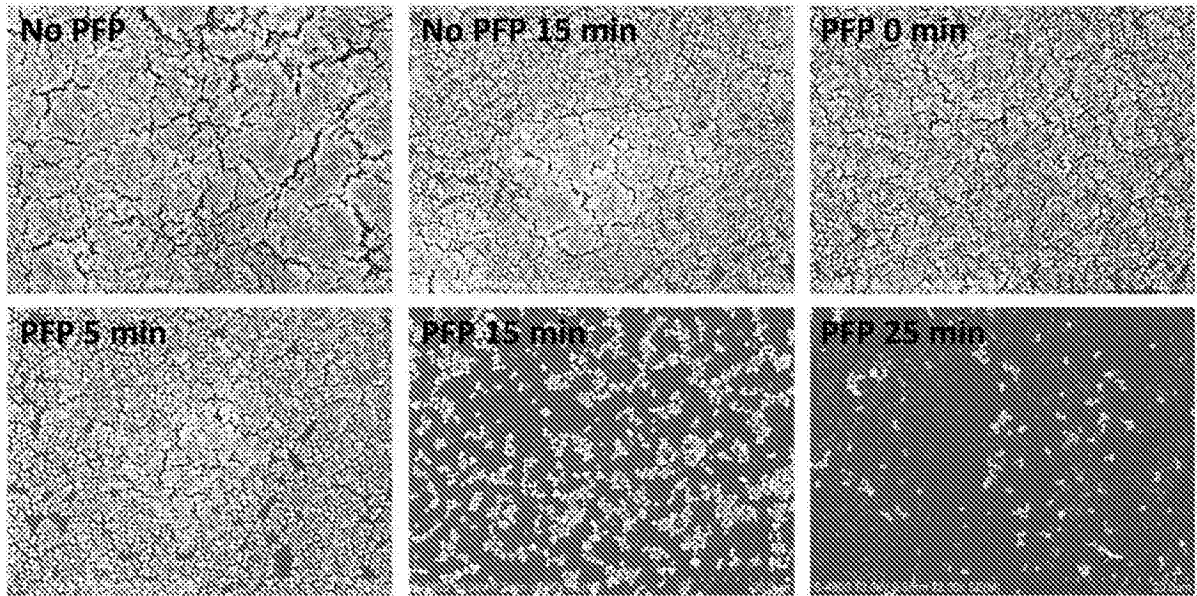


图5