

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 35/64 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03809944.6

[45] 授权公告日 2009年6月10日

[11] 授权公告号 CN 100496514C

[22] 申请日 2003.3.6 [21] 申请号 03809944.6

[30] 优先权

[32] 2002.3.9 [33] GB [31] 0205593.7

[86] 国际申请 PCT/GB2003/000959 2003.3.6

[87] 国际公布 WO2003/075654 英 2003.9.18

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.2

[73] 专利权人 英国国防部

地址 英国威尔特郡

[72] 发明人 D·I·普里查德

[56] 参考文献

WO 03013557A 2003.2.20

审查员 王孟佳

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李连涛 王景朝

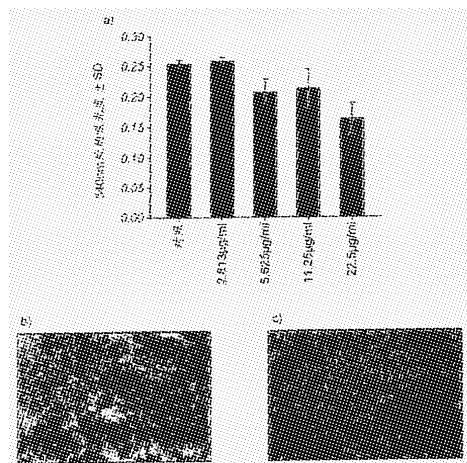
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 10 页

[54] 发明名称

细菌聚集表面的处理

[57] 摘要

本发明提供了通过与具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质接触来处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的表面,其中所述的具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质获自丽蝇、丝光绿蝇 (*Lucilia sericata*) 幼虫的分泌物和/或排泄物。此外,当所述的幼虫分泌物/排泄物与抗生素,例如四环素结合使用时可获得协同作用。这些获自丝光绿蝇幼虫分泌物和/或排泄物的具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质也构成了本发明的一部分。



1. 一种处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的表面的方法，其包括使获自丝光绿蝇的分泌物/排泄物具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质与表面接触。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述的表面选自金属表面、玻璃表面和塑料材料的表面。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述的表面为医疗装置或植入物的表面。

4. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中所述的能够产生生物薄膜的细菌为铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

5. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中在包括另外一种或多种抗生素化合物的组合物中提供所述的物质。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中所述的抗生素化合物为四环素。

7. 一种包括分离自丝光绿蝇的分泌物/排泄物或其类似物以及一种或多种抗生素化合物的抗微生物的组合物。

8. 根据权利要求 7 的组合物，其中所述的抗生素化合物为四环素。

9. 一种用于生物薄膜降解的组合物，它包括作为活性成分的分自丝光绿蝇的分泌物/排泄物的具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质或其类似物以及载体。

10. 一种用于处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的伤口表面的组合物，它包括作为活性成分的分自丝光绿蝇的分泌物/排泄物的具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质或其类似物以及载体。

11. 分离自丝光绿蝇的分泌物/排泄物的具有 N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质或其类似物在制备用于处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的伤口表面的药物中的应用。

12. 分离自丝光绿蝇的分泌物/排泄物的具有 N-酰基高丝氨酸

内酯降解活性的物质或其类似物与一种或多种抗生素化合物组合在制备用于处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的伤口表面的药物中的应用。

13. 权利要求 12 的应用，其中所述的抗生素化合物为四环素。

14. 一种用于生物薄膜降解的组合物，它包括作为活性成分的分离自丝光绿蝇分泌物/排泄物的丝氨酸蛋白酶或其类似物以及载体。

15. 一种用于生物薄膜降解的组合物，它包括作为活性成分的分离自丝光绿蝇分泌物/排泄物的糖苷酶或其类似物以及载体。

16. 一种抗微生物的组合物，它包括作为活性成分的分离自丝光绿蝇分泌物/排泄物的具有天蚕素类活性的物质或其类似物以及载体。

17. 根据权利要求 9-10、14-16 中任意一项的组合物，其含有另外的一种或多种抗生素化合物。

18. 根据权利要求 17 的组合物，其中所述的抗生素化合物为四环素。

19. 一种含有获自丝光绿蝇幼虫的无细胞血淋巴的抗微生物的组合物，其中让丝光绿蝇幼虫生长在存在铜绿假单胞菌或所述血淋巴的一种或多种活性组分或该组分的合成类似物的条件下。

20. 一种含有权利要求 7-10、14-19 中任意一项的组合物以及载体的伤口敷料。

细菌聚集表面的处理

本发明涉及一种利用丝光绿蝇的幼虫的分泌物处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的表面的方法以及可用于此方法的组合物。

生物薄膜是在表面生长并且持续存在的生物膜。它们可存在于运输或处理流体的工业设备的表面上、管道系统中以及在与这些设备或系统邻近的表面上。它们通常存在于医用植入物或插入到体内的装置的表面上。它们也可形成于暴露于空气的身体的区域；尤其是它们可存在于伤口中以及在肺的内层上。生物薄膜可被描述成包围在粘附于表面的多糖基质内的细菌群落。

生物薄膜通常为稳定的形式，通过传统方法很难对其进行处理。这取决于其中包埋了微生物的多糖生物薄膜基质的保护特性。

常规的药物，诸如抗生素受生物薄膜中微生物的扩散壁垒或改变的新陈代谢状态的影响而效果较小。

生物薄膜的形成被认为与微生物通过被称为密度感受的过程进行的可扩散的信号分子的产生相关。这些分子被认为通过微生物启动外多糖、外蛋白质及其它次级代谢产物的产生。干扰这些分子作用的化合物可抑制生物薄膜的形成和/或削弱已经形成的生物薄膜。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种最普通和最成问题的传染性细菌。尤其是其形成的生物薄膜很难用常规的抗生素处理。铜绿假单胞菌形成的生物薄膜对于具有囊状纤维化的患者是非常严重的问题，其中铜绿假单胞菌在所述患者的肺中繁殖会引起很难治疗且最终常常致死的感染。

有效的伤口愈合是一个复杂的生理过程，其涉及许多的机制包括细胞迁移、生长因子的分泌、血管生成、组织 n lelling 以及有助于以协调以及以明显分阶段的方式来促进受控的组织再生的伤口的固有蛋白酶/抗蛋白酶平衡。

伤口护理产品在现代医疗实践中是必要的，尤其是用于慢性创伤或烧伤患者的治疗。许多不同的物质以前被认为具有有助于伤口愈合的活性。这些以前所讨论的物质包括链激酶、胶原酶以及链道酶(全部获自细菌来源)、菠萝蛋白酶(来自菠萝)、纤溶酶和胰蛋白酶(获自

牛)以及磷虾酶(获自甲壳纲动物)。临床试验的数据显示这些物质仅对促进伤口愈合部分地有效。

已知作为活生物体的丽蝇(green bottle fly)、丝光绿蝇的幼虫(蛆)具有显著的伤口愈合特性。利用丝光绿蝇幼虫进行的清创术治疗已成为被广泛接受的临床应用。然而,在文献中很少有关于此方式的报道,其中这些幼虫能够将伤口净化到通常非妥协性的伤口愈合的程度。愈合可以是机械的、生化的或两者相结合的方式。我们的工作表明了可以利用体外分泌物来模仿这些幼虫的作用。

尽管是有效的,然而活幼虫对许多来说是使人厌恶的,并且通过在伤口上利用活幼虫以及当使用幼虫时不可避免地将它们的天然分泌物导入到伤口中,对于许多病人和对许多医疗工作者来说是无法接受的。使用活的生物体也增加了患者发生过敏性反应的危险。

已知丝光绿蝇幼虫的排泄物/分泌物(ES)含有一种显示出胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶活性的酶。本发明是基于发现了体外的ES也具有破坏细菌产生的低分子量信号分子的能力来测定细菌群落的密度,并且因此破坏生物薄膜所赖以形成的细菌信息网络。

本发明的第一个方面提供了一种处理聚集了能产生生物薄膜的细菌的表面的方法,其包括用获自丝光绿蝇分泌物/排泄物的具有N-酰基高丝氨酸内酯降解活性的物质接触表面。典型地,所述的能产生生物薄膜的细菌为铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌。

目前通常比较接受的对生物薄膜的研究是更接近于细菌存在的自然模式而不是更广泛地研究浮游生物的系统。Thomas S.等, *J. Tissue Viability*, 1999 Vol 9 No. 4 p127-132 报道了丝光绿蝇幼虫的分泌物针对浮游细菌细胞的抗微生物活性。我们尚不能重复这些结果。然而,在我们的实验中,我们已经发现在实验室的条件下,丝光绿蝇幼虫的分泌物具有阻止或减少细菌性的生物薄膜形成的活性。去除伤口中的细菌性的生物薄膜在与感染进行的斗争中将是有益的。

我们的实验显示作为细菌性的生物薄膜的一部分而形成的外多糖被通过丝光绿蝇分泌物的作用去除。这些作用有说服力地表明了分泌物中存在糖苷酶活性。

慢性伤口的愈合已被证明由于细菌感染的存在而削弱。感染的水平影响愈合和恶化之间的平衡。导致伤口组织缺氧和病变作用的细菌

是有效愈合的阻碍。

众所周知，可扩散的低分子量的信号分子允许单独的细菌来测定群体密度，并且因此当集聚“密度”时以一种协调的方式进行作用。这些作用，通常被称为“密度感受”，现在已知它调控病原体中毒性决定因子的产生，因此确保感染危险期的巩固的攻击。已知低分子量的信号分子(密度感受分子)包括 N-酰基高丝氨酸内酯，例如，来自铜绿假单胞菌(参见图 1)的 N-丁酰基 L-高丝氨酸内酯(BHL)和 N-(3-氧代十二烷基)-L-高丝氨酸内酯(OdDHL)。内酯也引起真核生物组织中的细胞程序性死亡，因此在抵抗伤口愈合所需的组织再生中起作用。显然破坏这些信号分子将减少细菌对宿主组织的有效攻击的能力。我们通过实验表明，丝光绿蝇幼虫的分泌物具有降解 BHL 和较小程度的降解 OdDHL 的活性。一旦细菌形成一种生物薄膜，BHL 被认为是更有活性的。我们已发现这些活性为热稳定的，然而对苯基甲磺酰氟(PMSF)和 4-氨基苯基-甲磺酰氟(APMSF)是敏感的，已知其中所述的苯基甲磺酰氟(PMSF)和 4-氨基苯基-甲磺酰氟(APMSF)抑制丝氨酸蛋白酶和酯酶的活性。

来自丝光绿蝇幼虫的分泌物可以通过用磷酸盐缓冲液洗涤无菌的幼虫，然后在无菌的条件下过滤来收集。

我们令人惊讶地发现，当幼虫的分泌物与常规的抗生素诸如四环素结合使用时，具有大于幼虫分泌物和抗生素分别单独地使用时的各自的作用。因此，当组合使用时这些单独的物质之间具有某些协同作用。因此，根据进一步的方面，本发明提供了包括丝光绿蝇幼虫的分泌物和一种或多种抗生素化合物的抗微生物组合物。在一个优选的实施方案中，所述的抗生素化合物为四环素。

在我们研究的过程中，我们意识到幼虫分泌物的很多重要组分可能被忽略了，如它们可以是在血淋巴或其它组织中通过暴露于细菌就可诱导的(如 Hoffmann 等在 *Drosophila melanogaster* 中描述的(1999))而不是组成型表达的。因此，我们测试了在体外暴露于用于在血淋巴中产生抗微生物化合物的细菌之后表型改变的丝光绿蝇幼虫。

可利用任意已知的皮肤传递系统或输入到无菌载体诸如膏药中以敷料的形式将添加或者没有添加常规抗生素的无菌分泌物输送到伤口区域上，来用于伤口区域。

实验

用于制备丝光绿蝇 (*L. sericata*) 分泌物的方法

1 日龄的 (1st 龄虫) 叉叶绿蝇丝光绿蝇的幼虫购自 Surgical Materials Testing Laboratory (SMTL) Bridgend.

在无菌条件下饲养且利用无菌设备以及在层流橱柜中收集所有这些丝光绿蝇幼虫的分泌物。在向每一通用样品 (含有大约 200 个幼虫) 中添加 200 μ l 磷酸的缓冲盐水溶液 (PBS) 后, 收集分泌物。在移取 (无菌移液管)、离心 (13,000 \times g 10 分钟) 和冷冻 (-20 $^{\circ}$ C) 分泌物之前用 PBS 洗涤幼虫。在第二次洗涤之前, 让幼虫休息 40 分钟, 然后重复进行第三次洗涤。

测定所收集的分泌物的蛋白质含量 (BioRad 蛋白测定试验) 和蛋白酶活性 (异硫氰胺荧光素标记的 (FITC) 酪蛋白)。无菌过滤分泌物 (22 μ m 过滤) 并等分备用且在 -20 $^{\circ}$ C 储藏。

1. 丝光绿蝇 ES 与常规抗生素的协同作用

利用最小抑菌浓度试验在 96 孔平皿中测定抑制浮游细菌生长的 ES 的浓度-通过在 492 nm 处吸光率的增加来测定生长。

与 Thomas 等 (1999) 的观察进行比较的结果表明, 由丝光绿蝇在无菌条件下生长产生的 ES 对革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌 (分别为金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌) 的生长没有抗生作用 (图 2)。

类似地, 在 492nm 处进行 24h 的吸收之后, 比较 ES 和加热变性 (沸腾 10 分钟) 的 ES 以及常规抗生素四环素对铜绿假单胞菌生长的影响 (图 3)。10 μ g / ml 四环素完全破坏生长。相比之下, 活性的 ES 显示通过此方法测定的生长的微弱增强 (可能取决于生物薄膜剥离-参见下面的图 4)。然而, 利用亚致命水平的四环素与 ES 结合, 发现在降低细菌生长的这两者之间具有协同效应 (图 4)。这也通过用 24 小时后的菌落数来证实, 其中发现四环素和活性 ES 的组合将活菌数减少了三分之一。

结论是, 单独的丝光绿蝇分泌物对浮游条件下的细菌生长不具有抗生作用, 然而与常规的抗生素四环素一起具有协同效应。

2. 在存在丝光绿蝇 ES 的条件下减少生物薄膜的形成

目前通常比较接受的是, 对生物薄膜的研究是更接近于细菌存在的自然模式, 而不是更广泛使用的但是不适当的浮游生物系统。去除

伤口中的细菌性生物薄膜在与感染进行的斗争中将是有利的。

利用 O'Toole 和 Kolter (1999) 的结晶紫法测定在存在丝光绿蝇 ES 时生物薄膜形成的减少。

在 96 孔平皿中培养生长 24h, 然后在去除浮游细菌之后测定附着的细菌(参见第 3 部分)。在溶解和在 540nm 处测定染色的吸光率之前用结晶紫染料染色所附着的细菌。在丝光绿蝇 ES 的存在下, 测定金黄色葡萄球菌生物薄膜在生物薄膜形成中的剂量反应减少达 24 之久(图 5a)。在 ES 存在时温育盖玻片的培养生长中, 在铜绿假单胞菌生物薄膜形成中发现类似的减少。利用 Baclight 染色来显像微菌落(图 5b 和 5c)。

结论是, 在实验室的条件下丝光绿蝇分泌物对于阻止细菌膜的形成是有活性的。

3. 丝光绿蝇 ES 产物的糖苷酶活性

当培养物在存在丝光绿蝇 ES 产物的条件下生长时, 在产生生物薄膜的条件下生长的培养物中回收的细胞显示出了差异。培养物在 96 孔微滴定板中的 100 μ L 等分试样中生长。与烧瓶生长培养相比, 这样具有增加液体与塑料孔表面接触的表面面积的作用, 由此促进了生物薄膜的增长。从过夜的培养物接种铜绿假单胞菌并生长到早期的指数生长期, 然后稀释(1/2000)来得到 $\sim 10^3$ 个细胞/孔。培养物然后在存在 ES、灭活 ES (沸腾 10min) 或磷酸盐缓冲液(对照)的条件下生长。37 $^{\circ}$ C 过夜培养培养物, 然后收集每一种等分试样并离心(13,000 \times g 10 分钟)回收细胞。结果表明(图 6), 在对照和灭活 ES 样本中存在的“粘液层”, 而在活性 ES 存在时却不存在。加入活性 ES 的等分试样到样本 D (变性 ES) 中, 然后在 37 $^{\circ}$ C 温育过夜导致最初形成的粘液层被除去。我们认为粘液层可能包括作为生物薄膜的一部分的外多糖, 并且通过丝光绿蝇 ES 中的糖苷酶可使其去除。就铜绿假单胞菌而言, 人们认为其外多糖是藻酸盐(一种由古洛糖醛酸和甘露糖醛酸构成的聚合物)。

结论是: 酶催化除去外多糖将降低细菌形成有效的生物薄膜并且因此在伤口中形成一种有效的感染的能力。

4. 通过来自丝光绿蝇排泄/分泌产物(ES)的热稳定的 PMSF / APMSF -敏感的活性(内酯酶)使铜绿假单胞菌的密度感受信号分子失

活

可利用薄层色谱法(TLC)测定 BHL 和 OdDHL(分别为 RP18F_{254S} 或 RP2 UV₂₅₄ 板)。在色谱层析之后,信号分子的位置和量可以通过它们对生物传感器生物的影响来显示。当和 BHL 或 HL 接触时,所使用的特定生物会发光。因此,如果将 TLC 板用含有生物传感器生物的软琼脂覆盖,则温育一段时期后,通过光线的发射显示了信号分子的位置。通过转换成假的颜色显示了发射光的强度,其中最强烈的光显示为黄色并且渐变为最弱的-深蓝色(附图 7-侧面的条棒)。

通过下列的温育测试丝光绿蝇分泌物对 BHL 的作用:

1. 100 μ l ES (120 μ g/ml 蛋白) +100 μ M BHL
2. 100 μ l 沸腾的 ES (120 μ g/ml 蛋白) +100 μ M BHL
3. 100 μ l ES (120 μ g/ml 蛋白) +100 μ M BHL
4. 用 APMSF (2mM)预温育的 100 μ l ES (120 μ g/ml 蛋白) +100 μ M BHL
5. 在缓冲液(磷酸盐缓冲液)中的 100 μ MBHL

温育 6 小时后,每一温育的 1 μ l 被用于 RP18F_{254S} TLC 板并在如上所述利用生物传感器覆盖来显示 BHL 之前用 60% (v/v) 甲醇/水进行分离。

结果(图 7)证实了幼虫 ES 对降低 BHL 的作用。阳性对照(泳道 5)表明光产生来自单独的 BHL。在幼虫 ES(泳道 1)存在下与 BHL 一起温育时光产生降低(泳道 1),表明了信号分子的降解。通过将 ES 与苯基甲磺酰氟(PMSF)(泳道 4)一起预温育阻止了此降解以及通过将 ES 与 4-氨基苯基-甲磺酰氟(APMSF)一起预温育在较低的程度阻止了此降解(泳道 3)(丝氨酸蛋白酶活性的抑制剂)。煮沸的 ES(泳道 2)没有阻止降低,由此表明了活性的热稳定性。

此外,实验证实了 ES 对在 6 小时的温育开始时和结束时采集的 OdDHL(附图 8 和 9)比较样品有类似的作用。

这一次,在 RP2 / UV₂₅₄ 板上利用 45% (v/v) 甲醇/水进行色谱层析。降解导致了第二种物质的出现,确信它为 OdDHL 分子的开环。这有待于通过柱层析(通过 C18 柱进行高效液相色谱)来证实。同样,该降解对煮沸是稳定的但其受 PMSF 抑制和在较少程度上受 APMSF 抑制。

结论是,丝光绿蝇幼虫 ES 具有对能降解 BHL 和 OdDHL 的 PMSF 和

APMSF 敏感的热稳定活性，其中的 BHL 和 OddHL 是两种涉及铜绿假单胞菌的生物薄膜形成和感染并且由此与伤口愈合有关的信号分子。

5. 丝光绿蝇中抗微生物活性的诱导

丝光绿蝇的无菌幼虫获自 Surgical Materials Testing Laboratory SMTL (Princess of Wales Hospital, Bridgend CF31 1 RQ)。

将幼虫培养在 Sherman (1995) 所描述的培养基上，该培养基包括分解的猪肝和细菌培养用琼脂，用在密闭容器中的高压灭菌器进行杀菌，其中的密闭容器允许气体和湿气在容器的内部和外部之间交换但其阻止细菌进入到容器中。在容器的基体中提供用于幼虫的培养基的薄膜层。

将无菌的第一龄幼虫 (200 个) 悬浮在 $200\ \mu\text{l}$ 的无菌磷酸盐缓冲液中并转入到容器中。在保湿室中在 $28\ ^\circ\text{C}$ 的无菌条件下培养 48 个小时，来允许幼虫的产生。将铜绿假单胞菌的突变体 PAO P47 接种到 10ml Luria Bertani (LB) 培养基中并在 $37\ ^\circ\text{C}$ 振荡培养过夜。给容器接种 1ml ($\sim 10^8$ 活菌数) 的培养物并且允许幼虫在细菌的存在下培养。在另一 48h 之后，处死幼虫并在脊前部切口收集血淋巴。微离心 ($13,000\times g$ 持续 10 分钟) 血淋巴以除去细胞。

通过在含有大肠杆菌 D31 的细菌菌苔中的 $2\ \mu\text{l}$ 血淋巴的微孔周围无菌噬菌斑的形成来评估抗微生物的活性。接种 $1\ \mu\text{l}$ 的培养物到 7ml 的熔化 ($50\ ^\circ\text{C}$) 的含有 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素和 $5\text{mg}\ \dots\ \text{yso}$ 酶的 1%LB 琼脂中来制备平板。这些在无菌皮式培养皿中形成。利用模板以距离平板边缘等间距的规则模式来形成微孔 (8)。通过与用 $2\ \mu\text{l}$ 分别为 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 和 $0.1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的天蚕素 B (Sigma) 产生的噬菌斑进行比较来评估抗微生物活性 (附图 10)。通过铜绿假单胞菌诱导 48h 之后获得的血淋巴产生的 5mm 直径的抗微生物噬菌斑大于那些用 $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 标准的天蚕素产生的抗微生物噬菌斑 (4.25mm) 但小于用 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 标准的天蚕素产生的抗微生物噬菌斑 (8mm)。

结论是，通过在培养过程中暴露于铜绿假单胞菌诱导后，在丝光绿蝇的血淋巴中发现了抗细菌活性。

参考文献

OT'oolle, G. A. 和 Kolter, R. (1999), 通过多重的、收敛的信号途径引发荧光假单胞菌 WCS365 中生物薄膜的形成: 一种遗传分析, *Molecular Microbiology* 28: 449-461.

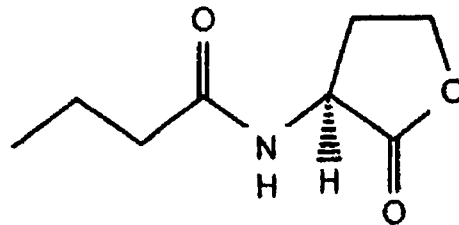
Sherman, R. A. 和 Tran, J. M. (1995), 用于饲养丝光绿蝇 (*Diptera; Calliphoridae*) 幼虫的简单的无菌食物来源, *Medical and Veterinary Entomology* 9: 393-398.

Thomas, S., Andrews, A. M., Hay, N. P. 和 Bourgoise, S. (1999) 蛆分泌物的抗微生物活性: 初步研究的结果, *J. Tissue Viability* 9 : 127-132.

Hoffmann, J. A. , Kefatos, F. C. , Janeway, C. A. 和 Ezekowitz, R. A. B. (1999), 先天免疫中的系统发育前景, *Science* 284: 1313-1318.

来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的
密度感受信号分子

BHL (N-丁酰基 L-高丝氨酸内酯)



OdDHL (N-(3-氧代十二碳烷酰基) L-高丝氨酸内酯)

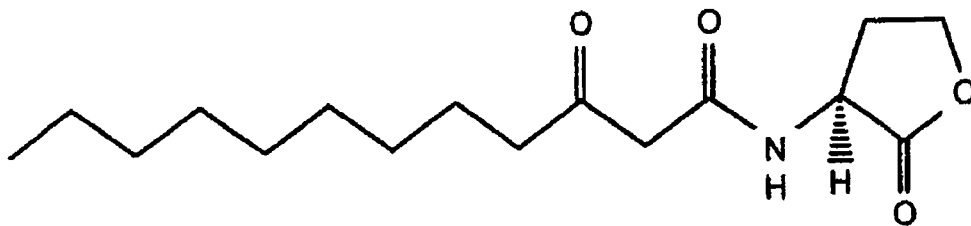
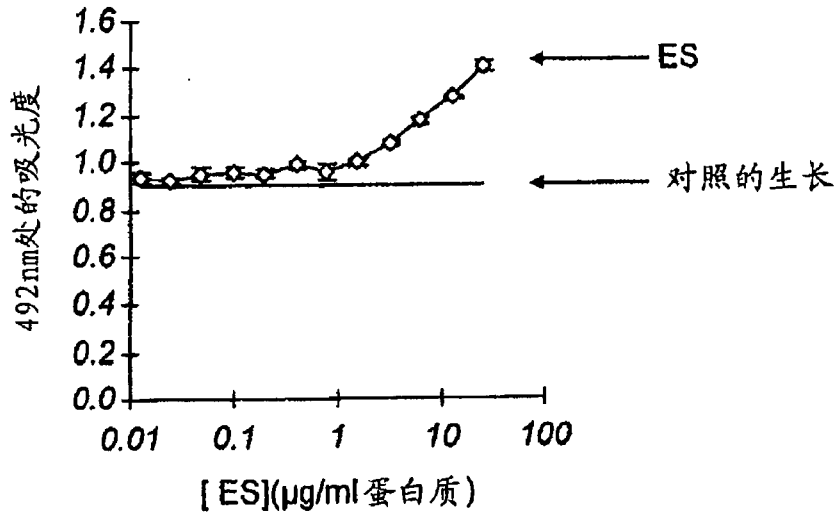
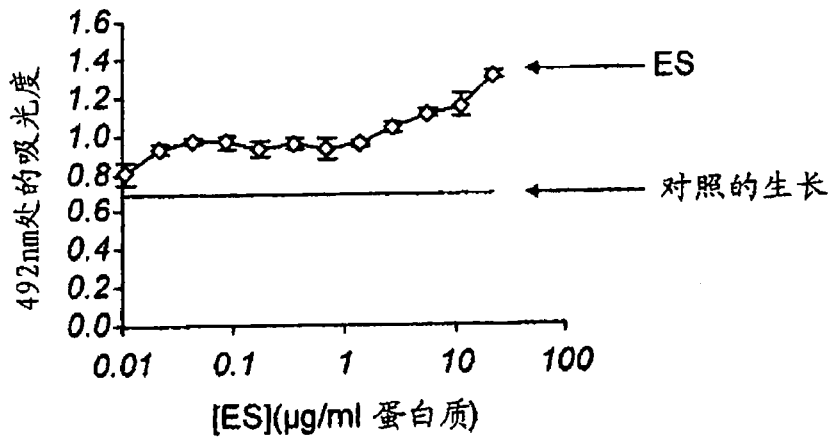


图 1

24小时后，[ES]对金黄色葡萄球菌生长的影响



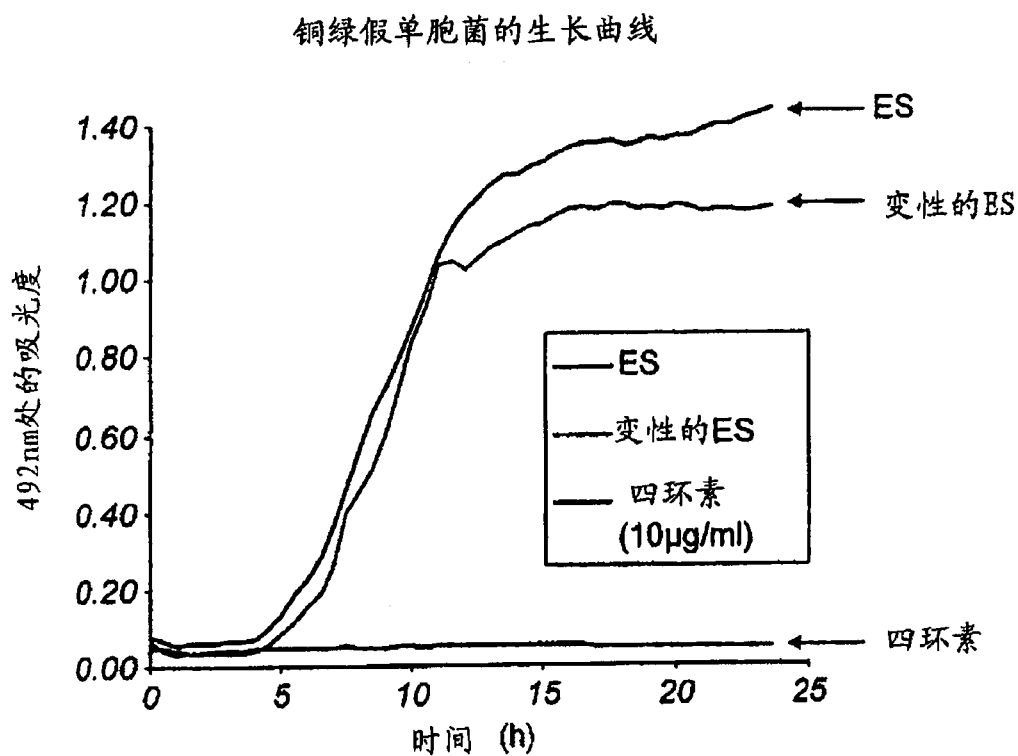
24小时后，[ES]对铜绿假单胞菌生长的影响



ES对铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌浮游生长的作用。

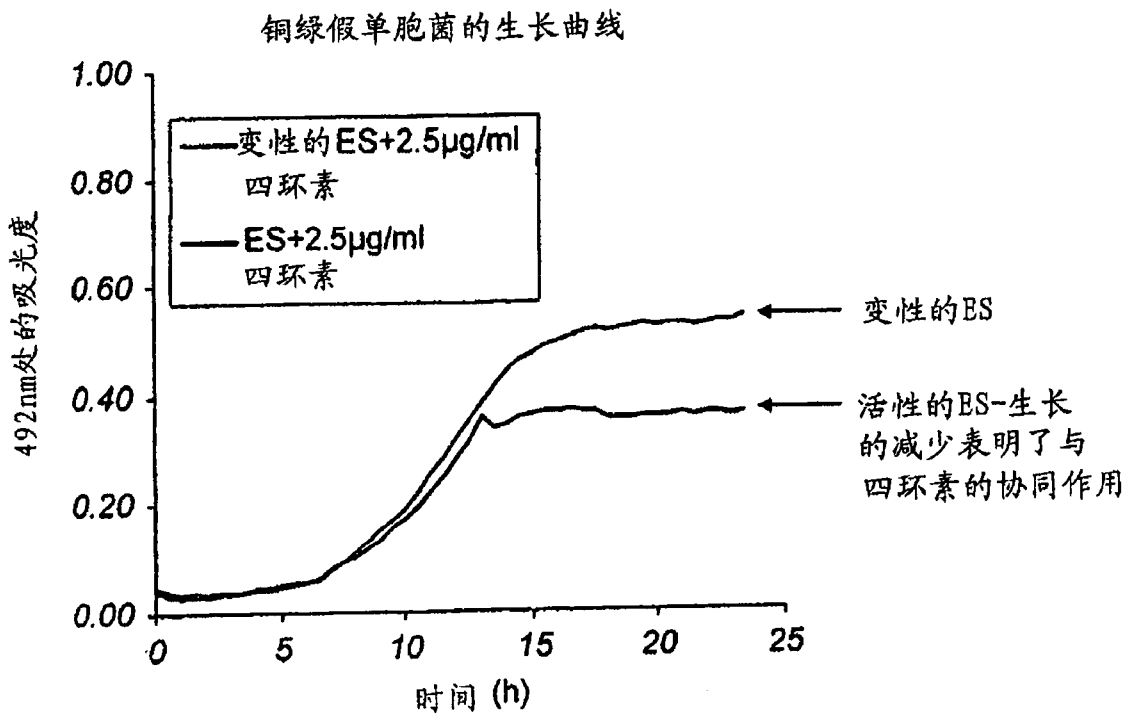
早期对数生长期的细菌 (~1000个生物体/孔) 在96孔平板中的PBS中在ES稀释液存在下在37℃生长24小时。通过在492nm处的吸光率来测定该生长。

图 2



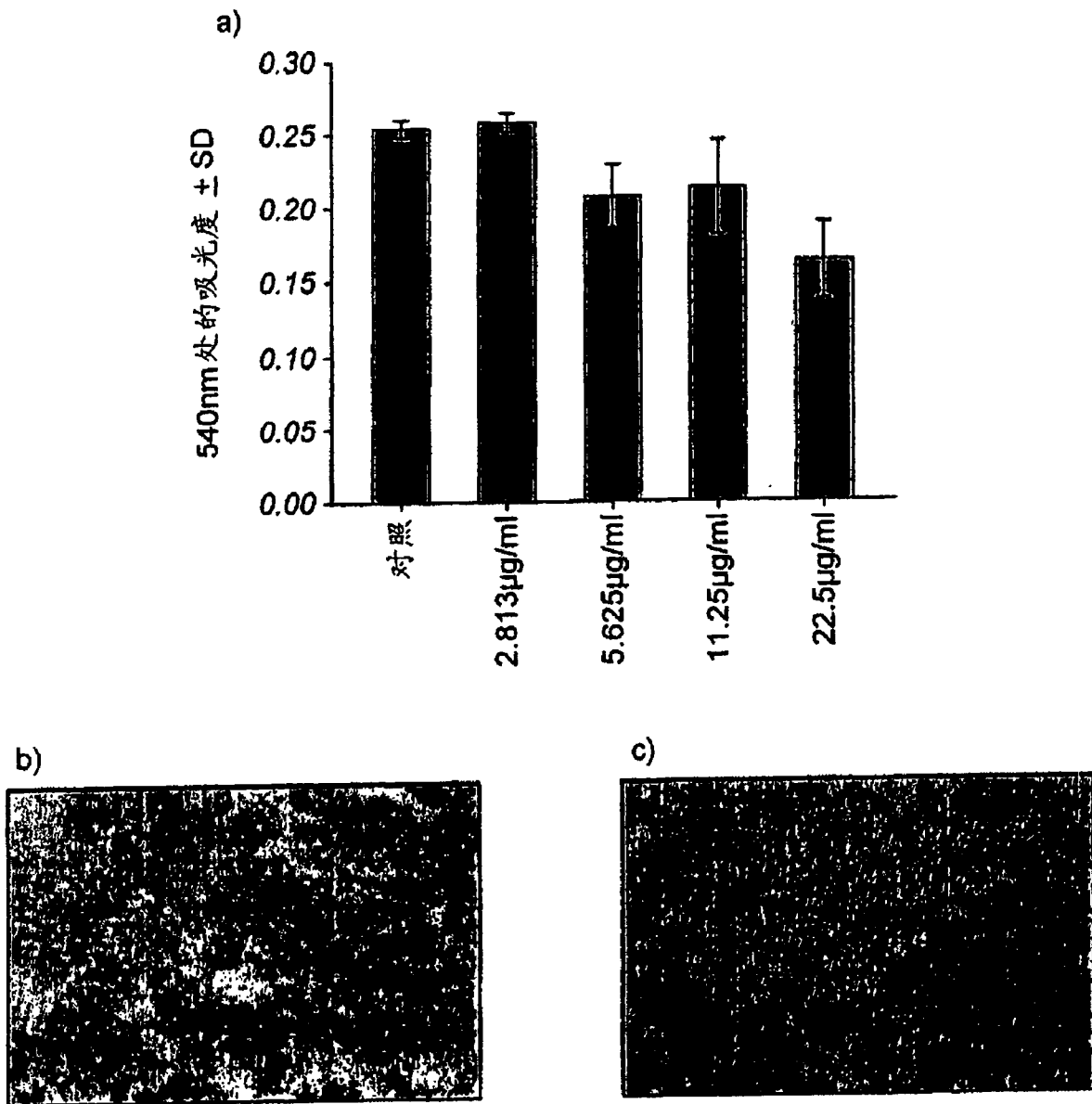
通过492nm处的吸光率用24小时的时间测定ES、变性的ES或四环素对铜绿假单胞菌的浮游生长的作用。与变性形式的相比较，在存在ES时在24h后的吸光率比较高，其可能是由于酶催化从孔中除去了附着的生物

图 3



通过在492nm处的吸光率用24小时的时间测定的2.5 µg/ml的四环素与活性的以及变性的ES对铜绿假单胞菌浮游生长的影响

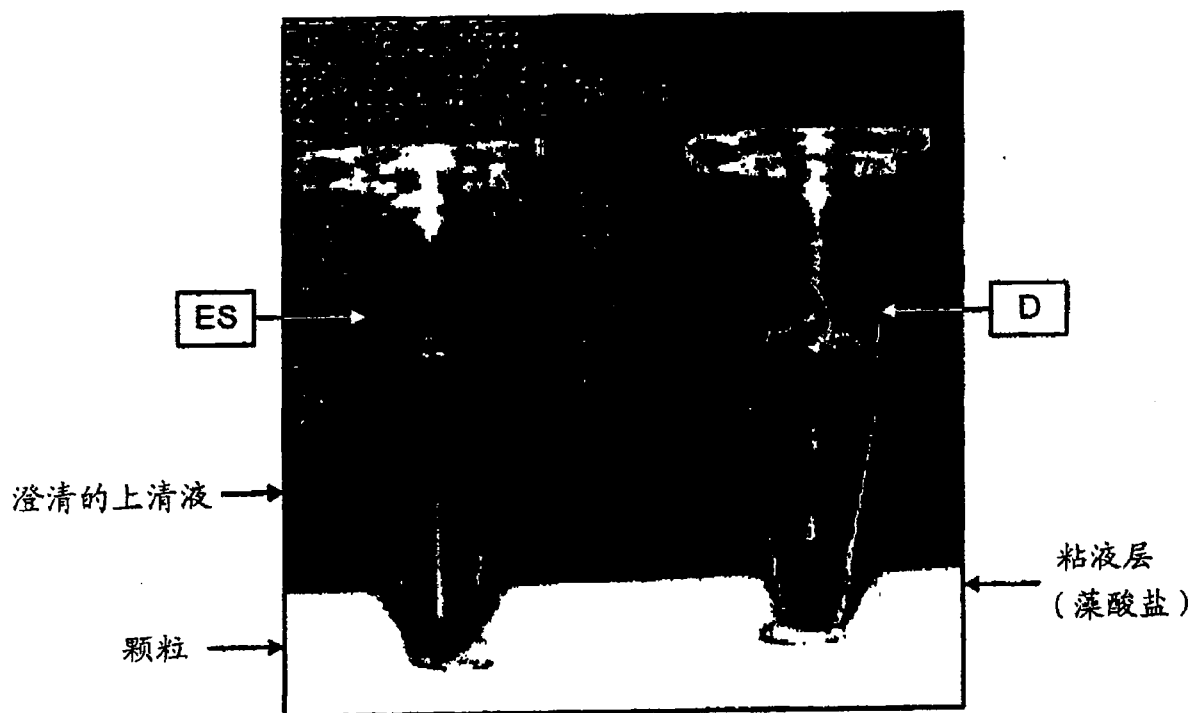
图 4



在丝光绿蝇ES的存在下生物薄膜的形成

a) 丝光绿蝇ES对金黄色葡萄球菌生物薄膜作用，通过监测与粘附细胞结合的溶解的结晶紫在540nm处的吸光率来定量测定。b, c) ES生长对玻璃盖玻片上的铜绿假单胞菌生物薄膜的作用，生长20h之后利用Baclight™染色进行显像，b)代表对照生物薄膜。c)代表在存在丝光绿蝇ES产物(22 µg/ml)条件下的生长

图 5

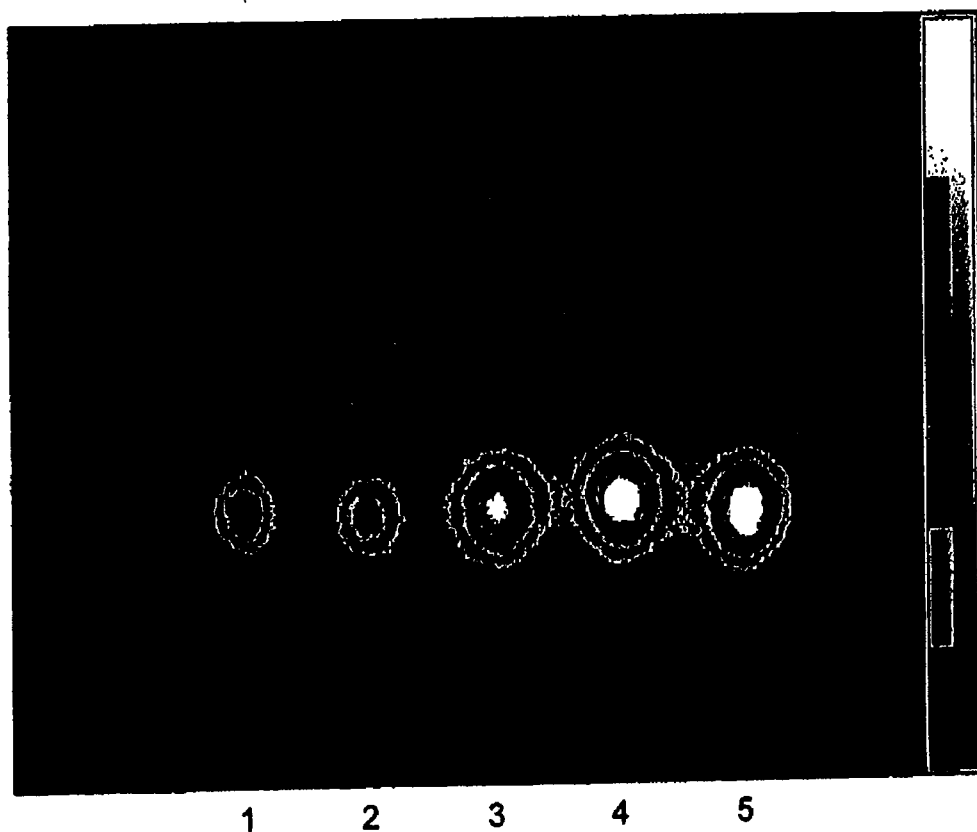


铜绿假单胞菌在含有活性的 (ES) 或变性的 (D) 丝光绿蝇分泌物 ($100 \mu\text{l}$ 在 96 孔微孔板中的等分样品) 的产生生物薄膜的条件下生长 24h, 收集并微离心 ($13,000 \times g$) 10 分钟。通过利用浓缩的苯酚硫酸测定碳水化合物测得粘液层产生 $\sim 500 \mu\text{g/ml}$ 的葡萄糖 (相当的) 的浓度。

随后通过与 $2.5 \mu\text{g}$ 的活性 ES 一起温育 (在 37°C 下 18h) 除去对照 (D) 粘液层。

图 6

通过丝光绿蝇ES对BHL的降解 - 煮沸的以及和抑制剂PMSF或APMSF
一起预温育的作用

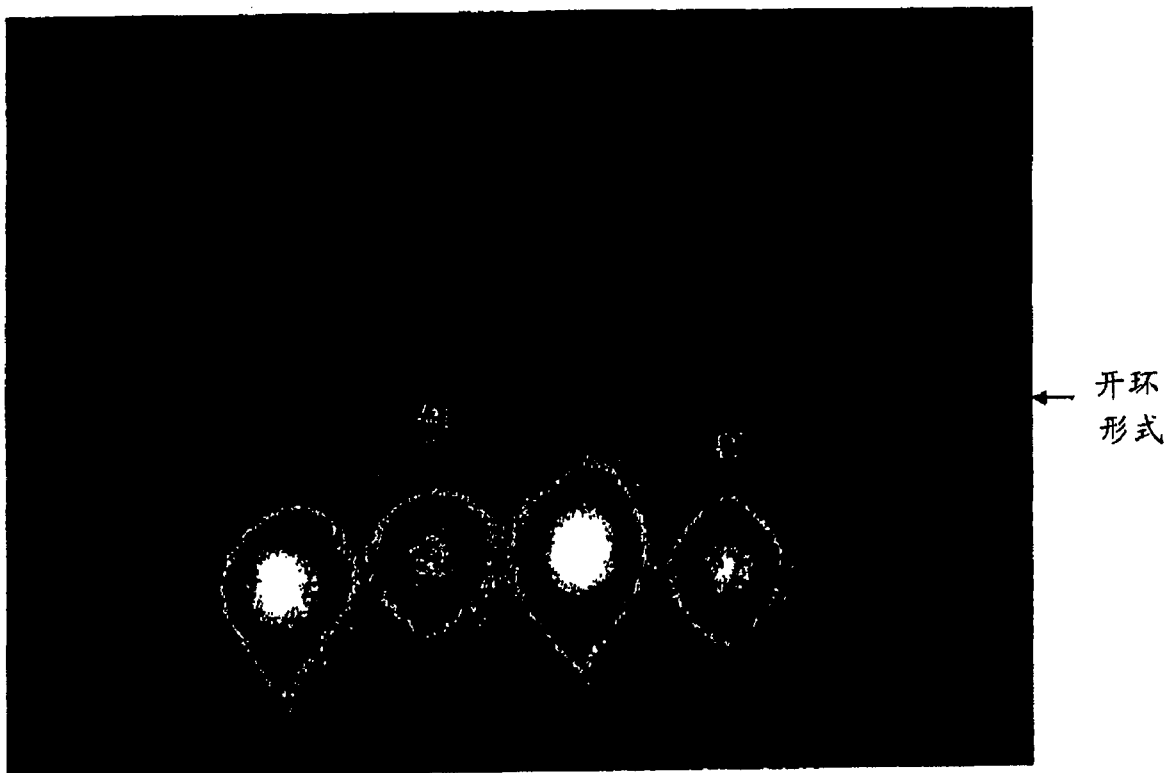


与丝光绿蝇ES一起温育6h后的 $1\mu\text{l}$ 的 $100\mu\text{MBHL}$ 的薄层分析
($100\mu\text{l}$ - $120\mu\text{g/ml}$ 总蛋白):

1. ES
2. 煮沸的ES
3. 与APMSF (0.5mM) 一起预温育的ES
4. 与PMSF (2mM) 一起预温育的ES
5. 在磷酸盐缓冲液中的BHL对照

图 7

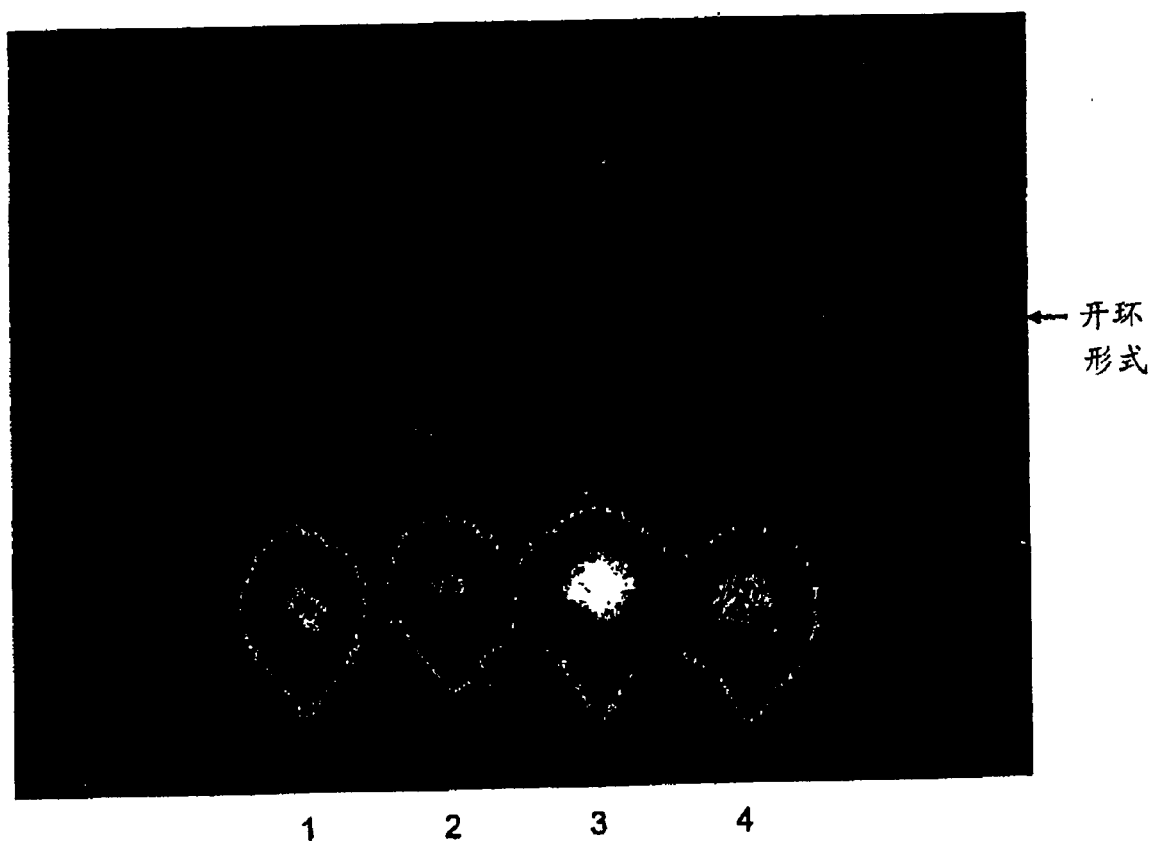
丝光绿蝇ES对O_dDHL的降解 - 煮沸的作用



1 2 3 4
与丝光绿蝇ES一起温育6h后的1 μ l的100 μ M O_dDHL的薄层分析
(100 μ l-120 μ g/ml总蛋白):

- 1.煮沸的ES (t=0h)
- 2.煮沸的ES (t=6h)
- 3.ES (t=0h)
- 4.ES (t=6h)

图 8

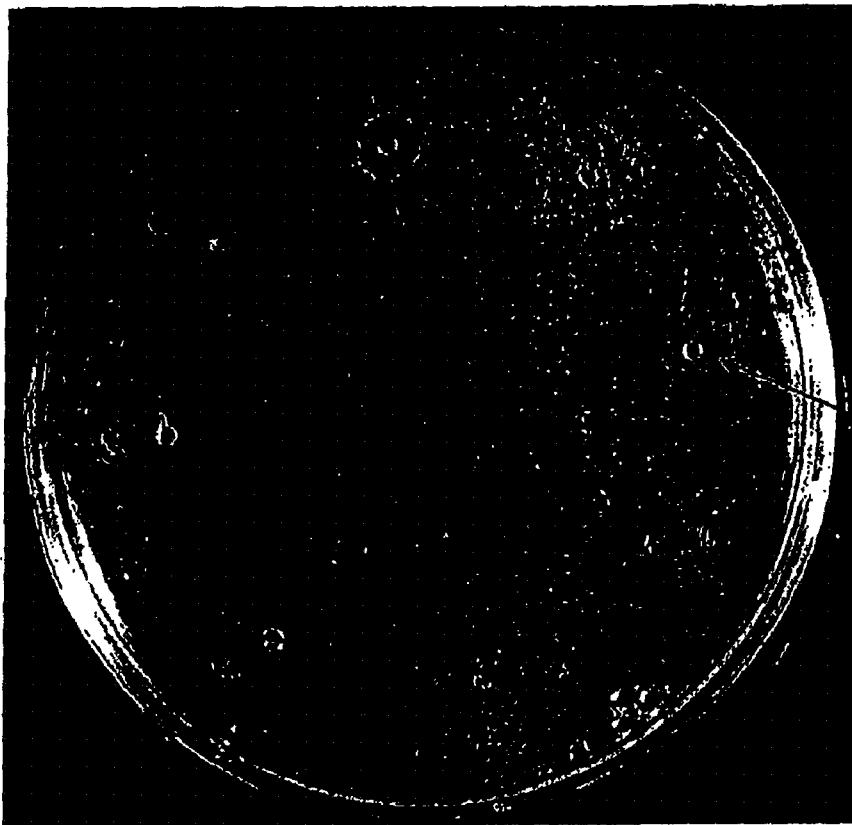
丝光绿蝇ES对O₆DHL的降解 - 与PMSF和APMSF一起预温育的作用

与丝光绿蝇ES一起温育6h后的1 μ l的100 μ M BHL的薄层分析
(100 μ l-120 μ g/ml总蛋白)：

1. 与APMSF (0.5mM) 一起预温育的ES, t=0h
2. 与APMSF (0.5mM) 一起预温育的ES, t= 6h
3. 与PMSF (2mM) 一起预温育的ES, t=0h
4. 与PMSF (2mM) 一起预温育的ES, t=6h

图 9

经铜绿假单胞菌诱导后获得的丝光绿蝇幼虫的血淋巴对
大肠杆菌D31的生长抑制



幼虫血淋巴中
由铜绿假单胞菌
诱导的抗微生物
活性

受铜绿假单胞菌攻击后的丝光绿蝇血淋巴的抗微生物活性。使用抗微生物的天蚕素B (Sigma) 的标准品。在大肠杆菌D31菌苔中具有清晰的噬菌斑表明了抗微生物的活性。所测定的直径给出了样品中抗微生物的天蚕素浓度的指示。

1. 天蚕素B 100 $\mu\text{g/ml}$
2. 天蚕素B 10 $\mu\text{g/ml}$
3. 天蚕素B 1 $\mu\text{g/ml}$
4. 天蚕素B 0.1 $\mu\text{g/ml}$
5. 对照 4h
6. 铜绿假单胞菌 4h
7. 铜绿假单胞菌 48h
8. 对照 48h

图 10