



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103690543 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310719704. X

(22) 申请日 2013. 12. 24

(71) 申请人 广西医科大学

地址 530021 广西壮族自治区南宁市青秀区  
双拥路 22 号

(72) 发明人 陈一强 黄宏 孔晋亮

(74) 专利代理机构 广州市红荔专利代理有限公司  
44214

代理人 李珊

(51) Int. Cl.

A61K 31/506 (2006. 01)

A61P 31/10 (2006. 01)

A61K 31/216 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

杀死烟曲霉菌的组合物及方法

(57) 摘要

一种杀灭烟曲霉菌的组合物和杀死烟曲霉菌的方法,属于生物技术领域。杀灭烟曲霉菌的方法,包括制备药物、收集菌株、制备载体、制备孢子悬液、药物敏感试验、制备烟曲霉菌生物膜载体、药物对烟曲霉生物膜作用、XTT 减低法测代谢活性、荧光染液的配制和荧光染色及观察,用绿原酸和伏立康唑联合杀死烟曲霉菌。本发明提供的一种杀死烟曲霉菌的组合物及方法,能够杀死生物膜中的烟曲霉菌丝,解决抗真菌药物无法杀死生物膜中的烟曲霉菌的难题。

1. 一种杀灭烟曲霉菌的方法,包括制备药物、收集菌株、制备载体、制备孢子悬液、药物敏感试验、制备烟曲霉菌生物膜载体、药物对烟曲霉生物膜作用、XTT 减低法测代谢活性、荧光染液的配制和荧光染色及观察,其特征在于,用绿原酸和伏立康唑联合杀死烟曲霉菌,具体步骤如下:

1) 制备药物 取 400~500mg 绿原酸和 4~5mg 伏立康唑,分别用 3~6ml 100% 的二甲亚砷溶解,分别配制成浓度为 102400  $\mu\text{g/ml}$  和 1280  $\mu\text{g/ml}$  的溶液,于  $-20^{\circ}\text{C}$  ~  $-25^{\circ}\text{C}$  储存;

2) 收集菌株 收集烟曲霉菌株,质控菌株为近平滑念珠菌;

3) 制备载体 将直径为 10~15 mm 玻璃细胞爬片进行高温高压灭菌,作为载体;

4) 制备孢子悬液 将步骤 2) 收集的菌株接种到 PDA 培养皿,置于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  生化培养箱进行复苏,后转至另一个 PDA 培养皿并置于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  生化培养箱活化 3~5 天后,用 5~10ml 含有 0.025% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液冲洗平皿表面收集孢子,用 20~30ml MOPS 缓冲的 RPMI-1640 重悬孢子,用血细胞计数板调整孢子浓度,并用 RPMI-1640 液体培养液调整浓度为  $1\sim3\times10^6\cdot\text{孢子}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,再用 RPMI-1640 液体培养基稀释 50 倍,得到 2 倍终浓度的孢子悬液;

5) 药物敏感试验 微量液基稀释法,在无菌的 96 孔细胞培养板的第 1 至第 10 孔加入步骤 4) 制备的孢子悬液,再将步骤 1) 制备的绿原酸和伏立康唑分别置于两个无菌的 96 孔细胞培养板的第 1 至第 10 孔,第 1 孔加入量为 100  $\mu\text{l}$ ,第 2~10 孔依次倍比稀释至二倍终浓度,第 11 孔为步骤 4) 制备孢子悬液的生长对照孔,第 12 孔为 MOPS 缓冲的 RPMI-1640 液体培养基,静置于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  培养 48h;获得绿原酸和伏立康唑最低抑菌浓度 MIC;由获得的最低抑菌浓度 MIC 测定伏立康唑的最低杀菌浓度 MFC;

6) 制备烟曲霉菌生物膜载体

A: 早期模型建立 将步骤 2) 收集的菌株接种到 PDA 培养皿,置于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  培养箱培养活化 3~5 天,用 5~10ml 含有 0.025% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液冲洗平皿表面收集孢子,用 20~25ml MOPS 缓冲的 RPMI-1640 重悬孢子,用血细胞计数板调整孢子浓度,并用 RPMI-1640 液体培养液调整浓度为  $1\sim5\times10^5\cdot\text{孢子}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,将 1~2ml 孢子悬液放在步骤 3) 制备的载体上,静置于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  生化培养箱中培养;培养 24h 时载体上为早期烟曲霉菌生物膜;

B: 成熟期模型建立 按照步骤 A 制备的烟曲霉菌生物膜培养 48h 时载体上为成熟期烟曲霉菌生物膜;

7) 药物对烟曲霉菌生物膜作用 将步骤 6) 制备的两种模型烟曲霉菌生物膜载体用无菌磷酸盐缓冲液漂洗,后放入新的 24 孔板中,按步骤 5) 获得的绿原酸最低抑菌浓度 MIC,加入亚抑菌浓度的绿原酸及最低杀菌浓度 MFC 的伏立康唑,每个孔加入量为 1ml,空白组为 MOPS 缓冲的 1640 液体培养基,静置于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  培养 48h,后取出载体,进行观察;

8) XTT 减低法测代谢活性 将配制好的维生素  $\text{K}_3$  溶液加入到 XTT 溶液中,使前者在 XTT 溶液中的终浓度为 1~2  $\mu\text{mol/l}$ ;XTT 减低法:用枪头吸取磷酸盐缓冲液轻轻冲洗步骤 7) 含有药物的烟曲霉菌生物膜载体表面浮游菌,放到新的 24 孔板内,吸取 400~500  $\mu\text{l}$  XTT 和维生素  $\text{K}_3$  混合溶液加入到装有载体的孔内,于  $35^{\circ}\text{C}$ ~ $37^{\circ}\text{C}$  避光静置 2~4h,后吸取 100~150  $\mu\text{l}$  孔内的 XTT 和维生素  $\text{K}_3$  混合液,置于 96 孔酶标板中,在波长为 490nm 处测各孔 OD 值;

9) 荧光染液的配制

a. 取 1ml 无菌去离子水加入到 1.5ml 的避光离心管中;

- b. 吸取 2  $\mu$ l SYTO9 染液加入到步骤 a 的避光离心管中；
- c. 吸取 2  $\mu$ l PI 染液加入到步骤 b 的避光离心管中；
- d. 用漩涡振荡器震荡此避光离心管 30-60s；
- e. 将步骤 d 的避光离心管用离心机以 2000rpm 转速离心 2~3min；

10) 荧光染色及观察 将步骤 7) 制备的烟曲霉菌生物膜载体置于无菌 24 孔板中，再取 100  $\mu$ l 步骤 9) 配制的荧光染液上清液滴加到载体上，35~37℃培养 2h，再用荧光显微镜观察，此过程全程避光操作。

2. 根据权利要求 1 所述的体外杀灭烟曲霉菌的方法，其特征在于，所述的绿原酸浓度为亚抑菌浓度的绿原酸 512~1024  $\mu$ g/ml。

3. 根据权利要求 1 所述的体外杀灭烟曲霉菌的方法，其特征在于，所述的伏立康唑为最低杀菌浓度伏立康唑 30~50  $\mu$ g/ml。

4. 一种杀死烟曲霉菌的组合物，其特征在于，包括绿原酸和伏立康唑联合应用于生物膜中的烟曲霉菌。

5. 根据权利要求 6 所述的杀死烟曲霉菌的组合物，其特征在于，所述的绿原酸的浓度为 512~1024  $\mu$ g/ml，所述的伏立康唑的浓度为 30~50  $\mu$ g/ml。

## 杀死烟曲霉菌的组合物及方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及烟曲霉菌生物膜,具体涉及一种杀灭烟曲霉菌的组合物和杀死烟曲霉菌的方法。

### 背景技术

[0002] 烟曲霉菌是一种条件致病菌,能导致免疫低下患者致命的感染,其引起的侵袭性曲霉病是免疫低下患者主要的死亡原因之一,死亡率达到30~100%。目前唑类抗真菌药是治疗侵袭性曲霉病的主要药物,其中的伏立康唑凭借更强的抗菌能力和更少的不良反应等优点成为治疗侵袭性曲霉病的首选药物,但是尽管其已经运用于治疗侵袭性曲霉病多年,此疾病的死亡率并未见明显的降低,并且唑类抗真菌药物的耐药率却不断升高,其中伊曲康唑的耐药率由1999年的0%上升到2007年的17%,而耐药菌株和敏感菌株引起的死亡率分别为88%和48%,现今如何控制耐药成为了临床面临的巨大难题。

[0003] 研究发现,生物膜的形成是烟曲霉耐药的一个重要原因。体内外实验均表明烟曲霉能形成生物膜,由于其菌丝被胞外基质所包裹,药物难以渗透进去作用于菌丝,因此烟曲霉菌丝细胞得以逃避抗真菌药和机体免疫的伤害,从而能形成持续的感染源造成慢性而且耐药的感染,生物膜中的烟曲霉菌比没有胞外基质包裹的浮游菌耐药性高几十至上千倍,并且生物膜越成熟,胞外基质越致密,生物膜中的烟曲霉菌就会越耐药。目前治疗侵袭性曲霉病的常用抗真菌药物包括首选药物伏立康唑对没有胞外基质包裹的烟曲霉菌丝细胞具有较好的抗真菌作用,但对生物膜中的烟曲霉菌丝细胞效果欠佳,如何解决生物膜导致的烟曲霉耐药性问题,已成为侵袭性曲霉病成功治疗的一大难题。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是解决以上技术问题,提供一种杀灭烟曲霉菌的方法,本发明所采用的技术方案是:一种杀灭烟曲霉菌的方法,包括制备药物、收集菌株、制备载体、制备孢子悬液、药物敏感试验、制备烟曲霉菌生物膜载体、药物对烟曲霉生物膜作用、XTT 减低法测代谢活性、荧光染液的配制和荧光染色及观察,其特征在于,用绿原酸和伏立康唑联合杀死烟曲霉菌,具体步骤如下:

1)制备药物 取400~500mg 绿原酸(CRA)和4~5mg 伏立康唑(VRC),分别用3~6ml 100%的二甲亚砷溶解,分别配制成浓度为102400  $\mu$ g/ml和1280  $\mu$ g/ml的溶液,于-20℃~-25℃储存;

2)收集菌株 收集烟曲霉菌株,质控菌株为近平滑念珠菌;

3)制备载体 将直径为10~15 mm 玻璃细胞爬片进行高温高压灭菌,作为载体;

4)制备孢子悬液 将步骤2)收集的菌株接种到PDA 培养皿,置于35~37℃生化培养箱进行复苏,后转至另一个PDA 培养皿并置于35~37℃生化培养箱活化3~5天后,用5~10ml 含有0.025%吐温20的磷酸盐缓冲液冲洗平皿表面收集孢子,用20~30ml MOPS 缓冲的RPMI-1640 重悬孢子,用血细胞计数板调整孢子浓度,并用RPMI-1640 液体培养液调整浓度

为  $1 \sim 3 \times 10^6 \cdot \text{孢子} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 再用 RPMI-1640 液体培养基稀释 50 倍, 得到 2 倍终浓度的孢子悬液;

5) 药物敏感试验 微量液基稀释法, 在无菌的 96 孔细胞培养板的第 1 至第 10 孔加入步骤 4) 制备的孢子悬液, 再将步骤 1) 制备的绿原酸和伏立康唑分别置于两个无菌的 96 孔细胞培养板的第 1 至第 10 孔, 第 1 孔加入量为  $100 \mu\text{l}$ , 第 2~10 孔依次倍比稀释至二倍终浓度, 第 11 孔为步骤 4) 制备孢子悬液的生长对照孔, 第 12 孔为 MOPS 缓冲的 RPMI-1640 液体培养基, 静置于  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  培养 48h; 获得绿原酸和伏立康唑最低抑菌浓度 MIC; 最低抑菌浓度 (MIC) 的判定: 肉眼观察判断终点: 96 培养板各个孔充分混匀之后与生长对照孔比较, 100% 生长抑制所对应的最低药物浓度为此药物的 MIC。

[0005] 最低杀真菌浓度 (MFC) 的测定: 将 MIC 以上各孔各吸取  $100 \mu\text{l}$  的液体放到 SDA 平板上, 用无菌接种棒均匀涂布到平板各处后静置于  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  的生化培养箱进行孵育, 3 天后数平板上的菌落, 小于 5 个菌落的最低药物浓度即为最低杀真菌浓度, 测定获得伏立康唑的最低杀菌浓度 MFC。

[0006] 6) 制备烟曲霉菌生物膜载体

A: 早期模型建立 将步骤 2) 收集的菌株接种到 PDA 培养皿, 置于  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  培养箱培养活化 3~5 天, 用  $5 \sim 10\text{ml}$  含有 0.025% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液冲洗平皿表面收集孢子, 用  $20 \sim 25\text{ml}$  MOPS 缓冲的 RPMI-1640 重悬孢子, 用血细胞计数板调整孢子浓度, 并用 RPMI-1640 液体培养液调整浓度为  $1 \sim 5 \times 10^5 \cdot \text{孢子} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 将  $1 \sim 2\text{ml}$  孢子悬液放在步骤 3) 制备的载体上, 静置于  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  生化培养箱中培养; 培养 24h 时载体上为早期烟曲霉菌生物膜;

B: 成熟期模型建立 按照步骤 A 制备的烟曲霉菌生物膜培养 48h 时载体上为成熟期烟曲霉菌生物膜;

7) 药物对烟曲霉菌生物膜作用 将步骤 6) 制备的两种模型烟曲霉菌生物膜载体用无菌磷酸盐缓冲液漂洗, 后放入新的 24 孔板中, 按步骤 5) 获得的绿原酸最低抑菌浓度 MIC, 加入亚抑菌浓度的绿原酸及最低杀菌浓度的伏立康唑, 每个孔加入量为  $1\text{ml}$ , 空白组为 MOPS 缓冲的 1640 液体培养基, 静置于  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  培养 48h, 后取出载体, 进行观察;

8) XTT 减低法测代谢活性 配制 XTT 溶液和维生素  $\text{K}_3$  溶液: (1) XTT 粉末用 PBS 溶解, 配成  $500\text{mg/ml}$  的饱和溶液; (2) 将饱和溶液用  $0.22 \mu\text{m}$  的滤器过滤除菌; (3) 分装、避光保存在  $-70^\circ\text{C}$  冰箱; (4) 维生素  $\text{K}_3$  粉末用 100% 的丙酮溶解, 配成  $10\text{mmol/l}$  的母液; (5) 分装保存在  $-70^\circ\text{C}$  冰箱, 将配制好的维生素  $\text{K}_3$  溶液加入到 XTT 溶液中, 使前者在 XTT 溶液中的终浓度为  $1 \sim 2 \mu\text{mol/l}$ ; XTT 减低法: 用枪头吸取磷酸盐缓冲液轻轻冲洗步骤 7) 含有药物的烟曲霉菌生物膜载体表面浮游菌, 放到新的 24 孔板内, 吸取  $400 \sim 500 \mu\text{l}$  XTT 和维生素  $\text{K}_3$  混合溶液加入到装有载体的孔内, 于  $35 \sim 37^\circ\text{C}$  避光静置  $2 \sim 4\text{h}$ , 后吸取  $100 \sim 150 \mu\text{l}$  孔内的 XTT 和维生素  $\text{K}_3$  混合液, 置于 96 孔酶标板中, 在波长为  $490\text{nm}$  处测各孔 OD 值;

9) 荧光染液的配制

- 取  $1\text{ml}$  无菌去离子水加入到  $1.5\text{ml}$  的避光离心管中;
- 吸取  $2 \mu\text{l}$  SYTO9 染液加入到步骤 a 的避光离心管中;
- 吸取  $2 \mu\text{l}$  PI 染液加入到步骤 b 的避光离心管中;
- 用漩涡振荡器震荡此避光离心管  $30 \sim 60\text{s}$ ;
- 将步骤 d 的避光离心管用离心机以  $2000\text{rpm}$  转速离心  $2 \sim 3\text{min}$ ;

10) 荧光染色及观察 将步骤 7) 制备的烟曲霉菌生物膜载体置于无菌 24 孔板中, 再取 100  $\mu$ l 步骤 9) 配制的荧光染液上清液滴加到载体上, 35~37℃ 培养 2h, 再用荧光显微镜观察, 此过程全程避光操作。

[0007] 以上所述的绿原酸浓度为亚抑菌浓度的绿原酸 512~1024  $\mu$ g/ml。

[0008] 以上所述的伏立康唑为最低杀菌浓度伏立康唑 30~50  $\mu$ g/ml。

[0009] 一种杀死烟曲霉菌的组合物, 包括绿原酸和伏立康唑联合应用于生物膜中的烟曲霉菌。

[0010] 以上所述的绿原酸的浓度为 512~1024  $\mu$ g/ml, 所述的伏立康唑的浓度为 30~50  $\mu$ g/ml。

[0011] 本发明突出的实质性进步和显著的特点是: 运用本发明烟曲霉菌的药物组合及杀菌方法, 能够杀死生物膜中的烟曲霉菌, 单独使用抗真菌药物, 无法杀死生物膜中的烟曲霉菌, 使用本发明绿原酸和伏立康唑, 便能够达到完全杀灭生物膜中烟曲霉菌的效果。

## 附图说明

[0012] 图 1 是本发明实施例 2 早期烟曲霉生物膜用药干预后的死活菌变化情况; A: 空白组; B: 1024  $\mu$ g/ml 绿原酸组; C: 512  $\mu$ g/ml 绿原酸组; D: VRC 组; E: 1024  $\mu$ g/ml 绿原酸联合 VRC 组; F: 512  $\mu$ g/ml 绿原酸联合 VRC 组。

[0013] 图 2 是本发明实施例 2 成熟期烟曲霉生物膜用药干预后的死活菌变化情况; A: 空白组; B: 1024  $\mu$ g/ml 绿原酸组; C: 512  $\mu$ g/ml 绿原酸组; D: VRC 组; E: 1024  $\mu$ g/ml 绿原酸联合 VRC 组; F: 512  $\mu$ g/ml 绿原酸联合 VRC 组。

[0014] 具体实施方式

### 实施例 1

#### 1.1 材料

1.1.1 抗真菌药物 绿原酸(CRA, 国家食品药品检定研究院, 批号 110753-201314), 伏立康唑(VRC, 国家食品药品检定研究院, 批号 100862-200701)。均用 100% 的二甲亚砷溶解, 分别配成浓度为 102400  $\mu$ g/ml、1280  $\mu$ g/ml 的储存液, 分装后于 -20℃ 储存。

[0015] 1.1.2 菌株 于 2012 年 9 月到 2013 年 5 月在广西医科大学第一附属医院检验科细菌室收集到的 30 个烟曲霉菌株, 用结晶紫法选出形成生物膜能力最强菌株作为受试菌株。质控菌株为 ATCC22019 近平滑念珠菌, 获赠于广西医科大学第一附属医院检验科细菌室。

[0016] 1.1.3 载体 玻璃细胞爬片, 直径 13mm (海门市盛邦实验器材有限公司), 高温高压灭菌后备用。

[0017] 1.1.4 试剂和器材 马铃薯葡萄糖培养基 PDA (北京路桥)、SDA 沙堡氏琼脂培养基(北京路桥)、MOPS (Sigma)、RPMI-1640 粉 (Gibco)、二甲亚砷(Sigma)、XTT 粉(生工生物公司)、丙酮(国产分析纯)、维生素 K<sub>3</sub> 粉剂(生工生物公司)、无菌 96 孔细胞培养板(美国 Corning)、生化培养箱(常州市伟嘉仪器制造有限公司, 型号: SPX-250)、生物安全柜(苏州净化设备有限公司, 型号: BHC-1300 II A/B<sub>2</sub>)。

[0018] 1.2 方法

1.2.1 孢子悬液的制备 将储存的菌株接种到 PDA 培养皿, 置于 37℃ 生化培养箱进行

复苏,再转种到另一个 PDA 培养皿并置于 37℃生化培养箱活化 3 天之后用 5ml 含有 0.025% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液冲洗平皿表面收集孢子,20ml MOPS 缓冲的 RPMI-1640 重悬孢子,血细胞计数板调整孢子浓度为  $1 \times 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ ,再用 RPMI-1640 液体培养基稀释 50 倍,得到 2 倍终浓度的孢子悬液。

[0019] 1.2.2 药物敏感试验 微量液基稀释法:按照 CLSI 颁布的 M38-A2 的标准进行。把受试的药物倍比稀释到 2 倍终浓度,分别取 100  $\mu\text{l}$  加入到无菌 96 孔细胞培养板的第 1-10 孔,第 11 孔为不含药物的生长对照孔,第 12 孔为不含药物且不含孢子的无菌对照孔。第 1 至第 11 孔分别加入 100  $\mu\text{l}$  制备好的 2 倍终浓度的孢子悬液,静置于 37℃孵育 48h。

[0020] 1.2.3 最低抑菌浓度(MIC)的判定:肉眼观察判断终点:96 培养板各个孔充分混匀之后与生长对照孔比较,100% 生长抑制所对应的最低药物浓度为此药物的 MIC。

[0021] 1.2.4 最低杀真菌浓度(MFC)的测定:将 MIC 以上各孔各吸取 100  $\mu\text{l}$  的液体放到 SDA 平板上,用无菌接种棒均匀涂布到平板各处后静置于 37℃的生化培养箱进行孵育,3 天后数平板上的菌落,小于 5 个菌落的最低药物浓度即为最低杀真菌浓度。

[0022] 1.2.5 质控 按照 CLSI 的建议选用 ATCC22019 近平滑念珠菌作为质控菌株,其对伏立康唑的 MIC 参考范围是 0.5~4  $\mu\text{g/ml}$ ,本试验中质控菌株的伏立康唑的 MIC 为 2  $\mu\text{g/ml}$ ,同时实验过程中菌株生长状态良好,结果可靠。实验重复 3 次,结果均一致。

[0023] 1.2.6 早期和成熟期烟曲霉生物膜模型建立 以灭菌后的玻璃细胞爬片(直径 13mm)作为载体。将受试烟曲霉菌株接种在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平皿上,置于 37℃培养,活化 3 天之后用 5ml 含有 0.025% 吐温 20 的磷酸盐缓冲液冲洗平皿表面收集孢子,20ml MOPS 缓冲的 RPMI-1640 重悬孢子,血细胞计数板调整孢子浓度为  $(1 \sim 5) \times 10^5/\text{ml}$ ,将 1ml 孢子悬液加入 24 孔板中的无菌玻璃细胞爬片上,静置于 37℃生化培养箱中孵育,每日用 MOPS 缓冲的 RPMI-1640 换液。孵育至 24h 时载体上为早期烟曲霉生物膜,48h 时载体上为成熟期烟曲霉生物膜。

[0024] 1.2.6 实验所用药物浓度 空白组为 MOPS 缓冲的 1640 液体培养基,绿原酸组分为 2 个组,除了 MOPS 缓冲的 1640 液体培养基,其中还分别含有亚抑菌浓度的 1024  $\mu\text{g/ml}$  和 512  $\mu\text{g/ml}$  的绿原酸;伏立康唑的浓度为其最低杀真菌浓度 32  $\mu\text{g/ml}$ 。

[0025] 1.2.7 绿原酸对早期和成熟期烟曲霉生物膜的作用观察 把孵育了 24、48h 的载体用无菌磷酸盐缓冲液轻轻漂洗后放入新的 24 孔板中,按上述浓度加入药物,每个孔加入 1ml,静置于 37℃培养,继续孵育 48h,期间每 24h 用相同的药物换液。于药物作用 48h 后,取出载体,分别行 XTT 减低法测定代谢活性和荧光死活菌染色后用激光共聚焦显微镜观察。

[0026] 1.2.8 XTT 减低法测代谢活性 XTT 溶液和维生素  $\text{K}_3$  溶液的配制:(1)XTT 粉末用磷酸盐缓冲液溶解,配成 500mg/ml 的饱和溶液;(2)将饱和溶液用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤器过滤除菌;(3)分装、避光保存在 -70℃冰箱;(4)维生素  $\text{K}_3$  粉末用 100% 的丙酮溶解,配成 10mmol/l 的母液;(5)分装保存在 -70℃冰箱;(6)临用前将配好的维生素  $\text{K}_3$  丙酮溶液加入到 XTT 溶液中,使前者在 XTT 溶液中的终浓度为 1  $\mu\text{mol/l}$ 。XTT 减低法:用枪头取磷酸盐缓冲液轻轻冲洗载体表面浮游菌,放到新的 24 孔板内,吸取 400  $\mu\text{l}$  XTT 和维生素  $\text{K}_3$  混合液加入到装有载体的孔内,于 37℃避光静置 2h,之后吸取 100  $\mu\text{l}$  孔内的 XTT 和维生素  $\text{K}_3$  混合液,置于 96 孔酶标板中,在波长为 490nm 处测各孔 OD 值。 $\text{XTT}\% = \text{OD}_{\text{药物处理组}} / \text{OD}_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。以上实验,每组 4 个标本,均独立重复 3 次。

[0027] 1.2.9 荧光死活菌染色及观察 荧光染液的配制：(1)取 1ml 无菌去离子水加入到 1.5ml 的避光离心管中；(2)吸取 2  $\mu$ l SYTO9 染液加入到上述的避光离心管中；(3)吸取 2  $\mu$ l PI 染液加入到上述的避光离心管中；(4)用漩涡振荡器震荡此避光离心管 30 秒；(5)将此避光离心管用离心机以 2000rpm 转速离心 2 分钟；(6)使用时吸取离心管中上部分的染液。激光共聚焦显微镜观察：用波长为 488nm 的激发光观察 SYTO9 标记的活菌，显示出绿光；用波长为 543nm 的激发光观察 PI 标记的死菌，显示出红光；两种颜色的光重叠部分显示为黄光。

[0028] 实施例 2

依据实施例 1 的实施，得出的结果，表 1 为 XTT 减低法测代谢活性，各组的 XTT%

组别	早期烟曲霉生物膜	成熟期烟曲霉生物膜
VRC 组	71.07	85.29
512 $\mu$ g/ml CRA 组	99.97	98.02
1024 $\mu$ g/ml CRA 组	99.12	98.68
512 $\mu$ g/ml CRA 组 + VRC	17.82	35.89
1024 $\mu$ g/ml CRA 组 + VRC	10.23	19.21

荧光染色和观察 荧光死活菌染色后用激光共聚焦显微镜观察，无论是早期或者是成熟期绿原酸干预组与空白组相比，无明显区别，菌丝同样密集并且均为有活力的绿色；伏立康唑组菌丝密度同空白组无明显差别，少数菌丝显示出无活力的红色及活力差的黄色，作用于早期生物膜时红色和黄色比成熟期多；绿原酸联合伏立康唑组与空白组相比菌丝明显减少，并且残留的菌丝多数呈现出红色或者黄色，1024  $\mu$ g/ml 的绿原酸联合伏立康唑组与 512  $\mu$ g/ml 的绿原酸联合伏立康唑组相比，残留的菌丝更少。早期生物膜的用药后变化见图 1，成熟期生物膜的用药后变化见图 2。



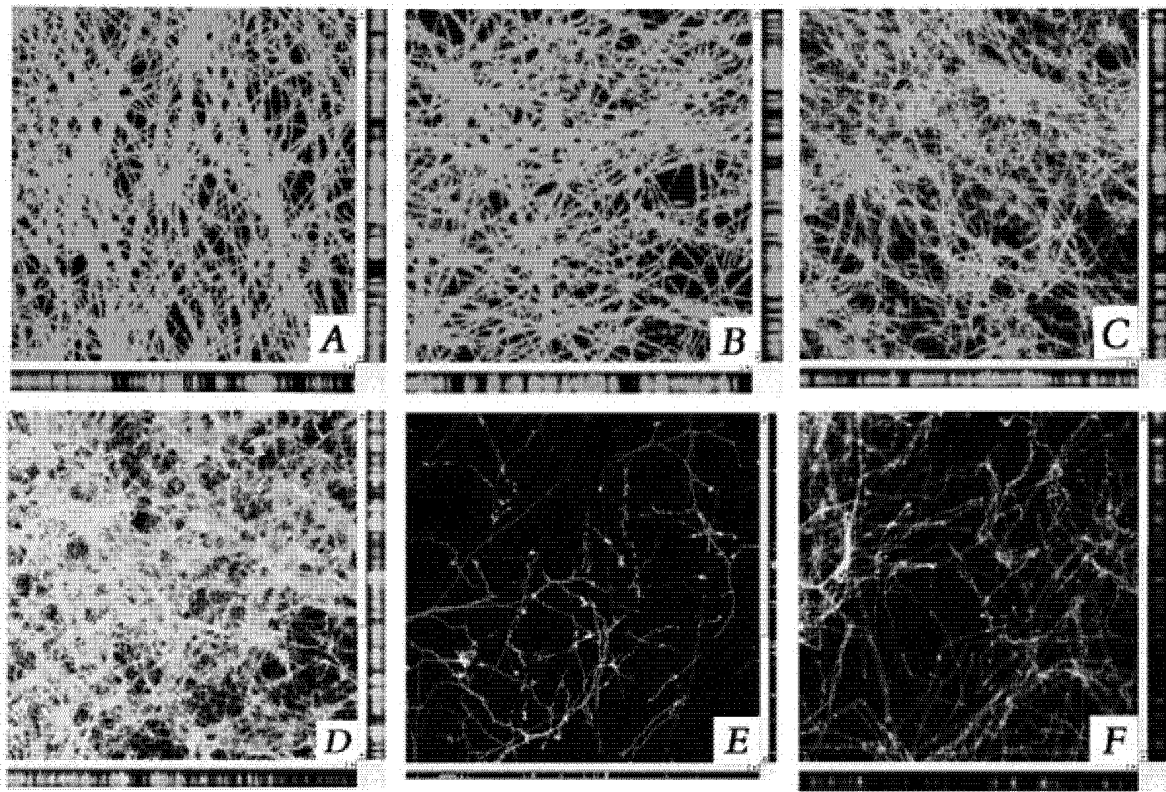


图 1

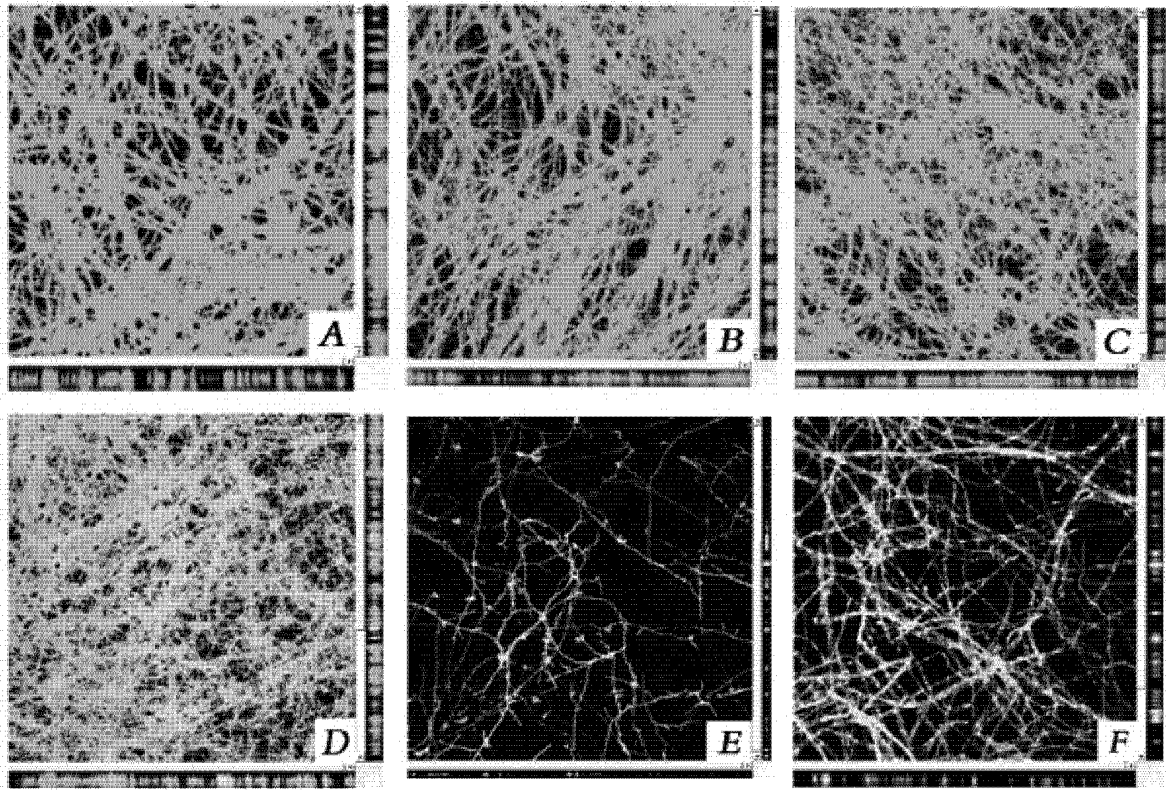


图 2