



(21) 申请号 202310005531.9

(22) 申请日 2023.01.04

(71) 申请人 云南伦扬科技有限公司

地址 650000 云南省昆明市高新区科园路  
101号细胞产业集群创新园第5层B区  
B5-01

(72) 发明人 杨亚玲 李秋兰 杨德志

(51) Int. Cl.

A61K 38/44 (2006.01)

A61K 47/69 (2017.01)

A61K 47/61 (2017.01)

A61K 33/26 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61K 41/00 (2020.01)

A61P 31/04 (2006.01)

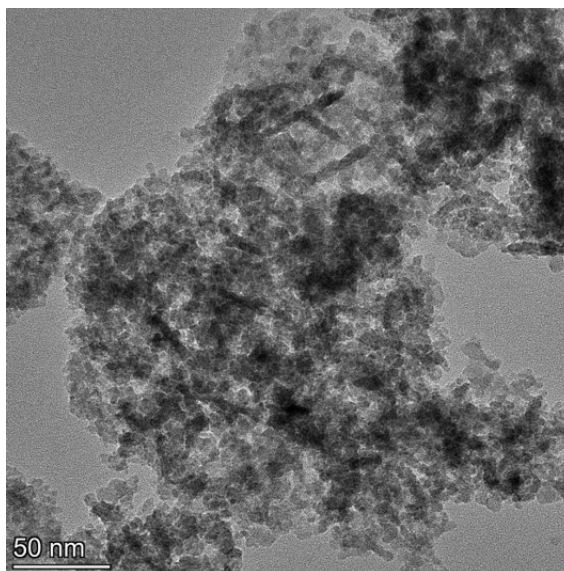
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的  
级联纳米酶

(57) 摘要

本发明公开了一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶,本发明制备了壳聚糖(CS)-钼掺杂碳点修饰四氧化三铁与g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>、硝酸银和葡萄糖氧化酶(GOx)组成的复合纳米酶(CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx),先以微波法制备CS-Mo,CDs,水热法制备Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>,再通过光刻蚀法制备CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>,自组装方法制备CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx纳米酶;结合人龋齿时富含糖和酸性的条件,以GOx催化口腔生物膜中葡萄糖产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>及葡萄糖酸,利用有过氧化物酶活性的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>将低浓度的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>有效转化为羟基自由基(·OH),同时CS可通过静电作用与带负电荷的膜结合,改变膜的通透性,从而靶向破坏生物膜,选择性地杀死变形链球菌(病原体)而不影响口腔链球菌(共生菌),纳米酶对含有变形链球菌的生物膜具有特异性的抗菌效果,对正常软组织几乎无影响。



1. 一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶,其特征在于,制备步骤如下:

(1) CS-Mo, CDs合成: 0.4-1.0 g 单宁酸、0.4-0.6 g 钼酸铵、0.1-0.2 g 壳聚糖分散于35-45 mL去离子水中,加入0.1-0.2 mL浓盐酸,搅拌10-15 min后,转移至聚四氟乙烯罐中,马弗炉180℃烧10-12 h,离心、经0.22 μm滤膜过滤,即得;

(2) g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>合成: 三聚氰胺在600℃、N<sub>2</sub>保护下管式炉煅烧2 h即得;

(3) CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>合成: 将0.5-1 mL的Mo, CDs溶液与0.2-0.3 g 的g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>和0.5 mol/L Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>和0.5 mol/L FeCl<sub>3</sub>混合,将所得溶液加入100-150 mL 28-30%氨水溶液中,超声1-2 h,将悬浮液在80-90℃下烘干,然后以10℃/min的升温速率550℃管式炉中煅烧为2-4 h即得;

(4) CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag合成: 将0.2-0.4 g的 CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>和5-10 mL 2 mg/mL 的AgNO<sub>3</sub>甲醇溶液混合,150 rpm避光搅拌1-1.5 h,再用功率为300 W氙灯光照搅拌1-1.5 h,离心,用乙醇洗涤2-3次,60-80℃烘箱中干燥12-20 h,即得;

(5) CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx合成: 1 mL 5 mg/mL的CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag被分散于10-15 mL含有15-20 mg葡萄糖氧化酶的0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>中,150 rpm室温搅拌1-2 h,离心,用去离子水洗涤2-3次,贮存于4℃冰箱中。

2. 根据权利要求1所述的一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶,其特征在于,所述纳米酶应用于制备抗口腔有害菌生物膜的产品,所述有害菌为口腔链球菌和变形链球菌。

## 一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶

### 技术领域

[0001] 本发明涉及纳米材料抗菌技术领域,具体为一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶。

### 背景技术

[0002] 生物膜由镶嵌在胞外聚合物(EPS)基质中的微生物组成,结合在一个表面,形成一个受保护的群落,从而增强了耐受性,并可能导致棘手的感染问题。龋病是由饮食和微生物相互作用驱动的生物被膜诱导的疾病,导致矿化牙的酸溶解,如果不治疗,会导致全身并发症,牙菌斑生物膜的形成是龋病发生的先决条件。鉴于细菌是包埋在膜内的,生物膜基质会阻止治疗药物的渗透,人们逐渐探索将纳米粒子应用到口腔疾病治疗。现有的抗菌方式仅限于广谱抗菌药物,这些药物缺乏对致龋生物膜的有效性和靶向特异性,对龋齿的影响有限。因此,在不破坏共生菌的情况下,致龋病原体的靶向治疗提出了新的挑战。针对高风险个体中高致龋性条件下的产酸、糖暴露和口腔卫生不良特性,需要开发新的抗生物被膜策略。

[0003] 生物活性纳米颗粒显示出优异的多功能特性,可以通过其多种功能实现生物膜中微生物的靶向作用,从而强化药物输送和渗透以及响应环境刺激的按需激活。其中,具有类酶特性的氧化铁纳米颗粒(也称为纳米酶)由于其公认的安全性,在动物模型中表现出有前景的治疗活性而迅速兴起。研究发现,在酸性条件下,具有高过氧化物酶活性的氧化铁纳米颗粒能够催化外源引入的 $H_2O_2$ 产生活性氧(reactive oxygen species,ROS)来破坏病原生物被膜。然而,外源性 $H_2O_2$ 给局部口服纳米催化的临床转化带来了挑战,因为它需要两步法才能实现。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种用于靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶,可以通过级联反应增强治疗变形链球菌生物被膜,该方法利用了纳米酶产生的双重催化活性,一是GOx可以催化致龋生物膜中大量存在的葡萄糖转化为 $H_2O_2$ ,二是Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ 在酸性条件下可以催化 $H_2O_2$ ,产生ROS,杀死细菌并降解EPS基质。

[0005] 我们设计了一种双功能纳米杂化系统,将葡萄糖氧化酶(GOx)共价连接到g- $C_3N_4$ 及硝酸银修饰的四氧化三铁纳米粒子上形成纳米酶,利用与疾病相关的高糖、低pH和高胞外聚合物含量病理条件,来促进 $H_2O_2$ 的产生,并以可控的、酸性的pH依赖性方式更有效地触发ROS。这种策略我们发现,纳米酶优先结合变形链球菌,能更有效地杀死病原体,从而导致目标生物膜的破坏,以对抗致龋生物膜的形成。

[0006] 本发明制备了壳聚糖(CS)-钼掺杂碳点修饰四氧化三铁与g- $C_3N_4$ 、硝酸银和葡萄糖氧化酶(GOx)组成的复合纳米酶(CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag@GOx),先以微波法制备CS-Mo,CDs,水热法制备 $Fe_3O_4$ ,再通过光刻蚀法制备CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ ,自组装方法制备CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag@GOx纳米酶;结合人龋齿时富含糖和酸性的条件,以GOx催化口

腔生物膜中葡萄糖产生 $H_2O_2$ 及葡萄糖酸,利用有过氧化物酶活性的 $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ 将低浓度的 $H_2O_2$ 有效转化为羟基自由基( $\cdot OH$ ),同时CS可通过静电作用与带负电荷的膜结合,改变膜的通透性,从而靶向破坏生物膜,选择性地杀死变形链球菌(病原体)而不影响口腔链球菌(共生菌),纳米酶对含有变形链球菌的生物膜具有特异性的抗菌效果,对正常软组织几乎无影响。

[0007] 本发明制备的靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶步骤如下:

(1)CS-Mo,CDs合成:0.4-1.0 g单宁酸、0.4-0.6 g钼酸铵、0.1-0.2g壳聚糖分散于35-45 mL去离子水中,加入0.1-0.2 mL浓盐酸,搅拌10-15min后,转移至聚四氟乙烯罐中,马弗炉180 °C烧10-12 h,离心、经0.22 $\mu m$ 滤膜过滤,即得;

(2)g- $C_3N_4$ 合成:三聚氰胺在600°C、 $N_2$ 保护下管式炉煅烧2h即得;

(3)CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ 合成:将0.5-1 mL的Mo,CDs溶液与0.2-0.3 g 的g- $C_3N_4$ 和0.5 mol/L  $Fe(NO_3)_3$ 和0.5 mol/L  $FeCl_3$ 混合,将所得溶液加入100-150mL氨水溶液(28-30%)中,超声1-2 h,将悬浮液在80-90°C下烘干,然后以10°C/min的升温速率550°C管式炉中煅烧为2-4h即得;

(4)CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag合成:将0.2-0.4 g的CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ 和5-10mL  $AgNO_3$ (2 mg/mL,甲醇为溶剂)混合,150 rpm避光搅拌1-1.5 h,再用功率为300W氙灯光照搅拌1-1.5 h,离心,用乙醇洗涤2-3次,60-80°C烘箱中干燥12-20h,即得;

(5)CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag@GOx合成:1 mLCS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag(5 mg/mL)被分散于10-15mL含有15-20mg葡萄糖氧化酶的0.1 mol/L  $NaHCO_3$ (pH 9.6)中,150 rpm室温搅拌1-2h,离心,用去离子水洗涤2-3次,贮存于4°C冰箱中。

[0008] 所述的靶向光催化变形链球菌生物膜的级联纳米酶,将纳米酶用于抗口腔链球菌(*S. oralis*)和变形链球菌(*S.mutans*)诱导羟基磷灰石为载体的生物膜。

[0009] 本发明的优点在于:

1、本发明将葡萄糖氧化酶(GOx)共价连接到g- $C_3N_4$ 及硝酸银修饰的四氧化三铁纳米粒子,通过级联反应,在高糖、低pH和高胞外多糖含量的病理条件下,GOx氧化葡萄糖,产生 $H_2O_2$ 并形成酸性条件,具有过氧化物酶活性的CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ 将低浓度的 $H_2O_2$ 有效地转化为羟基自由基( $\cdot OH$ ),同时CS可通过静电作用与带负电荷的膜结合,改变膜的通透性,可以有效的靶向性破坏生物膜,结合银形成的CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag在光作用下具有选择性地杀死变形链球菌(病原体)而不影响口腔链球菌(共生菌),从而对含有变形链球菌的生物膜具有强大的抗菌特异性,保证对正常软组织的最小影响;

2、CS-Mo,CDs中氧空位增强了纳米酶的催化活性,依靠磁驱动级联催化活性的优势,局部产生ROS杀死细菌并降解EPS基质,CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag@GOx的磁靶向能力表现在与变形链球菌的结合能力大于其他物种,使其对口腔生物被膜具有可控和更强的穿透性,可用于精准治疗;

3、CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag@GOx是一种强效且具有生物相容性的抗生物膜剂,有可能作为一种替代治疗来控制蛀牙和其他可能与生物膜相关的疾病。

## 附图说明

[0010] 图1为CS-Mo,CDs/ $Fe_3O_4$ -g- $C_3N_4$ /Ag@GOx的TEM图;

图2为CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx与Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx的Zeta电位图;

图3为在有无葡萄糖存在下,纳米酶氧化TMB的紫外可见吸收光谱图;

图4为纳米酶细胞毒性实验结果;

图5为纳米酶处理前后*S. mutans*及*S. oralis*生物膜的结晶紫染色图像及结果;

图6为蒽酮-硫酸法检测*S. mutans*生物膜中EPS的含量结果;

图7为处理后生物膜的共聚焦显微镜图像,细菌细胞用Syto 82染色,CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag用Alexa Fluor 488标记;

图8不同纳米酶浓度处理羟基磷灰石盘平板*S. mutans*及*S. oralis*菌落计数结果。

## 具体实施方式

[0011] 下面将结合具体的实施例对本发明的技术方案作进一步详细地描述说明,但本发明的保护范围并不仅限于此。

[0012] 实施例:多功能纳米酶原位水凝胶的制备及性能

(1)CS-Mo,CDs合成:0.5 g单宁酸、0.5 g钼酸铵、0.2g壳聚糖分散于40 mL去离子水中,加入0.2 mL浓盐酸,搅拌15min后,转移至聚四氟乙烯罐中,马弗炉180 °C烧12 h,离心、经0.22μm滤膜过滤,即得;同时相同条件下合成不加入CS材料Mo,CDs;

(2)g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>合成:三聚氰胺在600°C、N<sub>2</sub>保护下管式炉煅烧2h即得;

(3)CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>合成:将0.6 mL的Mo,CDs溶液与0.2 g 的g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>和0.5 mol/L Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>和0.5 mol/L FeCl<sub>3</sub>混合,将所得溶液加入120mL氨水溶液(28-30%)中,超声1-2 h,将悬浮液在80-90°C下烘干,然后以10°C/min的升温速率550°C管式炉中煅烧为3h即得;同时相同条件下合成不加入CS材料Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>;

(4)CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag合成:将0.2-0.4 g的CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>和8mL AgNO<sub>3</sub>(2 mg/mL,甲醇为溶剂)混合,150 rpm避光搅拌1.5 h,再用功率为300W氙灯光照搅拌1.5 h,离心,用乙醇洗涤2-3次,60°C烘箱中干燥20h,即得;同时相同条件下合成不加入CS材料Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag;

(5)CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx纳米酶合成:1 mLCS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag(5 mg/mL)被分散于10-15mL含有15-20mg葡萄糖氧化酶的0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>(pH 9.6)中,150 rpm室温搅拌1-2h,离心,用去离子水洗涤2-3次,贮存于4°C冰箱中;通过TEM观察CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx的表面形貌(图1),结果表明,由于CS的存在,材料呈现团聚的状态,且表面分布有明显的不同类型的颗粒,符合该复合纳米酶的形貌特征;同时相同条件下合成不加入CS材料Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx;

将合成的Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx与CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx进行Zeta电位测试(图2),结果表明,CS的存在使得材料表面带正电荷,从而有利于与带负电荷的细胞膜结合,改变细胞膜通透性,以有效的靶向性破坏毒性生物膜;

(6)采用TMB显色反应测定纳米酶的拟过氧化酶(POD)活性

将100μg/mL CS-Mo,CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx纳米酶100μL、100mmol/L的TMB 50μL,加入到pH5.0醋酸盐缓冲溶液2mL中,加入1%葡萄糖或不加入葡萄糖,充分混匀,室温孵育10min后,离心分离,取上层清液用紫外-可见分光光度计在655nm处测量吸光度,每个样品

测量3次,取平均值,结果如图3;从图3中可以看出,纳米酶在葡萄糖存在下表现出相当高的拟过氧化酶活性;

(7)细胞毒性测试:采用CCK-8细胞活力试剂盒检测纳米酶的细胞毒性,具体实验,将人脐静脉内皮细胞(HUVECs, 北纳创联生物科技有限公司)接种于96孔板中培养24h后,分别用不同浓度的CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx (0、5、10、20、40、80、160 μM,以Ag<sup>+</sup>含量计算)处理8h,分次用PBS漂洗细胞,每孔加入CCK-8溶液至10%浓度,37℃孵育,在450nm处测定吸光度;CCK-8分析(图4)显示CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx对细胞均无明显毒性;

(8)纳米酶对*S. mutans*及*S. oralis*形成生物膜的影响

变形链球菌(*S. mutans*) UA159 (ATCC 700610)是一种强致龋性致病菌和生物膜形成菌株,口腔链球菌(*S. oralis*) J22是一种产生过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的共生口腔链球菌,从北纳创联生物科技有限公司获得;*S. mutans*及*S. oralis*复苏后培养于胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基,温度 37℃;厌氧条件下培养(N<sub>2</sub>80%;H<sub>2</sub>10%;CO<sub>2</sub>10%);取处于对数生长期的*S. mutans*及*S. oralis*悬液,调节 OD<sub>600 nm</sub>约为 0.6,与 TSB 培养基 1:9(体积比)混合,其中包含 2%蔗糖,在24孔培养板中,每孔加入 100 μL经调整OD<sub>600 nm</sub>值之后的细菌悬液与等量的无菌生理盐水,置于厌氧箱培养;待特定时间点加入定量的CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx,终浓度为10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL,其中不加CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx者以等量生理盐水代替以为对照组;

结晶紫染色按下列步骤:

1) 厌氧培养 24 h 之后,细菌生物膜在孔底形成,弃去上清,并使用 PBS溶液轻柔冲洗 3 次,以保证浮游状态的细菌被洗去;

2) 将细菌生物膜暴露于空气中干燥;

3) 在每孔中加入 200 μL 1%结晶紫溶液,置于室温 20 min,遂用 PBS 漂洗未被吸收的染料。弃去上清后,可见孔底存在淡紫色的薄膜结构;

4) 于每孔中加入 95%乙醇溶液 200 μL,使细菌生物膜中含有的紫色结晶重新溶出,置于振荡器上并充分振荡 2 min;

5) 使用酶标仪测定λ = 590nm 下的光密度值(OD<sub>575 nm</sub>),取平均值并记录,OD<sub>575</sub> 值越大,说明生物膜量越多;

细菌生物膜是细菌最重要的组成部分,结晶紫染色被用来检测CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx对于细菌生物膜形成的影响。根据结晶紫染色的范围和程度可以评估生物膜中的细菌生物量的多少;图5显示结晶紫法检测24 h *S. mutans*及*S. oralis*生物膜的结果,CS-Mo, CDs/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/Ag@GOx(40 μg/mL)对*S. mutans*生物膜的形成具有强的抑制作用,但对口腔共生菌*S. oralis*的影响很小;

(9)纳米酶对*S. mutans*产胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)的影响

不溶于水的EPS是*S. mutans*的关键致龋毒力,用蒽酮-硫酸法检测*S. mutans*生物膜中EPS的含量,其生物膜形成如步骤(8),将各孔底部的生物膜全部刮下至1.5 mL EP管内,4000 r/min离心10 min,离心后弃上清,沉淀用PBS溶液重悬并清洗2~3次,再次离心并弃上清;配制0.4 mol/L NaOH溶液,每管内加入1 mL,将底部沉淀彻底混匀后,于37℃孵育2 h。将上述溶液液于4℃、6000 r/min离心10 min。将200 μL上清液吸取至另一个干净EP管中,加入600 μL蒽酮试剂(50 mL浓硫酸溶解100 mg蒽酮),混匀后于干热仪中95℃加热8

min。室温下冷却后取200  $\mu$ L,加入24孔板中,读取OD 625 值,OD 625 值越大说明合成的水不溶性EPS越多;

结果如图6所示,随着CS-Mo,CDs/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g- $\text{C}_3\text{N}_4$ /Ag@GOx浓度增高,*S. mutans*对EPS的合成减少;40  $\mu$ g/mLCS-Mo,CDs/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g- $\text{C}_3\text{N}_4$ /Ag@GOx组以及阳性对照组EPS的合成均显著下降;

高分辨率共聚焦图像(图7)显示,CS-Mo,CDs/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g- $\text{C}_3\text{N}_4$ /Ag@GOx处理显著降低了EPS基质,使其受损*S. mutans*积累并改变生物膜3D结构;

(10)口腔生物膜的构建:将羟基磷灰石盘涂上过滤消毒的澄清的人工唾液,在37 $^\circ$ C和150rpm下振摇1h,然后将唾液涂覆的羟基磷灰石(sHA)盘置于24孔板中。将制备的*S. mutans*及*S. oralis*菌悬液加入2.8 mL含1%(w/v)蔗糖的BHI培养基中,*S. mutans*终浓度为 $10^6$  CFU/mL,*S. oralis*终浓度为 $10^2$  CFU/mL。取出上清液,每天在19、29 h更换培养基2次,直到实验期结束(43h);

生物膜处理:用NaAC缓冲液(pH 4.5,0.1 M)和15 mM葡萄糖制备浓度为不同浓度CS-Mo,CDs/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g- $\text{C}_3\text{N}_4$ /Ag的反应溶液。将生物膜每天处理两次,将其放入上述制备的1 mL反应溶液中,在37 $^\circ$ C下处理30 min,处理后,用无菌生理盐水3次去除未结合的物质,然后将这些sHA盘转移到培养基中;实验结束时(43h),刮取生物膜,然后用超声波处理30 s,得到均匀分布的细菌悬液;

数据显示,CS-Mo,CDs/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -g- $\text{C}_3\text{N}_4$ /Ag@GOx处理对变链菌有很强的抑制作用,但对口腔共生菌的影响很小(图8)。



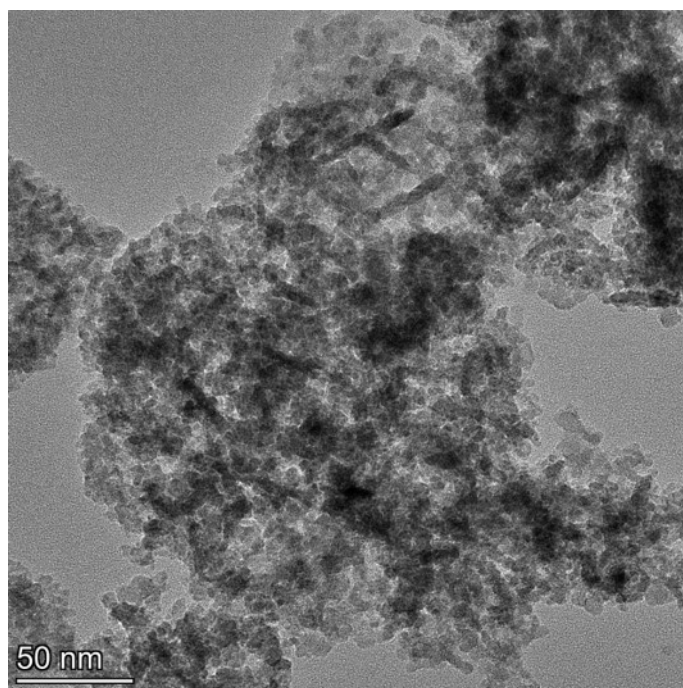


图1

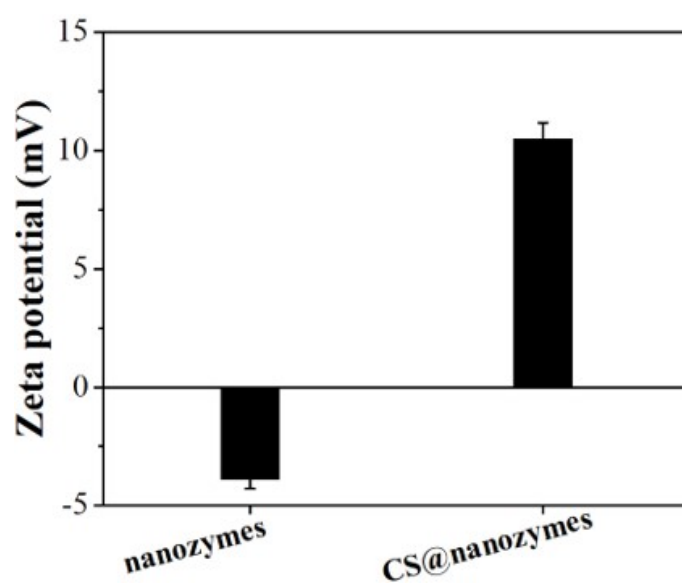


图2



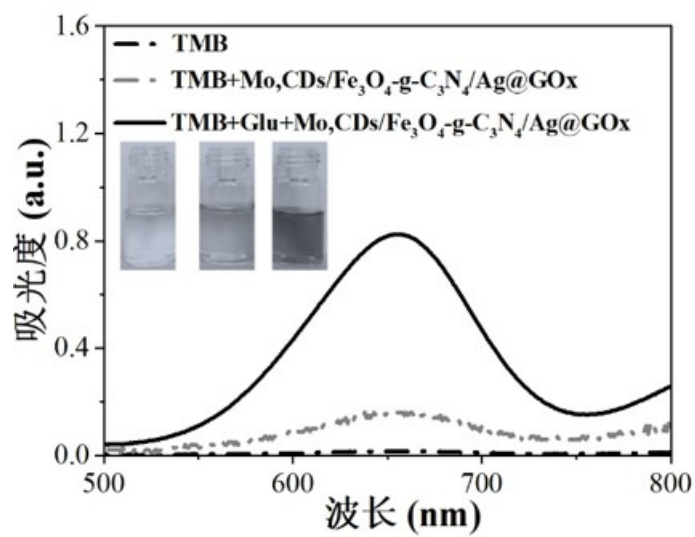


图3

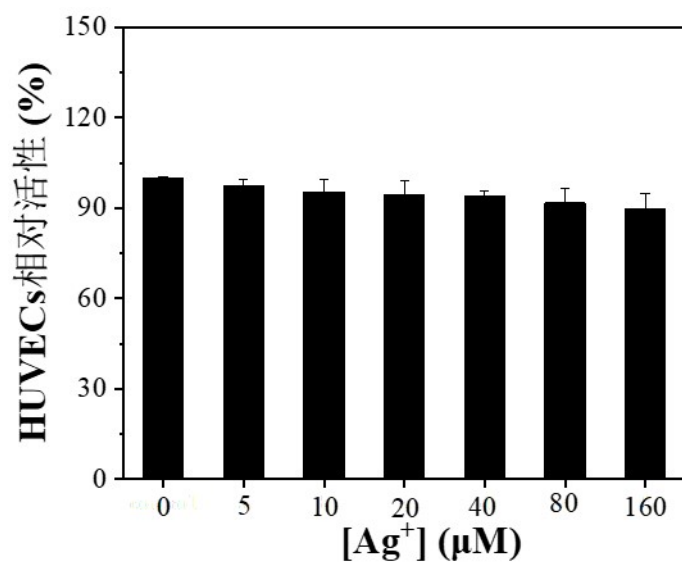


图4

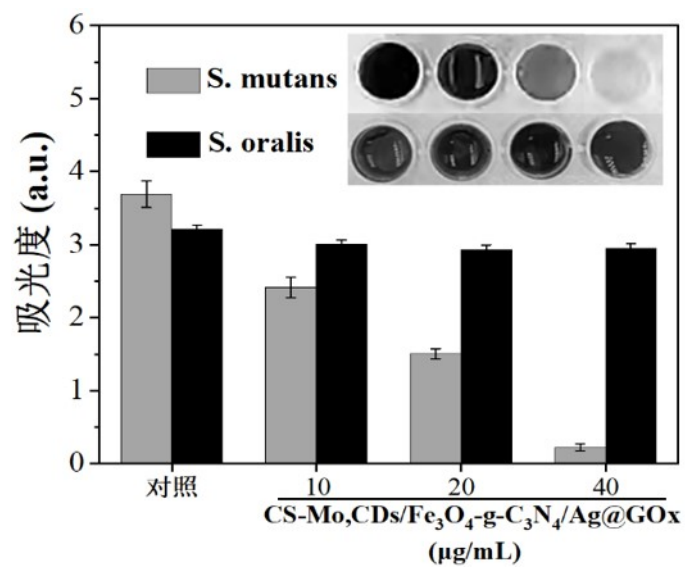


图5

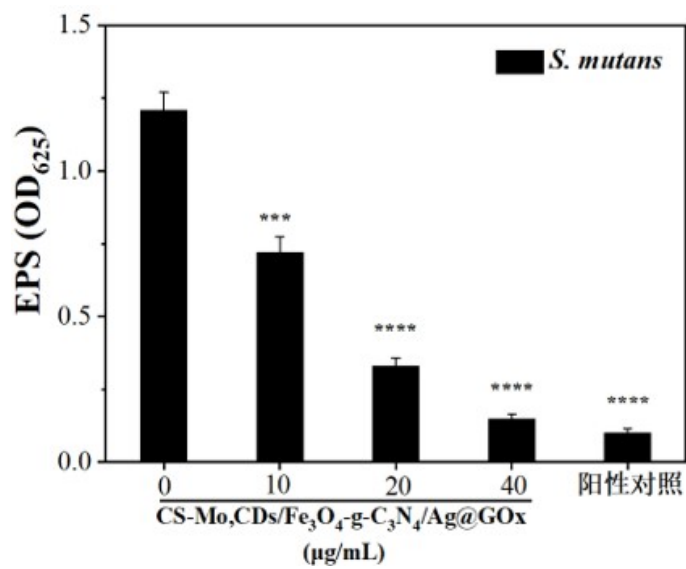


图6

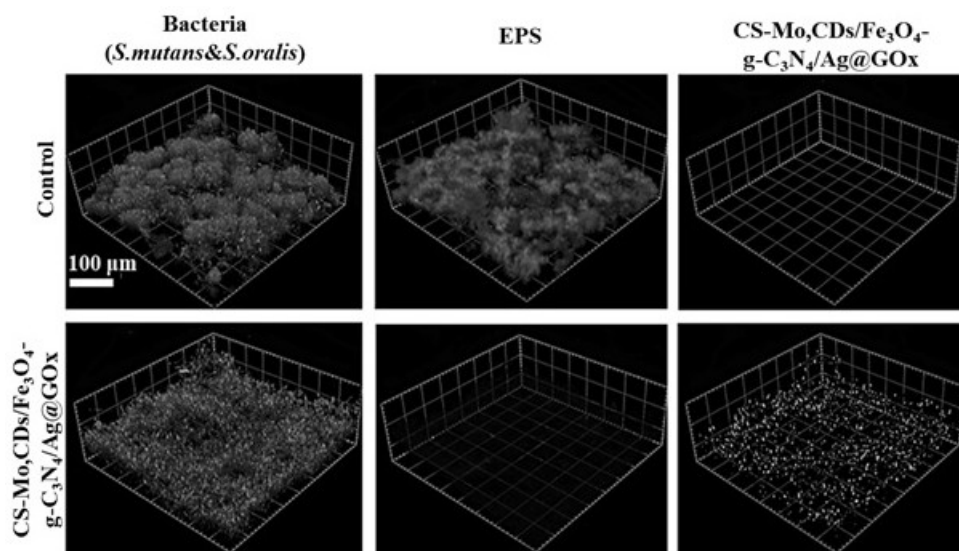


图7

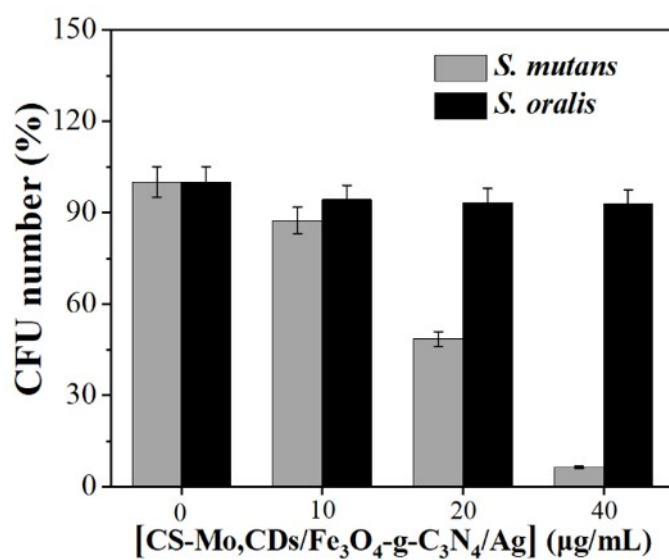


图8