



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108982430 B

(45) 授权公告日 2020.09.29

(21) 申请号 201710399645.0

CN 101551333 A, 2009.10.07

(22) 申请日 2017.05.31

CN 1138560 C, 2004.02.18

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 101235413 A, 2008.08.06

申请公布号 CN 108982430 A

CN 1188415 A, 1998.07.22

(43) 申请公布日 2018.12.11

CN 102399876 A, 2012.04.04

(73) 专利权人 北京大学

CN 106337087 A, 2017.01.18

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

CN 101210270 A, 2008.07.02

CN 104459125 A, 2015.03.25

(72) 发明人 陈兴 王炜

Arnold J. Kell.et.Vancomycin-Modified Nanoparticles for Efficient Targeting and Preconcentration of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.《ACS NANO》.2008,第2卷(第9期),第1777-1788页.

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 赵囡囡 吴贵明

Liyi Huang.et.Type I and Type II Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Therapy: An In Vitro Study on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria.《Lasers in Surgery and Medicine》.2012,第44卷第490-499页.

(51) Int.Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G12N 1/20 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2004137524 A1, 2004.07.15

EP 1247815 A2, 2002.10.09

WO 9914359 A1, 1999.03.25

JP 2004500109 A, 2004.01.08

FR 2850378 A1, 2004.07.30

CN 104755498 A, 2015.07.01

崔长征等.利用绿色荧光蛋白标记革兰氏阴性细菌的研究.《环境科学学报》.2011,第31卷(第2期),第276-282页.

审查员 刘俊

权利要求书5页 说明书15页 附图2页

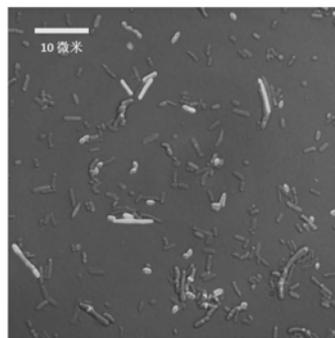
(54) 发明名称

标记细菌菌群样品的试剂盒、方法及应用

(57) 摘要

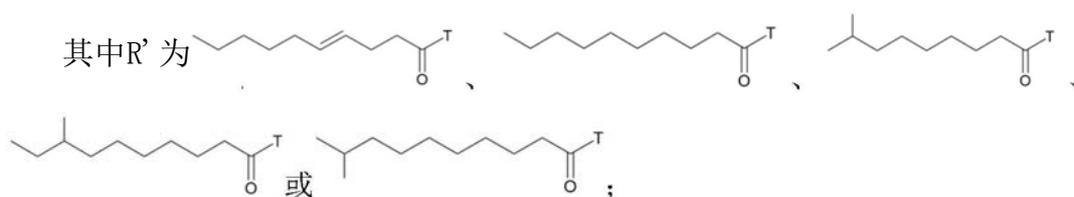
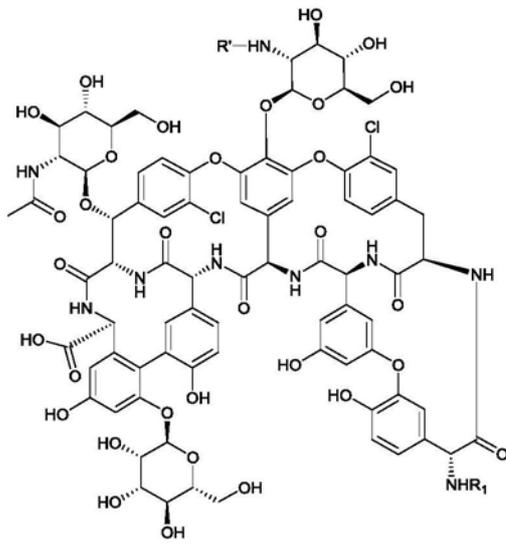
本发明提供了一种标记细菌菌群样品的试剂盒、方法、带荧光标记的细菌菌群及其应用。试剂盒包括利用第一类荧光探针和第二类荧光探针针对细菌菌群中的菌种进行标记,其中,第一类荧光探针特异性标记革兰氏阳性菌,第二类荧光探针特异性标记革兰氏阴性菌,且第一类荧光探针和第二类荧光探针分别带有不同的荧光标记。采用基于窄谱抗生素的高特异性结合两类菌种的荧光探针,可以利用两种荧光标记的互补结合,相互印证,避免仅基于一类荧光探针来对两类细菌分类所导致的误判,从而大大提高标记的

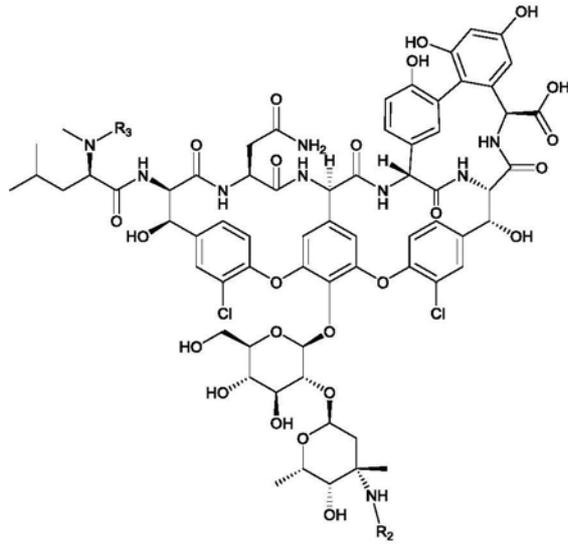
可信度。此外,还有利于更准确地统计不同荧光探针组合对细菌菌群的标记覆盖度,进而更有利于评价荧光探针组合在标记细菌菌群中的优劣。



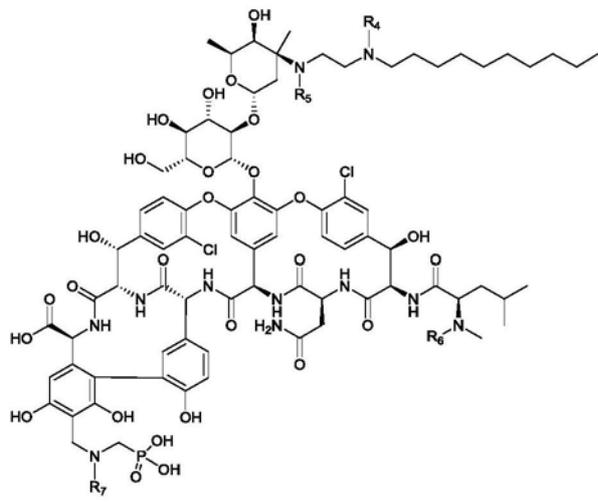
1. 一种标记细菌菌群样品的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括第一类荧光探针和第二类荧光探针,第一类荧光探针特异性标记样品中的革兰氏阳性菌,所述第二类荧光探针特异性标记革兰氏阴性菌,且所述第一类荧光探针和第二类荧光探针分别带有不同的荧光标记;所述第二类荧光探针为基于十三肽菌素类抗生素的荧光探针和基于多粘菌素的荧光探针中的任意一种或多种;所述第一类荧光探针选自基于替考拉宁类抗生素的荧光探针中的一种或多种,所述基于替考拉宁类抗生素的荧光探针包括基于替考拉宁的荧光探针、基于万古霉素的荧光探针、基于特拉万星的荧光探针、基于达巴万星的荧光探针、基于奥利万星的荧光探针、基于伊端霉素的荧光探针、基于巴尔赫霉素的荧光探针以及基于瑞斯托霉素的荧光探针,所述基于十三肽菌素类抗生素的荧光探针包括基于十三肽菌素A1的荧光探针、基于十三肽菌素B1的荧光探针和基于十三肽菌素C的荧光探针,所述荧光标记选自香豆素类荧光标记、萘类荧光标记、氟硼荧类荧光标记、氧杂蒽类荧光标记、菁类荧光标记、方酸类荧光标记以及蒽类荧光标记中的任意两种或两种以上。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述基于替考拉宁的荧光探针为

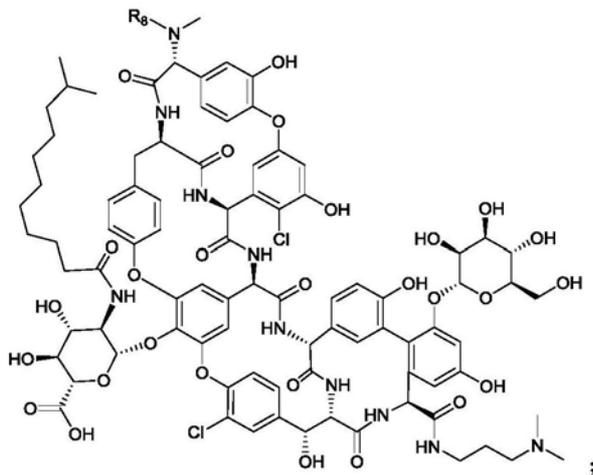




所述基于万古霉素的荧光探针为：

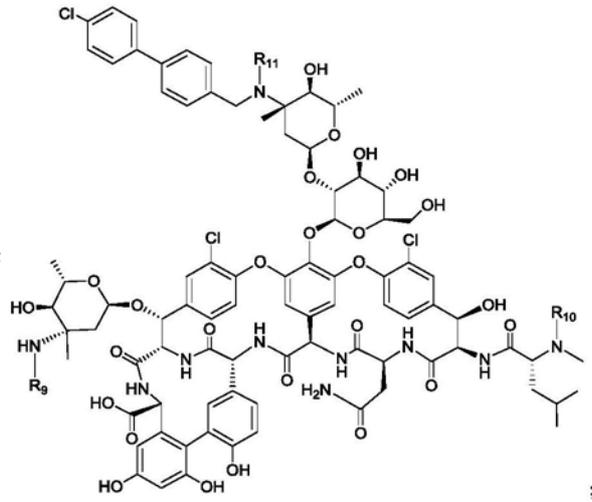


所述基于特拉万星的荧光探针为：

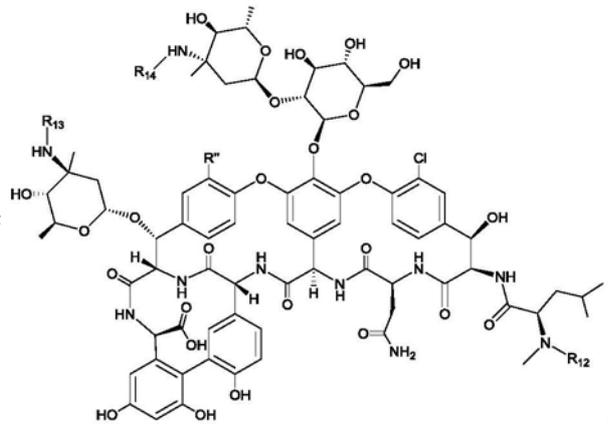


所述基于达巴万星的荧光探针为：

所述基于奥利万星的荧光探针为：

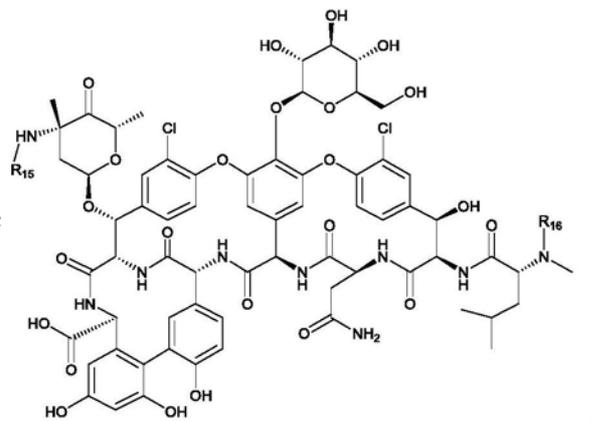


所述基于伊端霉素的荧光探针为：

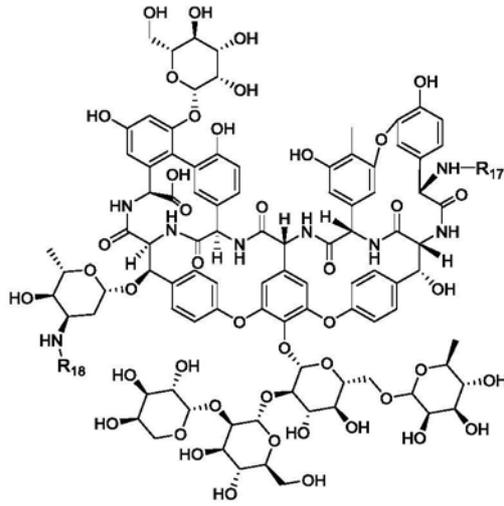


其中R''为H或者Cl；

所述基于巴尔赫霉素的荧光探针为：

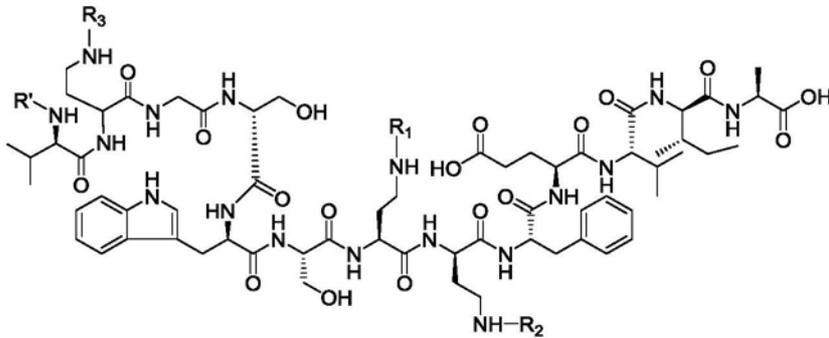


所述基于瑞斯托霉素的荧光探针为：



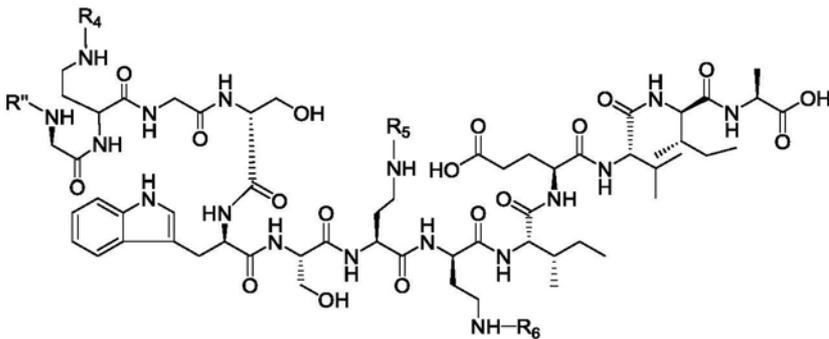
其中,R<sub>1</sub>至R<sub>18</sub>各自独立地表示荧光标记。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述基于十三肽菌素A1的荧光探针为:



其中R' 为 CCCC(O)CCCC(=O)T 或者 CCCCCCCC(=O)T;

所述基于十三肽菌素B1的荧光探针为:



其中R'' 为 CCCC(O)CCCC(=O)T 或者 CCCCCCCC(=O)T;

所述基于十三肽菌素C的荧光探针为:



## 标记细菌菌群样品的试剂盒、方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细菌荧光标记领域,具体而言,涉及一种标记细菌菌群样品的试剂盒、方法、带荧光标记的细菌菌群及其应用。

### 背景技术

[0002] 针对组成未知的细菌样品进行初步的鉴别观察有很大的科研和临床应用价值。目前常用的细菌染色、标记、成像观察主要有传统革兰氏染色、荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH)、区分性核酸染色(根据不同细菌细胞膜通透性不同)、麦胚凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)染色标记革兰氏阳性菌细胞壁等方法。

[0003] 在医院环境中的临床细菌样品,例如病人的痰液、肺部灌洗液、脓液、体液(血液、尿液、脑脊液)等,目前的常规操作仍是需要进行革兰氏染色。通过革兰氏阳性/阴性菌细胞外膜的结构不同而最终在光学显微镜的明场下呈现不同的颜色(阳性菌为紫色,阴性菌呈红色),并结合形态学观察以进行初步的细菌学诊断。

[0004] 在科研环境中,针对复杂细菌样品,包括各类宿主的细菌菌群(例如近年研究火热的哺乳动物肠道细菌)、环境细菌菌群(土壤、水体、原油细菌等),目前最可行的方式是使用FISH探针,利用针对细菌16s rRNA的含有荧光基团的DNA探针,来对特定的固定后的细菌种类进行标记成像观察(利用荧光显微镜)。

[0005] 出于各类科学研究的目的,已有一些基于抗生素的细菌标记荧光探针见诸报道。用于细菌成像观察的一类主要是基于万古霉素(特异性抗革兰氏阳性菌)抗生素的荧光探针,文献中的应用主要是用来对某种细菌细胞壁的结构进行成像观察。也有一些报道通过列举比较标记几种常见细菌种类,提到了这类探针可以特异性地标记几个革兰氏阳性菌物种。另一类见诸报道的为基于多粘菌素的探针,主要涉及到的为研究此类抗生素的作用机制与药物动力学方向。其中两种探针Vancomycin-BODIPY和Polymyxin-BODIPY市场曾经有售。

[0006] 革兰氏染色这种方法自1884年由Hans Christian Gram发明之后,其基本原理一直沿用至今。这种染色方法存在某些细菌种类染色后颜色结果不明确,染色结果受人为操作因素影响较大(染色过程中冲洗的步骤较多,往往需要靠经验判断每一步的操作细节和程度),仅能对固定之后的细菌进行操作(活的细菌无法应用),在处理含有非细菌杂质的样品时容易受杂质的染色背景影响等问题。

[0007] FISH探针的试剂盒存在DNA探针设计复杂、低rRNA含量、操作繁琐、信噪比低等问题,也是仅能对固定之后的细菌进行操作,并且只限于检测事先知其存在且引物可行性已验证的细菌,故其应用仍受很多限制。

[0008] 尽管文献中已报道的抗生素荧光探针种类包括基于多粘菌素的探针和基于万古霉素/雷莫拉宁的探针。这些探针仅限于对某些特定已知细菌种类的标记成像。而针对如肠道细菌菌群等复杂细菌体系或复杂细菌样品(指含有两种或两种以上细菌物种,且种类未

知,且可能含有非细菌类的污染物)样品中的细菌进行标记或成像鉴别,现有技术中目前还没有很好的解决办法。

**发明内容**

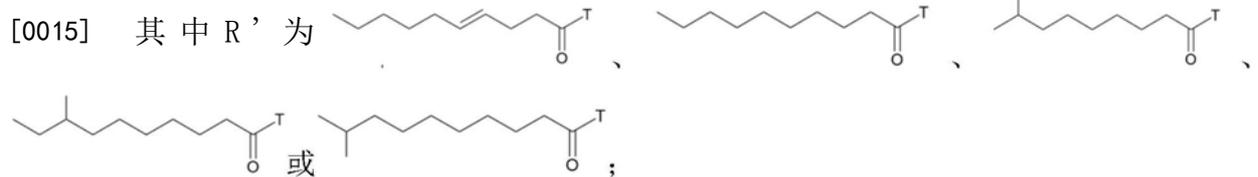
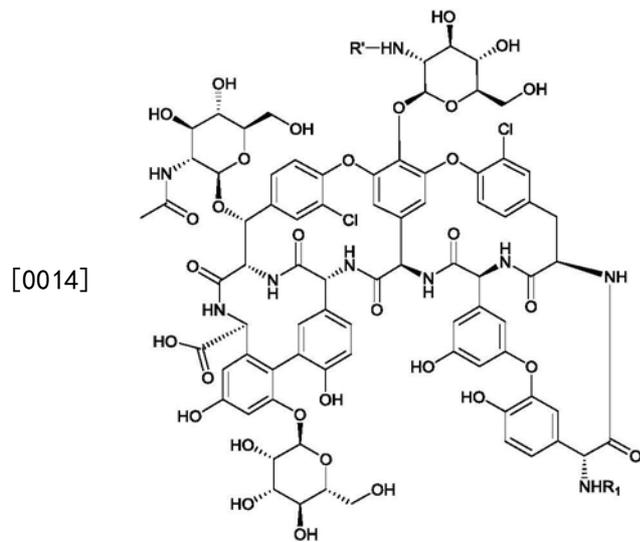
[0009] 本发明的主要目的在于提供一种标记细菌菌群样品的试剂盒、方法、带荧光标记的细菌菌群及其应用,以解决现有技术中难以对复杂细菌体系进行准确标记的问题。

[0010] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了种标记细菌菌群样品的试剂盒,试剂盒包括第一类荧光探针和第二类荧光探针,第一类荧光探针特异性标记样品中的革兰氏阳性菌,第二类荧光探针特异性标记革兰氏阴性菌,且第一类荧光探针和第二类荧光探针分别带有不同的荧光标记。

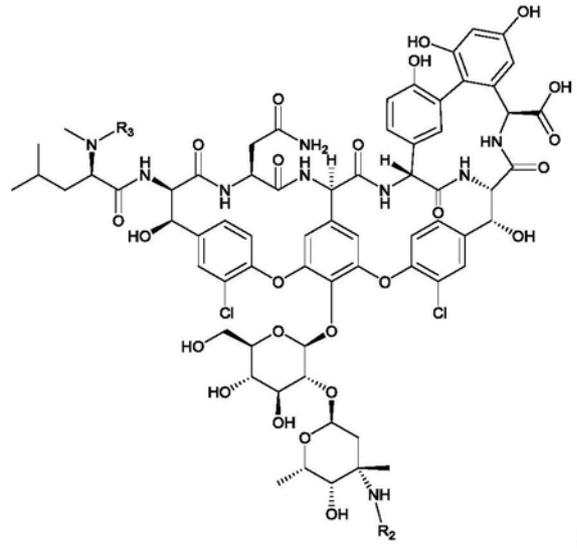
[0011] 进一步地,第一类荧光探针选自基于替考拉宁类抗生素的荧光探针中的一种或多种。

[0012] 进一步地,基于替考拉宁类抗生素的荧光探针包括基于替考拉宁的荧光探针、基于万古霉素的荧光探针、基于特拉万星的荧光探针、基于达巴万星的荧光探针、基于奥利万星的荧光探针、基于伊端霉素的荧光探针、基于巴尔赫霉素的荧光探针以及基于瑞斯托霉素的荧光探针。

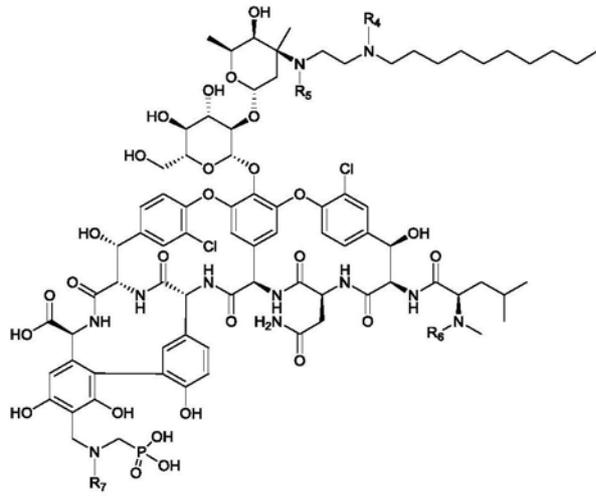
[0013] 进一步地,基于替考拉宁类抗生素的荧光探针为



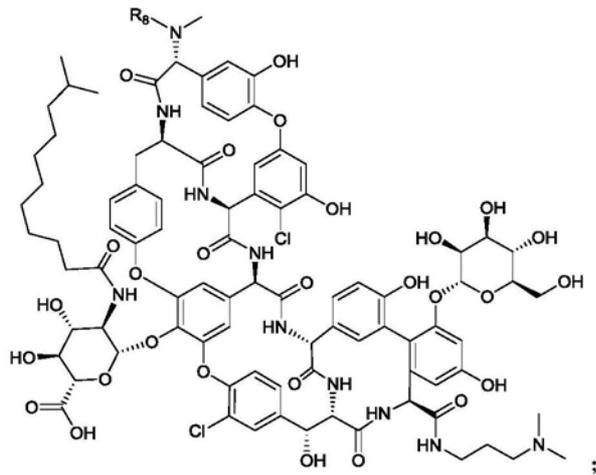
[0016] 基于万古霉素的荧光探针为：



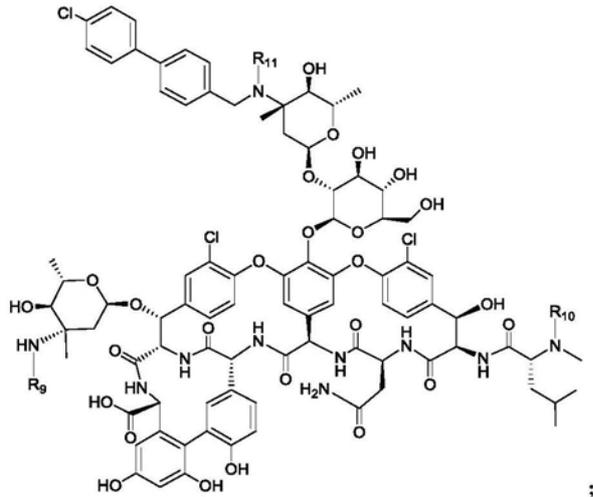
[0017] 基于特拉万星的荧光探针为：



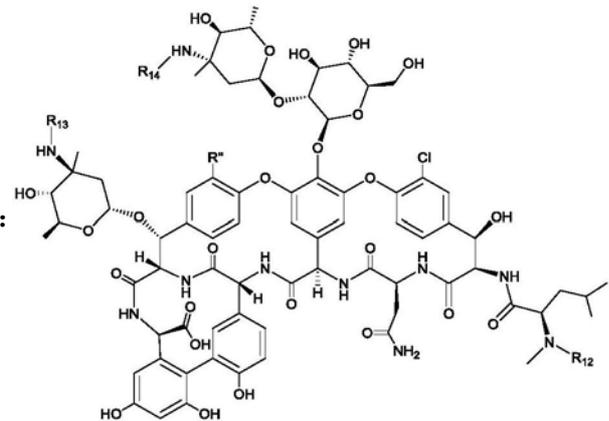
[0018] 基于达巴万星的荧光探针为：



[0019] 基于奥利万星的荧光探针为：



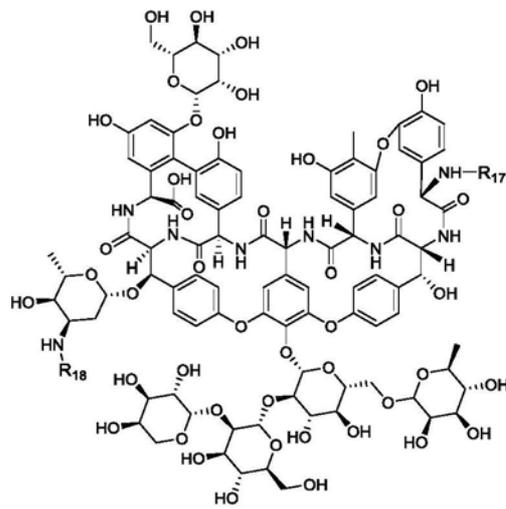
[0020] 基于伊端霉素的荧光探针为：



其中R''

为H或者Cl；

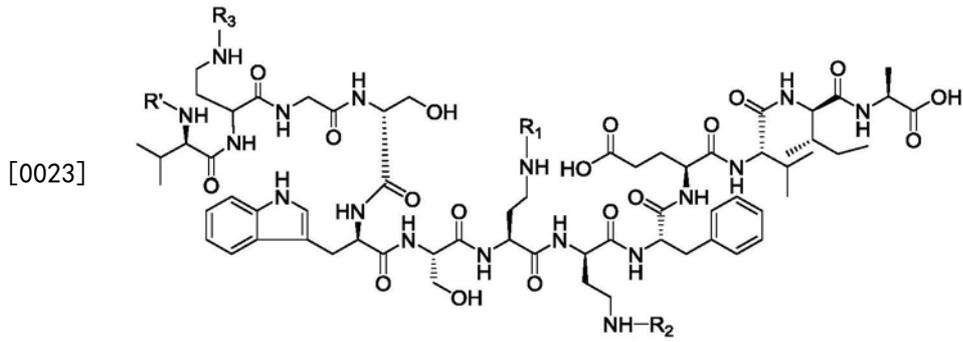
[0021] 基于瑞斯托霉素的荧光探针为：



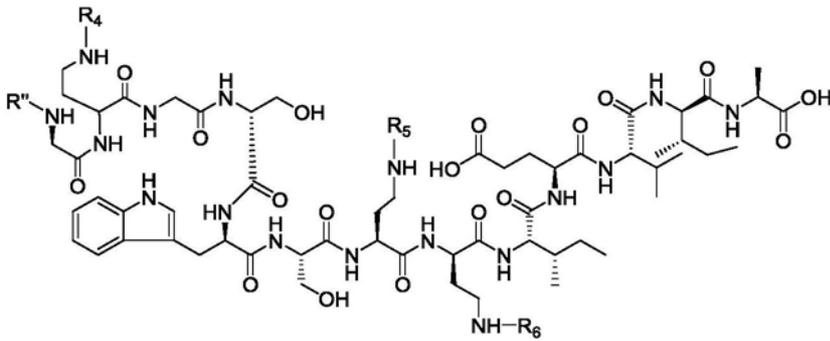
其中，R<sub>1</sub>至

R<sub>18</sub>各自独立地表示荧光标记。

[0022] 进一步地，第二类荧光探针为基于十三肽菌素类抗生素的荧光探针和基于多粘菌素类抗生素的荧光探针中的任意一种或多种；优选地，基于十三肽菌素类抗生素的荧光探针包括基于十三肽菌素A1的荧光探针、基于十三肽菌素B1的荧光探针和基于十三肽菌素C的荧光探针；更优选地，基于十三肽菌素A1的荧光探针为：

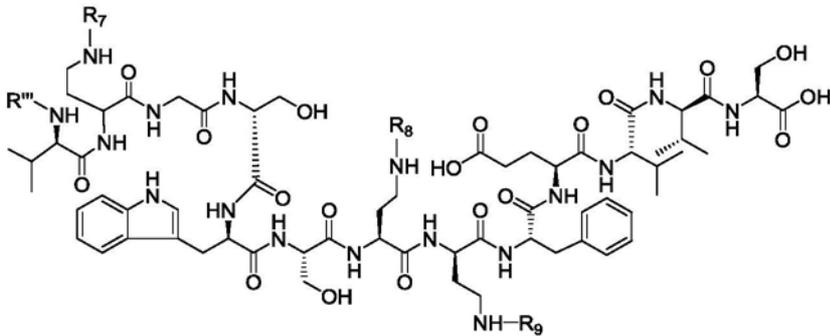


[0024] 基于十三肽菌素B1的荧光探针为:



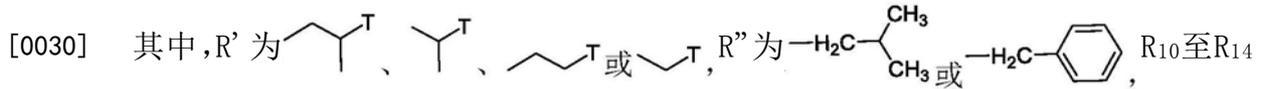
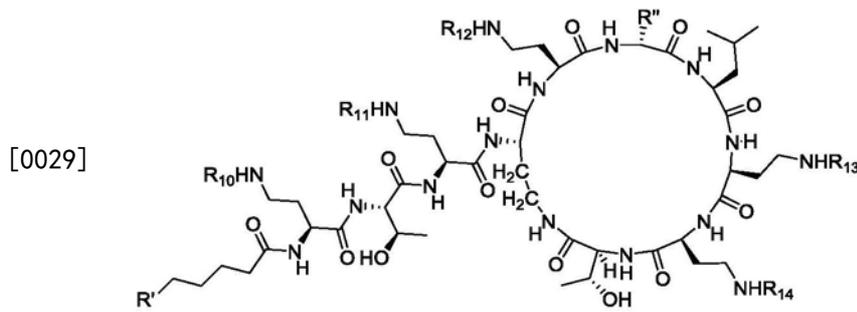
[0025] 其中R''为 或者

[0026] 基于十三肽菌素C的荧光探针为:



[0027] 其中R'''为 其中, R<sub>1</sub>至R<sub>9</sub>各自独立地表示荧光标记;

[0028] 优选地基于多粘菌素的荧光探针为:



各自独立地表示荧光标记。

[0031] 进一步地, 荧光标记选自香豆素类荧光标记、萘类荧光标记、氟硼茈类荧光标记、氧杂蒽类荧光标记、菁类荧光标记、方酸类荧光标记以及蒽类荧光标记中的任意两种或两种以上。

[0032] 为了实现上述目的, 根据本发明的一个方面, 提供了一种带荧光标记的细菌菌群, 细菌菌群通过上述任一种试剂盒中进行标记。

[0033] 根据本发明的另一方面, 提供了一种标记细菌菌群的方法, 该方法包括利用第一类荧光探针和第二类荧光探针对细菌菌群中的菌种进行标记, 其中, 第一类荧光探针和第二类荧光探针为上述任一种试剂盒中的第一类荧光探针和第二类荧光探针。

[0034] 进一步地, 利用第一类荧光探针和第二类荧光探针同时对细菌菌群中的细菌进行标记。

[0035] 根据本发明的另一方面, 提供了上述任一种带荧光标记的细菌菌群在荧光显微镜观察或流式细胞荧光分选中的应用。

[0036] 应用本发明的技术方案, 通过采用基于窄谱抗生素的高特异性结合两类菌种的荧光探针, 可以利用两种荧光标记的互补结合, 相互印证, 能够避免仅基于一类荧光探针来对两类细菌分类所导致的误判, 从而大大提高标记的可信度。此外, 采用两类探针分别对两类菌种进行标记, 还有利于更准确地统计不同荧光探针组合对细菌菌群的标记覆盖度, 进而更有利于评价荧光探针组合在标记细菌菌群中的优劣。

## 附图说明

[0037] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解, 本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明, 并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0038] 图1示出了根据本发明的一种优选的实施例中的被抗生素探针标记的小鼠肠道菌群, 其中, 绿色显示的是替考拉宁探针标记的革兰氏阳性菌, 红色显示的是十三肽菌素A1 (Tridecaptin A1) 探针标记的革兰氏阴性菌;

[0039] 图2示出了图1中的细菌样品在流式细胞仪上分别利用两种探针相应的波长对样品进行分析的散点图结果, 可以看出明确的革兰氏阳性细菌 (Q3) 和革兰氏阴性细菌 (Q1) 的分组; 以及

[0040] 图3示出了根据本发明的一种优选的实施例中的被抗生素探针标记的人类痰液细菌涂片, 其中, 绿色显示的是伊端霉素探针标记的革兰氏阴性菌, 红色显示的是十三肽菌素

B1 (Tridecaptin B1) 探针标记的革兰氏阳性菌。

### 具体实施方式

[0041] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将结合实施例来详细说明本发明。

[0042] 现有技术中虽然有报道基于抗生素的荧光探针,但这些探针仅限于对某些特定细菌种类的标记成像,并没有将其大范围地应用在复杂细菌体系和样品中进行成像鉴别的应用。为了改善现有技术中难以对复杂细菌体系进行准确标记的现状,发明人用两类分别特异性标记革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌的基于窄谱抗生素(窄谱抗生素指选择性抑制或杀灭革兰氏阴性菌或阳性菌)的探针,以对复杂细菌样品中的这两大类细菌进行直接的标记荧光成像观察。

[0043] 针对革兰氏阳性菌,发明人设计并合成了基于替考拉宁(teicoplanin)类抗生素的荧光探针,包括了基于替考拉宁、万古霉素(vancomycin)、特拉万星(telavancin)、达巴万星(dalbavancin)、奥利万星(oritavancin)、伊端霉素(eremomycin)、巴尔赫霉素(balhimycin)以及瑞斯托霉素(ristocetin)结构的荧光探针。这一类抗生素的主要作用机制是通过特异性地与细菌细胞壁肽聚糖(peptidoglycan)上的一段D-丙氨酸-D-丙氨酸结构结合,抑制肽聚糖交联、合成,进而起到抑菌杀菌的作用。在革兰氏阴性菌中,由于细胞壁外存在的主要由脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)构成的细菌外膜对替考拉宁类抗生素不通透,因此替考拉宁类抗生素不能接触到其肽聚糖,进而不能结合革兰氏阴性菌。

[0044] 通过对基于上述抗生素结构而设计的荧光探针分别进行了荧光标记测试,最终确定了一些荧光显示效果最优的革兰氏阳性菌的荧光探针。这些基于窄谱抗生素的探针皆可与复杂细菌样品中的革兰氏阳性菌直接结合从而实现特异性标记革兰氏阳性菌,以用于后续的成像分析。

[0045] 同时,针对革兰氏阴性菌,发明人设计并合成了基于十三肽菌素(tridecaptin)类抗生素的荧光探针,包括了基于十三肽菌素A1(tridecaptin A1),十三肽菌素B1(tridecaptin B1),十三肽菌素C(tridecaptin C)的探针。这类探针可以与复杂细菌样品中的革兰氏阴性菌直接结合从而实现特异性标记,以用于后续的成像分析。这类革兰氏阴性菌抗生素的抗菌机理为与革兰氏阴性菌中的脂质II(lipid II)特异性结合,通过阻断细胞壁合成起到抑菌杀菌作用。而革兰氏阳性菌脂质II的结构与革兰氏阴性菌的脂质II的结构不同,十三肽菌素不能与其结合。因而,基于该类革兰氏阴性菌抗生素的荧光探针具有标记革兰氏阴性菌特异性高的优点。

[0046] 同样针对革兰氏阴性菌,发明人还设计并合成了基于多粘菌素类抗生素的荧光探针,多粘菌素类抗生素是革兰氏阴性菌专一性的抗生素,其主要作用机制是通过与细菌外膜上的LPS结合,导致外膜膨胀,破坏细胞膜完整性,导致渗透失衡和细胞死亡。而在革兰氏阳性菌中不存在LPS结构,因而基于多粘菌素的荧光探针仅能特异性结合革兰氏阴性菌,而不能结合革兰氏阳性菌。

[0047] 基于上述两类荧光探针的研究结果,在本申请一种典型的实施方式中,提供了一种对细菌菌群进行标记的试剂盒,该试剂盒包括利用第一类荧光探针和第二类荧光探针分别对细菌菌群中的菌种进行标记,其中,第一类荧光探针特异性标记革兰氏阳性菌,第二类荧光

探针特异性标记革兰氏阴性菌,且第一类荧光探针和第二类荧光探针分别带有不同的荧光标记。

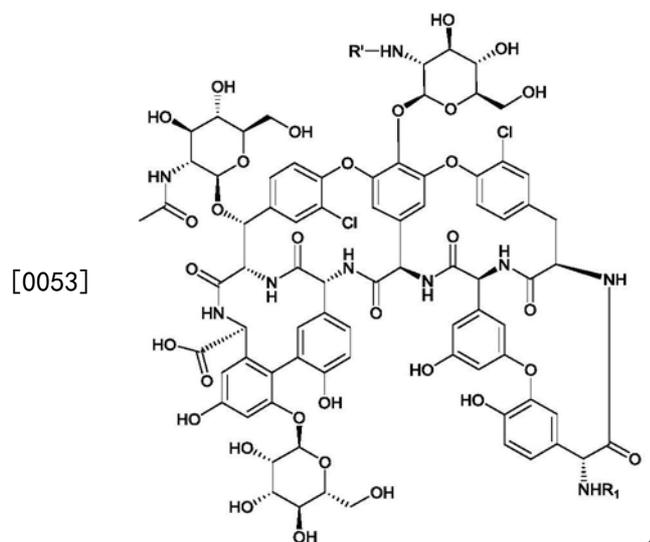
[0048] 该试剂盒同时包括特异性结合两类菌种的荧光探针,当采用第一类荧光探针特异性标记革兰氏阳性菌时,细菌菌群中未被第一类荧光探针标记上的菌种理论上应该是革兰氏阴性菌;而采用第二类荧光探针标记革兰氏阴性菌时,除了真正的革兰氏阴性菌会被标记上外,其他属于革兰氏阴性菌但由于未知原因被第一类荧光探针所标记的菌种,同样会被第二类荧光探针标记上。这样革兰氏阳性菌的荧光探针能够对革兰氏阴性菌的标记结果进行验证,同样,革兰氏阴性菌的荧光探针能够对革兰氏阳性菌的标记结果进行验证,两类探针相互印证标记结果,使得标记结果更准确。而且,在细菌样品中也存在一些不能被任何一类探针所标记的细菌,其原因可能较复杂,但利用本申请的试剂盒中的探针能够避免现有技术中仅基于一类探针来对两类细菌分类所导致的误判。此外,采用两类探针分别对两类菌种进行标记,还有利于更准确地统计不同荧光探针组合对细菌菌群的标记覆盖度,进而更有利于评价荧光探针组合在标记细菌菌群中的优劣。

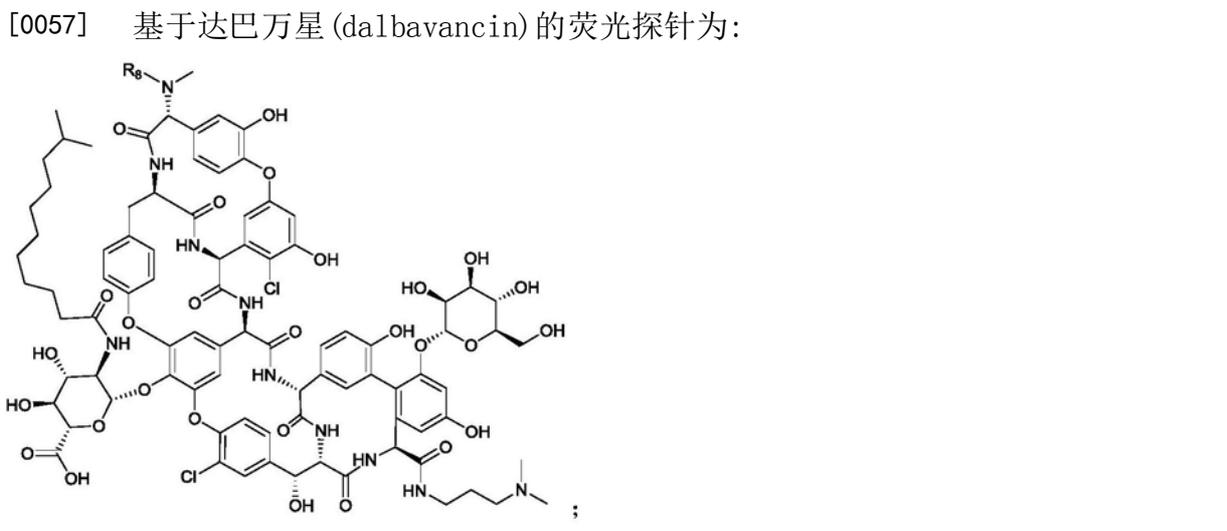
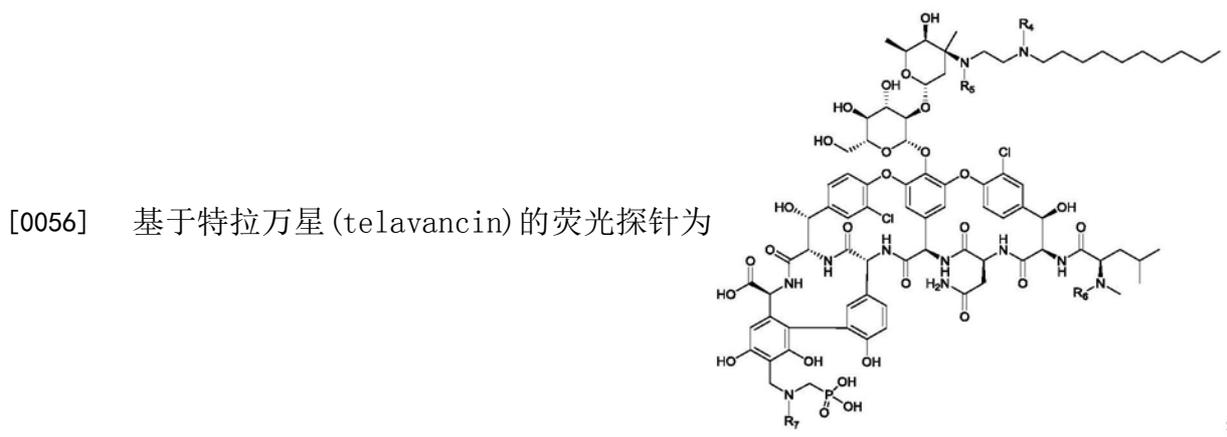
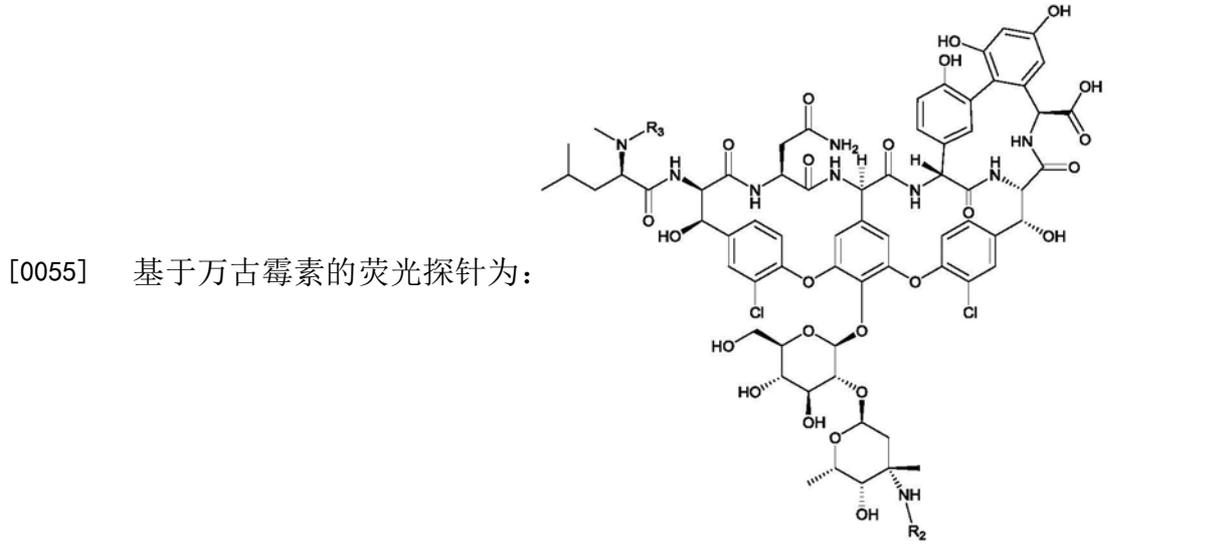
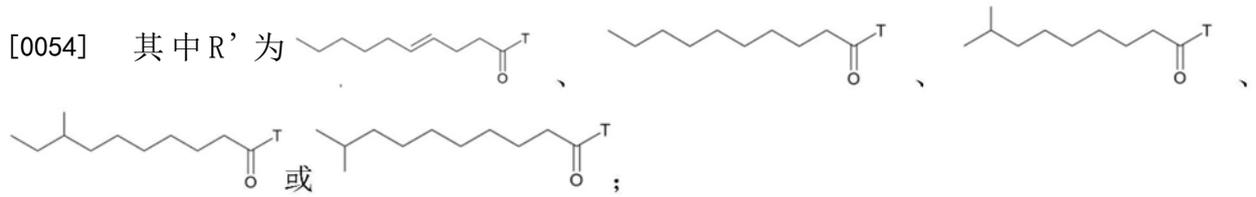
[0049] 在本申请一种优选的实施例中,第一类荧光探针选自基于替考拉宁(teicoplanin)类抗生素的荧光探针。基于上述类别的抗生素的荧光探针的设计及合成方法采用现有的方法进行,只要能够基于抗生素对革兰氏阳性菌菌种的特异结合性能,实现对革兰氏阳性菌的特异性标记即可。

[0050] 在本申请一种优选的实施例中,基于替考拉宁类抗生素的荧光探针包括基于替考拉宁的荧光探针、基于万古霉素(vancomycin)的荧光探针、基于特拉万星(telavancin)的荧光探针、基于达巴万星(dalbavancin)的荧光探针、基于奥利万星(oritavancin)的荧光探针、基于伊端霉素(eremomycin)的荧光探针、基于巴尔赫霉素(balhimycin)的荧光探针以及基于瑞斯托霉素(ristocetin)的荧光探针。

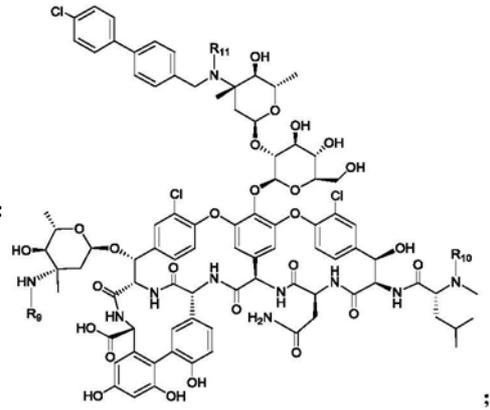
[0051] 具体上述荧光探针中的荧光标记在相应抗生素的设计位置,可以根据所选择的荧光标记的种类的不同以及抗生素结构的差异而进行合理选择适配关系,只要满足特异识别及荧光显示即可。

[0052] 在本申请一种优选的实施例中,基于替考拉宁的荧光探针为

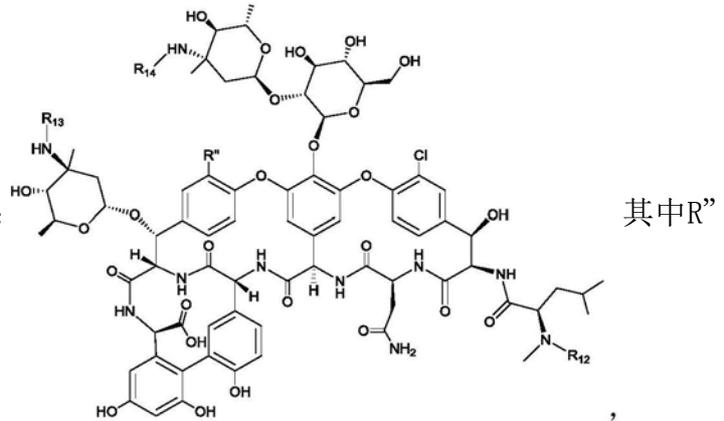




[0058] 基于奥利万星 (oritavancin) 的荧光探针为:



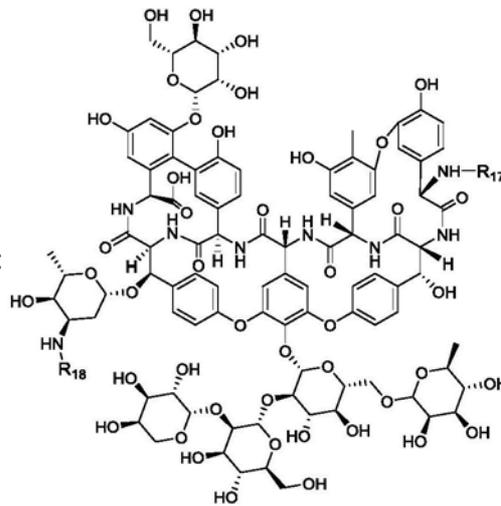
[0059] 基于伊端霉素的荧光探针为:



其中R<sup>9</sup>

为H或者Cl;

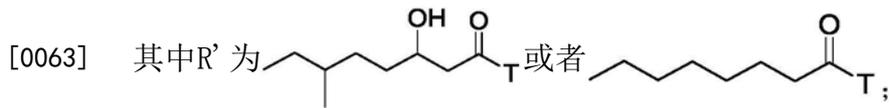
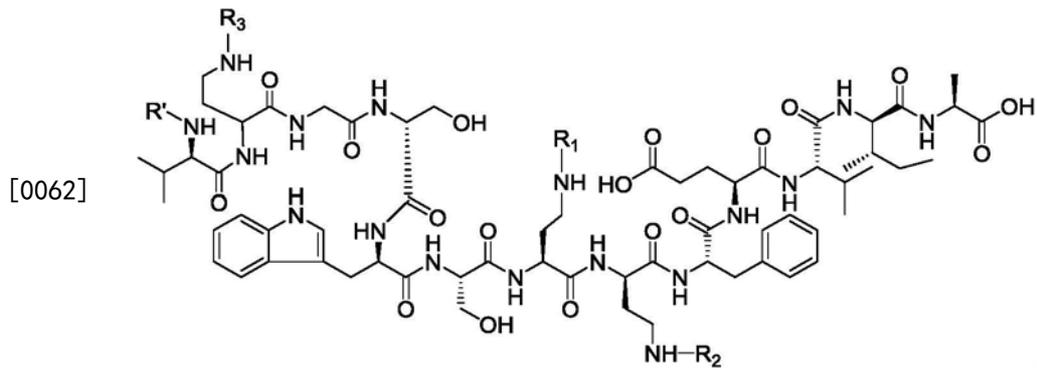
[0060] 基于瑞斯托霉素的荧光探针为:



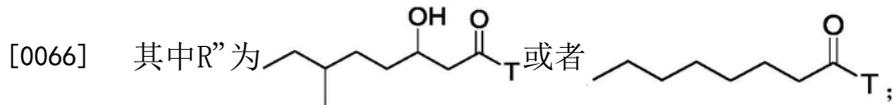
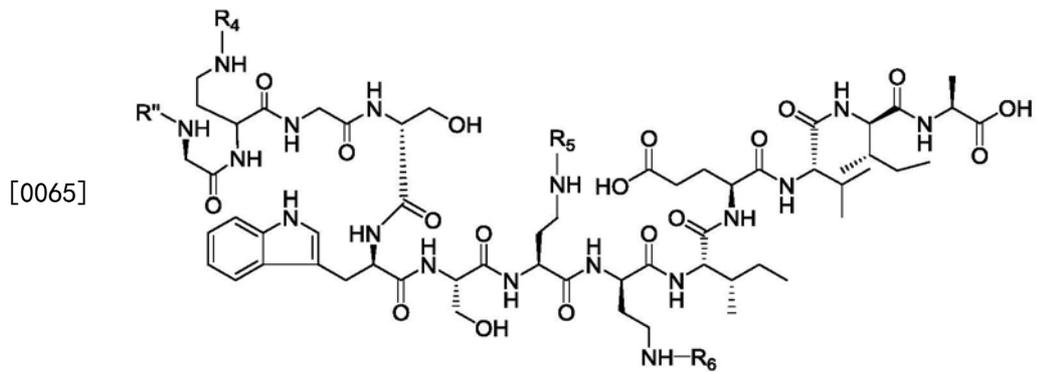
上述各荧光

探针中, R<sub>1</sub>至R<sub>18</sub>各自独立地表示荧光标记。

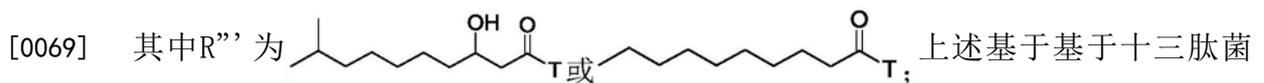
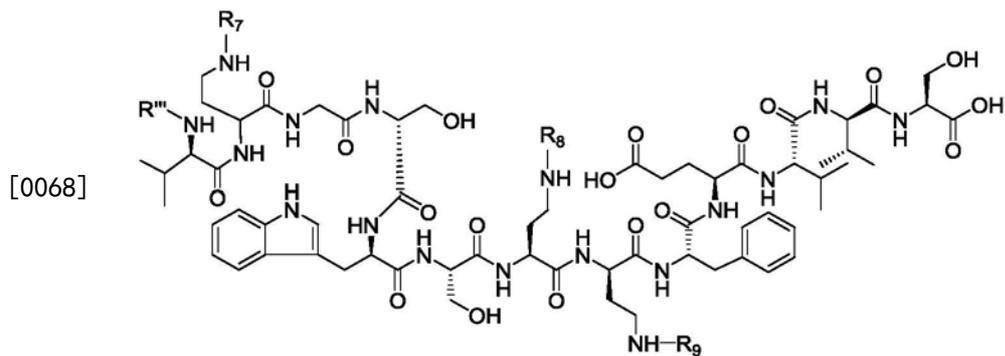
[0061] 在本申请一种优选的实施例中, 第二类荧光探针为基于十三肽菌素类抗生素的荧光探针和基于多粘菌素类抗生素的荧光探针中的一种或多种。优选基于十三肽菌素类抗生素的荧光探针包括基于十三肽菌素A1的荧光探针、基于十三肽菌素B1的荧光探针和基于十三肽菌素C的荧光探针; 更优选基于十三肽菌素A1的荧光探针为



[0064] 基于十三肽菌素B1的荧光探针为:



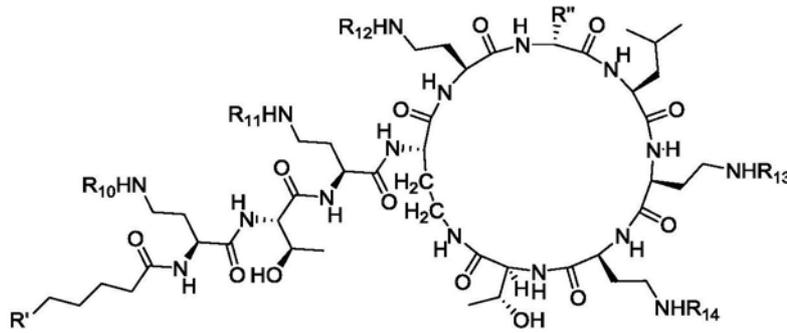
[0067] 基于十三肽菌素C的荧光探针为

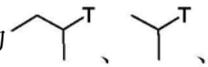
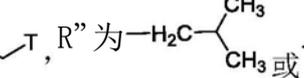


各自独立地表示荧光标记。

[0070] 优选地,基于多粘菌素的荧光探针为:

[0071]



[0072] 其中, R' 为 、、或, R'' 为 , R<sub>10</sub>至R<sub>14</sub>

各自独立地表示荧光标记。

[0073] 上述荧光探针的典型的合成步骤如下:将某种抗生素(4.0 $\mu$ mol)溶解在300 $\mu$ L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH=7.8)中,然后加入荧光标记的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯(例如Cy5-NHS, BODIPY-NHS, 罗丹明-NHS等)的DMSO溶液(5.0 $\mu$ mol溶于200 $\mu$ L)。反应在室温下避光进行20小时,后用反向高效液相色谱法(reverse phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)将带有荧光基团的抗生素探针产物分离纯化。

[0074] 上述荧光探针通过将荧光标记设计在各抗生素所标注的氨基基团位置上,对于含有一个氨基基团的抗生素,其荧光标记的位置是唯一的。但对于含有多个氨基的抗生素,则反应完成后可能存在一个探针分子含有一个、两个或多个荧光基团的结果,且无法分离出结构均一的化合物,但无论携带的荧光标记数目为一个或者多个,均不影响最终的标记结果。

[0075] 在本申请一种优选的实施例中,荧光标记选自香豆素类、萘类、氟硼茈类、氧杂蒽类、菁类、方酸类、蒽类荧光染料中的任意两种或两种以上。

[0076] 上述荧光标记均是现有的市售的荧光标记,荧光标记通常为荧光染料。具体地,香豆素类荧光染料有羟基香豆素;萘类有丹磺酰染料;氟硼茈类有BODIPY;氧杂蒽类有荧光素、德克萨斯红、Oregon green、罗丹明系列、Alexa Fluor系列;菁类有Cyanine系列;方酸类有Seta系列、SeTau系列;蒽类有DRAQ系列、CyTRAK系列。

[0077] 上述两类荧光探针分别是基于两类抗菌机制完全不同的抗生素,因此其抗生素结构能确保各探针结合相应菌种类别的特异性,而上述荧光标记的荧光显色性能对其特异性结合并无影响,因而,对具体荧光探针的荧光标记种类并无特殊限定。基于同一抗生素所合成的带有不同荧光标记的荧光探针在标记细菌菌种类别方面的性能并无明显差异。

[0078] 在本申请另一种典型的实施方式中,提供了一种带荧光标记的细菌菌群,细菌菌群中的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌通过上述任一种试剂盒进行标记。

[0079] 利用本申请试剂盒中进行细菌菌群标记,通过特异性标记革兰氏阳性菌的荧光探针和特异性标记革兰氏阴性菌的荧光探针对两类菌种分别进行标记,不仅能提高细菌菌种的标记覆盖度,而且能提高菌群分类的准确性。而且,本申请的荧光探针还适合活菌标记,能够更真实、更准确地地区分菌群类别。

[0080] 在本申请第三种典型的实施方式中,还提供了一种细菌菌群标记的方法,该方法

包括利用上述任一种试剂盒中的第一类荧光探针和第二类荧光探针对细菌菌群中的菌种进行标记。

[0081] 本申请的细菌菌群标记的方法中,第一类荧光探针和第二类荧光探针的标记顺序并无特殊限定。无论是先用一类荧光探针标记一类菌种后,再用另一类荧光探针标记另一类菌种,还是将两类荧光探针同时加入细菌菌群中进行同时标记,由于两类荧光探针具有各自的特异性,相互之间没有影响,因而都能够将两类不同菌种分别标记上,提高细菌菌群中的标记覆盖率和准确性,降低标记的错误率。

[0082] 具体在不同的标记应用中,针对不同的细菌菌群样品,其所使用的第一类荧光探针和第二类荧光探针的组合不同。第一类荧光探针和第二类荧光探针的组合中第一类荧光探针的具体种类数目并无特殊限定,只要其所携带的荧光标记的颜色能够与第二类的荧光探针中所携带的荧光标记的颜色区分开来即可。比如,第一类荧光探针可以有基于两种、三种、四种、五种甚至更多种抗生素的荧光探针,同样,第二类荧光探针也可以有基于两种、三种、四种、五种甚至更多种抗生素的荧光探针,只要这两类的荧光探针在组合使用时,荧光颜色能够区分菌种类别即可。

[0083] 在本申请第四种典型的实施方式中,还提供了一种上述带有荧光标记的细菌菌群在荧光显微镜观察或流式细胞荧光分选中的应用。两类不同荧光探针所标记的细菌菌群能够通过荧光显微镜成像观察进行菌种鉴定,由于本申请的两类探针的组合同样适用于活菌,因而也可以根据实际应用需求,可通过不同标记经流式细胞仪对两类菌种的细胞进行分选,以便对筛选出的细胞进行后续处理。

[0084] 下面将结合具体的实施例来进一步说明本申请的有益效果。

[0085] 实施例1:复杂细菌样品荧光标记的成像分析

[0086] 将小鼠肠道细菌组样品重悬在含有0.5%牛血清白蛋白(BSA)的无菌PBS溶液中(菌液密度在600nm处的吸光值为0.1-2.0),加入纯化后的标记革兰氏阳性菌的替考拉宁-罗丹明110荧光探针至终浓度0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,样品于室温下避光搅动孵育30min,后离心(13,000rpm,5min),用PBS洗三次。再将细菌样品重悬在含有0.5%BSA的无菌PBS溶液中(菌液密度在600nm处的吸光值约为1.0),加入纯化后的标记革兰氏阴性菌的十三肽菌素A1-Cy5荧光探针至终浓度0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,样品于室温下避光搅动孵育30min,后离心(13,000rpm,5min),用PBS洗三次。

[0087] 将标记完成后的细菌样品置于荧光显微镜下,分别利用两种探针相应的波长(罗丹明110,吸收/发射488/520nm,图1中显示为绿色;Cy5,吸收/发射645/670nm,图1中显示为红色)进行成像观察。

[0088] 观察结果如图1所示。从图1中可以看出,被抗生素探针标记的小鼠肠道菌群中,绿色显示的是替考拉宁探针标记的革兰氏阳性菌,红色显示的是十三肽菌素A1探针结合标记的革兰氏阴性菌。而且,经统计,两种探针的标记信号重合度很低( $<10\%$ ,显微镜下观察时重合度更低,流式细胞分析时重合度相对高些,原因未知),两者相加对所有细菌的覆盖率 $>85\%$ 。

[0089] 此外,从图1中也可以看出,菌群中仍有一些不能被两类探针所标记的细菌,因而,当仅采用一类探针对该菌群进行区分时,是难以将其与已标记的细菌的种类进行区分的。

[0090] 应用本申请的试剂盒处理的细菌样品可以是活细菌,也可以是死细菌或者多聚甲

醛固定后的样品。

[0091] 实施例2

[0092] 将实施例1处理后的细菌样品,置于流式细胞仪上分别利用两种探针相应的波长对样品进行分析,并使用流式细胞荧光分选技术(Fluorescence activated Cell Sorting)利用某一类探针的荧光实现复杂细菌样品中革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌的物理分离。

[0093] 观察结果如图2所示。从图2中看出明确的革兰氏阳性细菌(Q3)和阴性细菌(Q1)的分组及相应的比例。而且,从图2中还可以看出,通过流式细胞仪对两类菌种进行分选时,会有部分两种荧光标记重叠的细菌(Q2),同样还有少量不能被两类荧光探针所标记的菌种(Q4)。

[0094] 实施例3:临床痰液涂片样品中革兰氏阳性/阴性细菌染色分析

[0095] 以临床病人痰液为例说明本发明中的两类探针在临床细菌样品中的应用。将痰液样品混匀于PBS中,均匀涂于载玻片,自然干燥后利用火焰法固定。随后将含有革兰氏阳性菌特异性的伊端霉素-Alexa Fluor 647探针(0.1-100 $\mu$ g/mL)和革兰氏阴性菌特异性的十三肽菌素B1-BODIPY探针(0.1-100 $\mu$ g/mL)的PBS溶液(含有0.5%牛血清白蛋白)加到其上,于室温下孵育30分钟,后用PBS充分清洗后(约2小时),可直接利用荧光显微镜对两类细菌的染色进行观察。观察结果如图3所示,革兰氏阳性菌可被伊端霉素-Alexa Fluor 647探针结合图中显示为红色,革兰氏阴性菌可被十三肽菌素B1-BODIPY探针结合,图中显示为绿色。结合其形态观察,可以对菌种类别进行区分。

[0096] 从以上的描述中可以看出,在现有技术中,当菌群中存在一些细菌不能被任何一种探针标记(比如,某些细菌表面存在荚膜多糖等情况时),或者存在细胞结构破损的细菌或其他易吸附物质的干扰的问题时,单一荧光探针对细菌菌群类别进行标记和区分的准确度和可信度比较低。而本申请通过设计合成两大类含有不同荧光标记的基于窄谱抗生素的高特异性探针,可以利用两种荧光标记的互补结合,相互印证,从而大大提高标记的可信度。此外,对临床细菌样品也提供了传统革兰氏染色方法之外的染色和观察手段,且无需固定,实现了对活细菌的直接标记成像观察,从而提高临床细菌诊断的准确度和覆盖率。

[0097] 相比FISH探针所存在的一系列问题,本申请的试剂盒中的两类探针的适用范围广(两种探针的组合使用可适用于绝大部分的样品);标准比较统一(无需考虑探针设计或合成);操作简单(无需固定,适用于活细菌),染色标记完成后还可以对样品继续进行其他实验研究。

[0098] 相比较另一种根据不同细菌细胞膜穿透性不同而利用差异性核酸染色来选择性标记细菌的方法,本申请的试剂盒具有特异性高,适用于固定后的样品(固定后往往不同细菌对核酸染料的区分性就会丢失)以及含有非细菌性组分(往往有核酸染料吸附背景)的样品的优点,染色标记完成后还可以对样品继续进行其他实验研究。

[0099] 相比较通过使用麦胚凝集素(wheat germ agglutinin,WGA)标记革兰氏阳性菌细胞壁(结合其中的N-乙酰葡萄糖胺)的选择性细菌标记方法,本申请的试剂盒中的荧光探针具有特异性更高的优势。由于WGA也能结合非革兰氏阳性菌细胞壁成分,例如唾液酸(存在于很多革兰氏阴性菌表面)和非细菌来源物质中的N-乙酰葡萄糖胺,导致此方法的标记特异性下降。而本申请的试剂盒的标记原理基于具有高特异性结合能力的窄谱抗生素,故标

记的选择性更好,抗干扰能力更强。

[0100] 本申请的探针可以以高覆盖度,高特异性地标记绝大部分革兰氏阳性和阴性菌。应用本发明中的方案,可以很好地对目前临床中所使用的传统革兰氏染色方法形成互补,为细菌诊断提供更多且相对更准确的信息。而且还可以对活的细菌样品做出快速的基于细菌细胞外膜结构特点的区别性标记及物理分离。

[0101] 本申请中涉及到的抗生素还可以是其他未上市的或尚未为我们所知的功能或者结构类似的化合物,或者结构经过简单改变的化合物,利用荧光标记衍生后也可起到类似的标记效果。具体在利用荧光标记进行衍生过程中,除了本申请所提到的合成方式外,也可以利用其他的化学反应,例如利用抗生素分子中的羧基等活性基团等,进行反应,从而生成功能类似的探针。

[0102] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

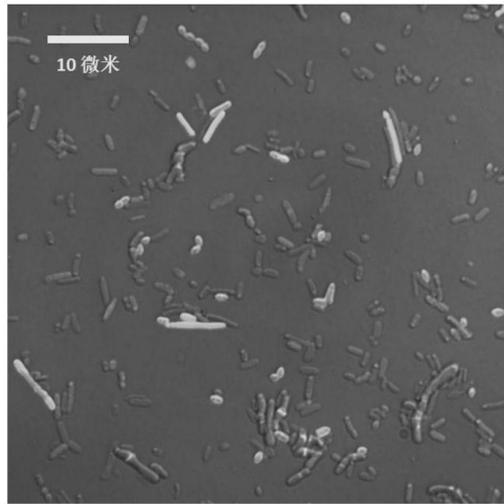


图1

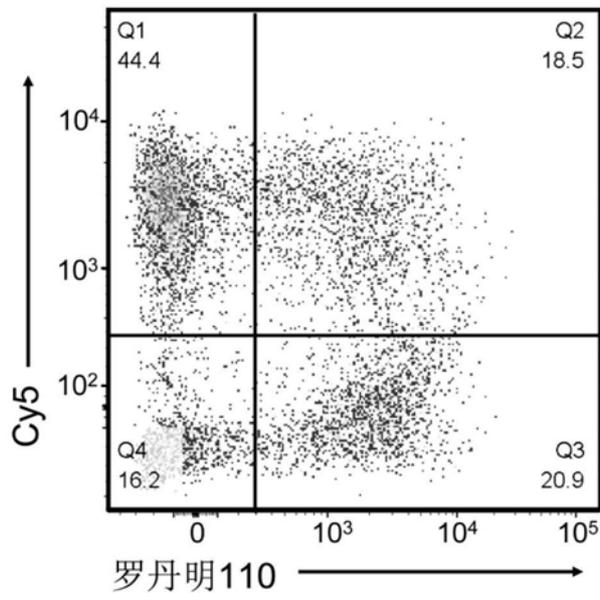


图2

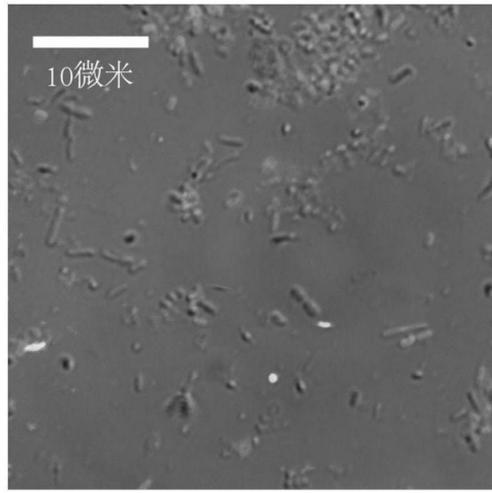


图3