

权 利 要 求 书

1、一种具备有 pH 敏感抗菌特性的新型叔胺单体 (DMAEM , dodecylmethylaminoethyl methacrylate)在制备抑制口腔及胃部幽门螺杆菌药物中的用途。

2、如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,所述新型叔胺单体作用于幽门螺杆菌后, MIC 为 $8\mu\text{g/mL}$; 对于幽门螺杆菌的 MBC 为 $64\mu\text{g/mL}$; 叔胺作用浓度在 $>8\mu\text{g/mL}$ 时能对幽门螺杆菌的生长繁殖及致病作用起到有效抑制,而在 $>64\mu\text{g/mL}$ 时能有效杀灭幽门螺杆菌。

3、一种如权利要求 1~2 任意一项所述用途中的新型叔胺单体作为抗幽门螺杆菌的新型材料的药效检测方法,其特征在于,所述检测方法包括:

步骤一,平板及液体培养基培养,确定药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度;

步骤二,药物作用下细菌菌量变化测定和药物对细菌毒力水平影响测定;

步骤三,细胞安全性检测。

4、如权利要求 3 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤一中,平板及液体培养基培养具体过程为:

使用 $10\mu\text{L}$ 一次性接种环,将幽门螺杆菌均匀涂抹于 CBA 固体培养基上,置于二氧化碳恒温孵箱, 37°C ,微需氧条件下培养 24 小时;

所述微需氧条件为: 5%氧气, 10%二氧化碳和 85%氮气。

药物最小抑菌浓度及最小杀菌浓度确定,具体过程为:

使用 $10\mu\text{L}$ 一次性接种环,从 CBA 培养基上刮下新鲜菌体,置于 BHI 血清培养基中,交替使用枪尖吹打和涡旋振荡器充分混匀;

使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 调节菌液 OD 值为 $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.3$, 稀释 10 倍,此时菌液浓度约为 $1\times 10^5\text{ CFU/mL}$; 菌液加入无菌 96 孔板,体系为 $100\mu\text{L}$,加入 $98\mu\text{L}$ 菌悬液与 $2\mu\text{L}$ 2 倍连续稀释后的 DMAEM,使药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、 $128\mu\text{g/mL}$,置于孵箱中培养 24 小时;后观察菌液清亮的最低药物浓度组为该药物 MIC,从每个药物作用浓度的孔中吸取 $2\mu\text{L}$ 菌液垂直悬空滴加于 CBA 培养基,培养 24 小时后,无菌落生成的最低药物浓

权 利 要 求 书

度为该药物的 MBC，该实验设置三组平行样本。

5、如权利要求 3 所述的检测方法，其特征在于，所述步骤二中，药物作用下细菌菌量变化测定过程为：制备活菌菌量标准曲线和菌量测定；

制备活菌菌量标准曲线具体过程为：

使用无菌 10 μ L 一次性接种环刮下 CBA 固体培养基上菌体置于 PBS，混匀，调节 OD_{600nm}=1，菌液浓度约为 1 $\times 10^8$ CFU/mL；依次 10 倍梯度稀释，得到 1 $\times 10^8$ CFU/mL、1 $\times 10^7$ CFU/mL、1 $\times 10^6$ CFU/mL、1 $\times 10^5$ CFU/mL 和 1 $\times 10^4$ CFU/mL 浓度菌液各 1mL；该实验设置三组平行样本，按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作；将上述中所得样本通过 5000g 离心 10 分钟，以提取的 DNA 为模板，使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒，采用 12.5 μ L 体系，在 LightCycler 480 II System 实时荧光定量 PCR 仪上运行，检测幽门螺杆菌 16S rDNA 基因；以细菌浓度的对数值作为横坐标 x 值，上一步得到的 CT 值为纵坐标 y 值绘制回归曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，所得实验数据的统计学分析使用软件 SPSS 16.0 完成；

菌量测定过程为：使用多功能酶联检测仪 SpectraMax iD5 检测细菌 OD 值；取各药物浓度菌液 1mL，提取细菌 DNA，通过 qPCR 获得 CT 值，并通过上述得到公式进行活菌菌量测定；

药物对细菌毒力测定具体过程为：

在测得 DMAEM 对幽门螺杆菌的 MIC 为 8 μ g/mL，在 MIC 以下，取药物浓度为 0、0.5、1、2、4、8 μ g/mL 作用于幽门螺杆菌并孵育 24 小时；富集菌液 1mL，5000rpm 离心 10 分钟，Trizol 重悬；

提取细菌 RNA：转移至加有氧化锆磁珠的破壁管中，液氮冷却，在高速组织匀浆机中破碎细胞；冰浴 2-5 分钟，待破壁过程产生的气泡逐渐消失；加入 350 μ L“氯仿：异戊醇（24:1）”溶液，涡旋振荡器震荡 15 秒，静置 10 分钟；13000 rpm，4℃，离心 15 分钟；吸取 400 μ L 上层澄清液体，转移至新的无酶 EP 管内；依次加入已预冷的 350 μ L 高盐溶液和 250 μ L 异丙醇，上下颠倒 EP 管数次以充

权 利 要 求 书

分混匀, 静置 10 分钟; 13000 rpm, 4℃, 离心 15 分钟; 弃去上清液, 13000 rpm, 4℃, 离心 2 分钟, 小心去尽上清液; 向沉淀中加入 1 mL 提前预冷的 70%乙醇溶液, 上下颠倒 EP 管数次, 13000 rpm, 4℃条件下离心 5 分钟; 弃去上清, 自然风干底部沉淀; 根据底部沉淀多少, 加入 40-70μL 无酶水; 65℃水浴 10 分钟, 使用无酶枪尖吹打混匀; 使用 NanoDrop 2000 分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度;

RNA 纯化及反转录: 使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, 去除 RNA 样本中的 DNA 进行纯化及后续的 RNA 反转录过程。

6、如权利要求 5 所述的检测方法, 其特征在于, 所述实时荧光定量反转录聚合酶链式反应: 以反转录后的 cDNA 为模板, 每个样本设置 4 个复孔, 使用 TB Green™ Premix Ex Taq™ II 试剂盒, 采用 20 μL 体系; 在 LightCycler 480 II System 实时荧光定量 PCR 仪上运行, 确定反应条件; 以幽门螺杆菌管家基因 *16S rRNA* 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行幽门螺杆菌 *16S rRNA*、*VacA*、*CagA*、*UreaB*、*FlaA*、*LuxS* 的表达检测。

7、如权利要求 3 所述的检测方法, 其特征在于, 所述步骤三中, 细胞安全性检测过程为:

96 孔板里, 接种 1×10^4 个 HOK 细胞或 L929 细胞, 于 5% CO₂ 细胞培养箱、37℃过夜孵育; 细胞贴壁后, 吸去原培养基, 加入新鲜 100μL 含不同浓度 DMAEM 的 DMEM 培养基, 在 37℃细胞培养箱孵育; 每组 6 个复孔, 24 h 后, 利用 CCK8 试剂盒进行细胞增殖毒性检测。

8、如权利要求 7 所述的检测方法, 其特征在于, 所述细胞安全性检测过程还包括: 吸去原培养基, PBS 洗三遍, 加入 100μL 含 10% CCK8 试剂的 DMEM 培养基, 37℃细胞培养箱内避光孵育; 1~2 小时后, 吸取上清转移到新的 96 孔板, 在酶标仪下读取 A450 的光吸收值。

9、一种抑制口腔及胃部幽门螺杆菌的检测试剂盒, 其特征在于, 所述抑制口腔及胃部幽门螺杆菌的检测试剂盒包含权利要求 1~2 任意一项所述新型叔胺

权 利 要 求 书

单体。

10、一种如权利要求 1~2 任意一项所述新型叔胺单体在制备抗幽门螺杆菌及幽门螺杆菌导致的慢性胃炎、胃溃疡、胃腺癌、黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的相关疾病药物中的应用。