

体外抗真菌活性测试

In Vitro Antifungal Activity Test

杨万镇^{1,2,#}, 涂杰^{1,#}, 盛春泉¹, 刘娜^{1,*}

¹药学院, 中国人民解放军海军军医大学, 上海; ²药学院, 福建中医药大学, 福州市, 福建省

*通讯作者邮箱: liuna@smmu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 杨万镇, 涂杰, 盛春泉, 刘娜. (2020). 体外抗真菌活性测试. *Bio-101* e1010851. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010851.

How to cite: Yang, W.Z., Tu, J., Sheng, C.Q. and Liu, N. (2021). *In vitro* antifungal activity test. *Bio-101* e1010851. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010851. (in Chinese)

摘要: 真菌感染是临床上一类常见病、多发病。真菌感染分为深部真菌感染和浅部真菌感染。近年来, 随着免疫受损人群的增加, 深部真菌感染的发病率和致死率大幅上升。目前用于深部真菌感染临床治疗的抗真菌药物数量十分有限, 且普遍存在毒副作用大、耐药性严重等问题。因此, 开发新型的抗真菌药物十分必要。体外抗真菌活性测试用于抗真菌药物的高通量筛选, 该方法是采用微量液基稀释法或棋盘法测定真菌培养物的光密度值 (OD), 以此评价化合物对真菌的体外抑制活性, 从而筛选出具有抗真菌活性的目标化合物。

关键词: 抗真菌活性测试, 协同活性测试, MIC, FICI

材料与试剂

1. 15 ml 玻璃摇菌管 (上海泰坦科技股份有限公司)
2. 1.5 ml 离心管 (上海越夷生物科技有限公司)
3. 50 ml 离心管 (上海越夷生物科技有限公司)
4. 血球计数板 (上海泰坦科技股份有限公司)
5. 6 孔 (或 24 孔)、96 孔细胞培养板 (Corning) (康宁生命科学(吴江)有限公司)
6. DMSO (翌圣生物科技(上海)股份有限公司)

7. PBS 缓冲溶液 (见溶液配方)
8. YEPD 培养液 (见溶液配方)
9. RPMI 1640 培养液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 医用低温保存箱 (青岛海尔特种电器有限公司, 型号: DW-86W100J)
2. 生物安全柜 (苏州安泰空气技术有限公司, 型号: BSC-1004II A2)
3. 数显气浴恒温振荡器 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司, 型号: THZ-92A)
4. 精密分析电子天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司, 型号: ME204E)
5. 空冷型台式高速离心机 (上海泰坦科技股份有限公司, 型号: HDC-15K)
6. 低速离心机 (大龙兴创实验仪器北京有限公司, 型号: DM0412)
7. 旋涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号: VORTEX-5)
8. 生物显微镜 (北京测维光电技术有限公司, 型号: LW100T)
9. 霉菌培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司, 型号: MJ-150-I)
10. 酶标仪 (赛默飞世尔上海仪器有限公司, 型号: Thermo Multiskan FC)
11. 微量可调移液器 (德国艾本德上海股份公司, 型号: Eppendorf Research plus 单道可调量程移液器: 10 μ l/100 μ l/1000 μ l, 8 道可调量程移液器: 300 μ l/道)

实验步骤

1. 待测化合物的配制: 将待测化合物用 DMSO 配制成 2 mg/ml 的母液。
2. 待测菌株的活化: 于 -80 °C 低温保存箱中取出冻存的待测菌株, 吸取 10 μ l 菌液加入装有 1 ml YEPD 培养液的玻璃摇菌管中, 置于 30 °C 气浴恒温振荡培养箱中, 200 rpm/min 振荡培养。24 h 后从 YEPD 菌悬液中吸取 10 μ l 加入到新的 1 ml YEPD 培养液中, 继续 30 °C 振荡培养 16 h, 活化完成, 此时的真菌即处于指数生长末期。
3. 菌悬液的配制: 取处于指数生长末期的待测菌株置于 1.5 ml 离心管中, 离心 (3000 rpm, 1 min), 吸弃上清液, 使用 1 ml PBS 缓冲溶液洗涤菌株, 离心 (3000 rpm, 1 min), 吸弃上清液, 重复洗涤 3 次。取 10 μ l 真菌原液稀释 100 倍后使用血球计数板于生物显微镜下计数, 计算出真菌原液的菌浓度, 然后用 RPMI 1640 培养液

稀释配制成实验所需浓度 (1×10^3 CFU/ml) 的菌悬液。

4. MIC₈₀ 的测定 1-5: 采用美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M27-A3 和 M38-A2 文件所推荐的微量液基稀释法进行测定, 并通过培养物的光密度值(OD)来评价真菌的生长情况, 以此考察化合物对真菌的体外抑制活性。如图 1 所示, 将配制好的菌悬液涡旋均匀后转移至 96 孔细胞培养板的 B-G 行中, 第 1 列每孔加入 200 μ l, 第 2-11 列每孔加入 100 μ l。将配制好的待测化合物溶液分别加入第 1 列的 B1-D1 和 E1-G1 孔中, 作三复孔, 每孔加入 6.4 μ l 待测化合物使其终浓度为 64 μ g/ml。各列从左到右依次进行倍半稀释使得第 1-10 列的化合物终浓度分别为 64-0.125 μ g/ml。第 11 列各孔中为未加任何药物作用的菌悬液, 作为阴性对照组。96 孔细胞培养板最外周即第 12 列、A 行和 H 行各孔中加入空白的 RPMI 1640 培养液, 作为空白对照组。将 96 孔细胞培养板置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置培养, 48 h 后 (隐球菌培养时间为 72 h) 使用酶标仪测定每孔真菌在 630 nm 处的光密度值 OD₆₃₀。以阴性对照组的 OD₆₃₀ 值为 100%, 依据抑菌率 (%) 公式 (1) 计算各孔对应的不同药物浓度下化合物的抑菌率 (%), 抑菌率 (%) $\geq 80\%$ 时所对应的最小浓度即为该化合物的最低抑菌浓度值 (MIC₈₀)。

抑菌率(%)的计算公式为:

$$\text{抑菌率(\%)} = (\text{OD}_{630 \text{ 阴性对照组}} - \text{OD}_{630 \text{ 药物组}}) / (\text{OD}_{630 \text{ 阴性对照组}} - \text{OD}_{630 \text{ 空白对照组}}) \times 100\% \quad (1)$$

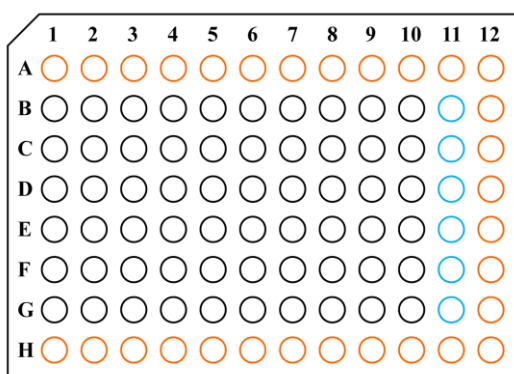


图 1. MIC 的测定实验中 96 孔板的布局图。其中, 红色: 空白 RPMI1640, 作为空白对照; 蓝色: 未加任何药物作用的菌悬液, 作为阴性对照; 黑色: 加待测药物作用的菌悬液。

5. **FICI 的测定 6-11:** 采用 CLSI 推荐的棋盘式微量液基稀释法（棋盘法）进行测定，并通过培养物的光密度值（OD）来评价真菌的生长情况，以此考察化合物对真菌的体外协同抑制活性。将配制好的菌悬液涡旋均匀后转移至 6 孔细胞培养板中，第 1 孔加入 2.6 ml，第 2-6 孔每孔加入 1.3 ml。取 83.2 μ l 待测化合物溶液加入第 1 孔中使其终浓度为 64 μ g/ml，依次进行倍半稀释使得第 1-6 孔中的化合物终浓度分别为 64-2 μ g/ml。如图 2 所示，将在 6 孔细胞培养板中配制好的含药菌悬液按化合物浓度从高到低 (64-2 μ g/ml) 依次对应转移至 96 孔细胞培养板的 A-F 行中，第 1 列每孔加入 200 μ l，第 2-10 列每孔加入 100 μ l。第 11 列的 A11-F11 孔和第 G 行的 G1-G9 孔中加入未加药的空白菌悬液，100 μ l/孔。将配制好的 FLC 溶液分别加入第 1 列的 A1-G1 孔中，每孔加入 6.4 μ l 使其终浓度为 64 μ g/ml。各列从左到右依次进行倍半稀释使得第 1-9 列的 FLC 终浓度分别为 64-0.25 μ g/ml。96 孔细胞培养板第 11 列的 A11-F11 孔中为未加任何药物作用的菌悬液，作为阴性对照组。第 12 列和 H 行各孔中分别加入 100 μ l 的 RPMI 1640 培养液，作为空白对照组。将 96 孔细胞培养板置于 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中静置培养，48 h 后（隐球菌培养时间为 72 h）使用酶标仪测定每孔真菌在 630 nm 处的光密度值 OD₆₃₀。以阴性对照组的 OD₆₃₀ 值为 100%，依据抑菌率 (%) 公式 (1) 计算各孔对应的不同药物浓度下化合物的抑菌率 (%)，根据化合物和 FLC 单用或联用时的 MIC₈₀ 值计算协同指数 FICI (公式 2)。

FICI 的计算公式为：

$$FICI = MIC_{80 \text{ 化合物(联用)}} / MIC_{80 \text{ 化合物(单用)}} + MIC_{80 \text{ FLC(联用)}} / MIC_{80 \text{ FLC(单用)}} \quad (2)$$

注：FICI < 0.5，说明化合物与阳性药具有协同作用；FICI > 4，说明化合物与阳性药具有拮抗作用；0.5 ≤ FICI ≤ 4，说明化合物与 FLC 之间无相关作用。

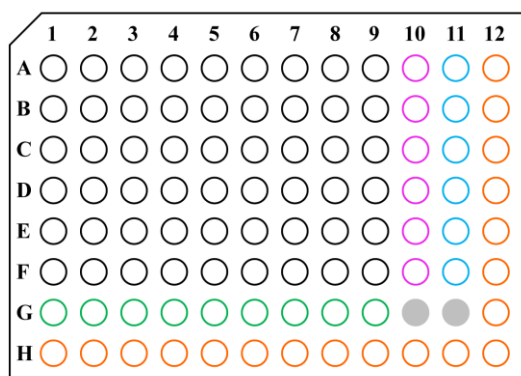


图 2. FICI 的测定实验中 96 孔板的布局图。其中，红色：空白 RPMI1640，作为空白对照；蓝色：未加任何药物作用的菌悬液，作为阴性对照；绿色：只加阳性药 FLC 作用的菌悬液；粉色：只加待测药物作用的菌悬液；黑色：加待测药物与阳性药物协同作用的菌悬液；灰色：G10-G11 为未加菌悬液的空白孔。

注意事项

1. PBS 缓冲液和培养液的配制和储存过程须保证无菌。
2. 实验须在生物安全柜中进行，保证无菌操作，避免染菌导致实验失败。
3. 倍半稀释的操作需规范，防止数据跳孔。

溶液配方

1. PBS 缓冲溶液

NaCl: 8.0 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 3.57 g, KCl: 0.20 g, KH_2PO_4 : 0.24 g, 以超纯水定容至 1,000 ml, 经高压蒸汽灭菌(121 °C, 15 min), 后于室温保存备用。

2. YEPD 培养液

酵母浸膏: 10.0 g, 蛋白胨: 20.0 g, D-葡萄糖: 20.0 g, 加超纯水 800 ml 溶解, 再以超纯水定容至 1,000 ml, 经高压蒸汽灭菌(121 °C, 15 min), 自然冷却至室温, 后于 4 °C 保存备用。

3. RPMI 1640 培养液

RPMI 1640 (Gibco BRL): 10.0 g, NaHCO_3 : 2.0 g, 3-吗啉丙磺酸(MOPS): 34.5 g, NaOH: 2.7 g, 以超纯水定容至 1,000 ml, 经 0.45 μm 、0.22 μm 微孔滤膜抽滤灭菌, 后于 4 °C 保存备用。

致谢

感谢国家自然科学基金 (81973175, 81725020) 和上海市教委科技创新重大项目 (2019-01-07-00-07-E00073) 的资助。已发表的使用过本实验方案的研究论文请见参考文献。

参考文献

1. Han, G. Y., Liu, N., Li, C. L., Tu, J., Li, Z. and Sheng, C. Q. (2020). [Discovery of Novel Fungal Lanosterol 14 \$\alpha\$ -Demethylase \(CYP51\)/Histone Deacetylase Dual Inhibitors to Treat Azole-Resistant Candidiasis.](#) *J Med Chem* 63: 5341-5359.
2. Ji, C. J., Liu, N., Tu, J., Li, Z., Han, G. Y., Li, J. and Sheng, C. Q. (2020). [Drug Repurposing of Haloperidol: Discovery of New Benzocyclane Derivatives as Potent Antifungal Agents against Cryptococcosis and Candidiasis.](#) *ACS Infect Dis* 6: 768-786.
3. Li, C. L., Liu, Y., Wu, S. C., Han, G. Y., Tu, J., Dong, G. Q., Liu, N. and Sheng, C. Q. (2020). [Targeting fungal virulence factor by small molecules: Structure-based discovery of novel secreted aspartic protease 2 \(SAP2\) inhibitors.](#) *Eur J Med Chem* 201: 112515.
4. Li, Z., Liu, N., Tu, J., Ji, C. J., Han, G. Y., Wang, Y. and Sheng, C. Q. (2019). [Discovery of novel simplified isoxazole derivatives of sampangine as potent anti-cryptococcal agents.](#) *Bioorg Med Chem* 27: 832-840.
5. Li, Z., Liu, N., Tu, J., Ji, C. J., Han, G. Y. and Sheng, C. Q. (2019). [Discovery of Simplified Sampangine Derivatives with Potent Antifungal Activities against Cryptococcal Meningitis.](#) *ACS Infect Dis* 5: 1376-1384.
6. Li, Z., Tu, J., Han, G. Y., Liu, N. and Sheng, C. Q. (2021). [Novel Carboline Fungal Histone Deacetylase \(HDAC\) Inhibitors for Combinational Treatment of Azole-Resistant Candidiasis.](#) *J Med Chem* 64: 1116-1126.
7. Liu, N., Zhong, H., Tu, J., Jiang, Z. G., Jiang, Y. J., Jiang, Y., Li, J., Zhang, W. N., Wang, Y. and Sheng, C. Q. (2018). [Discovery of simplified sampangine derivatives as novel fungal biofilm inhibitors.](#) *Eur J Med Chem* 143: 1510-1523.
8. Tu, J., Li, Z., Jiang, Y. J., Ji, C. J., Han, G. Y., Wang, Y., Liu, N. and Sheng, C. Q. (2019). [Discovery of Carboline Derivatives as Potent Antifungal Agents for the Treatment of Cryptococcal Meningitis.](#) *J Med Chem* 62: 2376-2389.

9. Yang, W. Z., Tu, J., Ji, C. J., Li, Z., Han, G. Y., Liu, N., Li, J. and Sheng, C. Q. (2021). [Discovery of Piperidol Derivatives for Combinational Treatment of Azole-Resistant Candidiasis](#). *ACS Infect Dis* 7: 650-660.
10. Zhu T. B., Chen X., Li C. L., Tu J., Liu N., Xu D. F., Sheng C. Q. (2021). [Lanosterol 14 \$\alpha\$ -demethylase \(CYP51\)/histone deacetylase \(HDAC\) dual inhibitors for treatment of *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* infections](#). *Eur J Med Chem* 221:113524.
11. Yuan R., Tu J., Sheng C. Q., Chen X., Liu N. (2021). [Effects of Hsp90 Inhibitor Ganetespib on Inhibition of Azole-Resistant *Candida albicans*](#). *Front Microbiol* 12: 680382.