



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118652955 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 17

(21) 申请号 202411085780.4

(22) 申请日 2024.08.08

(71) 申请人 广东省大湾区华南理工大学聚集诱导发光高等研究院

地址 510700 广东省广州市黄埔区开源大道11号科技企业加速器C3栋401室

(72) 发明人 唐本忠 何柳 谭妙英 王志明  
刘勇 龚晚君

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 江裕强

(51) Int. Cl.

C12Q 1/04 (2006.01)

C09K 11/06 (2006.01)

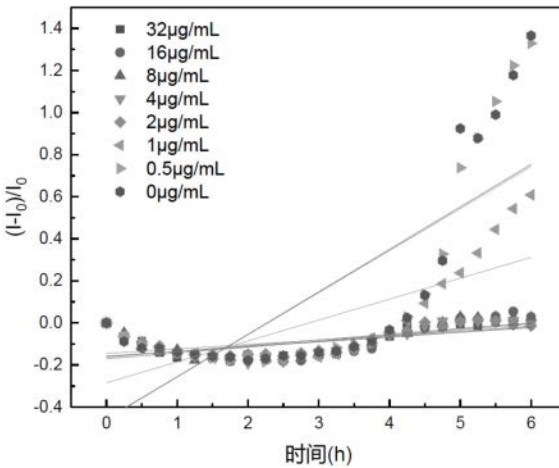
权利要求书3页 说明书21页 附图9页

(54) 发明名称

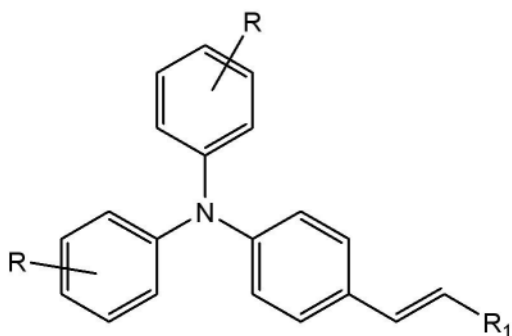
一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂及方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂及方法。本发明AIE分子包括AIE-1分子,优选的还包括AIE-2分子,用于体外抗菌药物敏感性检测。所述AIE试剂的灵敏度高、荧光背景低且光稳定性好,可以直接将试剂加入药敏测试稀释液中,实时进行细菌生长的长时间监测,通过细菌生长曲线,快速得出药敏结果且满足MIC值测定的需求。本发明的快速检测抗菌药物敏感性的方法,能够在8h内获取药敏试验结果,且准确判断抗菌药物的MIC值,适用于不同的培养基,且检测设备的要求低,大大提高了体外抗菌药物敏感性试验的效率,能够为抗菌治疗快速提供解决方案。



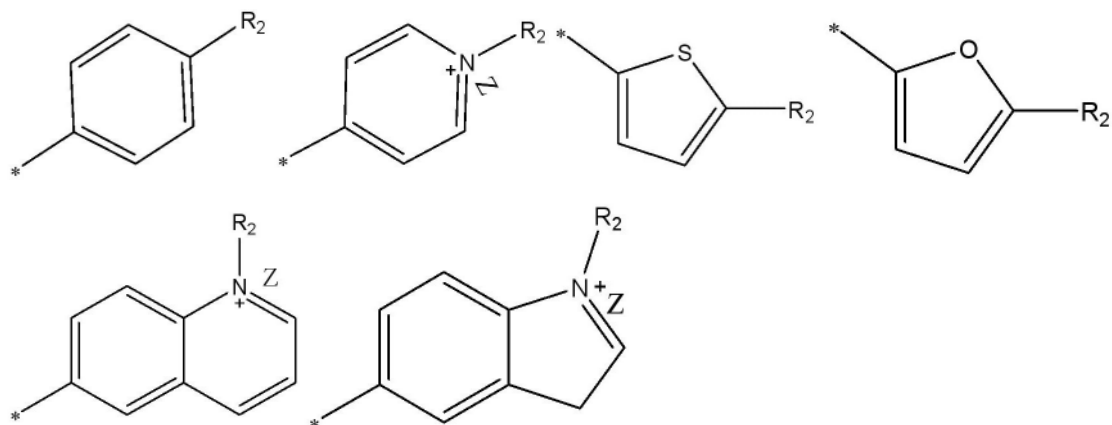
1. AIE分子在体外抗菌药物敏感性检测中的应用,其特征在于,所述AIE分子包括AIE-1分子,所述AIE-1分子选自式1中的至少一种;



式1

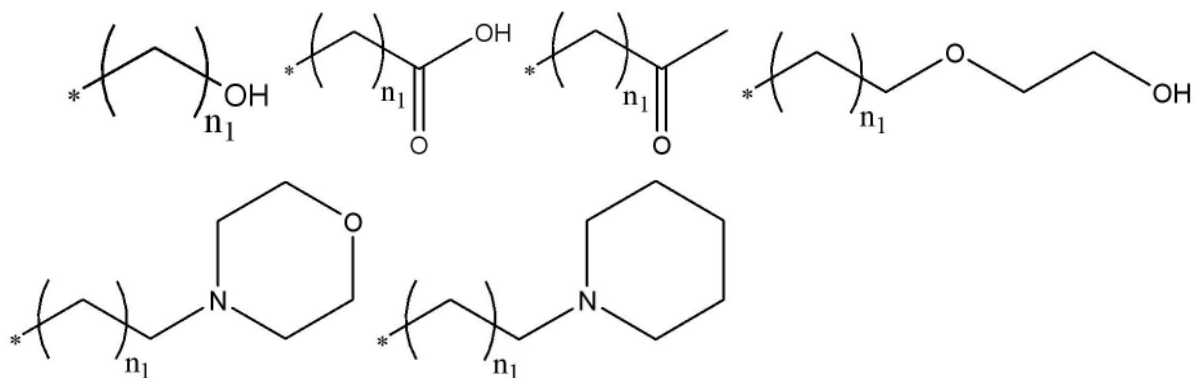
式1中,R各自独立选自氢、氨基、具有1~20个碳原子的烷基、具有2~20个碳原子的不饱和烃基、具有1~20个碳原子的杂烷基、具有3~20个碳原子的环烷基、具有2~20个碳原子的杂环烷基、具有6~30个碳原子的芳基和具有5~30个碳原子的杂芳基;

R<sub>1</sub>选自以下结构中的一种:



Z为阴离子;

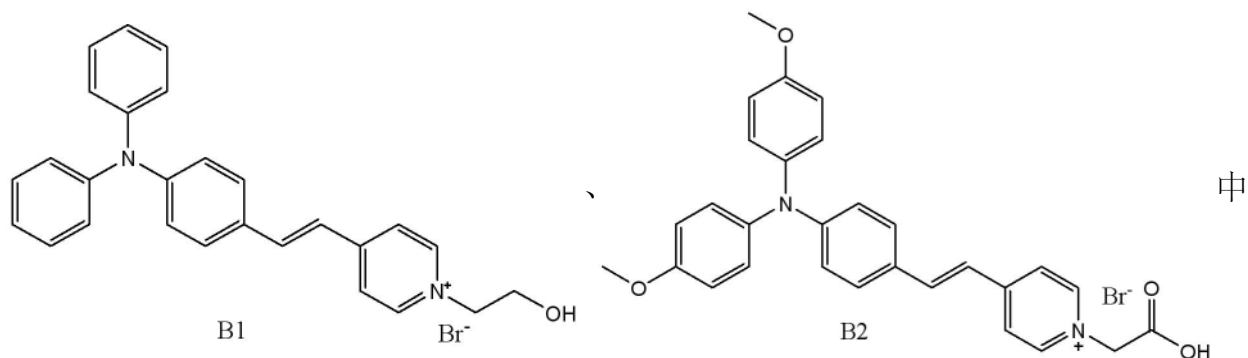
R<sub>2</sub>选自以下结构中的一种:



n<sub>1</sub>为1-5的整数。

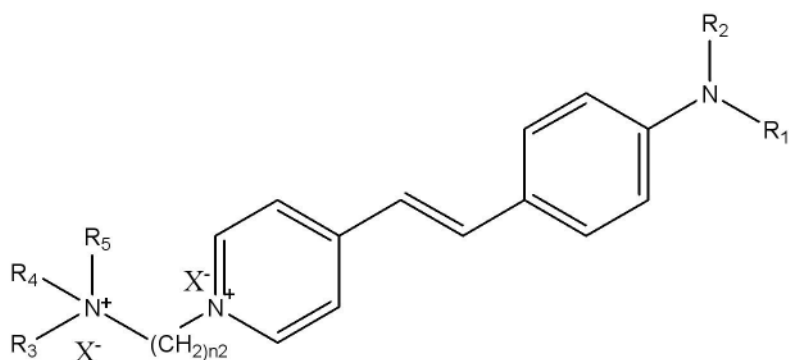
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,式1中,所述杂烷基包括烷氧基或烷氨基;所述阴离子为卤离子、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>、BF<sub>4</sub><sup>-</sup>、BF<sub>6</sub><sup>-</sup>、NO<sub>3</sub><sup>-</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述AIE-1分子选自



的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述AIE分子还包括AIE-2分子;所述AIE-2分子选自式2中的至少一种;



式2

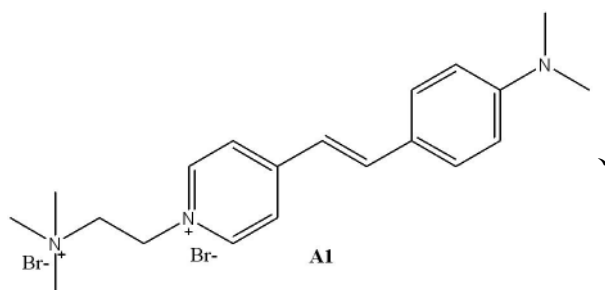
式2中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基;

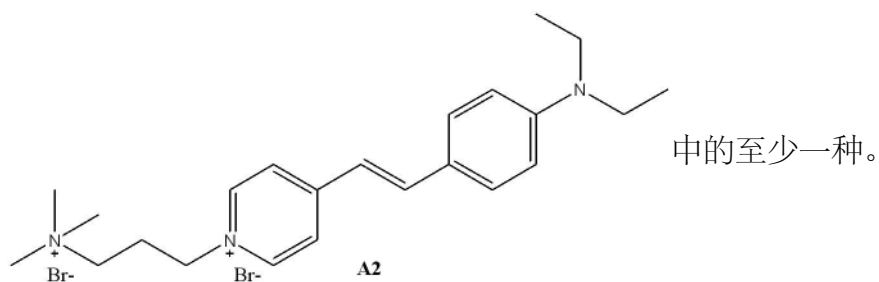
$n_2$ 为2-10的整数;

$X^-$ 为阴离子。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,式2中,所述阴离子为卤离子、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{BF}_4^-$ 、 $\text{BF}_6^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 中的至少一种;所述取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基中的取代基为 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CHO}$ 、 $-\text{CN}$ 或 $-\text{NO}_2$ 。

6. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述AIE-2分子选自





7. 根据权利要求1所述的应用, 其特征在于, 用于测定抗菌药物的最小抑菌浓度。

8. 一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂, 其特征在于, 包括AIE分子; 所述AIE分子包括权利要求1-3任一项所述应用中的AIE-1分子。

9. 根据权利要求8所述的快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂, 其特征在于, 所述AIE分子还包括权利要求4-6任一项所述应用中的AIE-2分子。

10. 根据权利要求8所述的快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂, 其特征在于, 还包括溶剂。

11. 根据权利要求9所述的快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂, 其特征在于, 所述AIE-1分子与AIE-2分子的摩尔比为1: (5~10)。

12. 一种快速检测抗菌药物敏感性的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

(1) 制备菌液, 加入权利要求8~11任一项所述的AIE试剂, 混合均匀, 得含AIE试剂的混合菌液;

(2) 梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液, 分别加入步骤(1)的混合菌液, 得检测液, 进行细菌培养, 监测不同时间点的荧光值;

分别计算不同抗菌药物浓度下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ , 其中,  $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值,  $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

(3) 分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系, 确定直线斜率, 通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较, 确定抗菌药物的最小抑菌浓度, 判断抗菌药物敏感性;

随抗菌药物浓度提高, 当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时, 该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的最小抑菌浓度。

13. 根据权利要求12所述的快速检测抗菌药物敏感性的方法, 其特征在于, 步骤(2)中, 所述检测液中, 菌的浓度为0.5麦氏浊度~0.5麦氏浊度稀释1000倍之间的任意浓度, AIE分子的浓度为5-12 $\mu$ M。

## 一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂及方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细菌敏感性检测技术领域,具体涉及一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂及方法。

### 背景技术

[0002] 抗生素的广泛使用,细菌产生耐药性的速度逐渐加快,使得药物选择困难。细菌耐药性快速检测技术是应对全球公共卫生挑战的重要手段,目前临床微生物实验室使用的抗菌药物敏感性实验主要包括纸片扩散法、稀释法、E-test法等。这些方法都是通过肉眼观察细菌的生长情况,需要细菌生长到一定的数量,最少需要12小时甚至更长的时间。自动化细菌药敏检测系统在一定层面上提高了检测速度,但是这些仪器普遍采用比浊法观测细菌数量的动力变化,受限于比浊法的低灵敏度,也需要8h左右才能给出药敏结果,并且这些仪器成本较高,基层医院使用受限。因此,需要开发出对设备要求低、能在更短的时间里给出药敏检测结果且满足MIC(最小抑菌浓度)需求的快速检测方法,能够为抗菌治疗快速提供解决方案。

### 发明内容

[0003] 鉴于此,本发明的目的在于提供一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂及方法。

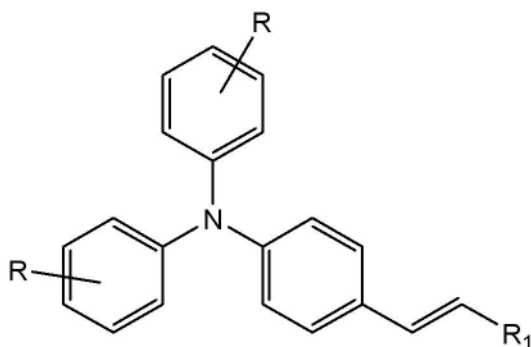
[0004] 本发明首先提供一种AIE分子(包括AIE-1分子,还可以包括AIE-2分子)在体外抗菌药物敏感性检测中的应用,用于判断抗菌药物的敏感性,以及测定抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC值)。

[0005] 其次,本发明提供一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂,用于体外抗菌药物敏感性试验,灵敏度高、荧光背景低且光稳定性好,能够在更短时间内得出药敏检测结果,快速判断抗菌药物的敏感性,准确测定MIC值。

[0006] 最后,本发明提供一种快速检测抗菌药物敏感性的方法。

[0007] 本发明的目的通过以下技术方案实现:

本发明提供一种AIE分子在体外抗菌药物敏感性检测中的应用,所述AIE分子包括AIE-1分子,所述AIE-1分子选自式1中的至少一种;

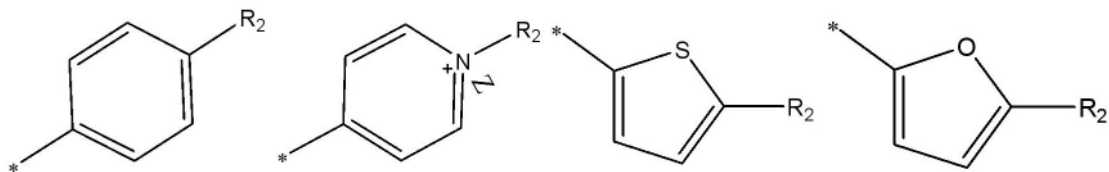


[0008] 式1

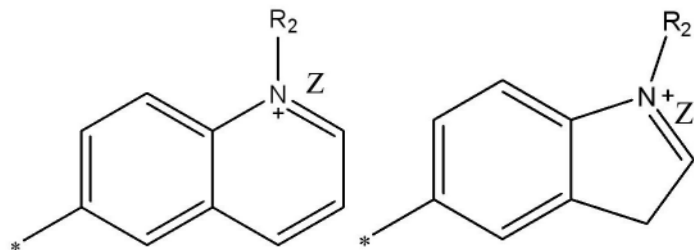
式1中,R各自独立选自氢、氨基、具有1~20个碳原子的烷基、具有2~20个碳原子

的不饱和烃基、具有1~20个碳原子的杂烷基、具有3~20个碳原子的环烷基、具有2~20个碳原子的杂环烷基、具有6~30个碳原子的芳基和具有5~30个碳原子的杂芳基；

$R_1$ 选自以下结构中的一种：

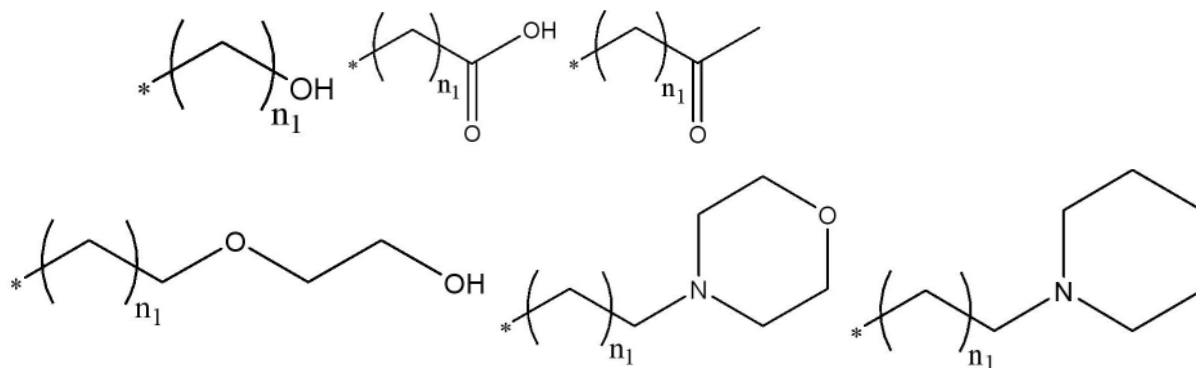


[0009]



[0010]  $Z$ 为阴离子；

$R_2$ 选自以下结构中的一种：

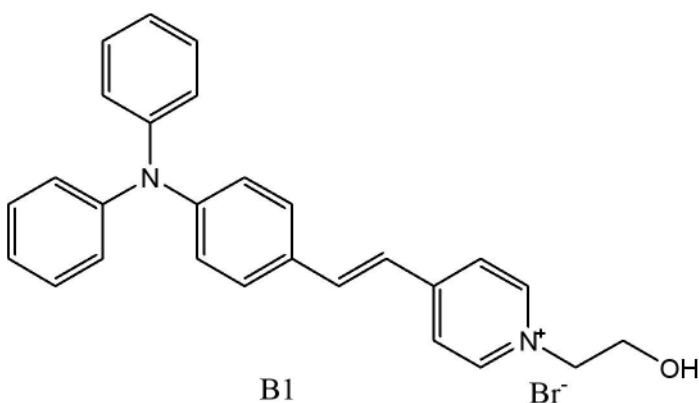


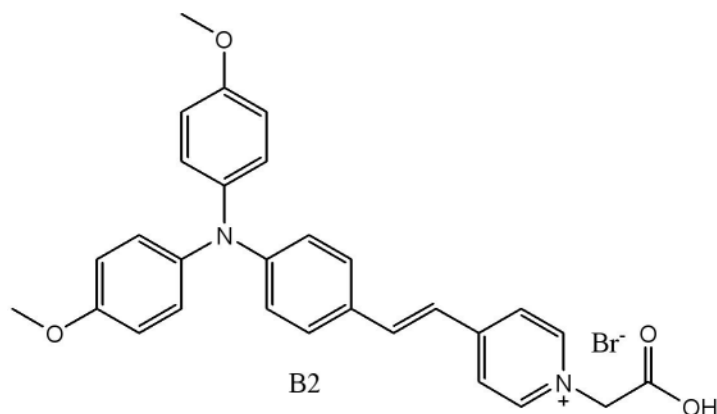
[0011]  $n_1$ 为1-5的整数(1、2、3、4、5)。

[0012] 优选的,式1中,所述杂烷基包括烷氧基或烷氨基；

优选的,式1中,所述阴离子为卤离子(氟离子、氯离子、溴离子、碘离子等)、 $\text{NO}_2^-$ 、 $\text{BF}_4^-$ 、 $\text{BF}_6^-$ 、 $\text{NO}_3^-$ 、 $\text{PO}_4^{3-}$ 、 $\text{SO}_3^{2-}$ 中的至少一种。

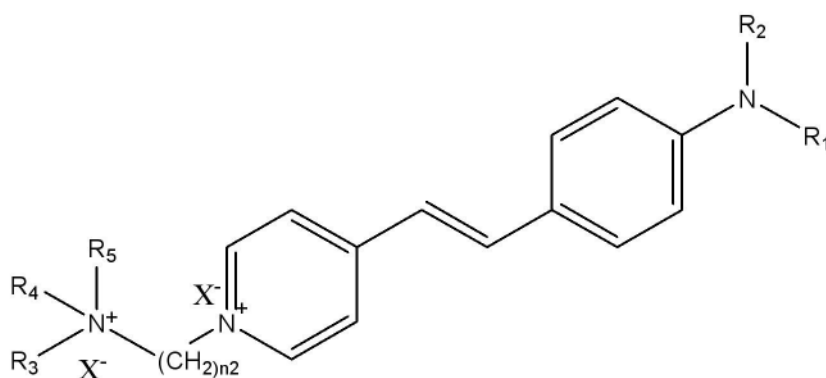
[0013] 优选的,所述AIE-1分子选自





中的至少一种。

[0014] 优选的,所述AIE分子还包括AIE-2分子;所述AIE-2分子选自式2中的至少一种;



[0015] 式2

式2中, $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 各自独立的选自取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基;

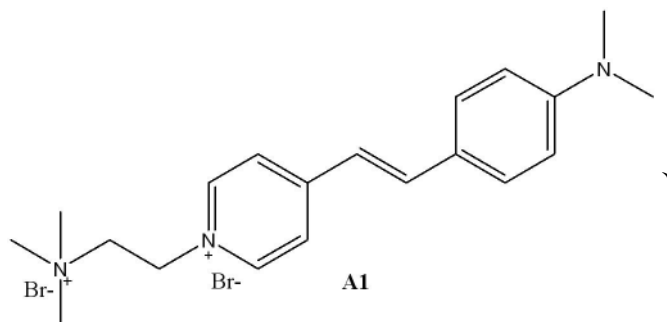
$n_2$ 为2-10的整数(2、3、4、5、6、7、8、9、10);

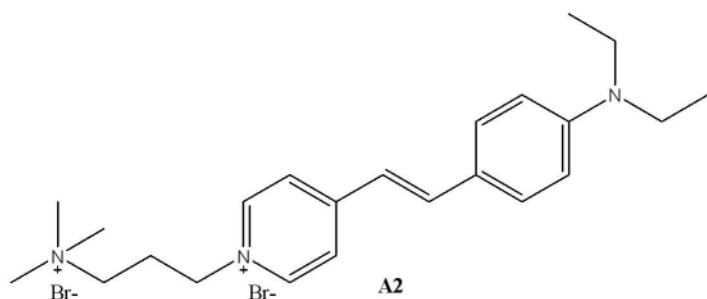
$X^-$ 为阴离子。

[0016] 进一步优选的,式2中,所述阴离子为卤离子(氟离子、氯离子、溴离子、碘离子等)、 $NO_2^-$ 、 $BF_4^-$ 、 $BF_6^-$ 、 $NO_3^-$ 、 $PO_4^{3-}$ 、 $SO_3^{2-}$ 中的至少一种;

进一步优选的,式2中,所述取代或未取代的具有1~20个碳原子的直链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的支链烷基、取代或未取代的具有3~20个碳原子的环烷基中的取代基为 $-COOH$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CHO$ 、 $-CN$ 或 $-NO_2$ 。

[0017] 进一步优选的,所述AIE-2分子选自





中的至少一种。

[0018] 进一步优选的,所述AIE-1分子与AIE-2分子的摩尔比为1:(5~10)。

[0019] 优选的,本发明所述AIE分子在体外抗菌药物敏感性检测中用于测定抗菌药物的最小抑菌浓度和判断抗菌药物的敏感性。

[0020] 本发明提供一种快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂,包括AIE分子;所述AIE分子包括上述的AIE-1分子。

[0021] 优选的,所述快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂的AIE分子还包括上述的AIE-2分子。

[0022] 进一步优选的,所述AIE-1分子与AIE-2分子的摩尔比为1:(5~10)。

[0023] 优选的,所述快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂还包括溶剂。所述溶剂优选为水、二甲基亚砜、N,N-二甲基甲酰胺中的任意一种。

[0024] 本发明提供一种上述快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂在体外抗菌药物敏感性检测中的应用。

[0025] 本发明提供一种快速检测抗菌药物敏感性的方法,包括以下步骤:

(1) 制备菌液,加入上述的AIE试剂,混合均匀,得含AIE试剂的混合菌液;

(2) 梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液,分别加入步骤(1)的混合菌液,得检测液,进行细菌培养,监测不同时间点的荧光值;

分别计算不同抗菌药物浓度下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

(3) 分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,确定抗菌药物的最小抑菌浓度,判断抗菌药物敏感性;

随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的最小抑菌浓度。

[0026] 优选的,步骤(2)中,所述检测液中,菌的浓度为0.5麦氏浊度~0.5麦氏浊度稀释1000倍之间的任意浓度,AIE分子的浓度为5-12 $\mu$ M;

进一步优选的,AIE分子为AIE-1分子时,步骤(2)所述检测液中AIE-1分子的浓度为5-10 $\mu$ M;

进一步优选的,AIE分子为AIE-1分子和AIE-2分子时,步骤(2)所述检测液中AIE分子-1的浓度为1-2 $\mu$ M,AIE分子-2的浓度为5-10 $\mu$ M。

[0027] 优选的,步骤(2)中所述细菌培养的条件为适宜细菌生长的条件。

[0028] 优选的,所述荧光值可以采用任何具有发光检测功能的仪器进行监测。优选酶标仪直接进行实时培养和监测。

[0029] 优选的,所述待测抗菌药物溶液梯度稀释浓度参照CLSI(美国临床和实验室标准协会)标准。

[0030] 作为优选的一种实施方式,所述的快速检测抗菌药物敏感性的方法,包括以下步骤:

(1) 将菌种在平板培养皿上30-37℃培养15-20 h,挑取平板单菌落,用培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释0-500倍备用;

将AIE分子加入超纯水溶解,制备AIE分子浓度为5-12mM的AIE试剂;

将AIE试剂加入菌液中混合均匀,制备含AIE分子终浓度为10-24μM的混合菌液;

(2) 将抗菌药物储液按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液,每个梯度按100 μL/孔分装至96孔微孔板;再按100 μL/孔将步骤(1)的混合菌液分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液;96孔板制备完毕后置于荧光读取仪器中定时监测,设置激发波长460nm,发射波长560nm;

分别计算不同抗菌药物浓度下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

(3) 分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,确定抗菌药物的最小抑菌浓度,判断抗菌药物敏感性;

随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的最小抑菌浓度。

[0031] 本发明具有以下有益效果:

1、本发明提供AIE分子(包括AIE-1分子,还可以包括AIE-2分子)在体外抗菌药物敏感性试验中的应用。本发明创造性的发现,AIE-1分子能够用于体外抗菌药物敏感性试验,灵敏度高、荧光背景低且光稳定性好,能够在更短时间内得出药敏检测结果,快速判断抗菌药物的敏感性,且能够准确测定抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC值)。

[0032] 2、本发明的快速检测抗菌药物敏感性的AIE试剂,相比于现有技术,具有更低的荧光背景和较好的光稳定性(长时间监测不会出现荧光猝灭),可以直接将试剂加入药敏测试稀释液中,实时进行细菌生长的长时间监测;检测灵敏度高,通过细菌生长曲线,快速得出药敏结果且满足MIC值测定的需求。

[0033] 3、本发明的快速检测抗菌药物敏感性的方法,能够在8h内获取药敏试验结果,且准确判断抗菌药物的MIC值,适用于不同的培养基,且检测设备的要求低(采用普通的具有发光检测功能的多功能读板机就能实现监测),大大提高了体外抗菌药物敏感性试验的效率,能够为抗菌治疗快速提供解决方案。

## 附图说明

[0034] 图1a和图1b是实施例1中AIE试剂I测试不同菌浓度的荧光强度变化图。

[0035] 图2a是实施例7中AIE试剂I测试铜绿假单胞菌在不同浓度头孢他啶作用下,相对荧光强度和时间的拟合关系直线图。

[0036] 图2b是实施例8中AIE试剂II测试铜绿假单胞菌在不同浓度头孢他啶作用下,相对荧光强度和时间的拟合关系直线图。

[0037] 图3是对比例1中AIE试剂IV测试金黄色葡萄球菌在不同浓度左氧氟沙星作用下,相对荧光强度和时间的拟合关系直线图。

[0038] 图4a是对比例2中AIE试剂V测试金黄色葡萄球菌在不同浓度头孢他啶作用下,OD随时间变化曲线图。

[0039] 图4b是对比例2中AIE试剂V测试金黄色葡萄球菌在不同浓度头孢他啶作用下,荧光强度随时间变化曲线图。

[0040] 图5是对比例3中AIE试剂VI测试铜绿假单胞菌在不同浓度头孢他啶作用下,相对荧光强度和时间的拟合关系直线图。

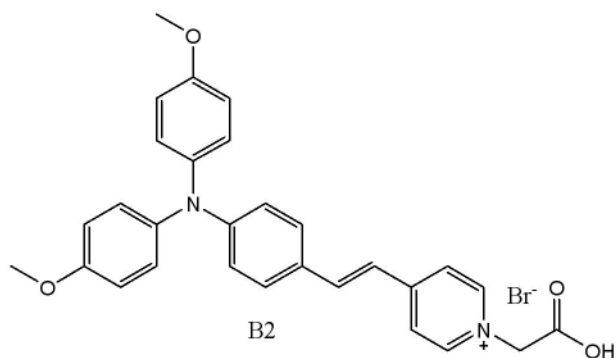
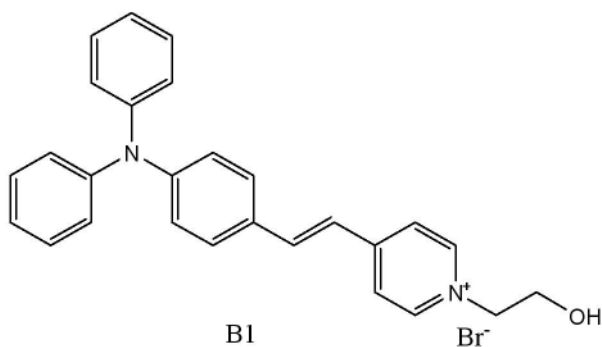
[0041] 图6a是对比例4中AIE试剂VII测试铜绿假单胞菌在不同浓度左氧氟沙星作用下,相对荧光强度和时间的拟合关系直线图。

[0042] 图6b分别是对比例4中AIE试剂VII测试金黄色葡萄球菌在不同浓度左氧氟沙星作用下,相对荧光强度和时间的拟合关系直线图。

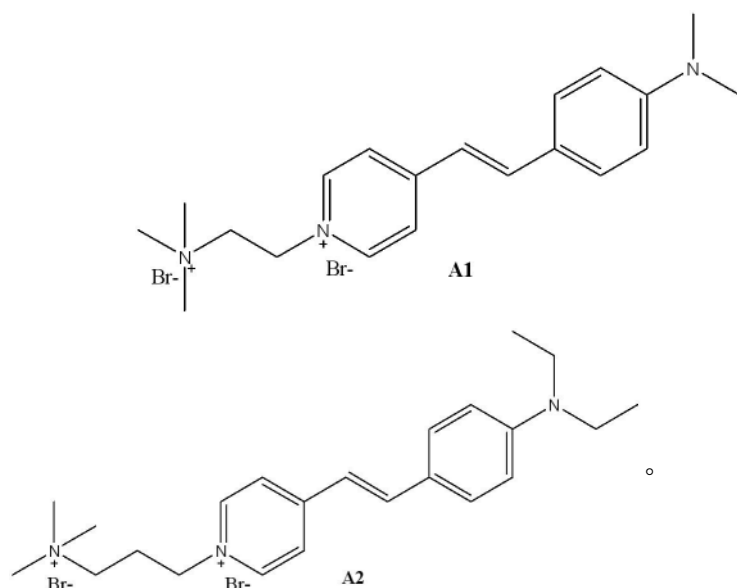
### 具体实施方式

[0043] 下面结合实施例对本发明进行具体地描述,但本发明的实施方式和保护范围不限于以下实施例。

[0044] 本发明实施例中所用AIE-1分子选自以下一种:



[0045] AIE-2分子选自以下一种:



[0046] 本发明实施例的培养基采用Mueller-Hinton 肉汤培养基 (MH肉汤培养基)。

[0047] 本发明实施例采用的荧光检测仪器为Biotek多功能酶标仪。

[0048] 实施例1:

用天平称取AIE-1 (B1) 分子,加入超纯水溶解,用0.22μm滤膜过滤除菌,制得AIE试剂I (10mM), 4℃保存;

分别将大肠埃希菌25922和金黄色葡萄球菌29213在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,用MH肉汤培养基梯度稀释成一系列浓度。每个浓度中分别加入AIE试剂I (AIE-1分子终浓度为10μM)。取200uL于96孔板中,分别检测各个浓度下的OD值和荧光强度。结果如图1a和图1b所示。由图1a和图1b可以看出,随着细菌浓度的增长,荧光强度发生变化,并且与OD值具有较好的线性关系。

[0049] 实施例2:

(1) 将大肠埃希菌25922在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-1分子 (B1),加入超纯水溶解,用0.22μm滤膜过滤除菌,制得AIE试剂I (10mM), 4℃保存;

(2) 采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液 (氨苄西林、头孢他啶、左氧氟沙星、亚胺培南) 分别按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液 (浓度梯度见表1), 配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100 μL/孔分装至 96孔微孔板;

表1:

抗菌药物	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )								
氨苄西林	0	2	4	8	16	32	64	128	256
头孢他啶	0	2	4	8	16	32	64	/	/
左氧氟沙星	0	0.5	1	2	4	8	16	/	/
亚胺培南	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32

[0050] 每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu\text{L}$  AIE试剂I混合均匀,按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表2, AIE-1分子终浓度为10 $\mu\text{M}$ );

(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测4h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0051] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0052] 结果如表2和表3所示,可以看出,大肠埃希菌对氨苄西林具有耐药性,而对头孢他啶、左氧氟沙星、亚胺培南都是敏感的,测得MIC值与传统肉汤稀释法相符。这一结果也表明,本发明的AIE试剂是可以实时监测细菌的生长状况,并且在4h左右就能给出药敏结果以及MIC值,大大缩短了药敏试验的时间。

[0053] 表2:

氨苄西林	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	2	4	8	16	32	64	128
	监测4 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.32	0.29	0.29	0.29	0.27	0.3	0.29	0.27	0.29
头孢他啶	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	2	4	8	16	32	/	/
	监测4 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.28	0.017	0.015	-0.02	-0.01	-0.02	-0.03	/	/
左氧氟沙星	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	/	/
	监测4 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.28	-0.02	-0.03	-0.02	-0.02	-0.02	-0.03	/	/
亚胺培南	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
	监测4 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.31	0.005	0.008	0.014	0.011	0.018	-0.02	-0.02	-0.02

[0054] 表3:各药物抗大肠埃希菌的MIC值

	实施例2	传统肉汤稀释法
氨苄西林	大肠埃希菌对氨苄西林具有耐药性	大肠埃希菌对氨苄西林具有耐药性
头孢他啶	1 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL
左氧氟沙星	0.25 $\mu$ g/mL	0.25 $\mu$ g/mL
亚胺培南	0.125 $\mu$ g/mL	0.125 $\mu$ g/mL

[0055] 实施例3:

(1) 分别将以下8种菌种(肺炎克雷伯菌、沙门氏菌1、沙门氏菌19、大肠埃希菌25922、铜绿假单胞菌27853、金黄色葡萄球菌29213、MRSA、屎肠球菌)在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-1分子(B1),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,制得AIE试剂I(10mM),4℃保存;

(2) 采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液左氧氟沙星按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液,配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu$ L/孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu$ L AIE试剂I混合均匀,按100  $\mu$ L/孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表4,AIE-1分子终浓度为10 $\mu$ M);

(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测6h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0056] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0057] 结果如表4和表5所示,可以看出,MRSA对左氧氟沙星具有耐药性,肺炎克雷伯菌、沙门氏菌1、沙门氏菌19、大肠埃希菌25922、铜绿假单胞菌27853、金黄色葡萄球菌29213、屎肠球菌对左氧氟沙星都是敏感的,测得MIC值与传统肉汤稀释法相符。这一结果也表明,本发明的AIE试剂是可以实时监测细菌的生长状况,并且在6h左右就能给出药敏结果以及MIC值,大大缩短了药敏试验的时间。

[0058] 表4:

肺炎克雷伯菌	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.15	0.14	0.11	0.10	-0.01	-0.01	-0.01	-0.001	-0.005
沙门氏菌1	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.35	0.3	0.29	0.28	0.26	0.28	0.31	0.01	-0.01
沙门氏菌19	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.1	0.05	0.03	-0.01	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02
大肠埃希菌 25922	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.46	0.2	0.02	-0.001	-0.004	-0.007	-0.01	-0.01	-0.01
铜绿假单胞菌 27853	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.26	0.2	0.18	0.18	0.16	0.13	0.09	0.02	-0.006
金黄色葡萄球菌 29213	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	4	8	16	/	/
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.12	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	-0.02	/	/
MRSA	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	4	8	16	32	64
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
屎肠球菌	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	2	4	8	16	32	64	128
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.20	0.19	0.18	0.19	0.17	0.16	-0.05	-0.07	-0.09

[0059] 表5:左氧氟沙星抗各类菌的MIC值

	实施例3	传统肉汤稀释法
肺炎克雷伯菌	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
沙门氏菌1	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
沙门氏菌19	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$
大肠埃希菌 25922	0.06 $\mu\text{g/mL}$	0.06 $\mu\text{g/mL}$
铜绿假单胞菌 27853	2 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
金黄色葡萄球菌 29213	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$
MRSA	MRSA对左氧氟沙星具有耐药性	MRSA对左氧氟沙星具有耐药性
屎肠球菌	32 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$

[0060] 实施例4:

(1) 分别将以下9种菌种(肺炎克雷伯菌、沙门氏菌1、沙门氏菌19、大肠埃希菌25922、铜绿假单胞菌27853、金黄色葡萄球菌29213、屎肠球菌、松鼠葡萄球菌29061、无乳链球菌)在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过

滤除菌,制得AIE试剂Ⅱ(AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1)摩尔比为1:5,浓度分别为2mM、10mM),4℃保存;

(2)采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液左氧氟沙星按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液,配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100 μL/孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2μL AIE试剂Ⅱ混合均匀,按100 μL/孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表6,AIE-1分子终浓度为2μM、AIE-2分子终浓度为10μM);

(3)96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测6h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4)分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0061] (5)同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0062] 结果如表6和表7所示,可以看出,肺炎克雷伯菌、沙门氏菌1、沙门氏菌19、大肠埃希菌25922、铜绿假单胞菌27853、金黄色葡萄球菌29213、屎肠球菌、松鼠葡萄球菌29061、无乳链球菌对左氧氟沙星都是敏感的,测得MIC值与传统肉汤稀释法相符。这一结果也表明,本发明的AIE试剂是可以实时监测细菌的生长状况,并且在6h左右就能给出药敏结果以及MIC值,大大缩短了药敏试验的时间。

[0063] 表6:

肺炎克雷伯菌	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.721	0.141	0.067	-	-	-	-	-	-
沙门氏菌1	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.805	0.032	0.03	-	-	-	-	-	-
沙门氏菌19	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.865	0.014	-	-	-	-	-	-	-
大肠埃希菌 ATCC 25922	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.815	-	-	-	-	-	-	-	-
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.223	0.210	0.161	0.103	-	-	-	-	-
金黄色葡萄球菌 ATCC 29213	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.034	-	-	-	-	-	-	-	-
屎肠球菌	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.023	0.022	0.024	0.023	0.021	0.018	0.016	0.015	-
松鼠葡萄球菌 ATCC 29061	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.098	-	-	-	-	0.018	-	-	-
无乳链球菌	抗菌药物浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.074	-	-	-	-	-	-	-	-

[0064] 表7:左氧氟沙星抗各类菌的MIC值

	实施例4	传统肉汤稀释法
肺炎克雷伯菌	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
沙门氏菌1	1 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$
沙门氏菌19	0.5 $\mu\text{g/mL}$	0.5 $\mu\text{g/mL}$
大肠埃希菌 25922	0.06 $\mu\text{g/mL}$	0.06 $\mu\text{g/mL}$
铜绿假单胞菌 27853	2 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$
金黄色葡萄球菌 29213	0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.25 $\mu\text{g/mL}$
屎肠球菌	32 $\mu\text{g/mL}$	32 $\mu\text{g/mL}$
松鼠葡萄球菌 29061	0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.25 $\mu\text{g/mL}$
无乳链球菌	0.25 $\mu\text{g/mL}$	0.25 $\mu\text{g/mL}$

[0065] 实施例5:

(1) 分别将铜绿假单胞菌27853和金黄色葡萄球菌29213在平板培养基上37℃培养

18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-1分子(B2)和AIE-2分子(A2),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,制得AIE试剂Ⅲ(AIE-1分子(B2)和AIE-2分子(A2)摩尔比为1:7.5,浓度分别为1mM、7.5mM),4℃保存;

(2)采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液左氧氟沙星按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液,配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu$ L/孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu$ L AIE试剂Ⅲ混合均匀,按100  $\mu$ L/孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表8,AIE-1分子终浓度为1 $\mu$ M、AIE-2分子终浓度为7.5 $\mu$ M);

(3)96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测6h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4)分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0066] (5)同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0067] 结果如表8和表9所示,可以看出,铜绿假单胞菌27853、金黄色葡萄球菌29213对左氧氟沙星都是敏感的,测得MIC值与传统肉汤稀释法相符。这一结果也表明,本发明的AIE试剂是可以实时监测细菌的生长状况,并且在6h左右就能给出药敏结果以及MIC值,大大缩短了药敏试验的时间。

[0068] 表8:

铜绿假单胞菌ATCC 27853	抗菌药物浓度( $\mu$ g/mL)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.156	0.143	0.122	0.105	-0.006	-0.012	-0.012	-0.013	-0.013
金黄色葡萄球菌ATCC 29213	抗菌药物浓度( $\mu$ g/mL)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.026	-0.008	-0.008	-0.010	-0.009	-0.010	-0.010	-0.011	-0.011

[0069] 表9:左氧氟沙星抗各类菌的MIC值

	实施例5	传统肉汤稀释法
铜绿假单胞菌27853	2 $\mu$ g/mL	2 $\mu$ g/mL
金黄色葡萄球菌29213	0.25 $\mu$ g/mL	0.25 $\mu$ g/mL

[0070] 实施例6:

(1)将铜绿假单胞菌27853在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,分别制备无稀释、稀释5倍、稀释50倍、500倍的工

作菌液备用；

用天平称取AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,制得AIE试剂Ⅱ(AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1)摩尔比为1:5,浓度分别为2mM、10mM),4℃保存；

(2)采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液左氧氟沙星按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液,配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu$ L/孔分装至 96孔微孔板；

分别将每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu$ LAIE试剂Ⅱ混合均匀,按100  $\mu$ L/孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表10,AIE-1分子终浓度为2 $\mu$ M、AIE-2分子终浓度为10 $\mu$ M)；

(3)96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测6h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm；

(4)分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值；

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0071] (5)同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0072] 结果如表10所示,可以看出,采用不同麦氏浊度菌液进行左氧氟沙星的药敏试验,测得MIC值为2 $\mu$ g/mL,与传统肉汤稀释法相符。这一结果表明,本发明的AIE试剂适用于不同麦氏浊度菌液,可以快速且准确获得药敏试验结果。

[0073] 表10:

铜绿假单胞菌 ATCC 27853	0.5麦氏 浊度	抗菌药物浓度 ( $\mu$ g/mL)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
		监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.115	0.202	0.318	0.384	-0.01	-0.012	-0.041	0.0132	0.0129
	0.5麦氏 浊度稀 释10倍	抗菌药物浓度 ( $\mu$ g/mL)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
		监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.252	0.314	0.309	0.301	0.0142	0.0170	0.0171	0.0172	0.0171
	0.5麦氏 浊度稀 释100倍	抗菌药物浓度 ( $\mu$ g/mL)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
		监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.223	0.210	0.161	0.103	-0.017	-0.018	-0.018	-0.019	-0.020
	0.5麦氏 浊度稀 释1000 倍	抗菌药物浓度 ( $\mu$ g/mL)	0	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32
		监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.283	0.287	0.325	0.331	0.0105	0.0110	-0.094	-0.090	-0.088

[0074] 实施例7:

(1)将铜绿假单胞菌27853在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用；

用天平称取AIE-1分子(B1),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,制得AIE试剂I(10mM),4℃保存；

(2)采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液头孢他啶按梯度稀释配制不同梯度浓度的

待测抗菌药物溶液(浓度分别为0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 、256 $\mu\text{g/mL}$ 、512 $\mu\text{g/mL}$ ),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu\text{L}$  AIE试剂I混合均匀,按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表11, AIE-1分子终浓度为10 $\mu\text{M}$ );

(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测8h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0075] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0076] 结果如表11、表12和图2a所示,可以看出,AIE试剂I在进行头孢他啶抗铜绿假单胞菌的药敏试验时,准确判读结果需要7-8h。

[0077] 表11:

铜绿假单胞菌 ATCC 27853	头孢他啶浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	-0.032	-0.024	0.001	0.011	0.021	0.020	0.023	0.021
	监测7h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.100	0.090	0.047	0.016	0.019	0.019	0.020	0.016
	监测8h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.129	0.122	0.059	0.009	0.009	0.007	0.002	0.0015

[0078] 表12:头孢他啶抗铜绿假单胞菌的MIC值

	实施例7	传统肉汤稀释法
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	2 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$

[0079] 实施例8:

(1) 将铜绿假单胞菌27853在平板培养基上37 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,制得AIE试剂II(AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1)摩尔比为1:5,浓度分别为2mM、10mM),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

(2) 采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液头孢他啶按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液(浓度分别为0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ ),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu\text{L}$  AIE试剂II混合均匀,按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板

的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(药物终浓度梯度见表13,AIE-1分子终浓度为2 $\mu$ M、AIE-2分子终浓度为10 $\mu$ M);

(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测8h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0080] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0081] 结果如表13、表14和图2b所示,可以看出,AIE试剂II在进行头孢他啶抗铜绿假单胞菌的药敏试验时,在4-6h内即能准确判读结果。

[0082] 表13:

铜绿假单胞菌 ATCC 27853	头孢他啶浓度 ( $\mu$ g/mL)	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测4h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.028	0.030	0.026	0.025	0.026	0.027	0.019	0.024
	监测5h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.149	0.139	0.084	0.0042	0.0046	0.0047	0.0044	0.0045
	监测6h的 $F_n$ -T 关系直线斜率	0.201	0.199	0.099	0.009	0.008	0.007	0.007	0.002

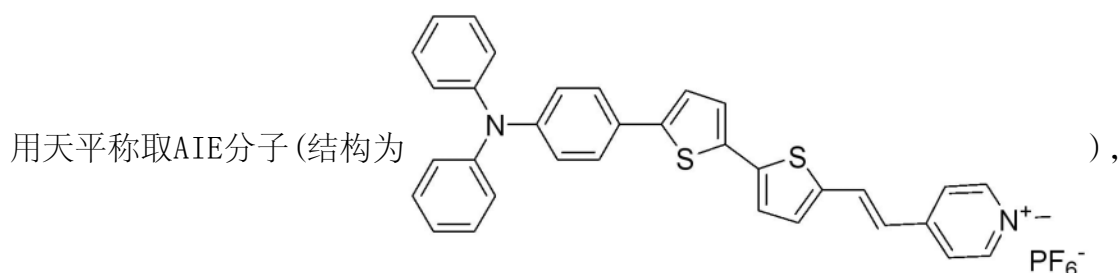
[0083] 表14: 头孢他啶抗铜绿假单胞菌的MIC值

	实施例8	传统肉汤稀释法
铜绿假单胞菌 ATCC 27853	2 $\mu$ g/mL	2 $\mu$ g/mL

[0084] 通过实施例3/4/7/8比较可以看出,双分子的AIE试剂相比于单分子的AIE试剂,检测灵敏度更高。双分子的AIE试剂对大部分菌的药敏试验均能在4-6h内准确判读结果,适用性更广;单分子AIE试剂对某一部分菌的药敏试验需要7-8h才能准确判读结果,所需时间相对较长。本发明优选含有AIE-1分子和AIE-2分子的AIE试剂。

[0085] 对比例1:

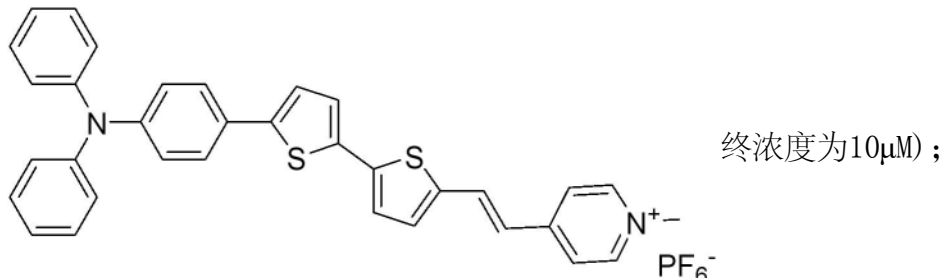
(1) 将金黄色葡萄球菌29213在平板培养基上37 $^{\circ}$ C培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;



加入超纯水溶解,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,制得AIE试剂IV(10mM),4 $^{\circ}$ C保存;

(2) 采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液左氧氟沙星按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液(浓度分别为0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ ),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu\text{L}$  AIE试剂IV混合均匀,按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(AIE分子



(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测5h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较。

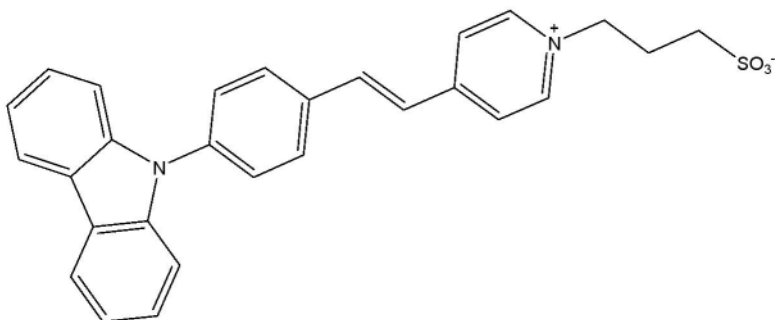
[0086] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0087] 结果如图3所示。由图中可以看出,整个细菌连空白组都未发生荧光变化,而对照组传统肉汤稀释法证明空白组生长良好。后续证明是对比例1的AIE试剂IV会影响细菌生长,导致出现假敏感现象。

[0088] 对比例2:

(1) 将金黄色葡萄球菌29213在平板培养基上37 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE分子(结构为



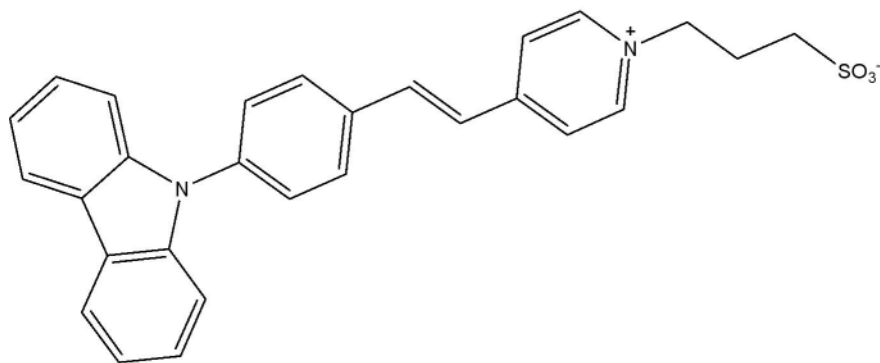
),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu\text{m}$ 滤

膜过滤除菌,制得AIE试剂V(10mM),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存;

(2) 采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液头孢他啶按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液(浓度分别为0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 、256 $\mu\text{g/mL}$ 、512 $\mu\text{g/mL}$ ),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu\text{L}$  AIE试剂V混合均匀,按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至 96孔微孔板

的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(AIE分子



终浓度为10 $\mu$ M);

(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测25h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

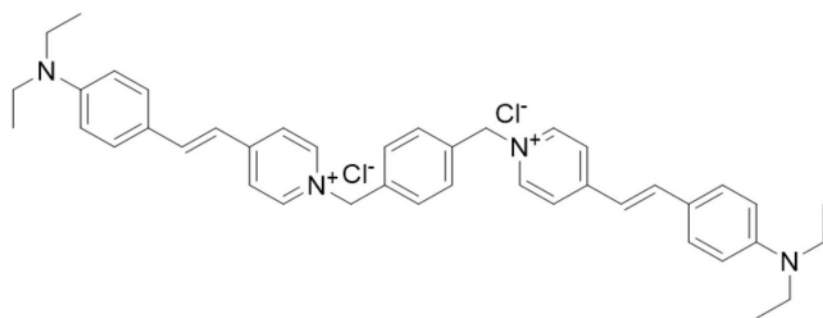
[0089] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0090] 结果如图4a和图4b所示,由图中可以看出,对比例2的AIE试剂V对细菌有较好的染色效果,且加入AIE试剂V并不会影响细菌生长。24h后对照组传统肉汤稀释法监测判读的MIC值为4 $\mu$ g/mL,而对比例2判读结果MIC值为16 $\mu$ g/mL。对比例2的AIE试剂V灵敏度低,不能准确判读出MIC值。

[0091] 对比例3:

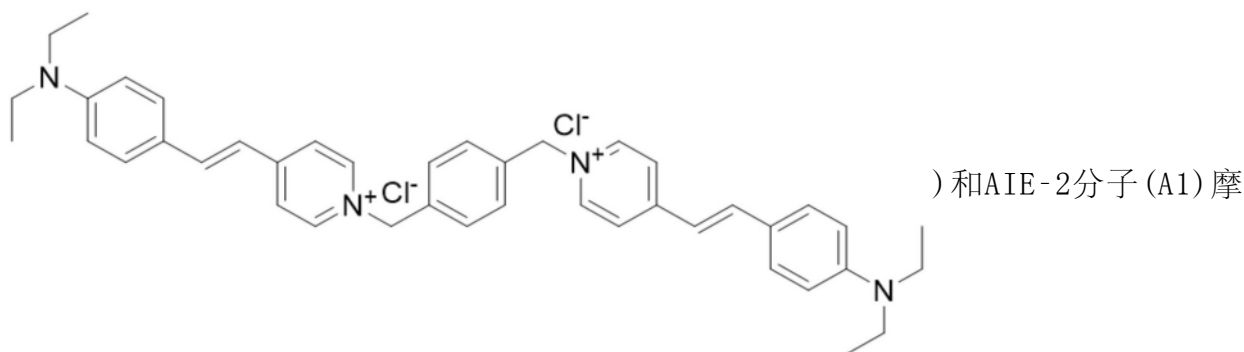
(1) 将铜绿假单胞菌27853在平板培养基上37 $^{\circ}$ C培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE分子(



)和AIE-2分子(A1),加入超纯

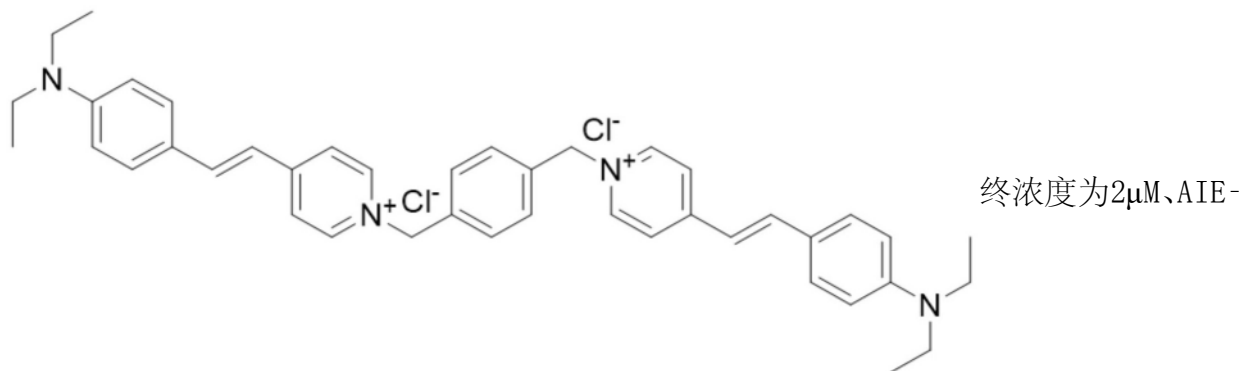
水溶解,用0.22 $\mu$ m滤膜过滤除菌,制得AIE试剂VI(AIE分子(



尔比为1:5,浓度分别为2mM、10mM),4℃保存;

(2) 采用MH肉汤培养基将抗菌药物储液头孢他啶按梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液(浓度分别为0μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、16μg/mL、32μg/mL、64μg/mL、128μg/mL、256μg/mL、512μg/mL),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按100 μL/孔分装至96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2μL AIE试剂VI混合均匀,按100 μL/孔分装至96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(AIE分子



2分子终浓度为10μM);

(3) 96孔板制备完毕后置于酶标仪(96孔板等)中定时监测8h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0092] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0093] 结果如图5和表15所示,可以看出,对比例3的AIE试剂VI对细菌有较好的染色效果,加入AIE试剂VI不会影响细菌生长。24h后对照组传统肉汤稀释法监测判读的MIC值为2μg/mL,而对比例3判读结果MIC大于32μg/mL。对比例3的AIE试剂VI不能准确判读出MIC值。

[0094] 表15:

铜绿假单胞菌ATCC 27853	头孢他啶浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测8 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.143	0.123	0.115	0.124	0.117	0.134	0.105	0.133

[0095] 对比例4:

(1) 分别将铜绿假单胞菌27853和金黄色葡萄球菌29213在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1),加入超纯水溶解,用0.22 $\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌,制得AIE试剂Ⅶ(AIE-1分子(B1)和AIE-2分子(A1)摩尔比为1:2,浓度分别为4mM、8mM),4℃保存;

(2) 将抗菌药物储液左氧氟沙星梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液(浓度分别为0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、16 $\mu\text{g/mL}$ 、32 $\mu\text{g/mL}$ 、64 $\mu\text{g/mL}$ 、128 $\mu\text{g/mL}$ 、256 $\mu\text{g/mL}$ 、512 $\mu\text{g/mL}$ ),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2 $\mu\text{L}$  AIE试剂Ⅶ混合均匀,按100  $\mu\text{L}$ /孔分装至96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(AIE-1分子(B1)终浓度为4 $\mu\text{M}$ 、AIE-2分子(A1)终浓度为8 $\mu\text{M}$ );

(3) 96孔板制备完毕后置于荧光读取仪器(96孔板等)中定时监测8h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0096] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0097] 结果如图6a、图6b和表16所示,可以看出,对比例4加入AIE试剂Ⅶ并不会影响细菌生长。24h后对照组传统肉汤稀释法监测判读的铜绿假单胞菌对应MIC值为2 $\mu\text{g/mL}$ 、金黄色葡萄球菌对应MIC值为0.5 $\mu\text{g/mL}$ ,而对比例4判读结果MIC值分别为大于32 $\mu\text{g/mL}$ 和32 $\mu\text{g/mL}$ 。对比例4的AIE试剂Ⅶ灵敏度低,不能准确判读出MIC值。

[0098] 表16:

铜绿假单胞菌ATCC 27853	左氧氟沙星浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测8 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.208	0.151	0.133	0.128	0.120	0.139	0.199	0.196
金黄色葡萄球菌ATCC 29213	左氧氟沙星浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测8 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.097	0.084	0.054	0.048	0.045	0.025	0.052	0.009

[0099] 对比例5:

(1) 分别将铜绿假单胞菌27853和金黄色葡萄球菌29213在平板培养基上37℃培养18 h,挑取平板单菌落,分别用MH肉汤培养基制备成0.5麦氏浊度菌液,再稀释50倍备用;

用天平称取AIE-2分子(A1),加入超纯水溶解,用0.22μm滤膜过滤除菌,制得AIE试剂Ⅷ(AIE-2分子(A1)浓度分别为10mM),4℃保存;

(2) 将抗菌药物储液左氧氟沙星梯度稀释配制不同梯度浓度的待测抗菌药物溶液(浓度分别为0μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、4μg/mL、8μg/mL、16μg/mL、32μg/mL、64μg/mL、128μg/mL、256μg/mL),配制好的抗菌药物溶液每个梯度浓度按 100 μL/孔分装至 96孔微孔板;

每1mL步骤(1)菌液与2μL AIE试剂Ⅷ混合均匀,按100 μL/孔分装至 96孔微孔板的待测抗菌药物溶液中,得若干个不同梯度浓度的抗菌药物检测液(AIE-2分子(A1)终浓度为10μM);

(3) 96孔板制备完毕后置于荧光读取仪器(96孔板等)中定时监测8h(每隔一小时测定一次荧光值),设置激发波长460nm,发射波长560nm;

(4) 分别计算不同浓度抗菌药物溶液下培养时间n小时的相对荧光强度 $F_n = (I_n - I_0) / I_0$ ,其中, $I_n$ 为培养时间n小时的荧光值, $I_0$ 为培养时间0小时的初始荧光值;

分别拟合不同抗菌药物浓度下的 $F_n$ 与时间的线性关系,确定直线斜率,通过将抗菌药物浓度为a时的直线斜率 $k_a$ 与抗菌药物浓度为0时的直线斜率 $k_0$ 进行比较,随抗菌药物浓度提高,当首次斜率 $k_a \leq 0.01$ 时,该斜率对应的抗菌药物浓度a确定为该抗菌药物的MIC值。

[0100] (5) 同步进行传统肉汤稀释法药敏检测实验,培养24h后用肉眼从浑浊度判断MIC值。

[0101] 结果如表17所示,可以看出,对比例5加入AIE试剂Ⅷ,24h后对照组传统肉汤稀释法监测判读的铜绿假单胞菌对应MIC值为2μg/mL、金黄色葡萄球菌对应MIC值为0.5μg/mL,而对比例5判读结果MIC值分别为大于32μg/mL和小于0μg/mL。对比例5的AIE试剂Ⅷ灵敏度低,效果不佳,不能准确判读出MIC值。

[0102] 表17:

铜绿假单胞菌ATCC 27853	左氧氟沙星浓度(μg/mL)	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测8 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.424	0.353	0.301	0.267	0.216	0.204	0.219	0.151
金黄色葡萄球菌ATCC 29213	左氧氟沙星浓度(μg/mL)	0	0.5	1	2	4	8	16	32
	监测8 h的 $F_n$ -T关系直线斜率	0.006	0.005	0.004	0.001	0.001	0.002	0.007	0.007

[0103] 以上实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

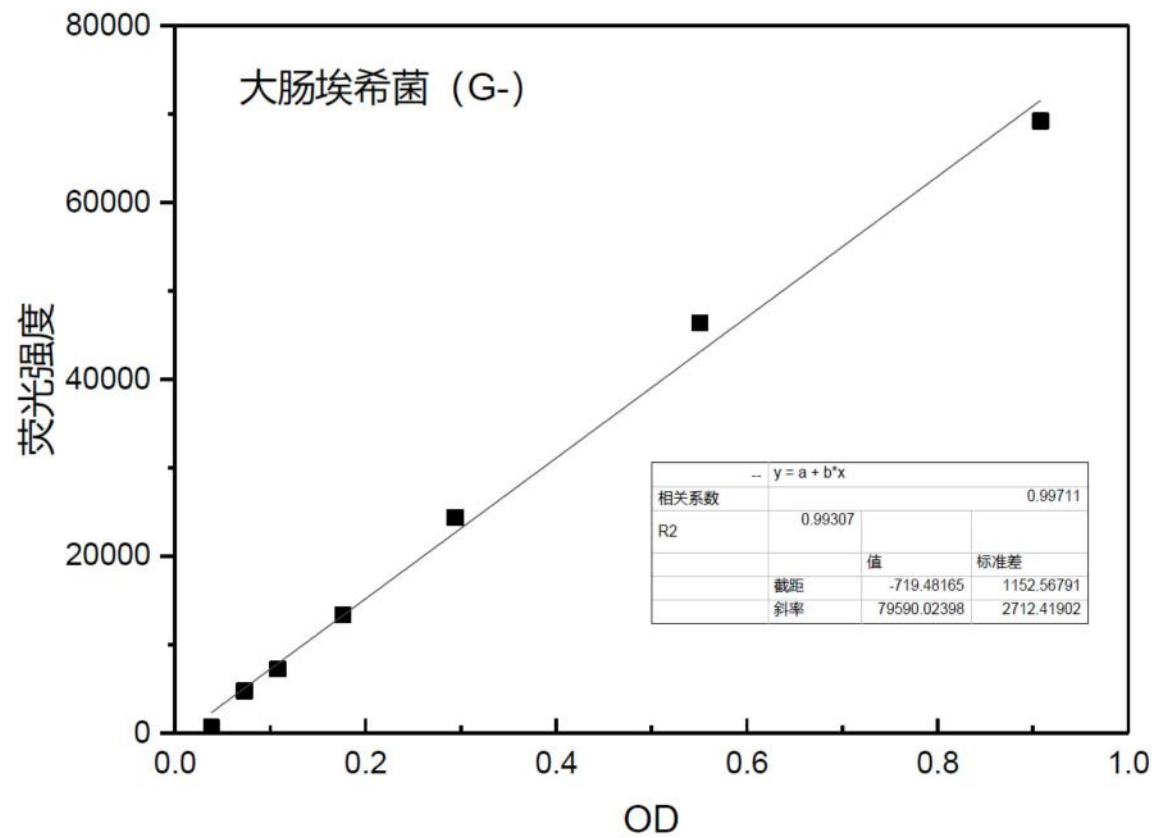


图1a

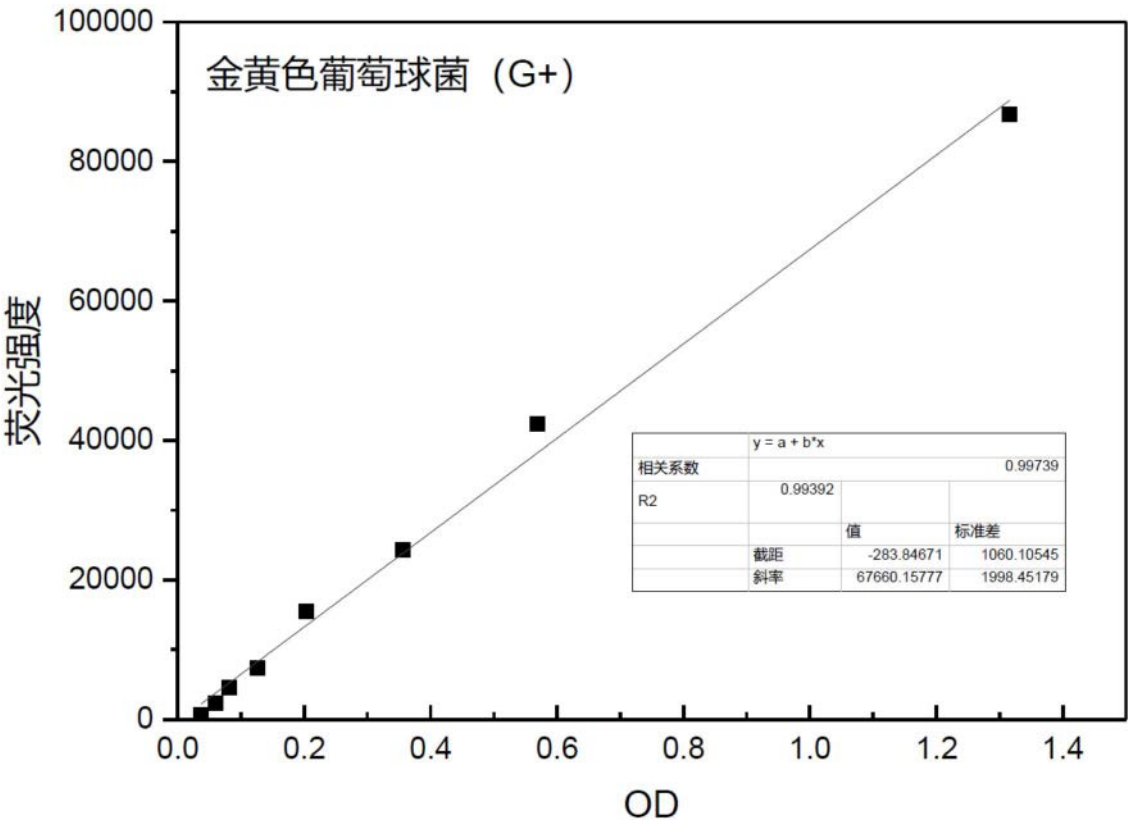


图1b

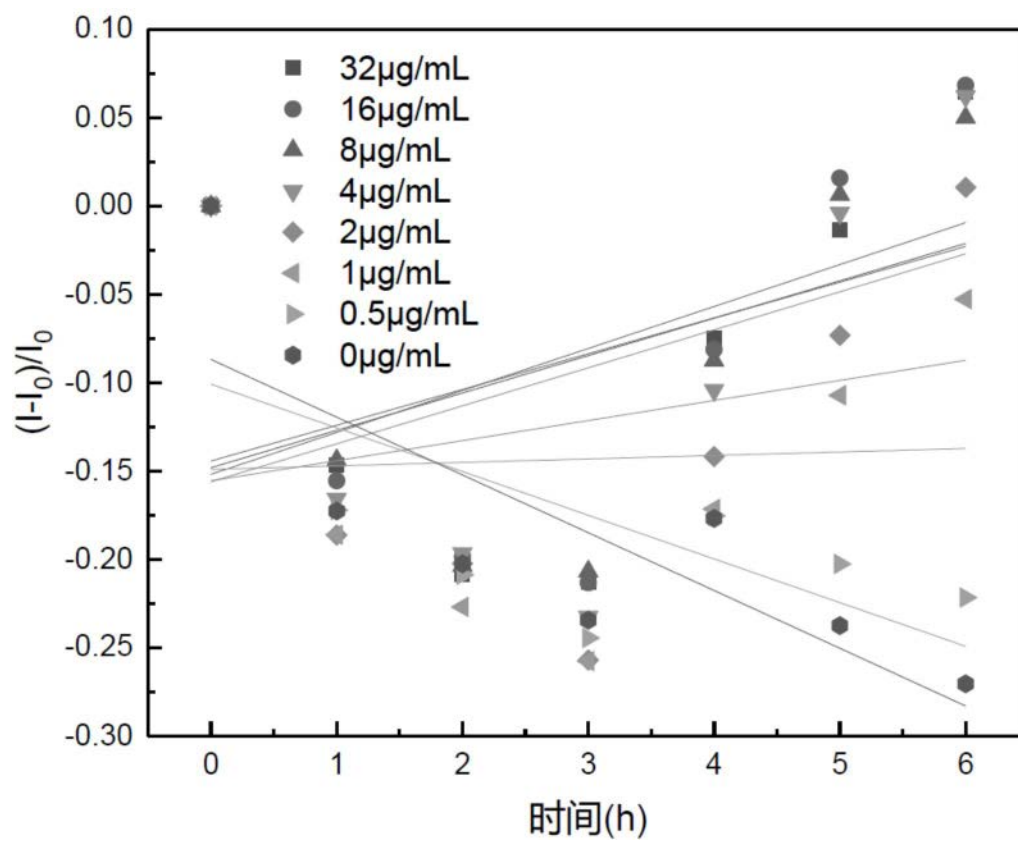


图2a

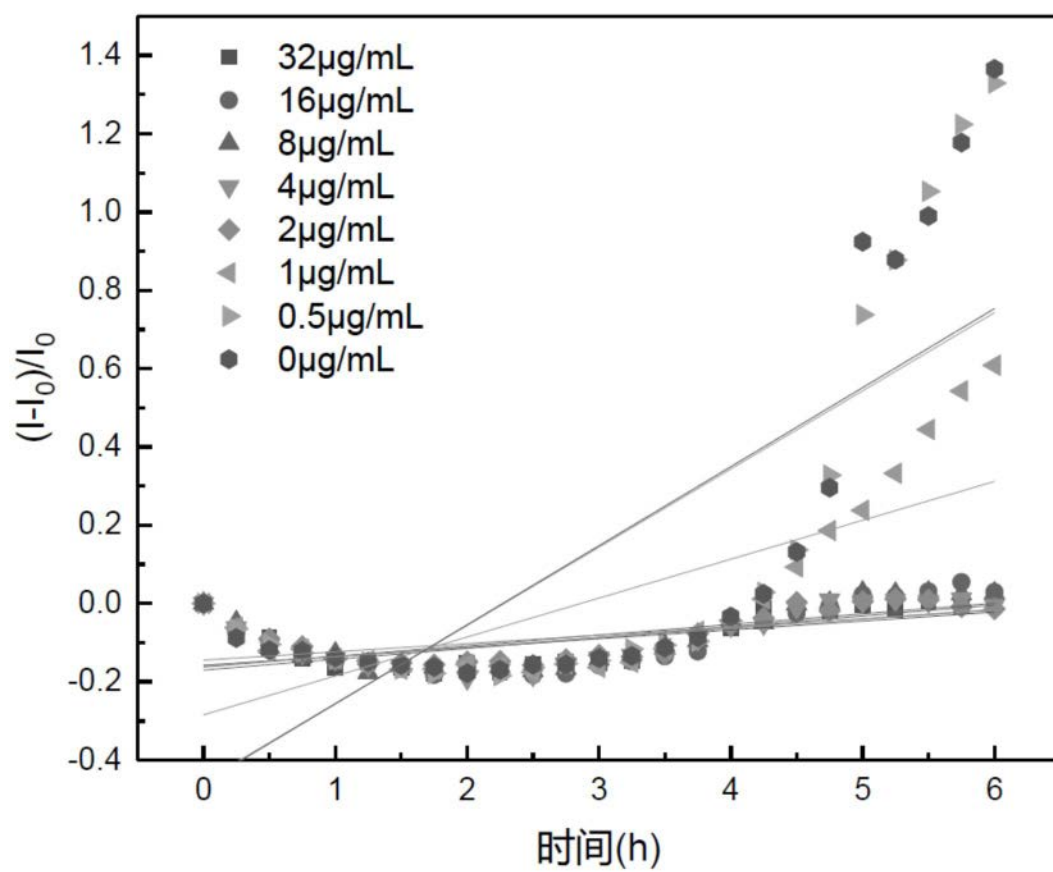


图2b

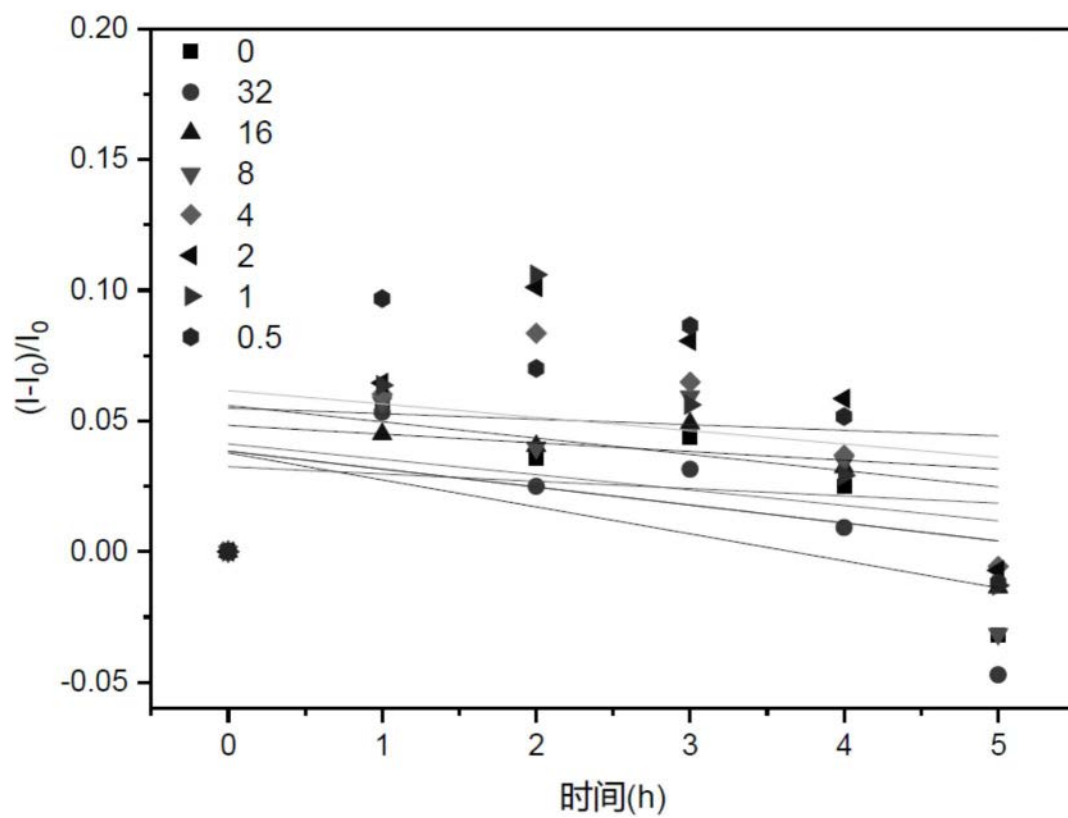


图 3

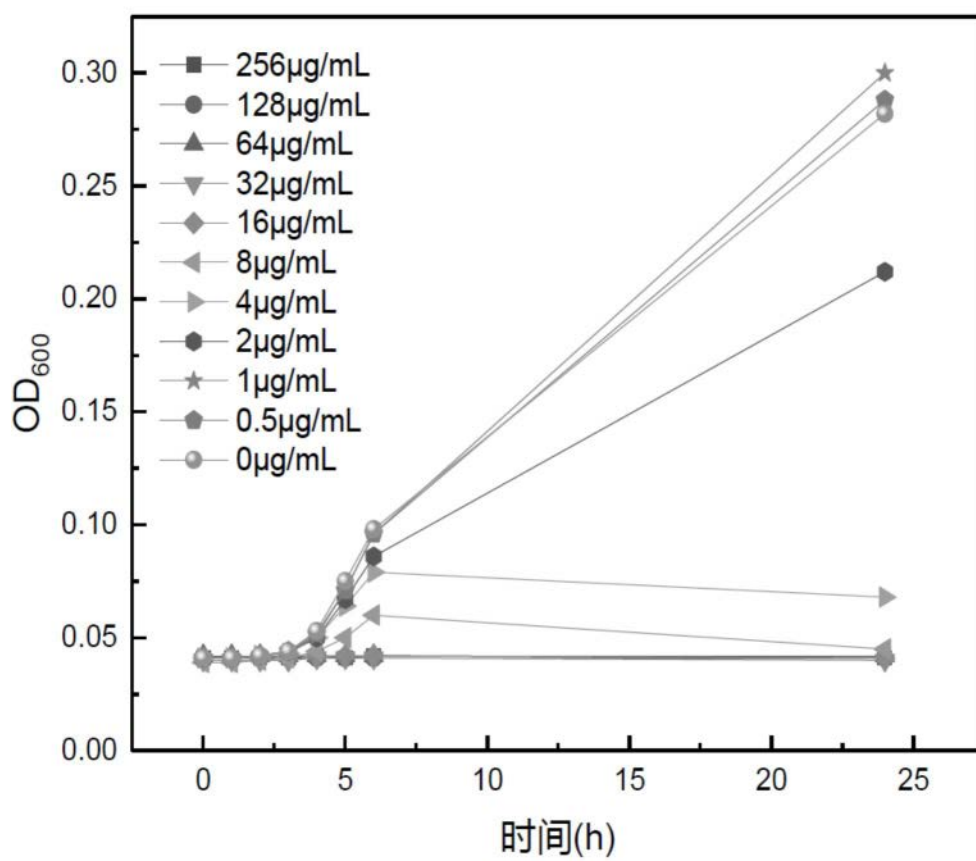


图4a

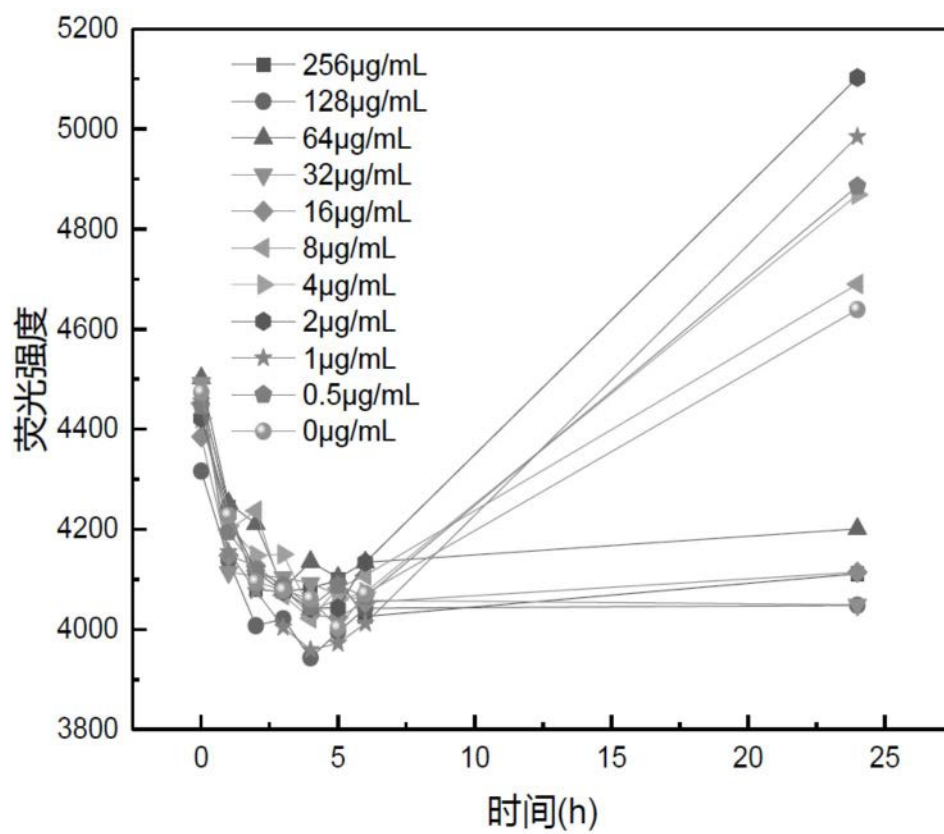


图4b

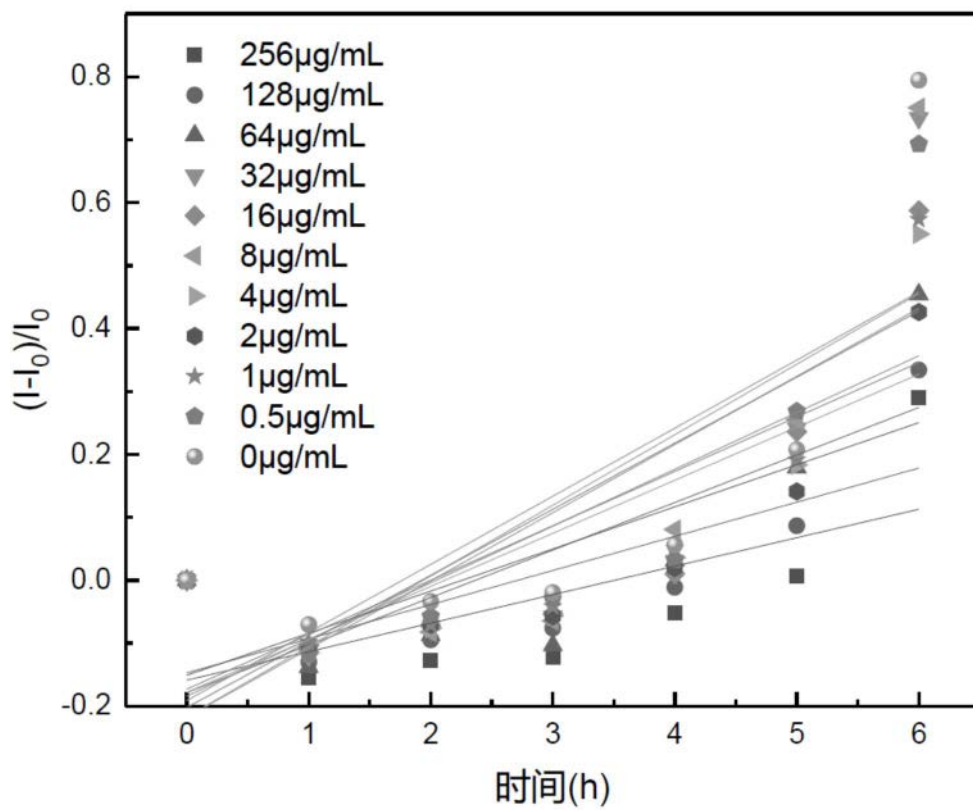


图 5

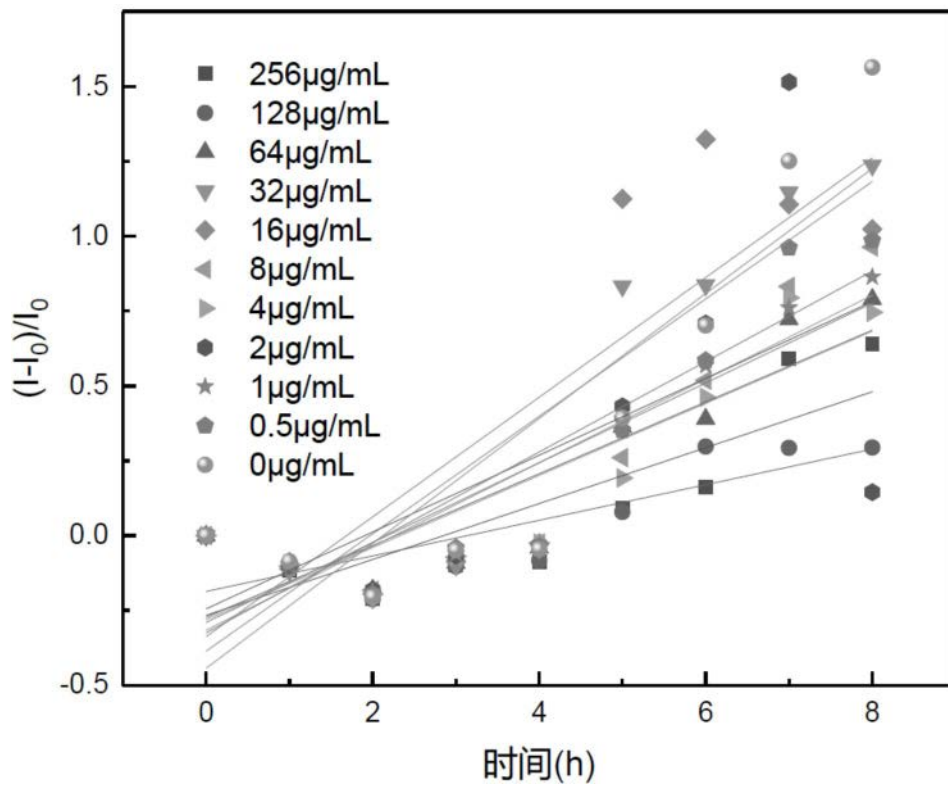


图6a

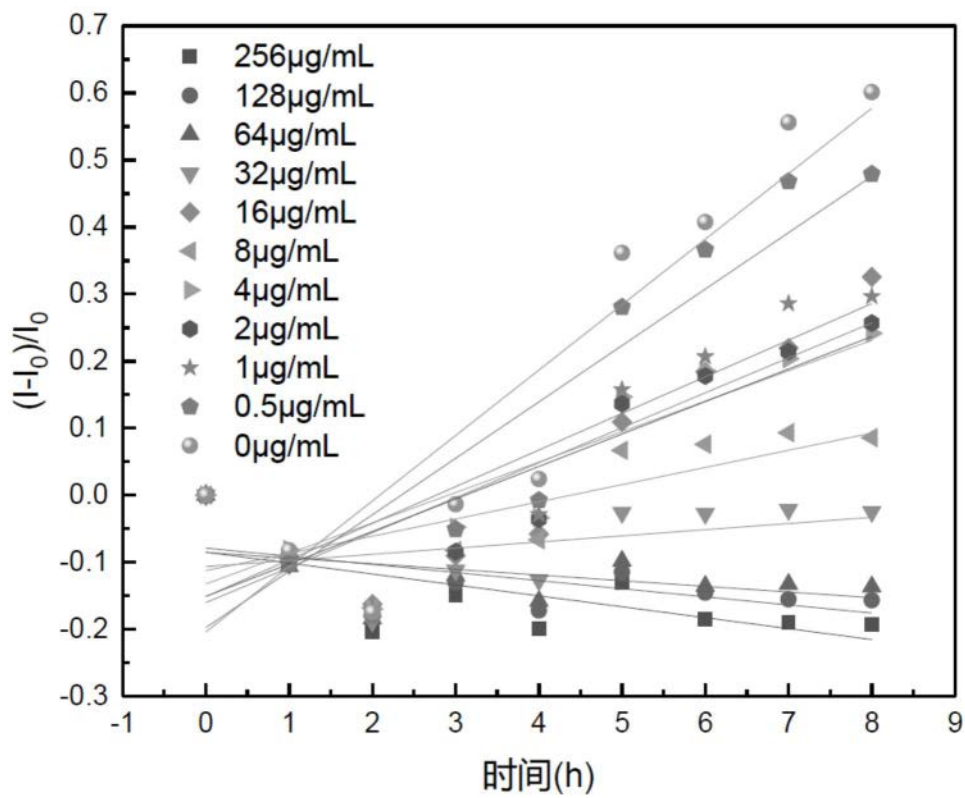


图6b