

基于微流控芯片的抗恶臭假单胞菌生物膜活性天然产物筛选

强文娟 孙懿格 侯铁舟 强乐

西安交通大学口腔医院陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室,西安交通大学口腔医院陕西省牙颌疾病临床研究中心,西安交通大学口腔医院牙体牙髓病科,西安 710004
通信作者:强乐,Email:qiangle@xjtu.edu.cn

【摘要】 目的 针对恶臭假单胞菌(*P. putida*)在根管治疗失败及难治性根尖周炎中日益凸显的致病性及其生物膜耐药问题,解决天然产物因样品量极低而难以开展系统活性评估的瓶颈,探讨基于微流控芯片的微量、可视化高通量药物筛选平台的构建。**方法** 选用*P. putida* KT2440作为模式菌株,构建绿色荧光蛋白标记菌株并建立微流控生物膜模型。针对珍稀天然产物,确立了以200 $\mu\text{g/mL}$ 为固定阈值的“定性快筛”策略,利用荧光线段长度作为量化指标,对40种天然产物进行抗生物膜活性盲筛。以氢氧化钙和环丙沙星分别作为效力下限与上限,界定有效筛选区间,采用*t*检验比较与传统96孔板微量肉汤稀释法的组间差异,对比两种方法的样品消耗。**结果** 微流控筛选平台成功将40种化合物区分为强效、中效和无效3个梯队,最终鉴定出6种具有显著抗*P. putida*生物膜活性的先导化合物(阳性检出率15%),其中包括新型大环肽类及部分单萜类化合物。微流控芯片筛选结果与传统方法具有极高的总体一致性。样品消耗方面,该平台单次测试仅需纳升(nL)级体积,单化合物消耗量低至8 ng,相比传统96孔板法节约样品约15 000倍。**结论** 本研究构建的微流控高通量筛选平台,通过固定浓度定性筛查策略,有效克服了天然产物样品稀缺带来的筛选难题。该平台具有样品消耗低、分析通量高和结果准确可靠等优势,为快速锁定抗耐药菌生物膜的活性先导化合物提供了强有力的技术支撑。

【关键词】 微流控芯片; 恶臭假单胞菌; 高通量筛选; 生物膜; 天然产物

基金项目:国家自然科学基金(42307568)

引用著录格式:强文娟,孙懿格,侯铁舟,等. 基于微流控芯片的抗恶臭假单胞菌生物膜活性天然产物筛选[J/OL]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2026,20(5):354-362.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2026.05.002

Microfluidic chip-based screening of natural products with activity against *Pseudomonas putida* biofilms

Qiang Wenjuan, Sun Yige, Hou Tiezhou, Qiang Le

Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University; Clinical Research Center of Shaanxi Province for Dental and Maxillofacial Diseases, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University; Department of Cariology and Endodontics, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Corresponding author: Qiang Le, Email: qiangle@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective To address the growing pathogenicity and biofilm-mediated drug resistance of *Pseudomonas putida* (*P. putida*) in root canal therapy failure and refractory apical periodontitis, and to overcome the bottleneck of "extremely low sample quantity" that hinders the systemic activity evaluation of natural products. This study aims to establish a micro-scale, visual, and high-throughput drug screening platform based on microfluidic chips. **Methods** *P. putida* KT2440 was selected as the model strain, and a green fluorescent protein (GFP)-labeled strain was constructed to establish a microfluidic biofilm model. To accommodate rare natural products, a "qualitative rapid screening" strategy with a fixed threshold of 200 $\mu\text{g/mL}$ was established. Using the length of the fluorescent line segment as a quantitative metric, 40

natural products derived from myxobacteria and plants were blindly screened for anti-biofilm activity. Calcium hydroxide and Ciprofloxacin served as the lower and upper limits of efficacy, respectively, to define the effective screening range. A *t*-test was used to compare results with the traditional 96-well plate micro-broth dilution method; consistency between the two methods was verified, and sample consumption was compared. **Results** The microfluidic screening platform successfully categorized the 40 compounds into three tiers: Strong, moderate, and ineffective. Ultimately, 6 lead compounds with significant anti-*P. putida* biofilm activity were identified (positive detection rate of 15%), including novel macrocyclic peptides and certain monoterpenoids. Methodological validation showed high qualitative consistency between the microfluidic chip screening and traditional methods. regarding sample consumption, the platform required only nanoliter (nL)-level volumes per test, with a single compound consumption as low as 8 ng. This represented a sample saving of approximately 15 000-fold compared to the traditional 96-well plate method, significantly reducing the demand for fermentation products. **Conclusions** The microfluidic high-throughput screening platform constructed in this study effectively overcame the technical challenge of sample scarcity in natural product mining through a fixed-concentration qualitative screening strategy. The platform featured extremely low sample consumption, high analytical throughput, and accurate results, providing strong technical support for rapidly locking onto active lead compounds against drug-resistant bacterial biofilms.

【Key words】 Microfluidic chip; *Pseudomonas putida*; High-throughput screening; Biofilm; Natural products

Fund program: National Natural Science Foundation of China(42307568)

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1366.2026.05.002

根管治疗失败及难治性根尖周炎(refractory apical periodontitis, RAP)的主要诱因在于根管系统内复杂微生物生物膜的持续存在^[1]。尽管粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, *E. faecalis*)长期被视为导致根管治疗失败的主要病原菌^[2-3],但近年来的微生物组学研究表明,根管感染具有高度的微生物多样性^[4-5],其中恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*, *P. putida*)作为一种革兰氏阴性菌,在感染根管及根尖周组织中被频繁检出,被认为是导致根管炎症迁延不愈的重要潜在病原体^[6-8]。*P. putida*具有极强的生物膜形成能力,能够深入定植于牙本质小管,并对次氯酸钠(NaClO)冲洗液及氢氧化钙[Ca(OH)₂]等常规根管消毒药物表现出显著的耐受性。因此,寻找能够有效渗透并清除*P. putida*生物膜的新型抗菌药物,已成为口腔微生物学研究的迫切需求。

微生物次级代谢产物因其结构多样性和独特的抗菌机制,一直是新型抗生素的重要来源^[9]。然而,目前针对假单胞菌属的天然产物筛选工作大多集中于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*),专门针对*P. putida*的药物筛选研究相对缺乏。基于同属细菌间潜在的药物交叉活性与靶点相似性,从已知具有抗*P. aeruginosa*活性的天然产物库中寻找抗*P. putida*的活性物质,不失为

一种高效的筛选策略^[10-13]。尽管如此,天然产物挖掘往往面临产量极低、分离纯化步骤烦琐的共性难题^[14]。在早期的发现阶段,经过复杂发酵与分离纯化获得的单体化合物往往仅为微克(μg)级,而传统的试管稀释法或96孔板微量肉汤稀释法通常需要毫克(mg)级的样品量^[15]。这种样品稀缺与筛选消耗大之间的矛盾,严重制约了对天然产物在抗*P. putida*领域的系统评估与开发,亟需引入微量化的筛选技术。

为了突破这一微量筛选的瓶颈,微流控技术(microfluidics)凭借其在微米尺度下对流体的精准操控能力及纳升(nL)级的试剂消耗,为天然产物筛选提供了微量、高通量和低成本的解决方案。本课题组前期已成功研发了一款高通量微流控筛选芯片,并成功应用于抗白假丝酵母菌(*Candida albicans*, *C. albicans*)增效药物的筛选^[16]。在此基础上,本研究选用遗传背景清晰且生物安全性高的*P. putida* KT2440作为模式菌株,进一步优化芯片设计与检测体系,将样品消耗量降低至传统方法的千分之一,构建针对该菌株的天然产物高通量筛选平台。再从已报道的文献中选择40种具有抗*P. aeruginosa*活性的天然产物,利用该平台评价其对*P. putida*生物膜的抑制效果。本研究旨在通过这一微量化平台快速

锁定具有抗根管感染潜力的新型先导化合物,为解决由假单胞菌引起的根管治疗失败和持续性根尖周炎症提供新的药物选择和理论依据。

材料与方法

一、细菌菌株和培养条件

本研究使用 *P. putida* KT2440 菌株^[17],购自武汉华尔纳生物科技有限公司(ATCC47054)。细菌在溶菌肉汤培养基(lysogeny broth medium, LB培养基)中培养,并于 30 °C、200 r/min 振荡过夜培养。通过 600 nm 波长下的吸光度值(A_{600})监测液体培养基中的细胞生长。

二、绿色荧光蛋白标记菌株的构建

为了实现 *P. putida* KT2440 在微流控芯片中的实时可视化监测,本研究利用标准欧洲载体架构(Standard European Vector Architecture, SEVA)质粒系统构建绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的 *P. putida* 菌株。选用广宿主载体 pSEVA234-GFP,该质粒骨架包含 pBBR1 复制起点、卡那霉素抗性基因(*KmR*)及由组成型启动子 P_{EM7} 驱动的 *GFPmut3* 基因^[18]。

具体构建方法如下:首先将 *P. putida* KT2440 接种于 LB 液体培养基中,30 °C、200 r/min 振荡培养过夜。次日按 1:100 的比例转接至新鲜 LB 培养基中,培养至对数生长期($A_{600}=0.5$)。菌液经 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8.4 cm)收集菌体,弃去上清液,用预冷的 300 mmol/L 蔗糖溶液洗涤菌体 3 次,最后重悬于 100 μ L 300 mmol/L 蔗糖溶液中制备成电转感受态细胞。取约 100 ng 提取纯化的 pSEVA234 质粒 DNA 与 100 μ L 感受态细胞轻轻混匀,转移至 0.2 cm 间距的预冷电转杯中。使用电穿孔仪(Bio-Rad, 美国)在 2.5 kV、25 μ F 和 200 Ω 的条件下进行电击转化。电击结束后立即加入 1 mL 无抗生素的 LB 培养基,于 30 °C、200 r/min 复苏培养 2 h。取适量复苏菌液涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体平板上,置于 30 °C 倒置培养 24 h。挑取单菌落进行菌液聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)验证(引物针对 GFP 基因序列),并利用荧光显微镜(激发波长 488 nm、发射波长 510 nm)确认转化子中 GFP 的表达强度及荧光稳定性。

三、微流控芯片的设计与制造

芯片制造基于标准的软光刻(soft lithography)工艺。首先,利用光刻技术在硅片上制作带有微通

道浮雕图案的阳模;随后,以聚二甲基硅氧烷(polydimethylsiloxane, PDMS)为基质浇注于模具上,经高温固化后揭膜,获得带有微纳结构的 PDMS 层。最后,将 PDMS 层与经预清洗的玻璃载玻片同时进行氧等离子体(oxygen plasma)表面改性处理,并快速贴合键合,形成封闭、透明的微流控高通量筛选芯片。

四、扫描电镜样品制备

参考 Rong 等^[19]的方法进行扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)样品制备。将 PDMS 微流控芯片与玻璃基底分离,得益于 *P. putida* 细胞的黏附特性,菌体保留在芯片微流道内部。使用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 PDMS 芯片 3 次,并于室温下使用 1% 锇酸溶液处理 1 h。随后,使用 2% 戊二醛溶液在室温下固定 2 h。利用梯度乙醇(浓度分别为 10%、30%、50%、70% 和 100%)对样品进行逐级脱水,随后置于真空冷冻干燥机中干燥 8 h。最后,将 PDMS 样品固定于 SEM 样品台上,经真空喷金处理后,使用 SEM(S-440, Leica Cambridge, 英国)进行观察。

五、微流控芯片操作与培养

将对数生长期的 *P. putida* 菌悬液($A_{600}=0.5$)吸入 1 mL 无菌注射器中,连接微量注射泵(ASP12-XB, 保定兰格恒流泵有限公司),以 2 μ L/min 的恒定流速将菌液注入微流控芯片流道中。停止进样后,将芯片静置培养 2 h,使细菌沉降并牢固黏附于 PDMS 流道表面。随后,每隔 4 h 向芯片内通入新鲜的 LB 培养基以补充营养,持续培养至 16 h。此时,微流道网络已被呈线性生长排列的 *P. putida* 完全填充。

在天然产物筛选阶段,于芯片各单元入口处分别加入 2 μ L 待测天然产物溶液,并在出口处施加负压(真空抽吸)辅助进样,使药液快速充满流道。得益于 *P. putida* 细胞优异的表面黏附特性,菌体在整个流体培养及药物加载过程中均能稳定保留在微流道内,未发生流失。药物处理 1 h 后,再次启动注射泵通入新鲜 LB 培养基,对流道内的残留药物进行冲洗,以模拟药物清除过程并进行后续观测。

六、天然产物的合成与制备

本研究所筛选的 40 种天然产物的合成路线及结构确证数据均参照已发表的文献或标准化学合成方案进行,详情见附表 1。合成产物经制备型高

效液相色谱(preparative high-performance liquid chromatography, Pre-HPLC)纯化,并通过高分辨质谱(high-resolution mass spectrometry, HRMS)及核磁共振氢谱(proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, $^1\text{H-NMR}$)鉴定其化学结构。所有用于生物学测试的化合物纯度均大于95%。实验前,将各化合物粉末溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液中,配制成浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,分装后置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。在进行微流控芯片药敏实验时,利用LB培养基将母液稀释至所需的工作浓度,确保最终体系中DMSO的浓度低于0.1%,以排除溶剂对*P. putida* KT2440生长及生物膜形成的非特异性影响。



扫描二维码查阅附表1

七、数据采集与统计学分析

使用自动化活细胞成像系统(Celldiscoverer 7, Zeiss, 德国)对微流控芯片进行全景荧光扫描,获取微流道内*P. putida*生长并形成生物膜后的连续荧光条带图像。基于ImageJ软件的宏指令脚本及Python批处理脚本,实现对荧光图像的自动化分析。所有实验重复3次,利用Prism 10.5(GraphPad Software, 美国)进行数据分析,采用 t 检验比较组间差异。

结 果

一、微流控芯片的设计与制造

本研究所使用的微流控芯片制造工艺流程如图1A所示,芯片实物见图1B。为确保*P. putida*在流道内形成生物膜,本研究在前期已构建的高通量微流控芯片平台基础上对流道尺寸进行了优化,单个流道宽度为19.299 μm ,微流道间间隔为5.666 μm (图1C)。单枚芯片集成40个独立的检测单元,每个检测单元不仅均设有独立的流体入口与出口,还可同时进行20组平行实验。

二、恶臭假单胞菌微流控生物膜模型构建与表征

将转染GFP的*P. putida* KT2440接种至微流控芯片流道内后,在2 $\mu\text{L/min}$ 的持续层流灌注培养下,细菌表现出良好的表面黏附特性。Celldiscoverer 7观察显示,*P. putida*在PDMS微流道内能够持续、稳定地表达GFP,发出高强度的绿色荧光信号,在长达16 h的培养周期内未观察到明显的荧光衰减或质粒丢失现象。随着培养时间的推移,细菌在空间受限的微流道内呈线性致密生长,最终填充流道形成形态规则、边界清晰的连续荧光条带(图2)。这种稳定的荧光表达特性为后续的自动化定量分析提供了可靠的光学基础。

为了进一步确证流道内*P. putida*的生长状态,利用SEM对芯片内部进行微观形态学表征。SEM图像清晰地显示,*P. putida*菌体紧密黏附于PDMS通道内壁,菌体之间通过分泌的胞外聚合物相互交联,

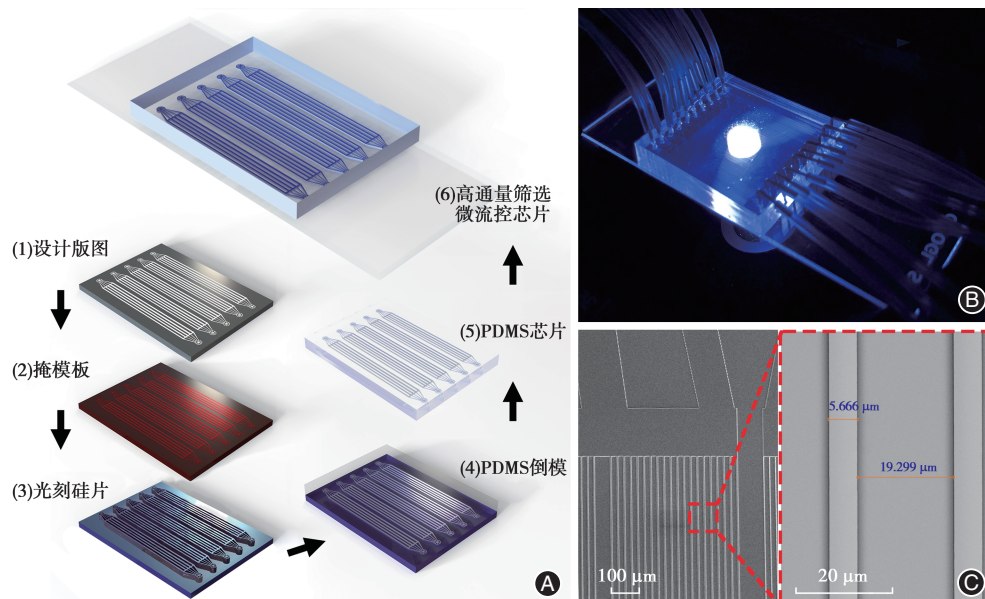


图1 光刻工艺制备高通量筛选微流控芯片 A:光刻工艺制备流程;B:芯片实物图;C:芯片微流道扫描电镜(SEM)图像;PDMS:聚二甲基硅氧烷。

形成了具有典型三维结构的成熟生物膜(图2A~2B)。SEM结果与荧光成像结果(图2C~2D)相互印证,证实了本研究构建的微流控平台能够成功模拟*P. putida*在受限空间及流体剪切力环境下的生物膜形成过程,构建了可视化的体外生物膜模型。

三、筛选标准的建立与有效化合物判定

基于本课题组前期建立的微流控检测体系,本研究针对天然产物的筛选特性,进一步优化了量化评估标准。研究确立以药物作用后的剩余荧光线段长度作为评估*P. putida*细菌清除效率的核心指标。该指标与天然产物的抗生物膜活性负相关:即剩余荧光线段越短,提示该浓度下的化合物对*P. putida*生物膜的破坏及清除能力越强;反之,若线段长度接近对照组,则表明其抗生物膜活性微弱或无效。

据此,本研究制定了双标锚定的筛选策略:以临床常用根管封药氢氧化钙(1 000 $\mu\text{g/mL}$)作为效力下限,以强效抗生素环丙沙星(ciprofloxacin, CIP; 0.25 $\mu\text{g/mL}$)作为效力上限。微流控芯片实测结果显示,0.25 $\mu\text{g/mL}$ 环丙沙星处理组的剩余荧光线段长度小于流道全长的10%,而1 mg/mL氢氧化钙处理组的长度则维持在90%以上。基于此动态范围,本研究设定当待测固定浓度的天然产物(200 $\mu\text{g/mL}$)致使剩余荧光线段长度位于(10%,90%)区间时,判定该化合物对*P. putida*生物膜具有有效抑制活性(图3)。之所以选取200 $\mu\text{g/mL}$ 作为统一初筛浓度,是因为该浓度在样品消耗可控的前提下,能够较好覆盖强效至中低活性化合物的筛选区间,并兼顾化合物溶解性控制及非特异性干扰的规避。

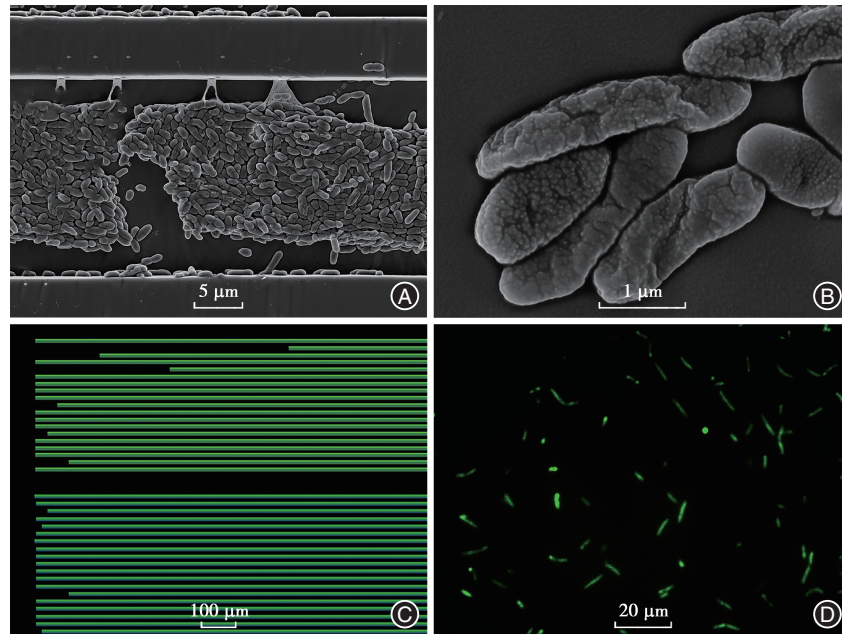


图2 表达绿色荧光蛋白的恶臭假单胞菌(*P. putida*)在微流道中形成的生物膜与常规培养条件下菌体的形态及荧光特征 A:微流道中生物膜的扫描电镜(SEM)图像;B:正常生长的SEM图像;C:微流道中生物膜的荧光显微镜图像;D:正常生长的荧光显微镜图像。

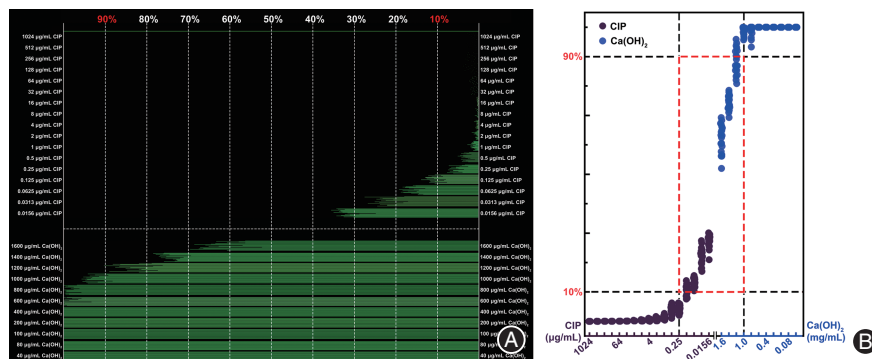
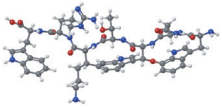
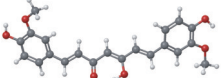
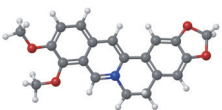
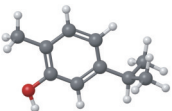
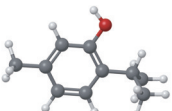
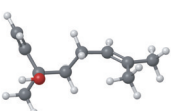


图3 微流控芯片中不同浓度环丙沙星和氢氧化钙的剩余荧光线段长度 A:荧光显微镜图像;B:百分比统计分布图;图B横坐标采用以2为底的对数刻度;横坐标各点对应的具体浓度顺序与图A中各处理组自上而下的浓度排列一致;横坐标左侧(紫色)与右侧(蓝色)并无连续关系。

表1 6种显著抗恶臭假单胞菌(*P. putida*)生物膜活性的天然产物及其潜在机制

序号	分子式	化学结构	剩余荧光线段长度占比 (%, $\bar{x}\pm s,n=60$)	化学 分类	结构特点	潜在机制	参考文献
1	C ₅₃ H ₆₅ N ₁₅ O ₁₁		13.09±1.82	大环肽	刚性双环骨架,七肽	靶向外膜 BamA 蛋白	[20-21]
2	C ₂₁ H ₂₀ O ₆		22.22±2.92	多酚	双酮结构,共轭双键	抑制生物膜黏附和群体感应	[22-23]
3	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺		27.78±2.13	生物碱	异喹啉骨架,季铵盐	嵌入DNA,抑制 FtsZ 细胞分裂	[24]
4	C ₁₀ H ₁₄ O		43.44±2.53	单萜酚	酚羟基,异丙基	破坏细胞膜完整性	[25-27]
5	C ₁₀ H ₁₄ O		55.55±2.81	单萜酚	酚羟基,异丙基	破坏细胞膜完整性	[28-29]
6	C ₁₀ H ₁₈ O		78.84±2.01	单萜醇	长链醇,无苯环	增加膜通透性	[30-31]

注:BamA 为外膜β-桶组装蛋白A;FtsZ 为一种由细菌*f*tsZ 基因编码的蛋白质,以“长丝的温度敏感突变体Z”命名。

四、40种黏细菌天然产物的筛选结果

利用所构建的微流控高通量平台,对40种具有潜在活性的天然产物进行了抗*P. putida*生物膜的盲样筛选。其中有6种天然产物表现出显著的抗生物膜活性,阳性检出率为15%(表1);其余34种化合物在测试浓度下未能有效抑制流道内*P. putida*生物膜的生长。

该策略成功将40种化合物区分为强效(大环肽,~13%)、中效(多酚/生物碱,20%~30%)和弱效(萜类,40%~80%)3个梯队,为后续的优先级排序提供了直接依据。对于活性较弱但具有修饰潜力的单萜类化合物,如果采用低浓度初筛很容易被漏掉,而在200 μg/mL的高浓度下仍能被捕捉到,保留了对其进行结构优化的可能性。通过本平台和配套筛选方法的建立,可迅速从复杂的天然产物库中锁定核心目标,既节约了天然产物资源又节约了筛选时间。

五、筛选结果的验证与样品消耗对比

为评估微流控芯片筛选结果的可靠性,并量化该平台在样品节约方面的技术优势,本研究进一步采用传统96孔板微量稀释法对芯片筛选命中的阳性化合物及3种阴性化合物进行了验证,并对两种方

法的样品消耗进行了对比分析。

芯片筛选命中的6种化合物在96孔板体系中均表现出明确的抑菌活性,其中芯片中活性最强的大环肽类化合物在微流控平台中对应最低的剩余荧光线段长度占比(13.09±1.82)%,在96孔板法中亦表现出最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值(4 μg/mL)。在本研究检测的化合物范围内,两种方法呈现的相对活性排序基本一致,表现为大环肽类>多酚类>生物碱类>萜类(附表2)。



扫描二维码查阅附表2

除结果一致性外,本研究更突出的优势在于对珍贵天然产物样品的极大节约。传统96孔板微量肉汤法通常需要在多个浓度梯度下重复加样,样品消耗量较大;而本研究建立的微流控芯片平台采用固定浓度定性快筛策略,在保证筛选效率的同时显著降低了单次测试所需样品量(表2)。

表2 微流控芯片法与传统96孔板法在天然产物筛选中的样品消耗对比

筛选方法	单次测试体积	单化合物消耗量	所需发酵液当量	加样时间
96孔板微量稀释法	100~200 μL /孔	约120 μg (重复3次)	约60 L发酵液	10~40 min
微流控芯片法	~2 nL/通道	8 ng(重复60次)	约0.06 L发酵液	<5 min
差异倍数	100倍	15 000倍	100倍	2~8倍

讨 论

一、固定浓度策略对微量筛选的重新定义

与常规的MBIC测定不同,本研究在初筛阶段并未追求量效关系的完整性,而是通过设定200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这一固定浓度阈值,将复杂的药敏测试转化为高效的有效/无效二元判定。该策略的合理性主要体现在3个方面。

首先,与经长期优化、通常可在极低浓度下起效的临床抗生素不同,天然产物来源的先导化合物在早期筛选阶段往往尚未经过系统药效优化,其活性窗口通常更高^[32]。若初筛浓度设定过低,容易遗漏具有中等活性但具有后续结构优化潜力的苗头化合物;而将筛选阈值设定为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,则可在有限样品条件下提高命中率,使真实活性化合物能够产生可检测信号,同时避免将整体效力过低、缺乏进一步研究价值的样本纳入后续验证。

其次,天然产物普遍存在一定疏水性,水相体系中的溶解度有限,通常需要借助DMSO等有机溶剂助溶。若测试浓度设置过高,往往需要同步提高助溶剂比例,从而增加溶剂本身干扰细菌生长和生物膜状态的风险^[33]。本研究将工作浓度控制在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并将DMSO终浓度严格控制在0.1%以下,从而在保证化合物充分溶解的同时,有效避免因助溶剂毒性导致的假阳性结果。

再次,天然产物在过高浓度下可能通过非特异性膜扰动、蛋白沉淀或其他广泛物理化学作用产生表观抑菌效应,而不一定代表其具有明确的特异性作用机制^[34]。将初筛浓度统一设定为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,有助于在筛选灵敏度与结果特异性之间取得平衡,减少高浓度背景下的非特异性噪声,从而更有利于锁定真正具有后续研究价值的先导化合物骨架。

结合本研究建立的双标锚定体系,即以0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 环丙沙星作为效力上限、以1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氢氧化钙作为效力下限,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能够较好覆盖强效、中效和弱效化合物的区分需求。因此,该固定浓度并非任意设定,而是在平台动态范围、样品稀缺现实条件及早期命中筛选目标之间取得平衡

后的实用性选择。在样品消耗方面,本研究采用固定浓度初筛,减少了设置多个浓度梯度所需的样品用量。在本研究设定的比较条件下,单个化合物的样品消耗量为8 ng,低于96孔板微量稀释法完成一次MIC测定的用量(表2)。这一低消耗特点有利于对分离所得量较少的天然产物开展初步活性评价。不过,固定浓度初筛与完整MIC测定所提供的信息不同,样品消耗差异应结合各自的检测任务理解。

二、可视化定性分析的准确性与优势

结晶紫染色法、细胞活性检测法{2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide, XTT}等传统方法在生物膜研究中应用广泛,适用于常规生物膜形成量评价、群体水平代谢活性检测以及不同处理条件下的定量比较,因而仍是标准化实验体系中的重要工具。相比之下,本研究所建立的微流控筛选平台更适用于样品量极其有限条件下的快速初筛与动态观察。该平台利用*P. putida*在微流道内受限生长形成连续荧光条带的特征,将药物作用效果转化为可直接读取的剩余荧光线段长度,从而实现对化合物活性的快速定性分流。

本平台在流体剪切力条件下进行培养和药物处理,观察的是微流道内生物膜对化合物的响应;96孔板微量稀释法测得的MIC则反映静态浮游菌体系中完全抑制可见生长的最低浓度。两种方法在实验对象、培养环境及终点定义方面存在差异,生物膜与浮游菌的药物耐受性也可能不同^[35-36]。因此,芯片中的剩余荧光线段长度百分比与MIC不宜进行直接的数值对应,本研究的比较主要用于考察候选化合物的活性判定及相对活性趋势。

在本研究检测的化合物范围内,两种方法呈现的相对活性排序基本一致。其中,大环肽类化合物在芯片中对应最短的剩余荧光线段,在96孔板微量稀释法中亦具有最低的MIC。这些观察为固定浓度下荧光读出用于候选化合物的初步活性分层提供了支持,但尚不能据此认定两种方法的测量结果等效,也不能由单一浓度的筛选结果确定化合物的浓度依赖性。

因此,本平台可作为面向微量天然产物的补充

性筛选工具,在低样品消耗条件下对候选化合物进行初步分流。筛选命中化合物仍需通过后续浓度梯度实验、MIC测定及相应的生物膜定量检测进一步评价其活性。本方法的定位是早期筛选,而非替代传统MIC测定或经典生物膜定量方法。

三、筛选结果的生物学意义

通过该策略,本研究从40种化合物中成功锁定6种活性分子。其中,大环肽类化合物表现出最优异的抗生物膜活性,这与其靶向革兰氏阴性菌外膜外膜 β -桶组装蛋白A(β -barrel assembly machinery protein A, BamA)的独特机制有关^[20-21,37-38]。此外,本研究还发现部分单萜类化合物在高浓度下具有一定的膜破坏作用。这些发现不仅验证了同属交叉筛选策略的有效性,也为后续针对特定骨架(如大环肽)进行结构修饰提供了明确的物质基础。

尽管固定浓度筛选可能漏掉部分在极低浓度下才显效的特殊化合物,但对于旨在快速从海量微量样品中锁定高潜能分子的早期研发阶段,这是一种在通量、消耗与准确性之间取得最佳平衡的务实策略。

本研究针对天然产物挖掘中样品稀缺的共性难题,成功构建了一种基于微流控芯片的微量化、可视化、高通量筛选平台。通过确立200 $\mu\text{g/mL}$ 固定浓度定性筛选的核心策略,本研究实现了以下突破:

1. 方法学创新:将传统的浓度梯度定量转化为固定阈值定性,结合荧光线段长度分析,建立了有效/无效的快速二分类评价体系。

2. 极致的样品节约:相比传统96孔板法,该平台将单化合物筛选消耗量降低至原来的1/15 000(仅需8 ng),极大拓展了微量次级代谢产物的筛选边界。

3. 活性化合物发现:从40种黏细菌及植物来源的代谢产物中成功筛选出6种具有显著抗*P. putida*生物膜活性的先导化合物,特别是大环肽类分子的发现,为开发治疗难治性根管感染的新型药物提供了重要线索。

综上所述,该微流控筛选平台及配套的定性快速策略,为解决天然产物与抗耐药菌药物研发中的瓶颈问题提供了强有力的技术支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 强文娟:酝酿和设计实验、实施研究、起草文章、统计分析;孙懿格:实施研究、采集数据、分析数据;侯铁舟:对文章的知识性内容作批评性审阅、研究资源提供、研究课题指导;强乐:对文章的知识性内容作批评性审阅、研究经费、指导、支持性贡献

参 考 文 献

[1] Ricucci D, Siqueira Jr J F. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and

histopathologic findings[J]. J Endod, 2010, 36(8): 1277-1288. DOI: 10.1016/j.joen.2010.04.007.

[2] Alghamdi F, Shakir M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review[J]. Cureus, 2020, 12(3): e7257. DOI: 10.7759/cureus.7257.

[3] Love R M. *Enterococcus faecalis*: A mechanism for its role in Endodontic failure[J]. Int Endod J, 2001, 34(5): 399-405. DOI: 10.1046/j.1365-2591.2001.00437.x.

[4] Rôças I N, Siqueira J F, Santos K R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases[J]. J Endod, 2004, 30(5): 315-320. DOI: 10.1097/00004770-200405000-00004.

[5] Murad C F, Sassone L M, Faveri M, et al. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization[J]. J Endod, 2014, 40(7): 899-906. DOI: 10.1016/j.joen.2014.02.010.

[6] Patten C L, Glick B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 3795-3801. DOI: 10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.

[7] Ausaf N, Saleen H, Nawab R, et al. Comparative efficacy of trichoderma harzianum and *Pseudomonas putida* in mitigating verticillium wilt of brassica napus[J]. J Phytopathol, 2025, 173(2): e70045. DOI: 10.1111/jph.70045.

[8] Ordinala-Zapata R, Costalonga M, Nixdorf D, et al. Taxonomic abundance in primary and secondary root canal infections[J]. Int Endod J, 2023, 56(2): 278-288. DOI: 10.1111/iej.13864.

[9] Andrei C, Zanfirescu A, Ormeneanu V P, et al. Evaluating the efficacy of secondary metabolites in antibiotic-induced dysbiosis: A narrative review of preclinical studies[J]. Antibiotics (Basel), 2025, 14(2): 138. DOI: 10.3390/antibiotics14020138.

[10] Nagraj A K, Shukla M, Kulkarni M, et al. Reversal of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by camelid single domain antibody fragment(VHH) against the C4-dicarboxylate transporter[J]. J Antibiot (Tokyo), 2024, 77(9): 612-626. DOI: 10.1038/s41429-024-00748-w.

[11] Paunova - Krasteva T, Dimitrova P D, Damyanova T, et al. Interference of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by different extracts from inula species[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2025, 18(12): 1824. DOI: 10.3390/ph18121824.

[12] Mohammed Aggad F Z, Ilias F, Elghali F, et al. Evaluation of antibacterial activity in some algerian essential oils and selection of *Thymus vulgaris* as a potential biofilm and quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chem Biodivers, 2025, 22(5): e202402691. DOI: 10.1002/cbdv.202402691.

[13] Al-Maddboly L A, El-Salam M A, Bastos J K, et al. Anti-biofilm and anti-quorum sensing activities of galloylquinic acid against clinical isolates of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in open wound infection: *In vitro* and *in vivo* efficacy studies[J]. BMC Microbiol, 2025, 25(1): 206. DOI: 10.1186/s12866-024-03712-8.

[14] Dinglasan J L N, Otani H, Doering D T, et al. Microbial secondary

- metabolites: Advancements to accelerate discovery towards application[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2025, 23(6): 338-354. DOI: 10.1038/s41579-024-01141-y.
- [15] Singh B P, Rateb M E, Rodriguez-Couto S, et al. Editorial: Microbial secondary metabolites: Recent developments and technological challenges [J]. *Front Microbiol*, 2019 (10): 914. DOI:10.3389/fmicb.2019.00914.
- [16] Qiang L, Guo J, Han Y, et al. A novel anti *Candida albicans* drug screening system based on high-throughput microfluidic chips[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 8087. DOI:10.1038/s41598-019-44298-w.
- [17] Franklin F C, Bagdasarian M, Bagdasarian M M, et al. Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWVO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78(12): 7458-7462. DOI: 10.1073/pnas.78.12.7458.
- [18] Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013(41): D666-D675. DOI: 10.1093/nar/gks1119.
- [19] Rong X, Chen W, Huang Q, et al. *Pseudomonas putida* adhesion to goethite: Studied by equilibrium adsorption, SEM, FTIR and ITC[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 80(1): 79-85. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.05.037.
- [20] Imai Y, Meyer K J, Iinishi A, et al. A new antibiotic selectively kills Gram-negative pathogens [J]. *Nature*, 2019, 576(7787): 459-464. DOI: 10.1038/s41586-019-1791-1.
- [21] Susanto F C, Wuisan Z G, Spohn M, et al. Exploring the anti-biofilm effect of darobactin B and colistin in static and dynamic environments [J]. *Microbiol Spectr*, 2026, 14(2): e0286825. DOI: 10.1128/spectrum.02868-25.
- [22] Shariati A, Noei M, Askarinia M, et al. Inhibitory effect of natural compounds on quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa*: A helpful promise for managing biofilm community [J]. *Front Pharmacol*, 2024(15): 1350391. DOI: 10.3389/fphar.2024.1350391.
- [23] Garcia-Lara B, Saucedo-Mora M A, Roldan-Sanchez J A, et al. Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 61(3): 299-305. DOI: 10.1111/lam.12456.
- [24] Liu Q, Tang Y, Jiang S, et al. Mechanisms of action of berberine hydrochloride in planktonic cells and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microb Pathog*, 2024 (193): 106774. DOI: 10.1016/j.micpath.2024.106774.
- [25] Nostro A, Papalia T. Antimicrobial activity of carvacrol: Current progress and future perspectives [J]. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2012, 7(1): 28-35. DOI: 10.2174/157489112799829684.
- [26] Soumya E, Saad I K, Hassan L, et al. Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2011, 5(20): 3229-3232. DOI: 10.5897/AJMR11.275.
- [27] Burt S A, Ojo-Fakunle V T A, Woertman J, et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93414. DOI: 10.1371/journal.pone.0093414.
- [28] Liu T, Kang J, Liu L. Thymol as a critical component of *Thymus vulgaris* L. essential oil combats *Pseudomonas aeruginosa* by intercalating DNA and inactivating biofilm [J]. *LWT*, 2021 (136): 110354. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110354.
- [29] Al-Rabia M W, Asfour H Z, Alhakamy N A, et al. Thymoquinone is a natural antibiofilm and pathogenicity attenuating agent in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024 (14): 1382289. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1382289.
- [30] Guo F, Chen Q, Liang Q, et al. Antimicrobial activity and proposed action mechanism of linalool against *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Front Microbiol*, 2021 (12): 562094. DOI: 10.3389/fmicb.2021.562094.
- [31] Park S N, Lim Y K, Freire M O, et al. Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria [J]. *Anaerobe*, 2012, 18(3): 369-372. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.001.
- [32] Gonzalez-Pastor R, Carrera-Pacheco S E, Zuniga-Miranda J, et al. Current landscape of methods to evaluate antimicrobial activity of natural extracts [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1068. DOI: 10.3390/molecules28031068.
- [33] Summer K, Browne J, Hollanders M, et al. Out of control: The need for standardised solvent approaches and data reporting in antibiofilm assays incorporating dimethyl-sulfoxide (DMSO) [J]. *Biofilm*, 2022(4): 100081. DOI: 10.1016/j.biofilm.2022.100081.
- [34] Tran-Nguyen V K, Junaid M, Simeon S, et al. A practical guide to machine-learning scoring for structure-based virtual screening [J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(11): 3460-3511. DOI: 10.1038/s41596-023-00885-w.
- [35] Nahum Y, Gross N, Cerrone A, et al. Effect of biofilm physical characteristics on their susceptibility to antibiotics: Impacts of low-frequency ultrasound [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2024, 10(1): 70. DOI: 10.1038/s41522-024-00544-2.
- [36] Nguyen A V, Shourabi A Y, Yaghoobi M, et al. A high-throughput integrated biofilm-on-a-chip platform for the investigation of combinatory physicochemical responses to chemical and fluid shear stress [J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0272294. DOI: 10.1371/journal.pone.0272294.
- [37] Dutta A, Sharma P, Dass D, et al. Exploring the darobactin class of antibiotics: A comprehensive review from discovery to recent advancements [J]. *ACS Infect Dis*, 2024, 10(8): 2584-2599. DOI: 10.1021/acscinfdis.4c00412.
- [38] Carevic T, Kolarevic S, Kolarevic M K, et al. Citrus flavonoids diosmin, myricetin and neohesperidin as inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence from antibiofilm, gene expression and *in vivo* analysis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024 (181): 117642. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.117642.

(收稿日期: 2026-03-24)

(本文编辑: 王嫚)