

# 利用糖芯片技术快速检测沙门氏菌

张蓓蕾<sup>1</sup>, 王晓丽<sup>1</sup>, 王雪玉<sup>1</sup>, 胡静<sup>2</sup>, 尹健<sup>1</sup>

(1. 江南大学生物工程学院糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214122)

(2. 江南大学无锡医学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 为了探讨糖芯片在沙门氏菌检测上的应用, 以沙门氏菌 ATCC31685 为主要研究对象, 制作不同类型的糖芯片用于优化糖芯片检测条件; 在优化条件的基础上, 降低糖浓度或细菌浓度用于确定糖芯片检测限值; 继而系统地研究了糖芯片在沙门氏菌和凝集素 FimH 拮抗剂筛选上的应用, 并探究糖芯片对菌株的破坏性。由实验现象可知, 沙门氏菌可与甘露糖化合物修饰的糖芯片结合, 其中, 以 Man-1 与 NHS 玻片所构建的糖芯片效果最优, 并且两种不同的沙门氏菌 (ATCC31685 和 ATCC9184) 与糖芯片的结合能力不同, 因此糖芯片可作为沙门氏菌的一种快速检测手段; 在糖浓度为 313 mmol/L 或细菌浓度  $10^6$  个/mL 时荧光信号接近背景值, 并且糖芯片检测后对菌株无破坏性, 可继续其他检测项目; 此外, 实验结果表明糖芯片可作为 FimH 蛋白拮抗剂的筛选工具。

**关键词:** 沙门氏菌; 糖芯片; 甘露糖; FimH 蛋白; 拮抗剂

文章编号: 1673-9078(2017)3-323-327

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.048

## Rapid Detection of *Salmonella* Using Carbohydrate Microarrays

ZHANG Bei-Lei<sup>1</sup>, WANG Xiao-Li<sup>1</sup>, WANG Xue-Yu<sup>1</sup>, HU Jing<sup>2</sup>, YIN Jian<sup>1</sup>

(1.Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (2.Wuxi Medical School Jiangnan University, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The applicability of carbohydrate microarrays for *Salmonella* detection was investigated, using *Salmonella* ATCC31685 as the primary test subject. Different types of carbohydrate microarrays were first tested to optimize the detection conditions. Then, using the optimized conditions, decreased carbohydrate concentrations or bacterial concentrations were used to determine the microarray's limit of detection. The carbohydrate microarrays were tested for their destructiveness of bacterial strains as well as their ability to screen for antagonists of *Salmonella* lectin FimH. The results indicated that *Salmonella* bound to modified mannose compounds in the carbohydrate microarrays, among which the microarray chips with Man-1 and NHS were the most optimal. In addition, the microarray-binding abilities of two *Salmonella* strains (ATCC31685 and ATCC9184) were found to be different. Therefore, carbohydrate microarrays can serve as a rapid procedure for detecting *Salmonella*. At a carbohydrate concentration of 313 mmol/L or a cell concentration of  $10^6$ /mL, the fluorescent signal approaches a background value. The carbohydrate microarray detection of *Salmonella* is non-destructive and can be used continuously. In addition, these microarrays can be used as tools for screening FimH protein antagonists.

**Key words:** *Salmonella*; carbohydrate microarrays; mannose; FimH; antagonist

沙门氏菌作为最常见的食源性致病微生物之一, 常引起暴发性食物中毒, 危害人类身体健康甚至造成死亡。据美国疾病预防控制中心统计, 受沙门氏菌的感染的人群占食物中毒人群的 10% 以上, 居食物细菌感染疾病缘由首位<sup>[1]</sup>。随着食品安全日渐受到重视,

收稿日期: 2016-02-22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20150140, BK20140154); 江南大学公共卫生中心重点项目 (JUPH201502)

作者简介: 张蓓蕾 (1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖芯片检测沙门氏菌

通讯作者: 胡静 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 糖生物学; 尹健 (1979-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向: 糖生物工程

研究人员致力于发展沙门氏菌的检测手段<sup>[2]</sup>, 现今对沙门氏菌的检测方法由传统的培养方法发展到免疫学方法与分子生物学方法, 逐步解决检测程序中过程繁琐、检出率差及检测时间长等问题, 由于每一种方法依旧存在不同程度的缺陷, 仍旧迫切需要开发操作简单与灵敏度高的检测方法和技术<sup>[3]</sup>。

生物芯片是推动现代生物学和医学发展的一个重要研究领域, 继基因芯片、蛋白质芯片之后新兴的糖芯片作为第三代高通量、大规模的检测技术, 是研究功能性糖的重要分析技术, 并且可以与多种分析手段联用, 促进糖领域的发展。糖芯片技术提供了一个理想的平台在抗体特异性分析、凝集素的筛选、细菌病

毒识别以及酶特性分析等方面<sup>[4]</sup>。而现今,该技术已经成为研究糖-生物大分子相互作用不可或缺的手段,为探究在药物开发和临床疾病的诊断领域的应用。

Disney 等人发现,用多种单糖衍生物所制备的糖芯片可用于大肠杆菌<sup>[5]</sup> (*Escherichia coli*) 的检测,不同的糖类物质与菌株结合效果不同。其中,未发生 FimH 蛋白突变的大肠杆菌菌株 ORN178 相较于突变菌株 ORN209,可与甘露糖芯片发生明显的特异性吸附作用,该研究表明糖芯片可用于检测以及分离亲和力不同的大肠杆菌菌株。在本文中,利用凝集素 FimH 蛋白能与甘露糖特异性结合<sup>[6]</sup>的特性以及不同化学基团对糖-蛋白质相互作用的不同影响,设计不同甘露糖衍生物,且利用共价结合的方法与不同玻片构建糖芯片,研究沙门氏菌与糖芯片之间的结合效果,以探究糖芯片在沙门氏菌检测以及拮抗剂筛选等方面的重要作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 药品与试剂

#### 1.1.1 实验药品

D-甘露糖 (D-Mannose, 分析纯) 购自国药集团化学试剂有限公司; 丙基三甲基硅烷 (GPTS, 99%) 和氨丙基三氧基硅烷 (ATPS, 98%) 购于北京百灵威科技有限公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺 (AR) 购于北京百灵威科技有限公司; *N,N'*-二环己基碳二亚胺 (AR) 购于北京百灵威科技有限公司; 二羟甲基丙酸 (DMPA, 99%) 购于阿达玛斯科技有限公司; 溴乙醇 (97%) 购于北京百灵威科技有限公司; 分子筛购于天津一方科技有限公司; 二甲基甲酰胺 (AR) 购于北京百灵威科技有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器

数显调速多用振荡器 HY-2A 购于常州华奥仪器制造有限公司; 回旋式振荡器 HY-5A 购于常州华奥仪器制造有限公司; 台式高速冷冻离心机 CT15RE 购于 Hitachi Koki Global; 恒温恒湿箱 CTHI-100B 购于上海施都凯仪器设备有限公司; 迷你离心机 Force SpinPrep 购于美国 SVP; 超声清洗机 SB-3002D 购于宁波新芝生物科技股份有限公司; 振荡器 Vortex SHAKER 购于德国 IKA 公司; 抽干真空泵 VACUUM PUMP RZ6 购于 VACUUBRAND; 磁力搅拌器 RH basic 2 购于德国 IKA 公司; 水纯化系统 Direct-Q5W 购于苏州赛恩斯仪器有限公司; 糖芯片的构建由 Arrayjet 生物点样仪完成; 荧光强度由生物芯片扫描仪 GenePix 4200AM 扫描, 设置光电倍增管 PMT 为 50%, 激光强度 60%,

仪器购于美谷分子仪器有限公司; 核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>HNMR) 由德国 Bruker 公司 AVANCE 400M 型核磁共振仪测定。

### 1.2 沙门氏菌菌株

鸡沙门氏菌 (*Salmonella gallinarum*, ATCC9184) 和羊流产沙门氏菌 (*Salmonella abortusovis*, ATCC 31685), 购于美国菌种保藏中心。两种沙门氏菌对甘露糖的结合能力不同, 其中 ATCC9184 是一种对甘露糖结合不活泼的菌株, 而 ATCC31685 则是高特异性结合甘露糖的沙门氏菌<sup>[7]</sup>。

细菌培养: 将沙门氏菌 ATCC9184 菌株和 ATCC31685 菌株分别接种到培养液 LB 培养基上, 在 37 °C, 220 r/min 条件下摇至吸光度(OD<sub>660</sub>) 约为 1.0 (10<sup>8</sup> cells/mL)。

### 1.3 糖芯片的制备

#### 1.3.1 玻片的制备及修饰

如图 1 所示, 本实验制备了两种不同的玻片, 即环氧化玻片 (a) 以及用四乙二醇琥珀酰基二琥珀酸 (TGDD) 修饰的氨基化玻片 (b) 和 (c) 图为 TGDD 的合成。玻片的制备及修饰方法参照已发表文献<sup>[8]</sup>。

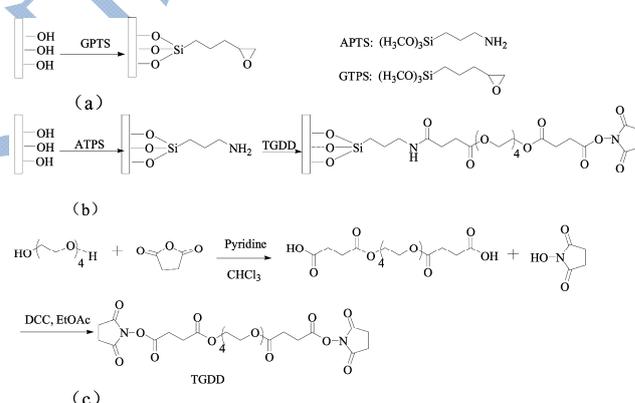


图 1 两种玻片的修饰以及 TGDD 的合成

Fig.1 Modification and synthesis of TGDD

#### 1.3.2 糖芯片的制备

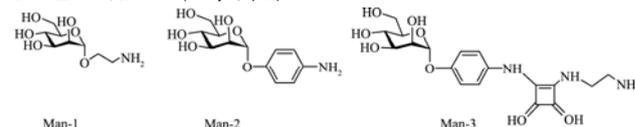


图 2 三种甘露糖化合物

Fig.2 Chemical structures of three kinds of mannoside compounds

以全乙酰化甘露糖为原料, 合成了三种不同结构修饰的甘露糖衍生物 (图 2), 溶解于 25% 的 DMF (二甲基甲酰胺) 水溶液中, 配制成浓度为 20 mmol/L 的溶液, 利用自动点样仪在点样于玻片, 湿度 70% 下室温

孵育过夜, 在温度 60 °C 下固定 3 h, 冷却至室温备用后用 1×PBS (Phosphate Buffered Saline, 磷酸盐缓冲液) 清洗芯片 2 次 (5 min/次), 离心甩干。将糖芯片置于芯片杂交盒中, 加入封闭缓冲液 (含 1% BSA, 0.1% Tween-20 的 1×PBS), 然后置于放入杂交箱中进行封闭。封闭结束后的糖芯片依次使用 1×PBST (含 0.2% Tween-20 的 1×PBS) 和 1×PBS 清洗 2 次 (5 min/次), 甩干后储存在真空干燥器中备用。

上文所用甘露糖衍生物如下图所示: Man-1 为 1-氨基乙基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖葡萄糖苷; Man-2 为 1-对氨基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖葡萄糖苷; p-[ (N-2-乙二胺-2, 3-二环氧丁基-1-烯基) 氨基]- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖葡萄糖苷; 三种化合物的合成参照已发表文献<sup>[9,10]</sup>。

#### 1.4 糖芯片与沙门氏菌杂交

取等量沙门氏菌菌液离心, 弃去上清液, 使用等量的 PBS 缓冲液 (pH 7.2) 清洗两遍, 重悬, 离心, 得到细胞沉淀物。用 SYTO63 红色荧光核酸染料对两种沙门氏菌细胞进行染色。孵化之后, 离心分离细胞悬液, 用 1 mL 1×PBS 缓冲液冲洗 2 遍, 甩干。将染色后的细胞沉淀物重悬于杂交液 (含有 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 及盐酸羟胺) 中, 然后将糖芯片和杂交液置于杂交盒中, 于室温下进行杂交孵化 1 h。将杂交后的玻片取出, 先后用 1×PBST 和 1×PBS 缓冲液清洗 2 次 (5 min/次), 再用超纯水清洗 1 次 (5 min/次), 以洗去未杂交上的细胞。最后, 载片离心干燥后通过荧光扫描仪扫描。

#### 1.5 从芯片上收集细菌和抗生素试验

染色后的沙门氏菌经过芯片杂交后, 用 PBS 缓冲液洗去未杂交的细菌, 离心甩干芯片后进行扫描。在甘露糖位点和没有甘露糖位点进行取样后划线接种到 LB 平板上, 置于 37 °C 的摇床上培养过夜。在培养之后, 观察生长情况, 在长有菌落的位置取样, 转接到 LB 液态培养基, 培养至吸光度约为 1 时, 稀释细菌菌液吸光度约为 0.001, 在 96 孔板每一个孔点中加入 100  $\mu$ L 菌液和 100  $\mu$ L 稀释后的抗生素, 以不含细菌的 LB 液态培养基和抗生素溶液作为对照组。培养 24 h 后, 检测每一个孔点中的吸光度, 绘制曲线图。

## 2 结果与讨论

### 2.1 糖芯片优化实验

本实验选用环氧化玻片和 NHS 玻片分别与 3 种修饰的甘露糖化合物制备糖芯片, 然后与 ATCC31685

菌株杂交, 用芯片扫描仪检测荧光信号强度, 筛选出最优组合。实验结果如图 3 所示: (a) 图为氨基玻片修饰后的 NHS 玻片: 1~4 列为 Man-1, 5~8 列为 Man-2, 9~12 列为 Man-3, 每孔直径约为 180  $\mu$ m; 三种甘露糖化合物均可检测到不同强度的荧光信号, 其中 Man-1 的荧光值为 3100, Man-3 为 1830, Man-2 为 1050; 而环氧化玻片 (b) 与三种甘露糖化合物的结合效果均不如 NHS 玻片 (点样顺序一致), 其中 Man-1 为 850, Man-3 为 450, Man-2 荧光信号检测接近背景值, 难以捕捉; 因此, 后续试验选用 NHS 玻片与 Man-1 所制成的糖芯片。

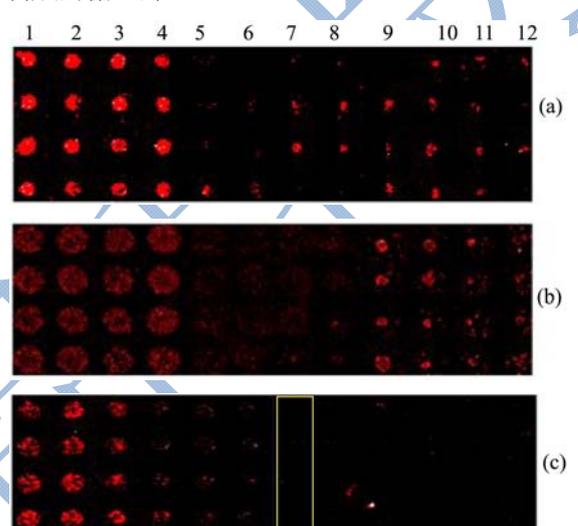


图3 糖芯片的优化

Fig.3 Optimization of carbohydrate microarrays

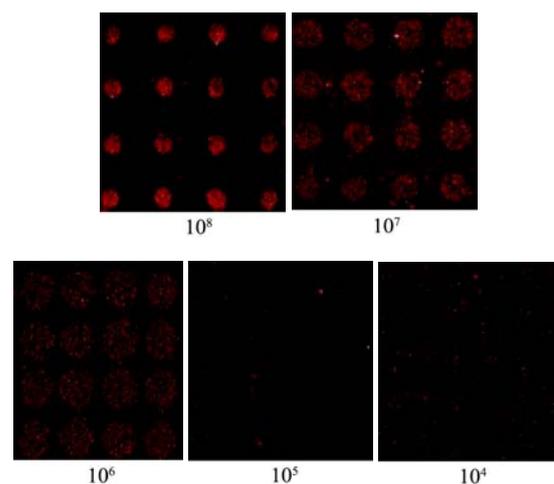


图4 ATCC31685 菌株与芯片杂交的最低细菌检测浓度

Fig.4 Determination of the minimum concentration of strain ATCC31685 hybridized to the microarray chip

选用 12 个浓度范围在 10  $\mu$ mol/L~20 mmol/L 的 Man-1 糖溶液以研究糖浓度对检测的荧光信号的影响, 其中, 1~12 列糖浓度分别为 20、10、5、2.5 和 1.25 mmol/L 和 625、313、156、78、39、20 和 10  $\mu$ mol/L。

其中, 313  $\mu\text{mol/L}$  (图 3c 中黄色框所标示处) 时, 仍可检测到高于背景值的荧光信号; 而继续降低糖结果如图 3c 显示, 在沙门氏菌的菌浓度为  $10^9$  cells/mL 时, 检测到的荧光信号随着糖浓度的升高而升高, 在 10 mmol/L 时, 荧光强度几乎达到最大值, 这表明在糖芯片中固定的甘露糖已经饱和, 即使增加糖浓度, 荧光强度也不再增加。后续实验以 10 mmol/L Man-1 糖溶液制作糖芯片与不同浓度的细菌溶液杂交, 结果如图 4 所示, 所检测到的荧光信号随着细菌浓度降低而降低: 当 ATCC31685 菌株浓度大于或等于  $10^6$  cells/mL 时, 仍可检测到荧光信号; 继续降低菌株浓度后, 荧光信号难以检测, 所以可知  $10^6$  cells/mL 为本实验糖芯片检测沙门氏菌的最低细菌检测浓度。

以上结果表明, 糖芯片技术可应用于沙门氏菌检测, 并且在低糖浓度下 ( $313 \mu\text{mol/L}$ ) 可检测到沙门氏菌, 可节约糖原料的消耗。另外, 早期研究中糖芯片的构建为手动构建, 由于孔径大, 同一玻片上只能点 200 多个的样, 因此这类糖芯片大多只能称为“多阵列” (multiarray), 与“微阵列” (microarray) 还有较大差距。而本实验中自动点样仪所构建的糖芯片, 每一个所构建的点样孔径为  $180\sim 200 \mu\text{m}$ , 可大大增加点阵密度, 即可在同一个玻片上可以点成千上万个样, 实现了真正的高通量。因此, 通过糖芯片技术可建立更多数量的平行实验从而检测大量样品, 和传统的细菌检测方法相比, 节省了大量时间和原料。

### 2.2 糖芯片和沙门氏菌的结合特异性

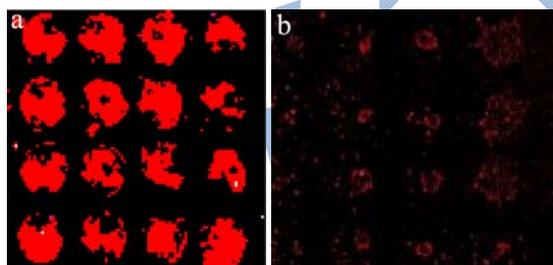


图 5 不同沙门氏菌对糖芯片的粘附

Fig.5 Adhesion of different *Salmonella* strains to the carbohydrate microarrays

注: a 表示 ATCC31685; b 表示 ATCC9184。

为研究糖芯片和沙门氏菌的结合特异性, 选取两种对甘露糖具有不同亲和力的沙门氏菌 ATCC9184 和 ATCC31685, 分别与 NHS 玻片制备的 Man-1 甘露糖糖芯片杂交, 然后进行荧光检测。实验结果如图 5 所示, 在两种细菌浓度都为  $10^9$  cells/mL 时, a 图为 ATCC31685 菌株, 平均荧光信号约为 3000; b 图为 ATCC9184 菌株, 平均荧光信号接近于背景值, 平均

荧光值约为 230; 每孔直径约为  $200 \mu\text{m}$ ; 因此, ATCC 9184 菌株和糖芯片杂交效果远不如 ATCC31685。

由结果可知, 糖芯片也可筛选不同的菌株, 这是由于病原体的黏附大多与糖类物质有关<sup>[11]</sup>, 比如粘液放线菌 (*Actinomyces viscosus*) 对 D-半乳糖敏感, 而支原体 (*Mycoplasma*) 则对 N-乙酰神经氨酸敏感等, 因此可根据糖类物质与细菌菌株之间的亲和力的不同制作糖芯片, 用于快速筛选和鉴定细菌, 促进临床检测技术的发展。

### 2.3 研究糖芯片技术在拮抗剂筛选上的应用

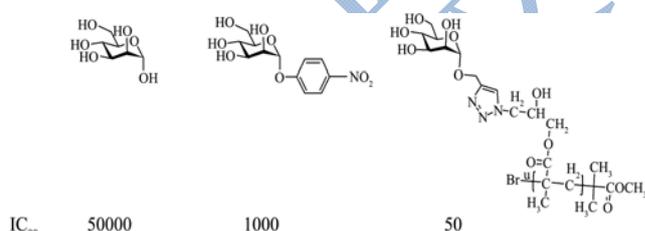


图 6 糖芯片上拮抗剂的研究

Fig.6 Adhesion of different *Salmonella* strains to the carbohydrate microarrays

有关文献表明<sup>[11]</sup>, 凝集素 FimH 与肠道细菌黏附上皮细胞相关, 可引起尿路感染等疾病; 多种甘露糖衍生物和甘露糖 (在微摩尔条件下) 可以阻断细菌黏附 (FimH 蛋白介导), 因而可作为相关疾病的治疗剂。为研究糖芯片技术在拮抗剂筛选上的应用, 本实验选取三种已经报导的拮抗剂 (可有效抑制凝集素 FimH 作用) 加入芯片杂交溶液中, 与 ATCC31685 细胞孵化。所选拮抗剂分别为 D-甘露糖<sup>[12]</sup>、p-硝基苯基- $\alpha$ -D-吡喃甘露糖苷 (p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannoside, p-NPMan)<sup>[13]</sup> 和一种共价键连接 D-甘露糖的双亲性聚合物分子 PGMA-Mannose (PGMA: Polyglycidyl methacrylate, 聚甲基丙烯酸缩水甘油酯)<sup>[14]</sup>。

实验结果显示, 甘露糖多聚物 ( $50 \mu\text{mol/L}$ ) 抑制细菌的效果明显优于比 p-NPMan ( $1000 \mu\text{mol/L}$ ), 而 p-NPMan ( $1000 \mu\text{mol/L}$ ) 又优于甘露糖 ( $50000 \mu\text{mol/L}$ )。实验结果与之前报道一致, p-NPMan 相比于甘露糖是一种更好的拮抗剂, 它可与生物大分子形成稳定交互, 且带芳基、杂芳基或杂环基的甘露糖化合物已被证明可作为预防或治炎性肠病的拮抗剂用于抑制大肠杆菌引起的尿路感染<sup>[13]</sup>; 而 PGMA-Mannose 与沙门氏菌的结合远远强于单糖与沙门氏菌的结合, 可能由于沙门氏菌表面存在多个甘露糖结合凝集素, 可进行多价结合, 有利于提高糖配体对蛋白受体的结合力和选择性; 但也有报道表明并不是糖配体越多, 结合力越强, 其中涉及能量变化以及空间位阻效应, 需

继续探讨。

## 2.4 糖芯片技术对沙门氏菌菌株的破坏性

为了研究糖芯片检测技术对沙门氏菌菌株的破坏性,将 ATCC31685 均质溶液与糖芯片孵化后,洗去未绑定细胞,在点样部位取样接种,经富集培养后用于抗生素敏感性检测。结果如图 7a 所示,经培养后的 LB 平板上,由甘露糖位置取样划线部分有多个菌落生长,而在无甘露糖位置取样划线部分基本无菌落生长;图 7b 所示,是将 LB 平板上的菌落经传代后,仍可用抗生素敏感性检测;该结果表明糖芯片不仅可用于病原体检测,而且在检测后对病原体无明显破坏性,并可在一定时间内保持其生物活性用于其它后续检测,而现今的其它方法如噬菌体技术因对病原体造成破坏而不具备这一功能。

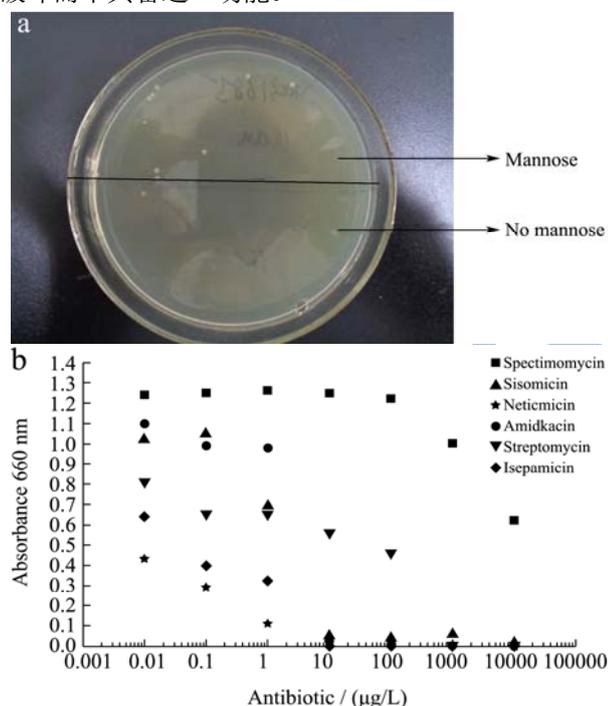


图 7 在糖芯片上收集沙门氏菌进行培养以及进行抗菌敏感性实验

Fig.7 Growth of *Salmonella* harvested from a carbohydrate array and testing of its antibacterial susceptibility

## 3 总结

3.1 本研究首先通过不同的玻片和甘露糖化合物构建多种糖芯片优化检测条件,其中以 NHS 和 Man-1 所构建的糖芯片为最优;之后,改变甘露糖化合物浓度以及细菌浓度优化糖芯片检测条件,本实验中 313 μmol/L 糖浓度为糖芯片技术检测的最低糖浓度限值以及  $10^6$  cells/mL 细菌浓度为最低细菌检测浓度。

3.2 本文也考察了糖芯片对不同沙门氏菌菌株以及

FimH 拮抗剂的筛选能力,结果表明,糖芯片技术可区分不同的菌株,也可作为凝集素 FimH 拮抗剂的筛选技术;而且经糖芯片检测的沙门氏菌仍可以在平板上生长以及进行抗菌敏感性测试可知糖芯片不仅仅是一种无破坏性检测手段,也可以在检测过程中保持沙门氏菌的活性,用于其他相关检测项目。

3.3 因此,本研究糖芯片技术可作为沙门氏菌的检测方法,但现今仍存在多个难题,沙门氏菌与糖类物质之间的特异性相互作用仍需要进一步研究,如何制备更为高效的糖芯片(基质的选择以及化学修饰)和增强检测信号也是实验需要解决的难题之一。在后续实验中将对糖芯片技术以及沙门氏菌进一步研究,逐步解决所面临的各种难题,为传染性疾病和食品安全等监督方面提供一种高速有效的检测手段。

## 参考文献

- [1] Botelho-Nevers E, Gautret P. Outbreaks associated to large open air festivals, including music festivals, 1980 to 2012 [J]. *Eurosurveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles=European communicable disease bulletin*, 2013, 18(11): 20426-20426
- [2] Wang R, Ni Y, Xu Y, et al. Immuno-capture and in situ detection of *Salmonella Typhimurium* on a novel microfluidic chip [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 853(1): 710-717
- [3] 孙园园,赵鹏,刘骏,等.沙门氏菌检测方法研究进展[J].*中国牧兽医*,2011,38(1):218-221  
SUN Yuan-yuan, ZHAO Peng, LIU Jun, et al. Research progress of detection methods of *Salmonella* [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38(1): 218-221
- [4] Park S, Gildersleeve J C, Blixt O, et al. Carbohydrate microarray [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(10): 4310-4326
- [5] Disney M D, Seeberger P H. The use of carbohydrate microarrays to study carbohydrate-cell interactions and to detect pathogens [J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 11(12): 1701-1707
- [6] Grzymajlo K. FimH adhesin from Host Unrestricted *Salmonella Enteritidis* binds to different glycoprotein ligands expressed by enterocytes from sheep, pig and cattle than FimH adhesins from host restricted *Salmonella Abortusovis*, *Salmonella Choleraesuis* and *Salmonella Dublin* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 166(3-4): 550-557
- [7] Runkel S, Wells H C, Rowley G. Living with stress: A lesson from the enteric pathogen *Salmonella Enterica* [J]. *Advances*

- in Applied Microbiology, 2013, 83(2): 87-144
- [8] 南刚.用于制备糖芯片新方法的研究[D].西安:西北大学, 2008
- NAN Gang. To study a new method for preparation of carbohydrate array [D]. Xi'an: Northwest University, 2008
- [9] Pavao MSG. Glycans in diseases and therapeutics [M]. New York: Springer, 2011
- [10] Chalopin T, Brissonnet Y, Sivignon A, et al. Inhibition profile of mono- and polyvalent FimH antagonists against 10 different *Escherichia Coli* strains [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2015, 13(46): 11369-11375
- [11] Pang L, Kleeb S, Lemme K, et al. FimH Antagonist: Structure-activity and structure-property relationships for biphenyl  $\alpha$ -D-mannopyranosides [J]. Chem. Med. Chem., 2012, 7(8): 1404-1422
- [12] Sommer R, Hauck D, Varrot A, et al. Cinnamide derivatives of D-Mannose as inhibitors of the bacterial virulence factor LecB from *Pseudomonas Aeruginosa* [J]. Chemistry Open, 2015, 4(6): 756-767
- [13] Darfeuille-Michaud A, Hofman P, Rolhion N. Antagonists for the prevention or treatment of inflammatory bowel disease, and more particularly of Crohn's disease: EP, US8974789 [P]. 2011-10-20
- [14] 汪舒婷,张权,叶舟,等.D-甘露糖修饰聚合物胶束的制备及在靶向药物输送中的应用[J].生物工程学报,2016,32(1): 84-94
- WANG Su-ting, ZHANG Quan, YE Zhou, et al. D-mannose-conjugated polymeric micelles for targeted drug delivery [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2016, 32(1): 84-94