



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101981447 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 23

(21) 申请号 200980111736. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 02. 12

G01N 33/53 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/028, 898 2008. 02. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/033847 2009. 02. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/102824 EN 2009. 08. 20

(71) 申请人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 史蒂芬·B·罗斯科

斯特凡妮·J·莫勒

曼基里·T·克希尔萨加尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 樊卫民

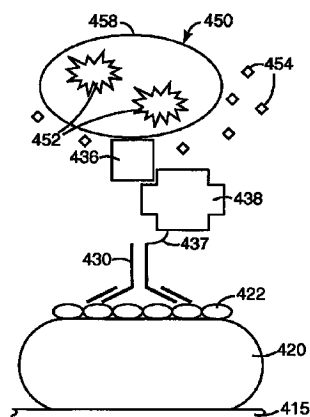
权利要求书 3 页 说明书 27 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用于检测微生物的方法和组合物

(57) 摘要

本发明描述了分析样品中所关注的靶标微生物的方法。具体地讲, 这些方法可用于基于普遍性细胞壁成分如酵母聚糖的存在来检测多种酵母和霉菌微生物。本发明还描述了用脂质体和 / 或培养基分析样品中的真菌微生物的方法。



1. 一种检测靶标微生物或其成分的方法,包括:
提供选择性结合酵母聚糖的识别元件;
使所述识别元件与怀疑含有所述靶标微生物的样品接触;以及
检测所述靶标微生物。
2. 一种检测靶标微生物或其成分的方法,包括:
提供选择性结合酵母聚糖的识别元件;
提供产生能被检测到的信号的信号元件,其中所述信号元件包含连接部分;
使所述识别元件和所述信号元件与怀疑含有所述靶标微生物的样品接触;以及
检测所述能被检测到的信号。
3. 一种检测靶标微生物或其成分的方法,包括:
提供选择性结合酵母聚糖的识别元件;
提供产生能被检测到的信号的信号元件,其中所述识别元件连接到所述信号元件;
使所述识别元件和所述信号元件与怀疑含有所述靶标微生物的样品接触;以及
检测所述能被检测到的信号。
4. 一种检测靶标微生物或其成分的方法,包括:
提供包含脂质双层和产生能被检测到的信号的信号元件的脂质囊泡;
提供选择性结合细胞壁成分的识别元件;
使所述脂质囊泡和所述识别元件与怀疑含有所述靶标微生物的样品在有效引起所述脂质囊泡与如果存在的所述靶标微生物的结合的条件下接触;以及
检测所述能被检测到的信号。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述脂质双层包含至少一种生物素分子。
6. 根据权利要求4或权利要求5所述的方法,其中所述识别元件包含至少一种生物素分子。
7. 根据权利要求4-6中任一项所述的方法,还包括提供生物素结合分子。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括以下步骤:i) 在培养装置中提供营养培养基和 ii) 将所述样品在容许至少一次细胞分裂的条件下进行温育。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括从培养装置移出活微生物的步骤。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括裂解所述样品中的微生物的步骤。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括 i) 提供捕获剂和 ii) 捕获所述靶标微生物或其成分。
12. 根据权利要求2-11中任一项所述的方法,其中所述信号元件包含脂质囊泡、磁性颗粒、聚合物颗粒或金颗粒。
13. 根据权利要求2-11中任一项所述的方法,其中所述信号元件包含多肽。
14. 根据权利要求2-11中任一项所述的方法,其中所述信号元件包含多核苷酸。
15. 根据权利要求2-12中任一项所述的方法,其中所述信号元件包含转化成能被检测到的信号的潜在信号成分。
16. 根据权利要求15所述的方法,还包括以下步骤:i) 提供信号产生元件和 ii) 使所述信号产生元件与所述信号元件接触以将所述潜在信号成分转化成能被检测到的信号。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述信号产生元件是能活化的信号产生元件,

且还包括活化所述能活化的信号产生元件的步骤。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述能活化的信号产生元件包含多肽。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述多肽包含能活化的结构,所述能活化的结构当被活化时能增强所述多肽调节膜的渗透性的能力。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述能活化的结构包含能水解的键。

21. 根据权利要求 18 或权利要求 19 所述的方法,其中所述多肽通过 pH 变化来活化。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括对所述样品中的所述靶标微生物进行计数的步骤。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述能被检测到的信号能通过光学法检测。

24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中光学法检测包括比色测定法检测、荧光测定法检测或发光测定法检测。

25. 根据权利要求 23 或权利要求 24 所述的方法,其中光学法检测包括用仪器进行检测。

26. 一种用于检测靶标微生物的组合物,包含:

选择性结合酵母聚糖的识别元件;和

包含产生能被检测到的信号的颗粒的信号元件。

27. 根据权利要求 26 所述的信号元件,其中所述颗粒包含脂质囊泡。

28. 根据权利要求 26 所述的信号元件,其中所述颗粒包含荧光分子。

29. 根据权利要求 26 所述的信号元件,其中所述颗粒包含磁性颗粒。

30. 根据权利要求 26 所述的信号元件,其中所述颗粒包含聚合物颗粒。

31. 根据权利要求 26 所述的信号元件,其中所述颗粒包含金颗粒。

32. 根据权利要求 26 所述的信号元件,其中所述颗粒包含多肽。

33. 根据权利要求 26 所述的组合物,还包含连接部分。

34. 根据权利要求 33 所述的组合物,其中所述识别元件与所述信号元件连接。

35. 根据权利要求 26-34 中任一项所述的组合物,其中所述信号元件包含转化为能被检测到的信号的潜在信号元件。

36. 根据权利要求 35 所述的信号元件,其中所述潜在信号元件包含酶底物。

37. 根据权利要求 35 所述的信号元件,其中所述信号元件包含多肽。

38. 根据权利要求 37 所述的多肽,其中所述多肽含有酶活性。

39. 根据权利要求 35 所述的组合物,其还包含信号产生元件,其中所述信号产生元件将潜在信号元件转化为能被检测到的信号。

40. 根据权利要求 39 所述的组合物,其中所述信号产生元件是能活化的。

41. 根据权利要求 40 所述的组合物,其中所述能活化的信号产生元件包含多肽。

42. 根据权利要求 41 所述的多肽,其中所述多肽包含能活化的结构,所述能活化的结构当被活化时能增强所述多肽调节膜的渗透性的能力。

43. 根据权利要求 41 或权利要求 42 所述的组合物,其中所述能活化的结构包含能水解的键。

44. 根据权利要求 43 所述的组合物,其中所述能水解的键是酯键或酰胺键。

45. 根据权利要求 41-44 中任一项所述的组合物,其中所述信号产生元件通过 pH 变化来活化。

46. 根据权利要求 26-45 中任一项所述的组合物,还包含捕获剂。

47. 根据权利要求 46 所述的组合物,其中所述捕获剂连接到固相支撑物。

48. 根据权利要求 47 所述的组合物,其中所述固相支撑物选自塑料薄膜、塑料颗粒、金属薄膜、颗粒、膜、水凝胶、纤维素组合物、无纺布物、纤维、微通道。

49. 根据权利要求 46-48 中任一项所述的组合物,其中所述捕获剂或所述识别元件选择性结合酵母聚糖。

50. 根据权利要求 46-48 中任一项所述的组合物,其中所述捕获剂和所述识别元件选择性结合酵母聚糖。

51. 根据权利要求 26-50 中任一项所述的组合物,其中所述识别元件或所述捕获剂包含包括有酵母聚糖结合结构域的多肽。

52. 根据权利要求 51 所述的组合物,其中所述多肽包含选择性结合酵母聚糖的抗体或其衍生的抗原结合片段。

53. 根据权利要求 52 所述的其抗原结合片段,其中所述其抗原结合片段选自 Fab 片段、Fab' 片段、F(ab)₂ 片段、单链 Fv 和 Fv 片段。

54. 根据权利要求 51 所述的多肽,其中所述多肽包含受体。

55. 根据权利要求 54 所述的受体,其中所述受体包含来自 Dectin-1 的碳水化合物识别结构域。

56. 根据权利要求 51 所述的多肽,其中所述多肽结合酵母聚糖的能被 Dectin-1 的碳水化合物识别结构域识别的同一表位。

用于检测微生物的方法和组合物

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 2 月 14 日提交的美国临时申请序列号 61/028,898 的权利,该临时申请以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 真菌微生物(例如酵母和霉菌)在自然界中普遍存在。虽然真菌微生物(例如酵母和霉菌)在一些领域如抗生素或酶的生产中是有用的,但已知它们会造成食物腐败,某些种类还已知会产生毒素或者引起人类或动物感染。

[0004] 真菌微生物包括非常庞大和多样化的一群化能异养微生物。有大约 1500 种酵母菌。大多数酵母菌以单细胞生物体形式存在,通过出芽生殖繁殖。一些种类以多细胞形式存在,还有其他种类通过二分分裂方式繁殖。霉菌包括可形成长长的多细胞菌丝的丝状真菌。霉菌通过形成小孢子来繁殖,这些孢子通常能抵抗多种恶劣环境条件,如极端温度。

[0005] 真菌微生物的存在通常是通过标准的培养技术来检测。将样品放入营养培养基中温育一段时间,以让微生物增殖。温育后,菌落可以肉眼看见,或者可用显微镜检查样品以观察和鉴定微生物。基于生长的培养试验法仍是真菌微生物检测 and 计数的最通用方法。

[0006] 真菌微生物的生长速度各不相同。某些酵母种类可每隔大约 30-40 分钟进行细胞分裂。这些酵母生物体能在约 1-2 天后检测和计数。相比之下,某些霉菌每次细胞分裂需要几个小时。这些霉菌能在约 4-5 天后检测和计数。

[0007] 尽管目前有多种方法供真菌微生物检测和计数,但仍需要更快更灵敏的方法来进行真菌微生物检测和计数。

发明内容

[0008] 本发明涉及检测样品中的酵母和/或霉菌微生物并任选对其进行计数。尽管真菌微生物存在遗传和生化多样性,但本发明方法和组合物能提供对样品中多种酵母和霉菌微生物的简便且同时进行的检测。

[0009] 在一个方面,本发明提供用于检测靶标微生物或其成分的方法。该方法包括提供识别元件和怀疑含有靶标微生物的样品,其中该识别元件选择性结合酵母聚糖。该方法还包括使该样品与该识别元件之间接触并检测该靶标微生物。任选地,该方法还可包括在培养装置中提供营养培养基的步骤和将该样品在容许至少一次细胞分裂的条件下进行温育的步骤。

[0010] 在另一个方面,本发明提供用于检测靶标微生物或其成分的方法。该方法可包括提供选择性结合酵母聚糖的识别元件、产生能被检测到的信号的信号元件和怀疑含有靶标微生物的样品。信号元件可包含连接部分。该方法还包括使该样品与该识别元件和该信号元件之间接触并检测该能被检测到的信号。任选地,该方法还可包括在培养装置中提供营养培养基的步骤和将该样品在容许至少一次细胞分裂的条件下进行温育的步骤。

[0011] 在另一个方面,本发明提供用于检测靶标微生物或其成分的方法。该方法可包括

提供识别元件、产生能被检测到的信号的信号元件和怀疑含有靶标微生物的样品。该识别元件可与该信号元件连接且可选择性结合酵母聚糖。该方法还包括使该样品与该识别元件之间接触并检测该能被检测到的信号。任选地,该方法还可包括在培养装置中提供营养培养基的步骤和将该样品在容许至少一次细胞分裂的条件下进行温育的步骤。

[0012] 在另一个方面,本发明提供用于检测靶标微生物或其成分的方法。该方法可包括提供包含脂质双层和产生能被检测到的信号的信号元件的脂质囊泡、选择性结合细胞壁成分的识别元件和怀疑含有该靶标微生物的样品。该方法还可包括使该样品、该识别元件和该脂质囊泡之间在能有效引起该脂质囊泡与如果存在的该靶标微生物的结合的条件下接触,并检测该能被检测到的信号。任选地,该方法还可包括在培养装置中提供营养培养基的步骤和将该样品在容许至少一次细胞分裂的条件下进行温育的步骤。

[0013] 在另一个方面,本发明提供用于检测靶标微生物的组合物。该组合物可包含选择性结合酵母聚糖的捕获剂和产生能被检测到的信号的信号元件。

[0014] 术语“被分析物”和“抗原”可互用,指所关注的微生物特征性的各种分子(如酵母聚糖)或分子表位(如酵母聚糖的不同结合位点)或微生物全细胞。它们包括细胞壁成分(如细胞壁蛋白质)、细胞壁外成分(如甘露聚糖、几丁质或酵母聚糖)、细胞内成分(如细胞质膜蛋白质)等。

[0015] 词语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下可提供某些有益效果的本发明实施例。然而,在相同的或其他的情况下,其他实施例也可以是优选的。此外,述及一个或多个优选的实施例并非暗示其他实施例不可用,也并非旨在将其他实施例排除在本发明的范围之外。

[0016] 术语“包含”和其变型形式在说明书和权利要求书中出现时不具有限制性意义。

[0017] 本文所用的“一种”、“至少一种”和“一种或多种”可互换使用。因此,例如,怀疑含有“一种”靶标微生物的样品可解释为意指该样品可包含“一种或多种”靶标微生物。

[0018] 术语“和/或”意指所列要素的一个或全部,或所列要素的任何两个或更多个的组合。

[0019] 另外,在本文中,由端点界定的数值范围包括该范围内所含的所有数值(如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0020] 上述的“发明内容”并非意图描述本发明的每个公开的实施例或每种实施方式。下面的描述更为具体地举例说明了示例性的实施例。在本专利申请中的几个地方,通过实例的列表来提供指导,这些实例可以以各种组合来使用。在每种情况中,所述及的列表只是用作代表性的群组,不应被解释为是排他性的列表。

附图说明

[0021] 本发明将结合下面所列的附图进行进一步的阐述,其中在几个视图中相同的结构由相同的数字指代。

[0022] 图1是根据本发明一个实施例,信号元件和靶标微生物之间的结合相互作用的示意图。

[0023] 图2a是根据本发明一个实施例,靶标微生物、识别元件和带标记的第二识别元件之间的结合相互作用的示意图。

[0024] 图 2b 是根据本发明一个实施例,靶标微生物、带生物素标记的识别元件和带链霉抗生物素蛋白标记的信号元件之间的结合相互作用的示意图。

[0025] 图 3 是根据本发明一个实施例,连接到载体材料的捕获剂、细胞壁成分、带生物素标记的识别元件和带链霉抗生物素蛋白标记的信号元件之间的结合相互作用的示意图。

[0026] 图 4a 是根据本发明一个实施例,靶标微生物、带生物素标记的识别元件和含有潜在信号元件的带生物素标记的脂质囊泡的结合相互作用的示意图。

[0027] 图 4b 是图 4a 的潜在信号元件的活化的示意图。

[0028] 图 5a 是根据本发明一个实施例,靶标微生物、带生物素标记的识别元件、链霉抗生物素蛋白和含有潜在信号元件的带生物素标记的脂质囊泡的结合相互作用的示意图。

[0029] 图 5b 是图 5a 的潜在信号元件的活化的示意图。

[0030] 图 6a 是根据本发明一个实施例,连接到载体材料的捕获剂、细胞壁成分、带生物素标记的识别元件、链霉抗生物素蛋白和含有潜在信号元件的带生物素标记的脂质囊泡的结合相互作用的示意图。

[0031] 图 6b 是图 6a 的潜在信号元件的活化的示意图。

[0032] 图 7a 是使用捕获剂检测样品中的靶标微生物的方法的框图。

[0033] 图 7b 是检测样品中的靶标微生物的方法的框图。

[0034] 图 7c 是采用生长步骤检测样品中的靶标微生物的方法的框图。

具体实施方式

[0035] 当试图开发用于检测酵母和霉菌微生物当中的大多数或全部种类的快速方法时,这两类微生物的多样性提出了一个挑战。多样性可由各真菌微生物的基因组和蛋白质组的差异看出。多样性还由这些微生物在传统的生长培养基上的生长速度在相对较宽的范围得到反映。

[0036] 本发明涉及用于快速检测多种多样的酵母和霉菌微生物的方法和组合物。这些方法包括使用选择性结合在大量不同的真菌微生物中存在的被分析物(例如细胞壁成分)的识别元件,来传递用于检测这些微生物的信号元件。酵母聚糖作为多种真菌微生物的细胞壁中存在的葡聚糖,是检测酵母和霉菌微生物的优选被分析物。

[0037] 真菌细胞壁基质的主要多糖由非纤维素葡聚糖例如酵母聚糖和糖原样化合物、甘露聚糖(甘露糖的聚合物)、壳聚糖(葡糖胺的聚合物)和半乳聚糖(半乳糖的聚合物)组成。可能存在少量的岩藻糖、鼠李糖、木糖和糖醛酸。

[0038] 许多真菌尤其是酵母具有处于 α -和 β -葡聚糖的基质中的可溶性肽甘露聚糖(peptidomannan)作为它们外细胞壁的成分。甘露聚糖、半乳甘露聚糖和鼠李甘露聚糖造成对许多医学上重要的酵母和霉菌的免疫应答(鼠李甘露聚糖的情况较少)。甘露聚糖是甘露糖的聚合物或具有 α -D-甘露聚糖主链的杂聚糖。在结构上,甘露聚糖由内芯、外链和碱敏感的寡甘露糖苷组成。

[0039] 用来检测微生物的信号元件主要分成两类:明显信号元件和潜在信号元件。明显信号元件是能容易被多种手段(如荧光)中的至少一种检测到的分子或组合物。明显信号元件的非限制性例子包括染料(例如荧光染料)、颗粒(例如磁性颗粒、聚合物颗粒或金颗粒,其可任选用染料标记)、多肽(例如酶或荧光蛋白如 GFP 或 YFP)以及其他可用可检测部

分（例如荧光素）进行标记并连接到识别元件（例如抗体）的化学基团（例如聚氧化烯）。信号元件与识别元件的连接优选不干扰识别元件与其相应的结合伴侣的相互作用。

[0040] 潜在信号元件是被隔离或保护而不能容易检测到的分子或组合物，直到隔离或保护被降低到该信号元件变得可检测的这么一个程度才能被检测到。潜在信号元件的非限制性例子包括被隔离在脂质囊泡当中的酶、酶底物、染料和 / 或荧光分子。将酶与其相应的底物隔离开来能防止发色反应或发荧光反应。可将荧光分子以足够高的浓度包装在脂质囊泡中，以促进荧光猝灭。或者，可将荧光分子与相应的猝灭试剂一起包装在脂质囊泡中。当脂质囊泡破开时，荧光分子和 / 或猝灭试剂的浓度可变得足够稀释以克服猝灭作用，从而变得可检测地发荧光。

[0041] 图 1 显示使用直接连接到识别元件的明显信号元件检测靶标微生物的方法的一个实施例。在这个实施例中，将含有包含被分析物 122（例如酵母聚糖）的靶标微生物 120 的样品与选择性结合被分析物 122 的识别元件 130（例如抗体）混合。识别元件 130 还包含直接连接到识别元件 130 的信号元件 140（例如荧光染料）。有多种将小分子（例如生物素或荧光染料）或多肽（例如酶）连接到抗体的方法是本领域公知的（参见例如“Antibodies, A Laboratory Manual”；E, Harlow 和 D. Lane（编辑）；1988；冷泉港实验室出版社；美国纽约州冷泉港）。异硫氰酸荧光素（FITC）是直接连接到识别元件的荧光信号元件一个例子。

[0042] 图 1 中还显示了任选的载体材料 115。在本发明方法中，靶标微生物 120 可自由悬浮于液体相中，或者可附接到载体材料 115。载体材料 115 的非限制性例子包括塑料薄膜、颗粒或基材（例如微量滴定板）；玻璃薄膜、颗粒或基材（例如玻璃小珠或载玻片）；金属薄膜、颗粒或基材；膜和 / 或过滤器（例如玻璃纤维过滤器、尼龙或硝酸纤维素）；陶瓷颗粒或基材；水凝胶（例如琼脂糖或聚丙烯酰胺），或者任何两种或更多种前述材料的组合。有多种将靶标微生物 120 固定于载体材料 115 的方法是本领域公知的。固定靶标微生物 120 的非限制性例子包括热固定、化学交联（例如使用戊二醛）、抗体捕获等。固定靶标微生物 120 的方法应加以选择，使得它不会掩盖、改变或破坏全部的被分析物 122 而妨碍识别元件 130 选择性结合被分析物 122。

[0043] 图 2a 显示使用间接连接到识别元件的明显信号元件检测靶标微生物的方法的一个实施例。在这个实施例中，将含有包含被分析物 222（例如酵母聚糖）的靶标微生物 220 的样品与选择性结合被分析物 222 的识别元件 230（例如抗体）混合。标记有信号元件 240 的第二识别元件 235（例如第二抗体）选择性结合识别元件 230。在这个实施例中，信号元件 240 包含将酶底物 254 转化成可检测酶产物 256 的酶活性。酶反应可通过本领域公知的多种手段检测，例如通过颜色变化（例如光吸收或反射）、通过荧光、通过阻抗或电导率或通过发光来检测。如上所述，靶标微生物 220 可自由悬浮于液体相中，或者可附接到载体材料（未显示）。

[0044] 图 2b 显示使用间接连接到识别元件的明显信号元件检测靶标微生物的方法的另一个实施例。在这个实施例中，将含有包含被分析物 222（例如酵母聚糖）的靶标微生物 220 的样品与选择性结合被分析物 222 且包含生物素基团 236 的识别元件 230（例如抗体）混合。标记有信号元件 240 的生物素结合分子 238（例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白）选择性结合生物素基团 236。在这个实施例中，信号元件 240 包含将酶底物 254 转化成

可检测酶产物 256 的酶活性。信号元件 240 通过接头 237 连接到生物素结合分子 238。用来连接不同的分子如两个多肽的接头 237 是本领域公知的,在下文有更详细的描述。酶反应可通过多种上述的手段检测。如上所述,靶标微生物 220 可自由悬浮于液体相中,或者可附接到载体材料(未显示)。

[0045] 图 3 显示在夹心型测定中使用明显信号元件检测靶标微生物的方法的一个实施例。在这个实施例中,捕获剂 330a(例如选择性结合酵母聚糖的抗体或受体)连接到载体材料 315。将含有被分析物 322(例如酵母聚糖)的样品与标记有生物素 336 的识别元件 330b(例如选择性结合酵母聚糖的抗体或受体)、标记有信号元件 352 的生物素结合分子 338(例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白)和捕获剂 330a(连接到载体材料 315)接触,以形成图 3 中所示的复合物。在这个实施例中,信号元件 352 包含将酶底物 354 转化成可检测酶产物 356 的酶活性。在这个和其他的实施例中,信号元件 352 可通过任选的接头 337 连接到生物素结合分子 338,只要接头 337 不会妨碍生物素结合分子 338 结合生物素 336 和不会阻断信号元件 352 的酶活性。接头 337 的例子在下文描述。载体材料 315 可以多种形式(例如薄膜、膜、颗粒)构造和用多种不同的材料构造。载体材料 115 的非限制性例子在上文描述过。

[0046] 图 4a 显示使用潜在信号元件检测靶标微生物的方法的一个实施例。在这个实施例中,将含有包含被分析物 422(例如酵母聚糖)的靶标微生物 420 的样品与选择性结合被分析物 422 的识别元件 430(例如包含来自 Dectin-1 的碳水化合物识别结构域的抗体或组合物)和脂质体 450 混合。在这个实施例中,脂质体 450 充当潜在信号元件,因为脂质体 450、识别元件 430 和靶标微生物 420 本身的相互作用并不一定导致产生能被检测到的信号。更确切地,在这个实施例中,一个另外的步骤(在图 4b 中显示)可产生能被检测到的信号。在这个实施例中,识别元件 430 还包含通过任选的接头 437 连接到识别元件的生物素结合分子 438(例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白)。或者,生物素结合元件 438 可直接连接到识别元件 430。

[0047] 脂质体 450 包含酶 452 和能被生物素结合元件 438 选择性结合的生物素 436。脂质体 450 可从包含生物素 436 的磷脂构造而成。例如,双层膜 458 可如实例 3 中所述从 N-生物素酰-1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(Avanti Polar Lipids,美国亚拉巴马州 Alabaster 市)合成,和/或从非生物素酰化的磷脂合成。酶 452 可(例如以含水悬浮液的形式)存在于脂质体 450 当中(如图 4a 中所示)。或者,酶 452 可以与脂质体 450 的双层膜 458 物理缔合。本文所用的“物理缔合”意指该酶可跨越双层膜 458 的两个脂质层(例如该酶的至少一部分在双层膜 458 的两侧面上),或者酶 452 可分配到双层膜 458 的内脂质层或外脂质层中。在一些实施例中,酶 452 可用化学加合物(例如烷基加合物)修饰以促进与双层膜 458 的物理缔合。

[0048] 图 4b 显示图 4a 的潜在信号元件(酶 452)如何可被活化以产生能被检测到的信号。在这个实施例中,脂质体 450 的双层膜 458 被破坏,从而让酶 452 接触酶底物 454 并将其转化成产物 456。酶底物 454 向产物 456 的转化可导致产生能被检测到的信号。能被检测到的信号可通过光学法检测。光学检测的非限制性例子包括比色测定法检测、荧光测定法检测或发光测定法(例如生物发光或化学发光)检测。能被检测到的信号可以目测观察,或者可用诸如分光光度计、荧光计或发光计之类的仪器来检测。或者,该信号可通过混合物

中阻抗或电导率的变化来检测,或者通过混合物 pH 的变化来检测。

[0049] 双层膜 458 的渗透性可通过多种可导致形成脂质体碎片 451 的手段来破坏。破坏手段的非限制性例子包括声振动、冷冻-解冻过程、加热、化学(例如表面活性剂)破坏、渗透破坏(例如渗透溶解(osmolysis)),或用成孔剂如溶细胞肽(下文描述)进行的透化处理。破坏双层膜 458 的渗透性可让酶 452 移出脂质体 450、酶底物 454 移入脂质体 450 或者同时进行这两方面。图 4b 中还显示接头 437,其将识别元件 430 连接到生物素结合分子 438。

[0050] 图 5a 显示使用潜在信号元件检测靶标微生物的方法的另一个实施例。在这个实施例中,将含有包含被分析物 522(例如酵母聚糖)的靶标微生物 520 的样品与标记有生物素 536 的选择性结合被分析物 522 的识别元件 530(例如包含来自 Dectin-1 的碳水化合物识别结构域的抗体或组合物)、生物素结合分子 538 和包含生物素 536 的脂质体 550 混合。生物素结合分子 538 可在识别元件 530 和脂质体 550 之间形成桥。在这个实施例中,脂质体 550 充当潜在信号元件,因为脂质体 550、识别元件 530 和靶标微生物 520 本身之间的相互作用不一定导致产生能被检测到的信号。更确切地,在这个实施例中,一个另外的步骤(在图 5b 中显示)可产生能被检测到的信号。在这个实施例中,识别元件 530 还包含生物素 536。图 5a 中还显示了酶底物 554。

[0051] 脂质体 550 包含酶 552 和能被生物素结合分子 538 选择性结合的生物素 536。脂质体 550 可从包含生物素 536 的磷脂构造而成。例如,双层膜 558 可如实例 3 中所述从 N-生物素酰-1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(Avanti Polar Lipids,美国亚拉巴马州 Alabaster 市)构造而成,和/或从非生物素酰化的磷脂合成。酶 552 可(例如以含水悬浮液的形式)存在于脂质体 550 当中(如图 5a 中所示)。或者,酶 552 可以与脂质体 550 的双层膜 558 物理缔合。在一些实施例中,酶 552 可用化学加合物(例如烷基加合物)修饰以促进与双层膜 558 的物理缔合。

[0052] 图 5b 显示图 5a 的潜在信号元件(酶 552)如何可被活化以产生能被检测到的信号。在这个实施例中,脂质体 550 的双层膜 558 被破坏,从而让酶 552 得以接触酶底物 554 并将其转化成产物 556。酶底物 554 向产物 556 的转化可导致产生能被检测到的信号。能被检测到的信号可如上所述通过光学法检测,或者该信号可通过混合物中阻抗或电导的变化或通过混合物 pH 的变化来检测。如上所述,双层膜 558 的渗透性可通过多种可导致形成脂质体碎片 551 的手段来破坏。破坏双层膜 558 的渗透性可让酶 552 移出脂质体 550、酶底物 554 移入脂质体 550 或者同时进行这两方面。

[0053] 图 6a 显示在夹心型测定中使用潜在信号元件检测靶标微生物的方法的一个实施例。在这个实施例中,捕获剂 630a(例如选择性结合酵母聚糖的抗体)连接到载体材料 615。将含有被分析物 622(例如酵母聚糖)的样品与标记有生物素 636 的识别元件 630b(例如选择性结合酵母聚糖的抗体或受体)、生物素结合分子 638(例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白)、包含生物素 636 的脂质体和捕获剂 630a(连接到载体材料 615)接触,以形成图 6a 中所示的复合物。或者,被分析物 622 可连接到靶标微生物或其片段(未显示)。脂质体 650 还包含酶 652。在这个实施例中,脂质体 650 充当潜在信号元件,因为脂质体 650、识别元件 630a 和 630b 和被分析物 622 本身之间的相互作用不一定导致产生能被检测到的信号。更确切地,在这个实施例中,一个另外的步骤(在图 6b 中显示)可让酶 652 接触酶底

物 654, 从而产生能被检测到的信号。

[0054] 脂质体 658 包含酶 652 和能被生物素结合分子 638 选择性结合的生物素 636。脂质体 658 可从包含生物素 636 的磷脂构造而成。例如, 双层膜 658 可如实例 3 中所述从 N-生物素酰-1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 (Avanti Polar Lipids, 美国亚拉巴马州 Alabaster 市) 构造而成。酶 652 可 (例如以含水悬浮液的形式) 存在于脂质体 650 当中 (如图 5a 中所示)。或者, 酶 652 可以与脂质体 650 的双层膜 658 物理缔合。在一些实施例中, 酶 652 可用化学加合物 (例如烷基加合物) 修饰以促进与双层膜 658 的物理缔合。

[0055] 图 6b 显示图 6a 的潜在信号元件 (酶 652) 如何可被活化以产生能被检测到的信号。在这个实施例中, 脂质体 650 的双层膜 658 被信号产生元件如成孔多肽 (未显示) 破坏, 从而让酶底物 654 通过孔 657 进入脂质体而接触酶 652。或者, 脂质体 650 可通过上述的其他化学和 / 或机械手段破坏。

[0056] 表 1 中显示可使脂质体透化的示例性多肽的列表。多肽对脂质体颗粒的裂解在标题为“颗粒” (“PARTICLES”) 的国际专利申请号 PCT/GB98/03071 和标题为“受保护肽” (“ARMED PEPTIDES”) 的国际专利申请号 PCT/GB02/00033 中有公开, 这两个专利申请以引用方式全文并入本文。双层膜 658 被透化后, 酶 652 将酶底物 654 转化成产物 656。如上所述, 酶底物 654 向产物 656 的转化可导致产生能被检测到的信号。破坏双层膜 658 的渗透性可让酶 652 移出脂质体 650、酶底物 654 移入脂质体 650 或者同时进行这两方面。载体材料 615 可如上所述进行构造。

[0057] 表 1. 可破坏脂质体渗透性的肽

[0058]

A-23187 (钙离子载体)	蛙皮抗菌肽	李斯特菌溶胞素	Ranalexin
气单胞菌溶素	Dermatoxin	Maculatin	Ranateurin
两性霉素 B	直接裂解因子 来自动物毒液	爪蟾抗菌肽	皱褶菌素
Ascapin	白喉毒素	Maxymin	皂苷
曲霉溶血素	Distinctin	蜂毒肽	金黄色葡萄球菌 毒素(α , β , χ , δ)
丙甲甘肽	七叶亭	Metridiolysin	链球菌溶血素 O
载脂蛋白	菲律宾菌素	尼日利亚菌素	链球菌溶血素 S
ATP 易位酶	Gaegurin	制霉菌素	会联蛋白
铃蟾抗菌肽	GALA	Ocellatin	表面活性肽
Brevinin	短杆菌肽	P25	微管蛋白
Buforin	螺旋状红血球裂解肽	沼泽水苏苷	缬氨霉素
Caerin	溶血素	磷脂酶	Vibriolysin
蜡状菌溶素	离子霉素	Phylloxin	
大肠杆菌素	KALA	多烯抗生素	
Dermadistinctin	LAGA	多粘菌素 B	

[0059] 样品

[0060] 在某些实施例中,流体样品包含食品或饮料。制备食品样品以供进行微生物分析的方法是公知的。一些针对食品样品的样品制备方法涉及将已知数量的食品材料(例如 25 克)悬浮于相对较大体积的稀释剂(例如 225 毫升)。使样品经历剧烈的混合过程,如掺混或胃吞(stomaching),以产生相对均匀的液体悬浮液。常常将样品在称为胃袋(stomacher bag)的塑料样品容器中进行处理。本公开的方法和组合物提供分析食品或饮料样品的手段。常规进行微生物检验的食品的非限制性例子包括肉类(例如绞细肉、禽肉、鱼肉、海产品)、新鲜的或加工的农产品(例如水果、蔬菜)、奶制品(例如乳或乳制品、乳清、干酪)和饮料(例如乳、水、果汁、蔬菜汁、茶)。

[0061] 在一些实施例中,要处理和分析的样品包括来自一团水的样品。这种一团水的非限制性例子包括地表水、人或动物消费水和工业过程用水。地表水包括海洋、湖泊、河流、运河、池塘、水库、溪流等。工艺用水包括用于市政或工业用途如清洁、洗涤、清洗、冷却塔、水处理存储罐等的水。示例性的清洁过程包括食品加工过程,如洗涤、清洗和消毒肉类或农产品以供人类或动物消费。

[0062] 在其他的实施例中,本公开的方法和组合物用于分析适于进行处理和微生物检测

的样品,例如食品、饮料和药品的溶液、混合物、均浆或液体悬浮液。在某些实施例中,液体样品包含一种或多种溶解的溶质,如糖类、盐类或蛋白质。在其他实施例中,液体样品可包含一种或多种溶剂(如醇)或表面活性剂。可按照本发明来使用含溶剂或表面活性剂的样品,只要溶剂或表面活性剂的存在浓度不会阻碍能被检测到的信号的检测或者造成潜在信号元件无意中转化成能被检测到的信号(例如当样品中不存在靶标微生物时引发能被检测到的信号)。当要将样品与 pH 敏感性信号元件(例如荧光标记如 4-甲基伞形酮)或 pH 响应性信号产生元件(例如 pH 触发的溶细胞肽)混合时,可先进行缓冲和/或调整至相容的 pH 后再与 pH 敏感性或 pH 响应性元件混合。

[0063] 在一些实施例中,本公开的方法和组合物可用于检测环境或临床样品中的微生物。通常,用药签、海绵、擦拭物等从可能污染微生物的表面(例如柜台台面、地板、皮肤、伤口部位)收集残余材料,来收集环境或临床样品。可将收集装置转移到样品容器并用溶剂(标准方法缓冲液、缓冲胨水、缓冲盐水或蒸馏水)混合或均化,以将微生物释放到溶剂中。随后,可分析溶剂确定是否存在微生物。或者,可在含有收集装置的溶液中分析靶标微生物。

[0064] 各个单个的液体样品可含有几乎任何数量和种类的微生物。液体样品中的微生物数量,可从已经历过灭菌条件的样品中的每毫升零个微生物直到重度污染的样品中的每毫升 10^9 个或更多个微生物。本发明的装置和方法使得可以分析含有多种微生物浓度的液体样品。

[0065] 识别元件

[0066] 本公开包括使用选择性结合靶标微生物的细胞壁成分如酵母聚糖的识别元件。在一些实施例中,识别元件包括抗体,如单克隆或多克隆抗体。抗体可用本领域公知的方法从多种生物如小鼠、兔、山羊等获得,所述方法如“Antibodies, A Laboratory Manual”(冷泉港实验室出版社,美国纽约州冷泉港)中所述的那些方法。

[0067] 本发明还包括各种抗体片段,也称抗原结合片段,它们仅包括完整抗体的一部分,通常包括完整抗体的抗原结合位点,从而保持结合抗原的能力。片段可通过对完整或完全的抗体或抗体链进行化学处理或酶法处理来获得。片段也可通过重组手段获得。抗体片段的例子包括例如通过蛋白水解消化和/或还原二硫键产生的 Fab、Fab'、Fd、Fd'、Fv、单链 Fv、dAB 和 F(ab')₂ 片段和从 Fab 表达文库产生的片段。这种抗体片段可通过本领域公知的技术产生。本发明的抗体可包括单独的可变区或者可变区与铰链区、CH1 结构域、CH2 结构域、CH3 结构域和/或 Fc 结构域的全部或一部分的组合。术语“抗原结合片段”指免疫球蛋白或抗体的这样的多肽片段,该片段结合抗原或与完整抗体(即与衍生其的完整抗体)竞争抗原结合(即特异性结合)。

[0068] 本发明的单克隆抗体包括但不限于人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、单链 Fvs(scFv)、二硫键连接的 Fvs(sdFv)、Fab 片段、F(ab') 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、双抗体、由 Fab 表达文库产生的线性抗体片段、包括 VL 或 VH 结构域的片段、胞内制备的抗体(即胞内抗体)以及它们的抗原结合抗体片段。

[0069] 本发明的单克隆抗体可为任何同种型。本发明的单克隆抗体可为例如鼠 IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgD 或 IgE。本发明的单克隆抗体可为例如人 IgM、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD 或 IgE。在一些实施例中,单克隆抗体可为鼠 IgG2a、IgG1

或 IgG3。对于本发明,给定的重链可与 κ 或 λ 形式的轻链配对。

[0070] 在另外的实施例中,识别元件包括细胞壁成分的多肽受体。多肽受体通常包含至少一个选择性结合特定被分析物的结构域。酵母聚糖的一种示例性多肽受体是 Dectin-1 受体。Dectin-1 包含碳水化合物识别结构域。在一些实施例中,识别元件还包括多肽受体的配体结合片段(例如 Dectin-1 的碳水化合物识别结构域)。受体可从天然来源纯化得到,例如在 Dectin-1 的情况中从人单核细胞纯化得到。或者,多肽受体可通过将编码 Dectin-1 多肽或其碳水化合物识别结构域的遗传物质在合适的宿主生物中克隆和表达来产生。

[0071] 识别元件可用化学组分来修饰,只要化学修饰不会妨碍识别元件结合被分析物(例如细胞壁成分)。化学组分可例如是信号元件。可将结合靶标细胞上的预定结构的识别元件插入到脂质体的双层膜中。例如,可将 Dectin-1 受体或其衍生物插入到脂质体中并用于结合酵母聚糖。衍生物可包括能促进多肽与脂质体的缔合的长链烷基基团(例如肉豆蔻酸衍生物)。

[0072] 信号元件

[0073] 信号元件起到提供能被检测到的信号的作用,信号元件当与靶标微生物缔合时能指示样品中靶标微生物的存在。信号元件可直接连接(例如共价偶联)到识别元件。或者,可通过间接连接(例如形成由生物素酰化的识别元件、链霉抗生物素蛋白和生物素酰化的信号元件组成的复合物)使信号元件可与识别元件相缔合。信号元件可包含多肽(例如荧光多肽,如绿色荧光蛋白或黄色荧光蛋白或酶)或者多核苷酸(例如带标记的多核苷酸)。

[0074] 信号元件可为明显信号元件,从而它们可提供直接的和/或显而易见的能被检测到的信号(例如荧光染料)。或者,信号元件可为潜在信号元件,从而它们必须被活化以提供能被检测到的信号。潜在信号元件的非限制性例子包括通过例如荧光能量转移猝灭的荧光染料和被与其相应的酶底物隔离开来的酶。

[0075] 信号元件可掺入到脂质囊泡或脂质体中。掺入在该颗粒当中的信号元件可为任何选定的化合物。例如,信号元件可以是相对较小的分子,如染料或电化学介质(例如可影响电化学传导性的聚电解质)。信号元件还可以是荧光分子(如乳胶或聚苯乙烯)、抗体、激素或酶。

[0076] 信号产生元件

[0077] 本文所用的“信号产生元件”指可促使潜在信号元件产生能被检测到的信号的分子(例如多肽或化学试剂)。被隔离在脂质囊泡中从而不能自由地与相应的酶底物反应的酶,是潜在信号元件的一个例子。示例性的信号产生元件可以是能调节脂质囊泡的渗透性使得酶底物和/或酶可穿过脂质囊泡的双层膜从而让酶反应发生的溶细胞多肽。可使脂质囊泡(包含信号元件)适应于使得内容物(species)可以多种方式活化。例如,可对脂质囊泡的脂质双层的渗透性进行调节,使得可响应预定的代谢信号而提高透过该双层的渗透性。根据本发明的第一个方面,这可通过将充当溶细胞剂的肽掺入到囊泡中来实现。示例性的溶细胞肽在表 1 中列出,并在标题为“颗粒”(“PARTICLES”)的国际专利申请号 PCT/GB98/03071、标题为“受保护肽”(“ARMED PEPTIDES”)的国际专利申请号 PCT/GB02/00033 和 2008 年 2 月 14 日提交的标题为“用于微生物检测的多肽”(“POLYPEPTIDES FOR MICROBIAL DETECTION”)的美国专利申请号 61/028,896 中有描述,这些专利申请以引用方式全文并入本文。肽可以是蛋白质或短多肽,只要它们能够调节该颗粒的渗透性。

[0078] 信号产生元件可起到使脂质双层当中的孔或通道开放或介导所述孔或通道的开放,以让分子(例如酶底物)进入囊泡从而产生能被检测到的信号的作用。作为另外一种选择或除此之外,脂质双层当中的孔或通道的开放可让物质释放到囊泡外的环境中。溶细胞剂甚至可造成脂质囊泡的破裂,以让其中所含的内容物释放出来。溶细胞剂可以是能活化的(例如响应从细胞释放的化学物质或生物物质而活化)。溶细胞肽可产生离子通道,其能响应离子(例如 H^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 HCO_3^- 、 K^+ 等)而“开放”。或者,离子通道可响应衍生自靶标细胞的较大分子(例如生长因子、哺乳动物细胞的胞外基质的成分或微生物的荚膜多糖)的结合。还有可能对肽进行遗传工程改造,使得它会响应来自选定细胞的任何预定代谢信号。

[0079] 在某些实施例中,肽可以是脂质双层的整合蛋白(即跨越脂质双层的肽)。但是应理解,肽可以其他方式与脂质双层相互作用(例如非共价连接到外脂质层)。

[0080] 在一些实施例中,信号产生元件可以是包含能活化的结构如化学键或组分的多肽(例如溶细胞肽)。能活化的结构当被活化时能增强该多肽调节膜的渗透性的能力。在一些实施例中,能活化的结构可以是能响应 pH 的化学基团如磷酸基团。例如,磷酸基团的质子化可活化信号产生元件的溶细胞活性。这种质子化可通过靶标微生物的代谢活性(例如酸性代谢物的产生)来介导。几种示例性的溶细胞肽(GALA 和 LAGA)随着 pH 从 7 降低到约 5.0 而被活化(Advanced Drug Delivery Reviews 56, (2004)967-985)。相反,另一种溶细胞肽 KALA 随着 pH 从 5 升至约 7.5 而被活化。国际专利申请号 PCT/GB02/00033 公开了一些在 6.5 至 7.4 之间被活化的肽和其他在 6.0 以下或 5.5 被引发的肽。

[0081] 在另外的实施例中,能活化的结构通过化学键如磷酸酯的水解来活化。键的水解可例如降低溶细胞肽的极性(疏水性)和/或可改变该肽的等电点,从而促使该多肽调节膜的渗透性。键的这种水解可通过靶标微生物的代谢活性(例如磷酸酶活性)来介导。

[0082] 可充当信号产生元件的化学试剂包括能促使潜在信号元件产生能被检测到的信号的化学物质。例如,如果能被检测到的信号被隔离在脂质囊泡中,则能提高脂质囊泡的渗透性的化学物质(例如去污剂或表面活性剂)可充当信号产生元件。另外,处于能促使脂质囊泡发生胞浆溶解(plasmolysis)的有效浓度下的盐(例如 NaCl)也可充当信号产生元件。

[0083] 连接部分

[0084] 连接部分是这样的分子,其可用来连接两个或更多个其他的分子(例如多肽)。连接部分可用来在两个被连接的分子之间提供距离,从而减少结合位点或酶活性位点的空间位阻的可能性。一种连接部分的例子包括 1-乙基-3-[3-二甲氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐,其可用来将具有羧基基团的分子偶联到具有胺基团的另一分子。

[0085] 在一些实施例中,连接部分可包含结合伴侣如生物素结合多肽(例如抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白)。生物素酰化试剂盒可从多个商业来源获得,如 Pierce Biochemical(美国伊利诺伊州 Rockford 市)。某些生物素酰化剂包括包含有聚环氧乙烷和/或聚乙二醇的“间隔臂”。例如,酰肼修饰的链霉抗生物素蛋白可用来将链霉抗生物素蛋白连接到用作生物素结合伴侣的多肽(例如抗体或受体蛋白)。

[0086] 检测方法

[0087] 在一个方面,本公开提供在非依赖于生长的测定中检测靶标微生物的方法。本文

所用的“非依赖于生长的测定”指这样的靶标微生物试验法，它不包括提供生长营养物并在旨在促使靶标微生物生长和繁殖的条件下进行温育步骤的这么一个步骤。应指出的是，虽然非依赖于生长的测定不需要生长步骤作为方法的一个组成部分，但在非依赖于生长的测定之前可有生长步骤，这可改进检测相对较低数量的靶标微生物的能力。

[0088] 图 7a 显示示例性的非依赖于生长的测定的框图。在所例示的实施例中，样品任选可进行浓缩（例如通过过滤或离心来浓缩）。样品任选可用裂解剂处理，以增强识别元件（例如抗体）及其相应的结合伴侣（例如细胞壁成分如酵母聚糖）之间的相互作用。合适的裂解剂可包括化学物剂如去污剂和 / 或物理因素如热或超声振动。在浓缩步骤和 / 或裂解步骤（如果需要任一者）之后，使靶标微生物（或其成分）与连接到载体材料的捕获剂（见图 3）在能有效捕获可能存在于样品中的一种或多种真菌微生物特征性的一种或多种被分析物以形成一种或多种捕获的被分析物的条件下接触。在一些实施例中，分析物是完整微生物的细胞表面成分。使被捕获分析物与识别元件及其相应的信号元件在能有效引起被捕获分析物、识别元件和信号元件之间的结合的条件下接触。

[0089] 还应指出，裂解步骤、靶标捕获步骤及结合识别元件和信号元件的步骤可分别进行，或者这几个单独步骤可以以两个或更多的组合来进行。在结合步骤之后，可将载体材料洗涤以除去非特异性结合的和 / 或未结合的信号元件。在洗涤步骤之后，可将潜在的信号元件（如果在测定中存在）活化以产生能被检测到的信号。活化可包括例如向所得混合物加入酶底物和 / 或通过化学或物理手段破坏脂质囊泡。能对能被检测到的信号进行检测，以确定样品中靶标微生物的存在。任选地，可对能被检测到的信号进行测量，并可估算出原始样品中的靶标微生物数量。

[0090] 图 7b 显示另一个示例性的非依赖于生长的测定的框图。在所例示的实施例中，样品任选可进行浓缩（例如通过过滤或离心来浓缩）。样品任选可用裂解剂处理，以增强识别元件及其相应的结合伴侣（例如细胞壁成分如酵母聚糖）之间的相互作用。合适的裂解剂可包括化学物剂如去污剂和 / 或物理因素如热或超声振动。在浓缩步骤和 / 或裂解步骤之后（如果包括这些步骤中的任一个），可使靶标微生物（或其成分）与识别元件及其相应的信号元件在能有效引起靶标微生物（如果存在）、识别元件和信号元件之间的结合的条件下接触。可将所得的混合物洗涤，以除去可能非特异性结合非靶标微生物的信号元件，不过包括荧光颗粒的方法（以下描述）表明该洗涤步骤可以是任选的。

[0091] 可使该混合物通过带检测器的流动系统，如流式细胞仪。任选地，可使样品与结合到载体材料的捕获剂在能有效引起靶标微生物和捕获剂之间的结合的条件下接触。在一些实施例中，载体材料可以是在第一波长下发荧光的荧光颗粒。可使被捕获的材料与标记有信号元件的识别元件（例如包含在第二波长下发荧光的荧光染料）在能有效引起识别元件和被捕获的靶标微生物（或其成分）（如果存在）之间的结合的条件下接触。然后可使载体材料通过流动系统如流式细胞仪。因此，在一些实施例中，在流通池中检测到在第一和第二波长下都发荧光的荧光颗粒则可表明样品中存在靶标微生物。任选地，在流通池系统中，可将颗粒进行分类，阳性颗粒可例如经历验证性试验（如聚合酶链反应 (PCR) 试验）或培养方法。

[0092] 在另一个方面，本公开提供在依赖于生长的测定中检测靶标微生物的方法。依赖于生长的测定包括增加靶标微生物的数量的步骤，该步骤是通过提供使靶标微生物能够进

行生长、代谢和 / 或细胞分裂的环境（例如营养物、温度）来进行。

[0093] 图 7c 显示示例性的依赖于生长的测定的框图。在所例示的实施例中，在生长步骤之前，样品任选可进行浓缩（例如通过过滤或离心来浓缩）。可将样品放入含有营养培养基的培养装置中。可根据靶标微生物的生长需求选择营养培养基和温育温度。营养培养基可装在多种培养装置中，如培养皿、可复水的培养装置（例如 3M 公司（美国明尼苏达州 St. Paul 市）以商品名 PETRIFILM 出售的膜培养装置）、微量滴定板、烧瓶、管子等。在生长步骤之前，或者任选地在生长步骤之后，可将识别元件和信号元件在能有效引起识别元件和信号元件与靶标微生物（或其成分）的结合的条件下加到样品混合物。

[0094] 在这个实施例中，可使用能被靶标微生物的代谢活性活化的潜在信号元件。例如，潜在信号元件可包括信号产生元件（例如溶细胞肽，如国际专利申请号 PCT/GB98/03071 或 PCT/GB02/00033 中描述的那些溶细胞肽）。这种溶细胞肽在环境的 pH 发生改变（例如通过营养物代谢成酸性副产物而改变）从而容许孔的形成时能在脂质囊泡中形成孔。或者，溶细胞肽上的官能团如磷酸基团可被水解，从而容许在脂质囊泡中形成孔（参见图 6，图中显示了孔的形成如何可引起能被检测到的信号）。酵母和霉菌微生物已知产生可用于活化溶细胞肽的磷酸酶。潜在信号元件活化后，能检测到信号。

[0095] 在一些涉及营养物生长培养基的实施例中，可将来自样品的各个单个的靶标微生物在空间上进行分离（例如在琼脂平板的表面上分离），使得可以观察各个单个的菌落或微菌落的位置（在生长和信号检测步骤之后）。包括将靶标微生物与原始样品进行空间分离的实施例，可包括任选的计数步骤，其中对各个单个的菌落或微菌落进行计数。再一个任选的步骤可包括回收靶标微生物（例如挑取菌落）供随后进行存档或另外的试验（例如 PCR 分析）。

[0096] 应认识到，基于生长的测定中的一些步骤可同时进行。例如，图 7c 中的虚线框中显示的步骤可同时进行，依靠生长中的细胞的代谢活性来活化潜在信号。当同时进行所指出的步骤时，可以连续地或在不同时间监测培养装置，以观察能被检测到的信号。这个过程可对靶标微生物进行早期检测。

[0097] 优选地，在上述方法中，使样品、固定化抗体和经标记的识别元件（例如抗体）之间接触包括：使样品与固定化抗体在能有效捕获特定靶标微生物（如果样品中存在）特征性的一种或多种分析物以形成一种或多种被捕获分析物的条件下接触；和使该一种或多种被捕获分析物（如果存在）与经标记的识别元件在能有效引起该一种或多种被捕获分析物与该经标记的识别元件之间的结合的条件下接触。优选地，使样品与捕获剂接触包括使样品与每种捕获剂之间同时接触。优选地，使该一种或多种被捕获的靶标微生物（如果存在）与经标记的识别元件接触包括使该被捕获的靶标微生物与每种经标记的识别元件之间同时接触。

[0098] 实例

[0099] 实例 1.

[0100] 兔抗酵母聚糖抗体通过间接 ELISA 识别酵母聚糖。

[0101] A. 一般材料和方法

[0102] 通过将 3.03g Na_2CO_3 和 6.0g NaHCO_3 在 1000mL 蒸馏水中混合，制备包被缓冲液（0.1M 碳酸氢盐 / 碳酸盐缓冲液，pH 9.6），作为 1X 母液。磷酸盐缓冲盐水（PBS，155mM NaCl

于 10mM 磷酸盐缓冲液中, pH 7.4) 从获自 Biosource(美国马里兰州 Rockville 市) 的 10X 母液制备。BD Falcon Microtest™ 96 孔增强型表面 ELISA 板获自 BD Biosciences(美国马萨诸塞州 Bedford 市)。所有的程序都在室温下进行, 除非另有说明。所有的 ELISA 洗涤程序都包括三个连续的 200 微升 / 孔的洗涤体积, 且所有的洗涤都用 PBS 缓冲液进行。辣根过氧化物酶发色底物 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 获自 Pierce Biotechnology(美国伊利诺伊州 Rockford 市)。2M 硫酸从获自 Mallinckrodt Baker(美国新泽西州 Phillipsburg 市) 的浓母液 (18.4M) 制备。牛血清白蛋白 (BSA) 作为 1% 的 PBS 溶液用于本实验, 获自 Sigma-Aldrich(美国密苏里州 St. Louis 市)。

[0103] 本实验中所用的抗原包括获自 InvivoGen(美国加州 San Diego 市) 的酵母聚糖 (目录号 tlr1-zyn)。将酵母聚糖重构成 1mg/mL 水溶液并在 4℃ 下保藏。

[0104] 本实验中所用的抗体包括获自 Molecular Probes(美国加州 Carlsbad 市) 的兔抗酵母聚糖 (目录号 Z2850) 和获自 Amersham Biosciences(英国白金汉郡) 的辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合驴抗兔 IgG (目录号 NA934V)。

[0105] B. ELISA 条件

[0106] 酵母聚糖在本测定中用作包被抗原。将酵母聚糖在包被缓冲液中从其冷冻保藏起始浓度稀释至微孔 (microwell) 包被浓度 (20 微克 / 孔)。将 200 微升的包被溶液加到各微孔板的各孔中。将各板在摇摆平台 (Barnstead Lab-Line Maxi Rotator, 美国爱荷华州 Dubuque 市) 上以 100rpm 的速度在环境温度下温育 120 分钟。在封闭步骤之前, 先通过用 PBS 洗涤将包被溶液去除。

[0107] 将微量滴定板用 200 微升 / 孔的稀释于 PBS 的 1% BSA 溶液在摇摆平台上在环境温度下封闭 60 分钟。通过用 PBS 洗涤去除封闭溶液。

[0108] 将 400 微升的在 PBS 中稀释至 2000ng/mL 的兔抗酵母聚糖抗体 (Molecular Probes#Z-2850) 加至 A 排。其余各孔含有 200 微升的 PBS。如下将各排稀释两倍: 从 A 排取 200 微升稀释到 B 排中, 然后从 B 排取 200 微升稀释到 C 排中, C 排稀释到 D 排中, D 排稀释到 E 排中, E 排稀释到 F 排中, F 排稀释到 G 排中。H 排不含兔抗酵母聚糖, 作为空白。从 G 排弃去 200 微升, 以保持每孔 200 微升的一致体积。兔抗酵母聚糖抗体的浓度范围从 2000ng/mL 到 31.25ng/mL。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 120 分钟。然后用 PBS 洗涤板。

[0109] 将 HRP 缀合驴抗兔 IgG (Amersham#NA934V) 在 PBS 中稀释 625 倍。将 400 微升的 (稀释的?) HRP 缀合驴抗兔 IgG 加到第 11 列和第 12 列。其余各孔含有 200 微升的 PBS。为获得双份重复样品, 将 HRP 缀合驴抗兔 IgG 沿板进行两倍稀释。从第 11 列取 200 微升加到第 9 列, 然后从第 9 列取 200 微升加到第 7 列, 然后从第 7 列取 200 微升加到第 5 列, 然后从第 5 列取 200 微升加到第 3 列, 然后从第 3 列取 200 微升加到第 1 列。从第 1 列弃去 200 微升, 以保持每孔 200 微升的一致体积。同样, 从第 12 列取 200 微升加到第 10 列, 然后从第 10 列取 200 微升加到第 8 列, 然后从第 8 列取 200 微升加到第 6 列, 然后从第 6 列取 200 微升加到第 4 列, 然后从第 4 列取 200 微升加到第 2 列。从第 2 列弃去 200 微升, 以保持每孔 200 微升的一致体积。HRP 缀合驴抗兔 IgG 稀释系数在 1 : 625 至 1 : 20,000 的范围。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0110] 向每个孔加入 100 微升的 TMB 底物。将各板在室温下温育 15 分钟, 以观察显色情

况。通过将 100 微升的 2M 硫酸加到每孔终止过氧化物酶反应。将板放在读板机中,在 450nm 波长处读取吸光度。

[0111] 这些实验中所用的抗体是兔抗酵母聚糖抗体。所用的第二抗体是能识别在兔子中产生的所有第一抗体的 HRP 缀合抗兔 IgG。运行滴定曲线,以确定这些抗体是否识别酵母聚糖。如表 2 中所示,滴定显示了抗体对靶标酵母聚糖的线性响应。

[0112]

表 2. ELISA 结果，其表明兔抗酵母聚糖以线性的“剂量/响应”方式结合酵母聚糖。对于每一行，第一抗体的浓度以纳克/毫升列出。对于每一列，HRP 缀合驴抗兔 IgG 以稀释系数列出。

450nm 处吸光度													生物素酰化的兔抗酵母聚糖(ng/mL)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.023	0.025	0.06	0.076	0.144	0.142	0.269	0.262	0.388	0.388	0.584	0.51	2000
B	0.016	0.007	0.046	0.038	0.099	0.065	0.138	0.154	0.246	0.241	0.355	0.358	1000
C	-0.001	0.001	0.017	0.013	0.034	0.025	0.073	0.073	0.125	0.122	0.189	0.204	500
D	-0.006	0.001	0.011	0.011	0.017	0.009	0.035	0.036	0.056	0.057	0.094	0.139	250
E	-0.002	-0.008	0.001	0.007	0.005	0.004	0.012	0.02	0.032	0.024	0.057	0.079	125
F	-0.001	-0.009	0.001	0.001	0	0.008	0.007	0.002	0.016	0.004	0.022	0.082	62.5
G	-0.008	-0.008	0.001	0.003	0.002	-0.007	0.011	0.003	0.003	0	0.022	0.001	31.25
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20000													
R ² = 0.9853													
10000													
R ² = 0.9832													
5000													
R ² = 0.9909													
2500													
R ² = 0.9968													
1250													
R ² = 0.9825													
625													
R ² = 0.977													
HRP 缀合的驴抗兔稀释系数													

[0113] 实例 2.

[0114] 生物素酰化的抗酵母聚糖抗体通过生物素 - 链霉抗生物素蛋白 ELISA 识别酵母聚

糖。

[0115] A. 一般材料和方法

[0116] 包被缓冲液、PBS、ELISA 板、温育和洗涤程序按实例 1 中所述进行。碱性磷酸酶、发色底物、对硝基苯基磷酸二钠盐 (pNPP, 目录号 37621) 获自 Pierce Biotechnology。2N 氢氧化钠从 5M 的母液浓度制备, 获自 Sigma-Aldrich。牛血清白蛋白 (BSA) 作为 1% 的 PBS 溶液用于本实验, 获自 Sigma-Aldrich。碱性磷酸酶 (AP) 缀合的 Immunopure 链霉抗生物素蛋白获自 Pierce Biotechnology。

[0117] 酵母聚糖抗原按实例 1 中所述制备和保藏。

[0118] 本实验所用的抗体包括获自 Molecular Probes 的兔抗酵母聚糖 (目录号 Z2850)。兔抗酵母聚糖用获自 Pierce Biotechnology 的 EZ-Link Sulfo-NHS 生物素酰化试剂盒进行生物素酰化。

[0119] B. ELISA 条件

[0120] ELISA 条件与实例 1 中所述的类似, 例外的是 i) 用生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体 (目录号 Z-2850, Molecular Probes) 代替兔抗酵母聚糖抗体, ii) 用碱性磷酸酶 (AP) 缀合链霉抗生物素蛋白 (目录号 21324, Pierce Biotechnology) 代替 HRP 缀合驴抗兔 IgG, 和 iii) 如下所述使用 pNPP 底物代替 TMB 底物。

[0121] 向每个孔加入 100 微升的 pNPP 底物。将各板在室温下温育 15 分钟, 以观察显色情况。通过将 100 微升的 2N 氢氧化钠加到各孔终止磷酸酶反应。将板放在读板机中, 在 405nm 波长处读取吸光度。

[0122]

表 3. ELISA 结果，其表明生物素酰化的兔抗酵母聚糖以线性方式结合酵母聚糖。对于每一行，第一抗体的浓
度以纳克/毫升列出。对于每一列，AP 缀合链霉抗生物素蛋白以稀释系数列出。

450nm 处吸光度													生物素酰化的兔抗酵母 聚糖(ng/mL)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.028	0.038	0.051	0.046	0.082	0.098	0.070	0.064	0.152	0.099	0.174	0.124	2000
B	0.032	0.021	0.027	0.030	0.022	0.028	0.035	0.027	0.062	0.067	0.065	0.094	1000
C	0.011	0.004	0.013	0.013	0.012	0.015	0.008	0.008	0.020	0.027	0.113	0.016	500
D	0.011	0.001	-0.004	0.004	0.000	-0.011	0.032	0.015	0.044	0.030	0.056	0.005	250
E	0.011	0.007	0.015	0.016	0.004	-0.004	-0.021	0.002	0.035	0.012	0.009	0.013	125
F	0.004	-0.001	-0.011	-0.005	-0.007	0.017	0.004	0.018	-0.022	-0.011	-0.025	0.006	62.5
G	0.001	-0.002	0.004	-0.003	-0.007	-0.002	-0.007	0.013	0.012	-0.019	0.004	0.010	31.25
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20000													625
R ² = 0.8888													R ² = 0.9102
碱性磷酸酶缀合链霉抗生物素蛋白稀释系数													R ² = 0.9479

[0123] 实例 3 和 5 中所用的脂质体具有生物素酰化的磷脂，这意味着抗体是用生物
素-链霉抗生物素蛋白化学来缀合到这些脂质体。进行这个实验是为了对使用生物素-链

霉抗生物素蛋白化学来将抗体缀合到脂质体的条件进行优化。在这个实验中,抗酵母聚糖抗体被生物素酰化,而抗体结合酵母聚糖的检测是用 AP 缀合链霉抗生物素蛋白来进行。滴定数据表明了生物素酰化的抗体和链霉抗生物素蛋白对酵母聚糖的线性响应(表 3)。

[0124] 实例 3.

[0125] 脂质体通过抗酵母聚糖抗体相互作用识别酵母聚糖。

[0126] A. 一般材料和方法

[0127] 包被缓冲液、PBS、ELISA 板、温育和洗涤程序按实例 1 中所述进行。牛血清白蛋白(BSA) 作为 1% 的 PBS 溶液用于本实验,获自 Sigma-Aldrich。ImmunoPure 链霉抗生物素蛋白获自 Pierce Biotechnology。

[0128] 用 0.25% TRITON X-100 水溶液裂解脂质体。辣根过氧化物酶发色底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) 获自 Pierce Biotechnology。2M 硫酸按实例 1 中所述从浓母液制备。

[0129] 酵母聚糖抗原按实例 1 中所述制备和保藏。

[0130] 生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体按实例 2 所述制备。

[0131] B. HRP 脂质体合成

[0132] 量取 1.25mL 的 20mg/mL 的 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC) (Avanti Polar Lipids,美国亚拉巴马州 Alabaster 市) 于 CHCl_3 中的溶液到烧瓶中。接着加入 5 μL 的 50mg/mL 的 1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-(生物素酰基)(钠盐) (Avanti Polar Lipids,美国亚拉巴马州 Alabaster 市) 于 CHCl_3 中的溶液。然后将该合并的溶液在旋转蒸发仪上干燥,并置于真空下除去过量的溶剂。

[0133] 然后将干燥的脂质膜用 1mL 的 5mg/mL 的辣根过氧化物酶(HRP, 获自 Sigma Aldrich) 于 10mmol N-三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸(TES) 中的溶液进行水化,该溶液的 pH 用 1N HCl 调至 6.5。

[0134] 然后将此溶液置于超声浴(Bransonic 2510, Branson Ultrasonic Corp., 美国康涅狄格州 Danbury 市) 并于 50°C 下超声处理 1 小时。

[0135] 超声处理后,将脂质体溶液在干冰/丙酮浴中冷冻然后在温水中解冻,交替进行五次。浑浊的溶液首先在 50°C-55°C 下挤出通过 400nm 聚碳酸酯膜(Avanti Polar Lipids) 15 次,然后在相同温度下挤出通过 200nm 膜。

[0136] 过量的未包囊的 HRP 通过柱色谱法除去,首先是通过 Q-XL 阴离子交换柱(GE Healthcare,美国新泽西州 Piscataway 市) 进行,然后通过 Sephacryl S-300 尺寸排阻柱(GE Healthcare) 进行,在每种情况中都用 10mM TES 洗脱。脂质浓度经磷脂 C 试验(Wako Chemicals,美国弗吉尼亚州 Richmond 市) 评估为 4.13mg/mL, z 平均颗粒经动态光散射(Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd, 英国伍斯特郡) 测定为 126nm。

[0137] C. ELISA 条件

[0138] 酵母聚糖在本测定中用作包被抗原。将酵母聚糖在包被缓冲液中从其冷冻保藏起始浓度稀释至微孔(microwell) 包被浓度(20 微克/孔)。将 200 微升的包被溶液加到各微孔板的各孔中。将各板在摇摆平台上在环境温度下温育 120 分钟。在封闭步骤之前,先通过用 PBS 洗涤将包被溶液去除。

[0139] 将微量滴定板用 200 微升/孔的稀释于 PBS 的 1% BSA 溶液在摇摆平台上在环境

温度下封闭 60 分钟。通过用 PBS 洗涤去除封闭溶液。

[0140] 向 A、B、E 和 F 排加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 2000ng/mL 的生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体 (Molecular Probes#Z-2850)。C、D、G 和 H 排含有 200 微升的 PBS。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 120 分钟。然后用 PBS 洗涤板。

[0141] 向 A、B、C 和 D 排加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 5000ng/mL 的 ImmunoPure 链霉抗生物素蛋白 (Pierce Biotechnology#21122)。E、F、G 和 H 排含有 200 微升的 PBS。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。然后用 PBS 洗涤板。

[0142] 将生物素酰化的脂质体在 PBS 中稀释 625 倍。向第 6 列中的所有孔加入 400 微升的脂质体。其余各孔含有 200 微升的 PBS。将脂质体沿板进行两倍稀释。从第 6 列取 200 微升加到第 5 列, 然后从第 5 列取 200 微升加到第 4 列, 然后从第 4 列取 200 微升加到第 3 列, 然后从第 3 列取 200 微升加到第 2 列, 然后从第 2 列取 200 微升加到第 1 列。从第 1 列弃去 200 微升, 以保持每孔 200 微升的一致体积。脂质体稀释系数在 1 : 625 至 1 : 20,000 的范围。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0143] 向各孔加入 25 微升的 0.25% Triton X-100 以裂解脂质体。加入 Triton X-100 后, 立即向各孔加入 100 微升的 TMB 底物。将各板在室温下温育 15 分钟, 以观察显色情况。通过将 100 微升的 2M 硫酸加到每孔终止过氧化物酶反应。将板放在读板机中, 在 450nm 波长处读取吸光度。

[0144] 表 4 中的结果表明脂质体通过抗体相互作用识别酵母聚糖。含有生物素酰化的磷脂的脂质体通过链霉抗生物素蛋白接头缀合到生物素酰化的抗酵母聚糖抗体。表中所示的对照包括省略抗酵母聚糖抗体、省略链霉抗生物素蛋白或者同时省略该抗体和链霉抗生物素蛋白。

[0145]

表 4. ELISA 结果，其表明脂质体通过抗体介导的相互作用识别酵母聚糖。对于每一列，生物素酰化的脂质体以稀释系数列出。

450nm 处吸光度						
	1	2	3	4	5	6
A	0.183	0.302	0.546	0.794	1.014	1.143
B	0.194	0.325	0.531	0.749	1.052	1.127
C	0.069	0.071	0.081	0.081	0.127	0.294
D	0.069	0.072	0.075	0.076	0.149	0.287
E	0.061	0.063	0.067	0.077	0.121	0.250
F	0.064	0.062	0.067	0.073	0.119	0.296
G	0.061	0.066	0.070	0.077	0.120	0.323
H	0.061	0.063	0.069	0.080	0.136	0.318
	1:20000	1:10000	1:5000	1:2500	1:1250	1:625
生物素酰化的脂质体稀释系数						
	生物素酰化的兔抗酵母聚糖 + 链霉抗生物素蛋白 + 含生物素酰化的 HRP 的脂质体					
	链霉抗生物素蛋白 + 含生物素酰化的 HRP 的脂质体					
	生物素酰化的兔抗酵母聚糖 + 含生物素酰化的 HRP 的脂质体					
	含生物素酰化的 HRP 的脂质体					

[0146] 实例 4.

[0147] 生物素酰化的抗酵母聚糖通过生物素-链霉抗生物素蛋白 ELISA 结合酵母和霉菌

全细胞裂解物中的酵母聚糖。

[0148] A. 一般材料和方法

[0149] 包被缓冲液、PBS、ELISA 板、温育和洗涤程序按实例 1 中所述进行。辣根过氧化物酶、发色底物、3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 获自 Pierce Biotechnology。2M 硫酸从 18.4M 的母液浓度制备, 获自 Mallinckrodt Baker (美国新泽西州 Phillipsburg 市)。牛血清白蛋白 (BSA) 作为 1% 的 PBS 溶液用于本实验, 获自 Sigma-Aldrich。辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的 Immunopure 链霉抗生物素蛋白获自 Pierce Biotechnology。

[0150] 酵母聚糖抗原按实例 1 中所述制备和保藏。

[0151] 本实验中所用的酵母包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (ATCC#24297)、酿酒酵母 (ATCC#201390), 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) (ATCC#10231)。本实验中所用的霉菌包括黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) (ATCC#9643)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (ATCC#16404)、草本枝孢菌 (*Cladosporium herbarum*) (ATCC#76226) 和绳状青霉菌 (*Penicillium funiculosum*) (ATCC#11797)。酵母在获自 BD Biosciences (美国加州 San Jose 市) 的 Difco™ Sabouraud 琼脂上培养。霉菌在获自 BD Bioscience 的 Difco™ 马铃薯葡萄糖琼脂上培养。白色念珠菌培养物在 37℃ 下生长。所有其他培养物在 28℃ 下生长。

[0152] 本实验所用的抗体包括获自 Molecular Probes 的兔抗酵母聚糖 (目录号 Z2850), 作为捕获抗体。兔抗酵母聚糖用获自 Pierce Biotechnology 的 EZ-Link Sulfo-NHS 生物素酰化试剂盒进行生物素酰化, 并用作第一抗体以检测酵母和霉菌全细胞裂解物中的酵母聚糖。

[0153] B. 酵母和霉菌全细胞裂解物条件

[0154] 本实验中所用的酵母包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) (ATCC#24297)、酿酒酵母 (ATCC#201390), 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) (ATCC#10231)。本实验中所用的霉菌包括黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) (ATCC#9643)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (ATCC#16404)、草本枝孢菌 (*Cladosporium herbarum*) (ATCC#76226) 和绳状青霉菌 (*Penicillium funiculosum*) (ATCC#11797)。将酵母在获自 BD Biosciences 的 Difco™ Sabouraud 琼脂上培养两天后收获。将霉菌在获自 BD Bioscience 的 Difco™ 马铃薯葡萄糖琼脂上培养五天后收获。菌苔是通过加入 RIPA 缓冲液 (10mM Na₂HPO₄, pH 7, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 2mM EDTA) 来收获。RIPA 缓冲液所用的所有化学品均获自 Sigma-Aldrich。加入 RIPA 缓冲液后, 用刮铲从平板刮取菌落并转移到 1.5mL 微量离心管。将霉菌滤过玻璃棉以除去孢子。用获自 Kimble/Kontes (美国新泽西州 Vineland 市) 的 Micro Ultrasonic 细胞破碎仪将细胞在 50 赫兹下超声处理 1 分钟, 然后将裂解物在 4℃ 下于 13,000rpm 离心 10 分钟, 以使不溶性物质沉淀下来。将上清液转移到新管, 用获自 Pierce Biotechnology 的 BCA™ 蛋白质测定试剂盒测定总蛋白质浓度。每个全细胞裂解物取 20 微克进行分析。

[0155] C. ELISA 条件

[0156] 兔抗酵母聚糖在本测定中用作捕获抗原。将兔抗酵母聚糖在包被缓冲液中从其冷冻保藏起始浓度稀释至微孔 (microwell) 包被浓度 (20 微克 / 孔)。将 200 微升的包被溶液加到各微孔板的各孔中。将各板在摇摆平台上在环境温度下温育 120 分钟。在封闭步骤之前, 先通过用 PBS 洗涤将包被溶液去除。

[0157] 将微量滴定板用 200 微升 / 孔的稀释于 PBS 的 1% BSA 溶液在摇摆平台上在环境温度下封闭 60 分钟。通过用 PBS 洗涤去除封闭溶液。

[0158] 将获自酿酒酵母 (ATCC#24297)、酿酒酵母 (ATCC#201390)、白色念珠菌 (ATCC#10231)、黄曲霉 (ATCC#9643)、黑曲霉 (ATCC#16404)、草本枝孢菌 (ATCC#76226) 和绳状青霉菌 (ATCC#11797) 的 20 微克全细胞裂解物在 PBS 中稀释至 200 微升的总体积。将酵母聚糖在 200 微升的 PBS 中从其冷冻保藏起始浓度稀释至 20 微克 / 孔。将酵母聚糖加到第 1 列的 A、B 和 C 排, 酿酒酵母 (ATCC#24297) 加到第 2 列的相应的排, 酿酒酵母 (ATCC#201390) 加到第 3 列, 白色念珠菌 (ATCC#10231) 加到第 4 列, 黄曲霉 (ATCC#9643) 加到第 5 列, 黑曲霉 (ATCC#16404) 加到第 6 列, 草本枝孢菌 (ATCC#76226) 加到第 7 列, 绳状青霉菌 (ATCC#11797) 加到第 8 列。第 12 列仅含有 200 微升的 PBS, 作为空白。将各板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0159] 向 A 排加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 5000ng/mL 的生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体 (Molecular Probes#Z-2850)。向 B 排加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 2500ng/mL 的生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体。向 C 排加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 1250ng/mL 的生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 120 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0160] 将辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的链霉抗生物素蛋白在 PBS 中稀释至 100ng/mL 的工作浓度。向每孔加入 200 微升的 HRP 缀合链霉抗生物素蛋白。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0161] 向每孔加入 100 微升的 TMB 底物。将各板在室温下温育 15 分钟, 以观察显色情况。通过将 100 微升的 2M 硫酸加到每孔终止过氧化物酶反应。将板放在读板机中, 在 450nm 波长处读取吸光度。

[0162] 表 5 所示的结果表明, 生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体识别了酵母和霉菌的全细胞裂解物中的酵母聚糖。纯化的酵母聚糖用作对照。

[0163] 表 5. ELISA 结果, 其表明生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体能结合酵母和霉菌全细胞裂解物中的酵母聚糖。对于每一列, 第一抗体的浓度以纳克 / 毫升列出。

[0164]

全细胞裂解物	生物素酰化的兔抗酵母聚糖		
	5.0 ug	2.5 ug	1.25 ug
纯化的酵母聚糖 (InvivoGen tlr1-zyn)	0.045	0.022	0.010
酿酒酵母 ATCC #24297	0.167	0.211	0.098
酿酒酵母 ATCC #201390	0.152	0.154	0.076
白色念珠菌 ATCC #10231	0.167	0.141	0.079
黄曲霉 ATCC #9643	0.224	0.173	0.066
黑曲霉 ATCC #16404	0.485	0.319	0.154
草本枝孢菌 ATCC #76226	0.133	0.058	0.034
绳状青霉菌 ATCC #11797	0.251	0.237	0.135
450nm 处吸光度			

[0165] 实例 5.

[0166] 脂质体通过抗体相互作用识别酵母和霉菌全细胞裂解物中的酵母聚糖。

[0167] A. 一般材料和方法

[0168] 包被缓冲液、PBS、ELISA 板、温育和洗涤程序按实例 1 中所述进行。牛血清白蛋白 (BSA) 作为 1% 的 PBS 溶液用于本实验, 获自 Sigma-Aldrich。ImmunoPure 链霉抗生物素蛋白获自 Pierce Biotechnology。

[0169] 所用的脂质体含有 DPPC/ 生物素加 5mg/mL HRP 于 10mM TES (pH 6.5) 中。用 0.25% Triton X-100 水溶液来裂解脂质体。辣根过氧化物酶、发色底物、3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 获自 Pierce Biotechnology。2M 硫酸从 18.4M 的母液浓度制备, 获自 Mallinckrodt Baker (美国新泽西州 Phillipsburg 市)。

[0170] 本实验中所用的抗原包括获自 InvivoGen 的酵母聚糖 (目录号 tlr1-zyn)。将酵母聚糖重构成 1mg/mL 水溶液, 并在 4°C 下保藏。

[0171] 本实验中所用的酵母和霉菌按实例 4 中所述制备。本实验中所用的抗体按实例 4 中所述制备。

[0172] R. 酵母和霉菌全细胞裂解物条件

[0173] 酵母和霉菌全细胞裂解物条件和程序如实例 4 中所述。

[0174] C. HRP 脂质体合成

[0175] 脂质体按按实例 3 中所述合成。

[0176] D. ELISA 条件

[0177] 按实例 4 中所述将各板用兔抗酵母聚糖包被并用 BSA 封闭。

[0178] 按实例 4 中所述将全细胞裂解物和酵母聚糖加到各板的孔中并将各板温育和洗涤。

[0179] 向每孔加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 5000ng/mL 的生物素酰化的兔抗酵母聚糖抗体 (Molecular Probes#Z-2850)。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 120 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0180] 向每孔加入 200 微升的在 PBS 中稀释至 5000ng/mL 的 ImmunoPure 链霉抗生物素蛋白 (Pierce Biotechnology#21122)。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。然后用 PBS 洗涤板。

[0181] 将生物素酰化的脂质体在 PBS 中稀释 625 倍。向 A 排中的所有孔加入 400 微升的脂质体。其余各排含有 200 微升的 PBS。将脂质体沿板进行两倍稀释。从 A 排取 200 微升加到 B 排, 然后从 B 排取 200 微升加到 C 排, 然后从 C 排取 200 微升加到 D 排, 然后从 D 排取 200 微升加到 E 排, 然后从 E 排取 200 微升加到 F 排, 然后从 F 排取 200 微升加到 G 排, 然后从 G 排取 200 微升加到 H 排。从 H 排弃去 200 微升, 以保持每孔 200 微升的一致体积。脂质体稀释系数在 1 : 625 至 1 : 40,000 的范围。将板在摇摆平台上在环境温度下温育 60 分钟。用 PBS 洗涤板。

[0182] 向各孔加入 25 微升的 0.25% Triton X-100 以裂解脂质体。加入 Triton X-100 后, 立即向各孔加入 100 微升的 TMB 底物。将各板在室温下温育 15 分钟, 以观察显色情况。通过将 100 微升的 2M 硫酸加到每孔终止过氧化物酶反应。将板放在读板机中, 在 450nm 波长处读取吸光度。

[0183] 表 6 所示的结果表明, 脂质体通过抗体相互作用识别了酵母和霉菌的全细胞裂解物中的酵母聚糖。

[0184]

表 6. ELISA 结果，其表明脂质体通过抗体介导的相互作用结合酵母和霉菌全细胞裂解物中的酵母聚糖。对于每一排，生物素酰化的脂质体以稀释系数列出。

450nm 处吸光度									脂质体稀 释系数
	1	2	3	4	5	6	7	8	
A	0.062	0.215	0.467	0.858	0.576	0.937	0.564	0.679	625
B	0.043	0.435	0.501	0.911	0.565	0.882	0.587	0.697	1250
C	0.060	0.199	0.267	0.215	0.361	0.512	0.353	0.541	2500
D	0.092	0.196	0.211	0.162	0.260	0.329	0.251	0.389	5000
E	0.045	0.114	0.101	0.089	0.162	0.265	0.150	0.237	10000
F	0.035	0.073	0.070	0.059	0.088	0.143	0.080	0.139	20000
G	0.001	0.029	0.024	0.017	0.046	0.076	0.033	0.065	40000
H	0.007	0.022	0.026	0.018	0.025	0.042	0.021	0.029	80000
全细胞 裂解物	纯化的酵母聚糖 (InvivoGen)	酿酒酵母 ATCC #24297	酿酒酵母 ATCC #201390	白色念珠菌 ATCC #10231	黄曲霉 ATCC #9643	黑曲霉 ATCC #16404	草本枝孢菌 ATCC #76226	绳状青霉菌 ATCC #11797	

[0185] 现已结合发明人所预见的、给出了操作性描述 (enabling description) 的若干具体实施例描述了本发明。本发明的非实质修改形式，包括非当前所预见的修改形式，仍可构

成其等同物。因此,本发明的范围不应受本文所述的细节和结构的局限,而是仅受以下权利要求书及其等同物的限定。

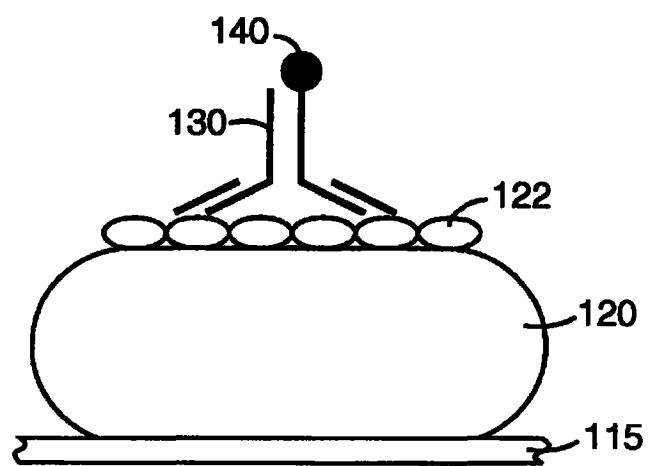


图 1

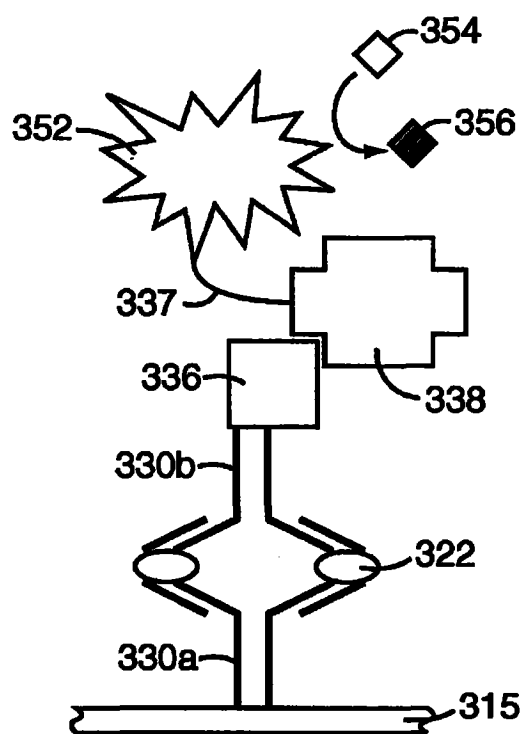


图 3

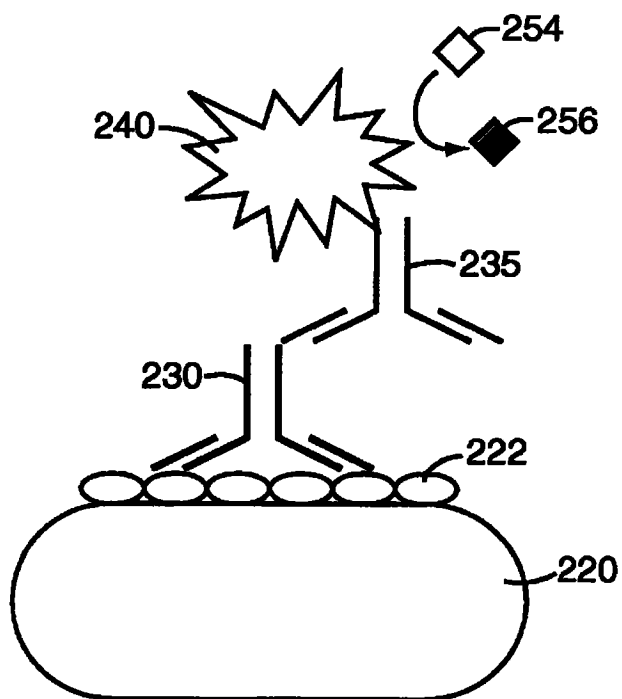


图 2a

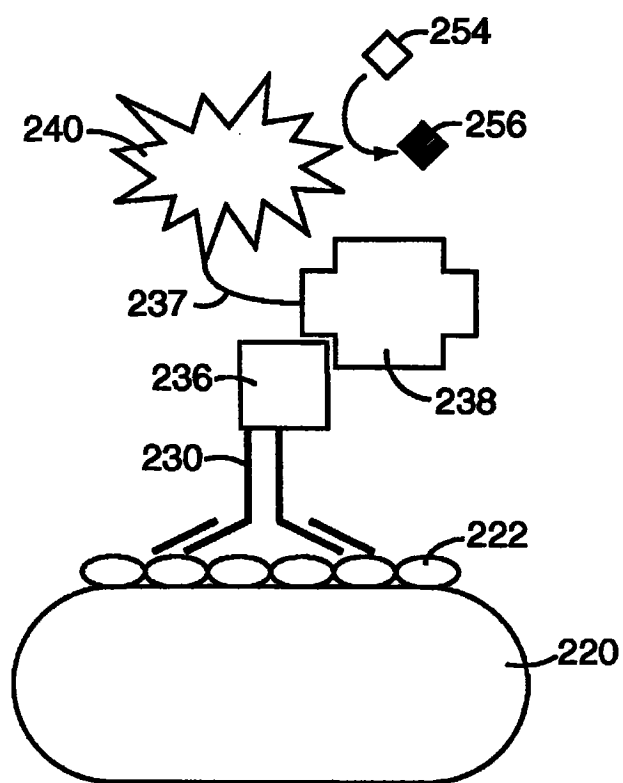


图 2b

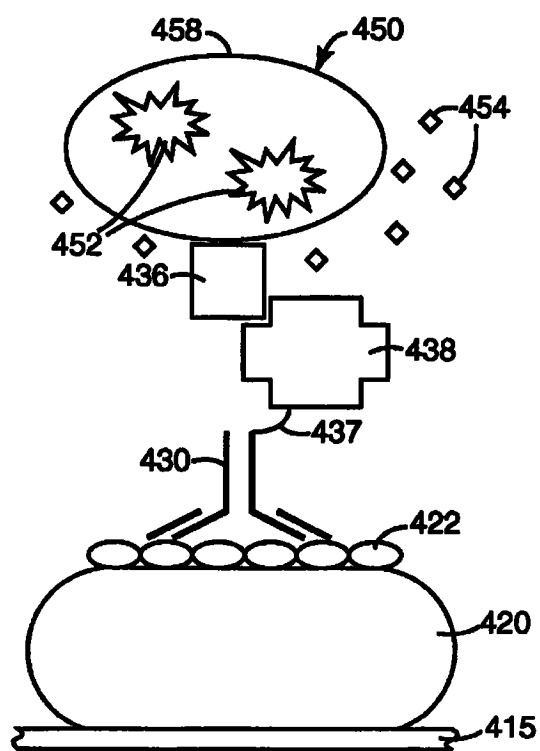


图 4a

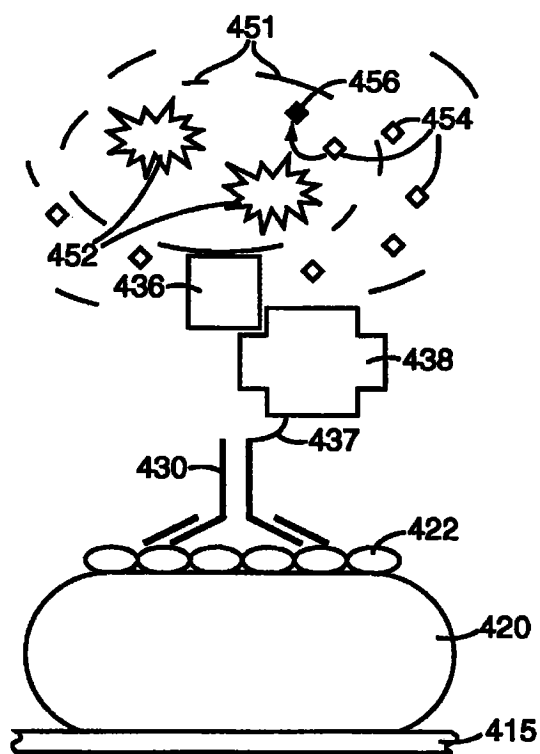


图 4b

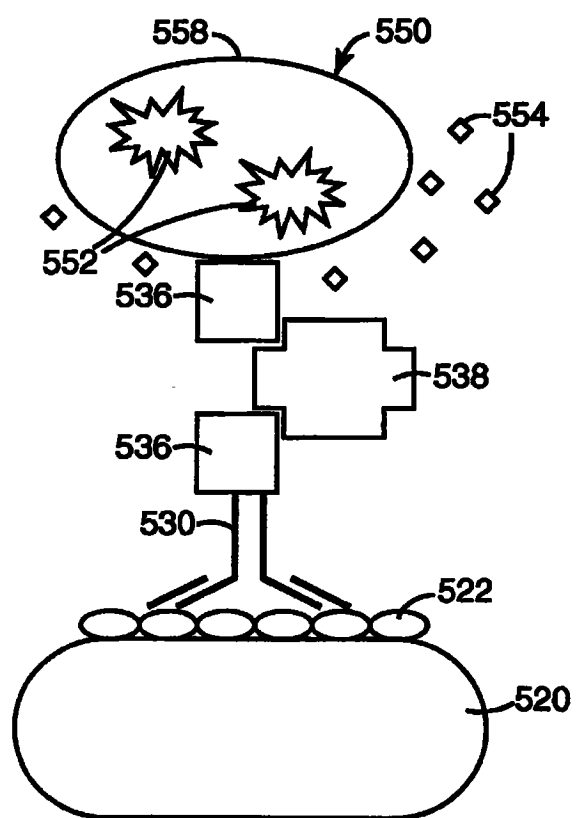


图 5a

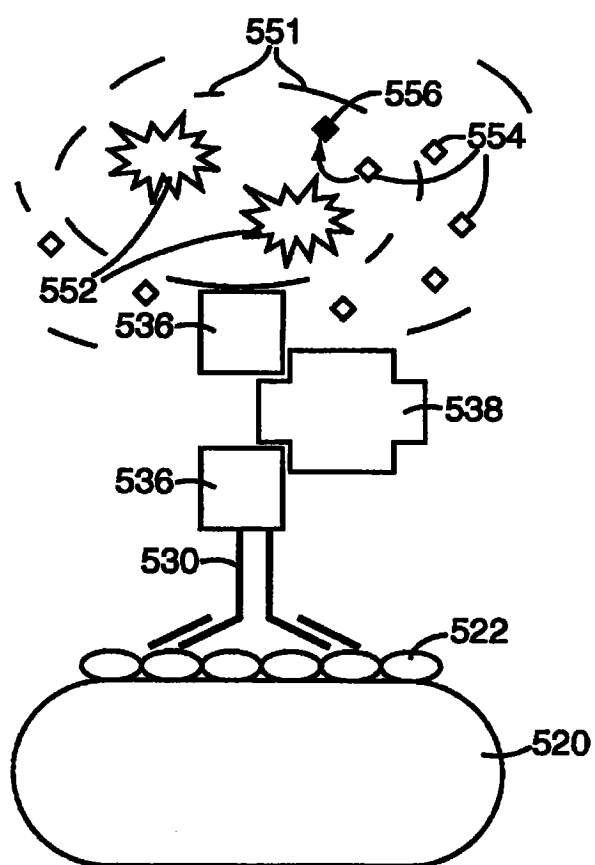


图 5b

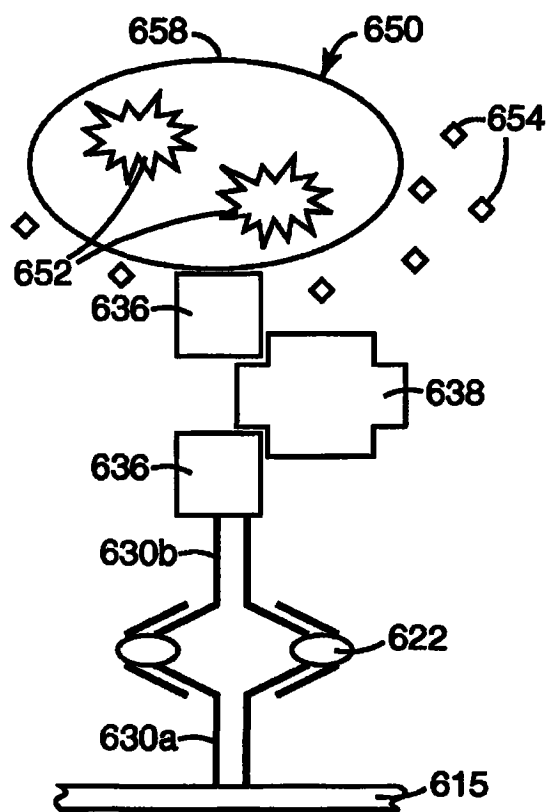


图 6a

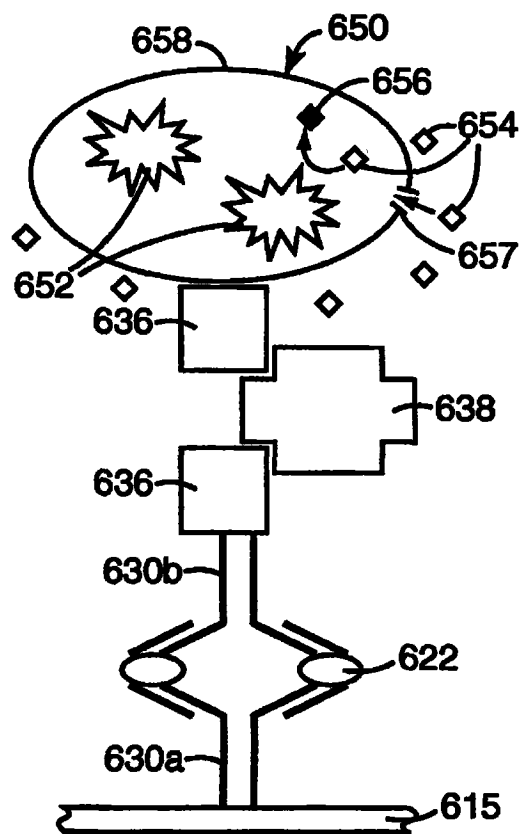


图 6b

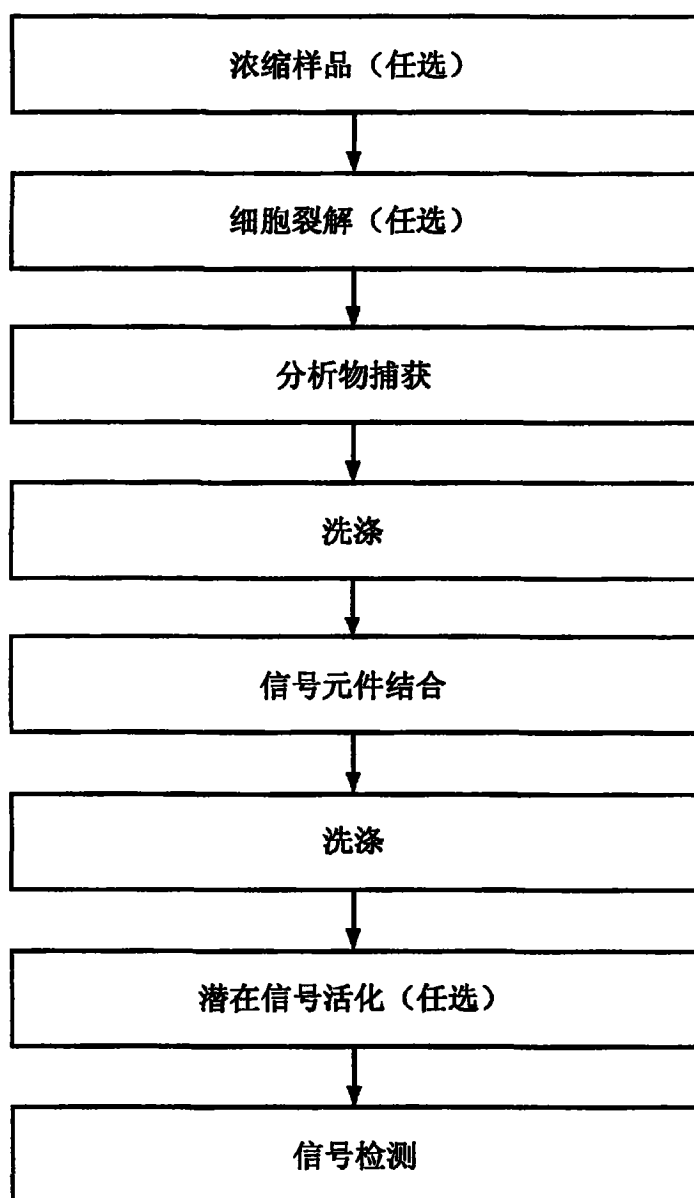


图 7a

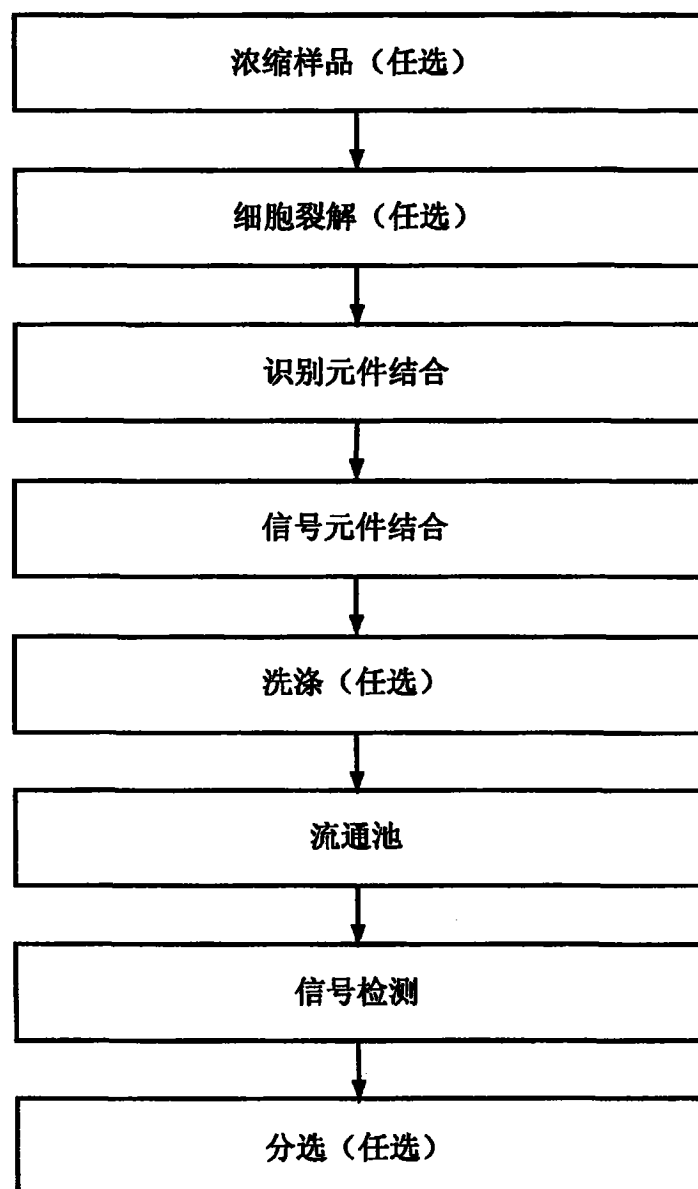


图 7b

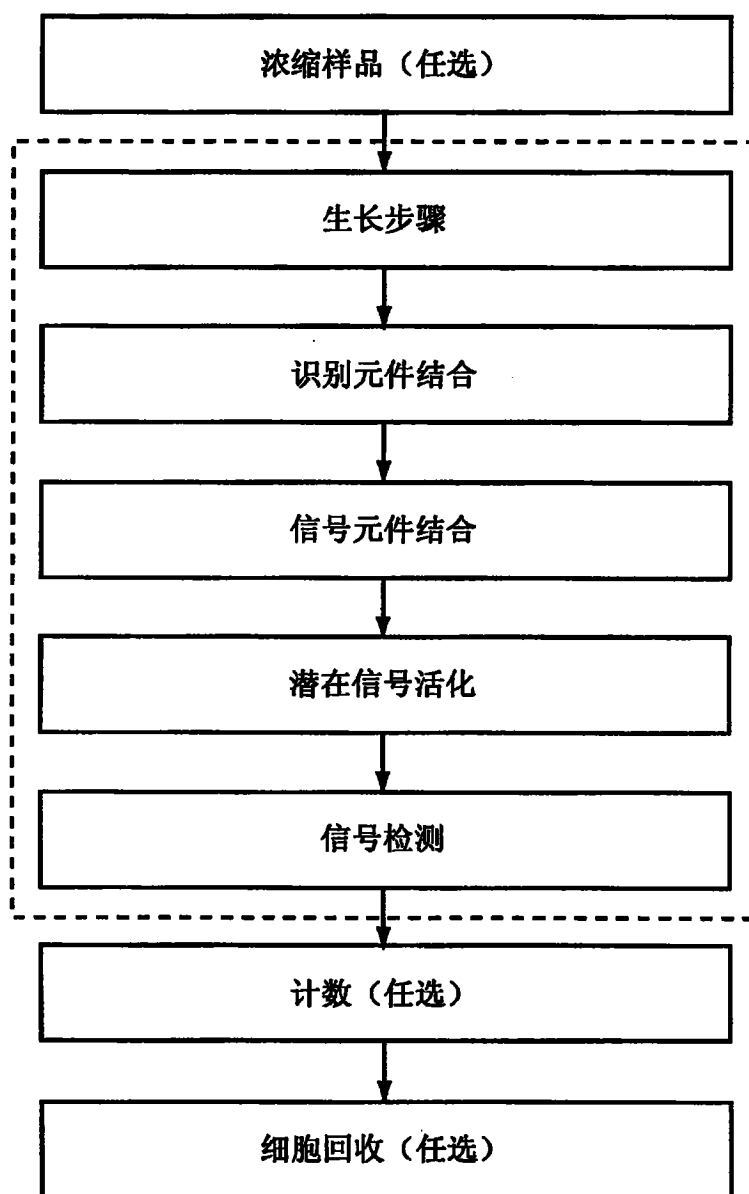


图 7c