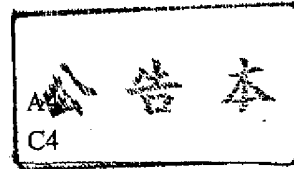


409149

88年9月1日 修正補充



申請日期	85.7.29
案 號	85109225
類 別	C12Q 1/04

(以上各欄由本局填註)

第 85109225 號		發 明 專 利 說 明 書		修正頁 修正日期: 88年09月
一、發明 名稱	中 文	使用昆蟲淋巴液來偵測微生物之方法		
	英 文	PROCESS FOR DETECTING MICROORGANISM USING INSECT HEMOLYMPH		
二、發明 人	姓 名	土谷正和		
	國 籍	日 本		
	住、居所	日本國尼崎市高田町6-1		
三、申請人	姓 名 (名稱)	日商・和光純藥工業股份有限公司		
	國 籍	日 本		
	住、居所 (事務所)	日本國大阪市中央區道修町三丁目1番2號		
	代 表 人 名 姓	田中幹晃		

409149

裝

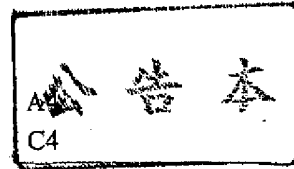
訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

409149

88年9月1日 修正補充



申請日期	85.7.29
案號	85109225
類別	C12Q 1/04

(以上各欄由本局填註)

第 85109225 號		發明 新 型 專 利 說 明 書		修正頁 修正日期: 88年09月
一、發明 名稱	中 文	使用昆蟲淋巴液來偵測微生物之方法		
	英 文	PROCESS FOR DETECTING MICROORGANISM USING INSECT HEMOLYMPH		
二、發明 人	姓 名	土谷正和		
	國 籍	日 本		
	住、居所	日本國尼崎市高田町6-1		
三、申請人	姓 名 (名稱)	日商・和光純藥工業股份有限公司		
	國 籍	日 本		
	住、居所 (事務所)	日本國大阪市中央區道修町三丁目1番2號		
	代 表 人 名 姓	田中幹晃		

409149

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

409149

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

日本 國(地區) 申請專利，申請日期： 1995, 7, 31 案號： 特願平7-214200 ， 有 無主張優先權

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

發明之背景

本發明是關於一種偵測微生物的方法，其可用於諸如半導體洗滌水之品質管制，感染疾病之診斷，環境微生物之偵測，食品中微生物之檢定等。

微生物之偵測有其不同目的，諸如，半導體洗滌水之品質管制，感染疾病之診斷，環境微生物之偵測及食品中微生物之檢定。

微生物之檢定有下列數種例行方法①培養法，包括直接添加樣品於培養基中，並計算形成單株的數目，②所有細胞數目計算方法，包括藉由過濾樣品以收集在濾紙上樣品之細胞數目再利用顯微鏡觀察計算細胞數目，③聚合酶鏈鎖反應(PCR)方法，包括探討存在品係中核酸(聚核苷酸)鏈之特性，④流動式細胞測量術，包含細胞之螢光標記，再予以檢測，⑤ATP測定法，包括藉由測定細胞內腺核苷三磷酸(ATP)而計算細胞數目。所有之方法均具有部分問題且亦無法快速容易的測定。

例如，培養法之缺點是因為培養的時間通常需24小時或更長(在某些例子檢定黴菌時需1星期或更長)，而致無法快速檢測。其另一缺點是某些細菌無法利用傳統的方法加以培養，致使某些存在樣品中的微生物被忽略。而全部細胞計算方法之缺點是需要昂貴的儀器，諸如螢光顯微鏡，影像分析儀等均是在計算細胞時所必須的。而PCR之法很難計算所有微生物細胞之數目，流動式細胞測量法之缺點是當微生物含量低時無法偵測，且由於固定劑(例如

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

福馬林)之干擾而使測量精確性降低。ATP測定法之缺點是測定所需之儀器設備非常昂貴。

為解決上述之問題，即需探討一種方法，其包含將欲檢測微生物之樣品與一種昆蟲體液混合進行反應，其含有非活化狀態之串級原酚氧化酶因子（此處之昆蟲體液縮寫為PPO試劑），並觀察微生物細胞壁成份，諸如(1→3)- β -D糖苷（此處縮寫為 β -糖苷）或聚醣胜肽之呈色程度，並以觀察結果為基準偵測微生物。但此方法仍未非常完美因為其具有下列問題，由於本法中樣品直接與PPO試劑混合，故測定結果受樣品中鹽類濃度之影響，詳細言之，為鹽類濃度高時，測定的敏感性即降低，故須耗電許多時間去決定偵測的環境。在高鹽狀態下偵測樣品中微生物的量，無可避免的是必須將樣品進行適當之稀釋，因此也降低測量之敏感度與精確度，一些樣品所含有的 β -糖苷其非衍生自微生物時，測定結果則可能為假性正反應。

發明之摘要

回於上述之情況後，本發明所需解決之問題是提供一種快速，簡易；高精確度之不同樣品微生物偵測法。

本發明提供一種測定微生物的方法，其包含有藉由濾片過濾樣品，清洗濾片，將濾片上之殘留物與昆蟲體液反應共含有不活化型式之串級原酚氧化酶因子，及藉由顏色的改變測是樣品中微生物之量。

圖之詳細描述

第1圖表示第1實例中所偵測到之乾乳酪酸桿菌之結

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

果。

第2圖表示第1實例中所偵測到之大腸桿菌結果。

第3圖表示第2實例中所偵測到之大腸桿菌結果。

第4圖圖示第3實例之結果，在其中樣品含有枯草桿菌。

第5圖圖示第3實例之結果在其中樣品含有乾乳酪酸桿菌。

第6圖圖示第3實例中利用不同細菌所得到之結果。

第7圖圖示第4實例所得到之結果。

第8圖圖示第3比較實例之結果。

較佳實例之描述

本發明是一種偵測微生物的方法其包含有藉由濾片過濾樣品，清洗濾片，將濾片上之殘留物與PPO試劑反應，並藉由顏色的變化測是樣品中微生物量。

本發明之方法亦是藉由PPO試劑而能簡易，快速，及高精確性向檢測不同樣品中微生物含量，將樣品通過一個適當孔徑之濾片，並清洗濾片，爾後再與PPO試劑反應，其優點如下描述：(1)有一至多種的微生物可容易，快速高精確度的被偵測到，且不會有下列使用PPO之問題：測定結果會受樣品中鹽類濃度之影響，且當鹽類濃度高時，偵測之敏感度將會降低，因此需耗費勞力以決定測定之環境，在此情況下，無可避免的需將樣品進行適當之稀釋，此亦使測定敏感度及精確性降低；而一些樣品含有之 β -糖苷非衍生自微生物時其測定結果可能為假性正反應。(2)樣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (4)

品可藉由過濾而濃縮因而提高其偵測敏感性。

根據本方法測得之樣品可直接被應用而不需再一次偵測樣品中微生物含量，該樣品包括半導體之洗滌水，體液（即，血液，血漿，血清及腦脊髓液），尿液，自來水，工業廢水，食品，飲料，清洗儀器後之溶液，諸如人造腎，醫學儀器等。

雖然本發明中之濾片並未特定限制其孔徑及不與PPO試劑反應（或僅與不會影響偵測微生物之範圍反應），但較佳的濾片樣品為如薄層狀的濾片，其組成材質諸如聚乙烯叉二氧，聚矽，聚四氟乙烯（PTFE），聚乙烯吡咯啉（PVP），聚醯胺樹脂，尼龍或纖維素衍生物（即醋酸纖維素，硝酸纖維素或其混合物）。且該濾片具有 β -糖苷或聚糖胜肽與PPO試劑反應而易辨色之特性。以纖維素衍生物製成之濾片通常會受 β -糖苷污染，故這使用此種濾片時，必須先檢定是否受到污染，如果已遭受污染，則可以一般之方法加以去除。

有一種商業上使用之濾片可用於本發明，該商業化使用之濾片為Durapore（一種聚乙烯叉二氟濾片，由日本密理博公司生產），HT Tuffryn（一種聚矽濾片，由Gelman Sciences公司生產），Millex（一種聚四氟乙烯濾片，由日本密理博公司生產），Isopore（一種聚乙烯吡咯啉濾片，由日本密理博公司生產），一種聚醯胺樹脂濾片（由Sartorius AG所製備），一種尼龍濾片（由康寧公司製備），醋酸纖維素濾片及硝酸纖維素濾片（由Iwaki Glass

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(5)

公司製備)及MF-Millipore,一種纖維素濾片(由日本密理博公司生產)。

本發明中可因選擇適當的孔徑大小之濾片而測定特定之微生物,例如偵測大腸桿菌與真菌時,則濾片孔徑大小最好為 $0.2\ \mu\text{m}$ 或 $0.45\ \mu\text{m}$,當偵測真菌類諸如酵母菌及黴菌時則濾片孔徑最好為 $1.2\ \mu\text{m}$ 至 $3\ \mu\text{m}$,當測定黴菌時則孔徑最好為 $5\ \mu\text{m}$ 。若樣品中含有多種微生物,包括細菌,則濾液通過孔徑為 $1.2\ \mu\text{m}$ 至 $3\ \mu\text{m}$ 之濾片,後再將濾液通過孔徑為 $0.2\ \mu\text{m}$ 或 $0.45\ \mu\text{m}$ 之濾片,並將後者濾片以本發明之方法偵測之,則只有細菌可被偵測到。

本發明所使用之濾片可為下列任何一種(1)為濾片與支撐架分開的產品,其可分別消毒,及(2)為一種無菌可拋棄式的完整組合型式者。亦可使用一種具有濾片的微定量平碟(即Multiscreen GV Filter Plate為日本密理博公司生產)。

當濾片遭受聚糖生態或 β -糖苷之污染時,必須用一般方法加以去除。

本發明中所使用之PPO試劑為取自昆蟲之體液並含有串級原酚氧化酶之不活化因子並至少可與存在微生物細胞壁之 β -糖苷或聚糖胜肽反應以活化酚類氧化酶。由於PPO試劑會與存在微生物細胞壁上的 β -糖苷反聚糖胜肽反應,故當其用於本發明時可與所謂的協同基質一同併入,該物質可為PPO試劑與 β -糖苷及/或聚糖胜肽反應時可活化酵素的基質,並可因為酵素本身的作用而產生顏色或螢光

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(6)

。 PPO試劑通常是用一般的方法由昆蟲體液中製備得到，而該試劑亦可藉由遺傳重組之方法適當的組合串級原酚氧化酶之不活化因子而製得。

雖然收集昆蟲的體液並無特別的限制，但以能盡可能大量收集且最好依據已建立之方法收集。該昆蟲包括，諸如鱗翅目的煙草天蛾，甜瓜蛾，借古比天蠶蛾，家蠶等雙翅目的麻蠅，秋家蠅等；直翅目的飛蝗，遷徙蝗等及鞘翅目的橘褐天牛等、昆蟲亦不僅限於此，至於體液則以收集昆蟲體腔中之淋巴液最為容易亦最有用。

至於收集上述昆蟲體液可採用例行之方法，即將昆蟲置於冰上以停止其移動，並在其體腔中注入含糖的生理鹽水，該糖成分含有甘蔗因子並包括含有取自甘蔗的葡萄糖、胺苯酸，及其他成分的高分子量物質，將此含甘蔗因子的不純生理鹽水於昆蟲體內停留一段時間，再收集昆蟲體腔中的淋巴液，將淋巴液以離心方式去除血球細胞後進行透析即可得到血漿，該血漿即可用於本發明之PPO試劑。而共同存在的物質可與 β -糖苷反應以增加酵素活性或誘導酵素活性，而其中的物質亦可與聚糖胜肽反應以活化酵素或誘導酵素。因此為以此漿液為PPO試劑時則可測定微生物細胞壁上含有之 β -糖苷及聚糖胜肽成份。此類之試劑亦可做為商業上之用途(例如SLPTM試劑組，為Wako Pure Chemical Industries所生產)。

適當的處理上述之昆蟲漿液後可製備僅與 β -糖苷反

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (7)

應而不與聚糖胜肽反應之PPO試劑或僅與聚糖胜肽反應而不與 β -糖苷反應之PPO試劑，一種只允許特定偵測 β -糖苷之PPO試劑製備法被揭露於JP-A-63-141598 (U.S.P. 4,970,152)中，而一種只允許特定偵測聚糖胜肽之PPO試劑製備法被揭露於JP-A-63-141599 (U.S.P. 4,970,152)。

下列將進一步解釋這些方法。

以上述方法所製得之漿液，有一種共同存在的物質其並不與內毒素反應但可專一性的與 β -糖苷反應以激發或誘導酵素活性，亦有一種物可以專一性的與聚糖胜肽反應以激發或誘導該酵素，為得到可專一性偵測 β -糖苷的PPO試劑，則必須將能與聚糖胜肽反應之物質自漿液中去除；而製備可專一性偵測聚糖胜肽的PPO試劑，則必須將能與 β -糖苷反應的物質自漿液中去除。自上述之漿液中去除能與聚糖胜肽反應而激發或誘導酵素活性之物質的方法或去除能與 β -糖苷反應而激發或誘導酵素活性物質的方法均可將所有的分離與純化步驟例行化而應用於生化領域中，可與聚糖胜肽反應以激發或誘導酵素之物質能藉由具有聚糖胜肽鍵結之親和性屬折法而輕易且有效的加以去除，而可與 β -糖苷反應以激發或誘導酵素之物質亦可藉由有 β -糖苷鍵結之親和性層析法而輕易且有效的加以去除。

本發明之真正操作過程如下：

首先將適當量的樣品以上述適當的濾片過濾之以獲取濾片上包括細菌及真菌(酵母菌及黴菌)等微生物，爾後以

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

適當的清洗液清洗濾片以去除存在樣品除微生物以外之物質，將適量如上述之PPO試劑滴在濾片上並於定義的環境下進行反應，例如0~50℃，較好為20~40℃，一段時間後即可看到濾片顏色的改變。樣品中微生物之量即可被偵測得知或樣品中微生物的濃度亦可藉由該濾片顏色變化及免反應對照與正反應對照之差異而求得。其中負反應對照之試驗為所有的反應試劑與反應步驟均與前述相同，相同樣品，水，緩衝液或其他溶液，但卻不加β-糖苷及聚糖胜肽，而正反應對照測試即所使用之方法與試劑均與前述相同但卻不添加含微生物之樣品。在上述的測定中微生物濃度之半定量結果可藉由不同之正反應對照測試而得知。

在上述之方法中，亦可採用下列之步驟：將較大量之樣品以有過濾裝置之微定量平碟過濾之(例如Multiscreen GV Filter Plate，日本密理博公司製造)，清洗濾片並將之與PPO試劑反應而顏色之改變可以微定量平碟判讀機偵測之，則樣品中微生物的含量或環度即可由觀察結果而判定之。以此方法偵測微生物時可快速且偵測大量之樣品。

而且上述之偵測方法是將樣品以濾片過濾，清洗濾片，再將之與PPO試劑反應，故樣品中幾乎不會有鹽類，可溶性β-糖苷及其類似物以影響偵測結果。

上述方法中所提及之清洗液並沒有特別的限制，只要不會被β-糖苷及聚糖胜肽所污染亦不會破壞濾片之特性即可。較佳的清洗液之實例為水及pH 6至8，含10~

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

150 mM較好是20至40 mM鹽類(例NaCl)之緩衝液(例如Good's緩衝或磷酸緩衝液)。

亦再採用鹼性溶液(10 mM至4 M, 較好為50 mM至1 M)為清洗液以去除不溶性之 β -糖苷, 因此樣品中可能有來自細菌的一些不溶性 β -糖苷, 多糖胜肽, 故可用該清液清洗濾片後再用一般清洗液清洗之即可專一性測得該細菌。

於一個合成脂肪之樣品(例化粧品之乳霜或食品中之奶油等)或含有機溶劑之樣品中偵測細菌或真菌時, 則存在樣品中之干擾物質可藉適當的有機溶劑清洗液清洗濾片而加以去除, 再以上述一般的清洗液清洗即可。

本發明可藉由下列之參考實例及比較實例而進一步詳加說明, 但卻不僅限於此。

第1實例

(1) 試劑及器具

• PPO試劑

該溶液之製備是溶解衍生自蠶淋巴液之PPO試劑(SLP™ reagent, available from Wako Pure chemical Industries, Ltd.; for 3 ml)於6毫升之SLP™試劑組之溶劑中(available from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

• 濾片

採用Millex 4 mm GV(日本密理博公司製造)。

• 水及清洗液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(10)

使用之注射水為Otsuka Pharmaceutical公司生產。

• 3%之氯化鈉溶液

採用之溶液製備時將氯化鈉(Wako Pure Chemical Industries公司生產，特級)溶解並於250℃加熱處理2小時，並將之以注射水調整為3%之濃度。

(2) 樣品

於樣品之製備上，以注射水或3%之氯化鈉溶液調整乳酸菌(乾乳酪酸桿菌)或大腸桿菌之濃度為 10^3 ， 10^4 或 10^5 細胞/毫升之懸浮液。

(3) 偵測過程

將樣品以2 ml之清洗液清洗之，以1 ml欲測定之樣品以該濾片過濾之，再將此濾片以2 ml之清洗液清洗之，隨後再於濾片上滴上0.01 ml之PPO試劑，則濾片上顏色的變化可觀察得到。

(4) 結果

第1圖為以水稀釋之不同濃度的乾乳酪酸桿菌懸浮液之樣品偵測結果，第2圖為以注射水稀釋不同濃度之大腸桿菌懸浮液之樣品偵測結果，第1圖與第2圖均進行負反應對照測試(NC)，並以相同的水製備樣品。

由第1圖及第2圖得知有細胞存在的濾片較負反應對照組呈色為快，且在起始反應10至20分鐘後即可判定反應的有無，而且由結果亦可看出轉乳酪酸桿菌在 10^3 細胞/ml濃度下即可被偵測到，而大腸桿菌在 10^4 細胞/ml之濃度即可測得。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (11)

樣品以3%之氯化鈉溶液製備時，所得到之結果亦相同。

比較實例 1

以已知之方法偵測微生物。

(1) 試劑與器具

- PPO試劑：與第1實例相同
- 水：與第1實例相同
- 2%之氯化鈉水溶液：與第1實例相同
- 測定儀器：使用Taxinometer ET-301 (Wako Pure Chemical Industries公司製造)。

(2) 樣品

與第1實例相同

(3) 偵測方法

將0.1 ml之PPO試劑及0.1 ml濃度為 10^4 細胞/毫升之乾乳酪酸桿菌或大腸桿菌樣品攪拌混合，並利用Toxinometer ET-301偵測Tg值(穿透之光線達到定義值所需之時間)。

(4) 結果

當以水製備乾乳酪酸桿菌或大腸桿菌之懸浮液樣品時，則乾乳酪酸桿菌之Tg值為32.4分鐘，大腸桿菌的Tg值為59.4分鐘。由這些實例中可知反應可正向調整於90分鐘內完成。另一方面當以3%之氯化鈉製備乾乳酪酸桿菌或大腸桿菌之懸浮液樣品時，乾乳酪酸桿菌或大腸桿菌之Tg值均無法在90分鐘內完成，因此該樣品不作正向調整。

上述之測定亦包括負反應對照測試，同樣採用水及3%

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (12)

之氯化鈉以製備樣品，結果並未偵測到Tg值，二者均不需進行正向調整。

從第1實例及比較實例1之結果可知本方法可測定高鹽濃度下之微生物溶液，此為一般傳統方法所無法偵測的。

第2實例

(1) 試劑及器具

• PPO試劑

該溶液之製備是溶解衍生自蠶淋巴液之PPO試劑 (SLP™ reagent, available from Wako Pure chemical Industries, Ltd.; for 3 ml) 於6毫升之SLP™ 試劑組之溶劑中 (available from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

• 濾片

使用3 mm可拋棄式無菌注射針式濾片 (一種尼龍濾片為康寧公司生產)。

• 水及清洗溶液

使用Otsuka Pharmaceutical公司製備之注射水

• 清洗人造腎之溶液

將人造腎上之醋酸有孔纖維 (FB-70A, 由Nipro公司製備) 以注射水浸泡1小時，該水溶液即為清洗人造液之水溶液。

(2) 樣品

以清洗人造腎之溶液或水配置大腸桿菌之樣品使濃度

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(13)

及 10^4 細胞/毫升。

(3) 測定方法

將濾片以2 ml之清洗液清洗後，將0.5 ml之樣品以該濾片過濾之，此濾片再以2 ml之清洗液清洗之，爾後將0.01 ml之PPO試劑滴在濾片上以觀察顏色變化。

(4) 結果

第3圖顯示大腸桿菌之測定結果(以水配置)，第3圖亦有負反應試驗之結果，其包括相同的樣品及製備樣品的水。

由第3圖可知濾片上有細菌者較負反應對照試驗(NC)呈色為快，因此大腸桿菌之濃度可調整至 10^4 細胞/毫升並可將反應進行正或負調整使在啟始反應20分鐘內測得。

樣品以人造腎清洗液配置時，所得之結果與上述相同。

比較實例2

以已知方法偵測微生物

(1) 試劑及器具

- PPO試劑：與第2實例相同
- 水：與第2實例相同
- 清洗人造腎之溶液：與第2實例相同
- 測定儀器：

採用Toxinometer ET-301 (Wako Pure Chemical Industries公司製造)。

(2) 樣品：與第2實例相同

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(14)

(3) 測定方法

將0.1 ml之PPO試劑及0.1 ml之樣品混合攪拌並以Toxinometer ET-301測是Tg值(穿透之光線達到定義值所需之時間)。

(4) 結果

當以水為製備大腸桿菌懸浮液時，則Tg值為59.4分鐘而製備大腸桿菌懸浮液之水用做負反應時，在偵測之90分鐘內並未偵測到Tg值，由此結果可知以水製備大腸桿菌之懸浮液可調整正或負反應使在90分鐘內完成偵測。

另一方面當以人造腎清洗液製備大腸桿菌懸浮液之樣品其Tg值為6分鐘，若以相同之人造腎清洗液為負反應對照偵測時，則存在的微生物無法被測得，此可能由於清洗人造腎之溶液中的 β -糖苷已經溶解所致。

由第2實例及比較實例2可知，本發明可偵測到人造腎清洗液中之微生物但一般傳統方法卻無法測得。

第3實例

(1) 試劑及器具

• PPO試劑

該溶液之製備是溶解衍生自靈淋巴液之PPO試劑(SLP™ reagent, available from Wako Pure chemical Industries, Ltd.; for 3 ml)於6毫升之SLP™試劑組之溶劑中(available from Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

• 濾片

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(15)

採用 Multiscreen GV 過濾平碟 (日本密理博公司製備)

• 水及清洗溶液

使用 Otsuka Pharmaceutical 公司製備之水為注射水

(2) 樣品

以注射水配置細菌懸浮液至一定之濃度 (細胞 / 毫升)

(3) 測定方法

以 0.2 ml 之清洗液清洗 Multiscreen GV 過濾平碟，並用以過濾 0.2 ml 之樣品，當過濾完 0.2 ml 之清洗液後在過濾器下方再放一薄片，並將 0.1 ml 之 PPO 試劑滴入孔穴中於 30°C 下以微量平碟測是吸光度 650 nm 之變化情形以求得其反應啟始時間 (在 650 nm 之下達到預定之 0.2 吸光度所需的反應時間)。

(4) 結果

第 4 圖為樣品中含枯草桿菌之結果，第 5 圖為樣品中含乾乳酪酸桿菌之結果，第 6 圖表示樣品中含不同細菌之結果。

在第 6 圖中 -●- 之曲線表示樣品中含有鏈球菌之結果其屬於革蘭氏陽性之細菌。而 -▲- 表示樣品中含有金黃色葡萄球菌，該菌屬於革蘭氏陽性細；曲線 -□- 表示樣品中含有產氧單胞菌之結果，該菌屬於革蘭氏陰性細菌，及曲線 -△- 表示樣品中含有弧菌之結果，該菌屬於革蘭氏陰性細菌。

由第 4 圖至第 6 圖之結果可知，利用本發明可偵測樣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

品中不同細菌之濃度。

第 4 實例

(1) 試劑與器具

• PPO試劑

同第 3 實例使用者

• 濾片

同第 3 實例使用者

• 水及清洗液

同第 3 實例使用者

(2) 樣品

以含 NaCl 之注射水配置細菌懸浮液使達一定之濃度 (細胞 / 毫升) 。

(3) 測定方法

以 0.2 ml 之清洗液清洗 Multiscreen GV 過濾平碟，並用以過濾 0.2 ml 之樣品，當過濾完 0.2 ml 之清洗液後即在過濾器下方放一薄片，並將 0.1 ml 之 PPO 試劑滴入孔穴中於 30℃ 下以微量平碟測是吸光度 650 nm 之變化情形，以求得其反應啟始時間 (在 650 nm 之下達到預定之 0.2 吸光度所需之反應時間) 。

(4) 結果

結果顯示於第 7 圖，在第 7 圖中曲線 -○- 表示樣品中不含 NaCl 之結果，曲線 -■- 表示樣品中含 100 mM 之 NaCl，及曲線 -△- 表示樣品中含 200 mM NaCl 之結果。

比較實例 3

五、發明說明 (17)

利用已知之方法偵測微生物

(1) 試劑與器具

• PPO試劑

同第 4 實例

• 水

同第 4 實例

• 微量平碟

採用 Lid(3860-096)之 96 孔穴微量平碟 (Iwaki Glass 公司製造)

(2) 樣品

樣品配置法與第 4 實例相同除改變 NaCl 之外。

(3) 測定方法

將 0.1 ml 之 PPO 試劑與 0.1 ml 之樣品混合，並於 30°C 下以微量平碟判讀機測定其 650 nm 吸光度變化以測得啟始時間 (在 650 nm 之下達到預定之 0.2 吸光度所需的反應時間)

(4) 結果

結果圖示於第 8 圖，在第 8 圖中曲線 -○- 表示樣品不含 NaCl 之結果，曲線 -●- 表示樣品中含 25 mM NaCl 之結果，曲線 -□- 表示樣品含 50 mM NaCl 之結果及曲線 -■- 為樣品含 100 mM NaCl 之結果。

由第 7 圖與第 8 圖之比較結果得知本發明之方法可使測含高鹽濃度之樣品，此為一般傳統分法無法達到的。

如同前述，本發明提供一種容易快速且高精確度的測

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (18)

定細菌之方法，利用本發明之方法偵測各種樣品中之微生物可獲得如下之明顯效果，此為一般傳統方法所無法提供的，因此，本發明之貢獻包括：

(1) 可以快速的偵測微生物

偵測可於數小時之內完成

(2) 樣品中之物質與微生物共同存在時並不會影響偵測結果。

PP0試劑常受樣品中鹽濃度及游離的 β -糖苷所影響，因而降低偵測的敏感性。但本發明之方法因有清洗過程故可去除此影響。

(3) 樣品中之微生物可藉由過濾而濃縮

由於樣品必須以濾片過濾，故樣品中之微生物可以被濃縮，因此而增加測定之敏感性。

(4) 可藉由適當的增加正反應對照之數量而進行定量或定性之測試。

(5) 同時可測得活細胞與死細胞。

(6) 可同時測得革蘭氏陽性細菌。

(7) 製備樣品之溶劑不會影響偵測結果

即使樣品溶於有機溶劑中亦可藉由過濾與清洗步驟而測定，並不會受有機溶劑之影響。

(8) 藉由更換不同的PP0試劑而可測得真菌、細菌或二者，

例如使用同時可與 β -糖苷及多肽反應的PP0試劑，則細菌與真菌均可被測得。

若使用只與 β -糖苷反應而不與聚糖肽反應的PP0試劑則可偵測真菌。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (19)

若使用只與聚糖胜肽反應而不與 β -糖苷反應的試劑，則可偵測細菌。

(9) 可藉由濾片之孔徑大小之改變而選擇偵測微生物之種類。

例如當測定細菌及真菌時，則濾片之孔徑大小應為 $0.2\ \mu\text{m}$ 或 $0.45\ \mu\text{m}$ 較佳，當偵測真菌時，諸如酵母菌及黴菌，則濾片孔徑大小為 $1.2\ \mu\text{m}$ 至 $3\ \mu\text{m}$ 較佳，當偵測黴菌時，濾片之孔徑最好大於等於 $5\ \mu\text{m}$ ，若在含多種微生物且包括細菌之樣品中偵測細菌，則樣品應以 $1.2\ \mu\text{m}$ 至 $3\ \mu\text{m}$ 之濾片過濾後，濾液再以 $0.2\ \mu\text{m}$ 或 $0.45\ \mu\text{m}$ 之濾片過濾，再將後者之濾片用以偵測微生物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

409149

88年9月6日 修正
使用昆蟲淋巴液來偵測微生物之方法

A5
B5

四、中文發明摘要 (發明之名稱：

使用昆蟲淋巴液來偵測微生物之方法)

可藉由一種方法以高精確度，簡單且快速地偵測到樣品中之微生物，該方法包括將樣品以濾片過濾之，清洗濾片，令濾片上之殘留物與一昆蟲淋巴液反應 (該淋巴液含有原酚氧化酶生物階之不活化型式因子)，並根據顏色變化來偵測樣品中之微生物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱：

PROCESS FOR DETECTING MICROORGANISM)
USING INSECT HEMOLYMPH

Microorganisms in a sample can be detected easily and rapidly with high precision by a process which comprises filtering the sample through a filter, washing the filter, reacting the residue on the filter with an insect hemolymph containing inactive type factors of the pro-phenol oxidase cascade, and detecting the microorganisms in the sample on the basis of the color change thus caused.

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

409149

88年9月6日 修正
使用昆蟲淋巴液來偵測微生物之方法

A5
B5

四、中文發明摘要 (發明之名稱：

使用昆蟲淋巴液來偵測微生物之方法)

可藉由一種方法以高精確度，簡單且快速地偵測到樣品中之微生物，該方法包括將樣品以濾片過濾之，清洗濾片，令濾片上之殘留物與一昆蟲淋巴液反應 (該淋巴液含有原酚氧化酶生物階之不活化型式因子)，並根據顏色變化來偵測樣品中之微生物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱：

PROCESS FOR DETECTING MICROORGANISM USING INSECT HEMOLYMPH)

Microorganisms in a sample can be detected easily and rapidly with high precision by a process which comprises filtering the sample through a filter, washing the filter, reacting the residue on the filter with an insect hemolymph containing inactive type factors of the pro-phenol oxidase cascade, and detecting the microorganisms in the sample on the basis of the color change thus caused.

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種偵測微生物之方法，其包含以濾片過濾含有微生物之樣品，清洗濾片，令濾片上之殘留物與含有原酚氧化酶生物階之不活化型式因子的昆蟲淋巴液起反應，並根據顏色變化來偵測樣品中之微生物。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該昆蟲淋巴液為一種只與 β -糖苷反應而不與聚糖胜肽反應的淋巴液。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該昆蟲淋巴液為一種只與聚糖胜肽反應而不與 β -糖苷反應的淋巴液。
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該顏色變化係以眼觀辨識之。

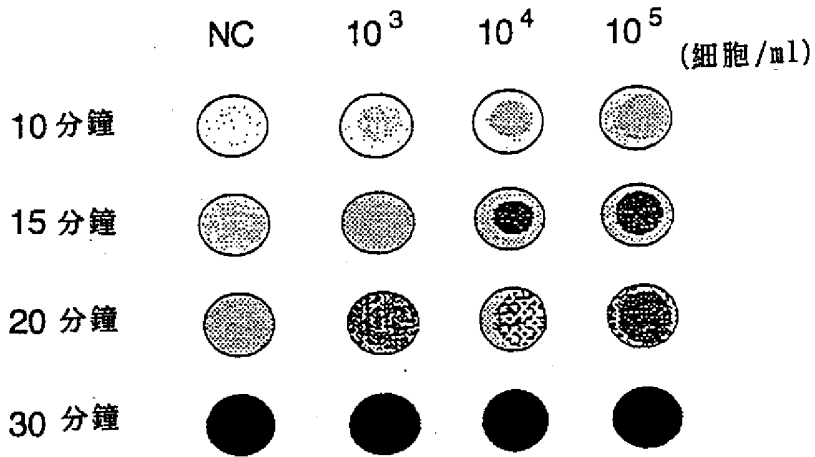
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

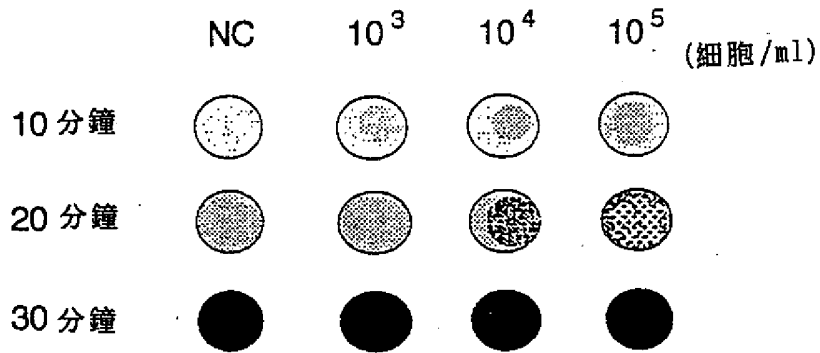
訂

公告本

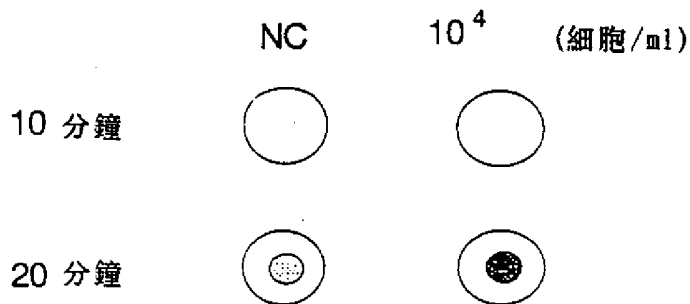
第 1 圖



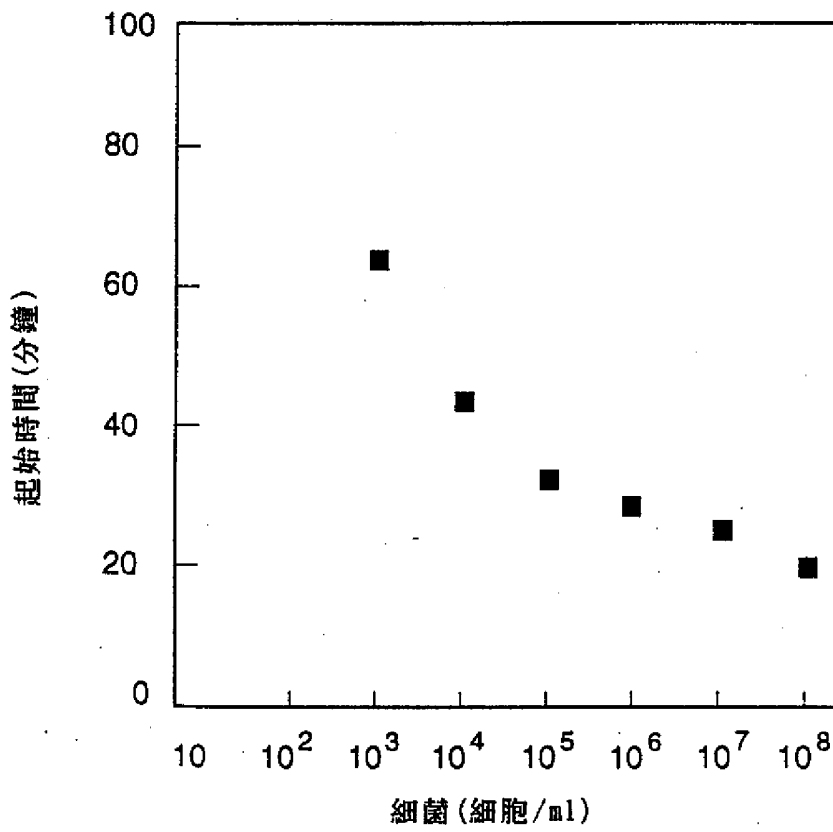
第 2 圖



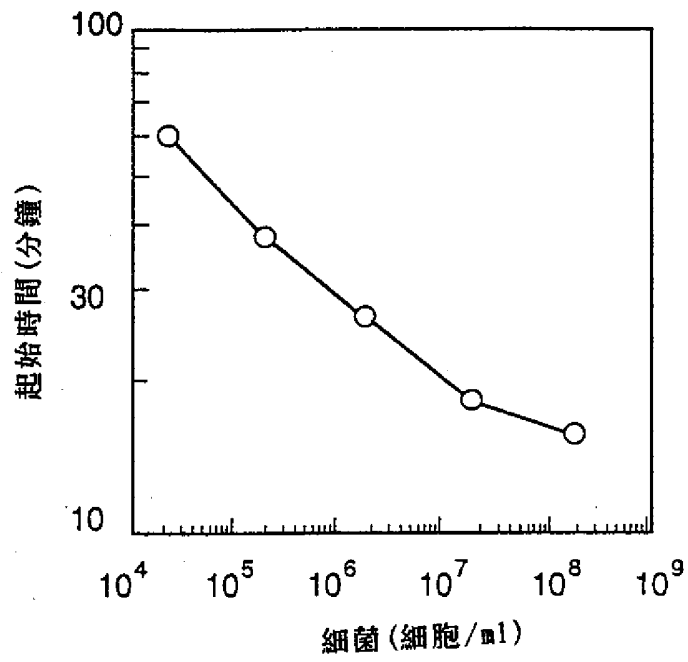
第 3 圖



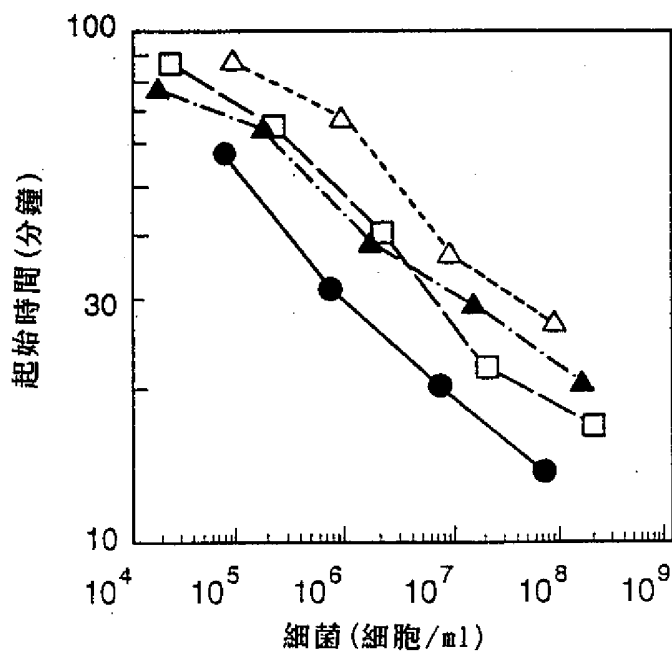
第 4 圖



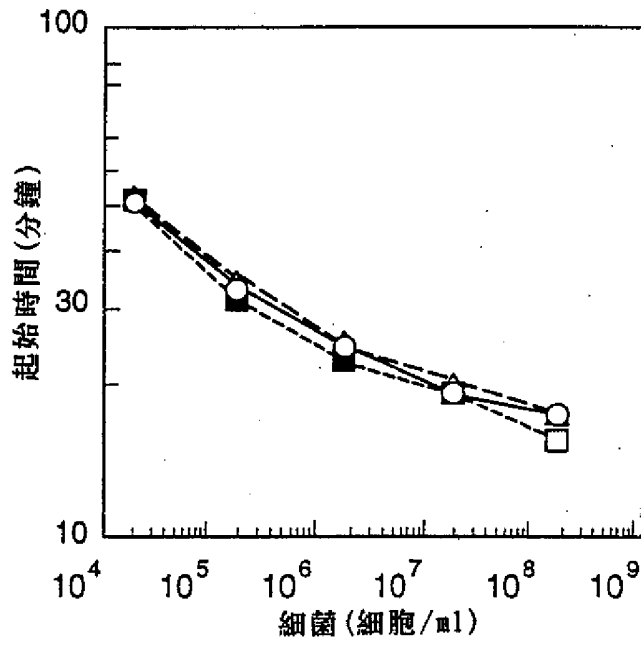
第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖



第 8 圖

