



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104379760 B

(45)授权公告日 2018.03.16

(21)申请号 201380029083.0

阿克塞尔.A.俞

(22)申请日 2013.04.04

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104379760 A

代理人 赵蓉民

(43)申请公布日 2015.02.25

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/620,823 2012.04.05 US

C12Q 1/02(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.02

(56)对比文件

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/035291 2013.04.04

US 7205100 B2,2007.04.17,

WO 2011160887 A1,2011.12.29,

US 6323337 B1,2001.11.27,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/152203 EN 2013.10.10

蔡红星等.3.3'二乙基硫脲三碳菁化碘拉曼光谱研究.《光谱学与光谱分析》.2010,第30卷(第12期),3244-3248.

(73)专利权人 BD公司

地址 美国新泽西州富兰克林湖

陶家平等.流式细胞计在免疫荧光测量中去除死细胞影响的方法.《生物化学与生物物理进展》.1990,第17卷(第1期),298-301.

(72)发明人 李晓 张永强

肯尼思.安东尼.高夫

约翰.D.曼特罗

威廉.艾尔弗雷德.波普 石松

审查员 吕小蒙

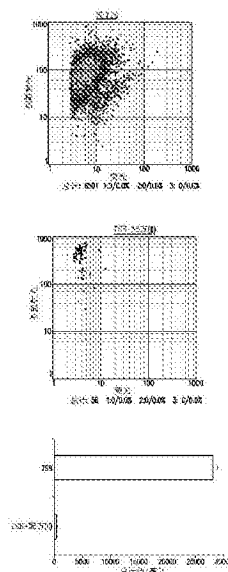
权利要求书4页 说明书13页 附图18页

(54)发明名称

用于流式细胞术的样品制备

(57)摘要

这里描述的是用于识别和分析样品中的至少一种微生物(例如细菌)以及降低当通过流式细胞术分析样品时获得的背景信号强度的方法和试剂。通过结合样品与减少背景信号的分子或与和淬灭剂以共价键连接的核酸染色剂来制备样品。样品中的一部分颗粒物质可以在利用核酸染色剂染色之前可选择地利用树脂去除。

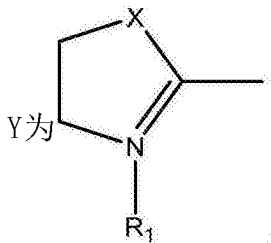


1. 一种针对活的微生物的量分析样品的方法, 包含:

获得针对至少一种目标微生物的存在或不存在的待测样品;

制备样品;

加入包含过量的减少背景信号的分子的减少背景信号的物质, 其中所述减少背景信号的分子选自具有结构 $Y-(CH=CH)_n-CH=Z$ 的分子或者它的盐, 其中,



并且是以苯基取代的, 或融合至选自苯基或萘基的芳族部分, 或是

未取代的;

n是0或者直到5的整数;

X是碳或者硫;

R₁可选择地是氢、具有1-6个碳原子的烷基、亚硫酸基或者烷基胺, 并且可以进行选择以便使减少背景信号的分子进入活目标微生物的细胞渗透性降低; 并且

Z与Y相同或不同;

加入渗透和标记微生物的目标活细胞的核酸染色剂; 以及

分析制备好的样品,

其中减少背景信号的分子以与核酸染色剂类似的方式和类似的效率与非目标颗粒结合, 并且其中所述方法不以诊断为目的。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中样品选自食物样品、环境样品、化妆品样品和生物样品。

3. 根据权利要求1所述的方法, 其中当与样品结合时, 减少背景信号的分子的浓度为从0.1 μM到50 μM。

4. 根据权利要求1所述的方法, 其中当与样品结合时, 减少背景信号的分子的浓度为从0.1 μM到10 μM。

5. 根据权利要求1所述的方法, 其中当与样品结合时, 减少背景信号的分子的浓度为从0.5 μM到5 μM。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中加入核酸染色剂之前, 与样品一起培养减少背景信号的分子2分钟到1小时。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中加入核酸染色剂之前, 与样品一起培养减少背景信号的分子2分钟到30分钟。

8. 根据权利要求1所述的方法, 其中加入核酸染色剂之前, 利用样品培养减少背景信号的分子2分钟到5分钟。

9. 根据权利要求1所述的方法, 其中猝灭剂附加于减少背景信号的分子。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中减少背景信号的分子是半花菁或者闭链花菁。

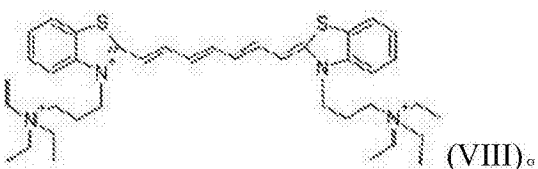
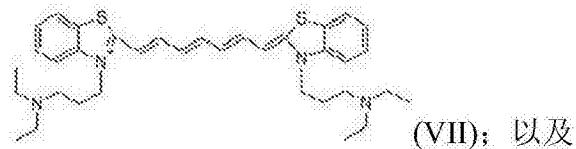
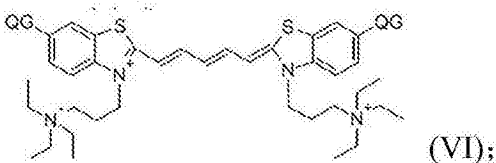
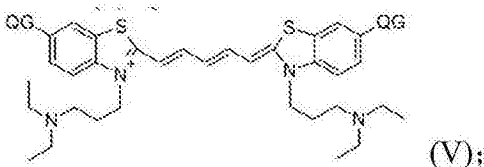
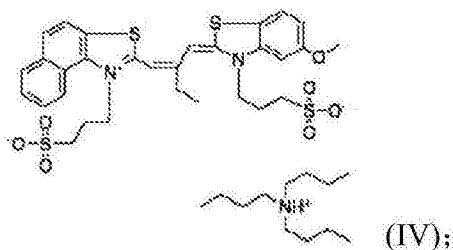
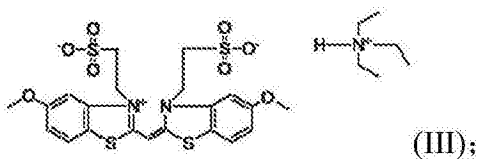
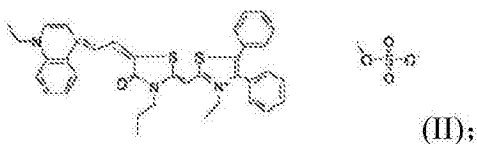
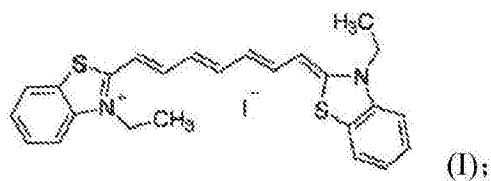
11. 根据权利要求1所述的方法, 其中n是0或者直到3的整数。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中Y融合至选自苯基或萘基的芳族部分,

其中苯基或萘基可以是未取代的或是以1-6个碳原子的-O-烷基或QG基取代的,其中所述QG基是荧光信号猝灭基团。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中n是0或者直到3的整数;X是硫,R₁是烷基胺。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述减少背景信号的分子选自:



15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述减少背景信号的分子与核酸染色剂相继加入或者与核酸染色剂同时加入。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述制备好的样品通过流式细胞术进行分析。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中背景信号强度降低至少90%。

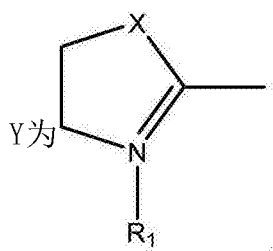
18. 根据权利要求16所述的方法, 其中背景信号强度降低至少70%。

19. 根据权利要求16所述的方法, 其中背景信号强度降低至少50%。

20. 一种组合物, 包含与样品结合的减少背景信号的物质以及渗透和标记所述样品中的目标微生物的目标活细胞的核酸染色剂, 所述减少背景信号的物质降低流式细胞术测定中结合了所述减少背景信号的事物的样品的背景信号强度, 其中所述减少背景信号的物质包含结合所述样品中的非目标颗粒的分子, 其中所述样品选自食物样品、环境样品、化妆品样品和生物样品, 并且包含复杂基质和至少一种微生物,

其中所述分子以与所述核酸染色剂结合所述非目标颗粒类似的方式和类似的效率结合所述非目标颗粒; 并且

其中减少背景信号的分子具有结构 $Y-(CH=CH)_n-CH=Z$ 或者它的盐, 其中,



并且是以苯基取代的, 或融合至选自苯基或萘基的芳族部分, 或是

未取代的;

n 是0或者直到5的整数;

X 是碳或者硫;

R_1 可选择地是氢、亚硫酸基或者烷基胺, 或者如果 Y 是以苯基取代的则 R_1 是1-6个碳原子的烷基; 并且可以进行选择以便使减少背景信号的分子进入活目标微生物的细胞渗透性降低; 并且

Z 与 Y 相同或不同。

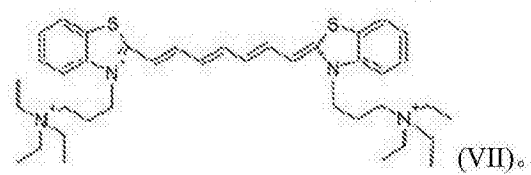
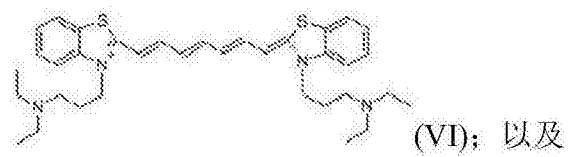
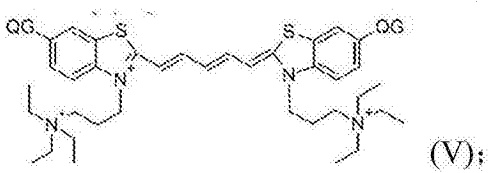
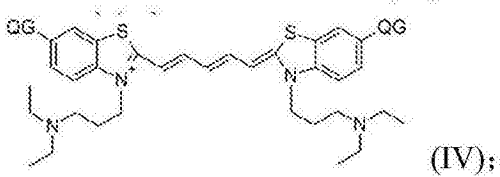
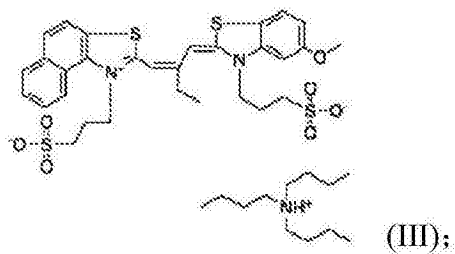
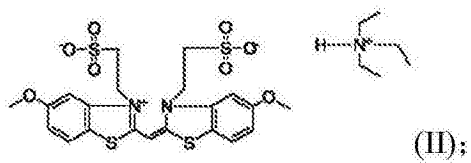
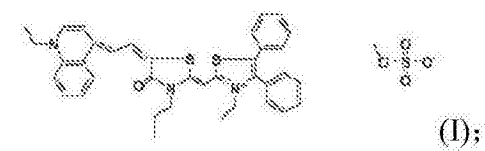
21. 根据权利要求20所述的组合物, 其中 n 是0或者直到3的整数。

22. 根据权利要求20所述的组合物, 其中 Y 融合至选自苯基或萘基的芳族部分,

其中苯基或萘基可以是未取代的或是以1-6个碳原子的-O-烷基或QG基取代的, 其中所述QG基是荧光信号猝灭基团。

23. 根据权利要求22所述的组合物, 其中 n 是0或者直到3的整数; X 是硫, R_1 是烷基胺; 并且 Y 融合至选自苯基或萘基的芳族部分。

24. 根据权利要求20所述的组合物, 其中所述减少背景信号的分子选自



用于流式细胞术的样品制备

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年4月5日提交的美国第61/620,823号临时专利申请的申请日的权益,并且本申请与2013年3月13日提交的美国第61/779,766号临时申请相关,该申请与本申请是共同拥有的,这两个申请的公开的内容通过参考结合于此。

背景技术

[0003] 确定特定样品中活的生物体的身份和总数非常重要。通过监督和食物中致病菌的鉴定快速、有效、准确地监控和确保食物和供水的安全尤为重要。

[0004] 总活的生物体(total viable organism, TVO)测定是实现上述目标的一种这样的方法。目前, TVO测定技术作为一种质量控制应用广泛用在工业微生物学领域。例如, TVO测定用于监控消费类食物产品——例如肉类——中的细菌数量和类型。TVO方法也可以用于监控饮用水中的细菌群落。当然, 监控食品和饮用水对保障食品和供水消费安全是至关重要的。

[0005] TVO测定的步骤总体上包括: 1) 获取测样品; 以及2) 在放置在适宜容器中的琼脂(一种凝胶状的营养基)上培养样品或者直接涂覆样品。这样, 微生物得以生长, 并且基于形成于琼脂之上的菌落数, 可以计算多个菌落形成单位(CFU)。仅在菌落生长的允许时间之后, 可以计算CFU。计算CFU时, 通常要将样品进行稀释, 并考虑该稀释因数(即样品和总体积的体积比率)。

[0006] 也可以将样品放置于各种各样的琼脂板上培养, 琼脂板含有不同类型的选择性培养基以帮助隔离目标微生物, 并且更准确和可靠地确定存在何种类型的微生物。选择性试剂(例如抗生素, 抗真菌药剂等)将消除某些非目标微生物(例如, 不感兴趣的细菌)。如果形成来自于许多不同类型的微生物的群落, 则这样可以避免可能产生的假性结果的可能性。

[0007] 选择性试剂还可以优于其他试剂促成某些类型的微生物的生长。尽管TVO测定考虑到检测不同的微生物种群——例如不同的细菌种群, 但食品和环境微生物学家必须经常在枚举和鉴定两者之间在没有二者的选择能力的情况下进行选择。虽然可以增加选择性试剂以促成特定群组的菌类的生长, 但是TVO测定经常要基于在富营养培养基中繁殖正常的健康细胞的能力(即没有选择性)。因此, TVO具有测量被测样品中微生物总数或微生物的群组的能力。然而, 因为缺乏区分特定微生物的能力, TVO整体来看可以是对于微生物种群来说是相对非特异性的。

[0008] 识别特定微生物, 尤其是病原体可用的方法很多。这样的方法广泛应用于临床环境。检测微生物的方法经常依赖于微生物培养的富集以增加目标微生物的数量, 以及允许受损微生物的恢复。当使用选择性和区分性平皿培养(plating)时, 研究人员能够将目标生物体从背景微生物群落中区分开来。然而, 结果几乎总是不可计数的。换言之, 仅可以确定特定的细菌种群的存在或者不存在, 而非数量。

[0009] 利用样品富集和选择性平皿培养二者都是很耗时的测定, 它们在甚至可以得到初步的结果之前, 也经常要花费数天时间。尽管这样的富集或者选择性平皿培养是确定样品

中微生物的数量和种类的最基本的程序,但要在计数琼脂上生长的菌落后典型地花费数天得到最终的结果。得到结果所花费的时间的总量是利用最基本的TV0测定的最显著的缺陷。

[0010] 通过取消选择性和区分性平皿培养步骤来试图缩短检测时间的不同方法已经得到开发。这些方法包括DNA杂交,凝集,以及酶免疫分析法。尽管这些可供选择的技术已经缩短了用于检测的时间,但培养富集步骤仍然是必须的,原因在于这些方法只允许目标病原体的 10^3 - 10^4 CFU的最终检测。因此,对于TV0测定来讲,对于假定地阳性结果的确认仍然是必须的。

[0011] 进一步来说,不存在用于分析生物样品——尤其是食物样品——以检测多种微生物的存在或者不存在的通用方法或者单一技术。这使得在用于微生物的测定前用于从生物样品中的微生物的分离和随后的浓缩的样品制备步骤成为用于病原体——包括食物源性病原体——的检测的分子方法中的限制步骤。

[0012] 至于用于微生物的分离的特异性样品制备技术,利用离心法然后进行洗涤和过滤步骤的技术是不利的,因为在处理过程中,它们会导致微生物的显著损失或者对微生物的损伤。进一步来说,整个程序不适合于自动化操作。

[0013] 为实现从样品中分离微生物,已经使用针对特定微生物的亲合剂。然而,用于从复杂基质中隔离微生物的亲合剂的有效利用也是很复杂的,原因如下:1) 缺乏从其他的样品组分中选择性地结合所有的生物体的通用亲合剂;2) 对于通用的亲合试剂,结合不同的生物体的亲和性的变化性;3) 很难将结合后的生物体洗脱回到溶液中。

[0014] 其他用于识别食品和水中的病原体的技术也是公知的。例如,有报道称流式细胞术作为一种快速确定微生物的数目和识别微生物的技术。最初,流式细胞术是用于分离和分析真核细胞种群的方法,但也已经用于评估和检测微生物。具体地,已经例如利用核酸染料进行荧光染色的微生物穿过一束光。对感兴趣的微生物唯一的图案通过光的吸收和散射二者的组合来实现。(Breeuwer等人发表在环境微生物应用(Appl. Environ. Microbiol.), 61 (4):1614-9 (1995年4月版)中的啤酒酵母中通过细胞内酯酶的导致荧光产物积累的荧光素二乙酸酯和二醋酸羧基荧光素的吸收和水解表征(Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *S.cerevisiae*); de Boer&Beumer发表在国际食品微生物杂志50 (1-2):119-30 (1999年9月版)中的食物源性微生物的检测和归类方法(Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms))。

[0015] 流式细胞术的主要优点在于它操作起来快速、简单。流式细胞术适用于不同类型的样品和方法,成为了也适应于自动化操作的稳健应用。许多流式细胞术应用已经出现在工业生物技术、食品和药品质量控制、饮用水和废水系统的常规监测以及土壤和天然水生环境的微生物生态研究也就不足为奇了。

[0016] 然而,流式细胞术具有其他局限性,例如为检测而对标记目标微生物进行染色的需要,设备的高昂成本以及对人员的专门的培训的需要。对于检测的进一步的限制是由以下方面强加的:非特异性荧光的干扰,小于最佳检测极限,将该方法应用于固体或者颗粒状食品样品的困难,对区分活的和死亡的细胞的无能——处分使用专门的着色,以及会在样品处理过程中发生的细胞存活率的破坏(Quintero-Betancourt等人在微生物方法杂志(J. Microbiol. Methods), 49 (3):209-24 (2002年5月版)中发表的隐孢子虫和环孢子虫:检

测水传播寄生虫的实验室方法综述 (Cryptosporidium parvum and Cyclospora cayetanensis: a review of laboratory methods for detection of the waterborne parasites))。该技术的广阔且常规的利用已经开始减轻这些缺陷。

[0017] 其他实际问题也属于流式细胞术,特别是在分析来自于被称为“复杂基质”的生物或者环境样品的情况下。复杂基质可以由包括颗粒物质的物质组成,其中颗粒物质干扰生物或者环境样品中微生物的检测。用于检测样品中微生物的核酸染料可以非特异性地结合样品基质中的这样的颗粒物质,产生一个高背景荧光信号。这一高背景使得识别和分析样品中的低浓度的微生物变得困难。

[0018] 如在buttry等人的美国专利第7,205,100号中已有描述的——该专利的全部内容通过参考结合于此,通过在感兴趣的样品中混合目标特异性荧光染料和荧光猝灭剂可以降低由渗透膜生成的荧光背景和荧光信号。然而,在一些含有细胞外颗粒的样品基质中——细胞外颗粒具有对目标特异性荧光染料的非特异性亲和力,荧光背景就不能被荧光猝灭剂有效猝灭。另外,在含有大量具有对目标特异性荧光染料的非特异性亲和力的细胞外颗粒的样品中,绝大多数目标特异性染料将非特异性地结合这些颗粒,结果溶液中就不会有足够的染料分子用来标记目标生物体。

[0019] 因此,人们寻求解决针对利用流式细胞术检测样品中微生物的存在或不存在的当前方法的缺点的方法。

发明内容

[0020] 本发明涉及一种在样品中识别至少一种微生物的存在或不存在的方法。如此处所描述的,首先获得针对至少一种微生物的存在或不存在的待测样品,然后制备该待测样品用于待进行的测定。使用活着的或者死亡的生物体二者可渗透的荧光核酸染色剂标记用于流式细胞术研究的悬浮液中的细胞。然而,当悬浮液里的目标细胞具有来自于非特异性地结合核酸染料的样品基质的颗粒物质时,会不利地影响这样的流式细胞术的检测灵敏性。这里描述了一些掩盖和/或者去除溶液中的来自那些干扰颗粒的荧光信号并随后提高检测灵敏度的途径。

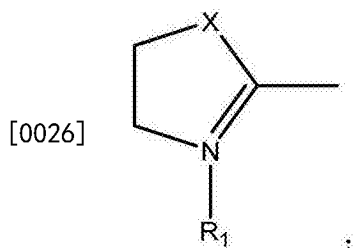
[0021] 在一个实施例中,分析样品用来确定活的微生物的数量的方法包括获得样品,以及制备样品用于检测样品中活的微生物的存在或不存在的测定。在一个实施例中,测定是TVO测定。作为样品制备的一部分,样品中加入过量的减少背景信号的分子。核酸染色剂透过活细胞(也加入样品中),减少背景信号的分子不会渗透样品中的活细胞,但是在制备的样品中具有与渗透活细胞的核酸染色剂(其也加入到样品中)类似的对样品中的非活细胞(例如死细胞,细胞碎片)和其他非细胞物质的结合能力。制备好的样品进行总活的生物体的测定。

[0022] 这里预期的减少背景信号的分子的示例是半花菁或者闭链花菁。这样的分子包括基本花菁结构,该结构具有含有至少一个氮原子的五元杂环。基本花菁以结构(I)进行说是:

[0023] $Y-(CH=CH)_n-CH=Z$

[0024] 结构(I),或者是它的盐。

[0025] 其中,Y是:



[0027] n为0或者直到大约5的整数；在一些实施例中，n为0或直到大约3的整数；

[0028] X是碳或者硫。

[0029] 并且R1可选择地是氢，具有1到6个碳原子的烷基，亚硫酸基(sulfite moiety)或者烷基酰胺。在某些实施例中，选择R1来降低进入活的目标微生物的减少背景信号的分子(background-signal reducing molecule)的细胞渗透性。

[0030] Z和Y相同或不同。无论是否相同，Z还包括Y的五元杂环。如果Z和Y不同，那么差别在于五元杂环取代基。

[0031] 可选地，Y部分(moiety)具有与其融合的苯或者苯衍生物。苯或者苯衍生物可以是取代的或者是未取代的。这里使用的苯衍生物，包括多环芳族部分，例如萘。在其他的实施例中，五元环结构具有喹诺酮取代基。喹诺酮取代基也可以是取代的或者未取代的。

[0032] 在另一个实施例中，分析样品以确认活的微生物数量的方法包括获得样品和为TV0测定制备样品。与荧光淬灭剂以共价键连接的不渗透活的细胞的核酸染色剂加入到样品中。渗透活的细胞并且没有与荧光淬灭剂以共价键连接的核酸染色剂也加入到样品中。不渗透活的细胞的核酸染色剂可以通过光谱重叠淬灭核酸染料的荧光信号。

[0033] 在又一实施例中，用于TV0测定的样品的制备包括使用树脂的至少部分颗粒物质从复杂基质中的去除。在一个实施例中，使用树脂的至少部分颗粒物质从复杂基质中的去除包括获得样品以及结合样品与树脂。随后，树脂携带来自样品的至少一部分颗粒物质从样品中去除。样品中加入渗透活的细胞的核酸染色剂。制备好的样品之后用于进行总活的生物体的存在和数量的测定。在一个实施例中，使用树脂的颗粒物质的去除可以在加入过量的减少背景信号的分子之前使用，或者在加入与荧光淬灭剂以共价键连接的核酸染色剂之前使用。

[0034] 本发明的进一步的实施例包括：在包含至少一个减少背景信号的分子或者与淬灭剂以共价键连接的核酸染色剂的样品中检测至少一个微生物的试剂盒；核酸染色剂；以及可选择地树脂。试剂盒与样品结合并且经受将确定样品中的活的微生物的存在或不存在的测定。

附图说明

[0035] 图1A-1C阐述了利用或未利用分子式(II)的分子处理过的样品中的背景信号的量。

[0036] 图2A-2C阐述了在利用核酸染色剂处理之前或者在利用核酸染色剂的同时增加的利用或未利用分子式(II)处理过的样品中的背景信号的量。

[0037] 图3阐述了在各种浓度下利用或未利用分子式(II)处理过的样品中的背景信号的量。

[0038] 图4阐述了在加入核酸染色剂之前,在各个时间点培养的利用或未利用分子式(II)处理过的TSB样品中的背景信号量。

[0039] 图5A-5E阐述了在利用或未利用分子式(I),(III),或者(IV)处理过的TSB样品中的背景信号量。

[0040] 图6A-6D阐述了在利用核酸染色剂之前或者利用核酸染色剂的同时增加的利用或未利用分子式(I)处理过的TSB样品中的背景信号量。

[0041] 图7A-7D阐述了利用或未利用分子式(I)或者(II)处理过的工艺用水样品中的背景信号量。

[0042] 图8A-8F阐述了利用或未利用分子式(I)处理过的拭子样品中的背景信号量。

[0043] 图9A和9B展示了流式细胞术分析的强度图,其阐述了利用在BD FACSMicroCount(BD全自动即时微生物计数分析仪)进行的标准水测试方法,在利用或未利用5 μ M碘化丙啶的情况下的活的生物体的浓度。

[0044] 图10A和10B展示了流式细胞术分析的强度图,其阐述了在利用或未利用5 μ M碘化丙啶的情况下在水样品中刺入大约15,000cfu/ml的大肠杆菌时的活的生物体的浓度。

具体实施方式

[0045] 这里描述的是通过部署用于样品分析的流式细胞术来改善已知的测定——例如TVO测定——的方法。取自食品、化妆品和土壤样品的样品,由于“复杂基质”中的颗粒物质所产生的干扰,会难以用流式细胞术进行精确分析。这里使用的复杂基质是具有与测定无关的显著量的原料的样品。对于这里预期的测定,这些无关的原料包括死亡的细胞,细胞碎片和样品中除活的微生物之外的其他样品组成。这里描述的方法以对于检测低水平的病原体或者分散的污染物必要的方式改进样品制备,其可能减轻或者甚至省略测定前富集样品培养的需要。

[0046] 具体地,这里描述的方法和分子在使含有目标微生物的可疑的样品经受针对目标微生物的存在或不存在的检测的测试或者测定之前,改善了样品的质量。使用这里所描述的方法的优势包括但不限于:便于多种微生物菌株的检测;去除了基质相关的测定抑制剂;去除了干扰基质颗粒;提高了检测信号强度或者提高了读取检测信号的能力以及减小了考虑到更多典型的食用分量和/或小培养基体积的食品样品尺寸的使用的必要样品尺寸。

[0047] 这里所描述的用于样品制备的方法和试剂有利于低水平的病原体或分散的污染物的检测。该方法和试剂减少或者甚至消除了对检测富集样品培养以提高检测可用的微生物的量或者以便在样品测定之前加速微生物生长的需要。

[0048] 这里所描述的方法和分子通过从样品中去除会干扰针对目标微生物/病原体/细菌的测定的基质相关的抑制剂来浓缩样品中的目标微生物/病原体/细菌(如果存在的话)。这里所描述的方法和试剂还提高了从样品中获得的表征目标微生物/病原体/细菌的存在或不存在的信噪比。所描述的方法是有优势的,原因在于它们是通用的(例如对多种类型的基质和目标微生物/病原体/细菌均适用)。所描述的方法简单、快捷和廉价。此外,这里所描述的方法降低了由于加入到样品中的检测染料与目标微生物/病原体/细菌和剩余基质组分或死亡的目标细胞二者的交叉反应而可能出现的假阳性或者阴性结果的概率。

[0049] 过量的减少背景信号的分子

[0050] 在一个实施例中,针对活的微生物的量分析样品的方法(TVO)包括如下步骤:i)获得样品,ii)制备样品,通过加入过量的减少背景信号的分子;以及通过加入渗透活的细胞的核酸染色剂。减少背景信号的分子不会渗透活的细胞,但该分子具有与核酸染色剂类似的与制备好的样品的结合性能。然后分析制备好的样品。

[0051] 这里所描述的方法预期获得样品。样品可以是例如环境样品,食物样品,化妆品样品,或者生物样品。这些类型的样品通常以含有例如土壤碎片细胞外基质这样的各种颗粒物质的复杂基质的形式。

[0052] 利用针对待分析的特定类型的样品的且对所属技术领域的技术人员公知的已知技术制备待分析的样品。正因如此,在这里不再详细说明样品制备技术。在一个示例性实施例中,制备肉类样品的过程包括首先混合样品与缓冲液。用于混合肉类与适当的缓冲液以获得肉类提取物的标准方案的使用预期为适合用在这里所描述的方法中。利用多种技术完成混合,这些技术是例如把肉类样品加入到合适体积的磷酸盐缓冲稀释水中,再转移至均质袋(stomacher bag)(<50 μ M过滤器90-Interscience公司样品均质器系统(Interscience Bag system):111625或者等价物)中,并且在均质器(例如Tekmar (Seward) 拍打式匀质器(Stomacher Lab Blender 400)或等价物)中混合。这样的方案对所属技术领域的技术人员来说是公知的,这里不再详细描述。这样的方案的示例在USDA网站(<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microiab/mIgchp3.pdf>)中进行了描述,该内容通过参考结合于此。

[0053] 样品制备之后,在制备好的样品中加入过量的减少背景信号的分子,该分子不渗透活的细胞但是具有与核酸染色剂类似的结合性能。因为减少背景信号的分子不渗透活的细胞,所以只有细胞可渗透的核酸染色剂可以标记活的细胞,并产生来自细胞的荧光信号。非特异性地结合染料的干扰颗粒结合核酸染色剂和这里所描述的分子二者。减少背景信号的分子可以为基质中核酸染色剂与颗粒物质的结合而竞争,颗粒物质例如细胞外颗粒、死亡的细胞等等,并且因此减少了当样品通过流式细胞术进行分析时由核酸染色剂的非特异性结合导致的荧光信号。

[0054] 减少背景信号的分子的量不做限制,只要多于核酸染色剂以便对于实质上结合复杂基质样品中的所有颗粒物质顺利地和核酸染色剂竞争。由于过量的减少背景信号的分子可以顺利地 and 核酸染色剂竞争并结合样品中的颗粒物质,核酸染色剂与颗粒物质的非特异性结合减少,降低了非特异性荧光强度。同样地,这里所描述的“过量浓度”是定性的,并且相对于添加到样品中的核酸染色剂的量。所属技术领域的技术人员可以容易地确定待添加的减少背景信号的分子的量以减缓、降低或者消除针对特定应用的核酸染色剂与非目标颗粒的不期望的非特异性结合。

[0055] 在一个实施例中,当与样品结合时,减少背景信号的分子的浓度是大约0.1 μ M到大约50 μ M。在另一个实施例中,当与样品结合时,减少背景信号的分子的浓度是大约0.1 μ M到10 μ M。在又一个实施例中,当与样品结合时,减少背景信号的分子的浓度是大约0.5 μ M到5 μ M。

[0056] 在一个实施例中,不渗透活的细胞但是具有和核酸染色剂类似的结合性能的过量的减少背景信号的分子在细胞可渗透的核酸染色剂之后或者同时加入到待分析的样品中。在另一个实施例中,减少背景信号的分子在核酸染色剂的加入之前加入。

[0057] 在减少背景信号的分子加入样品中之后,可以培养混合物。在一个实施例中,培养混合物大约2分钟到大约1小时。在另一个实施例中,培养混合物大约2分钟到大约30分钟。在又一个实施例中,培养混合物大约2分钟到大约5分钟。

[0058] 减少背景信号的分子的结构不做限制,只要该分子可以与复杂基质样品中的颗粒物结合,当通过流式细胞术进行分析时减少背景荧光信号,并且不会明显渗透活的微生物细胞即可。对减少背景信号的分子的化学结构以降低细胞渗透性的修改——包括例如在分子内加入例如酸性黑48和台盼蓝这样的带电分子——对所属技术领域的技术人员来说是公知的,并且在此不再进行详细说明。

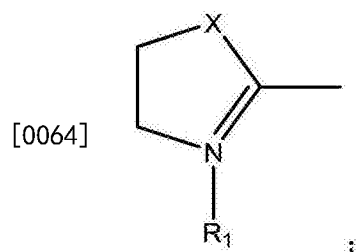
[0059] 在一个实施例中,将猝灭剂附加于减少背景信号的分子。具有附加的猝灭剂的减少背景信号的分子将附加到减少背景信号的分子的结合部位。猝灭剂将猝灭充分接近猝灭剂的、非特异性地结合样品中的颗粒物质的任何核酸染料的荧光信号。具有附加于其上的猝灭剂的减少背景信号的分子以双重方式进一步减少背景信号:i)通过占去样品中非目标物质上的结合部位;以及ii)通过猝灭来自于结合样品中的非目标物质的任何目标染料的信号。猝灭剂的选择取决于用于检测和分析微生物细胞的核酸染料的类似,并且可以包括例如台盼蓝和结晶紫。荧光猝灭剂对所属技术领域的技术人员来说是公知的,因此在这里不再进行详细说明。

[0060] 这里预期的减少背景信号的分子的示例是半花菁或者闭链花菁。这样的分子包括基本花菁结构,该结构具有包含至少一个氮原子的五元杂环。基本花菁结构如结构(I)所示:

[0061] $Y-(CH=CH)_n-CH=Z$

[0062] 结构(I)或者其盐,

[0063] 其中,Y是:



[0065] n是0或直到大约5的整数;在一些实施例中,n是0或者直到大约3的整数。

[0066] X是碳或者硫;

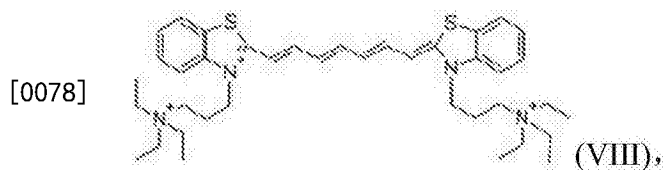
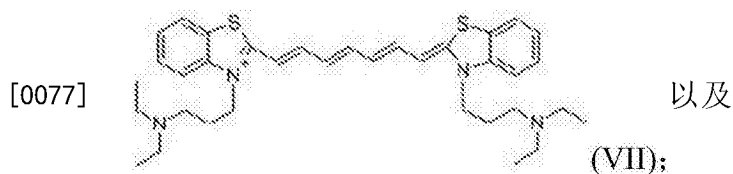
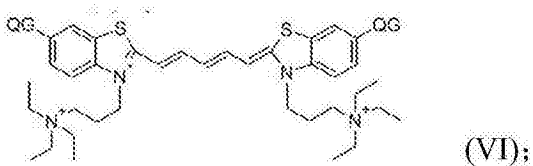
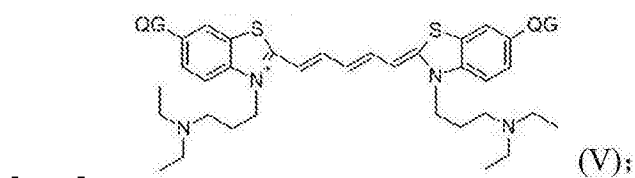
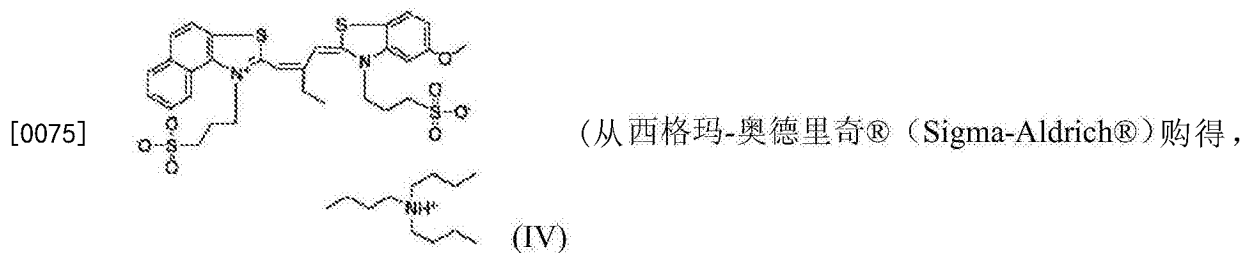
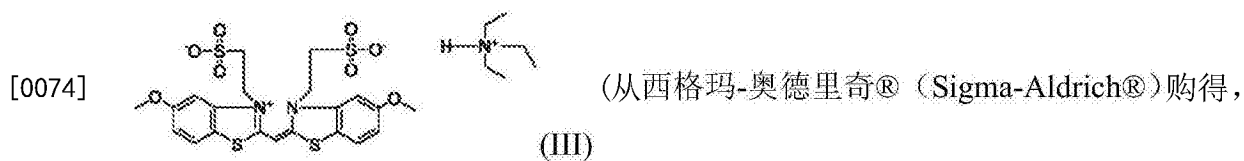
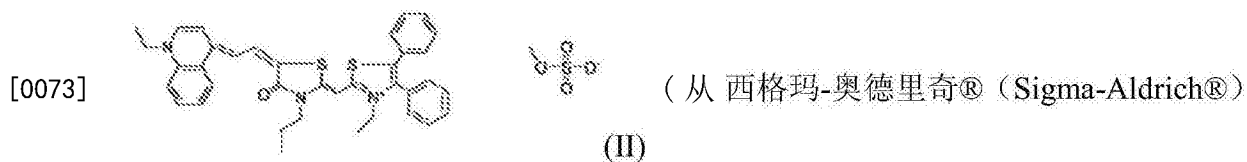
[0067] 并且R₁可选地是氢,含有1-6个碳原子的烷基,亚硫酸基或者烷基酰胺。在某些实施例中,选择R₁以降低减少背景信号的分子向活的目标微生物的细胞渗透性。

[0068] Z和Y相同或不同。无论相同或不同,Z还包括Y的五元杂环。如果Z和Y不同,那么差异在五元杂环的取代基。

[0069] 可选地,Y部分具有与其融合的苯或者苯衍生物。苯或者苯衍生物可以是取代的或未取代的。这里使用的苯衍生物,包括多环芳香部分,例如萘。在其他实施例中,五元环结构具有喹诺酮取代基。喹诺酮取代基也可以是取代的或未取代的。

[0070] 在一个实施例中,减少背景信号的分子包括结构(I)的化合物,其中n直到3,X为硫,R₁是烷基酰胺,并且Y具有苯环部分或者与其融合的苯部分衍生物。

[0071] 在一个实施例中,减少背景信号的分子包括如下中的至少一个:



[0079] 其中, QG表示荧光信号猝灭基团。

[0080] 为检测样品中微生物的存在, 在样品中加入核酸染色剂。这样的染色剂——例如

Invitrogen公司的SYTO® 13——对所属技术领域的技术人员来说是公知的。当选择染色剂时,所属技术领域的技术人员将考虑以下因素:i)感兴趣的微生物(例如革兰氏阳性,或者革兰氏阴性),部署下游测定用于确定样品中的微生物的存在或不存在;以及iii)针对样品成分,已选染色剂和其他染色剂之间的对比分析。当选择染料染色剂用于这里所描述的方法时,所属技术领域的技术人员会意识到其他考虑。核酸染色剂可以与利用减少背景信号的分子的培养同时加入或者在培养之后加入。

[0081] 在利用核酸染色剂着色后,然后利用流式细胞术针对目标微生物的存在或不存在分析样品。流式细胞术的使用对所属技术领域的技术人员来说是公知的,并且在此不再说明。在Hammes,F.等人发表在分析和生物化学杂志(Anal.Bioanal.Chem.),2010年第397卷,1083-1095页的“测量水中细菌的细胞计数方法:优势,误区和应用(Cytometric methods for measuring bacteria in water:advantages,pitfalls,and applications)”中描述了流式细胞术分析的说明,其内容通过参照结合于此。整个过程也可以自动化操作。这里所描述的方法使用于流式细胞术的样品制备方案适应于包括提高样品中的目标物质(例如,活的微生物)的信背比的物质的添加。

[0082] 这里所描述的方法和分子降低了当核酸染色剂非特异性地结合包含复杂基质的样品中的颗粒物质时获得的背景信号强度。背景信号强度的降低不亚于未加入这里所描述的分子和树脂的同样的样品的背景信号强度的降低。在一个实施例中,背景信号强度降低了至少大约90%。在另一个实施例中,背景信号强度降低了至少大约70%。在再一个实施例中,背景信号强度降低了至少大约50%。

[0083] 以共价键连接核酸染色剂的猝灭剂

[0084] 在一个实施例中,分析样品以确定活的微生物的量的方法包括:i)获得样品;ii)制备样品;iii)加入以共价键连接荧光猝灭剂的核酸染色剂;iv)加入不包含猝灭剂且渗透活的细胞的核酸染色剂;以及v)分析制备好的样品。

[0085] 在该实施例中,一些核酸染色剂以共价键连接不允许染色剂渗透活的细胞并且可以通过光谱重叠猝灭核酸染色剂的荧光信号的荧光猝灭剂。由于具有猝灭剂的核酸染色剂不会渗透活的细胞,只有不具有猝灭剂的细胞可渗透核酸染色剂可以标记活的细胞。例如死亡的细胞或其他干扰微粒这样的可以非特异性地结合核酸染色剂的颗粒物质占去具有猝灭剂的核酸染色剂和不具有猝灭剂的核酸染色剂二者。染色剂-猝灭剂分子与不具有与其结合的猝灭剂的染料竞争在颗粒物质上的结合部位。染色剂-猝灭剂分子与颗粒物质的结合降低了将由被颗粒物质占去的核酸染色剂以其它方式发出的荧光信号的强度。

[0086] 在一个实施例中,过量的具有猝灭剂的核酸染色剂随后或同时与不具有猝灭剂细胞可渗透的核酸染色剂一起加入到待分析样品中。在另一个实施例中,具有猝灭剂的核酸染色剂在不具有猝灭剂的核酸染色剂的加入之前加入。在这个实施例中,不具有猝灭剂的核酸染色剂不与具有猝灭剂的核酸染色剂针对颗粒物质上的结合部位产生竞争。

[0087] 使用树脂去除颗粒物质

[0088] 在一个实施例中,生物样品的制备包括在分析之前利用树脂去除复杂基质中的至少一部分颗粒物质。用于至少一部分颗粒物质的去除的方法在2013年3月13日提交的美国专利申请第61/779,766号文献中进行了描述,其内容以其整体通过参考结合于此,并且其与本申请是共同拥有的。简单地说,美国专利申请第61/779,766号文献中描述的方法和试

剂从通常描述为拥有复杂基质的其他样品成分(例如绞碎的牛肉、鸡蛋、牛奶、泥土、化妆品等)中分离样品中的微生物,并在使含有目标微生物的可疑的样品经受针对目标微生物的存在或不存在或量的检测的测试或测定之前提高样品品质。在本发明的另一个实施例中,树脂用于调节或降低利用下游样品测定分析的复杂基质的干涉。

[0089] 各种树脂在所属技术领域中公知的,并且特定树脂的选择将取决于待分析的生物或环境样品的本质。在进行测定之前,可以通过例如过滤这样的技术去除树脂,但是所使用的特定技术大部分是设计选择的问题并且取决于树脂的种类和样品制备。所属技术领域的技术人员将给予这些和其他因素选择合适的分离技术。在一个实施例中,可以在所描述的方法的实践中使用例如由罗门哈斯公司(Rohm&Haas)制造的XAD树脂,尤其是XAD-4树脂——其是苯乙烯和二乙烯基苯的非功能性共聚物——这样的非功能性树脂。

[0090] 在一个实施例中,使用流式细胞术分析树脂并且树脂去除之后的样品。例如核酸染色剂或其他荧光染料这样的适合的染色剂在树脂去除之后并在流式细胞术之前与样品结合。染料促进流式细胞术中对测定目标的检测。例如猝灭这样的增强技术也可以用来进一步改善测定的完整性。

[0091] 使用树脂去除颗粒物可以在利用核酸染色剂对样品进行染色的制备中单独使用,也可以与这里所描述的各种方法和分子结合使用。例如,使用树脂去除颗粒物可以在加入这里所描述的过量减少背景信号的分子之前完成,或者在加入同样这里所描述的与猝灭剂以共价键连接的核酸染色剂之前完成。

[0092] 在一个实施例中,使用树脂从复杂基质中去除至少一部分颗粒物包括:i)获得样品;ii)结合样品和树脂;iii)去除至少一部分颗粒物从样品中粘附的树脂;iv)加入过量的减少背景信号的分子;v)加入渗透活的细胞的核酸染色剂;以及vi)分析生物样品。

[0093] 在另一个实施例中,使用树脂从复杂基质中去除至少一部分颗粒物包括:i)获得样品;ii)结合样品和树脂;iii)去除至少一个部分颗粒物从样品中粘附的树脂;iv)加入与猝灭剂以共价键连接的核酸染色剂;v)加入渗透活的细胞的核酸染色剂;以及vi)针对样品中活的微生物的存在、不存在或量测定制备好的样品。

[0094] 试剂盒

[0095] 本发明的进一步实施例包括用于样品中的至少一种微生物的检测的商业化试剂盒,包含下述中的至少一个:减少背景信号的分子或与猝灭剂以共价键连接的核酸;核酸染色剂;以及可选择地,树脂核酸。

[0096] 提供以下示例进一步阐明本发明的某些实施例。正因为如此,就所使用的材料、组合物和条件而言不限制这些示例。其他适合的修改以及通常遇见的对所属技术领域的技术人员来说显而易见的条件和参数的改变的适应都在这里所描述的本发明的精神和范围内。

[0097] 示例

[0098] 如上所述,用来检测和分析样品中微生物的存在的核酸染色剂可以非特异性地结合包含复杂基质、导致高背景信号强度的样品中的特定物质。设计示例1-9用来证实当通过流式细胞术分析时,这里所描述的各种减少背景信号的分析对于减少复杂基质中的背景信号强度的功效。在示例1-9中的每一个中,使用包含各种类型的颗粒物质的复杂基质(例如胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB),工艺用水,拭子样品),其中加入了减少背景信号的分子。为

了进行比照,制备仅具有样品基质而没有增加减少背景信号的分子的对照样品。然后在每个样品里都加入核酸染色剂。然后用流式细胞术分析样品以确定减少背景信号的分子是否降低了由核酸染色剂与样品基质中的颗粒物质的非特异性结合导致的背景信号强度。由于流式细胞术设计为仅检测与颗粒或细胞结合的荧光信号,所以来自减少背景信号的分子和核酸染色剂的保持在溶解状态的任何残留荧光信号都将不会被检测到。

[0099] 在示例10中,使用与上述针对示例1-9相同的一般程序,但是,细菌被刺入样品基质中。设计该示例用于证实减少背景信号的分子不仅降低背景信号强度,也不会干扰样品中的活的微生物的检测。示例1-10在下文中详细讨论。

[0100] 示例1

[0101] 分子式(II)的分子加入到胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)从而制成5 μ M的最终浓度。混合物培养30分钟,然后加入0.2M的最终浓度的核酸染色剂Syto®62。用流式细胞术分析混合物。作为对照,也测试了只含有TSB和核酸染色剂但是不含分子式(II)的分子的样品。结果如图1A-1C所示,并且证实了背景信号从在仅有TSB的样品中的6591个计数下降到了在混有分子式(II)的分子的样品中的58个计数。这证实了背景信号(即来自与样品颗粒结合的染料的信号)降低了大约99%。

[0102] 示例2

[0103] TSB中加入分子式(II)的分子以制成TSB中的5M的最终浓度。混合物要么在加入0.2M的最终浓度的核酸染色剂Syto®62之前培养5分钟,要么与核酸染色剂同时加入而没有预培养。通过流式细胞术分析混合物。作为对照,也检测了只有TSB和核酸染色剂但是不含分子式(II)的分子的样品。结果如图2A-2C中所示,并且证实了背景信号从仅具有核酸染色剂的TSB中的6436个计数降低到同时混有分子式(II)的分子和染色剂的TSB中的3062个计数。这证实了背景信号降低了大约51%。然而,当在加入核酸染色剂之前,与TSB混合、培养分子式(II)的分子时,背景信号减少至486个计数,背景信号几乎降低了92%。

[0104] 示例3

[0105] 分子式(II)的分子加入到TSB中至0.5M、1.67M或5M的最终浓度。在加入0.2M的最终浓度的核酸染色剂Syto®62之前,该混合物培养60分钟。通过流式细胞术分析混合物。作为对照,也测试了仅包含TSB和核酸染色剂而没有分子式(II)的分子的样品。结果如图3所示,并且证实了背景信号的减少取决于减少背景信号的分子的浓度。另外,在减少背景信号的分子的最低浓度情况下,背景信号至少降低了82%。

[0106] 示例4

[0107] 分子式(II)的分子加入到TSB中至5M的最终浓度。在加入0.2M的最终浓度的核酸染色剂Syto®62之前,混合物培养2分钟或5分钟。通过流式细胞术分析混合物。作为对照,也测试了仅包含TSB和核酸染色剂而没有分子式(II)的分子的样品。结果如图4所示,并证实了背景信号的减少取决于利用减少背景信号的分子的培养的时间。另外,在2分钟的培养时间的情况下,背景信号至少降低了75%。

[0108] 示例5

[0109] 分子式(I)、(III)和(IV)的分子加入TSB中以制成5 μ M的最终浓度。在0.2 μ M的最终浓度时加入核酸染色剂Syto®62之前,混合物培养30分钟。通过流式细胞术分析混合物。作为对照,也测试了仅含有TSB和核酸染色剂而没有减少背景信号的分子的样品。结果如图

5A-5E所示。在流式细胞术分析中,每一种减少背景信号的分子都降低了背景信号至少55%,并多达94%。

[0110] 示例6

[0111] 在TSB中加入分子式(I)的分子以制成5 μ M的最终浓度。混合物要么在加入0.2

[0112] M的最终浓度的核酸染色剂Syto®62之前培养2分钟或5分钟,要么与核酸染色剂同时加入而没有预培养。通过流式细胞术分析混合物。作为对照,也测试了仅包含TSB和核酸染色剂而没有分子式(I)的分子的样品。结果如图6A-6D所示,证实了在包含减少背景信号的分子的所有样品中背景信号的减少。对于其中减少背景信号的分子和核酸染色剂同时混合的样品,背景信号减少了大约34%。当在加入核酸染色剂之前,利用减少背景信号的分子预培养样品时,背景信号的减少量增加。对于分别培养5分钟和2分钟的样品,背景信号减少了大约89%和93%。

[0113] 示例7

[0114] 在工艺用水中加入分子式(I)和(II)的分子以制成5 μ M的分子最终浓度。在0.2 μ M的最终浓度时加入核酸染色剂Syto®62之前,混合物培养30分钟。然后,通过流式细胞术分析混合物。作为对照,也测试了仅包含工艺用水和核酸染色剂而没有分子式(I)和(II)的分子的样品。结果如图7A-7D所示,并且证实了当在流式细胞术分析之前利用这里所描述的减少背景信号的分子培养包含工艺用水的样品时,背景信号减少至接近于零。

[0115] 示例8

[0116] 此处所描述的减少背景信号的分子用来减少来自各种拭子样品的背景信号。由聚氨酯或者泡沫材料制作的拭子在5 μ M的最终浓度的分子式(I)的分子的溶液中培养30分钟。然后,在混合物中加入0.2 μ M的最终浓度的核酸染色剂Syto®62。通过流式细胞术分析混合物。最为对照,也测试了只含有拭子和核酸染色剂而没有分子式(I)的分子的样品。分析了三个区域,即区域1,区域2和区域3,这三个区域分别代表了典型地由霉菌、细菌和酵母菌栖居的区域。结果如图8A-8F所示,并证实了对于两种类型的拭子,每一区域中的背景信号均显著减少。

[0117] 示例9

[0118] 在BD FACSMicroCount(BD全自动即时微生物计数分析仪)上使用不具有活的微生物的纯净水样品用于流式细胞术分析。样品中加入标准的BD MicroCount TV0试剂(缓冲剂,生物量染色剂,其是细胞可渗透核酸嵌入荧光染料,BRAG3),然后通过仪器进行分析。如图9A所示,计算强度图中的环形门区域(circled gate area)中的事件,从而报告活的微生物的浓度(计数/毫升)。

[0119] 如图9A所示,在仪器上使用标准水测试方法,门中的290个计数/ml报告为该水样品中的总活的生物体浓度。然而,在将水样品完成覆盖并在恒温器中培养10天后,在R2A琼脂板中没有发现细菌群落。在门中的颗粒代表非特异性结合生物量染色剂并发荧光的背景颗粒。

[0120] 在加入MicroCount生物量染色剂之前,在同一批水样品中加入5 μ M碘化丙啶(PI)。相同设置的仪器用于分析水样品。如图9B中所示,门中的152个总计数报告为样品中的总活的生物体浓度。在该情况下,由于PI也是核酸嵌入分子,所以过量的PI可以阻止生物量染色剂的结合,并降低背景计数。尽管PI是一种荧光染料,但对研究来说不需要分子的荧光特

征。由于PI不会被FACSMicroCount系统中的红色激光激发,所以PI的荧光特征也就不会干扰MicroCount生物量染色剂。

[0121] 示例10

[0122] 水样品中刺入大约15,000cfu/ml的大肠杆菌(E.coli),然后通过FACMicroCount、利用标准水测试方法分析刺入的样品。在门中的3283个总计数报告为总活的生物体浓度。结果如图10A所示。

[0123] 在加入生物量染色剂之前,在水样品中刺入约15,000cfu/ml的E.coli和并在样品中加入5 μ M的PI。门中的3067个总计数报告为总活的微生物浓度,并且该结果不亚于来自不具有PI的添加的样品的结果。结果如图10A所示。由于PI不可渗透活的E.coli能力,而生物量染色剂细胞可渗透的染料,因此,PI的加入不会干扰通过生物量染色剂的活的细菌细胞的染色。

[0124] 尽管本发明在这里已经针对特定实施例进行了描述,但应当理解的是这些实施例仅仅说明本发明的原则和应用。因此理解为可以对说明的实施例作出各种修改以及在不背离由权利要求限定的本发明的主旨和范围的情况下可以作出许多修改。

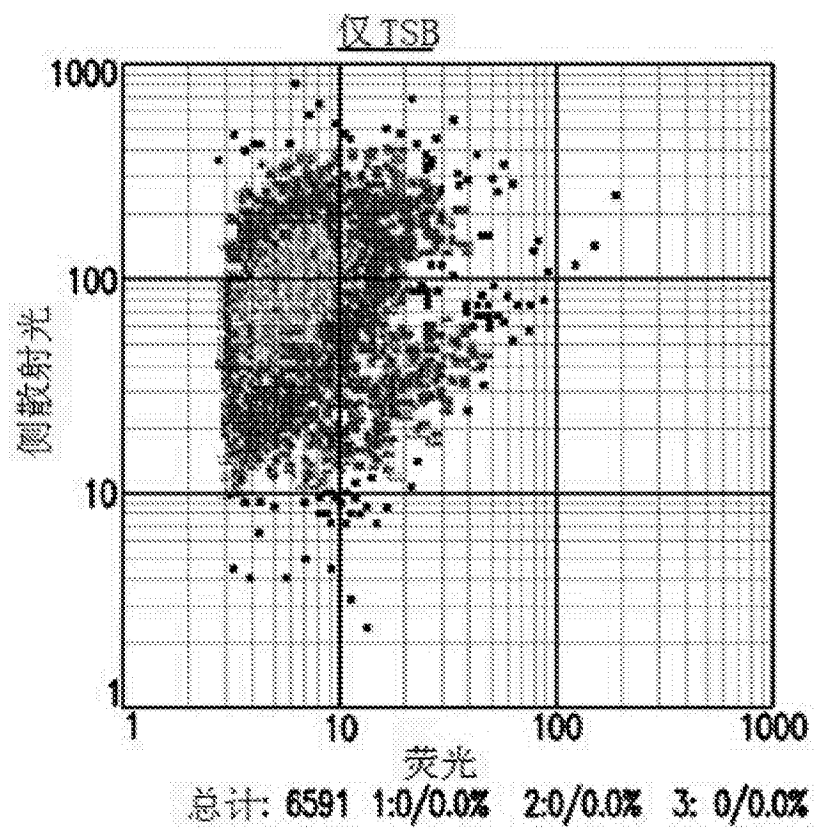


图1a

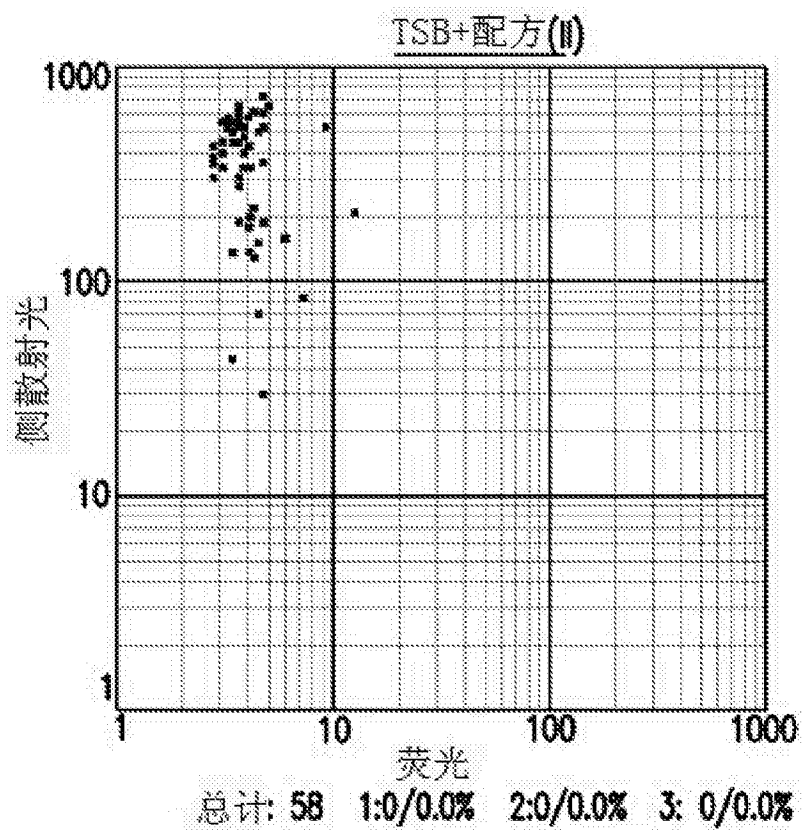


图1b

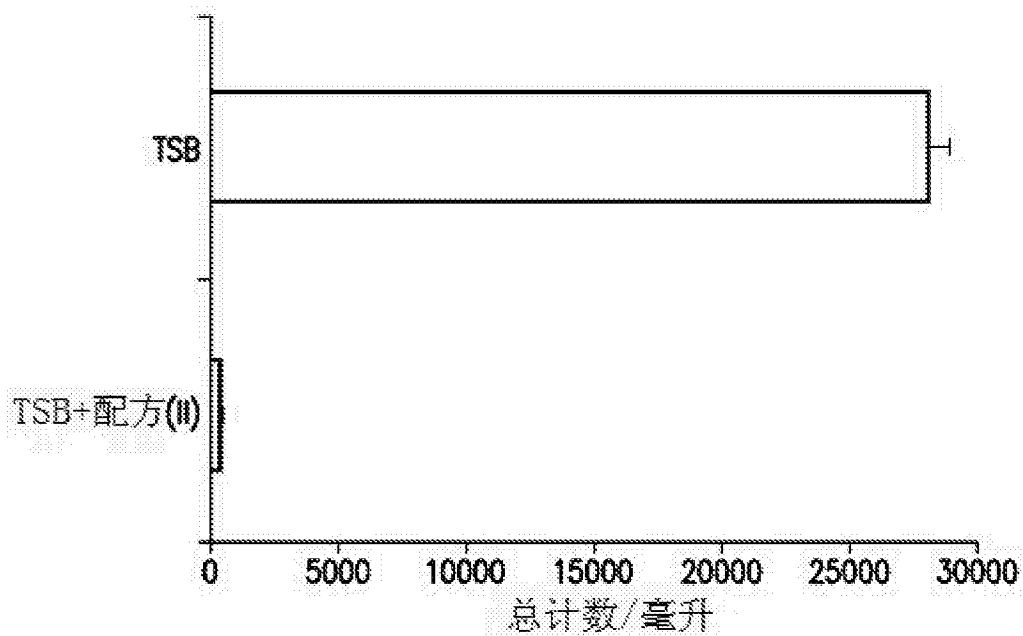


图1c

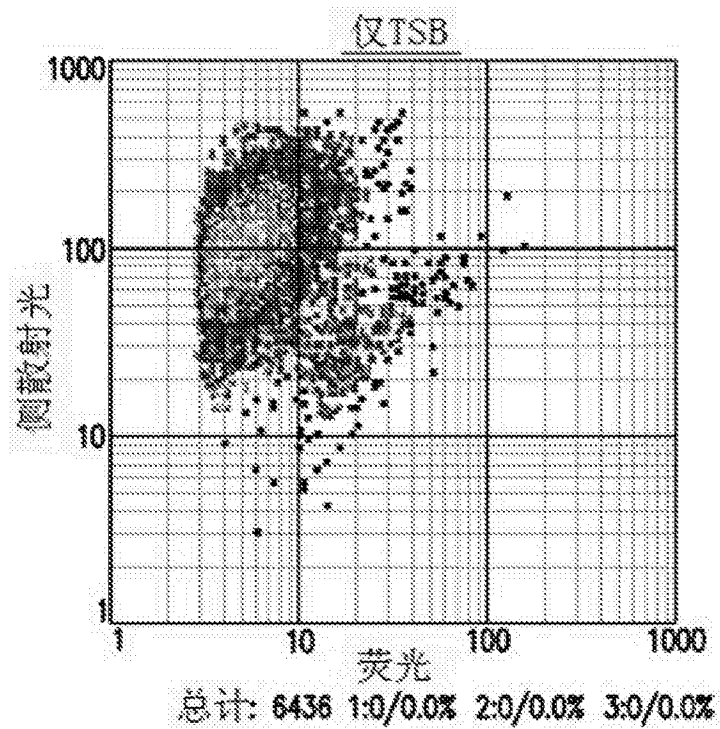


图2a

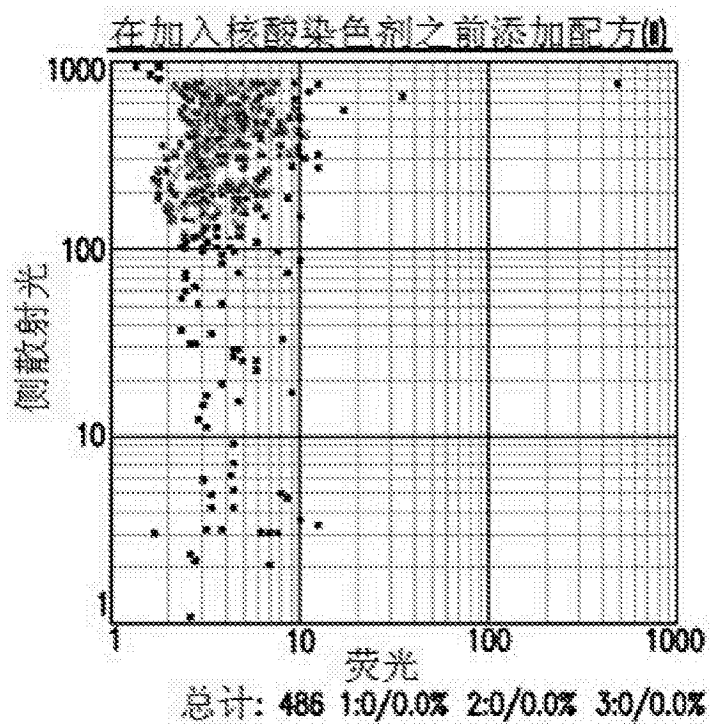


图2b

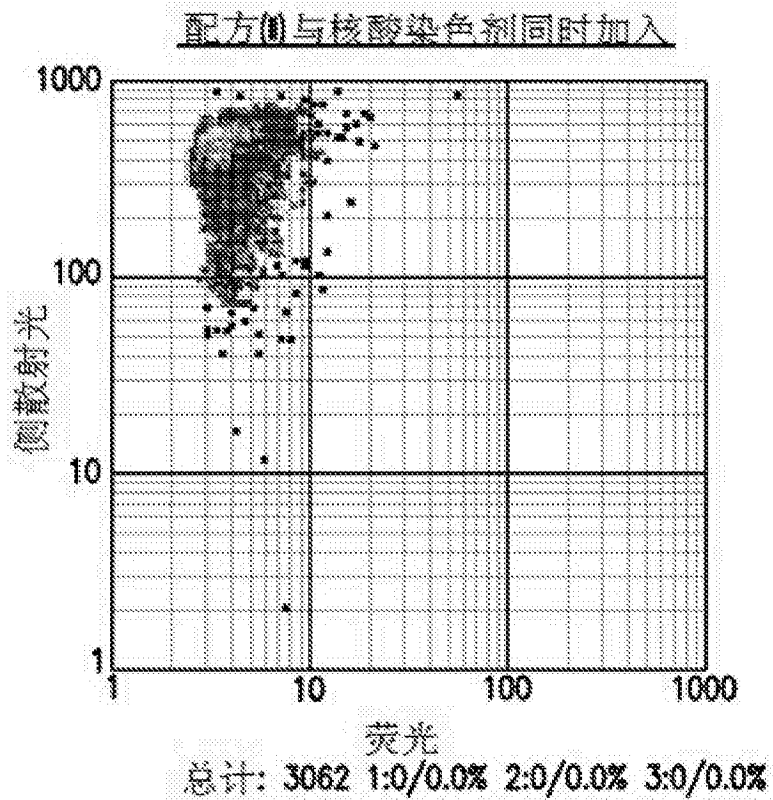


图2c

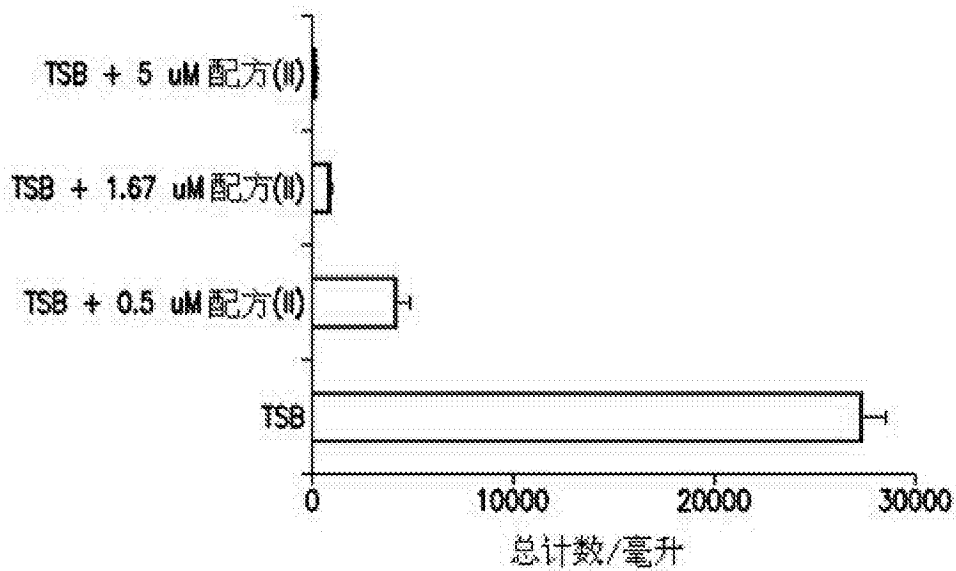


图3

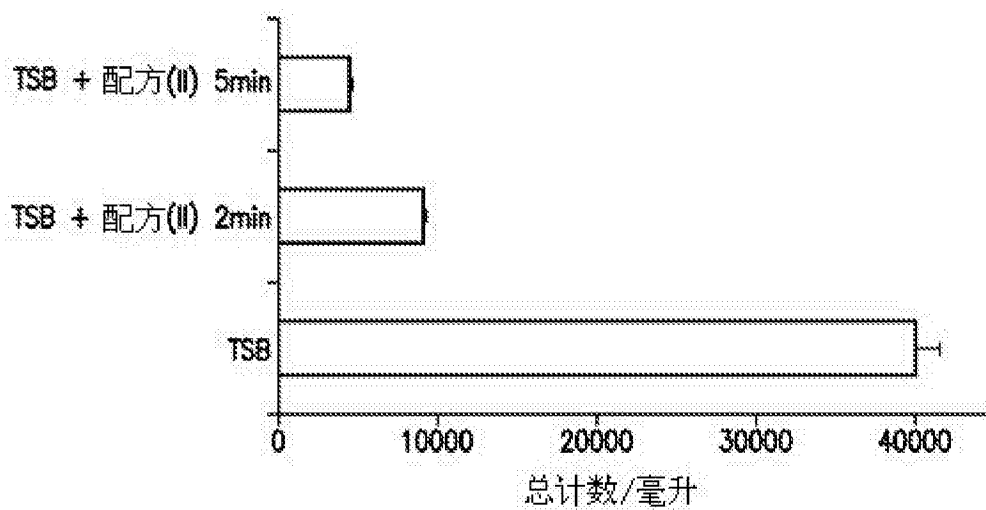


图4

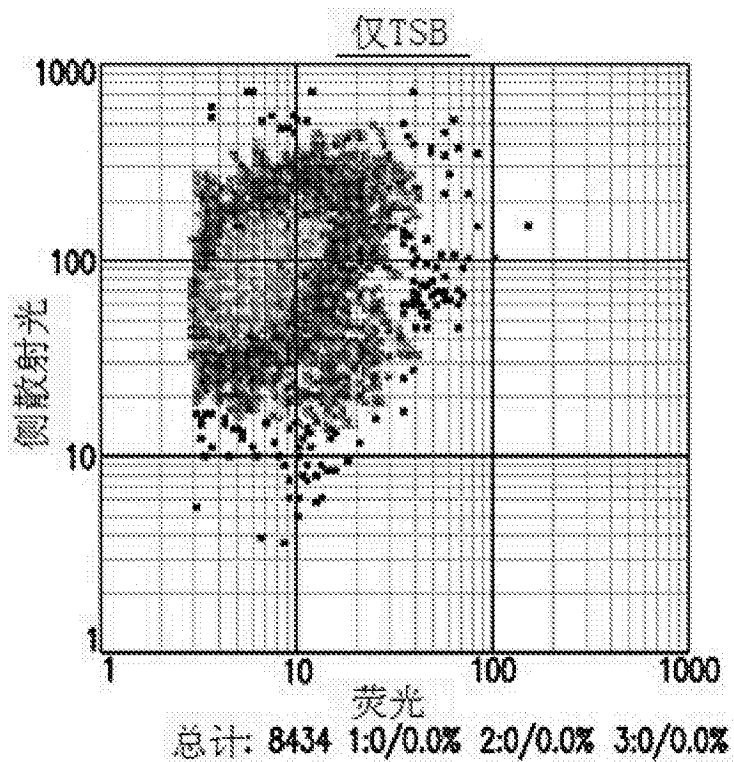


图5a

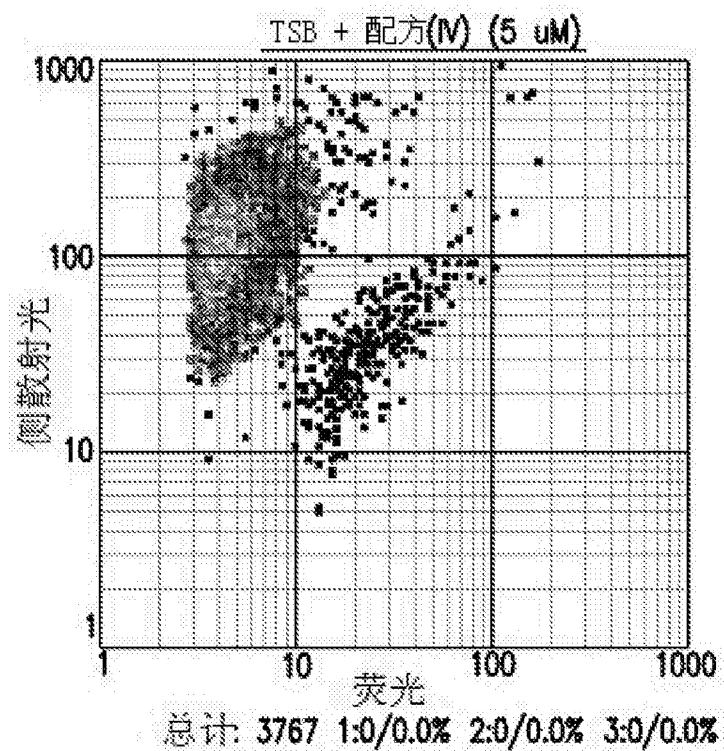


图5b

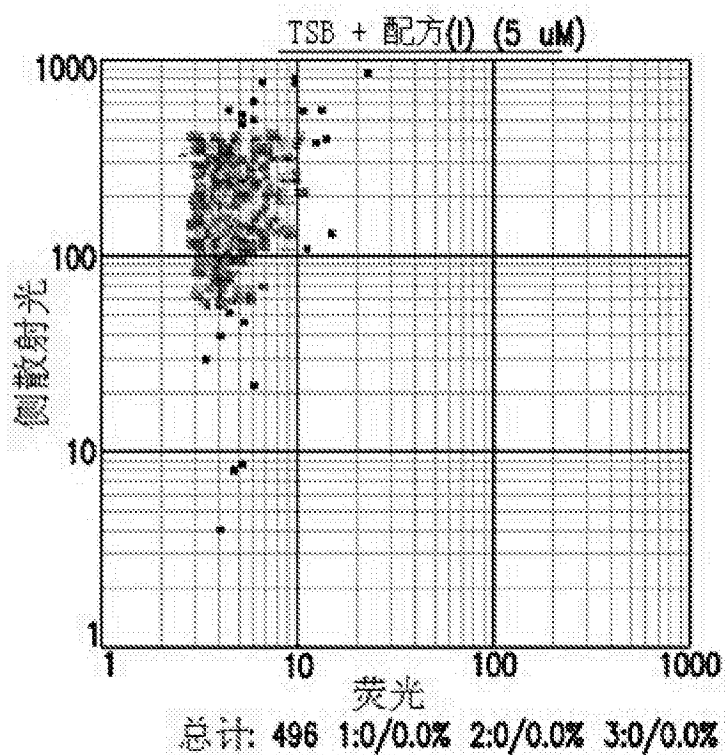


图5c

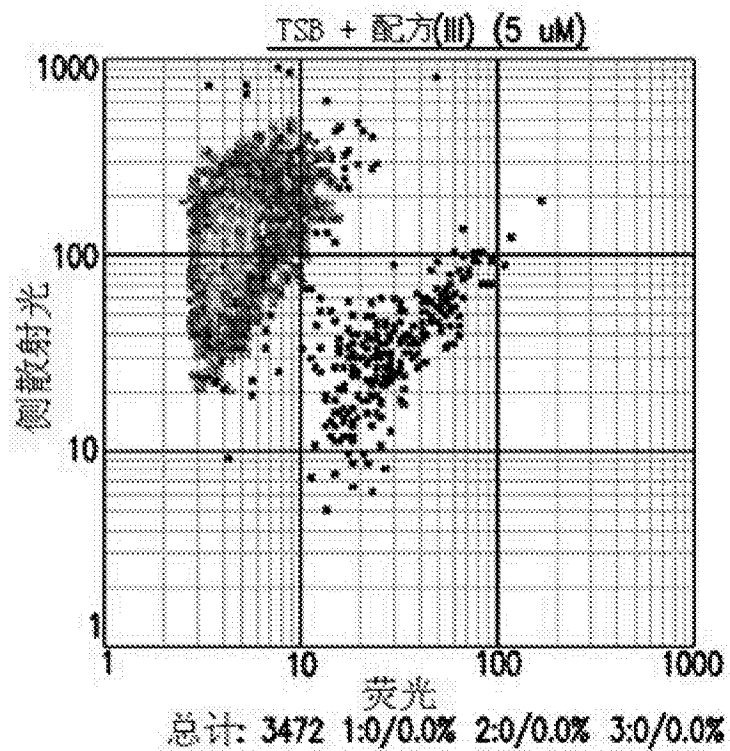


图5d

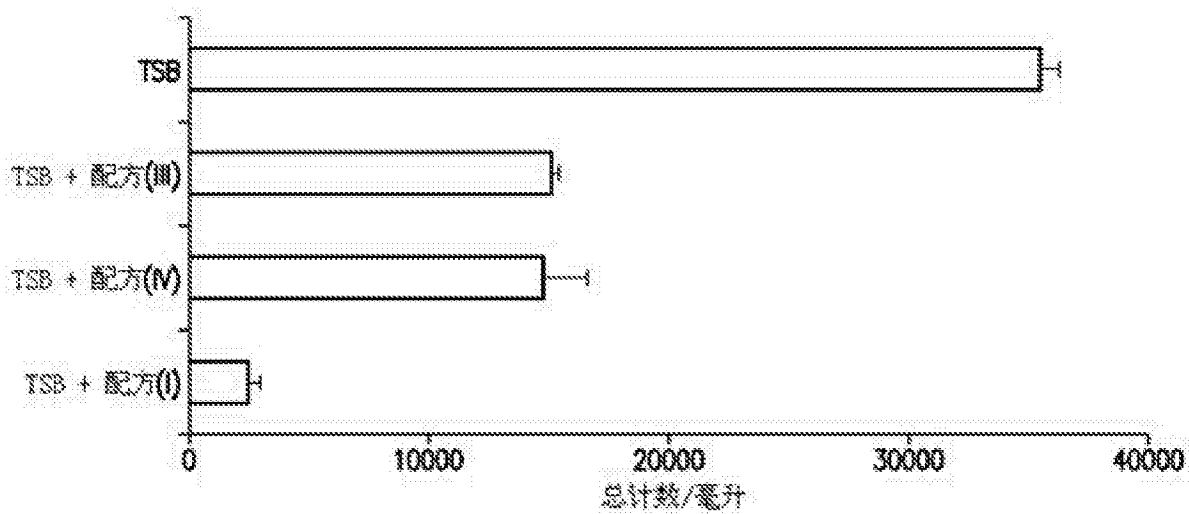


图5e

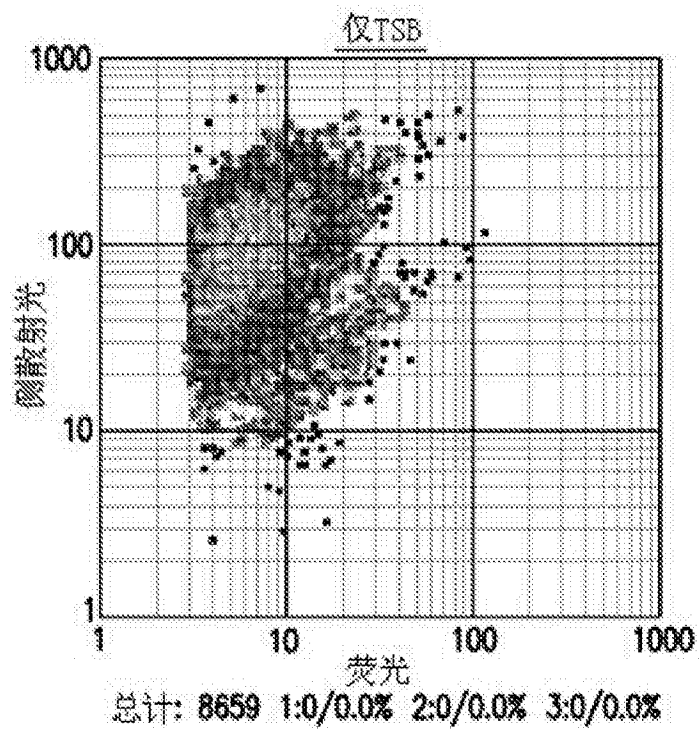


图6a

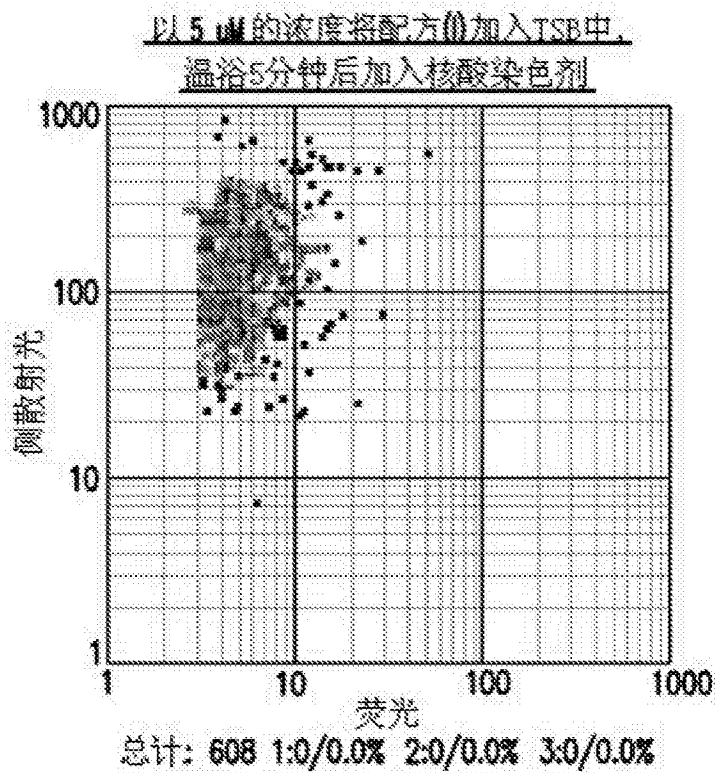


图6b

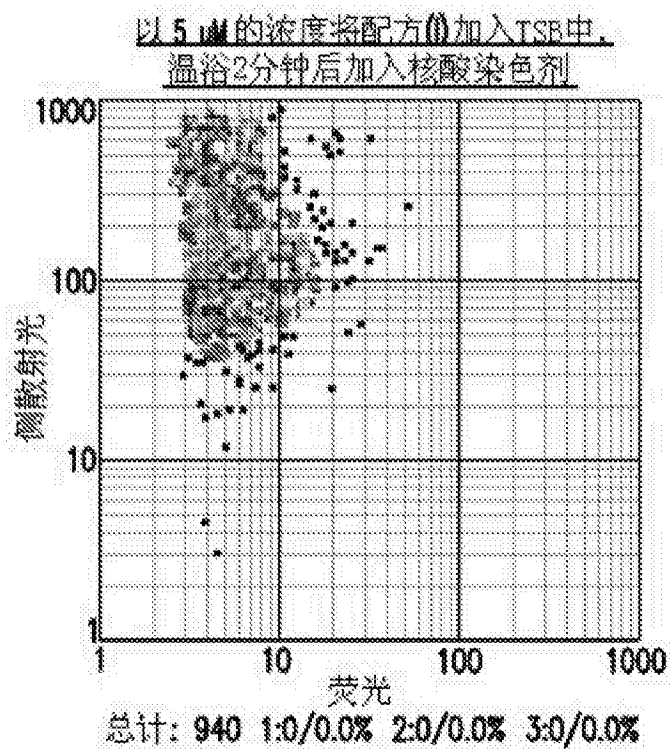


图6c

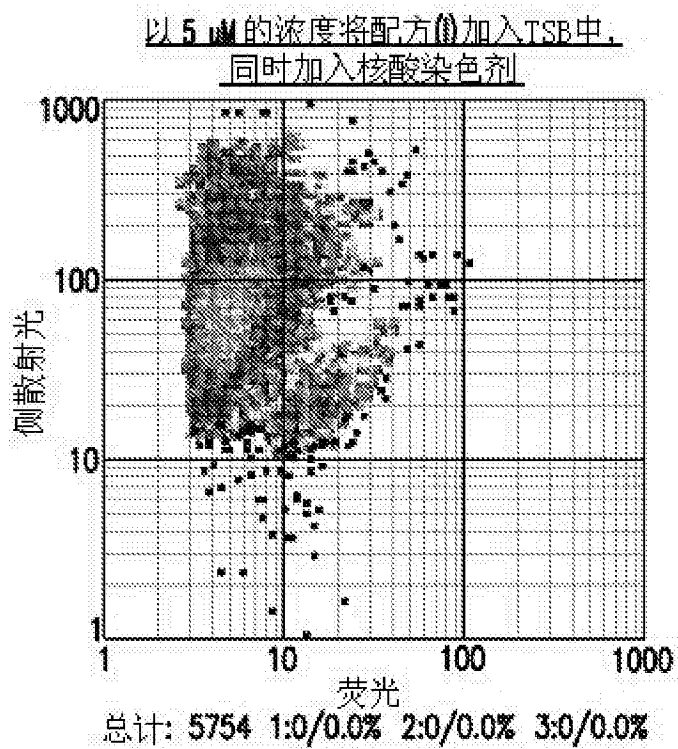


图6d

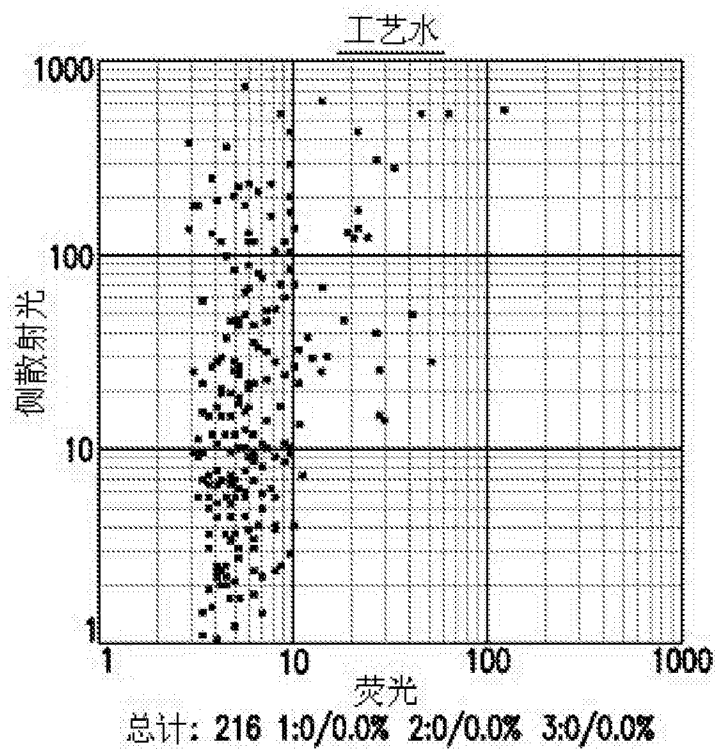


图7a

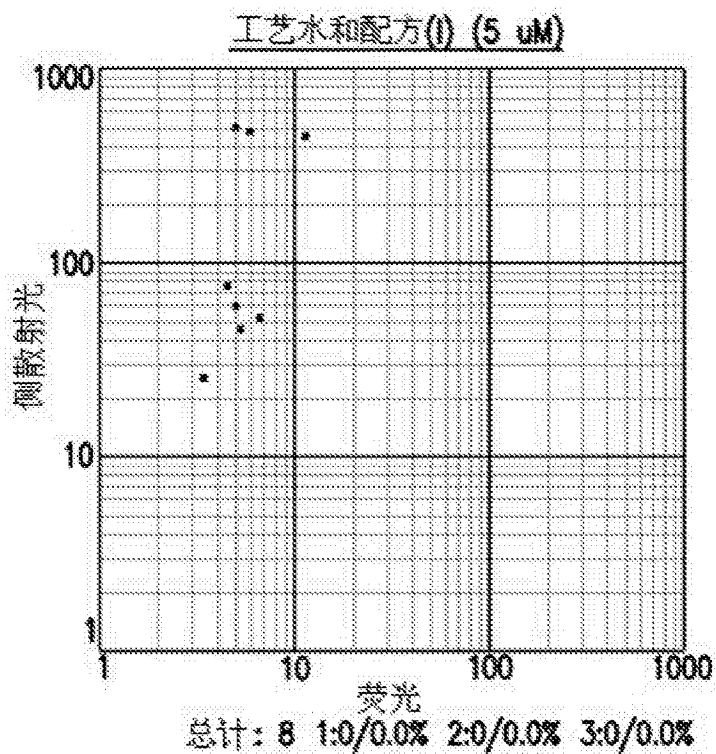


图7b

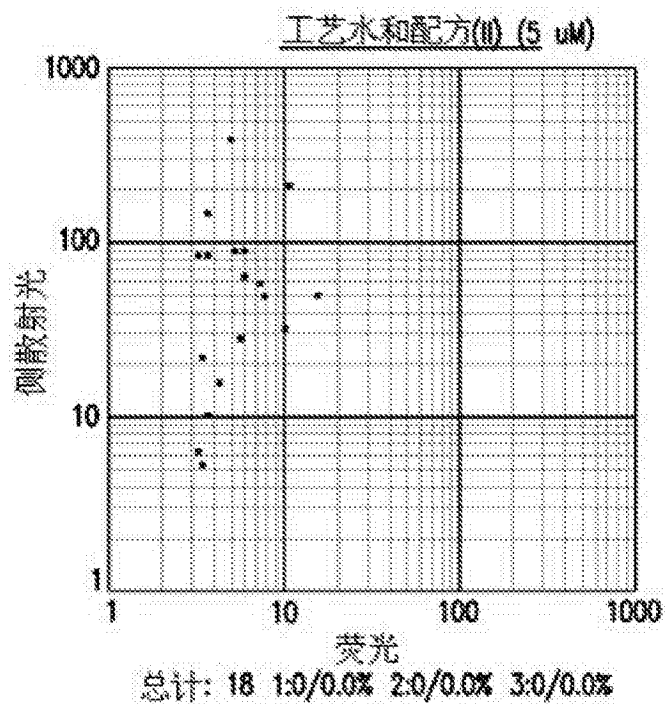


图7c

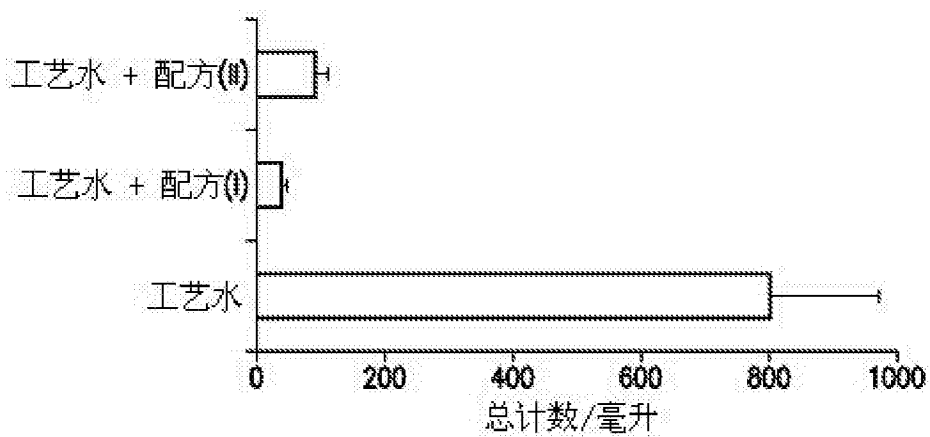


图7d

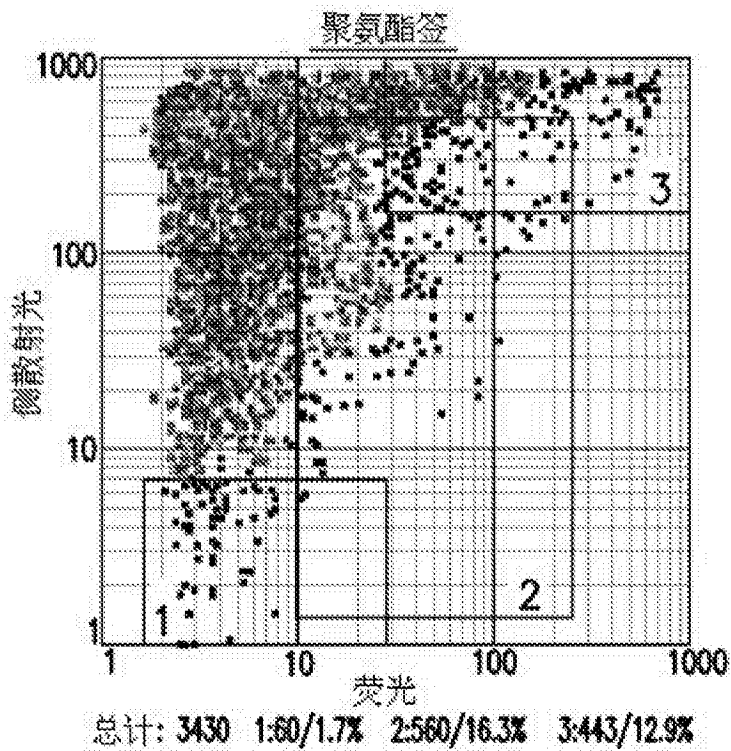


图8a

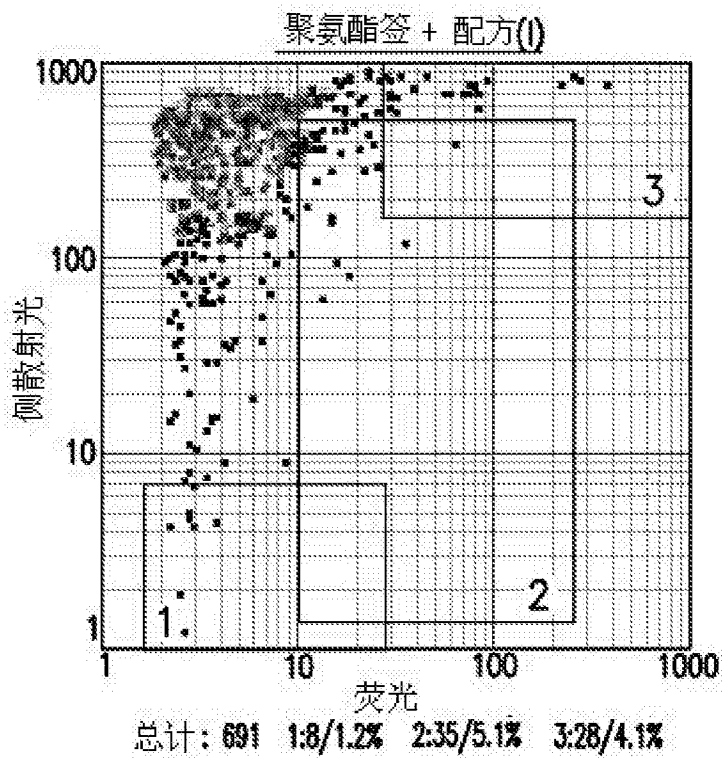


图8b

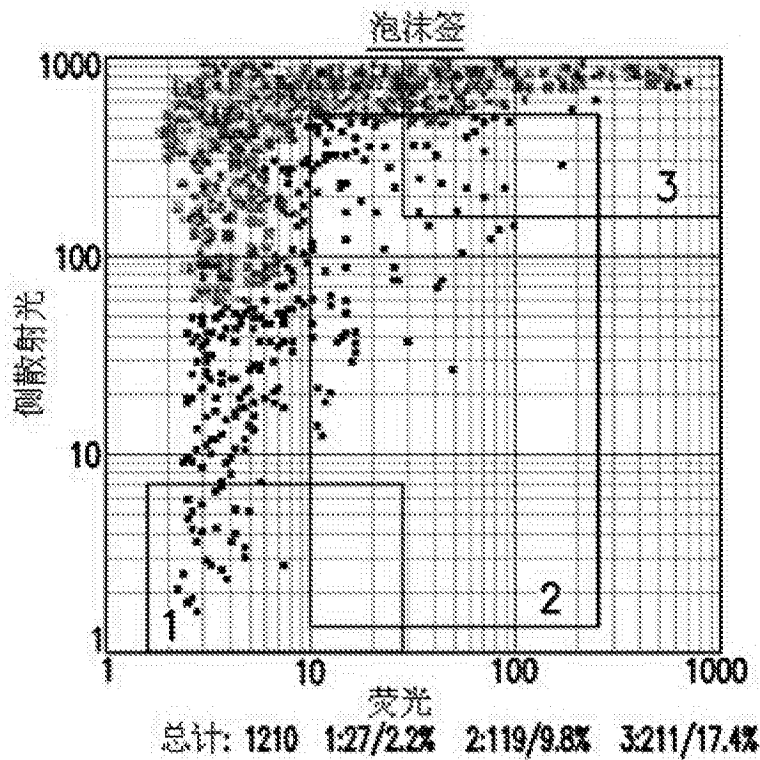


图8c

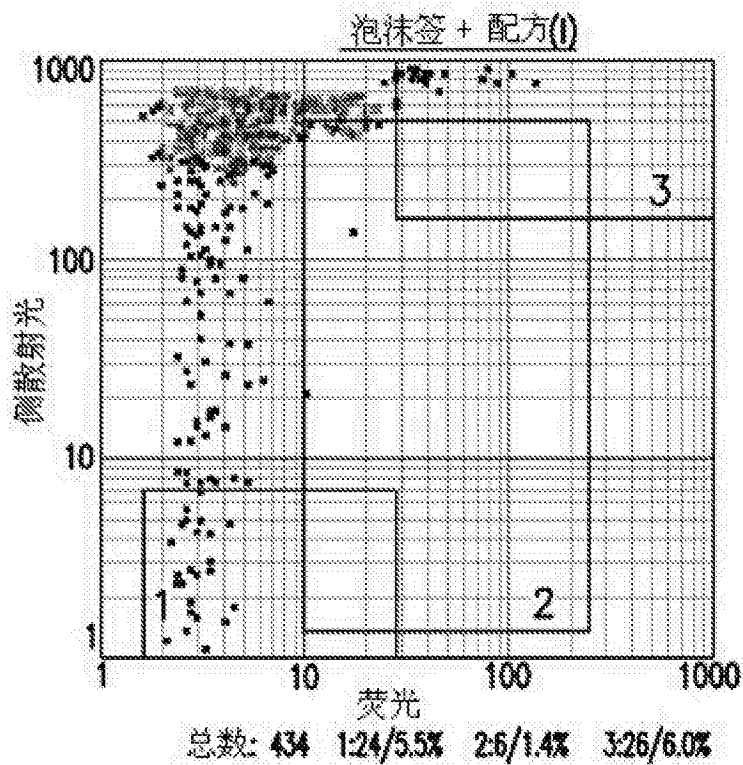


图8d

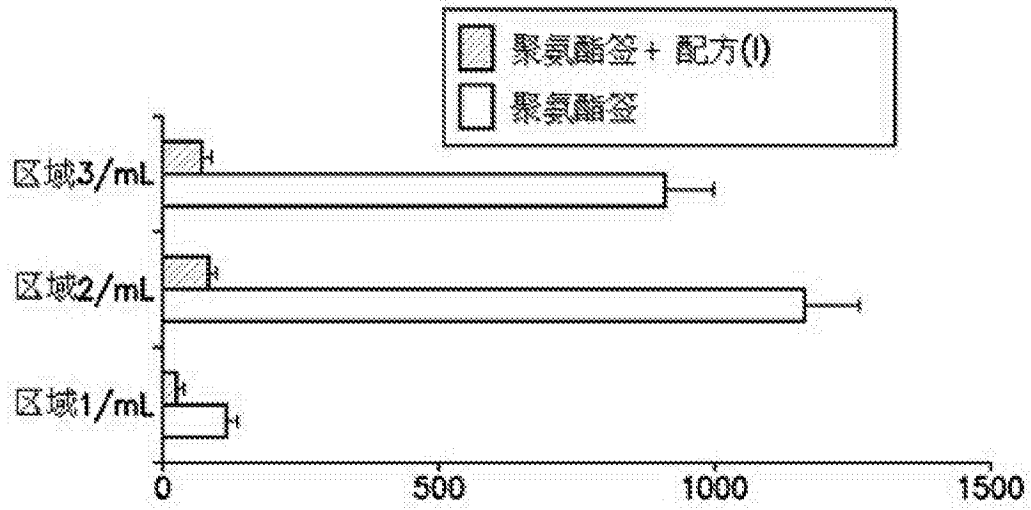


图8e

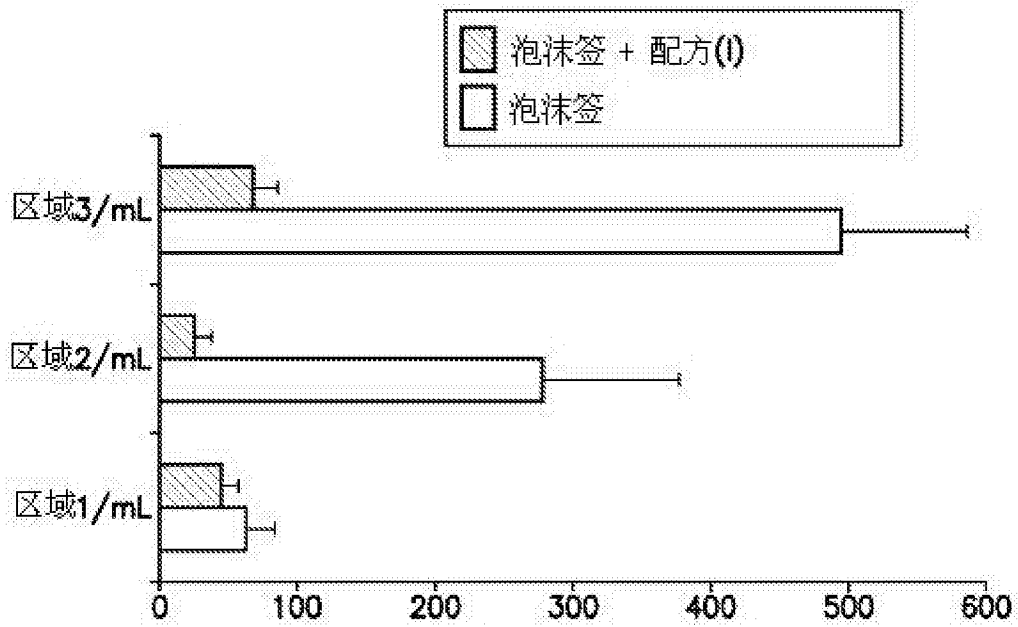


图8f

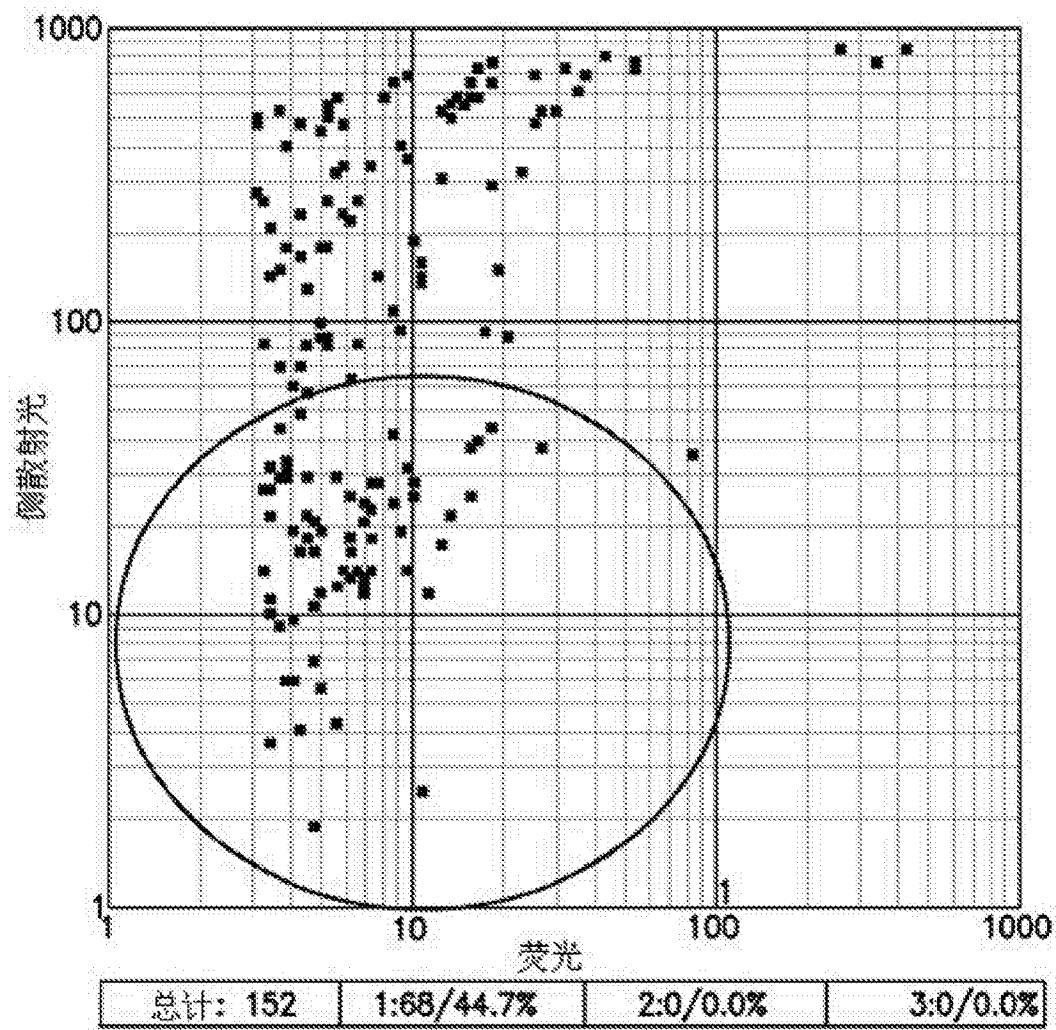


图9a

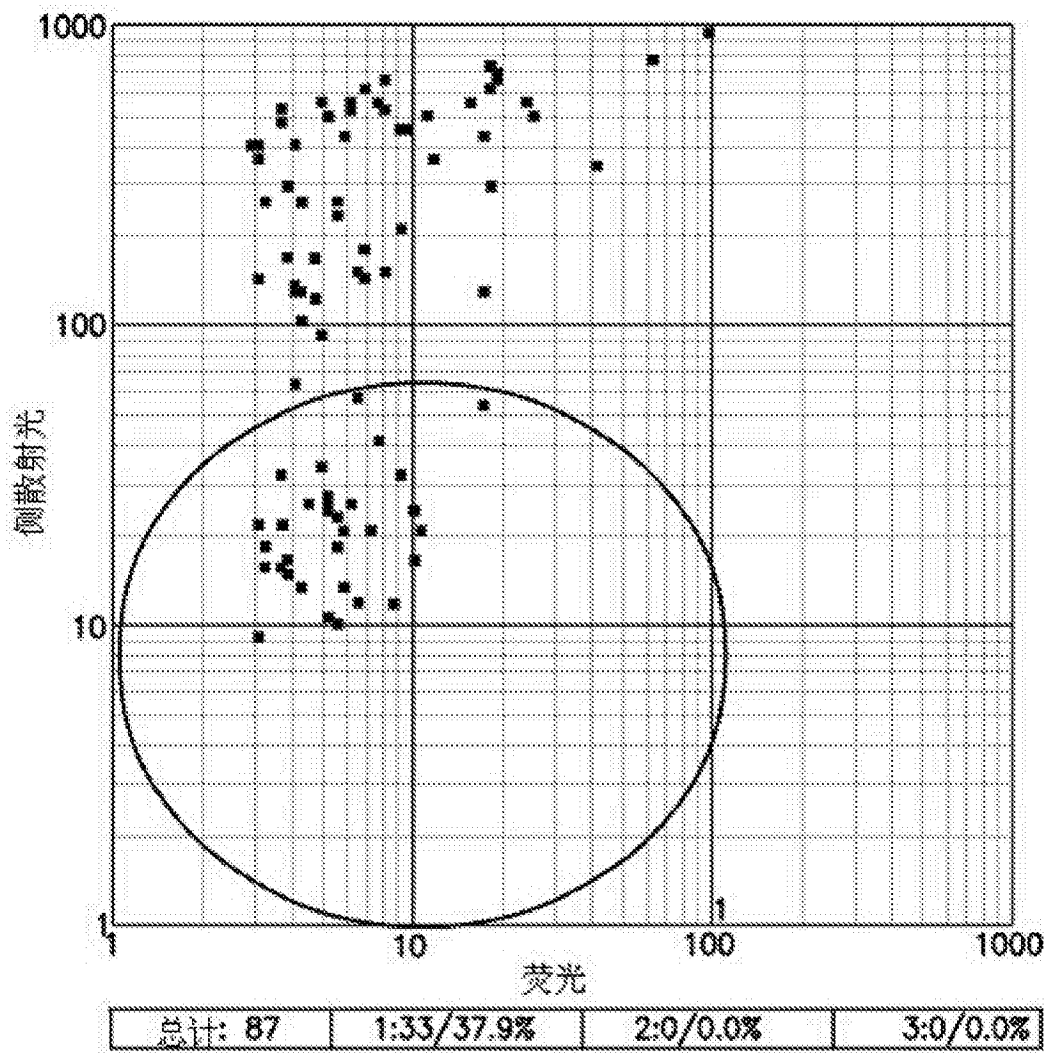


图9b

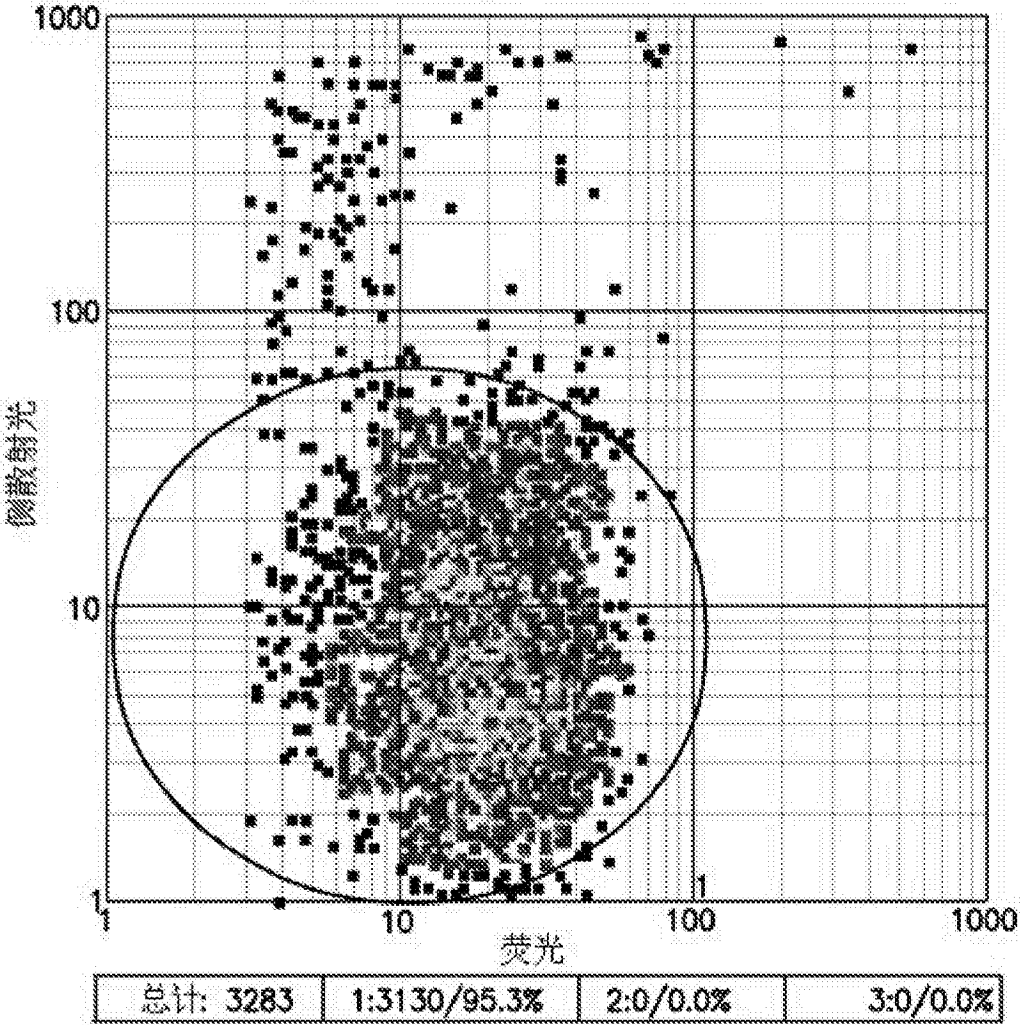


图10a

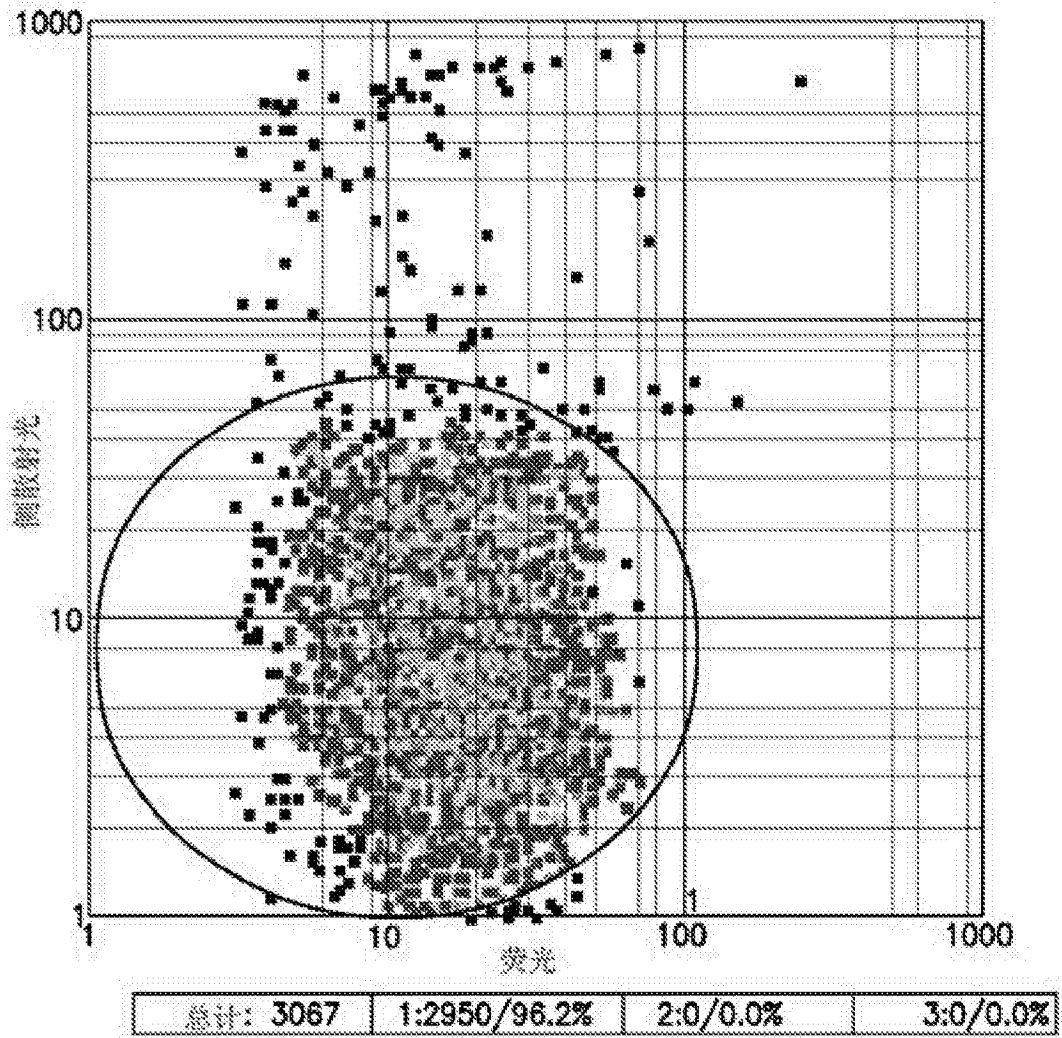


图10b