

[12] 发 明 专 利 说 明 书

G01N 33/569 G01N 33/543

C12Q 1/48 C12Q 1/66

[21] ZL 专利号 95194994.2

[45]授权公告日 2002 年 9 月 11 日

[11]授权公告号 CN 1090677C

[22]申请日 1995.7.12

[21]申请号 95194994.2

[30]优先权

[32]1994.7.13 [33]GB [31]9414096.9

[86]国际申请 PCT/GB95/01643 1995.7.12

[87]国际公布 W096/02666 英 1996.2.1

[85]进入国家阶段日期 1997.3.11

[73]专利权人 大不列颠及北爱尔兰联合王国国防大臣

地址 英国汉普郡

[72]发明人 D·J·斯奎勒尔

[56]参考文献

EP0217583A 1987.4.8 C12N1/06
C12Q1/00
C12R1/46

CHEMICAL ABSTRATS, VOL. 93, NO. 5 1980. 8. 4 S. E. BRO-LIN et al : "Firefly luciferase assay of adenylate kinase in insulin and glucagon producing cell

审查员 郭晓勇

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 王其灏

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 俘获测定法

[57]摘要

本发明提供了一种测定样品中微生物和/或其细胞内物质的存在和/或含量的方法,其特征在于:(a)将样品暴露于已固定化在一种固体基质上的特异性结合剂,这种特异性结合剂具有结合微生物或其细胞物质的能力,这样就使它与这种固体基质相结合,(b)将这种固体基质暴露于一种能够使腺苷酸激酶与微生物和/或其细胞内物质相关联的试剂,并且这些微生物和/或其细胞内物质是经处理易于与施加于该基质的溶液相作用的,(c)将含有二磷酸腺苷(ADP)的溶液在某种条件下施加于这种基质,在这种条件下,存在的任何腺苷酸激酶都能参与产生三磷酸腺苷(ATP),以及(d)测定三磷酸腺苷(ATP)的量,并使之与微生物或其细胞内物质的存在和/或含量相关联。步骤(d)可以借助于包括生色反应的测定法来实现,但是,优选的是通过使用虫荧光素酶/虫荧光素试剂来实现,其发光与 ATP 的产量成正比,

并且可以用光度计测定。优选的步骤(c)包括镁离子的存在,其浓度足以允许从 ADP 到 ATP 有最大的转化率。最优选的实施步骤(b)和(c)的方法是对样品加入提取剂、ADP 和镁离子,并将此混合物温育一个预定的时间,以使 ADP 有效地转化成 ATP。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种测定样品中微生物和/或其细胞内物质的存在和/或含量的方法, 其特征在于它包括:

5 (a) 将样品暴露于一种固定化在固体基质上的俘获剂, 该俘获剂能够与微生物或其细胞内物质相结合, 从而使微生物或其细胞内物质与固体基质相关联,

(b) 将固体基质暴露于能够使腺苷酸激酶与微生物和/或其细胞内物质相关联的试剂, 这些微生物和/或其细胞内物质是易于与施加于基质上的溶液相作用的,

10 (c) 将含有二磷酸腺苷(ADP)的溶液施加于基质, 所用的条件使存在的任何腺苷酸激酶都能产生三磷酸腺苷(ATP),

(d) 测定产生的三磷酸腺苷(ATP)的量, 并使之与微生物或细胞内含物的存在和/或含量相关。

15 2. 权利要求 1 的方法, 其中步骤(d)用一种包括生色反应的测定法来实现。

3. 权利要求 1 的方法, 其中实现步骤(d)的方法是: 用虫荧光素酶/虫荧光素试剂产生与生成的 ATP 的量成比例的光, 并用光度计测定所产生的光。

20 4. 权利要求 1、2 或 3 的方法, 其中用于步骤(c)的条件包括镁离子的存在, 其摩尔浓度足以使 ADP 最大限度地转化成 ATP。

5. 权利要求 4 的方法, 其中实现步骤(b)和(c)的方法是对样品加入提取剂、ADP 和镁离子, 并将此混合物温育一个预定的时间, 以使 ADP 转化成 ATP。

25 6. 上述权利要求任一权项的方法, 其中用于步骤(a)的俘获剂包含对微生物的一个属、种或一类微生物具有特异性的固定化抗体, 或者包含外源凝集素。

7. 权利要求 6 的方法, 其中俘获剂是一种用共价偶联或抗生蛋白链菌素/生物素相互作用而与固体基质相连的抗体。

8. 上述权利要求任一权项的方法, 其中固体基质能够被磁场吸住。

30 9. 权利要求 8 的方法, 其中步骤(a)可通过下述方法实现: 向一个容器内加入其表面带有固定化抗体的磁性微珠, 再加入溶液或悬液形式的

待检样品，并进行搅拌，然后用磁场将带有俘获的微生物和/或物质的微珠固定，除去剩余的样品溶液或悬液，加入底物 ADP 和提取剂溶液或可使腺苷酸激酶易于与 ADP 溶液相作用的溶液，撤去磁场，并对在底物溶液中的微珠进行搅拌，再次施加磁场使微珠固定，转移出包含有 ADP、提取剂和任何生成的 ATP 的溶液，并对其中的 ATP 进行测定。

10. 权利要求 1 至 7 中任一权项的方法，其中的俘获剂是被保持在柱中的。

11. 权利要求 10 的方法，其中的俘获剂被固定化在充装于柱中的微珠上。

12. 权利要求 11 的方法，其中样品和检测试剂依次通过该柱，使生成的 ATP 流出并被测定，并使之与俘获剂靶物质的存在相关。

13. 上述权利要求任一权项的方法，其中与被结合的样品相接触的 ADP 的含量，足以提供超过 0.005mM 的 ADP 浓度。

14. 权利要求 13 的方法，其中 ADP 的含量足以提供大约 0.1mM 的 ADP 浓度。

15. 权利要求 13 的方法，其中与被结合的样品相接触的镁离子的浓度是 1mM 或以上。

16. 权利要求 15 的方法，其中镁离子的浓度是 10mM 或以上。

17. 权利要求 1 至 16 中任一权项的方法，其中步骤(b)是通过加入含有阳离子去污剂的试剂来实现的。

18. 权利要求 17 的方法，其中的试剂含有叔二胺。

19. 一种用于实施权利要求 1 至 10 中任一权项的方法的检测试剂盒，该试剂盒包含能够结合微生物或其细胞内物质的固定化俘获剂以及二磷酸腺苷试剂。

20. 权利要求 19 的检测试剂盒，其还包含镁离子源和/或虫荧光素酶和虫荧光素。

21. 权利要求 20 的检测试剂盒，其包含一种固定化在固体支持物上的抗体，这种支持物是松散的微珠形式，用微珠填充的柱子，或者是被包被的微量滴定孔，试剂盒内还包含纯度高于 99.999% 的 ADP 试剂，以及包含基本上没有腺苷酸激酶活性的 BSA 的虫荧光素酶/虫荧光素试剂。

22.权利要求 19 至 21 中任一权项的检测试剂盒, 其中俘获剂是对微生物的一个属、种或一类微生物具有特异性的抗体, 或者是一种外源凝集素。

23.一种用于实施权利要求 3 至 18 中任一权项的方法的装置, 该装置包括一个反应室(5), 固定化的俘获剂能够在其中与样品相互作用, 该装置还包括用于对反应室(5)按顺序提供步骤(a), (b)和(c)所需试剂的装置, 以及一个光度计流动室(11), 后者与反应室(5)以及虫荧光素酶/虫荧光素源(13)相连, 其排列方式可使当步骤(a)、(b)和(c)完成之后, 产生的 ATP 能立即通过其与发光量的相互关系被直接测定。

24.权利要求 23 的装置, 其还包括一个电学可控制的磁体(7), 磁体的放置使它能够固定悬浮在反应室(5)内的磁性微珠。

25.权利要求 23 的装置, 其中反应室(5)包括反应柱。

26.权利要求 25 的装置, 其中反应柱内包含以俘获剂包被的支持材料, 该俘获剂能够结合微生物或其细胞内物质。

说明书

俘获测定法

5 本发明涉及一种用于检测和测定微生物的方法，用于这种方法的试剂以及检测试剂盒，该试剂盒内包含实施本方法的主要试剂。

欧洲专利申请出版物 No.217,583 描述了一种测定法，用于测定从细胞中提取的配体，其中当配体从细胞中被提取出的同时，将它与两个特异性的抗配体反应，产生可测定的产物。

10 所有有生命的有机体都利用三磷酸腺苷 (ATP) 作为化学能源，并且已经知道可以用 ATP 驱动的虫荧光素酶 / 虫荧光素反应来测定 ATP。这种酶促反应产生的光可以用光度计测定，并可以使其与存在的 ATP 量相关联。自从二十世纪六十年代中期以来人们就已经知道 ATP 作为微生物数量指标的用途 (见：微生物学中 ATP 发光的快速方法 (ATP Luminescence Rapid Methods in Microbiology) (1989) Stanley
15 等编辑；Blackwell 科学出版社，London，1 - 10 页)，其主要优点是快速和灵敏。应用这种形式的测定方法，简单的样品可以在大约几分钟内进行分析测定，对于复杂的样品，通常也只需花费半小时，提供的检测灵敏度可低至 10^{-12} M 的 ATP。但是，仍然需要提供更灵敏的方法来测定
20 微生物或者它们的内含物，并保持操作方法的快速、简便。

本发明人已经发现，通过将测定目标从 ATP 转向产生 ATP 的酶，特别是腺苷酸激酶，基于 ATP 方法的速度和灵敏度，有可能被显著地提高。腺苷酸激酶是被所有的有机体用于将二磷酸腺苷 (ADP) 转化为三磷酸腺苷 (ATP) 的酶。以这种酶，而不是以 ATP 作靶标，并通过用本发明的
25 的优选方法、试剂和试剂盒，可以使测定细胞内标志物腺苷酸激酶的灵敏度至少降低到 10^{-20} 摩尔。

已经知道可以用虫荧光素酶 / 虫荧光素系统来检测腺苷酸激酶 (见：Brolin 等，生物化学和生物物理方法杂志，1，(1979) 163 - 169，
和 Shutenko 等，Biotekhnologiya. No.4. (1988) 542 - 547)，用于
30 测定这种酶的活性和对某些哺乳动物及植物组织进行研究 (例如见 Rodionova 等 Fiziologiya Rastenii (1978)，25，4, P731 - 734)。但是，还没有人提出将这种测定系统用于检测和测定微生物，并且研究这种酶本身的人们还不了解这样做的优越性，即该方法能提供更高的灵敏度。

35 虽然腺苷酸激酶的存在量比 ADP 或 ATP 小，但是用它作为微生物的

生物学标志物，通过它产生的 ATP 来测定它的存在，将得到更高的灵敏度，典型地可获得 400,000 倍的放大作用，也就是说，在 10 分钟的温育时间内，每摩尔酶可使 400,000 摩尔 ADP 转化成 ATP。这样，通过测定这种酶催化反应的底物或产物，估计可提供低至 10^{-20} 摩尔的检测灵敏度。

5 申请人的共同未决 PCT 申请 PCT/GB 94/00118 和 PCT/GB 94/- 我们的参照号 1GP 0036 WOD，涉及根据将 ADP 转化成 ATP 的能力来测定样品中微生物的方法，并将这种能力与微生物或者其细胞内物质的存在相关联。这些专利申请例示了一些方法，其中两分子 ADP 与腺苷酸激酶的每个活性部位反应所必需的镁离子既可作为试剂加入，也可由任何所提供的细菌细胞和作为其它试剂的不纯成分来提供。在应用这种技术的实施
10 例中，所测定的细胞数量被证实为大约是 10^2 ，统计学上更合理的结果是 10^3 或更多；并可得到发光计数与细胞数量之间的线性关系。

本发明涉及一种改进的技术，其中腺苷酸激酶的活性在一种俘获测定法中被用作微生物的标记，在此测定法中，一旦微生物被俘获，而其它的试剂被除去，所俘获的微生物数量可通过先使其细胞内含物与 ADP 作用，然后测定产生的 ATP 量来检测，特别是可通过测定虫荧光素/虫荧光素酶反应进行过程中的发光，来提供快速检测的能力。应该认识到，当需要时，比色测定法仍然可用于检测样品中存在的 ATP 含量，例如用基于丙酮酸激酶的反应；这种与腺苷酸激酶测定法相联的比色测定法将提供极
15 高的灵敏度。

微生物可以通过任何常规的俘获测定法，如通过使用对它具有特异性的抗体来俘获，此抗体已被固定化在一种固体的表面，如微量滴定孔板表面或胶乳微珠表面。对于本领域的技术人员还可以发现很多适合于免疫测定的其它表面。在本方法中，特别优选的是把抗体固定化在磁性微珠表面，于是，任何结合于该抗体的微生物都可能被俘获在磁场中，它们的腺苷酸激酶活性可以被测定，这些微生物随后被释放，以便对测试材料的其他样品进行分析。因此，在这种优选的方法中，可进行样品的连续流动测定，例如，用于监测空气中细菌含量时，连续地测定来源于旋流采样器的样品。
20

30 用腺苷酸激酶测定法，特别是当使用腺苷酸激酶和消除了 ATP 的试剂时，存在于样品中的，能够以连续方式联机 (on-line) 测定的微生物数量是每 200 μ l 样品中数十个细胞，而由细胞与 ATP 产生的光之间的定量关系得到的读数有可能降至 10 个细胞，并且，当反应体积减小时，甚至可少于 10 个细胞。

因此，本发明第一方面提供了一种测定样品中微生物和/或其细胞内物质的存在和/或含量的方法，此方法的特征在于：

(a)将样品暴露于已固定化在固体基质上的俘获剂，这种俘获剂具有结合微生物或其细胞内物质的能力，这样就使微生物或其细胞内物质与这种固体基质相关联，

5 (b)将这种固体基质暴露于一种能够使腺苷酸激酶与微生物和/或其细胞内物质相关联的试剂，并且这些微生物和/或其细胞内物质易于与施加于该基质的溶液相作用；

(c)将含有二磷酸腺苷 (ADP) 的溶液施加于这种基质；

(d)测定产生的三磷酸腺苷 (ATP) 的量，并使之与微生物或其细胞内物质的存在和/或含量相联系。

10 步骤(d)可通过应用任何适宜的 ATP 测定法来实现。这些方法包括适宜的生色反应，但是，本领域的技术人员都熟知，用于检测 ADP 转化成 ATP 的最优选，最易得到的是虫荧光素/虫荧光素酶发光试剂。通过应用标准曲线可方便地使 ATP 含量与微生物和/或其细胞内物质的含量相关联，标准曲线可按照本测定方法，用已知量待检微生物或其细胞内物质来制作，然后通过与此曲线相比较来测算待测物的未知量。优选的方法是
15 是对每一定量微生物制作一条发光标准曲线，据此可以判读每单位时间样品中未知量待测物的发光读数。

为了使 ATP 的产量达到最大，并因而使与固体基质相结合的腺苷酸激酶的放大作用达到最大值，在本测定法中，ADP 变成 ATP 的转化过程
20 优选地是在存在镁离子的条件下进行的，镁离子的摩尔浓度足以允许 ADP 转化成 ATP 时有最大的转化率。镁离子的优选含量应该是足以对 1 摩尔 ADP 提供大约 1 摩尔镁，因而使所有的 ADP 分子都可能与至少一个镁离子相结合。注意，反应过程是： $ADP + Mg^{2+} \rightleftharpoons Mg^{2+} \cdot ATP + AMP$ ，因此不一定真正需要 1: 1 的比率，但这是一个有用的参考量。

25 在本发明关于这方面的优选实施方案中，样品是以水悬液或溶液的形式提供的，样品中所有待检微生物或物质处于被俘获的状态，通过对样品加入 ADP 和镁离子来测定与之相联的腺苷酸激酶，在此条件下，样品中存在的所有腺苷酸激酶都将参与将 ADP 转化成 ATP，将样品温育一个预定的时间以促进这种转化过程，加入虫荧光素酶和虫荧光素，测定
30 来自样品的发光量，并使之与腺苷酸激酶的存在和含量相联系。

俘获步骤优选地是用对微生物的一个属、种 或一类微生物具有特异性的固定化抗体来实现，但也可以用对各种不同类型微生物细胞壁上的特殊物质具有特异性的结合剂，例如，外源凝集素。最方便的俘获剂应该是抗体，它可以用常规的连接技术，如用共价偶联技术或通过抗

5 生蛋白链菌素/生物素相互作用，使之与固体基质连接。例如，使特异性抗体生物素化之后，它就可以与抗生蛋白链菌素包被的表面相结合。

在一个优选的方法中，使用了磁性固体基质，特别适合的是磁性微珠，如从 Dynal UK Ltd, Station House, 26 Grove Street, New Ferry, Wirral, Merseyside. 购得的那种微珠。用于将特异性抗体连接于这些微珠的方

10 法，对本领域的技术人员是熟知的，在厂商的说明书中也有介绍。

应用这种微珠可使待检微生物在溶液中与微珠固定化的抗体相结合，并使之通过一根导管如连续取样器中的，借助于磁场的作用集中于一个处理场所，在经此处理后，使其腺苷酸激酶与加入的 ADP 和 ATP 检测试剂相接触。优选的做法是当微珠被固定时加入 ADP、镁离子和虫

15 荧光素酶/虫荧光素试剂，然后用测光仪，如用一台紧靠处理场所的光度计测定样品发光。虫荧光素酶/虫荧光素试剂可以与 ADP 和镁离子同时加入，也可以在其后加入。

本发明的方法可以在单一检测容器内操作，先将其表面带有固定化抗体的磁性微珠加入容器中，再加入溶液或悬液形式的待测样品，并进行

20 搅拌，然后用磁场将带有俘获的微生物和/或物质的微珠固定，除去剩余的样品溶液或悬液，加入底物 ADP 和提取剂溶液或其它可使腺苷酸激酶易于与 ADP 溶液相接触的溶液，撤去磁场，并对在底物溶液中的微珠进行搅拌，再次施加磁场使微珠固定，转移出包含有 ADP、提取剂和所有生成的 ATP 的溶液，并对其中的 ATP 进行测定。可以用比色测定法对

25 ATP 进行测定，或者优选地用发光测定法。

另一种优选的方法是用一根俘获柱，其中装有其表面固定化有结合剂如抗体的固体基质如微珠，使样品和各种试剂相继通过该柱，直到生成的 ATP 流出，然后测定 ATP，并使之与该抗体靶物质的存在相关联。

在所有的情况下，加入与样品混合的 ADP 的量，优选的是足以能在

30 混合物中提供超过 0.005mM 的 ADP 浓度，更优选的是超过 0.01mM，而最优选的是超过 0.08mM。在转化步骤的混合物中，特别优选的 ADP 含量大约是 0.1mM。这可能取决于 ADP 的纯度：含有高污染水平的 ATP

时必须使用较高浓度的 ADP。实际使用的 ADP 浓度范围是大约 10mM 至大约 0.1 μ m。对于上述优选的 ADP 浓度，在 ADP 转化成 ATP 的过程中，样品悬液或溶液中优选的镁离子浓度是 1mM 或以上，更优选的是 5mM 或以上，而最优选的是 10mM 或以上。镁离子可以以任何镁盐的形式提供，但优选的是 醋酸镁。实际作用的 Mg^{2+} 浓度范围是大约 0.1 mM 至大约 25 mM。 Mg^{2+} 的含量可能主要取决于存在的 ADP 浓度和螯合剂(如 EDTA)的含量。

本发明的另一个优选的方式是，在温育开始时将虫荧光素/虫荧光素酶发光测定试剂加入到样品中，优选的是与 ADP 和镁离子源一起作为单一试剂加入。按这种方式进行测定，需要在生产过程中通过除去腺苷酸激酶而提供高纯度的虫荧光素酶试剂。在本发明的方案中，所有的试剂在 ADP 按此方式变成 ATP 的转化过程开始时，都被加入了，和/或在加入虫荧光素/虫荧光素酶之后接着进行发光计数，后者是一个分开的步骤，镁离子可以通过加入虫荧光素/虫荧光素酶试剂提供。但是，由于镁离子能被虫荧光素酶和 EDTA 结合，有必要通过预备试验或计算来确保镁离子的含量。本领域的技术人员都会认识到，加入到一个给定的 ADP、样品和虫荧光素/虫荧光素酶混合物中的最适镁盐量，可以用一个含有已知量细菌如 大肠杆菌(E - Coli)的样品，通过常规的实验容易地被测定出，由此可得到最大的信号。

因为镁离子会使 ADP 不稳定(通过污染腺苷酸激酶过早地将 ADP 转化成 ATP)，所以优选地是在使用之前，不要将它们共同保存在溶液之中，优选地它们可以在临使用之前或者在 ADP 转化步骤中混合在一起。因为腺苷酸激酶的活性需要镁离子存在，所以优选地可在加入 ADP 之前，将它们与样品混合在一起。当试剂要合并在一起保存时，优选地是使它们保持在冷冻干燥状态，以避免发生不稳定作用。

如上所述，三磷酸腺苷(ATP)可优选地用虫荧光素/虫荧光素酶系统来测定，它能提供可指示样品中 ATP 含量的光学可测定信号。本领域的技术人员都熟知用于测定 ATP 的虫荧光素/虫荧光素酶制剂和方法，并且它们是可购买到的(例如见 Brolin 等)。典型的制剂包括如 0.1 - 10 毫克/升的虫荧光素酶，15 - 1000 μ mol/升的 D - 虫荧光素，优选的是 15 - 100 μ mol/升(如~36 μ mol/升)，以及其它成分如 $MgCl_2$ (2.5 - 25mmol)，EDTA，BSA，和 pH7 缓冲液(见如 EP 054676)，更典型的是 pH7.8。

如果以单一的试剂形式用于在此所述的腺苷酸激酶测定法，其 pH 优选地应调节至对两种酶都是最适的 pH，这是为了在 ADP 转化成 ATP 的同时，能持续计数的一种折衷方案。这个 pH 可以用一个已知菌数的样品，借助常规的实验来确定。

- 5 可将样品、ADP 的镁离子源混合于能提供适合于腺苷酸激酶反应的 pH 值的任何缓冲液中，不再需要其它任何试剂。因此，可以使用能提供 pH5.5 - 8.5 的任何缓冲液，而最佳 pH 范围是在 pH6 和 pH7 之间，优选的是 pH6.5。适当的缓冲液的例子包括 Tris 缓冲液和磷酸盐缓冲液。最适当的做法是将样品在这种缓冲液中收集和/或稀释，为进行本发明的方法作好准备。

- 同其它放大式测定法一样，本发明中腺苷酸激酶测定法的灵敏度也受到试剂纯度的限制。在本测定中，有主要影响的污染物是底物 ADP 中的 ATP 和虫荧光素酶制剂中的腺苷酸激酶。为了用于灵敏的微生物测定，特别是当这些微生物可能是潜在有害的，并需要在数量少的情况下进行测定时，作为本测定法中与其反应的物质，每种试剂的纯度都必须尽可能的高。

- 15 用一个优选的 Econopaq Q 强阴离子交换凝胶柱(BioRad)，用 20mM 磷酸钾在 pH4.6 平衡，作 KP_i 梯度洗脱，(磷酸钾的)浓度直至 400mM，发现 ADP 可作为吸附峰被洗脱出，ATP 在其后被洗脱出。按这种方法，可得到含有上限为 2×10^{-8} 摩尔 % 的 ATP 的 ADP。本申请人从文献中知道的最纯的 ADP 是 0.001 % (见上述 Shutenko 等)，而在本发明方法中提供使用的 ADP，含有小于 0.001 摩尔 % 的 ATP，更优选的是 2×10^{-8} 摩尔 % 或更小。

- 25 对于第二个问题，作为基本上是一种“管家”(housekeeping)酶的腺苷酸激酶，实际上存在于所有的有机体内，因此通常也存在于虫荧光素酶制剂中。虽然可能只是微量的污染，但因为测定的对象就是样品中非常低浓度的腺苷酸激酶，所以它在虫荧光素酶中的存在可能是一个限制因素。

- 虫荧光素酶和腺苷酸激酶的分子量显著不同，分别是 61kD 和 21kD。而且，虫荧光素酶是一种膜结合蛋白质，因此是相对疏水的，而腺苷酸激酶是作为可溶性酶存在。这样就可能通过如分子排阻层析法，反相层析法，或者同时运用这二种方法，从虫荧光素酶制剂中除去腺苷

酸激酶。另一方面，或者除此之外，腺苷酸激酶污染虫荧光素酶的问题，还可以通过在临检测之前或者检测开始后加入生物发光试剂(虫荧光素酶和虫荧光素)来克服，这样任何污染的腺苷酸激酶都没有时间产生显著的影响。

- 5 纯化虫荧光素酶的适当方法可以用低孔隙度的凝胶，如葡聚糖 G - 25(Sephadex G - 25)进行柱层析分级分离(见 Nielsen 和 Rasmussen, Acta Chemica Scandinavica 22 (1968) P1757 - 1762); 还可以依次使用交联葡聚糖和琼脂糖柱层析分离，以及通过 SDS 电泳来纯化(见 Devine 等, 生物化学和生物物理学报 1172 (1993) 121 - 132), 或者通过提高环境
10 温度使酶在其中老化(aging)一般时间。

作为商品虫荧光素酶/虫荧光素制剂的一个成分，无腺苷酸激酶的 BSA 可来源于化学处理的乙酰化 - BSA 试剂，可从 Sigma 和 BDH 购得。本领域的技术人员还将意识到，其它化学处理的 BSA 也是适用的。

- 为了使所有与待检微生物有关的腺苷酸激酶都能与本发明的 ADP、
15 镁离子和虫荧光素酶/虫荧光素测定试剂相接触，有必要将微生物裂解，使之释放出细胞内物质，或者使之暴露于试剂中。这种裂解作用可以用机械的方法如超声波发生器来实现，还可以应用渗透压冲击法任选地结合冷冲击法，或者使用溶菌酶试剂，或更方便地使用去污剂来实现。这种去污剂可以购得，通常被称为“提取剂”(extractant)。典型的提取剂包
20 括通用的阳离子去污剂如 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)，以及专利产品如酶促 ATP 释放剂，Biotrace XM 提取剂(可以 Biotrace, Bridgend UK 购得)，Celsis UK 阳离子提取剂和 Lumac NRM(核苷酸释放剂，可从 Lumac BV, 荷兰，购得)。当使用 CTAB 时，适宜的制剂包括 0.01 - 1 % CTAB 的水溶液，例如 0.2 %，但本领域的技术人员还可以用其它浓度。

- 25 因此，在将 ADP 和虫荧光素酶/虫荧光素试剂加入到被怀疑含有微生物的待测样品之前，优选地是通过使用裂解剂将微生物裂解，使其细胞内含物能与发光检测试剂相作用。如果要求区分靶细胞和其它如真菌孢子细胞，可同时作二组测定，一组用非离子去污剂处理，其只能裂解那些孢子和多细胞动物的体细胞(例如用可购自 Sigma 公司的 Triton X -
30 100 处理)，另一组用上述的阳离子去污“提取剂”处理，能使所有的细胞裂解。如果在去污剂/虫荧光素酶/测定循环过程之间加入 ATP 酶如腺苷三磷酸双磷酸酶，随后再加入蛋白酶，那么这二组测定将可以在同一

样品上进行，在第一循环步骤中一个循环用非离子去污剂处理，其他循环用阳离子去污剂处理。

已经知道，提取剂对虫荧光素酶/虫荧光素系统的作用是重要的(见例如 Simpson 等(1991) *J Biolumin Chemilumin* 6(2) pp 97-106)，已知阳离子去污剂能使反应加强，但会引起虫荧光素酶逐渐失活，阴离子去污剂会抑制反应，而非离子去污剂和两性离子去污剂能广泛地促进反应。发现 0.15 % 阳离子去污剂和 0.25 % 叔二胺表面活性剂(从 Celsis, Cambridge, UK 购得)的混合物用于本目的是令人满意的，但是，本领域的技术人员无疑会找到其它“提取剂”，当它们共存于同一溶液时，将对腺苷酸激酶和虫荧光素酶活性是最佳的。可应用的去污剂浓度的范围，典型地大约是 0.05 % - 1.0 %。

在所有基本步骤完成，即 ADP 转化成 ATP 之后，接着将虫荧光素酶作用于虫荧光素，从混合物中发出的光可通过将样品保留在例如光检测器内的光度计管中来测定，测定是在加入虫荧光素酶和虫荧光素或其它能促进此基本步骤的试剂之后或同时进行的。

本发明的第二方面是提供了一个检测试剂盒，它包含本发明方法所需要的基本试剂，即固定化的俘获剂、二磷酸腺苷、以及优选的镁离子源和优选的虫荧光素酶和虫荧光素。该试剂盒优选地应包括所有这些试剂，并且虫荧光素酶和虫荧光素是作为单独的试剂溶液提供的，试剂盒中还带有适合于裂解待检细胞的去污剂。通常在检测微生物时，只需要阳离子去污剂，而如果真菌孢子和体细胞可能是重要的时，那么为了测定它们的数量，可能需要带有非离子去污剂。该试剂盒是一个单独包装形式，优选地附有关于如何操作本发明方法的说明书，试剂被提供在容器内，其浓度适合于直接使用或稀释后使用。

本发明优选的检测试剂盒包括固定化的抗体，它可以是松散的微珠形式，也可以是用微珠填充的柱，或者是包被的微量滴定孔(well)的形式，盒内还包括纯度高于 99.999 % 的 ADP 试剂，以及含有 BSA 的并基本上没有腺苷酸激酶活性的虫荧光素酶/虫荧光素试剂。另一方面，所采用的虫荧光素酶/虫荧光素的含量比例，应该使虫荧光素酶能够足够快速地作用于虫荧光素底物，以致在初始的发光结束之后，所有的虫荧光素酶都能与腺苷酸激酶的 ATP 产物相结合，这个比例已标示在试剂盒的使用说明书中，同时/或标示了它们的相对浓度；这样，微生物产生的腺苷

酸激酶将被快速动力学反应来指示，而污染物 ATP 由发光(glow)指示。

本发明还进一步提供了用于实施本发明方法的装置，它包括一个反应室，固定化的俘获剂与加入的样品在其中相互作用，此反应室具有能按顺序提供试剂的输入和输出装置，如进行本发明测定法的结合、萃取和加入 ADP 的步骤，反应室还与虫荧光素酶/虫荧光素试剂的源相连，并通向发光计的流动室，这样，当所有这些步骤完成之后，产生的 ATP 能立即通过与发光量的相互关系被直接测定。本发明装置的优选反应室包括：

10 (a)一个被放置在可控制的电磁场内的反应容器，这样，悬浮在该容器内反应液体中的磁性微珠，当需要更换试剂的时候，例如在泵装置的作用下，更换试剂时，可以被固定在容器中，或者

(b)一个反应柱，其中装有常规的俘获剂支持材料，如以俘获剂包被的胶乳微珠。

15 现在将根据如下非限制性的实施例和图表，通过实例对本发明的方法、装置、试剂和试剂盒进行说明。本领域的技术人员将可根据这些想到其他实施方案。

附图：

20 图 1：显示一个实施本发明方法的装置的示意图，它是一个带有固定化俘获剂磁性微珠的自动液流系统，并通过一个选择性磁化的磁体俘获这些微珠。

图 2：显示一个实施本发明方法的装置的示意图，它是一个带有固定化俘获剂的反应柱的自动液流系统。

图 3：以曲线图的形式表明用于低数量 E. coli 细胞的腺苷酸激酶测定法。

25 图 4：以柱状图的形式表明对 E. coli 的特异性测定法，该方法是用磁性微珠进行俘获，用腺苷酸激酶进行测定。

实施例 1：使用图 1 所示装置的 E. coli 测定法

30 含有待测 E. coli 的液体样品从样品源 1，通过一个五向阀 2，蠕动管 3 和双向泵 4，被输入到反应容器 5 内，容器中装有 Dynal 磁性微珠，在微珠表面已通过常规的共价偶联法固定化对 E. coli 有特异性的抗体。用搅拌器 6 将微珠和样品混合搅拌一段俘获时间，如 1 - 30 分钟，然后对磁体 7 充磁，从而使微珠固定在反应器中，样品中的液体可通过双向

泵 4 和阀门 2 排至废液 8。再从源 9 加入洗涤缓冲液使磁体 7 消磁, 开动搅拌器 6, 搅拌洗涤微珠, 再对磁体 7 充磁, 并将缓冲液排入废液。

从源 10 加入足量的底物 ADP (对于 ATP 其纯度大于 99.999 %), 醋酸镁和提取剂 (每份终体积中含有 0.15 % 阳离子去污剂和 0.25 % 叔二胺), 使反应容器内达到 0.1mM ADP 和 10mM 镁离子的含量, 使磁体消磁, 开动搅拌器, 按 1 - 5 分钟的设定时间进行提取和 ADP 转化过程, 然后停止搅拌, 对磁体充磁, 经过蠕动管 3, 借助于双向泵 4 和 12, 使液体转移至光度计流动室 (flow cell) 11, 并同时从源 13 注入有效体积的, 已消除所含腺苷酸激酶的虫荧光素酶 / 虫荧光素试剂, 使之混合。使用腺苷酸激酶改性的 Celsis LDR 试剂, 或者其他标准量的活性成分, 其体积大约是样品量的一半。先用已知数量的 E. coli 细胞进行测定, 制作标准曲线, 然后参照标准曲线, 使光度计流动室内的发光与被俘获的 E. coli 的数量相关联。

反应容器内的磁性微珠可以再生, 可通过泵将用过的微珠排入废液, 并从源 14 注入新的微珠, 或者用一种能使样品从微珠上分离的试剂或溶液处理, 使微珠再生, 例如, 如果从抗体上再生, 则可用 0.1M 的 HCl。

实施例 2: 使用图 2 所示装置的 E. coli 测定法

按照实施例 1 的方法进行测定, 但其中的反应容器 5、磁体 7 和双向泵 4, 被一个与光度计流动室相连的反应柱代替, 试剂是从前面所述的源加入。用 3 个二向阀 2 代替单个五向阀, 并且泵是单向的。样品直接来源于一个水力旋流器, 如在共同未决英国专利申请 GB 9405392.3 中所述。

应该意识到, 实施例 1 的五向阀也可以用于这种反应柱方法, 而相连的 3 个二向阀也可以用于实施例 2 的反应容器和搅拌器。类似地, 测定步骤还可以方便地通过人工控制磁体和人工加入试剂来进行。

说明书附图

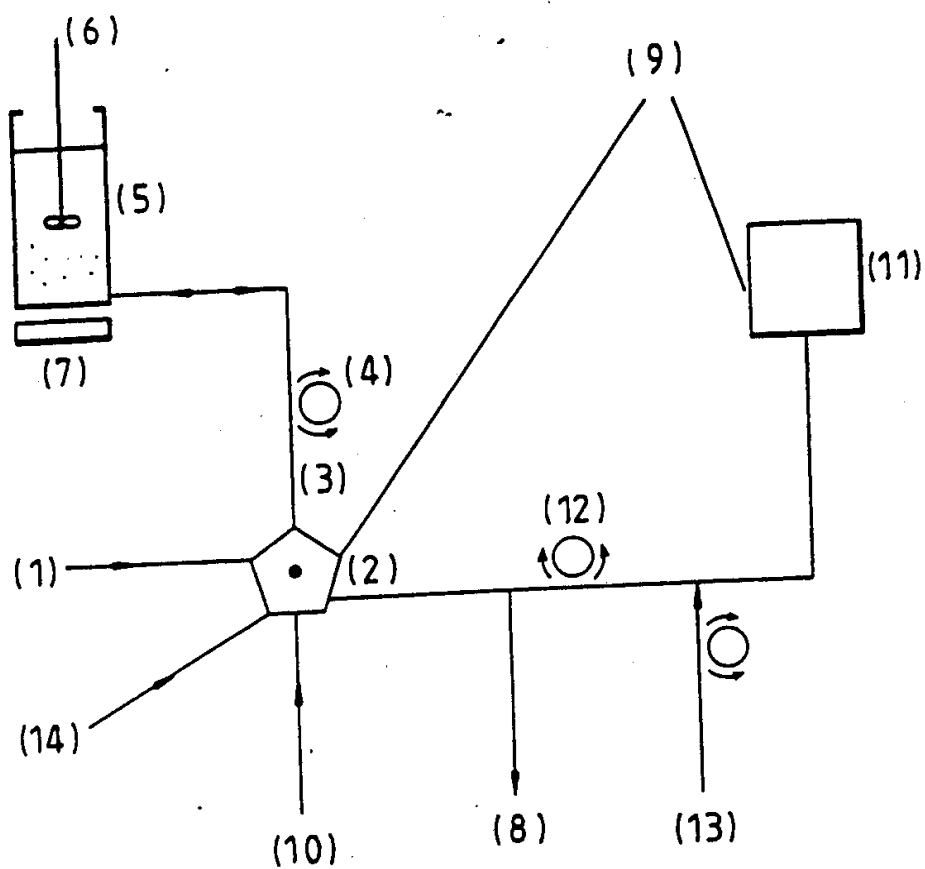


图1

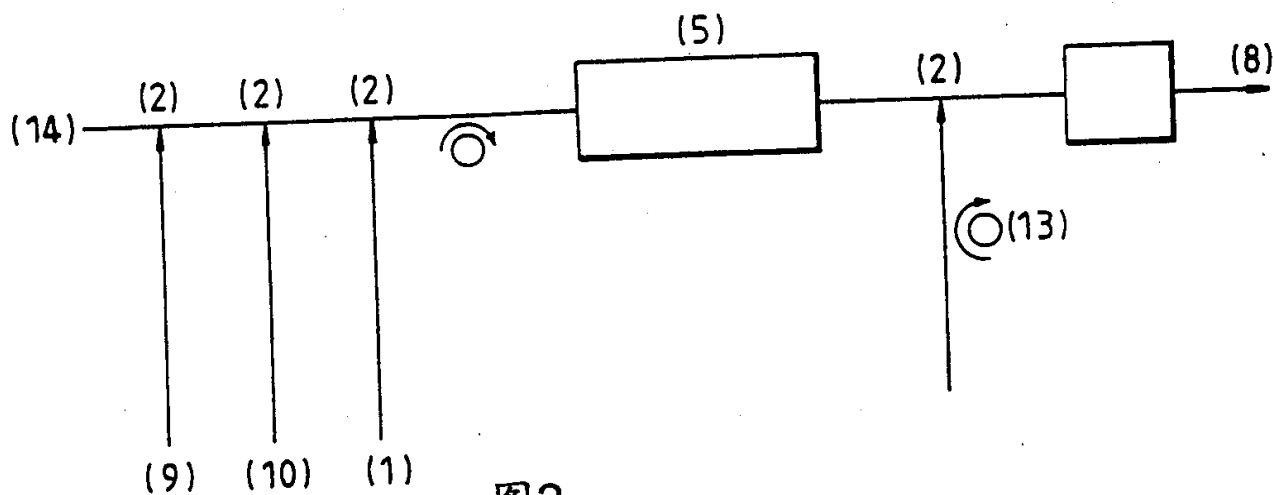


图2

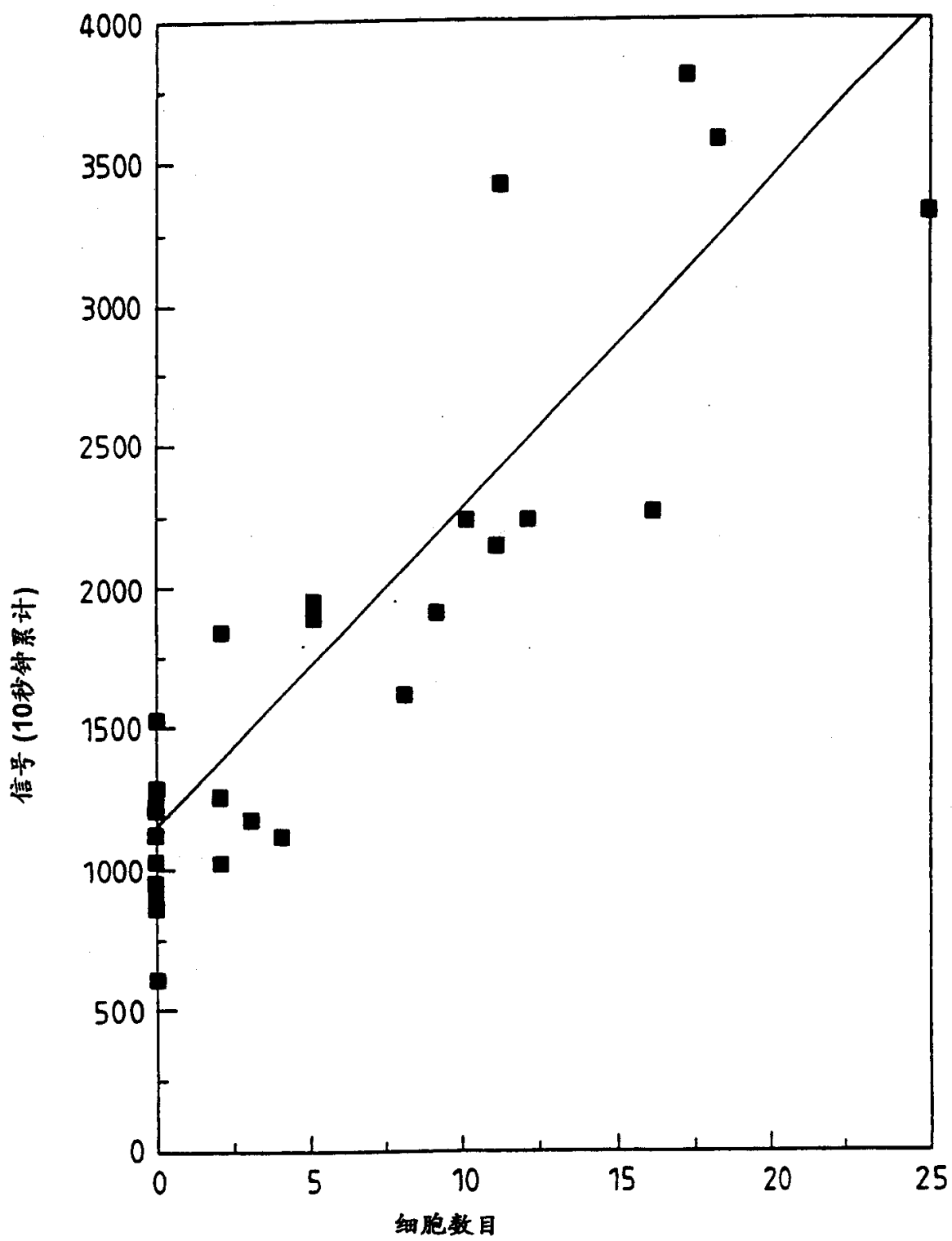


图3

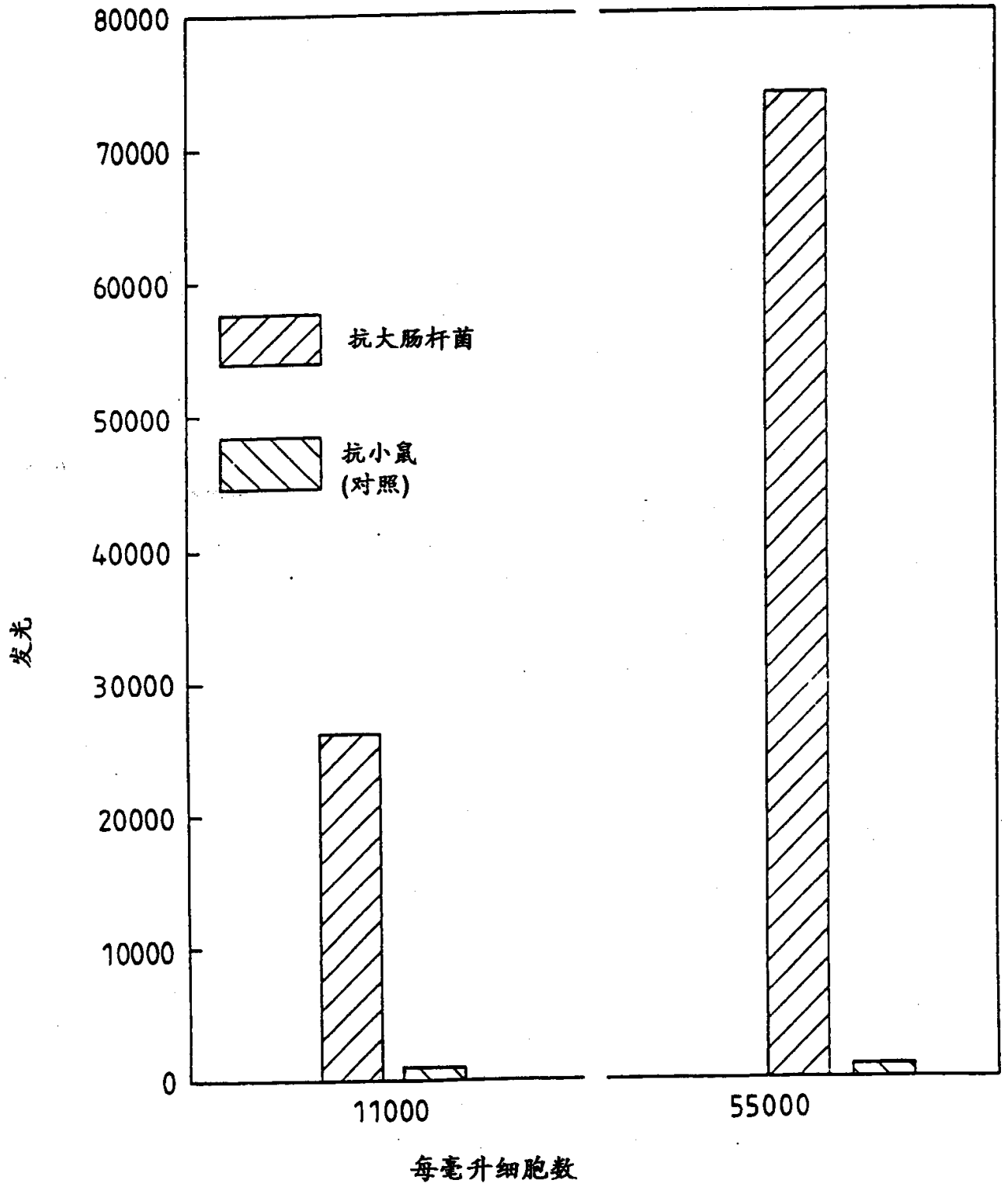


图 4