

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480029730.9

[51] Int. Cl.

C12M 1/33 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 8 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100410360C

[22] 申请日 2004.9.7

[21] 申请号 200480029730.9

[30] 优先权

[32] 2003.9.8 [33] GB [31] 0320954.1

[86] 国际申请 PCT/GB2004/003827 2004.9.7

[87] 国际公布 WO2005/023978 英 2005.3.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.10

[73] 专利权人 英国国防部

地址 英国威尔特郡

[72] 发明人 威廉·特伦斯·科克利

凯瑟琳·阿米莉娅·简·博思威克

马丁·伯纳德·麦克唐奈

特蕾西·伊丽莎白·洛夫

[56] 参考文献

EP0337690 1989.10.18

US6506584 2003.1.14

审查员 王佩兰

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

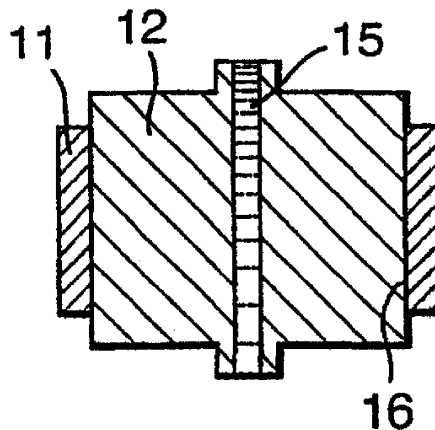
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称

用于微生物超声破碎的装置

[57] 摘要

用于微生物破碎的装置，该装置包括具有导热性固体发射层的圆筒形转换器，所述发射层沿至少部分所述转换器的内部纵向表面布置，所述发射层或所述转换器与发射层限定了用于接受液体样品的通道，所述装置还包括可以将交变电势输送到所述转换器的单元，所述交变电势的频率和电压可以在所述液体样品中激发谐振并诱导空化作用。



1. 用于微生物破碎的装置，该装置包括具有导热性固体发射层的圆筒形转换器，所述发射层沿至少部分所述转换器的内部纵向表面布置，所述发射层或所述转换器与发射层限定了用于接受液体样品的通道，所述装置还包括能够将交变电势施加到所述转换器的单元，所述交变电势的频率和电压能够在所述液体样品中激发谐振并诱导空化作用。

2. 如权利要求1所述的装置，其中，所述发射层的厚度为其中声波半波长的整数倍。

3. 如权利要求1或2所述的装置，其中，所述圆筒形转换器的壁厚为6.5 mm。

4. 如权利要求3所述的装置，其中，所述圆筒形转换器的外径为63.7 mm。

5. 如权利要求1所述的装置，其中，所述发射层包含钢。

6. 如权利要求5所述的装置，其中，所述发射层包括纵向长度大于所述圆筒形转换器的圆筒管，所述圆筒管的外径为50.5 mm，壁厚为20.5 mm。

7. 如权利要求6所述的装置，其中，所述通道的宽度或直径为3.8 mm。

8. 如权利要求1所述的装置，该装置包括用于关闭所述通道的单元。

9. 如权利要求1所述的装置，该装置进一步包括将样品输送到所述通道的单元。

10. 如权利要求1所述的装置，该装置进一步包括冷却单元。

11. 用于破碎微生物的方法，该方法包括 i) 将液体样品导入包含圆筒形转换器的装置中，所述转换器具有沿其内部至少部分纵向表面布置的导热性固体发射层，所述发射层或所述转换器与发射层限定了用于接受所述样品的通道，和 ii) 以能够在所述液体样品中激发谐振并诱导空化作用的频率和电压向所述转换器施加交变电势。

12. 如权利要求11所述的方法，其中，所述发射层的厚度为其中声

波半波长的整数倍。

13. 如权利要求 11 或 12 所述的方法, 其中, 所述圆筒形转换器的壁厚为 6.5 mm。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中, 所述圆筒形转换器的外径为 63.7 mm。

15. 如权利要求 11 所述的方法, 其中, 所述发射层包含钢。

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中, 所述发射层包含纵向长度大于所述圆筒形转换器的圆筒管, 所述圆筒管的外径为 50.5 mm, 壁厚为 20.5 mm。

17. 如权利要求 16 所述的方法, 其中, 所述通道的宽度或直径为 3.8 mm。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中, 所述交变电势的频率范围为 264 kHz~314 kHz, 电势的大小为 80 V<sub>rms</sub>。

19. 如权利要求 11 所述的方法, 该方法以间歇法进行。

20. 如权利要求 11 所述的方法, 该方法以连续法进行。

21. 如权利要求 11 所述的方法, 该方法包括冷却所述装置。

## 用于微生物超声破碎的装置

### 技术领域

本发明主要涉及通过暴露于辐射聚焦的超声波来破碎微生物的装置。本发明尤其涉及(尽管不是唯一地)适用于辅助检测和分析病原菌的小型装置。

### 背景技术

商业购得的通过超声空化作用来破碎微生物的装置典型地包括在 20 kHz 谐振的施用器(applicator)。半波长(最大发射)探针的长度通常约为 15 cm, 因此体积庞大, 不方便用于破碎小样品体积的病原菌。而且, 由于探针必须浸没于这些细菌的液体样品中, 因此有形成危险的气溶胶的内在风险。

已知许多在较高频率工作的较小的细胞破碎装置。例如, 使用由扩音器经与液体交界的柔性薄膜发射的超声能量的细菌细胞破碎器(Taylor, M.T.等, Anal. Chem, 2001, 73, 492-496)在 40 kHz 工作。另外, 已知一种细胞破碎器, 其包含 160°弧面的 1 MHz 厚的管状转换器, 该转换器将声波聚焦使其通过水到达狭窄塑料管中的孢子悬浮液(Chandler 等, 同上, 2001, 73, 3784-3789)。

然而, 虽然这些设备各自通过高声压来有效地破碎细菌, 但是它们产生大量的热, 导致样品温度显著上升到高达 50°C~90°C。当破碎的目的是提取用于 PCR(聚合酶链式反应)分析的 DNA(脱氧核糖核酸)时, 如此高的温度是允许的, 但对于例如蛋白质抗原的抗原性, 如此高的温度是有害的。

然而, 有利于蛋白质和细胞壁碎片的免疫测定的细菌的破碎的确提供了显著的优越性, 所述优越性在于大量潜在的碎片是可能检测的。

## 发明内容

因此，本发明主要寻求提供一种能够在温度上升最小的情况下快速破碎微生物例如液体样品中细菌的小型装置。

因此，本发明提供用于微生物超声破碎的装置，该装置包括具有导热性固体发射层(transmission layer)的圆筒形转换器，该发射层沿至少部分转换器的内部纵向表面布置，所述发射层或所述转换器与发射层限定了用于接受液体样品的通道，所述装置还包括可以将交变电势输送到所述转换器的单元，所述交变电势的频率和电压可以在所述液体样品中激发谐振并诱导空化作用。

本文所使用的术语“液体样品”是指微生物悬浮液，例如在液体中(通常是在水中)的细菌或孢子。

应当理解，激发一个或多个谐振所需的驱动频率取决于转换器壁和发射层的材料和厚度以及通道的直径或宽度(或样品层的厚度)。

转换器壁的厚度通常约为其中声波半波长的奇整数倍。除了谐振和小型装置的要求之外，该厚度没有其它限制。

优选地，发射层的厚度约为其中声波半波长的整数倍(偶数或奇数)以使声波的发射最大化。更优选地，发射层的厚度约为其中声波的半波长。除了谐振和小型装置的要求之外，该厚度没有其它限制。

还对通道的宽度或直径进行选择以实现谐振。优选地，所述宽度或直径有利于在合理体积的液体样品中产生空化作用，同时将其保持在转换器的聚焦区域内。更优选地，通道的宽度或直径支持将热从本体液体样品较好地传递到发射层。

以辐射模式驱动的圆筒形转换器在其聚焦区域(在纵轴或临近纵轴处)提供高声压的能力取决于其外径。因此，优选该直径尽可能大，同时符合小型装置的要求——尤其是当发射层的厚度较大时。

根据本发明，除了小型化的要求之外，对转换器的纵向长度没有限制。优选地，该长度沿所述通道提供一定程度的能量密度的均匀性而不破坏其阻抗。

优选的圆筒形转换器(PZT4D, 298kHz, Vernitron, Southampton,

UK)包括管状的压电陶瓷,该压电陶瓷的壁厚约为 6.5 mm,外径约为 63.7 mm,长度约为 25.6 mm。

发射层可沿部分圆筒形转换器内表面布置。具体地,发射层可包括跨越其内表面的一半布置的半圆筒。然而,在一个优选的实施方式中,发射层包括整个圆筒管。与液体或部分液体的发射层相比,该优选的实施方式在避免其中的空化作用方面具有最大效率。

显然,单独的发射层或转换器与发射层一起限定了通道。在优选的实施方式中,所述通道由发射层限定,具有圆形横截面,并与圆筒形转换器的纵轴同心。在该实施方式中,所导入的液体样品与聚焦区域获得良好的重叠。但是,还设想了通道从圆筒形转换器的纵轴偏离和/或通道为非圆形的其它配置。

发射层可包含任何适当的导热性材料。该材料将热导离所述样品,由此控制样品在如此高的压力下的迅速发热。优选地,发射层的纵向长度超过转换器的纵向长度,以确保较好地将热从聚焦区域内导离。适当的发射和传导材料包括金属或金属合金例如钢。

优选的发射层包括钢圆筒,该钢圆筒的外径约为 50.5 mm,内径约为 3.8 mm,长度约为 31.9 mm。发射层的壁厚约为 20.5 mm(半波长)。

一般通过适当的胶粘剂例如环氧树脂将发射层固定到圆筒形转换器的内表面上。具体地,所述优选的钢圆筒可用负载有银的传导性环氧树脂涂布,并将圆筒形转换器缓慢推进。

通过立体镜观察,所述优选的圆筒形转换器和优选的发射层在三个频率下在液体样品中提供显著的空化作用。最低频率 266 kHz 出现在根据一维转换矩阵(多层谐振模型)预测的谐振频率附近。显著的空化作用还出现在 297 kHz 和 314 kHz,这与所测定的电谐振吻合,并接近于额定的 298 kHz 厚的转换器谐振。

尽管相当多的细菌细胞的破碎是在 297 kHz 获得的,但是优选的驱动频率为 266 kHz。

在一个实施方式中,所述装置进一步包含通过例如所布置的管和泵等通道输送样品流的单元。在另一个实施方式中,所述装置通过例如闭

合单元或阀单元进行适配，以将液体样品保留在通道中，实现间歇式加工。

在其它的实施方式中，所述装置进一步包括促进从液体样品中除去热的冷却单元。所述冷却单元可以包括例如通过适当的油脂与发射层连接的栅格式散热器和一个或多个鼓风机。

在一个适合于间歇式加工的实施方式中，其中圆筒形转换器在使用中是垂直的，第一鼓风机将空气从所述装置上吹过，并通过与钢圆筒热接触布置的散热器。第二鼓风机从装置的上部向下吹空气。

本发明还提供微生物破碎方法，该方法包括 i) 将液体样品导入包括圆筒形转换器的装置中，该转换器具有沿其内部纵向至少部分表面布置的导热性固体发射层，所述发射层或所述转换器与发射层限定了接受所述样品的通道，和 ii) 以能够在所述液体样品中激发谐振并诱导空化作用的频率和电压向所述转换器施加交变电势。

所述方法可采用本发明前述的任何实施方式中的装置进行。在实践中，交变电势的频率由特定电势下计算机控制的扫描和对空化作用的光学/声学观测来确定。施加  $30\text{ V}_{\text{rms}} \sim 100\text{ V}_{\text{rms}}$  的适当的电势，以获得强谐振。

在一个优选的实施方式中，采用  $264\text{ kHz} \sim 314\text{ kHz}$ ，最佳为  $266\text{ kHz}$  的驱动频率于约  $80\text{ V}_{\text{rms}}$  实施所述方法。

本发明的方法可作为间歇法或连续法进行。对于间歇法，该装置垂直于样品液体放置，所述样品液体通过例如塑料薄膜和套管保留在通道中。然后在经测定的最佳频率下在一个或多个时间周期中对该液体样品进行声波处理。选择时间周期的次数和长度，以使液体样品产热最小化，而细胞破碎最大化。

当在短时间周期内对细胞进行高度破碎时，连续法是适当的。对于优选的装置，将含有细菌孢子的液体样品的流量设计为约  $1\text{ ml/min}$ 。因此，连续法提供将细胞破碎整合到利用流式技术的检测技术上的可能。

现在，仅以举例方式通过参考以下的实施例和其中的附图来对本发明进行描述。

## 附图说明

图 1 是根据本发明的优选实施方式的装置的正视图。

图 2a)和图 2b)分别是图 1 装置的端视图和剖面图。

图 3 是显示图 1 装置的阻抗对频率所作的曲线图。

图 4 是显示使用图 1 装置酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的破碎程度随时间的变化的曲线图。

图 5a)、图 5b)和图 5c)分别是显示使用图 1 装置和两种可商业购得的 20 kHz 的微生物超声破碎器通过吸附光谱法测定的枯草杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*)(BG)孢子抗原检测的曲线图。

## 具体实施方式

现在参考图 1 和 2, 本发明的一个优选实施方式包括圆筒形陶瓷转换器 11(PZT4D, 298 kHz, Vernitron, Southampton, 英国), 该陶瓷转换器长为 25.58 mm, 外径为 63.76 mm, 壁厚为 6.52 mm。所述圆筒形转换器配备有钢圆筒 12, 该钢圆筒 12 的长为 31.91 mm, 外径为 50.50 mm, 内径为 3.8 mm。所述圆筒限定了通道 13(图 1, 虚线), 该通道用于通过安装在钢圆筒上表面和下表面上的突出管状部分 14 来接受液体样品 15。

通过负载银的传导性环氧树脂 16 将钢圆筒固定到圆筒形转换器上。利用包含波发生器(Agilient 型 HP 33120A)和放大器(240L 型, ENI, Rochester, NY)的交变电势源(未显示)将范围约为  $30\text{ V}_{\text{rms}} \sim 100\text{ V}_{\text{rms}}$  的交变电势输送到所述转换器。

根据一维转换矩阵谐振器模型(Hawkes J.J.等, Ultrasonics, 2002, 40, 385-392), 作为平面系统(装载水)的圆筒形声学多层系统的阻抗测定和处理所预测的产生强空化作用的频率与试验所发现的那些频率非常吻合。

图 3 显示电导纳测定与频率的关系(虚线)以及由所述模型模拟的平面波谱。在 4 kHz 波段中观察到高的空化作用活性(由箭头显示), 其集中于 266 kHz、约 297 kHz 和 314 kHz 处。

人类红细胞的稀释缓冲悬浮液的破碎与频率的关系具有  $266\text{ kHz} \geq$

297 kHz > 314 kHz 的顺序。最高频率显示出最低程度破碎的事实可能是由于在该频率低阻抗与放大器的匹配效率较低。

### 实施例 1

在 80 V<sub>rms</sub> 于 266 kHz 的驱动频率对 0.6 ml 含有酵母菌株酿酒酵母菌 D1 的悬浮水溶液的液体样品进行间歇式处理。

在回转式振荡器(150 rpm (转/分钟); 25℃培养 48 小时, Mk X 振荡培养箱, LH Engineering Co. Ltd)中, 使所述酵母生长在酵母提取物蛋白胨葡萄糖(YEPD)培养基(1 L 去离子水中含有 10 g 酵母提取物、20 g 细菌学蛋白胨、20 g 葡萄糖、0.1 g 腺嘌呤和 0.1 g 尿嘧啶)上而制备样品。通过在 3000 rpm 离心 5 分钟而对细胞进行 2 次洗涤, 然后在蒸馏水中重悬浮。

用 Lowry 改良的 Folin-Ciocalteu 测定法测定样品上清液中释放蛋白质的累积。采用亚甲蓝染色细胞的显微观察(×20 和 ×40)来测定活细胞的数量, 并显示任何破碎的细胞壁物质。

在图 4 中显示这些酵母样品的破碎随时间的变化。可以看出, 在谐振的前 30 秒, 蛋白质释放迅速。显微观察(×40)显示在 60 秒出现破裂的细胞。3 分钟后测定, 温度上升 13 K。破碎相当于用商业购得的 20 kHz 微生物超声破碎器在 2.4 ml 液体样品中所获得的破碎。

### 实施例 2

制备悬浮于无菌蒸馏水中的经洗涤的 BG 孢子的原种悬浮液( $10^{10}$  cfu/ml ~  $10^{11}$  cfu/ml)。

在以下条件下对所述溶液进行间歇式处理: a) 0.6 ml, 266 kHz, 80V<sub>rms</sub>; b) 2.4 ml, 20 kHz(玻璃烧杯置于冰上, 使用以 60 W 驱动的直径为 9.54 mm 的钛探针; MSE Ltd, London, 英国); 和 c) 在 smartcycler 管中的 100 μl 含有 0.5 mg 的 106 μM 的酸洗珠(acid washed bead)悬浮液, 在 20 kHz, 使用以 100% 振幅驱动的直径为 6 mm 的钛探针(Cepheid, California, 美国)。

利用针对全 BG 孢子产生的多克隆  $\alpha$ -BG 兔抗体, 通过基于直接 ELISA 的免疫测定, 在各时间间隔测定孢子抗原的有效性。将孢子样品包埋到 Immulon 2(96 孔微滴定板)上, 在碳酸氢盐缓冲液(pH 9)中稀释, 并在 4℃培养过夜。洗涤滴定板( $\times 3$  PBS (磷酸盐缓冲液) Tween 20 0.05% 和  $\times 1$  PBS), 然后封闭(1%奶粉, PBS Tween 20, 0.05%, 在室温 2 小时)。加入抗体, 使各孔中的终浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$ , 培养(室温 1 小时)并洗涤(同前), 然后加入结合的兔 HRP(辣根过氧化物酶)。在培养(室温 1 小时)后, 洗涤滴定板( $\times 4$  PBS Tween 20 0.05% 和  $\times 1$  PBS), 并加入 ABTS 显影缓冲液。培养足以显色的时间后, 在 405 nm 波长处测定样品的吸光度。

图 5 突出显示采用各个装置 a~c 超声处理 30 s (秒)后, BG 抗原的分析敏感性的改善(发现分析敏感性在 30 秒后最高, 表明发生变性需要较长的超声处理时期)。

现在参考图 5 中的各曲线图, 在  $A^{405} 0.1$  单位曲线之间所画的水平线表明, 在 266 kHz 超声处理后分析敏感性提高了 15 倍。这种提高虽然有些落后于 c 中所获得的提高(20 倍), 但是至少与依据 b 所获得的一样好。

还测定了来自前述超声处理孢子样品的蛋白质释放。尽管 b 中所释放的蛋白质的量明显较高, 但是 a 和 b 中的释放模式明显类似。注意到尽管随着时间的变化所释放的蛋白质的量稳定增加, 但是免疫测定显示, 样品的抗原性下降。在基础装置中温度上升, 超声处理本身或其它孢子成分的释放可能会造成这种损失。

根据本发明的小型装置所获得的结果与商业购得的较大装置所获得的结果相当。而且, 与现有技术相比, 该装置具有降低与超声的高频和辐射聚焦有关的样品有害发热的固有特性。

在基础装置中, 可借助上述鼓风机辅助冷却而进一步改善对样品发热的控制。具体地, 在 266 kHz 于 80  $V_{\text{rms}}$  持续进行超声处理, 样品温度的提高可从 10 分钟后的 40℃改善为 1 小时后的 11℃。

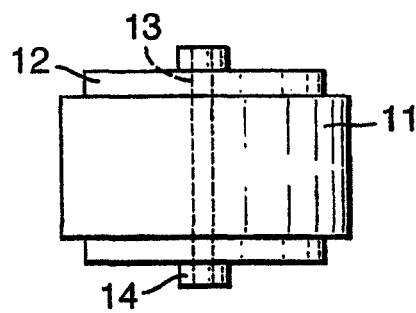


图 1

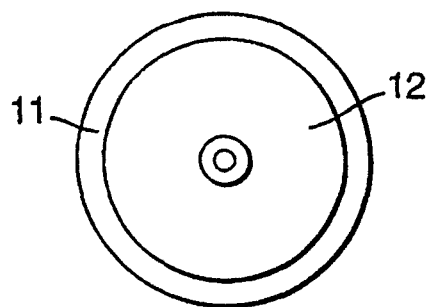


图 2(a)

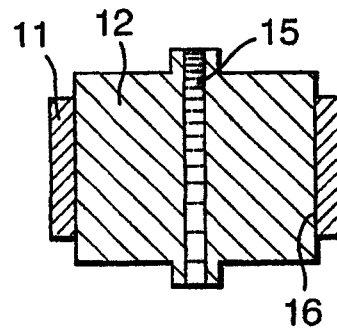


图 2(b)

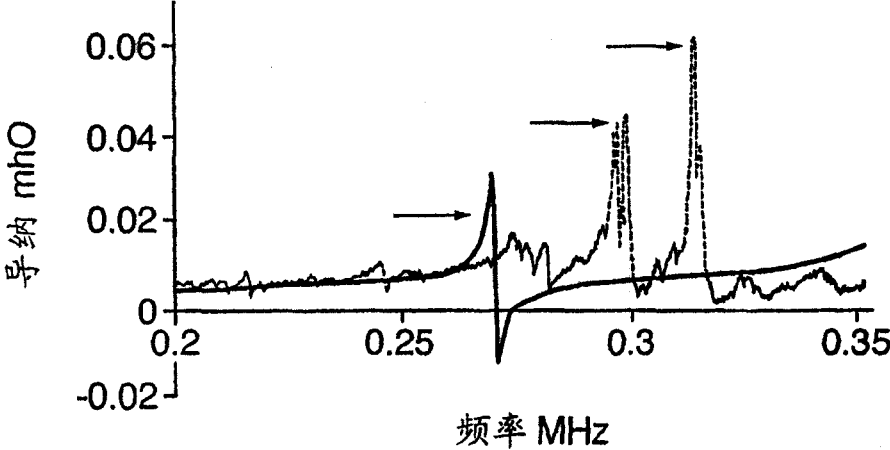


图 3

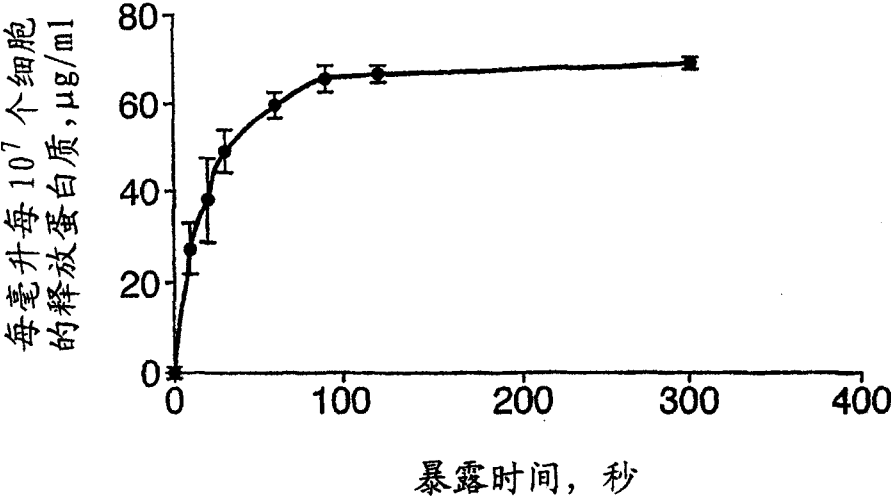


图 4

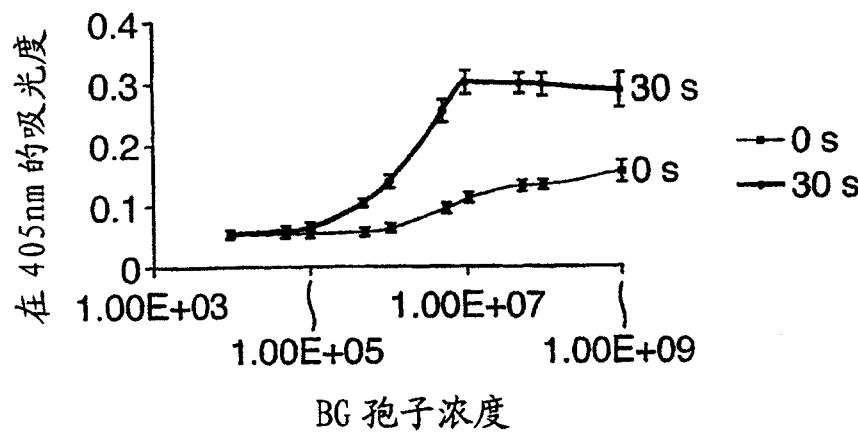


图 5 (a)

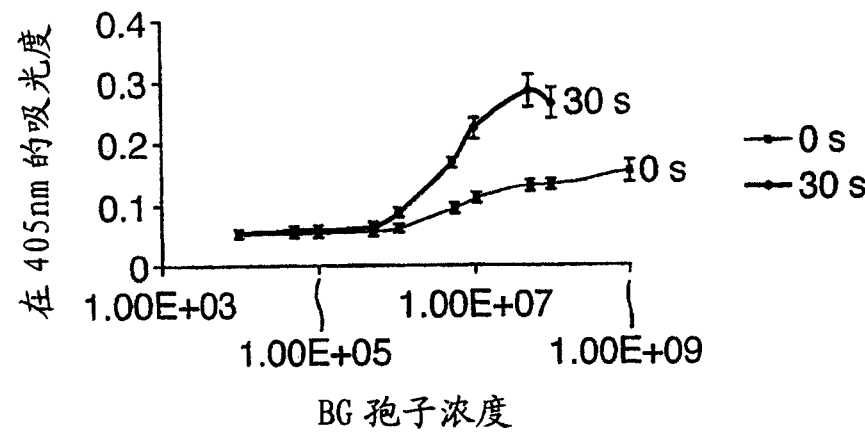


图 5 (b)

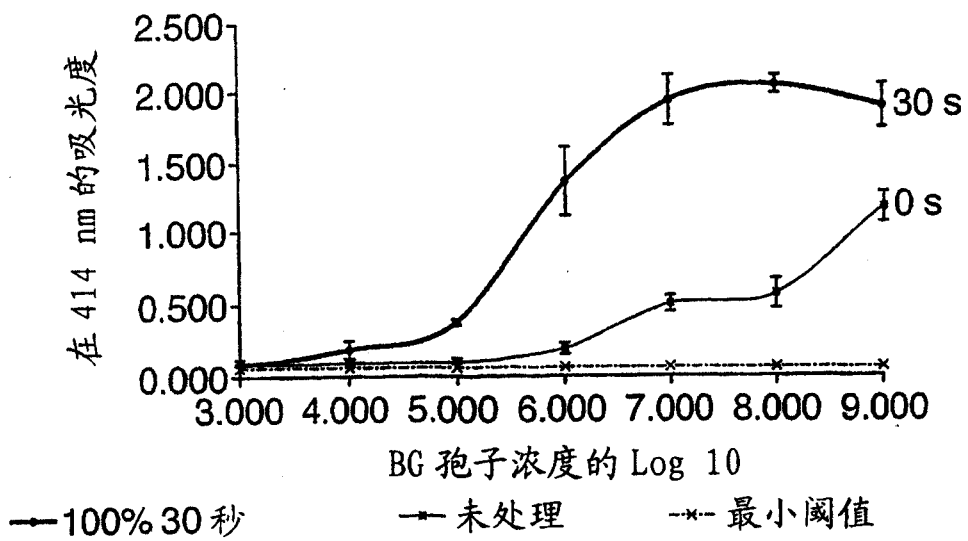


图 5 (c)