



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107109464 B

(45) 授权公告日 2021.03.30

(21) 申请号 201580061856.2

(72) 发明人 马克·B·德里斯科尔

(22) 申请日 2015.11.09

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107109464 A

代理人 吴润芝 郭国清

(43) 申请公布日 2017.08.29

(51) Int.Cl.

C12Q 1/42 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/079,156 2014.11.13 US

(56) 对比文件

WO 2009086343 A2, 2009.07.09

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 101126717 A, 2008.02.20

2017.05.15

TRAVERSO-CORI A etc. "KINETIC STUDIES  
AND PROPERTIES OF POTATO APYRASE".

(86) PCT国际申请的申请数据

《ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND  
BIOPHYSICS》.1965, 第109卷(第1期), 第173-184

PCT/US2015/059654 2015.11.09

页.

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 赵瑞琦

W02016/077185 EN 2016.05.19

权利要求书2页 说明书11页

(73) 专利权人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(54) 发明名称

用于检测样品中细菌ATP的包含ATP-二磷酸水解酶的试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测样品中细菌ATP的试剂盒。该试剂盒包含具有约6.0至7.2的pH的水性组合物。该水性组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶。还提供了一种使用该试剂盒检测细菌ATP的方法。

1. 一种试剂盒,其包含:

具有6.0至7.2的pH的水性组合物,所述组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶,其中所述ATP-二磷酸水解酶以250单位/升至2500单位/升的浓度存在于所述水性组合物中。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其还包含体细胞提取剂。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其条件是所述组合物不包含有效量的杀微生物化合物。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其条件是所述组合物不包含有效量的二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇或 $\beta$ -巯基乙醇。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其还包含荧光素酶活性物。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中所述荧光素酶活性物与所述水性组合物隔离。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述水性组合物的pH为6.4至7.0。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述多元醇选自山梨醇、木糖醇、甘油及其混合物。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其中所述多元醇包括山梨醇,其中所述山梨醇以1摩尔/升至1.6摩尔/升的浓度存在于所述水性组合物中。

10. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中水性组合物包含有效量的体细胞提取剂。

11. 根据权利要求2或权利要求10所述的试剂盒,其中所述体细胞提取剂包括非离子表面活性剂。

12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其中所述体细胞提取剂选自聚乙二醇对(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯基醚和聚乙二醇单烷基醚。

13. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述缓冲试剂包括HEPES和Tris琥珀酸盐的混合物。

14. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述缓冲试剂以0.5mM至200mM的浓度存在于所述水性组合物中。

15. 根据权利要求1所述的试剂盒,其中所述蛋白质选自血清白蛋白和纯化的胶原蛋白。

16. 根据权利要求1所述的试剂盒,其还包含细菌细胞提取剂。

17. 一种在大于0℃储存至少7天的水性组合物中保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性的方法,所述方法包括:

形成具有6.0至7.2的pH的水性组合物,所述组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶;以及

将所述水性组合物于包括端值在内的1-25℃之间的温度下储存至少7天的时间段;

其中所述水性组合物在第一时间点具有初始ATP-二磷酸水解酶活性;

其中所述pH和所述有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得所述组合物保持在25℃下从所述第一时间点直到所述第一时间点后至少7天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的所述初始ATP-二磷酸水解酶活性;

其中所述ATP-二磷酸水解酶活性是在pH 7.75并使用非限速浓度的ATP、荧光素和荧光素酶的条件下用生物发光偶联测定法在25℃下测量的。

18. 根据权利要求17所述的方法，其中所述pH和所述有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得所述组合物保持在25℃下从所述第一时间点直到所述第二时间点之后能够保留大于或等于95%的所述初始ATP-二磷酸水解酶活性。

19. 一种定量样品中细菌ATP的方法，所述方法包括：

形成包含样品和水性组合物的第一混合物；

其中所述水性组合物具有6.8至7.2的pH，并且包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶；

将所述第一混合物在预先确定的温度下保持第一时间段；

将所述第一混合物与细菌细胞提取剂、荧光素酶、荧光素和缓冲试剂组合以形成具有7.75的pH的第二混合物；以及

测量荧光素酶催化的生物发光反应。

## 用于检测样品中细菌ATP的包含ATP-二磷酸水解酶的试剂盒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年11月13日提交的美国临时专利申请62/079,156的优先权，该专利申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 需要对涉及工业过程的多种工业产品和其它样品(原材料、过程中样品、环境样品等)进行微生物污染测试。在一些情况下,最终产品必须是无菌的;在其它情况下,对所允许的微生物总数设定限制。经常对某些特定生物体的存在进行测试,并且此外可能对具体量的样品不存在要求或对所允许的数量可能有所限制。

[0004] 传统上,这些测试涉及使用培养技术。然而,这些传统的测试方法很慢。通常,在健康的、快速生长的细菌或酵母形成足够大的菌落以在琼脂板上轻松计数之前,一般需要花费至少24小时。然而,许多样品含有在其开始繁殖之前需要恢复期的应激微生物或在常见类型的培养基上生长缓慢的生物体(包括霉菌)。因此,许多经过验证的培养方法需要24-48小时的孵育期,并且在一些情况下需要5天或更多。

[0005] 现在许多微生物测试使用ATP生物发光反应检测从细胞(例如微生物细胞)中释放的ATP来更快速地进行。ATP是能量代谢的必要部分,并且因此是活生物体或其它有机物质存在的指示物。

[0006] 这些测试利用荧光素酶。生物发光试剂含有荧光素酶以及尤其是荧光素酶的底物荧光素、镁离子和合适的缓冲剂。当向此试剂中添加腺苷-5'-三磷酸(ATP)时,荧光素酶催化光发射。测试结果记录为RLU(相对光单位)值。RLU值通常与存在于测试样品中的微生物量成比例。

[0007] 某些样品(例如牛奶)可能含有相对高水平的与酪蛋白胶束相关的游离ATP和存在于体细胞中的ATP。在这些情况下,螯合剂可以用于破坏胶束,温和洗涤剂可以用于裂解体细胞,并且“非微生物”ATP可以使用三磷酸腺苷双磷酸酶(ATP水解酶)水解;从而能够实现对微生物ATP的检测。仍然需要简单、方便的检测微生物ATP的测试。

### 发明内容

[0008] 本公开涉及包含在环境温度(例如约25°C)下格外稳定的ATP-二磷酸水解酶的水性组合物的试剂盒以及制备所述组合物的方法。已知包含ATP-二磷酸水解酶的基本干燥的组合物在0°C下是稳定的。还已知,当冷冻储存时,≥1mg/mL的ATP-二磷酸水解酶在水性组合物(pH 5-7)中可以是稳定的。甚至还已知<1mg/mL的ATP-二磷酸水解酶可以储存在包含1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM DTT、1mM EDTA和1mg/mL牛白蛋白的水性组合物(pH 7.5)中。然而,还已知反复冻融循环和室温暴露数小时导致水性溶液中ATP-二磷酸水解酶活性的丧失。该组合物可以用于检测样品中细菌ATP的试剂盒中。

[0009] 本公开的发明性的水性组合物在室温(例如约21-25°C)下储存至少28天之后令人惊奇地保留了大于或等于约90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。有利的是,在环境温度下

水性溶液中ATP-二磷酸水解酶的这种稳定允许在用于检测ATP生物发光的试剂盒中使用水性组合物。

[0010] 在一个方面,本公开提供了包含具有约6.0至7.2的pH的水性组合物的试剂盒。水性组合物可以包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶。在任何实施方案中,多元醇可以包括山梨醇,缓冲试剂可以包括HEPES、Tris和琥珀酸盐的混合物,并且蛋白质可以包括牛血清白蛋白。

[0011] 在另一个方面,本公开提供了在大于0℃储存至少7天的水性组合物中保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性的方法。该方法可以包括形成具有约6.0至7.2的pH的水性组合物,该组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶;以及将该水性组合物于包括端值在内的1-25℃之间的温度下储存至少7天的时间段。水性组合物在第一时间点具有ATP-二磷酸水解酶活性的初始浓度。有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在25℃下从第一时间点直到第一时间点后7天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。ATP-二磷酸水解酶活性是在pH 7.75并使用非限速浓度的ATP、荧光素和荧光素酶的条件下用生物发光偶联测定法测量的。在上述方法的任何实施方案中,有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合,可以使得组合物保持在25℃下从第一时间点直到第一时间点后28天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。在该方法的任一上述实施方案中,有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合,可以使得组合物保持在25℃下从第一时间点直到第二时间点之后能够保留大于或等于95%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。

[0012] 术语“包括”及其变型形式在说明书和权利要求书中出现这些术语的地方不具有限制的含义。

[0013] 如本文所用,“一个”、“一种”、“所述(该)”、“至少一个(种)”以及“一个(种)或多个(种)”可互换使用。因此,例如,一种缓冲试剂可以理解为“一种或多种”缓冲试剂。

[0014] 术语“和/或”意指所列要素的一个或全部,或者所列要素的任何两个或更多个的组合。

[0015] 另外,在本文中,通过端点表述的数值范围包括该范围内所含的所有数值(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0016] 本发明的上述发明内容并非旨在描述本发明的每个公开的实施方案或每种实现方式。以下描述更具体地例示了示例性实施方案。在本申请全文的若干处,通过实施例列表提供了指导,这些实施例可以各种组合使用。在每种情况下,所引用的列表都只用作代表性的组,并且不应理解为排它性列表。

[0017] 在以下所示附图和说明书中阐述了这些和其它实施方案的另外细节。通过说明书和权利要求书,其它特征、目的和优点将变得显而易见。

## 具体实施方式

[0018] 在详细阐释本公开的任何实施方案之前,应当理解,本发明在其应用中不限于以下说明中阐述或以下附图中示出的构造细节和部件布置方式。本发明能够拥有其它实施方案,并且能够通过各种方式实践或进行。另外,应当理解,本文使用的措词和术语是出于描

述目的而不应被视为限制性的。本文使用的“包括”、“包含”或“具有”及其变型形式意在涵盖其后列出的项目及其等同形式以及附加的项目。

[0019] 现在已知本公开的水性组合物可以与荧光素酶、荧光素和ATP来源组合来检测样品中活微生物。水性组合物可以用于在微生物细胞(如果样品中存在的话)破坏之前从样品中去除“游离”ATP并且在生物发光酶促反应中检测与破坏的细胞相关的ATP。令人惊奇的是,组合物可以在环境温度或低于环境温度下储存至少四周的时间段后保留至少90%的初始三磷酸腺苷双磷酸酶活性。

[0020] 本公开提供一种试剂盒。在任何实施方案中,试剂盒可以用于检测与有活力的微生物相关的ATP。试剂盒包括本文公开的组分,以及任选地用于使用这些组分的说明书。试剂盒包含具有约6.0至约7.2的pH的水性组合物,该组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶。

[0021] 本公开的水性组合物可以用于检测样品(例如,牛奶)中微生物ATP的方法。将水性组合物与可能包含非微生物ATP的样品混合(例如,稀释)。因此,通过ATP-二磷酸水解酶的作用从样品中消除无细胞(非微生物)ATP。随后,微生物(如果样品中存在的话)被裂解,并且可以使用本领域已知的检测方法(例如,ATP依赖性生物发光)检测微生物ATP。

[0022] 因此,本公开的水性组合物包含一定量(例如,浓度)的ATP二磷酸水解酶,使得当与样品混合时能在相对较短的时间段内(例如,小于数小时、小于一小时、小于或等于30分钟、小于或等于20分钟、小于或等于15分钟、小于或等于10分钟、小于或等于5分钟、小于或等于2分钟、小于或等于1分钟、小于1分钟)有效水解样品中ATP。因此,ATP-二磷酸水解酶的“有效量”涉及ATP-二磷酸水解酶在其中使用ATP-二磷酸水解酶的方法中(例如,在检测非微生物ATP的方法中)的功能。

[0023] 尽管水性组合物的多元醇、缓冲试剂和/或蛋白质也可以在其中使用ATP-二磷酸水解酶的方法中具有功能;如本文所用,多元醇、缓冲试剂和蛋白质的“有效量”具体地涉及它们在水性组合物的储存期间(例如,在催化反应中使用ATP-二磷酸水解酶活性之前)保存ATP-二磷酸水解酶活性的作用。水性组合物的多元醇、缓冲剂和/或蛋白质组分的活性保存作用使得含ATP-二磷酸水解酶的水性组合物在环境温度(例如,约25°C)、高于环境温度或低于环境温度下能够储存。

[0024] 本公开的水性组合物包含有效量的至少一种缓冲试剂。在任何实施方案中,缓冲试剂用于将水性组合物的pH(在室温下)维持在约6.0至约7.2。在任何实施方案中,缓冲试剂用于将水性组合物的pH(在室温下)维持在约6.8至约7.2。在任何实施方案中,缓冲试剂用于将水性组合物的pH(在室温下)维持在约6.9至约7.1。缓冲试剂可以是具有约6-8的pKa的任何合适的缓冲剂化合物或用于在上述pH下缓冲水性溶液的所述化合物的混合物,其条件是当试剂以有效浓度(即适合于维持pH的浓度)存在于水性组合物中时,缓冲试剂基本上不抑制ATP-二磷酸水解酶活性。优选地,在水性组合物中的操作浓度下,当水性组合物接触荧光素酶时,缓冲试剂也基本上不抑制荧光素酶活性物。合适的缓冲试剂的示例包括(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸)(“HEPES”)、三(羟甲基)氨基甲烷(“Tris”)、琥珀酸、磷酸盐、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、ADA、ACES、PIPES、MOPS、BES、TES、前述缓冲试剂的任一种的盐以及前述缓冲试剂的任何两种或更多种的混合物。在任何实施方案中,水性组合物包含HEPES、Tris和琥珀酸盐缓冲试剂。在任何实施方案中,至少一种缓冲试剂以约0.5mM至约

200mM的浓度存在于水性组合物中。

[0025] 在任何实施方案中,水性组合物在室温(即约25°C)下的pH为约6.0至约7.2。在任何实施方案中,水性组合物在室温下的pH在包括端值在内的6.0和7.2之间。在任何实施方案中,水性组合物在室温下的pH在包括端值在内的6.4和7.0之间。在任何实施方案中,水性组合物在室温下的pH为约7.0。

[0026] 本公开的水性组合物包含有效量的多元醇。已知多元醇诸如蔗糖和山梨醇在冷冻储存期间有效保存肌原纤维蛋白的功能特性。适用于本公开的水性组合物的多元醇包括但不限于山梨醇、木糖醇、甘油及其混合物。用于稳定蛋白质的多元醇的有效量是本领域已知的。在任何实施方案中,多元醇是山梨醇。在任何实施方案中,山梨醇以包括端值在内的约1摩尔/升至约1.6摩尔/升的浓度存在于水性组合物中。

[0027] 本公开的水性组合物包含催化ATP水解以产生AMP和无机磷酸盐的ATP-二磷酸水解酶(三磷酸腺苷双磷酸酶)。在任何实施方案中,ATP-二磷酸水解酶衍生自马铃薯提取物。有利的是,水性组合物的其它特征(例如,pH、缓冲剂、多元醇、蛋白质)一致地用来在大于0°C的温度下在延长的时间段内(例如,大于一周、大于两周、大于3周、大于4周)稳定ATP-二磷酸水解酶活性。如本文所用,“稳定ATP-二磷酸水解酶活性”意指当使用具有固定量的ATP、荧光素和荧光素酶的偶联酶测定来测量活性时,在大于0°C储存之前存在于水性组合物中至少90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性在储存期之后保留在水性组合物中。

[0028] ATP-二磷酸水解酶活性以可用于催化细胞外ATP快速(例如,在15分钟内)分解成AMP和无机磷酸盐的浓度存在于水性组合物中。然而,优选地,ATP-二磷酸水解酶活性以基本上不干扰在pH 7.75下的荧光素酶/荧光素反应中细胞外ATP的测量的浓度存在于水性组合物中。在任何实施方案中,本公开的水性组合物中ATP-二磷酸水解酶活性的浓度是约250单位/升至约2500单位/升。在任何实施方案中,本公开的水性组合物中ATP-二磷酸水解酶活性的浓度是约600单位/升至约1200单位/升。

[0029] 本公开的水性组合物包含有效量的蛋白质。该蛋白质与水性组合物中存在的ATP-二磷酸水解酶不同。该蛋白质功能用于在大于0°C的温度下稳定ATP-二磷酸水解酶活性。用于本公开的水性组合物中合适蛋白质的非限制性示例包括血清白蛋白和纯化的胶原蛋白(例如,由密苏里州圣路易斯的西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich(St.Louis,MO))以商品名PRIONEX®出售的纯化的胶原蛋白)。在任何实施方案中,水性组合物包含血清白蛋白。在任何实施方案中,本公开的水性组合物中蛋白质(例如,血清白蛋白)的有效量是约100mg/L至约1000mg/L。

[0030] 在任何实施方案中,本公开的试剂盒任选地包含预先确定的量的体细胞提取剂。体细胞提取剂可以用于引起体细胞(即例如非微生物细胞诸如哺乳动物细胞和植物细胞)的裂解。在试剂盒的任何实施方案中,体细胞提取剂可以提供在与水性组合物隔离的试剂盒中(即,在与水性组合物不同的主容器中),或者试剂盒可以在水性组合物中提供有效量的体细胞提取剂。如果与水性组合物分开提供,则体细胞提取剂可以呈粉末或液体形式提供,其中任一种可以部分或全部与水性组合物混合以在水性组合物中提供有效量的体细胞提取剂。

[0031] 在任何实施方案中,体细胞提取剂可以包括非离子表面活性剂。合适的体细胞提取剂的示例包括但不限于聚乙二醇对(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯基醚、聚乙二醇单烷基醚

及其混合物。

[0032] 在本公开的水性组合物的任何实施方案中，组合物不包含有效量的杀微生物剂(例如，叠氮化合物)。在水性溶液中通常使用有效量的杀微生物剂化合物以防止微生物在溶液中生长。然而，本公开的水性组合物中有有效量的杀微生物剂化合物(如果存在的话)会使水性组合物在用于检测样品中微生物ATP的方法的某些实施方案中(例如，在其中用微生物细胞提取剂处理样品以引起ATP从微生物细胞中释放之前用ATP-二磷酸水解酶活性处理“游离”ATP或“体细胞”ATP的方法的实施方案中的)的使用无效。

[0033] 在本公开的水性组合物的任何实施方案中，组合物不包含有效量的包含巯基的化合物或能够还原蛋白质中二硫键的硫醇。含巯基化合物(例如，二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇)和硫醇(例如，2-巯基乙醇)用于在水性溶液中稳定某些酶(例如，蛋白酶)的活性。因此，在任何实施方案中，本公开的水性组合物不包括有效量的二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇或β-巯基乙醇。

[0034] 在任何实施方案中，本公开的试剂盒任选地包含荧光素酶活性物。在任何实施方案中，荧光素酶活性物可以与水性组合物隔离(即，在分开的主容器中)。荧光素酶活性物可以呈冻干形式提供，例如该冻干形式可以在使用前再水化。

[0035] 在任何实施方案中，本公开的试剂盒任选地包含微生物(例如，细菌)细胞提取剂。细菌细胞提取剂可以与本公开的水性组合物一起用于检测样品中微生物ATP的方法中。合适的微生物细胞提取剂的示例包括但不限于季铵化合物(例如，十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十二烷基三甲基溴化铵(DTAB))或阳离子聚双胍化合物(例如，氯己定或其盐)。在任何实施方案中，微生物细胞提取剂包括葡糖酸氯己定。在任何实施方案中，细菌细胞提取物还包括非离子洗涤剂(例如，TRITON N-60)，当与阳离子细胞提取剂组合时该非离子洗涤剂可以促进细胞提取。

[0036] 在另一个方面，本公开提供一种方法。该方法可以用于在大于0°C储存至少7天的水性组合物中保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。该方法包括形成本公开的水性组合物的任何实施方案，该组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶，各自如本文所公开；以及将该组合物于包括端值在内的1-25°C之间储存至少7天。pH和有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第一时间点后至少7天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性，其中ATP-二磷酸水解酶活性是在pH 7.75并使用非限速浓度的ATP、荧光素和荧光素酶的条件下用生物发光偶联测定法测量的。在本文的实施例2中描述了用于测量ATP-二磷酸水解酶活性的示例性生物发光偶联测定(“ATP测定”)。

[0037] 在该方法的任何实施方案中，有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第一时间点后14天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。在该方法的任何实施方案中，有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第一时间点后21天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。在该方法的任何实施方案中，有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第一时间点后28天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。在该

方法的任何实施方案中, pH和有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第二时间点之后能够保留大于或等于95%的初始ATP-二磷酸水解酶活性;其中第二时间点是第一时间点后的7天、14天、21天或28天。

[0038] 在另一个方面,本公开提供一种方法。该方法可以用于定量样品中细菌ATP。该方法包括将样品与本文公开的水性组合物的任何实施方案组合以形成第一混合物,其中水性组合物具有约6.9至约7.1的pH;将第一混合物在预先确定的温度下保持第一时间段;将第一混合物与细菌细胞提取剂、荧光素酶、荧光素和缓冲试剂组合以形成具有约7.75的pH的第二混合物;以及测量荧光素酶催化的生物发光反应。

[0039] 在该方法的任何实施方案中,样品可以包括水性样品。在一个优选的实施方案中,样品包括牛奶(例如,生牛奶)。

[0040] 在任何实施方案中,在该方法中使用的组合物具有约6.8至约7.2的pH。将样品与水性组合物组合以形成第一混合物后,将第一混合物在预先确定的温度(例如,环境温度)下保持一段时间(例如,约1分钟、约2分钟、约3分钟、约5分钟、约10分钟、约15分钟、约20分钟、约25分钟、约30分钟)以便允许ATP-二磷酸水解酶水解样品中存在的任何ATP。

[0041] 在任何实施方案中,将样品与水性组合物组合以形成第一混合物,任选地包括形成包含有效量的体细胞提取剂的第一混合物。如本文所述,体细胞提取剂可以单独添加到第一混合物中,或者它可以在样品中提供或在水性组合物中提供。如本文所讨论,在使样品与细菌细胞提取剂接触之前,体细胞提取剂可以用于引起样品中体细胞(即,例如非微生物细胞诸如哺乳动物细胞和植物细胞)的裂解。

[0042] 在将第一混合物保持第一个时间段后,将第一混合物与细菌细胞提取剂、荧光素酶、荧光素和缓冲试剂组合以形成具有约7.75的pH的第二混合物。一旦形成第二混合物;样品中细菌(如果存在的话)被裂解并且释放它们的ATP。释放的细菌ATP可以与本领域熟知的生物发光反应中荧光素酶和荧光素反应。可以使用光度计监测反应以确定样品中细菌ATP的量。

[0043] 示例性实施方案

[0044] 实施方案A是一种试剂盒,其包含:

[0045] 具有约6.0至约7.2的pH的水性组合物,该组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶。

[0046] 实施方案B是实施方案A的试剂盒,其还包含体细胞提取剂。

[0047] 实施方案C是实施方案A或实施方案B的试剂盒,其条件是组合物不包含有效量的杀微生物化合物。

[0048] 实施方案D是实施方案C的试剂盒,其中杀微生物化合物包含叠氮化物部分。

[0049] 实施方案E是前述实施方案中任一项的试剂盒,其条件是组合物不包含有效量的二硫苏糖醇、二硫赤藓糖醇或 $\beta$ -巯基乙醇。

[0050] 实施方案F是前述实施方案中任一项的试剂盒,其还包含荧光素酶活性物。

[0051] 实施方案G是实施方案F的试剂盒,其中荧光素酶活性物与水性组合物隔离。

[0052] 实施方案H是前述实施方案中任一项的试剂盒,其中水性组合物的pH为约6.4至约7.0。

[0053] 实施方案I是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中多元醇选自山梨醇、木糖醇、甘油及其混合物。

[0054] 实施方案J是实施方案I的试剂盒，其中多元醇包括山梨醇。

[0055] 实施方案K是实施方案J的试剂盒，其中山梨醇以约1摩尔/升至约1.6摩尔/升的浓度存在于水性组合物中。

[0056] 实施方案L是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中水性组合物包含有效量的体细胞提取剂。

[0057] 实施方案M是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中体细胞提取剂包括非离子表面活性剂。

[0058] 实施方案N是实施方案M的试剂盒，其中体细胞提取剂选自聚乙二醇对(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯基醚和聚乙二醇单烷基醚。

[0059] 实施方案O是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中缓冲试剂包括HEPES和Tris琥珀酸盐的混合物。

[0060] 实施方案P是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中缓冲试剂以约0.5mM至约200mM的浓度存在于水性组合物中。

[0061] 实施方案Q是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中蛋白质选自血清白蛋白和纯化的胶原蛋白。

[0062] 实施方案R是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中蛋白质以约100mg/L至约1000mg/L的浓度存在于水性组合物中。

[0063] 实施方案S是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中ATP-二磷酸水解酶衍生自马铃薯的提取物。

[0064] 实施方案T是前述实施方案中任一项的试剂盒，其中ATP-二磷酸水解酶以约250单位/升至约2500单位/升的浓度存在于水性组合物中。

[0065] 实施方案U是前述实施方案中任一项的试剂盒，其还包含细菌细胞提取剂。

[0066] 实施方案V是实施方案U的试剂盒，其中细菌细胞提取剂包括葡萄糖酸氯己定。

[0067] 实施方案W是一种在大于0°C储存至少7天的水性组合物中保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性的方法，该方法包括：

[0068] 形成具有约6.0至7.2的pH的水性组合物，该组合物包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶；以及

[0069] 将该水性组合物于包括端值在内的1-25°C之间的温度下储存至少7天的时间段；

[0070] 其中水性组合物在第一时间点具有初始ATP-二磷酸水解酶活性；

[0071] 其中pH和有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第一时间点后至少7天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性；

[0072] 其中ATP-二磷酸水解酶活性是在pH 7.75并使用非限速浓度的ATP、荧光素和荧光素酶的条件下用生物发光偶联测定法测量的。

[0073] 实施方案X是实施方案W的方法，其中有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25°C下从第一时间点直到第一时间点后14天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。

[0074] 实施方案Y是实施方案W的方法,其中有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25℃下从第一时间点直到第一时间点后21天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。

[0075] 实施方案Z是实施方案W的方法,其中有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25℃下从第一时间点直到第一时间点后28天的第二时间点之后能够保留大于或等于90%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。

[0076] 实施方案AA是实施方案W至Z中任一项的方法,其中pH和有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶的组合使得组合物保持在约25℃下从第一时间点直到第二时间点之后能够保留大于或等于95%的初始ATP-二磷酸水解酶活性。

[0077] 实施方案AB是一种试剂盒,其包含:

[0078] 具有约6.0-7.2的pH的水性组合物,该组合物包含有效量的山梨醇、HEPES、Tris琥珀酸盐、血清白蛋白和ATP-二磷酸水解酶活性。

[0079] 实施方案AC是实施方案AB的试剂盒,其中在水性组合物中,山梨醇的有效量是约1.3M,HEPES缓冲剂的有效量是约1mM,Tris琥珀酸盐的有效量是约1mM,血清白蛋白的有效量是约230mg/L,并且ATP-二磷酸水解酶活性的有效量是约600-1200单位/升。

[0080] 实施方案AD是实施方案AB或实施方案AC的试剂盒,其还包含聚乙二醇单烷基醚。

[0081] 实施方案AE是实施方案AD的试剂盒,其中聚乙二醇单烷基醚的有效量是约0.09重量%。

[0082] 实施方案AF是一种定量样品中细菌ATP的方法,该方法包括:

[0083] 形成包含样品和水性组合物的第一混合物;

[0084] 其中水性组合物具有约6.8至约7.2的pH,并且包含有效量的多元醇、缓冲试剂、蛋白质和ATP-二磷酸水解酶;

[0085] 将第一混合物在预先确定的温度下保持第一时间段;

[0086] 将第一混合物与细菌细胞提取剂、荧光素酶、荧光素和缓冲试剂组合以形成具有约7.75的pH的第二混合物;以及

[0087] 测量荧光素酶催化的生物发光反应。

[0088] 实施方案AG是实施方案AF的方法,其中形成第一混合物还包括形成包含有效量的体细胞提取剂的第一混合物。

[0089] 实施方案AH是实施方案AG的方法,其中水性混合物包含有效量的体细胞提取剂。

#### [0090] 实施例

[0091] 通过下面的实施例进一步说明了本发明的目的和优点,但这些实施例中列举的具体材料及其量以及其它条件和细节不应被理解为对本发明的不当限制。除非另外指明,否则所有的份数和百分比以重量计,所有的水是蒸馏水并且所有的分子量是重均分子量。

#### [0092] 材料

[0093] 表1.在实施例中使用的材料。

化学品	来源
ATP	料号 10127531001; 德国曼海姆的罗氏诊断产品有限公司 (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, DE)
山梨醇	料号 39278657; 英国多塞特郡的 Molekula 有限公司 (Molekula Ltd.; Dorset, UK)
L/L1(荧光素/荧光素酶)	荧光素和荧光素酶的冻干组合物; 可与明尼苏达州圣保罗的 3M 公司 (3M Company; St. Paul, MN) 的复原缓冲剂(根据料号 3003B) 分开获得;
芦布若尔	料号 195299; 俄亥俄州梭伦的 MP 生物医学公司 (MP Biomedical; Solon, OH)
牛血清白蛋白 (BSA)	料号 A4378; 密苏里州圣路易斯的西格玛化工公司 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)
三磷酸腺苷双磷酸酶 (来自马铃薯)	密苏里州圣路易斯的西格玛化工公司 (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO)

[0094] [0095] 参考例1. 在25°C下储存不同的时间段后冻干的ATP-二磷酸水解酶活性的稳定性。

[0096] 对于三磷酸腺苷双磷酸酶的长期储存本领域的当前状态是对酶进行冻干。当可能时,冻干的酶被储存在4°C或低于4°C,但它可以被储存在环境温度(25°C)下一定时间,如本参考实施例所示。冻干的ATP-二磷酸水解酶的小瓶(三磷酸腺苷双磷酸酶,料号62058354;明尼苏达州圣保罗的3M公司)在室温下储存表2所示的时间段。在每个相应的时间点(时间点“1”发生在环境温度下储存的初始日,时间点“2”发生在环境温度下储存6-7天后,时间点“3”发生在环境温度下储存14-15天后,时间点“4”发生在环境温度下储存21-22天后,并且时间点“5”发生在环境温度下储存28-29天后),根据制造商的说明书将这些小瓶中的一个进行复原。复原的酶用于以下所述的ATP测定中。如本文所述测量RLU/s。“%剩余”是指冻干的酶在环境温度下储存每个相应的时间段之后剩余的初始(时间点“1”)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的百分比。

[0097] 表2. 在环境温度下储存期间冻干的三磷酸腺苷双磷酸酶的稳定性。如本文所述测量RLU/s。“%剩余”是指在环境温度下储存之后在测试的每个相应的小瓶中的剩余的初始(时间点“1”)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的百分比。

时间点	RLU/s	%剩余
1	92	100
2	93.5	102
3	101.8	110
4	88	95.7
5	90	98

[0098] [0099] 结果指示冻干的三磷酸腺苷双磷酸酶在环境温度下稳定至少约4周。

[0100] 实施例1. 包含ATP-二磷酸水解酶的水性组合物 (pH7.0)

[0101] 通过在室温下混合表3中所列的成分制备包含三磷酸腺苷双磷酸酶(ATP-二磷酸水解酶)的水性组合物。使用1M NaOH将所得溶液的pH调节至7.0。将所得的水性组合物放置在储存在环境温度(25°C)下的密封STERILIN容器中。

[0102] 比较例1. 包含ATP-二磷酸水解酶的水性组合物(pH 7.75)

[0103] 通过在室温下混合表3中所列的成分制备包含三磷酸腺苷双磷酸酶(ATP-二磷酸水解酶)的水性组合物。使用1M NaOH将所得溶液的pH调节至7.75。将所得的水性组合物放置在储存在环境温度(25°C)下的密封STERILIN容器中。

[0104] 表3.三磷酸腺苷双磷酸酶制剂的组成

化学品	量
山梨醇	118.75g
芦布若尔	5g
HEPES	0.12g
Tris 琥珀酸盐	0.18g
牛血清白蛋白 (BSA)	0.115g
西格玛的三磷酸腺苷双磷酸酶 (来自马铃薯)	300-600 个单位
去离子水	422.65g

[0105] [0106] 储存在25°C下的水性组合物中ATP-二磷酸水解酶的稳定性。

[0107] 在环境温度下储存表4所示的时间段后,将等分试样从每个容器(即,实施例1和比较例1,以及参考例1)中取出并且用于以下所述的ATP测定中。

[0108] ATP测定:

[0109] 根据制造商的说明书将LL1的小瓶复原。通过在比色皿中(在25°C下)将600微升复原的LL1与50微升水性三磷酸腺苷双磷酸酶组合物(即,实施例1或比较例1的组合物)和50微升的10<sup>-7</sup>M ATP混合来制备用于确定三磷酸腺苷双磷酸酶活性的单独的测试样品。制备样品后,立即通过追踪光度计中8分钟内ATP衰变的速度来测量比色皿中三磷酸腺苷双磷酸酶活性。以每秒的相对光单位(RLU/s)记录结果。与起始时间点(“时间点1”)相比,每个连续的时间点处的相对较高的RLU/s数值指示在储存期间保留了较大分数的原始三磷酸腺苷双磷酸酶活性。在时间点“1”,制备用于测试三磷酸腺苷双磷酸酶活性的单个样品,并且在制备单个水性组合物(实施例1和比较例1)的同一天测试(如上所述)这些单个样品。在时间点“2”,从用于在已经老化6-7天的水性组合物中测试(如上所述)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的STERILIN容器中取出用于测试三磷酸腺苷双磷酸酶活性的单个的50微升样品。在时间点“3”,从用于在已经老化14-15天的水性组合物中测试(如上所述)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的STERILIN容器中取出用于测试三磷酸腺苷双磷酸酶活性的单个的50微升样品。在时间点“4”,从用于在已经老化21-22天的水性组合物中测试(如上所述)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的STERILIN容器中取出用于测试三磷酸腺苷双磷酸酶活性的单个的50微升样品。在时间点“5”,从用于在已经老化28-29天的水性组合物中测试(如上所述)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的STERILIN容器中取出用于测试三磷酸腺苷双磷酸酶活性的单个的50微升样品。结果在表4中示出。

[0110] 表4. 在环境温度下储存期间水性三磷酸腺苷双磷酸酶溶液的稳定性。如本文所述测量RLU/s。“%剩余”是指在环境温度下储存之后在测试的每个相应的组合物中的剩余的初始(时间点“1”)三磷酸腺苷双磷酸酶活性的百分比。

时间点	实施例 1		比较例 1	
	RLU/s	%剩余	RLU/s	%剩余
[0111]	1	107	100	108
	2	105.35	98	100
	3	108.4	101	95.8
	4	102	95.3	108
	5	107.2	100	82.6
				76.5

[0112] 数据指示具有7.0的pH的水性组合物在环境温度下储存期间比具有7.75的pH的类似组合物保留显著更多的ATP-二磷酸水解酶活性。

[0113] 本文引用的所有专利、专利申请和出版物的全部公开内容以及可供使用的电子版材料均以引用的方式并入。在本申请的公开内容和以引用的方式并入本文的任何文献的公开内容之间存在任何不一致的情况下,应以本申请的公开内容为准。上述具体实施方式和实施例仅为清楚理解本发明而给出。而不应被理解为不必要的限制。本发明并不限于所示和所述的准确细节,对本领域的技术人员显而易见的变型将包括在由权利要求书所限定的本发明内。

[0114] 所有的标题是为了方便阅读者,而不应当用于限制该标题后面的正文的含义,除非如此规定。

[0115] 本文说明性地描述的本发明可在不存在本文未具体公开的任何元素的情况下进行适当地实践。因此,例如,在本文的每个实例中,术语“包括”、“基本上由……组成”和“由……组成”中的任一个可被替换为其它两个术语中的任一个。尽管将已采用的术语和表达用作描述而非限制术语,并且非旨在使用此类术语和表达而排出所示和所描述的特征或其部分的任何等同物,但是已经认识到,在所要求保护的本发明的范围内的各种修改是可能的。因此,应当理解,尽管本发明已通过优选的实施方案和任选的特征而具体公开,但是本领域的技术人员可推出本文所公开的概念的修改和变型,并且此类修改和变型被视为在由所附的权利要求书所限定的本发明的范围内。