



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1908186 B

(45) 授权公告日 2011.05.25

(21) 申请号 200610104177.1

(22) 申请日 2006.08.03

(66) 本国优先权数据

200510047028.1 2005.08.09 CN

(73) 专利权人 沈阳中科靛马生物工程有限公司

地址 110036 辽宁省沈阳市于洪区白山路

101-2 号

(72) 发明人 金振华 卢麟麟 李越 李红

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

C12Q 1/06 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1051758 A, 1991.05.29, 全文.

US 5965453 A, 1999.10.12, 全文.

CN 1164259 A, 1997.11.05, 全文.

审查员 许欣嘉

权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种测定细菌总数的方法及其专用试剂与装置

(57) 摘要

本发明涉及一种测定细菌总数的方法、专用试剂与装置。测定细菌总数的试剂组分两种；①由体细胞三磷酸腺苷释放试剂 (TRA) 和细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂 (AFA) 构成；②由体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂 (TREA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂 (XRA) 和发光试剂 (LLR) 构成。测定细菌总数装置，包括细菌 ATP 检测杯和荧光检测仪，其细菌 ATP 检测杯，具有一底端、一开口顶端；当使用试剂组①时，用底端带直径为 0.15 μm-0.50 μm 孔的可浸透过滤器的 ATP 检测杯；当使用试剂组②时，则用底端无孔的 ATP 检测杯。通过所述试剂与装置，能有效排除非细菌产生的三磷酸腺苷，在 1-5 分钟内完成环境或食品的细菌总数检测。

1. 测定细菌总数的试剂,由体细胞三磷酸腺苷释放试剂组和细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组构成;

所述体细胞三磷酸腺苷释放试剂组由以下成分组成:

Tricine	10-15mM
EDTA	0.2-0.3mM
Triton X-100	0.005-0.015%
pH	6.5-8.0;

所述细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组由以下成分组成:

萤火虫荧光素酶	1-5mg/ml
虫荧光素	0.5-1.5mM
Triton X-100	0.9-1.0%
Tricine	20-30mM
Mg ²⁺	8-10mM
EDTA	1.5-3mM
牛血清白蛋白	15-25mg/ml
二巯基苏糖醇或巯基乙醇	0.5-1.5mM
pH 值	6.5-8.0

所述 Triton X-100 的含量为体积百分含量。

2. 根据权利要求 1 所述的测定细菌总数的试剂,其特征在于:所述体细胞三磷酸腺苷释放试剂组由以下成分组成:

Tricine	12.5mM
EDTA	0.25mM
Triton X-100	0.01%
pH	7.8;

所述细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组由以下成分组成:

萤火虫荧光素酶	3.0mg/ml
虫荧光素	0.95mM
Triton X-100	1.0%
Tricine	25.0mM
Mg ²⁺	9.0mM
EDTA	2.0mM
牛血清白蛋白	20mg/ml
二巯基苏糖醇或巯基乙醇	1.0mM
pH 值	7.8。

3. 一种利用权利要求 1 或 2 所述的测定细菌总数试剂测定细菌总数的方法,包括如下步骤:

1) 将待测样品放入测定细菌总数装置中的细菌 ATP 检测杯中;当细菌或被检样品浓度过低时通过所述测定细菌总数装置中的样品浓缩装置将待测样品浓缩,使待测样品中的微生物保留在所述细菌 ATP 检测杯中的可浸透的过滤器上;

所述测定细菌总数装置,包括细菌 ATP 检测杯、荧光检测装置和样品浓缩装置;所述细菌 ATP 检测杯,具有一底端、一开口顶端和不透明的侧壁;所述底端带有直径为 $0.15\ \mu\text{m}$ - $0.50\ \mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器;

2) 向步骤 1) 的细菌 ATP 检测杯中加入权利要求 1 或 2 所述的测定细菌总数试剂中的体细胞三磷酸腺苷释放试剂组中的试剂,释放待测样品中的体细胞 ATP;

3) 对步骤 2) 的细菌 ATP 检测杯施加压力,将游离及体细胞 ATP 通过所述细菌 ATP 检测杯的可浸透的过滤器排出;

4) 向步骤 3) 的细菌 ATP 检测杯中加入权利要求 1 或 2 所述的测定细菌总数试剂中的细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组中的试剂;

5) 用所述测定细菌总数装置中的荧光检测装置检测步骤 4) 中的细菌 ATP 检测杯中发出的荧光,得出待测样品中的细菌总数。

一种测定细菌总数的方法及其专用试剂与装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定细菌总数的方法及其专用试剂与装置。

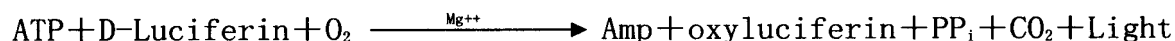
背景技术

[0002] 随着人们生活水平的提高、健康意识的增强,食品安全已经成为深受政府和人民普遍关注的问题,它直接关系到人们的生命安全和身体健康。为此我国卫生部曾先后颁发了“食品企业实施 HACCP 体系”的指南[卫法监发(2000年)174号]。HACCP 是 Hazard Analysis Critical Control Point(危险因素分析关键控制点)的英文缩写,也是发达国家普遍采用对食品、饮料企业的生产设备的细菌及食品残渣(细菌滋生条件)污染程度进行产前监控的认证体系。此后,卫生部从 2004 年 5 月 1 日实施的“食品企业卫生规范”中对蜜饯、乳制品、饮料、熟肉制品及定型包装饮用水五类企业的环境卫生、厂房设施卫生、人员卫生及清洁消毒、污水管理提出了明确要求。2004 年 1 月 1 日实施的“中华人民共和国食品卫生微生物检测国家标准”则对包括肉及肉制品、乳及乳制品、蛋品、水产品、罐头等 12 大类,49 小类食品饮料的菌落总数,以及大肠菌群,沙门氏菌、志贺氏菌等 14 个类别微生物的检测或检验程序,合格标准提出了明确的定义和指标。

[0003] 但是,由于目前国内还缺少可与 HACCP 认证体系配套,对食品污染微生物的总数进行准确、快速检测的科技手段,致使已经颁布的“规范”“标准”或认证体系难以发挥其应有的时效。我国至今采用常规的“活细胞平皿计数法”,其检测速度慢,效率低,从采集样品到取得结果至少需要 24~48 小时。因此,难以从生产原料、生产设备层面进行实时而有效的监控。往往是产品已经出来,检验结果还未完成。这就势必造成轻则产品质量下降,资源浪费,重则导致产品召回或卫生事故。并且在水处理、环境监测、啤酒及其它酿酒业、奶牛养殖及奶品制造、纸制品及纸浆制造领域行业,医学、法医学检测,如酶联免疫试剂、潜便血、菌血症、早期癌变检测试剂盒制备行业,也存在对微生物进行快检的需求。因此,制成低成本、低价格、高质量的细菌总数快速检测方法、试剂及装置,是解决我国进行快速卫生监测以满足各行业微生物标准检测以达到卫生规范要求的重要技术保障。

[0004] 萤火虫荧光素酶(虫光素酶)能将存在于所有生物(人、动植物、微生物)细胞中的能量物质 ATP 以及荧光素转变成荧光,这一生化反应如下:

[0005]



Firefly Luciferase

[0006] 其中:ATP:三磷酸腺苷;Luciferin:荧光素; O_2 :氧气; Mg^{++} :二价镁离子;Luciferase:虫光素酶;Amp:一磷酸腺苷;Oxyluciferin:氧化荧光素;PP_i:焦磷酸; CO_2 :二氧化碳。

[0007] 上述反应表明,ATP 是上述反应不可替代的反应物质,在有足量荧光素和氧的条件下,荧光强弱取决于 ATP 的数量。由于虫光素酶、ATP 生理状态和荧光之间有着精确的数量关系,可将 ATP 定量地转变成易于检测的光信号,因此,虫光素酶被称为生物传感器。

[0008] 三磷酸腺苷 (ATP) 是所有生物细胞中的能量物质,在有虫荧光素酶存在的情况下极微量的 ATP 就可以同虫荧光素反应发光,这种荧光可以用微量荧光检测仪检测。由于这种发光反应的发光强度在反应的其它试剂过量的情况下与 ATP 的含量存在明显的线性的关系。每种细菌细胞所含的 ATP 在常态下也是稳定的,导致污染食品问题的细菌,支撑其生命活动所必须的 ATP 存在于细胞内,可以通过特殊的试剂或方法将其从细胞内释放出来,促使其发生三磷酸腺苷荧光反应,通过测定荧光的量就推算被测样品中细菌的总数。

[0009] 但原有的三磷酸腺苷荧光法细菌总数快速检测法未能有效去除体细胞及其它非细菌所产生的三磷酸腺苷,而一个体细胞所含有的三磷酸腺苷量是细菌细胞的 100-1000 倍,体细胞将对检测细菌总数产生严重干扰。

发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是提供细菌总数快速检测方法及其专用试剂与装置,以解决传统的“活细胞平皿计数法”对细菌总数进行检测的速度慢、效率低,而现在的三磷酸腺苷荧光检测法中非细菌细胞 ATP 的干扰又影响检测准确度等方面存在的问题。

[0011] 本发明是通过以下技术方案来实现的:

[0012] 本发明提供两种测定细菌总数的试剂组。

[0013] 本发明所提供的测定细菌总数的试剂组有两种,试剂组①由体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 和细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA) 构成;试剂组②由体细胞三磷酸腺苷释放消除试剂组 (TREA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 构成。

[0014] 试剂组①系统中,所述体细胞三磷酸腺苷释放试剂组由以下成分组成:

[0015]	Tricine	10-15mM
[0016]	EDTA	0.2-0.3mM
[0017]	Triton X-100	0.005-0.015%
[0018]	pH	6.5-8.0;
[0019]	所述细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组	
[0020]	萤火虫荧光素酶	1-5mg/ml
[0021]	虫荧光素	0.5-1.5mM
[0022]	Triton X-100	0.9-1.0%
[0023]	Tricine	20-30
[0024]	Mg ²⁺	8-10mM
[0025]	EDTA	1.5-3mM
[0026]	牛血清白蛋白	15-25mg/ml
[0027]	二巯基苏糖醇或巯基乙醇	0.5-1.5mM
[0028]	pH 值	6.5-8.0
[0029]	所述 Triton X-100 的含量为体积百分含量。	

[0030] 试剂组①系统中,所述体细胞三磷酸腺苷释放试剂组优选由以下成分组成:

[0031]	Tricine	12.5mM
[0032]	EDTA	0.25mM

- [0033] Triton X-100 0.01%
- [0034] pH 7.8 ;
- [0035] 所述细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组优选由以下成分组成 :
- [0036] 萤火虫荧光素酶 3.0mg/ml
- [0037] 虫荧光素 0.95mM
- [0038] Triton X-100 1.0%
- [0039] Tricine 25.0mM
- [0040] Mg^{2+} 9.0mM
- [0041] EDTA 2.0mM
- [0042] 牛血清白蛋白 20mg/ml
- [0043] 二巯基苏糖醇或巯基乙醇 1.0mM
- [0044] pH 值 7.8。
- [0045] 试剂组②系统中,所述体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组由以下成分组成 :
- [0046] Tricine 10-15mM
- [0047] EDTA 0.2-0.3mM
- [0048] 牛血清白蛋白 8-12mg/ml
- [0049] Triton X-100 0.005-0.015%
- [0050] 腺苷三磷酸双磷酸酶 0.03-0.07U/ml
- [0051] pH 6.5-8.0 ;
- [0052] 所述细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组由以下成分组成 :
- [0053] CTAB 0.2-0.3%
- [0054] EDTA 1.5-3mM
- [0055] Tricine 20-30mM
- [0056] 二巯基苏糖醇或巯基乙醇 0.5-1.5mM
- [0057] Tween20 0.025-0.075%
- [0058] pH 6.5-8.0 ;
- [0059] 所述发光反应试剂组由以下成分组成 :
- [0060] 萤火虫荧光素酶 1-5mg/ml
- [0061] 虫荧光素 0.5-1.5mM
- [0062] Tricine 20-30mM
- [0063] Mg^{2+} 8-10mM
- [0064] EDTA 1.5-3mM
- [0065] 牛血清白蛋白 15-25mg/ml
- [0066] 二巯基苏糖醇或巯基乙醇 0.5-1.5mM
- [0067] pH 6.5-8.0 ;
- [0068] 所述 Triton X-100 的含量为体积百分含量,所述 CTAB 的含量为质量百分含量
- [0069] 所述 Tween20 的含量为体积百分含量。
- [0070] 其中,所述体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组优选由以下成分组成 :
- [0071] Tricine 12.5mM

- | | | |
|--------|--|-----------|
| [0072] | EDTA | 0.25mM |
| [0073] | 牛血清白蛋白 | 10.0mg/ml |
| [0074] | Triton X-100 | 0.01% |
| [0075] | 腺苷三磷酸双磷酸酶 | 0.05U/ml |
| [0076] | pH | 7.8 ; |
| [0077] | 所述细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组优选由以下成分组成 : | |
| [0078] | CTAB | 0.25% |
| [0079] | EDTA | 2.0mM |
| [0080] | Tricine | 25.0mM |
| [0081] | 二巯基苏糖醇或巯基乙醇 | 1.0mM |
| [0082] | Tween20 | 0.05% |
| [0083] | pH | 7.8 ; |
| [0084] | 所述发光反应试剂组由以下成分组成 : | |
| [0085] | 萤火虫荧光素酶 | 3.0mg/ml |
| [0086] | 虫荧光素 | 0.95mM |
| [0087] | Tricine | 25.0mM |
| [0088] | Mg ²⁺ | 9.0mM |
| [0089] | EDTA | 2.0mM |
| [0090] | 牛血清白蛋白 | 20mg/ml |
| [0091] | 二巯基苏糖醇或巯基乙醇 | 1.0mM |
| [0092] | pH | 7.8。 |
| [0093] | 所述试剂组②系统中的腺苷三磷酸双磷酸酶可以去除游离 ATP 及体细胞释放出的 ATP。腺苷三磷酸双磷酸酶的作用原理为,腺苷三磷酸双磷酸酶把 ATP 分解为 ADP 和 AMP,而 ADP 和 AMP 不能被萤火虫荧光素酶催化发光,这样可以有效的去除游离及体细胞产生的 ATP。 | |
| [0094] | 由于腺苷三磷酸双磷酸酶相对过量的,所以要除去没有反应的腺苷三磷酸双磷酸酶。阳离子表面活性剂可使腺苷三磷酸双磷酸酶失去催化活性,所以试剂组②系统中所述 XRA 所用的细菌细胞三磷酸腺苷释放剂为阳离子表面活性剂。 | |
| [0095] | 试剂组①和试剂组②系统中抗氧化剂二巯基苏糖醇 (DTT) 或巯基乙醇 (2-mercaptoethanol) 提供二硫键来防止萤火虫荧光素酶被异常氧化。 | |
| [0096] | 本发明所提供的测定细菌总数装置,包括细菌 ATP 检测杯和荧光检测装置,其中,所述细菌 ATP 检测杯,具有一底端、一开口顶端和透明或不透明的侧壁 ; | |
| [0097] | 当配合试剂组①使用时,所述细菌 ATP 检测杯底端带有直径为 0.15 μ m-0.50 μ m 孔径的可浸透的过滤器,将由体细胞三磷酸腺苷释放试剂组得到的体细胞 ATP 和游离 ATP 需通过过滤除去。所述可浸透的过滤器的孔径优选为 0.45 μ m。 | |
| [0098] | 当配合试剂组②使用时,所述细菌 ATP 检测杯底端无孔。由体细胞三磷酸腺苷释放试剂组得到的体细胞 ATP 和游离 ATP 用腺苷三磷酸双磷酸酶 (apyrase) 除去,不必通过过滤除去。 | |
| [0099] | 所述细菌 ATP 检测杯的侧壁和杯底由不与体细胞三磷酸腺苷释放试剂组和细菌 | |

细胞释放、发光试剂组中的试剂发生发应的材料制成。如侧壁和无孔的杯底可采用玻璃或合成材料构成,合成材料可为聚丙烯或聚苯乙烯;带有直径 $0.15\ \mu\text{m}$ – $0.50\ \mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器可采用尼龙、聚四氟乙烯或聚碳酸酯材料制成。

[0100] 所述荧光检测装置可为微量荧光检测仪,如英国 Biotrace M3、美国 NewHorizons 3650、美国 Turner TD 20/20、国产滨松系列产品。

[0101] 当所述细菌 ATP 检测杯的底端带有直径为 $0.15\ \mu\text{m}$ – $0.50\ \mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器时,所述测定细菌总数装置中还包括样品浓缩装置,所述样品浓缩装置可将待测样品中的微生物保留在所述细菌 ATP 检测杯中的可浸透的过滤器上。

[0102] 本发明还提供了两种利用上述测定细菌总数装置和试剂测定细菌总数的方法。

[0103] 本发明所提供的采用试剂组①系统测定细菌总数的方法,包括如下步骤:

[0104] 1) 将待测样品放入上述细菌 ATP 检测杯中;所述细菌 ATP 检测杯的底端带有直径为 $0.15\ \mu\text{m}$ – $0.50\ \mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器;当细菌或被检样品浓度过低时通过上述测定细菌总数装置中的样品浓缩装置将待测样品浓缩,使待测样品中的微生物保留在所述细菌 ATP 检测杯中的可浸透的过滤器上;

[0105] 2) 向步骤 1) 的细菌 ATP 检测杯中加入 TRA 混匀,释放待测样品中的体细胞 ATP;

[0106] 3) 对步骤 2) 的细菌 ATP 检测杯施加压力,将游离及体细胞 ATP 通过所述细菌 ATP 检测杯的可浸透的过滤器排出;

[0107] 4) 向步骤 3) 的细菌 ATP 检测杯中加入 AFA;

[0108] 5) 用上述测定细菌总数装置中的荧光检测装置检测步骤 4) 中的细菌 ATP 检测杯中发出的荧光,得出待测样品中的细菌总数。

[0109] 本发明所提供的采用试剂组②系统测定细菌总数的方法,包括如下步骤:

[0110] 1) 将待测样品放入上述细菌 ATP 检测杯,所述细菌 ATP 检测杯的底端无孔;

[0111] 2) 向步骤 1) 的细菌 ATP 检测杯中加入 TREA 混匀,释放并消除待测样品中的游离及体细胞 ATP;

[0112] 3) 向步骤 2) 的细菌 ATP 检测杯中加入 XRA 混匀并静止 5 分钟;

[0113] 4) 向步骤 3) 的细菌 ATP 检测杯中加入 LLR 混匀;

[0114] 5) 用上述测定细菌总数装置中的荧光检测装置检测步骤 4) 中的细菌 ATP 检测杯中发出的荧光,得出待测样品中的细菌总数。

[0115] 通过本发明技术方案的实施,能够很好地解决传统的“活细胞平皿计数法”对食品污染的微生物总数进行检测的速度慢、效率低,而现在的检测法中非细菌细胞 ATP 的干扰又影响检测准确度等方面存在的问题。本发明测定细菌总数的方法通过测定细菌总数试剂与测定细菌总数装置的配合,达到可以排除非细菌产生的三磷酸腺苷,进而可以精确测定被测样品表面或其中细菌总数的目的;灵敏、准确,与常规活细胞平皿计数法的符合率达 93–98%;并且检测速度快,可在 1–5 分钟内完成环境或食品的细菌总数检测;由于可采用基因工程或有机合成的方法制备荧光素和荧光素酶,大大降低试剂的成本,也有效提高了产量;本发明的测定细菌总数试剂和测定细菌总数装置携带方便,可在室内外使用。本发明的测定细菌总数的方法及其专用试剂与装置应用范围广,不仅在食品检测领域,并且在水处理、环境监测、啤酒及其它酿酒业、奶牛养殖及奶品制造、纸制品及纸浆制造领域。

附图说明

[0116] 图 1 为细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA) 中含有不同浓度的非离子型去污剂 Triton X-100 对浓度为 10^8 CFU/ml 的大肠杆菌的 ATP 释放效果示意图

[0117] 图 2 为细菌 ATP 检测杯的结构示意图

[0118] 图 3 为样品浓缩装置的立体图

[0119] 图 4 为样品浓缩装置和细菌 ATP 检测杯的使用状态参考示意图

具体实施方式

[0120] 本发明提供两种细菌总数测定试剂,包括两种组合:试剂组①由体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 和细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA) 构成;试剂组②由体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组 (TREA),细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 构成。

[0121] 根据对比实验确定,体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 和细胞裂解及三磷酸腺苷释放消除剂 (TREA) 中的对体细胞有专一性的裂解剂为体积百分含量为 0.005-0.015% 的 Triton X-100;在这个浓度范围内对体细胞有专一性的裂解剂不会裂解细菌细胞,而只裂解体细胞。为了使体细胞的 ATP 不粘附在细菌 ATP 检测杯底端带有的直径为 $0.15\mu\text{m}$ - $0.50\mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器上而完全去除,TRA 和 TREA 试剂还含有作为分散剂的表面活性剂 Tween20 或 Tween60 或 Tween80。

[0122] 由于溶液整体的 pH 值 (酸碱度) 对整个荧光反应的影响非常大,经实验得到反应适合 pH 值 6.5-8.0,所以必要的缓冲也是本发明的重要组成部分;缓冲液中的 8mM-10mM 的 Mg^{2+} 主要为本反应提供必要的金属镁离子;缓冲液中的 EDTA 是金属螯合剂,对萤火虫荧光素酶有稳定作用;由于萤火虫荧光素酶的性质不稳定,AFA 试剂和 LLR 试剂含有很多对萤火虫荧光素酶活性有影响的物质,所以添加高浓度的牛血清白蛋白 (15mg/ml-25mg/ml BSA) 对于 AFA 试剂和 LLR 试剂的稳定性和长时间保存都是必要的。

[0123] 在 AFA 试剂和 LLR 试剂中,萤火虫荧光素酶 (luciferase)、虫荧光素 (D-lucifrin) 和镁离子相对预测样品中细菌细胞含有的 ATP 是过量的,这样可以保证裂解发出的荧光量和细菌总数相互对应。此 AFA 主要创新点在于当细菌细胞裂解发光试剂组中的细菌裂解剂为非离子型去污剂时,所述细菌细胞裂解发光试剂中的所有试剂可在一个体系中存放,使整个细菌细胞裂解和催化发光的体系构建在一起,同时能保证不互相干扰,这样在操作上和便携性上就有了很大的提高,本发明的细菌细胞裂解发光试剂组中的溶液配比能保证细菌细胞的完全裂解而又不干扰整个催化发光体系。

[0124] 本发明所提供的测定细菌总数装置中的细菌 ATP 检测杯如图 2 所示,具有一底端 11、一开口顶端 12、侧壁 10;侧壁 10 可透明或不透明,底端 11 无孔或带有直径为 $0.15\mu\text{m}$ - $0.50\mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器。带有直径为 $0.15\mu\text{m}$ - $0.50\mu\text{m}$ 孔的可浸透的过滤器熔接在细菌 ATP 检测杯的底端。

[0125] 本发明所提供的测定细菌总数装置中的样品浓缩装置如图 3 和图 4 所示,样品浓缩装置具有上腔室 13、下腔室 16、同轴的通孔 8 和 9、“O”形圈 14 和 15。使用时可将注射器连接于通孔 8,之后对注射器柱塞施加一正压,使细菌 ATP 检测杯中的溶液从通孔 9 中流出。“O”形圈 14 和 15 提供了防泄漏密封。在完成浓缩后,将上腔室 13 和下腔室 16 分开,

露出细菌 ATP 检测杯的开口顶端 12, 然后从下腔室 16 中取下细菌 ATP 检测杯。

[0126] 细菌 ATP 检测杯的侧壁 10 和杯底 11 由不与体细胞三磷酸腺苷释放试剂组和细菌细胞裂解发光试剂组中的试剂发生反应的材料制成。侧壁 10 和无孔的杯底 11 可采用玻璃或合成材料构成, 合成材料可为聚丙烯或聚苯乙烯。透明的聚丙烯或聚苯乙烯能够完全传送 420-580nm 波长范围内的光。带有直径为 0.15 μm -0.50 μm 孔的可浸透的过滤器可采用尼龙、聚四氟乙烯或聚碳酸酯材料制成, 该过滤器在 10MPa 的压力下不变形, 0.15 μm -0.50 μm 的孔径可保证细菌细胞保留在过滤器的表面上, 同时可使任何相关的液体相在压力下能够完全通过。该过滤器具有足够的张力, 即使在加湿以后也可保留检测溶液。

[0127] 荧光检测装置可为微量荧光检测仪, 如英国 Biotrace M3、美国 New Horizons3650、美国 Turner TD 20/20、国产滨松系列产品。用于检测细菌 ATP 检测杯的透明侧壁或开口顶端发出的荧光。

[0128] 本发明提供了两种测定细菌总数的方法。

[0129] 对于本领域技术人员来说, 制备待测样品的方法是公知的, 如可以按照下述任意一种方法取样:

[0130] 1) 可用取样装置通过擦拭固体表面的限定区域来对固体表面取样, 将该取样装置放入一容器(如管、小杯)内, 向该容器中加入采集溶液, 并对其搅拌, 以使该表面的微生物从取样装置中释放到采集溶液中, 得到待测样品。所述取样装置包括一种吸收或吸附材料, 如可以是一块海棉或一个棉签。

[0131] 2) 可使气体通过采集溶液来收集气体中的微生物, 得到待测样品。

[0132] 所述采集溶液可以是保持微生物细胞壁完整的洗涤剂、盐、缓冲液或它们的任意组合, 如 pH7.2 的 PBS、含有 0.15M NaCl 和 0.5% Tween20 的水溶液等。

[0133] 接着将该待测样品的等分试样转移到上述细菌 ATP 检测杯中。然后按照下述 1) 或 2) 的方法操作:

[0134] 1) 当该细菌 ATP 检测杯的底端无孔时, 其侧壁可透明或不透明; 向该细菌 ATP 检测杯中加入体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组 (TREA); 60 秒后, 体细胞的 ATP 完全被释放并被腺苷三磷酸双磷酸酶降解, 再加入细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA), 30 秒后, 腺苷三磷酸双磷酸酶被十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 灭活, 再加入发光反应液 (LLR), 用微量荧光检测仪(如英国 Biotrace M3、美国 New Horizons 3650、美国 Turner TD 20/20、国产滨松系列产品)检测细菌 ATP 检测杯的透明侧壁或开口顶端的荧光, 通过软件或人工换算得出待测样品的细菌总数。

[0135] 2) 当该细菌 ATP 检测杯的底端带有直径为 0.15 μm -0.50 μm 孔的可浸透的过滤器时, 其侧壁不透明; 向该细菌 ATP 检测杯中加入体细胞三磷酸腺苷释放试剂 (TRA) 试剂; 10 秒后, 体细胞的 ATP 完全被释放, 向该细菌 ATP 检测杯施加正压或负压, 使该待测样品中的体细胞 ATP 和体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 中的试剂通过该细菌 ATP 检测杯的底端带有的过滤器除去, 从而只保留被检样品的细菌细胞, 以便精确计算细菌总数, 同时也对待测样品中的细菌进行了浓缩; 然后再加入细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA), 用微量荧光检测仪(如英国 Biotrace M3、美国 New Horizons 3650、美国 Turner TD 20/20、国产滨松系列产品)检测细菌 ATP 检测杯的开口顶端的荧光, 通过软件或人工换算得出待

测样品的细菌总数。

[0136] 加压方式中空气加压为本发明的首选。这种方法具有干扰小,不易带入三磷酸腺苷(ATP)及对细菌菌体无损害的优点。

[0137] 底端带有过滤器的细菌 ATP 检测杯具有浓缩和富集细菌的作用,由于被测样品中所含有的细菌总数往往过低,如纯净水、矿泉水、灭菌后的罐头制品等,有可能低于试剂系统或仪器的最低检测限度。此时就有必要对样品进行成倍浓缩或富集才能达到最低检测限度,通过浓缩的倍数推算出被测样品中的原始细菌总数。

[0138] 下述实施例中的实验方法,如无特别说明,均为常规方法。

[0139] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为体积百分含量。

[0140] 实施例 1、细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组(AFA)中 Triton X-100 的优化

[0141] 用 0.85% 无菌生理盐水配置的 10^8 CFU/ml 的大肠杆菌悬浮液,取悬浮液 $10 \mu\text{l}$ 放入底端无孔侧壁透明的细菌 ATP 检测杯中,选用体细胞三磷酸腺苷释放试剂组(TRA)、含有如图 1 所示的不同浓度 Triton X-100 的下述细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组(AFA)组合,并按照对应的操作方式进行操作,用微量荧光检测仪(北京滨松光子股份的 9504 型荧光检测仪)检测细菌 ATP 检测杯中释放出的荧光值,记录荧光值,结果如图 1 所示,表明 1% 的 Triton X-100 的裂解效果最好。对含有 1% Triton X-100 的 AFA 裂解液按常规方法涂 LB 平板进行菌落计数,结果均未长出菌落,表明所有的大肠杆菌完全被裂解。

[0142] 其中,体细胞三磷酸腺苷释放试剂组(TRA)由以下成分组成:

[0143] Tricine(pH7.8) 12.5mM

[0144] EDTA 0.25mM

[0145] Triton X-100 0.01%。

[0146] 细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组(AFA)由以下成分组成:

[0147] 萤火虫荧光素酶 3.0mg/ml

[0148] 虫荧光素 0.95mM

[0149] Triton X-100 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1.0%或 2.0%

[0150] Tricine 25.0mM

[0151] Mg^{2+} 9.0mM

[0152] EDTA 2.0mM

[0153] 牛血清白蛋白 20mg/ml

[0154] DTT 1.0mM

[0155] pH 值 7.8。

[0156] 实施例 2、分别利用两种不同的试剂组合和对应的细菌 ATP 检测杯对 10^8 CFU/ml 的大肠杆菌悬浮液的检测效果

[0157] 1. 分别将 1ml 用 0.85% 无菌生理盐水配置的 10^8 CFU/ml 的大肠杆菌悬液按 10 梯度用 0.85% 无菌生理盐水稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}) 后,各取悬浮液 $10 \mu\text{l}$ 放入细菌 ATP 检测杯中(底端带有直径为 $0.45 \mu\text{m}$ 孔的滤膜)中,选用体细胞三磷酸腺苷释放试剂组(TRA)和细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组(AFA)中的所有试剂,并按照对应的操作方式进行操作,并用微量荧光检测仪(北京滨松光子股份的 9504 型荧光检测仪)检测细菌

ATP 检测杯中释放出的荧光值,记录荧光值并通过计算软件或人工的方式换算出细菌总数。结果如表 1 所示。

[0158] 表 1. 试剂组①测得的大肠菌总数与对应荧光值

[0159]

大肠杆菌总数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)
1.28×10^7	331870
1.30×10^6	35670
1.27×10^5	3866
1.26×10^4	330
1.27×10^3	248
1.31×10^2	178

[0160] 由表 1 数值得到的细菌总数的 (Y) 与相对荧光单位 (X) 的曲线为 :

[0161] $\lg Y = 0.6836 \lg X + 0.3207 \quad R^2 = 0.9139$ 。

[0162] 对各个稀释度的裂解液按常规方法涂 LB 平板进行菌落计数,结果未得到菌落,表明所有的大肠杆菌完全被裂解。

[0163] 其中,体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 由以下成分组成 :

[0164] Tricine (pH7.8) 12.5mM

[0165] EDTA 0.25mM

[0166] Triton X-100 0.01%。

[0167] 细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA) 由以下成分组成 :

[0168] 萤火虫荧光素酶 3.0mg/ml

[0169] 虫荧光素 0.95mM

[0170] Triton X-100 1.0%

[0171] Tricine 25.0mM

[0172] Mg^{2+} 9.0mM

[0173] EDTA 2.0mM

[0174] 牛血清白蛋白 20mg/ml

[0175] DTT 1.0mM

[0176] pH 值 7.8。

[0177] 2. 分别将 1ml 用 0.85% 无菌生理盐水配置的 10^8 CFU/ml 的大肠杆菌悬液按 10 倍梯度用 0.85% 无菌生理盐水稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}) 后,各取悬浮液 $10 \mu l$ 放入细菌 ATP 检测杯 (底端无孔) 中,选用体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组 (TREA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 中的所有试剂,并按照对应的操作方式进行操作,并用微量荧光检测仪 (北京滨松光子股份的 9504 型荧光检测仪) 检测细菌

ATP 检测杯中释放出的荧光,记录荧光值并通过计算软件或人工的方式换算出细菌总数。

[0178] 表 2. 试剂组②测得的大肠杆菌总数与对应荧光值

[0179]

大肠杆菌总数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)
1.28×10^7	331855
1.30×10^6	35660
1.27×10^5	3866
1.26×10^4	327
1.27×10^3	243
1.31×10^2	175

[0180] 由表 2 数值得到的细菌总数的 (Y) 与相对荧光单位 (X) 的曲线为 :

[0181] $\lg Y = 0.6855 \lg X + 0.3085 \quad R^2 = 0.9144$ 。

[0182] 对各个稀释度的裂解液按常规方法涂 LB 平板进行菌落计数,结果均未长出菌落,表明所有的大肠杆菌完全被裂解。

[0183] 其中,体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组由以下成分组成 :

[0184] Tricine (pH7.8) 12.5mM

[0185] EDTA 0.25mM

[0186] 牛血清白蛋白 10.0mg/ml

[0187] Triton X-100 0.01%

[0188] 腺苷三磷酸双磷酸酶 0.05U/ml

[0189] 细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 由以下成分组成 :

[0190] CTAB 0.25% (质量百分含量)

[0191] EDTA 2.0mM

[0192] Tricine (pH7.8) 25.0mM

[0193] DTT 1.0mM

[0194] Tween20 0.05%。

[0195] 发光反应试剂组 (LLR) 由以下成分组成 :

[0196] 萤火虫荧光素酶 3.0mg/ml

[0197] 虫荧光素 0.95mM

[0198] Tricine 25.0mM

[0199] Mg^{2+} 9.0mM

[0200] EDTA 2.0mM

[0201] 牛血清白蛋白 20mg/ml

[0202] DTT 1.0mM

[0203] pH 值 7.8

[0204] 结果表明① 由 TRA 和 AFA 组合并配合底端带有滤膜的细菌 ATP 检测杯 ;与②由 TREA、XRA 和 LLR 组合配合底端无孔的细菌 ATP 检测杯,最终得到的细菌发光值是相近的。

[0205] 实施例 3、细菌细胞裂解发光试剂组对不同菌体的裂解效果

[0206] 分别将用 0.85% 无菌生理盐水配置的 10^6 CFU/ml 的金黄色葡萄球菌、 10^6 CFU/ml 的大肠杆菌、 10^6 CFU/ml 的枯草芽孢杆菌悬液用 0.85% 无菌生理盐水按 10 倍梯度稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4}) 后,各取悬浮液 $10 \mu\text{l}$ 放入细菌 ATP 检测杯中 (底端带有直径为 $0.45 \mu\text{m}$ 孔的滤膜) 中,选用实施例 2 中的体细胞三磷酸腺苷释放试剂 (TRA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA),并按照对应的操作方式进行操作,并用微量荧光检测仪 (北京滨松光子股份的 9504 型荧光检测仪) 检测细菌 ATP 检测杯中释放出的荧光值,平行操作三次并记录平均值。

[0207] 表 3、菌体总数和相应的相对荧光强度

[0208]

金黄色葡萄球菌		大肠杆菌		枯草杆菌	
实际菌数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)	实际菌数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)	实际菌数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)
1.3×10^5	3886	1.3×10^5	3895	1.3×10^5	3893
1.3×10^4	340	1.3×10^4	345	1.3×10^4	338
1.3×10^3	250	1.3×10^3	253	1.3×10^3	249
1.3×10^2	176	1.3×10^2	178	1.3×10^2	175

[0209] 结果表明,三种细菌的荧光值相近,说明本发明的细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组对每种细菌裂解效果相同。对各个稀释度的裂解液按常规方法涂 LB 平板进行菌落计数,结果均未长出菌落,表明所有的细菌完全被裂解。

[0210] 实施例 4、体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组 (TREA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 组合与体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 组合对比试验

[0211] 分别将 1ml 用 0.85% 无菌生理盐水配置的 10^8 CFU/ml 的大肠杆菌悬液按 10 倍梯度用 0.85% 无菌生理盐水稀释 (10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5}) 后,各取悬浮液 $10 \mu\text{l}$ 放入细菌 ATP 检测杯 (底端无孔) 中,选用体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组 (TREA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 中的所有试剂,并按照对应的操作方式进行操作。同时以选用体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA)、细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 和发光反应试剂组 (LLR) 组合中的所有试剂作为对照,并按照对应的操作方式进行操作。用微量荧光检测仪 (北京滨松光子股份的 9504 型荧光检测仪) 检测细菌 ATP 检测杯中释放出的荧光,记录荧光值并通过计算软件或人工的方式换算出细菌总数。

[0212] 表 4. 对比实验

[0213]

体细胞三磷酸腺苷释放、消除试剂组 (TREA)		体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA), 不含三磷酸腺苷消除剂	
大肠杆菌总数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)	大肠杆菌总数 (cfu/ml)	相对光单位 (RLU)
1.2×10^7	316740	1.2×10^7	513463
1.2×10^6	30995	1.2×10^6	58230
1.2×10^5	3226	1.2×10^5	5577
1.2×10^4	312	1.2×10^4	528
1.2×10^3	234	1.2×10^3	405
1.2×10^2	125	1.2×10^2	337

[0214] 通过表 4 的数据可以清晰的看到不添加三磷酸腺苷消除剂,虽然整个反应体系的其它部分是完全相同的,但是得到荧光值是不同的,而且相差很大。所以除去游离的 ATP 或体细胞释放出的 ATP 是非常必要的。

[0215] 实施例 4、检测自来水的细菌总数

[0216] 实施例 2 的体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 和细菌细胞三磷酸腺苷释放、发光试剂组 (AFA) 并配合一开口顶端的细菌 ATP 检测杯使用,该细菌 ATP 检测杯底端带有直径为 $0.45 \mu\text{m}$ 孔的滤膜,其侧壁不透明;

[0217] 将底端带有虑膜的细菌 ATP 检测杯与浓缩装置以如图 4 所示的方式组合,然后将装有自来水的注射器前端与浓缩装置的上端开口密合并推动注射器的活塞将自来水压入浓缩装置,虑出的自来水用一容器收集,水中的细菌将被在虑膜上得到富积和浓缩,以确保达到整个系统的最低检测灵敏度。然后取出细菌 ATP 检测杯,加入体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 5 秒后,体细胞的 ATP 完全被释放,向该细菌 ATP 检测杯施加正压或负压,使该待测样品中的体细胞 ATP 和体细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (TRA) 中的试剂通过该细菌 ATP 检测杯的底端带有的虑膜除去,从而只保留被检样品的细菌细胞;然后加入细菌细胞三磷酸腺苷释放试剂组 (XRA) 轻轻混匀,再加入发光反应液 (LLR)。用微量荧光检测仪检测细菌 ATP 检测杯的开口顶端的荧光,读出相对光单位 (RLU) (表 5),根据实施例 2 步骤 1 的标准曲线计算出该自来水中的细菌总数。

[0218] 将该自来水用广泛用于监测饮用水的异养菌平皿计数 (HPC) 法来检测该自来水中的细菌总数,结果表明本发明方法的检测结果与常规异养菌平皿计数 (HPC) 法的符合率达 90%;并且检测速度快,整个检测过程只需不到 2 分钟。

[0219] 表 5. 自来水中的细菌的相对荧光单位

[0220]

自来水浓缩的倍数	未浓缩	10 倍	50 倍	100 倍
相对光单位 (RLU)	-	110	531	915

[0221] 由上表可知对于自来水,纯净水或包装软饮料等细菌含量很低的检测样品,过滤浓缩的步骤和方法是必要的。

[0222] 实施例 5、体细胞三磷酸腺苷释放剂可专一有效的促使体细胞裂解

[0223] 1、体细胞三磷酸腺苷释放剂 TREA 可专一有效的促使体细胞裂解

[0224] 用实施例 2 的 TREA、XRA 和 LLR 配合细菌 ATP 检测杯(底端无孔)检测用 1ml0.85% 无菌生理盐水配制的含有如表 6 所示的细胞数的悬浮液的荧光,其中,按照表 6 的添加方式添加试剂,无 60 秒等待腺苷三磷酸双磷酸酶降解 ATP 过程,结果如表 6 所示

[0225] 表 6.

[0226]

细胞类别	细胞数	试剂			RLU	
		TREA	XRA	LLR	1	2
空白	空白	-	-	+	无	无
淋巴细胞	200 个	+	-	+	2083907	2155429
淋巴细胞	144 个	+	-	+	1125802	1330417
细菌	4000000 个	+	-	+	无	无
		-	+	+	108689	108663
细菌	3000000 个	+	-	+	无	无
		-	+	+	86731	86752

[0227] 表 6 中“+”表示加入相应试剂,“-”表示未加入相应试剂

[0228] RLU1, RLU2 :平行两次实验结果的相对荧光值

[0229] 选用仪器为北京滨松光子股份的 9504 型荧光检测仪。

[0230] 表 6 表明, TREA 能够很好的将淋巴细胞裂解,并释放出 ATP,仪器相应的 RLU 读数很高,对于细菌细胞则不能起到裂解细胞的作用,仪器相应 RLU 读数接近空白值。而必须通过加入 XRA 即细菌细胞三磷酸腺苷释放剂才能有效的将细菌细胞裂解,并释放出 ATP。

[0231] 2、体细胞三磷酸腺苷释放剂 TRA 可有效的促使体细胞裂解

[0232] 体细胞和细菌细胞混合的情况下,采用实施例 2 的 TRA、XRA、LLR 并配合带有滤膜的 ATP 检测杯,通过加压过滤的方式排除非细菌 ATP 进行表 7 的实验。实验结果如表 7 所

示,表明 TRA 能够很好的将淋巴细胞裂解并释放出 ATP,配合带有滤膜的 ATP 检测杯能有效排除非细菌 ATP 干扰,所以能准确的测出细菌释放出的 ATP 的发光值。

[0233] 表 7.

[0234]

细胞类别	取样体积 (μ l)	TRA	加压过滤	XRA	LLR	RLU	
						1	2
X	10	-	-	+	+	54131	54125
T	10	+	-	-	+	305297	305215
T	10	+	+	-	+	140	2120
H	20	+	+	+	+	45209	45187

[0235] 表 7 中, X :细菌细胞稀释液 T :血红细胞稀释液

[0236] H :细菌细胞及血红细胞稀释液等体积混合液

[0237] “+”:表示加入相应试剂或加压过滤“-”:表示未加入相应试剂或加压过滤

[0238] TRA :体细胞三磷酸腺苷释放剂 XRA :细菌细胞三磷酸腺苷释放剂

[0239] LLR :Luciferin-Luciferase 发光反应试剂

[0240] RLU1, RLU2 :平行两次实验结果的相对荧光值

[0241] 选用仪器为美国 NHD 公司的 3560 型荧光检测仪。

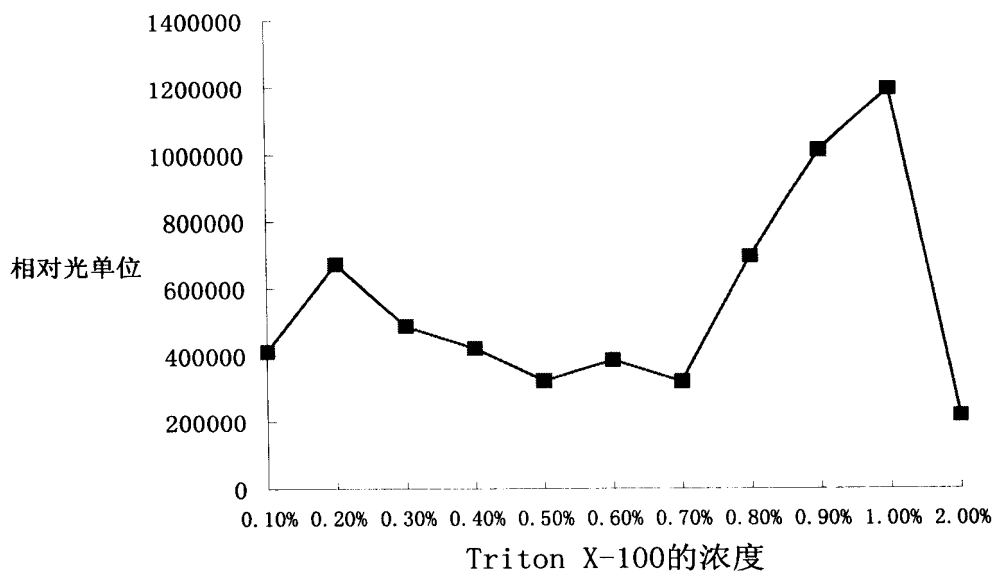


图 1

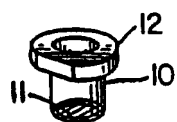


图 2

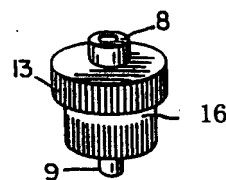


图 3

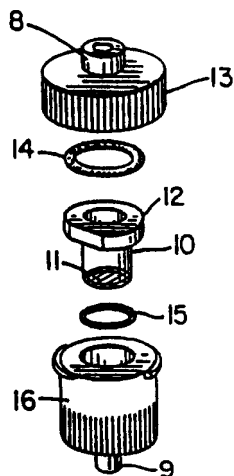


图 4