

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/04

G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02143520.0

[43] 公开日 2003年5月14日

[11] 公开号 CN 1417347A

[22] 申请日 2002.9.27 [21] 申请号 02143520.0

[30] 优先权

[32] 2001.11.1 [33] US [31] 09/999,159

[71] 申请人 微生物系统有限合伙公司

地址 美国怀俄明

[72] 发明人 L·S·鲍尔斯 W·R·小艾里斯
C·R·洛伊德

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书8页 说明书16页 附图1页

[54] 发明名称 分类学鉴定病原微生物及其毒性蛋白

[57] 摘要

本发明记述用以一定距离共价联接于基质表面的配体结合病原微生物及其毒性蛋白的方法，其中要求结合微生物的配体系链的距离为至少15埃，而结合蛋白的配体系链的距离为至少6埃。这里所述配体包括血红素复合物、铁载体、多糖、和特异于毒性蛋白、外膜蛋白和缀合脂的肽。分离被分析溶液的非结合成分与结合的组分而且通过显微镜检术、荧光、表面荧光、冷光、磷光、放射性或光吸收检测分析物进一步证实结合的发生。在基质表面的阵列中以一定模式排布许多配体，可以通过分析样品对该阵列的结合模式分类学鉴定微生物。

ISSN 1008-4274

1. 分类学鉴定生物学分析物的方法，包括：
 - (a) 将含有分析物的溶液暴露给特异于目的分析物的配体，该配体为捕捉微生物，由光稳定的接头以至少 15 埃的距离共价联接于基质表面；
 - (b) 以物理分离，清洗或这两种方法，分离结合的分析物与含分析物溶液中的非结合成分；
 - (c) 检查系有配体的基质表面上分析物的结合。
2. 权利要求 1 的方法，其中生物学分析物选自：
 - (a) 细菌；
 - (b) 病毒；
 - (c) 立克次氏体；
 - (d) 原生动物；和
 - (e) 真菌。
3. 权利要求 1 的方法，其中配体是血红素复合物。
4. 权利要求 1 的方法，其中配体是铁载体。
5. 权利要求 1 的方法，其中配体是多糖。
6. 权利要求 1 的方法，其中配体是特异于外膜蛋白的肽。
7. 权利要求 1 的方法，其中配体是特异于缀合脂的肽。
8. 权利要求 1 的方法，其中通过显微镜检术检测捕获的分析物。
9. 权利要求 1 的方法，其中通过靶标的固有荧光检测捕获的分析物。
10. 权利要求 1 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的荧光来检测捕获的分析物。
11. 权利要求 1 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的荧光来检测捕获的分析物。
12. 权利要求 1 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性化合物的放射性来检测捕获的分析物。

13. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获之后暴露于样品的反应性化合物的放射性来检测捕获的分析物。

14. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的冷光来检测捕获的分析物。

15. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的冷光来检测捕获的分析物。

16. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的磷光来检测捕获的分析物。

17. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的磷光来检测捕获的分析物。

18. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的光吸收来检测捕获的分析物。

19. 权利要求 1 的方法, 其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的光吸收来检测捕获的分析物。

20. 权利要求 1 的方法, 其中通过在结合分析物后, 系有荧光性配体的表面的荧光淬灭来检测捕获的分析物。

21. 分类学鉴定生物学分析物的方法, 包括:

(a) 将含有分析物的溶液特异于目的分析物的配体, 该配体为捕捉蛋白由光稳定的接头以至少 6 埃的距离共价联接于基质表面;

(b) 以物理分离, 清洗或这两种方法, 分离结合的分析物与含分析物的溶液中的非结合成分; 和

(c) 检查系有配体的基质表面上分析物的结合。

22. 权利要求 21 的方法, 其中生物学分析物选自:

(a) 蛋白毒素; 和

(b) 胞质蛋白。

23. 权利要求 21 的方法, 其中配体是特异于蛋白毒素的肽, 通常长 3 到 20 个氨基酸。

24. 权利要求 21 的方法, 其中配体是特异于蛋白激素的肽, 通常长 3 到 20 个氨基酸。

25. 权利要求 21 的方法，其中配体是特异于胞质蛋白的肽，通常长 3 到 20 个氨基酸。

26. 权利要求 21 的方法，其中通过蛋白的固有荧光检测捕获的分析物。

27. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的荧光来检测捕获的分析物。

28. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的荧光来检测捕获的分析物。

29. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于该蛋白的反应性化合物的放射性来检测捕获的分析物。

30. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于该蛋白的反应性化合物的放射性来检测捕获的分析物。

31. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的冷光来检测捕获的分析物。

32. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的冷光来检测捕获的分析物。

33. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的磷光来检测捕获的分析物。

34. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的磷光来检测捕获的分析物。

35. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的光吸收来检测捕获的分析物。

36. 权利要求 21 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于该蛋白的反应性染料缀合物的光吸收来检测捕获的分析物。

37. 权利要求 21 的方法，其中通过在结合蛋白后系有荧光性配体的表面的荧光淬灭来检测捕获的分析物。

38. 分类学鉴定生物学分析物的方法，包括：

(a) 将含有分析物的溶液暴露给特异于目的分析物的、且与标记缀合的配体；

(b) 分离结合的分析物与多余的与标记缀合的配体。

(c) 通过检测缀合的标记来检查分析物结合配体的情况。

39. 权利要求 38 的方法，其中生物学分析物选自：

(a) 细菌；

(b) 病毒；

(c) 蛋白毒素；

(d) 立克次氏体；

(e) 原生动物；

(f) 真菌，和

(g) 胞质蛋白。

40. 权利要求 38 的方法，其中通过色谱法分离结合的分析物与多余的缀合的配体。

41. 权利要求 38 的方法，其中配体与磁性颗粒缀合，并且通过磁性分离而分离结合的分析物与分析物溶液中的非结合成分，所述配体为捕捉微生物以至少 15 埃距离系于磁性颗粒。

42. 权利要求 38 的方法，其中配体是血红素复合物。

43. 权利要求 38 的方法，其中配体是铁载体。

44. 权利要求 38 的方法，其中配体是多糖。

45. 权利要求 38 的方法，其中配体是特异于外膜蛋白的肽。

46. 权利要求 38 的方法，其中配体是特异于缀合脂的肽。

47. 权利要求 38 的方法，其中标记是荧光性的，并且通过荧光检测。

48. 权利要求 38 的方法，其中标记是冷光性的，并且通过冷光检测。

49. 权利要求 38 的方法，其中标记是放射性的，并且通过放射性检测。

50. 权利要求 38 的方法，其中标记是磷光性的，并且通过磷光

检测。

51. 分类学鉴定生物学分析物的方法，包括：

(a) 将含有分析物的溶液暴露给共价联接于基质表面的不同配体的阵列，

(b) 以物理分离，清洗或这两种方法，分离结合于配体阵列的分析物与溶液中的非结合成分，和

(c) 检查系有配体的基质表面上分析物的结合。

52. 权利要求 51 的方法，其中阵列所用配体为捕捉微生物，由光稳定的接头以离基质表面至少 15 埃的距离共价联接于基质表面。

53. 权利要求 51 的方法，其中阵列所用配体为捕捉蛋白毒素，由光稳定的接头以离基质表面至少 6 埃的距离共价联接于基质表面。

54. 权利要求 51 的方法，其中生物学分析物选自：

(a) 细菌；

(b) 病毒；

(c) 蛋白毒素；

(d) 立克次氏体；

(e) 原生动物；

(f) 真菌，和

(g) 胞质蛋白。

55. 权利要求 51 的方法，其中一个或多个配体是血红素复合物。

56. 权利要求 51 的方法，其中一个或多个配体是铁载体。

57. 权利要求 51 的方法，其中一个或多个配体是多糖。

58. 权利要求 51 的方法，其中一个或多个配体是特异于外膜蛋白的肽。

59. 权利要求 51 的方法，其中一个或多个配体是特异于缀合脂的肽。

60. 权利要求 51 的方法，其中通过显微镜检术检测捕获的微生物。

61. 权利要求 51 的方法，其中通过靶标的固有荧光检测捕获的

分析物。

62. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的荧光来检测捕获的分析物。

63. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的荧光来检测捕获的分析物。

64. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性化合物的放射性来检测捕获的分析物。

65. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获之后暴露于样品的反应性化合物的放射性来检测捕获的分析物。

66. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的冷光来检测捕获的分析物。

67. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的冷光来检测捕获的分析物。

68. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的磷光来检测捕获的分析物。

69. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的磷光来检测捕获的分析物。

70. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之前暴露于样品的反应性染料缀合物的光吸收来检测捕获的分析物。

71. 权利要求 51 的方法，其中通过在表面所系配体捕获分析物之后暴露于样品的反应性染料缀合物的光吸收来检测捕获的分析物。

72. 权利要求 51 的方法，其中通过在结合分析物后系有荧光性配体的表面的荧光淬灭来检测捕获的分析物。

73. 鉴定蛋白的方法，包括：

(a) 将含有微生物的溶液暴露于导致微生物裂解而其内容物流出到溶液中的条件下，所述条件选自：化学处理、holins、酶处理、冻融循环、噬菌体感染和物理处理，

(b) 将含有蛋白分析物的溶液暴露于由光稳定的接头共价联接于基质表面的、特异于目的分析物的配体，

(c) 通过物理分离, 将结合的分析物与含分析物的溶液中的非结合成分分离开; 并且

(d) 检查系有配体的基质表面上分析物的结合, 其中为捕捉蛋白, 以离基质表面至少 6 埃的距离联接配体。

74. 权利要求 73 的方法, 其中配体是特异于目的蛋白的肽。

75. 权利要求 73 的方法, 其中通过被捕获的蛋白的固有荧光来检测。

76. 将生物学分析物捕捉到基质上的方法, 其中:

(a) 所用配体选自: 血红素复合物、铁载体、多糖、和特异于外膜蛋白、缀合脂和微生物蛋白靶的肽;

(b) 为捕捉微生物, 以离基质表面至少 15 埃的距离联接配体;

(d) 基质适于柱填充;

(e) 生物学分析物选自: 细菌、病毒、立克次氏体、原生动植物、和真菌;

(f) 通过在基质上捕获生物学分析物, 使生物学分析物从水样品中浓缩, 并且

(g) 通过在基质上捕捉生物学分析物, 使生物学分析物从医学样品中浓缩。

77. 以接头将配体系于基质表面的方法, 包括:

(a) 将硅烷化合物 $[\text{Si}(\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4)]$ 同氧化的(羟基化的)基质表面反应, 其中一个取代基包含带有能与配体反应的官能团的接头, 并且

(b) 将配体同共价联接的硅烷接头的官能团反应; 其中选择接头, 使联接的配体优选离基质表面至少 15 埃。

78. 权利要求 77 的方法, 其中 R_1 到 R_4 都分别选自: 氢、含 1 到 6 个碳的烷基, 含 6 到 12 个碳的芳基和含 1 到 4 个碳的烷氧基, 且 R_1 , R_2 和/或 R_3 中至少有一个是烷氧基。

79. 权利要求 77 的方法, 其中 R_4 是有机基团, 含至少 3 个碳原子, 且还含带有能与配体反应的官能团的长接头。

80. 权利要求 77 的方法, 其中含接头的有机基团包括胺、聚醚

和多聚甘氨酸。

81. 权利要求 77 的方法，其中接头 (R_4) 的偶联剂官能团包括环氧基、氨基、不饱和官能团、羟基和巯基。

82. 权利要求 77 的方法，其中配体同有机硅烷化合物的官能团，优选末端官能团反应，而直接与硅原子相联的易水解的烷氧基能够和表面基质的表面直接反应。

83. 权利要求 77 的方法，其中通过先将母体硅烷 [$\text{Si}(\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{R}_4)$] 与配体反应，然后由烷氧硅烷同基质表面反应，在原位构建配体系链。

分类学鉴定病原微生物及其毒性蛋白

发明背景

本发明涉及一种分类学鉴定病原微生物并检测其蛋白毒素的方法。

病原微生物，尤其是能够自然产生或获得毒性因子的病原细菌，是导致很多人类疫情疾病的原因。很多这种细菌可被用作生物战争试剂（biowarfare agent）。而且，非病原微生物经过遗传操作处理后有变为病原体的危险和可能。（例如，带有霍乱毒素的大肠杆菌）

典型的病原细菌包括那些导致肉毒中毒、黑死病、霍乱、白喉、痢疾、麻风病、脑膜炎、猩红热、梅毒和结核等很多疾病的细菌。最近几十年来，在工业化国家公众对这些疾病感觉淡漠，可能主要是因为使用抗生素治疗这些疾病取得很大的成功。然而，这些细菌正令人担忧的变得耐受抗生素。而且，最近关于细菌在人类疾病中的作用也有新的发现，如，幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）是胃溃疡的引发物，洋葱伯克氏菌（*Burkholderia cepacia*）是一种新的肺病源体，而肺炎衣原体（*Chlamydia pneumoniae*）是冠心病的一种可能的诱因。除去那些病原体，世界范围内细菌感染食品的增加也同样导致了很多人社会经济变化，这些细菌有大肠杆菌，沙门氏菌，弧菌和空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）等。

在医疗战线，潜在的感染也是重要的考虑。一些细菌病原体，包括炭疽芽孢杆菌（*Bacillus anthracis*）和鼠疫耶尔森氏菌（*Yersinia pestis*）和它们的外毒素被用作武器。而且总是存在非病原微生物被工程改造为病原性的，并用于生物战争试剂的危险。

病原微生物对家畜、家禽产业及野生动植物管理也值得重视。例如，流产布鲁氏菌（*Brucella abortus*）导致牛流产。有时鸟、鱼、兽群的死亡可能是因为水源污染了产生外毒素的微生物。近来查出疯牛病是经口传染的一种不能被过滤出来的蛋白颗粒引起的。因此，显然需要一种快

速而且便宜的技术来现场化验导致动物及人类疫情的毒性蛋白和病原微生物。

作为常规建议,用普通光学显微镜检测细菌感染。然而这种技术只有有限的分类学价值,对大于微米的区域进行研究和定量就比较困难并且费时。许多以商品形式出售的系统靠细菌培养来得到足够大的样品(培养生成物),然后运用不同的代谢测试进行种属鉴定。但是,需要细菌培养物的技术可能检测不到存活却不能被培养的细胞。相反,所用的培养基可能只利于某些特异表型的细菌的生长。

在“加速运用基因扩增操作流程对肉和肉制品进行病原体检查的策略”(Strategies to Accelerate the Application of Gene Amplification Protocols for Pathogen Detection in Meat and Meat Products) (by S.Pillai and S.C.Ricke (Crit. Rev. Microbiol. 21(4),239-261(1995)))和“环境监测微生物的分子方法(Molecular Approaches for Environmental Monitoring of Microorganism)” (by R.M.Atlas, G.Sayler, R.S.Burlage and A.K.Bej (Biotechniques 12(5), 706-717(1992)))中介绍了更灵敏、更快速的分类方法。那些方法使用聚合酶链反应(PCR)扩增细菌DNA或RNA,然后核酸测序来检测是否存在某种细菌。这样常规的扩增和测序要求专门的技术而且不容易适应实验室专门条件以外的环境。基于PCR的技术利用了微生物存在的推论,因为这些技术通过检查完整的核酸序列,而不需要微生物本身,仅仅提供阳性分析。PCR也不能检测到是否存在微生物的毒性蛋白。而且,从环境样品中检测某种微生物会因为在“脏的”样品中有干扰有效扩增目标DNA的其他物质而变得十分困难。

在样品裂解或高温裂解之后用质谱分析不稳定的细胞成分(如,脂肪酸)来检测细菌和病毒的存在。“Characterization of Microorganisms and Biomarker Development from Global ESIMS/MS analyses of Cell Lysates” by F.Xiang, G.A.Anderson, T.D.Veenstra, M.S.Lipton and R.D.Smith (Anal.Chem. 72(11),2475-2481(2000))记述了用这种方法检测微生物。可是,当微生物的不稳定成分随环境生长条件改变而变化以后,

对分析物的鉴定就不可靠了。

另一种方法利用 “The Use of Immunological Methods to Detect and Identify Bacteria in the Environment” by M.Schlotter, B.Assmus and A.Hartmann (Biotech.Adv.13, 75-80(1995))中记述的免疫化学捕捉, 然后再光学检出被捕捉的细胞。最常用的免疫化验方法, 酶联免疫吸附化验(ELISA), 有一个几百细胞的检出限。正好低于几种极具感染性的细菌, 如弗氏志贺氏菌 *Shigella flexneri* 的 ID₅₀。如 “Development of a Piezoelectric Immunosensor for the Detection of *Salmonella typhimurium*” by E.Prusak-Sochaczewski and J.H.Luong(Enzyme Microb.Technol.12:173-177(1990))中所介绍的压电 (Piezoelectric) 检出技术, 更不灵敏, 检出限大约 5×10^5 细胞。一个近期的报道 “Biosensor Based on Force Microscope Technology” by D.R.Baselt, G.U.Lee and R.J.Colton (Biosens.&Bioelectron. 13,731-739(1998)) 介绍使用原子力显微镜 (AFM) 检测免疫捕捉的细胞; 但是这种方法不适用于实验室之外, 及样品量较大的情况。

免疫公验目前也用于肽和蛋白的痕量分析。

而且, 现有技术捕捉肽/蛋白/微生物的时候都需要广泛使用已固定位置的抗体。那些类似的技术都有因为所用抗体对 pH、离子强度、温度的变化非常敏感而产生的重要问题。抗体还很容易被“脏的”样品中含有的蛋白水解酶的宿主降解。另外, 支持于(如, 小孔盘或磁珠) 表面的抗体分子密度总是不及常需水平。“Microbial Detection” by N.Hobson, I.Tothill and A.Turner(Biosens.& Bioelectron. 11, 455-477(1996))中对本领域最新的当前技术状况做了很好的总结。

医疗和军用要求更好的毒素及病源体的检测技术。通过远程感受装置时时评定战场感染程度可以允许和便于快速诊断来决定对策。适于这种情况的微生物/毒蛋白感受器要能够广泛区别病源体和非病源体。而且, 这种技术要求有很高的灵敏度, 可以检出少于 100 个的细胞, 并且实地的分析工作应能在 15 分钟以内完成。这种技术应该能够识别病源体, 并对菌株的毒性或产毒性作出一定的评估。

当前,用于鉴别病源微生物及其蛋白毒素的普通方法都运用免疫学的方法学。免疫学方法的缺点是抗体对 pH、离子强度、温度的敏感性;抗体自身容易被水解,要求苛刻的储存条件。为了克服这些问题,本发明记述使用非抗体配体捕捉微生物及其蛋白毒素的方法。相应的,本发明的一个目的就是为克服前述依赖抗体的技术的缺点,提供一种分类学评价微生物和蛋白的方法。

本发明更为具体的目的是提供一种分类学评价微生物和蛋白的方法,能够区分确定的微生物种,病源与非病源体,并能类似的用于鉴定有诊断效用的微生物蛋白质。

发明简述

本发明说明血红素复合物 (heme compounds)、铁载体、多糖和肽能够和病源微生物及其蛋白毒素结合;通过分析某种微生物所结合的配体的数量和种类实现对该微生物的分类学鉴定。开发这种方法是为了克服前述抗体依赖技术的局限性。本发明的概念在于一种通过微生物受体与特异的配体结合来捕获微生物的微生物分类学鉴定方法。用系于表面或缀合标记的配体接触含有微生物的样品。通过洗涤、磁性分离或色谱法,将目标微生物(细菌、病毒、真菌、原生动物、立克次氏体或其他细胞)或者蛋白质(毒素)同非结合的样品成分及未结合的配体分离开来。最后,通过合适的方法检测目标或标记的内源信号,判断配体是否与目标结合,而完成对样品的检查。

电磁辐射是一种根据本发明,用检测活的微生物的特征性代谢物的存在来检测所捕获微生物或/和毒素存在与否的方法。这些代谢物有,例如,还原性的嘧啶核苷酸或其他荧光性代谢物,或其他生物分子如,蛋白中较显著的色氨酸或酪氨酸,或结合的染料等。例如,如果配体含有荧光染料,洗涤后样品就会发荧光,因为配体跟细胞结合而多余的成分已被洗掉。其他标记,包括发冷光的,发磷光的,放射性的和/或能够比色的化合物,都可以结合在配体上,以类似的方式用于鉴定微生物和/或蛋白毒素。

美国专利第 5760406 号和第 5968766 号中介绍了一种检测所捕获的微生物或毒蛋白的具体方法。其中例如，以上述方式用含有分析物的溶液处理缀合有配体的基质后，对其表面进行电磁辐射。这种检测方法可用于判定分析物是否被结合上了。其他检测方法，如果适合于某种缀合于配体的标记，也可以用于判定配体是否特异性地与某种微生物或毒蛋白发生结合了。前面提到的一个例子中，应用与偶联配体缀合的荧光染料，在步骤（1）配体与微生物接触和（2）洗掉多余的缀合有染料的配体之后，通过染料特征性的荧光来检测微生物。应该注意，如果使用光学方法检测捕获的微生物或蛋白，配体与底物的联系不应该是光易裂解的。

因此，本发明的方法不依赖经典的抗原-抗体识别。相反，本发明的概念是利用相对不贵的试剂，捕捉样品中所含微生物和微生物蛋白。

在本发明的一个实施方案中，使用传感芯片（sensor chips）（或珠）。这些芯片应该由适合的支持材料，如玻璃或塑料基质（如，聚（丙稀）或聚（乙酸乙烯酯））制得，而且材料必须同将接头和配体缀合于其表面的化学反应及所用的检测方法相容。传感芯片制成为，其表面上有很多不同部分并且这些部分排布成某种模式的阵列（array）。每个部分结合不同的配体，该配体能够分子识别确定的微生物蛋白或微生物受体，并由此识别微生物本身。微生物受体包括例如微生物暴露于细胞周围液体环境的细胞外膜，纤毛或鞭毛等中存在的蛋白质。结合在传感芯片表面的用于捕捉病原体/蛋白的配体能够并且应该可以改变。一般来说，这样的配体可表现为能够捕捉广泛种类的微生物和毒蛋白的血红素复合物、铁载体、多糖和抗粘附肽（anti-adhesion peptide）等。这些配体可以通过适合大小的，也能与配体反应的交联剂固定或键合至传感芯片表面，由此该偶联剂在传感芯片表面和能与大量不同的微生物及蛋白反应的配体之间建立化学联系。传感芯片和阵列（1）暴露于含有微生物或毒蛋白的溶液，（2）去掉溶液中非结合的成分，（3）然后检查联有配体的表面，来检测分析物的结合情况。通过分析联有配体的表面在结合有捕获的微生物，或完整微生物细胞所不具有的微生物蛋白之后

出现的类型或模式，就能够分类学鉴定微生物或其毒蛋白。

这样，本发明可以用于快速的微生物鉴定，而不需要先进行微生物培养，后再显微镜检所得培养物。同样，可以类似地鉴定较低水平的毒性微生物蛋白。而且不必像本领域其他方法那样需要用到酶或抗体。阅读下面详述的实施方案和所附的权利要求，就会更明白本发明的上述和其他目的、特征和优势。

附图简述

图一显示，在表面被有所系血红素的显微镜玻璃载片上捕获的鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)。用授予 Powers 的美国专利第 5968766 号所述方法和设备检测这种病源微生物。

图二显示，在表面被有所系血红素的显微镜玻璃载片上捕获的稀释于多种浓度枯草芽孢杆菌 (*Bacillus globigii*) 中的产气杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)。用授予 Powers 的美国专利第 5968766 号所述方法和设备检测这种病源微生物。

发明详述

图一所示，按照本发明所述方法，用所系血红素捕获病源微生物(鼠伤寒沙门氏菌)。(用授予 Powers 的美国专利第 5968766 号所述方法和设备检测这种病源微生物。虽然可以使用多种适合的细菌检测方法，而在此应用这种方法是因为它能够在载片上检出这样少量的细菌。)从图示可以看出，用所系血红素捕获微生物的检出限 (<100 个细胞) 低于免疫学的方法 (最佳条件时，约 400 个细胞)。微生物和血红素配体间的结合不像和抗体的结合那样对 pH，离子强度和温度敏感。血红素配体也比较不贵，要求的存储条件比较不苛刻，而且不像抗体那样容易发生蛋白水解。

图二所示，用所系血红素捕获，以相同浓度稀释在非病源微生物(枯草芽孢杆菌)溶液中的病源微生物产气杆菌。此图显示，被有所系血红素的载片可以有效地从溶液中捕获病源微生物，即使非病源体与病源体

的比例是 $10^7:1$ 。用授予 Powers 的美国专利第 5968766 号所述方法和设备检测这种病源微生物。

在本发明的一个实施方案中,首先用配体接触含有未知被分析微生物或蛋白毒素的样品。配体系于芯片或珠子的表面上。结合效率跟系链 (tether) 的长度有关。发现系链长约 40 埃 (Å) 时,微生物与配体的结合效率最高。针对微生物的配体通过至少 15 埃的系链共价联接于基质表面;针对蛋白毒素的配体至少长 6 埃。然后,将分析物与非结合的样品物理分离。通过简单清洗芯片或珠子的表面,分离由表面所系配体捕获的分析物与样品中非结合成分。然后检查基质表面来判定是否发生了分析物同配体的结合。可以用以下方式检测基质表面结合的微生物:显微镜检术、固有荧光、结合染料荧光、放射性、冷光、磷光和/或光吸收。通过鉴定配体来鉴定微生物或蛋白。应该注意到所用系链不应容易发生光照裂解或对清洗系有配体的表面时用的溶液化学不稳定。

在本发明的一个实施方案中,首先用传感芯片接触含有未知被分析微生物或蛋白毒素的样品。传感芯片由玻璃等基质构成,其表面有一系列部分。每个部分联有一个不同的配体,可以结合特定的分析物。配体可通过结合来捕获分析物,然后使用如美国专利第 5760406 号和 5968766 号中公布并要求保护的荧光检查系统,通过蛋白毒素的固有荧光检出被捕获的分析物存在与否。这样,传感芯片的每个部分的配体能够捕获特定的微生物细胞或微生物蛋白。所用芯片可以保存或者用来培养捕获的微生物。

在本发明的另一个实施方案中,首先用联有包括但不限于荧光染料等标志的配体接触含有未知分析物(微生物、蛋白毒素或其他蛋白)的样品。将结合配体的分析物与非结合的样品成分及多余的配体分离开;可以通过离心(对细胞),磁性沉淀或色谱法(对蛋白)进行分离。通过检测标记(如,上例中所缀合的染料的荧光),来检测分析物和配体的结合,而由此分类学鉴定分析物。

在本发明的另一个实施方案中,首先用以上文所述适合长度的接头系于基质表面的配体接触含有未知分析物(微生物或蛋白)的样品。物

理分离并洗掉溶液中非结合成分。正如本领域技术人员将理解的，用反应性标记处理捕获的微生物或蛋白，前提是所用标记不能同基质表面或配体发生反应。检测联有接触了分析物的配体的表面区域上的标记，可指示特定的分析物存在与否。

在本发明的一个优选实施方案中，本发明所用配体可以选自血红素复合物、铁载体、多糖（包括寡糖）和肽。

如本领域技术人员所知，动物病源体一般有吸受血红素的能力，因此血红素复合物可用于捕获许多种类的病源体。除血红素复合物，其他形式为对铁有高亲和性的螯合剂的配体，一般称作铁载体，也可用于捕获许多种的病源细菌。这样的铁载体包括有：产碱杆菌素（alcaligin）、分枝菌素类、绿脓杆菌螯铁蛋白、葡萄球菌肝褐素（staphyloferrin）、弧菌素（vibriobactins）和耶尔森氏菌素（yersiniabactins）。

上文所述，且如本领域技术人员所知，通过与标有标记的血红素复合物或铁载体的结合，可以区别动物病源体。例如，用联有荧光性、发光性、磷光性，化学发光性或放射性化合物的铁载体或血红素复合物培养含细菌的溶液。清洗细胞之后，可以通过荧光、比色或放射检测等技术检测动物病源体。还可以利用系于支持物表面的铁载体或血红素复合物结合动物病源体来将这些微生物从环境样品，如水中分离出来，实现富集或纯化的目的。

在本发明的操作中，除铁载体或血红素复合物以外，真核生物表面被微生物细胞受体识别的表位（肽或碳水化合物），也可以类似地用作配体。这些配体包括天然的和可以化学合成产生的寡糖和多糖。K.A.Karlsson 在 “Microbial Recognition of Target Cell Glycoconjugates”(Structural Biology 5:622-635(1995))中介绍了其他寡糖及其与病源体的亲和性。

表1列举了许多病源细菌的性质，包括每种菌引发的疾病和它们对铁载体、寡糖和血红素复合物的结合性质。这些性质可以用于对这些种类细菌的捕获和鉴定。

通过亲和筛选寡肽库可以确定典型的肽配体，然后可以化学合成得

到。铁载体配体可以通过化学合成生产或者从用过的微生物培养基中分离得到。寡糖配体可以化学合成或者从真核组织中分离得到。血红素复合物可以典型地用原卟啉 IX 作起始试剂而化学合成得到。

表 1 细菌结合铁载体、寡糖和血红素的性质

菌种	所致疾病	是否结合铁载体	是否结合寡糖	是否结合血红素	是否产生的外毒素
炭疽芽孢杆菌	炭疽	未知	一种肺寡糖	未知	炭疽毒素
百日咳杆菌	百日咳	产碱杆菌素 (Alcaligin), 其他	N 乙酰葡萄糖胺	是	百日咳毒素
肉毒梭菌	肉毒中毒	未知	未知	是	肉毒毒素 A
产气荚膜梭菌	气性坏疽	未知	未知	未知	α -毒素
破伤风梭菌	破伤风	未知	未知	未知	破伤风毒素
白喉杆菌	白喉	气菌素 (Aerobactin)	未知	未知	白喉毒素
大肠杆菌 0157: H7	多种感染	许多	Globobiose, 其他	是	志贺 (Shiga) 样毒素, 其他
流感嗜血菌	脑膜炎	肠菌素 (Enterobactin)	N 乙酰 β (1-4) 乳糖, 其他	是	未知
幽门螺杆菌	胃溃疡	未知	一种粘膜寡糖	未知	成泡细胞毒素 A
肺炎杆菌	多种感染	许多	N 乙酰 β (1-4) 乳糖, 其他	是	未知
结核分枝杆菌	结核	分枝菌素 T	未知	未知	未知
脑膜炎奈瑟氏球菌	脑膜炎	许多	未知	是	未知
铜绿假单胞菌	多种感染	绿脓杆菌螯铁蛋白 (Pyochelin), 其他	Asialo G _{M1} , 其他	是	外毒素 A, 弹性蛋白酶, 其他
伤寒沙门氏菌	伤寒热	许多	未知	是	是
粘质沙雷氏菌	多种感染	气菌素 (Aerobactin), 铁草铵 B (Ferrioxamine B)	是	是	serralysin
痢疾志贺氏菌	痢疾	肠菌素, 气菌素 (Aerobactin)	是	是	志贺毒素
金黄色葡萄球菌	多种感染	葡萄球菌肝褐素 (Staphyloferrin), 其他	N 乙酰 β (1-4) 乳糖	是	几种超级抗原
肺炎链球菌	肺炎, 脑膜炎	未知	N 乙酰葡萄糖胺(1-3)乳糖, 其他	是	链球菌溶血素
霍乱弧菌	霍乱	弧菌素, 其他	是	是	霍乱毒素
鼠疫耶尔森氏菌	腺鼠疫	耶尔森氏菌素, 其他	未知	是	YopE, 其他

每分子中含有至少一个色氨酸或少量酪氨酸的毒素,在被所系肽捕获以后,可以通过色氨酸/酪氨酸荧光被检出。多种微生物,包括藻类、真菌和细菌,分泌可用这种技术检测的外毒素。

表 2 包含 (1) 可由本文所述技术捕获的,和 (2) 最终通过其固有荧光被检出的毒素和细菌蛋白实例。应该注意,对于代表表 2 中最不利情况(因为只存在一个色氨酸和 22 个酪氨酸)的金黄色葡萄球菌肠菌素 B,接着还研究了其单个色氨酸残基的荧光:在 B.R.Singh, M.L.Evenson 和 M.S.Bergdahl 的“对金黄色葡萄球菌肠菌素 B 和 C1 用循环二向色性和荧光光谱进行结构分析”(“Structural Analysis of Staphylococcal Enterotoxins B and C1 Using Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy”(Biochemistry 27:8735-8741(1988)))。如本领域技术人员所熟知的,检测色氨酸/酪氨酸荧光(标化为散射的激发信号),足以指示在传感芯片某个部分的表面上孢子、不能生活的细胞、营养生长的细菌或真菌的活细胞、病毒或微生物病毒的存在。(也即,结合于配体)。

表 2 细菌毒素选例的氨基酸计数

细菌	毒素	氨基酸数量	色氨酸数量	酪氨酸数量
炭疽芽孢杆菌	保护性抗原	753	7	27
炭疽芽孢杆菌	致死因子	770	5	35
蜡状芽孢杆菌	磷脂酶 C	245	9	15
副百日咳杆菌	百日咳毒素	952	11	50
肉毒梭菌	毒素 A	1296	15	67
艰难梭菌	毒素 A	2366	25	166
产气荚膜梭菌	ι -毒素	346	4	18
破伤风梭菌	破伤风毒素	1421	13	78
白喉杆菌	白喉毒素	534	5	16
大肠杆菌	α -溶血素	1023	3	38
幽门螺杆菌	成泡细胞毒素 A	808	8	14
单核细胞增生杆菌	李斯特菌溶胞素	523	7	23
铜绿假单胞菌	弹性蛋白酶	301	4	22
粘质沙雷氏菌	serralysin	470	7	19
痢疾志贺氏菌	志贺毒素	638	7	17
金黄色葡萄球菌	肠毒素 B	239	1	22
金黄色葡萄球菌	毒性休克毒素-1 (toxic - shock toxin - 1	194	3	9

如上所述，在传感芯片的每个部分联接不同的配体。然后用传感芯片接触含有未知微生物或蛋白的样品，芯片表面特定的配体结合特定的分析物，选择性地将其捕获。然后用适合的溶液（如磷酸-缓冲盐溶液）将未结合的分析物洗掉；并以适合的技术检测传感芯片。美国专利第 5706406 号和第 5968766 中公布了一种可以用来检测传感芯片表面是否存在细菌的技术，其中所述设备利用适合波长的电磁辐射激发出存在结合的分析物时所特有的荧光。

如本领域技术人员所熟知，如果用于捕捉分析物的所系配体具有固有荧光，那么在结合分析物之后其荧光可能改变。（这种荧光的改变可能表现为强度变化或者特征荧光能量的移动。）所系配体荧光的变化可进一步证实分析物的检测。

在本发明中，含有未知微生物的样品接触传感芯片，细菌的一种或多种受体同系于芯片多个部分的不同配体反应。然后，可以用探测器测量芯片的荧光，来检测传感芯片的哪些部分结合有分析物。例如，可以用分枝杆菌铁载体捕捉分枝杆菌，如结核分枝杆菌。用所系的 N 乙酰 neuro aminyl- α -2,3-乳糖捕捉幽门螺杆菌。肽：GADRSYLSFIHLY PELAGAGGGC 可以通过末端的半胱氨酸被联接来快速捕捉游离的金黄色葡萄球菌中毒性休克毒素-1。肽：GHHKHHHGGGC 也可以通过末端的半胱氨酸联接来特异性的捕捉金黄色葡萄球菌暴露于表面的蛋白质 A，并由此捕捉到金黄色葡萄球菌。A.Sato 等在“从噬菌体展示文库中确定结合毒性休克症状毒素-1 并抑止其结合主要组织相容性复合物（MHC）II 类分子的肽”（**Identification from a Phage Display Library of Peptides that Bind to Toxic Shock Syndrome Toxin-1 and Inhibit Its Binding to Major Histocompatibility Complex(MHC) Class II Molecules**）（*Biochemistry* 35, 10441-10447（1996））中介绍了金黄色葡萄球菌中毒性休克综合征毒素-1 的结合肽。

如上所指，可以通过确定某一种捕获的微生物或分散的微生物蛋白鉴定一些所关注的分析物。然而其他情况中，一系列的两种或更多捕获的目的分析物可用于确定某一种分析物。例如，某传感芯片的一个区域

在水平和垂直轴各有 3 部分，如下图：

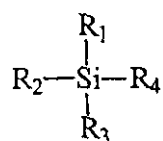
A1	A2	A3
B1	B2	B3
C1	C2	C3

此例中，按照下表的方式将下述配体联接于特定的部分：

部分位置	3×3 阵列的配体
A1	Aisalo G _{M1}
A2	氯高铁血红素
A3	绿脓杆菌螯铁蛋白
B1	GalNAc βGal
B2	Alcaligin
B3	纤连蛋白（肽片段）
C1	抗金黄色葡萄球菌蛋白 A 的肽
C2	葡萄球菌肝褐素
C3	铁草铵 B

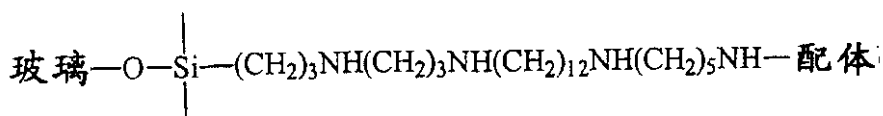
发现当检测出 A1, A2, A3, B1 和 C3 部分的分析物时可以确定该微生物是铜绿假单胞菌。类似的，当 A2, B1, B3, C1, C2 和 C3 部分中含有捕获的分析物时，可以确定是金黄色葡萄球菌。这种情况下，在 C1 部分捕获分析物就足够进行分类学鉴定。A2, B1, B3, C2 和 C3 部分对细胞的捕获进一步证实了结果。将捕捉某种给定分析物的多种配体整合到一个传感芯片上，事实上，允许对单一样品进行多个独立的分析。这就增加了分析结果的统计可靠性。

将多种配体联接到基质上时，优选使用本领域技术人员所熟悉的有机偶联剂。以表面有化学氧化所致暴露羟基的玻璃或塑料基质作传感芯片，在本发明的实施中，通常优选使用具有如下一般结构的有机硅烷化合物：



其中， R_1 到 R_4 匀选自基团：氢、含1到6个碳原子的烷基，含6到12碳的芳基和含1到4碳原子的烷氧基，且 R_1 、 R_2 和 R_3 中至少有一个是烷氧基。 R_4 是含至少3个碳原子并含有带有能与配体反应的官能团的长接头。不限制本发明，适合的带接头的有机基团包括胺、聚醚和多聚（甘氨酸）。偶联剂含有其他如环氧基、氨基和不饱和官能团，羟基，巯基及类似的能与多种配体反应的官能团时，也可用于本发明的实施。有关理论，不限制本发明，认为配体与有机硅烷的官能团，优选末端官能团反应，而硅原子所直接连接的容易水解的烷氧基能够直接与玻璃或塑料基质的表面反应。这种偶联剂（广义的(extended)硅烷）也可以这样在原位构成，首先将母体硅烷与传感芯片表面反应，然后以化学反应将接头接在固定的硅烷上。再通过偶联剂（即，带有机接头的硅烷）把配体系于玻璃或塑料的表面。而且，接头应该有足够的长度以最佳距离（40Å）从芯片表面呈现配体。这一原则基于我们对较短距离导致细菌细胞捕捉效率降低的确定。

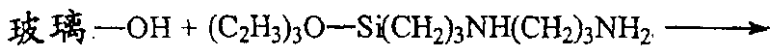
这样，系于玻璃表面的配体可以下述例子说明：



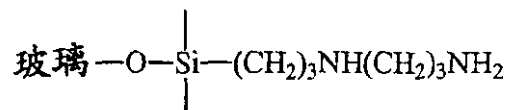
系于氧化的塑料表面的配体也可以上例说明，只要将“玻璃-O-Si”部分换成C（塑料聚合物的碳）。用于将配体系于传感芯片表面的化学反应为本领域技术人员所熟知并在文献中有记述。可以在下述文献中找到这类反应：G.T.Hermanson *Bioconjugate Technique*(San Diego: Academic Press,1996);Hansson 等., “Carbohydrate-Specific Adhesion of Bacteria to

Thin Layer Chromatograms: A Rationalized Approach to the Study of Host Cell Glycolipid Receptors”(Analytical Biochemistry 146:158-163 (1985); 和 Nilsson 等, “A Carbohydrate Biosensor Surface for the Detection of Uropathogenic Bacteria” (Bio/Technology 12: 1376-1378 (December 1994)).

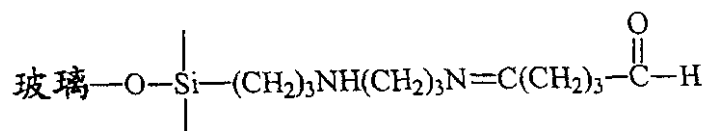
用将配体铁草铵联接于玻璃传感芯片表面的例子说明这种反应。在第一阶段, 用 2% 的 γ -N-(氨基丙基)- γ -氨基丙基三甲氧基硅烷溶液同带有游离羟基的玻璃表面反应, 使硅烷附着于玻璃表面:



(I)

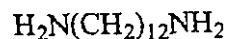


反应产物在 pH 大约 8 左右再同戊二醛反应形成相应的醛:

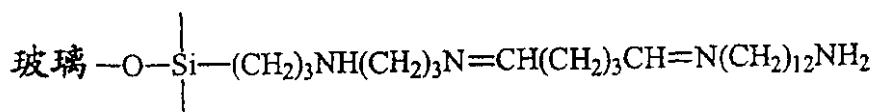


(II)

该醛再同二胺 (III) 反应产生 IV:

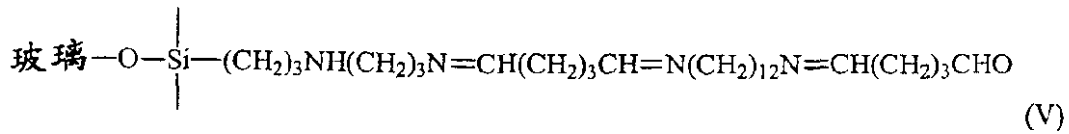


(III)

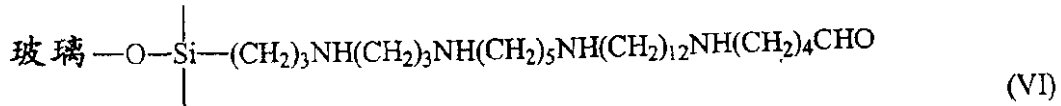


(IV)

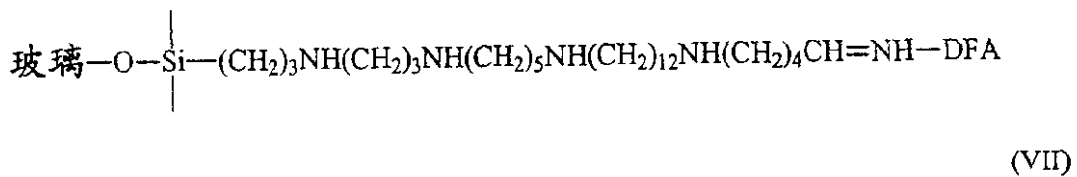
接着, 前面反应的产物同戊二醛反应来引入一个(末端)醛基:



该醛基可以用 NaCNBH_3 还原为:



然后通过与 **deferrioxamine B(或 DFA)** 在碱性 pH 反应可以将前述结合于表面的硅烷偶联剂衍生化得到:



然后, 在水溶液中同铁盐反应, DFA 就能与铁复合形成配体。

只要不偏离本发明, 尤其是下述权利要求中所定义的精神, 可以对测定、步骤和制剂进行多种改变和修正。

图 1

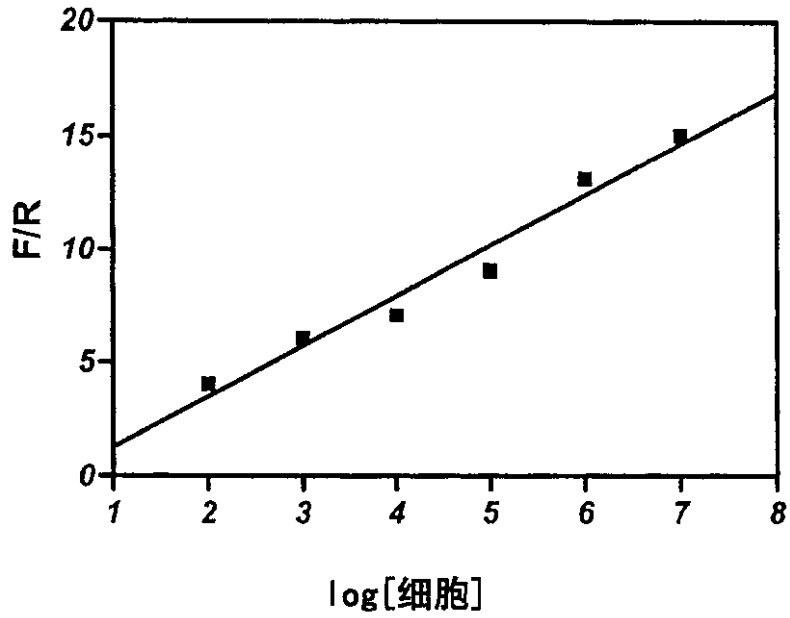
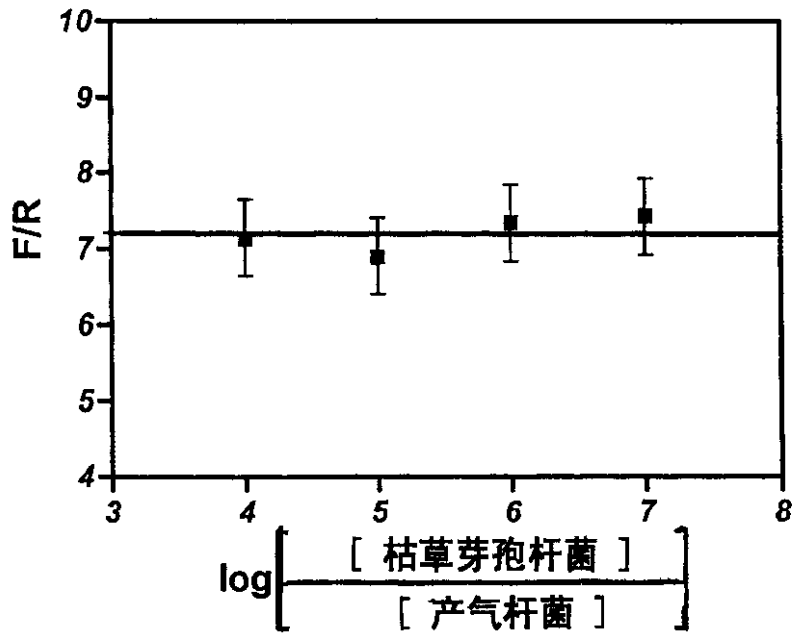


图 2



ABSTRACT

The present invention describes a method for the binding of pathogenic microorganisms and their toxic proteins with ligands that have been covalently tethered at some distance from the surface of a substrate: distances of at least fifteen Å are required for microorganism binding ligand tethers and at least six Å are required for protein binding ligand tethers. The ligands described herein include heme compounds, siderophores, polysaccharides, and peptides specific for toxic proteins, outer membrane proteins and conjugated lipids. Non-binding components of the solution to be analyzed are separated from the bound fraction and binding is confirmed by detection of the analyte via microscopy, fluorescence, epifluorescence, luminescence, phosphorescence, radioactivity, or optical absorbance. By patterning numerous ligands in an array on a substrate surface it is possible to taxonomically identify the microorganism by analysis of the binding pattern of the sample to the array.