



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103154262 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201180033610.6

(22)申请日 2011.07.07

(30)优先权数据

1055574 2010.07.08 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.01.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2011/051624 2011.07.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/004540 FR 2012.01.12

(73)专利权人 生物梅里埃公司

地址 法国迈合西-兰托阿嘞

(72)发明人 V·阿特拉什 B·科兰 A·拉费

B·马克鲁夫 P·蒙特

D·莫斯蒂科内 J·C·雷蒙

T·索菲亚 A·维蒙

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 安琪 张晓威

(51)Int.Cl.

C12Q 1/00(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

C12M 1/28(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 27/26(2006.01)

(56)对比文件

EP 0446972 A2,1991.09.18,

EP 0446972 A2,1991.09.18,

US 5795773 A,1998.08.18,

W0 2007106936 A1,2007.09.27,

审查员 赵天

权利要求书1页 说明书16页

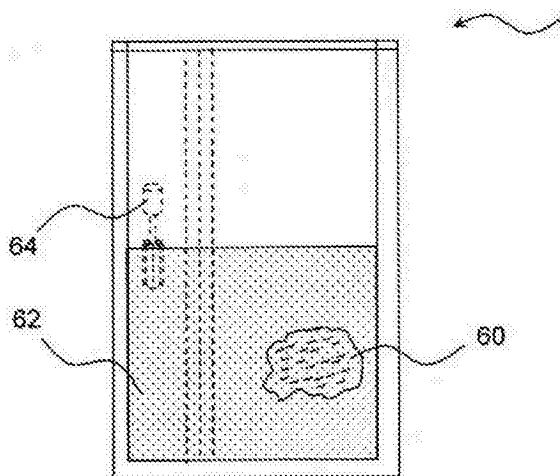
序列表1页 附图6页

(54)发明名称

直接检测和鉴别稀释于富集肉汤中的生物样品中的微生物的方法

(57)摘要

本发明大体上涉及分析领域,例如生物分析领域。更具体地,本发明涉及检测放置于密闭容器内的样品中存在的至少一种微生物的方法,所述方法基本包括以下步骤:a)在所述容器内,使所述样品与至少一种培养基和能够捕获待检测的所述微生物的支持物接触;b)封闭所述容器;c)将所述容器放置于能够允许所述微生物生长的条件下;和d)在所述密闭容器内,使用检测工具检测固定于所述捕获支持物上的微生物的存在。



1.检测放置于密闭容器内的样品中存在的至少一种微生物的方法,所述方法包括以下步骤:

a)在所述容器内,使所述样品与至少一种培养基和能够捕获待检测的所述微生物的支持物接触,

b)封闭所述容器,

c)将所述容器放置于能够允许所述微生物生长的条件下,

d)在所述密闭容器内,使用光学检测工具检测固定于捕获支持物上的所述微生物的存在,

其中所述容器为均化袋、烧瓶、瓶子或者药丸盒,

其中将所述微生物的至少一种特异性结合配偶体固定于所述捕获支持物上,

所述捕获支持物被所述结合配偶体敏化,并且

所述特异性结合配偶体选自:抗体、Fab片段、Fab'片段、重组或非重组的噬菌体蛋白和噬菌体,

其中在步骤a)的过程中,使能够进行所述检测的揭示系统在所述容器内接触。

2.权利要求1的方法,其包括中间步骤c'),所述中间步骤c')为:将全部或者部分由所述样品、所述培养基、所述能够捕获待检测的所述微生物的支持物以及可能的所述揭示系统构成的混合物从在这种情况下被称为主容器的所述容器中转移到至少一个被称为辅容器的第二容器中。

3.权利要求1的方法,其包括补充步骤e),所述补充步骤e)为确认对所检测微生物的检测,其中所述补充步骤e)与步骤d)同时进行或在步骤d)之后进行。

4.权利要求3的方法,其中使用与用于检测步骤的检测工具相同或者不同的检测工具完成补充步骤e)。

5.权利要求1的方法,其中用于捕获所述微生物的所述支持物也构成所述检测工具。

6.权利要求1的方法,其中实时进行对所述微生物的检测。

7.权利要求1的检测方法,其中在所述微生物的生长步骤之后进行对所述微生物的检测。

8.权利要求1的方法,其中所述捕获支持物是整体式支持物或者颗粒式支持物。

9.权利要求8的方法,其中所述颗粒式支持物由敏化颗粒构成。

10.权利要求9的方法,其中所述敏化颗粒为磁性的。

11.权利要求1的检测方法,其中所述检测工具与数据分析系统连接。

12.权利要求11的检测方法,其中所述捕获支持物或所述检测工具与所述数据分析装置之间的连接为有线连接或者无线连接。

直接检测和鉴别稀释于富集肉汤中的生物样品中的微生物的方法

[0001] 本发明大体上涉及分析领域,例如生物分析领域。更具体地,本发明涉及在密闭容器内直接且实时地检测稀释或者悬浮于富集肉汤的样品中的微生物的方法。

[0002] 微生物分析需要获得结果所花费的时间必须尽可能短的精确技术。

[0003] 在医学领域,预见和诊断感染风险是必要的:诊断越快越精确,则对患者的处理会越有效率,并且传播的风险会更小。对于动物健康,方法也是类似的。

[0004] 在农产品领域,问题是相同的。但是,其重点在于以下几方面:

[0005] • 存在于原材料、中间产物和上市成品中的病原微生物及其毒素,

[0006] • 在从原料到成品的生产过程中沿整条生产链用作质量指标的非病原微生物,以及

[0007] • 有技术意义的细菌,例如酶。

[0008] 对可疑污染物的快速精确的检测使得能够对其进行监控,从而能够采取正确的措施。

[0009] 从技术层面讲,微生物分析可能进行一个或者多个预富集和/或富集阶段、一个或者多个检测阶段以及一个或者多个微生物计数阶段。对于具体应用例如农产品微生物监控而言,可能还需要确认阶段,以满足该领域执行的标准。

[0010] 目前,还没有不使用富集步骤而在大量初始样品中检测目标微生物的方法。

[0011] 预富集和/或富集阶段使用选择性或者非选择性培养基,目的是促进生物样品或者环境样品中的目标微生物的生长,同时限制非目标菌群的生长。培养基通常用于无菌塑料袋型容器中,它们在其中与食品样品或者环境样品接触,以重悬浮和重富集寻找到的微生物。这一阶段是必需的,目的是满足下述要求:揭示非常多变且可能非常大量的样品(例如稀释于225-3375毫升(mL)培养基中的25克(g)至375g样品)中的至少一种目标微生物的可能的初始存在。该富集步骤结束时,取一份(5微升(μ l)至5mL)样品进行检测目标微生物的步骤。在这份样品中必须具有足量的目标微生物,以实现对其的系统检测。

[0012] 过去,检测阶段的基础是在琼脂培养基上培养微生物,以证明所研究微生物的代谢特征。通常使用特定的酶底物。这些酶底物一般包含两个部分:对待揭示的酶活性具有特异性的第一部分(也称为目标部分)和作为标记物的第二部分(也称为标记物部分),所述第二部分通常由生色团或者荧光团构成。通过根据是否有反应选择这些底物,可表征微生物的性质或者区分开不同组的微生物。因此,颜色或者荧光的出现或者消失会指示微生物的属或者类型。在这一点上,生色培养基的使用使得能够同时检测和鉴别所研究的病菌。它简化了方法,并且大幅地减少了获得结果所花费的时间。例如,我们举例申请人的**ChromID®**培养基。这些生色培养基的基础是检测所研究细菌的特定代谢特征,例如对大肠杆菌(*Escherichia coli*)的 β -葡糖醛酸糖苷酶的酶活性。

[0013] 免疫测定构成用于检测试验的另一种技术。它们利用所研究微生物的免疫原性特征。非穷举地,可以举例竞争性或夹心型ELISA(酶联免疫吸附测定)。

[0014] 最后,还采用基于所研究微生物的基因组特征的分子生物学技术来检测和鉴别目

标微生物。例如,可以举例常规的扩增技术,例如PCR(聚合酶链反应)和NASBA(基于核酸序列的扩增),其可以与本领域技术人员已知的实时检测技术联用。

[0015] 但是,所有这些技术的使用均需要在预富集/富集阶段结束时打开袋子,以回收一份匀浆并进行检测步骤。

[0016] 在农产品领域,确认阶段自身与微生物分析更加特别相关。事实上,在上述方法的结果是阳性时,必须确认所研究病原体的存在。这使得互补试验和使用不同于在首次分析过程中使用的检测原理成为必需。随意使用上述技术以进行确认。

[0017] 因此,完全地和精确地鉴别样品中的微生物必需一系列的几个步骤:富集、检测和确认。常规使用的测试的标准化已使检测方法的自动化称为可能,但是其实施仍需很长时间。事实上,现有技术的缺点是,这些步骤是连续进行的,且需要大量耗时的操作,因此影响到得到结果所需的时间。

[0018] 再者,上述技术需要将富集袋打开一次或者多次以采集多份样品。在筛选(尤其是在农产品产业中)期间的阴性样品数越多,则越不利。因此,考虑对操作者有益的是无需再次打开容器来查明研究样品的阳性/阴性结果。

[0019] 针对以上考虑到的与现有技术状况相关的技术问题,本发明的一个基本目的是提供一种简单的检测、鉴别和确认存在于样品特别是农产品样品中的微生物的方法。

[0020] 本发明的另一个目的是提供一种检测、鉴别和确认微生物的方法,该方法限制了对容器中所含的样品的处理,由此限制了对处理样品的工作人员和样品自身两方面的污染风险。

[0021] 本发明的另一个目的是提供一种检测和鉴别微生物的方法,该方法减少了分析样品所必需的时间。

[0022] 本发明的另一个目的是提供一种在整个富集过程中检测、鉴别和确认全部体积样品中的微生物的方法,该方法明显地提高了测量灵敏度甚至其特异性。

[0023] 本发明的另一个目的是提供一种可以大大地提高样品分析速率的方法。

[0024] 本发明的另一个目的是提供一种使得能够多次检测(multi-detection)的方法。

[0025] 本发明的另一个目的是通过大幅地减少样品处理步骤来改善分析的可追溯性。

[0026] 本发明特别实现了这些目的,本发明首先涉及一种检测放置于密闭容器内的样品中存在的至少一种微生物的方法,所述方法基本包括以下步骤:

[0027] a)在所述容器内,使所述样品与至少一种培养基和能够捕获待检测的所述微生物的支持物接触,

[0028] b)封闭所述容器,

[0029] c)将所述容器放置于能够允许所述微生物生长的条件下,

[0030] d)在所述密闭容器内,使用检测工具检测固定于捕获支持物上的所述微生物的存在。

[0031] 根据一个具体实施方案,在步骤a)的过程中,使能够检测所述微生物的存在的揭示系统在所述容器内接触。

[0032] 揭示系统被理解为任何能够与所述微生物或者所述微生物的结合配偶体偶联的分子,由于所述微生物或其结合配偶体的转导性质(具体为荧光、颜色变化(colouring)、放射性),使得能够揭示所述微生物的存在。

[0033] 根据另一具体实施方案,本发明的方法包括中间步骤c'),所述中间步骤c')为:将全部或者部分由所述样品、所述培养基、所述能够捕获待检测的所述微生物的支持物以及可能的所述揭示系统构成的混合物从所述容器(在这种情况下被称为主容器)转移到至少一个第二容器(被称为辅容器)中,其中可通过将营养元素和特别的选择剂提前加入所述辅容器中来来进行二次富集。这样的二次富集增加了所述目标微生物相对于非目标微生物的数量,改善了特异性。

[0034] 有利地,将所述微生物的至少一种特异性或者非特异性结合配偶体固定于所述捕获支持物上。根据本发明的一个优选实施方案,所述特异性结合配偶体选自:抗体、Fab片段、Fab'片段、重组或非重组的噬菌体蛋白和噬菌体,或者本领域技术人员熟知的任意其它配体。

[0035] 有利地,所述检测工具选自:电检测工具特别是电化学检测工具、光学检测工具、声学检测工具、热检测工具、机械检测工具和磁检测工具。

[0036] 所述捕获支持物可以是常规的支持物。具体而言,我们列举颗粒式支持物(可能有磁性)或者整体式支持物。它也可以仅仅是惰性支持物,例如塑料板或玻璃纤维板。然后将这样的捕获支持物与所述检测工具连接。有利地,所述捕获支持物可以被(可能是特异性的)结合配偶体敏化。

[0037] 或者,所述捕获支持物可以与所述检测工具是一体的。例如,当所述捕获支持物由电化学生物传感器或光纤构成时,情况就是如此。

[0038] 根据一个具体实施方案,完全能够想到结合检测工具以进行检测并同时或者随后进行确认。例如,可利用电化学生物传感器进行对目标微生物的检测。如果通过特异性结合配偶体固定所述目标微生物,则在这种情况下,所述检测步骤构成鉴别步骤。由光学检测装置对特异性地固定于生物传感器上的分析区域的微生物进行光学分析,可实现对待确认微生物的鉴别。若光学检测装置是拉曼分光仪(一种通过与对应于不同目标微生物的参考谱的数据库比较来对拉曼光谱进行的分析),则可确认对所述微生物的鉴别。

[0039] 根据另一具体实施方案,可用相同技术进行检测和确认。因此,如果检测工具是光学工具例如内荧光测量工具,则特别有利的是经由内荧光的出现进行对目标微生物的检测。在这种情况下,反应为是(存在荧光)或者否(不存在荧光)。如果有荧光,则对与对应于不同目标微生物的参考谱的数据库相比较的荧光信号进行的光谱分析使得所述微生物能够被鉴别,由此可以实现对待确认的所述微生物的存在的检测。

[0040] 优选地,实时进行对所述微生物的检测。或者,可以在所述微生物的生长步骤结束时或者之后完成对所述微生物的检测。

[0041] 根据本发明方法的一个具体实施方案,所述容器为均化袋(homogenisation bag)。同样也可使用硬质容器例如烧瓶、瓶子或者药丸盒。

[0042] 根据本发明方法的另一具体实施方案,所述检测工具与数据分析系统连接。

[0043] 有利地,所述检测工具与所述数据分析装置之间的连接为有线连接或者无线连接。

[0044] 本发明还涉及用于检测放置于密闭容器内的样品中存在的至少一种微生物的电化学生物传感器。所述生物传感器包含支持物,所述支持物包含以下元件:

[0045] • 至少一个检测电极,其涂覆有至少一种电活性聚合物,在其一端上固定有至少

一种单链或者双链寡核苷酸,所述寡核苷酸的另一端与待检测的微生物的至少一种特异性或者非特异性结合配偶体连接;

[0046] • 至少一个对电极。

[0047] 有利地,所述电活性聚合物选自:聚吡咯、聚乙炔、聚吡嗪(polyazine)、聚对亚苯(poly(p-phenylene))、聚(对苯亚苯基-1,2-亚乙烯基)(poly(p-phenylene vinylene))、聚茈、聚噻吩、聚呋喃、聚硒酚、聚吡嗪、聚吡唑和聚苯胺。

[0048] 根据一具体实施方案,所述电活性聚合物包括至少一种电化学介质。这样的电化学介质选自:二茂铁、醌和它们的衍生物,或者本领域技术人员熟知的任意其他介质。

[0049] 根据一备选实施方案,所述电化学介质在培养基中为游离形式。这样的介质可以是例如铁氰化物/亚铁氰化物对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 、铱氯化物对 $[\text{IrCl}_6]^{3-/4-}$ 或者六胺合钌(ruthenium hexamine) $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ 。

[0050] 寡核苷酸和微生物的结合配偶体之间的键优选由至少一个生物素-链霉亲和素或生物素-亲和素结合对形成。

[0051] 如果寡核苷酸为单链,则将生物素固定于所述核苷酸的3'端上,5'端使所述核苷酸能够与电活性聚合物(特别是通过共价键)结合。通过使用也被生物素化的结合配偶体,则容易通过链霉亲和素或亲和素分子将该结合配偶体连接至寡核苷酸的3'端。

[0052] 如果寡核苷酸为双链,则经由第一条链的5'端将该链(尤其是通过共价键)固定至电活性聚合物上。第二条链自身在其5'端被生物素化,这使得也被生物素化的结合配偶体经由链霉亲和素或亲和素分子而被固定。

[0053] 有利地,所述结合配偶体选自:抗体、Fab片段、Fab'片段、重组或者非重组的噬菌体蛋白和噬菌体。

[0054] 通过下文的详细描述和相关附图会更好地理解本发明的目的和优点,在所述附图中:

[0055] -图1示出与电化学生物传感器结合的预富集和/或富集袋。

[0056] -图2示出电化学生物传感器的主视图。

[0057] -图3A示出不存在微生物的电化学传感器的表面。

[0058] -图3B示出存在微生物的电化学传感器的表面。

[0059] -图4为用于分析具有电化学生物传感器的预富集/富集袋的系统的示意图。

[0060] -图5为在检测食品样品中的大肠杆菌O157:H7的过程中获得的阻抗谱测量结果的图。

[0061] -图6为在检测食物样品中的无害李斯特菌(*Listeria innocua*)的过程中获得的阻抗谱测量结果的图。

[0062] -图7为根据第一实施方案,通过在具有敏化的捕获支持物的预富集/富集袋中进行光学检测的分析系统的示意图。

[0063] -图8为如图7所示的分析系统的示意图,其中袋的位置使得敏化的捕获支持物能够被读解。

[0064] -图9为敏化的捕获支持物的示意图。

[0065] -图10为图8所示的敏化的捕获支持物的示意图,其在分析之后给出阳性结果。

[0066] -图11为根据第二实施方案,通过在具有敏化的捕获支持物的预富集/富集袋中进

行光学检测的分析系统的示意图。

[0067] 根据本发明的第一实施方案,微生物检测或鉴别的方法在于采用通常被称为 **Stomacher®** 袋的无菌塑料均化袋。这样的袋在图1中被标注为附图标记10。该袋10由两个大致为矩形的塑料片12和14构成,这两个塑料片12和14通过其3条边彼此连接,从而界定出接收培养基和待分析样品的内部空间。其附件包括通过一条边与片12和14连接的大致为矩形的过滤器16,将内部空间分为两部分。该袋最后含有生物传感器18。该生物传感器为电化学生物传感器,其细节示于图2。该生物传感器18被夹在片12和14之间,从而与检测区域相对应的一个部分181存在于袋10的内部空间中,而与连接区域相对应的部分在该袋之外,以使芯片连接到数据分析装置。这在下文进行阐释。

[0068] 图2详细地示出了电化学生物传感器18。如上文所阐释,该生物传感器18由分析区域181和连接区域182构成。分析区域包括八个工作电极20,它们围绕被称为对电极22的中央电极排列。另外,分析区域包含参比电极24,其为围绕对电极22放置的开口圆环的形式。所有这些电极均通过导轨(conductor track)28独立地连接于十个连接终端26。该连接终端由与工作电极相同的材料制成。该材料优选为金。但是,本领域技术人员熟知的任意其它导电材料均可使用,例如碳、铂或金刚石。构成电极支持物的材料为聚合物材料,例如聚酰亚胺。但是,可以想到使用本领域技术人员熟知的具有等同性质的任意其他材料。

[0069] 应注意,图2中给出的电极结构仅仅是众多结构中的一种,并且绝非要限制本专利申请的保护范围。

[0070] 图3A和3B分别示出在不存在或存在微生物的情况下的显微水平的工作电极的横截面。

[0071] 在工作电极处,可以看到三个重叠的层。这些层中的第一层30是构成生物传感器支持物的聚合物层。中间层32是导电材料(通常为金)层。最后,层34是电活性共轭聚合物(conjugated polymer)层。这样的聚合物例如是聚吡咯。这样的聚合物的导电性和电活性是公知的。还已知,当某些吡咯环的3位或4位被官能团取代时,聚吡咯保留其导电性及其电活性。携带这类官能团的聚合物描述于W0-A1-95/29199、Garnier等人(Synthetic Metals, 100:89-94,1999)、Ho-Hoang等人(Synthetic Metals,62:277-280,1994)、Ho-Hoang等人(J.Mater.Chem.,6(7),1107-1112,1996)和Korri-Youssoufi等人(Materials Science and Engineering,C1 5,265-268,2001)中。因此,不同的分子可被接枝到聚吡咯单体所携带的官能团上。W0-A1-95/29199因此描述了通过以大于或等于0.8V/ECS的电势电氧化合成聚吡咯。通过电化学氧化合成聚吡咯使得在电极表面——更精确地说在导电基板上——形成自支撑膜(self-supported film)形式的电活性膜。这是一种将寡核苷酸间接地固定于聚吡咯中的方法。将吡咯核的3位被官能团取代的吡咯单体稀释于非取代单体的溶液中,这会在它们的电引发共聚(electrocopolymerisation)过程中通过将官能单元纳入链中来固定官能团。在第二步中,将抗-配体例如寡核苷酸、多核苷酸或肽化学偶联至前体聚合物的官能团上。由此获得的聚合物保留其导电性和电活性。因此,这些聚合物可用于通过测量电势差异或电流变化来检测与接枝于聚合物上的抗-配体特异性相互作用的分析物。W0-A1-00/77523还描述了抗-配体例如寡核苷酸在携带官能团的前体聚合物上的化学偶联。

[0072] 这还可以是一种通过电引发共聚将寡核苷酸直接固定于聚吡咯中的方法。将吡咯核的3位被寡核苷酸取代的吡咯单体稀释于非取代单体的溶液中,这会在它们的电引发共

聚过程中通过将官能单元纳入链中来直接固定寡核苷酸。

[0073] 在该电活性聚合物层上,经由双链核酸36的一条链的5'端将该双链核酸36与在其5'端携带有生物素分子38的互补链接枝,从而能够经由链霉亲和素分子44与还结合有生物素42的特异性结合配偶体40成键。图3A和3B中示出的特异性结合配偶体40为抗体。它可以是一种或者多种单克隆抗体或多克隆抗体。它还可以是抗体片段例如Fab片段或者Fab'2片段,以及通过基因修饰或重组获得的对特定微生物具有特异性的任意抗体。

[0074] 或者,所述特异性结合配偶体可以是噬菌体或者重组噬菌体蛋白,其与目标微生物特异性结合。这样的蛋白及其捕获细菌的用途描述于专利EP-B-1356080等中。

[0075] 应注意到,图3A和3B中所示结构仅仅是众多结构中的一个实例,绝不应理解为对本发明的限制。事实上,作为变化方案,可以想到在不使用双链核酸的情况下将抗-配体分子直接地固定在电极上。

[0076] 为了进行分析,使与均化袋连接的电化学传感器与分散的样品、培养基和电化学介质例如铁氰化物-亚铁氰化物对接触。在不存在微生物时,在电活性共轭聚合物和存在于反应介质中的所述氧化还原系统之间发生电子交换。这示于图3A。电子交换被转化成电流,并使用恒电位仪通过电化学阻抗谱法(electrochemical spectroscopy)测量,如下文所阐释。

[0077] 当样品含有微生物44时,它们被抗-配体分子40捕获。电极附近微生物的存在引起位阻,所述位阻破坏并削弱经电活性共轭聚合物修饰的电极和存在于反应介质中的所述氧化还原系统之间的电子流。随后通过阻抗测量来测量该修饰,并通过荷载转移电阻(load transfer resistance,在细菌被捕获(阳性结果)时,电阻值增加的电阻)对其进行表征。

[0078] 第一实施方案的分析结果测量系统图示于图4中。如该图所示,袋10通过其生物传感器18与恒电位仪50连接。该连接经由连接器52实现,连接器52与生物传感器18的连接区域182连接。由与恒电位仪50连接的电缆54延伸连接器52。恒电位仪自身与能够记录和分析阻抗测量数据的计算机系统56连接。

[0079] 为了检测微生物,优选地,均化袋10的孵育时长为使微生物生长所需要的尽可能长的时长。可以在25-45℃温度下的培养箱中以常规方式进行该孵育。取决于存在于样品中的微生物的初始量以及待检测微生物的类型,孵育时间可以为3-72小时。

[0080] 根据第一实施方案,可以在结束时进行阻抗测量。事实上,将均化袋孵育被认为是微生物生长所必需和足够的一段时间,然后将其从培养箱中取出并与上文描述的阻抗测量系统连接。然后进行阻抗测量,并将结果与参照阻抗值比较。这样的阻抗测量是可行的,前提是一个或者多个工作电极20涂覆有电活性共轭聚合物和/或待检测微生物的非特异性抗-配体分子。在这一个或者多个电极的阻抗测量结果形成参照阻抗值。只要检测电极(其上直接或者间接地固定有目标微生物的抗-配体分子的电极)上的阻抗值和参照值之间的差异大于阈值,则对微生物的检测是有效的。

[0081] 第二实施方案为点式方案,即在孵育期间通过进行点式阻抗测量(spot impedance measurement)。在这种情况下,将均化袋从培养箱中取出,并与阻抗测量系统连接,连接时间为测量所需时间,然后再孵育。两次测量之间的间隔可以是30秒至2分钟。该第二实施方案相对于第一实施方案的主要优点在于,其能够在较短的孵育时间之后检测微生物的存在。

[0082] 最后,在作为优选实施方案的第三实施方案中,在培养箱内具有用于连接生物传感器与阻抗测量系统的工具。所述工具可以是有线或无线连接系统。这样的实施方案特别有利,原因在于它使得能够以常规间隔在均化袋内进行测量,而无需对均化袋进行处理。并且,以常规间隔进行阻抗测量使得能够实时进行微生物检测。当与在进行检测时通知技术人员的计算机系统连接时,技术人员不再被随时间连续进行测量的工作流程所约束。仅当在袋中检测到微生物时才要求工作人员的介入。

[0083] 有线连接工具包括任何能够将两个电子装置相互连接从而能够进行数据输送的工具。具体而言,有线连接工具可以是串联系统(RS 485、RS 232规格)、USB连接系统(通用串行总线)、网络连接系统(Ethernet)、并联系统(GPIB)或任意其他等同工具。

[0084] 无线连接工具为无线电波发射器-接收器。例如,它可以是Wi-Fi(802.11b规格)、蓝牙(802.15规格)或ZigBee(802.15.4规格)系统。

[0085] 根据一个备选方案,数据采集工具可以是RFID(射频识别)读数器、Labjack卡或者本领域技术人员熟知的任意其他工具。

[0086] 根据本发明方法的一个备选方案,可经由光学检测工具进行检测。该检测工具可以独立于捕获支持物。例如,对于光学传感器例如照相机,情况就是如此。或者,光学检测工具和捕获支持物可以是一体的。例如,对于光纤(其末端用作捕获支持物),情况就是如此。

[0087] 这样的备选方案示于图7。如前所述,将密闭均化袋10与食品样品60共同孵育,此处的食品样品60由肉馅样品构成。将该食品样品60倒入补充有揭示系统的培养基62中。将以任意合适的方式在袋中固定就位的敏化的捕获支持物64同样放入均化袋10内,并浸渍在培养基62中。将敏化的捕获支持物64用至少一种对待检测的目标微生物具有特异性的结合配偶体官能化。捕获支持物可以由任意能够固定特异性结合配偶体的支持物构成,并为本领域技术人员所熟知。作为非限制性实例,合适的捕获支持物可由经辐照的聚苯乙烯制成,例如Nunc/Thermo Scientific公司的市售产品(货号472230)。这样的捕获支持物图示于图9,附图标记为64。有利地,根据一个优选实施方案,下部可被分为两部分。具有附图标记641的区域可用结合配偶体(多克隆抗体、单克隆抗体、Fab'片段或Fab'2片段、噬菌体蛋白)的溶液敏化,而上部642没有任何结合配偶体,因此用作阴性对照。

[0088] 将捕获支持物用至少一种特异性结合配偶体例如抗体、适体、噬菌体、重组噬菌体蛋白或者能够特异性捕获目标细菌的任意等价工具官能化。

[0089] 在培养基内所含的揭示系统的作用下,这些目标细菌可随其生长同时发生颜色改变。

[0090] 根据一个具体实施例,所述揭示系统基于微生物对TTC的还原。在生长的同时,TTC(非还原形式下为无色)由所述微生物内化,随后被该微生物还原成为三苯基-甲臍(红色),由此使所述微生物变成红色,并在支持物上揭示所述微生物。

[0091] 通过对敏化的捕获支持物的光学读解,在孵育期间自动地或者非自动地进行对食品样品中的微生物的直接的实时检测方法。孵育可以在25-44℃的温度下进行6-48小时。

[0092] 此外,一旦一定量的被染色微生物(在阳性样品的情况下)被有效捕获,则通过支持物上出现颜色变红而发生支持物光学性质的改变(即生物信号的转导)。随后可经肉眼检测或者通过使用读解机器例如照相机测量捕获支持物的这一颜色改变。给出阳性结果的分析之后的捕获支持物图示于图10。如所见,区域641因为目标微生物固定在特异性结合配偶

体上而显现出颜色变化。作为阴性对照的区域642保持捕获支持物的最初颜色。

[0093] 为方便读解,优选敏化的捕获支持物不再与培养基接触。为此,可以想到例如倾斜均化袋10,如图8所清楚示出。如上文所阐释,可在结束时间断地(on a spot basis)进行读解或者实时地进行读解。

[0094] 根据本发明方法的另一备选方案,捕获支持物由敏化颗粒(即携带有待测微生物的特异性或非特异性结合配偶体)构成。随后,优选地,通过在孵育期间经由与敏化颗粒结合的目标微生物而出现敏化颗粒的实时凝集而证实所述检测。这样的实施方案描述于文献WO-A-2009/122069中。

[0095] 根据一个具体实施方案,敏化颗粒可以是磁性颗粒。该实施方案在于,经由敏化磁性颗粒的凝集,在富集阶段直接检测食品样品中目标微生物(即大肠杆菌O157:H7)的存在。在孵育期间通过将用特异性结合配偶体(即抗大肠杆菌O157:H7重组噬菌体蛋白)敏化的磁性颗粒浸渍于含有稀释于培养基中的食品样品的密闭容器内来进行检测。

[0096] 在这一备选方案中,可能有利的是,在主容器(均化袋)内使用管式容器,从而改善对敏化颗粒的凝集的验证。如图11所示,除了培养基62和样品60外,均化袋10还含有试管66。该试管66经由导线管68与均化袋10内所含的培养基62液体连通。随后,可将一部分包含食品样品的培养基62转移到试管66内,在其中进行检测。基于完全气体定律($PV=nRT$),可显著地通过温度改变实现这样的转移。这样的方法描述于文献WO-A-2004/092401中。

[0097] 在使用磁性颗粒的情况下,使用磁性读数器,在孵育期结束时在含有反应介质的辅容器内进行读解。

[0098] 可通过先使用将凝集聚集在读解区域中心的磁场(经由磁铁)来放大磁信号。

[0099] 当在已捕获微生物的磁性颗粒集合在一起后,这一现象引发凝集物的形成时,磁场的应用还可以提高检测限。事实上,如果微生物的浓度不足以引发被动凝集,则磁性颗粒——其中有一些在先前已捕获了微生物——的集合在一起会强制凝集。另外,重复这一顺序(即磁化和重悬浮)还可以增强捕获和凝集形成现象,由此增强分析敏感性。

[0100] 下文给出的实施例旨在提供本发明方法的不同实施方案以及所获得的结果。它们绝非以任何方式限制本发明。

实施例

[0101] 实施例1:电化学生物传感器的分析电极的制备

[0102] 试剂:

[0103] 高氯酸锂(LiClO_4)、氯化钠(NaCl)、氢氧化钠(NaOH)、六氰合铁酸钾(III)($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)、六氰合铁酸钾(II)三水合物($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、Tween 20、磷酸盐缓冲液(BPS)、牛血清白蛋白(BSA)、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)、马来酸、鲑鱼DNA和50X Denhardt,购自Sigma-Aldrich。

[0104] 洗涤缓冲液pH 7.2,为PBS 0.01M、NaCl 0.5M和0.05%Tween。

[0105] 杂交缓冲液为PBS 0.01M、NaCl 0.5M、2X Denhardt和10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鲑鱼DNA。

[0106] 结合配偶体的接枝缓冲液为TRIS-MALEATE BSA缓冲液,pH 6.2,包含24.23g/L TRIS、23.2g/L马来酸、6g/L氢氧化钠和5g/L BSA。

[0107] 3-(2-羟乙基)吡咯或PyOH和3-(酞酰亚胺乙酸酯)吡咯(3-

(phthalimideethanoate)pyrrole)或者PyNHP由EZUS Lyon提供。

[0108] 含有20个核苷酸并在其5'端携带氨基的合成寡核苷酸通过取代NHP基团被共价固定。

[0109] 官能单体为:Pyr-5' TTTTTTTTTTGAATCCTCAGTTTTTCAACG^{3'}。

[0110] 互补核苷酸在5'端携带有生物素基团。其序列为:5'CGTTGAAAACTGAGGATTC^{3'}。

[0111] 生物传感器和电化学检测设备:

[0112] 使用Sciences Instruments的计算机控制的BioLogic恒电位仪进行电化学检测测量。

[0113] 所用传感器来源于印刷电路板(PCB)技术。电极上的金沉积是通过从金基浴(gold-based bath)中电解的电沉积。电极包含环氧树脂、铜、镍和金多层。

[0114] 电极的制备:

[0115] 为了洗涤电极,在超声浴中将传感器的分析区域浸渍于1:1蒸馏水/乙醇溶液中,持续一分钟。

[0116] 洗涤之后,将传感器清洁并进行电化学活化。为此,将一滴(30μL)蒸馏水中的0.2M NaOH沉积在传感器的分析区域上,从而将全部电极润湿。将传感器连接至恒电位仪,并通过计时电流法产生氧化和还原中的几轮电势跳变。这一步骤的目的是在电极界面形成氧气泡,从而消除任何有机和/或者无机污染物。然后用蒸馏水清洗传感器。

[0117] 通过共聚物电沉积修饰工作电极的表面。所有电极由此被一滴电引发聚合溶液覆盖,所述溶液为100mM的PyOH和25μM的PyODN(1/4000浓度比)和0.5M LiClO₄。然后,通过施加通过计时电流法产生的0.8V/金假参照的固定电势对反应进行电导。一旦强加电荷达到11mC/cm²,就中断聚合。在所有工作电极上同时形成共聚物。然后用蒸馏水冲洗电极。

[0118] 以下步骤为杂交。在100nM生物素化的目标ODN的存在下,将传感器用一滴(30μL)缓冲溶液覆盖。在37℃进行杂交30分钟。用PBS缓冲液洗涤,然后在搅拌下将传感器浸渍于PBS缓冲液中的100μg/mL链霉亲和素溶液中,持续15分钟。随后,通过使传感器与1μg/mL抗-配体分子在TRIS-马来酸盐BSA缓冲液中的溶液相接触,从而固定抗-配体分子。

[0119] 在以下实施例中,抗-配体分子是用于检测大肠杆菌0157的重组噬菌体蛋白,或是用于检测李斯特菌(*Listeria* spp)的Fab'片段。

[0120] 实施例2:食品样品中的大肠杆菌0157:H7的检测

[0121] 如上所述,将用对大肠杆菌0157具有特异性的重组噬菌体蛋白官能化并与均化袋连接的生物传感器与食品样品一起孵育。

[0122] 将两个含有生物传感器的袋与阳性富集制品(preparation)一起孵育。将两个含有生物传感器的袋与阴性富集制品一起孵育,并将两个含有生物传感器的袋与未污染富集制品一起孵育,以测量食品基质的背景噪音。

[0123] 阳性富集制品

[0124] 将25g含有最少(5%)脂肪物质的生肉以无菌方式放入具有过滤器的Stomacher®袋中,并使其与大肠杆菌0157:H7 ATCC 43888接触。将该袋在2-8℃放置24小时,以使菌株受应激。

[0125] 随后将225mL在41.5℃下预热24小时的经缓冲的胨水(bioMérieux ref.42043)和5mM的氧化还原探针[Fe(CN)₆]^{3-/4-}加入该样品中。

[0126] 大肠杆菌0157:H7在5mM氧化还原探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 存在下的生长在此前就被证实。已确认,存在该氧化还原探针并不减缓细菌培养基内的生长。

[0127] 将悬浮液匀化,然后将官能化的捕获支持物放入Stomacher®袋中。

[0128] 重复这一方案,以通过两个含有官能化的支持物的袋来测试两个阳性悬浮液。

[0129] 对两个阳性悬浮液的培养皿计数,使得能够评估在Stomacher®袋内孵育前的大肠杆菌0157:H7 ATCC 43888的平均浓度,其为0.92CFU/g生肉。

[0130] 然后将制品于41.5℃下孵育3小时。

[0131] 阴性富集物的制备

[0132] 阴性对照:将25g来自同一批次的生肉以无菌方式放入具有过滤器的Stomacher®袋中,并使其与蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)ATCC 27522接触。将该袋在2-8℃放置24小时,以使菌株受应激。

[0133] 随后将225mL在41.5℃下预热24小时的经缓冲的胨水(bioMérieux ref.42043)和5mM的氧化还原探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 加入该样品中。

[0134] 将悬浮液匀化,然后将官能化的捕获支持物放入该袋中。

[0135] 重复这一方案,以通过两个含有官能化的支持物的袋来测试两个阴性悬浮液。

[0136] 在这两个悬浮液中,在Stomacher®袋中孵育前的蜡样芽胞杆菌ATCC27522的污染率被评估为1.32CFU/g生肉(理论测量值)。

[0137] 然后将制品于41.5℃下孵育3小时。

[0138] 对由基质产生的背景噪声的测量:在没有细菌的情况下重复相同的方案。然后将制品于41.5℃下孵育6小时。

[0139] 这一测试的目的是验证是否能够在3小时的孵育/富集之后检测大肠杆菌0157:H7。

[0140] 所得结果:

[0141] 对于每个袋,在不进行洗涤生物传感器的步骤的情况下直接进行阻抗测量。

[0142] 于200mV、1Hz至100kHz频标下获得的Nyquist图($-\text{Im}(z)$ 对 $\text{Re}(z)$)示于图5。

[0143] 在无污染的情况下将生肉制品于Stomacher®袋中孵育6小时后获得的电化学阻抗谱和在阴性污染的情况下将生肉制品孵育3小时后获得的电化学阻抗谱显示出相同的电子转移电阻 R_{ct} (半圆直径),其值分别等于116kΩ和115kΩ。

[0144] 因此,电子转移电阻被归因为基质的背景噪声,其与在非目标细菌生长期间的电子转移电阻相同。

[0145] 在将有阳性污染(大肠杆菌0157:H7(0.92CFU/g生肉)所致)的生肉制品富集3小时之后,电子转移电阻值为719kΩ,即大约是有阴性污染时获得的值的六倍,因此使得能够明确地检测大肠杆菌0157:H7。

[0146] 所有均化袋获得的平均 R_{ct} 值、标准差和变异系数值列于下表1。所给数值是与阻抗信号的半圆直径对应的电荷电阻的总值。

[0147] 表1

[0148]

	基质背景噪音 (无污染)	阴性污染 蜡样芽胞杆菌(1.32 CFU/g)	阳性污染 大肠杆菌(0.92 CFU/g)
平均 R_{ct} (k Ω)	109	90	708
标准差	9	8	25
变异系数(%)	8	9	4
测量数	16	7	16

[0149] 实施例3:食品样品中的无害李斯特菌的检测

[0150] 如上所述,将用对李斯特菌具有特异性的Fab'片段官能化并与均化袋连接的生物传感器与食品样品一起孵育。

[0151] 将一个含有生物传感器的袋与阳性富集制品一起孵育。将一个含有生物传感器的袋与阴性富集制品一起孵育。

[0152] 阳性富集物的制备

[0153] 将25g含有最少(5%)脂肪物质的生肉以无菌方式放入具有过滤器的Stomacher®袋中,并使其与无害李斯特菌ATCC 33090接触。将该袋在2-8℃放置22小时,以使菌株受应激。

[0154] 随后将225mL在30℃下预热18小时的Listeria Xpress肉汤(bioMérieux ref.42626)和5mM的氧化还原探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 加入该样品中。[0155] 无害李斯特菌在5mM氧化还原探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 存在下的生长在此前就被证实。因此确认,存在该氧化还原探针并不抑制细菌在培养基内的生长。

[0156] 将悬浮液匀化,然后将两个官能化的捕获支持物放入Stomacher®袋中。

[0157] 对培养皿计数使得能够评估在Stomacher®袋内孵育前的无害李斯特菌ATCC 33090的浓度,其为0.48CFU/g生肉。

[0158] 然后将制品于30℃下孵育6小时。

[0159] 阴性富集物的制备

[0160] 阴性对照:将25g来自同一批次的生肉以无菌方式放入具有过滤器的Stomacher®袋中,并使其与金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)ATCC6538P接触。将该袋在2-8℃放置22小时。

[0161] 随后将225mL在30℃下预热18小时的Listeria Xpress肉汤(bioMérieuxref.42626)和5mM的氧化还原探针 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 加入该样品中。

[0162] 将悬浮液匀化,然后将两个捕获支持物放入Stomacher®袋中。在Stomacher®袋中孵育前,金黄色葡萄球菌ATCC 6538P的浓度为4.107CFU/g生肉(理论测量值)。

[0163] 然后将制品于30℃下孵育6小时。

[0164] 这一测试的目的是验证是否能够在6小时的孵育/富集之后检测李斯特菌属细菌。

[0165] 所得结果:

[0166] 对于每个袋,在不进行洗涤生物传感器的步骤的情况下直接进行阻抗测量。

[0167] 于200mV、1Hz至100kHz频标下获得的Nyquist图($-\text{Im}(z)$ 对 $\text{Re}(z)$)示于图6。[0168] 在有阴性污染(金黄色葡萄球菌,4.10⁷CFU/g)的情况下将生肉制品于均化袋中孵育6小时后获得的电化学阻抗谱(图6的虚线)显示,电子转移电阻值为13k Ω 。

[0169] 在将有阳性污染(无害李斯特菌ATCC 33090(孵育前为0.48CFU/g生肉))的生肉制

品富集6小时之后(图6中的实线),电子转移电阻值为45k Ω ,即大约是有阴性污染时获得的值的三倍。

[0170] 该结果清楚地表明,可在不进行洗涤传感器的步骤并且不进行信号放大的情况下,使用固定于与含有食物样品的富集介质接触的电化学生物传感器上的特异性Fab'片段检测所述样品中的无害李斯特菌的存在。

[0171] 所有均化袋获得的平均 R_{ct} 值、标准差和变异系数值列于下表2。所给数值是与阻抗信号的半圆直径对应的总电荷电阻值。

[0172] 表2

[0173]

	阴性污染 金黄色葡萄球菌(4.10^7 CFU/g)	阳性污染 无害李斯特菌(0.48 CFU/g)
平均 R_{ct} (k Ω)	15	45
标准差	1	8
变异系数(%)	5	17
测量数	16	12

[0174] 实施例4:用于光学检测的用至少一种对目标微生物具有特异性的结合配偶体敏化的捕获支持物的制作

[0175] 捕获支持物由经辐照的聚苯乙烯制成,由Nunc/Thermo Scientific公司销售(货号472230),并示于图9和10。

[0176] 捕获支持物的敏化分以下六步进行:

[0177] 1)将聚苯乙烯支持物在37 $^{\circ}$ C下浸渍于碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中的5 μ g/mL生物素化的BSA(牛血清白蛋白)溶液,持续一个晚上;

[0178] 2)然后用PBS缓冲液冲洗支持物,持续几秒钟;

[0179] 3)冲洗之后,将支持物在37 $^{\circ}$ C下浸渍于磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中的10 μ g/mL链霉亲和素溶液,持续两个小时;

[0180] 4)然后用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)冲洗该支持物,持续几秒钟;

[0181] 5)然后在37 $^{\circ}$ C下将该支持物浸渍于碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中的特异性结合配偶体溶液(1 μ g/mL至40 μ g/mL),持续两个小时;

[0182] 6)最后在37 $^{\circ}$ C下将该支持物在碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中的BSA溶液中钝化两小时。

[0183] 由此制作的敏化支持物可用于微生物的光学检测或者保持在2-8 $^{\circ}$ C备用。

[0184] 实施例5:通过使用敏化支持物对食品样品中的大肠杆菌0157:H7的光学检测

[0185] 该实验的目的是,通过在富集过程中使用敏化支持物(例如上文描述并示于图8的敏化支持物)来直接检测食品样品中目标细菌大肠杆菌0157:H7的存在。

[0186] 如下文详述,通过将用抗-大肠杆菌0157:H7重组噬菌体蛋白敏化的捕获支持物浸渍于含有在反应介质中稀释至1/10的食品样品的均化袋中,从而在孵育期间进行检测。

[0187] 方案:

[0188] 步骤1:样品在反应介质中的重悬浮

[0189] 如下制备四个样品:

[0190] • 样品A:在均化袋中,将25g被5个集落形成单位(CFU)的大肠杆菌0157:H7污染的肉馅重悬浮于225mL补充有0.01g/L万古霉素(Sigma,货号75423)和0.3g/L TTC(bioMérieux,Ref.04568088)的BPW(bioMérieux,Ref.42043)中;

[0191] • 样品B:在均化袋中,将25g未被大肠杆菌0157:H7污染的肉馅重悬浮于225mL补充有0.01g/L万古霉素和0.3g/L TTC的BPW中;

[0192] • 样品C:在均化袋中,将375g被5CFU大肠杆菌0157:H7污染的肉馅重悬浮于3375mL补充有0.01g/L万古霉素和0.3g/LTTC的BPW中;

[0193] • 样品D:在均化袋中,将375g未被大肠杆菌0157:H7污染的肉馅重悬浮于3375mL补充有0.01g/L万古霉素和0.3g/L TTC的BPW中;

[0194] 对每个样品进行三次分析。

[0195] 步骤2:在孵育前将敏化支持物浸于均化袋内

[0196] 将敏化的捕获支持物放置在每个Stomacher袋(样品A、B、C和D)中,如下文所述。然后,通过密封夹再次密封均化袋,并在培养箱中于41.5℃下孵育16-24小时。

[0197] 步骤3:在孵育期后读解捕获支持物

[0198] 在孵育(41.5℃,20小时)和随后的由存在于样品中的所有细菌(即属于附属菌群(annex flora)和目标菌群)对TTC的非特异性还原结束时,反应介质的颜色为红色。最后,为了能够观察揭示分析样品为阳性或者阴性的捕获支持物,将均化袋倾斜,以将所述捕获支持物与反应介质分离。

[0199] 根据实验计划,样品B和D是阳性,而样品A和C为阴性。用申请人市售的VIDAS® ECPT方法(编号30122)分析这些相同的样品,得到相似的结果,因此确认了通过光学读解敏化的捕获支持物所获得的结果。

[0200] 最后,对于20小时孵育后达到的目标水平,样品B为大约 $5.5 \log_{10}$ CFU/mL,而样品D为大约 $3.5 \log_{10}$ CFU/mL。

[0201] 实施例6:通过使用敏化支持物对环境样品中的李斯特菌属细菌的光学检测

[0202] 该实验的目的在于,通过在富集过程中使用敏化支持物来直接检测环境样品中属于李斯特菌属的菌株的存在。

[0203] 如下文详述,通过将用三种抗-李斯特菌属细菌的重组噬菌体蛋白敏化的如图10所示的捕获支持物浸渍于含有稀释于反应介质中的样品的密闭容器中,从而在孵育期间进行检测。

[0204] 方案:

[0205] 步骤1:样品在反应介质中的重悬浮

[0206] 如下文实施例详述地制备全部环境样品:

[0207] 将用于采集表面样品的海绵(8cmx3cm)分为两部分,按照如下进行处理:

[0208] 样品1:在一个容器(即药丸盒)中,将第一1/2海绵用5CFU的属于李斯特菌属的菌株人工污染,并重悬浮于45mL补充有0.1g/L TTC(bioMérieux,Ref.04568088)的LX培养基(bioMérieux,Ref.42635)中;

[0209] 样品2:在另一容器(即药丸盒)中,将未用属于李斯特菌属的菌株污染的另一半重悬浮于45mL补充有0.1g/L TTC(bioMérieux,Ref.04568088)的LX培养基(bioMérieux,Ref.42635)中。

[0210] 各样品与人工接种的菌株之间的联系在下表3中给出：

[0211] 表3

[0212]

样品编号	接种的菌株
样品A1	单核细胞增多性李斯特菌(<i>L.monocytogenes</i>)4b ATCC 19115
样品A2	N/A
样品B1	斯尔李斯特菌(<i>L.seeligeri</i>)NSB 22460
样品B2	N/A
样品C1	威氏李斯特菌(<i>L.welshimeri</i>)6a
样品C2	N/A

[0213] 步骤2: 孵育前敏化支持物在容器(药丸盒)内的浸渍

[0214] 将如图9和10所示的敏化支持物放置于各药丸盒中。为此,在药丸盒的盖子上挖一个孔,使得能够将敏化的捕获支持物64强行插入,直至分析区域(区域641和642)完全浸入培养基中。然后,将药丸盒用其塞子密封,并在培养箱中于30℃孵育24-48小时。

[0215] 步骤3: 孵育期结束时读解捕获支持物

[0216] 在孵育(30℃,24-48小时)和随后的由存在于样品中的所有细菌(即属于附属菌群和目标菌群)对TTC的非特异性还原结束时,反应介质的颜色为红色。同时为了能够观察揭示分析样品为阳性或者阴性的敏化的捕获支持物,将均化袋倾斜,以将样品与反应介质分离。还通过**VIDAS®LIS**(编号30700)方法对每个样品进行分析。

[0217] 所得结果列在下表4:

[0218] 表4

[0219]

样品编号	接种的菌株	光学生物传感器结果	VIDAS LIS 结果
样品 A1	单核细胞增多性李斯特菌 4b ATCC 19115	+	+
样品 A2	N/A	-	-
样品 B1	斯尔李斯特菌 NSB 22460	+	+
样品 B2	N/A	-	-
样品 C1	威氏李斯特菌 6a	+	+
样品 C2	N/A	-	-

[0220] 对于敏化的捕获支持物,捕获支持物的区域641变为红色,而区域642没有颜色变化,确凿地证明样品为阳性(见图10)。

[0221] 根据实验计划,1号样品为阳性,而2号样品为阴性。通过VIDAS LIS方法对这些样品的分析得到类似的结果,因此确认了通过光学读解敏化的捕获支持物获得的结果。

[0222] 实施例7: 由对目标微生物具有特异性的至少一种结合配偶体官能化(结合)的颗粒的制作

[0223] 对于该实施例,由直径为400nm的乳胶颗粒制作两种类型的结合物。

[0224] • 按照以下步骤,通过吸附特异性结合配偶体(抗-大肠杆菌0157:H7重组噬菌体蛋白)进行制备:

[0225] 1.通过离心在VERSOL水中洗涤乳胶颗粒(Plain Hidy blue, Polymer lab);

[0226] 2.在固体含量为0.5%的乳胶颗粒的存在下,在用搅拌轮搅拌下于环境温度吸附在磷酸盐缓冲液(pH 7)中的150 μ g/mL的特异性结合配偶体。

[0227] 吸附收率大于80%,因此在吸附之后不必洗涤乳胶颗粒。

[0228] • 按照以下步骤,通过偶联特异性结合配偶体(抗-0157重组噬菌体蛋白)进行制备:

[0229] 1.通过离心在versol水中洗涤乳胶颗粒(Carboxylic Hidy, Polymer lab);

[0230] 2.通过在37℃下于热混合器内以700rpm搅拌3小时,在固体含量为0.5%的乳胶颗粒的存在下,在20mM磷酸盐缓冲液(pH7)中将125 μ g/mL链霉亲和素与乙基-(N',N'-二甲氨基)丙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)偶联;

[0231] 3.通过以5000g离心20分钟来除去未偶联的链霉亲和素,并将剩余物回收入20mM Tris缓冲液(pH 7)中;

[0232] 4.加入150 μ g/mL生物素化的特异性结合配偶体(抗-大肠杆菌0157:H7的生物素化的重组噬菌体蛋白),并在用搅拌轮搅拌下于环境温度孵育3小时;

[0233] 5.通过以7000g离心十分钟类似除去过量的结合配偶体,并回收入20mM Tris缓冲液pH 7中。

[0234] 实施例8:通过敏化乳胶颗粒在液体介质中的凝集检测食品样品中的大肠杆菌0157:H7

[0235] 该实验的目的是,通过诸如上文中的实施例所描述的敏化蓝色乳胶颗粒的凝集,在富集期间直接检测食品样品中的目标细菌大肠杆菌0157:H7的存在。

[0236] 如下文详述,通过将用抗-大肠杆菌0157:H7重组噬菌体蛋白敏化的蓝色乳胶颗粒浸渍于含有稀释于富集介质中的食品样品的密闭容器中,从而在孵育期间进行检测。

[0237] 方案:

[0238] 步骤1:样品在富集介质中的重悬浮/稀释

[0239] 按照下述制备六个样品:

[0240] 样品A1:在均化袋中,将25mL被5CFU大肠杆菌0157:H7污染的巴氏灭菌奶稀释于225mL BPW(bioMérieux,ref.42043)中;

[0241] 样品A2:在均化袋中,将25mL未被大肠杆菌0157:H7污染的巴氏灭菌奶稀释于225mL BPW中;

[0242] 样品B1:在均化袋中,将25g被5CFU大肠杆菌0157:H7污染的鲑鱼肉重悬浮于225mL BPW中;

[0243] 样品B2:在均化袋中,将25g未被大肠杆菌0157:H7污染的鲑鱼肉重悬浮于225mL BPW中;

[0244] 样品C1:在均化袋中,将25g被5CFU大肠杆菌0157:H7污染的沙拉重悬浮于225mL BPW中;

[0245] 样品C2:在均化袋中,将25g未被大肠杆菌0157:H7污染的沙拉重悬浮于225mL BPW中;

[0246] 对每个样品重复三次。

[0247] 步骤2:将含有反应介质的试管插入均化袋中,然后孵育

[0248] 根据图11,然后将含有反应介质的试管加入均化袋中。反应介质包含100 μ L敏化的

蓝色乳胶颗粒和1.4mL补充有10mg/L万古霉素的BPW。

[0249] 然后用密封夹再次密封均化袋,并将均化袋放入程控培养箱中,进行三个阶段的孵育。事实上,将一份样品(0.5mL)从均化袋中转移到含有反应介质的试管内是根据文献WO-A-2004/092401中所述的方法进行的,其基于完全气体定律($pV=nRT$)。

[0250] 孵育期分为以下阶段:

[0251] 阶段1:于41.5℃孵育16小时;富集稀释于BPW中的25g样品,

[0252] 阶段2:于30℃孵育1小时;将0.5mL样品转移到含有反应介质的试管中,

[0253] 阶段3:于1.5℃孵育8小时;富集含有0.5mL小份样品的反应介质。

[0254] 根据实验计划,1号样品被确定为阳性,而2号样品被确定为阴性。通过VIDAS ECPT方法对这些样品的分析得到相似的结果,因此确认了通过敏化乳胶颗粒在液体介质中的凝集而获得的结果。

序列表

	<110>	生物梅里埃公司	
	<120>	直接检测和鉴别稀释于富集肉汤中的生物样品中的微生物的方法	
	<130>	TALKING BAG	
	<140>	PCT/FR2011/051624	
	<141>	2011-07-07	
	<150>	FR1055574	
	<151>	2010-07-08	
	<160>	2	
	<170>	PatentIn version 3.3	
[0001]	<210>	1	
	<211>	30	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Coding monomer	
	<400>	1	
		tttttttt gaatcctcag ttttcaacg	30
	<210>	2	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	COMPLEMENTARY MONOMER	
	<400>	2	
		cgttgaaaaa ctgaggattc	20

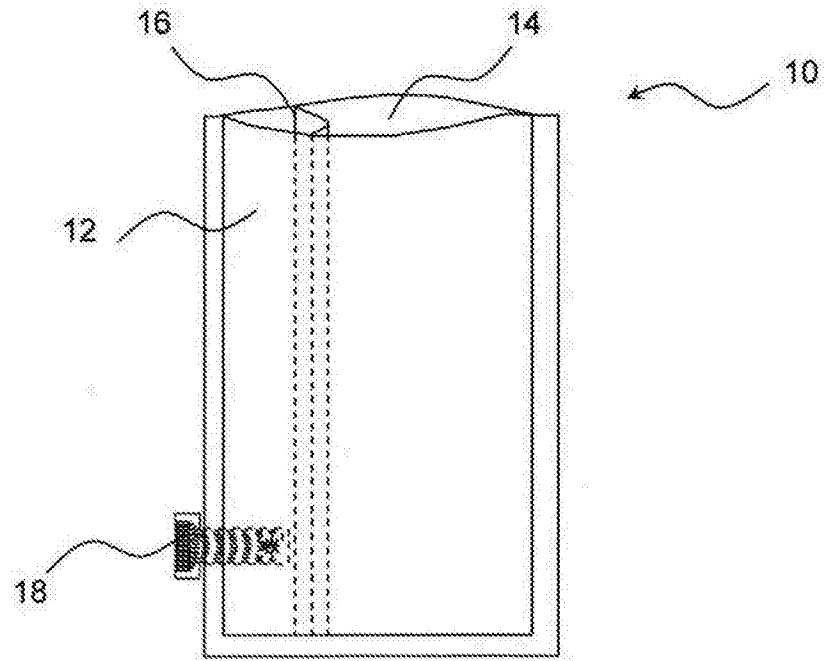


图1

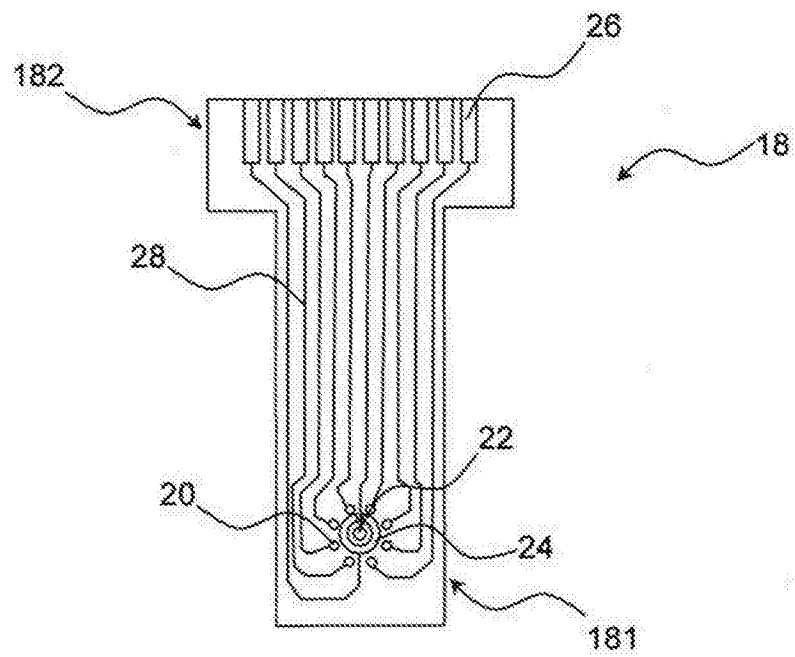


图2

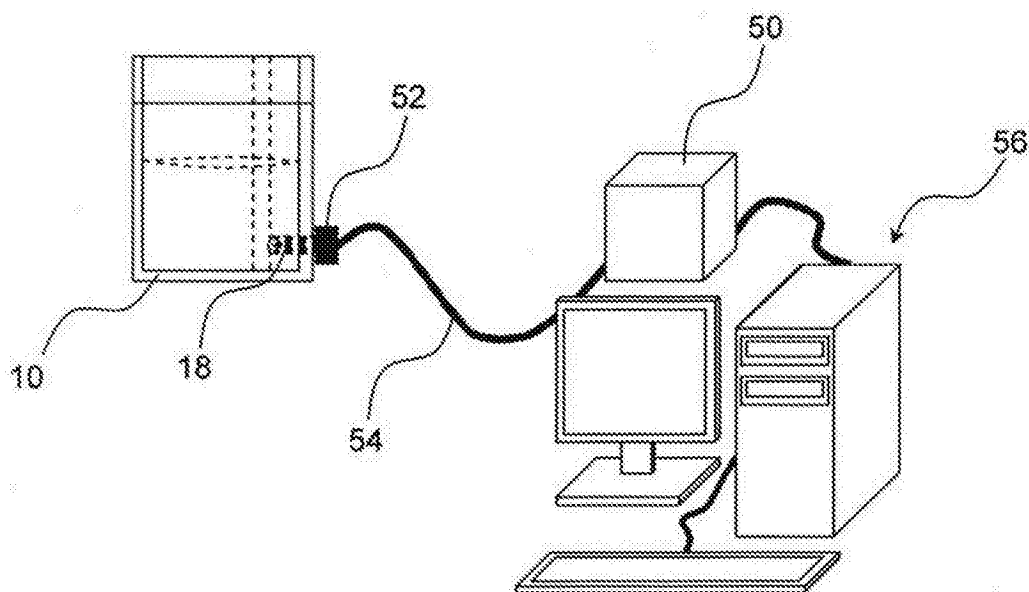


图4

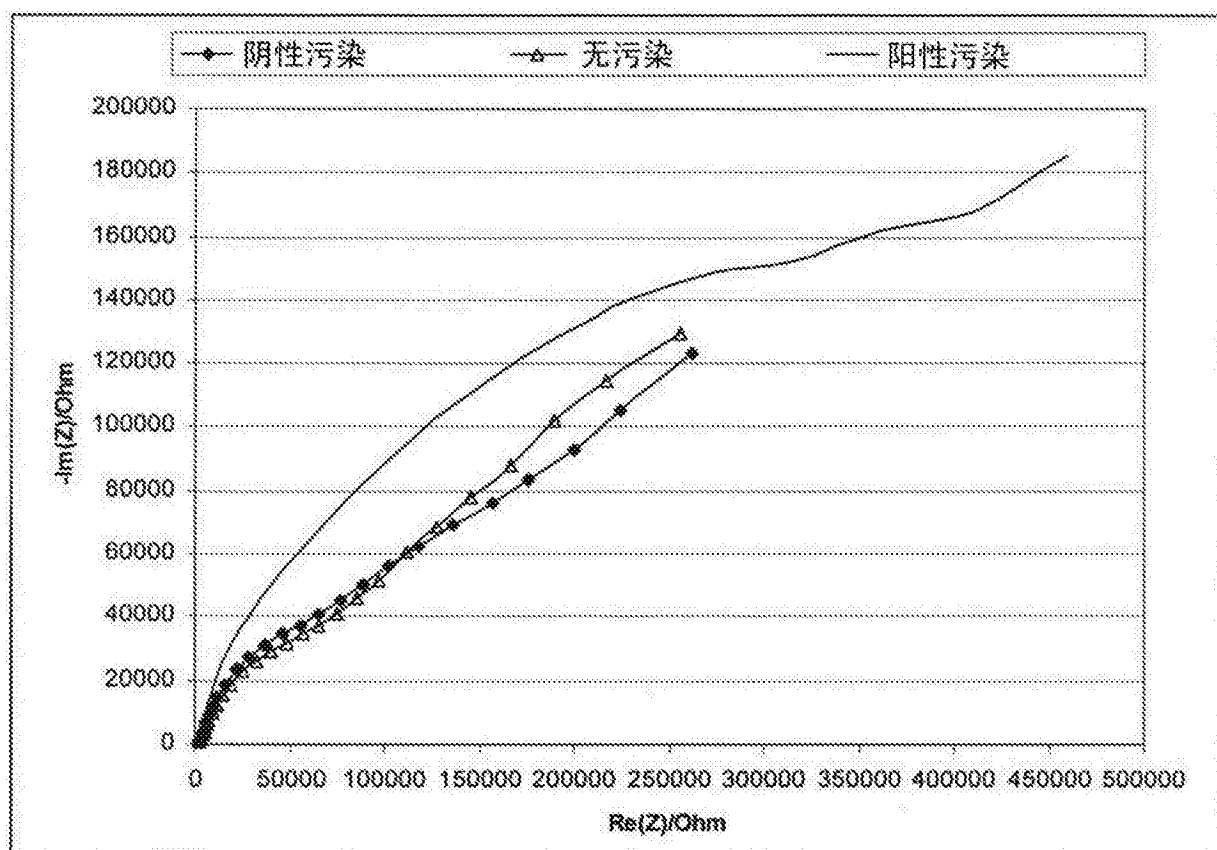


图5

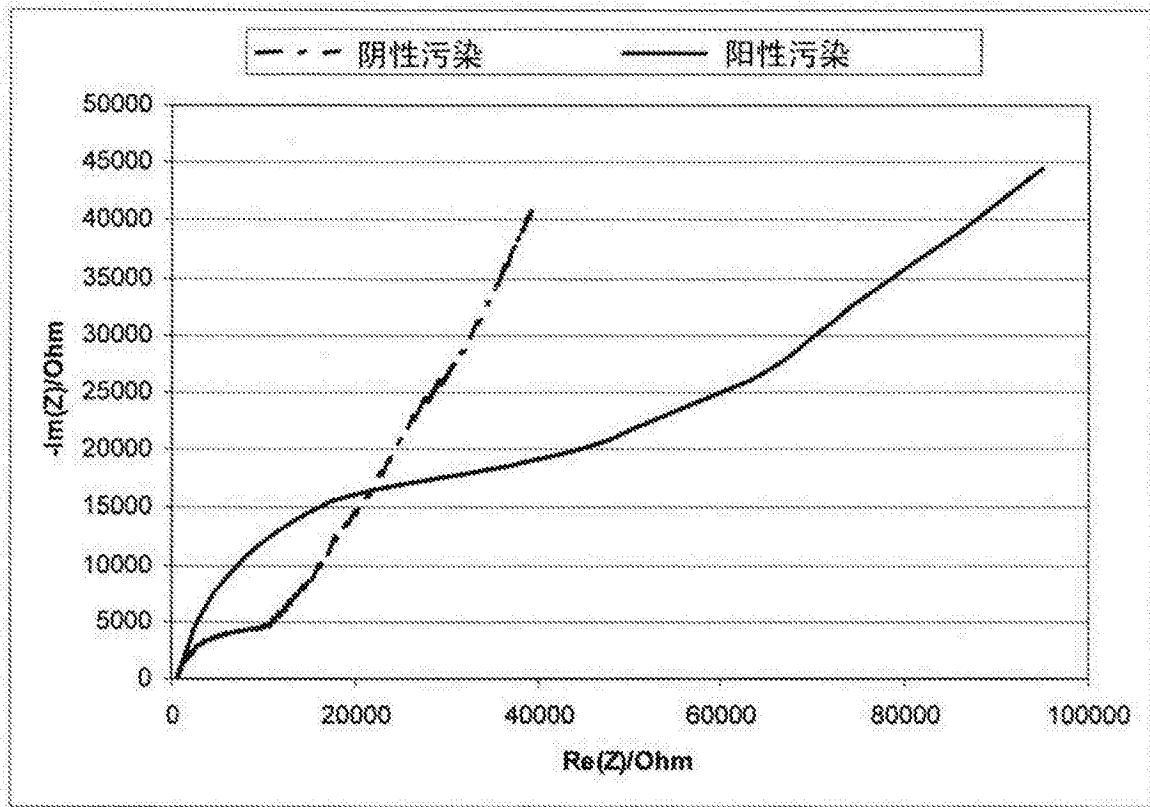


图6

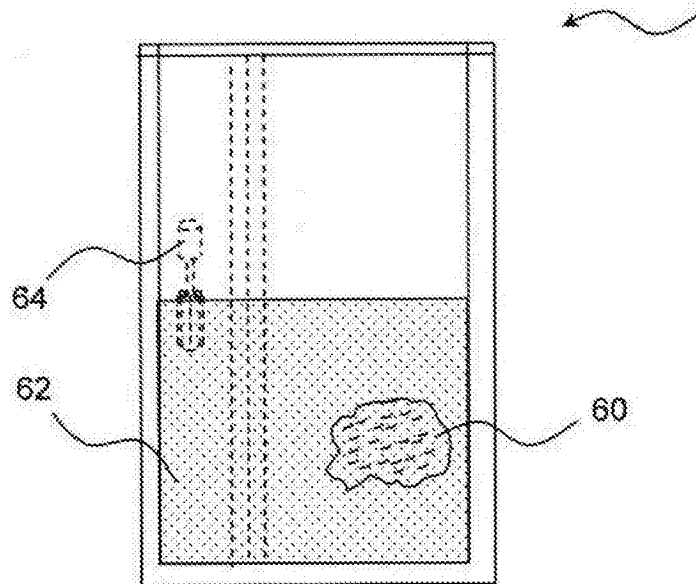


图7

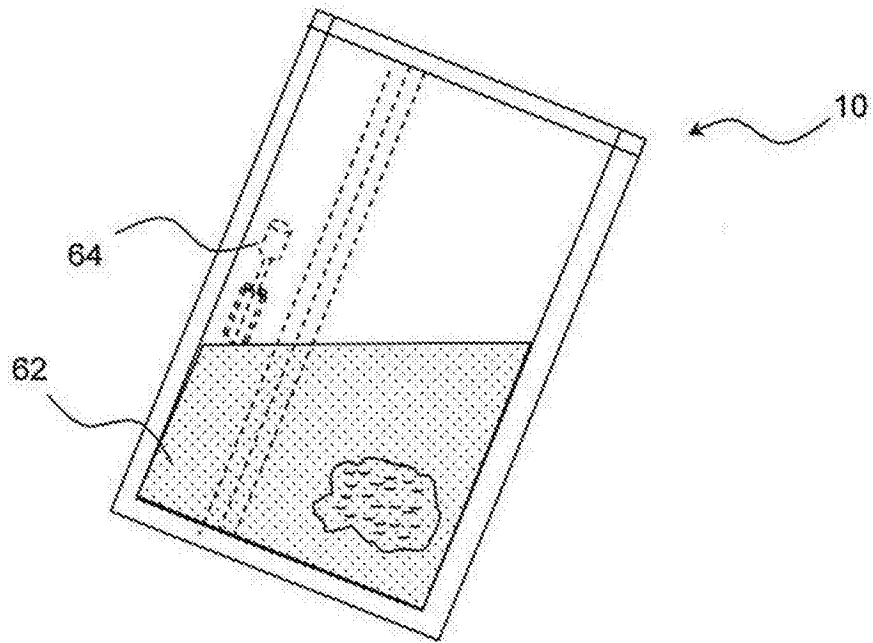


图8

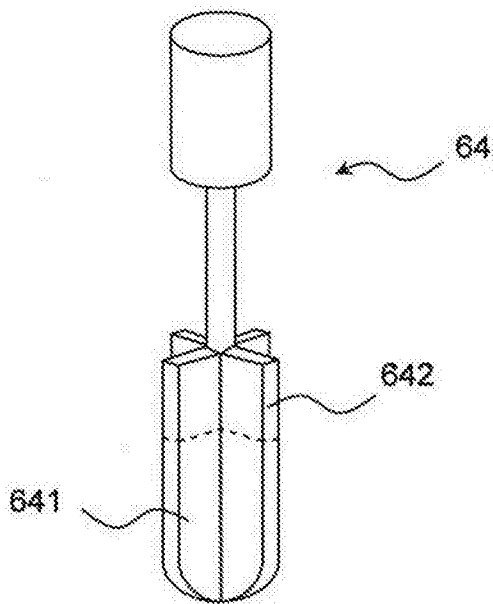


图9

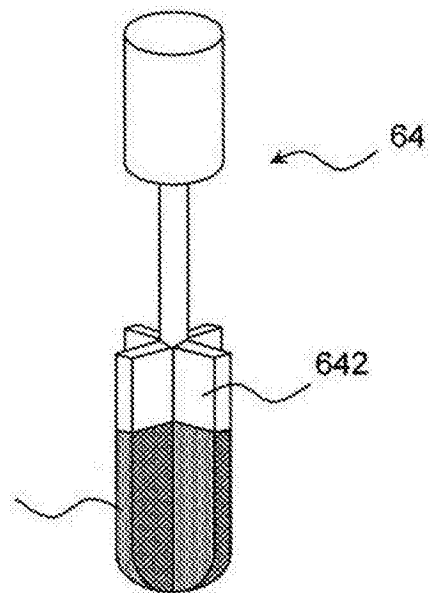


图10

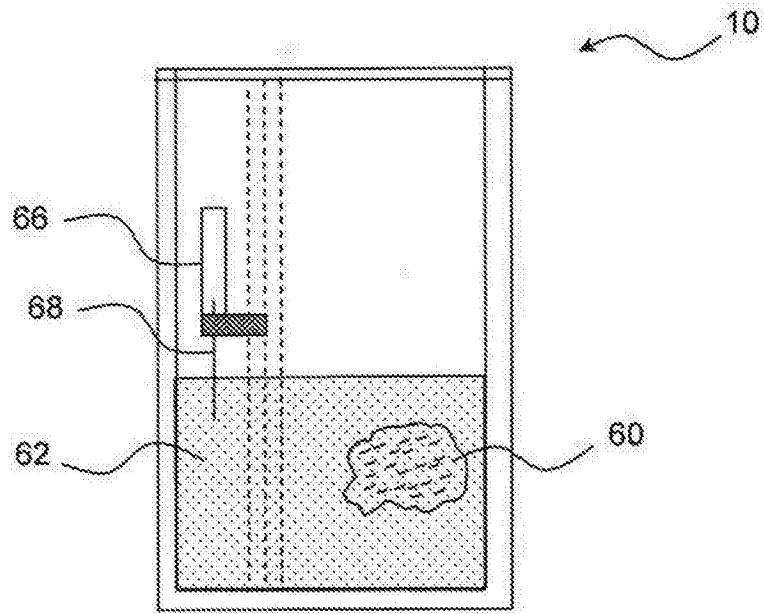


图11