



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104662425 B

(45)授权公告日 2017. 10. 10

(21)申请号 201380035736.6

(22)申请日 2013.05.02

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104662425 A

(43)申请公布日 2015.05.27

(30)优先权数据

61/641,805 2012.05.02 US

61/784,759 2013.03.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.04

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/039347 2013.05.02

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/166336 EN 2013.11.07

(73)专利权人 查尔斯河实验室公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 埃里克·斯廷普森

(74)专利代理机构 北京泛诚知识产权代理有限公司 11298

代理人 吴立 文琦

(51)Int.Cl.

C12Q 1/04(2006.01)

审查员 周洋

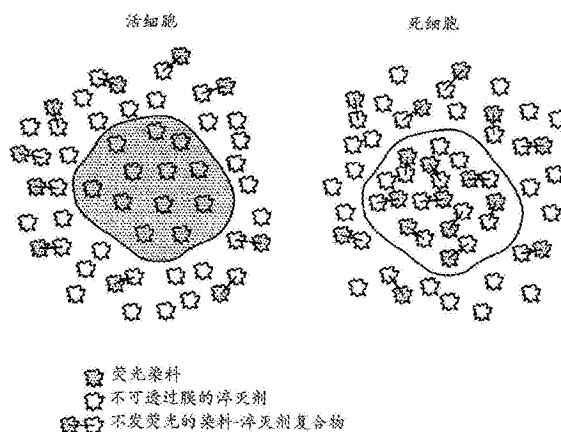
权利要求书3页 说明书41页 附图40页

(54)发明名称

活性染色方法

(57)摘要

本发明涉及一种使用可透过膜的渗透活细胞和非活细胞两者的荧光标记物以及不可透过膜的选择性地渗透非活细胞的淬灭剂来检测细胞样品中的活细胞的方法。



1. 一种检测样品中的活微生物的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 将所述样品中的如果存在的微生物(i)在允许可透过膜的结合核酸的荧光染料渗透活微生物与非活微生物两者的条件下,暴露于该荧光染料,并且(ii)在允许不可透过膜的结合核酸的荧光淬灭剂选择性地渗透非活微生物而不是活微生物的条件下,暴露于该淬灭剂,该淬灭剂能淬灭由所述荧光染料产生的荧光,其中所述荧光染料和所述荧光淬灭剂结合至所述非活微生物内的核酸形成基本上非荧光的复合物;

(b) 在步骤(a)之后,将所述微生物暴露于具有一波长的光,该波长能够激发所述荧光染料产生荧光发射;并且

(c) 用检测器对来自所述微生物的如果存在的荧光发射进行检测,其中,与在所述活微生物中的荧光染料相比,在所述非活微生物中的荧光染料发射显著更少的荧光,由此检测所述样品中的所述活微生物。

2. 一种检测样品中的活微生物的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 将所述样品中的如果存在的微生物(i)在允许可透过膜的结合核酸的荧光染料渗透活微生物与非活微生物两者的条件下,暴露于该荧光染料,并且(ii)在允许不可透过膜的结合核酸的荧光淬灭剂选择性地渗透非活微生物而不是活微生物的条件下,暴露于该淬灭剂,该淬灭剂能淬灭由所述荧光染料产生的荧光,其中所述荧光染料的发射光谱与所述荧光淬灭剂的吸收光谱重叠,使得当所述荧光染料和所述荧光淬灭剂两者结合至所述非活微生物内的核酸形成复合物时,所述复合物在暴露于具有能够激发所述荧光染料产生荧光发射的波长的光时是基本上非荧光的;

(b) 在步骤(a)之后,将所述微生物暴露于具有一波长的光,该光能够激发所述荧光染料产生荧光发射;并且

(c) 用检测器对来自所述微生物的如果存在的荧光发射进行检测,该检测器被配置为优先检测来自所述荧光染料的可检测发射而不是来自所述淬灭剂的可检测发射,从而使得来自所述淬灭剂的可检测发射如果产生的话不高于来自所述荧光染料的可检测发射的50%,其中,与所述活微生物相比,所述非活微生物发射由所述检测器检测到的显著更少的荧光,由此检测所述样品中的所述活微生物。

3. 如权利要求2所述的方法,其中,来自所述淬灭剂的可检测发射如果产生的话不高于来自所述荧光染料的可检测发射的30%。

4. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述淬灭剂在暴露于步骤(b)中的光时不发射可由所述检测器检测到的荧光事件。

5. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)中,所述微生物暴露于所述荧光染料并且然后暴露于所述荧光淬灭剂。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)中,所述微生物同时暴露于所述荧光染料和所述荧光淬灭剂。

7. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述荧光染料和所述荧光淬灭剂在所述微生物内与彼此结合。

8. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)期间,多种不同的荧光染料暴露于所述微生物。

9. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)期间,多种不同的荧光淬灭剂暴露于

所述微生物。

10. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述非活微生物在暴露于所述光时基本上不发射可由所述检测器检测到的荧光。

11. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述非活微生物在暴露于所述光时基本上不发射荧光。

12. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(b)期间,具有所述能够激发所述荧光染料的波长的所述光具有处于从350nm至1000nm范围内的波长。

13. 如权利要求12所述的方法,其中,所述波长至少在从350nm至600nm和从600nm至750nm的范围内。

14. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(c)中,所述荧光发射是在从350nm至1000nm波长范围内被检测到。

15. 如权利要求14所述的方法,其中,所述荧光发射是在选自以下的至少一个范围内被检测到:从350nm至450nm、从450nm至550nm、从550nm至650nm、从650nm至750nm、从750nm至850nm、以及从850nm至950nm。

16. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述微生物被捕获于多孔膜上。

17. 如权利要求16所述的方法,其中,所述多孔膜当暴露于具有处于从350nm至1000nm范围内的波长的光时基本上是非自发荧光的。

18. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述微生物布置于固体支撑物上。

19. 如权利要求18所述的方法,其中,所述固体支撑物是显微镜载玻片。

20. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述微生物布置于液体中。

21. 如权利要求20所述的方法,其中,所述微生物布置于光学池中。

22. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括将所述微生物暴露于第二种不同的可透过膜的荧光染料,该荧光染料对活微生物、非活微生物或活微生物与非活微生物的组合进行标记。

23. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括将所述样品中的所述微生物与多种荧光颗粒组合的步骤,所述荧光颗粒在由具有处于从350nm至1000nm的范围内的波长的光激活时发射荧光信号。

24. 如权利要求23所述的方法,该方法进一步包括对由所述荧光颗粒的一个或多个产生的荧光信号进行检测。

25. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括在所述样品的至少一部分中确定活微生物的数目的步骤。

26. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述样品是液体样品。

27. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括在步骤(c)后,在允许所述活微生物的生长和/或增殖的条件下对所述微生物进行培养。

28. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括对所述活微生物的属和/或种进行鉴定。

29. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)之前,在步骤(a)期间,或在步骤(a)之前和期间,在允许增殖的条件下对所述微生物进行培养。

30. 如权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤(a)之后但是在步骤(b)之前,在允许增

殖的条件下对所述微生物进行培养。

活性染色方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2012年5月2日提交的共同未决的美国临时专利申请号61/641,805和2013年3月14日提交的共同未决的美国临时专利申请号61/784,759的优先权和权益,将各申请的全部内容通过引用结合在此。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及检测细胞样品中的活细胞的系统和方法,并且特别涉及使用可透过膜的渗透活细胞和非活细胞两者的荧光标记物以及不可透过膜的选择性地渗透非活细胞的淬灭剂来检测细胞样品中的活细胞的系统和方法。

[0004] 背景

[0005] 例如由革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、以及真菌(例如酵母菌和霉菌)造成的微生物污染可以导致严重的疾病,并且在一些情况下甚至导致人类和动物受试者中的死亡。在某些产业例如食品、水、化妆品、制药、以及医疗器械产业中的生产商必须符合严格的标准验证他们的产品不包含一定水平的微生物污染物,否则会损害消费者或接受者的健康。这些产业需要针对微生物污染物的存在进行频繁的、准确的、和灵敏的测试,以符合某些标准,例如由美国食品与药品管理局或美国环境保护局规定的标准。

[0006] 取决于情况,区分活细胞与非活细胞的能力还可以是重要的。例如,在药物制剂和生物制剂的生产期间,重要的是在生产过程中使用的水是无菌的并且不含污染物。并且,重要的是在药物(例如,液体药物制剂和生物剂型,例如可注射的剂型)中包含的水以及例如经由非肠胃外途径给予至受试者的液体(例如,盐水)也是无菌的并且不含污染物。在另一方面,在饮用水中一些活微生物的存在可以被接受为直到达到一个点。为了适于饮用,饮用水必须符合严格标准。即使微生物可以存在于供水中,该水可依然对于人类消费来说是可接受的。然而,一旦细胞数超过一个阈值水平,该水可能不再被视为对人类消费是安全的。并且,在某些食物产品(例如,生鲜产品)和饮品(例如,牛奶)中某些预定水平的微生物的存在可以是可接受的。然而,一旦已经超过那些水平,食物或饮品可被视为已经变质并且对于人类消费不再是适当的和/或安全的。

[0007] 用于评估微生物污染的存在和/或微生物污染的程度的传统的细胞培养方法可以耗费几天来进行,这取决于测试针对的微生物。在此期间,存在怀疑的产品(例如,食物、饮品、或医疗产品)可以被检疫隔离,直至结果获得并且产品可以释放。因此,存在一种快速检测(例如,在数小时之内或更短)样品中的微生物污染物特别是活的微生物污染物的存在和/或量的系统和方法的需求。

[0008] 概述

[0009] 本发明部分地是基于可以用于选择性地标记包含细胞的样品中的活细胞(例如,原核细胞或真核细胞)的染色方法的发现。该染色方法可以与一种细胞捕获系统和/或光学检测系统组合使用以检测细胞样品中活细胞的存在。可替代地,该染色程序可以用于对布置于液体内和/或固体支撑物上(例如,在显微镜载玻片上,或培养皿、微量滴定板或吸收池

中)的活细胞进行染色。并且,该染色程序可以用于对溶液中的细胞进行荧光标记(例如,在流式细胞术之前)。该染色方案可以用于一种用以测量感兴趣的特定样品的生物负载(例如,用以测量一种样品中的活细胞(例如,活的微生物,如细菌、酵母菌、以及真菌)的数目和/或百分比和/或分数)的方法中。

[0010] 在一方面,本发明提供了检测细胞样品中的活细胞的方法。该方法包括将该细胞样品中的细胞(i)在允许一种可透过膜的荧光染料渗透活细胞与非活细胞两者的条件下,暴露于该荧光染料,并且(ii)在允许一种不可透过膜的荧光淬灭剂选择性地渗透非活细胞而不是活细胞的条件下,暴露于该淬灭剂,该淬灭剂能淬灭由该荧光染料产生的荧光。例如,该淬灭剂选择性地渗透非活细胞而不是活细胞。此后,该方法包括将细胞暴露于光,例如一束具有一个波长的能够激发荧光染料产生荧光发射的光,并且用一个检测器对来自细胞的荧光发射(如果有的话)进行检测,由此检测细胞样品中的活细胞。在选择的检测条件下,与活细胞内的荧光染料相比,在非活细胞内的荧光染料发射显著更少的荧光。因此,与活细胞相比,非活细胞发射显著更少的荧光。

[0011] 在某些情况下,例如,当淬灭剂能够产生荧光发射时,激发光的波长可以被选择为对该淬灭剂不进行光激发或基本上不进行光激发。可替代地,这种或这些检测器可以被选择和/或配置为优先检测来自染料发射事件而非来自淬灭剂的发射事件。

[0012] 在另一方面,本发明提供了检测细胞样品中的活细胞的方法。该方法包括将该细胞样品中的细胞(i)在允许一种可透过膜的荧光染料渗透活细胞与非活细胞两者的条件下,暴露于该荧光染料,并且(ii)在允许一种不可透过膜的荧光淬灭剂选择性地渗透非活细胞而不是活细胞的条件下,暴露于该淬灭剂,该淬灭剂能淬灭由该荧光染料产生的荧光。此后,这些细胞暴露于具有一个波长的光,该波长能够激发荧光染料产生荧光发射。用一种检测器对来自细胞的荧光发射(如果有的话)进行检测,这些检测器被配置为优先检测来自荧光染料的可检测发射而不是来自淬灭剂的可检测发射,从而使得来自淬灭剂的可检测发射(如果产生的话)不高于来自荧光染料的可检测发射的50%(例如,不高于40%、不高于30%、不高于20%、不高于10%)。在采用的检测条件下,与活细胞相比,非活细胞发射由检测器检测到的显著更少的荧光。因此,该方法可以用于检测细胞样品中的活细胞。

[0013] 在某些实施例中,在暴露于光时,非活细胞不发射或基本上不发射可由检测器检测的荧光。在某些实施例中,在暴露于用于激发荧光染料的光时,非活细胞不发射或基本上不发射荧光。

[0014] 在前述方面和实施例的每一个中,取决于正被检测的细胞和希望的灵敏度,可能的是将细胞暴露于多种不同荧光染料和/或多种不同荧光淬灭剂中。并且,取决于待使用的染料和淬灭剂、以及待检测的细胞,可以将这些细胞暴露于荧光染料中并且然后暴露于荧光淬灭剂中。可替代地,可以同时将这些细胞暴露于荧光染料和荧光淬灭剂中。在某些方法中,可以希望的是通过在采用用以激发荧光染料的光进行照射之前对这些细胞进行洗涤来减少任意的背景荧光。在其他方法中,后续的洗涤步骤是不必要的,并且洗涤步骤如果采用的话可以通过经由扩散到细胞外面而从活细胞去除荧光染料。

[0015] 检测方法可以在单一的细胞、细胞簇或细胞集落上进行。在某些情况下,例如,为了增加测定的灵敏度,可以希望的是在将细胞暴露于荧光染料和荧光淬灭剂之前和/或期间和/或之后,在允许细胞增殖的条件下培养细胞。包括生长培养基、温度、培养持续时间的

选择的培养条件可以被选择为允许样品中的至少一种细胞具有一次或多次细胞分裂。

[0016] 在前述方面和实施例的每一个中,荧光染料和/或荧光淬灭剂结合至细胞内的细胞组分或细胞器,例如,核酸。在其他实施例中,荧光染料和荧光淬灭剂在细胞中与彼此结合。

[0017] 在前述方面和实施例的每一个中,用于激发该荧光染料或这些荧光染料的该束光具有在以下的范围内的波长:从大约350nm至大约1000nm、从大约350nm至大约900nm、从大约350nm至大约800nm、从大约350nm至大约700nm、或从大约350nm至大约600nm。例如,激发光的波长是至少处于以下的一个范围内:从大约350nm至大约500nm、从大约350nm至大约550nm、从大约350nm至大约600nm、从大约400nm至大约550nm、从大约400nm至大约600nm、从大约400nm至大约650nm、从大约450nm至大约600nm、从大约450nm至大约650nm、从大约450nm至大约700nm、从大约500nm至大约650nm、从大约500nm至大约700nm、从大约500nm至大约750nm、从大约550nm至大约700nm、从大约550nm至大约750nm、从大约550nm至大约800nm、从大约600nm至大约750nm、从大约600nm至大约800nm、从大约600nm至大约850nm、从大约650nm至大约800nm、从大约650nm至大约850nm、从大约650nm至大约900nm、从大约700nm至大约850nm、从大约700nm至大约900nm、从大约700nm至大约950nm、从大约750nm至大约900nm、从大约750nm至大约950nm或从大约750nm至大约1000nm。某些范围包括从大约350nm至大约600nm以及从大约600nm至大约750nm。

[0018] 取决于采用的一种或多种荧光标记物,光学检测器可以检测处于以下范围内的发射光:从大约350nm至大约1000nm、从大约350nm至大约900nm、从大约350nm至大约800nm、从大约350nm至大约700nm、或从大约350nm至大约600nm。例如,可以检测处于以下范围内的荧光发射:从大约350nm至550nm、从大约450nm至大约650nm、从大约550nm至大约750nm、从大约650nm至大约850nm、或从大约750nm至大约950nm、从大约350nm至大约450nm、从大约450nm至大约550nm、从大约550nm至大约650nm、从大约650nm至大约750nm、从大约750nm至大约850nm、从大约850nm至大约950nm、从大约350nm至大约400nm、从大约400nm至大约450nm、从大约450nm至大约500nm、从大约500nm至大约550nm、从大约550nm至大约600nm、从大约600nm至大约650nm、从大约650nm至700nm、从大约700nm至大约750nm、从大约750nm至大约800nm、从大约800nm至大约850nm、从大约850nm至大约900nm、从大约900nm至大约950nm、或从大约950nm至大约1000nm。在某些实施例中,检测到处于以下范围的发射光:从大约660nm至大约690nm、从大约690nm至大约720nm、和/或从大约720nm至大约850nm。

[0019] 在前述方面和实施例的每一个中,这些细胞被捕获在多孔膜上,例如,在此所述的细胞捕获系统的多孔膜上。该多孔膜当暴露于具有一个处于从大约350nm至大约1000nm范围内的波长的光时可以基本上是非自发荧光的。在某些其他实施例中,这些细胞被布置于固体支撑物例如显微镜载玻片上。在某些其他实施例中,这些细胞被布置在液体样品中,该液体样品可以存在于光学池例如流动池或毛细管中。

[0020] 在前述方面和实施例的每一个中,该方法可以进一步包括将细胞暴露于第二不同的可透过膜的活细胞、非活细胞或活细胞与非活细胞组合进行标记的荧光染料。

[0021] 此外,在前述方面和实施例的每一个中,有可能包括用于检测系统的阳性对照。因此,该方法可以进一步包括将包含这些细胞的样品或流体中的这些细胞与多种颗粒例如荧光颗粒进行组合中,这些颗粒在被一束具有从大约350nm至大约1000nm范围内(例如,上文

结合针对一种或多种荧光染料的激发光讨论的波长范围)的波长的光激活时发射荧光信号。此后,由荧光颗粒中的一个或多个产生的荧光信号可以在由检测系统检测到任何活细胞的同时得以检测到。

[0022] 使用在此所述的染色方案,可能的是确定细胞样品(例如液体样品)的至少一部分中的活细胞的数目。液体样品可以是例如水样、可食用流体(例如,葡萄酒、啤酒、牛奶、婴幼儿配方奶粉或类似物)、体液(例如,血液、淋巴液、尿液、脑脊髓液或类似物)、生长培养基、通过从感兴趣来源收获细胞(例如,经由棉签)并进而分散和/或悬浮收获的细胞(如果有的话)于液体样品(例如,缓冲液或生长培养基)中而产生的液体样品。

[0023] 取决于所要求的灵敏度,这些细胞一旦已经被捕获于在此所述的膜上即可以在微生物生长培养基和/或孢子萌发引发剂的存在下暴露于活性染色系统。此后,这些细胞可以生长15分钟至若干小时,例如从15分钟至8小时、或30分钟至4小时(这将取决于感兴趣生物的倍增时间),以允许进行检测步骤之前使这些生物原位增殖。在这些条件下,这些细胞具有更多的时间被暴露于在此所述的活性染色系统并且被其标记。

[0024] 并且,在检测步骤之后,活细胞(例如,当布置于捕获膜上时)可以在允许活细胞生长和/或增殖的条件下得以培养。此后,活细胞的属和/或种可以通过标准程序(例如,微生物染色和可视化程序)或分子生物学程序(例如,扩增程序,包括聚合酶链式反应、连接酶链式反应、滚环复制等)以及核酸测序来确定。

[0025] 附图简要说明

[0026] 在附图中,遍及不同的视图,类似的参考字符通常指代相同的部分。另外,这些附图不一定是按比例,相反,大体上应将注意力放在说明本发明的原理上。在以下说明书中,本发明的不同实施例参考以下附图进行描述,其中:

[0027] 图1A是示例性检测系统的示意性图示,该检测系统可以用于在细胞样品中确定活细胞的存在和/或量;

[0028] 图1B是具有处于闭合位置的门的示例性检测系统的示意性透视图;

[0029] 图1C是图1B的其中门处于开放位置的示例性检测系统的示意性透视图;

[0030] 图1D是图1B的其中触摸屏处于凸起位置的示例性检测系统的示意性透视图;

[0031] 图2A是示例性膜组件的示意性俯视图;

[0032] 图2B是图2A的膜组件的示意性分解侧视图。

[0033] 图3A和3B是示例性膜组件的示意性图示;

[0034] 图4A是具有可渗透膜和流体可渗透支撑构件的示例性膜组件的示意性分解透视图;

[0035] 图4B是图4A的示例性可渗透膜组件的示意性侧视图;

[0036] 图5A是示例性细胞捕获杯和相应的基座的示意性透视图;

[0037] 图5B是示出膜组件的图5A的杯和基座的示意性部分剖视图;

[0038] 图5C是图5B的杯、基座、和膜组件处于未组装状态的示意性透视图;

[0039] 图5D是图5A的基座的示意性透视图;

[0040] 图5E是图5B的具有来自单独固持件的不同膜固持件组件和柱的杯和基座的示意性部分横截面视图;

[0041] 图6A-6D分别是具有盖、杯、膜、以及基座的杯组件的示意性透视图、侧视图、俯视

图以及仰视图；

[0042] 图6E是图6A的盖的示意性透视的仰视图；

[0043] 图6F是图6A的盖的示意性侧视图；

[0044] 图7A-7D分别是图6A的杯组件中显示的杯构件的示意性透视图、侧视图、俯视图以及仰视图；

[0045] 图8A-8D分别是图6A的杯组件的基座的示意性透视图、俯视图、仰视图以及侧视图；

[0046] 图9A是图8A的基座的示意性透视图，示出了膜和下部的可渗透支撑构件的部分剖视图；

[0047] 图9B-9D是图9A的基座(完整的膜和下面的可渗透支撑构件)的示意性俯视图、仰视图以及侧视图；

[0048] 图10A是图6A的杯组件的示意性分解透视图；

[0049] 图10B是图6A的杯组件的示意性横截面视图，而没有膜和可渗透支撑构件；

[0050] 图10C是图9A的基座的示意性横截面视图，具有膜、可渗透支撑构件以及基座盖；

[0051] 图11A描绘了用于在可渗透膜上捕获细胞的方法；

[0052] 图11B描绘了卡盘、平台、基座、支撑构件、膜、以及基座盖部件的示意性分解透视图；

[0053] 图12A是示例性荧光染料的发射(斜线,以荧光强度(IF)为单位)与示例性淬灭剂的吸收光谱(实线,以吸光度或光密度值(O.D.)为单位)之间的光谱重叠的示意性图示；

[0054] 图12B-12C是显示在示例性荧光染料与示例性淬灭剂的发射光谱之间的部分重叠的示意性图示,证实了用于选择供此处讨论的细胞活性测定使用的染料-淬灭剂对的两个途径；

[0055] 图13A是用于图1A的系统中的示例性膜固持件的示意性分解横截面侧视图；

[0056] 图13B是用于图13A的膜固持件(平台)的磁体配置的示意图；

[0057] 图13C是图13A的具有膜组件和卡盘的膜固持件(平台)的示意性分解透视图；

[0058] 图13D是图13C的膜固持件、膜组件以及卡盘处于组装配置的示意性透视图；

[0059] 图14A-14C分别是示例性平台的示意性透视图、俯视图、以及仰视图；

[0060] 图15A-15D分别是示例性卡盘的示意性透视图、俯视图、仰视图、以及侧视图；

[0061] 图16A是用于接收一个基座的示例性膜固持件(平台)的示意性透视图；

[0062] 图16B是用于图16A的膜固持件的示例性基座的示意性透视图；

[0063] 图16C是图16A的示例性膜固持件以及图16B的基座处于未组装配置的示意性透视图；

[0064] 图16D是图16A的示例性膜固持件以及图16B的基座处于组装配置的示意性透视图,示出了从膜固持件延伸并且通过由基座限定的操作处的柱；

[0065] 图17A是活的(存活的)和非活的(死的)细胞在用可透过膜的荧光染料以及不可透过膜的淬灭剂染色之后的示意性图示,该染料渗透活细胞和非活细胞两者,而该淬灭剂选择性地渗透非活细胞；

[0066] 图17B是活的(存活的)和非活的(死的)细胞在用可透过膜的结合核酸的荧光染料以及不可透过膜的结合核酸的淬灭剂染色之后的示意性图示,该染料渗透活细胞和非活细

胞两者,而该淬灭剂选择性地渗透非活细胞;

[0067] 图18是示出了用图17A或17B中所示的示例性活性染色系统染色的活细胞和非活细胞的可渗透膜的区域示意性图示;

[0068] 图19A和19B分别是活细胞和非活细胞的图形展示,其中在每个图中描绘了阳性对照珠粒;

[0069] 图20A和20B分别描绘了使用示例性活性染色系统针对活细胞和非活细胞的相位对比和荧光图像;

[0070] 图21A和21B分别是使用示例性活性染色系统针对活细胞和非活细胞的相位对比和荧光图像;

[0071] 22是在可渗透膜上捕获的活细胞(大肠杆菌和白色念珠菌)的图像,这些活细胞用示例性活性染色系统染色并且使用图1A所示的检测系统被检测为在旋转圆盘上的荧光事件;

[0072] 图23A-J是活微生物和非活微生物的混合群体的相位对比和荧光图像,这些微生物用示例性的结合核酸的荧光染料和结合核酸的荧光淬灭剂对染色;并且

[0073] 图24A-E是活微生物和非活微生物的混合群体的相位对比和荧光图像,这些微生物用示例性的结合核酸的荧光染料和结合核酸的荧光淬灭剂对染色,其中使用落射荧光显微镜(epifluorescent microscope)对这些细胞进行成像(图24A-D,其中相位对比图片显示于图24A和C中,并且相应的荧光图片分别显示于图24B和D中),或使用图1A所示的检测系统对这些细胞进行成像。

[0074] 说明书

[0075] 本发明针对细胞捕获系统、在细胞捕获系统中捕获细胞(包括活细胞)的方法、选择性地对活细胞(例如,被捕获在细胞捕获系统中的活细胞)进行染色的方法,并且针对用于在细胞样品(例如,液体样品)中确定活细胞的存在和/或量的方法。细胞捕获系统和不同的方法可以单独或组合使用,以确定包含细胞的样品中的活细胞的存在和/或量,特别是可以用于确定感兴趣的特性样品的生物负载(例如,确定样品中的活细胞的数目和/或百分比和/或分数)。细胞捕获系统和不同的方法可以用于测量液体样品(例如,水样)、可食用流体(例如,葡萄酒、啤酒、牛奶、婴幼儿配方奶粉或类似物)、体液(例如,血液、淋巴液、尿液、脑脊髓液或类似物)、生长培养基、通过从感兴趣来源收获细胞(例如,经由棉签)并进而分散和/或悬浮收获的细胞(如果有的话)于液体(例如,缓冲液或生长培养基)中而产生的液体样品中的细胞的生物负载。

[0076] 应考虑到,通过使用在此所述的装置和方法,将可能的是在小于大约2个小时内、小于大约1个小时内、或甚至小于大约30分钟内,在已经将细胞收获于细胞捕获系统的多孔膜上之后,确定在样品中的活细胞的存在和/或量。然而,应考虑到取决于希望的灵敏度,可能的是将捕获在多孔膜上的细胞进行培养(例如,持续15分钟至几个小时)以允许细胞增殖。即使如此,通过使用在此所述的装置和方法,甚至当包括培养步骤时,可能的是比本领域中可获得的其他技术更快速地确定样品中的活细胞的存在和/或量。

[0077] 本发明的各不同方法和某些实施例将在下文详细讨论。

[0078] (I) 细胞捕获系统

[0079] 在此描述的细胞捕获系统可以用于检测活细胞存在的光学检测系统中。这些结果

可以用于测量感兴趣的特定样品的生物负载(例如,用于测量样品中的活细胞的数目和/或百分比和/或分数)。在以下文件中描述了示例性检测系统,例如2010年11月3日提交的国际专利申请号PCT/IB 2010/054965,2011年2月24日提交的美国专利申请序列号13/034,402,2010年11月3日提交的国际专利申请号PCT/IB2010/054966,2011年2月24日提交的美国专利申请序列号13/034,380,2010年11月3日提交的国际专利申请号PCT/IB 2010/054967,以及2011年2月24日提交的美国专利申请序列号13/034,515。如图1A中示意性示出的示例性系统100的一个实施例,包括样品组件120,该样品组件包括(i)旋转平台130,其上有多孔膜,该多孔膜上有细胞布置于其上,该多孔膜围绕一个旋转轴140旋转,以及(ii)相对于一个检测系统170直线平移的可移动平台150(参见轨道160),该检测系统包括光源180(例如,白光光源或激光光源(例如近红外激光))以及至少一个检测器190(例如荧光检测器)。来自光源180的一束光(激发光)冲击旋转平台130以及布置于其上的平面膜,同时通过检测器190检测发射光。光源180和检测器190可以按照相对于平台130的相似的角度安排,因为该束光将以基本上相同的角度冲击并离开平台130。在某些情况下,检测系统由单一检测器组成,这种检测器检测单一的波长范围(参见图12B)或多重波长范围。可替代地,该检测系统由多重检测器组成,它们各自能够检测不同的波长范围。

[0080] 图1B-1D描绘了具有外壳110和显示器(例如,触摸屏)112的示例性细胞检测器系统100。该外壳110的大小被确定为容纳旋转平台130,该旋转平台可以通过该外壳110上的门114进出。外壳110可以制造为多种形状和大小,包括描绘的矩形棱柱形式,大约为10in.x 10in.x 12in.(l x w x h)。其他形状可以是立方体、圆柱、球体、或其他棱柱等等。虽然大小取决于形状而有所不同,依比例该外壳110的范围可以是几英寸至几英尺,并且取决于应用可能更小或更大。图1B描绘了其中门114处于闭合配置的细胞检测系统,并且图1C描绘了其中门114处于开放配置的相同系统,以显示平台130。触摸屏112提供了用于控制系统100的操作的用户界面,并且可以显示关于系统100的当前操作参数的信息。触摸屏112可以调节至一个更垂直的位置中(如图1D中所描绘),以便有助于更容易的操作。在某些实施例中,触摸屏112仅当处于垂直位置中时是活跃的。在其他实施例中,触摸屏112常常是活跃的,或仅仅在选择时间处(例如,当由用户接合时)是活跃的。

[0081] 应理解,当细胞布置于固体支持物上或以其他方式维持在具有以下平面度公差的范围的平面方位中时,此类检测系统最优地运行:例如在多达大约100 μm ($\pm 50\mu\text{m}$),例如,多达大约10 μm ($\pm 5\mu\text{m}$)、多达大约20 μm ($\pm 10\mu\text{m}$)、多达大约30 μm ($\pm 15\mu\text{m}$)、多达大约40 μm ($\pm 20\mu\text{m}$)、多达大约50 μm ($\pm 25\mu\text{m}$)、多达大约60 μm ($\pm 30\mu\text{m}$)、多达大约70 μm ($\pm 35\mu\text{m}$)、多达大约80 μm ($\pm 40\mu\text{m}$)、多达大约90 μm ($\pm 45\mu\text{m}$)的平面度公差以内,从而使得这些细胞可以通过检测系统在窄的焦平面内易于可视化。如果采用动态聚焦系统,应考虑到大于100 μm 的平面度公差是可以容忍的。因此,可以优选的是使用一种支撑系统,该支撑系统将该膜和任何捕获的细胞维持为一个基本上呈平面的方位内并且在适当严格的平面度公差内以允许可靠的检测。取决于检测系统和检测后的要求,支撑系统可以被适配为,在将包含溶液的细胞经由布置于固体支撑物内的孔通过固体支撑物后,细胞已经被捕获在固体支撑物上之后,当干燥时和/或当湿润或有水分时呈现和/或维持膜的平面性。

[0082] 本发明提供了一种细胞捕获系统,包括一种流体可渗透的平面膜,该平面膜包括暴露的第一表面,该第一表面的至少一部分被适配为将细胞保留在其上。该部分可以:(i)

限定具有一个平均直径的多个孔,该平均直径小于大约 $1\mu\text{m}$ 从而允许流体穿过该膜的该部分同时将细胞保留在其上;(ii)在暴露于具有波长范围为从大约 350nm 至大约 1000nm 的光时是基本上非自发荧光的;并且(iii)具有高达大约 $100\mu\text{m}$ 的平面度公差。该细胞捕获系统100可任选地进一步包括一个登记器(register)(例如,线、点、或其他标记,标戳或结构特征),该登记器与该膜关联从而允许对保留在该平面膜的至少一部分上的细胞(例如,活细胞)的位置进行确定。对于圆盘形膜,极坐标(即,径向“r”,以及角度“ θ ”坐标定位)可以是适合的。

[0083] 该膜可以具有多种形状的任何一种,例如,圆形、环形、卵形、方形、矩形、椭圆形等,并且可以使一侧的一些部分或全部暴露以用于细胞截留。并且,该膜可以在其中形成一个或多个孔以适应一个掩罩,并且可以从若干分离的与该掩罩或其他结构元件组装在一起的膜形成。在一个实施例中,该膜可以处于圆盘的形状,例如基本上呈平面的圆盘。在某些实施例中,该多孔膜的用于捕获细胞和/或颗粒的部分大于 400mm^2 、 500mm^2 、 600mm^2 、 700mm^2 、 800mm^2 、 900mm^2 或 $1,000\text{mm}^2$ 。该膜(例如,处于圆盘形式)可以具有一个处于选自下组的范围内的厚度,该组由以下各项组成:大约从 $1\mu\text{m}$ 至 $3,000\mu\text{m}$ 、从 $10\mu\text{m}$ 至 $2,000\mu\text{m}$ 、以及从 $100\mu\text{m}$ 至 $1,000\mu\text{m}$ 。

[0084] 在某些实施例中,该细胞捕获系统100进一步包括一个流体可渗透支撑构件,该构件与该膜的第二相对表面的至少一部分相邻近。例如处于光滑平面多孔塑料熔块形式的流体可渗透支撑物保留足够的流体以将水分保留在布置于该可渗透支撑物邻近处的多孔膜内,在某些实施例中这对维持保留在多孔膜上的细胞的活性而言可以是重要的。该支撑构件可以具有一个处于选自下组的范围内的厚度,该组由以下各项组成:大约从 0.1mm 至 10mm 、从 0.5mm 至 5mm 、以及从 1mm 至 3mm 。

[0085] 在某些实施例中,该细胞捕获系统100进一步包括一个掩罩,该掩罩与该膜的该第一表面的至少另一部分相贴近。取决于设计配置(例如,当多孔膜是圆盘时),该掩罩可以是圆形或环形的,可任选具有径向辐条或支撑物。

[0086] 该多孔膜限定具有一个平均直径的多个孔,该平均直径小于大约 $1\mu\text{m}$ 从而允许流体穿过该膜同时将细胞保留在其上。在某些实施例中,该平均孔径是大约或小于大约 $0.9\mu\text{m}$ 、 $0.8\mu\text{m}$ 、 $0.7\mu\text{m}$ 、 $0.6\mu\text{m}$ 、 $0.5\mu\text{m}$ 、 $0.4\mu\text{m}$ 、 $0.3\mu\text{m}$ 、 $0.2\mu\text{m}$ 、 $0.1\mu\text{m}$ 、或 $0.05\mu\text{m}$ 。在某些实施例中,该平均孔径是大约 $0.2\mu\text{m}$,并且在其他实施例中,该平均孔径是大约 $0.4\mu\text{m}$ 。适合的膜可以由尼龙、硝酸纤维素、聚碳酸酯、聚丙烯酸、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚酯、聚砜、聚四氟乙烯(PTFE)、聚乙烯和氧化铝制成。

[0087] 此外,该多孔膜当暴露于具有一个处于从大约 350nm 至大约 $1,000\text{nm}$ 范围内的波长的光时基本上是非自发荧光的。如在此参考多孔膜使用的,术语“当暴露于一束具有处于从大约 350nm 至大约 $1,000\text{nm}$ 范围内的波长的光时基本上是非自发荧光的”应理解为意指,当被一束具有一个足以导致从细胞或颗粒进行荧光发射的波长、通量(flucose)及辐照度的光照射时,与布置于该多孔膜上的荧光标记的细胞或荧光颗粒相比,该多孔膜发射更少的荧光。应理解,用户和/或检测器应该能够容易地且可靠地将荧光颗粒或荧光标记的细胞引起的荧光事件与从多孔膜散发的背景荧光区分开来。该多孔膜被选择为使得有可能检测或可视化布置于这种多孔膜上的荧光颗粒或荧光标记的细胞。在某些实施例中,当在相同条件下例如使用具有相同波长、通量和/或辐照度的一束光进行测量时,从被一束光照射的多

孔膜的一个区域(例如,具有与正被可视化的细胞或细胞集落或颗粒大致相同的表面积的区域)发射的荧光可以不大于从荧光颗粒或荧光标记的细胞发射的荧光的大约30%(例如,小于30%、小于27.5%、小于25%、小于22.5%、小于20%、小于17.5%、小于15%、小于12.5%、小于10%、小于7.5%、小于5%、或小于2.5%)。

[0088] 适合的非自发荧光的膜可以由一种膜,例如一种浸渍有碳黑或喷有惰性金属(例如但不限于金、锡或钛)的尼龙、硝酸纤维素、聚碳酸酯、聚丙烯酸、聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)、聚酯、聚砜、聚四氟乙烯(PTFE)或聚乙烯膜制成。具有适当孔大小的基本上是非自发荧光的膜包括例如Isopore膜(默克密理博)、核孔径迹蚀刻膜(Nucleopore Track-Etch membrane)(沃特曼)、ipBLACK径迹蚀刻膜(ipBLACK Track Etched Membrane)(由宾夕法尼亚州(PA)匹兹堡(Pittsburgh)的AR布朗(Brown)分布)、以及聚碳酸酯(PCTE)膜(Sterlitech)。

[0089] 为了协助捕获细胞的准确检测和计数评估,有益的是(甚至在一些情况下是至关重要的,取决于检测系统的配置和能力)该膜在细胞检测期间基本上是平面的(例如,基本上无皱)。如在此使用的,术语“基本上呈平面的”被理解为意指具有小于大约100 μm 的平面度公差物品。这是因为高度上的缺陷(例如,褶皱)可以干扰光学检测/测量系统,导致错误的结果。因此,对于多孔膜可以重要的是,当干燥和/或湿润时并且取决于检测条件,该多孔膜保持在检测系统的检测能力之内的相对严格的平面度公差。下文描述的不同的方法允许在将来自样品流体的细胞捕获在该多孔膜上后多孔膜保持为基本上是平的,并且基于在此的讨论本领域的技术人员对于其他方法可以是清楚的。

[0090] 在某些实施例中,细胞捕获系统包括多种可检测颗粒,例如荧光颗粒。该荧光颗粒可以被适配为由一束具有至少处于以下范围内的波长的光激发:从大约350nm至大约1000nm的波长、从大约350nm至大约600nm范围内的波长、从大约600nm至大约750nm范围内的波长、或以上讨论的波长范围的任一个。这些颗粒可以用作阳性对照的部分,以确保细胞捕获系统、细胞捕获方法、检测系统、以及检测活细胞的方法中的一个或多个得以正确地运行。

[0091] 取决于细胞捕获系统的设计,这些颗粒(例如,荧光颗粒)可以被预先布置于该多孔膜的至少一部分上或布置在掩罩中形成的一个孔之内。可替代地,在将样品通过该多孔膜之前,可以将这些颗粒(例如,荧光颗粒)与液体样品进行混合。在这种方法中,可以在一个添加有感兴趣样品的容器中对荧光颗粒进行干燥。此后,这些颗粒可以重悬浮和/或分散于该液体样品之内。可替代地,这些荧光颗粒可以存在于第二溶液中,该第二溶液与感兴趣的液体样品混合。此后,这些颗粒可以分散于该液体样品之内。

[0092] 图2A示出一个示例性膜组件200,该膜组件包括多孔平面膜202和一个框架(或掩罩)204,以将多孔膜202保持为基本上是平的,即不允许其中形成显著的褶皱。如所示,框架204包括中心部分204a,该中心部分经由多个辐条(例如,拉伸辐条)204c连接至外轮缘204b的圆周部分。指示的辐条之一204c'可以比其他辐条204c更厚,并且代表一个登记器,从其可以测量布置于该膜上的细胞的坐标(例如, r 、 θ 值),其中 r 是测量的距离旋转轴的径向距离,并且 θ 是在(i)横跨旋转点和细胞的径线与(ii)登记器204c'之间的夹角。

[0093] 膜202包括具有一个平均直径的多个孔,该平均直径为大约或小于大约1 μm ,例如大约或小于大约0.9 μm 、0.8 μm 、0.7 μm 、0.6 μm 、0.5 μm 、0.4 μm 、0.3 μm 、0.2 μm 、0.1 μm 、或0.05 μm 。

这样,当包含细胞和/或颗粒的液体流体接触膜202时,该流体可以经由这些孔穿过该膜,同时将细胞和/或颗粒保留在膜202的表面上。在暴露于具有波长范围为从大约350nm至大约1000nm的光时该膜202是基本上非自发荧光的。并且,该膜202具有光滑的表面,当该表面被限制或配置为用于由关联的检测系统检测时,该表面具有不大于大约100 μ m的平面度公差。

[0094] 如在图2B中所示,膜202具有第一表面214和与该第一表面相对的第二表面216。第一表面214可以附着至框架204,例如经由粘附性粘结层218。中心部分204a可以附着至膜202的中心部分。在所示实施例中,膜202的直径与外轮缘204b的直径大约相同,并且因此外轮缘204b附着至膜202的周界。辐条204c径向地从中心部分204a延伸,并且可以附着至膜202。这种配置可以将膜202保持为基本上是平的,防止或最小化褶皱的形成。另外,褶皱的形成还可以通过在中心部分204a上施加向下的压力来减轻或消除,这个压力增加了膜202中的表面张力。

[0095] 在另一个方法中,如在图3A中所描绘的,圆形膜组件300包括具有上表面304的多孔膜202。附着至表面304的中心部分的圆形掩罩306将膜202保持为基本上是平的。在膜组件300中,流体样品中的细胞(如果其中有任何存在的话)被捕获在由掩罩306覆盖的表面304的暴露部分上。膜组件300可以布置在流体可渗透多孔支撑构件上,如下文所述,该支撑构件可以在检测期间维持膜的希望的平面度。可替代地或另外地,为了将膜202保持为基本上是平的,可以向掩罩306施加向下的压力。适用于掩罩306的材料包括塑料、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚丙烯、以及具有斥水特性的其他材料。

[0096] 图3B描绘了类似于图3A中所示膜组件300的膜组件310。掩罩316类似于掩罩306,但掩罩316具有允许用户用手指或镊子拿起组件310(包括膜202)的突出物或突嘴318,并且将组件310转移至另一个位置,例如在膜固持件上。掩罩316的顶面还限定了一个孔320,该孔可以充当一个登记器,使得在膜202的表面304上检测到的颗粒或细胞的位置可以参照孔320的位置来描述。可替代地或另外地,有待检测的对照颗粒可以最初布置于孔320中。在某些其他实施例中,该掩罩可以包括突出物或孔任一者,但不是二者。

[0097] 在另一个方法中,如图4A和4B所描绘的,通过将多孔膜202放置于流体可渗透的固体支撑构件404上,可以将该多孔膜202布置于膜组件400中以将该多孔膜202维持为基本上平面的配置,而不需要针对框架204或掩罩306或316维持这种配置。在一个实施例中,当该多孔膜202湿润时,在膜202与固体支撑构件404之间的表面张力使得膜202的底面贴合至支撑构件404的配合上表面406。例如,在一个实施例中,该支撑构件404可以是一种流体可渗透的固体的基本上是平面的元件,它将膜202保持为基本上平面的配置,例如,当该膜湿润时。支撑构件404是多孔的,并且配合上表面406是基本上平且光滑的。在另一个实施例中,固体支撑构件404被非毒性粘合剂包覆,例如聚异丁烯、聚丁烯、丁基橡胶、苯乙烯嵌段共聚物、硅酮橡胶、丙烯酸共聚物、或它们的某些组合。当例如从一个真空施加向下的压力时,该多孔膜202变成松散地粘附至固体支撑构件404,这导致多孔膜贴合至固体支撑构件404的表面406。支撑构件404是多孔的,并且配合上表面406是基本上平且光滑的。例如,在一个实施例中,该表面406具有高达大约100 μ m的平面度公差。该支撑构件404的直径大致与膜202的直径相同,并且优选地该支撑构件404具有基本上均一的厚度。该支撑构件可以具有一个处于选自下组的范围内的厚度,该组由以下各项组成:大约从0.1mm至10mm、从0.5mm至5mm、以及从1mm至3mm。适合用于制造该多孔支撑构件404的材料包括塑料、聚碳酸酯、高密度聚

乙烯 (HDPE)、玻璃、以及金属。在一个实施例中,该支撑构件404是通过对保持在接近颗粒熔点的温度下以及足以导致颗粒烧结以便将它们融合在一起并且形成均一结构的压力下的塑料颗粒进行烧结而制成,这些塑料颗粒是由聚(甲基丙烯酸甲酯)制成,具有0.15-0.2mm的平均直径。

[0098] 虽然膜202和支撑构件404描绘为圆形,但这仅是说明性的。在其他实施例中,膜202和/或支撑构件404可以成形为方形、矩形、椭圆形等。总体上,如果使用的话,支撑构件的形状和表面积被选择为使得支撑构件的表面的大小大致与其上布置的膜的大小相同或略小。

[0099] 膜202被布置为与支撑构件404的基本上平的光滑表面406接触,之后样品流体被倾倒在膜202上。大体上平的表面406有助于在样品流体排出后将膜202保持为基本上是平的。流体可渗透的固体支撑物404还可以充当用于穿过膜202和流体可渗透固体支撑物404的流体的储器,从而提供防止膜202和布置于其上的活细胞在检测过程中干燥的额外益处。干燥可不利于保留在膜202上的细胞的活性。

[0100] 参照图5A-5E,具有一个杯502和一个基座504的杯-基座组件500用于协助将在液体样品中存在的细胞捕获在布置于基座504内的膜(例如,膜202)上。基座504具有表面506(参见,图5D)、外壁508、以及唇缘510。表面506限定了至少一个开口512以及可任选的圆形径向突出物或凹槽514,以协助液体穿过膜202的排放。壁508具有在唇缘510下的周向凹槽516。在某些实施例中(参见图5D),杯502包括一个壁520,该壁具有周向突出物522,这些突出物被适配为与基座凹槽516配合以可释放地将杯502与基座504互锁。壁520的唇缘节段524,即在突出物522之下的节段,向内倾斜以形成被适配为接触多孔膜202的上表面的周向密封唇缘。唇缘节段524还将多孔膜202(并且在某些实施例中,框架200和/或支撑构件404)捕获在杯520与基座504之间。

[0101] 更通常地,膜和用于将该膜保持为大体上平的任何组件,例如具有辐条的固持件(参考图2A和2B描述)、掩罩(参考图3A和3B描述)、和/或支撑构件(参考图4A和4B描述)可以被接收在杯-基座组件500内,并且被布置在基座504的表面506上。杯502进而被布置于膜组件上,以使得壁突出物522装配入基底504的凹槽516中,如图5E所描绘。这个装配有助于确保在杯502与基座504之间的合适定位,特别是关于在其间包含的膜202而言。节段524的大小(例如,长度、倾斜角等)被选择为使得该节段524抵靠布置于基座504中的膜组件400按压,以提供流体密封并且确保平膜202。

[0102] 图6A-6D描绘了杯-基座组件550的另一个实施例。杯-基座组件550具有杯552和基底554,在许多方面它们的功能类似于杯502和基座504。该杯-基座组件550还可以可任选地包含盖556,以便在使用前后将杯552的内部保持为受到保护免受污染物。支撑构件558(例如,支撑物404)布置于基座554中,以用于支撑膜202(描绘于图9A和9B中)。在描绘的实施例中,盖556基本上是圆形的,以与杯552互相装配,虽然任何互补形状可以是合适的。盖556被更详细地显示于图6E和6F中,包括脊560,该脊提供了在杯552的顶部与盖556的顶部的底面之间的小的偏移。

[0103] 图7A-7D更详细地描绘了杯552。杯552包括上部562,该上部基本上是中空的并且向外朝着顶部逐渐锥形化,从而提供可以倾倒流体于其中的增加的截面积。另外,锥形化将流体引导为朝向下节段564,该下节段被适配为被接收在基座554中。当杯552布置于基座

554中时,垂直段566可以提供增加的稳定性,一个唇缘节段568(类似于唇缘节段524)以一个角度从该垂直段延伸。另一个垂直节段570还被设置为用于接触膜202。

[0104] 图8A-8D描绘了基座554。基座554包括限定一个上部574的外壁572,该外壁可以捕获外部流体。下部576被适配为接收在一个平台内(下文详细地描述),并且可以被锥形化为当安装于其上时提供紧密抵压。内壁578限定了用于接收杯552并且更具体而言为垂直段566的一个中心凹陷580。当杯552安装于基座554上时,在垂直段566与内壁578之间的紧密配合和重叠有助于确保稳定的装配。用于接收膜202的壁架582位于内壁578的底部,并且进一步将凹陷584限定于中间以接收支撑构件558。基座554、膜202、以及支撑构件558的关系描绘于图9A-9D中,连同可任选的盖588(透明地描绘于图9A中)。开口586可以设置在基座554的底部中,类似于开口512。

[0105] 在某些实施例中,细胞捕获系统,特别是多孔膜,具有低于 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、或 10^{-9} 的无菌保证水平。这可以例如经由高压灭菌法、暴露于电离辐射(例如, γ 辐射)或暴露于灭菌流体或气体(例如,氧化乙烯或汽化的过氧化氢)通过对细胞捕获系统进行灭菌来实现。在灭菌之前、期间、或之后,可以将该细胞捕获系统装入一个容器(例如,包)中。在最终灭菌(例如,经由暴露于电离辐射)之前,可以将该细胞捕获系统放置于容器(例如,包)内并且密封(例如,不透气的密封)。

[0106] 在另一个实施例中,本发明提供了细胞捕获杯,该细胞捕获杯包括开放圆柱部分和环形密封,该环形密封被适配为与一个基座配合,该基座包括前述方面和实施例的任一个的细胞捕获系统。该细胞捕获杯和基座可以具有低于 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、或 10^{-9} 的无菌保证水平,这可以使用在此讨论的方法中的任一个或全部来实现。

[0107] (II) 细胞捕获方法

[0108] 图10A描绘了示例性杯-基座组件550的部件。将多孔支撑构件558和膜202布置于基座554的中心中。然后,将该杯552安装在膜202的顶部,有助于将膜202维持为处于平位置。可以将盖556设置在杯552的顶部以保护杯552的内部免于受到污染。图10B描绘了部件(没有膜202和支撑物558)的装配。

[0109] 在使用期间,将样品流体倾倒在杯552内。由于杯552的锥形化,流体将膜组件润湿并且穿过膜202。典型地流体朝向基座554穿过膜组件(例如,穿过膜202,以及多孔支撑构件558,如果使用一个的话)。可以有利地采用负压例如真空来将流体抽吸通过膜202至开口586(例如,在图5E的实施例中,经由凹槽514),并且有助于将膜保持为基本上是平的。在流体被抽吸通过杯-基座组件550之后,不能穿过膜202的流体中的任何颗粒和/或细胞保留在膜202的暴露的上表面上。在将流体倾倒入杯组件中之后,杯552可以与基座554分离,如在图10C中描绘的,并且与放置于基座554的顶部上的盖558分离。盖558可以设置在基座554的顶部上,从而在将基座转移至平台802(图11B)时或在孵育包含膜202的基座例如持续15分钟至8个小时以允许捕获的活细胞增殖时,保护润湿的膜202和支撑物558免受污染。

[0110] 示出用于在一个示例性光学检测系统中使用的细胞捕获系统的组件、流体样品通过细胞捕获系统的通道、以及膜固持件的组件的示例性流程图显示于图11A中。

[0111] 参照图11A,在步骤601中,提供了杯-基座组件550。在步骤603中,该杯-基座组件550与一个真空系统(例如,真空歧管606)连接,并且将负压施加至杯-基座组件550的下侧。在步骤605中,将液体样品倾倒在杯-基座组件550中,并且存在于液体样品中的任何细胞被

保留在多孔膜202的暴露的上表面上。这个倾倒步骤可以在步骤603之前、同时、或之后进行。应考虑到基本上非自发荧光的膜允许在大约5托或大约10托的真空下通过其的流率为至少5或至少10mL/cm²/min。然后将这些细胞用活性染色剂或活性染色系统进行染色,例如,如在III节中讨论的,从而使得有可能选择性地检测活细胞并区分活细胞与非活细胞。可以可任选地将细胞用生理学上可接受的盐和/或缓冲溶液进行洗涤,以将残留的非特异性地结合的荧光染料和/或淬灭剂去除。

[0112] 在步骤607中,将膜组件典型地与基座554组合从杯552移除,虽然独立于基座554的移除可以是可能的。在步骤609中,基座554(因此还有膜202)布置于平台802上。在步骤611中,平台802布置于卡盘804上。在下文更详细地描述平台802和卡盘804。步骤609和611可以按相反的顺序或同时进行。在该过程的开始处,平台802和卡盘804可以位于图1A的示例性检测系统100中,以便检测捕获于膜202的表面上的任何细胞(活细胞和/或非活细胞)和/或颗粒。在其他实施例中,平台802和/或卡盘804可以与远离检测系统100的基座554组装在一起。

[0113] (III) 细胞染色

[0114] 一旦细胞被捕获在可渗透膜上,可以使用活性染色剂或活性染色系统对这些细胞进行染色,从而检测活细胞或以其他方式区分活细胞与非活细胞。具体的染色方案将取决于多种因素,例如,正被检测的细胞、正采用的染色剂或染色系统、以及是否将立即对细胞进行染色和检测或是否将这些细胞捕获持续一个时期例如从30分钟至几个小时以允许细胞增殖,从而使得在特定点处检测到多个细胞而非单个细胞。示例性的染色以及在希望时的培养方案讨论于以下章节中。

[0115] 应理解多种染色剂和染色系统可以用于选择性地对活细胞和非活细胞对比染色。如在此使用的,术语“非活细胞”理解为意指已经死亡的细胞或正经历细胞死亡的细胞。一些方法是基于以下原理:活细胞排除某些试剂,例如台盼蓝、阿尔新蓝、伊红Y、苯胺黑、碘化丙啶、溴化乙锭、以及单叠氮乙锭。例如,当使用台盼蓝时,非活细胞染为蓝色,而活细胞未受到染色。其他方法是基于以下原理:活细胞吸收和/或修饰某些试剂(例如,荧光染料),而非活细胞不这样。选择性标记活细胞或非活细胞的染料描述于美同专利号5,534,416和PCT公开号W0 92/02632中,这包括酯酶依赖性染料、结合核酸的染料、依赖于细胞内氧化的染料、以及膜电位敏感的染料。

[0116] 应理解选择性地标记活细胞的活性染色剂和活性染色系统可以采用多种原理。例如,荧光染料可以渗透活细胞和非活细胞两者,但是荧光染料可以变成在活细胞内被修饰使得荧光染料在活细胞内变成活化的(例如,活化的染料可以结合至细胞基质或细胞器等等,或可以变得能够在用激发光照射时发射荧光),或在活细胞内变为不溶解的。修饰可以作为细胞内的代谢活性(例如,经由细胞内的酶活性)的结果而发生。通过举例方式,荧光染料可任选地包含用于酯酶的底物。其他系统可以使用一种荧光染料与淬灭激发时来自荧光染料的发射的一种淬灭剂或两种或更多种不同的淬灭剂的组合。在发射谱(例如,发射波长)是通过第二荧光染料或淬灭剂的存在来调节时,其他系统可以使用多种荧光染料或一种染料与淬灭剂的组合。在前述系统的每一个中,应理解可以采用多种不同的荧光染料,例如靶向于和/或染色不同的细胞或细胞类型、细胞器、结构、蛋白质、糖蛋白、脂质、糖脂类、核酸、碳水化合物等的2、3、4、或5种不同的荧光染料,从而增加荧光事件实际上是由细胞而

不是非特异性非细胞事件导致的置信度。

[0117] 通过举例方式,可以在活细胞内活化(例如,经由细胞内的代谢活性(例如,酯酶活性))的活性染色剂描述于美国专利号5,314,805和5,534,416、美国专利申请公开号US 2008/0305514、和PCT公开号W0 92/02632中。在一个实施例中,荧光染料可以包含酯酶底物。酯酶底物膜可透过性染料变成在活细胞内化学地经由酯酶修饰,产生了将修饰的荧光染料截留在完整的活细胞内的羧基。在这些情况中,可以通过使用不可透过膜的淬灭剂或用温和的洗涤剂降低背景,从而将任何荧光从细胞外区域或非活细胞中去除。在这种方法中,仅有活细胞被检测到。示例性的基于酯酶底物的可透过膜的染料讨论于美国专利号5,534,416中,包括而不限于钙黄绿素蓝AM、羧基钙黄绿素蓝AM、二醋酸荧光素、二醋酸羧基荧光素、5-羧基二醋酸荧光素AM、二醋酸磺基荧光素、BCECF-AM、以及钙黄绿素AM。

[0118] 优先标记非活细胞而不是活细胞的荧光染料(例如,渗透非活细胞的膜而不是活细胞的膜)包括例如PO-PRO-1、BO-PRO-1、YO-PRO-1、TO-PRO-1、PO-PRO-3、BO-PRO-3、YO-PRO-3、TO-PRO-3、POPO-1、BOBO-1、YOYO-1、POPO-3、BOBO-3、YOYO-3和溴化乙锭(美国专利号5,534,416)。

[0119] 此外,应考虑可用于本发明的实践中的荧光染料包括结合至细胞内的核酸的染料。这些染料可以渗透并且结合至活细胞中的核酸,渗透并且结合非活细胞中的核酸,或渗透并且结合活细胞和非活细胞中的核酸。对染料的选择将取决于有待采用的检测方案。

[0120] 多种活性染色系统已经得以开发并描述于例如美国专利公开案2008/0305514、美国专利号5,314,805、以及5,534,416、加拿大专利申请案CA 02236687、以及PCT公开案W0 2011/124927中,其中活细胞是用一种荧光染料标记,并且非活细胞是用第二不同的荧光染料标记。换言之,非活细胞仍然是发荧光的,然而从死细胞的荧光发射可以区分于从活细胞的荧光发射。

[0121] 加拿大专利申请号02236687描述了一种采用两种不同荧光染料的系统,其中第一染料能够非特异性地跨过选择性膜转移而标记所有的细胞,而第二染料能够跨过选择性膜移动并且可以仅进入具有受损的膜的细胞中。在这种情况下,活细胞被第一染料标记,并且非活细胞被第一和第二染料标记。在给定活细胞和非活细胞的发射谱的区别的情况下,有可能将活细胞与非活细胞区分开来。然而,当用适当的波长的光辐照时,非活细胞仍然生成荧光信号。

[0122] 美国专利公开案2008/0305514描述了一种系统,其中,第一荧光染料,例如包含酯酶底物的荧光染料,渗透并且选择性地标记活细胞,而第二不同的结合核酸的荧光染料渗透活细胞与非活细胞两者并且使存在于活细胞和非活细胞两者中的核酸染色。在这种方法中,荧光染料可以是例如酯酶底物,该酯酶底物具有高的细胞内保留,因为在活细胞中的酯酶将染料转化为可以不再穿过细胞膜的形式。该方法还可以采用对活细胞和非活细胞两者均进行标记的核酸染色剂(例如4',6-二脒基-2-苯基吡啶染料)。当用适当波长的光激发时,活细胞发射来自第一和第二荧光染料两者的光(即,存在两种不同的荧光事件),而非活细胞仅发射来自第二荧光染料的光。活性染色剂(例如,酯酶底物)和核酸染色剂两者的使用可以增加荧光事件实际上是由细胞而不是经由非特异性事件导致的置信度。当用适当的波长的光辐照时,非活细胞仍然生成荧光信号。

[0123] 美国专利号5,314,805描述了采用两种不同的荧光染料的不同的系统。第一荧光

染料例如钙黄绿素AM(一种酯酶底物)渗透并且选择性地标记活细胞。活细胞可通过在钙黄绿素AM的酶水解时生成的绿色荧光信号检测到。用第二不同的荧光染料例如乙锭同型二聚体可检测非活细胞。非活细胞可通过用乙锭同型二聚体染色的核酸产生的红色荧光检测到。作为结果,可能的是基于每个细胞的发射谱而在活细胞与非活细胞之间区分。当用适当的波长的光辐照时,非活细胞仍然生成荧光信号。

[0124] 美国专利号5,534,416描述了采用两种不同的荧光染料的不同的系统。第一荧光染料即环取代的非对称性花青染料对所有细胞(活细胞与非活细胞两者)进行染色。第二荧光染料是选择性地标记活细胞或非活细胞并且给出不同于第一荧光染料的荧光响应的染料。当第二荧光染料是选择性地对活细胞染色的染料时,则活细胞被第一和第二染料染色,而非活细胞被第一染料染色。相比之下,当第二荧光染料是选择性地对非活细胞染色的染料时,则活细胞被第一染料染色,而非活细胞被第一和第二染料标记。在任一方法的过程中,在给定活细胞和非活细胞的发射光谱的区分的情况下,有可能将活细胞与非活细胞区分开来。然而,当用适当的波长的光辐照时,非活细胞仍然生成荧光信号。

[0125] 在某些染色系统中,荧光染料穿过活细胞的完整膜,而由于细胞内的代谢活性变得不溶解或被截留于活细胞之内。另外,荧光染料可以结合选择性地进入非活细胞中的一种或多种淬灭剂一起使用,这些淬灭剂因此增加了针对从活细胞散发的荧光事件的选择性。在其他情况中,荧光染料可以渗透活细胞和非活细胞两者。在此情形下,荧光染料可以结合选择性地渗透非活细胞的一种或多种淬灭剂一起使用,这些淬灭剂因此增加了针对从活细胞散发的荧光事件的选择性。

[0126] 在一种替代方法中,美国专利申请公开号US 2006/0040400和欧洲申请号EP 1624 071描述了荧光染料和淬灭剂的使用。荧光染料(例如,二醋酸羧基荧光素)渗透活细胞和非活细胞两者。进而将淬灭剂添加至荧光染色的细胞中,该淬灭剂能够渗透活细胞的膜但不能在活细胞中的pH下淬灭荧光染料的荧光,而会在显著不同于活细胞pH的pH下淬灭荧光。在此方法中,将该淬灭剂以显著不同于活细胞pH值的pH添加至细胞中。在此方法中,该淬灭剂在活细胞的pH下淬灭荧光是不可操作的,而可以在非活细胞的pH下淬灭荧光。

[0127] 尽管这些细胞活性染色剂和活性染色系统在此处描述的方法和系统的实践中是可获得并且有用的,存在着开发一种简单快速稳定的染色方案的需求,这种方案可以用于在非活细胞散发很少或不散发背景荧光的情况下,尤其是在用于激发活细胞和/或包含或支撑细胞的系统(例如,膜、固体支撑物、光学池或流动池)的条件(例如,使用激发光)下,选择性地检测活细胞(单细胞和细胞簇)。此外,染色系统应该不损害被检测的细胞的活性。另外,如下文讨论的,如果希望的话,染色系统应允许细胞样品中的活细胞的的同时的增殖和染色。

[0128] 本发明提供了用于选择性地标记在包含细胞的样品中的活细胞(例如,原核细胞或真核细胞)的方法。该染色方法可以与一种细胞捕获系统和/或光学检测系统组合使用以检测细胞样品中活细胞的存在。该染色程序可以用于对布置于固体支撑物(例如显微镜载玻片和/或培养皿中的孔)上的、或液体样品中(例如在光学池或流动池中)的活细胞进行染色。该染色方案可以用于一种用以测量感兴趣的特定样品的生物负载(例如,用以测量活细胞(例如,活的微生物,如细菌、酵母菌、以及真菌)的数目和/或百分比和/或分数)的方法中。

[0129] 本发明提供了检测细胞样品中的活细胞的方法。该方法包括将该细胞样品中的细胞 (i) 在允许一种可透过膜的荧光染料渗透活细胞与非活细胞两者的条件下,暴露于该荧光染料,并且 (ii) 在允许一种不可透过膜的荧光淬灭剂选择性地渗透非活细胞而不是活细胞的条件下,暴露于该淬灭剂,该淬灭剂能淬灭由该荧光染料产生的荧光。此后,该方法包括将细胞暴露于一束具有能够激发荧光染料产生荧光发射的波长的光,并且用一个检测器(例如,检测单一波长范围或多个不同波长范围的单一检测器)或多个检测器(例如各自能够检测不同波长范围的不同检测器)对来自细胞的荧光发射(如果有的话)进行检测,由此检测细胞样品中的活细胞。与活细胞内的荧光染料相比,在非活细胞内的荧光染料发射显著更少的荧光。因此,与活细胞相比,非活细胞发射显著更少的荧光。

[0130] 在某些情况下,例如,当淬灭剂能够产生荧光发射时,激发光的波长可以被选择为对该淬灭剂不进行光激发或基本上不进行光激发。可替代地,检测器可以被选择和/或配置为优先检测来自染料的发射事件而非来自淬灭剂的发射事件。

[0131] 此外,本发明提供了检测细胞样品中的活细胞的方法。该方法包括将该细胞样品中的细胞 (i) 在允许一种可透过膜的荧光染料渗透活细胞与非活细胞两者的条件下,暴露于该荧光染料,并且 (ii) 在允许一种不可透过膜的荧光淬灭剂选择性地渗透非活细胞而不是活细胞的条件下,暴露于该淬灭剂,该淬灭剂能淬灭由该荧光染料产生的荧光。此后,这些细胞暴露于具有一个波长的光,该波长能够激发荧光染料产生荧光发射。用一个或多个检测器对来自细胞的荧光发射(如果有的话)进行检测,这些检测器被配置为优先检测来自荧光染料的可检测发射而不是来自淬灭剂的可检测发射,从而使得来自淬灭剂的可检测发射(如果产生的话)不高于来自荧光染料的可检测发射的50%(例如,不高于40%、不高于30%、不高于20%、不高于10%)。因此,在采用的检测条件下,与活细胞相比,非活细胞发射由检测器检测到的显著更少的荧光。因此,该方法可以用于检测细胞样品中的活细胞。

[0132] 在某些实施例中,在暴露于光时,非活细胞不发射或基本上不发射可由检测器检测的荧光。在某些其他实施例中,在暴露于该束光时,非活细胞不发射或基本上不发射荧光。

[0133] 应理解,适当的染料-淬灭剂对的选择取决于多种因素,这些因素包括以下中的一个或多个:染料的发射光谱,淬灭剂的吸收光谱,(如果淬灭剂具有发射光谱的话)淬灭剂的发射光谱,以及在给定检测器中的检测带宽。这些特征的每一个在下文讨论。

[0134] 通常,在本方法的实践中有用的示例性的可透过膜的荧光染料具有以下特征中的一个或多个:当暴露于一束具有在从大约350nm至大约1000nm的范围内的波长最大值的光时是发荧光的,在具有或不具有表面活性剂如温和洗涤剂或环糊精载体剂的情况下是水溶性的,在可检测的染色所需的浓度下时非毒性的,以及允许用于通过活细胞膜的被动扩散的疏水特性。在某些实施例中,可透过膜的荧光染料还可以表征为包含至少一个带电基团(例如,季氮基团)。在某些实施例中,荧光染料可以被激发以经历通过来自红色激光器(例如,发射具有在620nm至640nm范围内的波长的光的红色激光器)的辐照产生的荧光。

[0135] 此外,在本方法的实践中有用的示例性的可透过膜的荧光淬灭剂具有以下特征中的一个或多个:在足以淬灭来自荧光染料的信号的浓度下时非毒性的,水溶性的,亲水性的,以及包含任一高电荷基团(例如但不限于羧基、氨基、苯氧化物、硫酸盐、磺酸盐、磷酸盐、或膦酸盐部分)和/或被极性配体(例如,聚乙二醇、聚丙二醇、或聚乙烯醇)取代的为极

性的,从而使得淬灭剂的极性防止通过活细胞膜的被动扩散和/或主动地被泵出活细胞。在某些实施例中,不可透过膜的荧光淬灭剂可任选地包含至少两个带电基团(例如,至少一个季氮基团)。在另一个实施例中,当由用于检测活细胞存在的光源激发时,当暴露于从可透过膜的荧光染料发射的具有一个波长、一个波长范围、或多个波长范围的光时,淬灭剂不发光。

[0136] 示例性的荧光染料和荧光淬灭剂对可以被检测用于在此描述的发明的实践,并且可以选自例如在下文表I和II中列出的荧光染料和荧光淬灭剂。

[0137] 示例性的荧光染料(e^- 受体)可以选自噁嗪1、噁嗪170、噁嗪750、噁嗪4、罗丹明700、罗丹明800、甲酚紫、尼罗蓝、亚甲基蓝、天青A、天青B以及天青C,它们可以与一种示例性淬灭剂(e^- 供体)组合使用,该淬灭剂选自:抗坏血酸钠、5' 鸟苷单磷酸盐、L-色氨酸、六氰合铁(II)酸钾、二苯胺-2-磺酸、铜酞菁-3,4',4'',4'''-四磺酸四钠盐以及腐植酸。

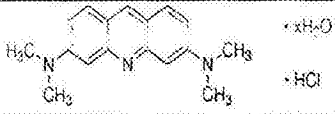
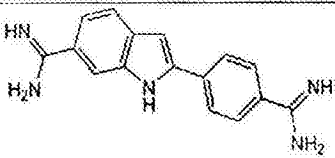
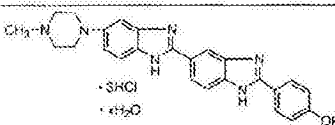
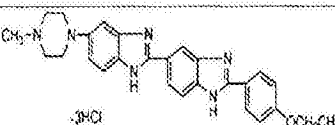
[0138] 示例性的荧光染料(e^- 供体)可以选自金属化的酞菁或卟啉(porphyrin)、赫斯特(Hoeschst) 33342、以及其他赫斯特染料、Ru(phen_dppz)²⁺和Rh(phi)bpy³⁺,它们可以与一种淬灭剂(e^- 受体)组合使用,该淬灭剂选自:二吡啶鎓衍生物(例如,N,N'-二甲基-4,4'-二吡啶鎓二氯化物、1,1'-乙烯-2,2'-二吡啶鎓二溴化物、以及蒽醌(例如,双烷基氨基蒽醌)。

[0139] 表I-示例性荧光染料

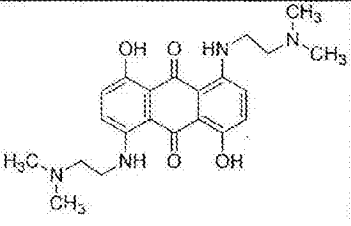
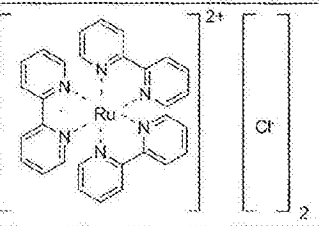
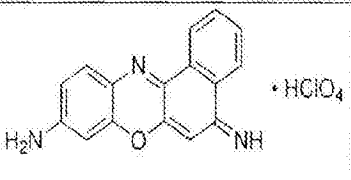
[0140]

染料 编号	荧光染料	结构	来源	荧光谱 激发(λ 最大) 发射(λ 最大)	示例性激 发波长 (nm)	典型的 PET 淬灭剂
D1	噻嗪 I 高 氯酸盐		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州 (Sigma-Aldrich , St. Louis, MO)	激发: 643 nm 发射: 665 nm	640 nm	电子供体
D2	噻嗪 170 高氯酸盐		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 613 nm 发射: 641 nm	532 nm, 640 nm	电子供体
D3	噻嗪 750 高氯酸盐		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 685 nm 发射: 695 nm	640 nm	电子供体
D4	罗丹明 6G (Rhodamine 6G)		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 524 nm 发射: 552 nm	488 nm, 532 nm	电子供体
D5	罗丹明 B		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 545 nm 发射: 565 nm	488 nm, 532 nm	电子供体
D6	罗丹明 700		AnaSpec 公司, 菲蒙市 (Fremont), 加 利福尼亚州 (CA)	激发: 643 nm 发射: 664 nm	640 nm	电子供体
D7	罗丹明 800		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 682 nm 发射: 712 nm	640 nm	电子供体

[0141]

染料 编号	荧光染料	结构	来源	荧光谱 激发(λ最大) 发射(λ最大)	示例性激 发波长 (nm)	典型的 PET 淬灭剂
D8	吖吨橙	 $\cdot xH_2O$ $\cdot HCl$	西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 502 nm 发射: 525 nm	488 nm	电子受体
D9	4',6-二脒基-2-苯基 吡啶 (DAPI)		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 358 nm 发射: 461 nm	355 nm	电子受体
D10	赫斯特 (Hoechst) 33258	 $\cdot 3HCl$ $\cdot CH_2O$	西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 355 nm 发射: 465 nm	355 nm	电子受体
D11	赫斯特 (Hoechst) 33342	 $\cdot 3HCl$	西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 355 nm 发射: 465 nm	355 nm	电子受体
D12	BOXT0		TATAA 生物中心 (TATAA Biocenter), 旧金山 (San Francisco), 加利福尼亚州 (CA)	激发: 515 nm 发射: 552 nm	488 nm	电子受体
D13	Vybrant DyeCycle 紫		生命技术公司 (Life Technologies Inc.), 格兰德艾兰 (Grand Island), 纽约州 (NY)	激发: 369 nm 发射: 437 nm	365 nm, 405 nm	电子受体
D14	Vybrant DyeCycle 绿		生命技术公司, 格兰德艾兰, 纽约州	激发: 506 nm 发射: 534 nm	488 nm	电子受体
D15	Vybrant DyeCycle 橙		生命技术公司, 格兰德艾兰, 纽约州	激发: 519 nm 发射: 563 nm	488 nm, 532 nm	电子受体
D16	Vybrant DyeCycle 宝石红		生命技术公司, 格兰德艾兰, 纽约州	激发: 638 nm 发射: 686 nm	488 nm, 532 nm, 633 nm	电子受体

[0142]

染料 编号	荧光染料	结构	来源	荧光谱 激发(λ最大) 发射(λ最大)	示例性激 发波长 (nm)	典型的 PET 淬灭剂
D17	Draq5		生物状态有限 公司 (BioStatus Limited), 莱斯 特郡 (Leicestershire) , 英国	激发: 488-647 nm 发射: 697 nm	488 nm, 532 nm, 633 nm	电子供体
D18	CYTRAK 橙		生物状态有限 公司, 莱斯特 郡, 英国	激发: 513 nm 发射: 603 nm	488 nm, 532 nm	电子供体
D19	三(二吡 啶)钌(II) 二氯化物		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 452 nm 发射: 623 nm	355 nm, 488 nm	电子受体
D20	甲酚紫高 氯酸盐 (Cresyl Violet Perchlorat e)		西格玛-奥德里 奇, 圣路易斯, 密苏里州	激发: 602 nm 发射: 614 nm	532 nm	电子供体
D21	SYTO 9		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 485 nm 发射: 498 nm	488 nm	电子受体或 供体
D22	SYTO 11		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 508 nm 发射: 527 nm	488 nm	电子受体或 供体
D23	SYTO 12		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 499 nm 发射: 522 nm	488 nm	电子受体或 供体
D24	SYTO 13		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 488 nm 发射: 509 nm	488 nm	电子受体或 供体
D25	SYTO 14		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 517 nm 发射: 549 nm	488 nm	电子受体或 供体
D26	SYTO 16		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 488 nm 发射: 518 nm	488 nm	电子受体或 供体

[0143]

染料 编号	荧光染料	结构	来源	荧光谱 激发(λ 最大) 发射(λ 最大)	示例性激 发波长 (nm)	典型的 PET 淬灭剂
D27	SYTO 18		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 490 nm 发射: 507 nm	488 nm	电子受体或 供体
D28	SYTO 21		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 494 nm 发射: 517 nm	488 nm	电子受体或 供体
D29	SYTO 24		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 490 nm 发射: 515 nm	488 nm	电子受体或 供体
D30	SYTO 25		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 521 nm 发射: 556 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D31	SYTO BC		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 485 nm 发射: 500 nm	488 nm	电子受体或 供体
D32	SYTO 80		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 531 nm 发射: 545 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D33	SYTO 81		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 530 nm 发射: 544 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D34	SYTO 82		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 541 nm 发射: 560 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D35	SYTO 83		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 543 nm 发射: 559 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D36	SYTO 84		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 567 nm 发射: 582 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D37	SYTO 85		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 567 nm 发射: 583 nm	488 nm, 532 nm	电子受体或 供体
D38	SYTO 17		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 621 nm 发射: 634 nm	580 nm	电子受体或 供体
D39	SYTO 59		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 622 nm 发射: 645 nm	580 nm, 633 nm	电子受体或 供体
D40	SYTO 60		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽 约州	激发: 652 nm 发射: 678 nm	633 nm	电子受体或 供体

[0144]

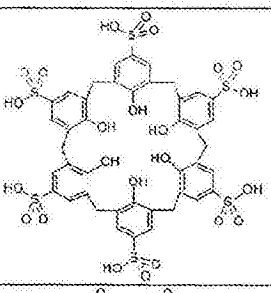
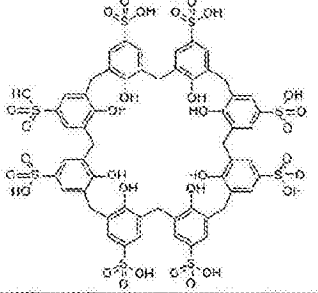
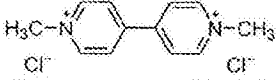
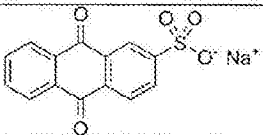
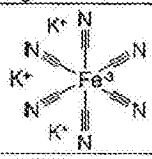
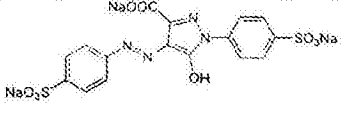
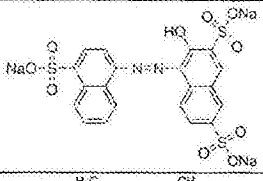
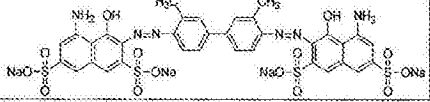
染料编号	荧光染料	结构	来源	荧光谱 激发(λ 最大) 发射(λ 最大)	示例性激发波长 (nm)	典型的 PET 淬灭剂
D41	SYTO 61		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽约州	激发: 628 nm 发射: 645 nm	580 nm, 633 nm	电子受体或供体
D42	SYTO 62		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽约州	激发: 652 nm 发射: 676 nm	633 nm	电子受体或供体
D43	SYTO 63		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽约州	激发: 657 nm 发射: 673 nm	633 nm	电子受体或供体
D44	SYTO 64		生命技术公司, 格兰德艾伦, 纽约州	激发: 599 nm 发射: 619 nm	580 nm	电子受体或供体

[0145] 表II-示例性荧光淬灭剂

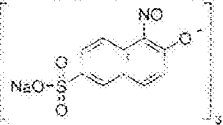
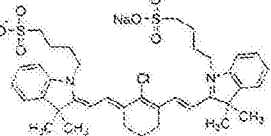
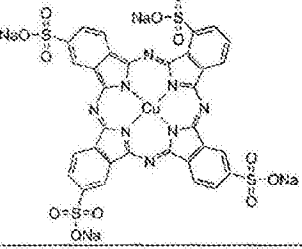
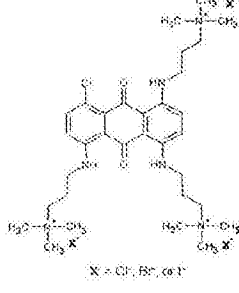
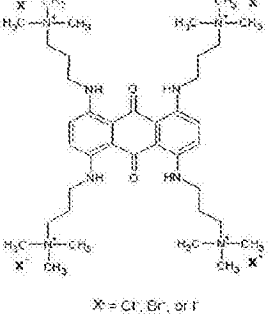
[0146]

淬灭剂编号	淬灭剂	结构	来源	PET 谱	FRET 淬灭适用范围
Q1	抗坏血酸钠		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子供体	N/A
Q2	六氰合铁(II)酸钾		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子供体	N/A
Q3	鸟苷 5'-单磷酸钠盐		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子供体	N/A
Q4	二苯胺-4-磺酸钠		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子供体	N/A

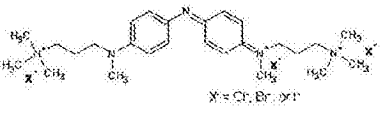
[0147]

淬灭剂 编号	淬灭剂	结构	来源	PET 谱	FRET 淬灭 适用范围
Q5	4-磺基杯 [6]芳烃		东京化学产业有限公司 (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.), 波特兰 (Portland), 俄勒冈州 (OR)	电子供体	N/A
Q6	4-磺基杯 [8]芳烃		东京化学产业有限公司, 波特兰, 俄勒冈州	电子供体	N/A
Q7	甲基紫精		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子受体	N/A
Q8	2-萘酚磺 酸钠		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子受体	N/A
Q9	六氟合铁 (III)酸钾		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	电子受体	N/A
Q10	酒石黄		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	N/A	400-500 nm
Q11	苋菜红		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	N/A	500-600 nm
Q12	台盼蓝		西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州	N/A	550-650 nm

[0148]

淬灭剂 编号	淬灭剂	结构	来源	PET 谱	FRET 淬灭 适用范围
Q13	奈酚绿 B		西格玛-奥德里奇, 圣 路易斯, 密苏里州	N/A	600-750 nm
Q14	1R-783		西格玛-奥德里奇, 圣 路易斯, 密苏里州	N/A	600-780 nm
Q15	铜酞菁 -3,4',4'',4''' -四磺酸四 铜盐		西格玛-奥德里奇, 圣 路易斯, 密苏里州	电子供体和 受体	500-700 nm
Q16	(3-([4-氯 -9,10-二氧 代-5,8-双 (([3- (三甲铵) 丙基)氨基 基])萘-1- 基]氨基) 丙基)三甲 基氮鎓三 卤化物			电子受体	400-750 nm
Q17	(3-([9,10- 二氧代 -4,5,8-三 (([3- (三甲铵) 丙基)氨基 基])萘-1- 基]氨基) 丙基)三甲 基氮鎓 四卤化物			电子受体	500-800 nm

[0149]

淬灭剂 编号	淬灭剂	结构	来源	PET 谱	FRET 淬灭 适用范围
Q18	N-甲基 -4-[(4-{甲 基[3- (三甲铵) 丙基]氨基 基}苯基) 亚氨 基]-N-[2- (三甲铵) 乙基]环己 -2,5-二烯 -1- 亚胺鎓三 卤化物	 X = Cl ⁻ , Br ⁻ , or I ⁻		电子受体	550-800 nm
Q19	Draq7		生物状态有限公司， 莱斯特郡，英国	电子受体	400-640 nm

[0150] 用于在此描述的发明的实践中使用的不可透过膜的淬灭剂典型地通过光诱导电子转移 (PET) (有时称为静态淬灭) 或荧光共振能量转移 (FRET) 或其某些组合抑制来自荧光染料的荧光。这些淬灭机制的效率是依赖于距离的，意味着荧光染料分子和淬灭剂分子必须处于紧密到足够接近处以便抑制荧光的发生。可能是选择使有效淬灭可以实现的机会最大化的条件。示例性的荧光染料与淬灭剂之间的光谱重叠示意性地显示于图12A中。在这种系统中，荧光染料的荧光发射被淬灭剂经由FRET机制抑制。使用此类原理时，可能创造在本发明的实践中有用的荧光染料-淬灭剂对。

[0151] 在一种方法中，荧光染料-淬灭剂对可以被选择为通过例如静电和/或疏水相互作用具有针对彼此的结合亲和力，当结合时这产生了基本上非荧光的基态复合物。换言之，荧光染料和荧光淬灭剂可以在细胞中与彼此结合。

[0152] 在这种方法中有用的荧光染料和荧光淬灭剂的示例性组合列出于表III中。

[0153] 表III-示例性的染料-淬灭剂组合

[0154]

示例性染料	示例性淬灭剂
D1	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q13、Q14、 或Q15、或其任何组合
D2	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q13、Q14、 或Q15、或其任何组合
D3	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q13、Q14、 或Q15、或其任何组合
D4	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q11、Q12、 或Q15、或其任何组合
D6	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q13、Q14、 或Q15、或其任何组合
D7	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q13、Q14、 或Q15、或其任何组合
D8	Q2、Q5、Q6、Q11、或Q12、或其任何组合
D20	Q1、Q2、Q3、Q4、Q5、Q6、Q8、Q13、Q14、 或Q15、或其任何组合

[0155] 在另一种方法中,荧光染料和/或淬灭剂可以被选择为具有针对特定细胞组分、细胞器、或结构(例如核酸)的结合亲和力。例如,荧光染料、荧光淬灭剂或两者结合至细胞中的核酸。当荧光染料和淬灭剂可以共结合至特定靶标例如核酸时,染料和淬灭剂的靠近使得形成一种基本上非荧光的复合物。在任一方法中,不可透过膜的淬灭剂不被允许经由完整的膜进入活细胞,这防止了活细胞中非荧光的复合物的形成。在本发明的一个实施例中,荧光染料-荧光淬灭剂对被选择以使得荧光染料和荧光淬灭剂两者结合至特定细胞组分例如核酸。这个方法具有以下优势:因为荧光染料和荧光淬灭剂结合至特定靶标,非特异性的荧光染色减少。因此,该方法可以减少非特异性荧光染色,当在活细胞之间区分时这优化了信噪比。结合核酸的荧光染料和结合核酸的荧光淬灭剂被选择为使得存在荧光染料的发射光谱与淬灭剂的吸收光谱之间的光谱重叠,例如如在图12A中示意性地显示的。

[0156] 选择性地结合核酸(例如,DNA或RNA)的荧光染料与荧光淬灭剂的示例性组合在表IV中列出。在荧光染料的发射光谱与淬灭剂的吸收光谱之间的光谱重叠的特征可以用于指导选择特定荧光染料用于与特定淬灭剂一起使用。当染料和淬灭剂两者结合例如选择性地结合至细胞器或细胞组分例如蛋白质、糖蛋白、碳水化合物、脂质或核酸时,该方法可以特别有效。

[0157] 表IV-示例性的结合核酸的染料-结合核酸的淬灭剂组合

[0158]

示例性的结合核酸的染料	示例性的结合核酸的淬灭剂
D1	Q16、Q17、或Q18、或其任何组合
D2	Q16、Q17、或 Q18、或其任何组合
D3	Q16、Q17、或 Q18、或其任何组合
D4	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D6	Q16、Q17、或 Q18、或其任何组合
D7	Q16、Q17、或 Q18、或其任何组合
D8	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D9	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D10	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D11	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D12	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D13	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D14	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D15	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D16	Q16、Q17、或Q18、或其任何组合
D17	Q16、Q17、或Q18、或其任何组合
D18	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D19	Q16、Q17、Q18、或Q19、或其任何组合
D20	Q16、Q17、Q18、或Q19、或其任何组合
D21	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D22	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D23	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D24	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D25	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D26	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D27	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D28	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合
D29	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D30	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D31	Q16、Q17、或 Q19、或其任何组合

[0159]

示例性的结合核酸的染料	示例性的结合核酸的淬灭剂
D32	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D33	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D34	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D35	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D36	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D37	Q16、Q17、或Q19、或其任何组合
D38	Q16、Q17、Q18、或Q19、或其任何组合
D39	Q16、Q17、Q18、或Q19、或其任何组合
D40	Q16、Q17、或Q18、或其任何组合
D41	Q16、Q17、Q18、或Q19、或其任何组合
D42	Q16、Q17、或Q18、或其任何组合
D43	Q16、Q17、或Q18、或其任何组合
D44	Q16、Q17、Q18、或Q19、或其任何组合

[0160] 染料和淬灭剂可以被选择为允许染料的发射光谱与淬灭剂的吸收光谱的光谱重叠,例如,如在图12A中证实的,以允许淬灭的必需水平出现。在这些条件下,荧光染料的荧光发射可以被淬灭剂经由FRET抑制。

[0161] 根据染料的发射光谱与淬灭剂的发射光谱(如果有的话)重叠的程度,可以进一步表征染料和淬灭剂对。在某些情况下,可以令人希望的是使淬灭剂的发射光谱与荧光染料的发射光谱(特别是在细胞活性测定期间被检测器(例如,荧光检测器)检测到的染料发射光谱的那个部分)重叠的程度最小化。因此,在某些实施例中,淬灭剂被选择为使得如果淬灭剂被用于激发荧光染料的光源(激发光)激发并且这种淬灭剂能够发射光子,则该淬灭剂优选具有以下特性中的一个或多个:(i)在染料发射光谱(特别是在细胞活性测定期间测量的荧光染料发射光谱的那个部分,即落入检测器检测带宽内的荧光染料发射光谱的部分(参见,图12B中的波长范围 λ_1 - λ_2))之内,该淬灭剂不发射大量的或任何电磁辐射,以及(ii)该淬灭剂具有比荧光染料的量子产率更低的量子产率。因此,淬灭剂在细胞活性测定期间测量的波长范围上保持为非荧光或基本上非荧光。相应地,当在检测器中的检测通道被设置为检测优先从荧光染料散发的发射信号时,从淬灭剂散发的显著更少的荧光(例如,经由激发源产生的自发荧光或荧光)(例如,少于40%、30%、20%、10%或5%的荧光)或没有荧光在检测器的检测通道(参见,图12B中的波长范围 λ_1 - λ_2)中检测到。

[0162] 在选择一种适当染料-淬灭剂对的一种方法中,如在图12B中示意性地显示的,荧光染料(例如,可透过膜的染料)的发射光谱由阴影线显示,并且淬灭剂(例如,不可透过膜的淬灭剂)的发射光谱由实线显示。具有检测带宽(BD,被表示为例如波长值 λ_1 与波长值 λ_2 之间的波长范围)的检测器能够检测荧光染料的发射光谱的一部分(表示为区域X的面积)。该面积X是荧光染料的可检测发射。在给定了检测带宽的条件下,检测器有时还能够检测淬灭剂的发射光谱的一部分(表示为区域Y的面积),假定淬灭剂具有其自身发射光谱(某些淬灭剂不发荧光并且不产生发射光谱),或淬灭剂的发射光谱与染料的发射光谱的至少一部分重叠。该面积Y是淬灭剂的可检测发射。在淬灭剂确实产生发射光谱的情况下,淬灭剂的可检测发射(面积Y)不大于染料的可检测发射(面积X)的50%(例如,不大于40%、不大于

30%、不大于20%、不大于10%、或不大于5%)，从而提供用于活细胞检测的适当的信噪比。在优选实施例中，淬灭剂的可检测发射(面积Y)不大于染料的可检测发射(面积X)的30%。

[0163] 该方法可以通过以下方式进行：采用染料和淬灭剂的荧光发射光谱，并且然后在每一个光谱下鉴别落入拟用检测器的带宽之内的部分(曲线下面积)(参见图12B)。这些值的比例进而被用于确定淬灭剂的可检测发射不大于染料的可检测发射的50%。染料-淬灭剂对的选择取决于检测器中适当的检测带宽、荧光染料和淬灭剂的选择。

[0164] 替代方法可以用于选择适当的染料-淬灭剂对。例如，在另一个实施例中，荧光染料的发射光谱与淬灭剂的发射光谱(如果存在的话)的分离可以根据荧光染料的临界发射波长范围和淬灭剂的临界发射波长范围的不重叠来表征。荧光染料的临界发射波长范围与淬灭剂的临界发射波长范围的分离图示于图12C中。术语“一个或多个临界发射波长”或 CER_{λ} 意指发射谱的一个或多个波长范围，在该发射谱上荧光团具有一个发射强度，该发射强度是荧光团的发射光谱的 λ_{max} 处的最大发射强度的至少40%、50%、60%、70%、80%、或90%。因此，荧光染料的临界发射波长是荧光染料的发射谱的波长范围，在该发射谱上该染料具有一个发射强度，该发射强度是荧光染料的发射光谱的 λ_{max} 处的最大发射强度的至少40%、50%、60%、70%、80%、或90%。淬灭剂的临界发射波长范围是淬灭剂的发射谱(如果有的话)的波长范围，在该发射谱上该淬灭剂具有一个发射强度，该发射强度是淬灭剂的发射光谱的 λ_{max} 处的最大发射强度的至少40%、50%、60%、70%、80%、或90%。

[0165] 为了进一步阐述，示例性的荧光染料的发射强度和示例性的淬灭剂的发射强度图示于图12C中。荧光染料的临界发射波长范围被标记为 CER_{λ} 染料，并且对应于染料的发射强度是染料在其 λ_{max} 处的最大发射强度的至少50%时的那些波长。淬灭剂的临界发射波长范围被标记为 CER_{λ} 淬灭剂，并且对应于淬灭剂的发射强度是淬灭剂在其 λ_{max} 处的最大发射强度的至少50%时的那些波长。如图12C中所绘，在荧光染料的临界发射波长范围与淬灭剂的临界发射波长范围存在重叠。图12C中在波长(即 $\lambda_1-\lambda_2$)之间的差由术语“d”指代，该差优选是至少5nm(或至少10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm或100nm)。

[0166] 取决于荧光染料和淬灭剂的发射光谱，应理解超过阈值强度(例如，染料在其 λ_{max} 处的最大发射强度的50%)的波长可以不是连续的。例如，染料和/或淬灭剂的发射光谱可以包含超过阈值强度(例如，染料或淬灭剂在其各自 λ_{max} 处的最大发射强度的50%)的两个或更多个波长范围。优选地，在荧光染料的一个或多个临界发射波长范围与淬灭剂的一个或多个临界发射波长范围之间存在很少重叠或不存在重叠。使用这些标准时，可能选择在此处描述的细胞活性测定中有用的染料-淬灭剂组合。

[0167] 特定可透过膜的荧光染料和不可透过膜的荧光淬灭剂的组合被选择为(i)提供来自活细胞中荧光染料的足够荧光强度，(ii)基本上淬灭非活细胞中荧光染料的荧光，并且(iii)使染料和/或淬灭剂的任何毒性最小化。在某些实施例中，当施用至细胞时，在从大约0.1 μ M至大约50 μ M、从大约0.5 μ M至大约30 μ M、或从大约1 μ M至大约10 μ M的范围内的浓度使用可透过膜的荧光染料。在某些实施例中，施用至细胞的不可透过膜的荧光淬灭剂的量是与荧光染料大约相同的分子浓度或者更高。在某些实施例中，当施用至细胞时，施用至细胞的不可透过膜的荧光淬灭剂的量是处于0.1 μ M至大约200mM、从大约0.5 μ M至大约100mM、从大约0.5 μ M至大约1mM、从大约0.5 μ M至大约500 μ M、从大约1 μ M至大约500 μ M、或从大约1 μ M至大约100 μ M的浓度。在其他实施例中，是以相对于荧光染料的浓度的例如2-倍、3-倍、4-倍、5-

倍、6-倍、7-倍、8-倍、9-倍、10-倍、20-倍、40-倍、60-倍、80-倍、100-倍、200-倍、300-倍、400-倍、500-倍、1000-倍、或2,000-倍、5,000-倍、10,000-倍、20,000-倍、50,000-倍或100,000-倍的摩尔过量提供淬灭剂。淬灭剂的量应被选择为使得淬灭剂对于在给定样品中正被检测的细胞而言是非毒性的或基本上非毒性的。在某些实施例中,施用至细胞的不可透过膜的荧光淬灭剂的量是处于相对于施用至细胞的可透过膜的荧光染料的量的大约5-倍摩尔过量至大约20-倍摩尔过量或大约5-倍摩尔过量至大约10-倍摩尔过量的范围内。

[0168] 取决于正被检测的细胞和希望的灵敏度,可能的是将细胞暴露于多种不同荧光染料和/或多种不同荧光淬灭剂中。并且,取决于待使用的染料和淬灭剂、以及待检测的细胞,可以将这些细胞暴露于荧光染料中并且然后暴露于荧光淬灭剂中。可替代地,可以同时将这些细胞暴露于荧光染料和荧光淬灭剂中。在某些方法中,使用例如生理学上可接受的盐和/或缓冲溶液的洗涤步骤可以用于在检测之前去除残留染料或淬灭剂。在某些方法中,随后的洗涤步骤不是必需的,并且如果在洗涤步骤期间荧光染料例如经由扩散到细胞外面而从活细胞去除或被萃取,洗涤步骤若采用的话甚至可以不希望的。

[0169] 检测方法可以在单一的细胞、细胞簇或细胞集落上进行。在某些情况下,例如,为了增加测定的灵敏度,可以希望的是在将细胞暴露于荧光染料和荧光淬灭剂之前和/或期间和/或之后,在允许细胞增殖的条件下培养细胞。包括生长培养基、温度、培养持续时间的选择的培养条件可以被选择为允许样品中的至少一种细胞具有一次或多次细胞分裂。

[0170] 例如,取决于所需的灵敏度,细胞一旦被捕获在膜上,即可以与生长培养基和/或孢子萌发引发剂接触,并且进而被允许增殖持续一个或多个倍增时间,以增加膜上特定点处的细胞数目。在一个实施例中,细胞被捕获在膜202上,将包含荧光染料和荧光淬灭剂以及生长培养基(例如,来自俄勒冈州威森维尔(Wilsonville)的PML微生物学公司的营养肉汤T7 105)的溶液倾倒在杯组件中并且经由真空吸引被牵拉通过膜202。然后将盖588放置在基座554(参见图10C)上,并且将所得单元放置于在预先选择的温度(例如,37℃)下的孵育器中持续希望长度的时间(例如,从15分钟至8小时,或从30分钟至4小时),该时间取决于微生物的倍增时间。在该时间期间,鉴于存在于固体支撑物558内的生长培养基和染色剂,膜202保持湿润。该方法还提供了针对荧光染料和淬灭剂渗透并染色细胞的更多时间。在孵育之后,进而将基座554转移并放置在平台802中,以便插入检测装置中。

[0171] 在某些实施例中,荧光染料和/或荧光淬灭剂结合至细胞中的核酸。在其他实施例中,荧光染料和荧光淬灭剂在细胞中与彼此结合。

[0172] 在某些实施例中,用于激发该荧光染料或这些荧光染料的该束光具有在以下的范围内的波长:从大约350nm至大约1000nm、从大约350nm至大约900nm、从大约350nm至大约800nm、从大约350nm至大约700nm、或从大约350nm至大约600nm。例如,激发光的波长是至少处于以下的一个范围内:从大约350nm至大约500nm、从大约350nm至大约500nm、从大约350nm至大约600nm、从大约400nm至大约550nm、从大约400nm至大约600nm、从大约400nm至大约650nm、从大约450nm至大约600nm、从大约450nm至大约650nm、从大约450nm至大约700nm、从大约500nm至大约650nm、从大约500nm至大约700nm、从大约500nm至大约750nm、从大约550nm至大约700nm、从大约550nm至大约750nm、从大约550nm至大约800nm、从大约600nm至大约750nm、从大约600nm至大约800nm、从大约600nm至大约850nm、从大约650nm至大约800nm、从大约650nm至大约850nm、从大约650nm至大约900nm、从大约700nm至大约

850nm、从大约700nm至大约900nm、从大约700nm至大约950nm、从大约750至大约900nm、从大约750至大约950nm或从大约750至大约1000nm。某些范围包括从大约350nm至大约600nm以及从大约600nm至大约750nm。

[0173] 可以检测处于以下范围内的荧光发射：从大约350nm至大约1000nm、从大约350nm至大约900nm、从大约350nm至大约800nm、从大约350nm至大约700nm、或从大约350nm至大约600nm。例如，可以检测处于以下范围内的荧光发射：从大约350nm至550nm、从大约450nm至大约650nm、从大约550nm至大约750nm、从大约650nm至大约850nm、或从大约750nm至大约950nm、从大约350nm至大约450nm、从大约450nm至大约550nm、从大约550nm至大约650nm、从大约650nm至大约750nm、从大约750nm至大约850nm、从大约850nm至大约950nm、从大约350nm至大约400nm、从大约400nm至大约450nm、从大约450nm至大约500nm、从大约500nm至大约550nm、从大约550nm至大约600nm、从大约600nm至大约650nm、从大约650nm至700nm、从大约700nm至大约750nm、从大约750nm至大约800nm、从大约800nm至大约850nm、从大约850nm至大约900nm、从大约900nm至大约950nm、或从大约950nm至大约1000nm。在某些实施例中，检测到处于以下范围的发射光：从大约660nm至大约690nm、从大约690nm至大约720nm、和/或从大约720nm至大约850nm。

[0174] 在前述内容的每一个中，该方法可以进一步包括将细胞暴露于第二不同的可透过膜的对活细胞、非活细胞或活细胞与非活细胞组合进行标记的荧光染料。

[0175] (IV) 细胞检测

[0176] 一旦细胞捕获系统已经用于捕获起初存在于流体样品中的细胞，可以将该膜或膜组件插入膜固持件（例如固持件802）中，以便插入适合检测系统中。在以下文件中描述了示例性检测系统，例如2010年11月3日提交的国际专利申请号PCT/IB 2010/054965，2011年2月24日提交的美国专利申请序列号13/034,402，2010年11月3日提交的国际专利申请号PCT/IB 2010/054966，2011年2月24日提交的美国专利申请序列号13/034,380，2010年11月3日提交的国际专利申请号PCT/IB2010/054967，以及2011年2月24日提交的美国专利申请序列号13/034,515。在前述检测系统中，当一束激发光指向膜表面上时，膜被旋转。用至少一个光学检测器检测发射光。

[0177] 为了协助可渗透膜的旋转，可以将该膜布置于膜固持件中。在一个实施例中，例如，在包含掩罩和可任选的辐条的膜组件中，膜组件可以插入到可被放置于图1A的膜组件120中的膜固持件之中。具体而言，该膜组件可以放置在旋转平台130上。

[0178] 图13A和13B示出了可以用于这种检测系统中的示例性膜固持件。膜固持件700包括容器702（例如，由铝制成的金属容器），该容器限定了中心圆柱凹陷704和偏移驱动孔或凹口706。容器702可以布置于可旋转的轴上，使得该轴被接收在、连接至、或以其他方式接合至凹陷704。该轴可以形成一个圆盘来支撑固持件700，并且可以包括一个与驱动凹口706连接的突出物，例如驱动销。因此，圆盘围绕其旋转轴的旋转相应地积极地旋转膜固持件700而不滑动。

[0179] 容器702还限定了一个腔室708用以接收膜和将膜保持为大体上是平的任何部件。这些部件包括具有辐条的固持件（参照图2A和2B所述）、掩罩（参照图3A和3B所述）、和/或多孔支撑构件（参照图4A-4B所述）。在腔室708下，可以将多个磁铁712布置于容器702内。示例性的磁铁配置710描绘于图13B中。配置710包括大概位于圆形图案中的三个磁铁712，该圆

形图案在容器702的旋转轴处或附近具有一个中心。磁铁712的圆圈的平面基本上平行于腔室708的表面。容器702进一步包括被圈封在磁环716中的窗口714,例如玻璃、聚碳酸酯或有机玻璃窗口。在某些实施例中,磁铁712是圆盘磁铁,并且用于在旋转期间将元件维持在腔室708中(例如,通过磁环716的吸引)。应理解,配置710仅是用于说明目的,并且其他配置例如具有比三个磁铁更少或更多的那些可以并入圆形图案以外的图案,以及其他保留方案可被视为在本发明的范围之内。

[0180] 窗口714保护保持下面细胞的膜以及细胞,并且如果被随后移除并在有助于活细胞生长的条件下(例如,温度、适度、以及营养)孵育的话可以维持膜的无菌性。磁环716可以具有形成磁性不锈钢环720的延伸718。延伸718的中心位于容器702的旋转轴处或其附近。因此,当窗口714布置于被腔室708接收的膜组件上时,环720基本上直接布置于磁铁712的配置710上。当磁环720并且由此窗口714朝向磁铁712移动时,接收在腔室708中的膜大体上被保持在合适位置,此时容器702围绕其旋转轴旋转。延伸718还可以在膜上施加向下的压力(例如,经由中心掩罩,等),有助于保持被接收在腔室708中的膜的平面度。

[0181] 图13C描绘了用于布置在容器(还称为管柱固持件)702中的光学检测系统组件中的膜固持件组件。包括在此所述的那些的其他膜组件还可以被接收于容器/固持件702中。窗口714布置于膜组件200上。磁铁712布置于容器702的底面772中的凹陷770中。如上所述,当膜组件200被接收于腔室708中,磁铁712朝着容器/管柱固持件702的表面772拉动窗口714的环720,由此将膜组件200保持在合适的位置,如图13D所描绘的。

[0182] 可以进而将容器/固持件702放置于具有轴782和驱动器机构784的圆盘或卡盘780上,该驱动器机构接合由容器/固持件702的基座限定的凹陷。该轴782与凹口704接合。圆盘/卡盘780装配在检测系统的电机轴上。电机轴的旋转驱动膜组件200的旋转。轴782和驱动器784防止容器/固持件702在圆盘780的表面上滑动或滑动。此外,磁铁786与具有在圆盘780的表面上预先确定的位置的容器/管柱固持件702对齐,由此协助膜组件200的初始定位的对正。当标出任何荧光事件(例如,由活细胞、非活细胞或颗粒发射的光)的位置时,这种对正可以是有益的。

[0183] 考虑了膜固持件的许多其他实施例。例如,已经考虑到这样一种膜固持件,具有三个布置于容器轮缘内的磁铁以及一种窗口,该窗口具有集成的或分离的磁性轮缘,该磁性轮缘具有三个凹口和三个支腿。在这种实施例中,膜固持件的轮缘可以具有三个挡块。当磁性轮缘布置于容器上时,支腿可以沿着轮缘的外表面滑动,直到支腿与挡块接触。磁铁布置于轮缘中,并且凹口位于磁性轮缘内,使得当支腿与挡块接触时,凹口的每一个被直接定位于这些磁铁之一上方。在这种位置中,磁性轮缘和窗口可以易于与膜固持件分离,并且膜组件可以被接收于或移除于容器腔室。此后,该窗口可以被替换。该窗口可以被旋转为使得凹口不与磁铁对齐,并且这样的话磁性轮缘和窗口基本上被磁铁保持在合适位置。因此,被接收于腔室中的膜组件也基本上被保持于合适位置。

[0184] 为了使得用于将多孔膜组件200转移至膜固持件中(这可以增加污染膜组件200的风险)的操作步骤数目最小化,考虑了膜固持件可以被适配为将膜组件和杯的基座(例如,基座554)接合在一起。图14A-14C描绘了被适配为接收基座554的平台802。平台802可以具有多个凹陷810,每个被适配为接收单独的基座554。凹陷的壁812被锥形化为接收基座554的相似锥形化的下部576,有助于确保用于旋转期间稳定性的紧固装配。平台802被描绘为

基本上圆形的形式,但可以是任何形式。平台802可以被确定大小为装配在外壳110内,无论是永久性的还是暂时的。平台810的下表面包括用于附接至卡盘804的配合凹陷814(描绘于图15A-15D中)。卡盘804提供了平台802坐落的基座,并且提供了用于旋转平台802的手段。卡盘804可以永久性地安装在外壳110中,或可以是可移除的。在平台802和卡盘804已经布置于外壳110中的实施例中,仅具有饱和膜202的基座554会需要被转移到外壳110中以开始运行,由此使得处理步骤的数目最小化。卡盘804具有上表面820,该上表面可以被确定大小为支撑平台802的大部分以用于运行期间的增加的稳定性。在顶面820上的突出物822被适配为与平台802的配合凹陷814配合,这描绘于图15A中的间断轮廓中。突出物822可以具有一个用于接收紧固器(例如,固定螺钉)的孔824,该紧固器用于进一步紧固卡盘804的平台802。卡盘804的底面826具有用于与驱动器配合的突出物828,该驱动器用于旋转卡盘804。

[0185] 如上所讨论,为了对细胞和/或颗粒进行准确的检测和/或评估,多孔膜202应是平的,基本上水平的,并且在冲击于其上的光的来源处或与其相距大约一个预先确定的距离。可任选地,膜202位于检测系统170的焦距处或附近。基座554的厚度和基座554的表面的平面度可以影响膜202的高度和平面。

[0186] 距离和平面性可以使用多种不同方法来维持。在一个实施例中,如在图16A-16D中所描绘的,当使用用于图1的系统中的组件时,描绘的柱790穿过基座504中的开口512并且可以接触布置于基座504中的多孔构件404的底面。多孔构件404从基座504升起,如图16D所示。多孔构件404的顶面和底面两者可以是非常平的和平行的,并且布置于检测系统170的焦平面内。柱790的高度被精确地加工为限定处于检测系统170中的预先确定高度处的水平面,使得膜支撑构件404由柱790直接地支撑而游离于基座504。因此,通过精确地唯一地控制支撑构件404的厚度和平面度,膜202的暴露的表面可以可靠地并且可重复地被定位为几乎准确地在检测系统170的焦平面处。由此在基座504的大小方面的变化性不影响检测系统170的准确性。换言之,基于一致的基础,布置于多孔构件404的顶面上的膜202可以基本上位于检测系统170的焦平面处。当相对基座504描述时,基座554具有可以结合柱790使用的相似的开口586。

[0187] 在另一个实施例中,柱被布置于容器/固持件的底面上并且从其延伸。杯的基座被布置于柱的上方使得这些柱穿过基座中形成的相应的孔。这些柱的高度可以被调整为使得膜处于基本上水平的平面并且在指定公差内距离容器/固持件的底面一定高度。因此,膜可以位于检测系统的焦平面处或附近。

[0188] 在此所述的系统和方法可以用于检测液体样品中的活细胞(例如,原核细胞或真核细胞)的存在和/或数量。该方法可以与一种细胞捕获系统和/或光学检测系统组合使用以检测细胞样品中活细胞的存在。该方法可以用于一种用以测量感兴趣的特定样品的生物负载(例如,活细胞(例如,活的微生物,如细菌、酵母菌、以及真菌)的数目和/或百分比和/或分数)的方法中。

[0189] 本发明提供了一种用于确定液体样品中的细胞的存在和/或量的方法。该方法包括以下步骤:(a)将在样品中存在的细胞例如活细胞捕获于上文披露的细胞捕获系统和/或细胞捕获杯中的任一个上;并且(b)确定步骤(a)中捕获的细胞的存在或量。该方法可以进一步包括用可检测部分例如荧光标记物(荧光部分)标记例如选择性地标记捕获的细胞。确定步骤可以采用光学检测器,例如荧光检测器。本发明还提供了一种在液体样品中检测活

细胞的存在和/或测量细胞活性的方法。该方法包括以下步骤：(a) 将以上披露的样品和/或细胞捕获杯中存在的细胞进行捕获；(b) 选择性地对捕获的活细胞进行标记；并且检测在步骤(b)中标记的细胞的存在，和/或测量步骤(b)中标记的细胞的活性。可以使用各自可以包括荧光部分的活性染色剂和活性染色系统中的至少一者对这些细胞进行标记。标记的活细胞可以用光学检测器例如荧光检测器来检测。

[0190] 本发明还提供了一种检测液体样品中的活细胞的存在和/或数量的方法。该方法包括：(a) 在将液体样品通过一种基本上平面的多孔膜的部分之后，对由该基本上平面的多孔膜的至少一部分保留的任何活细胞用一种荧光标记物进行标记；(b) 通过相对于一个检测系统旋转该多孔膜对该多孔膜的该部分进行扫描，该检测系统包括(i) 一个光源，该光源发射一束具有一个波长的光，该波长被适配为激发该荧光标记物产生一个发射事件，以及(ii) 至少一个检测器，该至少一个检测器能够检测该发射事件，由此查询该平面多孔膜的多个区域，并且检测通过与任何活细胞相关联的荧光标记物的激发而产生的发射事件；并且(c) 通过基于步骤(b)中检测的发射事件确定由该膜捕获的活细胞的存在和/或数量。

[0191] 该扫描步骤可以包括用该束光示踪该多孔膜上的嵌套圆形图案和螺旋图案中的至少一个。应理解的是在该扫描步骤期间，该多孔膜可以移动(例如，经由直线平移)，同时该检测系统保持静止。可替代地，该检测系统可以移动(例如，经由直线平移)，同时该多孔膜围绕单个点旋转(即该多孔膜围绕单个旋转轴旋转)。可替代地，可能的是多孔膜和检测两者可以移动并且它们的相对位置可以相对于彼此来测量。

[0192] 在运行期间，膜固持件700和膜以一个恒定速度旋转，并且该速度范围可以从大约1rpm至大约5,000rpm、从大约1rpm至大约1,000rpm、从大约1rpm至大约750rpm、从大约1rpm至大约500rpm、从大约1rpm至大约400rpm、从大约1rpm至大约300rpm、从大约1rpm至大约200rpm、从大约1rpm至大约100rpm、从大约1rpm至大约50rpm、20rpm至大约5,000rpm、从大约20rpm至大约1,000rpm、从大约20rpm至大约750rpm、从大约20rpm至大约500rpm、从大约20rpm至大约400rpm、从大约20rpm至大约300rpm、从大约20rpm至大约200rpm、从大约20rpm至大约100rpm、从大约20rpm至大约50rpm、30rpm至大约5,000rpm、从大约30rpm至大约1,000rpm、从大约30rpm至大约750rpm、从大约30rpm至大约500rpm、从大约30rpm至大约400rpm、从大约30rpm至大约300rpm、从大约30rpm至大约200rpm、从大约30rpm至大约100rpm、或从大约30rpm至大约50rpm。

[0193] 相似地，可以按一个恒定线速度相对于检测系统来平移旋转膜，该线速度可以或不取决于旋转速度。该线速度可以在以下范围变化：从大约0.01mm/min至大约20mm/min、从大约0.01mm/min至大约10mm/min、从大约0.01mm/min至大约5mm/min、从大约0.01mm/min至大约2mm/min、从大约0.01mm/min至大约1mm/min、从大约0.01mm/min至大约0.5mm/min、从大约0.06mm/min至大约20mm/min、从大约0.06mm/min至大约10mm/min、从大约0.06mm/min至大约5mm/min、从大约0.06mm/min至大约2mm/min、从大约0.06mm/min至大约1mm/min、从大约0.06mm/min至大约0.5mm/min、从大约0.1mm/min至大约20mm/min、从大约0.1mm/min至大约10mm/min、从大约0.1mm/min至大约5mm/min、从大约0.1mm/min至大约2mm/min、从大约0.1mm/min至大约1mm/min、从大约0.1mm/min至大约0.5mm/min、从大约0.6mm/min至大约20mm/min、从大约0.6mm/min至大约10mm/min、从大约0.6mm/min至大约5mm/min、从大约0.6mm/min至大约2mm/min、或从大约0.6mm/min至大约1mm/min。

[0194] 图17A是已经由布此所述的活性染色程序染色的细胞的示意图示。细胞暴露于渗透活(存活的)细胞和非活(死的)细胞两者的可透过膜的荧光染料。当暴露于不可透过膜的淬灭剂时,淬灭剂仅渗透并且残留在非活细胞内,从而产生非荧光的染料-淬灭剂复合物,此时在非活细胞中的荧光染料被淬灭并且不产生可以由检测系统检测到的显著发射事件。相比之下,在活细胞中的荧光染料未被淬灭,并且可以产生可以由检测系统检测到的显著发射事件。在此图中,荧光染料和荧光淬灭剂与彼此结合而形成一种复合物。在此程序中,活细胞产生了比由死细胞产生的荧光事件显著更多(更亮)的荧光事件。

[0195] 图17B是已经由针对图17A所述的活性染色程序染色的细胞的示意图示。然而,在此实施例中,荧光染料和荧光淬灭剂两者结合至细胞内的核酸,例如,DNA或RNA(例如,mRNA或tRNA)。可透过膜的荧光染料渗透活(存活的)细胞和非活(死的)细胞两者,并且不可透过膜的淬灭剂仅渗透并且残留于非活细胞中,从而产生结合核酸的非荧光的染料-淬灭剂复合物。因此,在非活细胞中的荧光染料被淬灭,并且不产生可以由检测系统检测到的显著发射事件。相比之下,在活细胞中的荧光染料未被淬灭,并且可以产生可以由检测系统检测到的显著发射事件。因此,活细胞产生了比由死细胞产生的荧光事件显著更多(更亮)的荧光事件。

[0196] 通过在此所述的方法(例如,如在图17A和17B中示意性地呈现的)染色的细胞的说明性视图示于图18中。正被检测系统查询的区域1110包含亮色的活细胞1120和暗色的非活细胞1130。荧光事件的数目、幅值、以及位置可以经数字化捕获,并且呈现为一种允许操作者对样品中的活细胞进行定量(例如,确定数目、百分比)和/或以其他方式确定具体样品的生物负载的形式。

[0197] 如上所指出的,在某些实施例中,细胞捕获系统、染色方法、以及检测步骤可以包括或使用多种可检测颗粒,例如,荧光颗粒。这些颗粒可以用作阳性对照系统的部分,以确保细胞捕获系统、细胞捕获方法、检测系统、以及检测活细胞的方法中的一个或多个得以正确地运行。荧光颗粒可以被适配为由具有一个波长的光激发,该波长至少处于从大约350nm至大约1000nm的范围内。例如,该波长是至少处于以下的一个范围中:从大约350nm至大约600nm、从大约400nm至大约650nm、从大约450nm至大约700nm、从大约500nm至大约750nm、从大约550nm至大约800nm、从大约600nm至大约850nm、从大约650nm至大约900nm、从大约700nm至大约950nm、从大约750至大约1000nm。某些范围包括从大约350nm至大约600nm以及从大约600nm至大约750nm。

[0198] 取决于细胞捕获系统的设计,这些颗粒可以被预先布置于该多孔膜的至少一部分上或布置于在与膜关联的掩罩中形成的一个孔之内。可替代地,在将样品通过该多孔膜之前,可以将这些颗粒(例如,荧光颗粒)与液体样品进行混合。在这种方法中,可以在一个添加有感兴趣样品的容器中对荧光颗粒进行干燥。此后,这些颗粒可以重悬浮和/或分散于该液体样品之内。可替代地,这些荧光颗粒可以存在于第二溶液中,该第二溶液与感兴趣的样品混合。此后,这些颗粒可以分散于该液体样品之内。这些颗粒例如多种颗粒可以进而连同细胞样品中的细胞被捕获在多孔膜上,这充当细胞捕获系统的阳性对照。一旦这些颗粒例如荧光颗粒在由来自光源的光激活时发射荧光事件,可以对这些颗粒进行检测。

[0199] 使用在此所述的染色方案,可能的是确定细胞样品(例如液体样品)的至少一部分中的活细胞的数目。液体样品可以是例如水样、可食用流体(例如,葡萄酒、啤酒、牛奶、婴幼

儿配方奶粉或类似物)、体液(例如,血液、淋巴液、尿液、脑脊髓液或类似物)、生长培养基、通过从感兴趣来源收获细胞(例如,经由棉签)并进而分散和/或悬浮收获的细胞(如果有的话)于液体样品(例如,缓冲液或生长培养基)中而产生的液体样品。并且,该检测系统可以用于确定可渗透膜上的活细胞的一个或多个位置,如上所述。

[0200] 在检测步骤之后,可以在允许由多孔膜捕获的活细胞(例如,微生物)的生长和/或增殖的条件下培养活细胞。活的生物的属和/或种可以通过标准程序(例如,微生物染色和可视化程序)或分子生物学程序(例如,扩增程序,包括聚合酶链式反应、连接酶链式反应、滚环复制程序等)以及通过核酸测序来确定。

[0201] 实例

[0202] 通过参考以下实例,将更易于理解现在正大体描述的本发明,这些实例被包括仅是出于对本发明的某些方面和实施例进行说明的目的而不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0203] 实例1-使用荧光探针和淬灭剂洗涤对固体支撑物上的活的和非活的大肠杆菌进行成像

[0204] 该实例证实了有可能使用荧光探针和单一淬灭剂洗涤对固体支撑物上的活细菌(大肠杆菌)进行选择性地染色和成像。

[0205] 通过挑取在常规培养皿上培养的菌落并且然后将细胞转移至磷酸盐缓冲盐水(PBS)中来制备活的和非活的大肠杆菌细胞部分。然后通过涡旋将这些细胞进行悬浮,并且然后进一步稀释于PBS中以给出等于1.0麦氏比浊标准(McFarland standard)的浊度。该储备液充当活细胞部分。将活细胞部分的等分试样转移至玻璃试管,将该玻璃试管放置于沸水浴中持续大约15分钟以将大肠杆菌热灭活。将该试管从水浴中移除,并且允许其冷却至室温。这个热灭活的悬浮液充当死细胞部分。

[0206] 荧光染色溶液被制备为在PBS中的噻嗪170高氯酸盐(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)的0.005mM溶液,包含1:100,000稀释度的10%w/v 0.8 μ m天蓝(Sky Blue)胶乳荧光颗粒(Spherotech,莱克福甲斯特(Lake Forest),伊利诺伊州(IL))。单独的淬灭剂洗涤溶液被制备为在PBS中的10mM抗坏血酸钠(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)溶液。

[0207] 将活细胞和死细胞部分单独地以1:1000稀释于10mL PBS中,并且使用真空系统使其通过单独的0.2 μ m黑色无机(Cyclopore)膜(沃特曼(Whatman),桑福德(Sanford),缅因州(ME))进行过滤,以将细胞捕获于每个膜上。然后采用5mL的染色溶液对两种膜均进行染色持续大约3分钟,然后通过膜过滤。然后将每个膜用10mL淬灭剂洗涤液部分进行漂洗。

[0208] 然后使用荧光显微镜(卡尔蔡司(Carl Zeiss)有限责任公司-索恩伍德(Thornwood),纽约州)在575nm-625nm的激发和660nm-710nm的测量的发射下对这些细胞进行成像。图19A是示出活细胞群体的荧光图像。在活细胞中,不可渗透的淬灭剂(抗坏血酸钠)被活细胞排除。因此,如同充当阳性对照的荧光胶乳颗粒一样,活细胞被明亮地染色。图19B示出使用热灭活的细胞产生的图像。热灭活的细胞被抗坏血酸盐淬灭剂渗透,导致荧光信号的淬灭和荧光的损失。阳性对照胶乳颗粒可以在图19B中看到,这证实了膜被功能化为捕获颗粒,膜的表面处于焦点,并且已经在等同的光照条件和参数下拍摄图像。

[0209] 实例2-使用荧光探针和两种光诱导电子转移(PET)淬灭剂对活的和非活的大肠杆

菌细胞进行辨别

[0210] 该实例证实了有可能用荧光探针和两种PET淬灭剂对溶液中的活细菌(大肠杆菌)进行选择性地染色和成像。

[0211] 如实例1中所述地来制备活的和热灭活的大肠杆菌。然后将热灭活的大肠杆菌悬浮液与活细胞悬浮液合并,并且通过涡旋混合。所得细胞悬浮液充当活的和非活的大肠杆菌溶液。

[0212] 将荧光探针-淬灭剂染色剂制备为由在PBS中的0.005mM噁嗪170高氯酸盐(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、0.4mM对-磺酸杯[6]芳烃(美国TCI,波特兰,俄勒冈州)、100mM抗坏血酸钠(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)组成的溶液。

[0213] 然后将活的和非活的大肠杆菌悬浮液以1:1000稀释于荧光探针-淬灭剂溶液中以对这些细胞进行染色。在孵育持续大约5分钟后,将一滴染色的细胞溶液放置于显微镜载玻片上,并且在荧光显微镜(卡尔蔡司有限责任公司,索恩伍德,纽约州)上成像。

[0214] 图20A和20B示出在相位对比下(图20A)以及荧光条件下(激发575-625nm,发射660-710nm)(图20B)拍摄的活的和非活的染色大肠杆菌的组合图像。活细胞和非活细胞在相位对比中是不可区分的,但在荧光条件下活细胞是明亮地发荧光的而非活细胞则不是。不可透过膜的淬灭剂对磺酸杯[6]芳烃和抗坏血酸钠渗透非活细胞膜,导致荧光的有效淬灭。

[0215] 实例3-使用荧光探针、光诱导电子转移(PET)淬灭剂、以及荧光共振能量转移(FRET)淬灭剂对活的与非活的大肠杆菌之间的辨别

[0216] 该实例证实了有可能用荧光探针和PET淬灭剂与FRET淬灭剂的组合对溶液中的活细菌(大肠杆菌)进行选择性地染色和成像。

[0217] 如实例2中所述地产生包含活的和非活的大肠杆菌细胞两者的细胞悬浮液。将荧光探针-淬灭剂染色剂制备为由在PBS中的0.005mM噁嗪170高氯酸盐(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、0.2mM IR-783(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、100mM 5'鸟苷单磷酸盐(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)组成的溶液。

[0218] 然后将活的和非活的大肠杆菌悬浮液以1:1000稀释于荧光探针-淬灭剂溶液中以对这些细胞进行染色。在孵育大约5分钟后,将一滴染色的细胞溶液放置于显微镜载玻片上,并且在荧光显微镜(卡尔蔡司有限责任公司,索恩伍德,纽约州)上成像。

[0219] 图21A和21B示出在相位对比下(图21A)以及荧光条件下(激发575-625nm,发射660-710nm)(图21B)拍摄的活的和非活的染色大肠杆菌的组合图像。活细胞和非活细胞在相位对比中是不可区分的,但在荧光条件下活细胞是明亮地发荧光的而非活细胞则不是。不可透过膜的淬灭剂渗透非活细胞膜,导致荧光的有效淬灭。

[0220] 实例4-使用荧光探针和淬灭剂洗涤对旋转膜上的活微生物(大肠杆菌和白色念珠菌)进行成像

[0221] 该实例证实了有可能使用图1A中示意性显示的检测系统用荧光探针和淬灭剂洗涤对活微生物进行选择性地染色和成像。

[0222] 通过将大肠杆菌的550CFU生物球(Bioball)和白色念珠菌的550CFU生物球(生物梅里埃(bioMerieux)-达勒姆,北卡罗来纳州)合并于PBS溶液中来制备活微生物的溶液。将该溶液简单涡旋以悬浮细胞。然后使用真空系统将该悬浮液通过0.2μm黑色无机膜(沃特

曼,桑福德,缅因州)过滤以将细胞捕获于膜上。通过使该溶液通过膜和多孔支撑构件,将这些细胞捕获于布置在多孔支撑构件上的多孔膜上,例如如图4A和4B中所示。

[0223] 荧光染色溶液被制备为在PBS中的0.005mM噻嗪170高氯酸盐(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)溶液。单独的淬灭剂洗涤溶液被制备为在PBS中的50mM抗坏血酸钠(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)溶液。然后将捕获的细胞用5mL的染色溶液孵育大约5分钟。将染色物通过膜过滤,并且随后采用20mL的淬灭剂洗涤溶液。

[0224] 然后将所得膜转移至图1中示意性示出的检测系统的平台。将膜以5转/秒进行旋转,并且经由检测系统对荧光事件进行检测。图22示出了经扫描表面的小部分,其中活的大肠杆菌和白色念珠菌群体作为明亮的荧光事件是清晰可见的。

[0225] 实例5-使用结合核酸的荧光探针和结合核酸的淬灭剂对活的和非活的微生物之间进行辨别

[0226] 该实例证实了有可能通过使用与结合核酸的不可透过膜的淬灭剂配伍的结合核酸的可透过膜的荧光染料,对活微生物(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌)进行选择性地染色和成像。

[0227] 通过从常规的培养皿挑取各自对应的微生物菌落并且将细胞转移至包含0.9%(w/v) NaCl的玻璃试管中,来制备活的和非活的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、和白色念珠菌的细胞悬浮液。然后通过涡旋将这些细胞进行悬浮,并且然后进一步稀释于盐水中以给出等于2.0麦氏比浊标准的浊度。这些悬浮液充当活细胞部分。将各个活细胞部分的等分试样转移至单独的玻璃试管中,然后将该试管放置于80℃加热块中持续2个小时。将该试管从水浴中移除,并且允许其冷却至室温。这些热灭活的细胞悬浮液充当死细胞部分。

[0228] 淬灭剂Q16可以根据来自以下的改进方法制备:别列茨卡亚(Beletskaya)等人(2005)欧洲有机化学杂志(Eur. J. Org. Chem.) 2005, 381-305。简而言之,将1mmol的1,4,5,8,-四氯蒽醌(纯化学科学(Pure Chemistry Scientific),舒格兰(Sugarland),德克萨斯州(TX))、0.08mmol的三(二苯亚甲基丙酮)二钨(0)(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、0.16mmol的2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-二萘基(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、5mmol的3-(二甲基氨基)-1-丙胺(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、以及5mmol的碳酸铯(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)合并入5mL的二噁烷(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)中。将该混合物在氮气下在密封容器中在100℃搅拌24小时。将所得悬浮液进行过滤,并且将滤液稀释于100mL的5%(w/v)水性碳酸钾中。可以将所得沉淀物通过离心进行收集。然后可以将所得沉淀溶解于5mL的1-甲基-2-吡咯烷酮(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)和季化的烷基胺中,所述季化是通过将烷基胺混合于过量摩尔量的对甲苯磺酸甲酯(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)中并且在60℃搅拌6小时而实现的。将该溶液稀释于100mL的丙酮(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)中,并且粗产物沉淀为蓝色固体,并且可以照原样使用。

[0229] 淬灭剂Q17可以基于描述于美国专利号5,342,974中的合成程序的改进版本进行制备。简而言之,将1mmol的1,4,5,8,-四氯蒽醌(纯化学科学,舒格兰,德克萨斯州)、0.10mmol的硫酸铜(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、5mmol的苯甲醇(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、5mmol的乙酸钾(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)、以及5mmol的3-(二甲基氨基)-1-丙胺(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)合并入10mL的2-

乙氧基乙醇(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)中。在氮气下,然后在130℃在密封容器中对搅拌的混合物加热10个小时。可以将所得悬浮液进行过滤,并且将滤液稀释于100mL的5% (w/v) 水性碳酸钾中。可以将所得沉淀物通过离心进行收集。将沉淀溶解于5mL的1-甲基-2-吡咯烷酮(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)和季化的烷基胺中,所述季化是通过将烷基胺混合于过量摩尔量的对甲苯磺酸甲酯(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)中并且在60℃搅拌6小时而实现的。将该溶液稀释于100mL的丙酮(西格玛-奥德里奇,圣路易斯,密苏里州)中,并且粗产物沉淀为蓝绿色固体。

[0230] 淬灭剂Q18可以根据来自F.Y. 蒋 (Kwong), 等人 (2002) 有机快报 (Org. Lett.), 第4卷, 第4期, 581-584和格里菲思 (Griffiths) 等人 (1999) 染料与颜料 (Dyes and Pigments), 42, 29-34) 的组合方法来制备。简而言之, 将1mmol的碘苯(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)、1.1mmol的N,N,N'-三甲基-1,3-丙二酰胺(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)、2mmol乙二醇(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)、0.10mmol碘化铜(I)(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)、以及2mmol的磷酸三钾(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)合并入5mL的异丙醇(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)中。将反应混合物回流24小时, 冷却至室温并且进行过滤。在减压下将溶剂进行蒸发。将一半的粗产物溶解于冷冰浴中的浓HCl(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)中。向该溶液中添加化学计量的亚硝酸钠(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州), 在5℃下保持温度。然后将混合物搅拌1小时, 并且添加饱和量的氯化钠(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)。可以将沉淀的亚硝基化的产物通过过滤进行收集。

[0231] 将化学计量的亚硝基化部分与非亚硝基化部分合并于乙酸酐中, 并且在室温下进行搅拌直至通过T.L.C. 分析判定为完成。将产物通过沉淀于乙醚(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)中来收集。然后将沉淀物重悬浮于1-甲基-2-吡咯烷酮(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)和季化的烷基胺中, 所述季化是通过将烷基胺混合于过量摩尔量的对甲苯磺酸甲酯中来实现。在室温下使混合物反应8小时, 并且然后将产物通过沉淀于乙醚(西格玛-奥德里奇, 圣路易斯, 密苏里州)中作为深绿色固体来收集。

[0232] 将荧光染料-淬灭剂溶液(参见表V, 引用分别在表I和II中鉴别的染料和淬灭剂)以在0.9% (w/v) NaCl中5μM荧光染料和50μM淬灭剂的浓度来配制。将来自一个物种的活细胞部分的等分试样与来自另一个物种的死细胞部分的等分试样合并入荧光染料-淬灭剂溶液中, 使得每一部分以1:100从其对应的储备浓度进行稀释。然后将所得混合的细胞悬浮液在室温孵育大约五分钟以对这些细胞进行染色。然后将一滴染色的细胞溶液放置在显微镜载玻片上, 并且使用对各个荧光染料适当的激发/发射滤光器在荧光显微镜(卡尔蔡司有限责任公司-索恩伍德, 纽约州)上成像。表V中在每个条目中概述了荧光染料和淬灭剂对、所使用的激发/发射滤光器、以及测试的微生物。

[0233] 表V

[0234]

实验 编号	荧光染料	淬灭剂	活的/死的微生物混合 物	激发/发射滤光器 (nm)
1	D9	Q19	活的-大肠杆菌 死的-金黄色葡萄球菌	激发-365 nm 发射-420-470 nm
2	D10	Q19	活的-白色念珠菌 死的-大肠杆菌	激发-365 nm 发射-420-470 nm
3	D18	Q16	活的-金黄色葡萄球菌 死的-大肠杆菌	激发-575-625 nm 发射-660-710 nm
4	D26	Q16	活的-大肠杆菌 死的-金黄色葡萄球菌	激发-575-625 nm 发射-660-710 nm
5	D42	Q16	活的-大肠杆菌 死的-金黄色葡萄球菌	激发-575-625nm 发射-660-710 nm

[0235] 针对表V中列出的每个荧光染料-淬灭剂对拍摄的相位对比和荧光两者的图像示出在图23A-J中,其中对于实验1,图23A和B分别对应于相位对比和荧光图像;对于实验2,图23C和D分别对应于相位对比和荧光图像;对于实验3,图23E和F分别对应于相位对比和荧光图像;对于实验4,图23G和H分别对应于相位对比和荧光图像;并且对于实验5,图23I和J分别对应于相位对比和荧光图像。在每个实验中,不可透过膜的结合核酸的淬灭剂被活细胞的完整细胞膜排除,产生明亮发荧光的易于区分的活细胞群体。然而,死细胞被结合核酸的淬灭剂渗透,由此允许荧光染料和淬灭剂共结合至死细胞中的核酸,产生暗色的非荧光的复合物。

[0236] 实例6-使用结合核酸的荧光探针和结合核酸的淬灭剂对活微生物进行成像

[0237] 该实例证实了有可能通过使用与结合核酸的不可透过膜的淬灭剂配伍的结合核酸的可透过膜的荧光染料对活微生物(大肠杆菌和金黄色葡萄球菌)进行选择性地染色和成像,并且然后使用落射荧光显微镜或在此描述的检测系统在活细胞得以在旋转膜上检测到的情况下对活细胞进行成像。

[0238] 通过从常规的培养皿挑取各自对应的微生物菌落并且将细胞转移至包含0.9% (w/v) NaCl的玻璃试管中,来制备活的和非活的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的细胞悬浮液。然后通过涡旋将这些细胞进行悬浮,并且然后进一步稀释于盐水中以给出等于2.0麦氏比浊标准的浊度。这些悬浮液充当活细胞部分。将各个活细胞部分的等分试样转移至单独的玻璃试管中,然后将该试管放置于80℃加热块中持续2个小时。将该试管从水浴中移除,并且允许其冷却至室温。这些热灭活的细胞悬浮液充当死细胞部分。

[0239] 将荧光染料-淬灭剂溶液(参见表VI,引用分别在表I和II中鉴别的染料和淬灭剂)以在10μM Tris、0.9% (w/v) NaCl (pH 7.4) 中5μM荧光染料和50μM淬灭剂的浓度来配制。对于表VI中的实验号1和2,将来自一个物种的活细胞部分的等分试样与来自另一个物种的死细胞部分的等分试样合并入荧光染料-淬灭剂溶液中,使得每一部分以1:100从其对应的储备浓度进行稀释。然后将所得混合的细胞悬浮液在室温孵育大约十五分钟以对这些细胞进行染色。然后将一滴染色的细胞溶液放置在显微镜载玻片上,并且使用对各个荧光染料适当的激发/发射滤光器在荧光显微镜(卡尔蔡司有限责任公司-索恩伍德,纽约州)上成像。

[0240] 为了使旋转膜上的活微生物成像,将来自大肠杆菌的活细胞部分的等分试样与来

自金黄色葡萄球菌的死细胞部分的等分试样悬浮于10 μ M Tris、0.9% (w/v) NaCl (pH 7.4) 的溶液中,并且然后通过图10A中描绘的包含镀金PET 0.45 μ m膜的组件进行过滤。然后将捕获在膜上的细胞暴露于2mL体积的荧光染料和淬灭剂溶液(参见,表VI,实验号3)中,并且在室温下孵育十五分钟以对这些细胞进行染色。通过真空过滤将染色溶液进行蒸发,并且将图10C中描绘的组件放置于图14A中描绘的固持件中,并且然后用图1A中描绘的检测系统进行成像,在该检测系统中该膜以大约5转/秒(300转/分)的速度旋转。表VI中概述了每个实验中的荧光染料和淬灭剂对、所使用的激发/发射滤光器、以及测试的微生物。

[0241] 表VI

实验 编号	荧光染料	淬灭剂	活的/死的微生物混合 物	激发/发射滤光器 (nm)
1	DI6	Q17	活的-金黄色葡萄球菌 死的-大肠杆菌	激发-575-625 nm 发射-660-710 nm
2	DI7	Q17	活的-大肠杆菌 死的-金黄色葡萄球菌	激发-575-625 nm 发射-660-710 nm
3	DI7	Q17	活的-大肠杆菌 死的-金黄色葡萄球菌	激发-640nm 发射-660 nm-690 nm

[0243] 对于表VI中列出的每个荧光染料-淬灭剂对拍摄的相位对比和荧光两者的图像列出在图24中,其中对于实验1,图24A和B分别对应于相位对比和荧光图像;对于实验2,图24C和D分别对应于相位对比和荧光图像;对于实验3,图24E对应于荧光图像。在每个实验中,不论成像技术是哪种(经由落射荧光显微镜或通过图1A中描绘的系统进行的检测),不可透过膜的结合核酸的淬灭剂被活细胞的完整细胞膜排除,产生明亮发荧光的易于区分的活细胞群体。然而,死细胞被结合核酸的淬灭剂渗透,产生暗色非荧光的复合物。

[0244] 通过引用结合

[0245] 出于所有目的,在此提及的专利文件和科技论文的每一个的完整披露通过引用结合于此。出于所有目的,美国临时专利申请序列号61/641,805、61/641,809、61/641,812、61/784,759、61/784,789、和61/784,807的完整说明通过引用结合于此。

[0246] 等效物

[0247] 本发明可以在不偏离其精神或实质特征的情况下以其他具体形式来实施。因此前述实施例应当在所有方面视为是说明性的而不是限制在此所述的本发明。不同实施例的各种结构元件和披露的各种方法步骤可以按照不同组合和排列来使用,并且所有此类变体应视为本发明的形式。因此本发明的范围是由所附权利要求书而不是前述说明书指示的,属于权利要求书的含义和等效范围内的所有变化预期被包含在其中。

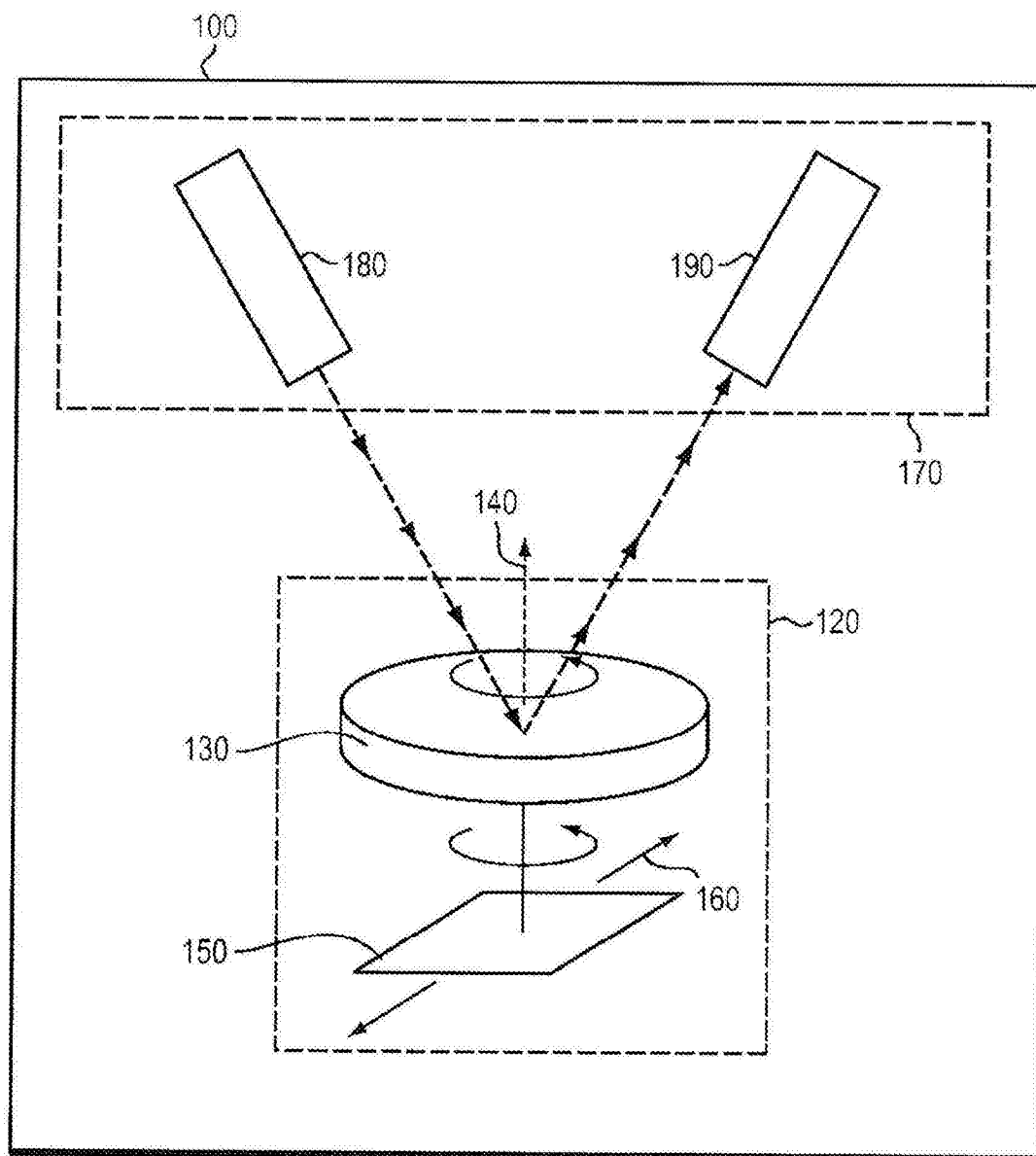


图1A

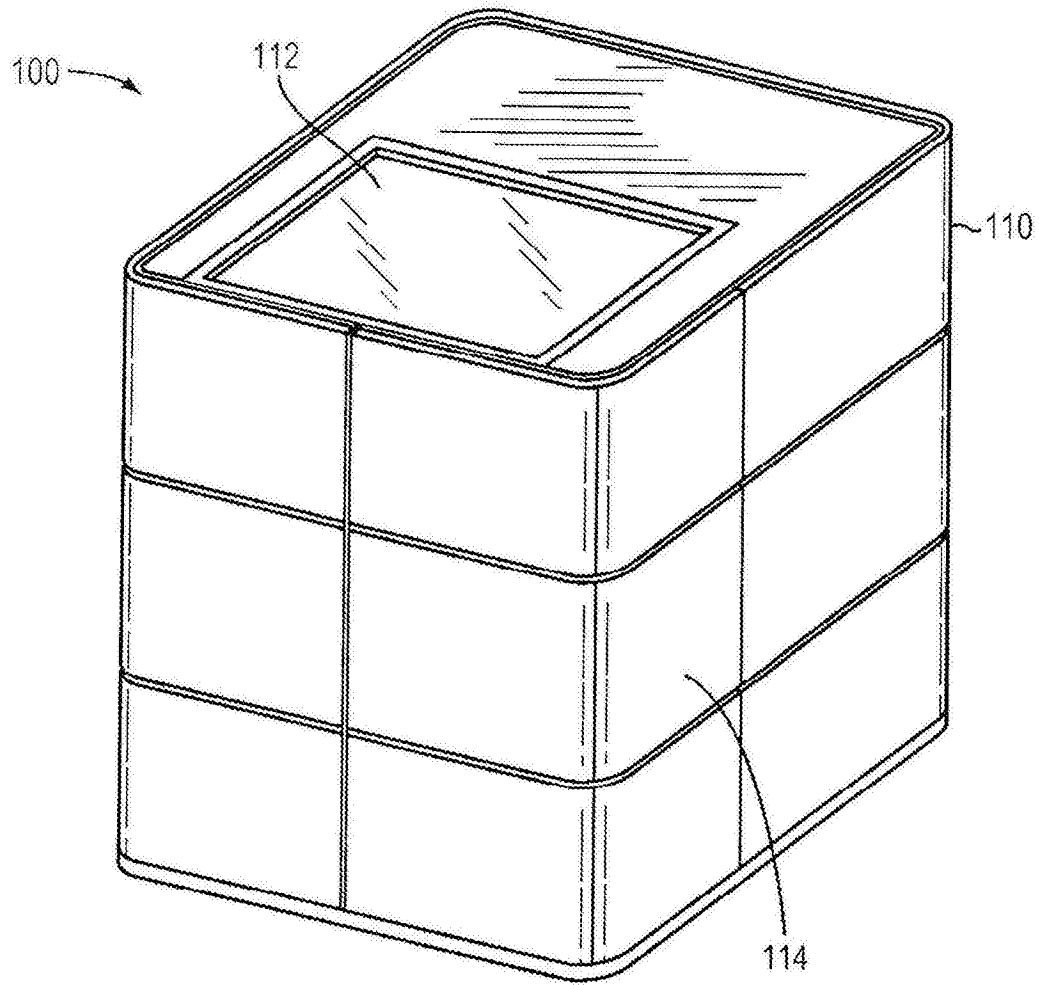


图1B

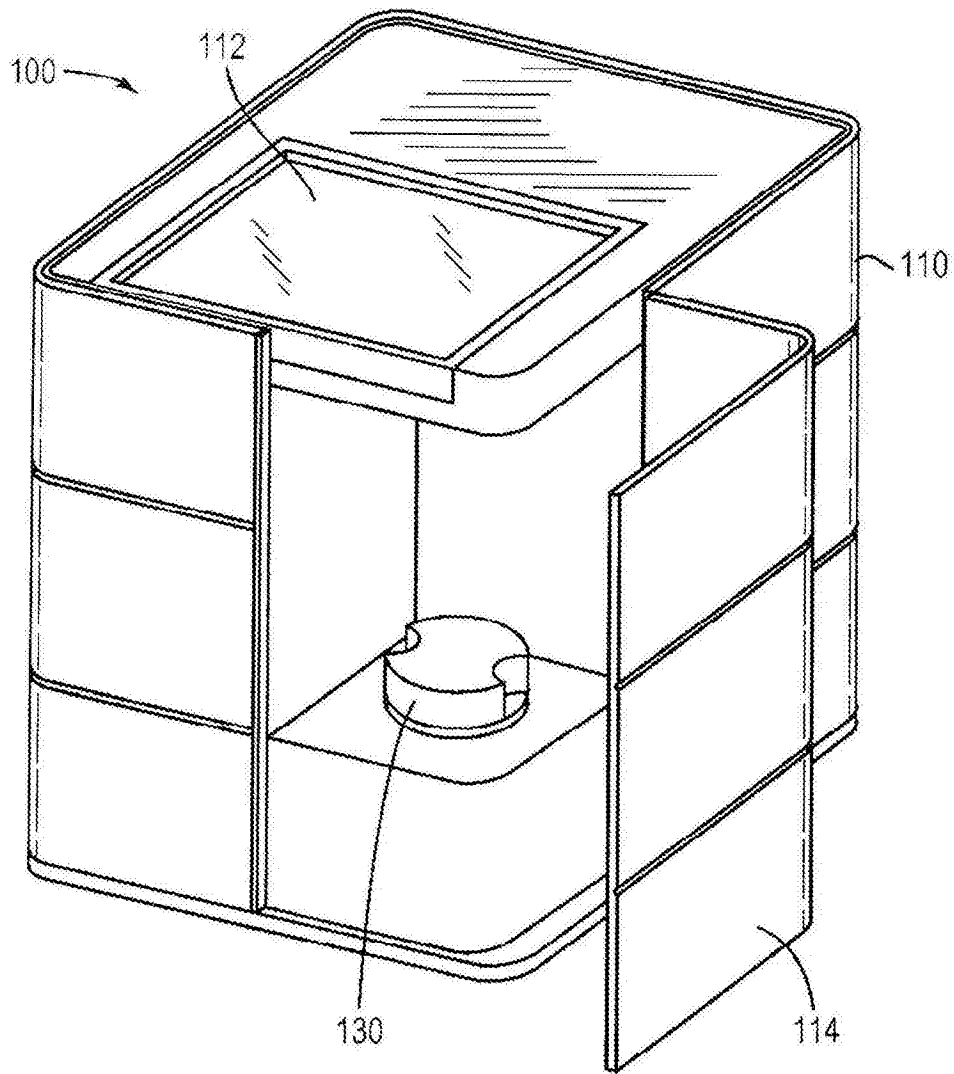


图1C

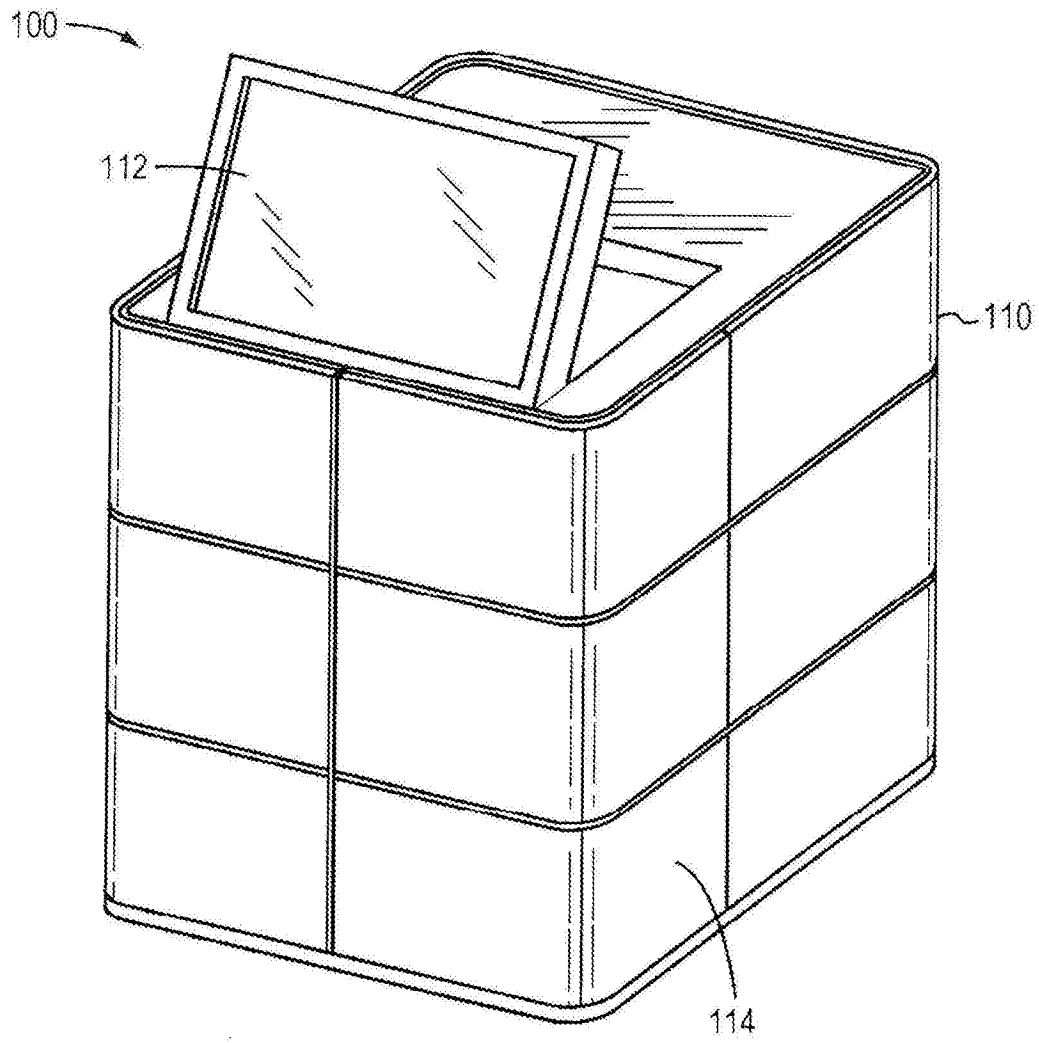


图1D

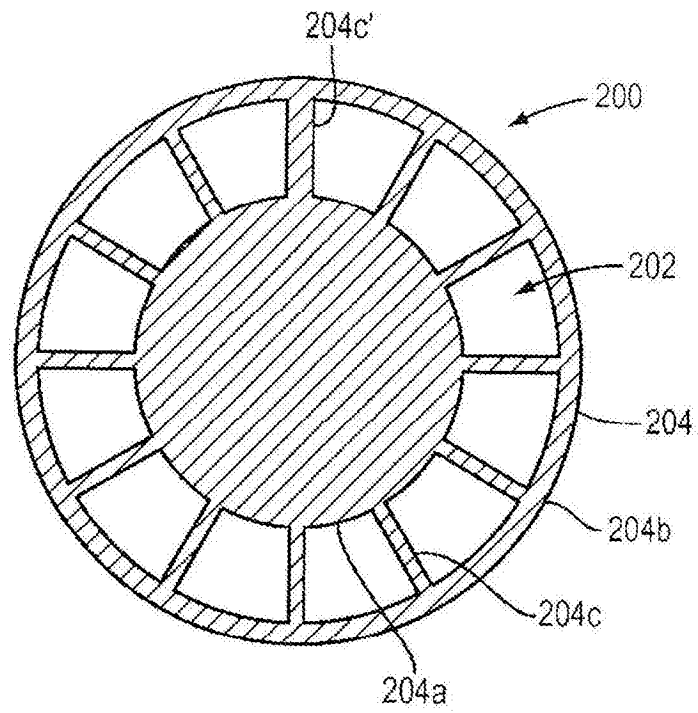


图2A

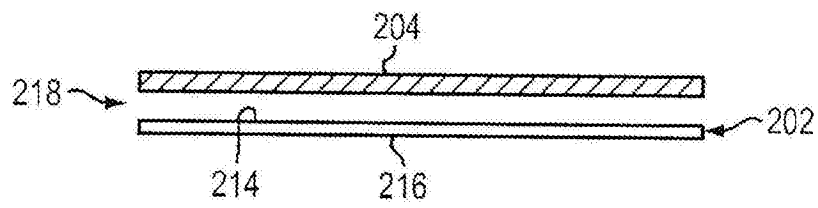


图2B

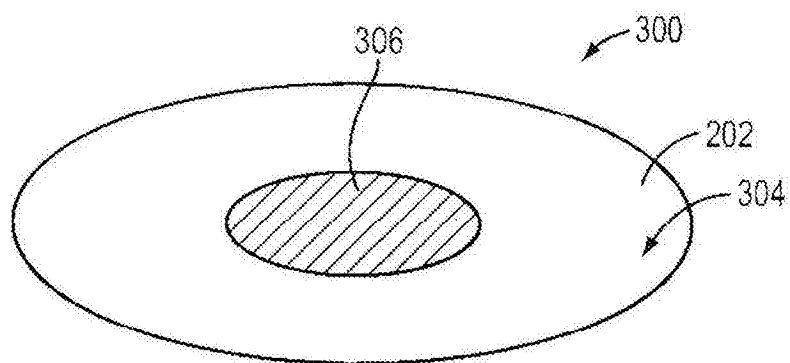


图3A

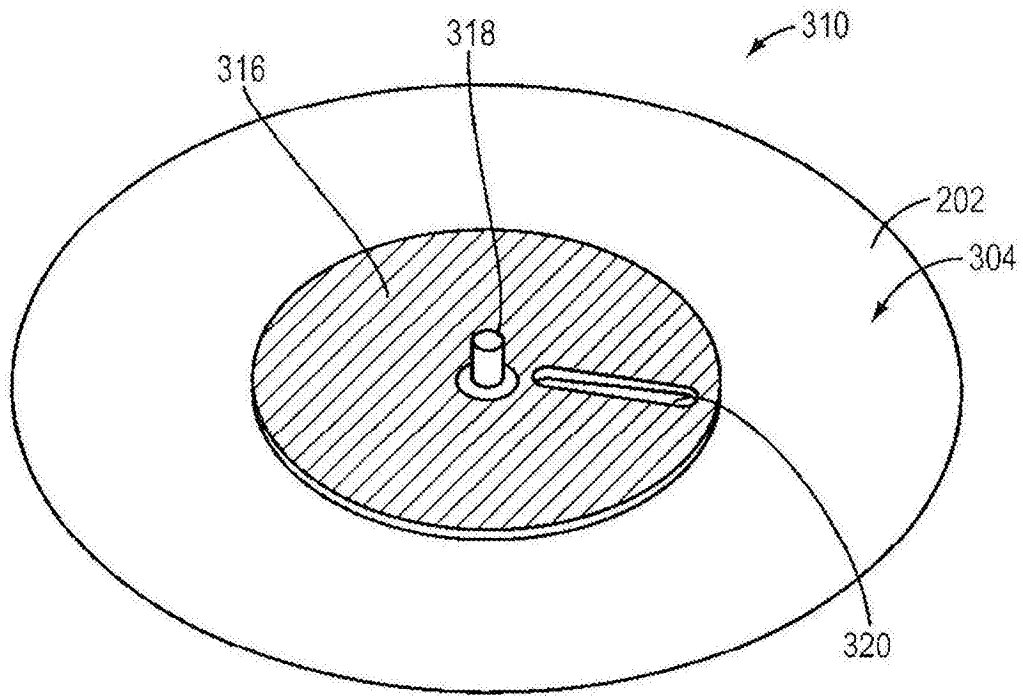


图3B

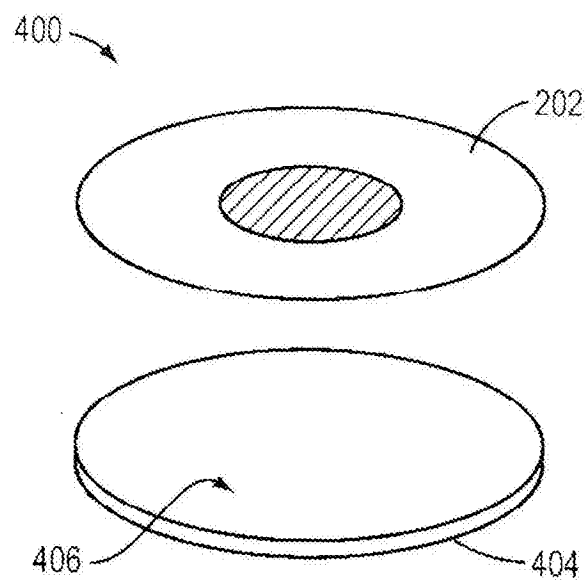


图4A

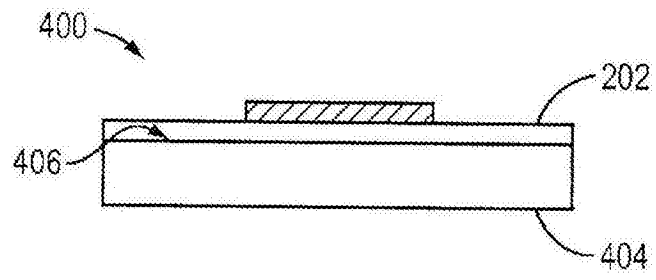


图4B

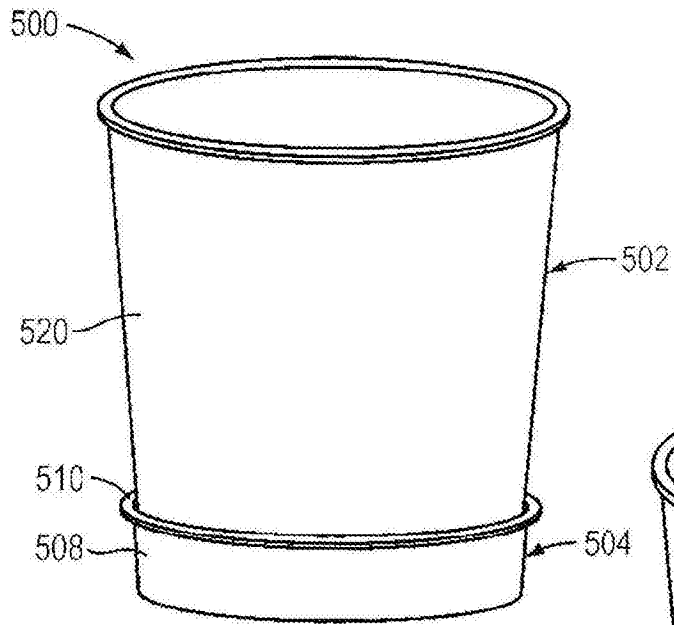


图5A

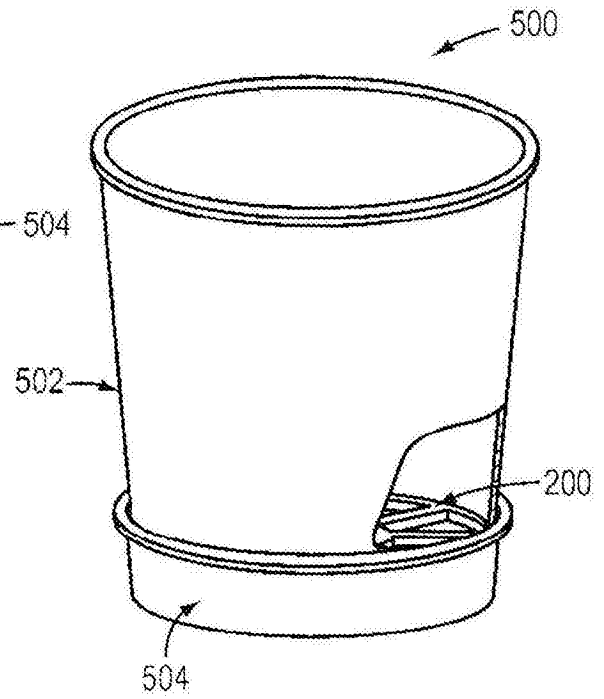


图5B

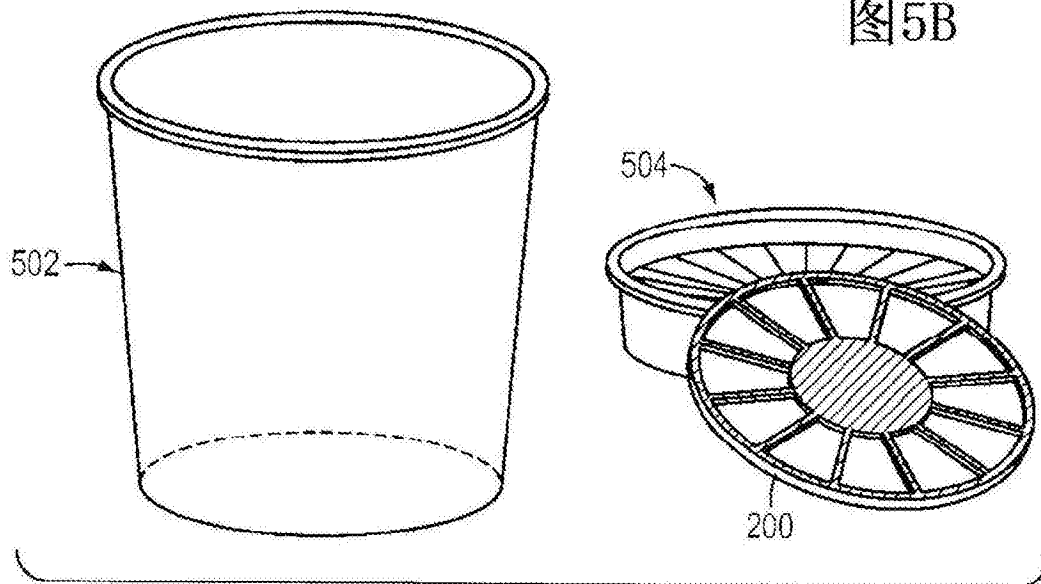


图5C

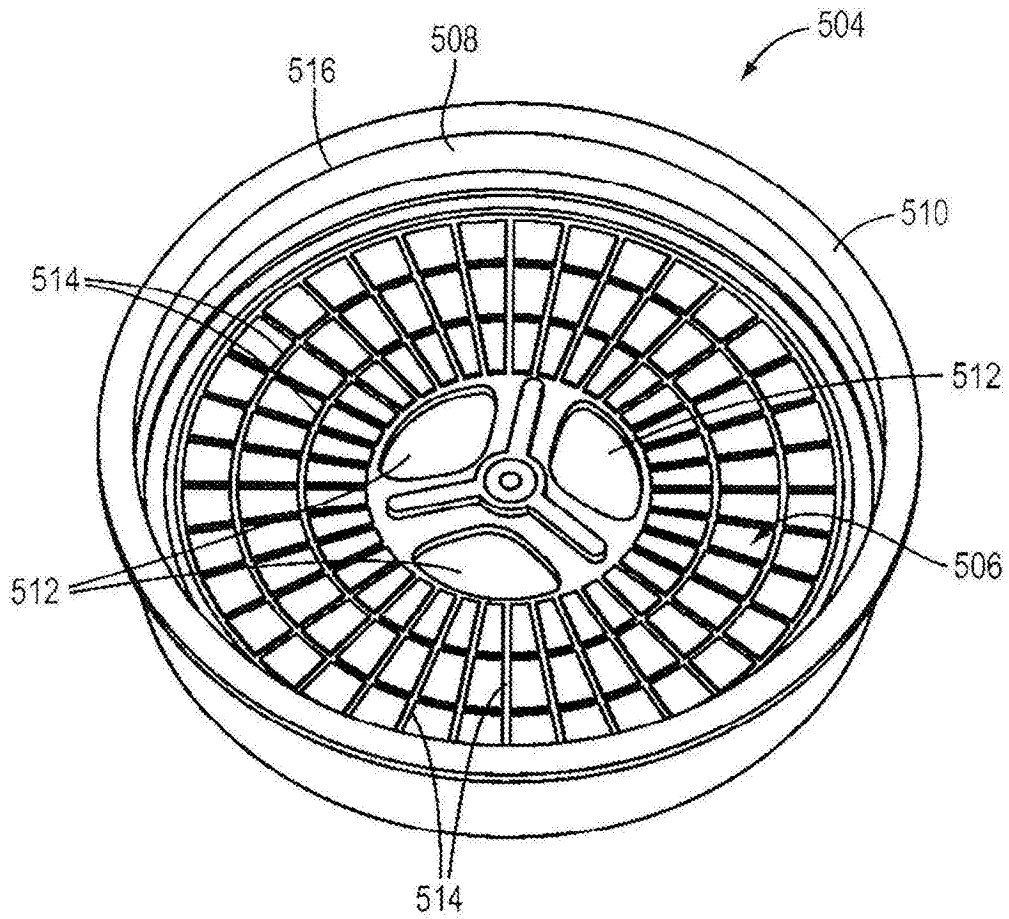


图5D

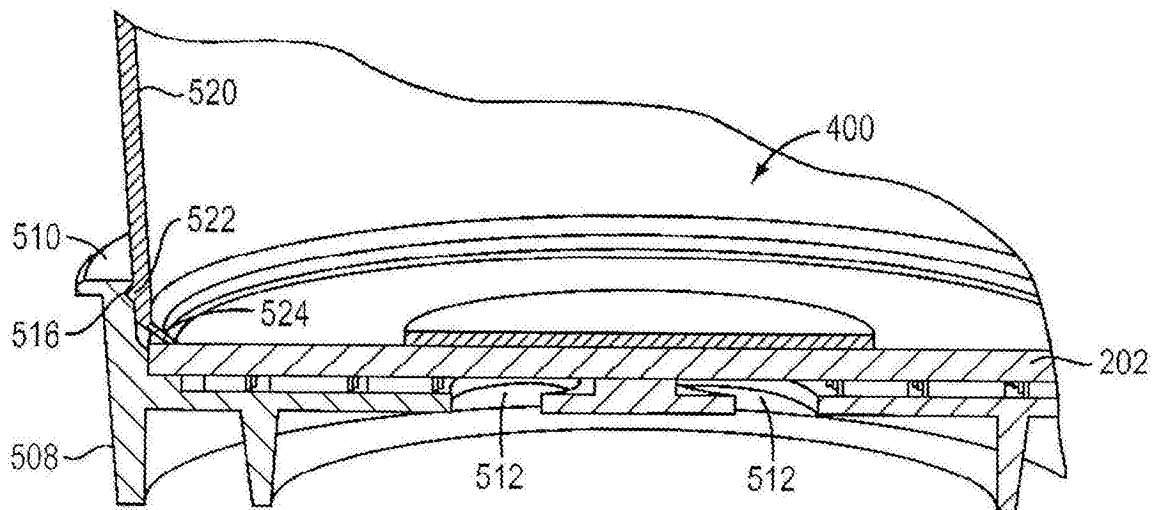


图5E

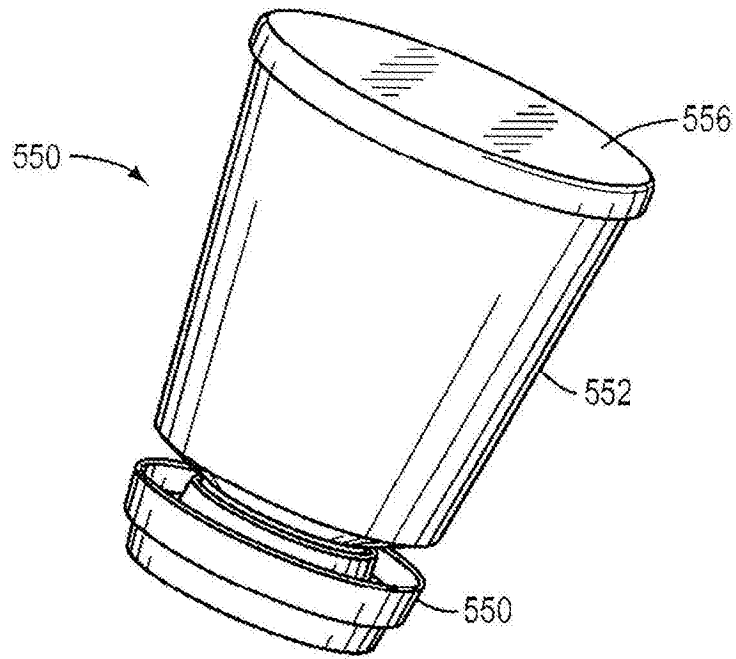


图6A

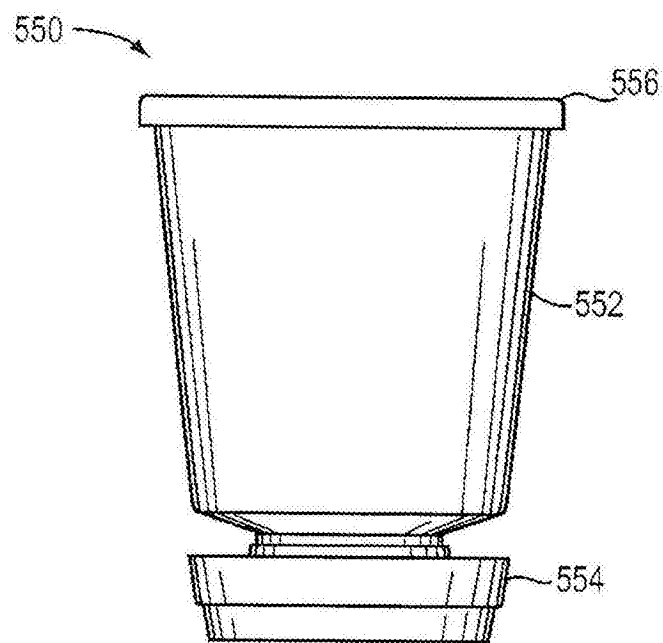


图6B

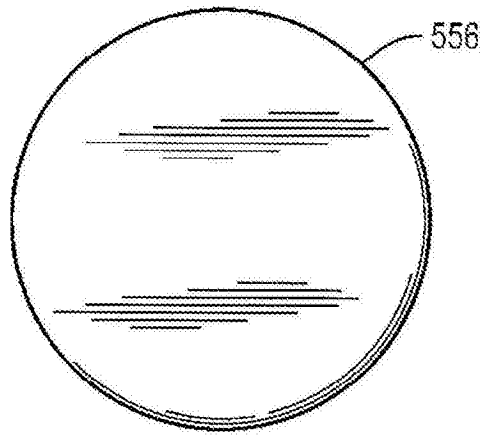


图6C

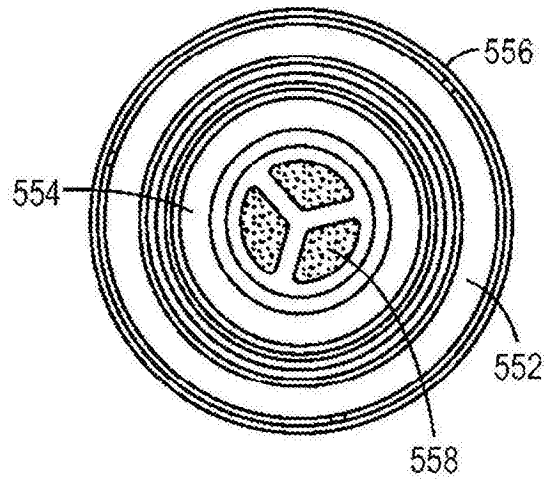


图6D

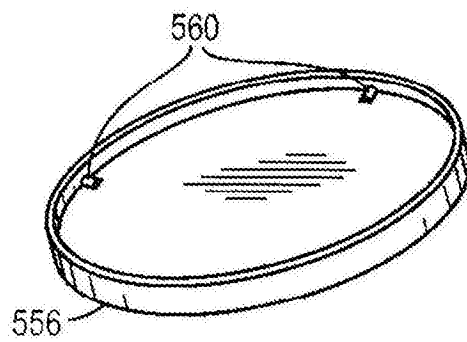


图6E



图6F

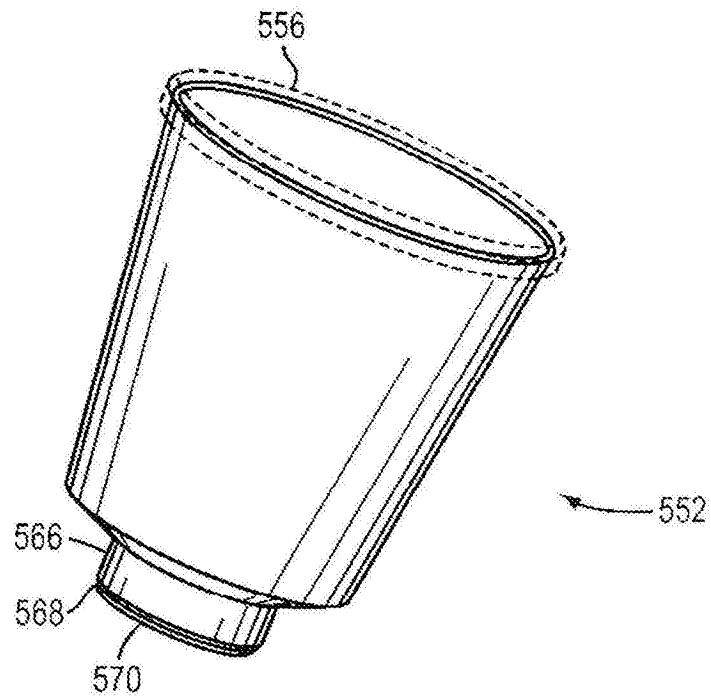


图7A

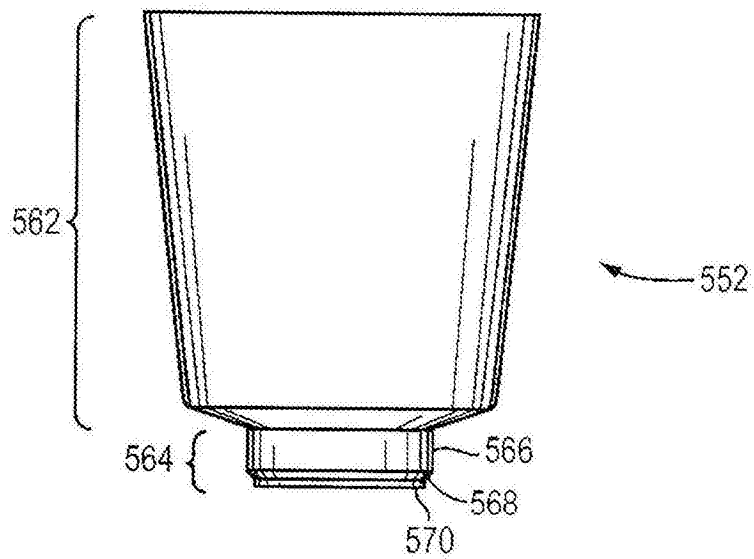


图7B

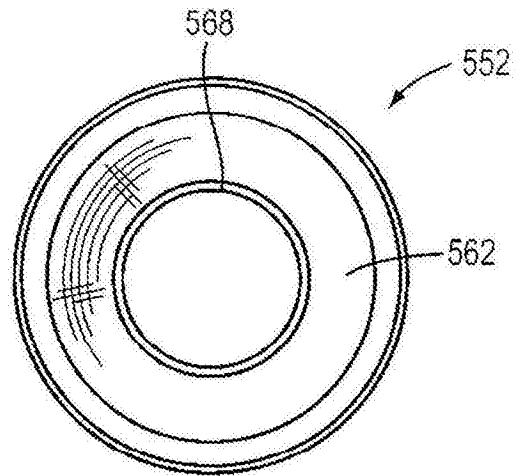


图7C

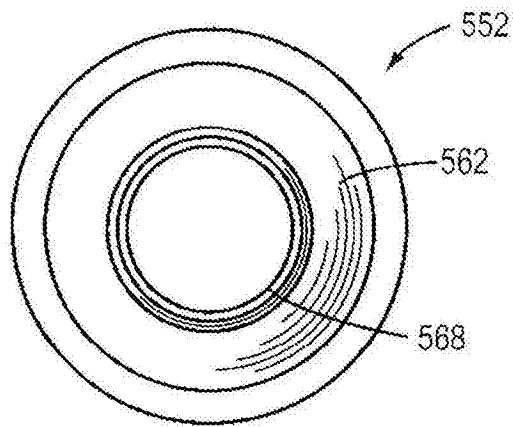


图7D

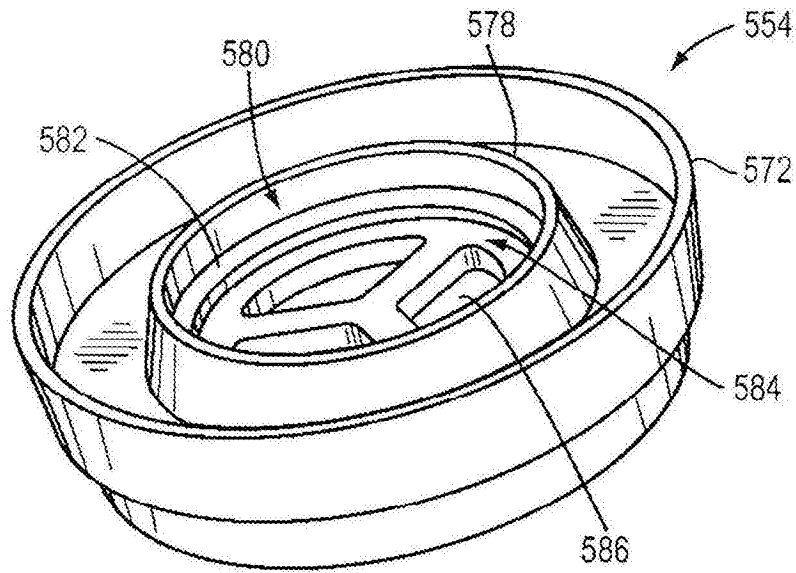


图8A

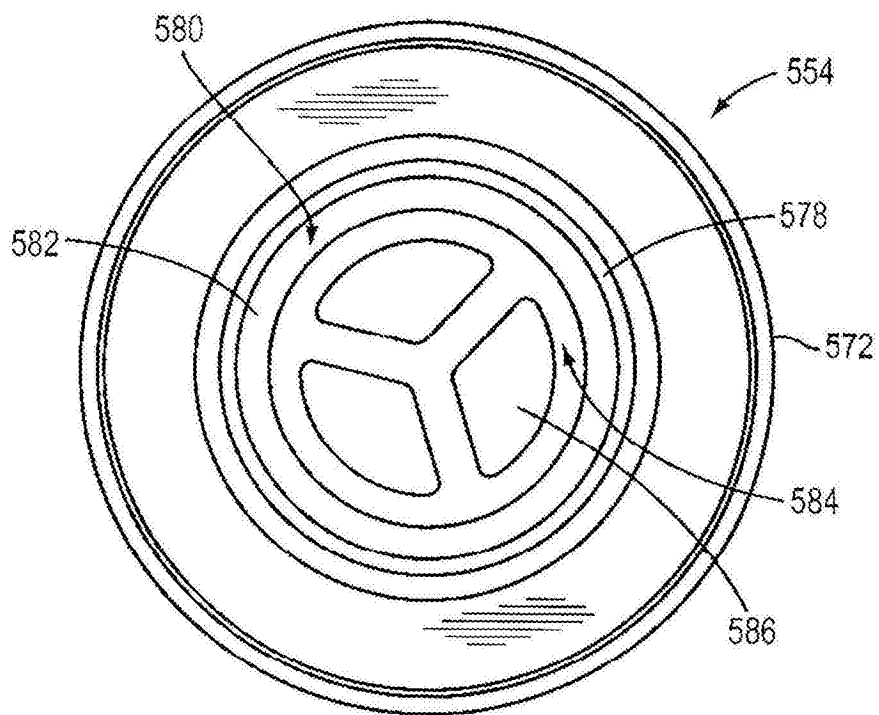


图8B

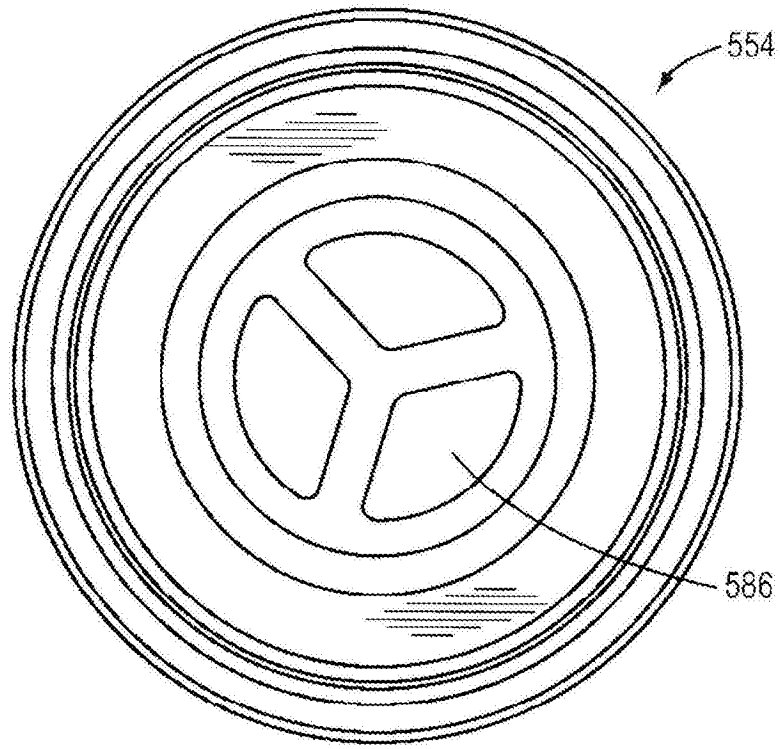


图8C

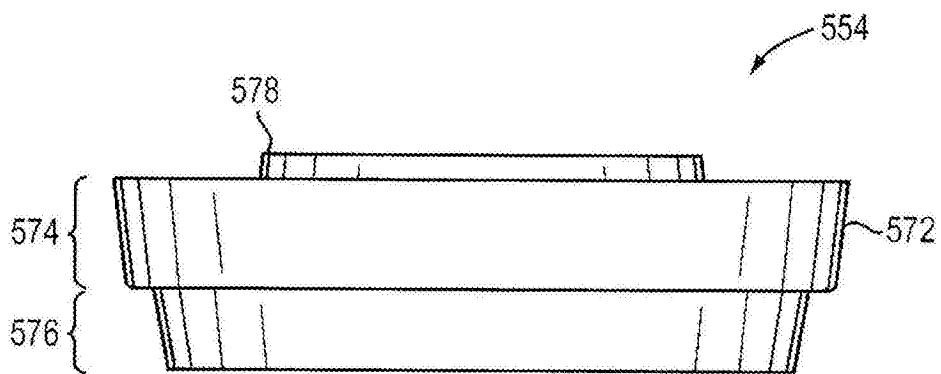


图8D

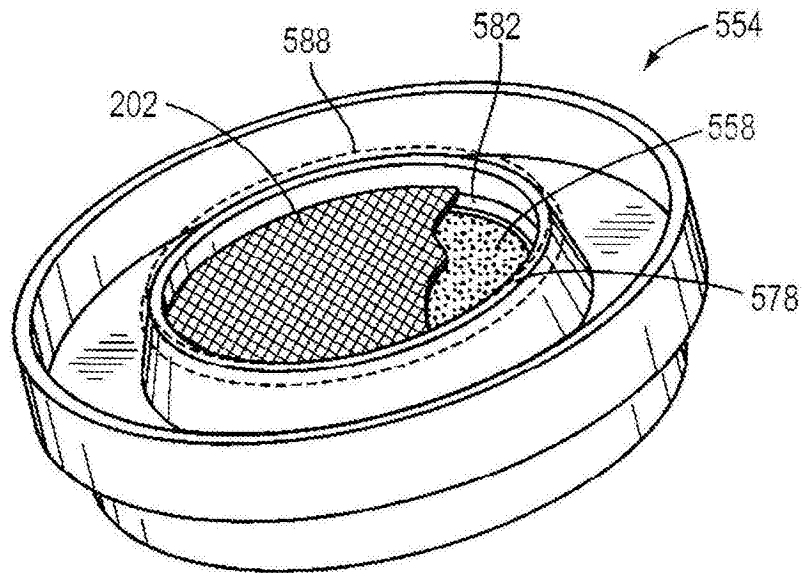


图9A

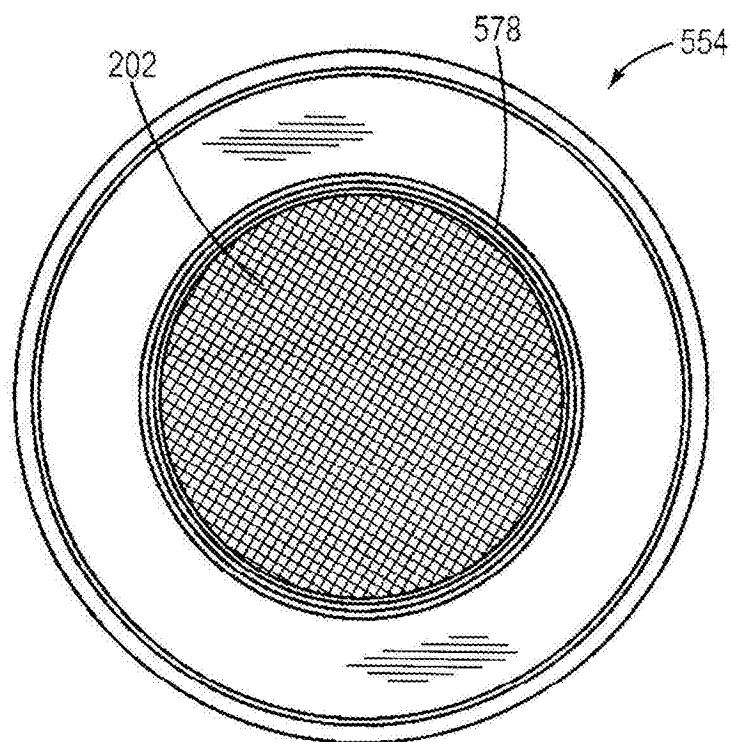


图9B

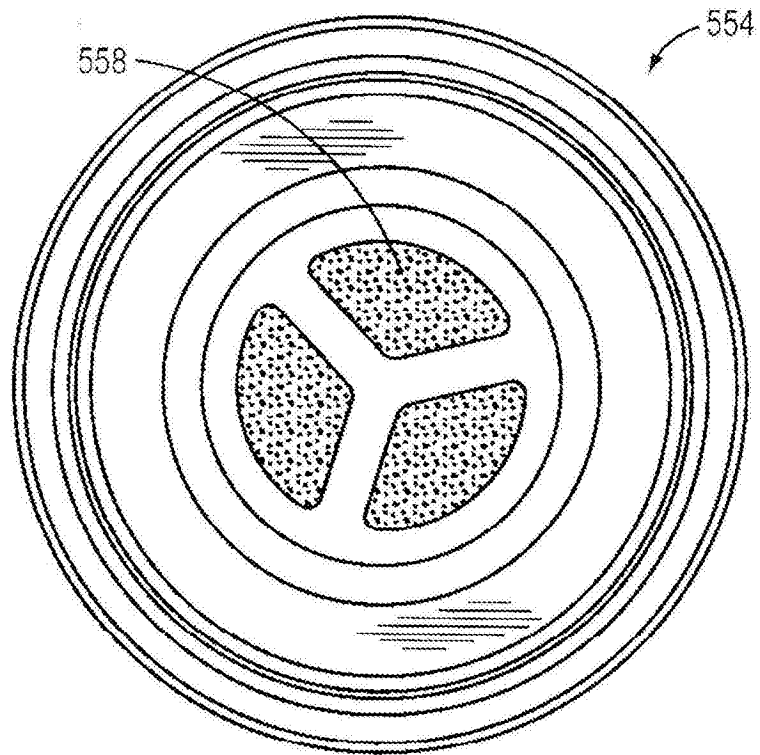


图9C

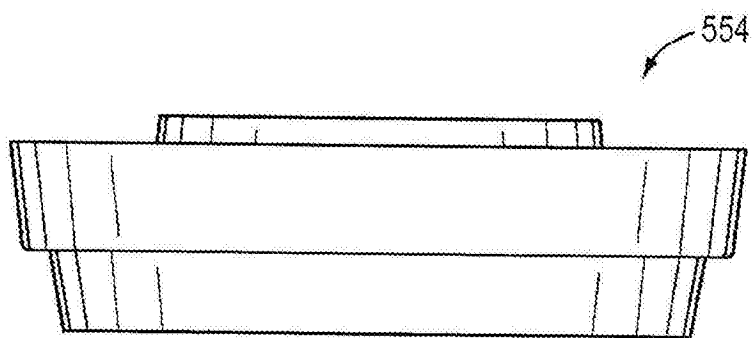


图9D

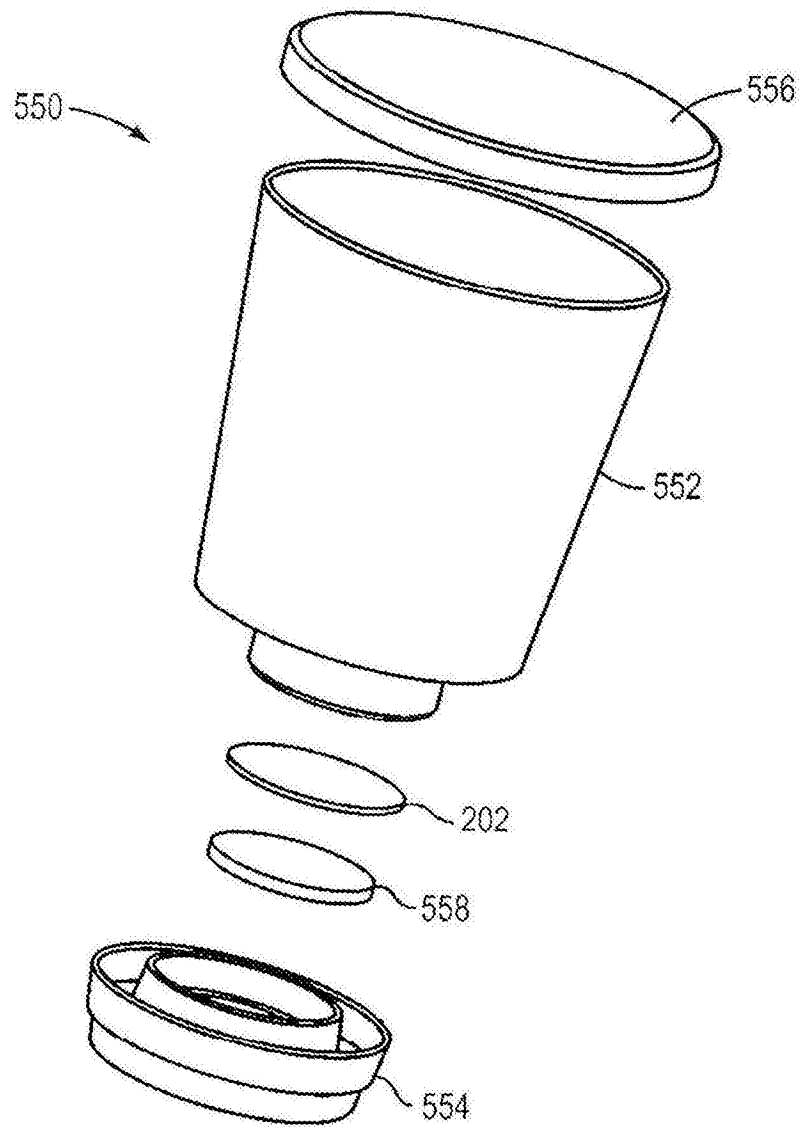


图10A

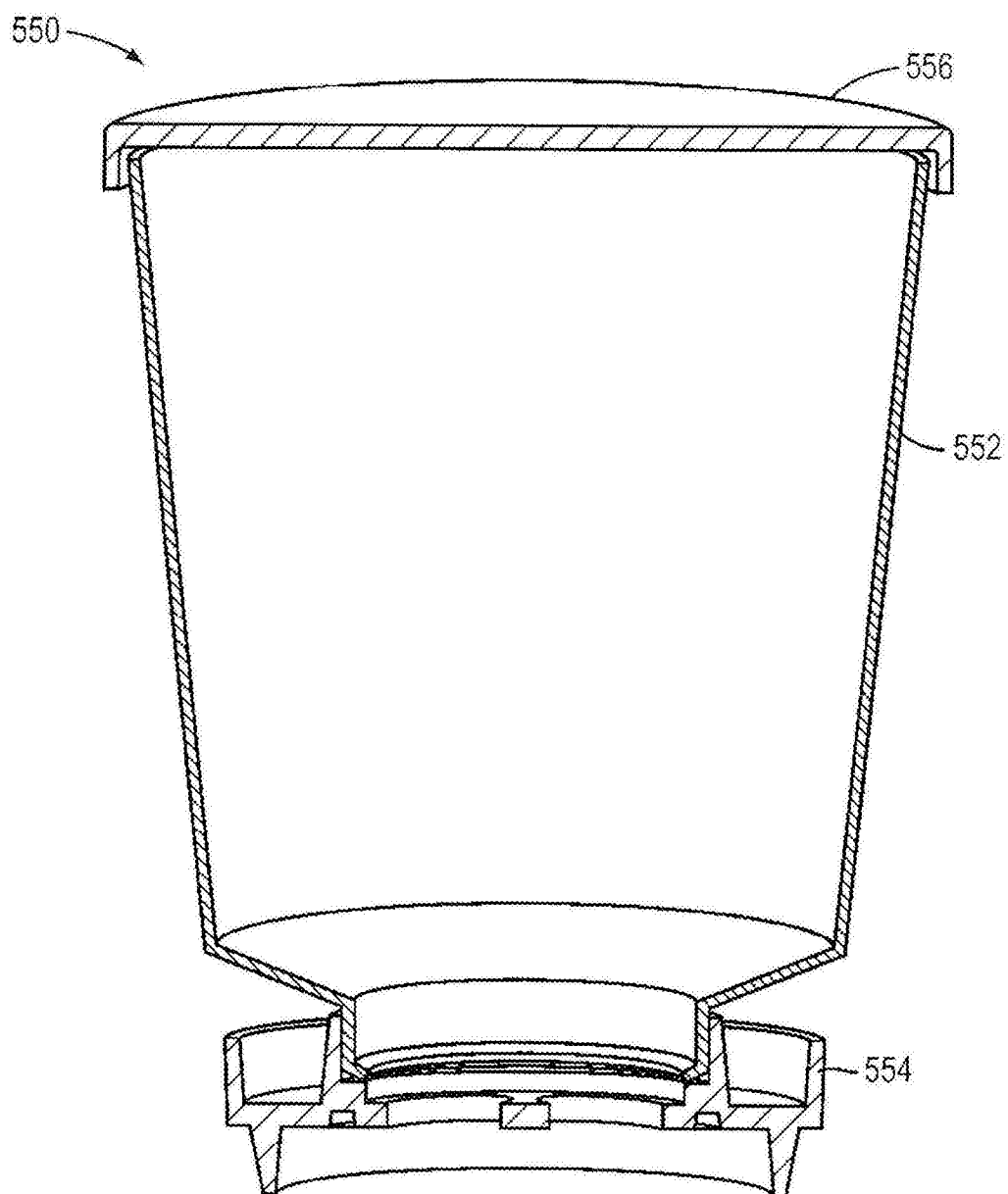


图10B

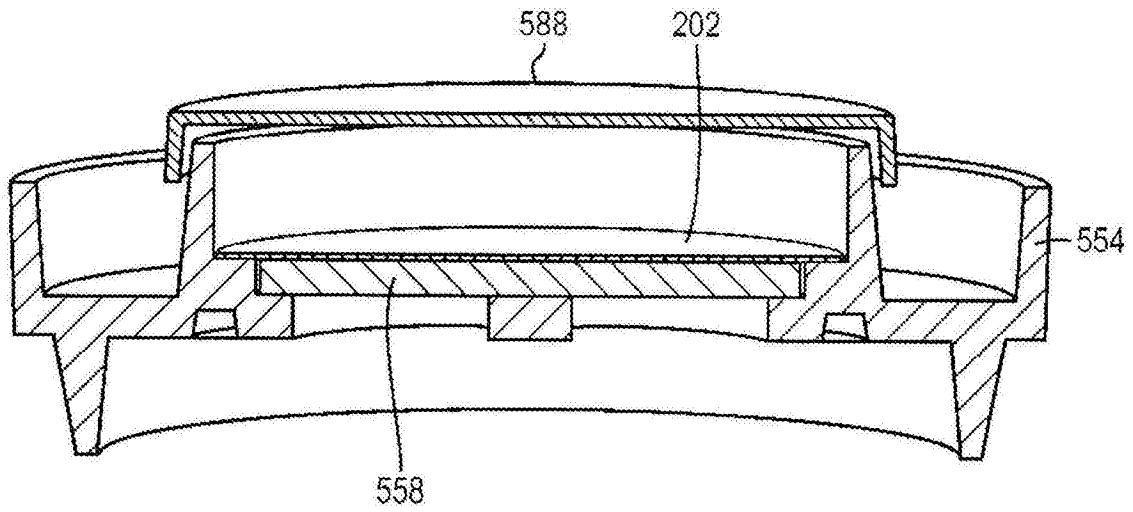


图10C

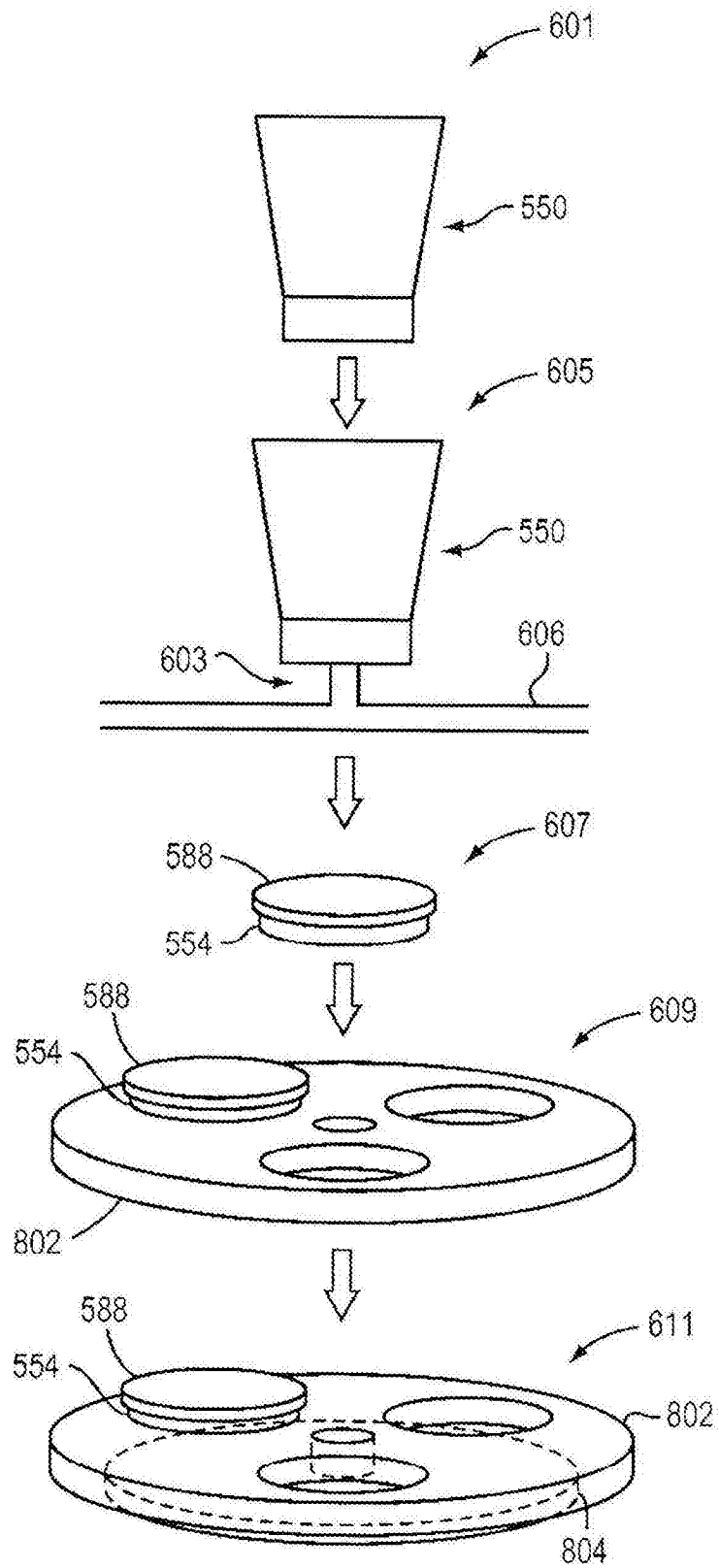


图11A

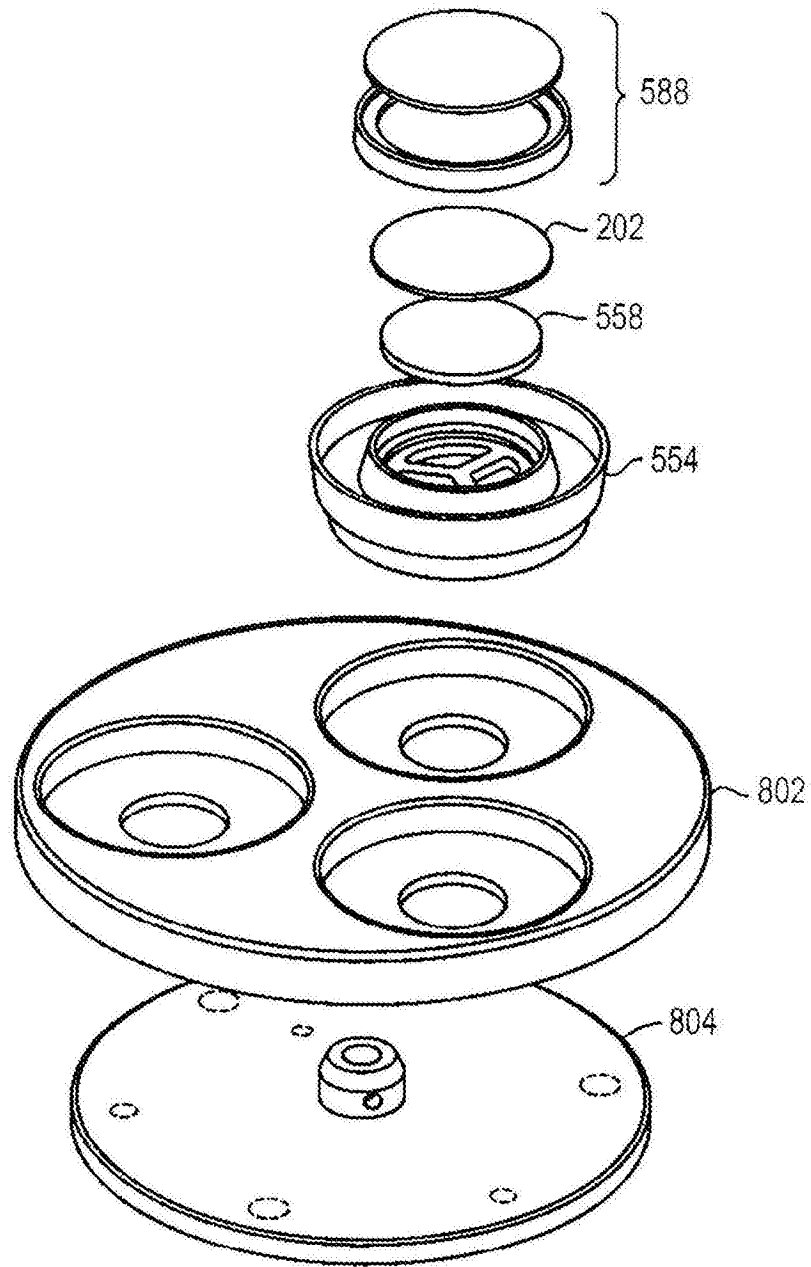


图11B

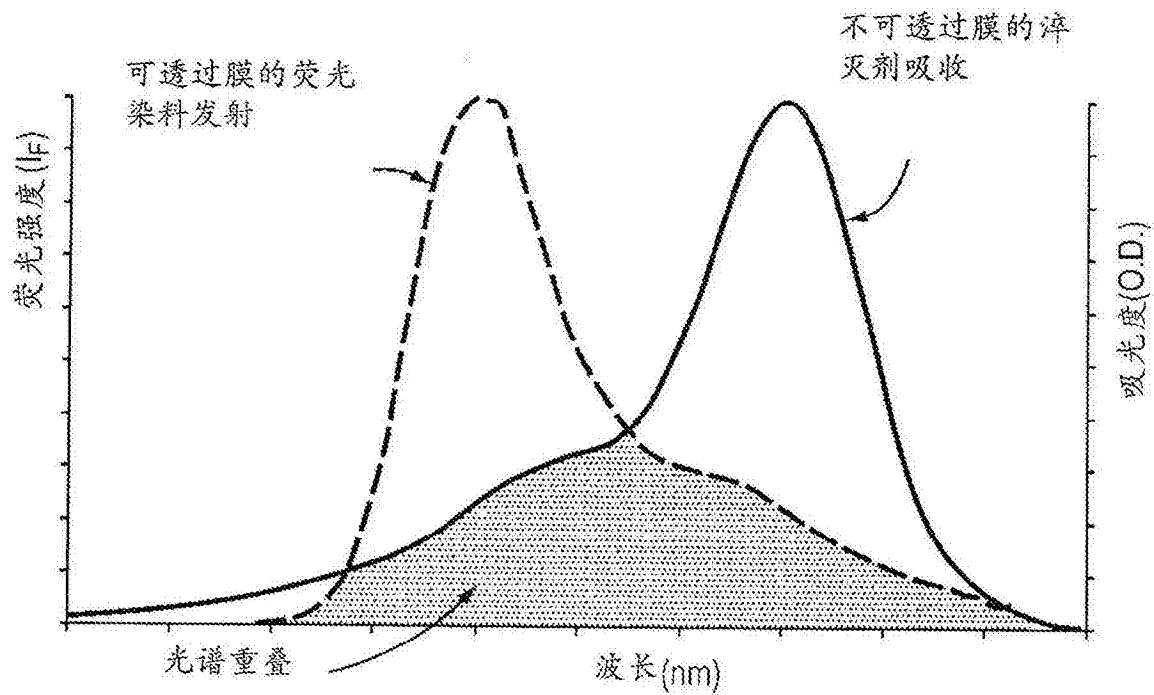


图12A

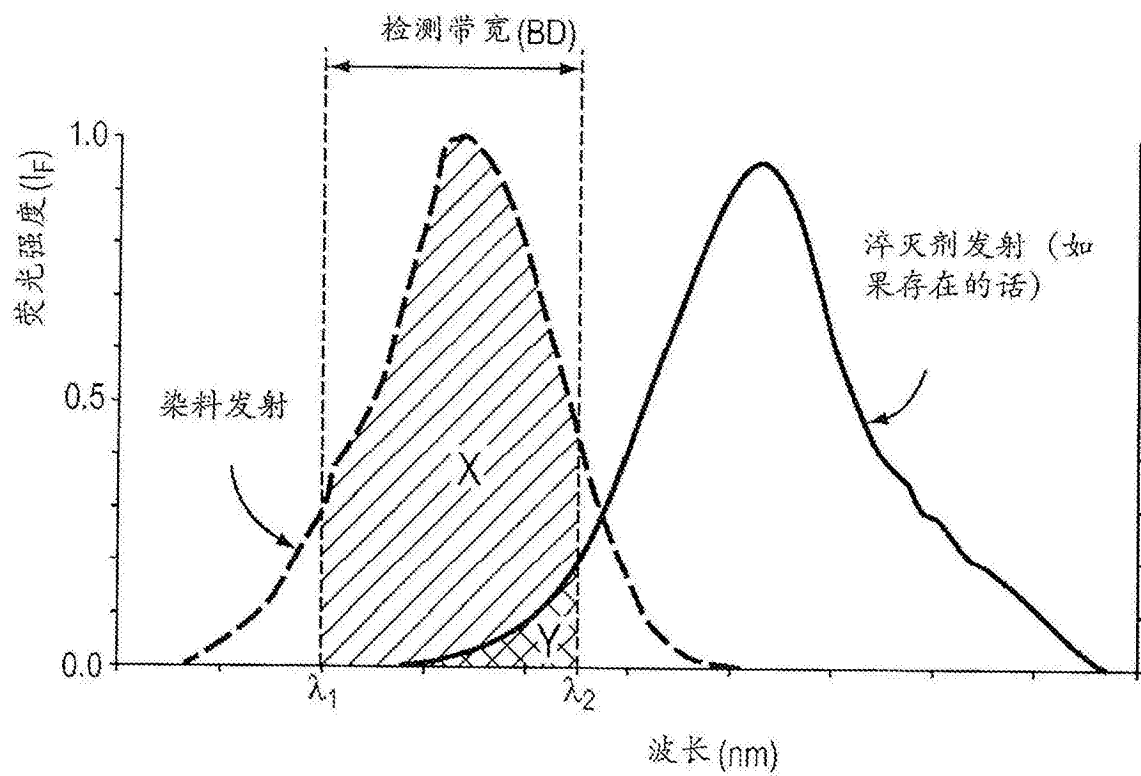


图12B

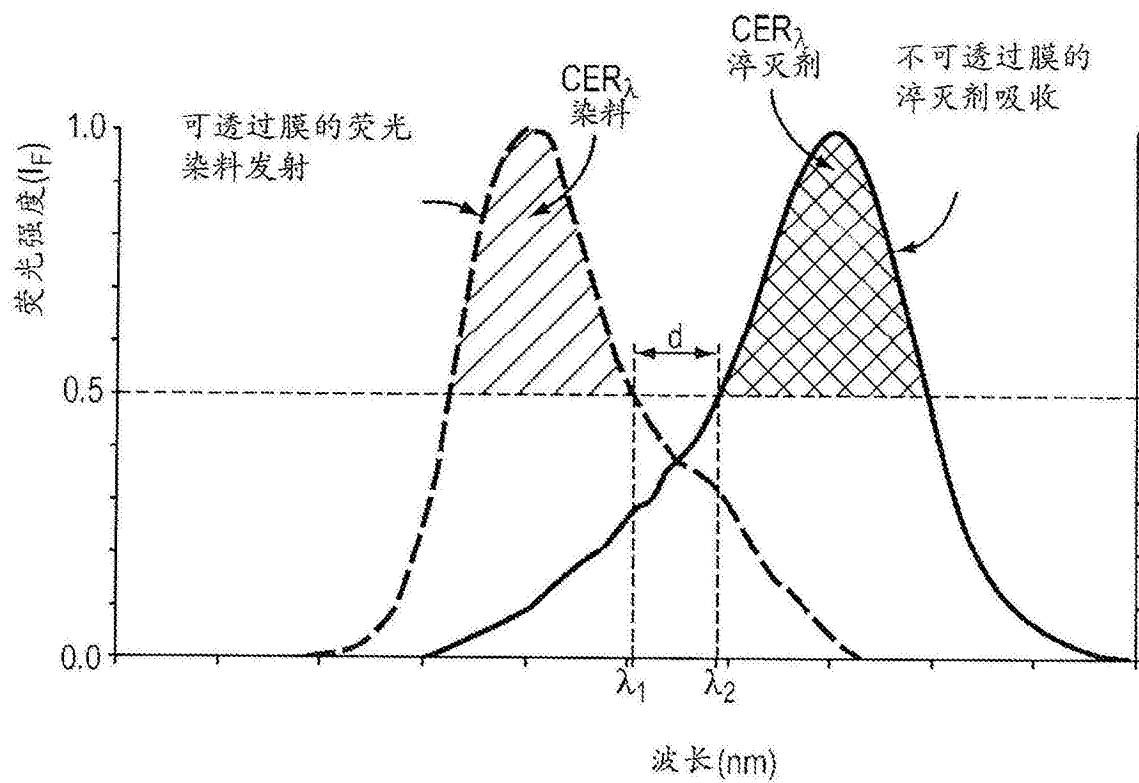


图12C

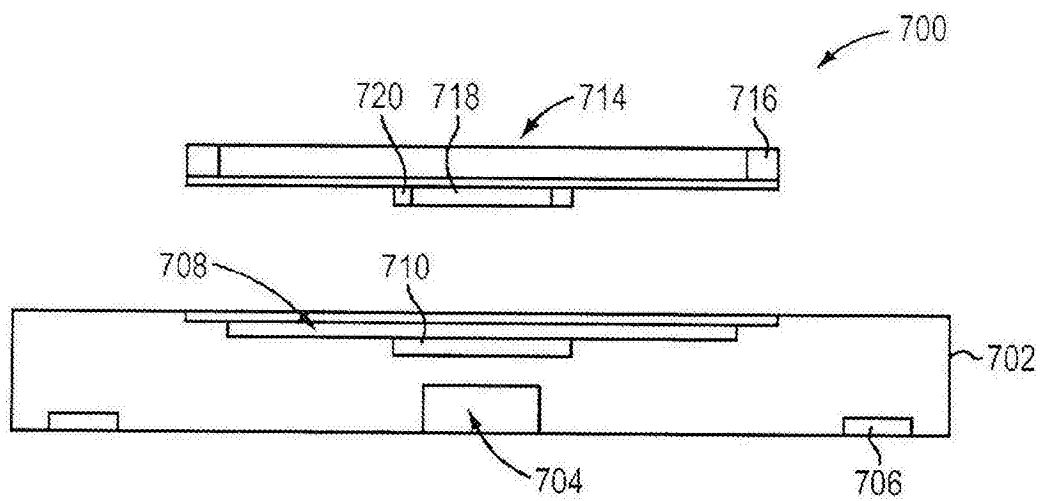


图13A

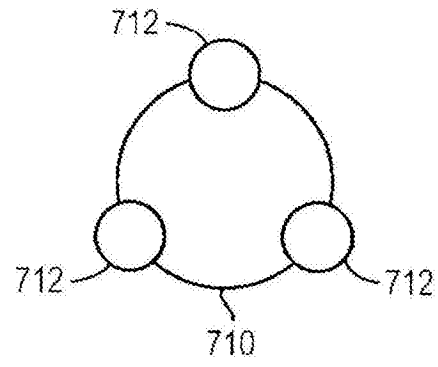


图13B

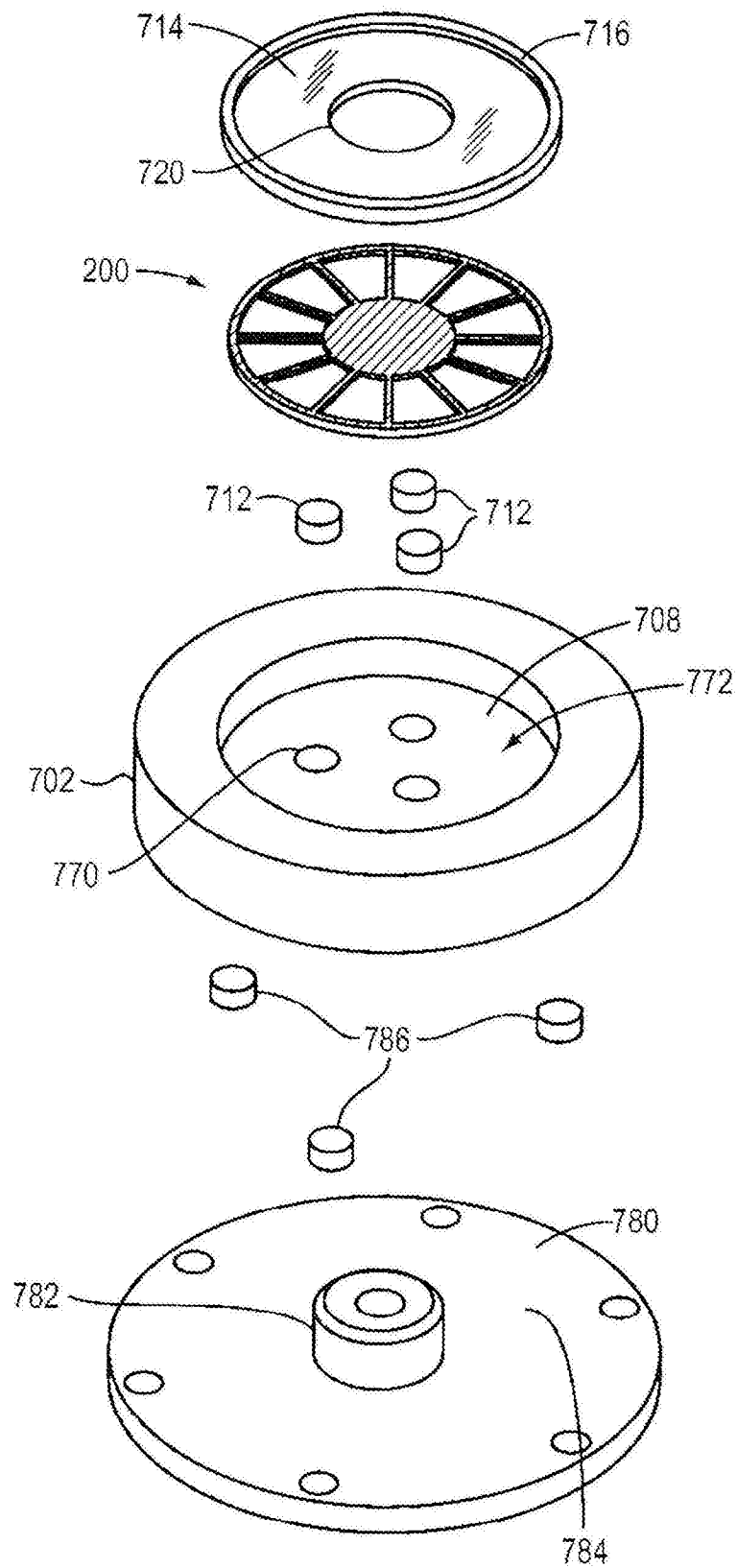


图13C

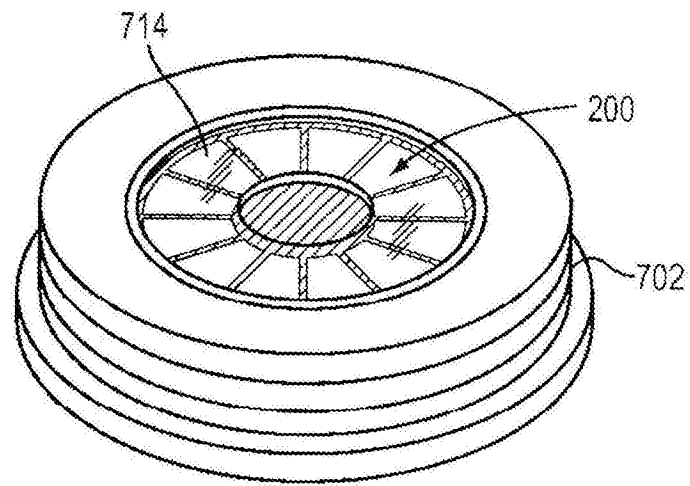


图13D

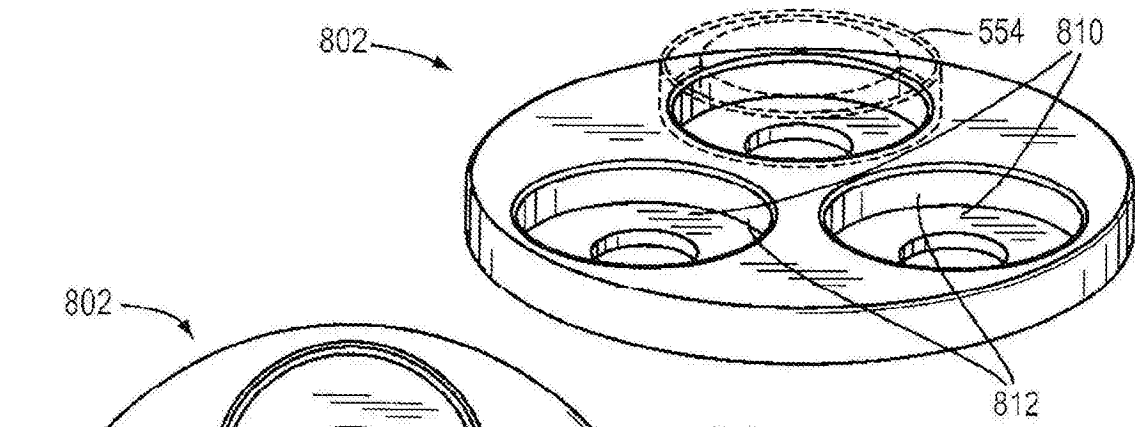


图14A

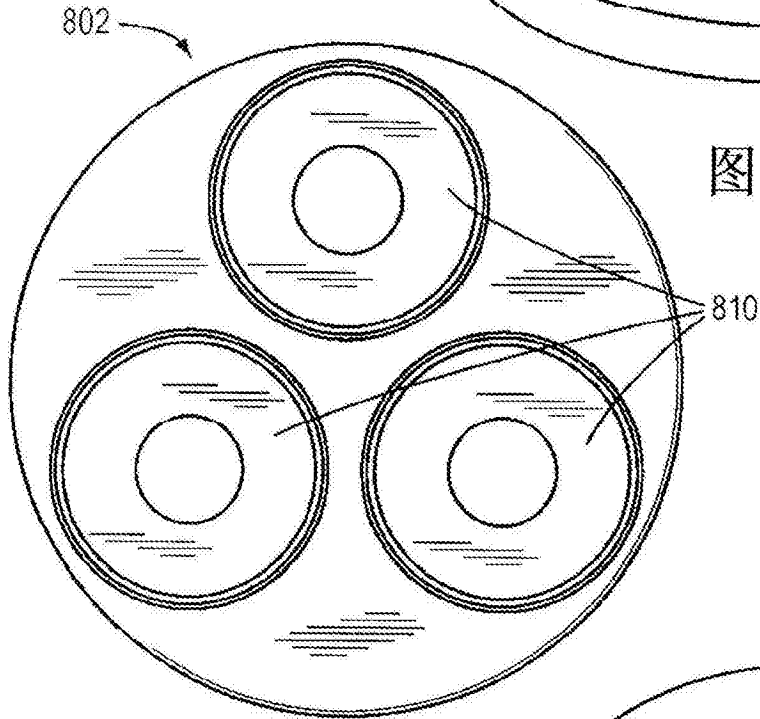


图14B

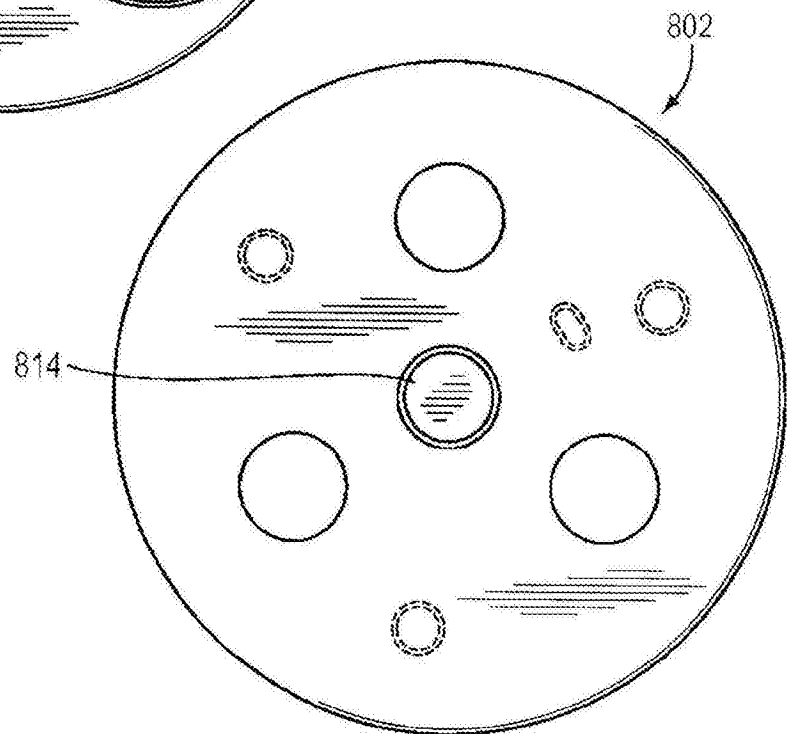


图14C

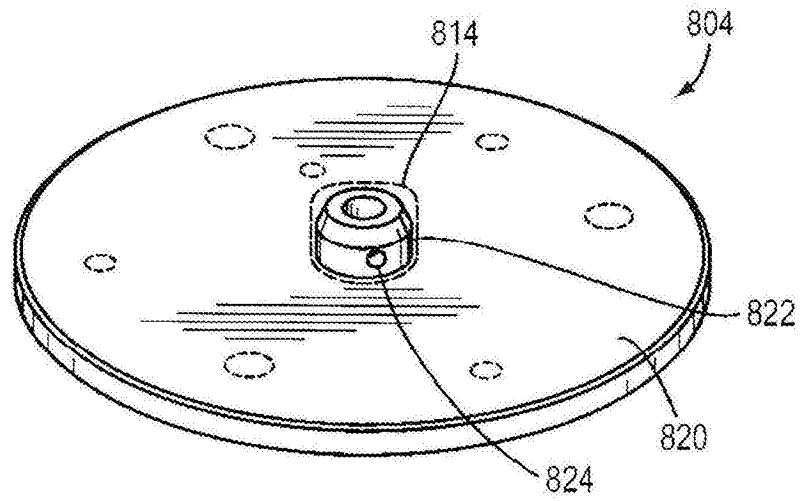


图15A

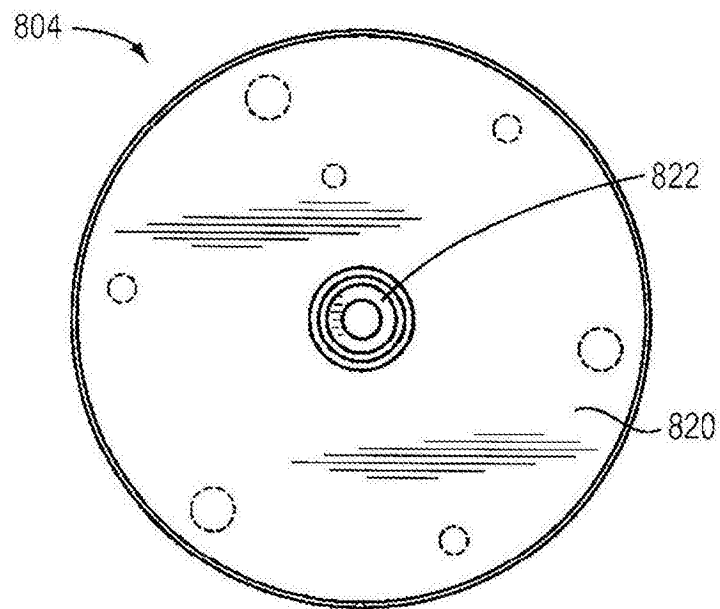


图15B

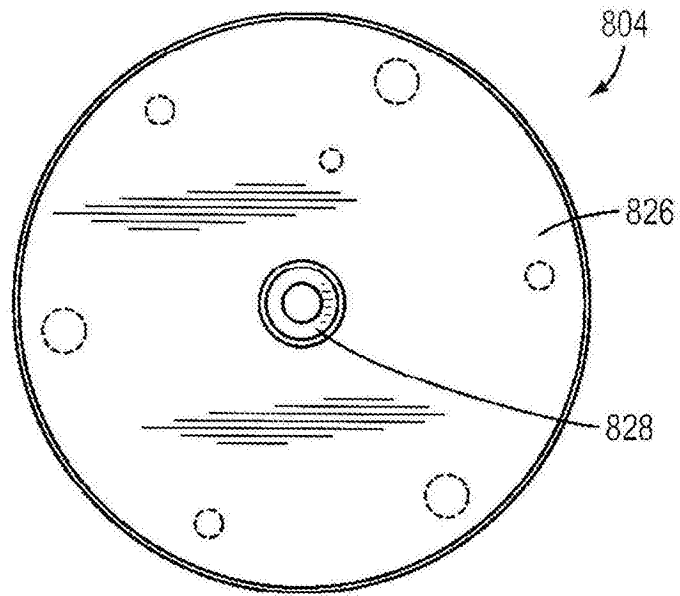


图15C

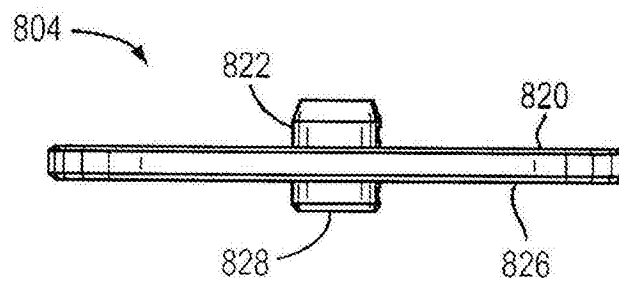


图15D

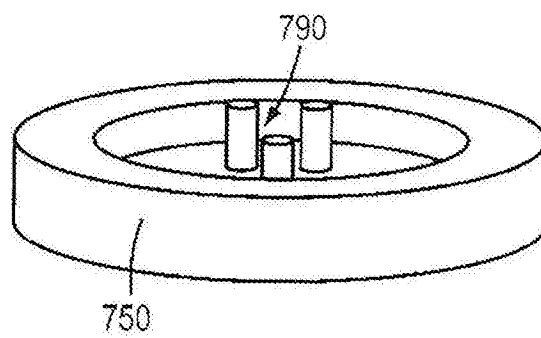


图16A

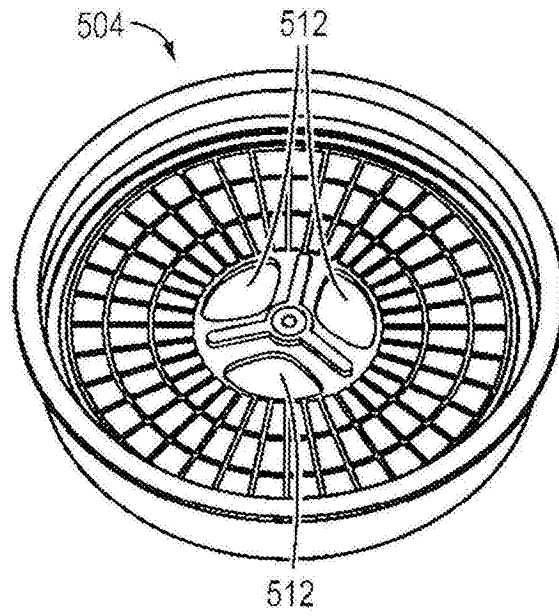


图16B

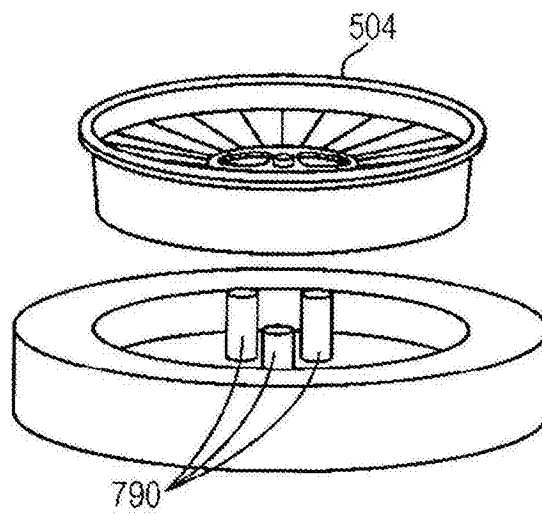


图16C

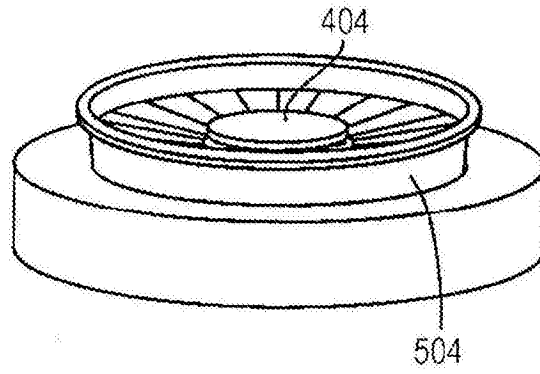


图16D

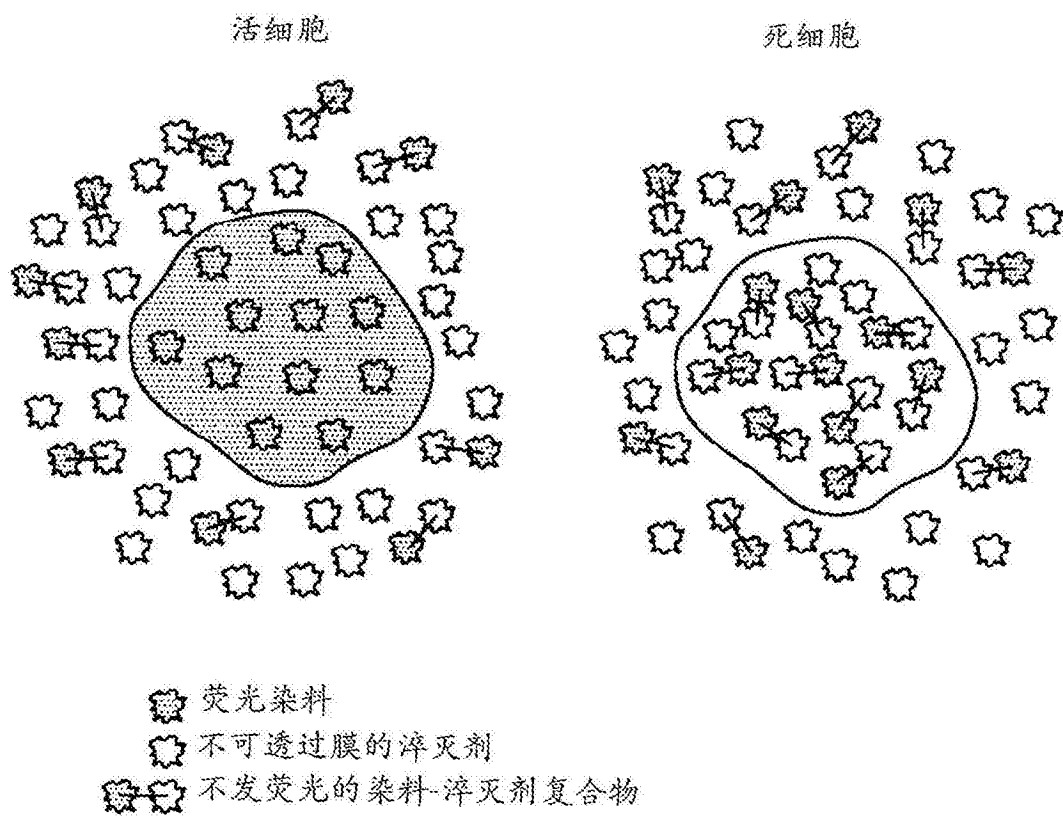


图17A

活细胞与死细胞的区别

结合核酸的荧光染料和淬灭剂

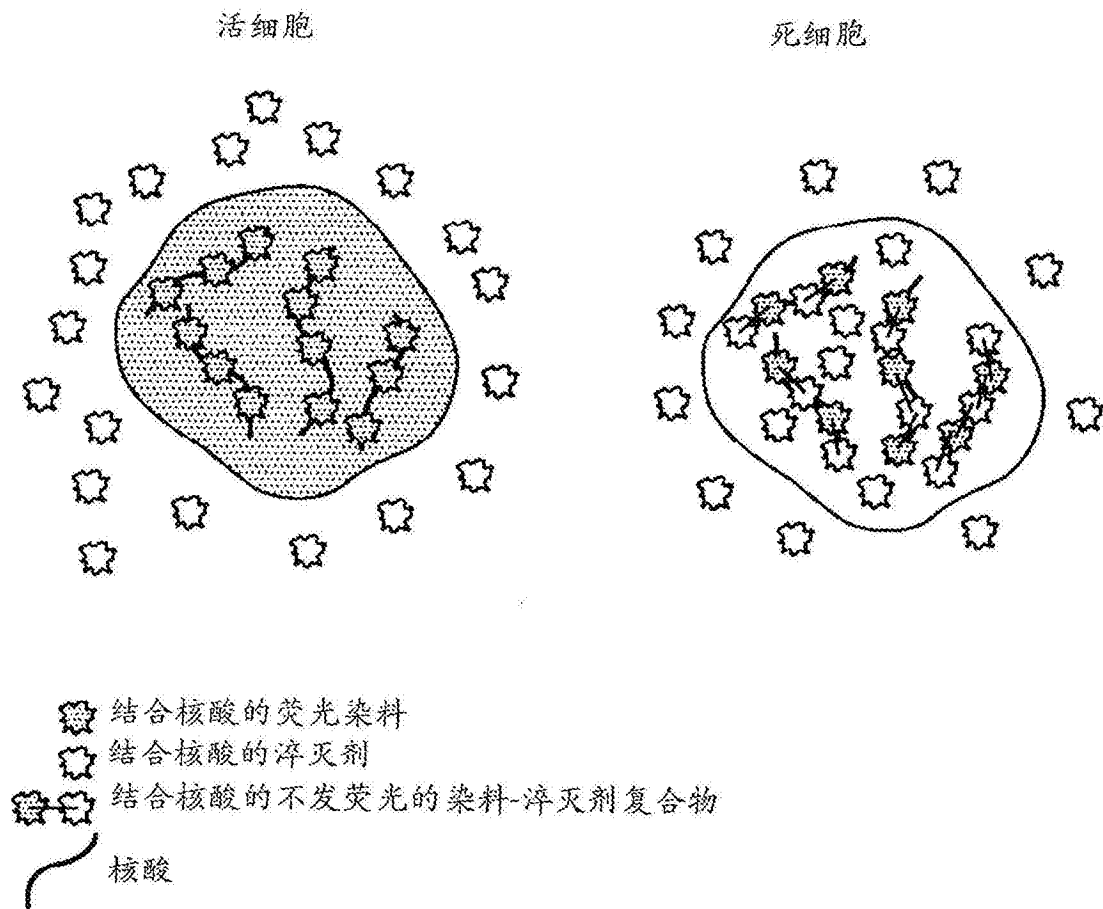


图17B

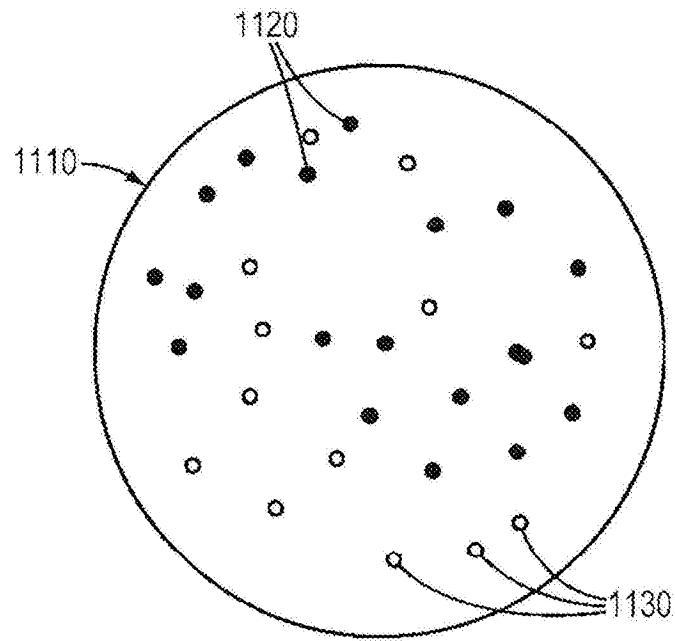


图18

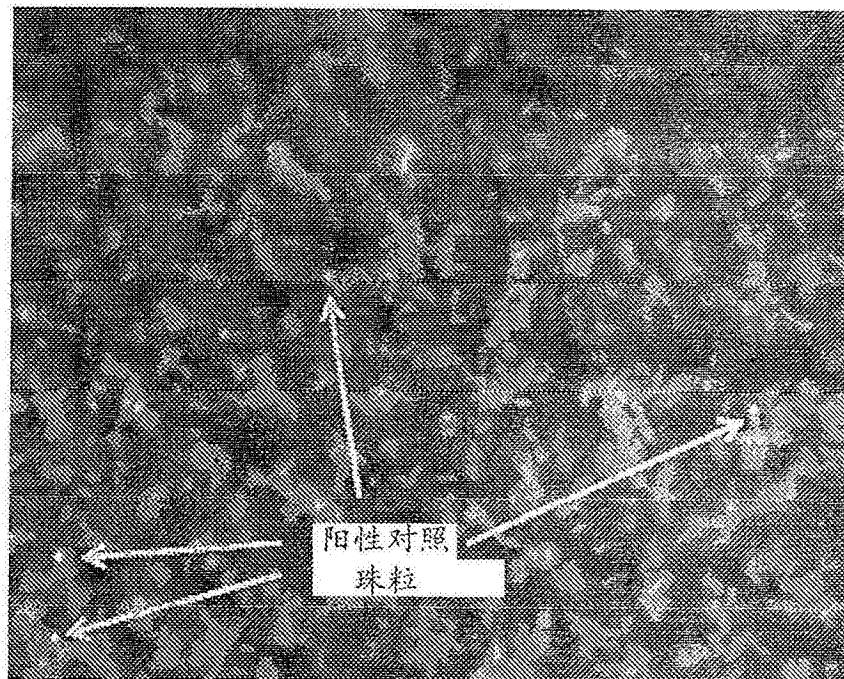


图19A

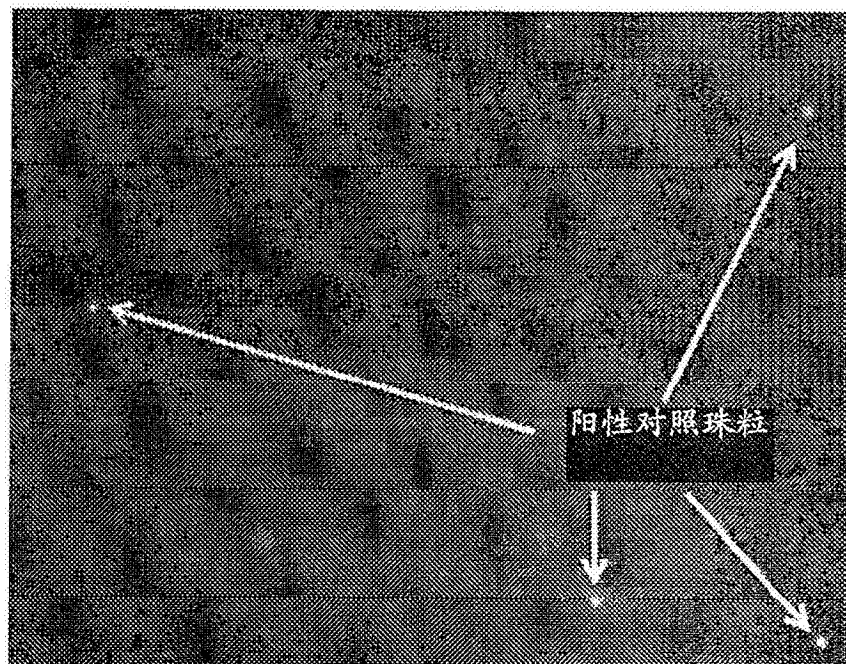


图19B

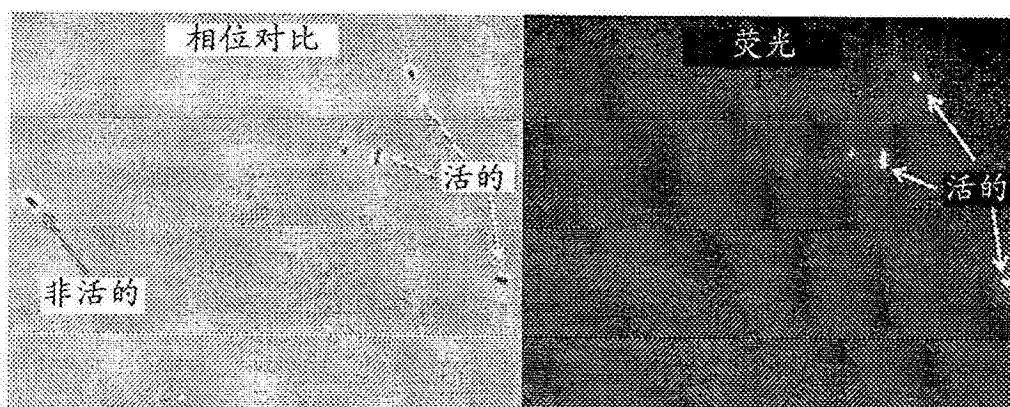


图20A

图20B

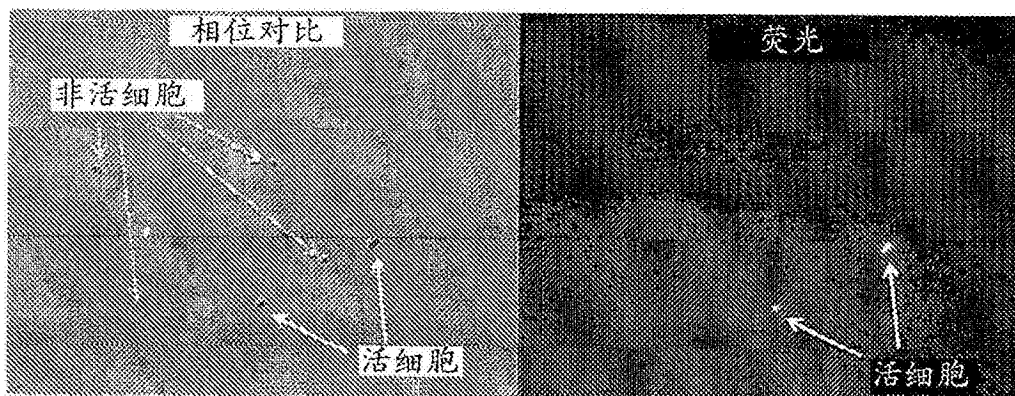


图21A

图21B

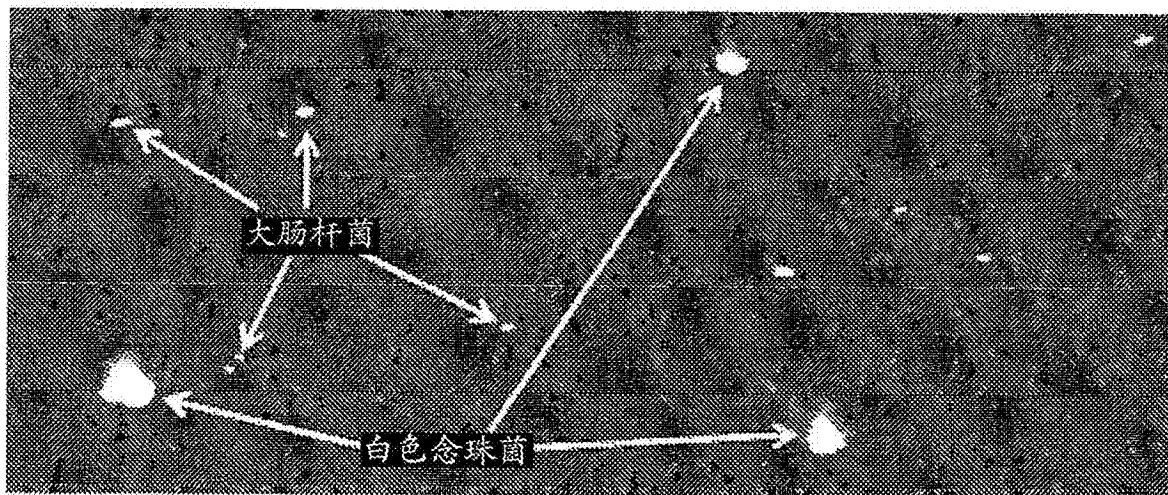


图22

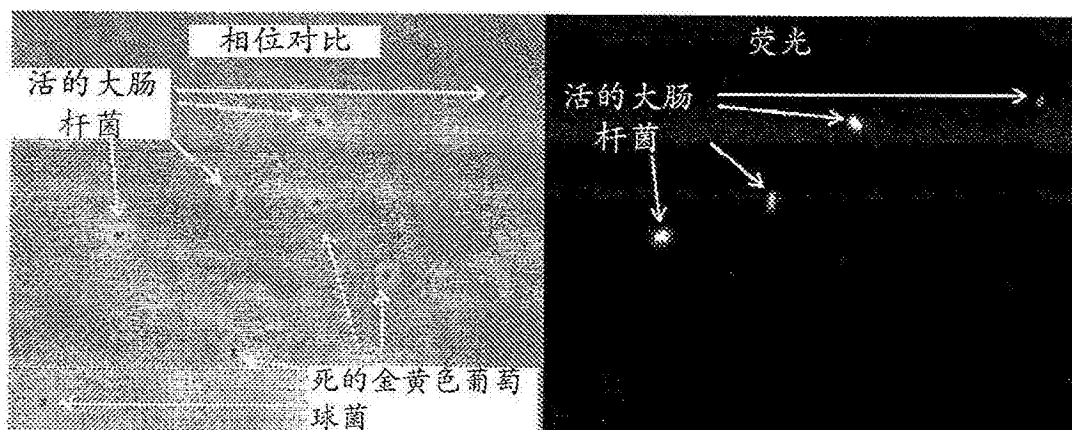


图23A

图23B

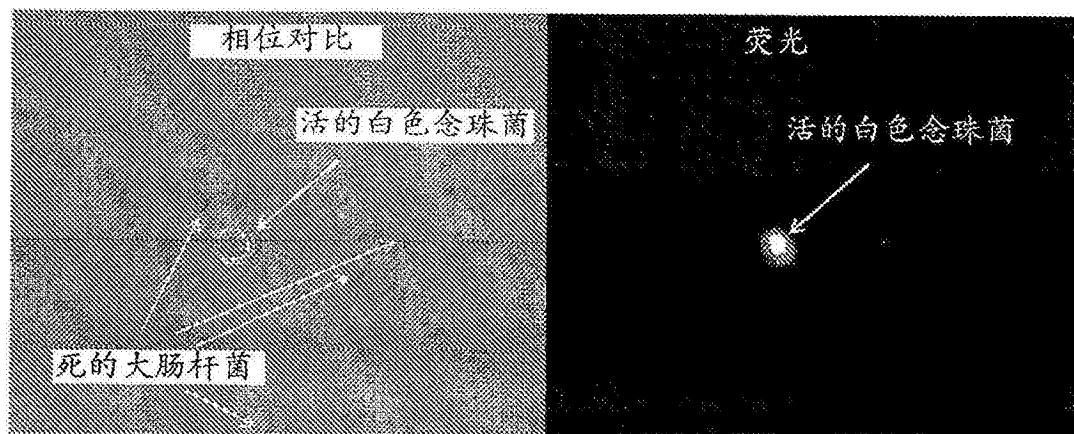


图23C

图23D

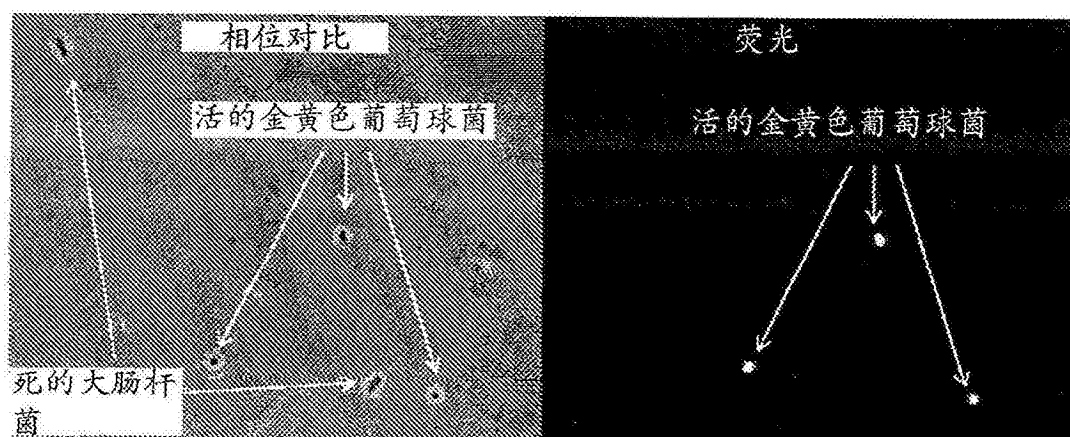


图23E

图23F

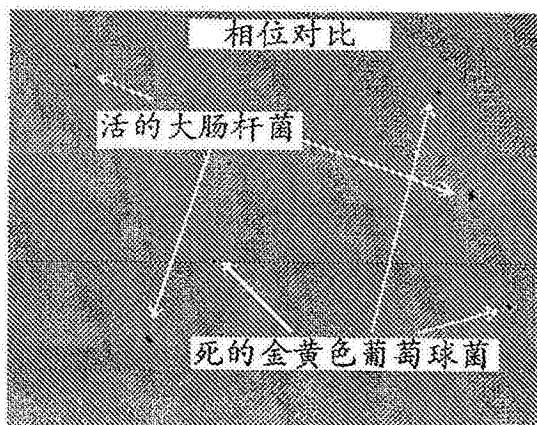


图23G

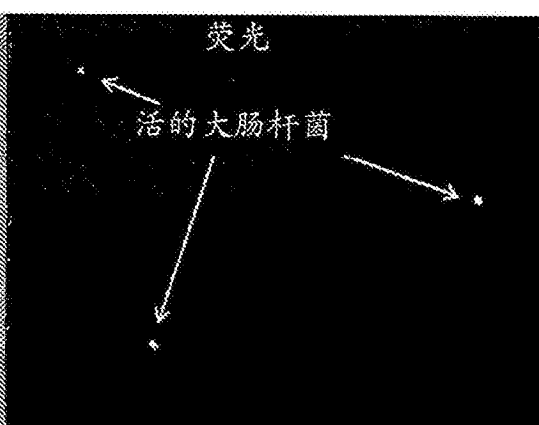


图23H

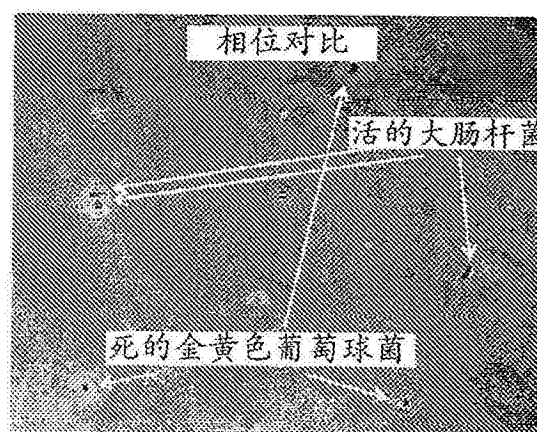


图23I

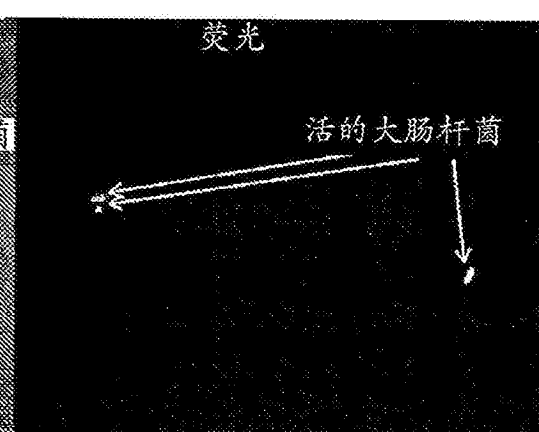


图23J

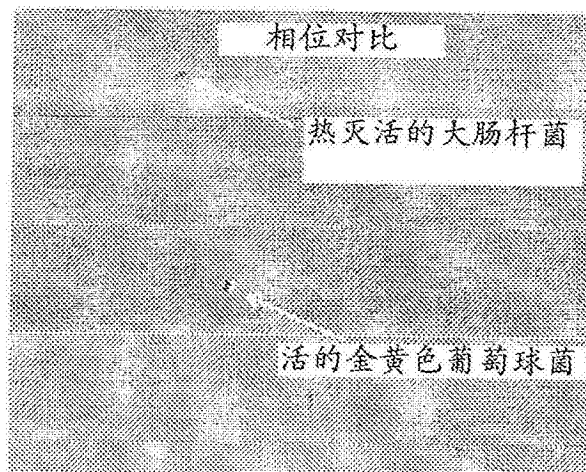


图24A

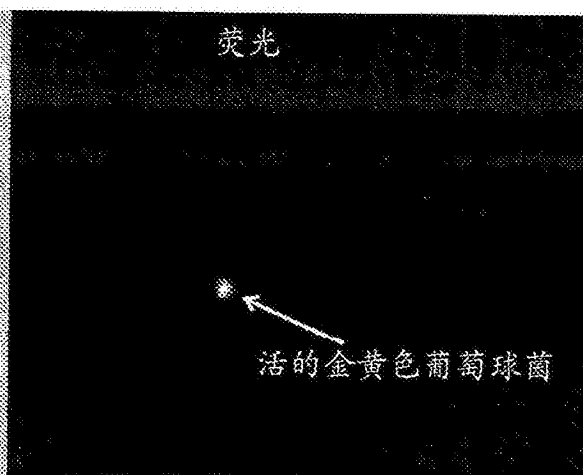


图24B

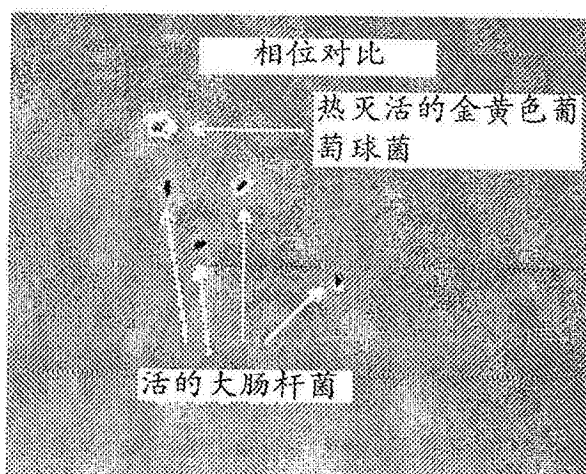


图24C

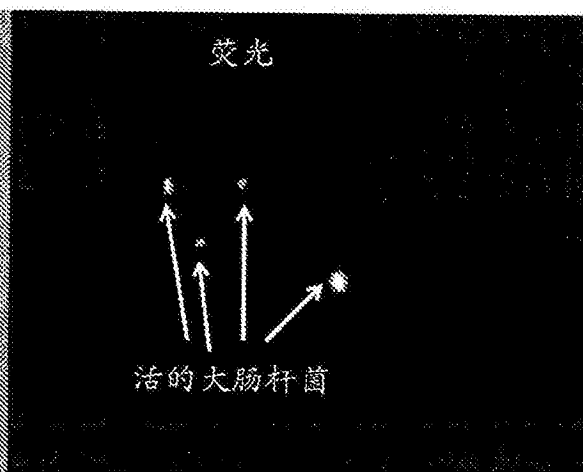


图24D

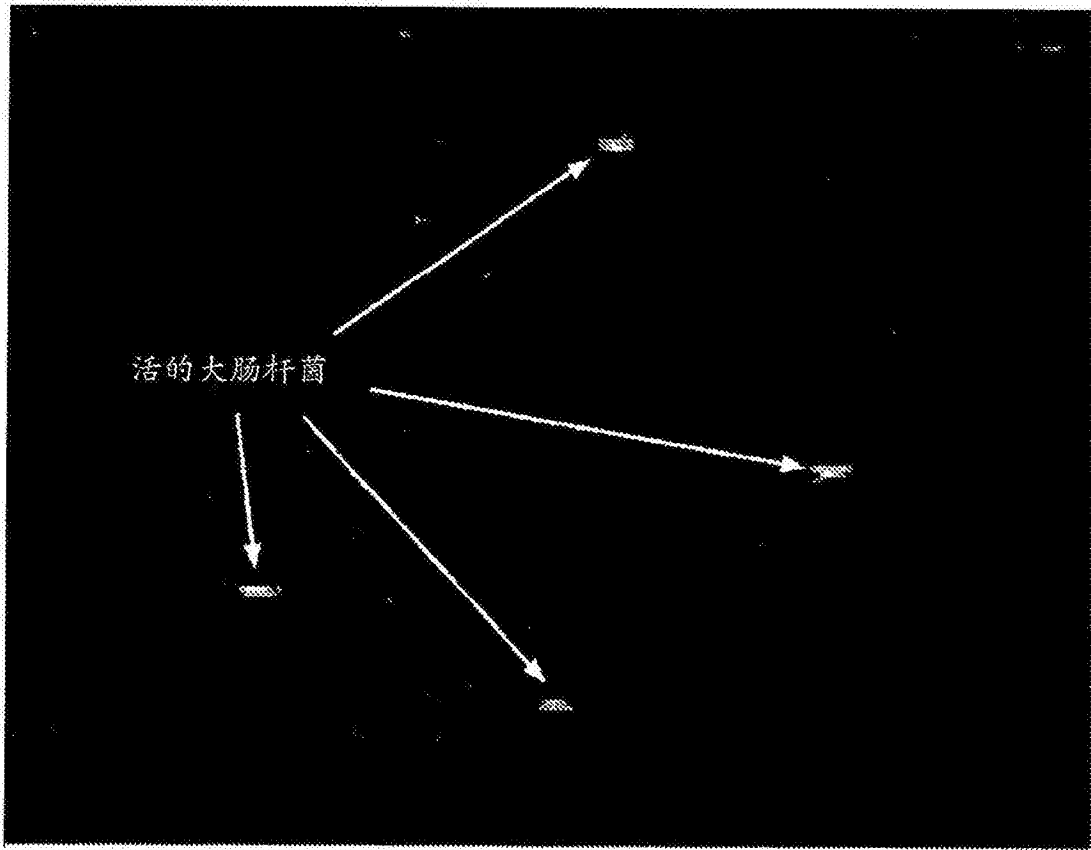


图24E