



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102770208 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201080064666. 3

(22) 申请日 2010. 12. 30

(30) 优先权数据

61/291, 301 2009. 12. 30 US

61/331, 931 2010. 05. 06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/062517 2010. 12. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02011/082309 EN 2011. 07. 07

(71) 申请人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 拉杰·拉贾戈帕尔

库尔特·J·霍尔沃森

曼基里·T·克希尔萨加尔

詹姆斯·E·艾斯塔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 梁晓广 关兆辉

(51) Int. Cl.

B01L 3/00 (2006. 01)

C12M 1/12 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/545 (2006. 01)

B01L 3/14 (2006. 01)

C12M 1/28 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

A61B 10/02 (2006. 01)

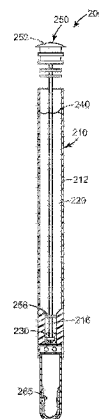
权利要求书 3 页 说明书 47 页 附图 15 页

(54) 发明名称

使用微粒进行的活生物负载检测

(57) 摘要

本发明提供了将细胞浓集到微粒上、浓集所述微粒以及检测所述细胞的方法。本发明还包括根据所述方法使用的一体化样品制备和检测装置。



1. 一种检测样品中的细胞的方法,所述方法包括:
提供细胞浓集剂、包含细胞提取剂的释放单元、和液体样品;
使所述液体样品与所述细胞浓集剂接触一段时间;
从所述液体样品的至少一部分分离所述细胞浓集剂;
形成包含所分离的细胞浓集剂和所述释放单元的液体混合物,其中所述细胞提取剂被释放到所述混合物中;以及
检测来自所述细胞的生物分析物。
2. 一种检测样品中的细胞的方法,所述方法包括:
提供:样品;细胞浓集剂;包含细胞提取剂的释放单元;检测制品,所述检测制品包括壳体,所述壳体具有第一容器和第二容器以及被构造为接纳所述样品的开口;和用于将所述细胞浓集剂从所述壳体的第一容器分离并转移至第二容器的装置;
使所述样品和所述细胞浓集剂在所述壳体的第一容器中的液体介质内接触;
将所述细胞浓集剂分离并转移至所述壳体的第二容器;
形成包含所分离的细胞浓集剂和所述释放单元的液体混合物,其中所述细胞提取剂被释放到所述混合物中;以及
检测来自所述细胞的生物分析物。
3. 一种检测样品中的细胞的方法,所述方法包括:
提供:样品;检测制品,所述检测制品包括壳体,所述壳体具有被构造为接纳样品的开口、包括细胞浓集剂的第一容器和包括含有细胞提取剂的释放单元的第二容器;用于从液体样品的至少一部分分离所述细胞浓集剂的装置;和用于将所述细胞浓集剂从所述壳体的所述第一容器转移至所述第二容器的装置;
使所述样品和所述细胞浓集剂在所述壳体的第一容器中的液体介质内接触;
将所述细胞浓集剂分离并转移至所述壳体的第二容器;
形成包含所分离的细胞浓集剂和所述释放单元的液体混合物,其中所述细胞提取剂被释放到所述混合物中;以及
检测来自所述细胞的生物分析物。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述释放单元包括基质、经涂覆基材、或壳结构。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括检测活细胞的存在。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括使用检测系统。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测生物分析物包括检测与微生物细胞相关的生物分析物。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括步骤:提供体细胞提取剂;和使所述体细胞提取剂与来自所述样品的细胞接触。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括定量所述生物分析物的量。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中将所述生物分析物的量定量两次或多次。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中将在第一时间点检测的生物分析物的量与在第二时间点检测的生物分析物的量进行比较。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括检测来自细胞的 ATP。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中检测所述来自细胞的 ATP 包括检测来自微生物细胞的 ATP。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中检测所述 ATP 包括检测来自细菌细胞的 ATP。

15. 根据权利要求 12-14 中任一项所述的方法,其中检测来自细胞的 ATP 包括检测包含荧光素和荧光素酶的反应中的 ATP。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,还包括步骤:提供能够水解 ATP 的酶;和使所述酶与所述样品的至少一部分接触。

17. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括以免疫学方法检测所述生物分析物。

18. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括以遗传学方法检测所述生物分析物。

19. 根据权利要求 1-11 中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括检测从所述样品中的活细胞中释放的酶。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述酶包括腺苷酸激酶。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测所述生物分析物包括以比色测定法、荧光测定法、电化学测定法或发光测定法进行检测。

22. 一种一体化样品制备和检测装置,包括:

壳体,所述壳体包括第一容器和第二容器,所述第一容器和第二容器之间具有通道;

其中所述第一容器包括被构造用于接纳样品的开口和设置于其中的细胞浓集剂;

其中所述第二容器包括设置于其中的检测试剂;

用于隔离所述第一容器与所述第二容器的装置;和

用于将所述细胞浓集剂从所述第一容器转移至所述第二容器的装置。

23. 根据权利要求 22 所述的装置,其中所述细胞浓集剂包括粒状或分散的细胞浓集剂。

24. 根据权利要求 22-23 中任一项所述的装置,其中用于隔离所述壳体的第一容器和第二容器的装置包括柱塞、阀门或易破密封件。

25. 根据权利要求 22-24 中任一项所述的装置,其中用于将所述细胞浓集剂从所述壳体的第一容器转移至第二容器的装置包括柱塞、拭子或阀门。

26. 根据权利要求 22-25 中任一项所述的装置,其中所述第一容器包括锥形内壁。

27. 根据权利要求 22-26 中任一项所述的装置,还包括包含细胞提取剂的释放单元。

28. 根据权利要求 27 所述的装置,其中所述释放单元包括珠粒、纤维、带材或片材。

29. 根据权利要求 27 所述的装置,其中所述释放单元包括经涂覆基材。

30. 根据权利要求 22-29 中任一项所述的装置,其中所述壳体还包括设置于所述第一容器和所述第二容器之间的第三容器。

31. 根据权利要求 30 所述的装置,其中所述释放单元设置在所述第三容器内。

32. 根据权利要求 22-31 中任一项所述的装置,还包括设置于容器中的体细胞提取剂。
33. 根据权利要求 22 所述的装置,还包括柱塞。
34. 根据权利要求 33 所述的装置,其中所述柱塞包括流体通道。
35. 根据权利要求 34 所述的装置,其中所述流体通道包括设置于其中的过滤器。
36. 根据权利要求 35 所述的装置,其中所述过滤器包括微孔过滤器。
37. 根据权利要求 33 所述的装置,其中所述柱塞还包括刮器。
38. 根据权利要求 37 所述的装置,其中所述刮器被构造成允许液体在所述刮器的边缘与所述壳体之间通过。
39. 一种套件,包括:
壳体,所述壳体包括至少两个容器,所述至少两个容器之间具有通道;
其中第一容器包括被构造用于接纳样品的开口;
其中第二容器包括设置于其中的检测试剂;
用于隔离所述第一容器与所述第二容器的装置;
细胞浓集剂;和
用于将所述细胞浓集剂从所述第一容器转移至所述第二容器的装置。
40. 根据权利要求 39 所述的套件,其中所述壳体包括用于将所述细胞浓集剂从所述第一容器转移至所述第二容器的装置。
41. 根据权利要求 39-40 中任一项所述的套件,其中所述细胞浓集剂设置于所述壳体的第一容器中。
42. 根据权利要求 39-41 中任一项所述的套件,其中所述细胞浓集剂包括粒状或分散的细胞浓集剂。
43. 根据权利要求 39-42 中任一项所述的套件,还包括含有微生物细胞提取剂的释放单元。
44. 根据权利要求 43 所述的套件,还包括体细胞提取剂。
45. 根据权利要求 39-44 中任一项所述的套件,还包括样品采集装置。
46. 根据权利要求 39-45 中任一项所述的套件,还包括柱塞。
47. 根据权利要求 46 所述的套件,其中所述柱塞包括流体通道。
48. 根据权利要求 47 所述的套件,其中所述流体通道包括设置于其中的过滤器。
49. 根据权利要求 48 所述的套件,其中所述过滤器包括微孔过滤器。
50. 根据权利要求 46 所述的套件,其中所述柱塞还包括刮器。
51. 根据权利要求 50 所述的套件,其中所述刮器被构造成允许液体在所述刮器的边缘与所述壳体之间通过。

使用微粒进行的活生物负载检测

[0001] 相关专利申请的交叉引证

[0002] 本专利申请要求 2009 年 12 月 30 日提交的美国临时专利申请号 61/291,301 和 2010 年 5 月 6 日提交的美国临时专利申请号 61/331,931 的权益,上述两个专利申请全部内容以引证方式并入本申请。

背景技术

[0003] 可获得可用于评估是否存在与样品(如,表面、水、空气等等)中的细胞或多个细胞相关的生物分析物的多种实验方法。这类试验包括基于使用萤火虫荧光素酶反应检测 ATP 的试验、基于使用比色法检测蛋白质的试验、基于使用微生物培养技术检测微生物的试验和基于使用免疫化学技术检测微生物的试验。可使用拭子装置或者通过直接与培养装置(如琼脂平板)接触,来对表面进行取样。可对样品进行分析,确定是否存在活细胞,特别是活微生物。

[0004] 通常用这些试验所得的结果来判定表面的清洁度。例如,试验可用来判定食物加工设备是否已得到充分地清洁以便用于生产。虽然上述试验可用于检测受污染的表面,但它们可能需要许多步骤以进行试验,它们可能不能够快速和/或容易地从死细胞区分活细胞的存在,并且在一些情况中它们可能需要长时间(例如数小时或数天)才能确定结果。

[0005] 试验可用来指示活微生物的存在。对于这类试验,常常使用细胞提取物来释放出与活细胞相关的生物分析物(例如 ATP)。胞外物质(例如从死的或受应激的动物细胞、植物细胞和/或微生物释放到环境中的非细胞 ATP)的存在,会造成高的“背景”ATP 水平,而这会使活细胞的检测复杂化。

[0006] 尽管有许多方法和装置可供检测活细胞,但仍需要简单可靠的试验来检测活细胞,特别是活微生物细胞。

发明内容

[0007] 总体上,本发明涉及用于检测样品中的活细胞的制品和方法。所述制品和方法可以快速地检测(如,通过荧光、化学发光、或颜色反应)存在于表面上的细胞(例如细菌)。在一些实施例中,本发明的制品为“样品即用型”,即,所述制品包括检测样品中的活细胞的所有必需特征。在一些方面,本发明的制品和方法提供将与真核细胞(例如植物或动物细胞)相关的生物分析物(如 ATP 或酶)从与原核细胞(例如细菌细胞)相关的类似或相同生物分析物区分开的手段。此外,本发明的制品和方法提供将游离于环境中的生物分析物(即无细胞生物分析物)从与活细胞相关的类似或相同生物分析物区分开的手段。

[0008] 本发明的方法允许操作者从液体样品中浓集细胞并且检测与细胞相关的分析物。在某些实施例中,检测到分析物可指示样品中存在活细胞(包括,特别地,活微生物细胞)。在一些实施例中,所述方法使得操作者能测量样品中的生物分析物和/或细胞的量。在一些实施例中,所述方法使得操作者能在有效量的细胞提取剂从组合物释放到液体混合物中的预定时间段之后测量生物分析物的量,以区分性地确定样品中来自非细胞材料和来自活

细胞的生物分析物的量。在一些实施例中,所述方法使得操作者能在第一预定时间段内进行生物分析物的量的第一次测量,并且在有效量的细胞提取剂从组合物中释放出来的第二预定时间段内进行生物分析物的量的第二次测量,以检测样品中活细胞的存在。在一些实施例中,本方法可允许操作者辨别样品中的生物分析物是否从活植物或动物细胞释放或者是否是从活的微生物细胞(如细菌)释放。本发明能够由操作者在在食物制作服务机构、卫生保健环境等等的相对苛刻的现场环境中使用。

[0009] 在一个方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法可包括提供细胞浓集剂、包含细胞提取剂的释放单元和液体样品。所述方法还可包括使液体样品与细胞浓集剂接触一段时间;从液体样品的至少一部分中分离细胞浓集剂;形成包含分离的细胞浓集剂和释放单元的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中;以及检测来自细胞的生物分析物。可选地,可在两个或多个分立的时间点检测分析物。在一些实施例中,检测生物分析物可包括检测活细胞。在一些实施例中,检测生物分析物可包括使用检测系统。在一些实施例中,检测生物分析物可包括对分析物进行定量。在一些实施例中,检测生物分析物可包括检测来自细胞的ATP。在一些实施例中,检测生物分析物可包括通过遗传学或免疫学方法检测细胞。在一些实施例中,所述方法还可包括步骤:提供体细胞提取剂;并且使体细胞提取剂与来自样品的细胞接触。

[0010] 在另一方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法还可包括提供:样品;细胞浓集剂;包含细胞提取剂的释放单元;包括具有第一和第二容器以及被构造用于接纳样品的开口的壳体的检测制品;用于分离细胞浓集剂并将细胞浓集剂从壳体的第一容器转移至第二容器的装置。所述方法还可包括使样品与细胞浓集剂在壳体的第一容器中的液体介质内接触。所述方法还可包括将细胞浓集剂转移至壳体的第二容器。所述方法还可包括形成包含分离的细胞浓集剂和释放单元的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中。所述方法还可包括检测来自细胞的生物分析物。可选地,可在两个或更多个分立的时间点检测生物分析物。在一些实施例中,检测生物分析物可包括检测活细胞。在一些实施例中,检测生物分析物可包括使用检测系统。在一些实施例中,检测生物分析物可包括对分析物进行定量。在一些实施例中,检测生物分析物可包括检测来自细胞的ATP。在一些实施例中,检测生物分析物可包括通过遗传学或免疫学方法检测细胞。在一些实施例中,所述方法还可包括步骤:提供体细胞提取剂;并且使体细胞提取剂与来自样品的细胞接触。

[0011] 在另一方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法可包括提供:样品;检测制品,包括壳体,所述壳体具有被构造用于接纳样品的开口、包括细胞浓集剂的第一容器和包括含有细胞提取剂的释放单元的第二容器;用于从液体样品的至少一部分中分离细胞浓集剂的装置;和用于将细胞浓集剂从壳体中的第一容器转移至第二容器的装置。所述方法还可包括使样品和细胞浓集剂在壳体的第一容器中的液体介质内接触。所述方法还可包括将细胞浓集剂分离并转移至壳体的第二容器。所述方法还可包括形成包含分离的细胞浓集剂和释放单元的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中。所述方法还可包括检测来自细胞的生物分析物。可选地,可在两个或更多个分立的时间点检测生物分析物。在一些实施例中,检测生物分析物可包括检测活细胞。在一些实施例中,检测生物分析物可包括使用检测系统。在一些实施例中,检测生物分析物可包括对分析物进行定量。在一些实施例中,检测生物分析物可包括检测来自细胞的ATP。在一些实施例中,检测生物分析物

可包括通过遗传学或免疫学方法检测细胞。在一些实施例中,所述方法还可包括步骤:提供体细胞提取剂;并且使体细胞提取剂与来自样品的细胞接触。

[0012] 在另一方面,本发明提供一体化样品制备和检测装置。所述装置可包括壳体,所述壳体包括其间具有通道的第一和第二容器。壳体的第一容器可包括被构造用于接纳样品的开口和设置于其中的细胞浓集剂。壳体的第二容器可包括设置于其中的检测试剂。所述装置还可包括用于分离第一容器和第二容器的装置。所述装置还可包括用于将细胞浓集剂从第一容器转移至第二容器的装置。在一些实施例中,用于分离第一和第二容器的装置为用于将细胞浓集剂从第一容器转移至第二容器的装置。在一些实施例中,所述壳体还可包括位于分离的第一和第二容器之间的易破密封件。在一些实施例中,第一容器可包括锥形区域。在一些实施例中,所述装置还可包括包含细胞提取剂的释放单元。在一些实施例中,壳体还可包括第三容器。在一些实施例中,所述装置还可包括样品采集装置。在一些实施例中,检测试剂可包括用于检测 ATP 的试剂。在一些实施例中,所述装置还可包括包含检测试剂的释放单元。

[0013] 在另一方面,本发明提供一体化样品制备和检测装置。所述装置可包括壳体,所述壳体包括其间具有通道的隔开的第一和第二容器以及被构造为贴合通道的柱塞。壳体的第一容器可包括开口,所述开口被构造用于接纳样品,和设置于其中的细胞浓集剂。壳体的第二容器可包括设置于其中的检测试剂。在一些实施例中,所述壳体还可包括位于分离的第一和第二容器之间的易破密封件。在一些实施例中,第一容器可包括锥形内壁。在一些实施例中,所述装置还可包括包含细胞提取剂的释放单元。在一些实施例中,壳体还可包括第三分离容器。在一些实施例中,所述装置还可包括样品采集装置。在一些实施例中,检测试剂可包括用于检测 ATP 的试剂。在一些实施例中,所述装置还可包括包含检测试剂的缓释组合物。

[0014] 在另一方面,本发明提供一体化样品制备和检测装置。所述装置可包括壳体,所述壳体包括其间具有通道的分离的第一和第二容器。壳体的第一容器可包括开口,所述开口被构造用于接纳样品,和设置于其中的细胞浓集剂。第二容器可包括设置于其中的检测试剂。所述装置还可包括阀门,所述阀门被构造为控制从第一容器到第二容器的材料通道。在一些实施例中,第一容器可包括锥形内壁。在一些实施例中,所述装置还可包括包含细胞提取剂的释放单元。在一些实施例中,壳体还可包括第三分离容器。在一些实施例中,所述装置还可包括样品采集装置。在一些实施例中,检测试剂可包括用于检测 ATP 的试剂。在一些实施例中,所述装置还可包括包含检测试剂的缓释组合物。

[0015] 在另一方面,本发明提供包括壳体和下述装置的套件,所述壳体包括其间具有通道的分离的第一和第二容器,所述装置用于将细胞浓集剂从第一容器转移至第二容器。壳体的第一容器可包括被构造用于接纳样品的开口。第二容器可包括设置于其中的检测试剂。所述套件还可包括细胞浓集剂。在一些实施例中,细胞浓集剂设置在壳体的第一容器中。在一些实施例中,所述套件还可包括包含微生物细胞提取剂的释放单元。在一些实施例中,所述套件还可包括体细胞提取剂。在一些实施例中,所述套件还可包括样品采集装置。

[0016] 在另一方面,本发明提供包括壳体的套件,所述壳体包括其间具有通道的分离的第一和第二容器。壳体中的第一容器可包括被构造用于接纳样品的开口。壳体中的第二容器可包括设置于其中的检测试剂。所述套件还可包括细胞浓集剂和用于将细胞浓集剂从第

一容器转移至第二容器的装置。在一些实施例中，细胞浓集剂设置在壳体的第一容器中。在一些实施例中，所述套件还可包括包含微生物细胞提取剂的释放单元。在一些实施例中，所述套件还可包括体细胞提取剂。在一些实施例中，所述套件还可包括样品采集装置。

[0017] 术语表

[0018] 本申请所用的“生物分析物”是指出现在生物体中的或者生物体所形成的分子或其衍生物。例如，生物分析物可包括(但不限于)下列中的至少一者：氨基酸、核酸、多肽、蛋白质、核苷酸、多核苷酸、脂质、磷脂、糖、多糖和它们的组合。生物分析物的具体实例可包括(但不限于)代谢物(如，小分子(例如 ATP)或多肽(如 A 蛋白))、变应原(如，花生变应原、激素、毒素(如，芽孢杆菌属腹泻毒素、黄曲霉毒素等)、RNA (如，mRNA、总 RNA、tRNA 等)、DNA (如，质粒 DNA、植物 DNA 等)、标记蛋白、抗体、抗原以及它们的组合。

[0019] 本申请所用的“液体样品”是指包含液体的样品材料。样品在其原始形式可包含诸如水、奶、汁液、血液、伤口渗出液等等之类的液体。作为另外一种选择，液体样品可为固体在液体悬浮介质(如，水、水性缓冲液)中的悬浮液。例如，可用样品采集装置收集固体、半固体或凝胶样品并将其悬浮于液体中以形成液体样品。

[0020] “净化的液体样品”是指在已使液体样品与细胞浓集剂接触并且已将细胞浓集剂从液体的本体中分离(如，通过沉降、过滤、离心或沉淀)之后保留的液体样品的本体。

[0021] “样品采集装置”在本申请中以最广义的含义使用，指用来采集液体、半固体或固体样品材料的器具。样品采集装置的非限制性实例包括拭子、擦拭物、海绵、勺子、刮刀、吸管、吸管头和虹吸管。

[0022] 本申请所用的“盲端阀门”是指用于调节材料(如，液体、固体或固体在液体中的悬浮液)在检测装置的壳体中的两个或更多个容器之间的转移的阀门类型。盲端阀门被设计为使得用于转移材料的阀门中的腔体每一时刻仅可与容器中的一个成流体连通。

[0023] 本申请所用的术语“水凝胶”是指用极性溶剂溶胀的或者能够用极性溶剂溶胀的亲水性聚合物材料。聚合物材料与极性溶剂接触时通常会溶胀但不溶解。也就是说，水凝胶不溶于极性溶剂。溶胀的水凝胶可进行干燥以除去至少一些极性溶剂。

[0024] 本申请所用的“细胞提取剂”是指任何能改变细胞膜或细胞壁渗透性或者破坏细胞膜和 / 或细胞壁的完整性(即裂解细胞膜和 / 或细胞壁或者造成在细胞膜或细胞壁中形成孔隙)，以实现通常存在于活细胞中的生物分析物的提取或释放的化合物或化合物组合。

[0025] 本申请所用的“检测系统”是指用于检测生物分析物的组件并且包括酶、酶底物、结合伴侣(如，抗体或受体)、标记、染料以及用于检测吸光度或反射率、荧光、和 / 或发光(例如，生物发光或化学发光)的器械。

[0026] 词语“优选的”和“优选地”是指在某些情况下可以提供某些有益效果的本发明的实施例。然而，在相同的情况或其他情况下，其他实施例也可以是优选的。此外，对一个或多个优选实施例的描述并不暗示其他实施例是不可用的，且并非意图将其他实施例排除在本发明范围之外。

[0027] 当术语“包含”及其变型型式出现在说明书和权利要求书中时，这些术语不具有限制性含义。

[0028] 本申请所用的“一种(个)”、“所述(该)”、“至少一种(个)”以及“一种或多种(一个或多个)”互换使用。因此，例如，包含“一种”检测试剂的壳体可被解释为意指该壳体可包

含“一种或多种”检测试剂。

[0029] 术语“和 / 或”意指所列要素的一个或全部,或所列要素的任何两个或更多个的组合。

[0030] 另外,本申请通过端点描述的数值范围包括该范围内的所有数值(如 1-5 包含 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5 等)。

[0031] 以上发明概述并非旨在描述本发明的每一个公开的实施例或每种实施方式。以下具体实施方式更具体地举例说明了示例性实施例。在本专利申请全部内容的若干处中,通过实例列表提供指导,可以多种组合使用这些实例。在每一种情况下,被描述的列表均仅用作一个代表性的组,不应当被理解为是排他性列表。

附图说明

[0032] 图 1A 示出了包括两个容器的壳体的一个实施例的剖视图和适于与壳体结合使用的柱塞的剖视图,所述壳体和柱塞均为根据本发明的样品制备和检测装置的组件。

[0033] 图 1B 示出了图 1A 中的组装装置的剖视图,所述组装装置具有设置在壳体中的第一位置的柱塞并且包括位于壳体的第一容器中的细胞浓集剂。

[0034] 图 1C 示出了图 1B 中的装置的剖视图,所述装置具有设置在壳体中的第二位置的柱塞并且包括位于壳体的第一容器中的液体样品。

[0035] 图 1D 示出了图 1C 中的装置的剖视图,所述装置具有位于第一位置的柱塞和位于壳体的第二容器中的细胞浓集剂。

[0036] 图 2A 示出了包括三个由易破密封件隔开的容器的壳体的一个实施例的剖视图和适于与壳体结合使用的柱塞的侧视图,所述壳体和柱塞均为根据本发明的样品制备和检测装置的组件。

[0037] 图 2B 示出了图 2A 中的壳体的剖视图,所述壳体其上固定顶盖并且具有设置在壳体的第一容器中的液体样品。

[0038] 图 2C 示出了图 2B 中的壳体的剖视图,所述壳体不具有顶盖并且具有设置在壳体中的第一位置的柱塞。

[0039] 图 2D 示出了图 2C 中的装置的剖视图,所述装置具有设置在壳体中的第二位置的柱塞和转移至壳体的第二容器的细胞浓集剂。

[0040] 图 3A 示出了根据本发明的包括壳体和阀门的样品制备和检测装置的一个实施例的前视图。

[0041] 图 3B 为图 3A 中的装置的侧视图。

[0042] 图 3C 示出了图 3A 中的装置的剖视图,所述装置具有设置在壳体的第一容器中的液体样品和细胞浓集剂以及位于第一位置的阀门。

[0043] 图 3D 示出了图 3C 中的装置的剖视图,所述装置具有位于第二位置的阀门和转移至壳体的第二容器的细胞浓集剂。

[0044] 图 4A 示出了包括两个容器和一排液阀门的壳体的一个实施例的剖视图以及柱塞的侧视图,所述壳体和柱塞均为样品制备和检测装置的组件。

[0045] 图 4B 示出了图 4A 中的组装装置的剖视图,所述组装装置具有处于打开构型的排液阀门和设置在壳体中的第一位置的柱塞。

[0046] 图 4C 示出了图 4B 中的组装装置的剖视图,所述组装装置具有设置在壳体中的第二位置的柱塞和转移至壳体的第二容器的细胞浓集剂。

[0047] 图 4D 示出了图 4C 中的装置的剖视图,其中柱塞已刺穿易破密封件并将细胞浓集剂转移至第二容器。

[0048] 图 5A 以局部剖视方式示出了壳体的一个实施例的剖视图和柱塞的侧视图,所述壳体和柱塞均为根据本发明的样品制备和检测装置的一个实施例的组件。

[0049] 图 5B-5D 示出了图 5A 中的组装装置的剖视图,其中柱塞插入到壳体中不同深度。

[0050] 图 6A 以局部剖视方式示出了图 5A 中的柱塞的尖端的分解侧视图。

[0051] 图 6B 以局部剖视方式示出了图 6A 中的组装尖端的侧视图。

[0052] 图 7A 以局部剖视方式示出了壳体的一个实施例的剖视图和中空柱塞的侧视图,所述壳体和中空柱塞均为根据本发明的样品制备和检测装置的一个实施例的组件。

[0053] 图 7B-7D 示出了图 7A 中的组装装置的剖视图,其中柱塞插入到壳体中不同深度。

[0054] 图 8A 以局部剖视方式示出了图 7A 中的柱塞的尖端的分解侧视图。

[0055] 图 8B 以局部剖视方式示出了图 8A 中的组装尖端的侧视图。

[0056] 图 9 示出了根据本发明的细胞浓集剂收集器的一个实施例。

[0057] 图 10A 以局部剖视方式示出了壳体的一个实施例的剖视图和柱塞的侧视图,所述壳体和柱塞均为根据本发明的样品制备和检测装置的一个实施例的组件。

[0058] 图 10B 以局部剖视方式示出了图 10A 中的组装装置的侧视图。

[0059] 图 11 示出了其中分散有细胞提取剂的释放单元的一个实施例的顶部透视图。

[0060] 图 12a 为包括具有腔孔的基材的释放单元的一个实施例的顶视图。

[0061] 图 12b 为图 12a 的释放单元的剖视图。

[0062] 图 13 为包括微通道腔孔的释放单元的一个实施例的顶部透视图。

[0063] 图 14 为释放单元的一个实施例的剖视图,所述释放单元包括具有含客体化合物的芯的壳结构。

[0064] 图 15 为释放单元的一个实施例的剖视图,所述释放单元包括含有客体化合物的壳结构。

[0065] 图 16 为包括壳结构的释放单元的一个实施例的剖视图,所述释放单元具有含第一客体化合物的芯和含第二客体化合物的壳结构。

[0066] 图 17 为释放单元的一个实施例的剖视图,所述释放单元包括设置成连续层的多个壳结构。

[0067] 图 18 为释放单元的一个实施例的剖视图,所述释放单元包括独立地设置在外壳结构内的多个壳结构。

具体实施方式

[0068] 本说明书中引用的所有专利、专利申请、政府出版物、政府法规和参考文献都全部内容以引证方式并入本申请。如有冲突,以本说明书(包括定义在内)为准。

[0069] 本发明整体涉及用于检测样品中的微生物的制品和方法。在某些优选实施例中,本发明涉及对样品中的活微生物的检测。用于从样品浓集细胞的方法和装置描述于名称为“SAMPLING DEVICES AND METHODS FOR CONCENTRATING MICROORGANISMS (用于浓集微生物

物的采样装置和方法)”的 PCT 国际公开号 WO 2010/078399 和名称为“METHODS, KITS AND SYSTEMS FOR PROCESSING SAMPLES (用于处理样品的方法、套件和系统)”的 PCT 国际公开号 WO 2010/078404 中,上述各专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。本申请所公开的本发明的装置和方法提供提高的敏感性,以便检测存在于样品中的少量微生物。

[0070] 生物分析物可用于检测样品中生物材料(如活细胞)的存在。生物分析物可通过它们可参与其中的各种反应(例如结合反应、催化反应等)来检测。

[0071] 化学发光反应可以以各种形式使用,以检测流体中以及经加工的材料中的细胞,如细菌细胞。在本发明的一些实施例中,基于三磷酸腺苷(ATP)与荧光素在荧光素酶的存在下反应以产生光的化学发光反应,提供了产生信号以检测生物分析物 ATP 的化学基础。由于 ATP 存在于所有的活细胞,包括所有的微生物细胞中,这个方法能提供快速的测定以获得对样品中活细胞数目的定量或半定量估测。早期的有关该基础性反应的性质、其发现史及其一般应用领域的论述由以下文献提供: E. N. Harvey (1957), *A History of Luminescence: From the Earliest Times Until 1900*, Amer. Phil. Soc., Philadelphia, Pa.; 以及 W. D. McElroy 和 B. L. Strehler (1949), *Arch. Biochem. Biophys.* 22:420-433。

[0072] ATP 检测是检测细菌和其他微生物种类的可靠方法,因为所有这类物种都含有一些 ATP。来自 ATP 的化学键能在出现于萤火虫(*Photinus pyralis*)尾部的生物发光反应中被利用。可分离出这个反应的生化组分使其不含 ATP,以后用来检测其他来源的 ATP。这个萤火虫生物发光反应的机制已得到很好的表征(DeLuca, M. 等人, 1979 *Anal. Biochem.* 95:194-198)。

[0073] 释放单元:

[0074] 根据本发明的释放单元包括包封材料。包封材料通常充当物理屏障和/或扩散屏障,以在一段时间内,防止有效量的细胞提取剂立即溶解到液体混合物(例如,包含样品的水性混合物)中。

[0075] 在一些实施例中,当包封剂暴露于活化刺激之后,包封材料可被活化以释放有效量的细胞提取剂。活化可包括(例如)包封材料的溶解或部分溶解、包封材料的透化(如,通过溶胀部分脱水的聚合物)、包封材料的崩解或部分崩解(如,通过熔融固体材料,例如,蜡)。

[0076] 在一些实施例中,包封材料可包括壳结构(例如,发色材料),如本申请所述。

[0077] 在一些实施例中,包封材料可包括基质。合适的基质材料的例子可见于(例如)名称为“ARTICLES WITH MATRIX COMPRISING A CELL EXTRACTANT AND BIODETECTION METHODS THEREOF”(具有含细胞提取剂的基质的制品及其生物检测方法)的 PCT 国际公开号 WO 2010/129726,该专利申请全部内容以引证方式并入本申请。在一些实施例中,基质包含基本上不溶于液体(例如,包含样品的水性液体)的材料(如,聚合物材料或如陶瓷之类的非聚合物材料)。在一些实施例中,基质包含在环境温度下基本上可溶于和/或分散在水性溶液中的赋形剂。在一些实施例中,基质包含在环境温度下基本上不溶于和/或不可分散在水性溶液中的赋形剂(即,可通过改变温度和/或添加化学触发剂来触发赋形剂的溶解或分散)。

[0078] 在一些实施例中,基质可为预成形基质(即,在利用细胞提取剂灌注基质之前形成

的基质)。在这些实施例中,可将基质放置到包含细胞提取剂的液体内并允许细胞提取剂扩散到基质材料内,由此将细胞提取剂加载到基质中。在一些实施例中,可在溶液中将基质前体与细胞提取剂混合并形成基质,其中细胞提取剂分散到基质中。在另一实施例中,细胞提取剂可分散在蜡中,如(例如)美国专利申请公开号 US2005/0152992 中的描述,该专利申请全部内容以引证方式并入本申请。

[0079] 包封材料可包括水凝胶。在用于检测样品中的细胞的制品和方法中使用水凝胶公开于 2008 年 9 月 30 日提交的名称分别为“BIODETECTION ARTICLES”(生物检测制品)和“BIODETECTION METHODS”(生物检测方法)的 PCT 国际公开号 WO 2010/039627 和美国专利申请序列号 61/101, 563, 上述专利申请中的每一个均全部以引证方式并入本申请。

[0080] 水凝胶广义地包括交联水凝胶、溶胀水凝胶以及干燥或部分干燥的水凝胶。本发明中的合适水凝胶包括(例如)描述于国际专利公开号 WO 2007/146722 中的水凝胶以及由其制备的聚合物珠粒,上述专利申请的全部以引证方式并入本申请。

[0081] 其他合适的水凝胶包括如下物质:包括含烯键式不饱和羧基单体和共聚单体(选自羧酸、乙烯基磺酸、纤维素单体、聚乙烯醇)的聚合物,如在美国专利申请公开号 US2004/0157971 中的描述;包括淀粉、纤维素、聚乙烯醇、聚氧化乙烯、聚丙二醇、和它们的共聚物的聚合物,如在美国专利申请公开号 US 2006/0062854 中的描述;包括分子量小于 2000 道尔顿的多功能聚(烯炔氧化物)可自由基聚合的大分子单体的聚合物,如在美国专利号 7,005,143 中的描述;包括在暴露于液体介质时交联的硅烷官能化聚氧化乙烯的聚合物,如在美国专利号 6,967,261 中的描述;包括具有至少一种醇(选自聚乙二醇、聚丙二醇、和丙二醇)的聚氨酯预聚物的聚合物,如在美国专利号 6,861,067 中的描述;以及包括亲水性聚合物(选自多糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚氨酯、聚丙烯酸酯、胶原和明胶)的聚合物,如在美国专利号 6,669,981 中的描述,上述专利或专利申请的全部公开内容均以引证方式并入本申请。其他合适的水凝胶包括琼脂、琼脂糖、聚丙烯酰胺水凝胶以及它们的衍生物。

[0082] 本发明提供包括成型水凝胶的制品和方法。成型水凝胶包括成型为例如珠粒、片材、带材和纤维的水凝胶。成型水凝胶的其他实例以及可制备成型水凝胶的示例性方法公开于名称为“POLYMERIC FIBERS AND METHODS OF MAKING”(聚合物纤维及制备方法)的美国专利申请公开号 2008/0207794A1 和名称为“METHODS OF MAKING SHAPED POLYMERIC MATERIALS”(制备成型聚合物材料的方法)的美国专利申请公开号 US 2010/0295219 中,上述专利申请中的两者的全部内容以引证方式并入全申请。

[0083] 本发明的水凝胶可包含细胞提取剂。包含细胞提取剂的水凝胶可通过两种基本方法制备。在第一种方法中,在水凝胶聚合物合成过程中将细胞提取剂掺入到水凝胶中。第一种方法的例子可见于国际专利公开号 WO 2007/146722 中。在第二种方法中,在水凝胶聚合物合成后将细胞提取剂掺入到水凝胶中。例如,将水凝胶放在细胞提取剂的溶液中,并让细胞提取剂吸收到水凝胶中和/或吸附到水凝胶。第二种方法的另一个例子是将离子单体掺入到水凝胶中,例如将阳离子单体掺入到水凝胶中。

[0084] 在一些应用中,可能有利的是,含有细胞提取剂的释放单元处于干燥或部分干燥的状态。某些释放单元(例如,水-溶胀水凝胶)可(例如)通过本领域的技术人员已知的方法进行干燥,包括蒸发法、对流烤炉干燥法、微波炉干燥法和真空炉干燥法,以及冷冻干燥

法。当干燥或部分干燥的释放单元暴露于液体或水性溶液时，细胞提取剂可从释放单元扩散。细胞提取剂可在释放单元中基本上保持为非活性的，直至暴露于液体或水性溶液。也就是说，细胞提取剂可保存在干燥或部分干燥的释放单元内直至所述释放单元暴露于液体。这能够防止细胞提取剂在不需要时的浪费或损失，并且可提高多种对水分敏感的细胞提取剂的稳定性，这些细胞提取剂可能会通过水解、氧化或其他机制而发生降解。

[0085] 在一些实施例中，包封材料可在包封剂暴露于活化刺激（例如压力、剪切力、热、光、pH 变化）、暴露于另一种化学品、离子强度变化等等之后被活化以释放有效量的细胞提取剂。活化可能导致（例如）包封材料的溶解或部分溶解、包封材料的透化（例如脂质双分子层的破裂）和 / 或包封材料的崩解或部分崩解（例如，通过压裂或熔融如微晶蜡之类的固体材料）。

[0086] 根据本发明的释放单元包括包封细胞提取剂的片剂。用于延缓医药组合物释放的片剂在本领域中是已知的（例如，参见国际专利公开号。WO 97/02812 和 WO 08/129517）。“片剂”以广义方式进行使用并且包括如名称为“PROCESSING DEVICE TABLET”（片剂加工处置）的美国专利申请公开号 US2010/0209927 中所公开的微片剂，该专利申请全部内容以引证方式并入本申请。

[0087] 根据本发明的片剂包含掺有赋形剂的细胞提取剂。“赋形剂”被广义使用，包括（例如）粘结剂、助流剂（例如，流动助剂）、润滑剂、崩解剂和上述任何两者或更多者。在一些实施例中，片剂可包括外涂层，其中当片剂接触液体（例如，包含样品的水性液体）时，所述外涂层可影响活性物质（如，细胞提取剂）的释放。在一些实施例中，片剂可包含用作片剂的增量剂的填充剂（例如，诸如乳糖或山梨醇之类的糖）。当片剂接触液体时，崩解剂（例如，诸如淀粉或纤维素之类的多糖）可促进片剂的润湿和 / 或溶胀并从而有利于活性物质的释放。山梨醇和甘露糖醇为可提高某些细胞提取剂（例如，酶）的稳定性的赋形剂。甘露糖醇可用于延缓细胞提取剂的释放。在一些实施例中，聚乙二醇（PEG）为用以控制活性物质从片剂释放的优选赋形剂。在一些实施例中，分子量在 3300 和 8000 道尔顿之间的 PEG 化合物可用于延缓活性物质从片剂的释放。

[0088] 制备片剂的方法在本领域中是已知的并且包括（例如）直接压片、湿法制粒、干法制粒和流化床制粒。

[0089] 根据本发明的释放单元包括包封细胞提取剂的蜡基质。在一些实施例中，多个细胞提取剂团粒可分散到蜡基质中。当蜡崩解（如，通过热熔融或机械破碎）时，细胞提取剂从蜡中释放。合适的蜡的非限制性实例包括天然的或合成的蜡或蜡类似物，包括石蜡、蒙旦蜡、巴西棕榈蜡、蜂蜡、鳞状蜡、地蜡、犹他（Utah）蜡、微晶蜡（例如塑料和槽底衍生的微晶蜡）、蜡替代物（例如费托蜡）、聚烯烃（例如聚乙烯、聚丙烯）以及它们的共混物和共聚物。

[0090] 在一些实施例中，细胞提取剂可以与蜡不混溶的溶液（如，水性溶液）的微滴形式分散于蜡中。在一些实施例中，细胞提取剂可以固体或半固体粒子或附聚物形式分散于蜡中。制备在蜡中的这种液体或固体分散体的方法在本领域中为熟知的。

[0091] 图 11 示出了包含基质材料 1192 的释放单元 1140 的一个实施例的透视图。在图示实施例中，基质材料 1192 包括蜡膜或蜡块。包含细胞提取剂的腔孔 1194 分散到基质材料 1192 中。已经认识到，可改变分散到释放单元 1140 中的细胞提取剂的量和 / 或浓度以及释放单元 1140 的形状和尺寸以便在给定检测制品内使用。

[0092] 根据本发明的释放单元包括利用包含细胞提取剂的基质材料涂覆的基材。包括具有细胞提取剂的经涂覆基材的释放单元公开于名称为“COATED SUBSTRATES COMPRISING A CELL EXTRACTANT AND BIODETECTION METHODS THEREOF (包含细胞提取剂的经涂覆基材及其生物检测方法)”的PCT国际公开号WO 2010/129727中,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。基质材料可为本申请所述的任何合适的基质材料。

[0093] 可利用本领域中已知涂覆方法将基质材料涂覆到基材上,所述涂覆方法为(例如)浸涂、刮涂、帘式涂覆、喷涂、触涂、凹版式涂覆、照相凹版式涂覆和/或印刷方法(例如丝网印刷和喷墨印刷)。在一些实施例中,可施用预定图案的涂层。涂覆方法的选择将由固体基材的形状和尺寸而定,本领域的技术人员能够确定用于涂覆任何给定固体基材的合适方法。

[0094] 在一些实施例中,将基质材料以包含细胞提取剂的预成形基质(例如,聚合物基质)涂覆到基材上。在一些实施例中,将包含基质前体和细胞提取剂的混合物涂覆到基材上并且使用(例如)本领域中已知和/或本申请所述的聚合方法在基材上形成基质。在一些实施例中,将预成形基质涂覆到基材上或者在基材上形成基质,随后使用本领域中已知和/或本申请所述的方法将细胞提取剂加载到基材中。

[0095] 在一些实施例中,涂层混合物包含添加剂(例如,粘结剂或增粘剂)以有利于基质材料粘附至基材。添加剂的非限制性实例包括树胶(如,瓜耳胶、黄原胶、海藻酸盐、角叉菜胶、果胶、琼脂、结冷胶、琼脂糖)、多糖(如,淀粉、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素)和多肽(如,明胶)。

[0096] 应选择涂层添加剂以使其与用于检测样品中的细胞的检测系统具有相容性。可通过如下方式来测试相容性:将添加剂与检测系统(如,荧光素酶和荧光素)和待检测的分析物(如,ATP)结合、测定响应、并确定添加剂是否实质上抑制分析物的检测,如本申请所述。

[0097] 其上涂覆基质材料的基材包括多种固体基材。其上可涂覆包含细胞提取剂的基质的合适基材材料的非限制性实例包括塑料(如,聚碳酸酯、聚烯烃(如聚乙烯和聚丙烯)、聚酯、聚丙烯酸酯和它们的衍生物和共混物)、金属(如,金、石墨、铂、钯、镍)、玻璃、纤维素和纤维素衍生物(例如,滤纸)、陶瓷材料、开孔泡沫(如,聚氨酯泡沫)、非织造材料(例如,膜、PTFE膜)以及它们的组合(如,涂覆金属箔的塑料)。基材可被构造成多种形式,包括(例如)纤维、非织造材料(如,由包含纤维素的纤维材料制成的非织造材料、玻璃、聚酯、聚烯烃、聚苯乙烯以及它们的衍生物或组合)、粒子(如,珠粒)、片材、薄膜和膜。

[0098] 在一些实施例中,基材可为过滤器,例如等级4的20-25 μ m定性滤纸、等级30的玻璃纤维滤纸、等级GB005的(1.5mm)厚的高吸收吸墨纸(上述均得自Whatman, Inc, Florham Park, NJ)、Zeta Plus Virosorb 1MDS盘(CUNO, Inc, Meriden, CT)以及0.45 μ m的MF-Millipore膜(Millipore, Billerica, MA)。上述基材中的任何一种均可加载包含聚乙烯醇的细胞提取剂溶液。上述基材中的任何一种均可加载包含VANTOCIL(Arch Chemicals, Norwalk, CT)的细胞提取剂溶液。上述基材中的任何一种均可加载包含CARBO SHIELD(Lonza, Walkersville, MD)的细胞提取剂溶液。上述基材中的任何一种均可加载包含5%的苯扎氯铵溶液的细胞提取剂溶液。

[0099] 应选择基质材料、细胞提取剂和基材以使其与用于检测样品中的细胞的检测系统具有相容性。可通过如下方式来测试该相容性:1) 检测检测系统中的分析物的量(如,将

ATP 与荧光素和荧光素酶结合并且利用发光计来测定发光量,如本申请所述);2) 利用基质材料、细胞提取剂或基材重复检测步骤;以及 3) 将步骤 1 的结果与步骤 2 的结果进行比较以确定基质材料、细胞提取剂或基材是否实质上抑制反应中的分析物的检测和 / 或测定。

[0100] 在一些实施例中,释放单元包括经涂覆基材。涂层、基材、和 / 或经涂覆基材适于充当物理屏障和 / 或扩散屏障以在短时间内防止有效量的细胞提取剂直接溶解到水性混合物中。

[0101] 经涂覆基材包括涂层和基材。涂层包含细胞提取剂。可使用本领域中已知的涂覆方法将涂层施用至基材,例如,浸涂、刮涂、帘式涂覆、喷涂、触涂、凹版式涂覆、照相凹版式涂覆和 / 或印刷方法(例如丝网印刷和喷墨印刷)。在一些实施例中,可施用预定图案的涂层。涂覆方法的选择将受固体基材的形状和尺寸的影响,本领域的技术人员能够确定用于涂覆任何给定固体基材的合适方法。

[0102] 其上施用涂层的基材包括多种基材材料。其上施用本发明的涂层的合适基材材料的非限制性实例包括塑料(例如,聚碳酸酯、聚烯烃(聚乙烯和聚丙烯)、聚酯、聚丙烯酸酯以及它们的衍生物和共混物)、金属(例如,金、石墨、铂、钯、镍)、玻璃、纤维素和纤维素衍生物(例如,滤纸)、陶瓷材料、开孔泡沫(如,聚氨酯泡沫)、非织造材料(例如,膜、PTFE 膜)以及它们的组合(如,涂覆金属箔的塑料)。基材可被构造成多种形式,包括(例如)纤维、非织造材料、片材和膜。

[0103] 在一些实施例中,基材表面可为相对平滑的。在一些实施例中,基材的至少一部分可包括腔孔。图 12a 示出了包括具有腔孔 1294 的基材 1292 的释放单元 1240 的一个实施例的俯视图。在图示实施例中,基材 1292 可为膜基材。图 12b 示出图 12a 的释放单元 1240 的剖视图。该图示实施例示出了具有腔孔 1294a 的基材 1292,其中腔孔开口 1295a 的横截面积约等于腔孔 1294a 最大的横截面积。基材 1292 还包括腔孔 1294b,其中腔孔开口 1295b 的横截面积小于腔孔 1294b 的最大横截面积。尽管不受理论的约束,但能预期到,可将腔孔开口面积与腔孔体积的比率作为一种方式用于控制细胞提取剂从释放单元的释放速率。尽管图示实施例包括相对均一的、球形或半球形的腔孔,但能预期到,合适的腔孔包括多种形状,包括不均一的、不规则的形状。

[0104] 本申请所用的基材包括微复制型基材。微复制或“微复制型”是指通过如下方法产生的微复制表面(如,微通道),其中所述结构化表面特征在产品到产品的制备期间保持变化不超过约 50 微米的个体特征保真度。微复制表面被优选地制备为使得所述结构化表面特征在产品到产品的制备期间保持变化不超过 25 微米的个体特征保真度。根据本发明,微结构表面包括如下表面,所述表面具有各特征得到精确复制的表面特征(即,物品、地方或其区域的表面特征),个体特征保真性以约 50 至 0.05 微米之间的分辨率、在一些实施例中为约 25 至 1 微米之间的分辨率保持。合适的微复制型基材描述于美国专利申请公开号 US 2007/0212266A1 中,上述专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。

[0105] 图 13 示出了包括微复制型腔孔的释放单元 1340 的一个实施例的顶部透视图。释放单元 1340 包括基材 1392,所述基材 1392 包括其间形成有通道 1304 的间隔开峰 1302。如本申请所述,利用包含细胞提取剂的组合物来涂覆基材 1392。可选地,覆盖件 1306(例如,塑料或金属膜)可附接至(如,通过粘合剂,未示出)基材 1392,从而形成覆盖通道 1305。可选地,可堆叠两个或更多个基材 1392(如图所示)以制成一层或多层覆盖通道 1305。基材

1392 可在利用细胞提取剂涂覆之后进行堆叠或者它们可在利用细胞提取剂涂覆之前进行堆叠。在其中基材 1392 在涂覆之前进行堆叠的实施例中,可通过将细胞提取剂施用至覆盖通道 1305 的末端来涂覆各个通道并且可允许通过毛细管作用来填充覆盖通道。

[0106] 覆盖通道 1305 可提供相对小的开口(即,通道的一个或两个末端)以接触其中悬浮释放单元 1340 的液体,由此控制和 / 或延缓有效量的细胞提取剂扩散出覆盖通道 1305 并扩散到液体内。

[0107] 可涂覆具有微复制型表面和 / 或腔孔的释放单元以利用细胞提取剂组合物来填充微通道。细胞提取剂组合物可是液体、固体、半固体或上述任何两者或更多者的组合。

[0108] 在一些实施例中,基材可为过滤器,例如等级 4 的 20-25 μm 定性滤纸、等级 30 的玻璃纤维滤纸、等级 GB005 的 (1.5mm) 厚的高吸收吸墨纸(上述均得自 Whatman, Inc, Florham Park, NJ)、Zeta Plus Virosorb 1MDS 盘 (CUNO, Inc, Meriden, CT) 以及 0.45 μm 的 MF-Millipore 膜 (Millipore, Billerica, MA)。上述基材中的任何一种均可加载包含聚乙烯醇的细胞提取剂溶液。上述基材中的任何一种均可加载包含 VANTOCIL (Arch Chemicals, Norwalk, CT) 的细胞提取剂溶液。上述基材中的任何一种均可加载包含 CARBO SHIELD (Lonza, Walkersville, MD) 的细胞提取剂溶液。上述基材中的任何一个均可加载包含 5% 的苯扎氯铵溶液的细胞提取剂溶液。

[0109] 在一些实施例中,可利用包含细胞提取剂的基质材料涂覆基材,如本申请所述。在一些实施例中,基质材料(例如,聚合物材料或非聚合物材料(如陶瓷))可基本上不溶于液体(例如,包含样品的水性液体)。此外或作为另外一种选择,基质材料可基本上不溶于有机溶剂。在一些实施例中,基质材料可包含如下赋形剂,所述赋形剂在环境温度下基本上溶于和 / 或分散于包含样品的液体混合物(例如,水性溶液)中。在一些实施例中,基质材料可包含如下赋形剂,所述赋形剂在环境温度下基本上不溶于和 / 或不可分散于水性溶液中(即,可通过温度变化和 / 或添加化学触发剂来触发赋形剂的溶解或分散)。

[0110] 在一些实施例中,用于涂覆基材的基质材料为可包含细胞提取剂的预成形基质(如,聚合物基质)。在一些实施例中,将包含基质前体和细胞提取剂的混合物涂覆到基材上并且随后可利用(例如)本领域中已知的和 / 或本申请所述的聚合方法在基材上形成基质。在一些实施例中,将预成形基质涂覆到基材上或者在基材上形成基质,随后利用本领域中已知的和 / 或本申请所述的方法将细胞提取剂加载到基材内。

[0111] 根据本发明的基质可包含掺有赋形剂的细胞提取剂。“赋形剂”被广泛地使用,包括例如粘结剂、助流剂(例如,流动助剂)、润滑剂、崩解剂和上述中的任何两者或更多者。在一些实施例中,经涂覆基材可包括外涂层,当经涂覆基材接触液体(如,包含样品的水性液体)时,所述外涂层可影响活性物质(如,细胞提取剂)的释放。在一些实施例中,基质可包含用作该基质的增量剂的填充剂(例如,诸如乳糖或山梨糖醇之类的糖)。当基质接触液体时,崩解剂(如,诸如淀粉或纤维素之类的多糖)可促进基质的润湿和 / 或溶胀,从而有利于活性物质的释放。山梨醇和甘露糖醇可为提高某些细胞提取剂(如,酶)的稳定性的赋形剂。甘露糖醇可用于延缓细胞提取剂的释放。在一些实施例中,聚乙二醇(PEG)为用以控制活性物质从基质释放的优选赋形剂。在一些实施例中,分子量在 3300 和 8000 道尔顿之间的 PEG 化合物可用于延缓活性物质从基质的释放。

[0112] 在一些实施例中,涂层混合物包含添加剂(如,粘结剂或增粘剂)以有利于涂层粘

附至基材。添加剂的非限制性实例包括树胶(如,瓜耳胶、黄原胶、海藻酸盐、角叉菜胶、果胶、琼脂、结冷胶、琼脂糖)、多糖(如,淀粉、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、琼脂糖)和多肽(如,明胶)。

[0113] 应选择基质材料、细胞提取剂、基材和涂覆添加剂以使其与用于检测样品中的细胞的检测系统具有相容性。可通过如下方式来测试该相容性:1) 检测检测系统中的分析物的量(如,将 ATP 与荧光素和荧光素酶合并并且利用发光计来测定发光量,如 PCT 国际公开号 W02010/129727 的实例 6 中所述);2) 利用基质材料、细胞提取剂、基材或涂覆添加剂重复检测步骤;以及 3) 将步骤 1 的结果与步骤 2 的结果进行比较以确定添加剂是否实质上抑制反应中的分析物的检测和 / 或测定。

[0114] 在一些实施例中,用于涂覆基材的材料可包括含有细胞提取剂的壳结构,如本申请所述。根据本申请的描述,可确定特定壳结构与特定检测系统的相容性。

[0115] 在一些实施例中,经涂覆基材还可包括屏障层。屏障层可充当延缓细胞提取剂从经涂覆基材释放的装置。屏障层包括(例如)易蚀涂层(例如本领域中已知的那些)以控制和 / 或延缓活性成分从片剂或胶囊药剂的释放。屏障层还包括可通过物理或机械处理破裂的层(如,可在升高的温度下破裂的蜡层)。

[0116] 在一些实施例中,包封材料可在包封剂暴露于活化刺激(例如压力、剪切力、热、光、pH 变化)、暴露于另一种化学品、离子强度变化等等之后被活化以释放有效量的细胞提取剂。活化可能导致(例如)包封材料的溶解或部分溶解、包封材料的透化和 / 或包封材料的崩解或部分崩解(如,通过压裂或熔融如(例如)微晶蜡之类的固体材料)。

[0117] 在一些实施例中,释放单元包括容纳和 / 或含有细胞提取剂的包封材料。合适的包封材料描述于名称为“ARTICLES WITH SHELL STRUCTURES INCLUDING A CELL EXTRACTANT AND BIODETECTION METHODS THEREOF”(具有包含细胞提取剂的壳结构的制品及其生物检测方法)的 PCT 国际公开号 W0 2010/129728 中,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。包封材料可充当物理屏障和 / 或扩散屏障,以在一定时间内防止有效量的细胞提取剂直接溶解和 / 或分散到液体混合物(例如,包含样品的水性混合物)中。

[0118] 在一些实施例中,包封材料可包含基质材料,如本申请所述。

[0119] 在一些实施例中,包封材料可在包封剂暴露于活化刺激(例如压力、剪切力、热、光、pH 变化)、暴露于另一种化学品、离子强度变化等等之后被活化以释放有效量的细胞提取剂。活化可能导致(例如)包封材料的溶解或部分溶解、包封材料的透化(例如脂质双分子层的破裂)和 / 或包封材料的崩解或部分崩解(例如,通过压裂或熔融如(例如)微晶蜡之类的固体材料)。

[0120] 在一些实施例中,释放单元形成壳结构。图 14 示出了根据本发明的释放单元 1440 的实施例。释放单元 1440 包括壳结构 1401 和芯 1404。客体化合物 1405 (如,本申请所述的细胞提取剂)位于芯 1404 中。芯 1404 可包括液体、固体、半固体或者它们的组合。客体化合物 1405 可溶于和 / 或分散于其中。

[0121] 在一些实施例中,释放单元的壳结构可包含细胞提取剂。图 15 示出了根据本发明的释放单元 1540 的实施例。释放单元 1540 包括含有客体化合物 1505 (如,本申请所述的细胞提取剂)的壳结构 1501。释放单元 1540 还包括芯 1504,所述芯 1504 可包括液体、固体、半固体或者它们的组合。

[0122] 在一些实施例中,释放单元可包含两种或更多种客体分子。图 16 示出了根据本发明的复合释放单元 1640 的实施例。复合释放单元 1640 包括含有第一客体分子 1606 的壳结构 1602 和含有第二客体分子 1605 的芯 1604。在一些实施例中,第一和第二客体化合物(分别为 1604 和 1605)可为相同的化合物。在一些实施例中,第一和第二客体化合物(分别为 1605 和 1606)可为不同的化合物。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为细胞提取剂。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为如本申请所述的检测试剂。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为细胞提取剂并且至少一种客体化合物可为检测试剂。

[0123] 在一些实施例中,释放单元可包括两个或更多个壳结构。图 17 示出了释放单元 1740 的实施例,所述释放单元 1740 包括第一壳结构 1701、第二壳结构 1702 和第三壳结构 1703 (释放单元 1740 的芯未示于该图中)。在此实施例中,第二壳结构 1702 包含第一客体化合物 1705 并且第三壳结构 1703 包含第二客体化合物 1706。在此实施例中,各个连续壳结构均以类洋葱样式被相邻壳结构包封。在一些实施例中,第一和第二客体化合物(分别为 1705 和 1706)可为相同的化合物。在一些实施例中,第一和第二客体化合物(分别为 1705 和 1706)可为不同的化合物。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为细胞提取剂。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为如本申请所述的检测试剂。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为细胞提取剂并且至少一种客体化合物可为检测试剂。

[0124] 图 18 示出了包括两个或更多个壳结构的释放单元 1840 的替代实施例。释放单元 1840 包括第一壳结构 1801、第二壳结构 1802 和第三壳结构 1803。第二壳结构 1802 包含第一客体化合物 1805 并且第三壳结构包含第二客体化合物 1806。在此实施例中,第二壳结构 1802 和第三壳结构 1803 均由第一壳结构 1801 包封。在一些实施例中,第一和第二客体化合物(分别为 1805 和 1806)可为相同的化合物。在一些实施例中,第一和第二客体化合物(分别为 1805 和 1806)可为不同的化合物。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为细胞提取剂。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为如本申请所述的检测试剂。在一些实施例中,至少一种客体化合物可为细胞提取剂并且至少一种客体化合物可为检测试剂。

[0125] 本发明的合适壳结构包括如下聚合物壳,所述聚合物壳包含(例如)纤维素、纤维素衍生物(如,纤维素醚、纤维素酯、硝酸纤维素、三乙酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素和羟丙甲纤维素酞酸酯)、丙烯酸酯的聚合物或共聚物,或者丙烯酸酯的共聚物(如,聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚(丙烯酸酯-甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯-甲基丙烯酸甲酯)、聚丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸甲酯、聚(丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸甲酯-三甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯氯化物)和聚(丙烯酸乙酯-甲基丙烯酸甲酯-三甲基胺基乙基甲基丙烯酸酯氯化物))、蛋白质(如,白蛋白、明胶、玉米蛋白、酪蛋白、胶原和纤维蛋白原)、乙烯基聚合物(如,聚氯乙烯、聚乙酸乙烯酯、聚乙烯醇、聚苯乙烯和聚丙烯腈)、胶(如,瓜耳胶、阿拉伯树胶、黄原胶、刺槐豆胶)、天然或改性的淀粉、糊精、右旋糖酐、脱乙酰壳多糖、海藻酸盐以及上述任何两者或更多者的组合,如美国专利号 7,485,609 中所描述,该专利全部内容以引证方式并入本申请。

[0126] 此外或作为另外一种选择,本发明的合适壳结构包括含有线性叠堆(chromonic)材料的壳结构。合适的线性叠堆材料包括如(例如)美国专利号 7,824,732 中所描述的形成壳层的那些,该专利全部内容以引证方式并入本申请。

[0127] 由线性叠堆材料构成的壳层可尤其适用于客体化合物(例如,细胞提取剂)的封装和受控释放。例如,可将细胞提取剂封装在如美国专利号 7,824,732 中所描述的线性叠堆纳米粒子内。线性叠堆物质可防止细胞提取剂经受某些环境条件并且随后在其他环境条件下可控制地递送细胞提取剂。然而,与仅包含线性叠堆材料的壳相比,包括含有线性叠堆材料、多价阳离子和酸阴离子的复合物的壳(“复合壳”)可相对某些环境条件提供增强的保护,所述酸阴离子选自 HCO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ 、 $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3^-$ 、 BO_3^{3-} 和 SO_4^{2-} 。

[0128] 含有封装于一个或多个线性叠堆材料壳层中的线性叠堆纳米粒子的多层线性叠堆结构在本领域中是已知的。细胞提取剂可封装于线性叠堆纳米粒子和/或一个或多个封装纳米粒子的线性叠堆壳层中。复合壳可与一个或多个线性叠堆壳层联合使用(例如,复合壳可为最内壳层、中间壳层、最外壳层或者它们的任何组合)。复合壳层可为细胞提取剂的可控释放(例如,持续释放)提供增强的灵活性。

[0129] 根据本发明的壳层还包括基本上围绕细胞提取剂的蜡结构(例如,胶囊)。在一些实施例中,可将细胞提取剂的大致一体主体(如,液体、固体、多个固体(例如粒子)、半固体或它们的组合)设置在外壳蜡的内部。当蜡崩解(如,通过热熔融或机械破碎)时,细胞提取剂从蜡中释放。合适的蜡包括石蜡、微晶蜡或者它们的衍生物和/或组合。

[0130] 根据本发明的壳层还包括脂质双分子层(例如,脂质体)。可通过本领域中已知的脂质体形成技术来形成脂质体。可由包含细胞提取剂的溶液来形成脂质体,以使得细胞提取剂的至少一部分被捕集在脂质体的芯中。相比于可包含可破坏任何类型的脂质双分子层的细胞提取剂的其它类型的释放单元,脂质体释放单元可包含实质上不损害脂质体的脂质双分子层的完整性的细胞提取剂。这种细胞提取剂的非限制性实例包括实质上不损害脂质体的多肽(例如溶菌酶和溶葡萄球菌酶)和抗生素。

[0131] 当脂质体接触液体(例如,包含样品的水性液体)时,细胞提取剂可通过(例如)扩散出脂质双分子层而从脂质体释放。在一些实施例中,可通过利用以热能或机械能(如,热、冷冻-融化或超声处理)破坏脂质双分子层完整性的释放因子以“爆裂”方式释放脂质体的整个内容物(例如细胞提取剂溶液),或者通过添加化学释放因子以渗透化处理和/或溶解脂质双分子层。在一些实施例中,可使用溶细胞肽来触发脂质体的破坏,如名称为“POLYPEPTIDES FOR MICROBIAL DETECTION”(用于微生物检测的多肽)的 PCT 国际公开号 W02009/102859 中所描述,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。

[0132] 在一些实施例中,本发明的释放单元可包括壳结构,所述壳结构包含涂覆在基材上的细胞提取剂。

[0133] 细胞提取剂 :

[0134] 在一些实施例中,化学性细胞提取剂包括生化物质,例如蛋白(如,溶细胞肽和酶)。在一些实施例中,细胞提取剂可增加细胞的渗透性,从而造成生物分析物从细胞内部释放出来。在一些实施例中,细胞提取剂可造成或促进细胞的裂解(例如破裂或部分破裂)。

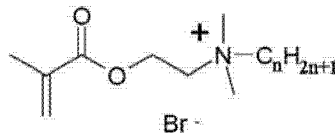
[0135] 在一些实施例中,细胞提取剂包括多种本领域所知的化学物质或化学物质混合物并且包括(例如)表面活性剂和季铵、双胍、表面活性剂、酚类、溶细胞肽和酶。通常,当释放单元与水性液体接触时,细胞提取剂不显著结合至(共价地或非共价地)释放单元并且可从释放单元中释放。

[0136] 表面活性剂通常既包含亲水基团又包含疏水基团。释放单元可含有一种或多种

选自阴离子表面活性剂、非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性离子表面活性剂以及它们的混合物的表面活性剂。在水中会离解并释放阳离子和阴离子的表面活性剂称作离子表面活性剂。如果存在两性离子表面活性剂的话,其通常与一种或多种阴离子和 / 或非离子表面活性剂联合使用。合适的表面活性剂和季铵的非限制性实例包括 TRITON X-100、Nonidet P-40(NP-40)、Tergitol、Sarkosyl、Tween、SDS、Igepal、皂草苷、CHAPSO、苯扎氯铵、苄索氯铵、‘cetrimide’(十二烷基-、十四烷基-和十六烷基-三甲基溴化铵的混合物)、十六烷基氯化吡啶鎓、(甲基)丙烯酰胺基烷基三甲基铵盐(如,3-甲基丙烯酰胺基丙基三甲基氯化铵和3-丙烯酰胺基丙基三甲基氯化铵)和(甲基)丙烯酰氧基烷基三甲基铵盐(如,2-丙烯酰氧基乙基三甲基氯化铵、2-甲基丙烯酰氧基乙基三甲基氯化铵、3-甲基丙烯酰氧基-2-羟基丙基三甲基氯化铵、3-丙烯酰氧基-2-羟基丙基三甲基氯化铵和2-丙烯酰氧基乙基三甲基铵甲基硫酸酯)。其他合适的单体季氨基盐包含具有含2-22个碳原子或2-20个碳原子的烷基的二甲基烷基铵基团。即,所述单体包括一组化学式

[0137] $-N(CH_3)_2(C_nH_{2n+1})^+$, 其中 n 为具有 2 至 22 的值的整数。示例性的单体包括但不限于以下化学式的单体

[0138]



[0139] 其中 n 是范围在 2 至 22 的整数。

[0140] 合适的双胍(包括二双胍在内)的非限制性实例包括聚六亚甲基双胍盐酸盐、对氯苯基双胍、4-氯-二苯甲基双胍、阿来西定、卤化的己定(如但不限于氯己定(1,1'-六亚甲基-双-5-(4-氯苯基双胍))以及它们的盐。

[0141] 合适的酚类的非限制性实例包括苯酚、水杨酸、2-苯基苯酚、4-叔戊基苯酚、氯二甲苯酚、六氯酚、4-氯-3,5-二甲基苯酚(PCMX)、2-苄基-4-氯酚、三氯生、丁基化羟基甲苯、2-异丙基-5-甲基苯酚、4-壬基苯酚、二甲苯酚、双酚A、邻苯基苯酚以及吩噻嗪(如氯丙嗪、丙氯拉嗪和硫利达嗪)。

[0142] 合适的溶细胞肽的非限制性实例包括 A-23187(钙离子载体)、蛙皮抗菌肽、李斯特菌溶胞素、Ranalexin、气单胞菌溶素、Dermatoxin、Maculatin、Ranateurin、两性霉素 B、来自动物毒液的直接溶解因子、爪蟾抗菌肽、皱褶菌素、Ascapin、白喉毒素、Maxymin、皂草苷、曲霉溶血素、Distinctin、蜂毒肽、金黄色葡萄球菌毒素、(α , β , x , δ)、丙甲甘肽、七叶亭、Metridiolysin、链球菌溶血素 O、载脂蛋白、菲律宾菌素、尼日利亚菌素、链球菌溶血素 S、ATP 易位酶、Gaegurin、制霉菌素、会联蛋白、铃蟾抗菌肽、GALA、Ocellatin、表面活性肽、Brevinin、短杆菌肽、P25、微管蛋白、Buforin、螺旋状红细胞裂解肽、沼泽水苏苷、缬氨霉素、Caerin、溶血素、磷脂酶、弧菌溶血素、蜡状菌溶素、离子霉素、Phylloxin、大肠杆菌素、KALA、多烯抗生素、Dermadistinctin、LAGA、多粘菌素 B。

[0143] 合适的酶的非限制性例实例包括溶菌酶、溶葡萄球菌酶、噬菌体溶素、无色肽酶、labiase、变溶菌素、链球菌溶血素、破伤风溶血素、 α -溶血素、溶细胞酶、真菌裂解酶、纤维素酶、果胶酶、**Driselase[®]**、**Viscozyme[®] L**、果胶溶酶。

[0144] 在其中释放单元为水凝胶的一些实施例中,制成水凝胶的前体组合物可包含如 WO

2007/146722 中所描述的阴离子或阳离子单体,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。将阴离子或阳离子单体掺入到水凝胶内,由此可保持细胞提取剂的活性。在一些实施例中,阴离子或阳离子单体可交联到水凝胶的表面。可将水凝胶珠粒或纤维短暂地浸入阳离子单体溶液中,随后快速移出并用光化辐射(例如,UV、电子束)进行交联。这将导致阳离子单体化学键合到水凝胶珠粒或纤维的外表面。

[0145] 在一些实施例中,细胞提取剂的各种组合可用于前体组合物(其用以合成水凝胶)或吸着物(其在水凝胶合成后加载到水凝胶中)。也可以使用任何其他已知的与前体组合物或所得的水凝胶相容的细胞提取剂。这些包括(但不限于)氯己定盐如氯己定葡萄糖酸盐(CHG)、对氯间二甲苯酚 1(PCMX)、三氯生、六氯酚、甘油和丙二醇的脂肪酸单酯和单醚(如甘油单月桂酸酯)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、甘油单辛酸酯、甘油单癸酸酯、丙二醇单月桂酸酯、丙二醇单辛酸酯、丙二醇单癸酸酯、苯酚、包含(C12-C22)疏水物和季铵基团或质子化叔氨基基团的表面活性剂和聚合物、含季氨基的化合物如季硅烷化和聚季铵(如聚六亚甲基双胍)、含过渡金属离子(如铜)的化合物、含锌的化合物和含银的化合物(如银金属、银盐(如氯化银)、银氧化物和磺胺嘧啶银)、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、奥替尼啶、2-溴-2-硝基丙-1,3-二醇或者前述物质中的任何两种或多种的混合物。

[0146] 合适的细胞提取剂还包括二烷基铵盐,包括N-(n-十二烷基)-二乙醇胺;阳离子乙氧基化胺,包括‘Genaminox K-10’、Genaminox K-12、‘Genamin TCL030’和‘Genamin C100’;脘,包括普罗帕脘和双溴丙脘;肽抗生素,包括多粘菌素B和乳链球菌素;聚烯抗生素,包括制霉菌素、两性霉素B和纳他霉素;咪唑,包含益康唑、克霉唑和咪康唑;氧化剂,包含氯和碘的稳定形式;以及如美国专利号7,422,868中所描述的细胞提取剂,该专利全部内容以引证方式并入本申请。

[0147] 细胞提取剂优选选择成不会使本发明的检测系统(例如检测试剂,如荧光素酶)失活。对于需要较严格的细胞提取剂(如,离子型去垢剂)的微生物而言,改进的检测系统(例如,在存在这些试剂的情况下显示出增强的稳定性的荧光素酶,例如公开于全部内容以引证方式并入本申请的美国专利申请公开号2003/0104507中的那些)尤其优选。

[0148] 本发明的方法使得可从释放单元释放出有效量的细胞提取剂以造成生物分析物从活细胞的释放。本发明包括多种本领域已知的细胞提取剂,所述细胞提取剂中的每一种均可以不同的速度从释放单元释放出来并且可以与其他种类细胞提取剂不同的浓度发挥其对活细胞的作用。下面将提供有关在选择细胞提取剂时和在确定要在释放单元中包含的有效量时所要考虑的因素的指导。

[0149] 本领域已知的是,任何细胞提取剂的功效主要由以下两个因素决定:浓度和暴露时间。也就是说,一般而言,细胞提取剂的浓度越高,它对活细胞的作用(例如细胞膜的透化和/或生物分析物从细胞的释放)将越大。而且,在细胞提取剂的任何给定浓度下,一般而言,将活细胞暴露于细胞提取剂的时间越长,细胞提取剂的作用越大。本领域已知,其他的外在因素如pH、共溶剂、离子强度和温度也会影响某些细胞提取剂的功效。已知这些外在因素可通过例如温度控制器、缓冲液、样品制备等加以控制。这些因素以及细胞提取剂也会对用来检测生物分析物的检测系统具有影响。本领域的技术人员完全能够进行一些简单的实验以确定细胞提取剂的有效量,从而生产本发明的制品和实施本发明的方法。

[0150] 可进行初步实验,以确定不同浓度的细胞提取剂对细胞和 / 或检测系统的作用。初始,可根据对生物分析物检测系统的作用来筛选备选释放单元。例如,可利用本申请所述的细胞提取剂灌注射放单元。随后,可将包含细胞提取剂的释放单元设置到 ATP 检测分析法(不存在细菌细胞)中。可利用具有试剂级 ATP (如,约 0.1 至约 100 皮摩尔的 ATP) 的溶液来执行所述检测分析法并且可将具有释放单元的样品中通过荧光素酶反应发出的生物发光量与不具有释放单元的样品发出的生物发光量进行比较。优选地,具有释放单元的样品中的生物发光量比不具有释放单元的样品中的生物发光量高 50%。更优选地,具有释放单元的样品中的生物发光量比不具有释放单元的样品中的生物发光量高 90%。最优选地,具有释放单元的样品中的生物发光量比不具有释放单元的样品中的生物发光量高 95%。

[0151] 另外,可按照与 PCT 国际公开号 WO 2010/129726 的实例 21 中所描述相类似的方式来实验确定细胞提取剂对生物分析物从细胞的释放的作用。例如,在存在检测系统(如,包含荧光素、荧光素酶和 pH 约为 7.6 至 7.8 的缓冲液的 ATP 检测系统)的情况下,将细胞(如,微生物细胞(如金黄色葡萄球菌))的液体悬浮液暴露于相对宽范围浓度的细胞提取剂(如, BARDAC 205M)一段时间(如至多数分钟)以检测来自细胞的生物分析物。定期测量生物分析物,第一次测量通常在细胞提取剂加到混合物后紧接着进行,以确定是否可检测到生物分析物(在本实例中为 ATP)从细胞的释放。结果可指示用来检测从细胞释放的生物分析物的最佳条件(即细胞提取剂的液体浓度和暴露时间)。如 PCT 国际公开号 WO 2010/129726 的表 26 中所示,结果还可表明,在高浓度的细胞提取剂下,细胞提取剂可对生物分析物(如,ATP)的释放不太有效并且 / 或者可干扰检测系统(即,可吸收由检测试剂产生的光或颜色)。

[0152] 在确定了细胞提取剂在液体混合物中的有效量后,应对通过本申请所述的方法掺入到释放单元中的细胞提取剂的量进行考虑。当释放单元接触液体混合物(如,水性悬浮液中的样品)时,细胞提取剂可从释放单元中释放(如,通过扩散)并且液体混合物中的细胞提取剂的浓度会增加,直至达到平衡。尽管不受理论的约束,但可设想到,在达到平衡之前,液体中将存在细胞提取剂的浓度梯度,其中在液体的靠近释放单元的部分中存在较高浓度的提取剂。当细胞提取剂的浓度在所述液体的含有细胞的部分中达到有效浓度时,细胞释放出生物分析物。所释放的生物分析物从而可供检测系统进行检测。

[0153] 可通过若干因素来控制在含有样品的液体中达到细胞提取剂的有效浓度。例如,加载到释放单元中的细胞提取剂的量可影响平衡时细胞提取剂在液体中的最终浓度。另外,释放单元的量,以及在一些实施例中液体混合物中的释放单元的面积的大小可影响细胞提取剂从释放单元的释放速率和平衡时细胞提取剂在液体中的最终浓度。此外,水性介质的温度可影响释放单元释放细胞提取剂的速率。其他因素(如细胞提取剂和释放单元的离子性质和 / 或疏水性质)可影响细胞提取剂从释放单元释放的量和细胞提取剂从释放单元释放的速率。所有这些因素都可由本领域的技术人员用常规实验进行优化,以获得为检测样品中的细胞所需的参数(例如制品的制造上的考虑因素和方法的出结果时间)。通常,希望将至少足够的细胞提取剂加入到释放单元内以在细胞提取剂在释放单元和包含样品材料的液体体积之间达到平衡时实现有效量(该有效量通过使用不含释放单元的细胞提取剂的实验来确定)。可能期望的是,将较大量的细胞提取剂添加至释放单元(相比于通过使用不含释放单元的细胞提取剂的实验确定的量)以减少释放单元释放有效量的细胞提取

剂所需的时间。

[0154] 在其中释放单元包括基质的一些实施例中,细胞提取剂可扩散到基质内、扩散出基质外或这两者都有。应可通过(例如)如下方式来控制扩散速率:改变基质材料和/或交联密度、改变在其中制备基质的极性溶剂、改变细胞提取剂在其中制备基质的极性溶剂中的溶解度和/或改变细胞提取剂的分子量。还可通过改变基质的形状、尺寸和表面形貌来改变扩散速率。

[0155] 尽管不受理论的约束,但据信,细胞提取剂可在释放单元与液体(如,包含样品的水性液体)接触时自发迁移出(例如,通过扩散)释放单元。在一些实施例中,可促进细胞提取剂迁移出释放单元。

[0156] 在一些实施例中,通过提供化学促进剂来促进细胞提取剂迁移出释放单元。化学促进剂可为(例如)酸或碱。改变混合物的pH值可干扰释放单元和细胞提取剂之间的离子相互作用,由此促进细胞提取剂迁移出释放单元。名称为 ANIONIC HYDROGEL MATRICES WITH PH DEPENDENT MODIFIED RELEASE AS DRUG CARRIERS(具有依赖于PH改进释放性的作为药物载体的阴离子水凝胶基质)的PCT国际公开号W02005/094792公开了具有药物或杀菌剂的释放改变依赖于pH值的水凝胶组合物,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。在一些实施例中,可通过改变液体的离子强度(如,通过添加或移除盐)来促进细胞提取剂的迁移。

[0157] 在一些实施例中,通过机械方法来促进细胞提取剂迁移出释放单元。合适的机械方法的非限制性实例包括振动、搅拌或压缩释放单元。

[0158] 可使释放单元静态地、动态地(即在通过(例如)振动、搅拌、通气或压缩进行混合的情况下)或静态动态相结合地与液体样品材料进行接触。PCT国际公开号W0 2010/129726的实例16表明混合可引起有效量的细胞提取剂从释放单元的更快释放。PCT国际公开号W02010/129726的实例17表明在一些实施例中压缩释放单元可引起有效量的细胞提取剂从释放单元的更快释放。压缩释放单元可包括(例如)将释放单元压靠至一表面和/或压碎释放单元。因此,在一些实施例中,混合可有利地提供细胞提取剂的更快释放,从而提供样品中的生物分析物(例如来自活细胞)的更快检测。在一些实施例中,压缩释放单元(例如通过用样品采集装置(如拭子或刮刀)、载体(下面描述)或一些其他合适的器具相对释放单元施加压力)能有利地提供细胞提取剂的更快释放,从而提供样品中的生物分析物的更快检测。另外,可在操作者方便时执行压缩释放单元的步骤,以加速细胞提取剂的释放。

[0159] 在一些实施例中,静态接触可延迟有效量的细胞提取剂的释放,从而给操作者提供额外的时间以在检测生物分析物之前执行其他的程序(例如试剂添加、仪器校准和/或样品传送)。在一些实施例中,可能有利的是将混合物静态保持至进行第一次生物分析物测量为止,然后将样品进行动态混合以减少释放有效量的细胞提取剂所需的时间。

[0160] 能完全预期的是,在本发明方法中起作用的最优选的浓度或浓度范围对于不同的微生物和对于不同的细胞提取剂而言将是不同的,可用本申请描述的方法或本领域的技术人员公知的方法凭经验确定。

[0161] 样品和样品采集装置:

[0162] 本发明的制品和方法提供对样品中的生物分析物的检测。在一些实施例中,所述制品和方法提供对来自样品中的活细胞的生物分析物的检测。在某些实施例中,所述制品

和方法提供对样品中的活微生物细胞的检测。在某些优选实施例中,所述制品和方法提供对样品中的活细菌细胞的检测。

[0163] 本申请所用的术语“样品”以其最广的含义使用。样品为可含有用本发明进行分析的生物分析物(如 ATP)的组合物。生物分析物可存在于样品中的细胞(如细菌)中。尽管通常已知或认为样品包含细胞或细胞群,可选地将其放入生长培养基或细胞裂解液中。样品也可为固体表面(例如,拭子、膜、过滤器、粒子),在该表面上可包括附着的细胞或细胞群。能够想到的是,对于这种固体样品,通过使该固体与可与根据本发明的细胞浓集剂混合的液体(如,水溶液)接触来制备水性样品。

[0164] 合适的样品包括固体材料(如,颗粒、过滤器)、半固体材料(如,凝胶、固体的液体悬浮液或者浆液)、液体或它们的组合的样品。合适的样品还包括包含固体、液体或它们的组合的表面残余物。表面残余物的非限制性实例包括来自环境表面(如,地板、墙壁、天花板、传染体、设备、水和水容器、空气过滤器)、食物表面(如,蔬菜、水果和肉类表面)、食物加工表面(如,食物加工设备和砧板)和临床表面(如,组织样品、皮肤和黏膜)的残余物。样品还可包括诸如原油或部分精炼油、汽油或油漆之类的混合物。

[0165] 收集样品材料(包括表面残余物在内)以供检测生物分析物是本领域已知的。各种样品采集装置,包括吸管、刮刀、海绵、拭子等等,已被描述并可用于本发明的方法中。

[0166] 细胞浓集剂 :

[0167] 本发明的方法包括使用细胞浓集剂来结合液体样品中存在的细胞。将细胞浓集剂与液体样品接触一段时间。细胞可以共价方式、非共价方式(如,通过疏水或离子相互作用)或通过共价和非共价结合的组合被结合至细胞浓集剂。在细胞已结合至细胞浓集剂之后,可通过(例如)沉降、絮凝、离心、过滤或上述方式的任何组合将细胞浓集剂从液体样品中去除。

[0168] “细胞浓集剂”以广义方式进行使用,其包括可悬浮于液体中并从而可捕集和保留存在于液体中的微生物的材料(如,颗粒、纤维)。尽管细胞浓集剂可通过过滤过程进行收集,但其不必需要过滤过程来捕集微生物。

[0169] 某些细胞浓集剂为本领域中已知的并且适用于本发明的方法。合适细胞浓集剂的非限制性实例包括羟基磷灰石(Berry 等人;Appl. Environ. Microbiol. ;63:4069-4074 ;1997)、磁性小珠(Oster 等人,J. Magnetism and Magnetic Mat. ;225:145-150 ;2001)、亚铁磁矿物、磁铁矿、脱乙酰壳多糖及亲和性载体。使用包括固定化金属载体材料的组合物来从样品中捕集或浓集微生物在名称为“COMPOSITIONS, METHODS, AND DEVICES FOR ISOLATING BIOLOGICAL MATERIALS (用于分离生物材料的组合物、方法和装置)”的美国专利申请公开号 US 2010/0062421 中有所描述,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。

[0170] 浓集剂的一个示例性类型包括硅藻土和经表面处理的硅藻土。这种浓集剂的具体实例可见于名称为“MICROORGANISMS CONCENTRATION PROCESS AND AGENT (微生物浓集方法和试剂)”共同转让的美国专利申请公开号 US 2010/0209961 中,该专利申请的公开内容以引证方式并入本申请。当分散于或悬浮于水系中时,无机材料显示具有材料和水系 pH 特征性的表面电荷。整个材料-水界面上的电势称为“ ζ 电势”,其可通过电泳迁移率(即,材料颗粒在设置于水体系中的带电电极之间移动的速率)进行计算。在一个实施例中,浓集剂与未经处理的硅藻土相比可具有至少某些正值的 ζ 电势,并且浓集剂可令人惊讶地比未

经处理的硅藻土能显著更有效地浓集诸如细菌之类的微生物(其表面通常往往带负电)。

[0171] 浓集剂的一个示例性类型包括硅藻土。浓集剂的另一个示例性类型包括经表面处理的硅藻土。示例性的表面处理包括表面改性剂,例如二氧化钛、微细纳米级金或铂或者它们的组合。这种表面处理可令人惊讶地比未经处理的硅藻土能更有效地浓集微生物。表面处理还可包括选自氧化铁、氧化锌、氧化铝等等以及它们的组合的金属氧化物。在一个实施例中,使用氧化铁。尽管已知诸如金之类的贵金属具有抗微生物特性,但含金的浓集剂不仅可有效结合微生物而且可有效地为了检测或测定的目的使它们保持为活的。

[0172] 可用的表面改性剂包括细纳米级金;细纳米级铂;与至少一种金属氧化物(例如,二氧化钛、氧化铁或它们的组合)结合的细纳米级金;二氧化钛;与至少一种其他金属氧化物(即,除二氧化钛之外)结合的二氧化钛等等;以及它们的组合。在一个实施例中,可使用如下表面改性剂,例如细纳米级金;细纳米级铂;与至少氧化铁或二氧化钛结合的细纳米级金;二氧化钛;与至少氧化铁结合的二氧化钛;或者它们的组合。

[0173] 在一个实施例中,可使用诸如下述物质之类的表面改性剂:细纳米级金;细纳米级铂;与氧化铁或二氧化钛结合的细纳米级金;二氧化钛;与氧化铁结合的二氧化钛;以及它们的组合。在一个实施例中,可使用细纳米级金;与氧化铁或二氧化钛结合的细纳米级金;与氧化铁结合的二氧化钛;以及它们的组合。在一个实施例中,也可使用细纳米级金、与氧化铁或二氧化钛结合的细纳米级金以及它们的组合。

[0174] 浓集剂的另一个示例性类型包括 γ -FeO(OH)(也称为纤铁矿)。这种浓集剂的具体实例可见于名称为“MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS(微生物浓集方法)”共同转让的美国专利申请公开号 US 2010/0248214 中,该专利申请的公开内容以引证方式并入本申请。已经发现这类浓集剂令人惊讶地比其他含铁浓集剂更有效地捕集革兰氏阴性细菌,革兰氏阴性细菌在食源性和水源性疾病以及人类细菌感染方面受到巨大关注。浓集剂还可包括(除 γ -FeO(OH) 之外)其他组分(例如,水软铝石(α -AlO(OH))、粘土、氧化铁和氧化硅)。在其中包括这些其他组分的实施例中,它们通常不显著妨碍样品和浓集剂的紧密接触。

[0175] γ -FeO(OH) 是已知的并且可通过已知方法化学合成(例如,通过在中性或弱酸性 pH 下对氢氧化亚铁进行氧化,如在美国专利号 4,729,846(Matsui 等人)中为磁带生产目的所描述的,该专利的描述内容以引证方式并入本申请)。 γ -FeO(OH) 还可商购获得(例如,自 Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, Ward Hill, MA 和自 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO)。

[0176] 在将 γ -FeO(OH) 用作浓集剂的实施例中, γ -FeO(OH) 通常为微粒形式。在一个实施例中,其为如下微粒形式,所述微粒具有约 3 微米(在其它实施例中,约 5 微米或约 10 微米)至约 100 微米(在其它实施例中,约 80 微米;约 50 微米或约 35 微米;其中任何下限可与该范围的任何上限配对)范围内的粒度(最大尺寸)。在一个实施例中,颗粒为较小颗粒的附聚物。颗粒可包括尺寸小于约 1 微米(在一个实施例中,尺寸小于约 0.5 微米)的微晶。微晶可作为针状微晶存在,作为包含针状微晶的筏状结构存在或作为针状微晶和筏状结构的组合存在。

[0177] 在一个实施例中,通过 BET (Brunauer-Emmett-Teller) 方法(通过氮气分子的物理吸附来计算固体的表面积)所测量的浓集剂的表面积大于约 25 平方米/克(m^2/g);在一个实施例大于约 $50m^2/g$;在另一个实施例中以大于约 $75m^2/g$ 。

[0178] 附聚形式的颗粒可提供微细颗粒系统的吸附能力,而又没有通常与微细颗粒相关的操作危害和其他危害。另外,此类附聚物颗粒可容易在流体中沉降,从而可提供微生物与流体相的快速分离(当进行过滤时还容许低背压)。

[0179] 浓集剂的另一个示例性类型包括金属硅酸盐。这种浓集剂的具体实例可见于名称为“MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS (微生物浓集方法)”共同转让的美国专利申请公开号 US 2010/0190171 中,该专利申请的公开内容以引证方式并入本申请。示例性的金属硅酸盐的表面组成中通过 X 射线光电子谱 (XPS) 所测定的金属原子与硅原子的比率可小于或等于约 0.5 (在一个实施例中,小于或等于约 0.4;在另一个实施例中,小于或等于约 0.3;在另一个实施例中,小于或等于约 0.2)。在一个实施例中,表面组成还包括根据 X 射线光电子谱 (XPS) 所测定的至少平均约 10 原子%的碳(在一个实施例中,至少平均约 12 原子%的碳;在另一个实施例中,至少平均约 14 原子%的碳)。XPS 是一种可测定样品表面的最外侧约 3 至 10 纳米 (nm) 的元素组成并且对周期表中除氢和氦之外的所有元素均敏感的技术。XPS 是一种定量技术,对于大多数原子而言检测极限在 0.1 至 1 原子%浓度范围。XPS 的示例性表面组成评价条件可包括相对于样品表面测量的 90 度的飞离角以及 ± 10 度的接受立体角 (solid angle of acceptance)。

[0180] 当分散于或悬浮于水体系中时,无机材料如金属硅酸盐呈现出该材料和水体系 pH 特征性的表面电荷。整个材料-水界面上的电势称为“ ζ 电势”,其可通过电泳迁移率(即,材料颗粒在设置于水体系中的带电电极之间移动的速率)进行计算。示例性的浓集剂与(例如)普通金属硅酸盐(例如普通滑石)相比可具有更大负值的 ζ 电势。另外,浓集剂令人惊讶地比滑石更有效地浓集诸如细菌之类的微生物(其表面通常往往带负电)。在一个实施例中,浓集剂在约 7 的 pH 下具有负 ζ 电势(在一个实施例中,在约 7 的 pH 下具有约 -9 毫伏至约 -25 毫伏范围的 Smoluchowski ζ 电势;在另一个实施例中,在约 7 的 pH 下具有约 -10 毫伏至约 -20 毫伏范围的 Smoluchowski ζ 电势;在另一个实施例中,在约 7 的 pH 下具有约 -11 毫伏至约 -15 毫伏范围的 Smoluchowski ζ 电势)。

[0181] 可用的金属硅酸盐包括(但不限于)下述金属的无定形硅酸盐,例如镁、钙、锌、铝、铁、钛等等,以及它们的组合。在一个实施例中,可使用镁、锌、铁、钛或它们的组合。在另一个实施例中,使用镁。在一个实施例中,可使用具有至少部分熔融颗粒形式的无定形金属硅酸盐。在一个实施例中,可使用无定形、球化金属硅酸盐。在另一个实施例中,可使用无定形、球化硅酸镁。金属硅酸盐为已知的并且可通过已知方法进行化学合成或者通过开采和加工天然存在的原始矿石获得。

[0182] 一些无定形金属硅酸盐为市售的。例如,无定形、球化硅酸镁可商购获得以用于化妆品制剂中(例如,以 3M 化妆品微球 CM-111 (Cosmetic Microspheres CM-111) 得自 3M 公司 (St. Paul, MN))。

[0183] 除了无定形金属硅酸盐之外,浓集剂还可包括其他材料(包括金属(例如,铁或钛)的氧化物、结晶金属硅酸盐、其他结晶材料等等),前提条件是浓集剂具有上面描述的表面组成。在一个实施例中,浓集剂基本上不含结晶二氧化硅。

[0184] 浓集剂可以任何适于样品接触和微生物捕集的形式使用。在一个实施例中,浓集剂以颗粒形式使用。在一个实施例中,浓集剂为微粒形式。在一个实施例中,浓集剂为如下微粒形式,所述微粒具有约 1 微米(在另一个实施例中,约 2 微米)至约 100 微米(在另一个

实施例中,约 50 微米;在另一个实施例中,约 25 微米;在再一个实施例中,约 15 微米;其中任何下限可与该范围内的任何上限配对)范围内的粒度。

[0185] 使用浓集剂进行的微生物浓集或捕集通常不具体针对任何特定株系、种或类型的微生物,因此提供对样品中微生物全体群落的浓集。然后,可使用任何已知的检测方法用特异性探针从捕集的微生物群落中检测特定的微生物菌株。因此,所述浓集剂可用于检测临床样品、食品样品、环境样品或其它样品中的微生物污染物或病原体(特别是食源性病原体,例如细菌)。

[0186] 在实施本发明的方法时,浓集剂可以以任何适于样品接触和微生物捕集的形式使用(例如,以颗粒形式或施加至诸如量杆(dipstick)、薄膜、过滤器、管、孔、板、小珠、隔膜或微流体装置的通道等等之类的载体)。优选地,浓集剂以颗粒形式使用。

[0187] 可选地,细胞浓集剂可包含可结合至微生物的结合伴侣(如,抗体、抗体片段、抗原结合域、凝集素(如,伴刀豆球蛋白A)、受体、噬菌体受体等等)。结合可为直接或间接的。结合可以对某些微生物类型具有选择性或者其可为非选择性的。

[0188] 用于从样品中捕集微生物的浓集剂的量可至少部分地取决于所用浓集剂的类型、样品大小、容器类型和尺寸、样品混合、具体应用、本申请未具体论述的其他因素或它们的组合。捕集效率(样品中结合至浓集剂的微生物的百分比)通常可通过让微生物与浓集剂接触的时间增加来提高。捕集效率也可通过具有较高的浓集剂浓度(这降低了微生物为被捕集所必须移动的平均扩散距离,从而导致较短的温育时间)来提高。因此,一般来讲,添加的浓集剂越多,则捕集相同量的微生物所需的温育时间就越短。

[0189] 在一个实施例中,根据等待微生物结合至浓集剂所需的时间(称为“捕集时间”),浓集剂的合适量可变化。例如,对于 1 分钟的捕集时间,每 10mL 样品 1000mg 浓集剂可为合适的;对于 10 分钟的捕集时间,每 10mL 样品 100mg 浓集剂可为合适的;对于 60 分钟的捕集时间,每 10mL 样品 10mg 浓集剂可为合适的。在一个实施例中,每 10mL 样品可使用约 1mg 至约 100mg 浓集剂。在一个实施例中,每 10mL 样品可使用约 1mg 至约 50mg 浓集剂。在一个实施例中,每 10mL 样品可使用约 10mg 至约 25mg 浓集剂。在(例如)使用金属硅酸盐浓集剂的一个实施例中,每 10mL 样品可使用约 10mg 金属硅酸盐浓集剂。在(例如)使用金属硅酸盐浓集剂的实施例中,每 10mL 样品可使用约 25mg 金属硅酸盐浓集剂。

[0190] 检测装置:

[0191] 本发明提供可用于检测样品中的微生物的装置。所述装置可包括壳体,所述壳体包括至少两个容器,所述至少两个容器之间具有通道、设置在壳体的第一容器中的可选的细胞浓集剂、用于分离壳体中的至少两个容器的装置以及用于将细胞浓集剂从壳体的第一容器转移至第二容器的装置。在一些实施例中,壳体可包括用于分离两个容器的装置(如易破密封件)。在一些实施例中,壳体可包括用于将细胞浓集剂从壳体的第一容器转移至第二容器的装置(如,阀门)。在一些实施例中,所述装置还可包括用于检测微生物的试剂。在某些实施例中,所述装置还可包括包含细胞提取剂的释放单元。细胞提取剂可有利于检测来自于微生物的生物分析物。

[0192] 现在转向附图,图 1A 示出了根据本发明的检测装置 100 的一个实施例的组件的剖视图。检测装置组件包括壳体 110 和柱塞 150。壳体 110 包括邻近下部件 114 的上部件 112。可通过本领域熟知的方法(例如,模铸)单独地利用聚合物材料(如,聚乙烯或聚丙烯)

来形成上部件 112 和下部件 114。部件的尺寸可设计为使得它们可压力配合在一起以提供基本上不透液体的连接,或者作为另外一种选择,它们可通过本领域中已知的方式(如,通过粘合剂、超声焊接等等)连接在一起。作为另外一种选择,壳体可通过本领域中已知的方法形成单个单元,例如挤出中空体部、模铸通道和用涉及热的方法密封壳体的底部。在其他实施例中,可将具有狭窄通道的插入部件放置到一体化壳体中,以形成第一容器和第二容器(分别为 120 和 124)。

[0193] 具有适当尺寸以接纳柱塞 150 的开口 113 位于远离下部件 114 的上部件 112 末端处。在上部件 112 的相对末端处为通向壳体 110 的下部件 114 的通道 116。在图示实施例中,通道 116 示为形成上部件 112 的壁的向内延伸件,所述通道 116 的横截面积小于第一容器 120 的横截面积。作为另外一种选择,通道 116 可由插件形成,所述插件贴合在邻近壳体 110 的下部件 114 的上部件 112 的壁的内部(未示出)。插件可形成邻近壳体 110 的下部件 114 的通道 116。图 1A 中的上部件 112、下部件 114 和通道 116 的相对比例仅为示例性的,可按需改动以适应各种参数,例如样品体积和 / 或仪器限制。

[0194] 柱塞 150 包括在一端具有柄部 152 并且在相对端具有多个密封件(第一下密封件 156 和第二下密封件 157)的轴 151。可选地,柱塞 150 可包括一个或多个上密封件 154 和 / 或指示标记 153。柄部 152、第一下密封件 156 和第二下密封件 157 之间的相对距离在下面描述。可选的检测试剂 165 和可选的释放单元 162 也示于图 1A 中。

[0195] 本申请所用的术语“检测试剂”以其最广的含义使用。检测试剂为可用于反应中以检测生物分析物的试剂。检测反应的非限制性实例包括结合伴侣之间的相互作用(如,抗原-抗体、受体-配体、探针-靶标以及杂交结合相互作用)和 / 或催化反应(例如酶介导反应,如荧光反应、显色反应、发光反应或聚合反应)。检测试剂可参与(如,作为结合伴侣、酶、酶底物或指示剂)检测反应和 / 或可有利于(如,作为缓冲剂、辅因子或结合反应的组分)检测反应。示例性的检测试剂包括酶,包括(例如)荧光素酶、腺苷酸激酶、过氧化物酶、碱性磷酸酯、腺苷三磷酸双磷酸酶等等;酶底物,包括(例如)荧光素、甲基伞形酮磷酸酯、磷酸邻硝基苯酯、磷酸对硝基苯酯、和 5-溴-4-氯-3-吡啶氧基-磷酸酯;缓冲剂,包括(例如)磷酸盐缓冲剂、TRIS 缓冲剂、和 HEPES 缓冲剂;和辅因子,包括(例如)FADH、NADH、辅酶 A 等等。

[0196] 检测试剂可以各种构型包括在壳体 110 中。例如,检测试剂 165 可包括干燥或部分干燥的涂层,如图 1A 所示。检测试剂 165 的合适替代构型(未示出)为本领域中所熟知,包括(例如)液体试剂(可选地,位于易碎隔室(例如安瓿瓶)中)、粉末、凝胶、片剂、冻干试剂、涂布膜、饼剂和干燥试剂。

[0197] 图 1B 示出了包括具有图 1A 中柱塞 150 的壳体 110 的检测装置 100 的剖视图。该图示出了其中装置 100 可在使用之前储存的构型。柱塞 150 完全插入到壳体 110 中。在此位置,柄部 152 的下边缘堵塞壳体 110 的上部件 112 的开口 113,从而防止材料进入或离开壳体 110。可选的上密封件 154 也可用于防止材料进入或离开壳体 110。上密封件 154 的尺寸被设计为接触壳体 110 的上部件 112 的壁的内表面并且由合适的材料(如,聚丙烯、丁基橡胶)制成以形成屏障,优选耐液体屏障。

[0198] 当柱塞 150 位于图 1B 所示的位置时,第一下密封件 156 阻塞通道 116,从而将壳体 110 的第一容器 120 与第二容器 124 隔开。当柱塞 150 位于图 1B 所示的位置时,柱塞 150 包括第二下密封件 157 的部分延伸到第二容器 124 内并且不接触壳体 110 的下部件 114 的

壁。第一下密封件 156 和第二下密封件 157 的尺寸被设计为接触通道 116 的壁并且由合适的材料(如,聚丙烯、丁基橡胶)制成以在第一容器 120 和第二容器 124 之间的通道 116 中形成屏障,优选耐液体屏障。图 1B 中还示出了位于第一容器 120 内的可选浓集剂 130。

[0199] 图 1C 示出了图 1B 的装置 100 的剖视图,其中柱塞 150 位于第二位置。此柱塞 150 位置可用于(例如)将样品加载到壳体 110 内。可通过柄部 152 抓住并拉出柱塞 150 直至第二下密封件 157 靠近通道 116 的上端。柱塞轴 151 上的可选指示标记 153(如,当其与开口 113 对准时)可用于指示达到该定位的柱塞 150 合适位置。图 1C 还包括正接触第一容器 120 中的浓集剂 130 的液体样品 140。在使用期间,可(例如)涡旋或振动装置 100 以混合浓集剂 130 和液体样品 140。在一段时间之后,浓集剂 130 可沉淀至第一容器 120 的底部,如图 1C 所示。在一些实施例中,可选的锥形区域 118 邻近通道 116。锥形区域 118 可通过与壳体 110 的上部件 112 和 / 或通道 116 相同的材料和 / 或方法形成。在使用中,锥形区域 118 可将正向壳体 110 内的通道 116 沉淀的液体悬浮颗粒(如,细胞浓集剂 130)导向通道 116。

[0200] 图 1D 示出了图 1C 的装置 100 的剖视图,其中柱塞 150 返回至图 1B 所示的第一位置。柄部 152 的下边缘靠近开口 113,液体样品中包含浓集剂 130 的部分 142 被转移至第二容器 124,其中部分 142 可与检测试剂 165 (示于图 1A 中)(如果存在)相互作用。部分 142 与检测试剂 165 之间的相互作用的非限制性实例包括检测试剂的溶解和 / 或悬浮、检测试剂与存在于所述部分中的生物分析物之间的结合相互作用和 / 或催化反应。图 1D 也示出了液体样品中接触第二容器 124 内的释放单元 162 (可导致从释放单元 162 中释放细胞提取剂)的部分 142。

[0201] 在图 1 所示的实施例中,用于隔离第一容器 120 和第二容器 124 的装置包括与通道 116 结合的柱塞 150 的第一下密封件 156 和 / 或第二下密封件 157。在图 1 所示的实施例中,用于将浓集剂 130 从第一容器 120 转移至第二容器 124 的装置包括通道 116 以及柱塞 150 的第一下密封件 156 和第二下密封件 157。

[0202] 图 2A 示出了柱塞 250 的剖视图和壳体 210 的局部分解剖视图,所述柱塞 250 和壳体 210 均为根据本发明的检测装置 200 的一个实施例的组件。壳体 210 包括邻近下部件 214 的上部件 212。上部件 212 和下部件 214 可按上面所述方式形成。

[0203] 尺寸被设计为接纳柱塞 250 的开口 213 位于上部件 212 的远离下部件 214 的端部。上部件 212 中的相对端部为通道 216,如上面所述。可选的锥形区域 218 邻近通道 216,如本申请所述。易破密封件 260a 和 260b 将壳体分成第一容器 220、第二容器 224 和第三容器 226。在此实施例中,第三容器 226 位于第一容器 220 和第二容器 224 之间。易破密封件 260a 和 260b 优选由耐水性材料(如,聚合物薄膜、聚合物涂布的纸张、薄片)制成并且可利用本领域中已知的材料和 / 或方法(如,粘合剂、热密封、超声焊接)固定至壳体 210 的壁以形成耐水性易破屏障。

[0204] 包含细胞提取剂的释放单元 262 位于第三容器 226 中。在一些实施例中,释放单元可包括水凝胶。包含细胞提取剂的水凝胶的合适实例描述于名称为“BIODETECTION ARTICLES (生物检测制品)”的 PCT 国际公开号 WO 2010/039627 中,该专利申请的全部内容以引证方式并入本申请。

[0205] 图 2A 中的三个容器的相对比例仅为示例性的,并且可按需改动以适应各种参数,

例如样品体积和 / 或仪器限制。图 2A 中还示出了可选的浓集剂 230、如本申请所述的可选的检测试剂 265 和可选的可移除顶盖 278。顶盖 278 可利用本领域中已知的方法(如, 压铸)由(例如) 聚合物材料(如, 聚乙烯、聚丙烯) 制成并且可被设计为形成壳体 210 的耐液体顶盖。

[0206] 柱塞 250 包括在一端具有柄部 252 并且在相对端具有下密封件 256 和刺穿端 259 的轴 251。优选地, 下密封件 256 被设计为接触通道 216 的壁并且由合适材料(如, 聚丙烯、丁基橡胶) 制成以在通道 216 中形成屏障, 优选耐液体屏障。可选地, 柱塞 250 可包括一个或多个如上面所述的上密封件 254。柄部 252、下密封件 256 和刺穿端 259 之间的相对距离在下面描述。

[0207] 图 2B 示出了图 2A 中的装置 200 的剖视图。在此视图中, 壳体 210 还包括位于第一容器 220 中的液体样品 240。顶盖 278 牢固地固定在壳体 210 上并因而可通过本领域中已知的方法, 例如涡旋、振动、摇动或翻转壳体 210, 将液体样品 240 与细胞浓集剂 230 进行混合。混合之后, 可允许细胞浓集剂 230 沉淀至通道 216 中的易破密封件 260a 上。

[0208] 图 2C 示出了装置 200 的剖视图, 所述装置 200 包括图 2B 中的具有部分插入其中的柱塞 250 的壳体 210。在此位置, 柱塞 250 的下密封件 256 接触通道 216 的壁, 从而在通道 216 中将液体样品 240 的至少一部分 242 与其余部分隔离开。细胞浓集剂 230 也被隔离于通道 216 中。

[0209] 图 2D 示出了图 2C 中的装置 200 的剖视图, 柱塞 250 完全插入其中。柱塞 250 的下密封件 256 接触通道 216 的壁, 并且刺穿端 259 已刺穿易破密封件 260a 和 260b, 从而将液体样品的部分 242、细胞浓集剂 230 和释放单元 262 转移到第二容器 224 中, 在此处部分 242 可与可选的检测试剂 265 (示于图 2A 中) (如果存在) 相互作用。部分 242 与检测试剂 265 之间的相互作用的非限制性实例包括检测试剂的溶解和 / 或悬浮、检测试剂与存在于所述部分中的生物分析物之间的结合相互作用和 / 或催化反应。

[0210] 在图 2 的图示实施例中, 用于隔离第一容器 220 和第二容器 224 的装置包括易破密封件 260a 和 260b。用于隔离第一容器 220 和第二容器 224 的装置还可包括与通道 216 结合的柱塞 250 的下密封件 256。在图 2 的图示实施例中, 用于将细胞浓集剂 230 从第一容器 220 转移至第二容器 224 的装置包括柱塞 250 的刺穿端 259 和下密封件 256 以及通道 216。

[0211] 图 3A 示出了根据本发明的检测装置 300 的一个实施例的前视图。装置 300 包括壳体 310 和可选的顶盖 390。壳体 310 可按上面所述构造为具有上部件 312、通道 316 和下部件 314。可选的顶盖 390 可按上面所述进行构造。装置 300 还包括具有阀门致动器 372 的盲端阀门 370, 该盲端阀门在图 3A 中示出位于第一位置。图 3B 示出了图 3A 中的装置 300 和阀门致动器 372 的侧视图。

[0212] 图 3C 示出了图 3A 中所示的装置 300 的剖视图。装置 300 包括顶盖 390 和壳体 310。壳体 310 包括上部件 312 和下部件 314。上部件 312 包括其中设置盲端阀门 370 的通道 316。盲端阀门 370 包括阀门腔体 374, 当阀门位于此第一位置中时, 所述阀门腔体 374 与第一容器 320 流体连通。阀门腔体 374 包括与第一容器 320 中的液体样品 340 接触的可选的细胞浓集剂 330。第二容器 324 包括可选的释放单元 362 和 / 或可选的检测试剂 365, 后两者均如本申请所述。图 3C 中还示出了可选的锥形区域 318, 如本申请所述。

[0213] 图 3D 示出了图 3C 的装置 300 的剖视图,其中阀门 370 位于第二位置。当阀门位于 370 位于第二位置时,将液体样品中包含细胞浓集剂 330 的部分 342 分离并转移至第二容器 324 中,其中部分 342 可接触释放单元 362 (如果存在) 并且可与检测试剂 365 (如果存在) 相互作用,如本申请所述。

[0214] 已经认识到的是,阀门腔体 374 的尺寸可构成已知的预定体积并由此可使用阀门 370 一次或多次以将预定量的液体样品 340 从第一容器 320 转移至第二容器 324。还认识到的是,在液体样品的部分 342 已从第一容器 320 转移至第二容器 324 之后,可清除第一容器 320 中的液体样品 340 的其余部分,并且可将不同的材料(如,稀释剂、缓冲剂、液体和 / 或粉末试剂) 设置到第一容器 320 中且随后可利用阀门 370 将预定量转移至第二容器 324 (未示出)。

[0215] 在图 3 的图示实施例中,用于隔离第一容器 320 和第二容器 324 的装置包括阀门 370。I 在图 3 的图示实施例中,用于将细胞浓集剂 330 从第一容器 320 转移至第二容器 324 的装置包括通道 316 和阀门 370。

[0216] 图 4A 示出了柱塞 450 的侧视图和壳体 410 的剖视图,柱塞 450 和壳体 410 两者均为根据本发明的检测装置 400 的组件。柱塞包括轴 451、可选的 O 形环 455 和穿刺端 459。O 形环可由适形材料(如,丁基橡胶)制成,从而与壳体 410 提供不透液体的密封件。壳体 410 可按上面所述构造为具有上部件 412 和下部件 414。可选顶盖 490 可按上面所述进行构造。易破密封件 460 将壳体 410 分成三个容器:第一容器 420、第二容器 424 以及位于第一容器 420 和第二容器 424 之间的第三容器 426。在此示图中,易破密封件 460 位于第一容器 420 的靠近第二容器 424 的端部。易破密封件 460 之间的空间限定第三容器 426。包含细胞提取剂的释放单元 462 位于第三容器 426 中。替代构造(未示出)可仅具有一个靠近第二容器 424 的易破密封件 460,其中释放单元 462 位于第二容器 424 中,如图 3C 所示。

[0217] 具有阀门 482 (显示处于关闭位置)的排液阀门 480 位于靠近易破密封件 460 的第一容器 420 中。液体样品 440 和可选的细胞浓集剂 430 也位于第一容器 420 中。可选的检测试剂 465 示为位于第二容器 424 中。

[0218] 图 4B 示出了包括图 4A 中的壳体 410 和柱塞 450 的组装检测装置 400 的剖视图。细胞浓集剂 430 沉淀至第一容器 420 的底部。排液阀门 480 的阀门 482 处于打开位置并且当沿通过箭头所示的方向施加力(如,通过手指或手的压力)时,使透明液体样品 445 从排液阀门 480 排出。图 4B 中还示出了涂覆在第二容器 424 的壁上的检测试剂 465。

[0219] 图 4C 示出了图 4B 中的检测装置 400 的剖视图。在此视图中,柱塞 450 的 O 形环 455 和穿刺端 459 在壳体 410 中插入到排液阀门 480 靠近最近的易破密封件 460 的一侧。在此位置,柱塞 450 将液体样品中包含细胞浓集剂 430 的部分 442 捕集在柱塞 450 与最近易破密封件 460 之间。

[0220] 图 4D 示出了图 4C 中的检测装置 400 的剖视图。在此视图中,柱塞 450 的穿刺端 459 已刺穿两个易破密封件 460 并且液体样品的部分 442 已转移至第二容器 424,其中第二容器 424 中具有溶解的检测试剂(示于图 4C 中)并且部分 442 与包含细胞提取剂的释放单元 462 相接触。

[0221] 图 5A 示出了柱塞 550 和壳体 510 的剖视图,柱塞 550 和壳体 510 两者均为检测装置 500 的组件。柱塞 550 包括具有可选柄部 552 和尖端 590 的轴 551。在任一实施例中,柄

部 552 还可包括可选的 O 形环 555。

[0222] 壳体 510 可按上面所述构造为具有上部件 512 和下部件 514。易破密封件 560a 和 560b 将壳体 510 分成三个容器：第一容器 520、第二容器 524 以及位于第一容器 520 和第二容器 524 之间的第三容器 526。在此示图中，易破密封件 560a 和 560b 位于第一容器 520 的靠近第二容器 524 的端部。易破密封件 560a 和 560b 之间的空间限定第三容器 526。包含如本申请所述的细胞提取剂的释放单元 562 位于第三容器 526 中。在图示实施例中，第二容器 524 包括可选的检测试剂 565。替代构造(未示出)可仅具有一个靠近第二容器的易破密封件，其中释放单元位于第二容器中，如图 3C 所示。

[0223] 柄部 552 可利用本领域中熟知的方法由多种材料(包括(例如)塑料、木材、金属以及它们的组合)制成。可选的 O 形环 555 设置在柄部 552 的凹口 554 中。柄部 552 的形状和尺寸可被设计为使得当柱塞 550 完全插入到壳体 510 中时，柄部 552 的至少一部分可插入到壳体 510 中。在一个实施例中，柄部 552 还包括边缘 554，所述边缘 554 接合壳体 510 的开口以避免柄部 552 完全插入到壳体 510 中。

[0224] 柱塞 550 的轴 551 可由多种材料制成，包括(例如)塑料、木材、金属以及它们的组合。轴 551 的一端(例如)通过压力配合到凹陷部分(如图 5 中所示)内、通过超声焊接或通过使用粘合剂连接至柄部 552。轴 551 的另一端(例如)通过压力配合、通过超声焊接或通过使用粘合剂连接至尖端 590。

[0225] 柱塞 550 的尖端 590 的细节示于图 6A 和 6B 中。

[0226] 图 6A 以局部剖视方式示出了图 5A 中的尖端 590 的局部分解侧视图。尖端 690 包括主体 691、单向阀门 697 和过滤器 696。

[0227] 主体 691 包括第一端部 691a、第二端部 691b 以及从第一端部 691a 到第二端部 691b 穿过主体 691 的导管 692。在第一端部 691a 处，导管 692 通过柱塞的轴 651 密封。在第二端部 691b 处，导管 692 通入凹陷开口 694 内。两个排液通道 695 从主体 691 的第一端部 691a 穿行至导管 692。因此，排液通道与导管 692 和凹陷开口 694 流体连通。此外，凹陷开口 694、导管 692 和排液通道 695 形成穿过柱塞的尖端 690 的流体通道。因此，在此实施例中，柱塞包括流体通道。

[0228] 在一个实施例中(未示出)，尖端 690 可仅包括一个排液通道 695。有利的是，多个排液通道 695 可提供较小的反向压力并因而使得流体以较高速率穿过尖端 690。

[0229] 主体 691 可由塑料(如，聚丙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯)通过(例如)模铸制成。主体 691 的形状和尺寸被设计为使其贴合在壳体(如，图 5A 中的壳体 510)内。在任一实施例中，当主体 691 插入到壳体中时，主体 691 或 O 形环 686 可与壳体的壁形成基本上不透液体的密封。在包括 O 形环 686 的任一实施例中，随着 O 形环 686 相对于壳体的壁移动，O 形环 686 可起到形成不透液体的密封以及起到从壳体的壁清除颗粒物质(如，细胞浓集剂)的作用。轴 651 可通过本领域中已知的方法(如，通过粘合剂、通过压力配合)连接至导管 692。可选的 O 形环 686 设置在主体 691 的凹口 689 中。

[0230] 尖端 690 还包括过滤器 696。过滤器 696 连接至主体 691。在图示实施例中，过滤器 696 由多孔材料形成，其可压力配合或通过粘结连接至凹陷开口 694。在一些实施例中，多孔材料可为半刚性多孔材料(例如，以零件号 X6854 由 Porex 公司(Fairburn, GA)出售的 POREX 过滤介质)。过滤器 696 可被构造为具有相对尖角或尖点的端部，以使得端部便于穿

透易破密封件。在可供选择的实施例(未示出)中,过滤器可包括连接至主体的膜过滤器。当连接至主体时,膜过滤器为包括导管和排液通道的流体通道的一部分。

[0231] 在一些实施例中,可选择过滤器 696 的孔隙度以使得过滤器 696 仅阻止相对较大的颗粒(如, $>1\ \mu\text{m}$ 、 $>5\ \mu\text{m}$ 或 $>10\ \mu\text{m}$)从中穿过。相对较大的颗粒可包括(例如)如本申请所述的细胞浓集剂。在这些实施例中,微生物如细菌、酵母和 / 或丝状真菌(霉菌)可穿过过滤器 696。

[0232] 在一些实施例中,可选择过滤器 696 的孔隙度以使得过滤器 696 仅阻止相对较小的颗粒(如, $<1\ \mu\text{m}$ 、 $<0.45\ \mu\text{m}$ 、 $<0.2\ \mu\text{m}$)从中穿过。在这些实施例中,微生物如细菌、酵母、和 / 或丝状真菌(霉菌)可被过滤器 696 截留。

[0233] 尖端 690 还包括单向阀门 697,所述单向阀门 697 设置在过滤器 696 和导管 692 之间的凹陷开口 694 中。另外示出了用于将单向阀门 697 保持在适当位置的可选的保持垫圈 698。单向阀门 697 可(例如)由塑料(如,聚丙烯、聚乙烯、聚酯)或橡胶进行制造,并且可被构造为(例如)鸭嘴阀门。在使用中,单向阀门 697 基本上阻止已穿过过滤器 696 的液体流以相反方向返回穿过过滤器 696。

[0234] 图 6B 以局部剖视方式示出了图 6A 中的组装尖端 690 的侧视图。单向阀门 697、可选的保持垫圈 698 和过滤器 696 设置在凹陷开口中并且与导管 692 和排液通道 695 流体连通。轴 651 连接至尖端 690 的主体 691。

[0235] 再参考图 5A,将包括壳体 510 和柱塞 550 的检测装置 500 用于检测微生物(具体而言是活微生物)的方法中。

[0236] 在使用中,将液体样品转移到壳体 510 的第一容器 520 中,以允许其接触细胞浓集剂 530。在液体样品 540 添加到壳体 510 中之后,将柱塞 550 的尖端插入到壳体 510 中并且推向(如,手动地或机械地)壳体 510 的第二容器 524,如图 5B 中所示。随着柱塞 550 的尖端 591 接触液体样品 540,液体穿过尖端 590 并且返回到壳体 510 中,如图 5B 中所示。这个过程将细胞浓集剂 530 以及在一些实施例中将游离微生物保持在液体样品的邻近第三容器 526 的部分 542 内。

[0237] 当柱塞 550 的尖端 590 穿透易破密封件 560a 时(未示出),液体样品中包含细胞浓集剂 530 的部分 542 接触释放单元 562。柱塞 550 的进一步移动(如图 5D 中所示)引起穿透易破密封件 560b,从而使得液体样品的部分 542 和释放单元 562 转移至第二容器 524,它们在此处接触检测试剂 565。

[0238] 图 7A 示出了根据本发明的检测装置 700 的另一个实施例的剖视侧视图。检测装置 700 包括柱塞 750 和壳体 610。

[0239] 壳体 710 可按上面所述构造为具有上部件 712 和下部件 714。易破密封件 760a 和 760b 将壳体 710 分成三个容器:第一容器 720、第二容器 724 以及位于第一容器 720 和第二容器 724 之间的第三容器 726。在此示图中,易破密封件 760a 和 760b 位于第一容器 720 的靠近第二容器 724 的端部。易破密封件 760a 和 760b 之间的空间限定第三容器 726。包含细胞提取剂的释放单元 762 位于第三容器 726 中。在图示实施例中,第二容器 724 包括可选的检测试剂 765。替代构造(未示出)可仅具有一个靠近第二容器 724 的易破密封件 760,其中释放单元 762 位于第二容器 724 中,如图 3C 所示。

[0240] 柱塞 750 包括连接至柄部 752 和尖端 790 的轴 751。在此实施例中,轴 751 为中空

的并且柄部包括排气孔 748 以平衡轴 751 的内部和外部之间的压力。柱塞还包括可选的排液管 753。排液管 753 接受来自尖端 790 的液体滤液并且将滤液分配至轴 751 的内部。通过用作溢流阀门,排液管 753 还减少可沿相反方向流回尖端 790 的滤液。

[0241] 柱塞 750 的尖端 790 的细节示于图 8 中。

[0242] 图 8A 以局部剖视方式示出了图 7A 中的尖端 790 的局部分解侧视图。尖端 890 包括主体 891、可选的单向阀门 897 和过滤器 896。图 8A 中还示出了包括中空轴 851 和排液管 853 的柱塞 850 的一部分。

[0243] 主体 891 包括第一端部 891a、第二端部 891b 以及从第一端部 891a 到第二端部 891b 穿过主体 891 的导管 892。在第一端部 891a 处,导管 892 连接(如,通过压力配合、粘合剂或者通过螺纹连接)至柱塞的排液管 853。在第二端部 891b 处,导管 892 通入凹陷开口 894。因此,凹陷开口 894 与导管 892 和排液管 853 流体连通。

[0244] 主体 891 可由塑料(如,聚丙烯、聚乙烯、聚四氟乙烯)通过(例如)模铸制成。主体 891 的形状和尺寸被设计为使其贴合在壳体(如,图 7A 中的壳体 710)中。在任一实施例中,当主体 891 完全插入到壳体中时,主体 891 或 O 形环 886 可与壳体的壁形成基本上不透液体的密封。在包括 O 形环 886 的任一实施例中,随着 O 形环 886 相对于壳体的壁移动,O 形环 886 可起到形成不透液体的密封以及起到从壳体的壁清除颗粒物质(如,细胞浓集剂)的作用。轴 851 可通过本领域中已知的方法(如,通过粘合剂、通过压力配合)连接至导管 892。可选的 O 形环 886 设置在主体 891 中的凹口 889 中。

[0245] 尖端 890 还包括过滤器 896。过滤器 896 在凹陷开口 894 处连接至主体 891。图示实施例中,过滤器 896 由多孔材料形成,其可压力配合或粘结连接至凹陷开口 894。在一些实施例中,多孔材料可为半刚性多孔材料(如,以部件号 X6854 由 Porex 公司 (Fairburn, GA) 出售的 POREX 过滤介质)。过滤器 896 可被构造为具有相对尖角或尖点的端部,以使得端部便于穿透易破密封件。在可供选择的实施例(未示出)中,过滤器可包括连接至主体的膜过滤器。当连接至主体时,膜过滤器为包括导管和排液通道的流体通道的一部分。

[0246] 在一些实施例中,可选择过滤器 896 的孔隙度以使得过滤器 896 仅阻止相对较大的颗粒(如, $>1\ \mu\text{m}$ 、 $>5\ \mu\text{m}$ 或 $>10\ \mu\text{m}$)从中穿过。相对较大的颗粒可包括(例如)如本申请所述的细胞浓集剂。在这些实施例中,微生物如细菌、酵母、和 / 或丝状真菌(霉菌)可穿过过滤器 896。

[0247] 在一些实施例中,可选择过滤器 896 的孔隙度以使得过滤器 896 仅阻止相对较小的颗粒(如, $<1\ \mu\text{m}$ 、 $<0.45\ \mu\text{m}$ 、 $<0.2\ \mu\text{m}$)从中穿过。在这些实施例中,微生物如细菌、酵母和 / 或丝状真菌(霉菌)可被过滤器 896 截留。

[0248] 尖端 890 还可包括可选的单向阀门 897,所述单向阀门设置在陷开口 894 中,在过滤器 896 和导管 892 之间。另外示出了可用于将单向阀门 897 保持在适当位置的可选的保持垫圈 898。单向阀门 897 可(例如)由塑料(如,聚丙烯、聚乙烯、聚酯)或橡胶进行制造,并且可被构造为(例如)鸭嘴阀门。在使用中,单向阀门 897 基本上阻止已穿过过滤器 896 的液体流以相反方向返回穿过过滤器 896。

[0249] 图 8B 以局部剖视方式示出了图 7A 中的组装尖端 790 的侧视图。单向阀门 897、可选的保持垫圈 898 和过滤器 896 设置在凹陷开口中并且与导管 892 和排液管 853 流体连通。轴 851 连接至尖端 890 的主体 891。

[0250] 再参考图 7A, 将包括壳体 710 和柱塞 750 的检测装置 700 用于检测微生物(具体而言是活微生物)的方法中。

[0251] 在使用中, 将液体样品转移到壳体 710 的第一容器 720 中, 以允许其接触细胞浓集剂 730。在液体样品 740 添加到壳体 710 中之后, 将柱塞 750 的尖端 790 插入到壳体 710 中并且推向(如, 手动地或机械地)壳体 710 的第二容器 724, 如图 7B 中所示。随着柱塞 750 的尖端 791 接触液体样品 740, 液体穿过尖端 790、穿过排液管 753 并且进入柱塞 750 的中空轴内, 如图 7B 中所示。这个过程将细胞浓集剂 730 以及在一些实施例中将游离微生物保持在液体样品的靠近第三容器 726 的部分 742 中。

[0252] 当柱塞 750 的尖端 790 穿透易破密封件 760a 时(未示出), 液体样品中包含细胞浓集剂 730 的部分 742 接触释放单元 762。柱塞 750 的进一步移动(如图 7D 中所示)引起穿透易破密封件 760b, 从而使得液体样品的部分 742 和水凝胶 762 转移至第二容器 724, 它们在此处接触检测试剂 765。

[0253] 本发明的装置包括壳体中的易破密封件。刺穿易破密封件以将细胞浓集剂从装置的一个隔室送至另一个隔室。在一些实施例中, 可通过将细胞浓集剂收集到易破密封件的相对区域上来增加在该过程中转移的细胞浓集剂的量。图 9 示出了用于提高细胞浓集剂回收的收集器 967 的一个实施例。收集器 967 的尺寸被设计为使其适配在根据本发明的检测装置的壳体中。收集器 967 包括取向为朝向包含细胞浓集剂的样品(未示出)的斜边缘 968。通常, 斜边缘 968 朝上以使其收集通过重力沉淀的颗粒。作为另外一种选择, 斜边缘 968 可取向为朝向(例如)离心力或水动力, 以收集经受重力之外的力的颗粒。收集器 967 还包括可选的易破密封件 969。

[0254] 收集器 967 可由多种材料制成, 包括(例如)聚合物(如, 聚酯、聚丙烯、聚四氟乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、尼龙以及它们的组合和衍生物)、玻璃和金属。收集器 967 还可包括抵制颗粒粘附至其表面的润滑涂层。斜边缘 968 可为成角度的(如, 45 度角、>45 度角))以有利于颗粒沿其斜坡的移动。易破密封件 969 按本申请所述进行制造, 并且可通过本申请所述的方法连接至收集器 967。

[0255] 图 10A 示出了包括收集器 1067 的检测装置 1000 的一个实施例。检测装置 1000 包括柱塞 1010 和壳体 1050。壳体 1010 包括上部件 1012 和下部件 1014。收集器 1067(具有与其连接的易破密封件 1069)设置在上部件 1012 内并且靠近下部件 1014。易破密封件 1069 连接至收集器 1067 面向下部件 1014 的一侧。因此, 易破密封件 1069 将壳体 1010 分成两个隔离容器: 第一容器 1020 和第二容器 1024。

[0256] 柱塞 1050 包括柄部 1052、轴 1051 和尖端 1090。柄部 1052 可按上面所述进行制造并且可包括可选的边缘 1054, 所述可选的边缘 1054 接合壳体 1010 以阻止柱塞 1050 过深地插入到壳体 1010 内。柄部 1052 可通过螺纹配合或通过其他连接方式(如, 压力配合、粘合剂)连接至轴 1051。尖端 1090 可利用本申请针对其他尖端实施例所述的方法和材料进行制造。尖端 1090 可包括一个或多个导向元件 1083。导向元件被设计为松散地贴合在壳体 1010 的内部并且当尖端 1090 纵向穿过壳体 1010 时用于减少尖端 1090 的横向运动。

[0257] 尖端 1090 还包括保持在尖端 1090 上的固定位置中的刮器 1086。在图示实施例中, 通过保持构件 1087 将刮器 1086 保持在固定位置中。保持构件 1087 可模制或加工成尖端 1090 的部分或者其可包括连接至尖端 1090 的托架或多个托架。作为另外一种选择, 刮

器 1086 可直接连接(如, 粘结性地连接) 至尖端 1090。

[0258] 刮器 1086 为圆盘形的并且被设计为在壳体 1010 内形成相对紧密的贴合。在一些实施例中, 刮器可包括 O 形环。刮器 1086 在浸于水性液体中时应基本上保持其形状。尽管刮器的尺寸应设计为在壳体中形成相对紧密的贴合, 但刮器应为相对柔性的, 以便随着柱塞被推动通过壳体 1010 内的液体样品时允许液体在其边缘周围流动。用于制造刮器 1086 的合适材料包括(例如) 聚氨酯橡胶。

[0259] 在使用中, 液体样品 1040 和细胞浓集剂 1030 在装置的壳体 1010 中接触, 如图 10B 中所示。将柱塞 1050 插入到壳体 1010 中并且将柱塞 1050 的尖端 1090 推向壳体 1010 的底部。随着尖端 1090 穿过液体样品 1040, 细胞浓集剂 1030 被刮器 1086 推向壳体 1010 的底部, 同时液体样品 1040 在刮器 1086 的边缘周围流过。有利的是, 如果允许细胞浓集剂 1030 通过重力沉淀至壳体 1010 的底部, 则此装置允许使用者在尽可能显著较短的时间段内收集和浓集细胞浓集剂 1030。此外, 柔性刮器有利于收集原本可能粘附到壳体的壁上的细胞浓集剂 1030 的一部分。因此, 本发明的装置 1000 增加了细胞浓集剂的回收, 并因而增加了使用细胞浓集剂来浓集微生物的方法的灵敏性。

[0260] 应当认识到, 在其中细胞浓集剂包含铁磁材料(如, 颗粒) 的样品制备和检测装置中, 可邻近所述装置设置磁体或电磁体, 以将颗粒(以及与其结合的微生物) 吸引至所需位置, 以收集颗粒和/或将它们转移至另一个容器。在一些实施例中, 可在足够长的让细胞浓集剂结合液体样品中基本上全部微生物的时间段之后将磁体设置为邻近所述装置(如, 邻近所述装置的底部)。

[0261] 检测来自活细胞的生物分析物的方法 :

[0262] 本发明的方法包括在暴露于有效量的细胞提取剂后检测从活细胞(包括例如活微生物) 释放出的生物分析物的方法。

[0263] 本发明的方法包括包含样品及含有细胞提取剂的释放单元的液体混合物的形成。本发明的方法还包括检测生物分析物。检测生物分析物还可包括量化样品中的生物分析物的量。

[0264] 在一方面, 本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法包括提供细胞浓集剂、包含细胞提取剂的释放单元和液体样品。合适的细胞浓集剂描述于名称为“MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS (微生物浓集方法)”的美国专利申请公开号 US2010/0190171, 该专利申请全部内容以引证方式并入本申请。

[0265] 所述方法还包括使液体样品与细胞浓集剂接触一段时间。细胞浓集剂可包括颗粒、纤维、包括颗粒的基质(如, 纤维基质) 或上述物质中的两者或更多者的任何组合。细胞浓集剂可在接触期间悬浮于液体样品中。可将悬浮液放到容器中, 例如管、烧瓶、烧杯或本申请所述的检测装置中的任何一个。在某些优选实施例中, 通过(例如) 搅拌、涡旋或振动悬浮液使液体样品与细胞浓集剂混合一段时间。当将细胞浓集剂与液体样品接触时, 来自液体样品的细胞结合至细胞浓集剂。

[0266] 所述方法还包括从液体样品的至少一部分中分离细胞浓集剂。在此过程中, 细胞浓集剂可浓集在比原始液体样品小的体积中。可通过多种方式将细胞浓集剂从液体样品的至少一部分中分离。例如, 如果细胞浓集剂具有高于液体样品的比重, 则细胞浓集剂可沉淀至悬浮液的底部。可(如, 通过吸液或滗析) 移除液体样品的至少一部分。作为另外一种选

择或除此之外,可通过离心或过滤移除液体样品的至少一部分。

[0267] 过滤器可通过其孔尺寸(例如,通过其泡点孔尺寸)进行描述。过滤器的泡点孔尺寸通常为过滤器中的孔的最大尺寸的平均值。在一些实施例中,过滤器的平均孔尺寸可小于细胞浓集剂的平均尺寸。当与其他用于从样品(例如水样品)中分离微生物的方法相比时,使用具有这些相对较大孔尺寸的过滤器的能力为本申请所公开的方法提供显著优点。

[0268] 在一个实施例中,过滤器的平均孔尺寸可为至少约 1 微米(μm)或更大。在一个实施例中,过滤器的平均孔尺寸可为至少约 1.5 μm 或更大。在一个实施例中,过滤器的平均孔尺寸可为至少约 5 μm 或更大。在一个实施例中,过滤器的平均孔尺寸可为至少约 10 μm 或更大。由于使用较大孔尺寸的过滤器,将会较容易和较快速地过滤样品,因为背压随孔尺寸的增加而降低。

[0269] 过滤样品可使用已知方法来完成。在一个实施例中,所选择的过滤方法可至少部分地取决于该方法的具体应用。例如,可使用负压真空、通过施加正压、通过重力来过滤样品。用于过滤样品具体技术可至少部分地取决于用于实施该方法的装置类型。例如,为了使用负压真空,所述装置可被构造为具有可换向连接至真空源的端口;为了施加正压,所述装置可被构造为允许使用者通过用手施加力来施加正压。在一个实施例中,可通过施加正压来过滤样品。使用正压(或使用重力)过滤可具有下述优点:很容易就能够实施本领域中的方法而无需任何其他设备,例如真空泵。

[0270] 在一些实施例中,离心步骤可包括使用相对低速的离心,其中细胞浓集剂从液体中分离出来(如,通过沉淀),但未结合至细胞浓集剂的微生物(如,细菌、酵母霉菌、孢子)保持悬浮于液体中。

[0271] 可选地,可将细胞浓集剂再悬浮于洗液(如,水或缓冲溶液)中,并且可将细胞浓集剂从洗液的至少一部分中分离出。应认识到,洗涤步骤可起到从液体样品中除去可能干扰生长和/或检测过程的污染材料。

[0272] 所述方法还包括形成包含分离的细胞浓集剂和释放单元的液体混合物,其中细胞提取剂从所述释放单元中释放。在一些实施例中,当将细胞浓集剂从液体样品的至少一部分中分离出时,细胞浓集剂保留于液体的残余体积中。可选地,可将额外的液体(如,水或缓冲溶液)添加至细胞浓集剂。在其中细胞浓集剂从液体样品中滤出的实施例中,可将细胞浓集剂重新悬浮于一定体积的液体(如,水或缓冲溶液)中。使包含细胞浓集剂的悬浮液与释放单元接触,从而将细胞提取剂释放到液体混合物中。在涉及使用过滤器收集细胞浓集剂的方法中,包含细胞浓集剂的悬浮液也可具有过滤器。可从释放单元中释放出有效量的细胞提取剂,以实现从混合物的细胞(如果存在)中释放生物分析物。有效量的细胞提取剂的释放可发生一段时间(如,长达若干秒、长达若干分钟、长达一小时或更长)。

[0273] 所述方法还包括检测分析物。生物分析物的检测可涉及使用检测系统。用于某些生物分析物(例如核苷酸(如,ATP、NADH、NAD)、多核苷酸(如,DNA 或 RNA)或酶(如,NADH 脱氢酶或腺苷酸激酶))的检测系统为本领域中已知,并且可根据本发明进行使用。本发明的方法包括用于检测生物分析物的已知检测系统。优选地,检测系统的准确度和灵敏度不被细胞提取剂显著降低。更优选地,检测系统包括均相测定。

[0274] 在一些实施例中,检测生物分析物可包括直接在其中形成包含样品和含细胞提取剂的释放单元的液体混合物的容器(如,管、多孔板和本申请所述的检测装置)中检测分析

物。在一些实施例中,检测生物分析物可包括将至少一部分所述液体混合物转移到一器皿中,而非转移到其中形成所述包含样品和含细胞提取剂的释放单元的液体混合物的容器中。在一些实施例中,检测生物分析物可包括一个或多个样品制备过程,如 pH 调节、稀释、过滤、离心、提取等。

[0275] 在一些实施例中,检测系统包括检测试剂。检测试剂包括(例如)染料、酶、酶底物、结合伴侣(如,抗体、单克隆抗体、凝集素、受体)、标记的结合伴侣和/或辅因子。在一些实施例中,检测试剂包括水凝胶,例如包含酶或酶底物的水凝胶,如名称为“BIODETECTION ARTICLES (生物检测制品)”的 PCT 国际公开号 WO 2010/039627 中所描述。在一些实施例中,检测系统包括仪器。检测仪器的非限制性实例包括分光光度计、发光计、读板机、热循环仪、培养箱。

[0276] 检测系统可包括检测仪器。检测仪器为本领域中已知并且可用于以比色测定法(即,通过光的吸收和/或散射)、荧光测定法或发光测定法检测生物分析物。通过发光测定法来检测生物分子的实例由 F. Gorus 和 E. Schram (Applications of bio-and chemiluminescence in the clinical laboratory, 1979, Clin. Chem. 25:512-519) 描述。

[0277] 生物分析物检测系统的实例为 ATP 检测系统。ATP 检测系统可包括酶(例如荧光素酶)和酶底物(例如荧光素)。ATP 检测系统还可包括发光计。在一些实施例中,发光计可包括台式发光计,例如 FB-12 单管发光计 (Berthold Detection Systems USA (Oak Ridge, TN))。在一些实施例中,发光计可包括手持发光计,例如得自 3M 公司 (St. Paul, MN) 的 NG 发光计 UNG2 或 UNG3。

[0278] 在一些实施例中,在单个时间点检测生物分析物。在一些实施例中,在两个或更多个时间点检测生物分析物。当在两个或更多个时间点检测生物分析物时,可将第一时间点(例如在有效量的细胞提取剂从释放单元中释放出来以实现生物分析物从至少一部分样品中的活细胞中释放出来之前)检测到的生物分析物的量与在第二时间点(例如在有效量的细胞提取剂从释放单元中释放出来以实现生物分析物从至少一部分样品中的活细胞中释放出来之后)检测到的生物分析物的量进行比较。在一些实施例中,在一个或多个时间点对生物分析物的测量是通过带处理器的仪器来进行。在某些优选实施例中,将第一时间点的生物分析物的量与第二时间点的生物分析物的量进行比较通过处理器来进行。

[0279] 例如,操作者在包含样品和含细胞提取剂的释放单元的液体混合物形成后测量样品中的生物分析物的量。这个第一次测量 (T_1) 中的生物分析物的量可指示样品中的“游离的”(即非细胞的)生物分析物和/或来自非活细胞的生物分析物的存在。在一些实施例中,第一次测量可在包含样品和含细胞提取剂的释放单元的液体混合物形成后立即(例如约 1 秒)作出。在一些实施例中,第一次测量可在包含样品和含细胞提取剂的释放单元的液体混合物形成后至少约 5 秒、至少约 10 秒、至少约 20 秒、至少约 30 秒、至少约 40 秒、至少约 60 秒、至少约 80 秒、至少约 100 秒、至少约 120 秒、至少约 150 秒、至少约 180 秒、至少约 240 秒、至少约 5 分钟、至少约 10 分钟、至少约 20 分钟作出。这些时间是示例性的,仅包括直到开始生物分析物的检测的时刻为止的时间。开始生物分析物的检测可包括稀释样品和/或加入试剂以抑制细胞提取剂的活性。应认识到,某些检测系统(例如核酸扩增或 ELISA)通常会花数分钟到数小时才能完成。

[0280] 操作者在作出生物分析物的第一次测量后,让样品接触包含细胞提取剂的释放单

元一段时间。在样品已接触释放单元一段时间之后,作出生物分析物的第二次测量。在一些实施例中,第二次测量可在生物分析物的第一次测量后至少约 0.5 秒、至少约 1 秒、至少约 5 秒、至少约 10 秒、至少约 20 秒、至少约 30 秒、至少约 40 秒、至少约 60 秒、至少约 90 秒、至少约 120 秒、至少约 180 秒、约 300 秒、至少约 10 分钟、至少约 20 分钟、至少约 60 分钟或更长时间作出。这些时间是示例性的,仅包括从开始生物分析物检测的第一次测量的时间到开始生物分析物检测的第二次测量的时间的间隔。开始生物分析物的检测可包括稀释样品和 / 或加入试剂以抑制细胞提取剂的活性。

[0281] 优选地,生物分析物的第一次测量是在包含样品和含细胞提取剂的释放单元的液体混合物形成后约 1 秒至约 240 秒作出,而在第一次测量后作出的第二次测量是在该液体混合物形成后约 1.5 秒至约 540 秒作出。更优选地,生物分析物的第一次测量是在该液体混合物形成后约 1 秒至约 180 秒作出,而在第一次测量后作出的第二次测量是在该液体混合物形成后约 1.5 秒至约 120 秒作出。最优选地,生物分析物的第一次测量是在该液体混合物形成后约 1 秒至约 5 秒作出,而在第一次测量后作出的第二次测量是在该液体混合物形成后约 1.5 秒至约 10 秒作出。

[0282] 操作者将第一次测量中检测到的生物分析物的量与第二次测量中检测到的生物分析物的量进行比较。第二次测量中检测到的生物分析物的量的增加表明样品中存在一个或多个活细胞。

[0283] 在某些方法中,检测活的体细胞(例如非微生物细胞)的存在可能是期望的。在这些实施例中,释放单元包含能从体细胞选择性释放生物分析物的细胞提取剂。体细胞提取剂的非限制性实例包括非离子型去污剂,例如非离子型乙氧基化烷基苯酚,包括(但不限于)乙氧基化辛基苯酚 Triton X-100(TX-100) 和其他乙氧基化烷基苯酚;甜菜碱去污剂,如羧基丙基甜菜碱 (CB-18)、NP-40、TWEEN、Tergitol、聚乙二醇苯基醚、市售的 M-NRS(Celsis, Chicago, IL)、M-PER(Pierce, Rockford, IL)、Cellytic M(Sigma Aldrich)。优选将细胞提取剂选择成不会使分析物及其检测试剂失活。

[0284] 在某些方法中,可能需要检测活微生物细胞的存在。在这些实施例中,释放单元可包含能从微生物细胞选择性释放生物分析物的细胞提取剂。微生物细胞提取剂的非限制性实例包括:季铵化合物,包括苯扎氯铵、苄索氯铵、‘cetrimide’(十二烷基-、十四烷基-和十六烷基-三甲基溴化铵的混合物)、十六烷基氯化吡啶鎓;胺,例如三乙胺 (TEA) 和三乙醇胺 (Teo1A);二双胍,包括氯己定、双胍啶、和聚六亚甲基双胍二烷基铵盐(包括 N-(n-十二烷基)-二乙醇胺)、抗生素(如多粘菌素 B(例如多粘菌素 B1 和多粘菌素 B2)、多粘菌素- β -九肽 (PMBN));烷基葡萄糖苷或烷硫基葡萄糖苷,例如辛基- β -D-1-硫吡喃葡萄糖苷(参见全部内容以引证方式并入本申请的美国专利号 6,174,704);非离子型去污剂,如非离子型乙氧基化烷基苯酚,包括(但不限于)乙氧基化辛基苯酚 Triton X-100(TX-100) 和其他乙氧基化烷基苯酚;甜菜碱去污剂,如羧基丙基甜菜碱 (CB-18);以及阳离子型、抗菌性、成孔性、膜活性、和 / 或细胞壁活性聚合物,例如聚赖氨酸、乳链菌肽、爪蟾抗菌肽、蜂毒肽、磷脂酶 A₂、磷脂酶 A₂ 活化肽 (PLAP);噬菌体;等等。参见(如)公开离子型表面活性化合物的 Morbe 等人, Microbiol. Res. (1997) vol. 152, pp. 385-394 和美国专利号 4,303,752,上述文献和专利全部内容以引证方式并入本申请。优选将细胞提取剂选择成不会使生物分析物和 / 或用来检测生物分析物的检测试剂失活。

[0285] 在某些可供选择的检测样品中活微生物细胞的存在的方法中,可用体细胞提取剂预处理样品一段时间(例如在包含样品和含微生物细胞提取剂的释放单元的液体混合物形成之前,使样品接触体细胞提取剂达足够的一段时间以提取体细胞)。在可供选择的实施例中,在第一次测量中检测到的生物分析物的量将包括任何由体细胞释放出来的生物分析物,而第二次测量中检测到的另外的生物分析物(如果存在的话)的量将包括来自样品中的活微生物细胞的生物分析物。

[0286] 检测样品中的微生物的存在的方法可包括使用本申请公开的检测装置。在某些实施例中,所述方法包括提供 i) 样品, ii) 包括具有第一和第二容器以及被构造用于接纳样品的开口的壳体的检测制品, iii) 细胞浓集剂,和 iv) 用于将细胞浓集剂从壳体的第一(如,上)容器隔离并转移至第二(如,下)容器的装置,以及 v) 包含细胞提取剂的释放单元。在这些实施例中,检测装置可包括示于图 1-4 中的检测装置 100、200、300 或 400 中的任何一个。可选地,检测装置可包括细胞浓集剂和 / 或释放单元。

[0287] 所述方法还包括将样品转移到壳体的第一容器中,其中样品材料在液体介质中与细胞浓集剂接触。样品可包括转移到壳体的第一容器中的液体、固体、半固体或它们的组合。如果样品不包含液体介质,则可将液体介质(如,水或缓冲溶液)添加到第一容器。将细胞浓集剂添加到液体样品。让细胞浓集剂与液体样品接触一段时间。可选地,可在接触期间通过(例如)摇动、搅拌、涡旋和 / 或振动壳体来混合该混合物。优选地,在接触期间关闭壳体(如,用可选的顶盖),以避免样品和 / 或细胞浓集剂的损失。

[0288] 所述方法还包括从液体介质的至少一部分中分离细胞浓集剂,其中分离细胞浓集剂包括将细胞浓集剂转移至壳体的第二容器。如本申请所述,存在多种用于分离细胞浓集剂的方式。分离和转移细胞浓集剂的方式的非限制性实例包括利用柱塞通过通道分配和转移细胞浓集剂(参见图 1 和 2)、在单向阀门的腔体中收集和转移细胞浓集剂(参见图 3)以及利用排液阀门和柱塞浓集和转移细胞浓集剂(参见图 4)。

[0289] 所述方法还包括形成包含分离的细胞浓集剂和释放单元的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中。使包含细胞浓集剂的液体混合物与包含细胞提取剂的释放单元接触。释放单元(如,水凝胶珠粒)可在壳体的第一容器和 / 或第二容器中与液体混合物接触。在一些实施例中,壳体的第二容器包含释放单元(参见图 1 和 3)并且液体混合物在其被转移到第二容器中时与释放单元接触。在一些实施例中,释放单元设置在第三容器中(参见图 2 和 4),当液体样品从第一容器转移至第二容器时,液体样品从第三容器穿过(从而使液体样品与释放单元接触)。

[0290] 应认识到,尽管图 2 和 4 示出使用柱塞来刺穿易破密封件并且将细胞浓集剂转移至第二容器,但可使用替代仪器(如,拭子、吸管、过滤器)来取代柱塞。在其中使用这种替代仪器的方法中,优选的是移除液体样品的至少一部分(如,通过离心、吸液、过滤或通过打开排液阀门(如果存在)),以使得当替代仪器刺穿易破密封件时并非所有的液体样品均被转移至第二容器中。

[0291] 所述方法还包括检测生物分析物。如本申请所述,生物分析物可在检测装置的第二容器中以及在有效量的细胞提取剂从释放单元中释放到包含细胞浓集剂的液体混合物中之前进行检测。如本申请所述,可在有效量的细胞提取剂从释放单元中释放到包含细胞浓集剂的液体混合物中之后,在检测装置的第二容器中检测生物分析物。如本申请所述,生

物分析物可在检测装置的第二容器中在有效量的细胞提取剂从水凝胶中释放到包含细胞浓集剂的液体混合物中之前和之后进行检测。

[0292] 预期到本申请所公开的方法中的任何一种还可包括生物生长步骤。通过提供营养培养基支持微生物的生长,来促进生长步骤。可将营养培养基在微生物被细胞浓集剂浓集之前、期间或之后与样品进行混合。在一些实施例中,生物生长步骤发生在微生物已被细胞浓集剂浓集之后但在生物分析物被检测之前。在一些实施例中,营养培养基可包含有利于某些类型的微生物(相比可存在于样品中的其他微生物)生长的营养物和/或选择剂(如,盐、抗生素)。

[0293] 浓集粒状细胞浓集剂的方法:

[0294] 本发明提供浓集粒状细胞浓集剂的装置。所述方法包括提供从颗粒物质在液体样品中的悬浮液分离液体样品的一部分的装置。合适的装置包括(例如)图 2A、图 3A、图 4A、图 5A、图 7A 和图 10A 中所示和所述的装置。所述装置每一个包括容纳含有粒状细胞浓集剂的液体样品的壳体以及用于从液体样品的至少一部分中分离粒状细胞浓集剂的装置。

[0295] 在图 2A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的装置包括锥形区域 218 和具有下密封件 256 的柱塞。图 3A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的装置包括盲端阀门 370 和阀门驱动器 372。在图 4A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的装置包括排液阀门 480 和阀门闸 482。在图 5A 和 7A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的装置包括具有流体通道的柱塞,过滤器 596 设置在所述流体通道中。在图 10A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的装置包括具有刮器的柱塞,所述刮器被构造为允许液体在刮器边缘和壳体之间通过。

[0296] 所述方法还包括形成粒状细胞浓集剂在液体样品中的悬浮液。悬浮液可在壳体中形成或者在壳体外形成。如果悬浮液在壳体外形成,则所述方法还包括将悬浮液转移到壳体中。所述方法还包括使粒状细胞浓集剂与液体样品接触足够长的时间以捕集微生物。接触可发生在壳体中。接触可发生在壳体外部。接触可发生在壳体外部和内部。所述方法还包括从颗粒物质在液体样品中的悬浮液分离液体样品的一部分,如上面针对图 2A、3A、4A、5A、7A、和 10A 的装置所描述。

[0297] 样品制备和检测套件:

[0298] 可将本发明的组件和/或装置与使用说明包装在一起,并可选地与辅助制品或试剂包装在一起,以生产样品制备和检测套件。因此,在一个方面,本发明提供一种套件,其包括 i) 壳体,所述壳体包括至少两个容器,所述至少两个容器之间具有通道;ii) 用于将壳体中的第一容器和第二容器隔离的装置;iii) 细胞浓集剂以及 iv) 用于将细胞浓集剂从第一容器转移至第二容器的装置。第一容器包括被构造用于接纳样品的开口。第二容器包括设置于其中的检测试剂。在一些实施例中,壳体还可包括用于隔离第一容器与第二容器的装置。在一些实施例中,壳体还可包括用于将细胞浓集剂从第一容器转移至第二容器的装置。在一些实施例中,细胞浓集剂设置在壳体的第一容器中。

[0299] 在一些实施例中,本发明的套件包括可与样品制备和检测装置结合使用的辅助制品或试剂。辅助制品的非限制性实例包括样品采集装置、过滤器、手套、培养装置(如,平板、培养管、得自 3M 公司(St. Paul, MN)的 PETRIFILM 板等等)、核酸分离或扩增试剂、免疫测定装置(例如,侧向流动装置、ELISA 板和试剂)或者上述制品中的两者或更多者的任何组合。辅助试剂的非限制性实例包括水、缓冲剂、指示剂(如, pH 指示剂)、染料、体细胞提取剂、包

含细胞提取剂的释放单元、如本申请所述的结合伴侣、酶、酶底物、寡核苷酸、对照样品、或者上述试剂中的两者或多者的任何组合。

[0300] 实例

[0301] 现已结合发明人所预见的、具有可实现描述 (enabling description) 的若干具体实施例描述了本发明。本发明的非实质修改形式,包括非当前所预见的修改形式,仍可构成其等同物。因此,本发明的范围不应受本申请所述的细节和结构的限制,而是仅受以下权利要求书及其等同物的限定。

[0302] 材料:

[0303] 除非另外指明,否则所有的细菌培养物均得自美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC, Manassas, VA)。

[0304] 除非另外指明,所有水均为使用得自 Millipore 公司 (Bedford, MA) 的 Milli-Q™ 梯度去离子系统获得的 18 兆欧姆的无菌去离子水。

[0305] CM-111:无定形、球化硅酸镁;微球以 3M™Cosmetic Microspheres CM-111 得自 3M 公司 (St. Paul, MN)。颗粒成形为具有 2.3g/cc 的颗粒密度并且具有大约 3.3m²/g 的表面积 的固体球。90% 的颗粒小于约 11 微米。50% 的颗粒小于约 5 微米。10% 的颗粒小于约 2 微米。CM-111 微球按照 2009 年 12 月 22 日提交并且名称为“MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS AND CONCENTRATION AGENT FOR USE THEREIN (微生物浓集方法和其中使用的浓集剂)”的美国专利申请号 61/289,213 的实例 1 中所述进行制备,该专利申请全部内容以引证方式并入本申请。

[0306] 制备含有 500mM KCl、100mM CaCl₂、10mM MgCl₂、和 100mM K₂HPO₄ 的 100X 吸附缓冲液 (pH 7.2),使用之前进行过滤除菌。

[0307] 将表面无菌组分与 70% 异丙醇接触(用异丙醇擦拭或浸于异丙醇)。倒出过量的醇,让组分在使用之前风干至少 30 分钟。

[0308] 除非另外指明,否则所有的化学物质均得自 Sigma-Aldrich Chemical 公司 (Milwaukee, WI)。

[0309] 实例 1

[0310] 在水凝胶聚合后将细胞提取剂掺入到水凝胶珠粒中。

[0311] 按照国际专利公开号 WO 2007/146722 的实例 1 中所述来制备水凝胶珠粒。活性珠粒的制备方式为按照实例 19 中所述进行干燥并且随后按照国际专利公开号 WO 2007/146722 的实例 23 中所述在活性溶液中进行浸渍。将 1 克珠粒在 60°C 下干燥 2 小时以从珠粒除去水分。将干燥珠粒在室温下浸渍于 2 克 BARDAC 205M (Lonza Group 公司 (Valais, Switzerland)) 的 50%(w/v) 水溶液中至少 3 小时至过夜。浸渍后,将珠粒倒入布氏漏斗中以将珠粒放干,然后用 10-20ml 的蒸馏水清洗。用纸巾吸干珠粒,除去其表面上过量的水。在使用珠粒之前,将其在室温下的广口瓶中保存至少两周。

[0312] 实例 2

[0313] 使用微粒进行的细胞浓集以及使用负载细胞提取剂的水凝胶和 ATP 生物发光进行的检测

[0314] 3M™CLEAN-TRACE 表面 ATP 体系得自 3M 公司 (St. Paul, MN)。将大肠杆菌 ATCC 51183 的纯培养物接种到胰酶大豆肉汤中并在 37°C 下生长过夜。将细菌培养物在

Butterfield's 缓冲液(pH 7.2±0.2;磷酸二氢钾缓冲溶液;VWR, West Chester, PA)中稀释至大约 10^6 或 10^5 CFU/ml。

[0315] 对于“捕集”反应(表 1),将 100 微升的稀释细菌悬浮液直接添加到含有十毫升去离子水(Milli-Q Bioce1 System, Millipore, MA)的各个管中,以分别在十毫升中获得大约 10^5 CFU 或 10^4 CFU。将十毫克高压消毒的 CM-1113M™Cosmetic Microspheres (焙烧的无定形球化硅酸镁粉末;3M 公司(St. Paul, MN))添加到包含细胞的试管中并且在室温下混合约 15 分钟。允许颗粒沉淀并且除去上清液。使颗粒悬浮于 100 μ l 的 Butterfield's 缓冲液中并转移至 1.5ml 的微量离心管(microfuge tube)中。将四百微升得自 CLEAN-TRACE 表面 ATP 体系的荧光素酶/荧光素液体试剂溶液添加到管中。

[0316] 对于对照反应(“对照”,表 1),将 100 μ l 大约 10^6 或 10^5 CFU/ml 的细胞悬浮液添加到 1.5ml 的微量离心管中,并且将 400 μ l 得自 CLEAN-TRACE 表面 ATP 体系的荧光素酶/荧光素液体试剂溶液添加到管中。在添加试剂之后立即将包含细胞提取剂的水凝胶珠粒(约 11mg)添加到各个管中,并且在台式发光计(得自 Turner Biosystems(Sunnyvale, CA)的 20/20n 单管发光计)中每隔 10 秒记录相对光单位(RLU)测量值。利用随发光计提供的 20/20n SIS 软件从发光计获得发光测量值。将光信号进行积分,积分时间 1 秒,结果(以 RLU 表示)在表 1 中提供。

[0317] 数据表明,使用本申请所述的方案,微粒能够浓集微生物细胞并且从水凝胶珠粒释放的细胞提取剂能够从已稀释成较大(10mL)体积的微生物细胞中提取约二分之一的 ATP(相比于具有类似数量的未稀释细胞的对照反应)。结果还表明,从细胞释放的 ATP 与 ATP 检测试剂反应,从而导致可测量的生物发光。

[0318] 表 1:来自结合至细胞浓集剂并且暴露于从水凝胶释放的微生物细胞提取剂的大肠杆菌细胞的 ATP 的检测。表中所表示的数值是相对光单位(RLU)。

时间 (秒)	对照		捕集	
	10^4 Cfu	10^5 Cfu	10^4 Cfu	10^5 Cfu
10	1226	2552	904	1648
20	1239	2648	948	1735
30	1265	2681	1000	1735
40	1272	2820	1067	1786
50	1280	3152	1107	1818
60	1312	3914	1147	1948
70	1352	4960	1178	2139
80	1393	6391	1197	2388
90	1440	8258	1226	2732
100	1538	10230	1250	3188
120	1618	11859	1260	3820
130	1704	12969	1286	4681
140	1838	13527	1297	5842
150	1905	13759	1318	6721
160	2006	13735	1309	6675
170	2088	13762	1314	6513
180	2119	13537	1330	6428
190	2169	13426	1363	6321
200	2140	13353	1375	6220
210	2141	13128	1342	6196
220	2143	13014	1389	6142
230	2155	12903	1381	6076
240	2110	12780	1401	6023

[0319]

[0320] 实例 3

[0321] 在一体化样品制备和检测装置中利用 ATP 生物发光检测系统来检测微生物细胞

[0322] 在本实例中使用如图 2 所示的一体化样品制备和检测装置 200。所述装置在第一容器 220 中包括大约 10mg 高压消毒的 CM-111 3M Cosmetic Microspheres。第二容器 224 中包括液体检测试剂 265, 其由大约 0.6 毫升得自 CLEAN-TRACE 表面 ATP 体系的荧光素酶 /

荧光素液体试剂溶液构成。第三容器 226 包括根据 PCT 国际公开号 W02010/039627 的制备实例 5 制备的两个 BARDAC 205M 珠粒。在即将使用之前即刻将十毫升无菌去离子水添加到一体化装置 200 的第一容器 220 中。

[0323] 按实例 2 中所述来制备大肠杆菌的过夜培养物。将细菌培养物在 Butterfield's 缓冲液稀释至大约 10^6 或 10^5 CFU/ml。将一百微升的稀释悬浮液直接移取到一体化装置 200 的第一容器 220 中以分别获得在十毫升中具有大约 10^5 CFU 或 10^4 CFU 的悬浮液。使用顶盖 278 封闭壳体 210 并且将细菌悬浮液在室温下与微球(细胞浓集剂 230)进行混合且允许沉淀到通道 216 内。移除顶盖 278 并且插入柱塞 250 以将包含沉淀微球和水凝胶珠粒的液体样品的一部分转移到包括 ATP 检测试剂的第二容器 224 中。将一体化装置立即插入到发光计(例如,NG 发光计 UNG2)的读数室中,并且使用 UNG2 发光计的无计划试验模式每隔 10 秒来记录 RLU 测量值。采集 RLU 测量值直至 RLU 的数值达到平台。使用随 NG 发光计提供的软件下载数据。数据将表明,微生物细胞被微球浓集,细胞提取剂由水凝胶释放,细胞提取剂引起 ATP 从细胞中释放,并且从细胞中释放的 ATP 被 ATP 检测系统检测到。

[0324] 实例 4

[0325] 在一体化样品制备和检测装置中利用 ATP 生物发光检测系统来检测微生物细胞

[0326] 在此实例中使用如图 3 所示的一体化样品制备和检测装置 300。阀门驱动器 372 设置为使得阀门腔体 374 在使用之前与第一容器 320 流体连通。所述装置在第一容器 320 内包括大约 10mg 的高压消毒的 CM-111 3M Cosmetic Microspheres。第二容器 324 中包括液体检测试剂 365,其包含大约 0.6 毫升得自 Clean-Trace 表面 ATP 体系的荧光素酶/荧光素液体试剂溶液。根据 PCT 国际公开号 W0 2010/039627 中的制备实例 5 来制备 BARDAC 205M 珠粒。在即将使用之前即刻将十毫升无菌去离子水添加到一体化装置 300 的第一容器 320 中。

[0327] 按实例 2 中所述来制备大肠杆菌的过夜培养物。将细菌培养物在 Butterfield's 缓冲液稀释至大约 10^6 或 10^5 CFU/ml。将一百微升的稀释悬浮液直接移取到一体化装置 300 的第一容器 320 中以分别获得在十毫升中具有大约 10^5 CFU 或 10^4 CFU 的悬浮液。使用顶盖 390 封闭壳体 310 并且将细菌悬浮液在室温下与微球(细胞浓集剂 330)进行混合且允许沉淀到阀门腔体 374 内。移除顶盖 390 并且将两个 BARDAC 205M 珠粒(水凝胶 362)放入壳体 310 内。在珠粒沉淀到阀门腔体 374 内后随即转动阀门驱动器 372 以将阀门腔体中的液体样品的部分(包含细胞浓集剂 330 和水凝胶 362)转移到包括 ATP 检测试剂的第二容器 324 中。将一体化装置立即插入到发光计(例如,NG 发光计 UNG2)的读数室中,并且使用 UNG2 发光计的无计划试验模式每隔 10 秒来记录 RLU 测量值。采集 RLU 测量值直至 RLU 的数值达到平台。使用随 NG 发光计提供的软件下载数据。数据将表明,微生物细胞被微球浓集,细胞提取剂由释放单元释放,细胞提取剂引起 ATP 从细胞中释放,并且从细胞中释放的 ATP 被 ATP 检测系统检测到。

[0328] 实例 5

[0329] 检测装置的制备:

[0330] I 型装置:对于这些检测装置,按照下面指明的差别来制造出与图 10A 中的壳体相类似的壳体。下面的参考标号是指图 10A 中的相应部件。使用得自 3M Clean-Trace™ 表面 ATP 试验(得自 3M 公司 (Bridgend, UK)) 的类似组件来获得壳体 1100 的上部件 1012

和下部件 1014。将具有与其连接的易破密封件 1068 的收集器 1067 压力配合到下部件 1014 的上部,其中易破密封件 1068 面向壳体 1100 的下部件 1014。利用热风枪(Master Appliances 公司(Racine, WI))通过 2cm 长的 3:1 聚烯烃双壁粘合剂内衬的热缩薄膜(得自 buyheatshrink.com (零件 #_HSC3A-050-cc, 直径 1.5cm) 将上部件 1012 连接至下部件 1014。

[0331] 对于这些检测装置,制造与图 2A 中的柱塞相类似的柱塞。下面的参考标号是指图 2A 中的相应部件。利用得自 3M Clean-Trace™ 表面 ATP 试验的聚烯烃塑料柄部 (252) 的一部分、黄铜金属轴 (251) 和乙缩醛刺穿构件 259 来组装柱塞 (250)。柄部 252 和刺穿构件 259 通过螺纹连接至黄铜轴的端部。黄铜金属轴长为 11.5cm 且直径为 3.9mm。利用车床在轴的各个端部加工 6mm 的 6-23 螺纹。刺穿构件 259 是利用 10"Southbend 车床由 1/2-英寸 (12.7mm) 的乙缩醛共聚物棒(零件号 8497K211, 得自 McMASTER-CARR(Santa Fe Springs, CA))制成。将 O 形环(得自 McMASTER-CARR 的 Buna N AS568A Dash Number 010) 用作下密封件 256 并且在刺穿端 259 上方大约 11.5mm 处连接至柱塞 250。柱塞在每次使用之前进行表面除菌。

[0332] II 型装置:使用具有尖端(类似于图 6A 中所示)的柱塞(类似于图 5A 中所示和所述)来组装这种检测装置。按针对 I 型装置所描述来构造壳体。柱塞的尖端是利用 10"Southbend 车床由 1/2-英寸 (12.7mm) 的乙缩醛共聚物棒(部件号 8497K211, 得自 McMASTER-CARR(Santa Fe Springs, CA))制成。然后将鸭嘴单向阀门和塑料保持垫圈压力配合到柱塞的尖端主体的凹陷开口内。过滤器如下制备:将 POREX 过滤器(得自 Porex 公司(Fairburn, GA), 零件号 X6854) 加工成图 6A 中所示的形状, 并且将一个端部的尺寸设计成使得可压力配合到尖端的凹陷开口中并使阀门和保持垫圈保持就位。柱塞在每次使用之前进行表面除菌。

[0333] III 型装置:按照下面指明的差别来制造与图 10A 中所示的那些相似的检测装置。下面的参考标号是指图 10A 中的相应部件。使用得自 3M Clean-Trace™ 表面 ATP 试验(得自 3M 公司(Bridgend, UK))的类似组件来获得壳体 1100 的上部件 1012 和下部件 1014。将具有与其连接的易破密封件 1068 的收集器 1067 压力配合到下部件 514 的上部,其中易破密封件 1068 面向壳体 1100 的下部件 1014。利用热风枪(Master Appliances 公司(Racine, WI))通过 2cm 长的 3:1 聚烯烃双壁粘合剂内衬的热缩薄膜(得自 buyheatshrink.com (零件 #_HSC3A-050-cc, 直径 1.5cm) 将上部件 1012 连接至下部件 1014。

[0334] 利用得自 3M Clean-Trace™ 表面 ATP 试验的聚烯烃塑料柄部 (1052) 的一部分、黄铜金属轴 (1051) 和尖端 1090 来组装柱塞 (1050)。柄部 1052 和尖端 1090 通过螺纹连接至黄铜轴的端部。黄铜金属轴长为 11.5cm 且直径为 3.9mm。利用车床在轴的各个端部加工 6mm 的 6-23 螺纹。尖端 1090 是利用 10"Southbend 车床由 1/2-英寸 (12.7mm) 的乙缩醛共聚物棒(部件号 8497K211, 得自 McMASTER-CARR(Santa Fe Springs, CA))制成。将 O 形环 1086 连接至尖端 1090。将尖端加工成包括保持构件 1087, 如图 10 所示。通过模切 1mm 厚的聚氨酯橡胶片并且将其滑入保持构件 1087 中来构造刮器。刮器 1086 的外径尺寸被设计为与壳体 1010 的内部提供紧密贴合。柱塞在每次使用之前进行表面除菌。

[0335] 实例 6

[0336] 利用 I 型装置通过粒状浓集剂从掺料水中捕集大肠杆菌。

[0337] 将得自胰酶大豆琼脂板 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 的大肠杆菌 (ATCC 51813) 的分离菌落用于接种 5ml 的胰酶大豆肉汤 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 并且在 37°C 的培养箱中温育过夜。将含有大约 10^9 个菌落形成单位 / 毫升 (CFU/ml) 的过夜培养物在经过滤除菌的 18 兆欧姆水中稀释 1:10000 (变为大约 10^5 CFU/mL, 在下面称为“初始稀释悬浮液”)。将五百微升稀释的培养物转移至 50ml 经过滤除菌的 18 兆欧姆水中, 得到大约 1000/ml 的最终浓度。

[0338] 将 100X 吸附缓冲液 (pH 为 7.2) 的等分试样 (0.5mL) 添加到 50mL 稀释的大肠杆菌悬浮液中(在下面称为“掺料水样品”)。通过手动混合将内容物混合约一分钟。

[0339] 称重 10mg 量的蒸汽消毒的 CM-111 并将其添加到按实例 5 中所述制备的 I 型装置中。将 10ml 体积的掺料水样品添加到各个装置中并且利用表面消毒的石蜡膜密封所述装置。在室温 (25°C) 下通过手动摇动来将内容物混合约 30 秒。

[0340] 混合之后, 将所述装置在 Thermolyne Vari Mix™ 振动平台 (Barnstead International, Iowa, 14 周 / 分钟) 上温育各种时间段(分别为 1、5、10 和 20 分钟)。温育之后将管在工作台顶部设置 10 分钟以沉淀粒状浓集剂 CM-111。沉淀之后, 移除石蜡膜包装材料并且使用预消毒的柱塞装置来刺穿箔密封件并将沉淀的 CM-111 试剂沉积到所述装置的下部件中。使用吸管移出上清液, 并且使用剃刀刀片将装置的下部件(其包括细胞浓集剂)与装置的上部件分离。将沉淀的 CM-111 浓集剂(在大约 100 微升的水中)从所述装置中移出; 在无菌水中稀释 1:100, 并且根据制造商的说明将稀释浓集剂的一毫升等分试样涂布到 3M™ Petrifilm™ 菌落总数计数板 (3M 公司 (St. Paul, MN)) 上。

[0341] 作为对照组, 将初始稀释悬浮液在无菌水中进一步地稀释为 1:1000 稀释液并且根据制造商的说明涂布到 3M™ Petrifilm™ 菌落总数计数板 (3M 公司 (St. Paul, MN)) 上。另外将颗粒物涂布在 Petrifilm™ 菌落总数计数板上作为无菌对照。将板在 37°C 的培养箱 (VWR Orbital Shaker Incubator, VWR, West Chester, PA) 中温育过夜。

[0342] 使用 3M™ Petrifilm™ 读板器 (3M 公司 (St. Paul, MN)) 按照制造商的说明来分析所有的板, 获得菌落计数。结果示于表 2 中。结果是使用下述公式计算的:

[0343] 捕集效率 = (浓集剂上的菌落数 / 掺料对照中的菌落总数) × 100

[0344] 表 2: 得自 10ml 样品的大肠杆菌的浓集 / 捕集所有的数据均表示每个实验中两次重复测试的平均值。

[0345]

样品	% 对照	标准偏差
1 分钟	8	4
5 分钟	34	4
10 分钟	33	11
20 分钟	80	10

[0346] 实例 7

[0347] 利用 III 型装置用 CM-111 浓集大肠杆菌

[0348] 将得自划线板的分离大肠杆菌 (ATCC 51813) 菌落接种到 5ml 胰酶大豆肉汤 (TSB, Becton Dickinson, Sparks, MD) 中并且在 37°C 下温育 18-20 小时。将 $\sim 10^9$ 个菌落形成单位 / 毫升的此过夜培养物在经无菌过滤的去离子水 (MilliQ, Millipore, MA) 中进行稀释并且掺入在 10ml 经无菌过滤的去离子水中, 以获得 $1 \times 10^3/\text{ml}$ 和 $1 \times 10^4/\text{ml}$ (大约 $1 \times 10^4/\text{ml}$ cfu 和大约 $1 \times 10^5/\text{ml}$ cfu 的最终浓度)。将掺料水添加到 III 型装置的壳体中, 该装置包含 10mg 经预除菌 (121 摄氏度, 15 分钟) 的 CM-111 (Cosmetic Microspheres-111, 3M 公司, St Paul) 粉末和 100 微升 100X 吸附缓冲液 (pH 为 7.2)。将壳体用经表面除菌的石蜡膜进行密封并置于振动平台上。然后将封闭的装置在室温 (25°C) 下在 Thermolyne Vari Mix™ 振动平台 (Barnstead International, Iowa, 14 周 / 分钟) 上温育 5 分钟的接触时间。然后让装置在无摇动下静置 (以让颗粒通过重力沉淀) 5 分钟 (摇动和沉淀的总耗时间 = 10 分钟), 移除石蜡膜, 将 II 型装置柱塞插入到壳体中并推向壳体的底部以将 CM-111 颗粒与样品主体分离。当柱塞刺破易破密封件时, 将悬浮于约 0.1ml 液体样品中的 CM-111 颗粒转移到壳体的第二容器中。将 CM-111 颗粒从第二容器中取出并且转移至 1.5ml 的无菌微量离心管中。将 100 微升体积的 BacTiter-Glo™ 试剂 (Promega, Madison, WI) 添加至该颗粒料, 在 VWR 定速涡旋混合器 (3200rpm 持续 5 秒) 上通过涡旋混合 5 秒、并且在台式发光计 (FB12Single Tube Luminometer, Berthold Detection Systems USA, Oak Ridge, TN) 上进行读数。通过从大肠杆菌细胞的 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 和 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 悬浮液测试 100 微升体积来制备阳性对照 (“100% 信号”)。结果是利用下述公式计算的并列于下述表 3 中:

[0349] $\text{ATP 信号捕集效率 \%} = (\text{CM-111 粒料上的 RLU} / \text{得自 100\% 信号的 RLU}) \times 100$

[0350] RLU = 相对荧光素酶单位。

[0351] 表 3. 利用 III 型装置通过 ATP 生物发光获得对大肠杆菌的浓集和检测

样品	以 RLU 计的 ATP 信号	ATP 信号采集效率 (%)
[0352] 大肠杆菌 (1×10^4 细胞) 对照组 (100% 信号)	30,866	不适用
大肠杆菌 (1×10^5 细胞) 对照组 (100% 信号)	176,933	不适用
得自 $\sim 1 \times 10^3/\text{ml}$ 样品的 CM-111 粒料	27,589	89
得自 $\sim 1 \times 10^4/\text{ml}$ 样品的 CM-111 粒料	94,840	54

[0353] N=2, 标准偏差 < 10%, 对于大肠杆菌对照组将数据基于水单独 (16,464RLU) 背景进行标准化并且对于接触细菌的 CM-111 粒料将数据基于未反应的 CM-111 (41,424RLU) 背景进行标准化。

[0354] 从上述实例可以看出, 粒状捕集剂可用于从水性样品中浓集细菌。

[0355] 实例 8

[0356] 利用 II 型装置用 CM-111 浓集大肠杆菌。

[0357] 将得自划线板的分离大肠杆菌 (ATCC 33090) 菌落接种到 5ml 胰酶大豆肉汤

(TSB, Becton Dickinson, Sparks, MD) 中并且在 37℃ 下温育 18-20 小时。将大约 10^8 个菌落形成单位 / 毫升的此过夜培养物在经无菌过滤的去离子水 (MilliQ, Millipore, MA) 中进行稀释并掺入在 10ml 经无菌过滤的去离子水中, 以获得 10^3 /ml (大约 10^4 cfu) 的最终浓度。将掺料水添加到已包含下述的装置中: 10mg 经预除菌 (121 摄氏度, 15 分钟) 的 CM-111 (Cosmetic Microspheres-111, 3M 公司, St Paul) 粉末和 100 微升 100X 吸附缓冲液。将所述装置用经表面除菌的石蜡膜进行密封并且置于振动平台上。然后将封闭的装置在室温 (25℃) 下在 Thermolyne Vari Mix™ 振动平台 (Barnstead International, Iowa, 14 周 / 分钟) 上温育 1 和 9 分钟 (总耗时间 = 2 分钟和 10 分钟)。

[0358] 温育之后, 移除石蜡膜并将柱塞插入到壳体中, 直至其接触易破密封件。通过进一步地插入柱塞以刺破易破密封件, 将结合大肠杆菌的 CM-111 以及大约 100 微升的液体样品转移到壳体的第二容器中。将包含大肠杆菌而无微粒的对照管进行类似地处理。

[0359] 通过切开第二容器取出 CM-111 粒料并将颗粒转移至 1.5ml 的无菌微量离心试管中。将 100 微升体积的 BacTiter-Glo™ 试剂 (Promega, Madison, WI) 添加至该粒料, 在 VWR 定速涡旋混合器 (3200rpm 持续 5 秒) 上通过涡旋混合 5 秒、并且在台式发光计 (FB12 Single Tube Luminometer, Berthold Detection Systems USA, Oak Ridge, TN) 上进行读数。对于 100% 信号, 使用得自 10^5 /ml 稀释液的 100 微升体积。结果是利用下述公式计算的并且列于下述表 4 中:

[0360] $\text{ATP 信号捕集效率 \%} = (\text{CM-111 粒料上的 RLU} / \text{得自约 } 10^4 \text{ 总大肠杆菌的 RLU}) \times 100\%$

[0361] RLU = 相对荧光素酶单位。

[0362] 表 4. 利用 II 型装置通过 ATP 生物发光获得对大肠杆菌的浓集和检测

样品	以 RLU 计的 ATP 信号	ATP 信号采集效率(%)
大肠杆菌 (10^4 细胞) 对照组	96,544	不适用
具有大肠杆菌的水样品 (未浓集)	25,583	0
[0363] 2 分钟测试时间下的具有浓集大肠杆菌的 CM-111 粒料	56,932	59
10 分钟测试时间下的具有浓集大肠杆菌的 CM-111 粒料	58,543	61

[0364] N=2, 标准偏差 < 10%, 对于大肠杆菌对照组将数据基于水单独 (27,938RLU) 背景进行标准化并且对于接触细菌的 CM-111 粒料将数据基于未反应的 CM-111 (30,611RLU) 背景进行标准化。

[0365] 实例 9

[0366] 利用 II 型装置用 AB-CM-111 浓集大肠杆菌

[0367] 另外使用实例 8 中所述的过程来测试 10mg 等分试样的 AB-CM (经吸附缓冲液处理的 CM-111) 在 10ml 水中对大肠杆菌的浓集。接触时间为 9 分钟, 其中 1 分钟用于使用 POREX 柱塞沉淀 AB-CM。数据列于表 5 中。

[0368] 表 5. 利用 II 型装置通过 ATP 生物发光获得对大肠杆菌的浓集和检测

	样品	以 RLU 计的 ATP 信号	ATP 信号采集效率 (%)
[0369]	大肠杆菌 (10^4) 对照组	82,845	不适用
	具有大肠杆菌的水样品 (未浓集)	733	1
	具有浓集大肠杆菌的 AB-CM 粒料	44,105	53

[0370] N=2, 标准偏差 <10%, 对于大肠杆菌对照组将数据基于水单独 (20, 281RLU) 背景进行标准化并且对于接触细菌的 CM-111 粒料将数据基于未反应的 AB-CM (44, 488RLU) 背景进行标准化。

[0371] 从上述实例可以看出, 粒状捕集剂可用于从水性样品中浓集细菌。

[0372] 实例 10

[0373] 比较例 - 未浓集样品中的大肠杆菌的检测。

[0374] 现有技术下的水测试包括其中使用标准 ATP 生物发光测定法 (例如, 3M CLEANTRACE Water - Free ATP 目录号 AQF100, 得自 3M 公司 (St. Paul, MN)) 来测试 100 微升水的 ATP 的方法。

[0375] 将大肠杆菌 (ATCC 33090) 在胰酶大豆肉汤中的过夜培养物在无菌水中进行稀释以产生两种悬浮液。悬浮液 A 包含约 10^3 CFU/ml, 而悬浮液 B 包含约 10^5 CFU/ml。

[0376] 将每个悬浮液的一百微升等分试样与 100 微升体积的 BacTiter-Glo™ 试剂 (Promega, Madison, WI) 进行混合, 并用如实例 8 中所述的发光计来测量所得的生物发光。结果示于表 6 中。

[0377] 表 6. 通过 ATP 生物发光对大肠杆菌的检测

	样品	以 RLU 计的 ATP 信号	归一化到水之后的 ATP 信号捕集效率 (%)
[0378]	大肠杆菌 (10^4) 对照组 (100%信号)	18,143	不适用
	水样品 (无大肠杆菌)	1,109	不适用
	具有大肠杆菌的水样品 (未浓集)	1,776	4%

[0379] N=2, 标准偏差 <10%

[0380] 本申请引证的所有专利、专利申请和专利公开的全部公开内容以及可供使用电子版材料均以引证方式并入本申请。在本专利申请和以引证方式并入本申请的任何文献的公开内容之间存在矛盾的情况下, 应以本发明的公开内容为准。给出上述详细描述和实例仅为了清楚地理解本发明。应该理解, 对于本发明, 这些描述和实施例没有不必要的限制。本发明不限于所示和所述的具体细节, 对本领域的技术人员显而易见的变型形式也将包含在由权利要求书所限定的本发明中。

[0381] 除非另外指明, 否则说明书和权利要求书中所用的表示组分、分子量等等的所有数字在所有情况下均应理解为被术语“约”所修饰。因此, 除非有相反的说明, 否则在说明书和权利要求中示出的数值参数均为近似值, 这些近似值可以随着试图通过本发明获得的

所需特性而变化。在最低程度上,且没有将等同原则局限于权利要求保护的范围的意思,最起码是应该根据所报告的有效数字的数并运用惯常的舍入技术来解释每一个数值参数。

[0382] 虽然在本发明的广泛范围内所示的数字范围和参数为近似值,但具体实例中所示的数值会尽可能准确地报告。尽管如此,在各自测试过程中产生的标准偏差不可避免地导致所有数值固有地包括一定范围。

[0383] 所有的标题是为了阅读者方便,而不应该被用于限制该标题后面的正文的含义,除非如此规定。

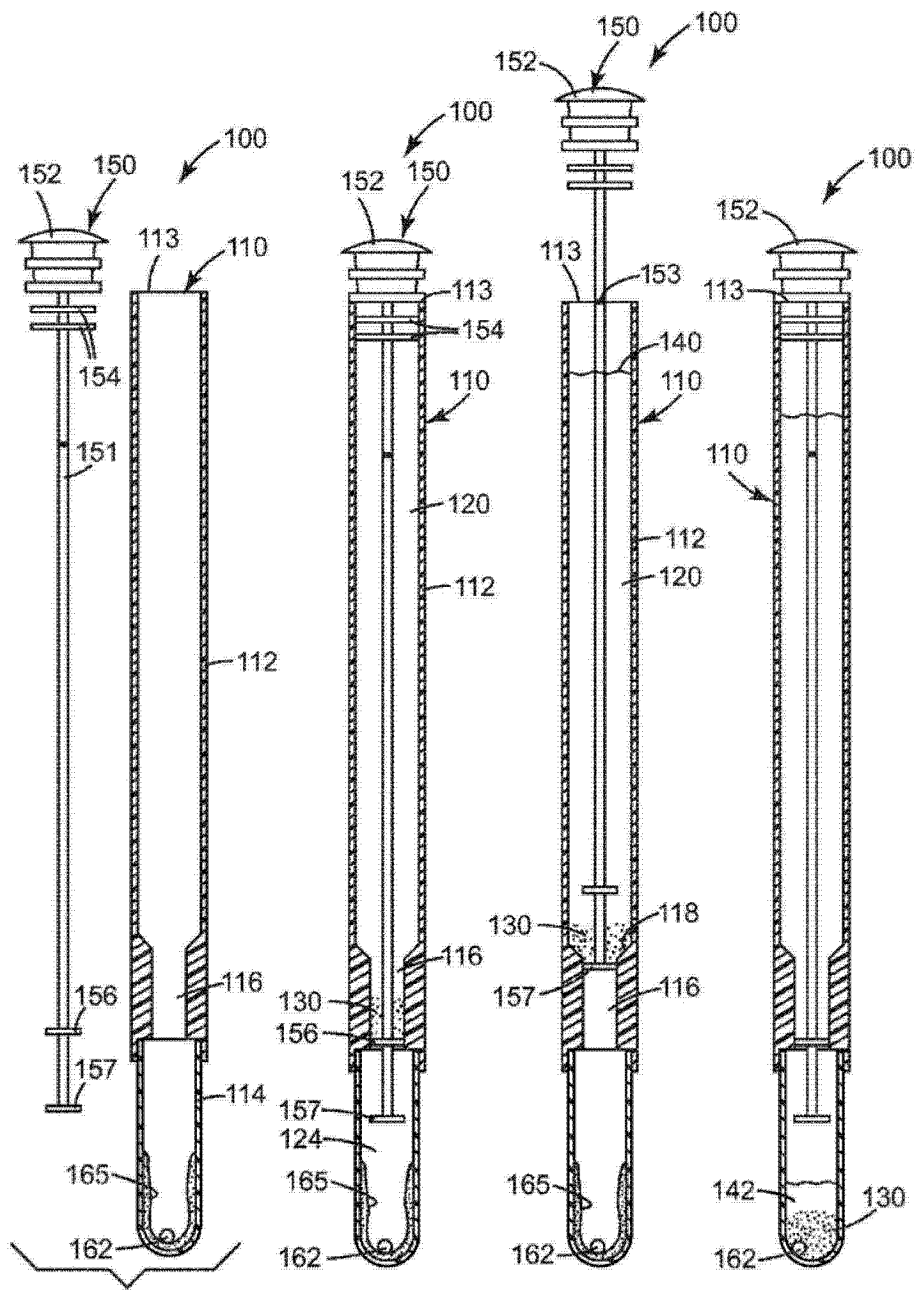


图1A

图1B

图1C

图1D

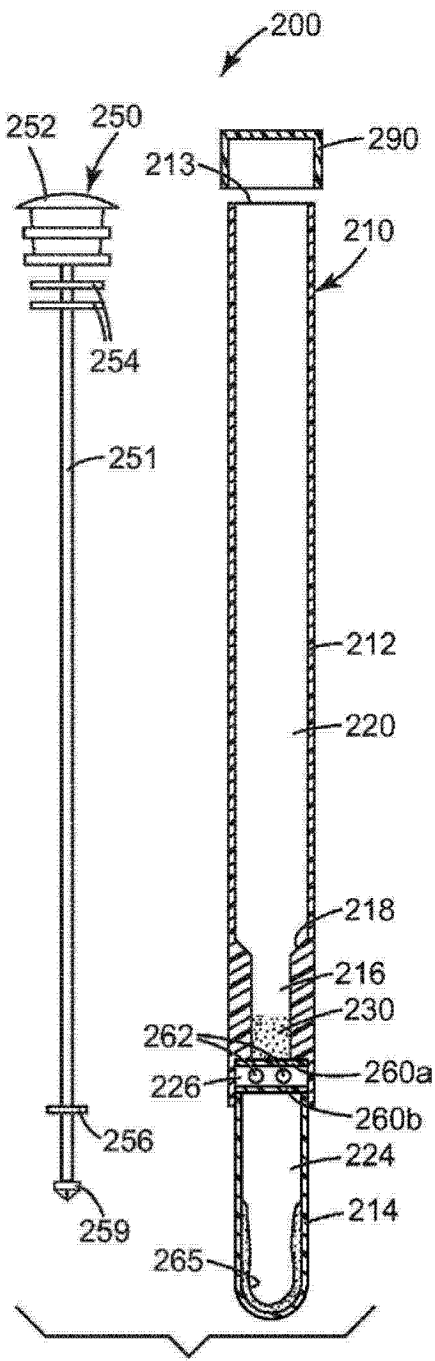


图 2A

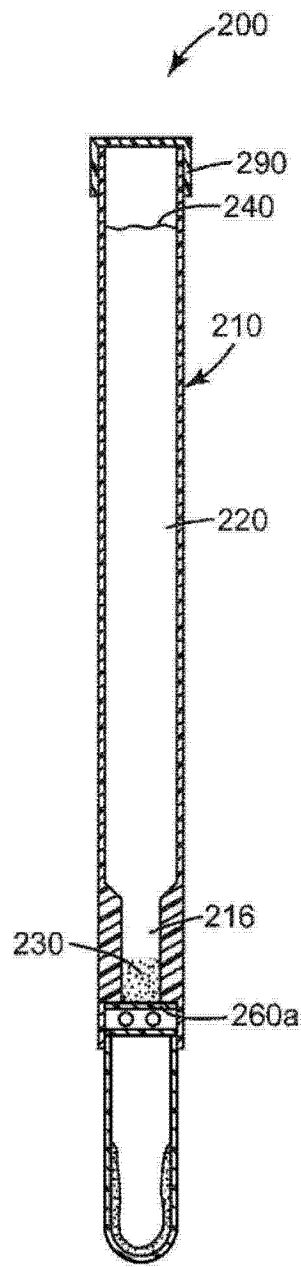


图 2B

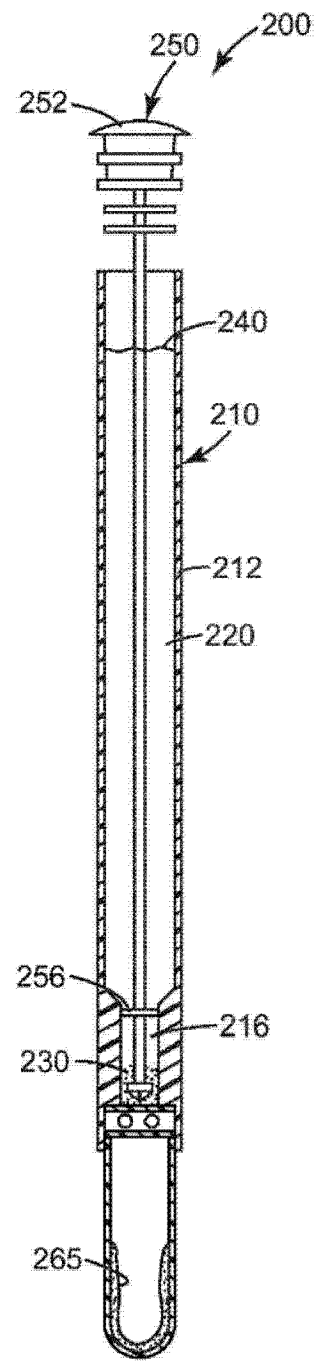


图 2C

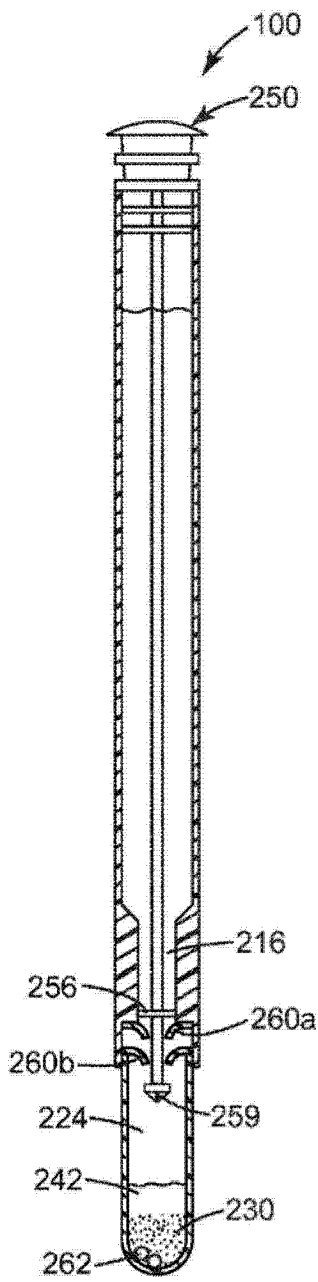


图 2D

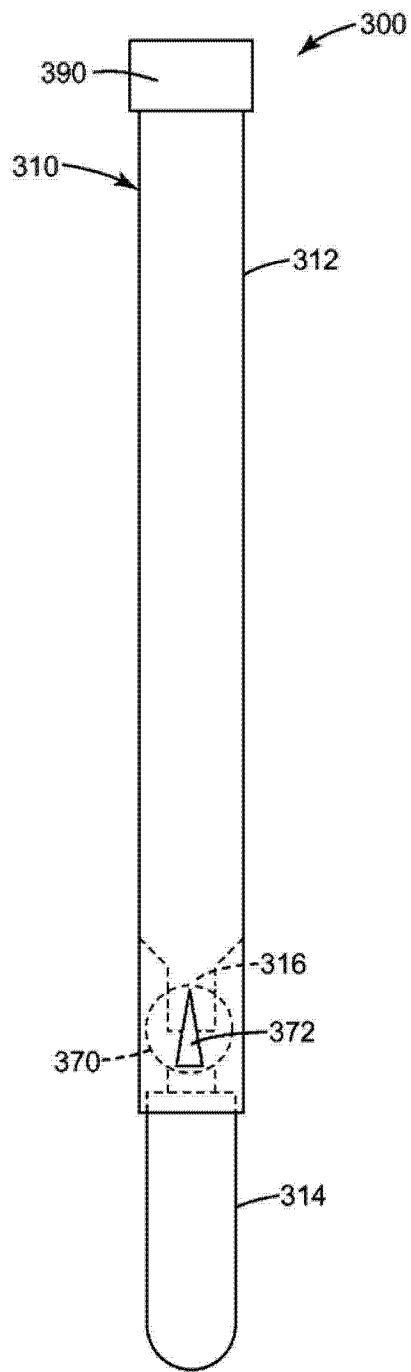


图 3A

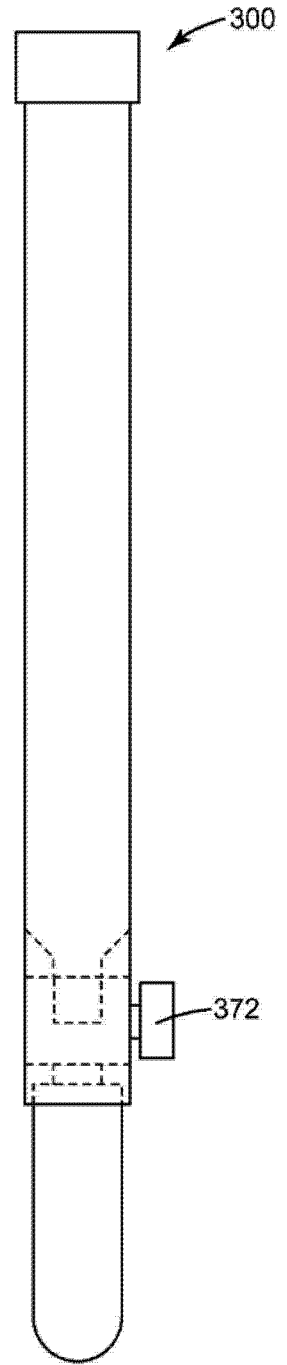


图 3B

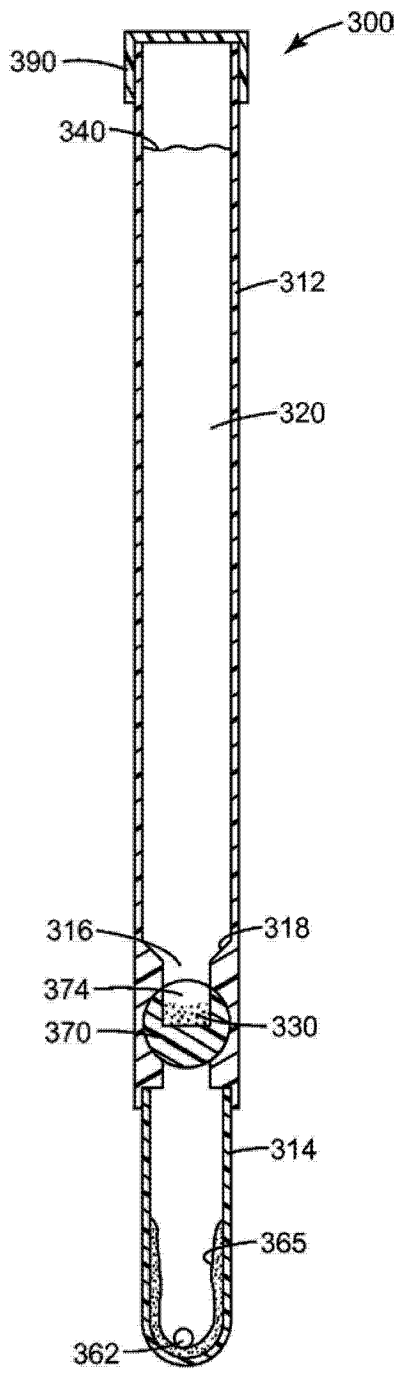


图 3C

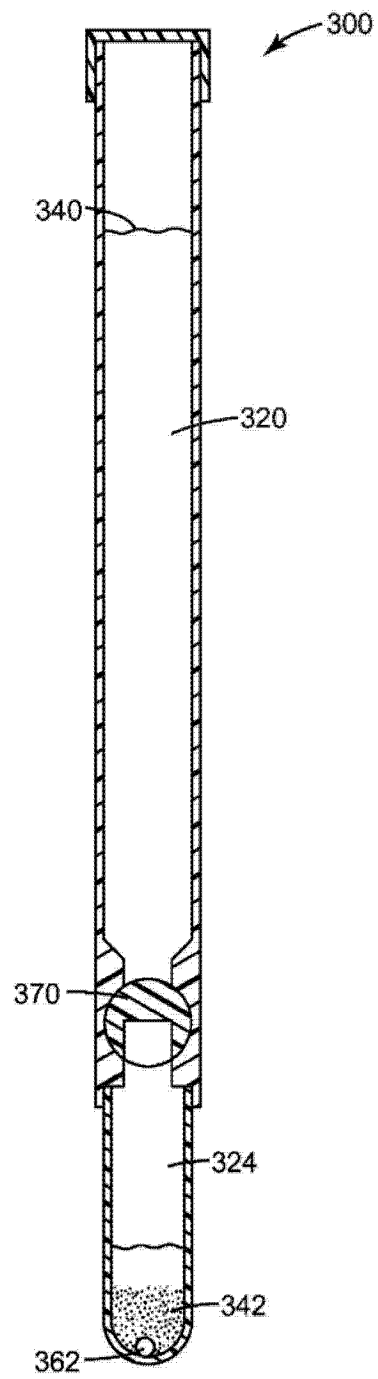


图 3D

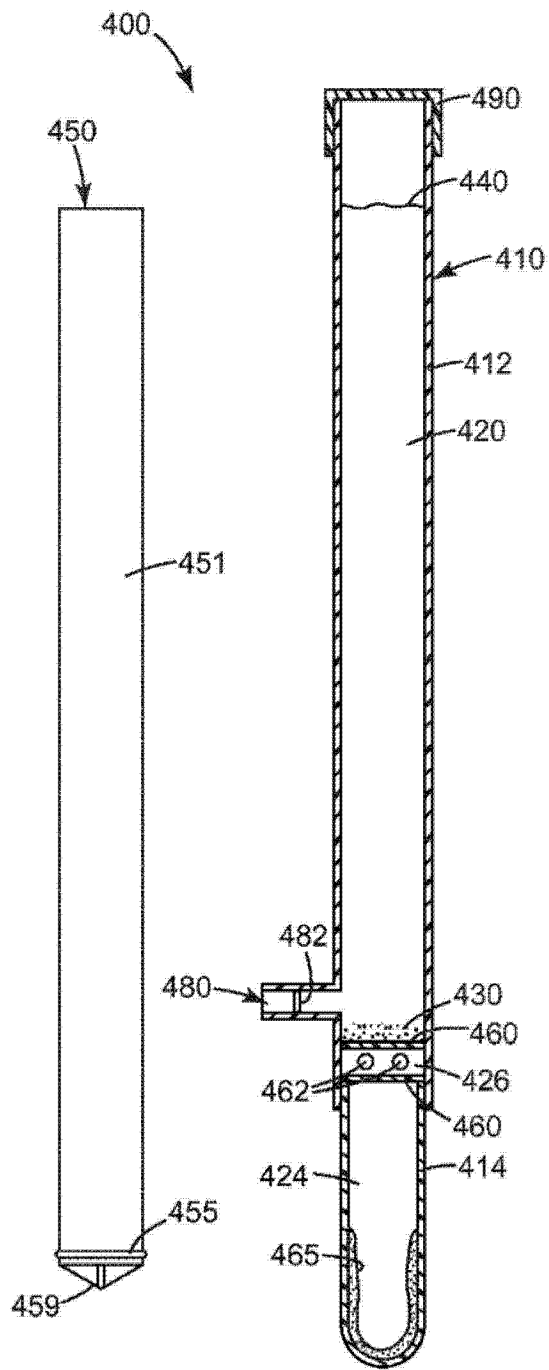


图 4A

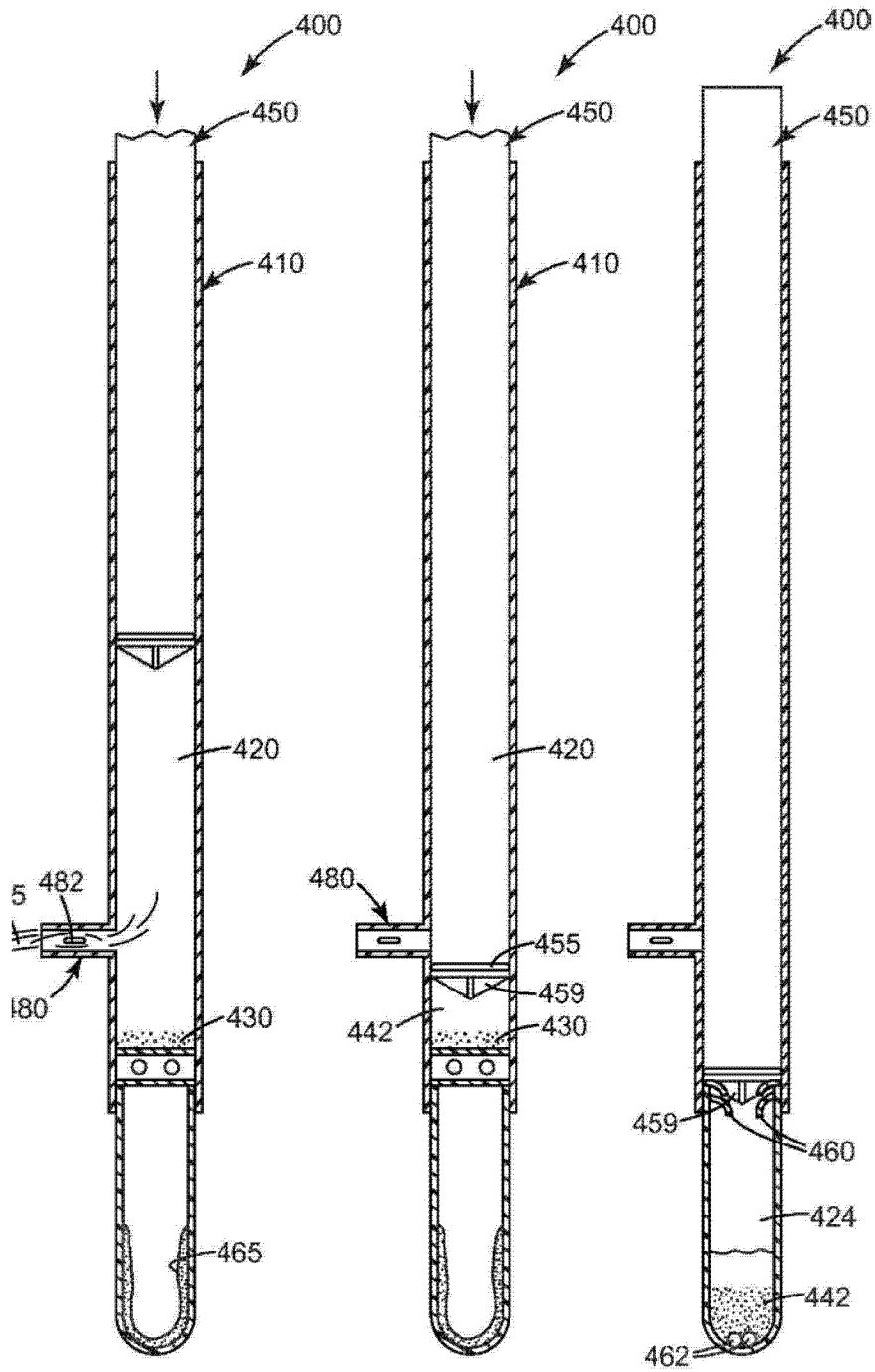


图4B

图4C

图4D

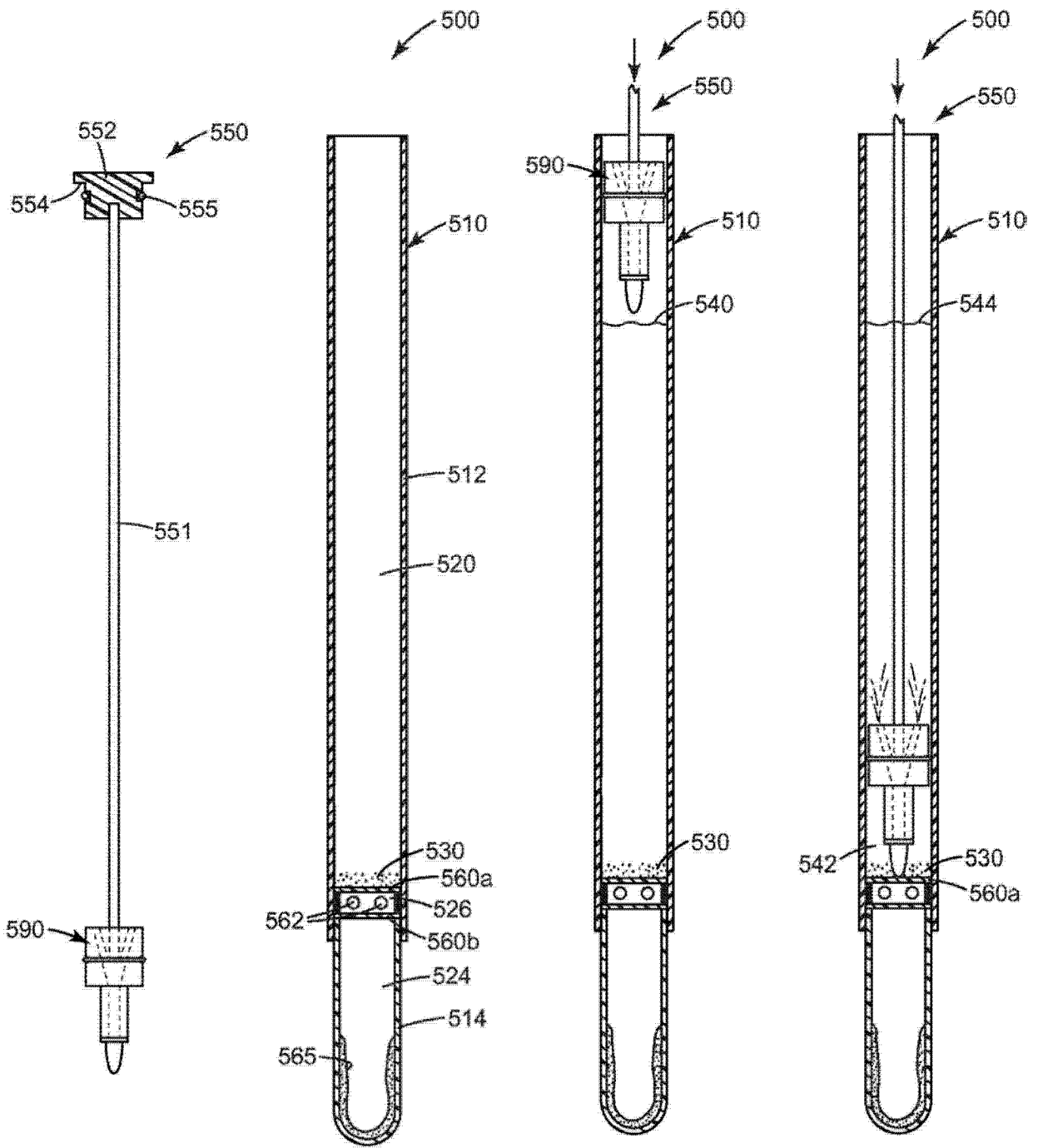


图 5A

图 5B

图 5C

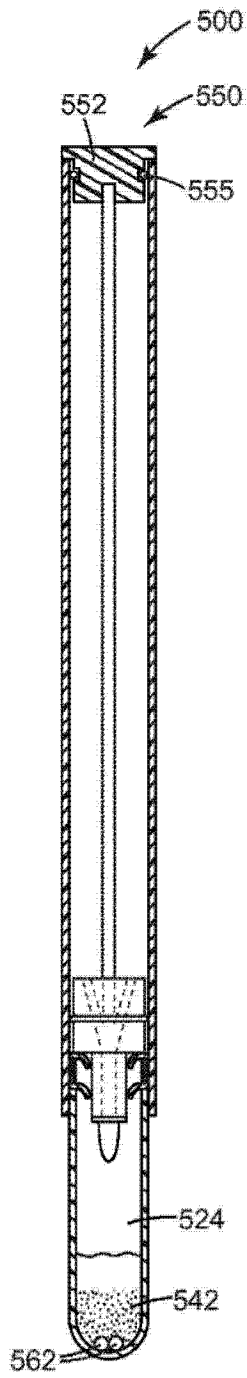


图 5D

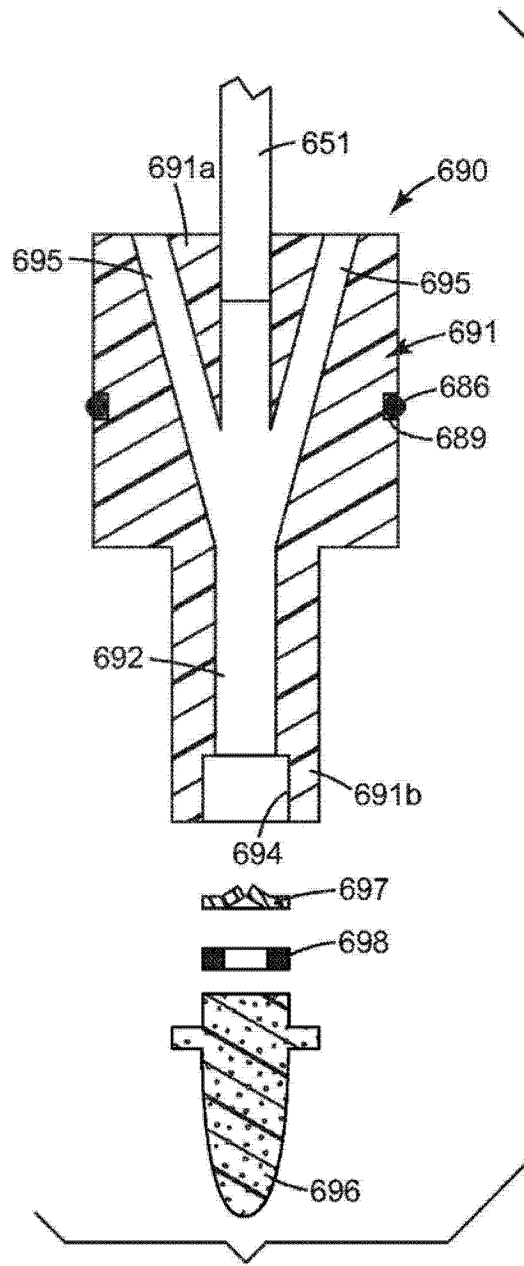


图 6A

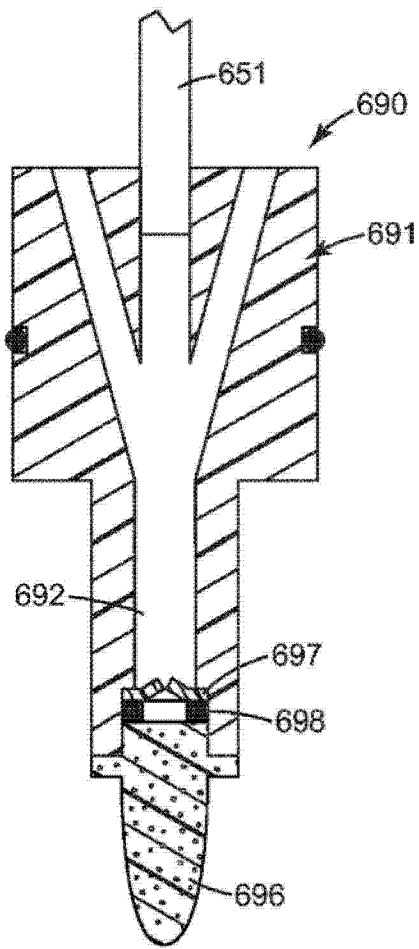


图 6B

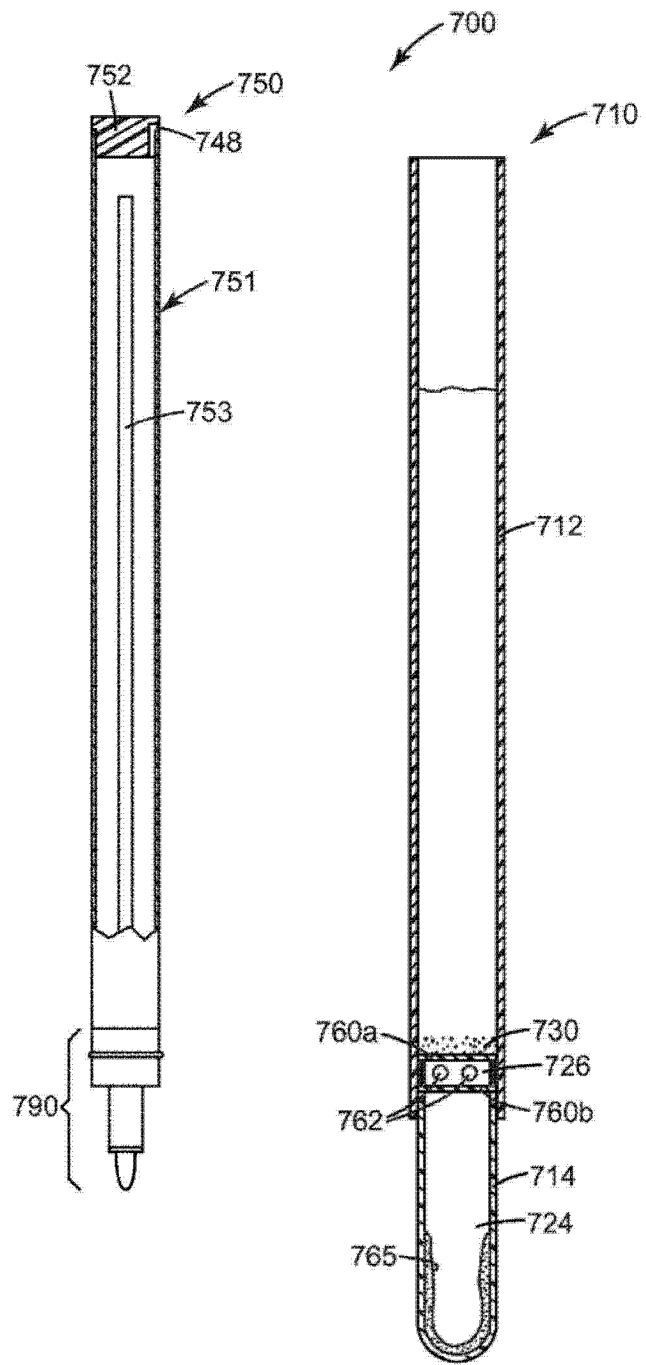


图 7A

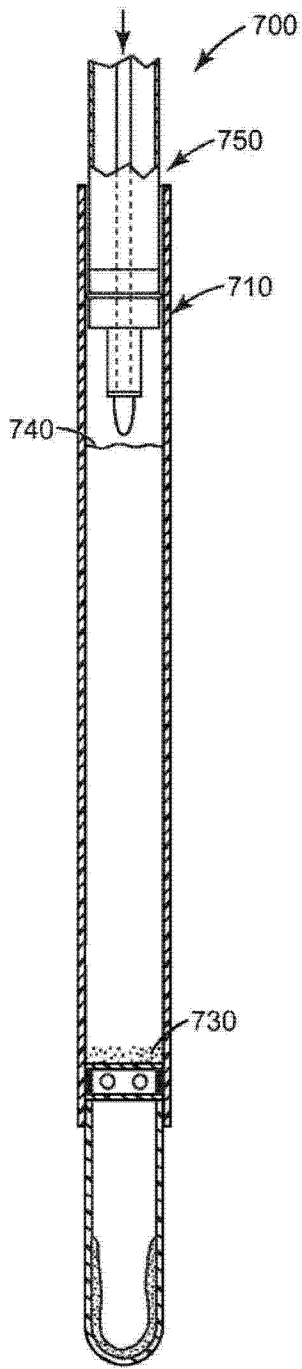


图 7B

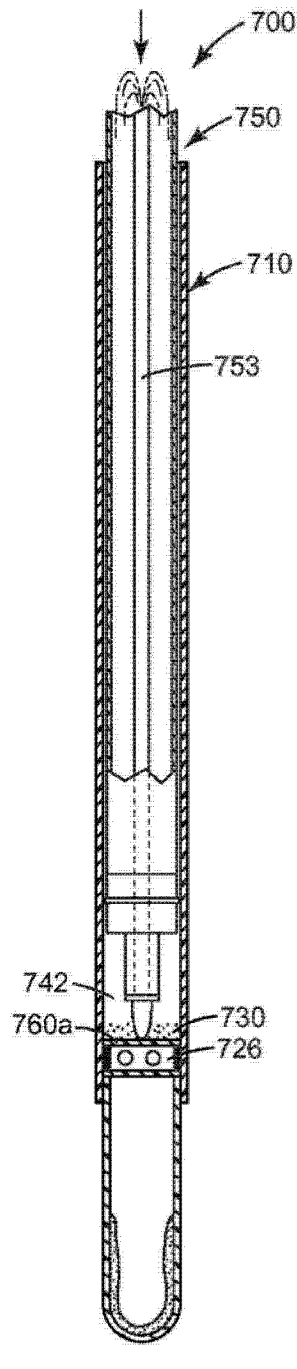


图 7C

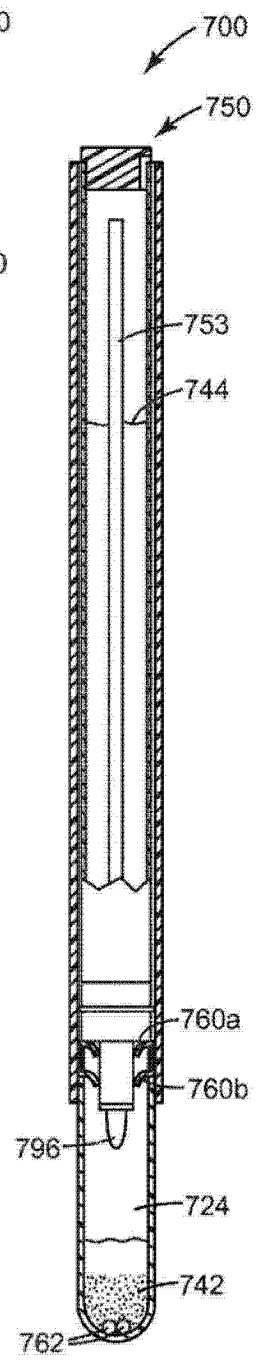


图 7D

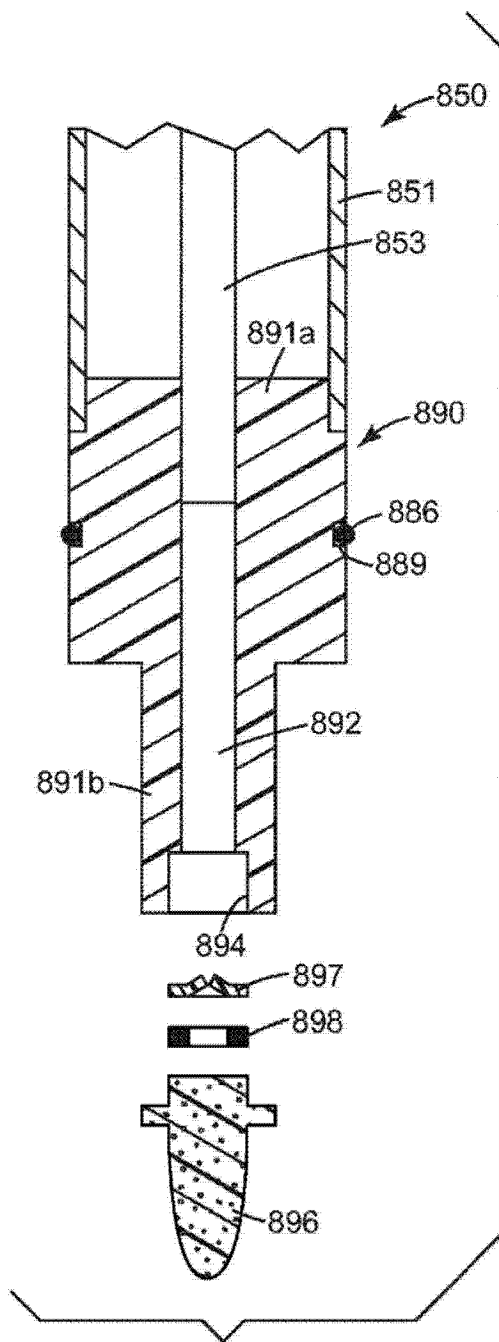


图 8A

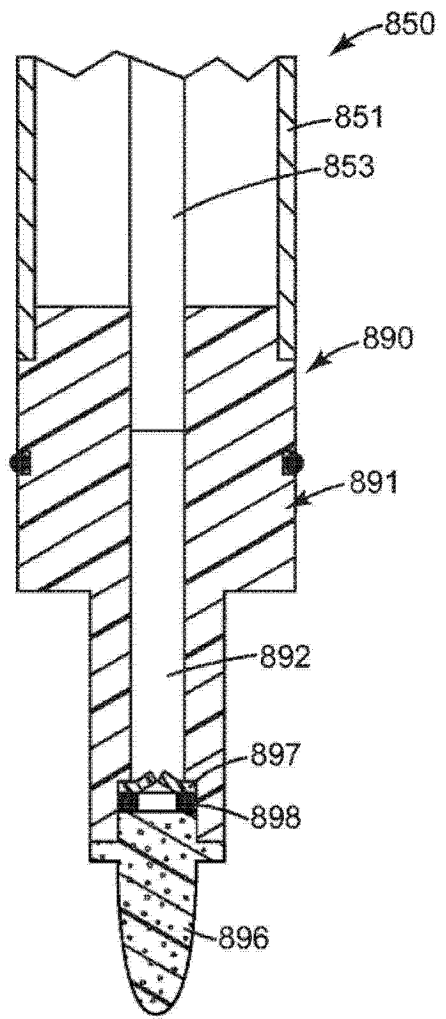


图 8B

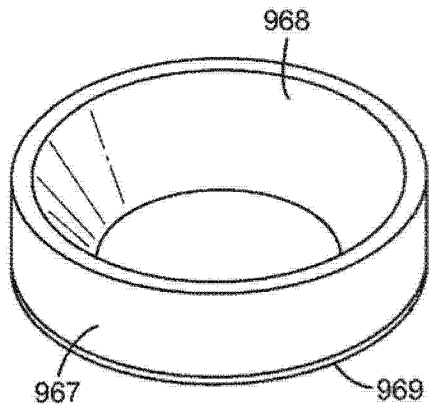


图 9

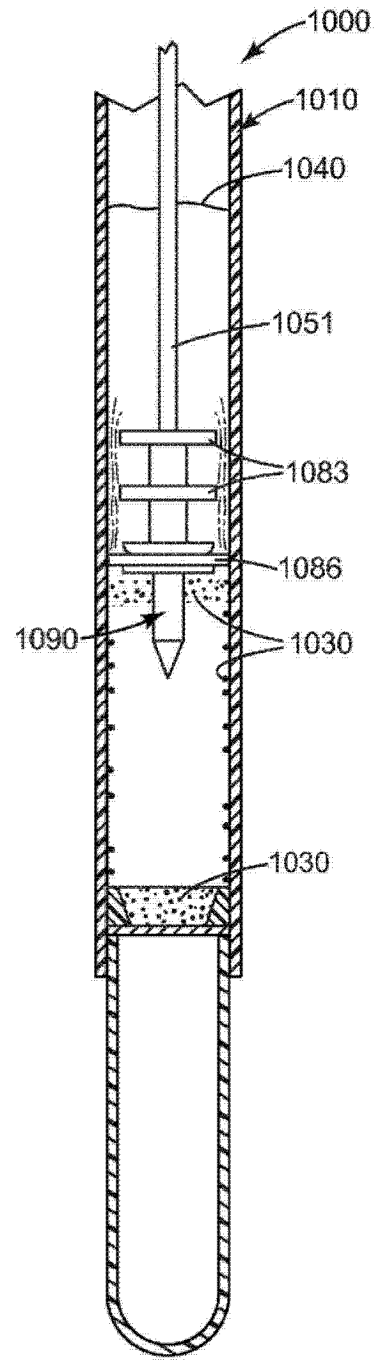


图 10B

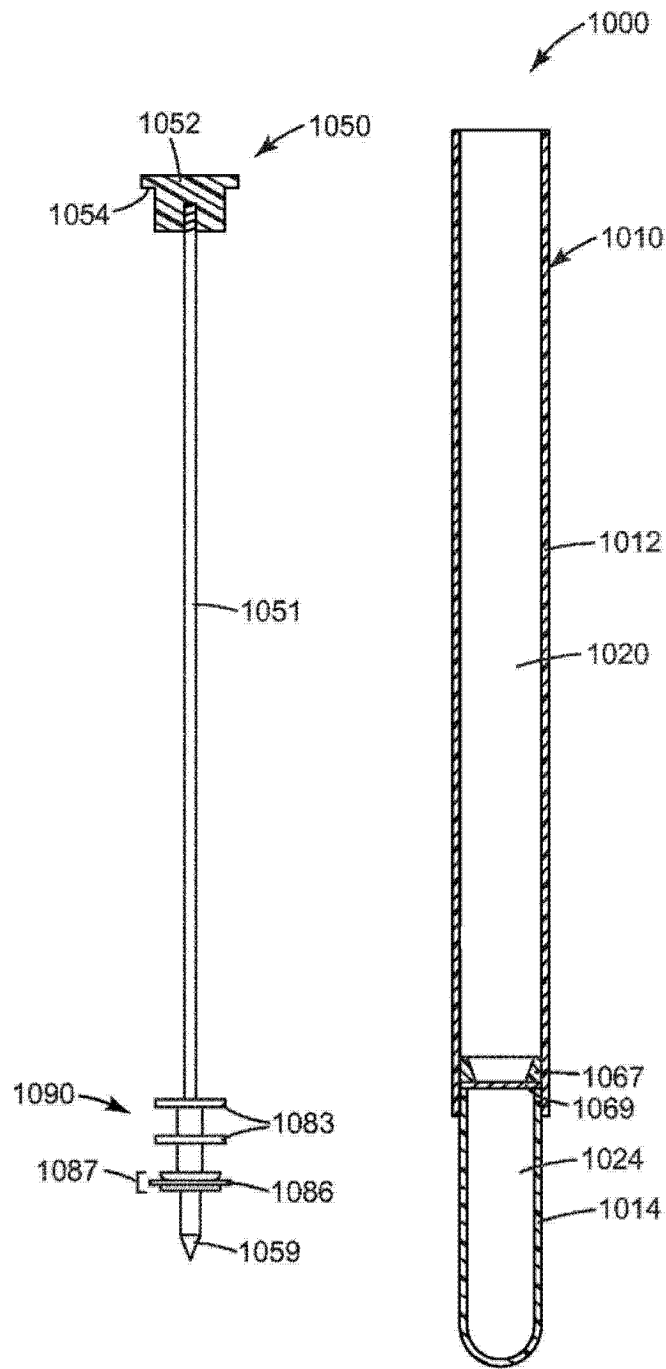


图 10A

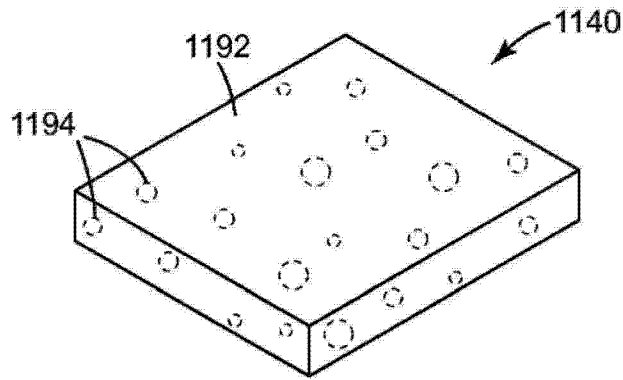


图 11

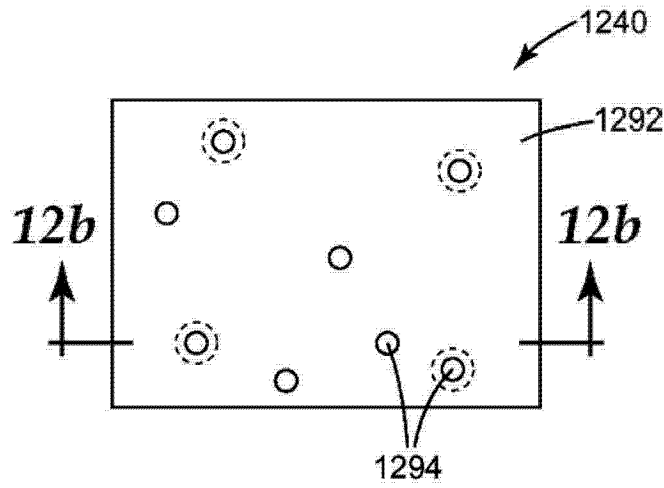


图 12a

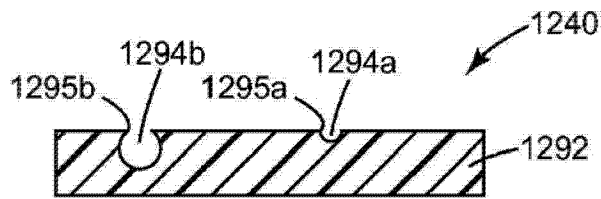


图 12b

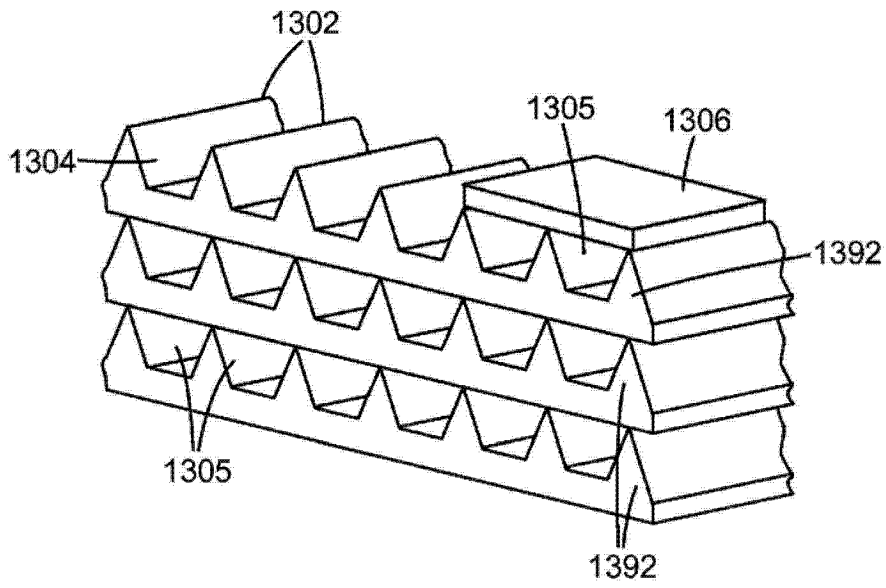


图 13

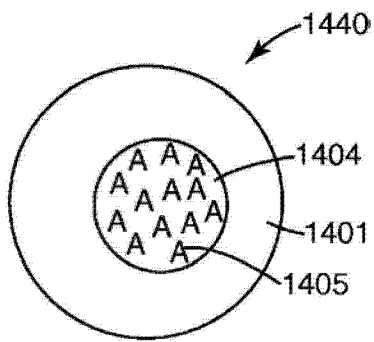


图 14

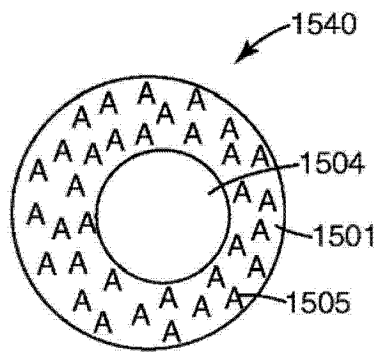


图 15

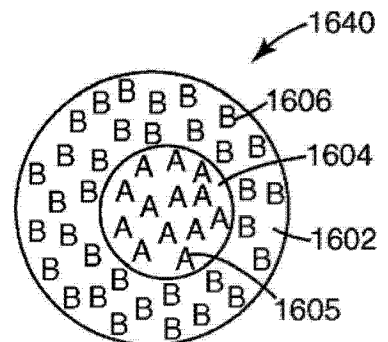


图 16

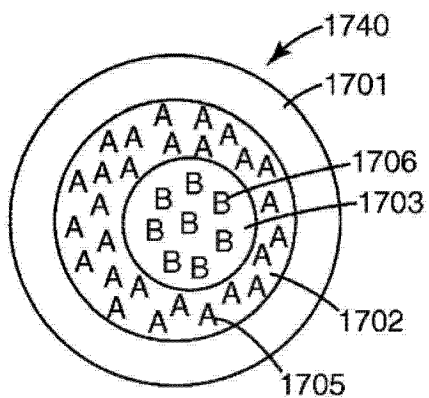


图 17

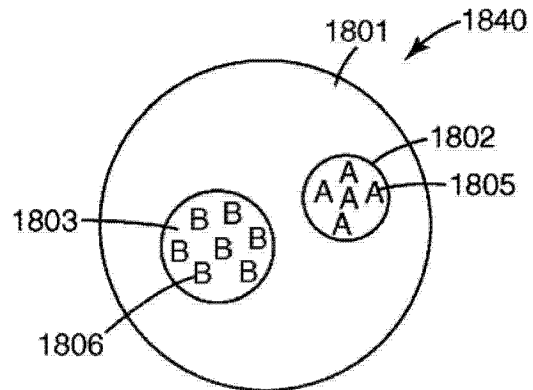


图 18

专利名称(译)	使用微粒进行的活生物负载检测		
公开(公告)号	CN102770208A	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	CN201080064666.3	申请日	2010-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	明尼苏达州采矿制造公司		
申请(专利权)人(译)	3M创新有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	3M创新有限公司		
[标]发明人	拉杰拉贾戈帕尔 库尔特J霍尔沃森 曼基里T克希尔萨加尔 詹姆斯E艾斯塔		
发明人	拉杰·拉贾戈帕尔 库尔特·J·霍尔沃森 曼基里·T·克希尔萨加尔 詹姆斯·E·艾斯塔		
IPC分类号	B01L3/00 C12M1/12 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 B01L3/14 C12M1/28 G01N33/569 A61B10/02		
CPC分类号	C12Q1/04 B01L3/5082 B01L2300/046 B01L2400/0478 B01L3/5029 B01L2300/0672 B01L2400/0683 B01L2300/087 B01L3/502 G01N33/5005 B01L2300/042 B01L3/5021 B01L2400/0644		
优先权	61/291301 2009-12-30 US 61/331931 2010-05-06 US		
其他公开文献	CN102770208B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了将细胞浓集到微粒上、浓集所述微粒以及检测所述细胞的方法。本发明还包括根据所述方法使用的一体化样品制备和检测装置。

