



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102325596 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 18

(21) 申请号 200980157421. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 12. 31

B01L 3/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12M 1/12 (2006. 01)

61/141, 685 2008. 12. 31 US

C12Q 1/68 (2006. 01)

61/291, 301 2009. 12. 30 US

G01N 33/53 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

G01N 33/543 (2006. 01)

2011. 08. 23

G01N 33/545 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/069898 2009. 12. 31

(87) PCT申请的公布数据

W02010/078482 EN 2010. 07. 08

(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 张颖 樊卫民

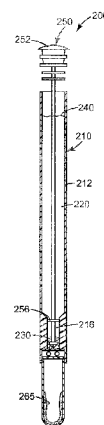
权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图 15 页

(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来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、包含细胞提取剂的水凝胶和怀疑包含细胞的液体样品;
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中分离所述细胞浓集剂;
形成包含所述分离的细胞浓集剂和所述水凝胶的液体混合物,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:
提供怀疑包含细胞的样品;细胞浓集剂;包含细胞提取剂的水凝胶;包括壳体的检测制品,所述壳体具有两个或更多个容器和具有被构造用于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上容器中分离并转移至下容器的机构;
使所述样品与所述细胞浓集剂在所述壳体的上容器中于液体介质内接触;
将所述细胞浓集剂分离并转移至所述壳体的下容器;
形成包含所述分离的细胞浓集剂和所述水凝胶的液体混合物,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:
提供怀疑包含细胞的样品;包括壳体的检测制品,所述壳体具有被构造用于接纳所述样品的开口、容纳细胞浓集剂的上容器和容纳含有细胞提取剂的水凝胶的下容器;用于从所述液体样品的至少一部分中分离所述细胞浓集剂的机构;和用于将所述细胞浓集剂从所述壳体中的所述上容器转移至所述下容器的机构;
在液体介质内使所述样品与所述壳体上容器中的所述细胞浓集剂接触;
将所述细胞浓集剂分离并转移至所述壳体的下容器;
形成包含所述分离的细胞浓集剂和所述水凝胶的液体混合物,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,其中检测所述生物分析物包括检测活细胞的存在。
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使用检测系统。
6. 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。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括提供体细胞提取剂并使所述体细胞提取剂与来自所述样品的细胞接触的步骤。
8. 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。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中将所述生物分析物的量定量两次或更多次。
10. 根据权利要求 9 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。

11. 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。

12. 根据权利要求 11 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。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中检测所述 ATP 包括检测来自细菌细胞的 ATP。

14. 根据权利要求 11-13 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。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,还包括提供能够水解 ATP 的酶并使所述酶与所述样品的至少一部分接触的步骤。

16. 根据权利要求 1-10 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。

17. 根据权利要求 1-10 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。

18. 根据权利要求 1-10 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。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述酶包含腺苷酸激酶活性。

20. 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。

21. 一种一体化样品制备和检测装置,包括:

壳体,包括至少两个在其之间具有通道的容器;

其中上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;

其中下容器包括设置于其中的检测试剂;

用于将所述上容器与所述下容器隔离的机构;以及

用于将所述细胞浓集剂从所述上容器转移至所述下容器的机构。

22. 根据权利要求 21 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。

23. 根据权利要求 21-22 中任一项所述的装置,其中用于隔离所述壳体的上容器和下容器的机构包括柱塞、阀门或易破密封件。

24. 根据权利要求 21-23 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所述上容器转移至所述下容器的机构包括柱塞、拭子或阀门。

25. 根据权利要求 21-24 中任一项所述的装置,其中所述装置包括锥形内壁。

26. 根据权利要求 21-25 中任一项所述的装置,还包括包含细胞提取剂的水凝胶。

27. 根据权利要求 26 所述的装置,其中所述水凝胶为珠子、纤维、带材或片材。

28. 根据权利要求 26 所述的装置,其中所述水凝胶涂布在固体基底上。

29. 根据权利要求 21-28 中任一项所述的装置,其中所述壳体还包括第三容器。

30. 根据权利要求 29 所述的装置,其中所述水凝胶设置在所述第三容器内。

31. 根据权利要求 21-30 中任一项所述的装置,还包括体细胞提取剂。

32. 根据权利要求 21 所述的装置,还包括柱塞。

33. 根据权利要求 32 所述的装置,其中所述柱塞包括流体通道。

34. 根据权利要求 33 所述的装置,其中所述流体通道包括过滤器。
35. 根据权利要求 34 所述的装置,其中所述过滤器包括微孔过滤器。
36. 根据权利要求 32 所述的装置,其中所述柱塞还包括刮器。
37. 根据权利要求 36 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和所述壳体之间通过。
38. 一种套件,包括:
壳体,包括至少两个在其之间具有通道的容器;
其中上容器包括被构造用于接纳样品的开口;
其中下容器包括设置于其中的检测试剂;
用于将所述上容器与所述下容器隔离的机构;
细胞浓集剂;以及
用于将所述细胞浓集剂从所述上容器转移至所述下容器的机构。
39. 根据权利要求 38 所述的套件,其中所述壳体包括用于将所述上容器与所述下容器隔离的所述机构。
40. 根据权利要求 38 或权利要求 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上容器转移至所述下容器的所述机构。
41. 根据权利要求 38-40 中任一项所述的套件,其中所述细胞浓集剂设置在所述壳体的上容器中。
42. 根据权利要求 38-41 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 38-42 中任一项所述的套件,还包括含有微生物细胞提取剂的水凝胶。
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 38-44 中任一项所述的套件,还包括样品获取装置。
46. 根据权利要求 38-45 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和所述壳体之间通过。

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用

[0002] 本专利申请要求 2008 年 12 月 31 日提交的美国临时专利申请号 61/141,685 和 2009 年 12 月 30 日提交的美国临时专利申请号 61/291,301 的权利,上述专利申请以引用方式并入本文中。

背景技术

[0003] 有各种试验可供用来评估生物分析物在样品(例如表面、水、空气等)中的存在。这类试验包括基于使用萤火虫萤光素酶反应检测 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。可以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的清洁以便用于生产。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/或容易地区分活细胞与死细胞的存在,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,常常使用细胞提取剂来释放出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] 总体而言,本发明涉及检测样品中的活细胞的制品和方法。所述制品和方法使得有可能快速检测(例如通过荧光、化学发光或颜色反应)细胞(如细菌)在表面上的存在。在一些实施例中,本发明的制品是“可立即用于检测样品的”,即制品包括为检测样品中的活细胞所需的所有必要特征物。在一些方面,本发明的制品和方法提供区分与真核细胞(例如植物或动物细胞)相关的生物分析物(如 ATP 或酶)将与原核细胞(例如细菌细胞)相关的类似或相同生物分析物的手段。此外,本发明的制品和方法提供区分游离于环境中的生物分析物(即无细胞生物分析物)将与活细胞相关的类似或相同生物分析物的手段。

[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,具体地讲,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,所述方法能让操作者辨别样品中的生物分析物是从活的植物细胞还是动物细胞释放出来,或者是否是从活的微生物细胞(例如细菌)释放出来。本发明能够被操作者在食物制作服务机构相对恶劣的场地环境、健康护理环境等环境下使用。

[0009] 在一个方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法包括提供细胞浓集剂、包含细胞提取剂的水凝胶和怀疑包含细胞的液体样品。所述方法还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分离细胞浓集剂;形成包含分离的细胞浓集剂和水凝胶的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中;以及检测生物分析物。任选地,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,检测生物分析物包括检测活细胞。在一些实施例中,检测生物分析物包括使用检测系统。在一些实施例中,检测生物分析物包括对分析物定量。在一些实施例中,检测生物分析物包括检测来自细胞的ATP。在一些实施例中,检测生物分析物包括通过遗传学或免疫学方法检测细胞。在一些实施例中,所述方法还包括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的步骤。

[0010] 在另一方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法包括提供怀疑包含细胞的样品;细胞浓集剂;包含细胞提取剂的水凝胶;包括壳体的检测制品,壳体具有两个或更多个容器和具有被构造用于接纳样品的开口;将细胞浓集剂从壳体中的上容器分离并转移到下容器的机构。所述方法还包括在液体介质内使样品与壳体上容器中的所述细胞浓集剂接触。所述方法还包括将细胞浓集剂转移到壳体中的下容器。所述方法还包括形成包含分离的细胞浓集剂和水凝胶的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中。所述方法还包括检测生物分析物。任选地,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,检测生物分析物包括检测活细胞。在一些实施例中,检测生物分析物包括使用检测系统。在一些实施例中,检测生物分析物包括对分析物定量。在一些实施例中,检测生物分析物包括检测来自细胞的ATP。在一些实施例中,检测生物分析物包括通过遗传学或免疫学方法检测细胞。在一些实施例中,所述方法还包括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的步骤。

[0011] 在另一方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法包括提供怀疑包含细胞的样品;包括壳体的检测制品,壳体具有被构造用于接纳样品的开口、容纳细胞浓集剂的上容器和容纳包含细胞提取剂的水凝胶的下容器;用于从液体样品的至少一部分中分离细胞浓集剂的机构;和用于将细胞浓集剂从壳体中的上容器转移至下容器的机构。所述方法还包括在液体介质内使样品与壳体上容器中的所述细胞浓集剂接触。所述方法还包括将细胞浓集剂分离并转移至壳体的下容器。所述方法还包括形成包含分离的细胞浓集剂和水凝胶的液体混合物,其中细胞提取剂被释放到该混合物中。所述方法还包括检测生物分析物。任选地,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,检测生物分析物包括检测活细胞。在一些实施例中,检测生物分析物包括使用检测系统。在一些实施例中,检测生物分析物包括对分析物定量。在一些实施例中,检测生物分析物包括检测来自细胞的ATP。在一些实施例中,检测生物分析物包括通过遗传学或免疫学方法检测细胞。

在一些实施例中,所述方法还包括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的步骤。

[0012] 在另一方面,本发明提供一体化样品制备和检测装置。所述装置包括壳体,该壳体包括至少两个在其之间具有通道的容器。壳体的上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。壳体的下容器包括设置于其中的检测试剂。所述装置还包括用于将上容器与下容器隔离的机构。所述装置还包括用于将细胞浓集剂从上容器转移至下容器的机构。在一些实施例中,用于将第一和下容器隔离的机构是用于将细胞浓集剂从上容器转移至下容器的机构。在一些实施例中,壳体还包括两个隔离的容器之间的易破密封件。在一些实施例中,上容器包括锥形区域。在一些实施例中,所述装置还包括包含细胞提取剂的水凝胶。在一些实施例中,壳体还包括第三容器。在一些实施例中,所述装置还包括样品获取装置。在一些实施例中,检测试剂包括用于检测 ATP 的试剂。在一些实施例中,所述装置还包括包含检测试剂的水凝胶。

[0013] 在另一方面,本发明提供一体化样品制备和检测装置。所述装置包括壳体,该壳体包括至少两个在其之间具有通道的隔离容器和被构造用于适配该通道的活塞。壳体的上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。壳体的下容器包括设置于其中的检测试剂。在一些实施例中,壳体还包括两个隔离的容器之间的易破密封件。在一些实施例中,上容器包括锥形内壁。在一些实施例中,所述装置还包括包含细胞提取剂的水凝胶。在一些实施例中,壳体还包括第三隔离容器。在一些实施例中,所述装置还包括样品获取装置。在一些实施例中,检测试剂包括用于检测 ATP 的试剂。在一些实施例中,所述装置还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。所述装置包括壳体,该壳体包括至少两个在其之间具有通道的隔离容器。壳体的上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。下容器包括设置于其中的检测试剂。所述装置还包括被构造用于控制材料从上容器到下容器的通过的阀门。在一些实施例中,上容器包括锥形内壁。在一些实施例中,所述装置还包括包含细胞提取剂的水凝胶。在一些实施例中,壳体还包括第三隔离容器。在一些实施例中,所述装置还包括样品获取装置。在一些实施例中,检测试剂包括用于检测 ATP 的试剂。在一些实施例中,所述装置还包括包含检测试剂的缓释组合物。

[0015] 在另一方面,本发明提供包括下述壳体和机构的套件,所述壳体包括至少两个在其之间具有通道的隔离容器,所述机构用于将细胞浓集剂从上容器转移至下容器。壳体的上容器包括被构造用于接纳样品的开口。下容器包括设置于其中的检测试剂。所述套件还包括细胞浓集剂。在一些实施例中,细胞浓集剂设置在壳体的上容器中。在一些实施例中,所述套件还包括包含微生物细胞提取剂的水凝胶。在一些实施例中,所述套件还包括体细胞提取剂。在一些实施例中,所述套件还包括样品获取装置。

[0016] 在另一方面,本发明提供包括壳体的套件,所述壳体包括至少两个在其之间具有通道的隔离容器。壳体中的上容器包括被构造用于接纳样品的开口。壳体中的下容器包括设置于其中的检测试剂。所述套件还包括细胞浓集剂和用于将细胞浓集剂从上容器转移至下容器的机构。在一些实施例中,细胞浓集剂设置在壳体的上容器中。在一些实施例中,所述套件还包括包含微生物细胞提取剂的水凝胶。在一些实施例中,所述套件还包括体细胞

提取剂。在一些实施例中,所述套件还包括样品获取装置。

[0017] 术语表

[0018] 本文所用的“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] 本文所用的“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(例如)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,可用样品获取装置收集固体、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] “样品获取装置”在本文中以最广义的含义使用,指用来收集液体、半固体或固体样品材料的器具。样品获取装置的非限制性例子包括拭子、擦拭物、海绵、勺子、刮刀、吸管、吸管头和虹吸管。

[0022] 本文所用的“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次仅可与容器中的一个成流体连通。

[0023] 本文所用的术语“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] 本文所用的“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] 本文所用的“检测系统”是指用于检测生物分析物的成分,包括酶、酶底物、结合伴侣(例如抗体或受体)、标记物、染料以及用于检测吸光度或光反射比、荧光和/或发光(例如生物发光或化学发光)的仪器。

[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实施例。然而,在相同的情况或其它情况下,其它实施例也可以是优选的。此外,对一个或多个优选实施例的表述并不暗示其它实施例是不可用的,且并非意图将其它实施例排除在本发明范围之外。

[0027] 术语“包含”及其变型当出现在具体实施方式和权利要求中时不具有限制的意思。

[0028] 本文所用的“一种(个)”、“所述(该)”、“至少一种(个)”以及“一种或多种(一个或多个)”可互换使用。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] 还有,本文通过端点表述的数值范围包括该范围内的所有数值(比如,1-5包含1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0031] 本发明的上述发明内容并非意图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。在本专利申请全文的几处,通过实例列表提供指导,可以不同组合使用这些实例。在每一种情况下,被引用的列表均仅充当一个代表性的组,不应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上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上容器中的液体样品。

[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下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上容器中的液体样品。

[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下容器的细胞浓集剂。

[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上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下容器的细胞浓集剂。

[0044] 图4A示出了包括两个容器和一个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开口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,其中柱塞已穿透易破密封件并将细胞浓集

剂转移至下容器。

[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。

具体实施方式

[0059] 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以引用方式全文并入本文。如有冲突,以本说明书(包括定义在内)为准。

[0060] 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 2008 年 12 月 31 日提交的题为“用于浓集微生物的采样装置和方法 (SAMPLING DEVICES AND METHODS FOR CONCENTRATING MICROORGANISMS)”的美国专利申请号 61/141,900 和 2008 年 12 月 31 日提交的题为“用于处理样品的方法、套件和系统 (METHODS, KITS AND SYSTEMS FOR PROCESSING SAMPLES)”的美国专利申请号 61/141,813,上述各个专利申请均以引用方式全文并入本文。本文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。

[0061] 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。

[0062] 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)与萤光素在萤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。

[0063] 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)。

[0064] 样品和样品获取装置 :

[0065] 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。

[0066] 本文所用的术语“样品”以其最广的含义使用。样品是怀疑含有有用本发明进行分析的生物分析物(例如 ATP)的组合物。生物分析物可存在于样品中的细胞(如细菌)中。虽然通常样品已知含有或怀疑含有细胞或细胞群体(任选地在生长培养基中)或者细胞裂解物,但样品也可以是怀疑含有附着的细胞或细胞群体的固体表面(例如拭子、膜、过滤器、颗粒)。设想到,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)接触来制备含水样品。

[0067] 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例子包括来自环境表面(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。

[0068] 收集样品材料(包括表面残余物在内)以供检测生物分析物,这是本领域知道的。各种样品获取装置,包括吸管、刮刀、海绵、拭子等等,已得到描述并且可用于本发明的方法中。

[0069] 细胞浓集剂 :

[0070] 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。使细胞浓集剂与怀疑包含细胞的液体样品接触一段时间。细胞可以以共价方式、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。

[0071] “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。

[0072] 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中。合适细胞浓集剂的非限制性例子包括羟基磷灰石(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,这在 2007 年 4 月 25 日提交并且题为“用于分离生物材料的组合物、方法和装置 (COMPOSITIONS, METHODS, AND DEVICES FOR ISOLATING BIOLOGICAL MATERIALS)”的美国专利申请号 60/913,812 中有描述,该专利申请以引用方式全文并入本

文。

[0073] 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。这种浓集剂的具体例子可见于 2007 年 10 月 3 日提交并且题为“微生物浓集方法和试剂 (MICROORGANISMS CONCENTRATION PROCESS AND AGENT)”的共同转让的美国专利申请号 60/977,200 中,该专利申请的公开内容以引用方式并入本文。当分散于或悬浮于水体系中时,无机材料呈现出材料和水体系 pH 特征性的表面电荷。整个材料-水界面上的电位称为“ ζ 电位”,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稍高正值的 ζ 电位,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)。

[0074] 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。

[0075] 可用的表面改性剂包括微细纳米级金;微细纳米级铂;微细纳米级金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)的组合;二氧化钛;二氧化钛与至少一种其他(即,除二氧化钛之外)金属氧化物的组合;等等;以及它们的组合。在一个实施例中,可使用下述表面改性剂,例如微细纳米级金;微细纳米级铂;微细纳米级金与至少氧化铁或二氧化钛的组合;二氧化钛;二氧化钛与至少氧化铁的组合;或它们的组合。

[0076] 在一个实施例中,可使用诸如下述之类的表面改性剂:微细纳米级金;微细纳米级铂;微细纳米级金与氧化铁或二氧化钛的组合;二氧化钛;二氧化钛与氧化铁的组合;以及它们的组合。在一个实施例中,可使用微细纳米级金;微细纳米级金与氧化铁或二氧化钛的组合;二氧化钛与氧化铁的组合;以及它们的组合。在一个实施例中,也可使用微细纳米级金、微细纳米级金与氧化铁或二氧化钛的组合、以及它们的组合。

[0077] 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 2007 年 10 月 3 日提交并且题为“微生物浓集方法 (MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS)”的共同转让的美国专利申请号 60/977,188 中;该专利申请的公开内容以引用方式并入本文。已经发现这种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,一水软铝石(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。

[0078] 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,该专利的说明内容以引用方式并入本文中)。 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)。

[0079] 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, 其为粒径(最大尺寸)在约 3 微米(在其他实施例中, 约 5 微米; 或约 10 微米)至约 100 微米(在其他实施例中, 约 80 微米; 或约 50 微米; 或约 35 微米; 其中可将该范围内任何下限与任何上限组对)范围内的微粒形式。在一个实施例中, 颗粒为更小的颗粒的附聚物。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。

[0080] 在一个实施例中, 如通过 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); 在一个实施例中大于约 50 m^2/g ; 并且在另一个实施例中大于约 75 m^2/g 。

[0081] 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)。

[0082] 浓集剂的另一个示例性类型包括金属硅酸盐。此类浓集剂的具体例子可见于 2007 年 10 月 3 日提交并且题为“微生物浓集方法”(“MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS”)的共同转让的美国专利申请号 60/977, 180 中; 该专利申请的公开内容以引用方式并入本文。示例性的金属硅酸盐的表面组成中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), 如通过 X 射线光电子谱 (XPS) 所测定。在一个实施例中, 表面组成还包括至少平均约 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), 如通过 X 射线光电子谱 (XPS) 所测定。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。

[0083] 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-水界面上的电位称为“ ζ 电位”, 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的移动的速率)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 电位。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 电位(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 电位; 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 电位; 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 电位)。

[0084] 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。在又一个实施例中, 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。

[0085] 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 Cosmetic MicrospheresCM-111 得自 3M 公司(St. Paul, MN))。

[0086] 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文所述的表面组成。在一个实施例中,浓集剂基本上不含结晶二氧化硅。

[0087] 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。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,浓集剂为微粒形式,其粒径范围为约 1 微米(在一个实施例中,约 2 微米)至约 100 微米(在一个实施例中,约 50 微米;在另一个实施例中,约 25 微米;在另一个实施例中,约 15 微米;其中可将该范围内任何下限与任何上限组对)。

[0088] 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株系。因此,所述浓集剂可用于检测临床样品、食品样品、环境样品或其他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)。

[0089] 在进行本发明的方法时,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、或微流体装置的沟槽等等之类的载体)。优选地,浓集剂以颗粒形式使用。

[0090] 任选地,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。

[0091] 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、本文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。

[0092] 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。例如,对于 1 分钟的捕集时间,则 1000mg 浓集剂/10mL 样品可为合适的;对于 10 分钟的捕集时间,则 100mg 浓集剂/10mL 样品可为合适的;并且对于 60 分钟的捕集时间,则 10mg 浓集剂/10mL 样品可为合适的。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。

[0093] 检测装置:

[0094] 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(包括至少两个在其之间具有通道的容器)、设置在壳体的上容器中的任选的细胞浓集剂、用于隔离

壳体中的至少两个容器的机构、以及用于将细胞浓集剂从壳体的上容器转移至下容器的机构。在一些实施例中，壳体可包括用于隔离两个容器的机构（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上容器转移至下容器的机构（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水凝胶。细胞提取剂可有利于从微生物检测生物分析物。

[0095] 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。上部件 112 和下部件 114 可通过本领域中熟知的方法（例如（如）模铸）由聚合物材料（例如聚乙烯或聚丙烯）分别形成。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耦接，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）耦接在一起。作为另外一种选择，壳体可通过本领域中已知的方法形成为单个单元，例如（如）挤出中空体部、模铸通道、以及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设置到一体化壳体中，以形成上容器和下容器（分别为 120 和 124）。

[0096] 尺寸被设计为可接纳柱塞 150 的开口 113 位于上部件 112 的远离下部件 114 的端部。上部件 112 中的相对端部是通向壳体 110 的下部件 114 的通道 116。在图示实施例中，通道 116 的横截面积小于上容器 120 的横截面积，所述通道 116 示为构成上部件 112 的壁的向内延伸部分。作为另外一种选择，通道 116 可通过贴合邻近壳体 110 的下部件 114 的上部件 112 的壁内部的插件（未示出）形成。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。

[0097] 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。任选地，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文中有描述。任选的检测试剂 165 和任选的水凝胶 162 也示于图 1A 中。

[0098] 本文所用的术语“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例子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、和杂交结合相互作用）和 / 或催化反应（例如酶介导反应，如（例如）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）萤光素酶、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）萤光素、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。

[0099] 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）为本领域中所熟知的，包括（例如）液体试剂（任选地，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。

[0100] 图 1B 示出了包括图 1A 中的壳体 110 与柱塞 150 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。在此位置中,柄部 152 的下边缘阻塞壳体 110 的上部件 112 的开口 113,从而防止材料进入或离开壳体 110。任选的上密封件 154 也可起到防止材料进入或离开壳体 110 的作用。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。

[0101] 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 的上容器 120 与下容器 124 隔离。当柱塞 150 位于图 1B 所示的位置时,柱塞 150 中包括第二下密封件 157 的部分延伸到下容器 124 内并且未接触壳体 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,以在上容器 120 和下容器 124 之间的通道 116 中形成屏障,优选耐液体屏障。任选的浓集剂 130 也示于图 1B 中,其位于上容器 120 内。

[0102] 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)将样品装载到壳体 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。可在柱塞轴 151 上使用任选的指示标记 153(如,当其于开口 113 对齐时),以指示柱塞 150 达到该定位的适当位置。图 1C 还包括正接触上容器 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 可沉淀至上容器 120 的底部,如图 1C 所示。在一些实施例中,任选的锥形区域 118 位于通道 116 附近。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 可将正沉淀至壳体 110 内的通道 116 中的液体悬浮颗粒(如,细胞浓集剂 130)引导至通道 116。

[0103] 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 的下边缘邻近开口 113,液体样品中包含浓集剂 130 的部分 142 被转移至下容器 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例子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 还示出了液体样品的部分 142 接触着下容器 124 中的水凝胶 162,这可导致从水凝胶 162 中释放细胞提取剂。

[0104] 在图 1 所示的实施例中,用于将上容器 120 和下容器 124 隔离的机构包括与通道 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 从上容器 120 转移至下容器 124 的机构包括通道 116 以及柱塞 150 的第一下密封件 156 和第二下密封件 157。

[0105] 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 包括上部件 212 和与之邻近下部件 214。上部件 212 和下部件 214 可按上文所述方式形成。

[0106] 尺寸被设计为接纳柱塞 250 的开口 213 位于上部件 212 中远离下部件 214 的端部。上部件 212 中的相对端部为通道 216,如上文所述。任选的锥形区域 218 邻近通道 216,如本文所述。易破密封件 260a 和 260b 将壳体分成上容器 220、下容器 224 和第三容器 226。

易破密封件 260a 和 260b 优选由耐水性材料（如，薄聚合物膜、聚合物涂布的纸张、薄箔）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。

[0107] 包含细胞提取剂的水凝胶 262 位于第三容器 226 中。包含细胞提取剂的合适水凝胶描述于 2008 年 9 月 30 日提交且题为“生物检测制品 (BIODETECTION ARTICLES)”的美国专利申请号 61/101,546 中，该专利申请以引用方式全文并入本文。

[0108] 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 中还示出了任选的浓集剂 230、如本文所述的任选的检测试剂 265 和任选的可移除顶盖 278。顶盖 278 可利用本领域中已知的方法（如，模铸）由（例如）聚合物材料（如，聚乙烯、聚丙烯）制成，并且尺寸可设计为形成壳体 210 的耐液体盖。

[0109] 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。优选地是，下密封件 256 的尺寸被设计为接触通道 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。任选地，柱塞 250 可包括一个或多个如上文所述的上密封件 254。柄部 252、下密封件 256 和刺穿端 259 之间的相对距离在下文中有描述。

[0110] 图 2B 示出了图 2A 中的装置 200 的剖视图。在这个视图中，壳体 210 还包括位于上容器 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（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。在混合之后，可让细胞浓集剂 230 沉淀至通道 216 中的易破密封件 260a 上。

[0111] 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。在此位置中，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。

[0112] 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 和水凝胶 262 转移到下容器 224 中，在此处部分 242 可与任选的检测试剂 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例子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。

[0113] 在图 2 的图示实施例中，用于将上容器 220 和下容器 224 隔离的机构包括易破密封件 260a 和 260b。用于将上容器 220 和下容器 224 隔离的机构还可包括与通道 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 从上容器 220 转移至下容器 224 的机构包括柱塞 250 的刺穿端 259 和下密封件 256 以及通道 216。

[0114] 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 和任选的顶盖 378。壳体 310 可按上文所述构造为具有上部 312、通道 316 和下部 314。任选的顶盖 378 可按上文所述进行构造。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。

[0115] 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 378 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时, 所述阀门腔体与上容器 320 流体连通。阀门腔体 374 包括与上容器 320 中的液体样品 340 接触的任选的细胞浓集剂 330。下容器 324 包括任选的水凝胶 362 和 / 或任选的检测试剂 365, 后两者均如本文所述。图 3C 中还示出了任选的锥形区域 318, 如本文所述。

[0116] 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 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 分离并转移至下容器 324, 在此处部分 342 可接触水凝胶 362 (如果存在), 并且可与检测试剂 365 (如果存在) 相互作用, 如本文所述。

[0117] 认识到, 阀门腔体 374 的尺寸可构成已知的预定体积, 由此可使用阀门 370 一次或多次以将预定量的液体样品 340 从上容器 320 转移至下容器 324。此外认识到, 在液体样品的部分 342 已从上容器 320 转移至下容器 324 后, 可弃去上容器 320 中的液体样品 340 的其余部分, 并且可将别的材料 (如, 稀释剂、缓冲剂、液体和 / 或粉末试剂) 放到上容器 320 中且随后可利用阀门 370 (未示出) 将预定量转移至下容器 324。

[0118] 在图 3 的图示实施例中, 用于将壳体的上容器 320 与下容器 324 隔离的机构包括阀门 370。在图 3 的图示实施例中, 用于将细胞浓集剂 330 从上容器 320 转移至下容器 324 的机构包括通道 316 和阀门 370。

[0119] 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、任选的 O 形环 455 和刺穿端 459。O 形环可由适形材料 (如, 丁基橡胶) 制成, 以给壳体 410 提供不透液体的密封件。壳体 410 可按上文所述构造为具有上部件 412 和下部件 414。任选的顶盖 478 可按上文所述进行构造。易破密封件 460 将壳体 410 分成三个容器: 上容器 420、下容器 424 和第三容器 426。在此示意图中, 易破密封件 460 位于上容器 420 中邻近下容器 424 的端部处。易破密封件 460 之间的空间限定第三容器 426。包含细胞提取剂的水凝胶 462 位于第三容器 426 中。替代构造 (未示出) 可仅具有一个邻近下容器 424 的易破密封件 460, 其中水凝胶 462 位于下容器 424 中, 如图 3C 所示。

[0120] 具有阀门闸 482 (显示处于关闭位置) 的排液阀门 480 位于上容器 420 中靠近易破密封件 460 处。液体样品 440 和任选的细胞浓集剂 430 也位于上容器 420 中。任选的检测试剂 465 被示出处于下容器 424 中。

[0121] 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 沉淀至上容器 420 的底部。排液阀门 480 的阀门闸 482 处于开放位置, 并且随着在箭头所示的方向上施加力 (如, 通过来自手指或手的压力), 净化的液体样品 445 从排液阀门 480 排出。图 4B 中还示出了涂布在下容器 424 的壁上的检测试剂 465。

[0122] 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 和刺穿端 459 在壳体 410 中插入在排液阀门 480 邻近最近的易破密封件 460 的一侧。在此位置中, 柱塞 450 将液体样品中包含细胞浓集剂 430 的部分 442 挡在柱塞 450 与最近的易破密封件 460 之间。

[0123] 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 的刺穿端

459 已刺穿两个易破密封件 460, 并且液体样品的部分 442 已转移至下容器 424, 其中下容器 424 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水凝胶 462 接触。

[0124] 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 包括具有任选的柄部 552 和尖端 590 的轴 551。在任一实施例中, 柄部 552 还可包括任选的 O 形环 555。

[0125] 壳体 510 可按上文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: 上容器 520、下容器 524 和第三容器 526。在此示意图中, 易破密封件 560a 和 560b 位于上容器 520 中邻近下容器 524 的端部处。易破密封件 560a 和 560b 之间的空间限定第三容器 526。包含如本文所述的细胞提取剂的水凝胶 562 位于第三容器 526 中。在图示实施例中, 下容器 524 包括任选的检测试剂 565。替代构造 (未示出) 可仅具有一个邻近下容器的易破密封件, 其中水凝胶位于下容器中, 如图 3C 所示。

[0126] 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。任选的 O 形环 555 设置在柄部 552 中的凹口 554 中。柄部 552 的形状和尺寸可设计为使得当柱塞 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, 以防止柄部 552 完全插入到壳体 510 中。

[0127] 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, 来耦接至柄部 552。轴 551 的另一端 (例如) 通过压力配合、通过超声焊接、或通过使用粘合剂来耦接至尖端 590。

[0128] 柱塞 550 的尖端 590 的细节示于图 6A 和 6B 中。

[0129] 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。

[0130] 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 通向凹陷开口 694。两个排液沟槽 695 从主体 691 的第一端部 691a 穿行至导管 692。因此, 排液沟槽与导管 692 和凹陷开口 694 成流体连通。在一个实施例 (未示出) 中, 尖端 690 可仅包括一个排液沟槽 695。有利地是, 多个排液沟槽 695 可提供较小的背压, 并因而提供流体穿过尖端 690 的较高速率。

[0131] 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)。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 (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) 耦接至导管 692。任选的 O 形环 686 设置在主体 691 的凹口 689 中。

[0132] 尖端 690 还包括过滤器 696。过滤器 696 耦接至主体 691。在图示实施例中, 过滤器 696 由多孔材料形成, 其可压力配合或粘结性地耦接至凹陷开口 694。在一些实施例

中,多孔材料可为半刚性多孔材料(如,以部件号 X6854 得自 Porex 公司(Fairburn,GA)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,以使得端部可便于穿透易破密封件。在另选的实施例(未示出)中,过滤器可包括耦接至主体的膜过滤器。当耦接至主体时,膜过滤器为包括导管和排液沟槽的流体通道的一部分。

[0133] 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)如本文所述的细胞浓集剂。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。

[0134] 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。

[0135] 尖端 690 还包括单向阀门 697,所述单向阀门 697 在凹陷开口 694 中设置在过滤器 696 和导管 692 之间。另外示出了起到将单向阀门 697 保持就位的作用的任选的保持垫圈 698。单向阀门 697 可(例如)由塑料(如,聚丙烯、聚乙烯、聚酯)或橡胶进行构造,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。

[0136] 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、任选的保持垫圈 698 和过滤器 696 设置在凹陷开口中并且与导管 692 和排液沟槽 695 成流体连通。轴 651 耦接至尖端 690 的主体 691。

[0137] 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。

[0138] 在使用中,将液体样品转移至壳体 510 的上容器 520 中,在此处让其接触细胞浓集剂 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 的下容器 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。

[0139] 随着柱塞 550 的尖端 590 穿透易破密封件 560a(未示出),液体样品的包含细胞浓集剂 530 的部分 542 接触水凝胶 562。柱塞 550 的进一步移动(如图 5D 中所示)造成穿透易破密封件 560b,从而使得液体样品的部分 542 和水凝胶 562 转移至下容器 524,它们在此处接触检测试剂 565。

[0140] 图 7A 示出了根据本发明的检测装置 700 的另一个实施例的横截面侧视图。检测装置 700 包括柱塞 750 和壳体 610。

[0141] 壳体 710 可按上文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:上容器 720、下容器 724 和第三容器 726。在此示意图中,易破密封件 760a 和 760b 位于上容器 720 中邻近下容器 724 的端部处。易破密封件 760a 和 760b 之间的空间限定第三容器 726。包含细胞提取剂的水凝胶 762 位于第三容器 726 中。在图示实施例中,下容器 724 包括任选的检测试剂 765。替代构造(未示出)可仅具有一个邻近下容器 724 的易破密封件 760,其中水凝胶 762 位于下容器 724 中,如图 3C 所示。

[0142] 柱塞 750 包括耦接至柄部 752 和尖端 790 的轴 751。在此实施例中,轴 751 为中空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。柱塞还包括任选的排液管 753。排液管 753 接纳来自尖端 790 的液体滤液并且将滤液分配至轴 751 的内部。通过充当溢流阀门,排液管 753 还减少会以相反方向流回通过尖端 790 的滤液的体积。

[0143] 柱塞 750 的尖端 790 的细节示于图 8 中。

[0144] 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、任选的单向阀门 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。

[0145] 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 耦接(如,通过压力配合、和粘合剂,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 通向凹陷开口 894。因此,凹陷开口 894 与导管 892 和排液管 853 成流体连通。

[0146] 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)。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件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)耦接至导管 892。任选的 O 形环 886 设置在主体 891 中的凹口 889 中。

[0147] 尖端 890 还包括过滤器 896。过滤器 896 在凹陷开口 894 处耦接至主体 891。在图示实施例中,过滤器 896 由多孔材料形成,其可压力配合和/或粘结性地耦接至凹陷开口 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 得自 Porex 公司(Fairburn,GA)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,以使得端部可便于穿透易破密封件。在另选的实施例(未示出)中,过滤器可包括耦接至主体的膜过滤器。当耦接至主体时,膜过滤器为包括导管和排液沟槽的流体通道的一部分。

[0148] 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)如本文所述的细胞浓集剂。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。

[0149] 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。

[0150] 尖端 890 还可包括任选的单向阀门 897,所述任选的单向阀门 897 在凹陷开口 894 中设置在过滤器 896 和导管 892 之间。另外示出了可起到将单向阀门 897 保持就位的作用的任选的保持垫圈 898。单向阀门 897 可(例如)由塑料(如,聚丙烯、聚乙烯、聚酯)或橡胶进行构造,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。

[0151] 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、任

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 成流体连通。轴 851 耦接至尖端 890 的主体 891。

[0152] 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。

[0153] 在使用中, 将液体样品转移至壳体 710 的上容器 720 中, 在此处让其接触细胞浓集剂 730。在将液体样品 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 的下容器 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邻近第三容器 726 的部分 742 中。

[0154] 随着柱塞 750 的尖端 790 穿透易破密封件 760a (未示出), 液体样品的包含细胞浓集剂 730 的部分 742 接触水凝胶 762。柱塞 750 的进一步移动 (如图 7D 中所示) 造成穿透易破密封件 760b, 从而使得液体样品中的部分 742 和水凝胶 762 转移至下容器 724, 它们在此处接触检测试剂 765。

[0155] 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传送至另一个隔室。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的回收的收集器 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 面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 还包括任选的易破密封件 969。

[0156] 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向下移动。易破密封件 969 按本文所述进行制造, 并且可通过本文所述的方法耦接至收集器 967。

[0157] 图 10A 示出了包括收集器 1067 的检测装置 1000 的一个实施例。装置 1000 包括壳体 1010 和柱塞 1050。壳体 1010 包括上部件 1012 和下部件 1014。收集器 1067 设置在上部件 1012 内并且邻近下部件 1014, 易破密封件 1069 与该收集器耦接。易破密封件 1069 耦接至收集器 1067 的面向下部件 1014 的一侧。因此, 易破密封件 1069 将壳体 1010 分成两个隔离的容器 : 上容器 1020 和下容器 1024。

[0158] 柱塞 1050 包括柄部 1052、轴 1051 和尖端 1090。柄部 1052 可按上文所述进行构造, 并且可包括接合壳体 1010 以阻止柱塞 1050 过深地插入到壳体 1010 内的任选的边缘 1054。柄部 1052 可通过螺纹配合或通过其他耦接方式 (如, 压力配合、粘合剂) 耦接至轴 1051。尖端 1090 可利用本文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件 1083。所述导件的尺寸被设计为使其宽松地贴合在壳体 1010 的内部, 并且随着尖端 1090 纵向移动穿过壳体 1010 时起到降低尖端 1090 的横向运动的作用。

[0159] 尖端 1090 还包括刮器 1086, 所述刮器 1086 在尖端 1090 上保持在固定位置中。在

图示实施例中,刮器 1086 通过保持构件 1087 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,或者其可包括耦接至尖端 1090 的托架或多个托架。作为另外一种选择,刮器 1086 可直接耦接(如,粘结性地耦接)至尖端 1090。

[0160] 刮器 1086 为圆盘形的并且尺寸被设计为在壳体 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。制造刮器 1086 的合适材料包括(例如)聚氨酯橡胶。

[0161] 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 的边缘周围流动。有利地是,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会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。

[0162] 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)。

[0163] 检测来自活细胞的生物分析物的方法:

[0164] 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。

[0165] 本发明的方法包括形成包含怀疑含有活细胞的样品及包含细胞提取剂的水凝胶的液体混合物。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定量样品中的生物分析物的量。

[0166] 在一个方面,本发明提供检测样品中的细胞的方法。所述方法包括提供细胞浓集剂、包含细胞提取剂的水凝胶和怀疑包含细胞的液体样品。合适的细胞浓集剂描述于 2007 年 10 月 3 日提交并且题为“微生物浓集方法”(“MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS”)的美国专利申请号 60/977,180,该专利申请以引用方式全文并入本文。

[0167] 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、或本文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。

[0168] 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。

[0169] 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文所公开的方法提供显著优点。

[0170] 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。随着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。

[0171] 过滤样品可使用已知方法来实现。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。用于过滤样品的具体技术可至少部分地取决于用于执行该方法的装置类型。例如,为了使用负压真空,所述装置可被构造为具有可衔接至或可换向(reversibly)衔接至真空源的端口;而为了施加正压,所述装置可被构造为允许使用者通过用其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,即很容易就能够执行本领域中的方法而无需任何其他设备,例如真空泵。

[0172] 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。

[0173] 任选地,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。

[0174] 所述方法还包括形成包含分离的细胞浓集剂和水凝胶的液体混合物,其中细胞提取剂从水凝胶中释放出来。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。可任选地将额外的液体(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液体悬浮液与水凝胶接触,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,包含细胞浓集剂的液体悬浮液也可具有过滤器。可从水凝胶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)。

[0175] 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的,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。

[0176] 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水凝胶的液体混合物的容器(如,管、多孔板、和本文所述的检测装置)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其中形成所述包含样品和含细胞提取剂的水凝胶的液体混合物的容器以外的容器。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。

[0177] 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,例如包括酶或酶底物的水凝胶,如在 2008 年 9 月 30 日提交且题为“生物检测制品”(“BIODETECTION ARTICLES”)的美国专利申请号 61/101,546 中所述。在一些实施例中,检测系统包括仪器。检测仪器的非限制性例子包括分光光度计、发光计、读板机、热循环仪、培养箱。

[0178] 检测系统可包括检测仪器。检测仪器为本领域中已知的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例子由 F. Gorus 和 E. Schram(Applications of bio-and chemiluminescence in the clinical laboratory, 1979, Clin. Chem. 25:512-519) 进行描述。

[0179] 生物分析物检测系统的例子为 ATP 检测系统。ATP 检测系统可包括酶(例如萤光素酶)和酶底物(例如萤光素)。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(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(如)NG 发光计 UNG2(3M 公司(St. Paul, MN))。

[0180] 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,在两个或更多时间点检测生物分析物。当在两个或更多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水凝胶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水凝胶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是通过处理器来进行。

[0181] 例如,操作者在包含样品和含细胞提取剂的水凝胶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水凝胶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水凝胶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。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。

[0182] 操作者在作了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水凝胶一段时间。样品已接触水凝胶一段时间后,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最多约 0.5 秒、最多约 1 秒、最多约 5 秒、最多约 10 秒、最多约 20 秒、最多约 30 秒、最多约 40 秒、最多约 60 秒、最多约 90 秒、最多约 120 秒、最多约 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。

[0183] 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水凝胶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。

[0184] 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。

[0185] 在某些方法中,可能需要检测活的体细胞(例如非微生物细胞)的存在。在这些实施例中,水凝胶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例子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、Igepal、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。

[0186] 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,水凝胶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例子包括:季铵化合物,其包括苯扎氯铵、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(TeolA);双-双胍,包括氯己定、阿来西定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);烷基葡糖苷或烷硫基葡糖苷,例如辛基-β-D-1-硫吡喃葡糖苷(参见美国专利号 6,174,704,该专利以引用方式全文并入本文);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 TritonX-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) 第 152 卷第 385-394 页和美国专利号 4,303,752,上述

文献和专利以引用方式全文并入本文。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。

[0187] 在某些另选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水凝胶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)。在另选的实施例中,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。

[0188] 检测样品中的微生物的存在的方法可包括使用本文公开的检测装置。在某些实施例中,所述方法包括提供 i) 怀疑包含细胞的样品, ii) 包括具有两个或更多个容器和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上容器分离和转移至下容器的机构,以及 v) 包含细胞提取剂的水凝胶。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。任选地,检测装置可包括细胞浓集剂和 / 或水凝胶。

[0189] 所述方法还包括将样品转移到壳体的上容器中,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上容器中的液体、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)添加到上容器。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。任选地,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。优选地是,在接触期间关闭壳体(如,用任选的顶盖),以避免样品和 / 或细胞浓集剂的损失。

[0190] 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下容器。如本文所述,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例子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)。

[0191] 所述方法还包括形成包含分离的细胞浓集剂和水凝胶的液体混合物,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水凝胶接触。水凝胶(如,水凝胶珠子)可在壳体的上容器和 / 或下容器中与液体混合物接触。在一些实施例中,壳体的下容器包括水凝胶(参见图 1 和 3),并且液体混合物在混合物被转移至下容器中时与水凝胶接触。在一些实施例中,水凝胶设置在第三容器中(参见图 2 和 4),随着液体样品从上容器转移至下容器,液体样品从第三容器穿过(从而使液体样品与水凝胶接触)。

[0192] 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下容器,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。

[0193] 所述方法还包括检测生物分析物。如本文所述,可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,在检测装置的下容器中检测生物分析

物。如本文所述,可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后,在检测装置的下容器中检测生物分析物。如本文所述,可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或之后,在检测装置的下容器中检测生物分析物。

[0194] 预期到,本文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)。

[0195] 浓集粒状细胞浓集剂的方法:

[0196] 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。所述装置各自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机构。

[0197] 在图 2A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的机构包括锥形区域 218 和具有下密封件 256 的柱塞。在图 3A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的机构包括盲端阀门 370 和阀门致动器 372。在图 4A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的机构包括排液阀门 480 和阀门闸 482。在图 5A 和 7A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的机构包括具有流体通道的柱塞,其中过滤器 596 设置在流体通道中。在图 10A 中,用于分离粒状细胞浓集剂的机构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。

[0198] 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其可在壳体外形成。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,如上文针对图 2A、3A、4A、5A、7A、和 10A 的装置所述。

[0199] 样品制备和检测套件:

[0200] 可将本发明的组件和/或装置与使用说明包装在一起,并任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,本发明提供下述套件,其包括 i) 具有至少两个在其之间具有通道的容器的壳体、ii) 用于将壳体中的上容器和下容器隔离的机构、iii) 细胞浓集剂、和 iv) 用于将细胞浓集剂从上容器转移至下容器的机构。上容器包括被构造用于接纳样品的开口。下容器包括设置于其中的检测试剂。在一些实施例中,壳体还可包括用于将上容器与下容器隔离的机构,如本文所述。在一些实施例中,壳体还可包括用于将细胞浓集剂从上容器转移至下容器的机构。在一些实施例中,细胞浓集剂设置在壳体的上容器中。

[0201] 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例子包括样品获取装置、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例子包括水、缓冲剂、指示剂（如，pH 指示剂）、染料、体细胞提取剂、包含细胞提取剂的水凝胶、如本文所述的结合伴侣、酶、酶底物、寡核苷酸、对照样品或者上述试剂中的两者或更多者的任何组合。

[0202] 实例

[0203] 现已结合发明人所预见的、有操作性描述 (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文所述的细节和结构的局限，而是仅受以下权利要求书及其等同物的限定。

[0204] 材料：

[0205] 除非另外指明，否则所有的细菌培养物均得自美国模式培养物保藏所 (ATCC, Manassas, VA)。

[0206] 除非另外指明，所有水均为使用得自 Millipore 公司 (Bedford, MA) 的 Milli-Q™ Gradient 去离子系统获得的 18 兆欧姆的无菌去离子水。

[0207] 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 of 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 日提交并且题为“微生物浓集方法和其中使用的浓集剂 (MICROORGANISM CONCENTRATION PROCESS AND CONCENTRATION AGENT FOR USE THEREIN)”的美国专利申请号 61/289, 213 的实例 1 中所述进行制备，该专利申请以引用方式全文并入本文。

[0208] 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。

[0209] 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。

[0210] 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)。

[0211] 实例 1

[0212] 在水凝胶聚合后将细胞提取剂掺入到水凝胶珠子中。

[0213] 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子。活性珠子的制备方式为按照国际专利公开号 WO 2007/146722 的实例 19 中所述进行干燥并且随后按照实例 23 中所述在活性溶液中浸渍。将一克珠子在 60℃ 下干燥 2 小时以从珠子中除去水分。将干燥珠子在室温下浸渍于 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，将珠子倒入布氏漏斗中以将珠子放干，然后用 10-20ml 的蒸馏水清洗。用纸巾吸干珠子，除去其表面上过量的水。在使用珠子之前，将其在室温下的广口瓶中保存至少两周。

[0214] 实例 2.

[0215] 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

[0216] 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, 并且将 100 微升稀释的悬浮液直接添加到含有十毫升去离子水 (Milli-Q Biocel 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。将十毫克经高压消毒的 CM-111 3M™Cosmetic Microspheres (煅烧的无定形球化硅酸镁粉末; 3M 公司 (St. Paul, MN)) 添加到包含细胞的管中并在室温下混合约 15 分钟。让颗粒沉淀并除去上清液。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。对于对照 (未浓集) 反应, 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子 (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 20/20nSIS 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。

[0217] 数据表明, 使用本文所述的方案, 微粒能够浓集微生物细胞并且从水凝胶珠子释放的细胞提取剂能够从大肠杆菌提取 ATP。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。

[0218] 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)。

[0219]

时间 (秒)	未浓集的		浓集的	
	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

[0220] 实例 3.

[0221] 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

[0222] 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。所述装置在上容器 220 中包括大约 10mg 经高压灭菌的 CM-111 3MCosmetic Microspheres。下容器 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 系统的荧光素酶 / 荧光素液体试剂溶液组成。第三容器 226 包括根据 2008 年 9 月 30 日提交的美国专利申请号 61/101, 546 的制备实例 5 制备的两个 BARDAC 205M 珠子。在使用前即刻将十毫升无菌去离子水添加到一体化装置 200 的上容器 220 中。

[0223] 按照实例 2 中所述来制备大肠杆菌过夜培养物。将细菌培养物在 Butterfield's 缓冲液中稀释至大约 10⁶ 或 10⁵CFU/ml。将一百微升的稀释的悬浮液直接移取到一体化装置 200 的上容器 220 中, 以分别获得在十毫升中具有大约 10⁵CFU 或 10⁴CFU 的悬浮液。使用顶盖 278 封闭壳体 210, 将细菌悬浮液在室温下与微球 (细胞浓集剂 230) 混合且允许沉淀到通道 216 中。移除顶盖 278 并插入柱塞 250, 以将包含沉淀的微球和水凝胶珠子的液体

样品的一部分转移到包括 ATP 检测试剂的下容器 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 的数值达到稳定。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。

[0224] 实例 4.

[0225] 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

[0226] 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。阀门致动器 372 设置为使得阀门腔体 374 在使用之前与上容器 320 流体连通。所述装置在上容器 320 中包括大约 10mg 高压灭菌的 CM-1113M Cosmetic Microspheres。下容器 324 中包括液体检测试剂 365，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组成。根据 2008 年 9 月 30 日提交的美国专利申请号 61/101,546 的制备实例 5 来制备 BARDAC 205M 珠子。在使用前即刻将十毫升无菌去离子水添加到一体化装置 300 的上容器 320 中。

[0227] 按照实例 2 中所述来制备大肠杆菌过夜培养物。将细菌培养物在 Butterfield's 缓冲液中稀释至大约 10^6 或 10^5 CFU/ml。将一百微升的稀释悬浮液直接吸取到一体化装置 300 的上容器 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 378 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）混合且允许沉淀到阀门腔体 374 内。移除顶盖 378 并且将两个 BARDAC 205M 珠子（水凝胶 362）放入壳体 310 内。在珠子沉淀到阀门腔体 374 内后，立即转动阀门致动器 372 以将阀门腔体中的液体样品（包含细胞浓集剂 330 和水凝胶 362）的一部分转移到包括 ATP 检测试剂的下容器 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。

[0228] 实例 5

[0229] 检测装置的制备：

[0230] I 型装置：对于这些检测装置，按照下文指明的差别来构造出与图 10A 中的壳体相类似的壳体。下文中的参考标号是指图 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。将耦接有易破密封件 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 朝向壳体 1100 的下部件 1014。利用热风枪 (Master Appliances 公司 (Racine, WI))，用 2cm 长的 3 : 1 聚烯烃双壁粘合剂内衬的热缩薄膜（得自 buyheatshrink.com (部件 #_HSC3A-050-cc, 1.5cm 直径) 将上部件 1012 耦接至下部件 1014。

[0231] 对于这些检测装置，构造出与图 2A 中的柱塞相类似的柱塞。下文中的参考标号是指图 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 通过螺纹连接附接至黄铜轴的端部。黄铜金属轴长为 11.5cm 且直径为 3.9mm。利

用车床在轴的每个端部产生 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 (部件号 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 处附接至柱塞 250。柱塞在每次使用之前进行表面除菌。

[0232] 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) 来组装这些检测装置。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的主体的凹陷开口中。过滤器如下制备: 将 POREX 过滤器 (得自 Porex 公司 (Fairburn, GA) 的部件号 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。

[0233] III 型装置: 按照下文指明的差别来构造出与图 10A 中所示的那些检测装置相似的检测装置。下文中的参考标号是指图 10A 中的相应部件。使用得自 3M Clean-Trace™ 表面 ATP 试验 (获自 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。将耦接有易破密封件 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 朝向壳体 1100 的下部件 1014。利用热风枪 (Master Appliances 公司 (Racine, WI)), 用 2cm 长的 3:1 聚烯烃双壁粘合剂内衬的热缩薄膜 (得自 buyheatshrink.com (部件 #_HSC3A-050-cc, 1.5cm 直径) 将上部件 1012 耦接至下部件 1014。

[0234] 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 通过螺纹连接附接至黄铜轴的端部。黄铜金属轴长为 11.5cm 且直径为 3.9mm。利用车床在轴的每个端部产生 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 附接至尖端 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 的外径的尺寸被设计为可提供与壳体 1010 的内部的紧密贴合。柱塞在每次使用之前进行表面除菌。

[0235] 实例 6

[0236] 利用 I 型装置通过粒状浓集剂从掺料水 (spiked water) 中捕集大肠杆菌。

[0237] 将得自胰酶大豆琼脂板 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 的大肠杆菌 (ATCC 51813) 分离菌落用于接种 5ml 的胰酶大豆肉汤 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 并在 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 1:10,000 (变为大约 10^5 CFU/mL, 在下文中称为“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。

[0238] 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 (在下文中称为“掺料水样品”)。通过手动混合将内容物混合约一分钟。

[0239] 称重 10mg 量的经蒸汽除菌的 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用经表面除菌的石蜡膜密封装置。在室温 (25℃) 下通过手动摇动来将内容物混合约 30 秒。

[0240] 混合之后, 将装置在 Thermolyne Vari Mix™ 振动平台 (Barnstead International, Iowa, 14 周 / 分钟) 上温育不同的时间 (分别为 1、5、10、和 20 分钟)。温育之后, 将各管在工作台上放置 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, 并且使用经预除菌的柱塞装置来刺穿箔密封件, 并将沉淀的 CM-111 试剂沉积到装置的下部件中。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) 从装置中移出; 在无菌水中稀释 1 : 100, 并且将稀释的浓集剂的一毫升等分试样按照制造商的说明涂布在 3M™ Petrifilm™ 菌落总数计数板 (Aerobic Count Plate, 3M 公司 (St. Paul, MN)) 上。

[0241] 作为对照, 将初始稀释的悬浮液在无菌水中进一步稀释为 1 : 1000 稀释液, 并且按照制造商的说明涂布在 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℃ 的培养箱 (VWR Orbital Shaker Incubator, VWR, West Chester, PA) 中温育过夜。

[0242] 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 :

[0243] 捕集效率 = (浓集剂上的菌落数 / 掺料对照中的菌落总数) × 100

[0244] 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。

[0245]

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

[0246] 实例 7

[0247] 利用 III 型装置用 CM-111 浓集大肠杆菌

[0248] 将得自划线平板的分离的大肠杆菌 (ATCC 51813) 菌落接种到 5ml 胰酶大豆肉汤 (TSB, Becton Dickinson, Sparks, MD) 中并在 37℃ 下温育 18-20 小时。将 ~ 10⁹ 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 × 10³/ml 和 1 × 10⁴/ml (总计 ~ 1 × 10⁴/ml cfu 和 ~ 1 × 10⁵/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℃) 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 0.1 mL 液体样品中的 CM-111 颗粒转移到壳体的下容器中。将 CM-111 颗粒从下容器中取出并且转移至 1.5 mL 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。通过从大肠杆菌细胞的 1×10^5 /mL 和 1×10^6 /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且列于下述表 2 中:

[0249] ATP 信号捕集效率% = (CM-111 粒料上的 RLU / 得自 100% 信号的 RLU) \times 100

[0250] RLU = 相对萤光素酶单位。

[0251] 表 2.

[0252]

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

[0253] N = 2, 标准偏差 < 10%, 对于大肠杆菌对照, 将数据归一化到单独水 (16, 464RLU) 背景, 而对于接触细菌的 CM-111 粒料, 将数据归一化到未反应的 CM-111 (41, 424RLU) 背景。

[0254] 从上述实例可以看出, 粒状捕集剂可用于从含水样品中浓集细菌。

[0255] 实例 8

[0256] 利用 II 型装置用 CM-111 浓集大肠杆菌。

[0257] 将得自划线平板的分离的大肠杆菌 (ATCC 33090) 菌落接种到 5 mL 胰酶大豆肉汤 (TSB, Becton Dickinson, Sparks, MD) 中, 并在 37°C 下温育 18-20 个小时。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 10 mL 经无菌过滤的去离子水中, 以获得 10^3 /mL (总计 10^4 cfu) 的最终浓度。将掺料水添加到已包含下述的装置中: 10 mg 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°C) 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)。

[0258] 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。通过进一步插入柱塞以刺破易破密封件, 将结合大肠杆菌的 CM-111 连同大约 100 微升的液体样品转移至壳体的下容器。将包含大肠杆菌而无微粒的对照管进行类似地处理。

[0259] 通过切开下容器取出 CM-111 粒料,并将颗粒转移至 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列于下述表 3 中:

[0260] $\text{ATP 信号捕集效率 \%} = (\text{CM-111 粒料上的 RLU} / \text{得自约 } 10^4 \text{ 总大肠杆菌的 RLU}) \times 100\%$

[0261] RLU = 相对萤光素酶单位。

[0262] 表 3

样品	以 RLU 计的 ATP 信号	ATP 信号采集效率(%)
大肠杆菌 (10^4 个细胞) 对照	96,544	不适用
具有大肠杆菌的水样品 (未浓集)	25,583	0
[0263] 2 分钟测试时间下的具有浓集的大肠杆菌的 CM-111 粒料	56,932	59
10 分钟测试时间下的具有浓集的大肠杆菌 的 CM-111 粒料	58,543	61

[0264] $N = 2$, 标准偏差 $< 10\%$, 对于大肠杆菌对照,将数据归一化到单独水 (27,938RLU) 背景,而对于接触细菌的 CM-111 粒料,将数据归一化到未反应的 CM-111 (30,611RLU) 背景。

[0265] 实例 9

[0266] 利用 II 型装置用 AB-CM-111 浓集大肠杆菌

[0267] 还使用实例 8 中所述的程序来测试 AB-CM (经吸附缓冲液处理的 CM-111) 的 10mg 等分试样对来自 10ml 水的大肠杆菌的浓集。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 4 中。

[0268] 表 4

[0269]

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

[0270] $N = 2$, 标准偏差 $< 10\%$, 对于大肠杆菌对照,将数据归一化到单独水 (20,281RLU) 背景,而对于接触细菌的 CM-111 粒料,将数据归一化到未反应的 AB-CM (44,488RLU) 背景。

[0271] 从上述实例可以看出,粒状捕集剂可用于从含水样品中浓集细菌。

[0272] 实例 10

[0273] 比较例 – 未浓集样品中的大肠杆菌的检测。

[0274] 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。

[0275] 将大肠杆菌 (ATCC 33090) 于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。

[0276] 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。结果提供于表 5 中。

[0277] 表 5

	样品	以 RLU 计的 ATP 信号号	归一化到水之后的 ATP 信号捕集效率 (%)
[0278]	大肠杆菌(10^4)对照(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%

[0279] N = 2, 标准偏差 < 10%

[0280] 本文引用的所有专利、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用方式并入本文。在本专利申请和以引用方式并入本文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。这些描述和实例不应被理解为不必要的限制。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。

[0281] 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。

[0282] 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。

[0283] 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，除非是这么规定的。

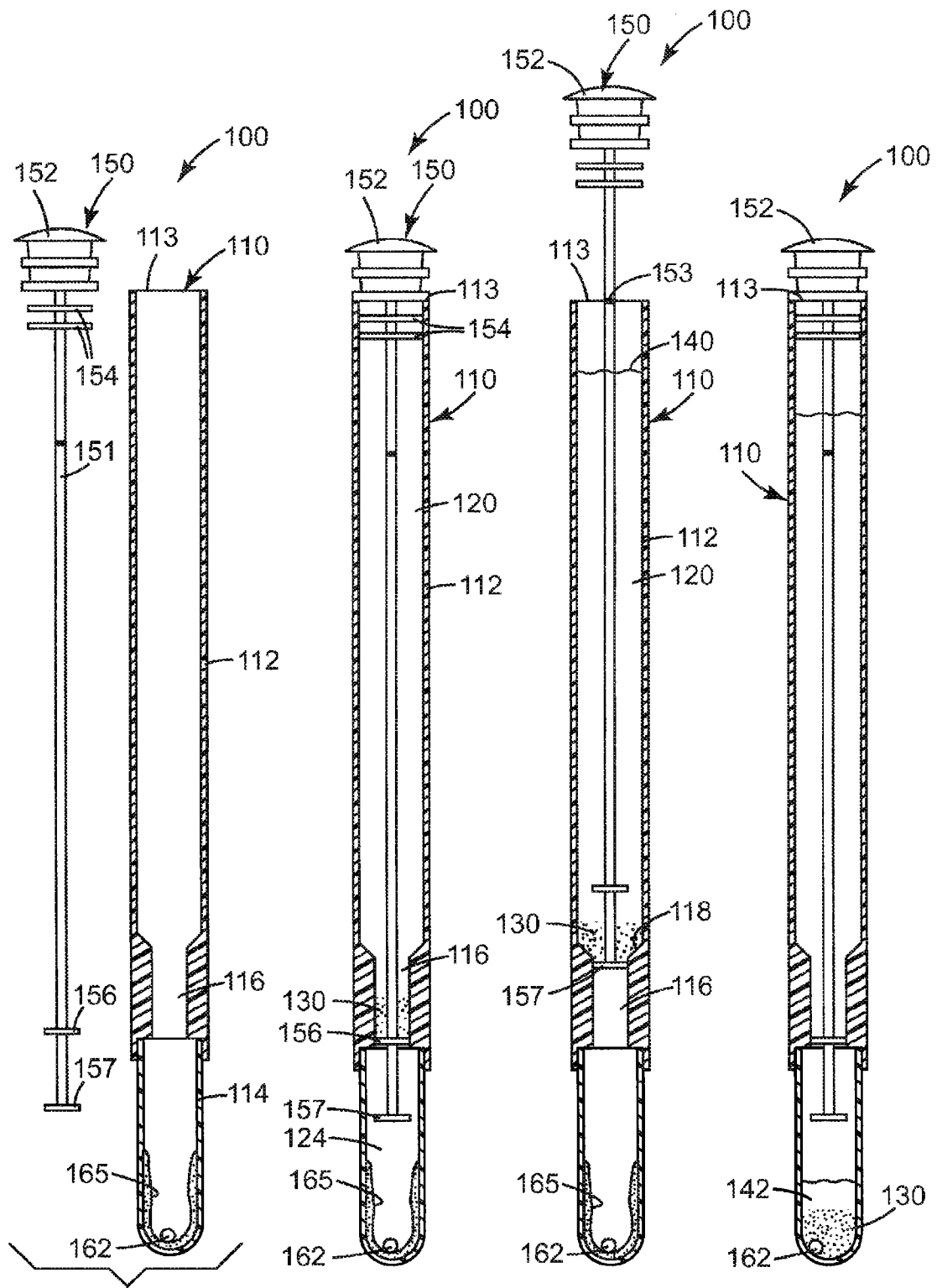


图1A

图1B

图1C

图1D

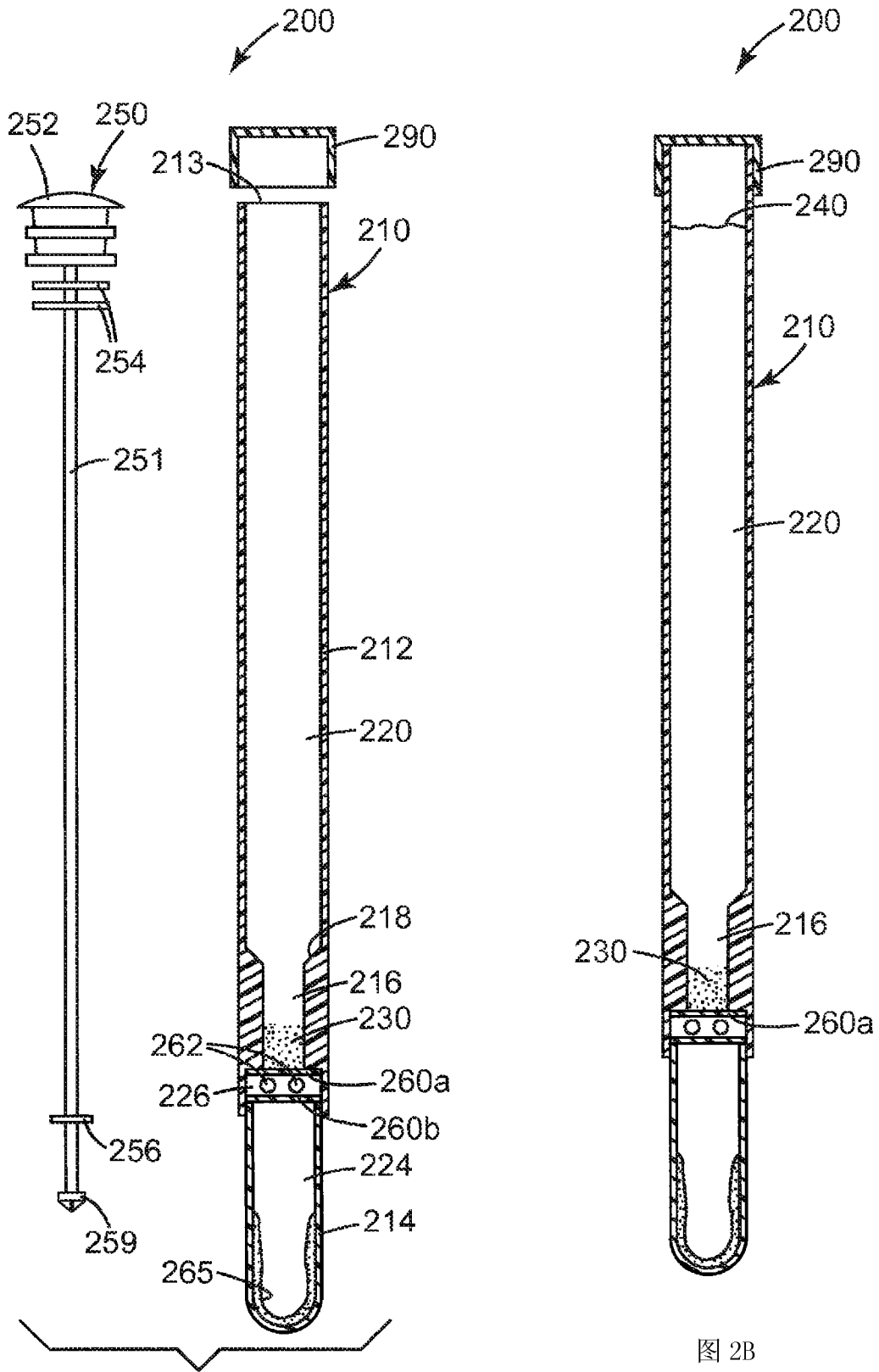


图 2A

图 2B

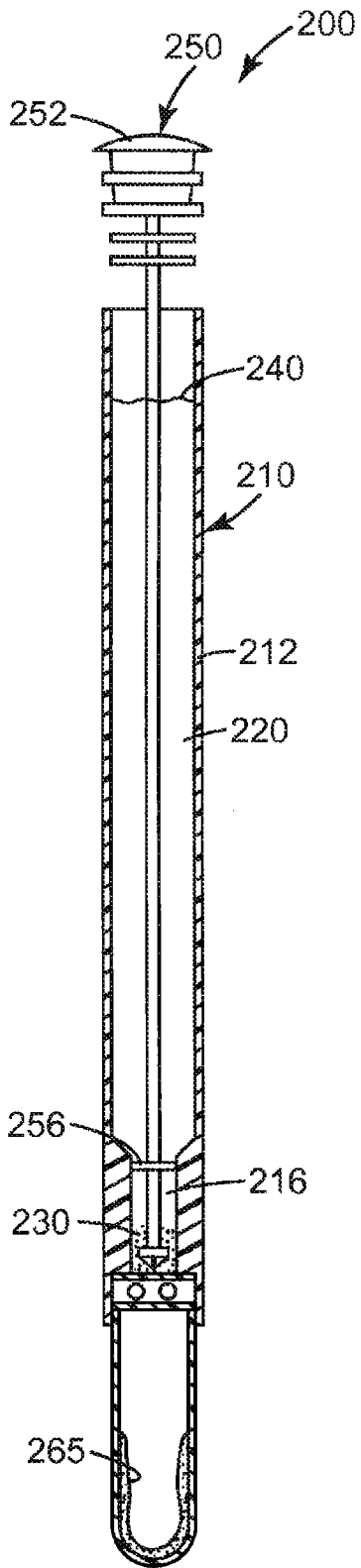


图 2C

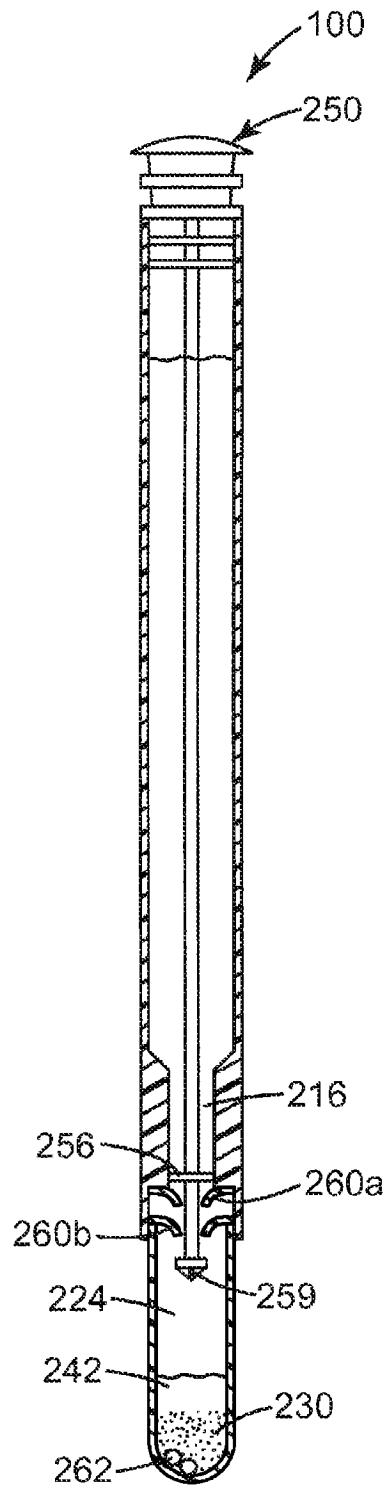


图 2D

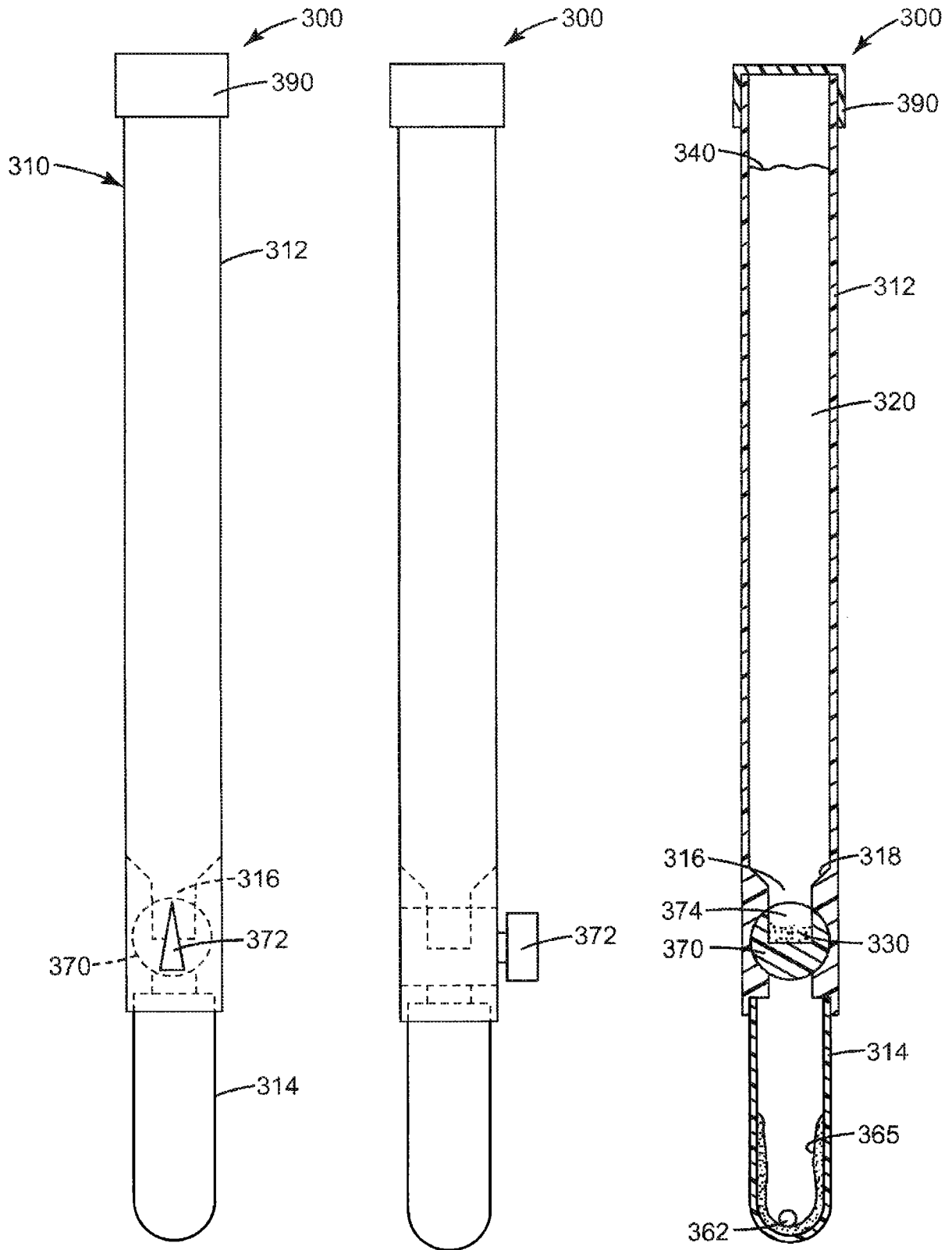


图 3A

图 3B

图 3C

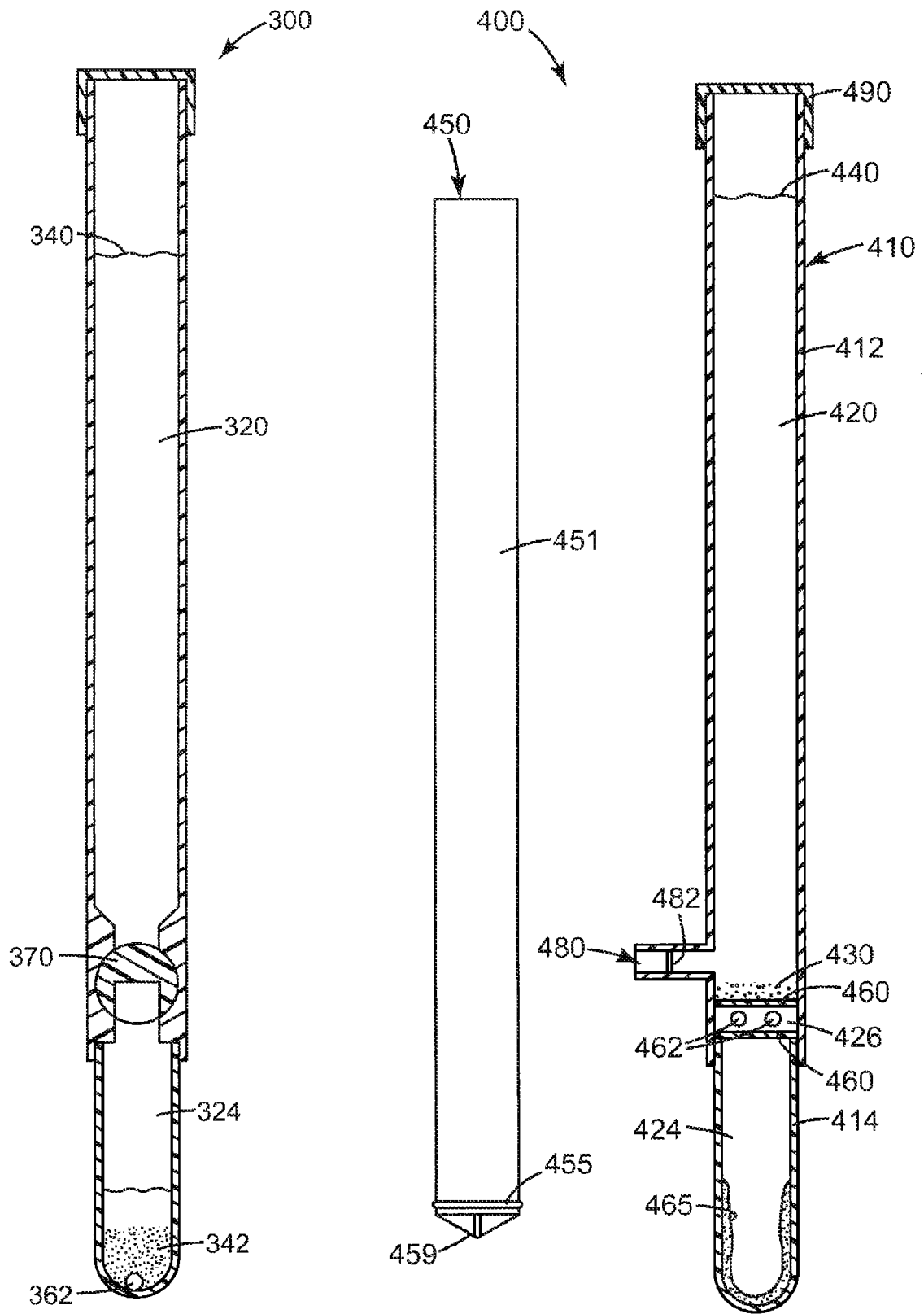


图 3D

图 4A

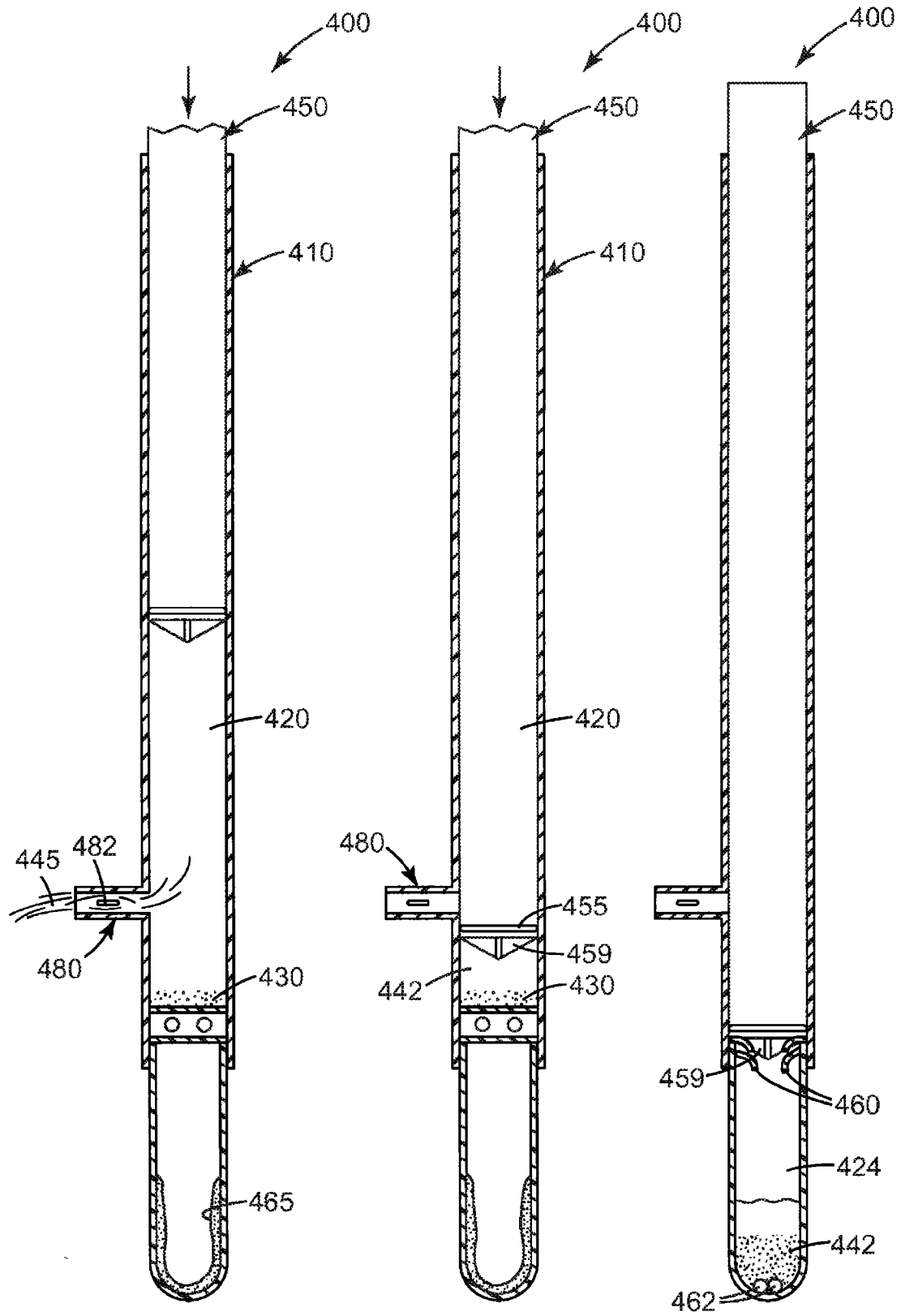


图4B

图4C

图4D

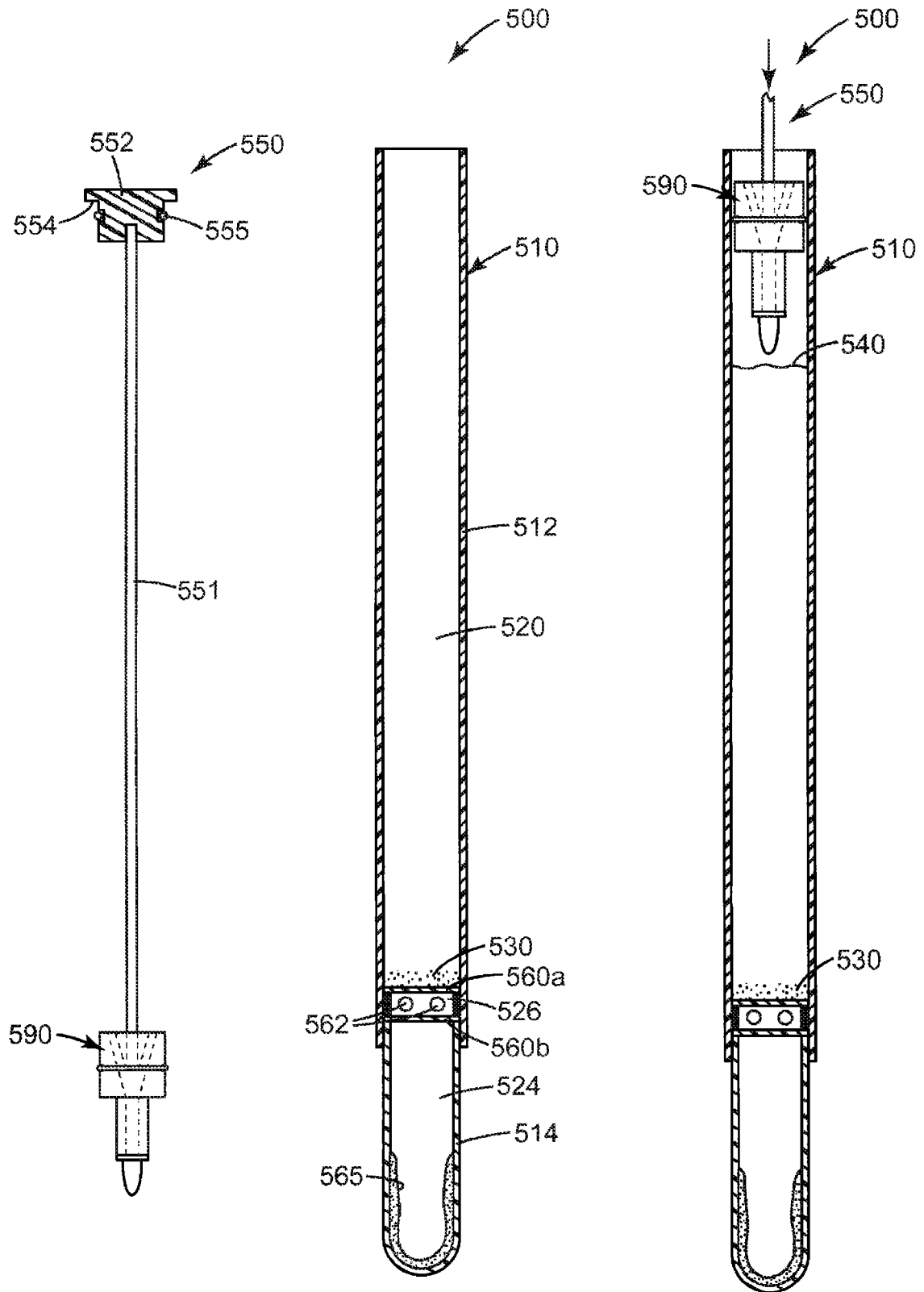


图 5A

图 5B

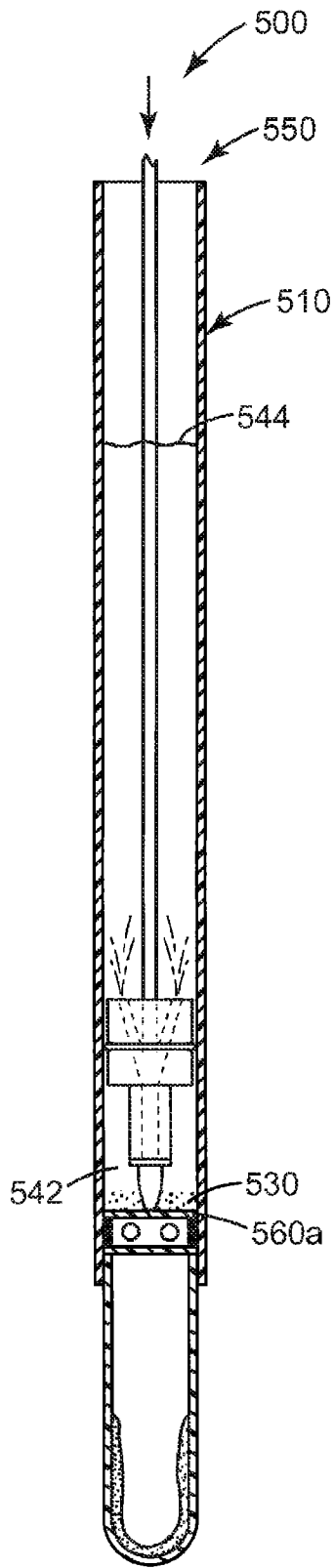


图 5C

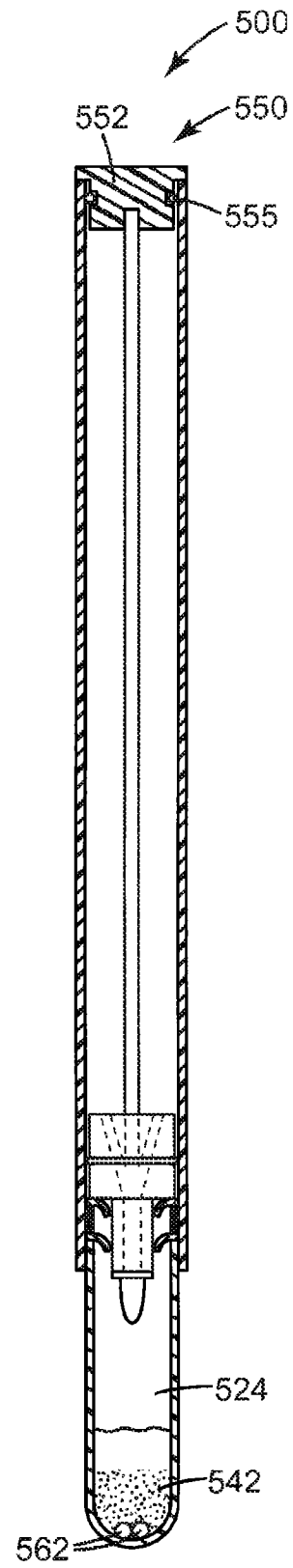


图 5D

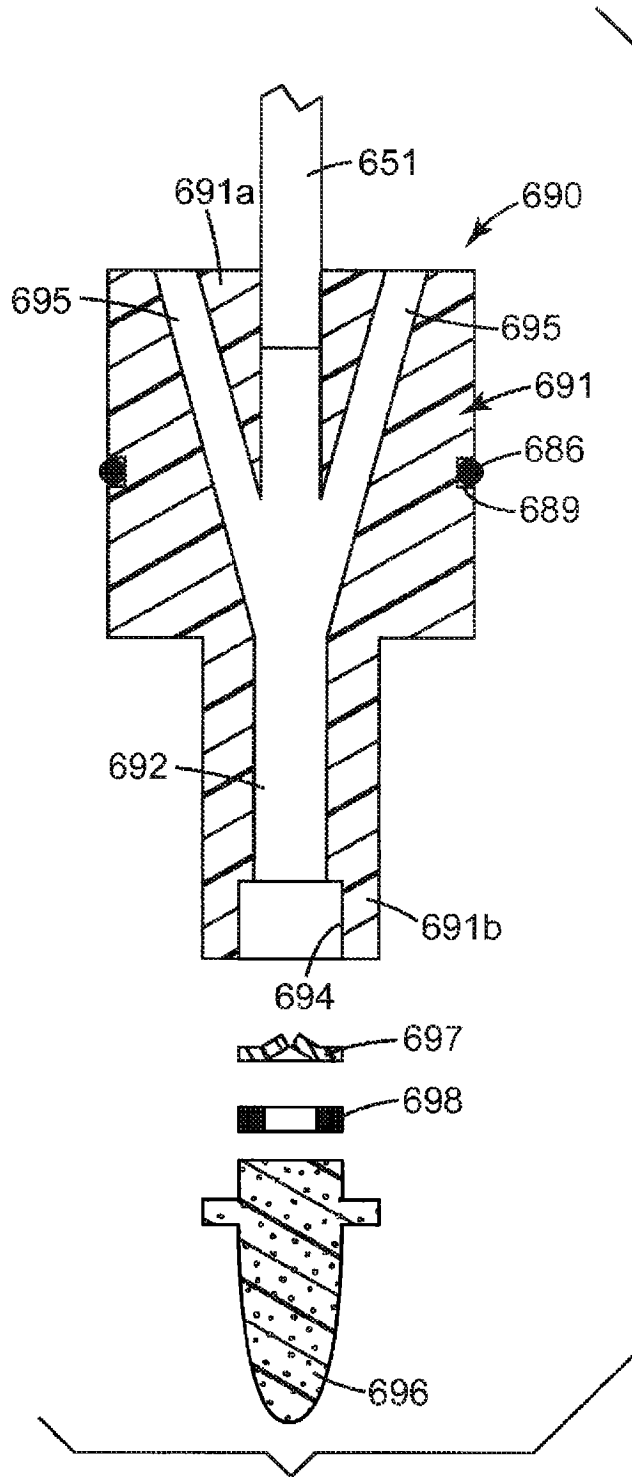


图 6A

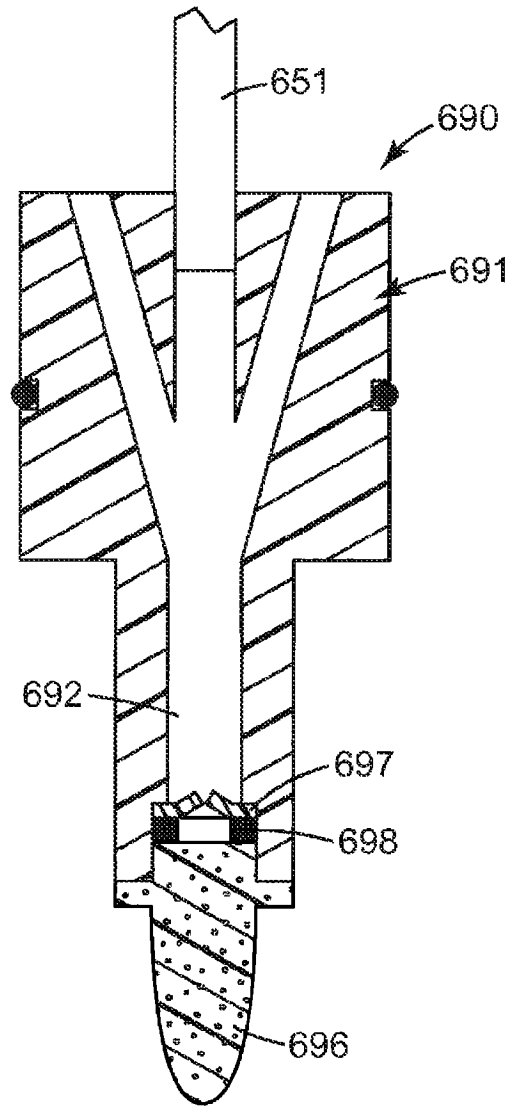


图 6B

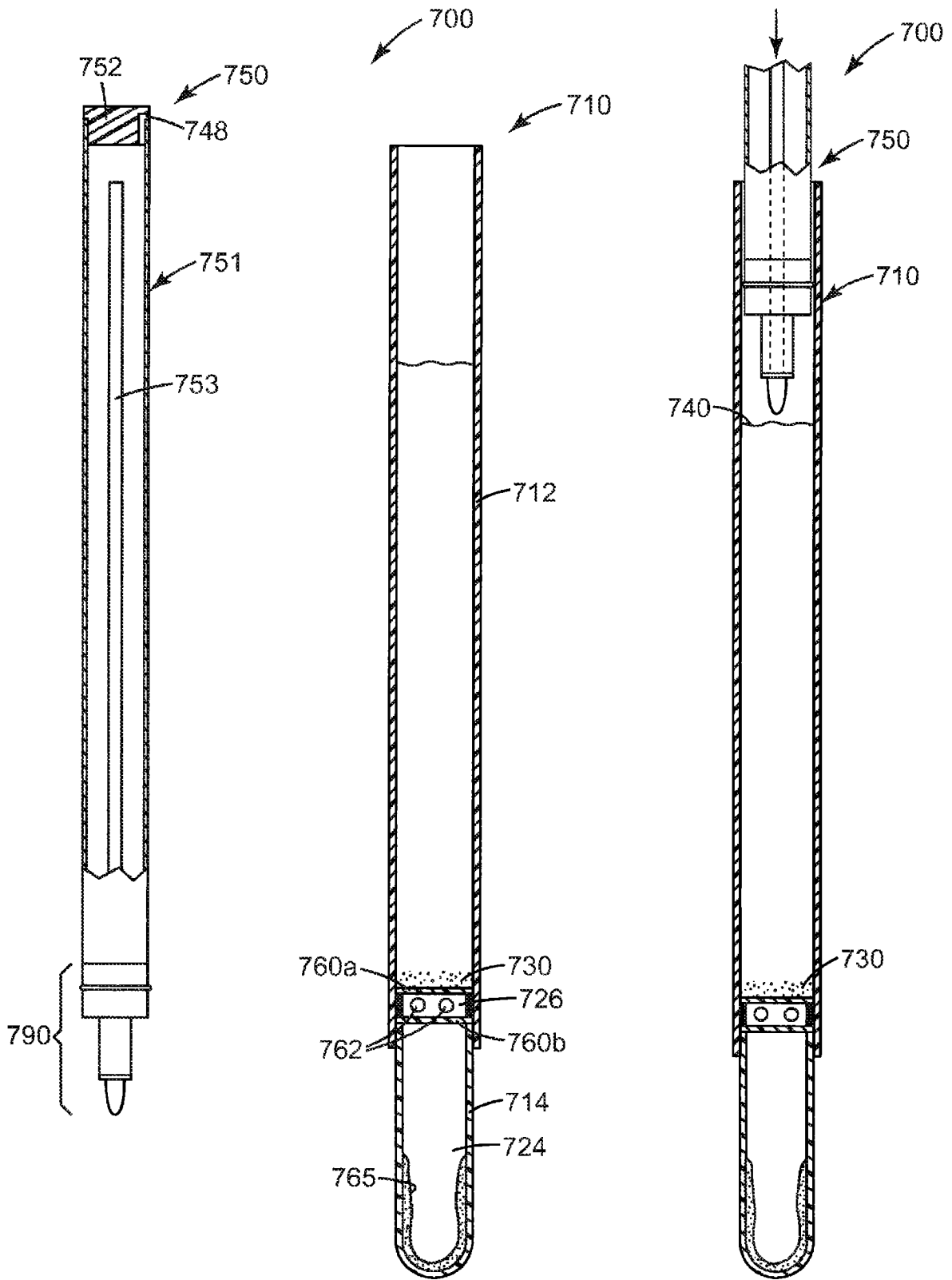


图 7A

图 7B

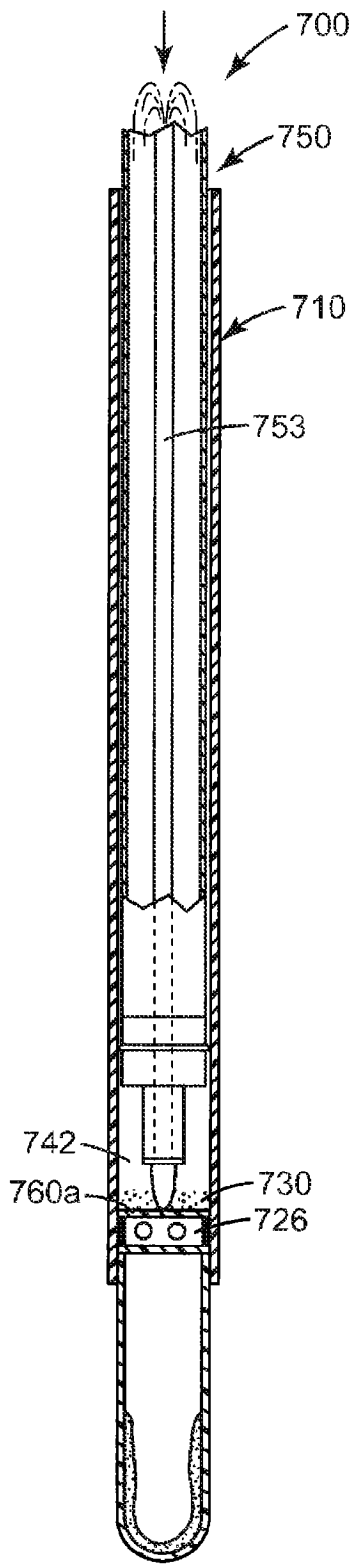


图 7C

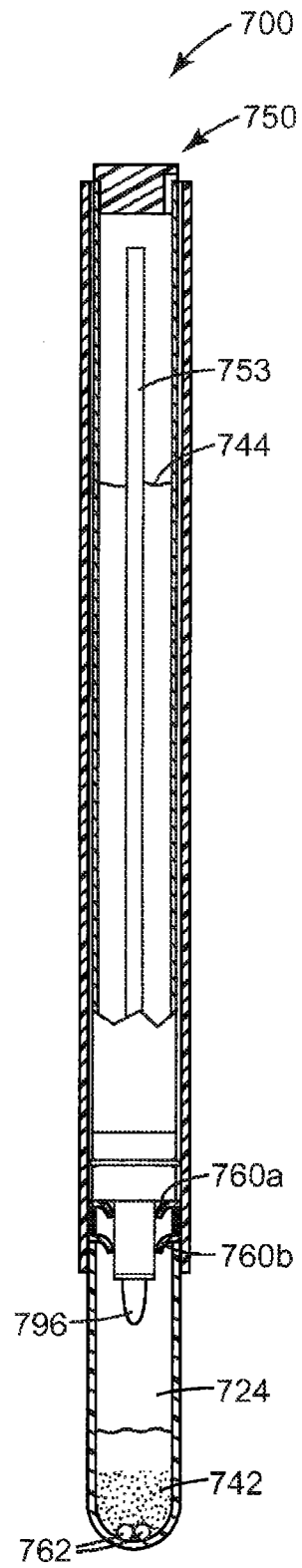


图 7D

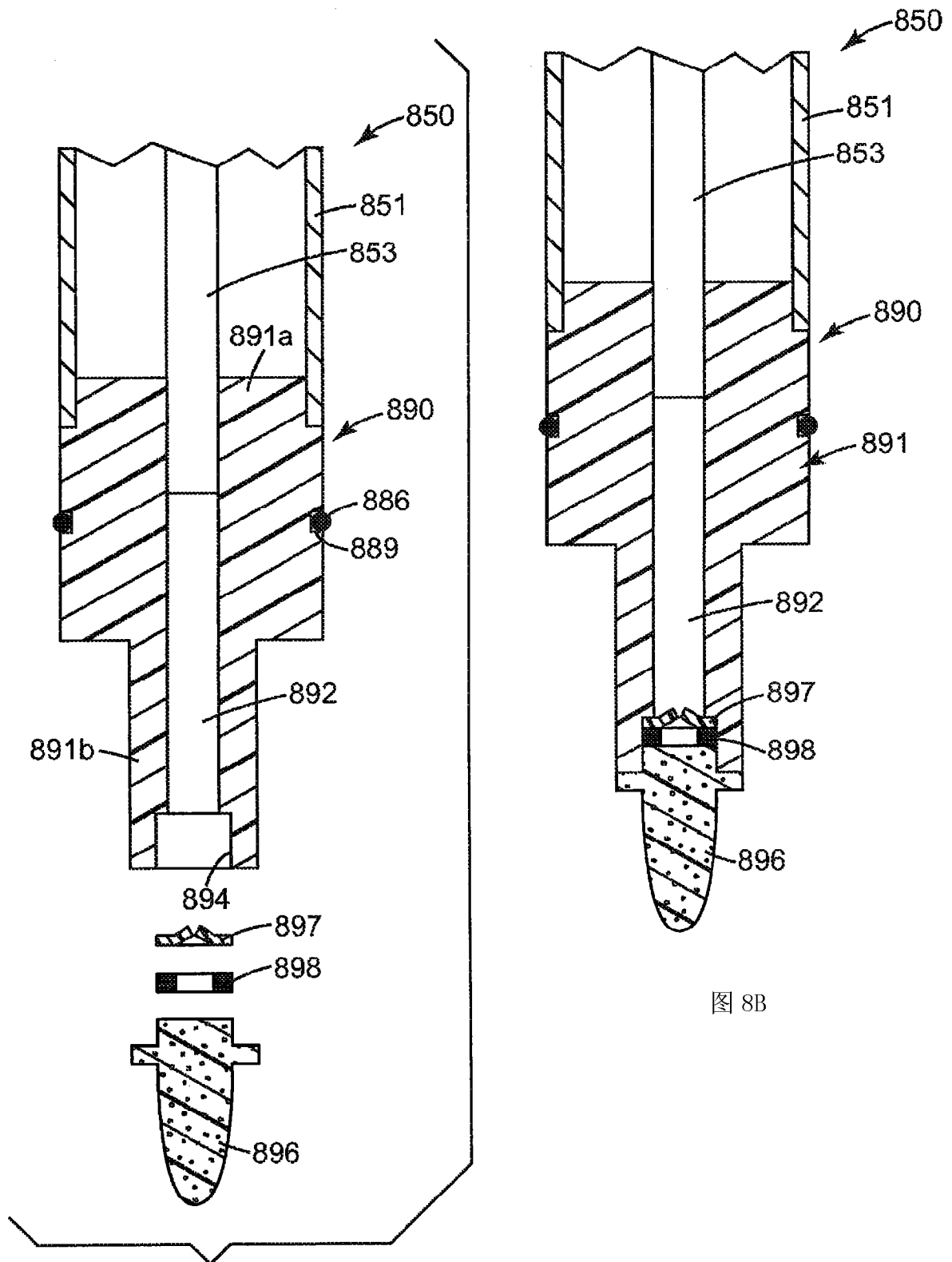


图 8A

图 8B

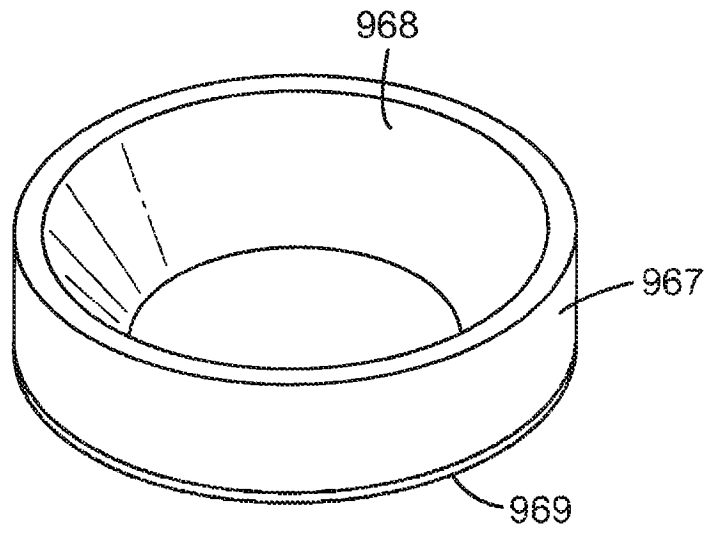


图 9

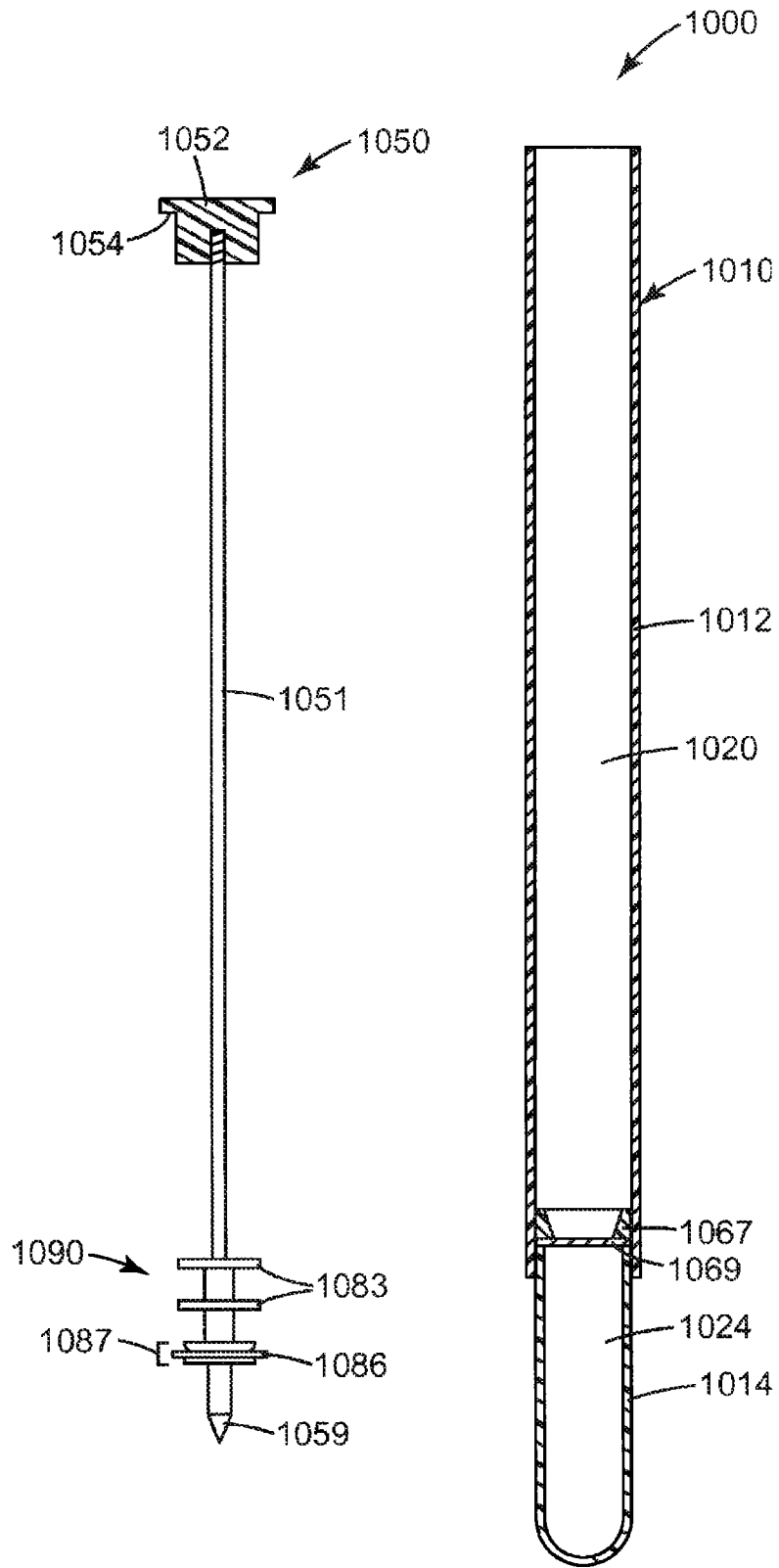


图 10A

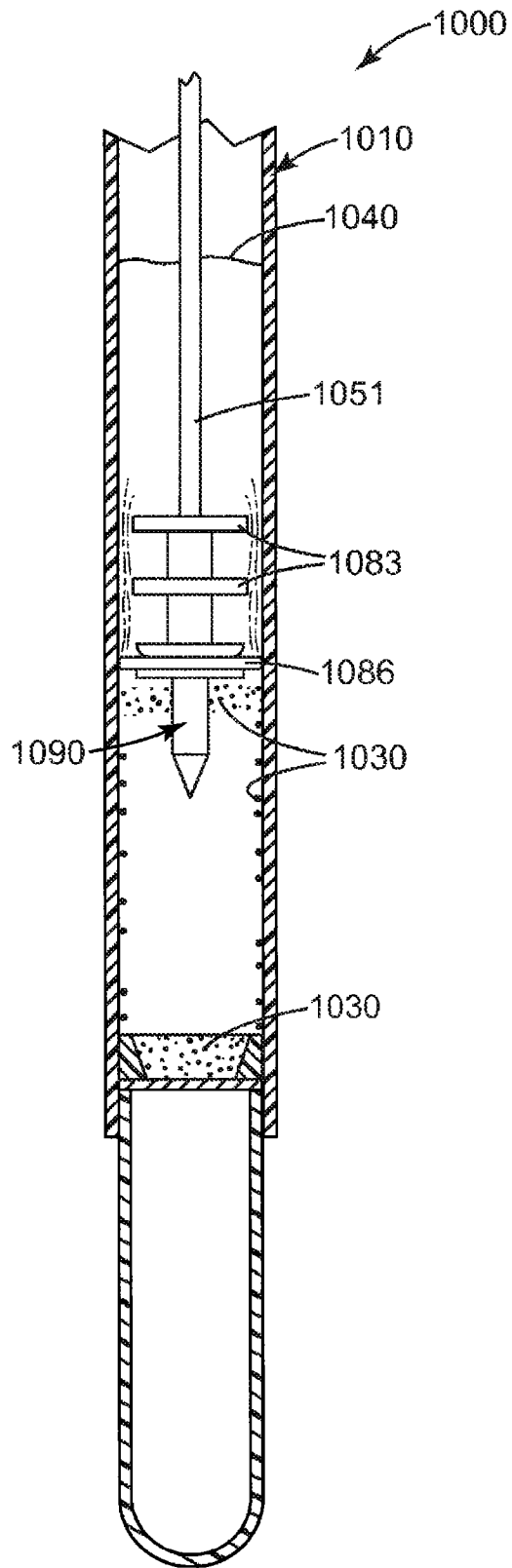


图 10B

专利名称(译)	使用微粒进行的活生物负载检测		
公开(公告)号	CN102325596A	公开(公告)日	2012-01-18
申请号	CN200980157421.2	申请日	2009-12-31
[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		
CPC分类号	C12M23/34 B01L3/5082 A61B10/0045 C12M33/02 B01L2200/026 B01L2200/10 G01N2333/245 G01N33/56916 C12M23/32 C12Q1/04 C12M23/08 A61B10/02		
代理人(译)	张颖		
优先权	61/291301 2009-12-30 US 61/141685 2008-12-31 US		
其他公开文献	CN102325596B		
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来使用的一体化样品制备和检测装置。

