



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102329723 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 14

(21) 申请号 201110155007. 7

US 6875619 B2, 2005. 04. 05,

(22) 申请日 2011. 06. 09

CN 101730847 A, 2010. 06. 09,

(30) 优先权数据

CN 101426931 A, 2009. 05. 06,

12/813, 488 2010. 06. 10 US

CN 101631501 A, 2010. 01. 20,

(73) 专利权人 香港理工大学

王惠民. 核酸杂交 - 酶呈色技术在 PCR 产物检测中的应用. 《临床检验信息》. 2000, 第 7 卷 (第 2 期),

地址 中国香港九龙红磡

(72) 发明人 卢俊立 柯少荣

审查员 陈云华

(74) 专利代理机构 深圳市顺天达专利商标代理有限公司 44217

代理人 郭伟刚 易皎鹤

(51) Int. Cl.

C12M 1/34(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/04(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101400801 A, 2009. 04. 01,

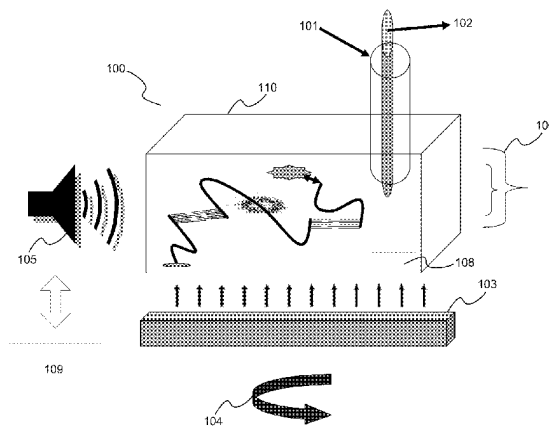
权利要求书2页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

检测特定 DNA 序列的方法和装置

(57) 摘要

检测样品中微生物的存在的装置包括壳体, 所述壳体包括与第一 DNA 引物固定的基底, 所述第一 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的特定 DNA 序列互补的核苷酸序列; 与第二 DNA 引物结合的纤维蛋白原分裂剂, 所述第二 DNA 引物具有同样与目的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列; 用于清洗所述壳体的清洗单元; 用于向所述壳体添加纤维蛋白原的纤维蛋白原添加单元以便纤维蛋白原与纤维蛋白原分裂剂发生化学反应产生粘性物质; 用于向所述壳体发射超声信号的超声发射器; 以及用于接收来自于所述壳体的超声信号并将接收的超声信号传输至超声分析器的超声接收器, 其中所述超声分析器基于接收的超声信号确定是否存在感兴趣的微生物。



1. 一种检测样品中微生物的存在的装置,其特征在于,包括:
 - 壳体,所述壳体包括:
 - 与第一 DNA 引物固定的基底,所述第一 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;
 - 与第二 DNA 引物结合的纤维蛋白原分裂剂,所述第二 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;
 - 用于清洗所述壳体的清洗单元;
 - 用于向所述壳体添加纤维蛋白原的纤维蛋白原添加单元,以便添加的纤维蛋白原与纤维蛋白原分裂剂发生化学反应产生粘性物质;
 - 用于向所述壳体发射超声信号的超声发射器;以及
 - 用于接收来自于所述壳体的超声信号并将接收的超声信号传输至超声分析器的超声接收器,
 - 其中所述超声分析器基于接收的超声信号确定样品中是否存在感兴趣的微生物;
 - 其中,所述基底是由聚苯乙烯或其他聚合物制成的塑料基底;所述装置还包括控制所述壳体的温度的加热/冷却板和一或多个温度传感器。
2. 根据权利要求 1 所述的检测样品中微生物的存在的装置,其特征在于,所述基底是具有一或多个孔的微孔板。
3. 根据权利要求 1 所述的检测样品中微生物的存在的装置,其特征在于,所述超声分析器基于接收的来自于超声接收器的超声信号幅度确定粘度改变是否发生。
4. 根据权利要求 1 所述的检测样品中微生物的存在的装置,其特征在于,所述装置还包括用于混合所述壳体内部的物质的磁力搅拌机构。
5. 根据权利要求 1 所述的检测样品中微生物的存在的装置,其特征在于,所述装置是便携式的且可用于现场操作。
6. 一种以非诊断性目的检测样品中微生物的存在的的方法,其特征在于,包括:
 - 固定第一 DNA 引物与壳体中的基底,所述第一 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;
 - 结合纤维蛋白原分裂剂与第二 DNA 引物,所述第二 DNA 引物具有与目的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;
 - 添加包含感兴趣的微生物的样品以形成混合物;
 - 在预定的持续时间内,培养所述混合物;
 - 通过缓冲液清洗所述壳体;
 - 向所述壳体添加天然的或合成的纤维蛋白原,以便纤维蛋白原与纤维蛋白原分裂剂发生化学反应产生粘性物质;
 - 向所述壳体发射超声信号;
 - 接收来自于所述壳体的超声信号并将接收的超声信号传输至超声分析器,
 - 其中所述超声分析器基于接收的超声信号确定样品中是否存在微生物;
 - 其中,所述基底是由聚苯乙烯或其他聚合物制成的塑料基底。
7. 根据权利要求 6 所述的以非诊断性目的检测样品中微生物的存在的的方法,其特征在于,所述超声分析器基于接收的来自于接收的超声信号的超声信号幅度确定粘度改变是否

已发生。

检测特定 DNA 序列的方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及基于生物-化学-物理转换方法和超声微生物检测装置,通过采用互补 DNA 序列和与纤维蛋白原裂解酶连接的特定 DNA 序列的结合检测微生物的特定 DNA 序列的存在,从而检测样品中微生物的存在。

背景技术

[0002] 生物分析物的存在的检测存在很多方法,例如,酶免疫分析法 (EIA)、放射免疫测定法 (RIA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)、聚合酶链反应 (PCR)、实时 PCR (RT-PCR) 等。这些方法已经用于测量激素水平、抗原、抗体、酶、蛋白质、药物、DNA 的特定片段和污染物等。

[0003] 在这些方法中,最常用的方法是 PCR 和 RT-PCR,在这两种方法中,提取含有感兴趣的微生物的样品的 DNA。然后,将基因组的双链 DNA 加热至 94-96°C 并保持 1-9 分钟,以便 DNA 链的互补碱基对之间的氢键断裂,生成单链 DNA。为了检测样品中感兴趣的微生物的存在,添加互补的 DNA 寡聚核苷酸引物 (例如 F#1 与 R#1 分别代表正向序列与反向序列),与 DNA 序列的相邻片段相结合,该 DNA 序列的相邻片段位于感兴趣的 DNA (单链 DNA) 的这一特定片段 (序列 #1) 的上游或下游。当引物序列与模板序列密切匹配时,稳定的 DNA-DNA 氢键将形成,这一过程被称为退火。然后,在保持 20-40s 前,将反应温度降至 50-65°C。添加脱氧三磷酸核苷,通过 DNA 聚合酶的作用 (例如 Taq 聚合酶),将生成与感兴趣的 DNA 这一特定片段 (序列 #1) 互补的、表明感兴趣的微生物存在的 DNA 片段 (称为序列 #2)。序列 #1 称为被转录,序列 #2 形成。这称为延伸 / 延长步骤。随着升温 (90°C) 与降温 (50-60°C) 的重复循环,在最终的延长步骤 (70-75°C 持续 15 分钟) 前,序列 #1 将多次被转录 (通常 30-35 次)。这确保任一剩余的单链 DNA 充分延伸。采用 PCR 方法,使用 1% 琼脂糖凝胶的琼脂糖凝胶电泳将溶解含有特定 DNA 的转录片段的混合物。这些 DNA 片段和引物将根据他们的分子量溶解 (resolve)。在紫外光 (UV) 下通过添加溴化乙锭实现 DNA 片段的可视化。如果感兴趣的微生物存在于样品中,在 PCR 步骤后,与互补 DNA (序列 #2) 分子大小相同 (right) 的吸收紫外线的 DNA 带将出现。随后,在宿主细菌 (例如大肠杆菌) 中表达前,将这一 PCR 产物 (假设序列 #2) 插入噬菌体载体系统 (例如 Pgem-T) 中。然后可以使用传统的双脱氧法研究这一 DNA 带的 DNA 序列 (例如序列 #2)。如果以及当获得的这一 PCR 产物 (实验性获得的序列 #2) 的测序结果与序列 #1 的测序结果互补时,该试验被认为是肯定的。另一方面,采用 RT-PCR 方法,在起始的加热步骤,将 DNA 结合染料 (比如花青绿色染料) 加入到反应混合物中 (与所有其他试剂)。采用与 PCR 方法类似的实验条件,如果 DNA (序列 #1) 的特定片段存在于样品中,它将被存在的 DNA 聚合酶转录。重复转录将产生多个序列 #2。随着 DNA 序列的增加和 DNA 结合染料的存在,与 DNA 结合的染料的数量将增加。这一染料具有唯一的荧光特性,当其与 DNA 结合时将发荧光。因此,增加的荧光不仅表明这一互补 DNA 序列 (序列 #2) 的存在,而且表明感兴趣的微生物中 DNA 的这一片段的复制数目,所述互补 DNA 序列表明这一感兴趣的微生物的序列 (序列 #1) 的存在因此表明感兴趣的微生物的存在。

[0004] 但是,虽然这些 PCR 与 RT-PCR 方法能够现场用于室外操作,但是由于他们依靠荧光检测和定量存在的分析物的水平,他们需要相对较重的仪器。因此,这些使用相对较重的仪器的方法不适合现场室外操作。

[0005] 本发明不需要荧光源以检测感兴趣的微生物的存在。另外,图 1 中所示的每一部件可以仅仅为几厘米大。就这一点而言,微生物检测装置的体积相对地可以是小的(例如在我们的样机中为 18cm 长、8cm 宽和 5cm 高)。另外,微生物检测装置可以全部是电池驱动。因此,该装置可以在没有常规的电源供给的远端位置操作。由于它的轻重量、可携带性和操作的简单性,该装置适合于手持现场室外操作。通过本发明,克服了现有检测方法和装置的缺点,可认识到其在生物分析物的分析领域中的优点。

发明内容

[0006] 根据本发明的一个方面,本发明提供嵌入装置中检测样品中微生物的存在的方法,所述装置包括壳体,其包括与第一 DNA 引物固定的基底,所述第一 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的特定 DNA 序列互补的核苷酸序列;与第二 DNA 引物结合的纤维蛋白原分裂剂,所述第二 DNA 引物具有同样与感兴趣的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;用于清洗所述壳体的清洗单元;用于向所述壳体添加纤维蛋白原的纤维蛋白原添加单元以便纤维蛋白原与纤维蛋白原分裂剂发生化学反应产生粘性物质;用于向所述壳体发射超声信号的超声发射器;以及用于接收来自于所述壳体的超声信号并将接收的超声信号传送给超声分析器的超声接收器,其中所述超声分析器基于接收的超声信号确定样品中是否存在感兴趣的微生物。

[0007] 根据本发明的另一方面,提供检测样品中微生物的存在的方法,所述方法包括固定第一 DNA 引物与壳体中的基底,所述第一 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;结合纤维蛋白原分裂剂与第二 DNA 引物,所述第二 DNA 引物具有与感兴趣的微生物的 DNA 序列互补的核苷酸序列;通过缓冲液清洗所述壳体;向所述壳体添加纤维蛋白原以便纤维蛋白原与纤维蛋白原分裂剂发生化学反应产生粘性物质;影响从超声发射器向超声分析器的超声信号的传输,其中,所述超声分析器内的算法基于接收的超声信号确定样品中是否存在微生物。

[0008] 从以下将参照附图介绍的示例性实施例,本发明的进一步的特点和方面是显而易见的。

附图说明

[0009] 说明书中包含的且作为说明书一部分的附图示出本发明的实施例,并与具体实施例一起解释本发明的原理。

[0010] 图 1 是依据本发明的实施例的超声微生物检测装置的结构示意图;

[0011] 图 2 是 DNA 引物一端与壳体 206 固定、另一端从 201 至 205 与感兴趣的微生物的互补 DNA 固定的实例的示意图;感兴趣的微生物上互补 DNA 的另一段与第二组 DNA 引物连接,在所述第二套 DNA 引物中,其自身通过双功能的化学键与纤维蛋白原分裂剂连接;

[0012] 图 3A 是具有多个孔的塑料(包括聚苯乙烯)微孔板的实例的示意图,在所述孔中,所述第一组 DNA 引物与所述壳体结合;所述微孔板的孔不限于圆形;

[0013] 图 3B 是微孔板的孔的实例的示意图；所述孔包含 DNA 引物的（第一）链与感兴趣的微生物的互补 DNA 的一段，这一微生物的 DNA 的另一段与互补的 DNA 引物的（第二）链结合，所述 DNA 引物与纤维蛋白原分裂剂连接；

[0014] 图 4 是采用时间对信号绘制的图形的实例的示意图，所述信号是超声接收器中接收的以接收的电压或振幅量化的信号；

[0015] 图 5 是根据本发明的实施例的示例性流程图。

具体实施方式

[0016] 本发明的各个实施例将在以下参照附图描述。

[0017] 图 1 是根据本发明的实施例的超声微生物检测装置 100 的示意图。检测装置包括壳体 110、超声发射器 105、超声接收器 106、加热/冷却板 103、一或多个温度传感器 108、试剂传递管 101 与试剂移除管 102 和磁力搅拌机构 104。

[0018] 壳体 110 用于确定其中的样品中是否存在微生物。壳体 110 包含聚合物基底，比如塑料（包括聚苯乙烯）（例如用于制造酶标板）。所述壳体的形状不限于矩形、圆柱形或圆形。所述壳体可以是任意适合于容纳液体并允许 DNA 引物固定的封闭结构。另外，壳体 110 适合于经过其中的超声传播。

[0019] “样品”指用于测试感兴趣的微生物的存在的物质。例如，样品可以是取自水库、湖泊、河流、水潭、海洋、食物表面、任意容器表面、生物流体、组织匀浆或空气样品的物质（例如，来自感兴趣的病原菌的 DNA）。合适的过滤器将用于容纳（trap）及浓缩样品中的微生物，以通过本发明作进一步分析。可以使用从合适的营养琼脂或细胞生长的细胞培养板直接获得的微生物的菌落并将其直接加入壳体 110 中。通过加热/冷却板 103 加热至大约 95°C，微生物的 DNA 成分将释放。

[0020] 图 2 是 DNA 引物和样品中感兴趣的目标微生物的结合的例子的示意图。在这一例子中，塑料聚合物 207（例如聚苯乙烯）用于构成所述壳体 110 的基底，并且它也与 DNA 引物 201 结合。DNA 引物 201 与基底 207 化学结合（206）。DNA 引物 201 的链可能通过共价结合或非共价结合与塑料基底（比如聚苯乙烯）固定，结合方式取决于塑料（例如聚苯乙烯底部）和 DNA 引物间的反应。DNA 引物 201 可能是具有 6-30 碱基长的核酸链，比如化学合成的寡聚核苷酸。它包含与感兴趣的目标微生物的部分 DNA 序列 205 互补的特定核苷酸序列。虽然仅仅阐述了 DNA 引物的单链，但是 DNA 引物的多个链可能以相似的方式固定在塑料基底上（例如聚苯乙烯）。

[0021] 所述壳体还包括与第二 DNA 引物 202 通过双功能化学键 203 结合的纤维蛋白原分裂剂 204（例如，各种类型的毒液包括拉塞尔蝰蛇的毒液中的凝血酶或活性组分，或其他天然的或合成的纤维蛋白原分裂化学制剂或酶）。DNA 引物 202 也包含与样品中感兴趣的目标微生物的另一部分 DNA 序列（205）互补的特定核苷酸序列。虽然仅仅阐述了 DNA 引物 202 的单链，但是 DNA 引物的多个链可能以相似的方式与纤维蛋白原分裂剂结合。

[0022] 塑料基底 207 可能是例如，图 3A 所示的微孔板孔 300 的形式或矩形或其他形状。微孔板包含唯一的或多个孔 310。微孔板的每一个孔包含至少如图 3B 中所所示的 DNA 引物的单链。以示意性为目的，具有与 DNA 引物互补的 DNA 序列的微生物如图 3B 中所示。因此，样品中感兴趣的微生物的 DNA 的链与两个 DNA 引物结合。

[0023] 本发明还包括搅拌机构 104, 比如通过磁力搅拌器搅拌。所述磁搅拌器能够轻轻地混合壳体 110 中的混合物。就这一点而言, 该移动使得 DNA 样品的链与 DNA 引物的链杂交与退火。

[0024] 加热/冷却板 103 能够加热或冷却壳体以便壳体内部的混合物在期望的适合于化学反应的温度范围内(例如 96°C 至室温)运行。加热/冷却板 103 可进一步包括监控壳体温度的温度传感器 108, 以便壳体在期望的温度运行。

[0025] 如果 DNA 样品 205 与 DNA 引物 201 互补, (样品中) 微生物的 DNA 205 链将如图 2 中所示与 DNA 引物 201 杂交(结合)。同样, DNA 205 链的另一部分将与 DNA 引物 202 杂交(结合)。换言之, 形成了由 DNA 引物 201、加上感兴趣的目标微生物的互补 DNA、加上另一互补的 DNA 引物、加上双功能化学键 203、加上纤维蛋白原分裂剂 204 组成的复合体。整个复合体与塑料基底 207(例如, 聚苯乙烯)共价或非共价连接 206。但是, 如果 DNA 样品的链与 DNA 引物不互补, 杂交将不会发生并且将不会形成复合体。

[0026] 其后, 混合物经历水浴处理, 该水浴处理清洗掉没有与 DNA 引物附着的过多的微生物。水浴可包含通过试剂管开口 101 进入的 pH 常数水溶性缓冲液。如前所述, 与 DNA 引物不互补的 DNA 链将不会与 DNA 引物结合。在这一水浴处理过程中, 没有结合的 DNA 链、纤维蛋白原分裂剂和其他松散物质被清洗掉并通过试剂管开口 102 从壳体离开。就这一点而言, 只有成功杂交的 DNA 链(例如, 以复合体的形式)将保留在壳体中。

[0027] 在水浴处理后, 纯化的纤维蛋白原溶液或包含天然纤维蛋白原或合成的类纤维蛋白原物质的混合物通过试剂管开口 101 添加至壳体 110 中。继水浴处理之后, 如果纤维蛋白原分裂剂仍然保留在壳体 110 中(由于与复合体连接, 目标微生物是所述复合体中的部分), 纤维蛋白原分裂剂将将天然的或合成的纤维蛋白原化学转换为粘性类型的混合物的纤维蛋白凝块(或胶体)。一般而言, 化学反应处理取决于样品量的数量, 需要几分钟来完成。

[0028] 然后, 超声发射器发出超声信号(或波)穿过壳体 110。虽然超声发射器/接收器可能在纤维蛋白原的添加之前或之后的任一时间被激活, 但是超声发射器/接收器必须在壳体的混合物成为粘性的之前被激活。超声发射器包含一或多个产生超声信号的超声换能器。发射的超声信号由如图 1 中所示的在壳体 110 另一端的超声接收器接收。接收的超声信号传输至超声分析器(未示出)用于分析。

[0029] 图 4 是在示波器上显示的典型的接收的超声信号的示意图。如图中所示, 接收的电压形式的超声信号在 10 分钟后显著减少至大约 0.25V。因此, 在短的一段时间内, 可以确定存在复合体的粘度的改变。当超声信号穿过凝块时, 超声信号幅度将显著降低。基于粘度的变化, 可以确定感兴趣的目标微生物是否存在于混合物中。

[0030] 超声中的衰减根据穿过介质的距离测量超声信号的幅度的下降。接收的超声信号的衰减可以通过以下方程计算: $\text{衰减} = 20(\log(V_{\text{接收的}}/V_{\text{传输的}})/d)(\text{dB/cm})$ (1), 其中, $V_{\text{接收的}}$ 是接收的超声电压, $V_{\text{传输的}}$ 是传输的超声电压, 以及 d 是超声发射器和接收器之间的距离。基于衰减值, 可以确定壳体 110 内部的内容物是否具有增强的粘度。当衰减值显著减少时, 例如低于 10dB, 可以确定壳体 110 内部的内容物具有增强的粘度。本发明不限制衰减范围。

[0031] 图 5 中阐述了检测感兴趣的目标微生物的 DNA 序列的示范性处理流程图。在步骤 S501 中, 设置壳体 110 的温度条件。壳体 110 包括与 DNA 引物的链结合的塑料聚合物基底

(包括聚苯乙烯)207,所述 DNA 引物与特定类型的微生物的 DNA 序列互补。通过激活加热/冷却板 103,将壳体 110 调整至合适的温度(例如,在大约 90°C)。其后,在步骤 502 中添加样品至壳体 110。可通过试剂管 101 的开口添加样品。然后,样品在壳体中被混合,例如,通过磁搅拌机构 104 搅拌。一般而言,整个混合物允许混合 10 分钟。随后,在添加 DNA 引物的链至壳体 110 前,将壳体 110 冷却至大约 56°C 或更低,所述 DNA 引物与与纤维蛋白原分裂剂结合的特定类型的微生物的 DNA 序列互补。整个混合物允许再混合 10 分钟。

[0032] 其后,在步骤 503 中,壳体用 pH 常数的水溶性缓冲液清洗以清洗掉未与 DNA 引物杂交的任意材料。在清洗后,再次激活加热/冷却板(培养箱)103 以将壳体 110 带至合适的温度,所述合适的温度用于纤维蛋白原裂解酶运转和阻止纤维蛋白原的快速降解(例如,在大约 37°C)。随后,添加纤维蛋白原溶液至壳体 110(步骤 S505)。另外,激活超声发射器 105 以发射超声信号穿过壳体 110(步骤 S504)。请注意,可能在纤维蛋白原的添加之前或之后激活超声发射器/接收器。

[0033] 所述系统允许混合物与添加的纤维蛋白原(天然的或合成的类纤维蛋白原物质)化学反应一段预定的时间。然后,超声接收器接收传输的超声信号并将接收的超声信号传输至超声分析器 109,用于分析。超声分析器可能安装在超声微生物检测装置中或通过有线或无线连接与超声微生物检测装置外部连接。

[0034] 其后,在步骤 S506 中,超声分析器基于接收的来自于超声接收器的超声信号幅度,确定壳体 110 中是否有粘度变化。如果有粘度变化(步骤 S506 中的 YES),超声分析器确定微生物存在于样品中(S508)。另一方面,在一段预定的时间后,如果复合体的粘度未改变(步骤 S507 中的 NO),超声分析器确定微生物不存在于样品中(S507)。然后,处理结束。

[0035] 本发明可能还包括基于接收的超声信号、表明微生物是否存在于样品中的显示器(例如,LCD 显示器)。例如,如果有粘度变化,超声分析器 109 确定微生物存在并且显示器将表明微生物存在。另一方面,在一段预定的时间后,如果壳体 110 内部的内容物的粘度未改变,超声分析器 109 确定微生物不存在并且显示器将表明微生物不存在。

[0036] 超声分析器 109 的操作可能通过确定是否有粘度变化的计算机可执行程序代码实现。计算机可执行程序代码可能存储在超声分析器 109 的计算机可读存储媒介中。例如,可以以系统、装置、方法、程序、记录媒介等的形式实现体积可以很小的本发明。

[0037] 通过使用本检测方法和装置,通过使用相应组的 DNA 引物可以检测各种微生物,所述 DNA 引物具有与感兴趣的目标微生物的 DNA 序列互补的 DNA 序列。另外,本超声微生物检测装置的用户不需要具有生物化学和分子生物学的广博知识,其对于执行基于荧光的检测方法(例如,PCR 和 RT-PCR)是必须的。

[0038] 虽然本发明参照示范性实施例描述,应该明白的是本发明并不受限于公开的示范性实施例。以下的权利要求的范围被认为是对本发明的最广泛的解释,以包括所有的改变和等同的结合和功能。

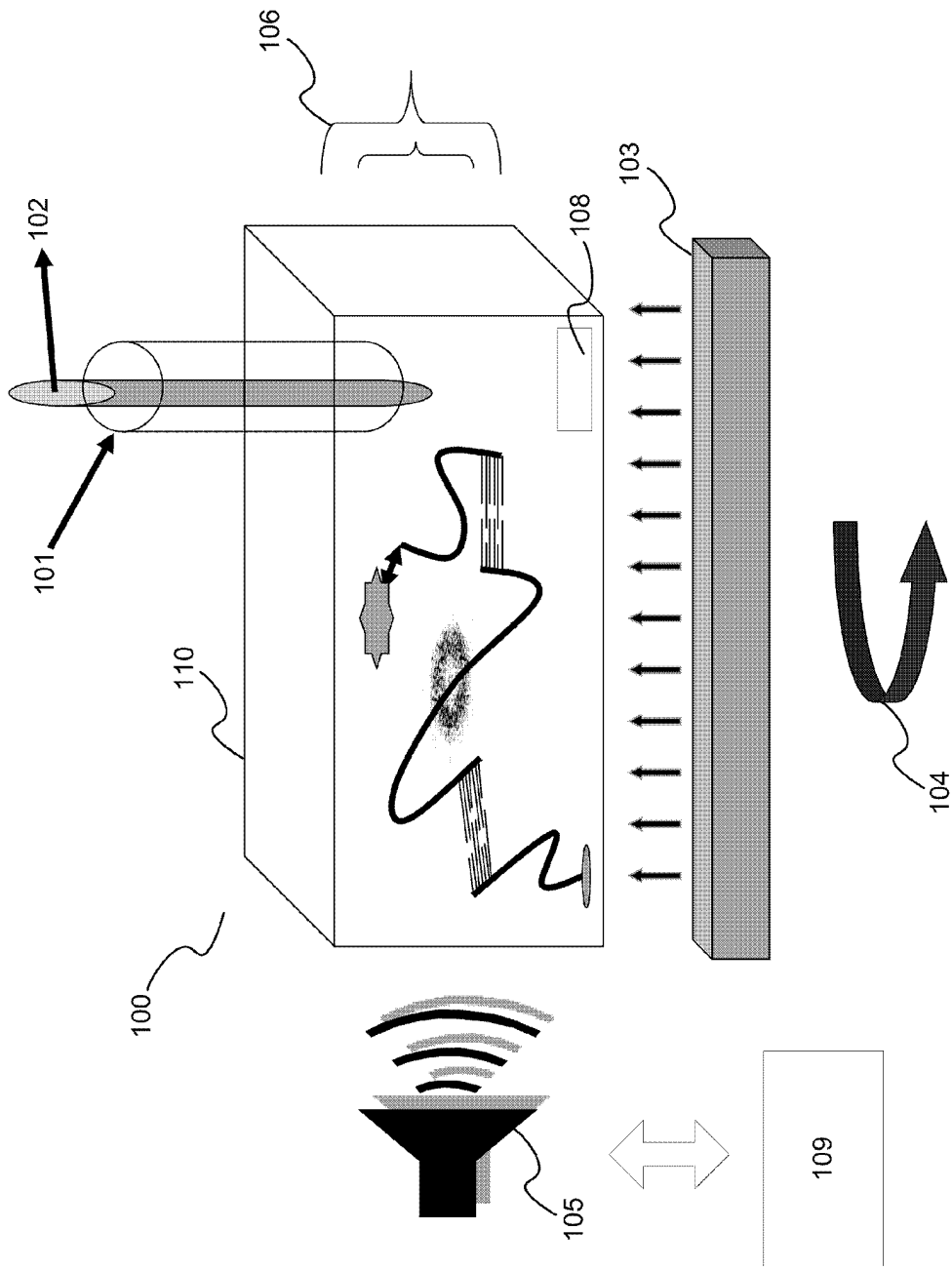


图 1

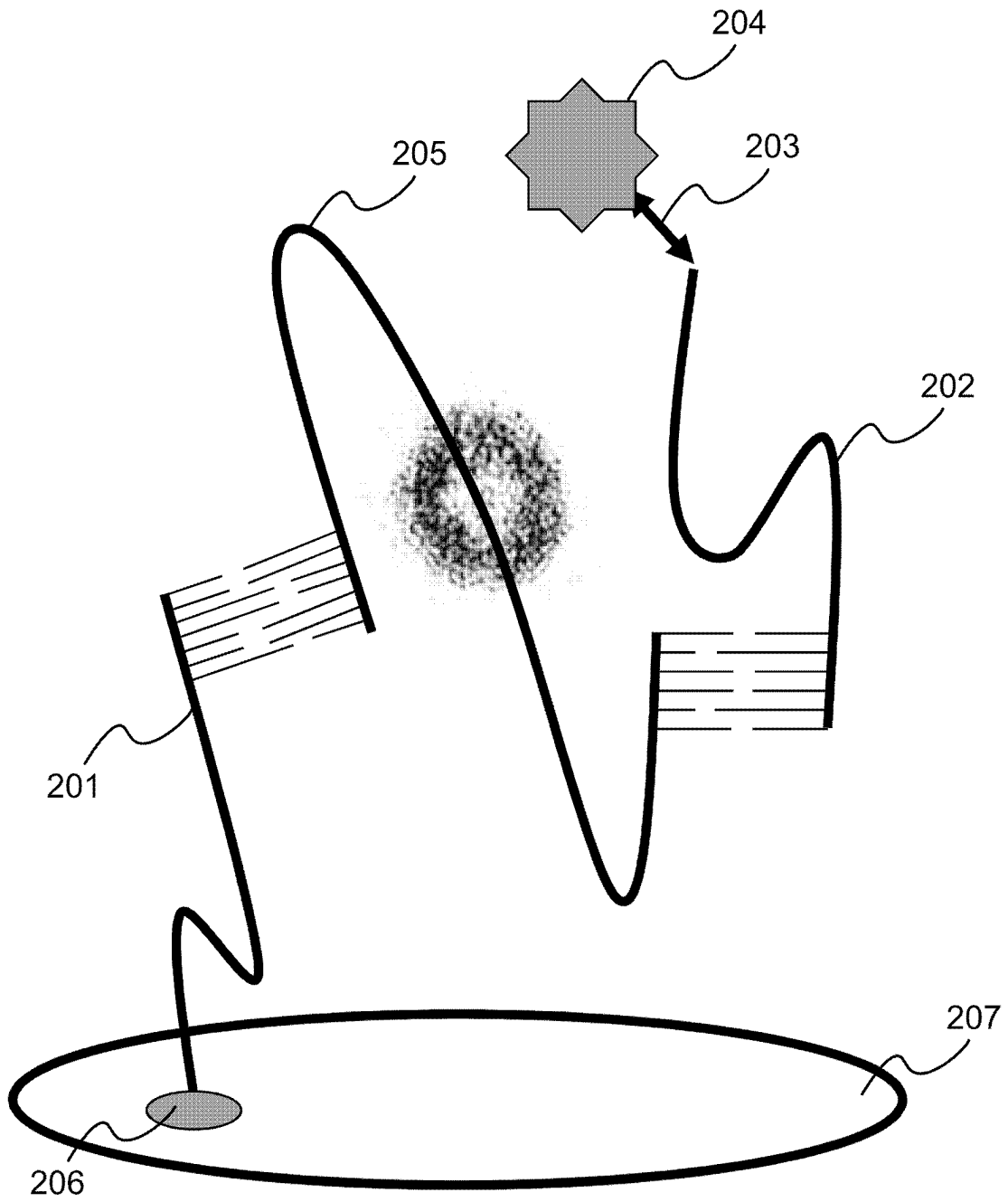


图 2

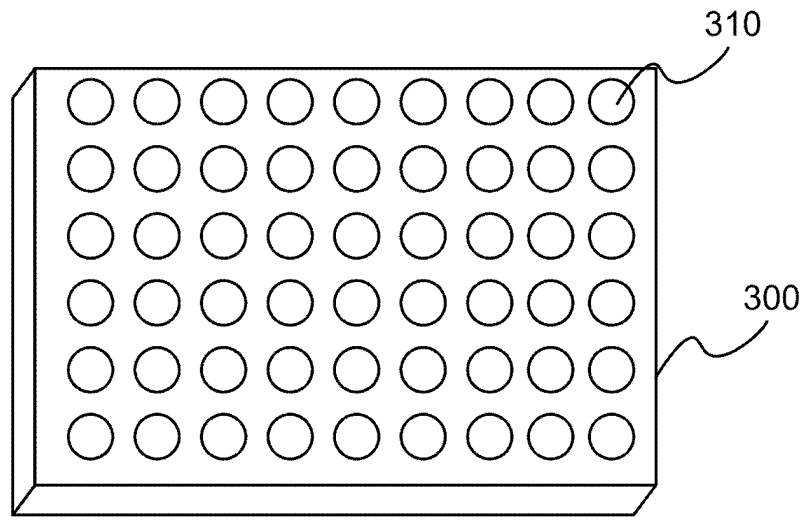


图 3A

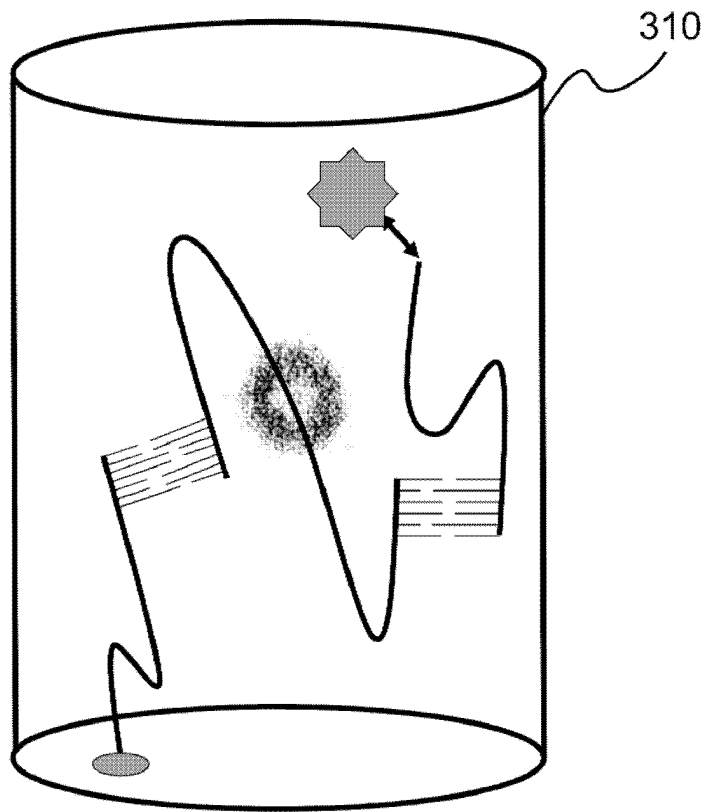


图 3B

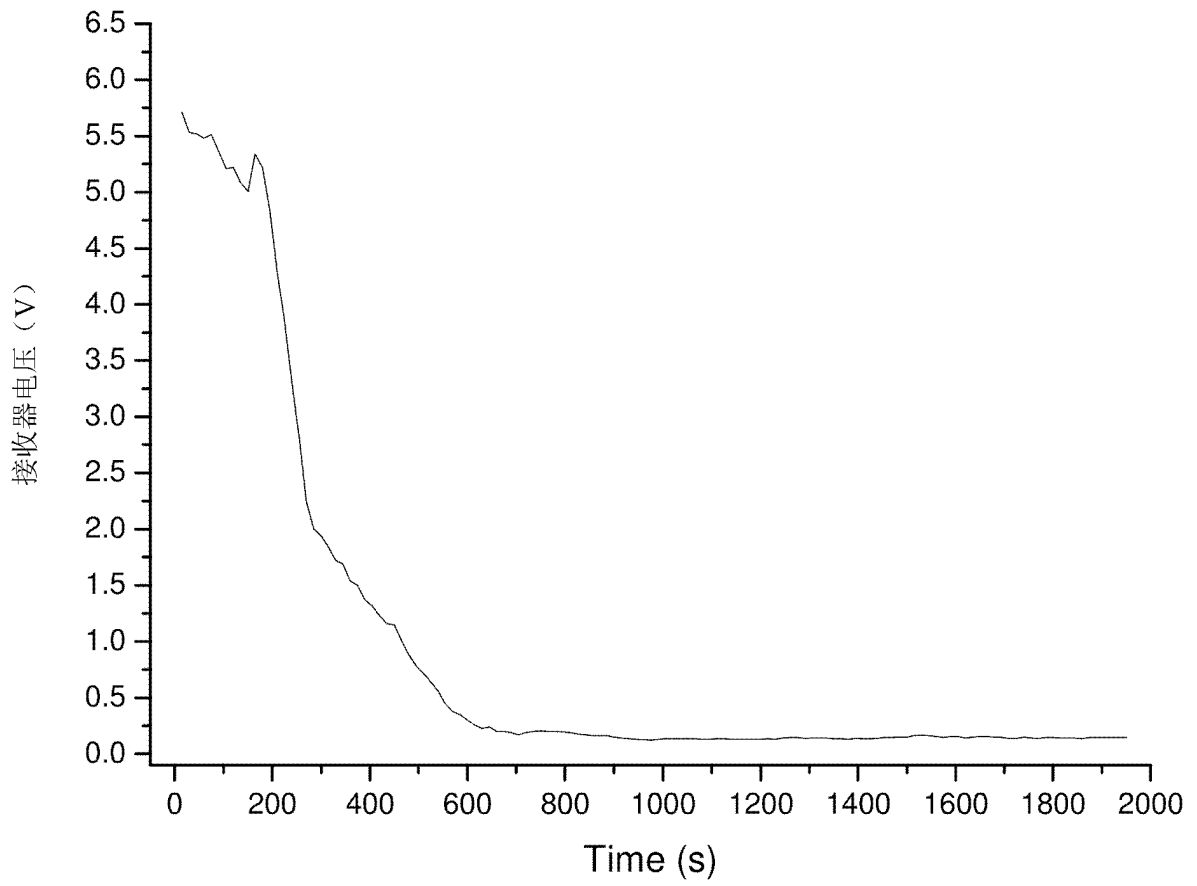


图 4

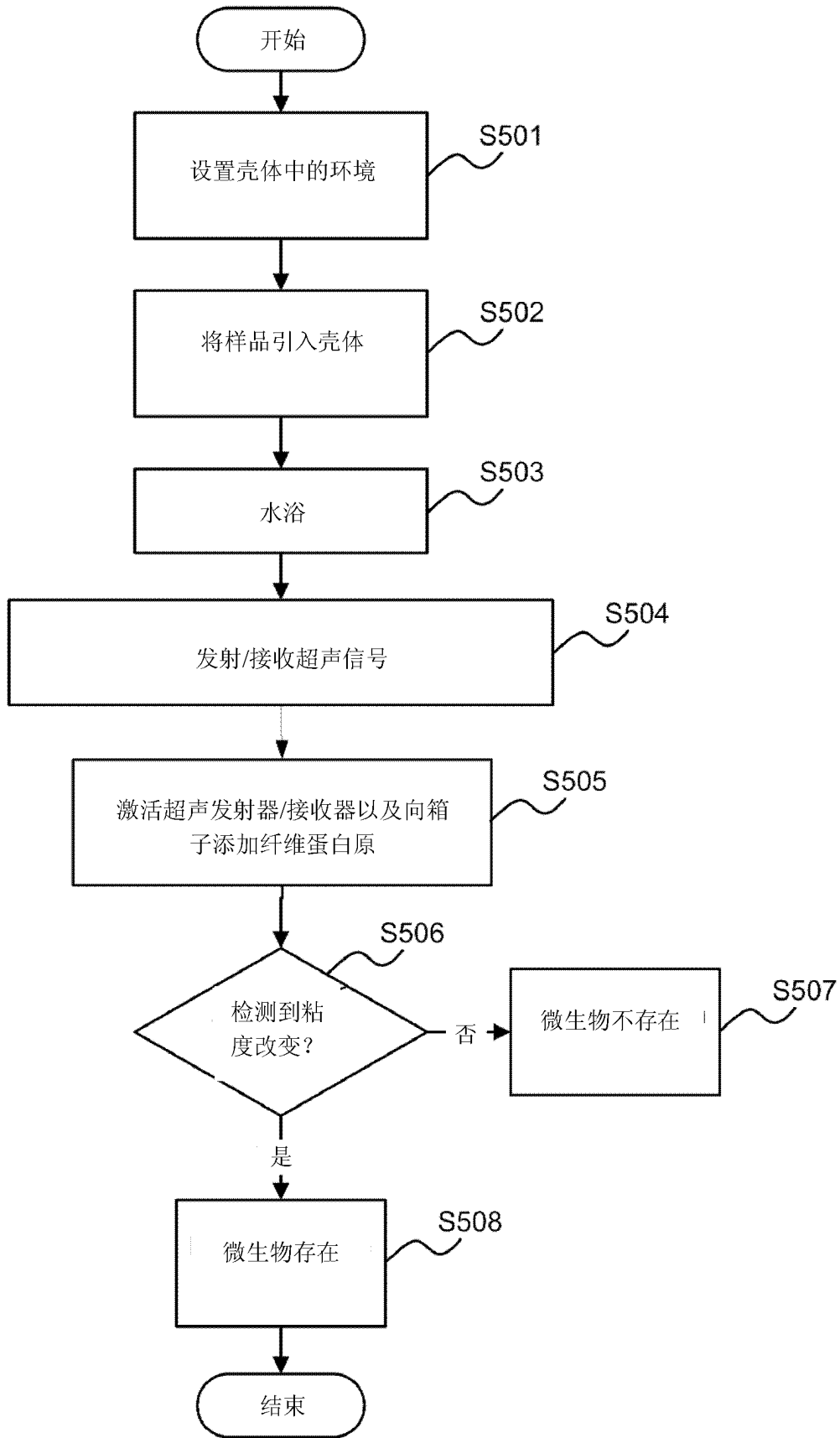


图 5