



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102725423 B

(45) 授权公告日 2015.04.01

(21) 申请号 201080055537.8

(22) 申请日 2010.12.07

(30) 优先权数据

09178363.9 2009.12.08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.06.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2010/055628 2010.12.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/070507 EN 2011.06.16

(73) 专利权人 拜奥卡蒂斯股份有限公司

地址 比利时梅赫伦

(72) 发明人 帕特·爱德华·古斯塔·约瑟夫·凡

米尔伯根

欧娜·米哈埃拉·皮丘朗·吉尔

克里斯蒂安·安妮·施密特

西格林德·尼尔肯

马克·威廉默斯·吉斯波特·彭杰

泽伊内普·塞弗莱克·维奈

罗埃尔·彼得曼

保罗·阿诺德·凡德维尔

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 申基成 郑霞

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 1/06(2006.01)

审查员 毛舒燕

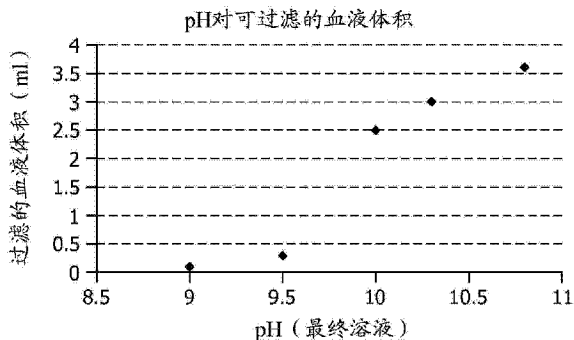
权利要求书1页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

细胞的选择性裂解

(57) 摘要

本发明公开了用于选择性裂解包含微生物例如细菌的样品中的细胞的方法和装置。通过将样品在碱性条件下在非离子型去污剂中孵育而获得该选择性裂解。



1. 一种选择性裂解包含或疑似包含微生物的样品内的动物细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 提供包含或疑似包含微生物的带有动物细胞的样品,

b) 向所述样品中加入非离子型去污剂和缓冲液以获得具有约9.5或更高的pH的溶液,其中加入的去污剂和加入的缓冲液的体积与样品的体积之间的比例在2/1和1/10之间;并且其中所述非离子型去污剂以在0.1%和5% (w/v%或v/v%) 之间的范围内的浓度存在;

c) 将所述溶液孵育足够长的时间段以裂解所述动物细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品是哺乳动物血液样品。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述血液样品是全血。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物是细菌。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述微生物是真菌。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述孵育步骤c) 进行30秒和10分钟之间。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述非离子型去污剂选自包括Nonidet P40、脱氧胆酸盐、Igepal CA 630和/或Triton-X 100的组。

8. 根据权利要求1所述的方法,还包括将所述孵育的溶液离心并分离所述微生物的步骤。

9. 根据权利要求1所述的方法,还包括在过滤器上过滤所述孵育的溶液的步骤,所述过滤器具有在所述过滤器上截留微生物的孔径。

10. 根据权利要求1所述的方法,还包括裂解所述微生物的步骤。

11. 根据权利要求9所述的方法,还包括裂解所述微生物的步骤。

12. 根据权利要求1所述的方法,还包括基于核酸的分子测定。

13. 根据权利要求10所述的方法,还包括基于核酸的分子测定。

14. 根据权利要求11所述的方法,还包括基于核酸的分子测定。

15. 一种用于通过权利要求1所述的方法检测样品中的微生物的装置(1),所述装置(1)包括:

用于接收体积低于40 ml的具有包含或者疑似包含微生物的动物细胞的样品流体的裂解室(2),

与所述裂解室连接的,包含具有9.5或更高的pH的碱性缓冲液且包含非离子型去污剂的储存室(3),或包含pH约9.5或更大的碱性缓冲液的储存室(31)和包含非离子型去污剂的储存室(32),

与所述裂解室连接的用于过滤动物细胞裂解后的样品的过滤器(4),所述过滤器(4)具有在所述过滤器上截留细菌的孔径,和

用于测定DNA的存在的检测室(5)。

16. 根据权利要求15所述的装置,其中所述碱性缓冲液具有大于9.0的pKa和/或所述非离子型去污剂是Triton X-100。

细胞的选择性裂解

发明领域

[0001] 本发明涉及真核细胞,特别是动物细胞,例如血细胞的裂解。本发明还涉及具有高浓度的其他细胞的样品中的低浓度微生物例如细菌的检测。

[0002] 发明背景

[0003] 分子诊断旨在快速检测样品例如血液中的微量病原体(通常是细菌)。然而血液是复杂的基质,且包含用于获得性免疫系统的白细胞(white blood cell)(白细胞(leukocyte)),用于运输氧的红细胞(red blood cell)(红细胞(erythrocyte))和用于伤口愈合的血小板(凝血细胞)。这使包含高量的细胞物质的样品例如全血中的病原体的直接检测变得复杂。

[0004] 经典的检测方法包括在选择性培养基和/或带有指示剂的培养基上培养细菌。通常,在可进行鉴定之前,这些测定需要至少1或2天的培养步骤。

[0005] 对于基于PCR的方法,新鲜血液样品中细菌的量理论上足高以被检测的而无需进一步培养该样品内存在的细菌。然而,为实现微量细菌的早期检测,需要大体积的血液。特别是白细胞中的高量的DNA明显升高了基于DNA的检测方法中的背景。另外,血红蛋白中血红素的存在强烈降低了DNA聚合酶的活性。1微升的人血包含约4,000至11,000个白细胞和约150,000至400,000个血小板。血液中DNA的浓度在约30和60 $\mu\text{g/ml}$ 之间。检测体积为10ml的全血中约10至100,000的细菌物种的存在是非常有挑战性的。

[0006] 白细胞的高量DNA可产生不相关的PCR产物,或可清除为检测细菌DNA而设计的引物。这使得在可通过PCR或其他方法检测细菌DNA之前彻底纯化DNA和分离哺乳动物DNA成为必要。

[0007] 除了干扰PCR反应本身,哺乳动物DNA的量增加样品的粘度。另外,来自裂解过的哺乳动物细胞的蛋白质和膜形成阻碍样品过滤的复合物。这对于微型装置特别成问题。进一步稀释已经大的样品体积导致不可接受的长的操作步骤。

[0008] 由于以上原因,所以需要去除血液样品中的人DNA的方法。

[0009] 在哺乳动物DNA存在下专门测定细菌DNA的方法是已知的。来自SIRSLab公司的Looxter™使用了富集样品中甲基化DNA的方法。由于细菌DNA是高度甲基化的,该方法促使富集细菌DNA。来自Molzylm公司的Molysis™使用了离液剂和去污剂来选择性裂解哺乳动物细胞。该裂解步骤之后为用不受该离液剂/去污剂影响的DNA酶消化。例如由Roche商业化的替代性方法(Septifast™)依赖于为防止非特异性结合人DNA和扩增人DNA而设计的PCR引物对。

[0010] US6,803,208描述了一种方法,其中在37°C下裂解掺杂细菌的血小板的高度稀释的悬浮液15分钟,随后在0.4 μm 过滤器上过滤小量的裂解样品以目视检查截留在过滤器上的细菌是可能的。然而该方法不允许在环境温度下处理大体积的样品。

[0011] 发明概述

[0012] 在所附独立和从属权利要求中列出了本发明的具体和优选的方面。可适当地将从属权利要求的特征与独立权利要求的特征和与其他从属权利要求的特征组合而不仅限于

这些权利要求中明确列出的特征。

[0013] 本发明的一个方面涉及用于选择性裂解包含或疑似包含微生物的样品中的真核细胞,特别是动物细胞的方法。该方法包括以下步骤:提供包含或疑似包含微生物的带有真核细胞,特别是动物细胞的样品,向该样品中加入非离子型去污剂和缓冲液以获得具有约 9.5 或更高的 pH 的溶液,和将该溶液孵育足够长的时间段例如 30 秒和 10 分钟之间,更优选 2 和 6 分钟之间以裂解所述真核细胞,特别是动物细胞。在具体实施方式中,可在 15 至 30°C 下,更优选接近室温下进行裂解。

[0014] 在具体实施方式中,样品是哺乳动物血液样品例如全血。

[0015] 在其他具体实施方式中,微生物是细菌或真菌。

[0016] 根据具体实施方式,其中所加入的去污剂和所加入的缓冲液的体积与样品的体积之间的比例在 2/1 和 1/10 之间。

[0017] 在具体实施方式中,非离子型去污剂以在 0.1% 和 5% (w/v% 或 v/v%) 之间的范围内的浓度存在。

[0018] 在具体实施方式中,非离子型去污剂选自包含 Nonidet、Brij、吐温、Igepal、还原型 triton、辛基葡糖苷、cholaat 和 Triton 的组。更优选的实例是 Triton X-100、Nonidet P40、脱氧胆酸钠和或 IgepalCA630。

[0019] 在具体实施方式中,本文所用的碱性缓冲液具有大于 9 的 pKa 值。其实例是硼酸盐、碳酸盐、CAPS (N-环己基-3-氨基丙磺酸)、CAPSO (3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸)、CHES (2-(N-环己基氨基)乙磺酸)、焦磷酸盐和乙醇胺。特别的实例是碳酸钠。缓冲液应具有足够的缓冲能力以致于当与样品以根据本发明的比例混合时,最终溶液的 pH 为约 9.5 或更高。

[0020] 在具体实施方式中,该方法还包括将经孵育的溶液离心并分离微生物的步骤。

[0021] 在具体实施方式中,该方法还包括在滤器上过滤经孵育的溶液的步骤,该滤器具有在所述滤器上截留微生物的孔径 (pore size),例如具有小于 0.7 μm ,更优选小于 0.5 μm 的孔径的滤器。本发明的方法有助于过滤大体积的样品而没有酶或加热相关的处理步骤。

[0022] 在具体实施方式中,该方法还包括在根据本发明的选择性裂解后加入酸或酸性缓冲液以获得约 7 和 9 之间的 pH 的步骤,“中和步骤”。

[0023] 在具体实施方式中,上述方法之后是微生物检测。其实例是细胞计量术、显微术、PCR 或培养。

[0024] 在具体实施方式中,上述方法之后是微生物裂解。

[0025] 在具体实施方式中,该方法还包括基于核酸的分子测定。

[0026] 本发明的另一方面涉及用于检测样品中微生物的装置 (1),包括:用于接收体积低于 40ml,优选低于 20ml 且优选 1 和 20ml 之间的样品流体的裂解室 (2),与裂解室连接的,包含具有约 9.5 或更大的 pH 的碱性缓冲液且包含非离子型去污剂的储存室 (3),或包含 pH 约 9.5 或更大的碱性缓冲液的储存室 (31),包含非离子型去污剂的储存室 (32),与所述裂解室连接的用于过滤裂解后样品的滤器 (4),所述滤器具有在滤器上截留细菌的孔径,和用于测定 DNA 存在的检测室 (5)。

[0027] 本文的碱性缓冲液通常具有高于 9.5 的 pKa,因此最终溶液将具有约 9.5 或更高

的 pH, 且非离子型去污剂通常是 Triton X-100、脱氧胆酸钠、Nonidet P40 和 / 或 Igepal CA630。

[0028] 本发明中所述的方法允许选择性裂解样品中的白细胞和红细胞, 而细菌和真菌保持完好 (死亡的或存活的)。

[0029] 本发明中所述的方法使处理样品而不显著稀释该样品成为可能, 且因此允许处理较大体积的样品。另外, 不需要通过例如 DNA 酶来酶促降解 DNA 或使用加热, 使得该方法与现有技术已知的方法相比复杂度较低。

[0030] 本发明中所述的方法产生具有低粘度和最小聚集的裂解样品, 这使得在截留细菌的过滤器上过滤大体积的裂解样品成为可能。可以约 100-1000 μ l 之间的体积在该过滤器上进一步处理细菌, 这使得处理大的样品体积以用于随后的步骤和在集成柱中全自动进行所需要的操作例如中和和洗涤成为可能。

[0031] 从以下详述结合通过实例阐释本发明的原理的附图, 本发明的上述和其他特点、特征和优点将变得明显。仅为了举例目的而不限制本发明的范围, 提供了本说明书。以下引用的参考图是指附图。

[0032] 附图简述

[0033] 图 1 示出了在根据本发明的方法的具体实施方式的不同 pH 值下选择性裂解之后的大体积血液的过滤效率。

[0034] 图 2 示出了在根据本发明的方法的具体实施方式的不同 pH 值下选择性裂解之后不同细菌的回收。

[0035] 图 3 示出了在根据本发明的方法的具体实施方式的不同孵育时间下选择性裂解之后不同细菌的回收。

[0036] 图 4 示出了通过根据本发明的选择性裂解人背景 DNA 的减少。

[0037] 图 5 和 6 分别示出了 1ml 和 5ml 全血中不同类型病原体的检测。

[0038] 图 7 示出了根据本发明的人工方法和装置实施的方法之间的对比。

[0039] 图 8 示出了根据本发明的方法与市售败血症检测试验的对比。

[0040] 图 9 示出了在根据本发明的选择性裂解和滤器捕集之后病原体的裂解。

[0041] 图 10 示出了当在根据本发明的选择性裂解和滤器捕集之后进行的与其他裂解方法相比的病原体裂解效率。

[0042] 图 11 示出了用于进行根据本发明的实施方式中所述的选择性裂解的装置的实施方式的图解概览。

[0043] 图 12 示出了包含本发明的实施方式中所述的选择性裂解单元的集成装置的实例。

[0044] 在不同的附图中, 相同的参考标记表示相同或相似的元件。

[0045] 将参考具体实施方式并参考某些附图描述本发明, 但是本发明不受其限制而仅受权利要求限制。权利要求书中的任何参考标记不应解释为限制范围。所述的附图仅是图解性的而非限制性的。在附图中, 某些元件的尺寸可被放大且为了说明性目的未按比例绘制。当术语“包括 (comprising)”用于本说明书和权利要求书中时, 其不排除其他元件或步骤。当表示单数名词时使用不定冠词或定冠词例如“a (一个)”或“an (一种)”、“the (该)”的情况下, 这包括那个名词的复数, 除非明确指出其他。

[0046] 另外,说明书和权利要求书中的术语第一、第二、第三及类似术语用于区分相似元件且不一定用于描述顺序性或时间性顺序。应当理解,在合适的情境下如此使用的术语是可互换的,且本文所述的本发明的实施方式能够以不同于本文所述或阐明的其他顺序实施。

[0047] 仅为有助于理解本发明而提供了以下术语或定义。这些定义不应解释为具有小于本领域普通技术人员理解的范围。

[0048] 实施方式详述

[0049] 本发明上下文中“血细胞”涉及血液中存在的哺乳动物细胞且包括红细胞(红细胞)、白细胞(白细胞)和血小板(凝血细胞)。

[0050] 本发明上下文中的“全血”涉及可能用抗凝剂处理的包含血浆和细胞的未处理的血液。

[0051] “样品”涉及包含细胞物质的含水悬浮液,且包括体液例如淋巴、脑脊液、血液(全血和血浆)、唾液,但还包括例如均质化的悬浮液诸如例如肌肉、脑、肝或其他组织的含水部分。

[0052] 本发明中的“真核的”涉及不包括真菌的任何类型的真核生物体,例如动物,特别是包含血液的动物,且包括无脊椎动物例如甲壳动物和脊椎动物。脊椎动物包括冷血动物(鱼、爬行动物、两栖动物)和温血动物(鸟类和哺乳动物)。哺乳动物特别包括灵长类且更特别地包括人。

[0053] 在样品(例如血液)中,当与保持完好的来自被收集样品的生物体中的真核细胞的百分比相比,该样品中保持完好的微生物细胞(例如细菌细胞)的百分比明显更高(例如,2、5、10、20、50、100、250、500 或 1000 倍更多)时,获得本发明中使用的“选择性裂解”。

[0054] 本发明中使用的“微生物”涉及通常作为病原体的存在于已被收集样品的生物体中的细菌(革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌,以及细菌孢子)和单细胞真菌例如酵母和霉菌。

[0055] 本发明的第一方面涉及用于选择性裂解包含或疑似包含微生物例如细菌的样品中的真核细胞,特别是动物细胞的方法。该方法的目标是增加用于检测样品中的微量细菌(即,每 ml 样品小于 10000、1000、100 或甚至更少的微生物)的试验的灵敏度。如在发明背景中解释的,来自样品中真核细胞特别是动物细胞的 DNA 干扰基于 PCR 的检测方法且该 DNA 与蛋白质和膜一起形成聚集物,这种聚集物增加了裂解后的粘度并对裂解样品的过滤具有显著影响。为解决该问题,选择性地裂解真核细胞特别是动物细胞,其中大部分的(即,大于 20%、40%、60%、80%、90% 或甚至大于 95%)微生物保持存活,或如果被这种处理杀死,细菌 DNA 仍包含在细胞壁内。本发明所述的方法中,解决了以上提及的问题。

[0056] 本发明所述的方法特别适用于任何类型的样品,其中包含 DNA 的其他细胞,特别是来自其中微生物以病原体存在的宿主的细胞的存在阻碍了来自微生物,特别是细菌的 DNA 的检测。

[0057] 现在进一步阐述本发明所述的方法的实施方式,其中研究了哺乳动物血液样品中微量细菌的存在。

[0058] 可将该血液样品以全血或处理过的部分例如血浆或血小板制品储存。通常,对新鲜分离的全血实施本发明所述的方法。通常用例如肝素、EDTA 或柠檬酸盐处理这些样品以避免凝结。

[0059] 可选择地,通过将来自静脉的血液直接收集在带有去污剂和缓冲液的管中对新鲜血液实施该方法。

[0060] 因此,用缓冲液或非离子型去污剂补充新鲜的血液样品或保存的样品。缓冲液或其浓度的选择被选择为用于补偿所提供的血液样品的缓冲能力并获得约 9.5 或高于 9.5,更特别地在 9.5 和 11.5 之间,甚至更特别地在 9.5 和 10.5 之间的 pH。大于 11.5 的 pH 值适合更强健的生物体例如革兰氏阳性细菌和真菌。同样地充分浓缩缓冲液以向样品中加入至多样品体积的 200%、150%、100%、50%、20% 或 10% 的缓冲液体积以获得所需要的 pH 变化。

[0061] 本发明上下文中合适缓冲液通常具有大于 9、大于 9.5 或甚至大于 10 的 pKa,且包括硼酸盐、碳酸盐、CAPS、CAPSO、CHES、焦磷酸盐、乙醇胺和在以上提及的 pH 范围内具有最佳缓冲能力的其他通常使用的缓冲液。

[0062] 合适的去污剂是非离子型去污剂,其一方面仅对真核细胞,特别是动物细胞具有裂解作用,且另一方面对 DNA 和蛋白质具有增溶作用。

[0063] 非离子型去污剂的实例是烷基葡糖苷、Brij35 (C12E23 聚氧乙烯二醇十二烷基醚) (15,7)、Brij58 (C16E20 聚氧乙烯二醇十二烷基醚) (16)、Genapol (13 至 19)、glucanids 例如 MEGA-8、-9、-10、辛基葡糖苷 (12,6)、Pluronic F127、Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n) (13,4)、Triton X-114 (C₂₄H₄₂O₆) (12,4)、吐温 20 (聚山梨醇 20) (16,7) 和吐温 80 (聚山梨醇 80) (15) Nonidet P40 脱氧胆酸钠、还原型 Triton X-100 和或 Igepal CA630。非离子型去污剂的特别优选的实例是 Triton-X100。

[0064] 去污剂的最有效浓度取决于不同的去污剂,但通常在 0.1% 和 5% 之间的范围内,更特别地在 0.1% 和 1% 之间的范围内。取决于去污剂 (固体或液体), % 分别指 w/v% 或 v/v%。

[0065] 在缓冲液和去污剂存在下,在 10 至 30°C 的温度下,更优选室温附近,在 10 分钟内,优选在 30 秒和 10 分钟之间且更优选在约 1 至 3、1-5、1-8、2-6 或 1-10 分钟内进行血液样品的孵育。

[0066] 根据本发明的方法具有优点:在低于 30°C 的温度下,在 10 分钟以下获得选择性裂解。因此,通常可在环境温度下实施该方法而不需要加热样品。

[0067] 任选地,裂解后,通过在中和步骤中加入酸或酸性缓冲液使裂解样品的 pH 变成中性值 (即,在 7 和 9 之间)。发现中性 pH 的裂解样品可储存更长的时间 (多至 1、2、6、12 或甚至 24 小时) 而不进一步裂解细菌细胞且没有裂解样品的流体性质的显著变化。

[0068] 本发明的方法中研究的另一个参数是裂解后血液样品的流体性质的评价。这可通过检验可通过 0.22 μm 滤器过滤的裂解的血液的体积来测定。根据本发明的方法允许过滤通过向 1 体积的样品中加入 1 体积的缓冲液 / 去污剂溶液稀释的至少 2、5、7.5 或甚至 10ml 的全血。

[0069] 通常,根据本发明的方法包括这样的步骤,其中通常通过离心或过滤从样品中分离完好的细菌细胞。在具体实施方式中,通过使裂解样品经过具有 1 μm 以下的孔径的滤器例如具有 0.4 或 0.22 μm 的市售滤器截留通常具有 0.5 和 10 μm 之间的大小的细菌来从样品中分离完好的细菌。对于样品的过滤,存在各种各样的市售装置,例如这样的滤器,其适合安装在注射器上以可在裂解后通过对注射器的活塞人工施压使注射器内的流体流经滤

器。

[0070] 此后,可研究滤器上细菌(或真菌)的存在。在具体实施方式中,通过 PCR 研究微生物的存在。为了该目的,可将细菌(或真菌)从滤器上洗掉并为了 PCR 扩增进一步处理细菌(或真菌)。可选择地,用裂解缓冲液清洗滤器以释放微生物中的 DNA,其进一步用于 PCR 反应。

[0071] 其他检测步骤可通过细胞计量术、显微镜、PCR 或培养实施。

[0072] 可在一个装置(图 11 中所图解示出的)中进行样品的裂解,微生物的过滤和检测。因此,本发明的一个方面涉及装置(1),其包括:用于接收体积为 1 和 10ml 之间的样品流体的裂解室(2),与裂解室(2)连接的,包含碱性缓冲液及上述表面活性剂的储存室(3),或包含上述碱性缓冲液的储存室(31)和包含上述表面活性剂的储存室(32)。在装置内,裂解室与滤器(4)连接以在裂解后过滤样品从而将微生物截留在滤器上。该装置还包括从滤器中去除微生物并在隔开的室中裂解这些微生物的通道。可选择地,该装置还包括用于在滤器上裂解微生物的设备,和将裂解细菌或真菌细胞的 DNA 从滤器转移到隔开的室中的通道。该装置还可包含 DNA 纯化和检测室(5)以测定 DNA 的存在。通常,检测室是 PCR 模块。

[0073] 图 12 中示出了其中进行选择裂解和随后的 DNA 纯化和鉴定的装置的实例。

[0074] 体现本发明的系统和方法的其他布置将对于本领域技术人员是明显的。

[0075] 应当理解,尽管本文已讨论了用于根据本发明的装置的优选实施方式、具体构造和结构,以及材料,可进行形式和细节的多种变化或修改而不偏离本发明的范围和精神。

[0076] 实施例 1

[0077] pH 对过滤的影响

[0078] 该实验的目标是评价缓冲液的 pH 对过滤效率的影响。如通过使用本领域技术人员已知的常规技术测量最终溶液的 pH 确认的,缓冲能力是足够在最终溶液中获得相似 pH 的。

[0079] 缓冲液包含:

[0080] 1M 硼酸钠, pH9.0+1% Triton X-100

[0081] 1M 硼酸钠, pH9.5+1% Triton X-100

[0082] 1M 碳酸钠, pH10.0+1% Triton X-100

[0083] 1M 碳酸钠, pH10.3+1% Triton X-100

[0084] 1M 碳酸钠, pH10.8+1% Triton X-100

[0085] 将 1ml 的缓冲液与 1ml 的全血混合并孵育 3 分钟。此后,加入中和缓冲液并使用真空过滤设置通过直径 25mm 和具有 0.45 μ m 孔径的尺寸选择滤器过滤混合物。测量阻塞前能够通过滤器的血液体积。图 1 中示出了结果。该实验表明,为获得足够分析低浓度病原体的滤过的血液体积,最终 pH 值应为约 9.5 或更高。

[0086] 实施例 2

[0087] 表明了缓冲液的 pH 对选择性裂解血细胞后完好病原体(大肠杆菌(E. coli))的回收的影响。

[0088] 所使用的缓冲液包含:

[0089] 1M 硼酸钠, pH9.0+1% Triton X-100

[0090] 1M 硼酸钠, pH9.5+1% Triton X-100

[0091] 1M 碳酸钠, pH10.0+1% Triton X-100

[0092] 1M 碳酸钠, pH10.5+1% Triton X-100

[0093] 将相同量的细菌掺入到 1ml 血液中。用以上提及的缓冲液处理该体积 3 分钟。此后, 离心 (10min, 4000g) 血液以收集完好的细菌。使用标准的碱裂解方法裂解细菌并使用 Qiagen 离心柱 (QiaAmp 血液微型试剂盒) 纯化 DNA。使用实时 PCR 对 DNA 量定量。图 2 中示出了结果。

[0094] 以上提及的附图示出了作为选择性裂解缓冲液的 pH 的函数的细菌回收。在低 pH 值下, 白细胞 DNA 不被降解且抑制 PCR 反应。在高 pH 值下, 细菌开始在选择性裂解期间被裂解, 且其未被回收。

[0095] 实施例 3

[0096] 孵育时间对病原体回收的影响。

[0097] 该实验表明血液与根据本发明的选择性裂解缓冲液的延长孵育对完好病原体的回收的影响。将固定数量的细菌铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 掺入到血液中。将 1ml 的掺杂的血液与 1ml 的选择性裂解缓冲液 (1M 碳酸钠 pH10.0+1% Triton X-100) 混合并孵育 1、2、3、5、7 或 10 分钟。此后, 加入 1ml 的中和缓冲液。通过离心 (4000g 下 10min) 收集病原体并洗涤细菌沉淀。最后, 通过标准的碱裂解来裂解细胞, 接下来使用 QiaAmp 血液微型试剂盒纯化 DNA。通过实时 PCR 测量回收的 DNA 的量。结果示出在图 3 中并表明优选孵育进行 30 秒和 10 分钟之间。

[0098] 实施例 4

[0099] 通过根据本发明的选择性裂解降低人背景

[0100] 本方法中真核细胞 DNA, 更具体地白细胞 DNA 的量的减少是重要的, 因为当存在时, 其将抑制接下来的检测病原体 DNA 或 RNA 的 PCR 反应。为检测残留背景 DNA 的量, 用根据本发明的选择性裂解方法处理不同的血液样品并使用 RNA 酶 P 检测试剂盒 (Applied Biosystems) 分析 PCR 反应中白细胞 DNA 的量。将这些样品的 Ct 值与从存在全部白细胞 DNA 的 200 μ l 血液全血样品中获得的那些 Ct 值进行比较。从文献中已知来自于 200 μ l 全血的人 DNA 是 PCR 反应可耐受而不抑制病原体 DNA 扩增的背景 DNA 的最大量。图 4 中示出了不同 PCR 反应的结果。

[0101] 该图示出了根据本发明的方法 (1M 碳酸钠 pH10.0+1% Triton X-100) 的 1ml 处理的血液样品和 200 μ l 全血参考样品的人背景的量的差异。处理了不同的样品且以单独的数据点示出了 PCR 结果。这些结果表明与 200 μ l 全血参考样品相比, 根据本发明处理的 1ml 的样品中的背景 DNA 的量低得多 (= 更高的 Ct 值)。该结果证明当使用根据本发明的方法时有效且充分地去除了样品中的白细胞 DNA。

[0102] 实施例 5

[0103] 该实施例的目的是阐明通过使用根据本发明的方法检测来自全血的不同类型的病原体。将不同类型的病原体, 革兰氏阴性菌 (铜绿假单胞菌)、革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)) 和真菌 (白色念珠菌 (*C. albicans*)) 一起混合到 1ml 血液中。用选择性裂解缓冲液 (1ml 的 1M 碳酸钠 pH10.0+1% TX-100 溶液) 处理血液样品 3min, 接下来中和 pH 并使用具有足够小以截留所有细胞的孔的尺寸选择过滤器过滤。清洗过滤器以去除残留的抑制剂例如血红蛋白和白细胞 DNA。此后, 根据标准的碱裂解方法裂解细胞并使用 Qiagen 血

液微型试剂盒纯化 DNA。

[0104] 通过实时 PCR 检测病原体 DNA ;Ct 值是 DNA 量的量度。为了定量,将小份的掺杂的血液样品涂布在血琼脂平板上以获得 CFU 计数。图 5 中提供的数据表明检测来自全血的低数目的病原体是可能的。参考样品包含于小体积的 PBS 缓冲液中的相同数目的细菌,直接裂解这些细菌,随后纯化 DNA 并使用实时 PCR 定量。参考测量和来自血液的实际的富集实验提供了相似的 Ct 值,因此说明高的回收率。阴性对照(无细菌的血液)表明无 PCR 信号。

[0105] 该测定允许使用较大体积的血液。实验设置与之前的实施例相同但血液的量增至 5ml。参考样品包含与 5ml 血液样品相同数目的病原体但细胞留在小体积的 PBS 中并被直接裂解。图 6 中示出了结果。

[0106] 该实验表明从大体积的血液中回收低数目的病原体的可能性。数据表明回收的病原体 DNA 的浓度与参考相同。因此可得出结论:大部分的病原体在选择性裂解期间保持完好且白细胞 DNA 的减少对防止抑制病原体 PCR 是有效的。

[0107] 实施例 6

[0108] 根据本发明的选择性裂解法可以多种方式实施,包括但不限于人工程和其中通过根据本发明的装置实施该方法的程序(集成程序)。本实施例比较了该集成程序和人工程序。人工程序需要人工吸取和离心步骤,而集成程序使用能够进行全部所需操作的微量流体柱体(micro-fluidic cartridge)和尺寸选择滤器。基础生化方法是相似的:使用 1M 碳酸钠 +1% Triton X-100 溶液选择性裂解白细胞和红细胞,然后 3 分钟后进行中和步骤。下一步,将混合物离心(人工)或过滤(集成)并洗涤细胞且最后通过标准碱裂解程序释放 DNA。在最后的步骤中,使用 Qiagen 血液微型试剂盒纯化 DNA 并通过实时 PCR 检测 DNA。以下图 7 中可找到集成程序和人工程序的结果。获得了相当的结果,表明该结果独立于测定的实施形式。

[0109] 实施例 7

[0110] 在该实施例中,相对于市售方法,即 MolYsis Complete 试剂盒(Molzym),检验(benchmark)根据本发明的方法。该试剂盒使用了离液剂和去污剂来选择性裂解哺乳动物细胞。该裂解步骤之后是用不受该离液剂/去污剂影响的 DNA 酶消化。

[0111] 对于该实验,用不同浓度的金黄色葡萄球菌掺杂 1ml 的血液样品。按实施例 5 中所述处理 1ml 血液,并用 MolYsis 试剂盒根据厂家说明处理另外的 1ml。图 8 中绘制了 Ct 值对细胞浓度的图,且 Ct 值表明不添加酶或离液盐时根据本发明的方法至少与已知的 MolYsis 试剂盒一样有效。

[0112] 实施例 8

[0113] 在选择性裂解血细胞并在尺寸选择滤器上富集病原体细胞后,采用碱裂解实现在滤器上同时裂解不同病原体以制备可用于 PCR 分析的 DNA。

[0114] 图 9 示出了在集成柱体上实施碱裂解程序的结果。用 10^6 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的细胞掺杂 1ml 的血液。在选择性裂解血细胞并在滤器上富集病原体细胞后,使用在 95°C 孵育 10min 的 200 μ l 的包含 200mM NaOH、0.5% SDS 的溶液进行碱裂解以在滤器中获得对病原体的完全裂解。用 20 μ l 的 1M 柠檬酸溶液中和包含病原体 DNA 的洗脱液,并使用 QIAamp DNA/血液微型试剂盒纯化。作为对照样品,在实验台上裂解每种病原体的 10^6 细胞,并如上所述地中和并纯化。

[0115] 为了优化并检验碱裂解程序,选择白色念珠菌 (*Candida albicans*) 作为模型系统,因为这些酵母细胞因其难以裂解的硬质细胞壁而被熟知。图 10 比较了碱裂解程序(使用 50mM NaOH、0.25% SDS 结合热处理)和其他裂解方法,即高强度超声 (HiFU) 处理和商购试剂盒 (BD GeneOhm 裂解试剂盒)。对于碱裂解和商购试剂盒裂解,使用离心分别将样品从 1ml 浓缩至 160 μ l 和 100 μ l。对于 HiFU,使用了 2ml 细胞溶液,没有之前的离心。裂解后,通过离心去除样品中的未裂解的细胞和碎片。将 1 μ l 的粗裂解液用作 PCR 输入。

[0116] NaOH 和 SDS 的组合对裂解比每种单独的化合物更有效。任何一种化合物的浓度增加不会进一步增加裂解效率。无加热孵育步骤的碱裂解明显更低效。可通过在 95 $^{\circ}$ C 孵育 2min 增加裂解效率,然而,为了将测定整合入柱体,在 70 $^{\circ}$ C 下孵育更长的时间是优选的。

[0117] 对于碱性裂解,将细胞重悬在 100 μ l 的包含 50mM NaOH 和 0.25% SDS 的裂解溶液中。随后将样品在 70 $^{\circ}$ C 孵育 10min,迅速冷却至室温并通过加入 30 μ l 的 500mM Tris-HCl, pH7.0 (产生终浓度为 150mM 的 Tris,即 NaOH 浓度的 3 倍) 来中和。

[0118] 对于粗裂解产物 PCR,通过离心 (5min, 14,000g) 去除样品中的未裂解的细胞和碎片。将 1 μ l 的上清液加入到 25 μ l 的 PCR 反应中。PCR 检测基于靶向 rRNA 基因的 Taqman PCR 测定 (Apollo)。使用 500nM 正向引物和 300nM 反向引物和 FAM-BHQ1 标记的探针 (所有寡核苷酸由 Biolegio BV 定制合成),在 Taqman Universal 主混合物 (Applied Biosystems) 中进行 PCR 反应。在 Biorad CFX 实时 PCR 系统中进行 PCR 反应。在 95 $^{\circ}$ C 下 10min 的初始加热步骤以活化热启动聚合酶之后,使用 50 个循环的 95 $^{\circ}$ C 下持续 15sec 和 60 $^{\circ}$ C 下持续 1min 来扩增。在每个循环中的 60 $^{\circ}$ C 步骤期间检测荧光信号。用 Biorad CFX 软件进行数据分析。

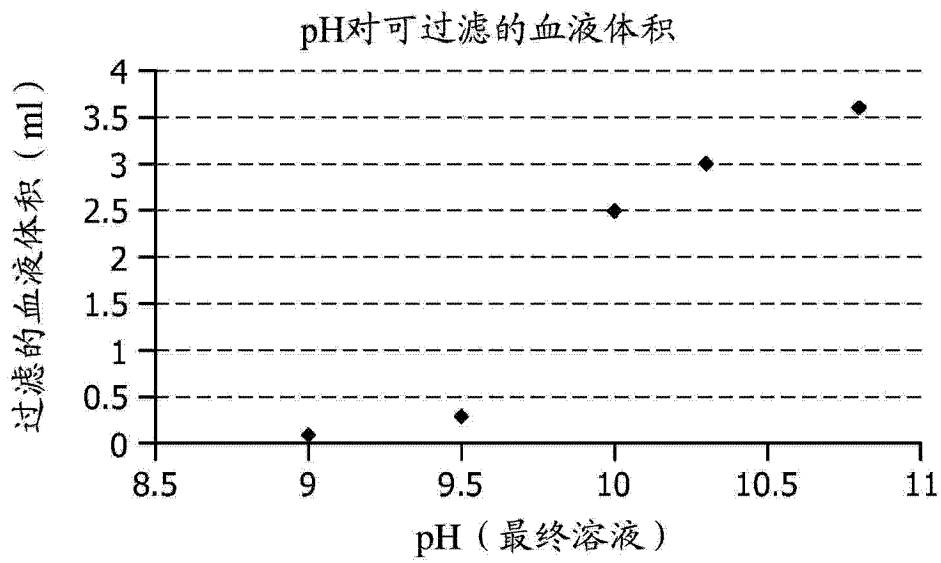


图 1

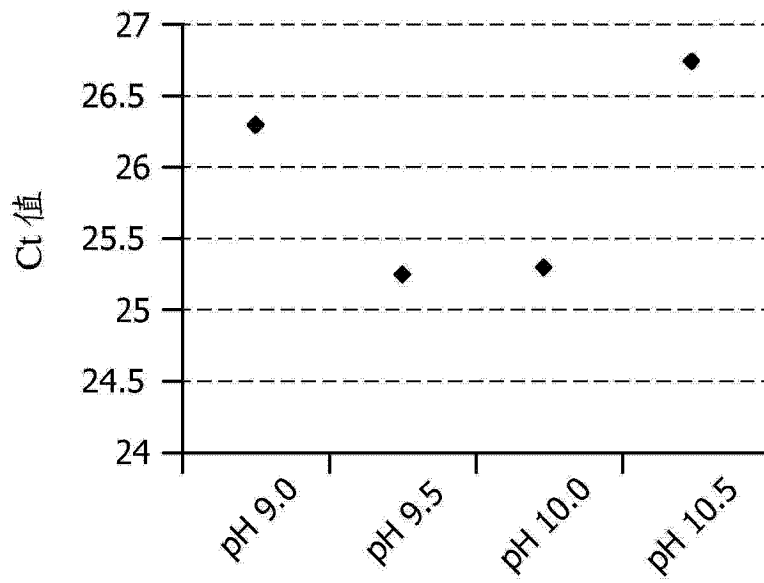


图 2

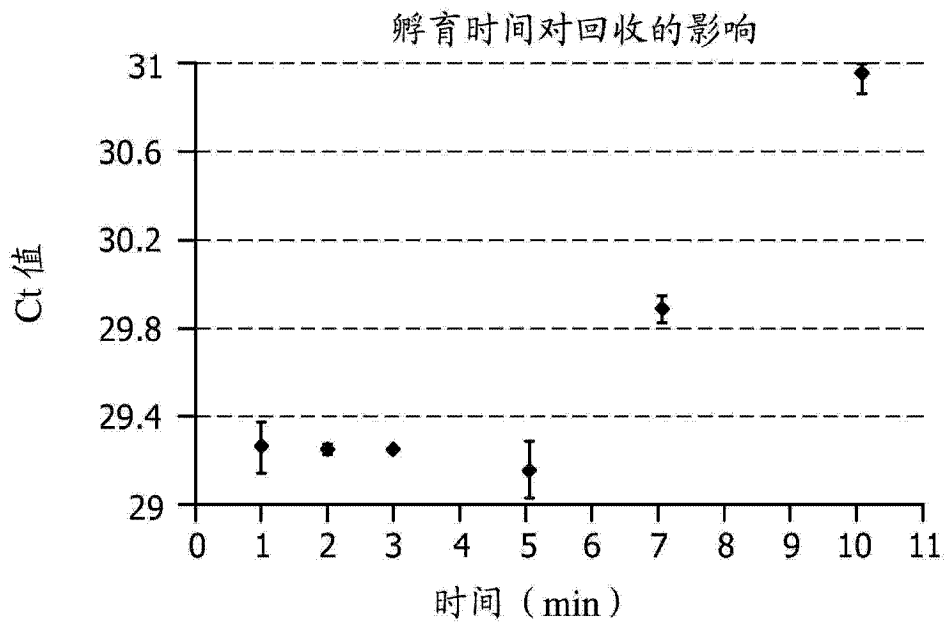


图 3

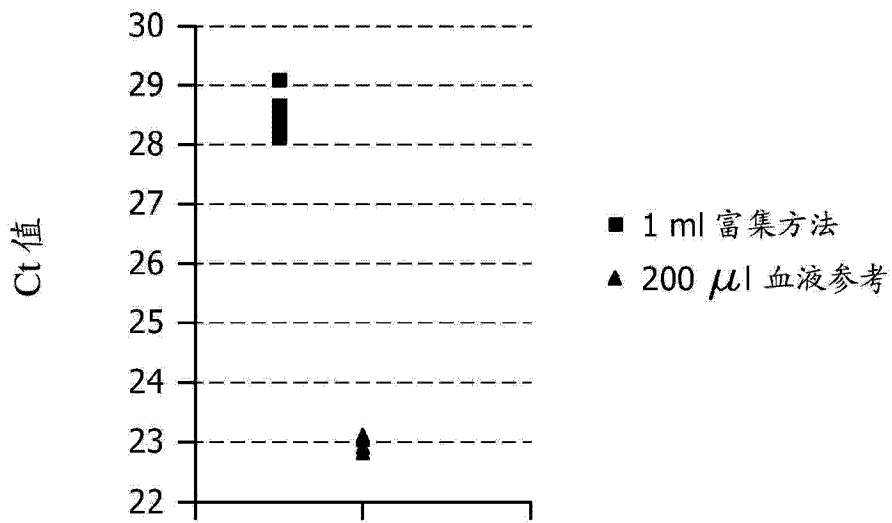


图 4

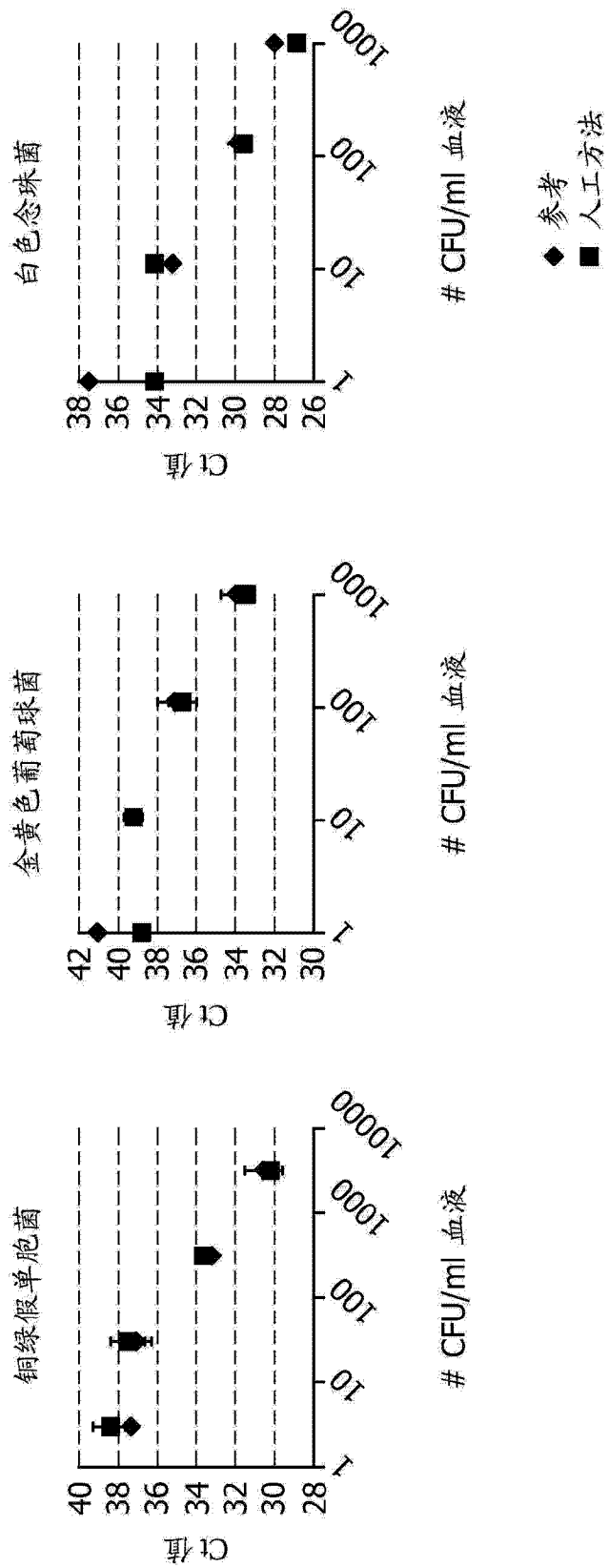


图 5

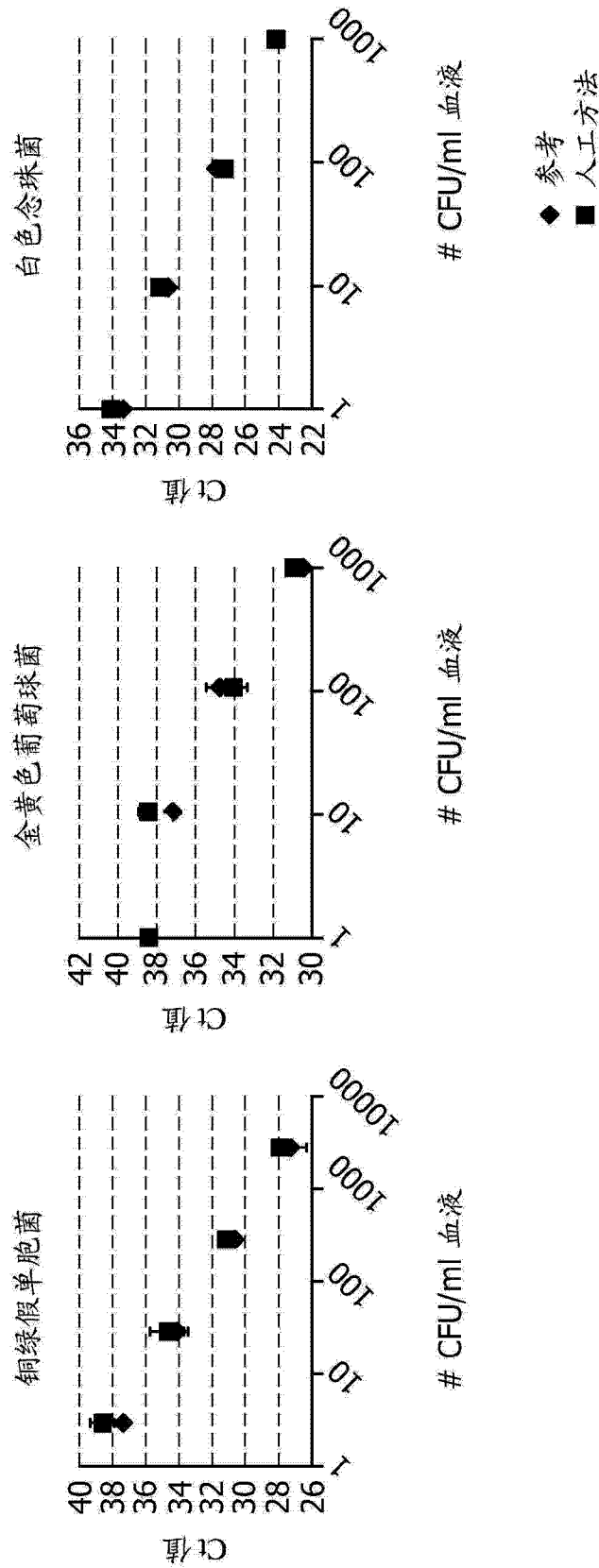


图 6

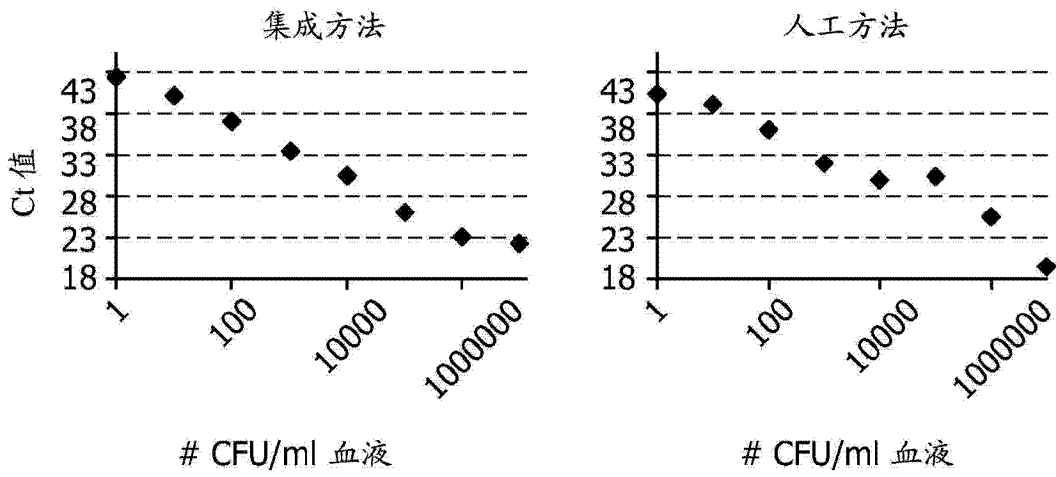


图 7

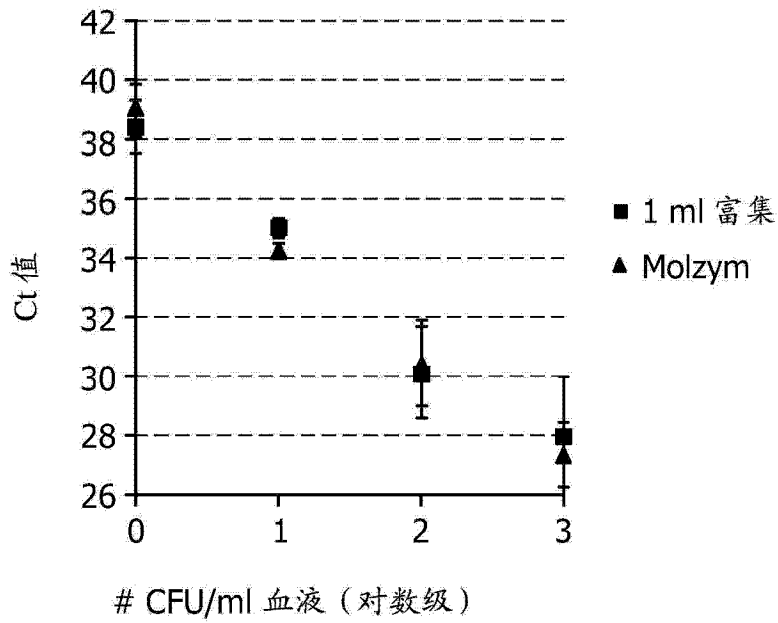


图 8

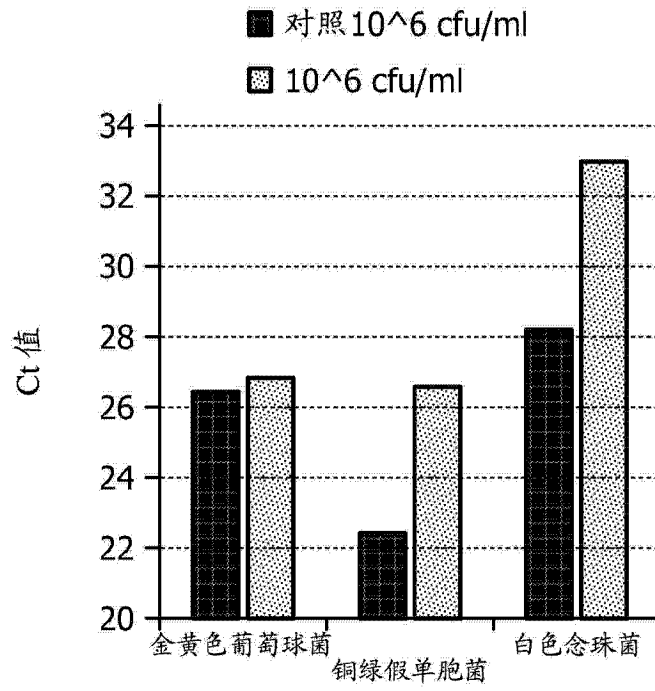


图 9

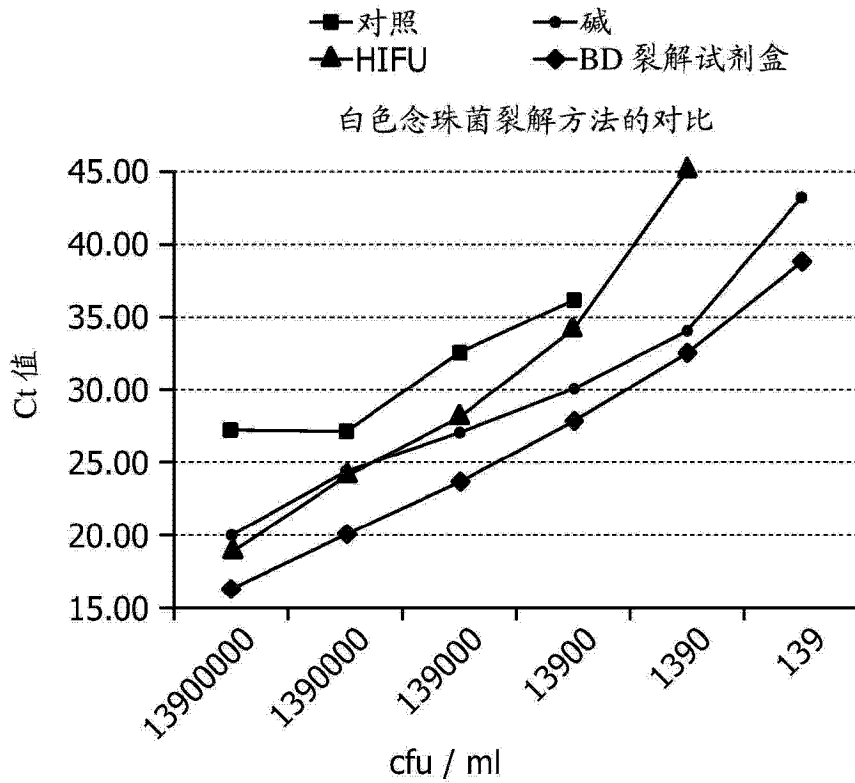


图 10

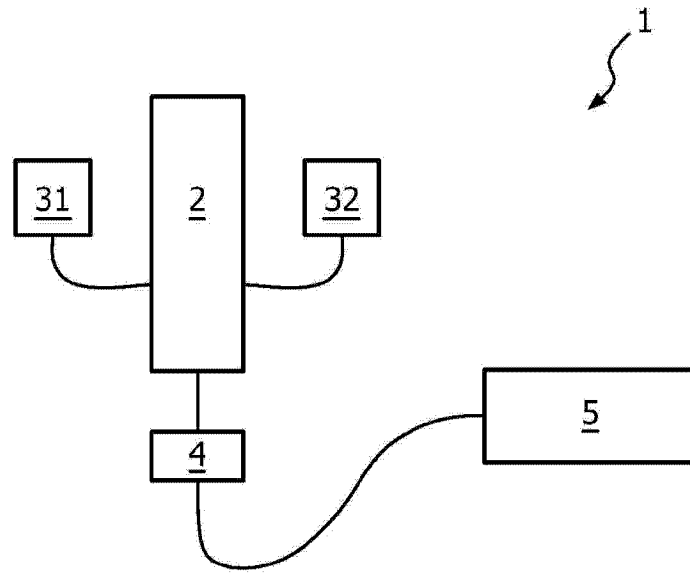


图 11

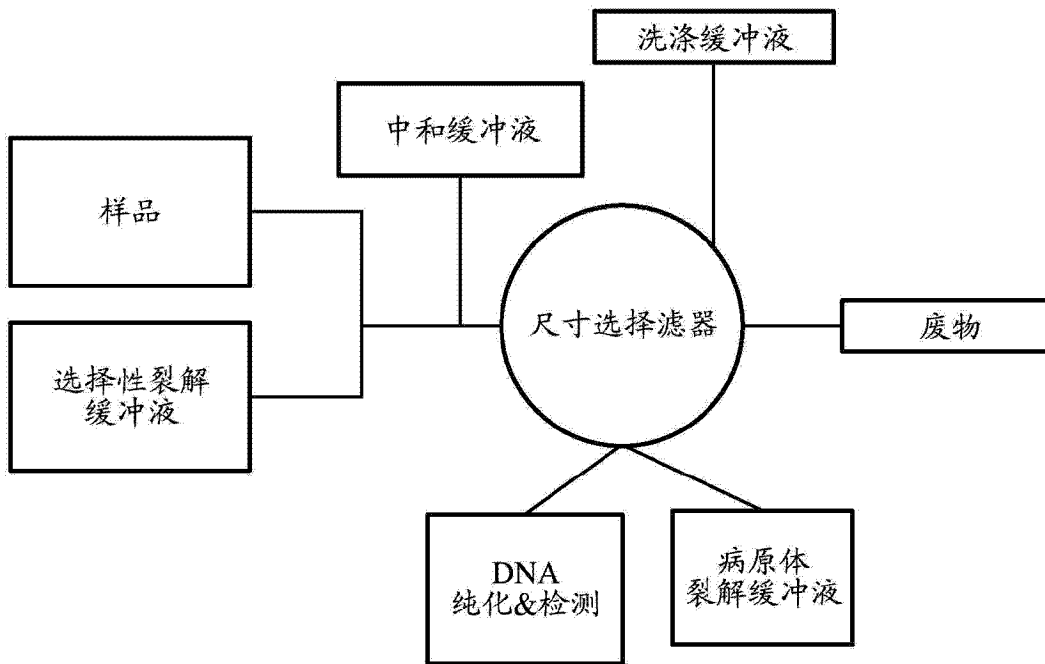


图 12