



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103097896 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 08

(21) 申请号 201180030448. 2

(22) 申请日 2011. 04. 20

(30) 优先权数据

12/764, 828 2010. 04. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 12. 20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/033291 2011. 04. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/133694 EN 2011. 10. 27

(71) 申请人 药物代谢动力公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 叶赫沙·沙查尔

温斯顿·吴

托马斯·陈

莱斯利·法卡斯

布雷特·乔丹

帕拉丁·卢波夫

海尔文·陈

凯尔·齐默曼

(72) 发明人 叶赫沙·沙查尔 温斯顿·吴

托马斯·陈 莱斯利·法卡斯

布雷特·乔丹 帕拉丁·卢波夫

海尔文·陈 凯尔·齐默曼

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 27/26 (2006. 01)

C12Q 1/04 (2006. 01)

C12R 1/42 (2006. 01)

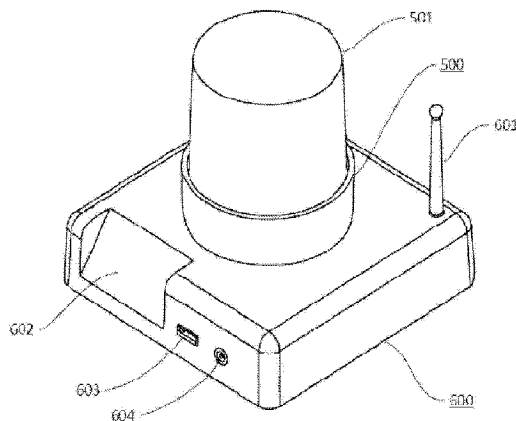
权利要求书2页 说明书18页 附图12页

(54) 发明名称

使用电化学适体生物传感器构成检测肠道沙门氏菌的自动化采样装置的方法和设备

(57) 摘要

一种基于适体的固态电化学生物传感器，用于使用固定化的适体对肠道沙门氏菌血清型进行无标记物检测。所述装置通过形成平行电容器的矩阵阵列实现，以此实现低成本、便携式、完全一体的装置。蛋白质-适体结合可调节电路的阈值电压，改变所述电路的阻抗(电容)。该电路的特征还在于 p-Si 基片编排的电极，其增强所述沙门氏菌外膜蛋白(OMP)和所述适体之间的亲和力。包埋有适体的检测板被配置在配合标准的、市售聚合物样品瓶的测试盖装置中。将样本与培养液混合，用于孵育并培养任何存在的沙门氏菌以得到可接受浓度的病原体用于测试。然后，可通过无线网络传输所得的信息。



1. 一种使用基于适体的电化学传感器阵列来检测肠道沙门氏菌的装置,其包含:  
传感器基板;  
排列于所述传感器基板上的多个沟槽通道中的电容阵列;  
排列于所述电容阵列中的多个适体分子,所述多个适体分子各自能够结合所述肠道沙门氏菌外膜上的指示蛋白,并且其中使用自装配单层(SAM)方法将每个适体分子固定化到所述电容阵列;以及  
连接到所述电容阵列的印刷电路板,所述印刷电路板包含连接和控制所述电容阵列的元件,并且  
其中所述印刷电路板和电容阵列通过 USB 接口由独立电源直接或间接提供电力。
2. 权利要求 1 的装置,其中位于所述传感器板上的电容阵列被配置于四面包封并在两个末端之一开口于液体流的多个通道中。
3. 权利要求 1 的装置,其中所述多个适体分子各自还包含:  
作为连接到所述适体分子的固定器的衔接体分子;  
连接到所述衔接体分子的氨基-硅烷化层;以及  
连接到所述氨基-硅烷化层和所述电容阵列的  $\text{SiO}_2$  绝缘体。
4. 权利要求 1 的装置,其中所述通过印刷电路板连接和控制所述电容阵列的元件还包括:用于检测由于所述多个沟槽通道的一对之间存在肠道沙门氏菌而导致的所述电容阵列中电容改变的元件。
5. 权利要求 1 的装置,其还包含将用于分析的液体递送到所述电容阵列的递送系统。
6. 权利要求 1 的装置,其还包含连接到所述印刷电路板并由其提供电力的电阻加热元件。
7. 权利要求 5 的装置,其中所述递送系统包含连接到所述传感器基板以确保所述电容阵列上适当的液体流的压电泵。
8. 权利要求 5 的装置,其中所述递送系统包含用于提供无限制的循环液体流通过所述电容阵列的元件。
9. 一种用于测试液体样本中肠道沙门氏菌的方法,包括:  
使包含连接到电容阵列的基片的传感器暴露于所述流体样本;  
使多个连接到所述电容阵列的适体分子暴露于所述样本流体;  
通过所述适体分子接受所述肠道沙门氏菌的外膜;  
检测所述电容阵列中的电变化;并且  
确定所分析的样本流体是否含有肠道沙门氏菌。
10. 权利要求 9 的方法,其中检测所述电容阵列中的电变化包括:检测所述电容阵列中电容值的改变、检测所述电容阵列中阻抗值的改变或者检测所述电容阵列中电容值或阻抗值随时间改变的速率。
11. 权利要求 9 的方法,还包括:通过连接到所述传感器的位于内部印刷电路板上的闪存器,从测试开始记录消耗的总时间和所述流体样本中温度的改变。
12. 权利要求 10 的方法,还包括:在显示器上显示检测所述电容阵列中电变化的方法步骤的结果。
13. 权利要求 9 的方法,还包括:借助递送系统使所述流体样本在所述传感器上循环。

14. 权利要求 9 的方法,还包括:当所述流体样本暴露于所述传感器时加热所述流体样本。

15. 权利要求 10 的方法,还包括:借助 Wi-Fi 网络将检测所述电容阵列中电变化的方法步骤的结果传输到外部计算机。

16. 一种用于测试肠道沙门氏菌的装置,其包含:

样品杯;

包含基于适体的传感器阵列的盖,所述盖活动连接到所述样品杯;以及

包含用于与所述盖连接的元件的底座,其中所述底座含有:

电化学电池阵列;

包含 CPU 和闪存器的印刷电路板;

液晶显示屏;

包含用于电力获取和数据通信的元件的 USB 端口;

包含用于连接到 110V 到 240V 的 AC 或 DC 电源的元件的电力端口;以及

包含用于标准 Wi-Fi 和蜂窝电话频率通信的元件的无线天线。

17. 权利要求 16 的装置,其中所述包含用于与所述盖连接的元件的底座还包括借助 USB 接口活动连接到所述盖中的基于适体的传感器阵列的底座。

18. 权利要求 16 的装置,还包含大小和构造适合用于容纳包括所述底座、所述盖和所述样品杯的装置的防风防雨的外壳,其中所述外壳含有:

太阳能光电池;

连接到所述底座并包含用于从所述太阳能光电池收集电力并将所述电力输送到所述底座的元件的电化学电池;

经底座上的 USB 端口连接到所述底座的外部增强天线;以及

含有用于将所述外壳连接到所述装运容器的外表面的元件的多个连接支架。

19. 权利要求 18 的装置,还包含连接到所述外壳背面的强力永磁体,并且包含用于将所述外壳半永久性连接到含铁表面的元件。

20. 权利要求 18 的装置,其中包含用于将所述外壳连接到装运容器外表面的元件的所述多个连接支架还包含用于使所述外壳配合标准装运容器外表面上一对延伸的瓦楞之间的元件,并且

其中所述外壳的轮廓小于所述标准装运容器外表面上延伸的瓦楞的轮廓。

## 使用电化学适体生物传感器构成检测肠道沙门氏菌的自动化采样装置的方法和设备

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请涉及于 2009 年 4 月 10 日提交的、标题为“采用适体生物传感器构成稳态环(homeostatic loop)的方法和设备”的共同待决的美国专利申请序列号 12/422, 125。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及化学生物传感器领域,具体地涉及电化学适体生物传感器用于自动化原位测试肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)存在情况的用途。

### 背景技术

[0004] 沙门氏菌是一种杆状的、革兰氏阴性的、不形成芽孢的并且大多数能动的肠道细菌属。沙门氏菌是全世界食物传播的疾病的重要原因。在美国每年报告约 140 万例沙门氏菌病例,包括大约 16,000 例住院病例及 550 例死亡病例。沙门氏菌自身与 26% 的导致住院的食物传播的腹泻病例有关。由于沙门氏菌的动物传染特性,即其具有在多个种间传染的能力,因此其对人尤其危险。

[0005] 肠炎沙门氏菌(例如肠道沙门氏菌)可导致腹泻,其通常不需抗生素治疗。但处于危险中的人例如婴儿、HIV 患者、小孩、老年人和免疫力低下的人可变为重病。感染沙门氏菌且具有镰状细胞贫血的儿童可能会发展成骨髓炎。沙门氏菌能引起伤寒症。据世界卫生组织报告,此症每年在全世界感染超过 1600 万人,其中 500,000 到 600,000 例被证明是致死的。

[0006] 沙门氏菌可在活体外存活若干周。紫外辐射和加热可加速其死亡,其在被加热至 55°C (131 °F) 持续 1 小时或至 60°C (131 °F) 持续半小时后死亡。其已在超过 2.5 年的干排泄物中被发现。为保护人群免受沙门氏菌感染,政府和其他规定制定机构已经制定了许多关于食品操作的规定。对于家庭烹饪,推荐将食物在制备食物的中心处于 75°C (167 °F) 下加热至少 10 分钟。沙门氏菌不能通过冷冻破坏。

[0007] 已经有许多尝试来控制食物供应中的沙门氏菌的扩散。对此一种方法是宣传关于正确食品操作和烹饪技巧的信息。这通过关于食品生产、运输和操作的广泛规定和法规实现。

[0008] 食品法规的一个方面是确定食物产品中可接受的沙门氏菌水平。例如,USFDA 已经将水供应中的可接受沙门氏菌水平设定为不高于 3CFU/4gm(www. fda. gov)。

[0009] 特别关注的是由耐多药(MDR)菌株例如肠道沙门氏菌鼠伤寒沙门氏菌(serovar Typhimurium)DT104 或肠道沙门氏菌新港沙门氏菌(serovar Newport)引起的沙门氏菌病。由于耐药菌株的性质,其较其他沙门氏菌的菌株难治疗得多。其对处于危险中的群体例如婴儿和老年人特别具有破坏性。这对于沙门氏菌的MDR菌株尤其如此,因此精确、容易地实施对食物源的测试很重要。这样,可减少或消除病原体到人的初始传播。

[0010] 由于对精确测试沙门氏菌的存在具有巨大需求,所以目前有许多市售的测试

方法。USFDA 有用于测试的指南(参见 USFDA Setting aRisk Threshold for Enteric Diseases in Drinking Water), USDA 也有(参见 Salmonella Testing)。测试通常通过基于 DNA 的方法(例如 GENE-TRAK Colorimetric, 和 PE Applied Biosystems 的 TAQMAN), 通过基于免疫分析的方法(例如 Foss Electric 的 EIA Foss), 通过基于免疫乳剂凝集的方法(例如 May&Baker Diagnostics Ltd. 的 Spectate), 以及有时通过其他生物化学方法例如活动性检测系统(例如 Oxoid 的 Salmonella Rapid Test) 实现。

[0011] 这些测试被广泛使用并且是准确的, 但有些要耗费许多天完成, 且这些测试中的许多并非高度自动化的, 即其全部倚赖技术人员来确定测试结果。此外, 这些测试通常通过实验室富集所述细菌样本、在某个时间点完成。

[0012] 适体以其结合特异性物质的能力而为本领域所熟知。基于核酸的适体还高度稳定。适体特异性通常利用通过指数富集的配体系统进化 (SELEX) 方法来确定。这使得可产生对多种分子的高特异性。现在适体可用作对细胞的标记物和衔接体。适体能够结合于细胞的外膜蛋白并因此用作对细胞的标记物和结合物 (Joshua K. Herr et al., Aptamer-Conjugated Nanoparticles for Selective Collection and Detection of Cancer Cells, Analytical Chemistry, Vol. 78, No. 9, pp. 2918-2924, May 2006)。

[0013] 采用与肠道沙门氏菌结合的适体已经被 Raghavendra Joshi 等人的基本测试证明 (Raghavendra Joshi et al., Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars, Molecular and Cellular Probes, Vol. 23, pp. 20-28, 2009)。在所述实验中, 发现了两种高度特异性的 40-mer 单 DNA 链肠道沙门氏菌适体。

[0014] 通过应用所发现的两个被测序的适体, Joshi 等人能够利用注入适体的磁性颗粒来分离和浓缩样本中的肠道沙门氏菌, 并以此检测肠道沙门氏菌的 7 种不同的血清型(检测灵敏度约 10CFU/gm)。

[0015] 美国专利号 5, 510, 241 (“Thorns”) 公开了一种用于沙门氏菌的测试系统, 但利用了单克隆抗体进行。

[0016] 美国专利号 5, 582, 981 (“Toole et al.”) 公开了适体技术用于结合特异性物质的应用, 但利用了聚合酶链式反应。PCR 测试需要实验室环境和受过训练的技术人员。

[0017] 美国专利号 5, 635, 617 (“Doran et al.”) 公开了沙门氏菌的特异性靶基因和蛋白; 然而, 其未将此用于自动化测试食品中的病原体的方法。

[0018] 美国专利号 5, 712, 17 (“Kouvonen et al.”) 公开了可用于测试病原体的快速免疫测定试条, 但未公开以自动化方式进行的方式, 并且 Kouvonen 的方法还需要受过训练的技术人员来完成测试。

[0019] 美国专利号 5, 840, 867 (“Toole et al.”) 公开了数种可用于靶向的特异性适体序列。然而, 其未公开使用所述序列的具体方法, 也未公开对肠道沙门氏菌膜外蛋白特异的适体。

[0020] 美国专利号 6, 680, 377B1 (“Stanton et al.”) 公开了作为分子灯塔的适体的组合物。由于这不是电化学反馈系统, 因此其需要受过训练的实验室人员和实验室设备。而且, 此篇现有技术未公开用于肠道沙门氏菌的检测系统。

[0021] 本领域需要的是可由普通人员在实验室环境外——特别是在“检验点”, 例如港

口、边界检查点和沿正常贸易路径的称重站——使用来精确原位测试食物样本中沙门氏菌存在情况的高度自动化的、精确的系统。

### 发明内容

[0022] 本公开的发明和方法提供了一种用于测试肠道沙门氏菌的高度自动化的系统。这些测试步骤高度自动化,从而仅需很少的训练就能进行所述检查。此外,本文公开了一种用于测试的方法,所述方法允许在运输货物时无线传输结果,使得可在装载和卸载位置快速进行处理。

[0023] 所述装置的使用首先是取得预先设定的量的市售培养液(例如 BHI 培养液),所述量适合所用的市售标准样品杯大小。然后,根据需要使用时售的无菌汤匙、剪刀、镊子、刀子、玻璃搅棒、移液管、培养皿、试管、弯曲玻璃棒(“曲棍球棒”),将待测项的小物品样本(例如一片鸡肉)放入所述杯中。接下来,将样品杯的容器盖(其中内置适体生物传感器阵列)牢固地放置在所述样品杯的顶端,并将所述杯剧烈摇动一段较短的时间,以使内容物和培养液混合。最后,将所述杯倒置于底座单元之上,其中 USB 端口插入所述盖中并与所述底座牢固地连接。所述测试方法的剩余步骤的完成不再需要人工辅助。

[0024] 在上述的样本制备之后,所述底座允许持续使所述沙门氏菌样本在培养液中孵育至可检测的水平的时间。孵育时间的长度依据环境温度而定。将温度传感器内置于所述盖中的 PCB 中,以此精确测量样本中的温度。基于现有技术中已建立的计算(Vijay K. Juneja et al., Modeling the effect of temperature on growth of Salmonella in chicken, Food Microbiology, Vol. 24, pp. 328-335, 2007),如果孵育循环的温度已知,即可以非常精确地对合适的孵育循环确定所需的时间长度。以此方式,不需要人工控制测试过程中肠道沙门氏菌孵育的温度。

[0025] 合适的孵育期一旦完成,新的基于生物化学适体的生物传感器就被用于测量肠道沙门氏菌的存在情况及其量。本发明使用了固定到电容阵列的结合 DNA 链的适体来完成所述测试过程。固定化的适体具有与所述沙门氏菌的外膜蛋白(OMP)结合的高亲和性和特异性。电容板形成“梳”状结构以形成传感器阵列,其中两个相对的面梳“齿”形成所述电容电路的阳极界面和阴极界面。当取样的源含有肠道沙门氏菌时,所述固定化的适体会结合所述沙门氏菌并将其捕捉在所述电容板之间。对所述板之间的电容进行测量。因为沙门氏菌的存在会改变所述板之间的电容,因此可通过测量电容检测所述样本中沙门氏菌的水平。该方法形成了能够测试具体样本中肠道沙门氏菌存在情况的电化学生物传感器。

[0026] 所述装置由与专门测试装置盖相连的标准聚合物样品杯构成。所述测试装置盖可利用微流体电化学传感器阵列中的肠道沙门氏菌特异性适体,使得测试结果可被预编程的计算机软件确定时间并解释。微流体技术的使用增加了所述适体传感器阵列的灵敏性。

[0027] 该装置使用能够特异性结合肠道沙门氏菌外膜蛋白的适体。本发明所用适体是短(40-mer)DNA 核苷酸序列,它们因其可预测的三维结构折叠特征而具有分子特异性。所述适体可高度特异性地折叠到肠道沙门氏菌特异的外膜蛋白上,以此捕捉沙门氏菌。一旦所述沙门氏菌被捕捉到所述电容板之间,就使用内置固态电路测试所述培养基的电容。基于电容板之间所述培养基的电容的变化,可以测试沙门氏菌的浓度。以下将更详细解释该方法。

[0028] 所述测试装置盖可采用内置于所述盖外表面中的标准通用串行总线 (USB) 接头。所述盖在内部具有适体传感器阵列,所述适体传感器阵列可选地具有内置微型泵以确保测试过程中正确的流体循环。所述适体传感器阵列置于允许对所述传感器阵列进行控制的印刷电路板 (PCB) 中。所述 PCB 还包括温度传感器。通过软件算法周期性地追踪温度传感器读数,以精确地预测所述测试方法的状态。

[0029] 所述装置的基底可利用 USB 接口连接至所述测试装置盖。本发明的底座(base station)中含有无线天线,用于将测试结果通信至通常在装运场处可用的 Wi-Fi 计算机网络。在所述装置的前部存在额外的 USB 接口,使得可借助标准台式计算机通过合适的兼容软件编程所述底座。此外,此 USB 接口可用于连接和升级所述装置,提供用于长时间工作的额外外部电池电源,或者通过上行连接至具有蜂窝电话或卫星电话功能的装置从而提供全球网络对所述测试单元的访问。

[0030] 所述装置的基底可利用标准液晶显示器 (LCD) 屏幕,以可视地输出所述测试步骤的状态和结果,而无需连接至标准个人计算机。PCB 板具有中央处理单元、用于存储的闪存器和为所述装置提供正确运行方案所需的其他部件。在需要时,所述底座还可利用标准可再充电二号 (C size) 电池或类似电池作为电源。用于再充电所述电池的插件装置可位于与所述 LCD 屏幕相邻的底座的前部。

[0031] 通过如下方式使用所述装置:向所述无菌标准样品杯中加入少量市售培养液(例如 BHI 培养液),取下保护所述适体传感器板的可选塑料覆盖物,加入待测试的食品样本,然后将所述测试装置盖牢固地附接至所述样品杯。然后倒置所述杯和盖,并以此取向置于所述底座上。所述底座可使用总是开启的实时时钟。基于环境时间和时间,设计在所述底座中的方案将在合适的时间分析所述样本以确保精确测量。

[0032] 在将所述培养液加入所述样品杯后,加入所述样本。在环境温度下孵育以使细菌量(bacterial load)增加至可测试水平。所述单元的编程允许独立计算测试所述样本中的沙门氏菌量所需的时长。

[0033] 因此,本发明可具有以下一个或多个优点:

[0034] 因此,本发明的一个实施方案提供了带有专门设计的测试装置盖的标准样品杯来测试肠道沙门氏菌的简单且高度自动化的方法。

[0035] 本发明的另一实施方案是,测试肠道沙门氏菌的计算纳入来自所述杯的温度和适体生物传感器数据并在底座装置中实现,并且提供对所述测试步骤的进展的精确测量。

[0036] 本发明的另一实施方案是所述底座装置具有无线功能,以允许原位检查测试数据。

[0037] 本发明的另一实施方案是本发明的装置可由电池供电、由来自货车或小汽车的直流电流供电,或者由壁式插座的交流电流供电,或其他电源供电。

[0038] 在本发明的另一实施方案中,一旦采样过程完成,所述装置可于外部以某种形式附接至装运容器。此形式可为螺栓附接、焊接或磁性附接至容器的外侧。

[0039] 本发明的另一实施方案是所述测试可在第一装运点开始,并且所述测试单元可跟随该货物容器。这样,不管所需的测试时间如何,所述测试时间与所述货物的运送时间重叠。利用此方法,许多装运会在它们到达其目的地之前完成其对沙门氏菌的测试,从而使得所述装运的效率更高。

[0040] 本发明的另一实施方案是可在位于检验点的无线接入点处从所述自动化测试装置采集数据,提供对所述数据的实时访问。此应用用于实践目的的一个实施例如下。运送菠菜(其带有在运输过程中分析样本的装置)的货车司机可驾驶通过存在 Wi-Fi 接入的称重站。在那时,如果认为所述样本被污染,可经由互联网告知装运公司的中心办公室,中心办公室会通知所述货车司机将被污染的菠菜载至另一地点,因为其不再适于人食用。所述分析器单元与中心办公室之间的联系可借助所述底座前部上的 USB 端口将所述底座与移动电话或卫星电话接口连接而进一步加强。

[0041] 本发明的最后一个实施方案是,随时间采集数据,使得肠道沙门氏菌生长的聚集可随每次装运时间而被记录,使得可对于食品腐败进行更细致的研究。

[0042] 尽管为了语法流利,已经或将要对所述设备和方法以功能解释进行描述,但应清楚地理解:除非依照美国法典第 35 篇第 112 节(35USC112)被清楚地阐述,否则权利要求未必被解释为受“方法”或“步骤”含义局限性的任何形式限制,而是要在等同替换的司法解释下适合所述权利要求限定的含义及等同替换的全部范围;并且当所述权利要求依照 35USC 112 清楚地阐述时,要适合依照 35USC 112 的全部法定等同替换。现在通过转到下列附图而更好地显示本发明,其中相同的元件以相同的数字指代。

#### 附图说明

[0043] 图 1 是所述设备的杯和基座的外部透视图。

[0044] 图 2A 是所述装置的样品杯和测试盖的外部视图,示出了所述样品杯盖和所述基底之间的对接孔和 USB 对接端口接口。

[0045] 图 2B 是所述样品杯的另一个部分切开的外部视图,突出了位于所述盖装置内侧上的电化学适体测试位点。

[0046] 图 2C 是所述样品杯的测试盖装置的内部部件的部分切开的侧视图,突出了附接至所述印刷电路板(PCB)上的适体传感器板,以及所述 USB 接口。

[0047] 图 2D 是位于本发明的测试盖装置内的、附有适体电化学传感器板的印刷电路板的整体视图。所述温度传感芯片可见于所述 PCB 上。

[0048] 图 2E 描绘了图 2D 所示的印刷电路板的反面,以及以沙门氏菌传感器编排的电极阵列——形成位于所述电路板上的一系列沟槽电容板。

[0049] 图 3A 是所述基底单元的部分切开的整体视图,可观察到内部可见部件,包括 PCB、无线天线、输出显示屏和数据接口端口。

[0050] 图 3B 是位于装运容器外表面上的用于容纳所述装置的防风防雨外壳的正面透明视图。还示出了另外的电池组和外部天线。

[0051] 图 3C 是在图 3B 中可见的外壳的部分切开的侧视图。

[0052] 图 4A 是图 2E 所示沙门氏菌检测器的电容排布的放大横截面视图。

[0053] 图 4B 是所述沙门氏菌传感器杂交(hybridization)元件的图示。

[0054] 图 4C 是所述沙门氏菌传感器杂交元件的图示,包括其结构和核苷酸序列的图示。

[0055] 图 5 是图 4A 所示电容排布的横截面视图,包括所述电子检测模块的示意图。

[0056] 图 6 是本发明优选实施方案的示意图,描绘了来自所述电容器阵列的等效电极-电解质节点的一个池。



[0057] 图 7 是电容器矩阵阵列的示意图,示出了图 6 所示电路的等效电路。

[0058] 图 8 是所述温度传感器的框图,所述温度传感器是图 1 所示单元的盖配件的部件。

[0059] 图 9 是由图 3A 所示装置的基底中的印刷电路板上的中央处理单元(CPU)进行的计算的示意性框图。

[0060] 现在可通过转到下面优选实施方案的详细描述而更好地理解本发明及其多个实施方案,所述优选实施方案是作为在权利要求书中限定的本发明的说明性实例给出的。应清楚地理解,由权利要求书限定的本发明可能比下述说明性实施方案范围更大。

[0061] 定义

[0062] 除非另有定义,本文所用的所有技术术语和科学术语都具有如本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述方法和材料类似或等同的任何方法和材料均可用于实行或测试本发明,但是现在仅描述这些方法、装置和材料。出于描述和公开在出版物中报告的、可用于本发明的材料和方法的目的,将本文提到的所有出版物均以引用的方式纳入本文。本文任何内容都不应理解为承认本发明无权凭借现有技术而先于这些公开内容。

[0063] “血清变型”或“血清型”是沙门氏菌的血清学变体的缩略形式,是区分不同类型的沙门氏菌的方式。沙门氏菌菌株的具体血清变型是指该细菌基于细胞膜抗原在其属内的个体分类。血清分型通常对于确定种和亚种起重要作用。例如,沙门氏菌属细菌已被确定具有超过 4400 种血清型,包括肠道沙门氏菌鼠伤寒血清变型、肠道沙门氏菌伤寒血清变型(*S. enterica* serovar Typhi)和肠道沙门氏菌都柏林血清变型(*S. enterica* serovar Dublin)。

[0064] “BHI 培养液”是指脑心浸液肉汤,其是一种多用途液体培养基,用于培养来自多种临床材料和非临床材料的需要复杂营养的和非复杂营养的微生物包括需氧菌和厌氧菌。所述培养基中可以添加氯化钠。BHI 培养液可用于培养多种微生物包括细菌、酵母和霉菌。

[0065] “CFU”是菌落形成单位的缩写,其是活细菌生长的一种测量方式。

[0066] 在微生物学中,菌落形成单位(CFU 或 cfu)的测量表示活的细菌或真菌的数量。与直接的显微镜计数(其计入所有的死细胞和活细胞)不同,CFU 只测量活细胞。结果表述为 CFU/mL(每毫升的菌落形成单位,用于液体)或 CFU/g(每克的菌落形成单位,用于固体)。因为本发明使用液体培养基作为孵育介质,所以 CFU/mL 测量值被用于衡量肠道沙门氏菌的密度。

[0067] 本文使用的病原体是指导致其宿主疾病或患病的生物剂。

[0068] 本文使用的电化学是指研究在电子导体(金属或半导体)与离子导体(电解质)界面处的溶液中发生的化学反应的化学分支,其涉及电极与溶液中的电解质或物质之间的电子转移。

[0069] 本文使用的适体是指可与特异性靶分子结合的寡核苷酸或肽分子。

[0070] 本文使用的沙门氏菌是指一种杆状的、大多数能动的肠道细菌的属。其可见于动物、人和非生命生境。

[0071] 本文使用的菌毛是指见于许多细菌表面的毛状附属物。尽管某些研究者保留术语菌毛用于细菌接合所需的附属物,但是术语菌毛和伞毛(fimbria)经常互换使用。所有菌毛均主要由寡聚菌毛蛋白构成。

[0072] 本文使用的 IVB 菌毛是指产生动力的细菌菌毛。

[0073] “Mfold”是指由 Michael Zuker 博士开发的 RNA 和 DNA 折叠包装预测软件,其目前由 Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY 拥有(见 <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>)。Mfold 软件提供 RNA 和 DNA 分子的二级结构预测方法。Mfold 的分析主要依靠热力学方法。

[0074] 分子的“一级结构”在生物化学中定义为对其原子组成和连接所述原子的化学键的确切说明。

[0075] “二级结构”是生物化学和结构生物学中的术语,其定义为生物聚合体例如蛋白质和核酸(DNA/RNA)的局部片段的一般性三维形式。

[0076] 本文使用的单核细胞是指一种类型的白细胞,其是人体免疫系统的一部分。

[0077] 本文使用的电泳是指分散的颗粒在空间均匀电场影响下相对于流体的运动。

[0078] 本文使用的等离子体激元是指等离子体振荡的量子。所述等离子体激元是由等离子体振荡的量子化产生的准粒子,就像光子和声子分别是光波和声波的量子化一样。

[0079] 本文使用的“表面修饰(modification)”是指 Y. Han et al., 2006 详述的过程,该过程描述了制备 SiO<sub>2</sub> 表面,其在室温下以 MeOH/HCl (1/1) 清洗 30 分钟,以超纯水 (Milli-Q Gradient A1018, 2MΩ) 清洗,并以氩气干燥。下一步,将所述表面通过用 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 或者在气相中进行的硅烷化步骤以 NH<sub>2</sub> 基团进行修饰。为进行气相硅烷化,将所述片置于含有几滴硅烷的干燥器中。将所述干燥器密封并加热至超过 100℃,并使所述片在低压(约 1mbar)下与硅烷蒸汽反应 1-2 小时。此技术采用生物相容的支架,提供形成用于粘附的修复材料的可行替代方案。使用被自装配的肽两亲体纳米纤维包被的支架来生长所述衔接体是有利的,因为其大表面积(使得存在对琥珀酰的大量位点)、粘附和生长。(琥珀酰,也称为二氢-2,5-呋喃二酮,是分子式为 C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 的有机化合物)所述包被层的纤维性质使得所述衔接体可通过扩散穿透所述表面,并且所述基质具有足够的表面积和对所述衔接体的暴露。所述衔接体还与氨基-硅烷化结合。(将石英或玻璃晶片(SiO<sub>2</sub>14)的表面用不同的氨基硅烷溶液处理,其中表面密度随着反应时间急剧增加并形成多层)。所述氨基硅烷化支架提供形成用于粘附于所述 SiO<sub>2</sub> 绝缘体表面的修复材料的可行替代方案。

[0080] 本文使用的“适体固定化”是指 Hyun-Seung Lee et al., 2009 详述的过程,该过程描述了固定化,藉此使上述的沙门氏菌 DNA 适体溶解于磷酸盐缓冲液(PB, 200mM, pH 8)以制备浓度为 20mM 的适体溶液。将每个小瓶在室温下孵育 4 小时。此后,加入适体溶液(500 μL)并于室温在 pH 7.5 下孵育。将所得基片依次用磷酸盐缓冲盐水(PBS)和水洗涤。最后,将所述基片进行空气干燥并用原子力显微镜(AFM)分析所述固定化,显示表面厚度因肠道沙门氏菌适体的固定化而平均增加约 3nm。Hwa Sung Lee 等在 Effect of the Phase States of Self-Assembled Monolayers on Pentacene Growth and Thin-Film Transistor Characteristics (J. Am. Chem. Soc, Vol. 130, No. 32, pp. 10556-10564, July 2008) 中还描述了适体包装技术。此外, Ryan J. White 等已发表了对用于检测靶分子的适体密度的研究,发现最适的适体包装密度依据具体的靶物质而不同,较高密度的适体探针并非总是最适于检测的 (Optimization of Electrochemical Aptamer-Based Sensors via Optimization of Probe Packing Density and Surface Chemistry, Langmuir, Vol. 24, p. 10513-10518, 2008.)。具体地,从 White 的文章所示的原理推断,沙门氏菌外膜蛋白的适

体探针包装密度初始将以  $1.2 \times 10^{11}$  到  $4.4 \times 10^{12}$  分子/cm<sup>2</sup> 的范围产生。如果发现其他包装密度更加适合用于检测和将肠道沙门氏菌附着到所述适体传感器板,在不背离本发明的精神和范围的情况下可以使用其他包装密度。

[0081] 使用单链核酸(适体)作为亲和分子用于蛋白结合的概念最初记载于1990年(Ellington and Szostak 1990,1992;Tuerk and Gold1990),其是基于在存在靶下,短序列折叠为以高亲和性和特异性结合所述靶的独特三维结构的能力。Eugene W.M Ng et al., 2006 描述了适体是对于高亲和性结合分子靶而选出的寡核苷酸配体。

[0082] 本文使用的“制造硅绝缘体表面”是指Hyun-Seung Lee et al., 2009 详述的过程,该过程描述了沉积在绝缘外壳 17 内以形成电极 103 的交错阵列的 Au(100 μm) 层。p- 掺杂的硅晶体 15 在所述 Au 导体表面 16 上生长,伴随在 50Torr 的气压和 530℃ 下的恒流 SiH<sub>4</sub> 前体。在此过程中,硅晶体原位掺杂作为 p- 掺杂剂的 B<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, SiH<sub>4</sub>:B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> 的相对压力比为  $10:1 \times 10^{-3}$ 。当所述 p- 基片 15 达到 1 μm 时, SiH<sub>4</sub> 流继续但 B<sub>2</sub>H<sub>6</sub> 流停止。当附加的 Si 层达到 10nm 后, SiH<sub>4</sub> 流停止;温度上升至 820℃ 并且将气室打开至大气压,使得在干空气中氧化以形成 SiO<sub>2</sub> 绝缘层。

[0083] 本文使用的“俘获剂”是能够结合靶分析物或靶试剂的分子或化合物,其可直接或间接附着于基本上为固体的材料。所述俘获剂可为对其存在天然靶分析物(例如抗体、多肽、DNA、RNA、细胞、病毒等)或对其可制备靶分析物的任何物质,并且所述俘获剂在测定中可结合一个或多个靶分析物。

[0084] 本文使用的“靶分析物”是有待于使用本发明在测试样本中检测的物质。所述分析物可为对其存在天然俘获剂(例如抗体、多肽、DNA、RNA、细胞、病毒等)或对其可制备俘获剂的任何物质,并且所述靶分析物在测定中可结合一个或多个俘获剂。“靶分析物”还包括任何抗原性物质、抗体及其结合物。所述靶分析物可包括蛋白、肽、氨基酸、碳水化合物、激素、甾体、维生素、药物(包括出于治疗目的给予的药物以及出于非法目的给予的药物)、细菌、病毒和任意上述物质的代谢物或抗体。

[0085] 本文使用的“靶分析物类似物”是指可与分析物俘获剂交叉反应的物质,尽管其反应程度可能较所述靶分析物本身更强或更弱。所述靶分析物类似物可包括修饰的靶分析物以及所述靶分析物分子的片断或合成部分,只要所述靶分析物类似物具有至少一个与所述目的靶分析物共同的表位位点。

[0086] 本文使用的“测试样本”是指含有有待于使用本发明检测和靶分析物的电解质溶液。除所述靶分析物以外,所述检测样本还可含有其他组分,可具有液体或气体的物理属性,并可为任意大小或体积,包括例如移动的液体流。所述测试样本可含有所述靶分析物以外的任意物质,只要所述其他物质不干扰所述靶分析物与所述俘获剂的结合或第一结合成员与第二结合成员的特异性结合。测试样本的实例包括但不限于:血清、血浆、痰、精液、尿、其他体液,以及环境样本例如地下水或废水、土壤浸出物、空气和农药残留物。

[0087] 作者出于分析和测试所提出设备的目的而使用的“方法和试剂”是基于Hyun-Seung Lee et al., 2009 的论文所提供的信息。出于确定所述方法的目的,使用了未进一步纯化的以下试剂:3-氨基丙基二乙氧基硅烷(APDES)、琥珀酰(SA)、碳酸钠(SC)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)片剂、十二烷基硫酸钠(SDS)、1-乙基-3-[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(硫代-NHS)、氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)

(Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO)。

[0088] 本发明使用的“SELEX”方法是指通过反复选择和扩增循环用随机序列筛选非常大的寡核苷酸文库的技术。

[0089] 本发明使用的“有效传感器几何体”是指所述生物传感器的物理几何体  $G_x$ ，及所述生物传感器以最小体积最大化感测面积的感测结构的排布。等式 1 中描述了所述传感器几何体导致的电容量  $C_{geometry}$ ，使用电介质 ( $\epsilon_r$ ) 作为与所述测试样本中靶分析物浓度相关的变量。

$$[0090] \quad C_{geometry} = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d} \quad (1)$$

[0091] 其中  $\epsilon_r$  是由沙门氏菌、体液、琥珀酰衔接体、氨基杂交物质、 $SiO_2$  绝缘体和 p-Si 基片组成的介质的总相对电容率(介电常量)； $\epsilon_0$  是自由空间的电容率( $8.854 \times 10^{-12} F/m$ )； $A$  是具有长、宽的电极板的总面积； $d$  是板之间的间隔。选择  $A$  和  $d$  的值使得可使用下面的电容测量技术来有效测量电容的变化。

[0092] 例如，如果所述生物传感器的横截面积 ( $d_{cap} \times W_{cap}$ ) 为约  $1cm \times 1cm$ ，其被分成以梳状模式排布的电极板对，将电极板排 (row) 连接以形成两组板。在可选择的实施方案中，在所述电极板结构中可使用手指模式，形成较长的单流体通道。按照上述绝缘体制造方法，一个传感器板的总厚度为  $102.02 \mu m$  (电极、两层 p- 基片、以及两层绝缘体的厚度之和)。  $1cm^2$  的板面积提供约  $10 \mu F$  的电容，可调节所述板的大小  $A$  和所述板之间的距离  $d$  以满足检测电路的要求。等式 1 中的唯一变量是随着沙门氏菌分子与所述表面杂交而变化的总介电常数  $\epsilon_r$ 。

[0093] 所述电化学池的“测量技术”是基于可变电容器池的所述感测原理，其中所述电极/溶液界面模型的介电常数 ( $\epsilon_r$ ) 是变量。在此模型中，所述沙门氏菌外膜蛋白(肠道沙门氏菌适体)在电极与溶液之间引入额外的绝缘层，导致所述界面模型的电容分量的可测量变化。所述基于电荷的电容测量 (CBCM) 技术可测量，所述电极-溶液界面阻抗的电容分量的变化。此 CBCM 技术的测量原理是以合适的频率对所述电化学池充电和放电，并从等式 2 所示的半衰期中的平均电流来测量其等效电容。

$$[0094] \quad I_{avg} = \frac{\Delta Q}{T/2} = \frac{C\Delta V}{T/2} = 2C\Delta V/T \quad (2)$$

[0095] 变量  $\Delta V$  和  $f$  是已知的， $I_{avg}$  可被测量。此测量技术由两个单独的电路构成。运算放大器电压跟随器 (Op Amp voltage follower) 可增大所述电化学池的输入阻抗，使得所述池可由来自微控制器的数字输出信号线的近乎完全的方波驱动。选择所述方波的频率 ( $f$ ) 作为在半衰期中对电化学池中的电容器完全充电和放电的最大频率。所述第二部分通过已知的电阻值  $R_1$  将  $I_{avg}$  转换为电压值，并通过运算放大器进行放大。在运算放大器的输出端， $V_1$  可如等式 3 所示进行计算。

[0096]

$$V_1 = -C_{eq} R_1 \frac{dV_{in}}{dt} \quad (3)$$

[0097] 运算放大器积分电路将瞬时电压值转换为方波,如等式 4 所示。

[0098]

$$V_{out} = -\frac{1}{C_2} \int \frac{V_1}{R_2} dt \quad (4)$$

[0099] 将等式 2 代入等式 3 中,上述输出(作为其输入的函数)可如等式 5 所示计算,导出等式 6。

[0100]

$$V_{out} = -\frac{1}{C_2 R_2} \int -C_{cell} R_1 \frac{dV_{in}}{dt} dt \quad (5)$$

[0101]

$$V_{out} = \frac{C_{cell} R_1}{C_2 R_2} V_{in} \quad (6)$$

[0102] 通过 ADC 采样的输出电压与  $C_{cell}$  的值成比例。

### 具体实施方式

[0103] 所公开的发明和方法提供了一种用于测试肠道沙门氏菌的高度自动化的系统(2)。

[0104] 图 1 以总体示出了整个测试设备的外部视图。底座单元(600)使用内置 LCD(602) 来显示数据。示出的数据的实例是测试进展、当前温度、平均温度、电池的当前电力水平、完成测试的时间和其他这类信息。图 1 示出用于以确定有利的多种频率进行数据通信的连接到底座(600)的无线天线(601),用于将数据和电力传递到外部编程装置例如个人计算机(未示出)的排列于底座(600)上的标准 USB 接口(603),和用于可使用来自 AC 或 DC 电源的电力的也排列于底座(600)上的外部电源接头(604)。无线通信被构想以多种频谱实现,包括标准的 Wi-Fi 801.11b 标准,其通常在 2.4GHz 到 2.4835GHz 频率范围内运行。在可选择的实施方案中,也可以使用无线天线(601)以国际标准的蜂窝电话频率运行,以实现更大面积的无限传输。如图 3Bm 所示,可通过电力端口(604)或经 USB 端口(603)连接另外的外部电池(705)以延长所述装置的电力循环。

[0105] 图 2A 示出了测试装置样品杯(501)和盖(500)。还可观察到排列在盖(500)内将盖(500)连接到底座(600)的 USB 通信端口(406)。

[0106] 图 2B 是图 2A 中所示的用于食物样本的样品杯(501)和容器盖(500)的倒视图。由于在此视图中方向被改变,因此可观察到与盖(500)的底侧连接的沙门氏菌适体传感器(502)。

[0107] 图 2C 示出了容器盖(500)及其内部部件。USB 接口(406)与盖(500)中的印刷电路板(PCB)(400)连接。USB 接口(406)是样品杯盖(500)和底座(600)之间的数据和电力连接点。与盖(500)中的 PCB(400)的底侧连接的有沙门氏菌适体传感器(502)。在可选择的实施方案中,容器盖(500)还包括电阻加热线圈(未示出)。该线圈能够加热所述样品杯中的内容物,以此减少孵育时间(下文中将更详细描述)。

[0108] 测试过程中,盖(500)中的沙门氏菌适体传感器(502)必须浸入培养液中。但是,PCB(400)必须与导电液体例如用于培养肠道沙门氏菌的液体隔离。沿沙门氏菌适体传感器(502)周围设置密封圈(503),其可阻止液体通过适体板(502)和盖(500)之间,用于确保PCB(400)在测试过程中保持干燥和正常发挥功能。在可选择的实施方案中,将图2E所示的绝缘层或绝缘板(17)置于PCB(400)和适体板传感器(502)之间,以防止PCB(400)暴露于样品杯(501)中被测试的物质。可以清楚地理解的是,可通过所述装置中相同的物理部件或通过多个分离的部件实现密封圈(503)和绝缘板(17)的功能。

[0109] 借助本领域技术人员已知的环氧树脂、粘合剂、螺丝、螺栓附接等方式,将所述盖配件的部件连接到一起并连接到定制的盖(500),以形成装配紧密的配件。所述装置的优选实施方案将主要使用塑料配合的夹子(未示出)和环氧树脂连接,以使本发明可实现快速且经济的装配。

[0110] 在本发明的可选择的实施方案中,将小的电加热元件(未示出)连接到盖(500)的内部,但不接触适体传感器板(502),使得它可以在下文详述的测试过程中加热所述样品杯内部的液体。所述加热元件的该用途可通过将样品杯(501)中的内容物加热到孵育可更快发生的水平而实现对所述孵育过程的另外的控制。但是,由于使用另外的电能供应所述加热元件,需要提供能够支持所需的电力输出和持续时间的更大的电化学电池(615)(见图3A)。

[0111] 图2D是如上所述的连接到沙门氏菌适体传感器(502)的PCB(400)的透视图。PCB(400)的功能是作为适体传感器板(502)(最清楚见图2E)与至杯(501)的USB数据和电力接口(406)之间的连接点和通信介质。

[0112] 图2E示出了图2D中所示的适体传感器基板(502)的反面。在图2E中,适体传感器板(502)包含被沙门氏菌传感器包被的电极阵列,形成电容阵列(103)。要注意,电容阵列(103)具有沟槽。在此具体实施方案中,样品杯(501)内无需泵装置来帮助适体传感器板(502)正确流动。

[0113] 在可选择的实施方案中,可在适体传感器板(502)的最内侧的测试表面添加防护性顶板(未示出),以此将传感器“沟槽”变成四面包围的传感“通道”,并在两末端之一开口于液体流。这些传感通道可以是直线的或者类似于图2E所示具有沟槽的电容阵列(103)的形状,或者可以采用在适体传感板(502)表面来回盘绕的“迷宫”形式。

[0114] 应明了,在上述任一实施方案中,在不背离本发明的初始精神和范围的情况下,可加入泵装置(例如压电泵,未示出)来改善液体流动。

[0115] 图3A示出了基底座单元(600)的内部部件的优选实施方案。再次示出了无线天线(601),以及LCD(602)、USB接口(603)和电力端口(604),如前文所述。此外,可观察到基底座(600)中的基底PCB(610),其容纳CPU、闪存器和基底座(600)的其他固态部件。基底PCB(610)起到实现所述装置的其他电子部件之间通信的作用。基底座(600)还包含多个电池(615),其在本发明未接入外部AC或DC电源时提供电力来源。优选可使用2个二号可再充电电池(615),但在不背离本发明的范围的情况下,也可使用其他电池电源或型号。CPU(未示出)起到中心控制点的作用,用于收集和解析来自适体传感器板(502)的数据,以及用于经无线天线(601)或USB数据接口端口(603)传输这些数据。所收集的数据储存在基底PCB(610)上内置的闪存模块(未示出)上。这些部件的结构和使用是本领域技术人员

公知的。

[0116] 图 3B 示出的实施方案是用于保护在户外使用的底座(600)、盖(500)和杯(501)配件的防风防雨外壳(700)。通过使用防风防雨外壳(700),可将所述配件置于装运容器的外表面,使得易于触及所述测试装置而不需费力打开所述装运容器本身。此外,金属装运容器可有效用作置于所述金属装运容器中的任何无线传输装置的法拉第笼(法拉第屏蔽)。如果底座(600)在位于金属装运容器中时尝试将数据无线传输到中心办公室,该传输会被屏蔽或者其传输范围受到很大的限制。防风防雨外壳(700)是通过铰合部(703)连接的,所述铰合部将外壳盖(701)连接到外壳基底(704)。闭锁装置(709)可使外壳(700)以防破坏的方式安全地关闭,并且在本发明的一些实例中可具有锁-钥特征(未示出)。在一个实施方案中,盖(701)的外表面可具有太阳能光电池。该太阳能光电池可直接连接到底座(600)以为其电池(615)充电。或者,可将其连接到位于外壳(700)内的另外的电池(705),然后将所述另外的电池连接到底座(600)以提供另外的电化学能量来源。限定在防风防雨的外壳(700)内的区域(707)可容纳底座(600)、盖(500)和杯(501)配件,以使所述孵育和测试过程可完全在外壳(700)内完成。外部天线(708)用于通过从外部天线(708)连接至基底(600)上 USB 端口(603)来增强所述信号传输。在一个实施方案中,将数据从底座(600)传输到外部天线(708)的同一 USB 端口(603)还可为外壳(700)外表面上的 LCD 屏幕或 LCD 灯(未示出)提供电力。通过连接支架(706),或者通过连接到外壳基底(704)的外底侧面的强力永磁体(未示出),或者通过所述两种方法,将外壳(700)连接到表面。将所述装置的外壳(700)塑形以使其可配合位于标准的 40 英尺金属装运容器的外表面上的沟槽之一中,因此允许所述容器的标准堆积和使用,而外壳(700)不会突出超过所述容器的正常尺寸限。

[0117] 图 4A 示出了排列在沙门氏菌适体传感器板(502)上的电容阵列(103)上通道的宽度(Wcap)(52),以及电容阵列(103)的通道之间的相对距离(Dcap)(51)。如下面将讨论的,这些间隔(51、52)对确定用于感测肠道沙门氏菌(2)的存在情况的正确电容水平是重要的。Wcap(52)必须足够大以允许沙门氏菌(2)容易地通过所述液体通道而不产生阻塞。沙门氏菌是大多数能动的肠道细菌,直径约 0.7 μm 到 1.5 μm,长度从 2 μm 到 5 μm,并且鞭毛伸向各个方向。具有大小为所测试细菌的约 20 倍的 Wcap(52),所述装置避免碎片堵塞所述电容通道,同时基于被测试的液体和材料产生已知抗性。但是,所述测试通道的宽度(Wcap)(52)必须高度一致,以使得穿过所述通道的电容可预测。因此,为测试沙门氏菌,Wcap(52)应当为肠道沙门氏菌大小的最大标准测量值(5 μm)乘以因子 20,或者说 100 μm 的一致宽度。在追求更高的测试效率、建造方便、电力消耗效率和其他性能优点时,本发明具体构想了大于或小于所述量的宽度。在计算所述测试通道的电容时,相对距离(Dcap)(51)是变量,如使用本文中的等式 1 到 3 计算。

[0118] 其他变量也会影响电容板(103)的测试通道的电容。所述生物传感器基于电化学方法,其利用基于生物改良的电极-溶液界面的电容测量值的无标记物检测技术。因此,电容板(103)的总电容可建模为如等式 7 所示得  $C_{cell}$  :

$$[0119] \quad C_{cell} = C_{geometry} + C_{electrode/solution} \quad (7)$$

[0120] 如等式 1 所示, $C_{geometry}$  是依赖所述传感器几何形状的电容。 $C_{electrode/solution}$  是图 6 所示的双层电容 106 和 109,其是两个电极各自与电化学电池 110 的溶液之间形成的。该双

层电容可如等式 8 所示模拟。在等式 9 和 10 中,电极 A 和 B 的  $C_{\text{electrode/solution}}$  以  $C_A$  和  $C_B$  表示。

[0121]

$$\frac{1}{C_{\text{electrode/solution}}} = \frac{1}{C_{\text{insulator}}} + \frac{1}{C_{\text{DNA}}} + \frac{1}{C_{\text{Molecule}}} + \frac{1}{C_{\text{Salmonella enterica}}} \quad (8)$$

[0122] 图 4B 和图 4C 所示部件的目的是将沙门氏菌特异性适体结合分子固定到形成电容板(103)的导电通道的表面。图 4B 是独立固定化的适体结合分子(11)的放大概念图。虽然在本发明优选的实施方案中使用上述现有技术部分的描述中提及的两个适体分子(编号 33 和 45)(Raghavendra Joshi et al.),然而还具体构想了,与本文公开的分子一起或者除本文公开的分子以外,还可以使用具有对沙门氏菌高特异性的其他寡核苷酸适体。肠道沙门氏菌(2)是可见的,其结合域位于外膜蛋白(1)上。作为说明,适体是可结合特异性靶分子的寡核苷酸或肽分子。适体是靶分子特异性的,因为所述寡核苷酸或肽(S. Typhirium 适体是单 DNA 链分子)根据其化学结构和组成以特异的且可预测的三维形状折叠。但是,本发明所用适体分子大小是 40-mer(序列长度为 40 个碱基),并且只使所述适体传感器基底板的厚度增加了约 10nm。相比之下,肠道沙门氏菌的长度通常达到 5  $\mu\text{m}$ ,使得所述细菌的大小比适体结合分子(11)大几个数量级。因此,S. Typhirium 适体(11)必须结合到所述沙门氏菌的外膜蛋白(OMP),所述蛋白在此作为所述肠道沙门氏菌(2)的外膜蛋白上的结合域(1)可见。

[0123] 图 4B 还示出了固定化的肠道沙门氏菌适体(11)的概念图,其经衔接体(琥珀酰)(12)衔接于氨基-硅烷基化分子(13)。氨基-硅烷基化分子(13)连接至  $\text{SiO}_2$  绝缘体(14)、p-Si 基片(15),并最终连接至用于电子界面的导电电极(16)。总之,这些元件构成适体传感器板(502)的最小工作构造。绝缘板(17)将被直接置于盖(500)中的 PCB(400)与适体生物传感器板(502)之间。在本发明的一些实施方案中,绝缘板(17)可与密封圈(503)结合。

[0124] 图 4B 示出了概念化的独立固定化的肠道沙门氏菌适体(11),其代表对肠道沙门氏菌具有高特异性的固定化适体。图 4C 示出了通过 Mfold 分析预测的适体 33 的三维二级结构形式。图 4B 中所示的许多配件也在图 4C 中示出。适体 33 和适体 45 的产生在 Raghavendra Joshi et al. (Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars, Molecular and Cellular Probes, Vol. 23, pp. 20-28, 2009) 中完全公开,所述文献提供了本发明所用的适体 33 和 45 的另外的结构图。

[0125] 使用独立固定化的适体传感器 DNA 链(11)形成生物传感器由 Hyun-Seung Lee et al., (Electrical detection of VEGFs for cancer diagnoses using anti-vascular endothelial growth factor aptamer-modified Si nanowire FETs, Biosensors and Bioelectronics, Vol. 24, pp1801-1805, 2009) 完全公开。本发明遵循 Hyun-Seung Lee et al. 的工作中所用的方法,将适体 33 和 45(其具有肠道沙门氏菌外膜蛋白特异性)替换为具有 VEGF 特异性的适体。本领域技术人员通过替换溶液中的多种适体能够很容易地实现所述替换,以此将所述适体的 5' 末端连接到所述传感器板,并使其 3' 末端游离以结合肠道沙门氏菌目标。使用 Hyun-Seung Lee et al. 公开的技术,可能固定化与传感器板互连的多个基



于 DNA 的适体序列。

[0126] 下述是以上参考文献中详细说明的方法的简要概述。简言之,通过自装配单层(SAM)方法将抗沙门氏菌适体固定化到具有图 4A 所示 p Si 基片层(15)并具有 SiO<sub>2</sub> 绝缘体(14)的导电电极(16)的表面。每个适体(11)使用单独的氨基-硅烷化分子(13)和衔接体(琥珀酐)(12)以最终连接适体分子(11)。这些部件以所述发明的制造方法构建和装配,并使其分层以形成用于检测肠道沙门氏菌生长存在情况的生物传感器板。

[0127] 回到图 5,示出了电容阵列(103)的横截面,给出了所述电子检测模块的示意图。电容阵列(103)含有基片(15),其被配置用于使流体在固定化适体链(11)排成线的电容阵列 103 表面上流动。

[0128] 孵育培养液(例如 BHI 培养液)经重力以及由底座(600)传输时运动产生的任何自然流动流入电容阵列(103)。在可选择的实施方案中,使用小的电子泵(例如压电泵,未示出)来增强液体在电极阵列(103)上的流动。电极板阵列配件(100)包含以电容板(103)上的固定化层中的适体链(11)编排的电极(300)的阵列。将电极(300)设计成“梳”型图案,以在小的体积中最大化所述传感器表面积,同时还最大化流体的自由流动。电极板阵列配件(100)与电容检测器电路(200)连接。检测器电路(200)包含运算放大器缓冲器(201);电流至电压放大器(202),其含有电阻器(204);以及运算放大器整合电路(203),其含有电阻器(205)和电容器(206)。电阻器(205)和电容器(206)的值分别大致与基片(100)的电阻器(204)和电容器相匹配,以使得输出信号(210)与输入方波(207)大致相等。输入方波(207)的半衰期应该显著大于由电阻器(204)和基片(100)形成的 RC 常数,以使得运算放大器(202)有足够的时间消除由方波(207)引起的急剧转变。当电容阵列(103)的电容随着靶分析物(2)的到达而增加时,输出信号(210)的振幅按比例增加。该测量技术的详细机制在上述的定义部分有进一步解释。

[0129] 图 6 是本发明优选实施方案的示意图,描绘了图 2E 中示出的电容器阵列(103)的等效电路,也是图 5 所示检测器电路的可选择实施方案。使用电容阵列(103)和检测器电路(200),适体传感器电极(300)之间的电容改变被用于检测肠道沙门氏菌(2)是否存在。在基于适体的电容性肠道沙门氏菌传感器板(502)的该图中,涂有沙门氏菌特异性的适体分子(103)的电容板通过其各自有效的几何项(geometrical term)G<sub>x</sub>(300)进行鉴定。选择有效的几何项 G<sub>x</sub>(300)的值以便使用电容阵列(103)中所述流体通道的边界条件有效地测量电容的改变。这些边界条件可被测量为以下值的选择:尺度 d<sub>cap</sub>(51)、计算电容值中的所述传感器板之间的距离以及用于计算所述电容值的传感器板的宽度 W<sub>cap</sub>(52)。通过提供无限制的循环液体流通过传感器板(502),具体而言通过由沙门氏菌适体传感器(11)编排的电极(103)的电容阵列(103)形成的通道,可确定这些数值。d<sub>cap</sub>(51)和 W<sub>cap</sub>(52)变量及其用途在图 4A 中最清楚。

[0130] 图 6 继续示出用于增加检测器电路(200)的输入阻抗,并确保来自输入信号的近乎完全的方波(207)的运算放大器缓冲器(201)。由于电路(200)的阻抗,在电路(200)的输出端可检测到电流信号(208),电流信号(208)与所述分析物和所述俘获剂的杂交量成比例。有源放大器(202)将电流信号(208)转变为电压信号(209),电压信号(209)在其曲线下方的面积与所述杂交成比例。

[0131] 此外,图 6 还示出了电路示意图,其由参考标识(110)标注,其包括:电极 A 与测试

样本溶液之间界面的电阻 (RA) (105)、电极 A 与测试样本溶液之间的双层电容 (CA) (106)、传感器体 (100) 内的测试样本溶液的电阻 (RS) (107)、电极 B/ 溶液界面的电阻 (RB) (108), 以及电极 B/ 溶液界面的双层电容 (CB) (109)。排列在传感器板 (502) 上的电容阵列 (103) 与电容检测器电路 (200) 相连接。运算放大器缓冲器 (201) 可增大检测器电路 (200) 的输入阻抗, 并确保来自输入信号的近乎完全的方波 (207)。通过有源放大器 (202), 可在检测器电路 (110) 的输出端检测到电流信号 (208), 电流信号 (208) 与所述分析物和所述俘获剂的杂变量成比例。有源放大器 (202) 将电流信号 (208) 转变为电压信号 (209), 电压信号 (209) 在其曲线下的面积与所述杂交成比例。因为存在肠道沙门氏菌 (2) 时电容阵列 (103) 的电容改变, 通过使用所呈现的电路解读电压信号使得所述装置可测试肠道沙门氏菌的存在情况和水平。

[0132] 图 7 示出了与所述沙门氏菌生物传感器的检测器电路 (110) 等效的电路, 并示出了所述电路如何分解为电容阵列 (103) 中每对电容板 (300) 的模型。每对电容板 (300) 与所述溶液构成电极 - 电解质界面, 其可以以等效电路 (120) 表示。由于所述溶液介质是动态的, 每对板 (300) 的电路在电极和溶液界面 (126) 处被短路。注意检测器电路 (110) 在图 6 和图 7 中都出现。因此, 图 6 和图 7 中示出了几种相同的部件, 相同的部件在图中有相同的识别编号。为清楚目的, 在图 6 和图 7 中对以不同的编号标示的下述部分进行统一描述: 电极 A 与测试样本溶液之间的界面 (RA) (105)、电极 A 与测试样本溶液之间界面的电阻 (RA) (105)、电极 A 与测试样本溶液之间的双层电容 (CA) (106)、传感器体 (100) 内的测试样本溶液的电阻 (RS) (107)、电极 B/ 溶液界面的电阻 (RB) (108), 以及电极 B/ 溶液界面的双层电容 (CB) (109)。通过使用所示示意图, 所述适体生物传感器电容电路能够调节电压的流入和流出, 以此测量电容板 (300) 之间的液体培养基的电阻 (107) 处的电容。该结果被用于确定存在的液体的密度, 并且解读该数据以确定溶液中肠道沙门氏菌 (2) 的存在情况。

[0133] 因此, 整个传感器的等效电路可被写成每对板与其相邻对电并联的组合电路。等式 9-13 使得检测器电路 (110) 的参数可从每对板 (120) 的参数得出。

[0134]

$$C_A = C_{A1} | C_{A2} | \dots | C_{An} = \sum_{i=1}^n C_{Ai} \quad (9)$$

[0135]

$$C_B = C_{B1} | C_{B2} | \dots | C_{Bn} = \sum_{i=1}^n C_{Bi} \quad (10)$$

[0136]

$$R_A = R_{A1} | R_{A2} | \dots | R_{An} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{R_{Ai}}} \quad (11)$$

[0137]

$$R_B = R_{B1} | R_{B2} | \dots | R_{Bn} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{R_{Bi}}} \quad (12)$$

[0138]

$$R_2 = R_1 | R_2 | \dots | R_n = \frac{1}{\sum \frac{1}{R_i}} \quad (13)$$

[0139] 图 8 是位于连接在盖 (500) 内的 PCB (400) 上的温度传感器 (403) 的示意性框图。盖 (500) 中的微控制器 (401) 通过以下操作发挥主控制器的作用: 读取沙门氏菌适体传感器板 (502) 和温度传感器 (403), 然后将此数据写入存在于底座 (600) 中的基底 PCB (610) 上的存储器中。可选的循环泵 (404) 也受微控制器 (401) 的控制, 同时借助从盖 USB 端口 (406) 至底座 (600) 的 USB 通信提供用于杯 (501) 的电源 (405)。

[0140] 图 9 是由基底 PCB (610) 上的中央处理单元 (CPU) (611) 进行的计算的示意性框图。底座 (600) 中的 CPU (611) 通信并控制基底 PCB (610) 的所有方面。经天线 (601) 与外部接收器 (612) 的无线通信允许基于所述适体的沙门氏菌检测系统与中心控制位置例如用于数据采集的外部计算机之间进行通信。与盖 (500) 的盖 USB 通信 (613) 从杯 (501) 中进行的样本分析提供所述输入。此外, 在正常操作时, 通过电池 (615) 提供底座 (600) 的电源 (614)。天线 (601) 和电池 (615) 的应用使得可无绳和无线使用所述装置。最后, CPU (611) 还指令从传感器板 (502) 输入的参数如温度、电容等在显示器 602 上显示。

[0141] 本文所描述的发明被设计为高度自动化, 从而仅需很少的训练就能执行所述检查。例如, 所述装置可安装在运输待测试的货物的容器上。

[0142] 为准备测试循环, 会将培养液以设定量加至杯 (501) 中, 留出足够的空间用于加入食品样本。用于孵育的培养液将是标准的, 并且目前有市售的种类例如 BHI 培养液。可加入另外的富集培养基以增加孵育速度。然后, 按需要使用无菌工具将所述食物样本加至样品杯 (501)。接下来, 通过将塑料薄片覆盖物 (未示出) 从适体传感板 (502) (如果存在) 拉出而使盖检测装置 (500) 待用。随后, 将盖 (500) 牢固置于样品杯 (501) 上, 并将所述密闭的样品杯剧烈摇动约 30 秒。该过程将所述培养液和食物样品完全混合。然后, 将所述密闭的样品杯上下颠倒并置于底座 (600) 中 (如图 1 所示), 以此过程中建立适体传感器盖 (500) 和底座 (600) 之间的 USB 连接。

[0143] 一旦所述食物样本被加入所述培养液中, 并所述样品杯被置于底座上, 就可孵育所述样本以使沙门氏菌 (2) 的存在增加到可测试的水平。

[0144] 所述装置的使用首先是取得预先设定的量的市售培养液 (例如 BHI 培养液), 所述量适合所用的市售标准样品杯 (501) 大小。然后, 根据需要使用市售的无菌汤匙、剪刀、镊子、刀子、玻璃搅棒、移液管、培养皿、试管、弯曲玻璃棒 (“曲棍球棒”) 将待测物品样本 (例如一片鸡肉) 放入所述杯中。接下来, 将样品杯的容器盖 (500) (其中内置适体生物传感器电容阵列 (103)) 牢固地放置在样品杯 (501) 的顶端, 并将杯 (501) 剧烈摇动一段较短的时间, 以使所述内容物和培养液混合。最后, 将杯 (501) 倒置于底座单元 (600) 之上, 其中盖 (500) 中的 USB 端口 (406、603) 与底座 (600) 牢固地连接。如果所述测试阶段使用外部防风防雨容器 (700) 来容纳所述装置, 则可将底座 (600) 及其正确连接的盖 (500) 和样品杯 (501) 置于防风防雨容器 (700) 内部。

[0145] 或者, 可将所述装置与食物样本储存在装运容器内, 与货车司机一起在驾驶室区域, 或者在港口储存所述测试装置的中心办公室。在优选的实施方案中, 总是使所述样本和运输的货物保持位置接近, 以在终点再次测试所述样本。

[0146] 剩余的测试过程不需要人工辅助即可完成。在如上述制备样本和正确储存装置后,底座(600)开始自动化过程,通过该过程测试肠道沙门氏菌(2)的存在情况。从所述过程中此刻开始,所述装置行使功能而不需要物理的外部输入。通过允许持续沙门氏菌样本(2)在培养液中孵育至可检测的水平的时间而开始该过程。通过环境温度确定孵育时间的长度。将温度传感器(403)植入盖(500)中的PCB(400)中,以此精确测量所述样本的温度。基于现有技术中建立的计算值(Vijay K. Juneja et al., Modeling the effect of temperature on growth of Salmonella in chicken, Food Microbiology, Vol. 24, pp. 328-335, 2007),如果知道孵育循环的温度,即可非常精确地确定适当的孵育循环所需时间的长度。以此方式,不需要人工控制测试过程中肠道沙门氏菌(2)的孵育温度。

[0147] 总之,孵育温度越高孵育时间越短。如果为了希望或需要减少孵育时间的目的而人工提高温度,可在盖(500)中使用任选的加热元件(未示出)。

[0148] 适合的孵育周期一旦完成,图4B中详述的基于生物化学适体的生物传感器构型就被用测量肠道沙门氏菌(2)存在情况及其量。该装置使用了固定化到电容阵列(103)上的适体结合DNA链(11)来完成所述测试过程。固定化的适体(11)具有与肠道沙门氏菌(2)外膜蛋白(OMP)(1)结合的高亲和性和特异性。电容板(300)形成“梳”状结构以形成图5所示的传感器阵列(103),其中两个相对的面梳“齿”形成所述电容电路的阳极界面和阴极界面。当取样的源含有肠道沙门氏菌(2)时,固定化的适体(11)会结合沙门氏菌(2)并将其捕捉在电容板(300)之间。对板(300)之间的电容进行测量。因为沙门氏菌(2)的存在会改变板(300)之间的电容,因此可通过测量电容来检测所述样本中沙门氏菌(2)的水平。该方法形成了能够测试具体样本中肠道沙门氏菌(2)存在情况的电化学生物传感器。

[0149] 测试步骤一旦完成,通过底座(600)对结果进行分析、解读、和传输。结果可经由天线(601)在任意Wi-Fi接入点(例如存在于仓库和称重站中的那些Wi-Fi接入点)无线传输。在所述测试步骤完成后,将杯(501)和盖(500)除去,底座(600)可使用新的杯(501)和盖(500)。

[0150] 在任何可能的时候使用标准库存部件,目的是减小所述装置的成本,同时也保持可通过使用标准部件实现的高水平的质量和通用性。

[0151] 所述装置的编程可经由底座(600)上的USB连接(603)完成。其也可通过无线方式完成,以使得从中心办公室对多个装置进行故障排除。所述装置的基底(600)可利用液晶显示器(LCD)屏幕(602)可视地输出所述测试步骤的状态和结果,而无需连接至标准个人计算机。所述装置在中心位置处编程,使得所述装置的现场使用尽可能简化,并且还避免因操作所述控制设备而干预所述装置。所述装置可由任何种类的电源供电,包括电池(615)、来自货车或小汽车的直流电流,或者经由充电端口(604)所附接的外部电池(705),或者通过来自壁式插座的交流电流,或者接至充电端口(604)的其他电源。

[0152] 最后,所述装置实现了以前不可能的简化的对食品腐败的数据采集。由于所述装置可全时运行,并使用实时时钟连同温度传感器,因此所述装置能够在所述装置运输过程中全时记录所述样本内的状况。这种信息在以前是无法获得的,并且这种信息使得可基于时间和温度条件设计关于食品腐败的更高精度预测。

[0153] 综上,本发明实现了可由经简单训练的人员完成的、在运输期间对食物源中的肠道沙门氏菌(2)高度自动化的、精确的测试,而且还提供高精度和合理的成本。此外,所述

装置可随时间采集肠道沙门氏菌(2)的信息并记录此信息,使得可获得更高的精度和更可靠的结果。

[0154] 在不背离本发明的精神和范围的情况下,本领域普通技术人员可进行许多改变和修饰。因此,必须理解,说明性实施方案的描述只是为了举例的目的,而不应被当作对由后文的本发明及其各个实施方案限定的发明进行限制。

[0155] 因此,必须理解,说明性实施方案的描述只是为了举例,而不应被当作对由下文的权利要求限定的发明进行限制。例如,尽管权利要求的要素在下面以某种组合的形式进行陈述,然而必须清楚地理解本发明包括在上面公开的更少、更多或不同要素的其他组合,即使当最初没有要求保护这些组合时也如此。在一个要求保护的组合中两个要素进行组合的教导还应理解为也包括所述两个要素未相互组合,但可单独使用或在其他组合中组合的情形。本发明任何公开的要素的删除明确地被认为在本发明的范围之内。

[0156] 在本说明书中用于描述本发明及其多个实施方案的词语不应仅理解为它们通常限定含义,还应包括超出通常限定含义范围的本说明书结构、材料或动作中的特殊定义。因此,如果要素在本说明书的上下文中可理解为包括一种以上的含义,那么其在权利要求中的使用必须理解为说明书和所述词语自身支持的通用含义乃至所有可能的含义。

[0157] 因此,在本说明书中所限定的以下权利要求的词语或要素的定义不仅包括字面上描述的要素组合,而且包括以基本相同的方式、行使基本相同的功能以获得基本相同结果的所有等同结构、材料或动作。因此,在这个意义上,应考虑到可将下面权利要求中的任一要素等同替换为两个或多个要素,或者可将权利要求中的两个或多个要素替换为单个要素。尽管要素可在上面被描述为在某些组合中起作用,甚至最初也这样要求保护,然而应清楚地理解所要求保护的组合的一个或多个要素可在某些情况下从所述组合中删除,以及所要求保护的组合可指向子组合或子组合的变型。

[0158] 本领域普通技术人员认为的所要求保护主题的非实质性变化——现在已知的或将来所知的——被明确地认为在权利要求的范围内等同。因此,本领域普通技术人员现在或将来所知的明显替换被定义为在限定要素的范围内。

[0159] 因此,权利要求应被理解为包括在上面具体说明和描述的内容、在概念上等同的内容、可被明显替换的内容以及本质上体现本发明本质构思的内容。

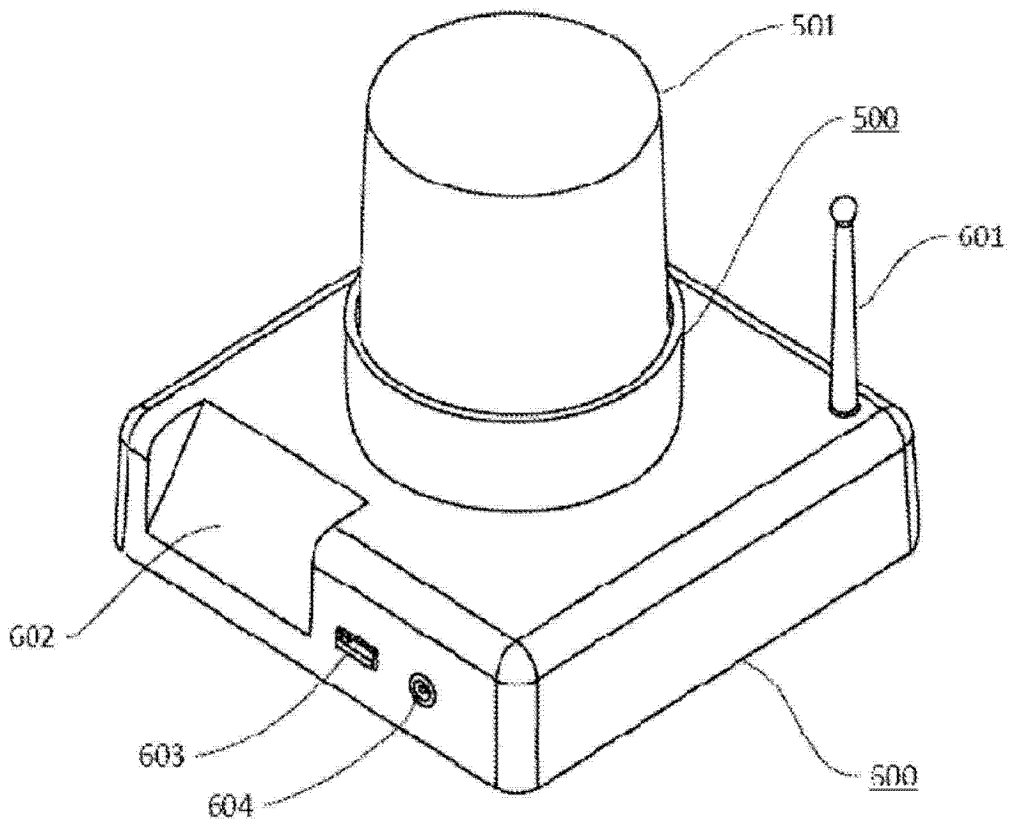


图 1

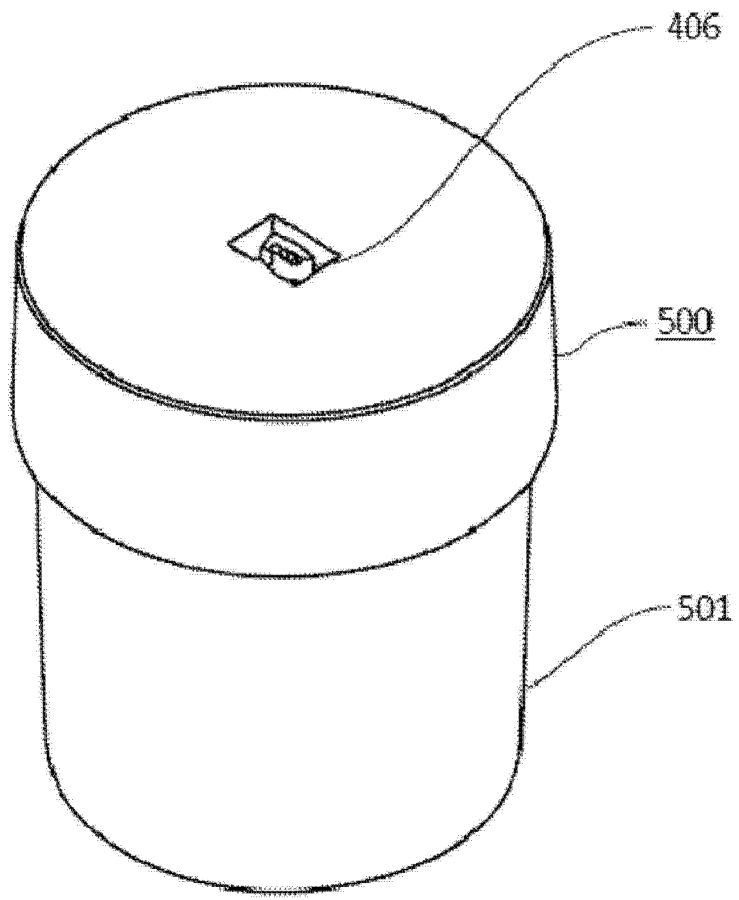


图 2A

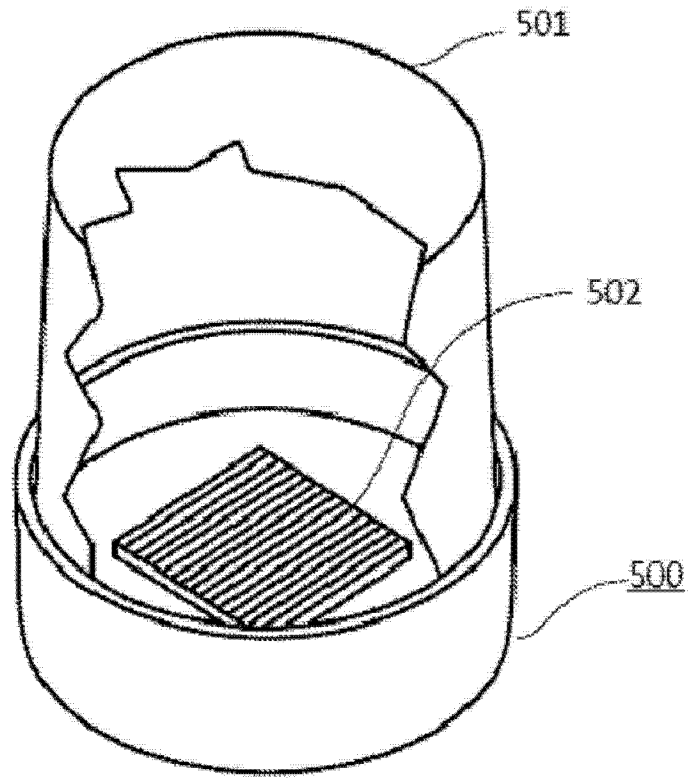


图 2B

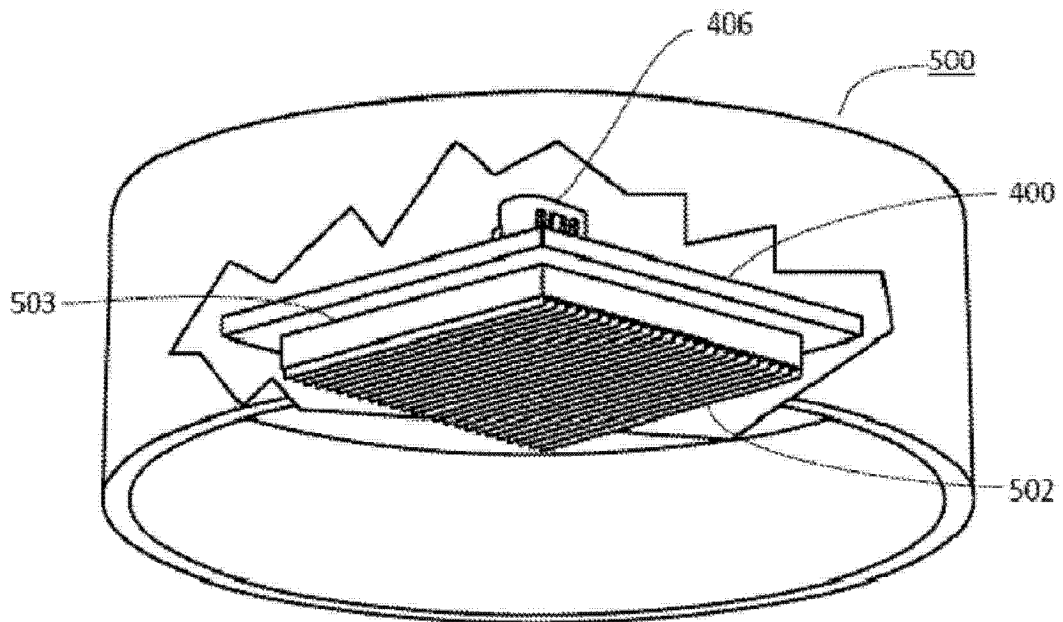


图 2C



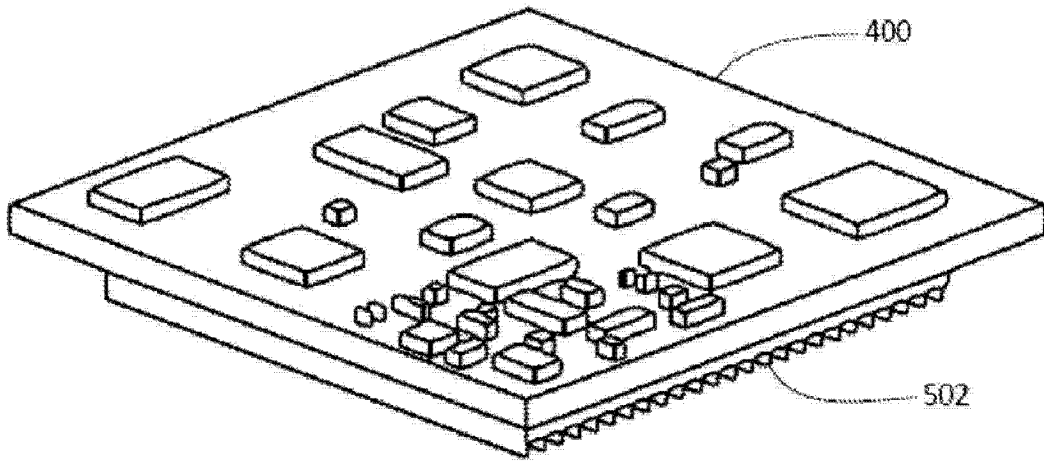


图 2D

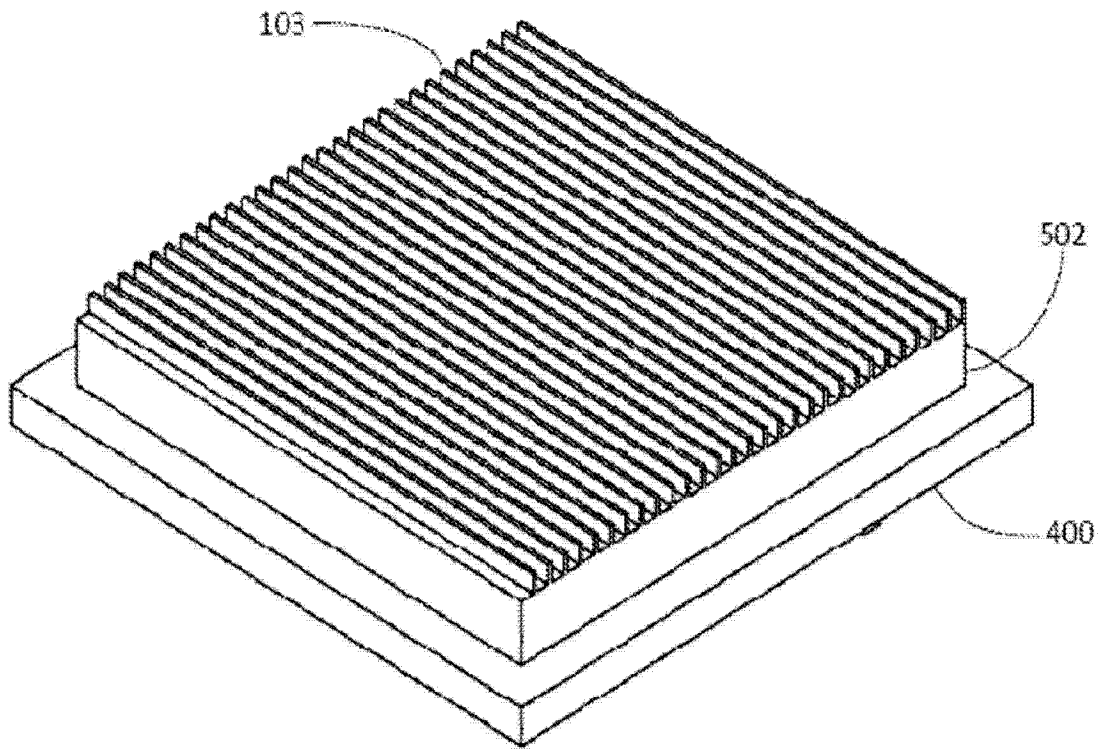


图 2E

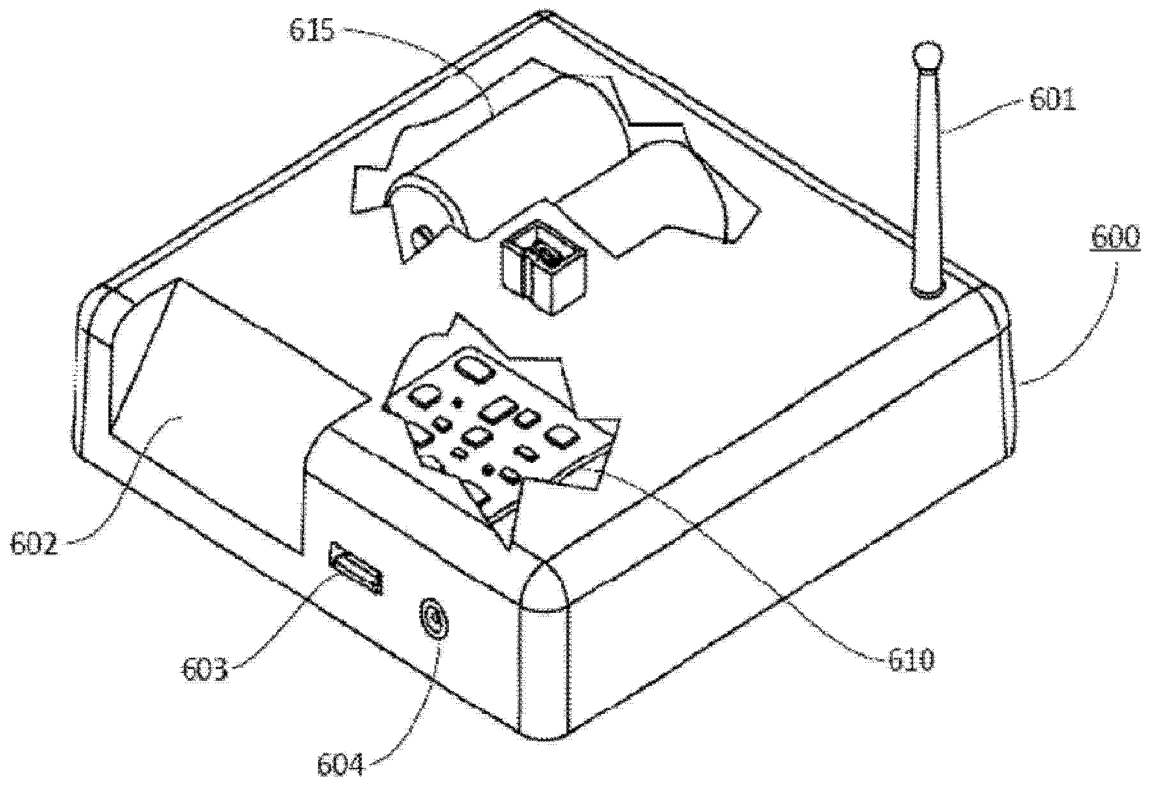


图 3A

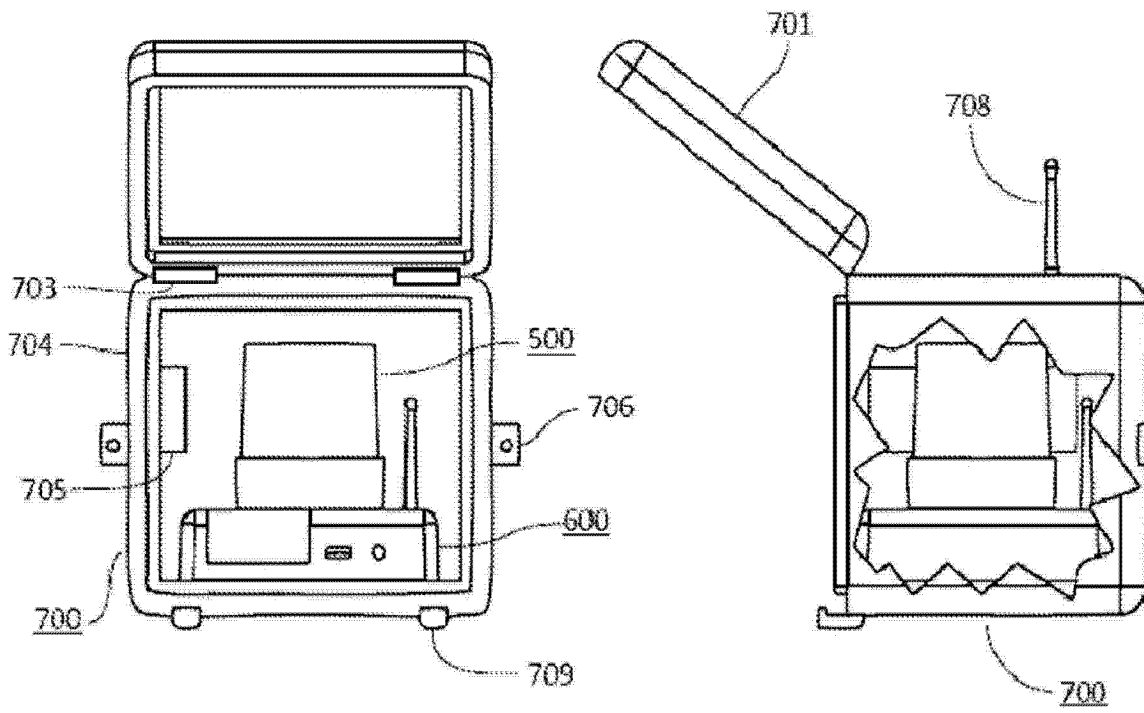


图 3B

图 3C

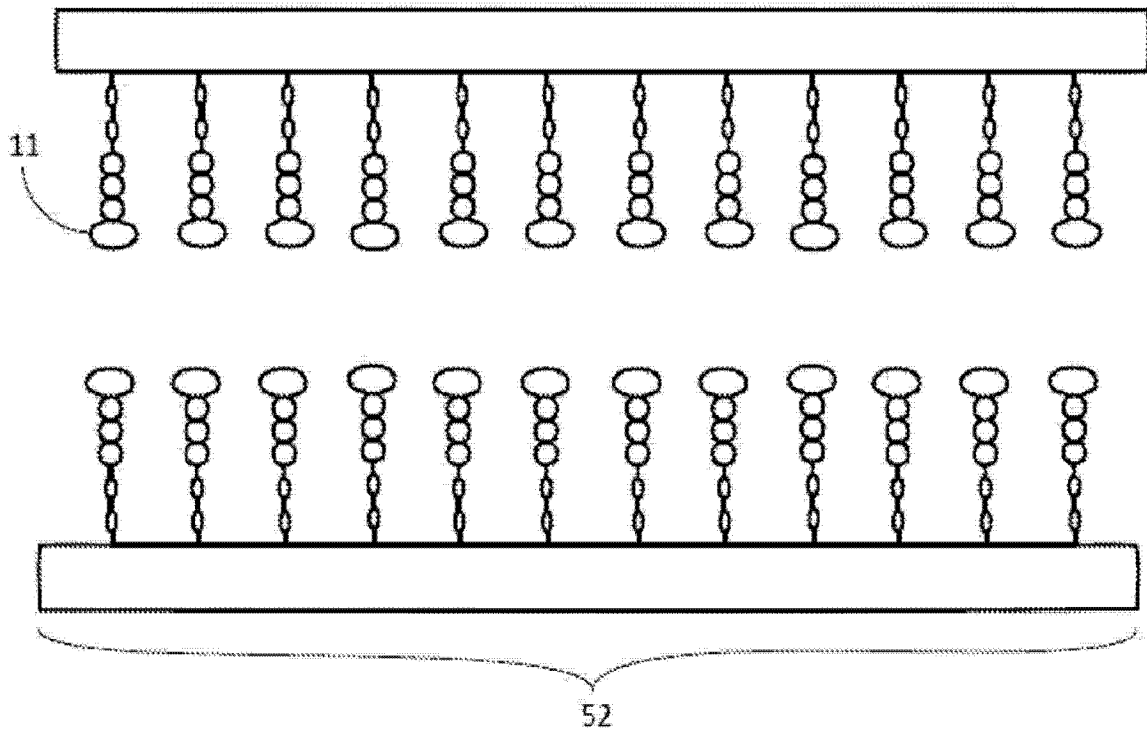


图 4A

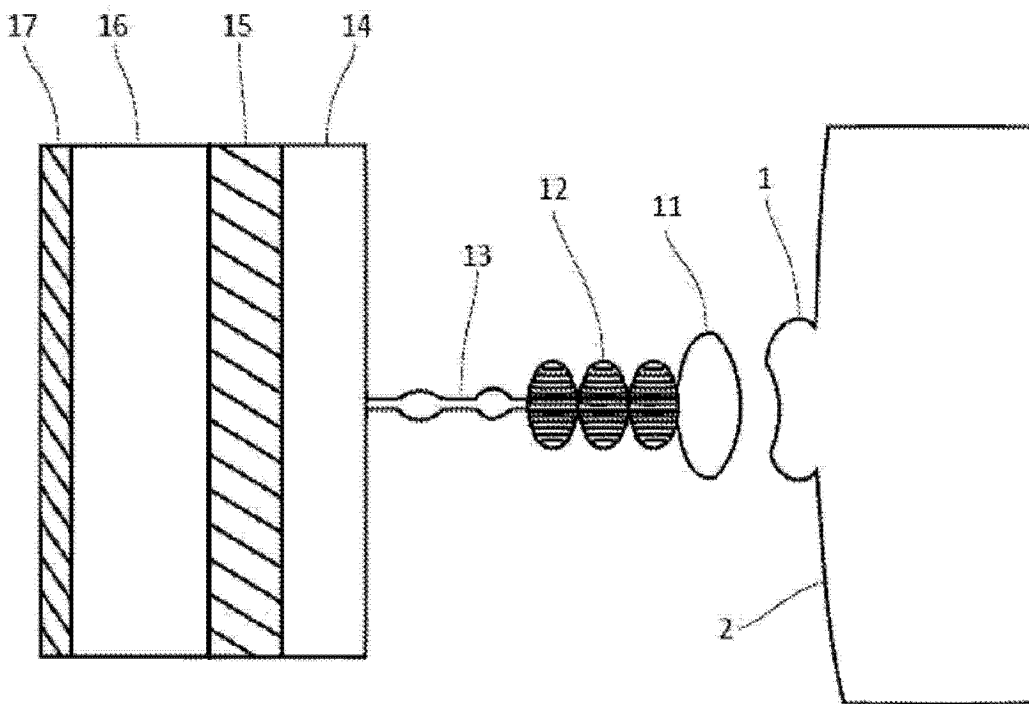


图 4B

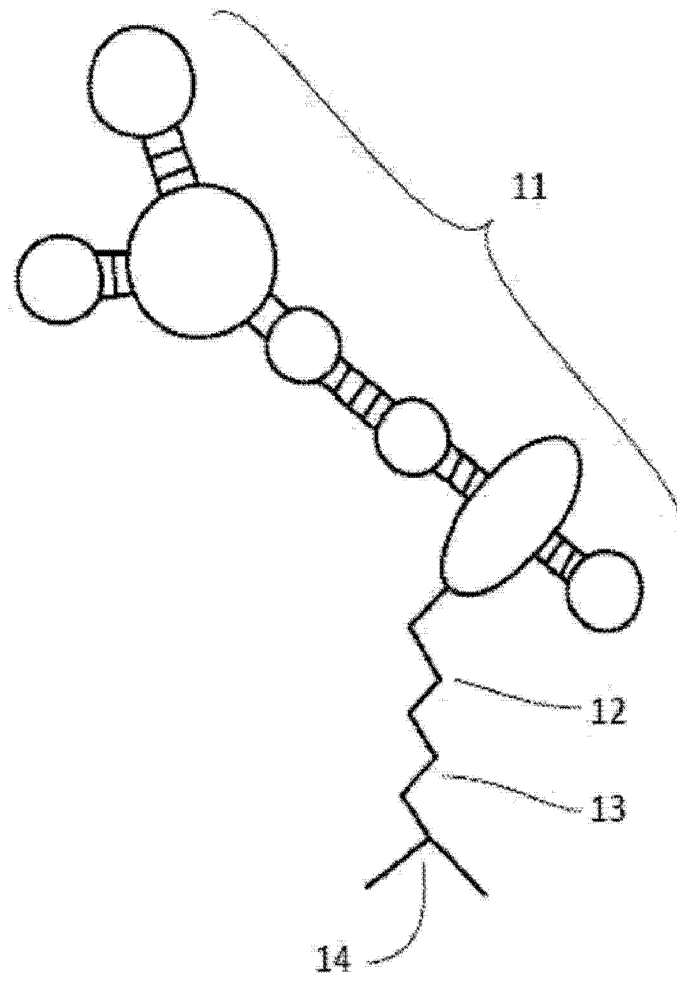


图 4C

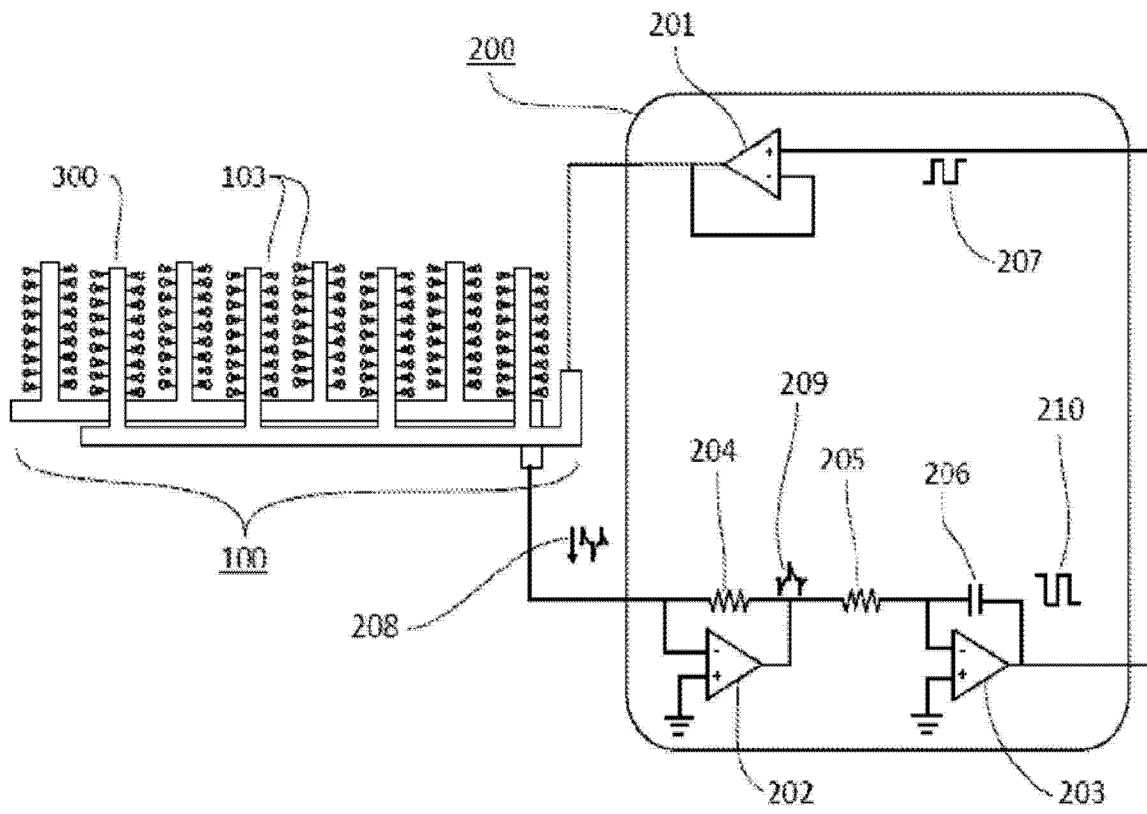


图 5

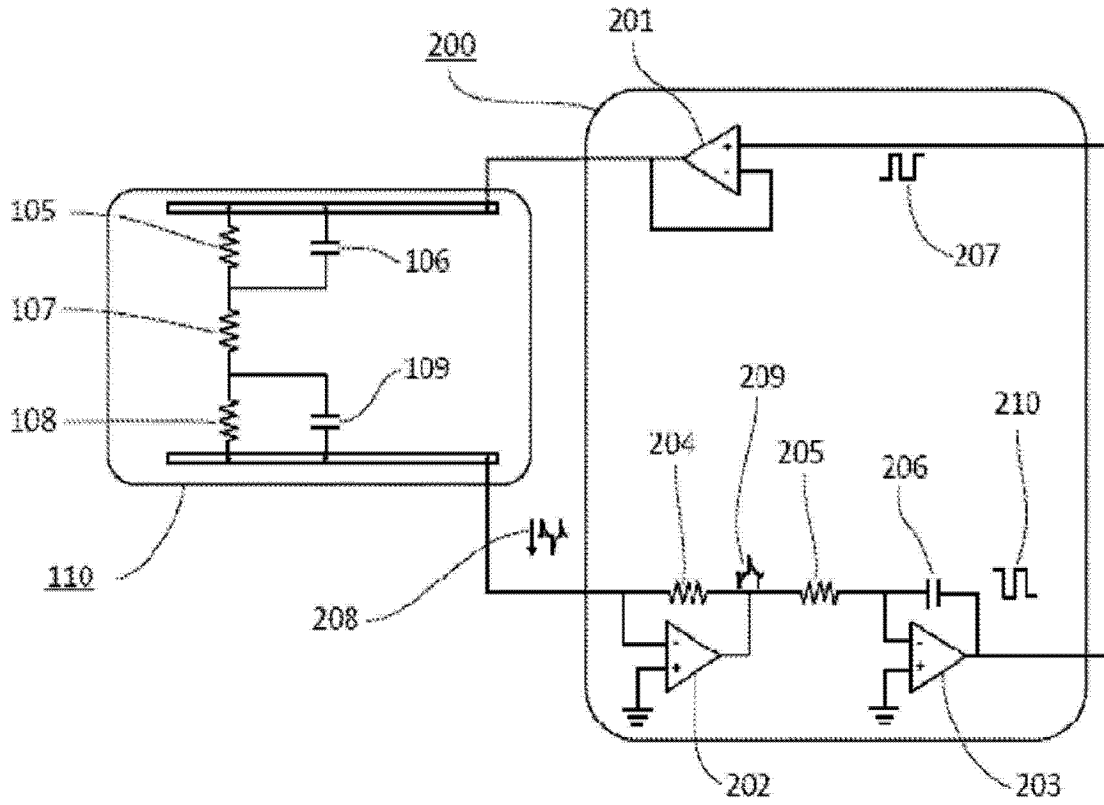


图 6

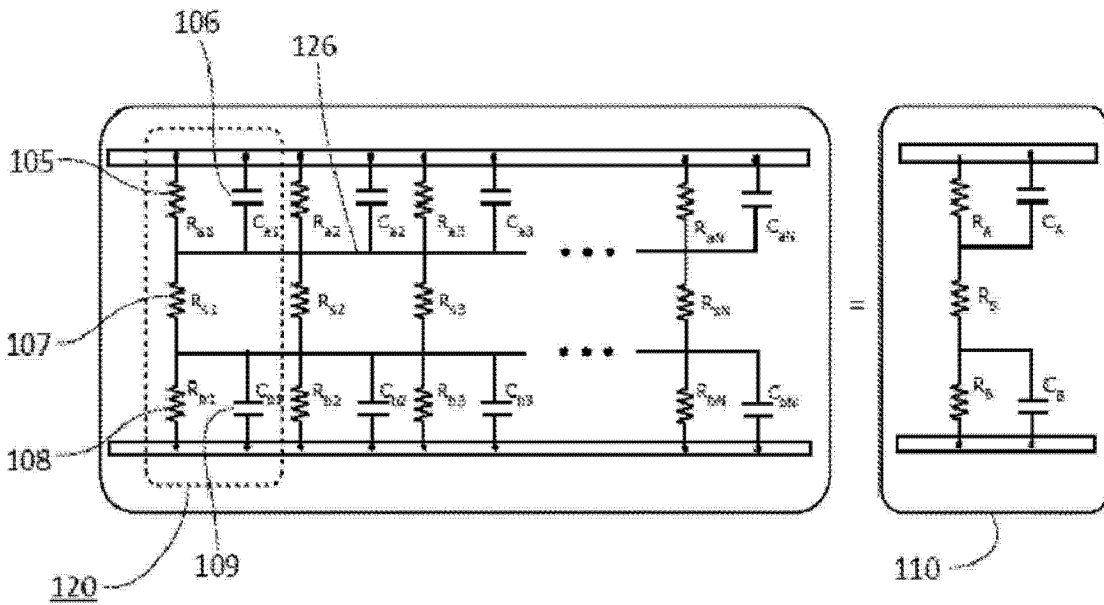


图 7

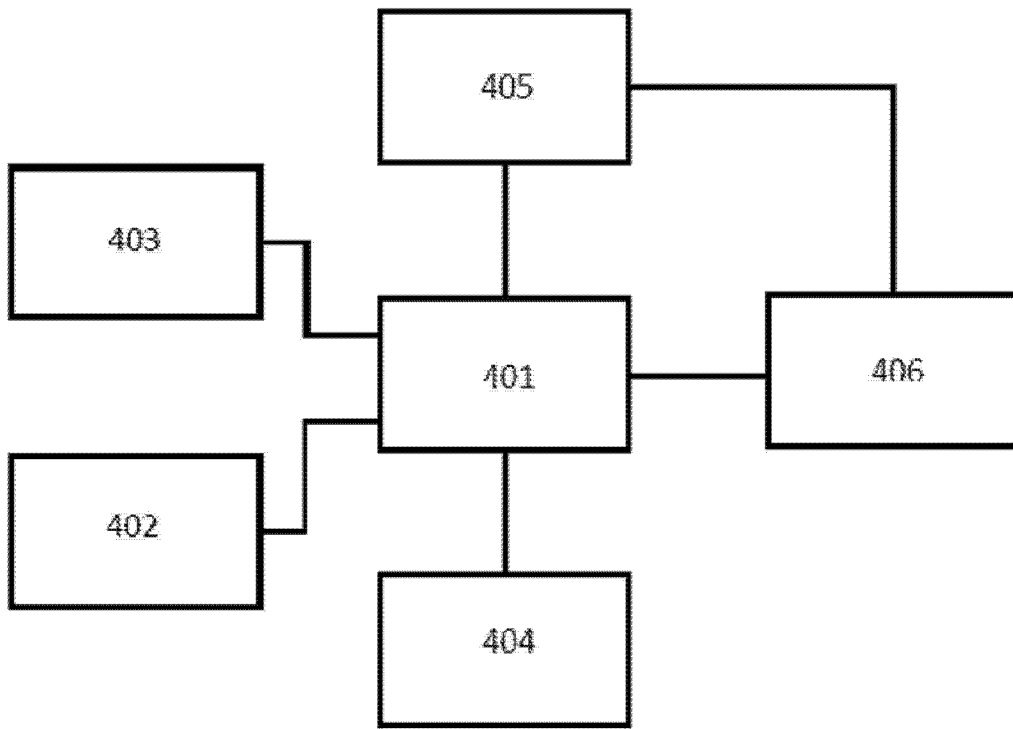


图 8



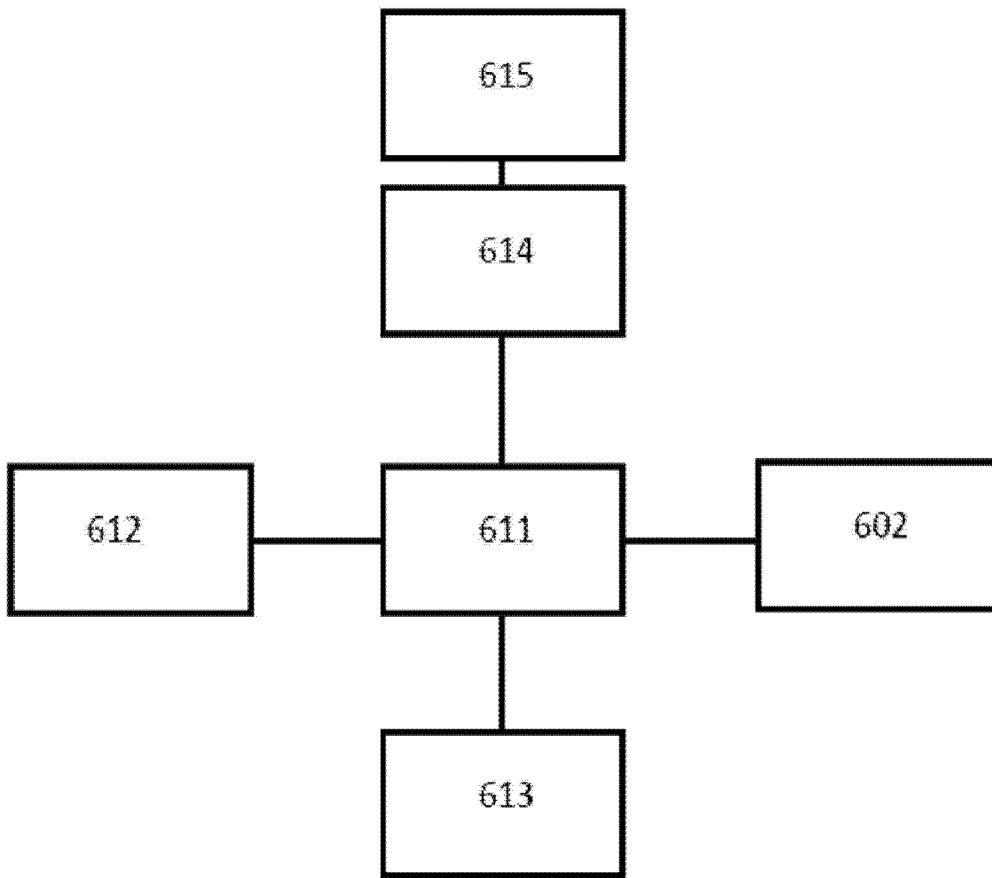


图 9