(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1833032 B
(45)授权公告日 2010.09.08

(21)申请号 200480022212.4
(22)申请日 2004.07.27
(30)优先权数据
202992/2003 2003.07.29 JP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2006.02.05
(86)PCT申请的申请数据
PCT/JP2004/011186 2004.07.27
(87)PCT申请的公布数据
WO2005/010208 JA 2005.02.03
(73)专利权人 独立行政法人科学技术振兴机构
地址 日本埼玉县
(72)发明人 黑田章夫
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 郭文洁 王景朝
(51)Int.Cl.
C12Q 1/48(2006.01)
C12N 9/12(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/00(2006.01)

(56)对比文件
WO 0153513 A1,2001.07.26,全文,尤其是权利要求1-6,第12页第16-25行,实施例6、图5.
JP 2002530087 A,2002.09.17,全文,尤其是权利要求1、5、11、12和20,实施例3.
M. Akiyama et al.The Polyphosphate Kinase Gene of Escherichia coli.THE JOURNAL OF BIOLOGICACL CHEMISTRY267 31.1992,267(31),22556-22561页,全文,尤其是图3.
M. Brune et al.Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (adk) of Escherchia coil.Nucleic Acids Research13 19.1985,13(19),7139-7151页,全文,尤其是图4.

审查员 田园

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图 2 页

(54)发明名称
改良的ATP扩增方法及其应用

(57)摘要

本发明提供的ATP扩增方法,其包括将不含ADP的多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白(PKK-ADK)作用于含有ATP、AMP和多磷酸化合物的混合物,扩增ATP,检测极微量的外源ATP的步骤。还提供可扩增基于ATP扩增的,可检测出单个细胞水平的ATP的超敏感ATP扩增方法,和基于该扩增方法的微生物检测方法。

CN 1833032 B

1. 一种ATP的扩增方法,它包括将从N末端开始顺序具有多磷酸激酶和腺苷酸激酶、且实施了除去ADP处理的融合蛋白作用于含有ATP、AMP和多磷酸化合物的混合物的步骤,其中所述的去除ADP的处理是通过腺苷三磷酸双磷酸酶和焦磷酸处理进行的。

2. 一种ATP的检测方法,它包括将从N末端开始顺序具有多磷酸激酶和腺苷酸激酶、且实施了除去ADP处理的融合蛋白作用于含有ATP、AMP和多磷酸化合物的混合物,扩增ATP的步骤;以及检测所扩增的ATP的步骤,其中所述的去除ADP的处理是通过腺苷三磷酸双磷酸酶和焦磷酸处理进行的。

3. 一种迅速检测微生物存在的方法,包括处理含有微生物的样品制备含有ATP的样品的步骤;将该含有ATP的样品添加到ATP扩增体系,扩增ATP的步骤;以及检测所扩增的ATP的步骤,其中,ATP扩增体系包括AMP、多磷酸化合物及从N末端开始顺序具有多磷酸激酶和腺苷酸激酶、且实施了除去ADP处理的融合蛋白,其中所述的去除ADP的处理是通过腺苷三磷酸双磷酸酶和焦磷酸处理进行的。

4. 一种迅速检测微生物存在的试剂盒,它包括包含AMP、多磷酸化合物及从N末端开始顺序具有多磷酸激酶和腺苷酸激酶、且实施了除去ADP处理的融合蛋白在内的ATP扩增试剂,和用于检测ATP的ATP检测试剂,其中所述的去除ADP的处理是通过腺苷三磷酸双磷酸酶和焦磷酸处理进行的。

5. 权利要求4所述的试剂盒,其进一步包括细胞溶解用试剂。

6. 一种融合蛋白质,其从N末端开始顺序具有多磷酸激酶和腺苷酸激酶、且实施了除去ADP的处理,其中所述的去除ADP的处理是通过腺苷三磷酸双磷酸酶和焦磷酸处理进行的。

改良的 ATP 扩增方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及 ATP 的扩增方法及应用该方法的迅速检测微生物存在的方法，以及用于检测的试剂盒。

技术背景

[0002] 迅速且高灵敏度地检测微生物的方法，例如，预防食物中毒而在食品制造场中检测微生物等环境微生物的控制、食品（例如，牛奶等乳制品）中微生物混入的检测等，在食品业界、酪农业界等中非常重要。以往，应用营养培养基检测活细胞的方法，要几天才能计数生存的微生物。

[0003] 该微生物的检测，是利用所有生物中存在的 ATP 的方法进行检测。作为 ATP 的检测方法，已知有应用虫荧光素酶的生物发光测定方法。该方法是依据测定 ATP 而确立的方法（参照 DeLuea，M.，W.D.McElroy.Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reations.Biochemistry，23：921-925(1974))，可作为迅速的卫生学监控（Bautista，D.A. 等人，Adenosine triphosphate bioluminescence as a method todetermine microbial levels in scald and chill tanks at a poultry abattoir.Poult.Sci.73：1673-1678(1994))。此外，最近有提案将 ATP 测定方法作为反生物恐怖的技术手段（Spencer，R.C.and N.F.Ligntfoot.Preparedness and response to bioterrorism.J.Infect.，43，104-110(2001))。

[0004] 但是，以往的 ATP 测定方法存在检测界限（例如，约 10^4 大肠杆菌菌落形成单位(CFU)/ 测定）。可以说，这样的灵敏度在工业或实际应用中还不足够。

[0005] 通过计算机模拟显示，应用腺苷酸激酶（ADK）和丙酮酸激酶（PVK）扩增 ATP 时，可以不应用高灵敏度的光度计即可检测出非常低水平的 ATP(Chittock，R.S. 等人，Kinetic aspects of ATPamplification reactions.Anal.Biochem.225：120-126(1998)。但是，实际上该方法并未实施。

[0006] 人们设计了扩增 ATP 的方法，用于测定微量的 ATP（特开 2001-299390）。图 1 中说明了特开 2001-299390 号公报中所示的方法。图 1 中，ADK 是指腺苷酸激酶（adenylate kinase），polyP 是指多磷酸（polyphosphate）、PPK 指多磷酸激酶（polyphosphate kinase）。以下，本说明书中有时使用这些缩写。图 1a 表示，在不存在 ATP 的条件下，理论上，AMP 与多磷酸生不成 ADP。图 1b 表示，在存在 ATP 的条件下，ADK 可催化磷酸基团从 ATP 转移到 AMP 的反应，从而生成 2 分子 ADP（第 1 反应）。第 1 反应中产生的 2 分子 ADP，在 PPK 的作用下，可接受来自多磷酸的磷酸基团，生成 2 分子 ATP（第 2 反应）。第 2 反应中产生的 2 分子 ATP 可再次在第 1 反应中使用，产生 4 分子 ADP，这 4 分子 ADP 在 PPK 的作用下可转换成 4 分子 ATP。

[0007] 如同特开 2001-299390 号公报中这样，在过剩的 AMP 和多磷酸存在下，通过调整 ADK 和 PPK 的平衡状态，可分别转向 ADP 生成方向（第 1 反应）和 ATP 生成方向（第 2 反应）。第 1 反应与第 2 反应作为 1 个反应体系，反复进行 n 次，1 个 ATP 可扩增到 2^n 个。因

此，该方法是很好的 ATP 扩增方法。

[0008]　特开 2001-299390 号公报的方法，其灵敏度比以往的水平高，在能检测出细胞的存在这一点上来讲是很好的方法，但是，该方法是理论上讲未出现的 ATP 非存在条件下的 ATP 扩增，低水平时，偶尔可以检测。欠缺可靠的仅检测、扩增外源性（从外部添加）ATP 是其问题所在。也就是说，存在的问题是，其灵敏度确实达不到在单个细胞水平扩增、检测 ATP。此外，还存在调整 ADK 和 PPK 的活性等问题。

[0009]　发明的公开

[0010]　因此，人们期望高效的外源性 ATP 的扩增方法，特别是仅扩增外源性 ATP 的方法，以及应用该方法能检测出 1 个细胞存在的高灵敏度的检测方法。

[0011]　本发明就是以解决上述课题为目标进行的。通过本发明的 ATP 扩增方法，可检测出极微量的 ATP，还可检测出 1 个细胞的存在。

[0012]　本发明提供 ATP 的扩增方法，它包括将多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白作用于含有 ATP、AMP 和多磷酸化合物的混合物的步骤。

[0013]　优选的实施方案中，上述多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白是不包含 ADP 的融合蛋白。

[0014]　另外，本发明提供 ATP 的检测方法，包括将多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白作用于含有 ATP、AMP 和多磷酸化合物的混合物，扩增 ATP 的步骤；以及检测所扩增的 ATP 的步骤。

[0015]　优选的实施方案中，上述多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白是不包含 ADP 的融合蛋白。

[0016]　此外，本发明提供一种迅速检测微生物存在的方法，包括处理含有微生物的样品，制备含有 ATP 的样品的步骤；将该含有 ATP 的样品添加到 ATP 扩增体系，扩增 ATP 的步骤；以及检测所扩增的 ATP 的步骤。该 ATP 扩增体系包括 AMP、多磷酸化合物及不包含 ADP 的多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白。

[0017]　此外，本发明提供一种迅速检测微生物存在的试剂盒，包括包含 AMP、多磷酸化合物及不包含 ADP 的多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白在内的 ATP 扩增试剂，和检测 ATP 的 ATP 检测试剂。

[0018]　优选的实施方案中，试剂盒中还备有细胞溶解用试剂。

[0019]　本发明还提供 ATP 的扩增方法，它是将腺苷酸激酶以及不包含 ADP 的多磷酸激酶作用于含有 ATP、AMP 和多磷酸化合物的混合物。

[0020]　此外，本发明提供多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白，以及不包含 ADP 的多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白。

[0021]　附图简述

[0022]　图 1 是应用 ADK 和 PPK 扩增 ATP 的机制模式图。

[0023]　图 2 表示应用 PPK-ADK 及腺苷三磷酸双磷酸酶处理的 PPK-ADK 进行 ATP 扩增的结果。

[0024]　图 3 表示对含有极微量 ATP 的样品进行 ATP 扩增反应的结果。

[0025]　图 4 表示对含有规定细胞浓度的样品进行 ATP 扩增反应的结果。

[0026]　实施发明的最佳状态

[0027] （融合蛋白）

[0028] 本发明中应用的多磷酸激酶与腺苷酸激酶的融合蛋白（以下，有时称作PPK-ADK），只要其具有PPK活性及ADK活性，对其结合状态无特殊限制。优选N末端包含PPK，C末端包含ADK的融合蛋白。该融合蛋白，PPK与ADK既可直接结合，也可通过间隔片断(spacer)结合。另外，融合蛋白的C末端可附加各种不影响酶表达的标签，对融合蛋白的纯化有用。

[0029] 编码PPK的基因ppk及编码ADK的基因adk，只要这些基因序列确定，对其来源无特殊限制。优选应用大肠杆菌的序列。

[0030] 根据这些基因的序列设计适当的引物，通过进行PCR，可获得各基因序列。

[0031] 作为制备ppk基因的适当引物，例如，优选应用以下引物的组合：(1)具有用于在ppk基因5'末端的上游导入适当的限制性酶识别序列的序列的引物；及(2)具有间隔（例如，甘氨酸）序列，且在间隔部位或其下游导入适当的限制性酶识别序列的序列的引物。将这两种引物作为一对进行PCR，可很容易地获得C末端含有间隔序列、表达PPK的ppk基因片段。

[0032] 作为制备adk基因的适当引物，与ppk基因同样，优选以下引物：(1)具有用于在adk基因5'末端的上游导入适当的限制性酶识别序列的引物；及(2)具有C末端标签（例如，组氨酸）序列，且在C末端标签的下游导入适当的限制性酶识别序列的序列的引物。将这两种引物作为一对进行PCR，可很容易地获得C末端含有标签序列、表达ADK的adk基因片段。

[0033] 上述引物的限制性酶，考虑ppk或adk的基因序列、重组载体的克隆位点来确定。

[0034] 以大肠杆菌的染色体DNA为模板，用上述引物进行PCR，分别用限制性酶酶切所得DNA片段，回收包含ppk基因的片段及包含adk基因的片段。将所得包含各基因的片段，按ppk-adk的顺序，重组到适当的载体中，可获得表达PPK-ADK融合蛋白的重组载体。

[0035] 将所得载体导入到合适的宿主（例如，大肠杆菌）中，通过表达重组载体，可生产出PPK-ADK融合蛋白。对于设计有组氨酸(His标签）的融合蛋白，可应用Hitrap螯合柱(Hitrap chelating column)很容易地纯化、回收。

[0036] 所得融合蛋白PPK-ADK可直接用于ATP扩增反应。但是，如后面所述，在仅测定外源性ATP时，有时不合适。考虑ADP以与PPK结合的状态存在是其原因。在多磷酸化合物存在下，与PPK结合的ADP作为PPK底物，其中ADP通过PPK转换成ATP。也就是说，在图1所示的反应体系中，即便ATP非存在的条件下，首先在第2反应中由ADP生成ATP，然后ATP被第1反应使用，可自动地开始ATP扩增反应。因此，为了仅测定外源性ATP，有必要预先去除与PPK结合的ADP。

[0037] 除去与PPK结合的不纯物ADP，例如，可通过腺苷三磷酸双磷酸酶处理进行。腺苷三磷酸双磷酸酶，可从ATP或ADP除去磷酸基团，生成AMP。腺苷三磷酸双磷酸酶处理优选在适量的焦磷酸存在的条件下进行。通过焦磷酸，可促进与PPK-ADK结合的ADP游离，ADP很容易接受腺苷三磷酸双磷酸酶的攻击。经腺苷三磷酸双磷酸酶处理的PPK-ADK，可再次用Hitrap螯合柱回收。回收的PPK-ADK，即使经腺苷三磷酸双磷酸酶处理，也可维持其各自的活性（即，PPK活性和ADK活性）。

[0038] （应用PPK-ADK的ATP的扩增）

[0039] 本发明的应用PPK-ADK的ATP的扩增是通过将PPK-ADK作用于ATP、过剩的AMP及过剩的多磷酸化合物中进行。也就是说，通过向AMP、多磷酸化合物及PPK-ADK的混合物中添加ATP进行，或者通过向ATP、AMP及多磷酸化合物的混合物中添加PPK-ADK进行。反应形式与图1相同，重复进行图1中所示的第1反应和第2反应，使ATP得到扩增。

[0040] ATP的扩增在适当的缓冲液中、适当的温度（例如30～40℃）、适当的时间（例如，5分～2小时）进行。认为ATP微量存在时，优选进行1小时的扩增反应。

[0041] 作为多磷酸化合物，可应用多磷酸或其盐。优选应用10～1000个磷酸，优选应用10～100个磷酸直链聚合的化合物。多磷酸既可来源于细菌，也可化学合成。或者，应用多磷酸合成酶从ATP合成。

[0042] (ATP的检测）

[0043] 扩增出的ATP的检测方法，可使用业内人士常用的方法，无特殊限制。通常，通过荧光素酶与ATP的反应来测定荧光发光量进行。例如，应用商品化的应用荧光素酶的ATP测定试剂盒。

[0044] （迅速检测微生物存在的方法）

[0045] 该方法着眼于所有生物的细胞中包含ATP，该方法是从含有微生物的样品中制备含ATP的样品，应用上述ATP扩增方法，扩增、检测ATP的方法。通过应用去除了ADP的PPK-ADK，可仅测定外源性ATP。例如，由于能扩增到可检测1个细胞中所含ATP的水平，所以可检测微生物的存在。以往的方法，每1次测定，检测界限是10^4个集落形成单位(CFU)的大肠杆菌，考虑到这些，该方法至少提高到其10000倍。

[0046] 微生物中也有ADP。应用去除了ADP的PPK-ADK时，向本发明的扩增体系中加入ADP，ADP即转换成ATP，ATP的扩增反应就开始了。因此，为了检测微生物而进行的前处理中，即便ATP分解成ADP也不影响本发明的灵敏度，从这一点上讲，这是本发明的优势。以下，微生物检测中，当言及测定的ATP样品时指样品中包含ADP。

[0047] 对从含有微生物的样品中制备含有ATP的样品的方法无特殊限制。虽然可用溶解细胞的方法，但考虑到细胞中包含的PPK、ADK等酶的影响，可进行加热处理溶出ATP。最优选应用溶解细胞，使ATP溶出，然后进行使其它酶失活的加热处理方法。加热处理，例如，100℃、进行1～5分钟。细胞溶解处理，例如，应用商品化的ATP测定试剂盒中附加的溶解缓冲液进行。

[0048] 将进行ATP溶解处理而得到的认为含ATP的样品加到AMP、多磷酸化合物及PPK-ADK的混合物中，进行ATP扩增反应。应用，例如应用荧光素酶的ATP检测方法检测ATP的存在。若样品中含有ATP则与荧光素酶进行反应，可观察到荧光。由于ATP得到扩增，所以没必要要求高灵敏度的发光分析器。

[0049] 本发明还提供用于迅速检测微生物存在的试剂盒。也就是说，本发明提供包括AMP、多磷酸及不包含ADP的PPK-ADK的ATP扩增试剂，以及包括ATP检测试剂的检测ATP的试剂盒。该试剂盒中还包括溶解细胞用的试剂。溶解细胞用的试剂，根据作为溶解对象的细胞（例如，微生物，体细胞等）的不同而改变其组成成分。

[0050] 将认为含有微生物的样品进行加热处理，添加到该试剂盒中的ATP扩增试剂中，进行适当时间的扩增反应，然后用ATP检测试剂确认ATP的存在，由此迅速确认微生物的存在。通过应用进行ADP处理而得到的PPK-ADK，该方法还可能仅检测出外源性的ATP。作为

ATP 检测试剂，一般指应用荧光素酶荧光素反应体系的试剂，术语“ATP 检测试剂”还包含生物发光（荧光）测定器。

[0051] （应用 ADK 及不包含 ADP 的 PPK 的 ATP 扩增）

[0052] 另外，本发明提供扩增 ATP 的方法，它包括将 ADK 及不包含 ADP 的 PPK 作用于 ATP、AMP 及多磷酸的混合物。不包含 ADP 的 PPK 基因。例如可用与上述融合蛋白同样的方法进行制备。简而言之，应用使 ppk 基因 5’末端上游具有适当限制性酶识别序列的引物，和具有 His 标签序列、且使其下游具有适当限制性酶识别序列的引物，回收包含能表达具有 His 标签的 PPK 的 ppk 基因的 DNA 片段。将所得 DNA 导入适当的载体内，得到重组载体，将其导入大肠杆菌中，表达 PPK。用 Hitrap 螯合柱生成 PPK，在焦磷酸存在下对其进行腺苷三磷酸双磷酸酶处理，再度加到 Hitrap 螯合柱上，回收除去了 ADP 的 PPK。通过图 1 所示的反应体系，该 PPK 可提供给仅扩增、检测外源性 ATP 的方法。

[0053] 实施例

[0054] 以下，列举实施例说明本发明，但本发明并不限定于这些实施例。

[0055] 该实施例中，AMP 及 ATP 分别购自和光纯药（大阪）及 Sigma。用 0.2M KCl 及 1% EDTA(pH10) 作为溶剂溶解 AMP，用 TSH 胶 SAX 柱 (TOSOH) 再进行纯化。多磷酸用平均链长 65 的多磷酸 (Sigma)。生物发光测定试剂盒 (CLSII) 包含荧光素和荧光素酶，从 Roche 购入。腺苷三磷酸双磷酸酶购自 Sigma。

[0056] （实施例 1：PPK-ADK 的制备）

[0057] 从大肠杆菌 (E.coli) 获得的编码多磷酸激酶的基因 (ppk)（参照 Akiyama，M 等人 .The polyphosphate kinase gene of Escherichia coli.Isolation and sequence of the ppk gene and membrance location ofthe protein.J.Biol.Chem.267：22566-22561(1992)）的引物如下：

[0058] GGATCTAGATGAATAAAACGGAGTAAAAGT（序列号 1），及

[0059] GGAGGATCCGCCGCCGCCGCCTTCAGGTTGTTCGAGTGATTT（序列号 2).

[0060] 序列号 1 中的引物具有在 ppk 基因的 5’末端导入限制性酶 XbaI 识别序列的序列 . 序列号 2 中 4 个甘氨酸是为了附着到 PPK 的 C 末端而设计的，且具有在 3’末端导入限制性酶 BamHI 识别序列的序列。

[0061] 获得大肠杆菌编码腺苷酸激酶基因的基因 (adk))(Brune，M. 等人，Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene(adk)ofEscherichia coli.Nucleic Acids Res.13,7139-7151(1985)）的引物如下：GGAGGATCCATGCGTATCATTCTGCTTGGC（序列号 3），及 GGAAAGCTTGCCGAGGATTTTTTCCAG（序列号 4）。

[0062] 序列号 3 的引物具有在 adk 基因的 5’末端导入限制性酶 BamHI 识别序列的序列。序列号 4 的引物是为将 C 末端标签组氨酸附着到 ADK 的 C 末端而设计的，且具有在 3’末端导入限制性酶 HindIII 识别序列的序列。

[0063] 以大肠杆菌的染色体 DNA 为模板，应用上述引物，按常规方法进行 PCR，分别获得包含 ppk 基因和 adk 基因的 DNA 片段。将所得含 ppk 基因的 DNA 片段，导入 pGEMT 载体 (Promega) 中，获得 pGEMTppk。将所得含 adk 基因的 DNA 片段，导入 pGEMT 载体 (Promega) 中，获得 pGEMTadk。

[0064] 用 XbaI-BamHI 处理 pGEMTppk 而得 2.1kb 的片段，用 BamHI-HindIII 处理 pGEMTadk

而得 0.6kb 的片段，将两个片段与 pET 载体 (Stratagene) 的 XbaI-HindIII 消化物连接，构建质粒 pETppkadk。该质粒含有编码 PPK 和 ADK 的融合蛋白的基因，PPK 与 ADK 介 4 个甘氨酸结合，C 末端具有 His 标签。

[0065] 将质粒 pETppkadk 导入大肠杆菌 (E.coli BL21)，将所得转化体培养 2 小时，然后将 1mM 的 IPTG 添加到培养基中。培养 4 小时后，离心收集转化体，悬浮到含 0.5M NaCl 的 20mM 磷酸缓冲液 (pH7) 中。用 B-PER 溶液 (Pierce) 溶解细胞，然后在 1mM PMSF 存在下，用 DNase 和 RNase 处理。离心，获得上清，用 0.2μm 滤膜过滤，然后加到 Hitrap 螯合柱 (Amersham Bioscience) 上。用 0.1M 焦磷酸、20mM 磷酸、0.5M NaCl、50mM 咪唑及 20％甘油 (pH7.4) 洗柱。用 0.1M 焦磷酸、20mM 磷酸、0.5M NaCl、0.5M 咪唑及 20％甘油 (pH7.4) 洗脱 PPK-ADK 融合蛋白。

[0066] 所得 PPK-ADK 融合蛋白具有 ADK(43U/mg) 和 PPK(38U/mg) 的活性，由 AMP 和多磷酸可生成 ATP。1 单位的 PPK、37℃可由 ADP 和多磷酸合成 1.0μmol/ 分的 ATP。1 单位的 ADK、37℃可由 ADP 合成 1.0μmol/ 分的 ATP。

[0067] 制备含 0.16μg PPK-ADK、10μM AMP、400μM 多磷酸、8mM$MgCl_2$ 及 60mM Tris-HCl(pH7.4) 的混合液 50μl，取 5μl 的反应液，与 40μl 的 ATP 生物发光测定试剂 (Roche) 混合，立即，用多板荧光测定仪 (ARVO Wallac) 测定荧光强度。

[0068] 如图 2PPK-ADK 所示，在不含 ATP 的反应体系中，ATP 发生扩增，可观察到荧光。探讨其原因时发现，ADP 与 PPK 结合，在 PPK 的作用下，ADP 发生最初图 1 所示的第 2 反应，生成 ATP，提示有可能这样 ATP 得到扩增。

[0069] (实施例 2：除去与 PPK-ADK 结合的 ADP)

[0070] 为了去除实施例 1 中获得的与 PPK-ADK 结合的不纯物 ADP，在 60mM Tris-HCl(pH8)、8mM $MgCl_2$ 和 10mM 多磷酸存在下，180μg PPK-ADK 与腺苷酸双磷酸酶 (apyrase)(200U) 反应 1 小时。反应终止后，再用 Hitrap 螯合柱，回收去除了 ADP 的 PPK-ADK。以下，PPK-ADK 是指用腺苷酸双磷酸酶处理了的 PPK-ADK。1 单位的腺苷酸双磷酸酶，可从 ATP 或 ADP、30℃游离 1μmol 的磷酸。

[0071] 制备含 0.16μg 经腺苷酸双磷酸酶处理了的 PPK-ADK、10μMAMP、400μM 多磷酸、8mM $MgCl_2$ 及 60mM Tris-HCl(pH7.4) 的混合液 50μl，取 5μl 的反应液，与 40μl 的 ATP 生物发光测定试剂 (Roche) 混合，立即，用多板荧光测定仪 (ARVO Wallac) 测定荧光强度。

[0072] 如图 2 所示，用经腺苷酸双磷酸酶处理了的 PPK-ADK 进行反应，反应 60 分钟后未观察到荧光。虽然图中未示出，向该反应液中加入 ATP 时，可观察到荧光。由此可以判断：腺苷酸双磷酸酶处理，未影响 PPK-ADK 的 ADK 活性及 PPK 活性；以及经腺苷酸双磷酸酶处理去除不纯物 ADP 的结果是看不到内源性 ATP 增加。因此，认为通过添加 ATP 而观察到的荧光是纯粹的外源性 ATP。因此，经腺苷酸双磷酸酶处理了的 PPK-ADK(不含 ADP) 对外源性 ATP 的测定极其有用。

[0073] 进行腺苷酸双磷酸酶处理时，PPK-ADK 吸附到 Hitrap 螯合柱及从同一柱子进行洗脱时，优选向洗涤缓冲液和洗脱缓冲液中添加焦磷酸。0.1M 焦磷酸具有从 PPK-ADK 游离出 ADP 的效果，对除去 ADP 很有效。

[0074] (实施例 3：超高灵敏度生物发光测定法)

[0075] 制备含 0.16μg 经腺苷酸双磷酸酶处理了的 PPK-ADK、10μMAMP、400μM 多磷酸、

8mM $MgCl_2$ 及 60mM Tris-HCl(pH7.4) 的混合液 48μl，然后向该混合液中添加 2μl 的 ATP 样品，扩增 ATP。随反应进程取 5μl 的反应液，与 40μl 的 ATP 生物发光测定试剂 (Roche) 混合，立即，用多板荧光测定仪测定荧光强度。测定的荧光与不进行 ATP 扩增 (不添加 PPK-ADK) 的情况进行比较。荧光值表示不同 3 次测定的均值 ± 标准差。荧光随时间变化的增加如图 3 所示，60 分钟后 ATP 扩增的结果如表 1 所示。

[0076] 表 1

[0077]

ATP (fmol)	荧光 (rlu)	
	ATP扩增	
	无	有
330	813 ± 22	28,180 ± 1606
33	113 ± 14	18,793 ± 241
3.3	50 ± 6	8,767 ± 443
0.33	52 ± 9	4,455 ± 36
0.033	53 ± 12	2,734 ± 233
0.0033	62 ± 12	1,553 ± 102
0	51 ± 2	229 ± 26

[0078] 如图 3 所示，经腺苷酸双磷酸酶处理了的 PPK-ADK，无外源性 ATP 时，尽管进行 60 分钟的扩增处理，一点也无 ATP 的扩增。还有，如图 3 及表 1 所示，即使 ATP 的初期浓度低，也可扩增到能用荧光测定的程度。该结果提示，该 ATP 扩增反应，可用于超高灵敏度生物发光测定法。即，含 0.0033fmol(fmol :10^{-15mol} = 3.3amol :10^{-18mol}) 浓度 ATP 的样品，通过进行 60 分钟的 ATP 扩增处理，可扩增到可检测的水平。也就是说，可检测出数 amol(amol :10^{-18}mol) 浓度的 ATP。与此相对，以往的生物发光，测定发光必需数十 fmol(fmol :10^{-15}mol) 浓度的 ATP(表 1)。这样，应用本发明的 ATP 扩增法，其生物发光的敏感度至少提高 10000 倍以上。

[0079] (实施例 4 :超高灵敏度生物发光测定法在单一微生物检测中的应用)

[0080] 用纯水将大肠杆菌的培养液 (2×10^9CFU/ml) 稀释到适当的浓度。向细胞悬液 (500μl) 中加入溶解缓冲液 500μl(生物发光测定试剂盒，Roche)，100℃，加热 2 分钟，使 ATP 从细胞中释放出来。取 2μl 加热样品进行 ATP 扩增测定，测定生物发光。

[0081] 测定的荧光与不进行 ATP 扩增 (不添加 PPK-ADK) 的情况进行比较。荧光值表示不同 3 次测定的均值 ± 标准差。荧光随时间变化的增加如图 4 所示，60 分钟后 ATP 扩增的结果如表 2 所示。

[0082] 表 2

[0083]

每次测定的大肠杆菌数(CFU)	荧光(rlu)	
	ATP扩增	
	无	有
100,000	1,126 ± 255	39,722 ± 1,596
10,000	296 ± 34	33,903 ± 2,244
1,000	52 ± 4	16,901 ± 1890
100	37 ± 4	6,823 ± 205
10	39 ± 6	3,280 ± 604
1	37 ± 7	1,714 ± 44
0	43 ± 12	364 ± 73

[0084] 如图4及表2所示，荧光量随测定法中应用的大肠杆菌数目的不同而变化(图4)。如表2所示，与不进行ATP扩增相比，进行ATP扩增时荧光发色显著增强。不进行ATP扩增时，即使达到表2中10000CFU时，荧光发光的强度极低，要想达到有意义的生物发光水平，必需数万CFU的大肠杆菌。与此相对，应用本发明的ATP扩增技术时，即使应用单一的大肠杆菌(1CFU大肠杆菌水平)这一最低水平，也可观察到明确的荧光。这提示，与不进行ATP扩增相比，其生物发光的敏感度是其10000倍以上。

[0085] 有报道，大肠杆菌活细胞的细胞内ATP水平约7μmol/g干燥菌体(Neuhard, J., and Y.Nygaard.Purines and pyrimidines.445-473;F.C.Neidhardt等人编著，Escherichia coli and Salmonella typhimurium:cellular and molecular biology, ASM press, Washington, D.C.(1987))。由于1个大肠杆菌的干重约2.8×10^{-13}g(F.C.Neidhardt.Chemicalcomposition of Escherichia coli.3-6页;F.C.Neidhardt等人编著，Escherichia coli and Salmonella typhimurium:cellular and molecularbiology, ASM press,Washington,D.C.(1987))，每一个大肠杆菌大约含2amol的ATP。该水平的ATP，几乎与本超高灵敏度生物发光测定法的检测界限相同。

[0086] (实施例5:超高灵敏度生物发光测定法在卫生学监测上的应用)

[0087] 探讨本发明的方法是否能应用于大肠杆菌的拭子监测。将大肠杆菌的细胞悬浮液涂到聚苯乙烯培养皿上，用空气干燥的市售棉签擦取。因为，市售棉签含有大量的ATP，所以预先在121℃进行75分钟的高压灭菌，使ATP分解为AMP和磷酸。将从$4cm^2$表面积擦拭的样品浸到400μl溶解缓冲液中，然后100℃加热2分钟。向加热样品(10μl)中添加ATP扩增反应液(40μl)，进行60分钟的ATP扩增反应。将其中25μl用于生物发光测定。结果如表3所示。

[0088] 表3

[0089]

大肠杆菌数（CFU）	荧光（rlu）	
	ATP扩增	
	无	有
120,000	223	30,630
12,000	62	23,835
1,200	52	10,215
120	51	2,685
12	53	1,653
0	65	404

[0090]　通过这种检测，可进行大约 12 大肠杆菌 CFU/cm^2 水平的测定。可以判断，本发明的方法可用于大肠杆菌的拭子监测。

[0091]　（实施例 6：饮料水中细菌的监测）

[0092]　探讨本发明的方法是否对饮料水中细菌的检测有效。向加热的水样品（2μl）中 ATP 扩增反应液（50μl），进行 60 分钟的 ATP 扩增反应。结果如表 4 所示。表 4 中，自来水（1）从广岛市的上水道获得。自来水（2）是广岛大学的再生水。瓶装水从市场购买。无菌水是将蒸馏水高压制备的。池水是广岛大学的池水。集落数（CFU）是将 1ml 水样涂到营养琼脂培养基（1.6g 蛋白胨，1g 酵母提取物，0.5g NaCl，15g 琼脂，1L 水）中，28℃培养 3 天后，计数所形成的集落。

[0093]　表 4

[0094]

样品来源	荧光（rlu）		集落数（CFU）
	ATP扩增		
	无	有	
自来水(1)	15	1,400	33
自来水(2)	13	413	1
瓶装水	30	239	>1
无菌水	23	254	>1
池	9	3100	59

[0095]　该结果提示，即使在以往的生物发光测定法中检测不出的水平，也能检测出细菌。如表 4 的结果所示，应用本发明的方法，通过对水样品进行 60 分钟的 ATP 扩增处理，可检测出 1CFU/ml 的细菌。以往的应用营养培养基的方法，要检测出混入的细菌，需要典型的数目（表 4）。有自来水中检测出病原菌绿脓杆菌（Pseudomonas aeruginosa）的报道（Bert，F. 等人，Multi-resistant Pseudomonas aeruginosaoutbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgeryintensive care unit. J. Hosp. Infect. 39，53-62（1998）），应用本发明可容易且迅速地检测出类似微生物的存在。

[0096]　（实施例 7：检测牛奶中的细菌）

[0097]　探讨在奶酪业中的应用。细菌的混入，给奶业界带来很大的危害，为了检测牛奶中的细菌，需要开发迅速且可信的实验。本发明者探讨了检测牛奶中金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus）的高灵敏度的测定法。将金黄色葡萄球菌的培养液稀释到适

当的浓度,加入到牛奶中。为了除去牛奶中所含来自乳腺和体细胞的非细菌性ATP,用0.45μm的膜对0.5ml牛奶进行过滤。用10ml含0.2% TritonX-100、100mMTris-HCl(pH 7.8)及2mM EDTA的溶液(Olsson,T.等人Extractionand determination of adenosine 5'-trihphosphate in bovine milk by thefirefly luciferase assay.Biotech.Appl. Biochem.8,361-369(1986))洗涤该膜。洗涤后,将该膜浸到200μl溶解缓冲液中,100℃、加热5分钟。将加热的样品(20μl)进行60分钟的ATP扩增。然后,用于生物发光测定法。结果如表5所示。

[0098] 表5

[0099]

黄色葡萄球菌数(CFU)/0.5ml牛奶	荧光(rlu)	
	ATP扩增	
	无	有
750,000	399	39,491
75,000	84	10,011
7,500	47	4,141
750	50	1,790
75	37	1,156
0	49	432

[0100] 测定的结果是,可检测出75CFU(金黄色葡萄球菌)/0.5ml牛奶。金黄色葡萄球菌的检测灵敏度低于大肠杆菌,但检测出的牛奶中的金黄色葡萄球菌的灵敏度比以往应用生物发光测定法的灵敏度增大约10000倍。本发明的迅速确定微生物存在的方法,不仅可用于环境中的微生物,而且可广泛应用于卫生学上的监测。

[0101] 产业上利用的可能性

[0102] 本发明的PPK-ADK融合蛋白,作用于ATP、AMP及多磷酸化合物的混合物,扩增ATP。特别是通过应用不含不纯物ADP的PPK-ADK,可用于仅扩增外源性ATP,且可扩增单个细胞水平的微生物的ATP。可用荧光素酶测定法等检测所扩增的ATP。因此,可迅速检测出以往经几天才勉勉强强检测出的微生物,且即便仅1个细胞也可进行检测。

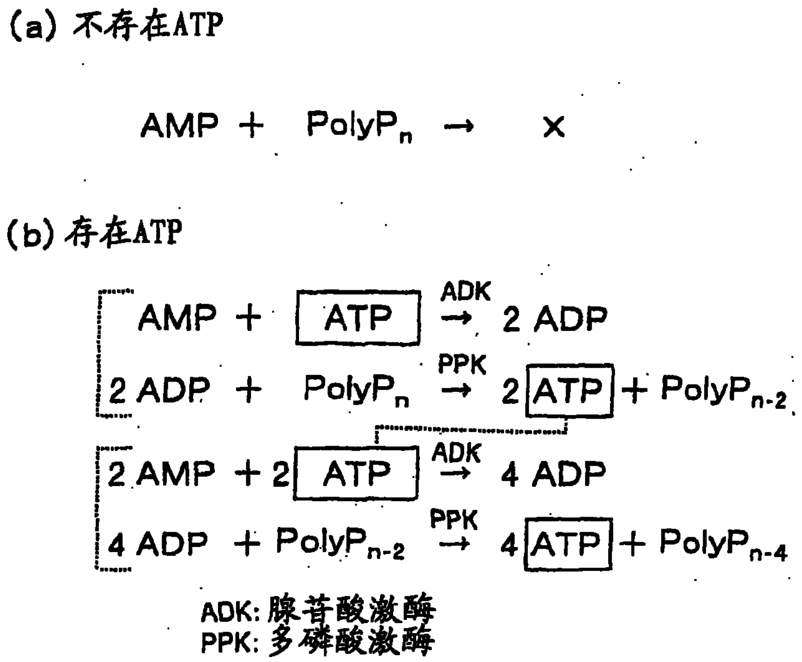
(a) 不存在ATP
AMP + PolyPn → X
(b) 存在ATP
AMP + ATP ADK → 2 ADP
2 ADP + PolyPn PPK → 2 ATP + PolyPn-2
2 AMP + 2 ATP ADK → 4 ADP
4 ADP + PolyPn-2 PPK → 4 ATP + PolyPn-4
ADK: 腺苷酸激酶
PPK: 多磷酸激酶

图 1

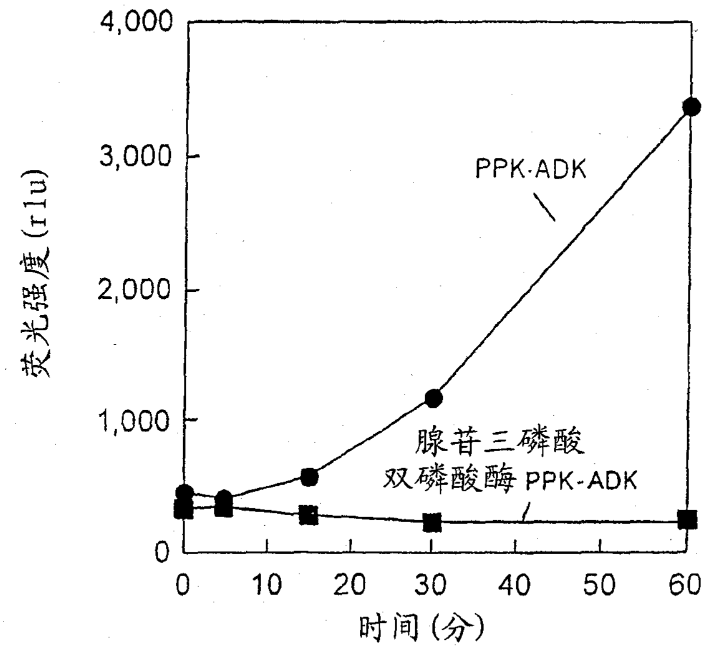
4,000
3,000
2,000
1,000
0
荧光强度(rlu)
PPK·ADK
腺苷三磷酸
双磷酸酶 PPK-ADK
0
10
20
30
40
50
60
时间 (分)

图 2

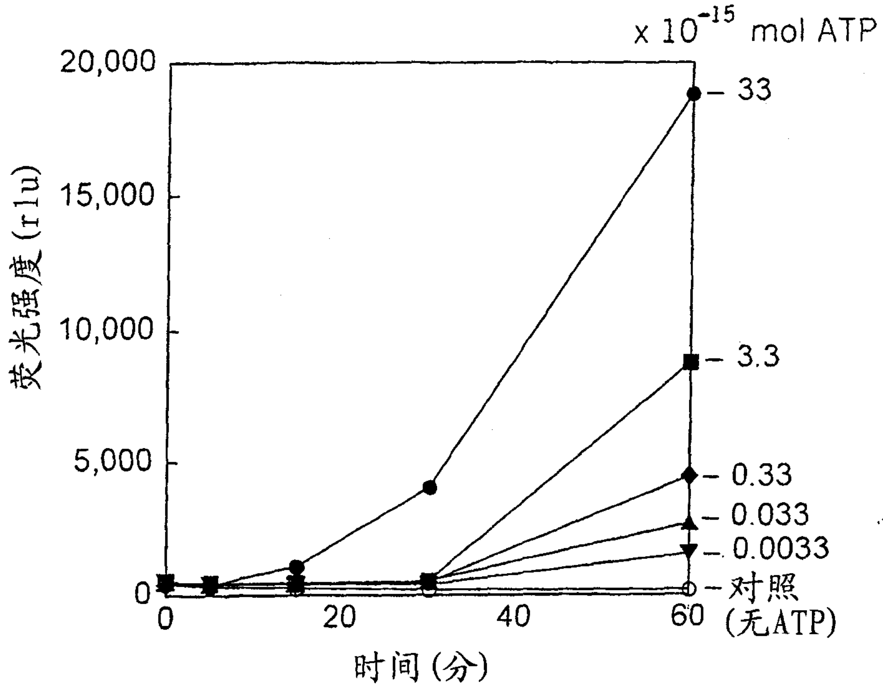
x 10⁻¹⁵ mol ATP
20,000
15,000
10,000
5,000
0
荧光强度(rlu)
0
20
40
60
时间(分)
33
3.3
0.33
0.033
0.0033
对照
(无ATP)

图 3

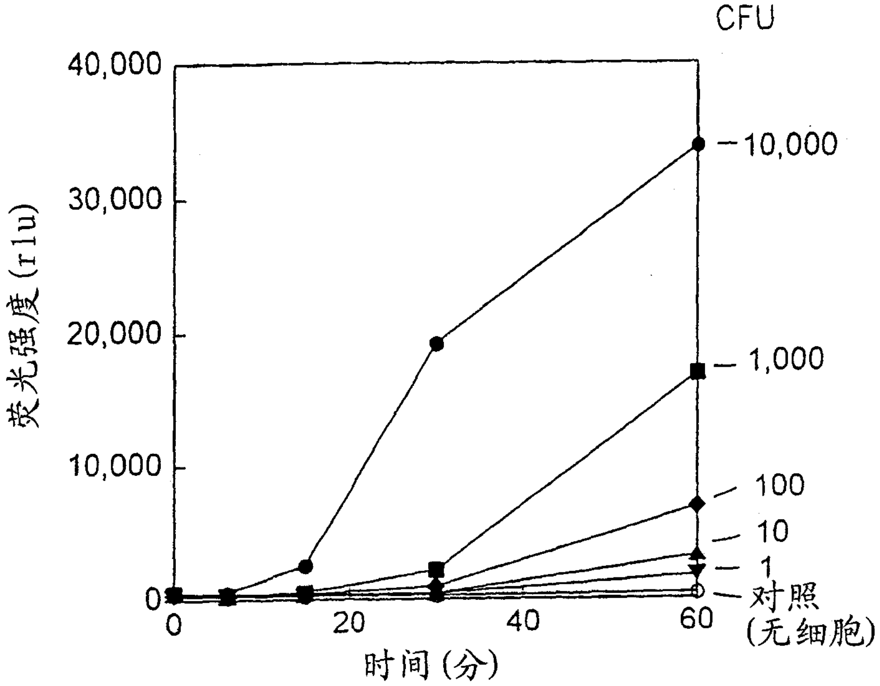
CFU
40,000
30,000
20,000
10,000
0
荧光强度(rlu)
0
20
40
60
时间(分)
10,000
1,000
100
10
1
对照
(无细胞)

图 4