



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105027113 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 04

(21) 申请号 201380052897. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 08. 09

G06F 17/18(2006. 01)

G06Q 10/06(2006. 01)

(30) 优先权数据

13/572277 2012. 08. 10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/054433 2013. 08. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/026168 EN 2014. 02. 13

(71) 申请人 六品科技公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 M. J. 罗森布卢姆 E. 塔基安

M. S. 克里斯 T. K. 卢

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 马红梅 张懿

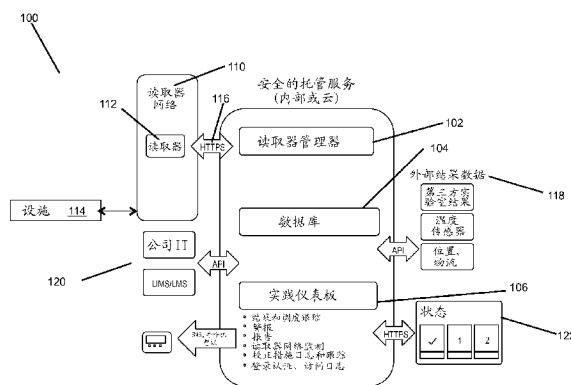
权利要求书2页 说明书60页 附图12页

(54) 发明名称

用于现场环境监测的系统

(57) 摘要

在本文提供用于在各种环境中且在各种物品上监测微生物的方法和系统,其中,来自监测的数据是可跟踪的、可分析的以及相对于各种标准或阈值可比较的。在本文公开的方法和系统也包括一平台,其用于在许多环境内的许多位置上管理对微生物的检测和报告,并且为了各式各样的目的来使用这样的检测。



1. 一种监测环境的方法,包括:  
在软件中数字化设施平面布置图;  
在设施平面布置图上建立测试点;  
基于业务规则来确定用于测试点的取样调度;  
根据业务规则来将特定诊断测试映射到测试点,其中,诊断测试用于根据取样调度来对测试点取样;以及  
在一定时间段内聚合来自在测试点处的多个取样的结果以便监测环境。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,使用被映射到测试点的诊断测试、经由在测试点处执行的取样来检测生物制剂。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中,作为向微生物引入噬菌体的结果,由微生物产生生物制剂。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,分析多个取样的结果以确定趋势、风险分布图、污染模式和预测的污染模式中的至少一个。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,分析来自多个取样的结果,以确定改良环境状况的校正措施。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,进一步包括,通过取样来跟踪校正措施对环境状况的影响。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,分析来自多个取样的结果以建议最小化微生物的出现且改善产品质量、环境安全和环境卫生中的至少一个的预防措施。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,准备多个取样的结果的报告。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,分析来自多个取样的结果以确定对用于环境的所定义的特性的集合的遵守。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,进一步包括,当存在遵守中的缺陷或者阳性测试结果中的至少一个时,生成警报。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,跟踪取样以确定特性。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中,特性是用户、日期、时间、批号 #、微生物检测、位置、周围温度和完成百分比中的至少一个。
13. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,在所述方法的执行期间添加附加测试点。
14. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,将附加的数据与来自于来自微生物传感器、传感器阵列和第三方数据源中的至少一个的多个取样的结果一起聚合。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,对附加的数据和来自多个取样的结果的组合进行分析以确定趋势、风险分布图、污染模式、预测的污染模式、改良环境状况的校正措施和最小化微生物的出现且改善产品质量的预防措施中的至少一个。
16. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,在环境监测平台的仪表板中基于来自多个取样的结果可视化数据并与数据交互。
17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中,仪表板的用户被准许对来自多个取样的结果的访问的级别。
18. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,通过地理定位和人工输入中的至少一个来确定

测试点位置。

19. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,测试点位置与图像和可扫描的标识符中的至少一个相关联。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,取样包括扫描与测试点相关联的标识符。

21. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,取样包括获取测试点位置的图像并且将其与先前与测试点相关联的图像相比较,以便定位测试点处的取样。

22. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,通过取样而检测的生物制剂是噬菌体诱导的生物发光的产物。

23. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,监测环境包括对个体微生物、多个不同的微生物和微生物的不同的菌株中的至少一个的存在进行检测和报告中的至少一个。

24. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括,在平面布置图上利用测试点覆盖步行交通模式和加工品的流中的至少一个,以确定散布在设施内的污染的影响。

25. 一种用于监视环境的计算机实施的系统,包括:

存储在计算机可读介质上的设施平面布置图,该平面布置图包括至少一个测试点;

在至少一个处理器上操作的调度模块,取样模块处理至少一个业务规则来建立用于测试点的取样调度;

在至少一个处理器上操作的诊断映射模块,诊断映射模块根据业务规则来将至少一个诊断测试映射到测试点,其中,诊断测试用于根据取样调度来对测试点取样;以及

数据库,在计算机可读介质中存储在一定时间段内来自在测试点处的多个取样的结果,以促进环境的监测。

26. 根据权利要求 25 所述的系统,进一步包括:分析设施,其分析多个取样的结果,以确定趋势、风险分布图、污染模式和预测的污染模式中的至少一个。

27. 根据权利要求 25 所述的系统,进一步包括:分析设施,其分析来自多个取样的结果,以确定改良环境状况的校正措施。

28. 根据权利要求 25 所述的系统,进一步包括:分析设施,其分析来自多个取样的结果,以建议新的测试点。

29. 根据权利要求 25 所述的系统,进一步包括:分析设施,其在地图上利用测试点来覆盖步行交通模式和加工品的流中的至少一个,以确定散布在设施内的污染的影响。

30. 根据权利要求 25 所述的系统,进一步包括:在环境监测平台的人类可读取计算机用户接口中实施的仪表盘,其呈现与环境的监测有关的可视内容并且使得能够与来自多个取样的结果交互。

## 用于现场环境监测的系统

### 背景技术

[0001] 典型地以不总是实时的或可付诸行动的方式将来自各种环境取样和检测方法的结果呈现给用户。另外,并不总是以使结果为可跟踪的、可分析的或相对于各种标准或阈值可比较的方式来递送结果。因此,存在对用于实时的或接近实时的监测和分析的在线系统的需要。能够与快速的、可靠的原位取样方法结合使用这样的系统以提供现场环境监测平台。

[0002] 存在方法以及系统用于检测在食品、食品准备 / 食品服务环境和包括医院、大学、其中环境微生物受到控制的任何制造设施和相关的设施的其他环境中产生健康危害的诸如李氏菌属(*Listeria*)、沙门氏菌(*Salmonella*)和大肠杆菌(*E. coli*)之类的微生物。这样的方法以及系统遭受许多缺点,包括大多数情况下需要将样本从其被收集的环境中移除并且将其输送到其中样本处于用于富集(enrichment)和生长的培养环境中的实验室环境。另外地,因为这些实验室常常是现场外的,所以存在通过将样本运输到实验室而引入的延迟。一旦被富集,就典型地通过非常昂贵的配备、进一步耗时的培养方法、PCR和/或其他方法来对样本进行询问。因此,当前处理是昂贵的,并且在取样和结果之间存在大的时滞,在时滞时间期间取样的条件可能已经改变,并且诸如易腐食品之类的所取样的物品可能不再是能存活的、可能不再处于发起人的控制中、或者可能已经被消耗。存在对于快速的、可靠的原位取样方法和系统的需要。另外地,存在对能够将活细胞与死细胞进行区分的系统的需要,这是因为,基于现代分子(例如核酸)的放大方法通常未在活细胞或死细胞之间进行区分,这产生了较高的假阳性率。此外,存在对于能够用于验证设施启动前(后清洗)、过程中或两者的系统的需要。

### 发明内容

[0003] 在本文提供了用于在各种环境中且在各种物品上检测、报告、监测和分析污染物或诸如微生物之类的其他环境因素的存在的方法和系统。一种这样的检测方法涉及制作荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP) NanoLuc™或通过将基因工程噬菌体引入到环境中而在微生物中诱导出的其他可筛查标记。在某些实施例中,该方法和系统包括在诸如食品生产环境之类的现实世界环境中并且在没有潜在地包含微生物的样本的富集的情况下对至少少量细胞的非常低级别的微生物的快速检测。在本文公开的方法和系统还包括一平台,其用于在许多环境内的许多位置上管理对污染物或诸如微生物之类的其他环境因素的检测和报告,并且为了各式各样的目的来使用这样的检测。这样的目的可以包括但不限于:计划校正措施、调度跟进测试、绘制污染趋势、确保测试中的依从性、提供报告、通知运输隔离库存中的物流、和更多的许多目的。

[0004] 在一方面中,平台可以包括用于在食品准备环境中对微生物存在的实时原位测量的读取器,其中,测量基于噬菌体诱导的产物的检测。在某些实施例中,可以有时在相同的设施中在小的实验室中并且有时完全在现场外(如在集中式或第三方实验室中)对生产部本身执行测量。无论如何,数据库可以用于存储测量并且仪表板可以用于报告测量,以用于

与测量交互以及调度和执行与测量相关联的操作。平台可能能够检测和报告不同的微生物或给定的微生物的不同的菌株的存在,或者诸如腐败菌之类的不良有机体的存在。平台能够量化和报告与预先确定的集合的风险级别相对应的给定微生物的级别。

[0005] 在一方面中,平台可以包括用于基于噬菌体诱导的产物的检测来检测环境中的微生物的至少一个模块和用于检测与环境的安全有关的至少一个其他因素的至少一个模块。其他因素可以是以下中的至少一个:环境中的(腺苷三磷酸)ATP水平、由另一种类型的检测器所测量的微生物、样本的温度、时间、菌落形成单位(CFU)计数、取样位置、成品的微生物测试结果以及取样频率。模块也可以检测样本如何被收集以及谁收集了样本。

[0006] 在一方面中,平台可以包括用于基于噬菌体诱导的产物的存在来检测环境中的微生物的至少一个模块,以及用于基于由该至少一个模块收集的纵向测试数据来预测应当检查的区域的处理器,并且建议在日间什么时候获取样本。除了预测区域外,平台还可以用于跟踪趋势并且将该信息与对环境了解整合以提出污染可能来自何处。

[0007] 在一方面中,分析平台可以包括:读取器,用于经由任何诊断试验来收集关于环境中的微生物的存在的实时数据的流;仪表板,用于报告关于环境中的微生物的存在的实时数据的流;处理器,用于分析关于环境中的微生物的存在的实时数据的流;以及读取器管理器,用于管理关于环境中的微生物的存在的实时数据的流。环境可以是食品生产环境。平台可以进一步包括在软件中对环境建模以跟踪感兴趣的区域中的微生物生长。平台可以进一步包括显示通过软件动态地生成的与它们的物理位置相关联的所跟踪的微生物生长(状态点的“热图”)。平台可以进一步包括将建模的结果与危害分析和关键控制点(HACCP)计划、环境控制计划、卫生计划和这些计划的验证整合。平台可以进一步包括在软件中对环境进行建模,以跟踪其中微生物可能是暂时性的或可能形成生长生态位的感兴趣的区域中的风险系数。

[0008] 在一方面中,平台可以报告一个或多个微生物的工程噬菌体诱导的产物的所检测的级别,用于实现与环境中的微生物活性的管理有关的警报、报告和措施中的至少一个。

[0009] 在一方面中,一种监测环境的方法包括:在软件中数字化设施平面布置图;在设施平面布置图上建立测试点;基于业务规则来确定用于测试点的取样调度;根据业务规则来将特定诊断测试映射到测试点,其中,诊断测试用于根据取样调度来对测试点取样;以及,在一定时间段内聚合来自在测试点处的多个取样的结果以便监测环境。可以使用被映射到测试点的诊断测试来进行经由在测试点处执行的取样来检测生物制剂。可以进行分析多个取样的结果以确定趋势、风险分布图、污染模式和预测的污染模式中的至少一个。可以进行分析来自多个取样的结果,以确定改良危险的或者潜在地危险的环境状况的校正措施。可以通过取样来跟踪校正措施对环境状况的影响。可以进行分析来自多个取样的结果以建议最小化微生物的出现且改善产品质量、环境安全和环境卫生中的至少一个的预防措施。可以准备多个取样的结果的报告。

[0010] 可以进行分析来自多个取样的结果以确定对用于环境的定义的特性的集合的遵守。当存在遵守的缺陷或者阳性测试结果中的至少一个时,可以生成警报。可以进行跟踪取样以确定特性。特性可以是用户、日期、时间、批号#、微生物检测、位置、周围温度和完成百分比。

[0011] 可以在方法的执行期间进行添加附加测试点。可以使用微生物传感器、传感器阵列和第三方数据源中的至少一个来进行将附加的数据与来自多个取样的结果一起聚合。可以对附加的数据和来自多个取样的结果的组合进行分析以确定趋势、风险分布图、污染模式、预测的污染模式、改良环境状况的校正措施和最小化微生物的出现且改善产品质量的预防措施中的至少一个。

[0012] 可以在环境监测平台的仪表板中进行基于来自多个取样的结果可视化数据并且与数据交互。仪表板的用户可以被准许对来自多个取样的结果的访问的级别。可以通过地理定位和人工输入中的至少一个来确定测试点位置。测试点位置可以与图像和可扫描的标识符中的至少一个相关联。取样可以包括扫描与测试点相关联的标识符。取样可以包括获取测试点位置的图像并且将其与先前与测试点相关联的图像相比较,以便定位在测试点处的取样。可以经由噬菌体诱导的生物发光的产物的表达通过取样来检测生物制剂。监测环境可以包括对个体微生物、多个不同的微生物和给定的微生物的不同的菌株中的至少一个的存在进行检测和报告中的至少一个。可以进行在平面布置图上利用测试点覆盖步行交通模式和加工品的流中的至少一个,来预测、推断或者确定散布在设施内的污染的影响。

[0013] 在一方面中,环境监测平台的系统可以包括:包括至少一个测试点的数字设施平面布置图;基于业务规则用于测试点的取样调度,根据业务规则将特定诊断测试映射到测试点,其中,诊断测试用于根据取样调度来对测试点取样;以及用于监测环境的在一定时间段内来自在测试点处的多个取样的结果的数据库。系统可以包括分析设施,其分析多个取样的结果以确定趋势、风险分布图、污染模式和预测的污染模式中的至少一个。系统可以包括分析设施,其分析来自多个取样的结果,以确定改良环境状况的校正措施。系统可以包括分析设施,其分析来自多个取样的结果,以建议新的测试点。系统可以包括分析设施,其在地图上利用测试点来覆盖步行交通模式和加工品的流中的至少一个,以确定散布在设施内的污染的影响。系统可以包括环境监测平台的仪表板,其可视化来自多个取样的结果并且使得能够与其进行交互。仪表板的用户可以被准许对来自多个取样的结果的访问的级别。

[0014] 根据优选的实施例和附图的以下详细描述,本发明的这些和其他系统、方法、目的、特征和优点对那些本领域技术人员将是明显的。

[0015] 在本文提及的所有文档在此通过引用以它们整体被并入。对单数形式的项的引用应当被理解为包括复数的项,并且反之亦然,除非另外明确地陈述或从文本中清楚得知。语法连词意图表示结合的从句、句子、词等等的任何和所有可分的和连结的组合,除非另有说明或从上下文清楚可知。

[0016] 附图说明

可以通过参考以下图来理解本发明及其某些实施例的以下详细描述。

[0017] 图 1 描绘系统的框图。

[0018] 图 2 描绘系统的处理流程。

[0019] 图 3 描绘系统的框图。

[0020] 图 4 图示出工作流程方法。

[0021] 图 5 描绘示例性仪表板。

[0022] 图 6 描绘用户接口的示例性平面布置图。

[0023] 图 7 描绘测试点详情对话框。

[0024] 图 8 描绘用户接口的补救日志。

[0025] 图 9a 描绘用户接口的调度表页面。

[0026] 图 9b 描绘用户接口的调度表页面。

[0027] 图 10 描绘用户接口的报告页面。

[0028] 图 11 描绘继用抗菌素 T3::0.7 luc 感染大肠杆菌细胞之后在不同的时间检测的荧光素酶的量。示出了检测不同浓度的细菌细胞的三个实验的结果。

[0029] 图 12 描绘继将大肠杆菌细胞与抗菌素 T3::0.7 luc 混合之后检测荧光素酶信号的时间。

[0030] 具体实施方式

除非在本文被另外定义,与本公开结合使用的科学和技术术语应当具有那些本领域普通技术人员通常所理解的意义。此外,除非上下文另外要求,单数项应当包括复数并且复数项应当包括单数。通常,在本文描述的与生物化学、酶学、分子与细胞生物学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学和杂交所结合使用的命名法以及其技术是现有技术中的那些公知的且常用的。通过引用将在本文的引用的某些参考文献和其他文档明确地合并于此。在冲突的情况下,包括限定的本说明书将进行支配。材料、方法和示例仅仅是说明性的且并非意图进行限制。

[0031] 应当理解,在本文使用的术语仅仅用于描述特定实施例的目的并且不意图进行限制。必须指出,如在说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一”和“该”包括复数指示物,除非上下文清楚地另外指示其他。

[0032] 如在本文所使用的术语“包括”的意义和“包括有”或“包含”是一样的,并且是可兼的或开放的并且不排除附加的、未描述的构件、要素或方法步骤。

[0033] 贯穿本说明书,可以可交换地使用术语“系统”、“卫生监测平台”、“环境监测平台”、“微生物监测平台”和“平台”。

[0034] 如在本文所使用的,术语“活体外”指的是发生在人工环境中——例如,在试管或反应容器中、在细胞培养中、在陪替氏培养皿中等等,而不是在有机体(例如,动物、植物或微生物)内的事件。相反,“原位”指的是不需要人工装置或材料的自然环境,诸如用于存储、传送或准备食物、药品或其他物品的环境,保健环境,其中微生物可以生长并且潜在地感染人类或其他动物的任何环境,医院,大学,其中环境微生物被控制的任何制造设施以及相关的设施。原位环境可以替换地被称为“现场”环境,反映不需要为了确定微生物的存在而将样本从自然环境传送到分开的实验室环境。

[0035] 如这里所使用的,“可筛查标记”是能够被用作识别表达标记的细胞的基础的可检测的标签。借助于这样的细胞的可筛查标记的表达,这样的细胞也能够被说成具有“可筛查表型”。适当的标记包括示踪用放射性同位素、荧光标签、核磁共振活性标签、发光标签、发色团标签、用于 PET 扫描仪的正电子发射同位素、化学发光标签,或酶标签。荧光标签包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、荧光素和若丹明。化学发光标签包括但不限于荧光素酶和 $\beta$ 半乳糖苷酶。酶标签包括但不限于过氧化物酶和磷酸酶。组氨酸标签也可以是可检测的标签。在一些实施例中,将异源核酸引入细胞中,并且细胞然后表示是或包括标签的蛋白质。例如,所引入的核酸能够包括用于操作地连锁到在细胞中为活性的调节序列的 GFP 的编码序列。

[0036] 工程噬菌体或一致工作的一组工程噬菌体(或噬菌体鸡尾酒)可以使寄主(例如大肠杆菌、李氏菌属、沙门氏菌)产生可检测且可测量的有效载荷。在本文描述了一种系统或平台,其充分利用如在 2012 年 5 月 4 日提交的命名为重组噬菌体和方法的 US 临时专利申请号 61/642,691 中所描述的生物照明噬菌体技术和用于现场、基于噬菌体的微生物或卫生监测的检测技术。据此在本文通过引用将 2012 年 5 月 4 日提交的命名为重组噬菌体和方法的美国临时专利申请号码 61/642,691 整体合并,并且该临时专利申请作为证据 A 附属于此。证据 A 据此通过引用在本文被整体合并并且构成本说明书的一部分。系统的独特性质为近实时数据生成、现场快速分析作准备,以在不要求微生物的富集的情况下提供可付诸行动的结果和监测。尤其在生产部上避免样本富集的优点是,具有向区域中引入筛查的微生物的种群的潜能该平台使得测试超出处理验证以包括连续监测和过程控制。

[0037] 工程噬菌体可以使得目标微生物能够在仅仅几个小时中表达发光酶,这显著地增加结果的转回时间并且进而实现更多测试、快速进行(并且跟踪)补救活动的的能力,以及从微生物可以进入设施的地方进行更快速的评定。在食物设置中的目标微生物能够包括李氏菌属、单核细胞增多性李氏杆菌、沙门氏菌大肠杆菌、大肠杆菌 0157 和其他有害的血清型或食物腐败有机体。在非食物设置中,能够测试其他细菌种类来包括:艰难梭状芽胞杆菌、葡萄球菌、MRSA,等等。在某些实施例中,测试可以具有将各个种类测试——例如,用于沙门氏菌和李氏菌属的单拭子中的测试复用的能力。

[0038] 工程噬菌体方法具有除速度之外的其他优点,包括将活细胞与死细胞辨别的能力(由于生物蛋白质生产处理需要发生来产生信号,将仅仅检测活动的和潜在地有害的或其他方面的不良的细胞),以产生低假阳性率。能够现场执行测试,这是因为不需要附加的微生物来用于检测,这意味着不需要富集,并且因此不使更多微生物生长——使其在现场使用是安全的。因为其是不要求技术人员具有实验室经验的独立的测试,所以平台突出高可用性。基于噬菌体的微生物检测的灵敏度和各个行业、州、联邦、公司或其他标准一致,或者超过其。

[0039] 与很敏感的传感器技术联合的环境监测系统使得该数据能够被快速发送给数据库模块 104,以用于创建警报、趋势分析,指示更多测试,生成报告,等等。

[0040] 这样的系统的另一个优点是,其通过使得加有位置标签的测试能够评定并且确定潜在的问题的根本原因来使得 QA / 食品安全人员或审计员(内部、第三方或政府的)能够确定潜在的微生物可能发源于的地方。系统和其要素以及工作流程的详图存在于在本文进一步描述的图 2 和图 3 中。

[0041] 在实施例中,平台可以被用作独立产品或者可以与各种仪表板或警报和跟踪系统集成。

[0042] 图 1 图示出充分利用生物发光噬菌体技术和用于现场环境监测的检测技术的系统 100。应当理解,尽管在本文详细描述的实施例使用噬菌体诱导的生物照明的检测,但噬菌体可以被工程化为诱导宽范围的可检测的有效载荷的产生,并且除背景上下文特定于生物照明之外,在本文公开的方法和系统应当被理解为能够应用于此类其他类型的有效载荷的检测。实际上,平台可以用于管理、分析和报告来自各式各样的试验的结果并且不局限于利用生物发光的试验。贯穿本说明书,可以就管理、分析和报告来自生物发光试验的结果而言来讨论该平台,但该试验被选择为对于该平台有用的各种各样的试验的示例。



[0043] 图 1 的系统 100 能够包括读取器管理器 102、数据库 104 和实践仪表盘 106。读取器管理器 102 可以包含耦合到可以包含一个或多个读取器 112 的读取器网络 110 的读取器。在实施例中,系统 100 可以被称为环境监测平台。

[0044] 在实施例中,系统 100 可以是能够位于内部主机上或者托管在云服务器上的安全主机服务。不管数据被存储在云中还是存在数据的本地托管的地方,系统都可以实现数据安全。在实施例中,为了保证数据安全,可以使用安全系统管理策略、可以使用基于硬件的安全性,或其组合。例如,管理员可以使用安全系统管理策略来设置由各个个体用户或用户群查看数据的许可、设置用于安全登录的口令,等等。在另一个示例中,使用 iPad 经由应用访问平台的用户可以使用硬件令牌来生成用于每次登录的新口令,其可以与多用途口令结合使用。

[0045] 在实施例中,为了易于样本读出,多个读取器 112 可以位于遍布设施 114 的各个位置。在其他的实施例中,为了易于取样,取样套件或取样站可以位于遍布设施的各个测试点位置。在实施例中,读取器 112 可以是微生物传感器或一些其他生物照明检测系统。替换地,读取器可以适于从任何类别的诊断试验检测替换的生物有效载荷。在实施例中,读取器位置可以包括沿着生产线布置的、在诸如在门口、在仓库中之类的在设施中的转移点的中央样本处理中心或实验室、第三方食物实验室,等等。在其他的实施例中,系统可以要求仅仅一个读取器 112、其可以是监测特定位置的手持实施例。贯穿本说明书,无论那里指出“多个读取器”或“多读取器”,都应当理解,也可以采用单个读取器。

[0046] 测试点可以是基于区域的。任何区域中的位置可以是测试点。例如,区域 1 可以指的是产物接触表面、切片机、传送带、去皮机、壳体移除、器皿、机柜、工作台、生产设备、器皿和容器。区域 2 可以指的是配备的外部、冷却单元、构架、配备壳体、地板、围裙、桌子、维修工具、软管,等等。区域 2 可以靠近于区域 1。区域 3 可以指离开区域 1 的暴露的产物房间中的区域,像墙壁、污水槽、铲车、电话、墙壁和地板。区域 4 可以指的是其中产物被暴露的房间之外的区域,像仓库、卫生盥洗室、墙壁、升降门、机柜、办公室、衣帽间、浴室或物理上与工厂楼层分开的但是工厂作业员去往其或者从其来的无论什么。在实施例中,环境监测平台可能基于取样应当发生的前述区域来提出各个级别的测试。在实施例中,可以利用抗微生物菌剂来处置测试点标识符以最小化引入污染的风险。测试点例如可以包括机器、表面、成品,等等。

[0047] 在实施例中,读取器 112 可以被配置为向读取器管理器 102、数据库 104,或实践仪表盘 106 中的一个或多个传送由图 1 中的要素 116 表示的各个信号。信号 116 可以包括用于特定测试点的测试结果、读取器的位置、来自其他连接的传感器的数据、读取器设备状态、读取器标识、用于操作员的进来的公告和更新、测试的时间 / 日期、操作员名或对其提供的任何其他信息。

[0048] 在实施例中,读取器 112 可以经由无线连接(例如, Wi-Fi、卫星或蜂窝连接)被连接到能够位于相同的设施中、在企业网内的、在高安全性云配置中,等等中的安全远程存贮器。在实施例中,读取器管理器 102 可以被配置为是或包括安全远程存贮器。

[0049] 在实施例中,测试或测试数据可以被编码在各种格式中,并且可以被包括在样本套件中,以用于进一步处理。读取器 112 可以被配置为通过各种手段从样本套件中读取测试的类型以及其他测试数据。各种手段可以包括在样本管上识别诸如条形码或 QR 码之类

的代码。测试或测试数据可以被编码到集成到样本管中的 RFID 标签中。计算机存储器可以被构建到样本管中来存储测试和 / 或测试数据。

[0050] 在实施例中,测试点可以位于任何区域中。例如,测试点可以位于生产线上的或接近生产线的各个点上,以便覆盖污染的机会最大的生产线上的最关键的区域,或者在生产线上的两个不同的环境的接口,诸如运输带、贮水槽、生产线配备、储物区、处理区、加工区、清洁区、杀菌区、包装 / 集装区、运输 / 输送区域、排污区、接触表面,等等。读取器管理器 102 可以被配置为通过聚合来自多个取样测试点的数据来连续地监测生产线上的污染。在实施例中,可以选择一个测试点来覆盖生产线的特定区域,同时可以选择另一个测试点来测量生产线的不同的区域,并且可以选择第三测试点来测量生产线的特定区域,等等,包括所需要的尽可能多的测试点,使得可以覆盖整个生产线。

[0051] 在其中在设施中存在多个读取器 112 的实施例中,读取器网络 110 可以被配置为从多个读取器 112 收集数据并且向读取器管理器 102 传送数据。在实施例中,多个读取器 112 中的每一个可以可操作地耦合到读取器管理器 102,以用于数据传输。数据传输可以经由许多不同的联网协议出现,诸如基于 Wi-Fi 或硬接线以太网的数据传输、IEEE 802.11、蓝牙、蜂窝(2G、3G、4G、GSM、GPRS、EVDO,等等)、IR、RF、网状网络,等等。

[0052] 在实施例中,可以在设施中的其他地方——在车间上或者在另一个房间或实验室中,在各个测试点位置获取样本和读取。当读取样本时,可以向数据库传送关于利用测量从哪里(使用在本文描述的标签)携带取样的位置的数据。在又一些其他实施例中,读取器可以是便携式读取器或者对便携式设备的插入式模块,使得用户能够立即取样和对它们进行测量。在实施例中,便携式设备或读取器可以使用常规联网协议来传送数据或者可以将数据存储在存储器上,以用于稍后检索。在实施例中,系统 100 可以与要被用于测试拭子的读取器的 iPhone 或其他智能电话、移动设备或平板机进行通信。例如,iPhone / ipad 可以包括作为用于接收和分析测试拭子的插入式模块的读取器的实施例。在其他的实施例中,iPhone / ipad 可以与读取器对接,来改善测试工作流程。例如,在每个拭子之后,iPhone / ipad 可以捕捉读出、将时间 / 天 / 批号 # 或诸如可跟踪性数据之类的其他相关信息联系到读出,并且通过无线传输或者同步向服务器发送数据。在本文描述了读取器的各种其他实施例。

[0053] 从测试收集的结果可以被聚合以诸如在仪表板中实现接近实时的报告。能够向电话、传呼机和其他设备发送仪表板警报以向用户警告结果。

[0054] 为了促进取样,系统可以监测具有将被擦拭的区域上的互补发射体的拭子上的 RFID 标签。在实施例中,系统可以在低功率上工作使得 RFID 标签必须处于发射体的区域中,否则交互不被记录。这保证用户接近于预定的测试地点。系统 100 也可以在 RFID / 发射体交互被记录时生成时间戳。

[0055] 系统 100 可以被配置为使测试点的图片与通过读取器获取的或者存储在数据库模块中的数据相关,如在本文所描述的来用于基于图像的测试点位置。

[0056] 在实施例中,读取器、取样套件,或者取样站可以包括用于要求等待周期、稳定期或者驯化阶段的测试的用于样本管存储的温度稳定器。当合适的样本管温度或者时间 / 温度已经达到时,温度稳定器能够向用户作出警报。在实施例中,温度稳定器可以是电池供电的以实现无绳功能,或者可以是有绳设备。在实施例中,温度稳定器可以被插入到读取器。

在实施例中,平台可以向用户警报样本应当被放置在温度稳定器中、被冷藏、被冷冻、被置于室温下,等等。

[0057] 在实施例中,读取器可以被配置为用于特定测试点的连续测试。例如,读取器可以被配置为具有将周期性地取样并且报告微生物的水平可替换的筒状物或者拭子的自动微生物传感器/监测器。可以将数据集中,并且将在高水平的微生物检测的情况下发出警报。测试可以适用于关键控制点,诸如特定机器、保健设置,等等。

[0058] 在实施例中,读取器管理器 102 可以被配置为通过 HTTP(安全超级文本传输协议)或者如在本文所描述的一些其他网络技术与读取器网络 110 交互。读取器管理器 102 可以被配置为管理或保证 HTTP 连接。读取器管理器 102 可以被配置为用于接收进来的结果。读取器管理器 102 可以用于来自读取器网络 110 的多个读取器中的至少一个接收设备状态。读取器管理器 102 可以用于向读取器网络 110 发送软件更新和系统状态通知。

[0059] 读取器管理器 102 可以被配置为向数据库模块 104 发送关于数据处理的从读取器接收的信息。数据库模块 104 可以经由 API(应用编程接口)协议来与包括公司 IT 或者 LIMS/LMS(实验室信息管理系统)的第三方主机 120 进行通信。

[0060] 在实施例中,读取器 112、数据管理器平台或数据库模块 104 可以被配置为诸如通过 API 或者经由接收将被处理和/或可视化的原始数据转储来与数据源 118 交互。数据源 118 可以包括来自以下的数据:任何种类的试验、第三方实验室、温度或其他环境传感器、物流位置、ATP 卫生监测系统、来自基于实验室的测试结果(例如细胞培养、PCR 和免疫测定法)的确诊测试结果、时间和温度监测、处理输入(例如大气质量和水质)、变态反应原和毒素监测、害虫防治、RFID、地理定位、经由 IR、蓝牙或无线联网协议传送状态的远程 QC 设备、产品码和批号、可跟踪性数据、FDA 数据、USDA 召回列表、HACCP 协议、校正措施/预防措施(CAPA)协议、公司 GMP 更新,等等。例如,来自各个源的数据可以被聚合,使得存在关于特定产品的多个数据流,诸如在生产期间的测试点取样、用于产品的原材料的 USDA 召回和大气质量监测。另外地,也可以包括零星数据来作为数据源 118,诸如将要用于监测的关于洗手依从性的数据(经由视频或者其他系统)以及来自视觉检查报告的数据,诸如在测试点是否发现静水。

[0061] 数据库模块 104 可以被配置为发送来自外部数据源 118 和第三方主机 120 的信息以及从外部数据源 118 和第三方主机 120 接收信息。数据库模块 104 可以被配置为接收和整合数据。例如,数据库模块 104 可以从诸如如上所述的那些、公司 IT 和 LIMS 或者其他信息管理系统之类的任何外部结果数据源接收数据,并且将其整合以生成相互关联且同步的输出,以用于分析。在另一个示例中,数据库模块 104 可以从第三方实验室或者用于周期性地验证阳性或阴性结果的其他测试接收数据。无论如何,能够通过整合不同的数据集的算法来聚合这些数据,以提供风险数据、趋势分析、预测的污染分析,等等。在实施例中,数据库模块 104 可以被配置为制作和维持数据结构。数据库管理工具可以用于与数据结构交互并且维持数据结构。在实施例中,数据库模块 104 可以与云系统或者诸如智能电话的移动通信系统集成。例如,读取器可以适于直接地或者通过读取器管理器向云数据库传送数据。在另一个示例中,读取器可以适于直接地向智能电话递送结果,或者智能电话可以适于从读取器拉出数据。无论如何,智能电话可以适于在整体式数据库模块(诸如被配置用于这样的目的的内部存储器)中存储结果。如将在本文进一步地描述的,智能电话或者其他设备也可

以适合于诸如通过运行移动式应用来分析从读取器获取的结果以及作为这样的结果的结论来执行另外的下游结果。

[0062] 数据库模块 104 可以可操作地耦合到读取器管理器 102 以使得能够从读取器管理器 102 接收测试结果数据。数据库模块 104 可以被配置为用于数据分析和验证以及与读取器管理器 102 和实践仪表板 106 交互。数据库模块 104 可以被配置为帮助污染的根本原因检测并且确定较高级别的污染。数据库模块也可以帮助在正在进行的处理中确定交叉污染。能够如参考图 2 和图 3 在本文进一步描述地进行数据验证和分析。

[0063] 数据库模块 102 可以可操作地耦合到实践仪表板 106。实践仪表板 106 可以被配置为与实现 web、设备或者智能电话访问的应用 122 交互。实践仪表板 106 可以被配置为从数据库模块 104 接收数据分析的结果并且在应用 122 中可视化结果。在实施例中,与实践仪表板相关联的应用 122 可以被配置为跟踪测试状态、结果、测试调度表、校正计划,等等,如在本文进一步描述的。

[0064] 在某些实施例中——诸如在多个读取器和环境监测平台一起使用的设施中,在不具有到因特网或者其他网络的其自己的连接的情况下,每个个体读取器可以仅仅无线地或者硬接线地连接到其他读取器或读取器管理器。在该示例中,读取器管理器将聚合来自读取器的所有数据并且执行诸如至数据库模块、网络、其他读取器管理器、应用,等等的另外的下游通信,如将在本文进一步地描述的。在某些实施例中,读取器还可以包括整体读取器管理器,使得读取器/读取器管理器可以是执行获得数据并且传送数据的功能的独立单元。在又一些实施例中,读取器可以包括用于临时地或者更长期存储包括结果、业务规则、协议、日历、数据库,等等的数据的内置存储器。这样,读取器/读取器管理器可以是执行获得数据、传送数据和存储数据的功能的独立单元。在更进一步的实施例中,读取器可以包括读取器管理器、内置存储器和处理器、其中,处理器可以其如下作用:制作测量、根据业务规则或者确立的协议来分析测量、生成警报或者诸如日历条目的其他的事件、执行根源分析、通常执行分析,等等。

[0065] 在实施例中,读取器可以被配置为诸如经由读取标签、条形码、QR 码、牛眼码、RFID 或者其他手段来为测试的位置加标签。在设施中获取样本并且然后在分开的位置中对样本进行测量的一个例子中,可以为样本管或样本套件加标签,以用于跟踪方便。用户可以在特定位置——诸如在切片机、洗手台、冰箱把手等等获得样本。如果设施是医院、疗养院、其他的保健设置、样本可以来自浴室、门把手、一件医疗设备等等。在示例中,样本可以是随后被放置在样品管中的拭子。可以在取样之前或者由用户在取样处理期间对样本管加标签,其中,标签可以编码各式各样的信息,诸如样本位置、操作员、日期/时间、周围温度,等等。当管处于读取器中用于测量时,读取器可以适于读取标签。可以利用来自标签的信息对来自样本的数据加标签,并且将其共同发送到读取器管理器、数据库模块或者其他下游系统。在本文将关于样本收集套件来进一步描述样本管加标签。

[0066] 在其他的实施例中,标签可以在取样测试点诸如附着到一件机器或者区域中的墙壁,并且可能需要当获取样本时被扫描。例如,如果读取器是便携式或者插入式设备,其可以用于首先扫描测试点标签以获取测试点信息来与来自样本的数据相关联。替换地,该用户可以在获取样本时扫描测试点标签,以便打印出样本管标签。在又一个替换方式中,用户可以诸如通过单独的编码或者样本管存储箱中的位置来简单地人工地使以某方式标识的

样本管与测试点标签扫描相关联。

[0067] 在读取器位于或者接近取样测试点的另一个示例中,用户可以获取样本并且准备其以用于放置在读取器中。如果利用这样的信息编程读取器或者读取器适于获取这样的信息,则可以在从读取器进行传输之前,将关于位置、日期 / 时间、环境传感器,等等的信息自动地添加到数据点。用户可以诸如通过刷卡、使用 RFID 标签或者人工地键入数据来向读取器输入他们作为操作员的身份。替换地,在已经读取样本之后,用户可以使他们自己与读取器相关联。

[0068] 在实施例中,系统可以对于各种感兴趣的人群提供对数据、警报、报告、地图,等等的定制的查看或者定制的级别的访问。在实施例中,经由许可或者授权,定制查看 / 访问可以是可用的。例如,读取器可以仅仅向客户资料库报告结果,而不向测试进行者披露读取器上的结果以维持数据的安全。事实上,环境监测平台可以使测试“操作员”看不到结果,仅仅为审查者(例如经理)提供看到测试结果数据的能力。在实施例中,当数据被递送到某些人群时,可以对数据进行滤波或以其他方式审查数据。在系统在食品包装工厂中运行的示例中,QA / 食品安全人员和经理可以具有报告给他们的时间上的所有数据,但是买主仅仅可以从特定批号的生产期间的时段接收数据。例如,可以与食品的买方共享选择数据以验证食品是通过指定过程适当生产的。这能够允许零售商和其他买主确定是否接受发货。这将涉及对平台的各个用户给出不同的“许可”。

[0069] 在实施例中,系统可以允许结果被分发给具有访问结果的权力的用户。例如,可以诸如经由在智能电话上的警报来设置各种许可,以允许特定用户或者用户群接收关于特定结果的通知。在实施例中,可以向一个或多个用户发送测试结果准备好被读取的通知。可以经由电子邮件、语音邮件、文本消息、智能电话应用警报,等等来递送通知。用户然后可以进一步能够经由用户接口访问结果,如以下描述的。

[0070] 当使用作为智能电话上的应用的系统时,为了解关于警报和执行诸如发起校正措施、向另一个用户或者用户群发送警报、查看完整的数据集、查看报告,等等的下游任务的机会的详情,可以向用户呈现对用户接口或者仪表板的访问。实践仪表板 106 可以由读取器管理器 102、数据库模块或者其他平台元件可操作地耦合到读取器网络 110。实践仪表板 106 可以用作用户接口并且可以提供登录认证模块,其可以保持跟踪用户活动、登录信息、调度表、日志、警报、报告,跟踪网络中的读取器的状态,提供用于读取器的管理的中央位置,等等。

[0071] 实践仪表板 106 可以用于保持跟踪所有签名 / 付款信息和关于用户访问和监视以及用于服务提供者的访问和监视的详情。

[0072] 在实施例中,仪表板可以是用于被核准的用户执行诸如以下的与环境监测平台相关联的各种任务的定制用户接口:诸如发起校正措施、向另一个用户或者用户群发送警报、查看完整的数据集、查看报告、查看作为地图的数据、查看图形、获取样本、比较由特定操作员获取的数据、比较在特定时间获取的数据、监测 / 修改读取器的状态、监测 / 修改读取器网络的状态、查看并提交数据验证和分析结果的报告,等等。例如,且不进行限制,工厂经理的仪表板可以具有与在工厂的取样相关联的所有原始数据的视图。经理可能能够使用仪表板分析工具来分析数据并且准备各种平面布置图、报告、图形、热图、概要、电子邮件,等等。在示例中,经理可以查看作为随着时间仅仅显示地图上的阳性结果的、所跟踪的污染

的地图 / 平面布置图的数据。能够向另一个用户发送地图。经理可以点击地图以获取关于在地图上显示的特定数据点的另外的详情。

[0073] 现在参考图 5, 描绘了用于访问平台的各个方面的示例性仪表板。可以通过读取器和读取器管理器将测试结果自动地添加到平台。仪表板在正在进行的基础上监视调度的测试进行、结果和校正措施(其基于推定的阳性测试结果并且包括诸如提纯和重新测试之类的活动)。仪表板诸如通过条线图指出在一定时间段测试完成的整体状态。仪表板允许访问调度表 502、平面布置图 504 和补救 / 校正措施日志 508。在该示例中, 用于调度表 502 的检验记号指示所有要求的测试已经完成、至少部分地完成, 或者至少没有延误。在该示例中, 存在一个推定的阳性结果和要求审查的两种补救。

[0074] 在实施例中, 环境监测平台可以经由颜色编码或者一些其他指示符来根据数字指示特定微生物的存在 / 不存在。在仪表板特征中, 特定微生物的存在 / 不存在的跟踪可以随时间进行并且通过区域或测试点、菌株或者其他变体的微生物类型被组织。如果获取阳性发现, 则可以向特定用户发送诸如 SMS、传呼机警报, 等等的警报以及发现的位置。能够向诸如食品安全顾问的第三方或者向公司经理等等发送结果。

[0075] 在实施例中, 可以将数据与企业资源规划(ERP) 系统、其他质量管理软件、实验室管理软件或其他专有软件集成。

[0076] 在实施例中, 系统 100 可以是有预见性的。如果获取阳性结果, 系统能够建议测试或者重新测试的特定区域。这能够基于从取样处理获取的测试点数据和对处理以及设施 114 的了解。替换地, 系统可以要求收集新样本来用于外部实验室测试。稍后, 系统使实验室结果和推定的阳性一致。当实验室结果已经到达时或者当延误时, 系统将进行警报。

[0077] 一旦接收到推定性的阳性数据点, 系统 100 就能够帮助识别污染的根源。在实施例中, 可以通过引导矢量取样来进行根源分析, 其中目标是确定污染源并且设计有效的且及时的补救。系统可以诸如基于距推定性的阳性的距离、自从记录推定性的阳性起的时间量、在推定性的阳性测试点记录的污染的类型, 等等来生成以作为起点和阳性测试点之外的或者从阳性测试点外推到应当随后测试的区域的矢量的推定的阳性测试点为中心的热图或者平面布置图。可以基于它们的测试历史来加权提出的围绕的测试点。例如, 与没有阳性测试的历史的区域相比, 可以对包括具有阳性测试的先前历史的测试点的区域更多地加权。另外地, 系统可以提出过去没有测试的或者按预定计划当前要测试的测试新点。当平台提出附加测试时, 其产生更多测试点或者将操作员引导到存在的测试点的新组合。测试点可以具有改变的有效期。它们能够是永久的、一次性使用(诸如时机性样本) 或者短期间(诸如在矢量取样的两天期间被使用)。

[0078] 可以由系统提出和跟踪测试的位置和量。热图或者平面布置图可以将加权的结果显示为颜色或者具有一些其他可视的标识符。随着数据被聚合, 污染的可能区域应当变得更加窄, 并且可以披露污染的特定和根本原因。历史矢量取样结果可以被覆盖到热图上以指出测试历史一致以及在矢量化期间揭露的分歧的两种区域。在实施例中, 可以有用于每次测试点的多数据流。例如, 可以以并行视图或者如被添加到加权来给出用于每次测试点的诸如 ATP、实验室结果、成品测试、图片和上下文输入之类的附加测试数据。可能的结果能够包括识别污染一件配备的可能性、人类交通问题、设施的排水或者其他特征。因此, 系统可以基本上实施一种遏制协议。

[0079] 在实施例中,平台分析可以用于识别有问题的供应者或者生产线。每次测试点及其相关联的测试结果提供细化地评定某一供应者是否供应污染产品的可能性。获取样本可以涉及食品表面本身、食品包装、卡车、接收区域、非食品接触表面(区域 3 / 4)和 / 或食品接触表面(区域 1 / 2)的擦拭。平台提供在平面布置图的背景下准备关于各种测试点的丰富的数据的基于时间的查看的能力。当特定测试点为阳性时,这样的平面布置图可以通过提供就通过测试点的诸如产品码的供应者标识符而言考察平面布置图的能力来示出发现推定的阳性的时间以及在那时材料是模棱两可的供应者。因此,平台能够利用产品码来针对阳性测试结果追溯特定供应者、特定批、产品类型和库存。

[0080] 在实施例中,系统 100 可以用于诸如利用仪表板的趋势分析工具来随着时间跟踪环境监测中的趋势。系统 100 可以随着时间进行监测和向用户呈现趋势的集合,以例如确定在某一设施中在一年的某时间期间在特定微生物中是否存在刺突。例如,可以使得用户能够将各个时间段的多个设施上的微生物污染趋势相比较。在实施例中,用户可以将测试获取的数据与行业标准相比较。在实施例中,可以在各个设施上生成比较报告以保证单个公司、资方、工厂,等等上的一致性。可以在宏观意义上使用数据以识别行业的标准。数据可以通过使制成品中的微生物存在的风险较低、诸如通过减小保险费而对保险业、CFO,等等有用。

[0081] 在实施例中,系统 100 可以用于确定潜在危害点或风险,如在本文进一步解释的。

[0082] 在实施例中,实践仪表板 106 可以将多个设施上的数据相比较或者与行业基准相比较。实践仪表板 106 可以将结果与诸如污染的可接受的水平的阈值或者所关注的阈值相比较。实践仪表板 106 可以被可操作地耦合或者编程以生成各种指示符。指示符性质上可以音频、可视的、视听的、图形的,或者光谱的。实践仪表板 106 可以被配置为推荐改良污染的措施。由实践仪表板 106 作出的报告可以被配置为将报告联系到区域,诸如用于作为食品接触表面的区域 1-2 的报告、用于作为非食品接触表面的区域 3-4 的报告、用于加地理标签的位置的报告、用于其他位置的报告,等等。

[0083] 在实施例中,可以开发算法来将从包括各个数据源 118、第三方主机 120、读取器网络 110 的各个源或任何其他源接收的信息组合为总体食品安全危险指数以向用户警告潜在危害。例如,可以如上所述来加权数据。算法可以诸如通过根据平面布置图、根据地理定位、根据代码、根据图片、根据日期 / 时间,等等匹配数据来关联来自各种源的数据。

[0084] 在实施例中,来自系统的数据可以被聚合并且被转为卖给资方、保险公司和其他当事人的风险模型。数据模型可以是帮助进行以下一个或多个操作的各种各样的动态“计算器”:a) 向高级管理说明预算、b) 识别关键危险区、c) 帮助调节器评定向什么地方聚焦调节、d) 通知关于保险费定价的精算决定,如在先前描述的,等等。可以从各种源聚合被用于该目的的数据。源可以包括行业或食品类型、客户趋势、季节性倾向、召回数据、来自各种食品实验室的微生物测试数据、由系统 100 生成的微生物测试数据、测试趋势、健康数据、监测网络,等等上的过程比较。

[0085] 用户可以点击平面布置图按钮 504 以到达图 6 中示出的视图。现在参考图 6,对示例性平面布置图进行描绘。平面布置图可以是 2D 或者 3D 格式并且可以使关键点突出。可以通过使用由设施提供的平面布置图或者通过步行设施并且拍照并且然后将那些照片转换到设施的布局中来促进在平台上创建平面布置图。平面布置图可以包括主要墙壁排水

系统、配备、工作人员位置、生产工作流程、人类交通地图的布局和其他关于设施的有关的视觉信息,以使得能够更好地进行微生物监测。平面布置图可以被存储在系统 100 中并且可以由用户来访问以用于参考目的或者访问先前的记录。在设施是食品生产设施的实施例中,可以产生指出所有主要食品接触区和非食品接触区的位置的设施的 2D 或 3D 地图。在实施例中,平面布置图可以是 2D 或 3D 模型的混合,其中测试点位置的图像被集成在每个标记的测试点。在实施例中,平面布置图可以是作为先决条件方案的一部分的形式的食品生产设施的 HACCP 或 CAPA 计划的一部分,诸如用于通过关键控制点识别潜在危害。

[0086] 平面布置图可以是动态的。例如,操作员具有动态地添加附加测试点的能力。例如,随着用户审查平面布置图,用户可以随机地决定向关键区域添加附加测试点。如果用户通过触摸屏接口来访问设备上的平面布置图或者点击位置,诸如如果用户从台式计算机访问平面布置图,那么添加测试点可以与触摸位置一样简单。替换地,用户可以通过对位置的拍照以与测试点相关联来添加新的测试点。无论如何,可以测试新的测试点一次,或者可以将新的测试点作为将在正在进行的调度表上测试的点来添加。在实施例中,操作员可以具有能够被映射到新的测试点的没有加标签的测试套件。

[0087] 在执行测试调度表时,操作员具有向系统中动态地添加一个或多个测试并且添加新的测试点的选项。取决于业务规则集,添加测试可以生成仪表盘警报和校正措施。可以在示例性处理中如下添加新的测试点。促成“未分配的”样本套件。这是还没有设置位置数据的套件。软件通过扫描 QR 码、访问计算机存储器,等等来将套件识别为未分配的。通过诸如智能电话应用的应用,用户添加新的测试点。应用可以显示活动图像并且要求操作员将十字准线对准在新的测试点上。一旦十字准线被对准,操作员就获取图像。使用应用,要求操作员扫描将样本套件或样本管与刚刚获得的图像相关联的未分配的测试套件上的 QR 码。通过应用或者在稍后的时间里,将提示操作员输入关于新的测试点的详情,诸如新的测试点的描述性的文本标签、附近的一个或多个存在的位置的选择、是永久地就将其添加到调度表还是将其留作为单个、时机性、样本收集,等等。当动态地添加的测试点的描述是不完整的时,应用可以向操作员进行警报。在将新的测试点添加到系统中的其他的示例中,处理能够包括将智能电话地理定位在新的测试点上以自动地关于其他位置和总体上关于设施来映射新的测试点。处理的其余部分可以不发生改变。在又一些其他示例中,添加新的测试的处理可以从在平面布置图表示上单击任何地方开始,其可以提示用户添加测试期中详情,诸如区域、测试类型、调度表或者图像,并且登记用于数据跟踪的样本套件,如上所述。

[0088] 作为对地理定位的样本收集点的替代,操作员可以选择获取每个取样位点的图像,其中测试点在图像的中心。能够经由智能电话应用或者其他软件处理来进行这一点。如果使用该方法,操作员具有使用移动软件来如上所述使调度表呈现为可视平面布置图或者打印出具有测试点图像的每日取样调度表的选项。使用图像和文本标签来提醒用户在什么地方获取样本,基于图像的测试点位置形成指导日常取样测试的不同方式。这在地理定位或者其他三角测量服务对于任务或者根据操作员偏好不是可用的或者不健壮的情况下是可应用的。

[0089] 在实施例中,系统 100 可以随机地提出用于取样的测试点。系统 100 可以通过与在某时间段擦拭整个设施或者设施的区域结合将高风险区的一个或多个权重与过去已经



是阳性的区域组合来提出新的测试点。使用可以替换随机化的调度表,以便确保某些测试点的包括或者除外。

[0090] 利用移动软件来使用可视平面布置图,用户可以点击与测试点相关联的图标以查看位置的图像并且读取关于如何收集样本的注解。

[0091] 在图 6 中,能够发现关于生产清洗线上的各个清洗工位的详情以及初级产品前置加工线上的清洗工位和排水系统和冷却单元中的排水系统。图标 602 可以与映射在平面布置图上的每次测试点相关联。图标 602 可以是交互的,如在本文将描述的。例如,检验记号可以指示确认的阴性结果、感叹号可以指示推定的阳性结果或者推定的阳性结果的最近的历史、跑表可以指示尚未完成的或者延误的结果,并且‘>’可以指示另外的详情是可通过点击在该图标上而得到的。应当理解,任何符号、字符,或者图标可以用于表示结果状态。图标也可以用于表示在测试点使用的各种各样的诊断测试。例如,图 6 中的图标 608 ‘L.’ 指的是用于李氏菌属的诊断测试。平面布置图是对实际的设施中的各种测试点的实际的位置的描绘。在该示例中,存在对于初级产品前置加工线 2、排水系统 1 所指出的一个警报。通过在平面布置图中点击与位置相关联的图标 602,可以访问图 7 中的视图。图 7 描绘当用户与图标 602 交互时所显示的对话框。对话框显示来自在该特定位置的测试的结果和统计量,包括引起警报的结果。在该示例中,也显示关于先前推定的阳性结果的数据。用户能够从该视图快速访问报告和补救日志。另外地,在这里可以显示用于测试点的第三方数据。任何推定的阳性结果将自动地引起能够在仪表板的补救 / 校正措施日志中被访问的校正措施的生成。图 8 描绘补救日志。第一条目指示开放的补救,包括位置、测试点、日期、所要求的校正措施、校正措施的状态、参考校正措施的标准操作程序、分配补救的用户,以及指示任务完成的一旦完成任务就按下的措施按钮。通过单击完成,可以将补救移动到审查列表。下一列显示需要被经理审查的用于补救的数据。条目指示位置、测试点、日期、所指示的校正措施、校正措施审查的状态、参考标准操作程序、分配补救审查的用户,以及指示其已经被审阅的且审阅完成就按下的措施按钮。如果对于审查补救过期,则可以生成警报。历史补救也可以在日志中是看得到的。

[0092] 现在参考图 9A 和图 9b,描绘仪表板的调度表页面的实施例。图 9A 的调度表页面允许用户停下在任何特定位置的用于任何特定数据的调度的测试,并且审查包括测试点、测试类型、当结果是应得的时的预定时间、指配测试的用户和注释的数据。图 9B 的调度表页面允许用户停下在任何特定测试点的用于任何特定时期的调度的测试,并且审查包括测试点、测试类型、位置、当结果是应得的时的收集时间、指配测试的用户和取样注解的数据。平台可以使用调度表来主动地跟踪进来的数据以确保准时完成测试,并且当其还没有发生时,平台将对仪表板进行警报。注释和取样注解能够将测试引导到特定位置,或者能够引导用户收集附加的数据,诸如观测的水坑。可以将这样的附加的数据添加到用于特定测试点的数据流。调度表可以带有折叠视图,其中点击行扩展提供许多附加的行的选择并且使得用户能够快速搜查图 9A 中的在所指示的时间段在不同位置上调度的测试。如在图 9B 中,折叠视图也可以用于审查贯穿星期所调度的测试,其中每天表示折叠视图中的折痕。使用调度表,能够在已知的或者随机地选择的位置添加新的测试、能够修改调度表,并且能够在任何时间随机地插入测试。实际上,如果用户诸如通过使用平面布置图接口来添加新的测试,则新的测试点然后可以作为现在将被收集的测试点出现在调度表上。

[0093] 利用调度表,环境监测平台可以跟踪样本是否如计划的那样被收集。可以编程环境监测平台来向用户提醒在什么地方以及何时获取给定的样本。可以(经由条形码或者其他)利用测试点数据来预先印制样本收集套件,以向用户警报在什么地方获取样本,因此使保持跟踪多个样本简单化。可以使用包括 GPS、条形码、QR 码、RFID 标签、PvF 三角测量,等等的方法来对样本进行地理定位。在实施例中, GPS 或者其他地理定位方法可以用于跟踪在什么地方收集样本以确保测试进行中的遵从性和一致性。在实施例中,如果未收集样本,则可以经由 SMS 或者其他手段来发送警报。跟踪的数据也可以包括样本收集的时间、取样器的名称,等等。在实施例中,可以将诸如条形码、QR 码,或者 RFID 标签的标识符放置在在取样之前将被扫描的遍布工厂的测试点上,使得取样可以被映射回到软件中的生产设施 114 的 2D 或 3D 地图,使得当进行测试时,能够跟踪测试的特定位置,等等。替换地,测试点处的标识符可以简单地与样本套件上的标识符相比,以保证从正确的位置获取样本。

[0094] 现在参考图 10,描绘仪表板的报告页面。报告可以包括所有测试活动的历史视图。报告输出可以是完全地可定制的、可以被打印、可以被导出到软件应用,或者与任何公司 IT 基础设施对接/同步。报告可以包括第三方数据。报告可以用于跟踪趋势和执行分析。报告可以是可搜索和可导出的。在实施例中,报告包括用于每个测试点的数据、包括测试的区域、测试点编号&位置、区、时间、%阴性测试、%阳性测试、随着时间中止的实际测试结果,等等。在该示例中,检检验记号指示阴性结果并且‘X’指示阳性结果。

[0095] 实践仪表板 106 可以被部署为 ticker 格式的软件、智能电话或者类似设备中的应用特征,等等。

[0096] 现在参考图 2,图示出用于通过进行各种测试、收集测试数据和分析所收集的数据来在给定环境中进行微生物的基于噬菌体的检测的方法 200。方法 200 可以包括在步骤 202 映射生产设施 114 或者任何其他环境,并且在软件中对环境进行建模以生成平面布置图,如先前描述的。在步骤 204 中,方法 200 可以进一步将测试点映射到在步骤 202 生成的平面布置图上的特定地点。

[0097] 方法 200 可以进一步包括对于提出诸如以下的各种参数的平台来在步骤 208 建立“业务规则”的集合:每天运行的测试的数量、按测试多长时间重复取样、应当在什么地方收集样本、在步骤 210 推定性的阳性结果之后出现的校正措施、满足推定的阳性结果上的校正措施所需要的反重新测试的数量、向什么地方发送数据、从数据产生什么图形/表/报告、用于警报的阈值、如何设置监测进程,等等。例如,规则可以是,如果在区域 1 中获取阳性结果,则校正措施是重新清洗所有配备。在实施例中,用户可以具有修改或者添加业务规则、审查业务规则、更新业务规则,等等的能力。

[0098] 方法 200 可以包括诸如经由基于无线或以太网的数据传输或者经由另一个联网协议的传输来在步骤 210 向中央服务器传送推定的阳性的或者确认的阴性的测试数据。在实施例中,数据可以被存储到测试读取器的存储器,诸如可移除的存储器,使得存储器可以被移动到另一个设备以供审阅。在实施例中,信息与服务器或者客户服务器同步以维持数据来用于将来发布、跟踪趋势、审计,等等。数据应当以与在位点的其他数据可比较的格式是可导出/可呈现的,以促进由审计员或者检查员进行审查。例如,常见格式(Excel,等等)的数据的输出可以用于形成测试结果的安全的客户资料库。在实施例中,可以由 QA、食品安全、感染控制人员或者其他用户来审查数据。来自读取器的结果的传输可以用于监测测试

读取器本身的使用。

[0099] 在步骤 212, 服务器可以预期调度表上的结果的传输, 因此当测试已经被跳过时, 或者当已经接收到推定性的阳性测试结果时, 服务器可以生成警报。读取器或服务器可以基于结果来向第三方实验室警报请求或拾取用于附加测试的样本。在实施例中, 可以由系统生成报告和诸如热图的图形, 其示出具有或者不具有用于微生物或者其他污染物的阳性结果的区域。

[0100] 方法 200 可以进一步包括在步骤 214 推荐校正活动。可以由系统 100 跟踪校正活动, 可以进行重新测试, 直到获取了阴性结果。业务规则可以支配满足推定的阳性结果上的校正措施所需要的阴性重新测试的数量。

[0101] 图 3 是表示系统 100 的框图并且图示出存在于系统 100 之中的功能层。

[0102] 系统 100 可以包括数据源 118, 其馈送来自包括生物发光试验的许多源的数据, 以检测噬菌体诱导的产物。

[0103] 类似于在先前在本文描述的实践仪表板 106, 系统 100 可以包括仪表板或概观模块 302。仪表板 / 概观模块可以作为用户接口被配置, 并且可以被配置为与用户交互、发出警报(例如 SMS、传呼机警报, 等等)、与 API / 应用交互、在简档中维护用户认证和日志详情, 等等。系统 100 可以包括调度表模块 304。调度表模块 304 可以可操作地耦合到仪表板 / 概观模块 302。调度表模块 304 可以被配置为用于执行调度和跟踪仪表板的任务, 诸如用于设置用于数据的收集的特定时间、取样的到期日, 用于向某些收集者 / 操作员分配任务, 等等。

[0104] 在实施例中, 调度表模块 304 根据业务规则来发送何时应该和由谁进行测试的提醒。调度表模块 304 可以适于诸如基于季节、基于轮班、基于用户 / 操作员, 等等来确定定制的调度表。调度表模块也可以可操作地耦合到数据库模块 104。在实施例中, 调度也可以包括确定将使用什么设备、何时和在什么位置使用。调度表模块也可以跟踪实际上何时执行任务、任务是否完成, 或者与其预定被执行的时候相比任务是否未完成以及完成的任务本应如何。这能够用于通过一组雇员跟踪执行。

[0105] 系统 100 可以包括平面布置图模块 306 (也被称为热图生成模块 306)。平面布置图模块 306 可以可操作地耦合到仪表板模块 302 和读取器管理器 102。平面布置图模块 306 可以被配置为生成生产设施的地图(如图 4 所图示的)。在先前参考图 2 描述了关于地图生成的详情。在实施例中, iPad / 智能电话可以与平台一起使用, 以跟踪在什么地方进行了取样。例如, 用户能够触摸在 iPad / 智能电话的触摸屏上显示的并且将某一拭子 # 联系到测试点的平面布置图上的位置。另外地, 在设备上运行的应用能够向测试进行者通知在什么地方进行每次测试、何时进行每次测试, 等等。能够由设备获取照片, 诸如测试点的照片, 以与样本相关联, 如在本文所描述的。

[0106] 系统 100 可以包括校正措施日志 308。校正措施日志 308 可以被配置为基于测试结果分析来推荐和存储校正措施。校正措施日志 308 可以耦合到调度表模块 304 以使得能够同步调度和校正措施。校正措施日志可以用于向各个操作员、经理, 等等分配任务。另外地, 一旦有返回阴性结果的跟进测试, 校正措施日志可以用于确认校正措施的完成。与业务规则结合, 校正措施日志可以用于确定某些校正措施是否应当进入 CAPA 系统。

[0107] 环境监测平台能够通过先前的阳性(和后继的校正措施)的地点具有阴性测试

来跟踪校正措施何时结束。可以在给定阳性结果之后自动地更新或者由用户人工地更新校正措施日志。校正活动可以包括建议用于校正措施和审查的实施方式的单独的菌剂。如果还没有根据强制要求执行校正措施或者还没有根据强制要求审查校正措施,则可以产生警报。在实施例中,环境监测平台可以推荐卫生协议以及在给定表面上潜在地哪些产品将是最有效的。在实施例中,环境监测平台可以推荐预防措施来最小化微生物的出现并且改善产品质量。

[0108] 系统 100 可以包括历史仪表板 310,其可以被配置为记录和显示先前的测试、测试结果、报告、图形、地图,等等以用于将来参考。历史仪表板允许用户扫视指定的时间段和位置上的所有测试以找出随着时间的趋势(例如季节性)或者改善/非改善。在实施例中,历史仪表板可以是配置为显示来自定义的时间段的项的仪表板。

[0109] 图 4 图示出在食品测试环境中的基于噬菌体的微生物检测过程的通用工作流程方法图 400。

[0110] 方法 400 可以包括在步骤 402 对设施 114 的测试点就地平面布置图进行建模和审查,并且扩展测试计划。测试点的建模以及监测可以被转给第三方。测试点可以与如在 HACCP 中识别的关键控制点的验证或监测、环境或者卫生计划相关联。在步骤 404,用户能够产生联系到正在进行的测试和历史趋势的动态平面布置图(如图 6 中所描绘的)和调度表(如图 9a 和 9b 中所描绘的)。在步骤 408,可以从简洁日常的仪表板管理测试,如图 5 中所描绘的。可以从诸如智能电话和传呼机之类的许多设备访问仪表板,并且仪表板可以向许多设备发送警报和通知。在步骤 410,能够跟踪校正措施,如图 7 的对话框和图 8 中的补救日志中所描绘的。在步骤 412,如图 10 中所描绘的历史趋势可以用于管理环境计划。数据可以被导出,或者平台可以与 IT 基础设施集成,以促进用于环境监测的端到端解决方案。

[0111] 系统 100 可以被配置为其中顾问或者审计员可以进入和用文件证明风险点的被动程序。顾问可以使用设施 114 的图片或者地图并且利用热点来对系统 100 编程。系统 100 可以被配置为记录和识别图片或地图。顾问可以监测根据 HACCP 计划进行的所有测试数据和结果以保证在关键控制点的潜在危害被有效地监测。在实施例中,系统 100 可以是像 ISO 的系统,使得可以在已经完成测试并且已经发现任何污染的阴性的报告之后给出认证的类型。可以设置调度表用于进一步的测试和认证更新。

[0112] 在实施例中,系统 100 可以用作用于在给定环境中实时或者接近实时原位监测微生物存在的平台。在实施例中,系统 100 可以是用于实时的或者接近实时监测环境中的微生物的平台,其中,平台可能能够取决于测试来检测和报告不同的微生物或者给定的微生物的不同的菌株的存在。此外,样本能够被划分用于通用筛查,其后是特定测试。

[0113] 在实施例中,系统 100 可以用作用于实时的或者接近实时监测环境中的微生物的平台,其中,平台能够量化和报告和预先确定的集合的风险级别相一致的给定的微生物的级别。在实施例中,可以由系统 100 预先确定或人工地输入风险水平。

[0114] 接近实时的结果使得能够进行大量下游活动。例如,接近实时的结果使得能够进行联机处理监测,使得如果检测到微生物能够立即脱机获取机器或系统。在实施例中,可以在清洗周期期间生成可付诸行动的信息,以确定重新清洗是否是必要的或者系统是否需要被拆开以进行清洗。在实施例中,频繁的擦拭使得比较容易地识别污染的点、微生物污染的根本原因,并且划去污染的假定的原点。此外,可以在内在污染或者微生物的连续的重新引

入与外部源之间画出区分。系统也可以帮助化学制剂的供应者确定在什么地方、在什么时候和使用哪些清洗剂。

[0115] 在实施例中,环境监测平台可以用于通过使信号与细胞的数量(<10 个细胞、>100 个细胞、>1000 个细胞)相关来量化问题的严重度,并且这能够与诸如重新清洗和重新测试、脱机地采取设施或者设施的一部分、隔离食品、毁坏食品,等等的特定校正措施相关联。在实施例中,平台可以在将转运站与储藏所区分方面有用,即,尤其当在适当的背景上下文中被获取时,具有低计数的表面可以被考虑为转运站。

[0116] 在实施例中,可以与位于相同的设施或者第三方设施中的其他检测技术结合来使用系统 100。

[0117] 在实施例中,系统 100 可以是包括用于基于噬菌体诱导的产物来检测环境中的微生物和用于检测与环境的安全有关的至少一个其他因素的模块的平台。

[0118] 在实施例中,系统 100 可以是包括用于基于噬菌体诱导的产物来检测环境中的微生物以及用于检测 ATP (腺苷三磷酸) 或者生物活动性的其他的标记、由另一种类型的检测器测量的微生物、样本的温度、时间、CFU (菌落形成单位) 计数、样本位置、取样频率,等等中的至少一个的模块的平台。系统 100 可以被配置为将从其他测试获取的结果与基于的由平台收集的噬菌体诱导的产物的测试结果相比较,并且诸如经由地理定位、编码或者其他手段来适当地将来自其他测试的结果与它们的平台对应方相关联。系统可以被编程为如果基于噬菌体诱导的产物的测试为阳性并且至少一个其他检测测试是阴性的就推荐行动方案。系统可以被编程为如果基于噬菌体诱导的产物的测试为阴性并且至少一个其他检测测试为阳性就推荐行动方案。在实施例中,可以与 ATP 水平测试结合来使用基于噬菌体诱导的产物的检测测试。

[0119] 在实施例中,系统 100 可以用于预测应当被检查或者应当归入仔细检查的区域。系统 100 可以是包括用于基于噬菌体诱导的产物来检测环境中的微生物以及用于基于纵向测试数据来预测应当被检查的区域的模块的平台。

[0120] 在实施例中,系统 100 可以用于识别应当被测试的位置。示例包括将多件配备或者房间器材分类。或者例如,识别在距离诸如排水系统的参考位置的固定距离内的区域(例如,在排水系统的 10 英尺半径内的区域)。

[0121] 在实施例中,系统 100 可以是用于收集、报告、分析和管理关于多个环境中的微生物的存在的实时数据的流的分析平台 / 构架 / 软件环境。

[0122] 在实施例中,可以在食品生产分析中使用系统 100。系统 100 可以是用于收集、报告、分析和管理关于食品生产环境中的微生物的存在的实时数据的流的分析平台 / 构架 / 软件环境。

[0123] 在实施例中,可以在分析和跟踪生长中使用系统 100。系统 100 可以是用于收集、报告、分析和管理关于环境中的微生物的存在的实时数据的流以及在软件中对环境进行建模以跟踪感兴趣的区域中的微生物生长的分析平台 / 构架 / 软件环境。

[0124] 在实施例中,可以在分析、跟踪生长和热图中使用系统 100。系统 100 可以是用于收集、报告、分析和管理关于环境中的微生物的存在的实时数据的流以及在软件中对环境进行建模以跟踪感兴趣的区域中的微生物生长并且在热图表示中显示所跟踪的生长的分析平台 / 构架 / 软件环境。在实施例中,可以产生指出所有主要食品接触区和非食品接触

区的位置的生产设施的 2D 或 3D 地图。在实施例中,地图可以是以先决条件计划的一部分的形式存在的食品生产设施 HACCP 规划的一部分。在实施例中,可以产生示出具有或者不具有微生物的阳性结果的区域的热图。利用基于位置的访问,可以在热图中呈现每个测试点的历史(当前的和先前的这两者),以及实际上,包括报告、图形和地图的数据的任何表示。

[0125] 在实施例中,可以在分析、跟踪生长和整合中使用系统 100。系统 100 可以是用于收集、报告、分析、管理关于环境中的微生物的存在的实时数据的流、在软件中对环境进行建模以跟踪感兴趣的区域中的微生物生长,以及将结果与 HACCP 计划、CAPA 系统和环境验证计划、卫生计划、存在的实验室管理系统或者企业数据库集成,等等的分析平台 / 构架 / 软件环境。例如, HACCP 计划可以涉及针对所有潜在危害在关键控制点监测环境。测试结果可以与为了符合 HACCP 计划所需要的那些测试(与实际地进行的那些点相比,其事实上可以是更少的点)一致。继续该示例,某些测试点可能具有阳性结果,但是如果那些测试点没有作为关键控制点被包括在 HACCP 计划中,尽管具有阳性测试结果,但设施可以仍然坚持 HACCP。

[0126] 在实施例中,可以由系统 100 来映射设施 114 的布局、处理流程和协议关联。

[0127] 在实施例中,可以在分析、跟踪生长和确定风险的区域中使用系统 100。系统 100 可以是用于收集、报告、分析和管理的关于环境中的微生物的存在的实时数据的流以及在软件中对环境进行建模以跟踪感兴趣的区域中的风险系数的分析平台 / 构架 / 软件环境。

[0128] 在实施例中,系统 100 可以被配置为用于使用所有检测的数据来用于各种目的。系统 100 可以用于报告微生物的工程噬菌体诱导的产物的所检测的级别,用于实现与环境中的微生物活性的管理有关的警报、报告和措施中的至少一个。环境可以指的是其中可以使用系统 100 的布置。

[0129] 在实施例中,可以由系统 100 使用数据来推荐卫生协议以及在给定表面上潜在地哪些产品将是最有效的。

[0130] 在实施例中,可以做出一种品牌或者可以在食品的盒子、纸板箱或者封装外侧上放置封印以向买方(饭店、超级市场、食品工业,等等)传达在生产期间已经监测了食品安全。

[0131] 品牌可以包含 QR 码或者能够被扫描以提供包括如下的详细生产数据的其他的机制:食品的源——例如“可跟踪性”数据、生产技术、健康信息、成分、有机状态、过期信息、烹调指南、批号码,等等。详细生产数据可以耦合到环境监测结果数据。

[0132] 在实施例中,系统 100 可以是可以通过以预订为基础出售给端用户的综合承包服务。在实施例中,用于食品安全监测的承包服务可以作为对终端消费者或者对诸如在大食品服务公司的那些、经销商、零售商,等等的买方的每月的预订来出售。系统 100 可以永久地激活以不断地监测微生物的存在、趋势和风险。在实施例中,系统 100 可以是警报系统、而不是成批系统。系统 100 可以被配置为用于微生物的主动检测和监测。

[0133] 与可以作为个体单元可用的其他微生物测试不同,系统 100 可以作为包括拭子、读取器硬件、数据管理和警报以及第三方监测的完整的系统来出售。在实施例中,价格模型可以包括每月一定数量的测试。在实施例中,所有监测和其他服务可以被包括在价格模型中。可以通过诸如食品实验室、清洁提供公司之类的经销商或者其他出售者来出售系统 100。在实施例中,推定的阳性结果可以与触发将被发送给用于培养的合作实验室的辅助拭

子的服务联合。

[0134] 环境监测平台可以在整个食物链上可使用以监测用于过程检测和清洗过程、HACCP 计划的验证两者,等等的环境微生物污染。在实施例中,可以在诸如用于肉、鲜切产品、海味、家禽,等等的加工厂中使用环境监测平台。在实施例中,可以在诸如超级市场(熟食柜台、鱼、方便食品生产)的零售店、饭店、批发市场、大型食品服务运营商和出售者、食品生产设施、进口/出口企业、诸如 US 食品和药物管理局(FDA)的联邦和州政府检查服务、US 农业部(USDA),食品安全监督服务局(FSIS)、医院、疗养院、其他的保健设置,等等中使用环境监测平台。

[0135] 在实施例中,可以在医院、长期护理设施或者私有保健设施中使用环境监测平台,用于监测可能引起例如医院获得性感染的改变的微生物。

[0136] 在实施例中,可以由大学、旅游客轮、慈善和老人护理、露天大型运动场、公园、休闲体育设施或衣帽间或者诸如军队营区或船舶、宿舍、夏令营之类的拥挤和人员流动可能是问题的任何区域,等等来使用环境监测平台。

[0137] 用于环境监测平台的市场可以包括食品区(加工者、批发商、零售商)、消费者、零售联营、国际食品出口/进口、保健设施等等。

[0138] 可以由环境监测平台检测的微生物可以包括大肠杆菌、李氏菌属、沙门氏菌、弯曲杆菌属、特定大肠杆菌子集(STEC、EHEC、各种 O&H 血清型,像 0157:H7、0111:H8、0104:H21 等等)、弧菌、志贺氏菌属、葡萄球菌、梭状芽孢杆菌、隐孢子虫、布鲁氏菌属、棒状杆菌、军团杆菌、考克斯氏体属、邻单胞菌属、耶尔森氏菌属、气单胞菌属,或者包括被考虑为用于指示另一个微生物的存在的指示符的任何细菌的在生产环境中被控制或者监测的任何微生物。

[0139] 系统 100 也可以用于检测特定腐败菌(SSO)。SSO 的存在可以对识别很可能腐败的食品的批是有用。可以再处理这些批以便获取更好的保存期限和较少的腐败物。

[0140] 在实施例中,可以由在用户位置的 QA 或者食品安全人员、第三方审计员、感染控制/护士、清洁班,等等来使用环境监测平台。在实施例中,环境监测平台可以用于监测微生物以向用户和其他有关的人员提供可付诸行动的数据。

[0141] 一旦成品已经被处理为服从由读取器读取的状态,就可以如图 2 中所描绘的,在成品测试中使用环境监测平台。在实施例中,假设不存在减小迁移率的胶束形成或者胶体,状态可以主要地是可以在磨细样本并且利用细滤器析出颗粒之后实现的水溶液的状态。在实施例中,可以利用用于成品样本准备的现在的/标准的实验室方法。在实施例中,成品测试机制可以用于基本上减小用于成品的保持时间并且因此实现保存期限的增加。

[0142] 在本文公开了本发明的详细实施例;然而,应当理解,所公开的实施例仅仅是可以以各种形式体现的本发明的示例。因此,在本文公开的特定结构和功能详情将不被解释为进行限制,而是仅仅作为权利要求的基础以及作为用于教导本领域技术人员在事实上任何适当的详细结构中不同地采用本发明的代表性基础。此外,在本文使用的术语和措词不意图进行限制,而是提供本发明的可理解的描述。

[0143] 如本文所使用的术语“一”或“一个”被定义为一个或多于一个。如本文所使用的术语“另一个”被定义为至少第二个或更多个。如本文所使用的,术语“包括”和/或“具有”被定义为包括(即,开放转换)。如本文所使用的术语“耦合”或“操作地耦合”被定义为连接——尽管不一定是直接地且机械地连接。

[0144] 可以通过在处理器上执行计算机软件、程序代码和 / 或指令的机器来部分地或完全地部署在本文描述的方法和系统。处理器可以是服务器、云服务器、客户端、网络基础设施、移动计算平台、固定计算平台, 否则其他计算平台的一部分。处理器可以是能够执行程序指令、代码、二进制指令等等的任何种类的计算或处理设备。处理器可以是或包括可以直接地或间接地促进存储在其上的程序代码或程序指令的执行的信号处理器、数字处理器、嵌入式处理器、微处理器或诸如协处理器(数学协处理器、图形协处理器、通信协处理器, 等等)的任何变体, 等等。另外, 处理器可以使得能够执行多个程序、线程和代码。可以同时地执行线程以增强处理器的性能并且促进应用的同时操作。通过实施, 可以在一个或多个线程中实施在本文描述的方法、程序代码、程序指令, 等等。线程可以造成可以具有与它们相关联的指配的优先级的其他线程; 处理器可以基于在程序代码中提供的指令、基于优先级或任何其他次序来执行这些线程。如在这里和其他地方所描述的, 处理器可以包括存储方法、代码、指令和程序的存储器。如在这里和其他地方所描述的, 处理器可以通过接口来访问可以存储方法、代码和指令的存储介质。用于存储能够由计算或处理设备执行的方法、程序、代码、程序指令或其他类型的指令的与处理器相关联的存储介质可以包括但是可以不限于 CD-ROM、DVD、存储器、硬盘、闪存驱动器、RAM、ROM、高速缓存中的一个或多个, 等等。

[0145] 处理器可以包括可以提高速度和多处理器的性能的一个或多个核。在实施例中, 处理器可以是组合两个或更多独立的核(称作管芯)的双核处理器、四核处理器、其他芯片级多处理器等等。

[0146] 可以通过在服务器、客户端、防火墙、网关、集线器、路由器, 或其他这样的计算机和 / 或联网硬件上执行计算机软件的机器来部分地或完全地部署在本文描述的方法和系统。软件程序可以与可以包括文件服务器、打印服务器、域服务器、因特网服务器、内部网服务器和诸如辅助服务器、主机服务器、分布式服务器的其他变体等等的服务器相关联。服务器可以包括存储器、处理器、计算机可读介质、存储介质、端口(物理和虚拟)通信设备, 和能够通过有线或无线介质访问其他服务器、客户端、机器和设备的接口中的一个或多个, 等等。可以由服务器来执行如在这里和其他地方所描述的方法、程序或代码。另外, 执行如在本申请中描述的方法所需要的其他设备可以被认为是与服务器相关联的基础设施的一部分。

[0147] 服务器可以提供到其他设备的接口, 其他设备包括但不限于客户端、其他服务器、打印机、数据库服务器、打印服务器、文件服务器、通信服务器、分布式服务器、社交网络, 等等。另外地, 该耦合和 / 或连接可以促进程序跨网络的远程执行。在不背离本发明的范围的情况下, 一些或所有这些设备的联网可以促进程序或方法在一个或多个位置的并行处理。另外, 通过接口附着于服务器的任何设备可以包括能够存储方法、程序、代码和 / 或指令的至少一个存储介质。中央储存库可以提供将在不同的设备上执行的程序指令。在该实施方式中, 远程储存库可以充当用于程序代码、指令和程序的存贮介质。

[0148] 软件程序可以与可以包括文件客户端、打印客户端、域客户端、因特网客户端、内部网客户端和诸如辅助客户端、主机客户端、分布式客户端的其他变体等等的客户端相关联。客户端可以包括存储器、处理器、计算机可读介质、存储介质、端口(物理和虚拟)通信设备, 和能够通过有线或无线介质访问其他客户端、服务器、机器和设备的接口中的一个或多个, 等等。可以由客户端来执行如在这里和其他地方所描述的方法、程序或代码。另外, 执



行如在本申请中描述的方法所需要的其他设备可以被认为是与客户端相关联的基础设施的一部分。

[0149] 客户端可以提供到其他设备的接口,其他设备包括但不限于服务器、云服务器、其他客户端、打印机、数据库服务器、打印服务器、文件服务器、通信服务器、分布式服务器,等等。另外地,该耦合和/或连接可以促进程序跨网络的远程执行。在不背离本发明的范围的情况下,一些或所有这些设备的联网可以促进程序或方法在一个或多个位置的并行处理。另外,通过接口附着于客户端的任何设备可以包括能够存储方法、程序、应用、代码和/或指令的至少一个存储介质。中央储存库可以提供将在不同的设备上执行的程序指令。在该实施方式中,远程储存库可以充当用于程序代码、指令和程序的存贮介质。

[0150] 可以通过网络基础设施来部分地或完全地部署在本文描述的方法和系统。网络基础设施可以包括诸如计算设备、服务器、云服务器、路由器、集线器、防火墙、客户端、个人计算机、通信设备、路由设备和其他有源和无源设备、模块和/或组件之类的元件,如现有技术中已知的。与其他组件分开的与网络基础设施相关联的计算和/或非计算设备可以包括诸如闪速存储器、缓冲器、堆栈、RAM、ROM 等等的存储介质。可以由一个或多个网络基础设施元件来执行在这里和其他地方描述的处理、方法、程序代码、指令。

[0151] 可以在具有多个小区的蜂窝网络实施在这里和其他地方描述的方法、程序代码和指令。蜂窝网络可以是频分多址(FDMA)网络或码分多址(CDMA)网络。蜂窝网络可以包括移动设备、小区站点、基站、中继器、天线、塔,等等。蜂窝网络可以是 GSM、GPRS、3G、EVDO、网状网,或其他网络类型。

[0152] 可以在移动设备上实施或通过移动设备实施在这里和其他地方描述的方法、程序代码和指令。移动设备可以包括导航设备、蜂窝电话、移动式电话、移动个人数字助理、膝上计算机、小型便携式电脑、上网本、传呼机、电子书阅读器、音乐播放机等等。与其他组件分开地,这些设备可以包括诸如闪速存储器、缓冲器、RAM、ROM 的存储介质和一个或多个计算设备。可以使得与移动设备相关联的计算设备能够执行存储在其上的程序代码、方法和指令。替换地,移动设备可以被配置为与其他设备合作来执行指令。移动设备可以与和服务器对接的基站进行通信,并且被配置为执行程序代码。移动设备可以在对等网络、网状网络或其他通信网络上进行通信。程序代码可以被存储在与服务器相关联的存储介质上并且由嵌入在服务器内的计算设备来执行。基站可以包括计算设备和存贮介质。存贮设备可以存储由与基站相关联的计算设备所执行的程序代码和指令。

[0153] 可以在可以包括如下的机器可读介质上存储和/或访问计算机软件、程序代码和/或指令:在某时间间隔保持用于计算的数字数据的计算机组件、设备和记录介质;被称为随机存取存储器(RAM)的半导体存贮器;典型地用于更永久存贮的大容量存储器,诸如光盘,像硬盘、磁带、磁鼓、磁存储器的形式,卡和其他类型;处理器寄存器、高速缓存存储器、易失性存储器、非易失性存储器;光诸如 CD、DVD 的光存储器;可移动介质,诸如闪速存储器(例如 USB 棍或密钥)、软盘、磁带、纸带、穿孔卡片、独立 RAM 磁盘、Zip 驱动器、可移动大容量存贮器、脱机,等等;其他计算机存储器,诸如动态存储器、静态存储器、读取/写入存贮器、可变存贮器、只读、随机存取、顺序存取、位置可寻址的、文件可寻址的、内容可寻址的、网络附接存储、存储区域网络、条形码、磁性墨水,等等。

[0154] 在本文描述的方法和系统可以将物理和/或无形的项从一种状态转换到另一种

状态。在本文描述的方法和系统可以将物理和 / 或无形的项从一种状态转换到另一种状态。

[0155] 包括在贯穿图中的流程图和框图中的在本文描述和描绘的要素暗示要素之间的逻辑边界。然而,根据软件或硬件工程实践,可以通过计算机可执行的介质在具有能够将存储在其上的程序指令作为如下来执行的处理器的机器上实施所描绘的要素和其功能:作为单片软件结构、作为独立软件模块、或作为采用外部例程、代码、服务等等的模块、或者这些的任何组合,并且所有这样的实施方式可以在本公开的范围。这样的机器的示例可以包括但不限于个人数字助理、膝上计算机、个人计算机、移动式电话、其他的手持计算设备、医疗设备、有线或无线通信设备、换能器、芯片、计算器、卫星、平板机 PC、电子书、小配件、电子设备、具有人工智能的设备、计算设备、联网设备、服务器、路由器等等。此外,可以在能够执行程序指令的机器上实施在流程图和框图中描绘的要素或者任何其他逻辑组件。因此,尽管上述附图和描述阐述了公开的系统的功能方面,但不应当从这些描述推定用于实施这些功能方面的软件的特定布置,除非有明确地陈述或以其他方式从背景上下文是清楚可知的。类似地,将理解的是,可以改变如上标识和描述的各个步骤,并且可以使步骤的次序适于在本文公开的技术的特定应用。所有这样的变化和修改意图落入本公开的范围。因而,不应当将用于各个步骤的次序的叙述和 / 或描述理解为要求用于那些步骤的执行的特定次序,除非特定应用需要,或者明确地陈述,或以其他方式从背景上下文清楚可知。

[0156] 可以在适合于特定应用的硬件、软件或者硬件和软件的任何组合中实现如上所述的方法和 / 或处理和其步骤。硬件可以包括通用计算机和 / 或专用计算设备或特定计算设备或者特定计算设备的特定方面或组件。可以与内部和 / 或外部存储器一起在一个或多个微处理器、微控制器、嵌入式微控制器、可编程数字信号处理器或者其他可编程设备中实现处理。处理也可以或者代替地被体现在专用集成电路、可编程门阵列、可编程阵列逻辑或者可以被配置为处理电子信号的任何其他设备或设备的组合中。将进一步理解的是,一个或多个处理可以被实现为能够在机器可读介质上执行的计算机可执行的代码。

[0157] 可以使用以下各项来创建计算机可执行的代码:诸如 C 之类的结构化编程语言、诸如 C++ 之类的面向对象的编程语言、或者可被存储、编译或解释以在以上设备之一上以及处理器、处理器体系结构的异质组合或者不同的硬件和软件的组合或者能够执行程序指令的任何其他机器上运行的任何其他高级或低级编程语言(包括汇编语言、硬件描述语言和数据库编程语言和技术)。

[0158] 因此,在一个方面中,如上所述的每个方法和其组合可以被体现在当在一个或多个计算设备上被执行时执行其步骤的计算机可执行的代码中。在另一个方面中,方法可以被体现在执行其步骤的系统中,并且可以以许多方式被分布在设备上,或者所有功能可以被集成到专用、独立设备或者其他硬件中。在另一个方面中,用于执行与如上所述的处理相关联的步骤的装置可以包括如上所述的任何硬件和 / 或软件。所有这样的排列与组合意图落入本公开的范围。

[0159] 在本公开的方法和系统中使用的诊断测试可以包括在没有作为将另一个生物制剂引入到样本的结果的富集的情况下所产生的生物制剂。在一些实施例中,在单个生产设施内执行引入和检测。在一些实施例中,在单个生产轮班内执行引入和检测。在一些实施

例中,在单个轮班内在单个生产设施内执行引入和检测。

[0160] 对在没有富集的情况下产生的生物制剂进行检测的示例是通过重组噬菌体的重组基因组编码的荧光素酶蛋白质。被引入样本的另一个生物制剂的示例是包括对荧光素酶蛋白质进行编码的重组噬菌体基因组的重组噬菌体。

[0161] 因此,在本公开的方法和系统中使用的诊断测试可以包括:a) 提供怀疑被目标微生物污染的样本;b) 使样本与能够感染目标微生物的重组噬菌体接触,重组噬菌体包括对当重组噬菌体感染目标微生物时被表达的标记进行编码的异源核酸序列;c) 如果目标微生物存在于样本中,在适合于产生标记的条件下,维持噬菌体接触的样本;以及 d) 针对标记在样本中的存在来进行试验。

[0162] 在一些实施例中,如果目标微生物在至少大约5分钟、至少大约10分钟、至少大约20分钟、至少大约30分钟、至少大约40分钟、至少大约50分钟、至少大约1小时、至少大约2小时、至少大约3小时、至少大约4小时、至少大约5小时或者至少大约6小时内存在于样本中,则在适合于产生标记的条件下维持噬菌体接触的样本。

[0163] 在一些实施例中,在使样本与重组噬菌体接触之后,在大约10分钟内、在大约20分钟内、在大约30分钟内、在大约40分钟内、在大约50分钟内、在大约1小时内、在大约1.5小时内、在大约2小时内、在大约2.5小时内、在大约3小时内、在大约4小时内、在大约5小时内或者在大约6小时内对噬菌体接触的样本中的标记的存在进行试验。因此,在一些实施例中,在收集样本之后,在大约20分钟内、在大约30分钟内、在大约40分钟内、在大约50分钟内、在大约1小时内、在大约1.5小时内、在大约2小时内、在大约2.5小时内、在大约3小时内、在大约4小时内、在大约5小时内或者在大约6小时内完成试验。

[0164] 在一些实施例中,试验不包括富集可存在于样本之中的目标微生物的任何细胞。因此,在这样的实施例中,收集怀疑被目标微生物污染的环境样本,并且在富集之前使样本与能够感染目标微生物的重组噬菌体接触,重组噬菌体包括对当重组噬菌体感染目标微生物时所表达的标记进行编码的异源核酸序列。

[0165] 一般而言,方法和系统中所使用的重组噬菌体包括对标记进行编码的异源核酸序列。在一些实施例中,对标记进行编码的异源核酸序列在重组噬菌体基因组中操作地连锁到对于噬菌体基因组也异源的至少一个调节元件。在一些实施例中,由对于噬菌体基因组异源的调节元件来专门地控制目标细菌中的对标记进行编码的异源核酸序列的表达。

[0166] 在一些实施例中,对标记进行编码的异源核酸序列在重组噬菌体基因组中操作地连锁到对于噬菌体基因组内源的至少一个调节元件。换句话说,借助于放置对标记进行编码的异源核酸序列的起始噬菌体基因组中的位置,对标记进行编码的异源核酸序列操作地连锁到内源调节元件。在一些实施例中,由对于噬菌体基因组内源的调节元件来专门地控制目标细菌中的对标记进行编码的异源核酸序列的表达。在一些实施例中,由对于噬菌体基因组内源的调节元件来部分地以及由对于噬菌体基因组异源的调节元件来部分地控制目标细菌中的对标记进行编码的异源核酸序列的表达。

[0167] 在一些实施例中,包括对标记进行编码的异源核酸序列的重组噬菌体包括多于一个对标记进行编码的异源核酸序列。在一些实施例中,重组噬菌体包括对标记进行编码的相同核酸序列的多个拷贝(即,拷贝对相同的标记编码)。在一些实施例中,重组噬菌体包括对标记进行编码的多于一个类型的核酸序列的拷贝(即,至少两个拷贝对不同的标记编

码)。在一些实施例中,多于一个拷贝位于重组噬菌体基因组中的相邻的位置。在其他的实施例中,多于一个拷贝的至少一个(多达所有)位于重组噬菌体基因组中的非相邻的位置。

[0168] 在一些实施例中,异源核酸序列的长度是至少 100 碱基、至少 200 碱基、至少 300 碱基、至少 400 碱基、至少 500 碱基、至少 600 碱基、至少 700 碱基、至少 800 碱基、至少 900 碱基、至少 1.0 千碱基(kb)、至少 1.1 kb、至少 1.2 kb、至少 1.3 kb、至少 1.4 kb、至少 1.5 kb、至少 1.6 kb、至少 1.7 kb、至少 1.8 kb、至少 1.9 kb、至少 2.0 kb、至少 2.1 kb、至少 2.2 kb、至少 2.3 kb、至少 2.4 kb、至少 2.5 kb、至少 2.6 kb、至少 2.7 kb、至少 2.8 kb、至少 2.9 kb、至少 3.0 kb、至少 3.1 kb、至少 3.2 kb、至少 3.3 kb、至少 3.4 kb、至少 3.5 kb、至少 3.6 kb、至少 3.7 kb、至少 3.8 kb、至少 3.9 kb、至少 4.0 kb、至少 4.5 kb、至少 5.0 kb、至少 5.5 kb、至少 5.5 kb、至少 6.0 kb、至少 6.5 kb、至少 7.0 kb、至少 7.5 kb、至少 8.0 kb、至少 8.5 kb、至少 9.0 kb、至少 9.5 kb、至少 10 kb 或更多。在一些实施例中,异源核酸序列的长度是 500 碱基或更小、1.0 kb 或更小、1.5 kb 或更小、2.0 kb 或更小、2.5 kb 或更小、3.0 kb 或更小、3.5 kb 或更小、4.0 kb 或更小、4.5 kb 或更小、5.0 kb 或更小、5.5 kb 或更小、6.0 kb 或更小、6.5 kb 或更小、7.0 kb 或更小、7.5 kb 或更小、8.0 kb 或更小、8.5 kb 或更小、9.0 kb 或更小、9.5 kb 或更小或者 10.0 kb 或更小。在一些这样的实施例中,异源核酸序列包括小于能够被封装到由噬菌体基因组编码的并且包括噬菌体基因组的噬菌体颗粒中的异源核酸序列的最大长度的长度。

[0169] 在一些实施例中,异源核酸序列的长度从 100 到 500 碱基、从 200 到 1000 碱基、从 500 到 1000 碱基、从 500 到 1500 碱基、从 1 kb 到 2 kb、从 1.5 kb 到 2.5 kb、从 2.0 kb 到 3.0 kb、从 2.5 kb 到 3.5 kb、从 3.0 kb 到 4.0 kb、从 3.5 kb 到 4.5 kb、从 4.0 kb 到 5.0 kb、从 4.5 kb 到 5.5 kb、从 5.0 kb 到 6.0 kb、从 5.5 kb 到 6.5 kb、从 6.0 kb 到 7.0 kb、从 6.5 kb 到 7.5 kb、从 7.0 kb 到 8.0 kb、从 7.5 kb 到 8.5 kb、从 8.0 kb 到 9.0 kb、从 8.5 kb 到 9.5 kb 或者从 9.0 kb 到 10.0 kb。

[0170] 在一些实施例中,异源核酸序列的长度与重组噬菌体的基因组的总长度之比是至少 0.05、至少 0.10、至少 0.15、至少 0.20 或者至少 0.25。在一些实施例中,重组噬菌体的基因组的长度与对应的起始噬菌体的基因组的长度之比是至少 1.05、至少 1.10、至少 1.15、至少 1.20 或者至少 1.25。

[0171] 在一些实施例中,在没有内源起始噬菌体基因组序列的丢失的情况下,异源核酸序列被插入起始噬菌体基因组中。在一些实施例中,插入的异源核酸序列替代内源起始噬菌体基因组序列。在一些这样的实施例中,异源核酸序列替代小于异源核酸序列的长度的一定量的内源基因组序列。因此,在这样的实施例中,重组噬菌体基因组的长度比起始噬菌体基因组的长度长。在一些这样的实施例中,异源核酸序列替代大于异源核酸序列的长度的一定量的内源基因组序列。因此,在这样的实施例中,重组噬菌体基因组的长度比起始噬菌体基因组的长度短。在一些这样的实施例中,异源核酸序列替代等于异源核酸序列的长度的一定量的内源基因组序列。

[0172] 在一些实施例中,由异源开放阅读框编码的蛋白质或多肽被改性为减少由存在于噬菌体寄主细胞之中的蛋白酶进行的分裂。例如,计算算法能够用于识别已知的蛋白酶分裂位点,并且可以使用保存性置换来改性开放阅读框的序列以移除这些位点。替换地,定向突变用于将开放阅读框序列发展为对具有对存在于噬菌体寄主细胞之中的或者噬菌体寄

主细胞的培养中的至少一个蛋白酶的增加的耐受性的产物进行编码。

[0173] 如本文所使用的,“标记”包括可选择和 / 或可筛查标记。如本文所使用的,“可选择标记”是授予拥有标记的细胞在存在或不存在分别地抑制或者激发没有表达标记的类似的细胞的生长的菌剂的情况下进行生长的能力的标记。借助于这样的细胞的可选择标记的表达,这样的细胞也能够被说成具有“可选择表型”。例如,氨苄青霉素抗性基因(AmpR)在拥有和表达基因的细胞上授予在有氨苄青霉素的情况下生长的能力。(请参见 Sutcliffe, J. G., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 August; 75(8):3737-3741。)其他非限制性示例包括授予对氯霉素、卡那霉素和四环素的耐受性的基因。其他标记包括 URA3、TRP 和 LEU, 其允许分别地缺乏所述尿嘧啶、色氨酸和白氨酸的情况下的生长。

[0174] 如这里所使用的,“可筛查标记”是能够被用作识别表达标记的细胞的基础的可检测的标签。借助于这样的细胞的可筛查标记的表达,这样的细胞也能够被说成具有“可筛查表型”。(通常,可选择标记也可以在可选择标记的基因产物可用作独立于基因产物在表达其的细胞上授予选择能力的功能来识别表达标记的细胞的基础的范围内起可筛查标记的作用) 能够被重组噬菌体区别地检测和编码的任何分子能够充当可筛查标记。可筛查标记能够是核酸分子或者其部分, 诸如单链或双链的 RNA 或者 DNA 分子。替换地,可筛查标记能够是蛋白质或其部分。适当的蛋白质标记包括催化可检测的反应产物的形式的酶。示例是化学发光的蛋白质, 荧光素酶, 或者变体, 诸如 luxAB 和  $\beta$  半乳糖苷酶。另一个示例是辣根过氧化酶。用于生成发光信号的蛋白质落入两大类: 直接地生成光的那些(荧光素酶和关联蛋白) 以及用于间接地生成光作为连串化学反应的一部分的那些(辣根过氧化酶)。生物学研究中所使用的最常见的生物发光蛋白质是水母发光蛋白和荧光素酶。前者蛋白质是从维多利亚发光水母得到, 并且能够用于在溶解状态中确定钙浓度。蛋白质的荧光素酶家族已经适合于宽范围的实验目的。来自萤火虫和海肾的荧光素酶在生物学研究中最常使用。这些蛋白质也已经从基因方面被分成只有当蛋白质紧密地共定位时才将生成光的两个不同的功能域。已经在过去的十年中生成这两个蛋白质的各种发射光谱移位的突变体衍生物。这些已经被用于活细胞内的多色成像和共定位。用于生成化学发光信号的其他蛋白质组是氧化物酶和磷酸酶。氧化物酶生成在生成光的反应中氧化鲁米诺的过氧化物。这些的最广泛的使用是辣根过氧化酶(HRP), 其已经被广泛地使用来进行蛋白质印迹和 ELISA 的检测。已经以类似的方式采用的第二组蛋白质是碱性磷酸酶, 其从底质分子中移除磷酸盐, 使其不稳定并且发起导致发射光的级联。

[0175] 其他适当的可筛查标记包括荧光蛋白质。荧光蛋白质包括但不限于蓝色 / UV 荧光蛋白质(例如, TagBFP、Azurite、EBFP2、mKalamal、Sirius、Sapphire 和 T-Sapphire)、青色荧光蛋白质(例如, ECFP、Cerulean、SCFP3A、mTurquoise、monomeric Midoriishi-Cyan、TagCFP 和 mTFP1)、绿色荧光蛋白(例如, EGFP、Emerald、Superfolder GFP、Monomeric Azami Green、TagGFP2、mUKG 和 mWasabi)、黄色荧光蛋白质(例如, EYFP、Citrine、Venus、SYFP2 和 TagYFP)、橙色荧光蛋白质(例如, Monomeric Kusabira-Orange、mKO $\kappa$ 、mKO2、mOrange 和 mOrange2)、红色荧光蛋白质(例如, mRaspberry、mCherry、mStrawberry、mTangerine、tdTomato、TagRFP、TagRFP-T、mApple 和 mRuby)、远红外荧光蛋白质(例如, mPlum、HcRed-Tandem、mKate2、mNeptune 和 NirFP)、近 IR 荧光蛋白质(例如, TagRFP657、IFP1.4 和 iRFP)、长斯托克斯位移蛋白质(例如, mKeima Red、LSS - mKate1 和 LSS-mKate2)、光活化

荧光蛋白质(例如, PA-GFP、PAmCherry1 和 PAtagRFP)、光转变荧光蛋白质(例如, Kaede (绿色)、Kaede (红色)、KikGR1 (绿色)、KikGR1 (红色)、PS-CFP2、PS-CFP2、mEos2 (绿色)、mEos2 (红色)、PSmOrange 和 PSmOrange)、以及可光开关型荧光蛋白质(例如, Dronpa)。对所列出的示例的若干变体和替换也是为本领域技术人员所公知的,并且可以在合适的应用中被代入。

[0176] 其他适当的标记包括表位。例如,包括能够利用抗体或者其他结合分子检测的表位的蛋白质是可筛查标记的示例。识别表位的抗体能够被直接地连锁到信号生成一部分(诸如通过化学发光或荧光蛋白质的共价结合),或者能够例如使用直接地连锁到信号生成一部分的诸如第二抗体的至少一个附加的结合试剂来检测该识别表位的抗体。在一些实施例中,表位不存在于噬菌体或者目标微生物的蛋白质中,所以样本中的表位的检测指示包括表位的蛋白质是由微生物在被包括对包括表位的蛋白质进行编码的基因的重组噬菌体感染之后产生的。在其他的实施例中,标记可以是在自然地存在于目标微生物或者噬菌体之中的蛋白质的上下文下的纯化标签。例如,标签(例如,6-His 标签)能够用于从其他细菌或噬菌体蛋白质纯化异源蛋白质并且然后能够例如使用抗体来检测纯化的蛋白质。

[0177] 在一些实施例中,目标微菌是任何类型的古生菌和/或细菌。在一些实施例中,微菌是病原微菌(其可以被称作为“病原体”)。在一些实施例中,古生菌是广古生菌。在一些实施例中,古生菌是泉古菌门。在一些实施例中,细菌是从放线菌、产水菌门、装甲菌门、拟杆菌、嗜热丝菌门、衣原体、绿弯菌、产金菌门、蓝细菌、脱铁杆菌门、异常球菌、网团菌门、迷踪菌门、纤维杆菌门、厚壁菌门、杆菌门、芽单胞菌门、硝化螺旋菌门、浮霉菌门、变形菌门、螺旋菌、互养菌属、柔膜菌门、脱硫杆菌纲、热袍菌门中选择的门的成员。在一些实施例中,细菌是从杆菌、李氏菌属、葡萄球菌中选择的至少一个厚壁菌门。在一些实施例中,细菌是从氧化亚铁硫杆菌、气单胞菌属、伯克氏菌属、奈瑟氏菌属、希瓦氏菌属、柠檬酸细菌属、肠杆菌属、欧文氏菌属、埃希氏杆菌属、克雷伯氏杆菌属、克吕沃氏菌属、摩根氏菌属、沙门氏菌、志贺氏菌属、耶尔森氏菌属、考克斯氏体属、立克次氏体、军团杆菌、禽杆菌属、嗜血杆菌属、巴斯德氏菌属、不动杆菌属、摩拉克氏菌属、假单胞菌属、弧菌、黄单胞菌属中选择的至少一个变形菌门。在一些实施例中,细菌是从类菌质体、螺原体属和脲原体中选择的至少一个柔膜菌门。

[0178] 使用在本文公开的系统和方法检测的食品的常见细菌污染物包括但不限于沙门氏菌、大肠杆菌(其包括但不限于微生物大肠杆菌、大肠杆菌 0157:H7、产志贺毒素大肠杆菌、大肠杆菌 026、0 大肠杆菌 111、大肠杆菌 0103、大肠杆菌 0121、大肠杆菌 045 和大肠杆菌 0145)、大肠菌类细菌(其包括但不限于柠檬酸细菌属、肠杆菌属、二氧化铅、克雷伯氏杆菌属、沙雷氏菌属)、志贺氏菌属、李氏菌属(包括单核细胞增多性李氏杆菌)、梭状芽孢杆菌(包括肉毒杆菌和产气荚膜梭菌)、弧菌(包括霍乱弧菌和创伤弧菌)、肠杆菌科、葡萄球菌(包括金黄色葡萄球菌和葡萄球菌表皮)、杆菌(包括蜡样芽孢杆菌)、弯曲杆菌属(包括空肠弯曲杆菌)、假单胞菌属、链球菌、不动杆菌属、克雷伯氏杆菌属、弯曲杆菌属和耶尔森氏菌属。

[0179] 示例

示例 1:用于监测环境的系统

在食品生产设施的平面布置图上标识十三个测试地点。测试点包括历史热点。标记的平面布置图被转换为 png 文件并且被导入到识别并跟踪平面布置图内的测试地点的软件

中。标识的测试点是：速冻间(排水系统 1)、速冻间(排水系统 2)、速冻间(排水系统 3)、速冻间(排水系统 4)、冷藏库(排水系统 5)、速冻间(排水系统 6)、速冻间(排水系统 7)、速冻间(天平)、冷藏库(引导冲洗排水系统)、速冻间(油滴盘 1)、速冻间(受水器 2)、速冻间(叉车)和速冻间(接近门的排水系统)。测试点被划分为三组用于每周测试。

[0180] 在 MS Excel 文件中提供用于该食品生产设施的历史测试数据。数据被分成两个部分：按日期和测试点的数据(制表 1)，以及具有元数据的测试点的列表(制表 2)。该数据被改换格式为单个电子数据表(csv)，其自动地考虑测试点和它们的数据的上载。

[0181] 业务规则然后用于产生取样调度表。使用以下业务规则：1) 总是在星期二上每周地获取样本；2) 以 10 个为批地收集样本；3) 每周在 3 组的 2 组之间样本具有平均分配；4) 每月至少一次地测试每个测试点；以及 5) 一月一次再访调度表以确保一些随机度。这些业务规则用于产生取样调度表。取样调度表被打印并且随着围绕食品生产设施到处走的工人被携带，以收集和测试样本。收集从 10AM 开始，使得结果将在同一天的下午到手，并且可以在同一天实施任何必要的补救。

[0182] 使用在证据 A 中描述的基于噬菌体的大肠杆菌测试方法(例如请参见证据 A 的示例 2) 来处理样本以测试大肠杆菌细菌的存在。在样本收集之后 1 个小时获得用于每个地点的测试结果。

[0183] 测试结果用于生成补救计划。用于补救的业务规则：1) 对于每个推定的阳性测试结果生成补救；2) 补救包括清洗、检查和重新测试；3) 将补救活动与日期、时间和拥有者一起记录，并且由经理来审查补救活动；4) 测试结果不退出补救处理，直到已经获取阴性结果。同一天的结果使得能够在同一轮班内结束补救措施。这对能访问所有资源、人员以及仍然能控制产品是关键。

[0184] 生成过去一个月的结果的报告以与食品生产设施的管理团队共享。一个报告呈现按测试地点组织的测试结果。另一个报告呈现按日期组织的用于整个设施的测试结果并且提供每个日期的阳性结果数量和阴性结果数量。

[0185] 尽管已经与详细地示出和描述的优选的实施例结合公开了本发明，但对其的各种修改和改善将容易地对本领域的技术人员变得明显。因此，本发明的精神和范围将不被上述示例限制，而是将按法规以可容许的最宽泛的意义被理解。

[0186] 本文引用的所有文档据此通过引用而被并入。

#### [0187] 证据 A: 重组噬菌体方法

本附录提供在实践本申请的公开的方法和系统以及其他方面时可以可选地使用的方法和试剂(除其他事项外)。

#### [0188] 背景介绍

已经使用分子生物学技术工程化模型噬菌体以向细菌细胞递送异源蛋白质产物。例如，噬菌体已经被工程化为向生物膜递送酶以消化细胞外基质并且毁坏生物膜。(例如，U. S. 专利申请出版物 No. 2009/0155215。)噬菌体也已经被工程化为表达能够被可视化以便检测对噬菌体进行的感染敏感的特定类型的细菌细胞的存在蛋白质产物。(例如，(1996) 年的 Applied and Environmental Microbiology (应用与环境微生物学) 卷 62、4 号，第 1133-40 页 M. J. Loessner 等人的“Construction of Luciferase Reporter Bacteriophage A511::luxAB for Rapid and Sensitive Detection of Viable *Listeria*

Cells (用于能存活的李氏菌属细胞的快速的且灵敏的检测的荧光素酶报告抗菌素 A511::luxAB 的构造)”。)至今工程化的噬菌体的天然寄主范围是限制,然而,那些噬菌体不感染许多有关的细菌和生物膜。

[0189] 利用更多样化的寄主范围工程化附加的噬菌体的方法将促成噬菌体工程技术的使用的扩展。在噬菌体基因组和工程噬菌体基因组中产生变体的高通量方法也将促成识别具有对诊断和治疗目的有用的改变的属性的噬菌体。然而,至今,这样的方法通常是缺乏的,并且因此工程噬菌体的附加的方法将是有益的。

[0190] 通过噬菌体基因组的属性通常使工程化多样噬菌体更困难。例如,在噬菌体挑战的情况下,利用传统的克隆技术,噬菌体基因组具有相对少的限制性位点并且被大大改性。噬菌体也具有包括微乎其微的非编码 DNA 的紧凑的基因组,这能够使得找到与传统工程化兼容的基因组内的位点是有挑战的。

[0191] 一种用于克隆噬菌体 DNA 的方法依赖于将噬菌体 DNA 分离、将 DNA 与限制酶切开,并且将 DNA 转化回寄主用于重组到能存活的噬菌体中。第二方式是克隆质体中的噬菌体基因组、异源序列中的工程的一部分,并且将该异源序列转移到有关的寄主菌株中。考虑噬菌体和异源序列之间的同源重组,能够利用野生型噬菌体来感染这些细胞。用于重组噬菌体的筛查将披露工程噬菌体。在分离实例中这些技术已经成功。(例如,(1996) 年的 Applied and Environmental Microbiology (应用与环境微生物学)卷 62、4 号,第 1133-40 页 M. J. Loessner 等人的“Construction of Luciferase Reporter Bacteriophage A511::luxAB for Rapid and Sensitive Detection of Viable Listeria Cells (用于能存活的李氏菌属细胞的快速的且灵敏的检测的荧光素酶报告抗菌素 A511::luxAB 的构造)”)然而,必须在能够测试任何工程噬菌体之前完成处理。对于在特定噬菌体内的任何新的插入位点,必须端到端重复整个处理。如果位点不是能存活的,必须对于下一插入位点重复整个处理。

[0192] 发明人设法开发更多有用的方法来通过使用与重组技术相关联的转化来克隆整个噬菌体基因组来克隆噬菌体 DNA 和产生基因工程噬菌体。在 N., Larionov, V. Oct. 2006. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution 7 (10), 805-812 中描述了该技术。在具有  $\lambda$  噬菌体的实验中,验证了总  $\lambda$  基因组的只不过 83%。在该结果的情况下,处理被认为对于许多用途来说不合适。

[0193] 发明人后来已经惊讶地发现在酵母细胞中噬菌体基因组不会致死,并且因此噬菌体能够被克隆到适当的质粒中并且在酵母中繁衍。发明人已经开拓本发现以开发包括噬菌体基因组的重组体质粒。在一些实施例中,噬菌体基因组被工程化为包括异源核酸序列,例如包括开放阅读框的序列。质粒是有用的,例如用于制作转基因的噬菌体。还提供了克隆噬菌体基因组的方法。还提供了制作重组噬菌体基因组的方法。在一些实施例中,噬菌体基因组被工程化为包括异源核酸序列,例如包括开放阅读框的序列。还提供了重组噬菌体基因组和重组噬菌体。在一些实施例中,方法是高通量方法,诸如制作多个重组噬菌体基因组或重组噬菌体的方法。还提供了重组噬菌体基因组和重组噬菌体的集合。在本文更全面地描述本公开的这些及其他方面。

## 发明概要



[0194] 在第一方面中,本公开提供包括噬菌体基因组的重组体质粒。在重组体质粒的一些实施例中,以从单链 DNA、双链 DNA 和 RNA 中选择的形式将噬菌体基因组封装在噬菌体颗粒中。在重组体质粒的一些实施例中,噬菌体是抗菌素。在一些实施例中,质粒是酵母人工染色体(YAC)。

[0195] 在重组体质粒的一些实施例中,噬菌体基因组包括异源核酸序列。在一些实施例中,异源核酸序列包括 3.1 千碱基。在一些实施例中,异源核酸序列包括开放阅读框。在一些实施例中,开放阅读框对在包括质粒的质粒寄主细胞上授予从可选择表型和可筛查表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在一些实施例中,开放阅读框对在包括噬菌体基因组的噬菌体寄主细胞上授予从可选择表型和可筛查表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在一些实施例中,异源核酸序列包括第二开放阅读框。在一些实施例中,开放阅读框操作地连锁到能够在质粒寄主细胞和噬菌体寄主细胞中的至少一个中引导开放阅读框的表达的表达控制序列。在一些实施例中,表达控制序列对于噬菌体基因组是内源的。在一些实施例中,表达控制序列位于异源核酸序列内。

[0196] 在重组体质粒的一些实施例中,从质体、粘粒和人工染色体中选择质粒。在一些实施例中,人工染色体是 BAC 或者 YAC。

[0197] 在重组体质粒的一些实施例中,起始噬菌体基因组的序列是已知的。在重组体质粒的一些实施例中,起始噬菌体基因组的序列是未知的。

[0198] 在另一个方面中,提供了一种包括质粒之一的质粒寄主细胞。在一些实施例中,质粒寄主细胞是细菌或古生菌细胞。在一些实施例中,质粒寄主细胞是真核细胞。在一些实施例中,质粒寄主细胞是酵母细胞。

[0199] 在另一个方面中,提供了一种包括存在于质粒之一之中的重组噬菌体基因组的噬菌体。

[0200] 在另一个方面中,提供了一种克隆噬菌体基因组的方法。在一些实施例中,方法包括:提供包括起始噬菌体基因组的重组体质粒;以及在质粒寄主细胞中繁衍重组体质粒。在一些实施例中,质粒寄主细胞不是噬菌体寄主细胞。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来制作包括起始噬菌体基因组的重组体质粒:在允许将起始噬菌体基因组插入到质粒中的条件下,将分离的起始噬菌体基因组和质粒共转化为多个噬菌体质粒寄主细胞;以及选择包括作为将起始噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的质粒寄主细胞。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来制作包括起始噬菌体基因组的重组体质粒:在允许将起始噬菌体基因组插入到质粒中的条件下,将分离的起始噬菌体基因组和质粒转化为多个噬菌体质粒寄主细胞;以及选择包括作为将起始噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的噬菌体质粒寄主细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括从质粒中移除噬菌体基因组。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法从质粒中移除噬菌体基因组:将包括噬菌体基因组的重组体质粒转化为感受态的噬菌体寄主细胞;以及,在足以产生包括噬菌体基因组的噬菌体颗粒的条件下培养噬菌体寄主细胞。

[0201] 在另一个方面中,提供了一种制作多个重组噬菌体基因组的方法。在一些实施例中,该方法包括:提供包括起始噬菌体基因组的重组体质粒;将异源核酸序列插入到起始噬菌体基因组中,以提供重组噬菌体基因组;以及在质粒寄主细胞中繁衍包括把异源核酸序列包括在内的重组噬菌体基因组的重组体质粒。在一些实施例中,质粒寄主细胞不是噬

菌体寄主细胞。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来制作包括起始噬菌体基因组的重组体质粒:在允许将起始噬菌体基因组插入到质粒中的条件下,将分离的起始噬菌体基因组和质粒共转化为多个噬菌体质粒寄主细胞;以及选择包括作为将起始噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的质粒寄主细胞。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来制作包括起始噬菌体基因组的重组体质粒:在允许将起始噬菌体基因组插入到质粒中的条件下,将分离的起始噬菌体基因组和质粒转化为多个噬菌体质粒寄主细胞;以及选择包括作为将起始噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的质粒寄主细胞。

[0202] 还提供了一种制作重组噬菌体基因组的替换的方法。在一些实施例中,该方法包括:提供起始噬菌体基因组;将异源核酸序列插入到起始噬菌体基因组中以提供重组噬菌体基因组;捕捉质粒中的重组噬菌体基因组以提供包括把异源核酸序列包括在内的重组噬菌体基因组的重组体质粒;以及在质粒寄主细胞中繁衍包括把异源核酸序列包括在内的重组噬菌体基因组的重组体质粒,其中,质粒寄主细胞不是噬菌体寄主细胞。在该方法的一些实施例中,在质粒中捕捉之前选择把异源核酸序列包括在内的重组噬菌体基因组。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来在质粒中捕捉重组噬菌体基因组:分离重组噬菌体基因组;在允许将起始噬菌体基因组插入到质粒中的条件下,将分离的重组噬菌体基因组和质粒共转化为多个质粒寄主细胞中;以及选择包括作为将重组噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的质粒寄主细胞。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来在质粒中捕捉重组噬菌体基因组:分离重组噬菌体基因组;在允许将起始噬菌体基因组插入到质粒中的条件下,将分离的重组噬菌体基因组和质粒转化为多个质粒寄主细胞;以及选择包括作为将重组噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的质粒寄主细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括将重组质粒与所选择的质粒寄主细胞分离。

[0203] 在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,通过非序列特定处理,异源核酸序列被插入起始噬菌体基因组中。在方法的一些实施例中,通过序列特定处理,异源核酸序列被插入起始噬菌体基因组中。在方法的一些实施例中,异源核酸序列被插入起始噬菌体基因组的基因内区域中。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,异源核酸序列在预先确定的位置被插入起始噬菌体基因组中。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,异源核酸序列被插入活体内的噬菌体基因组中。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,异源核酸序列被插入活体外的噬菌体基因组中。

[0204] 在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,该方法进一步包括从质粒中移除噬菌体基因组。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,通过包括以下的方法从质粒中移除噬菌体基因组:将重组体质粒转化为感受态的噬菌体寄主细胞中;以及,选择从转化的噬菌体寄主细胞产出包括噬菌体基因组的噬菌体颗粒的重组噬菌体基因组。

[0205] 在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,异源核酸序列包括 3.1 千碱基。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,异源核酸序列包括开放阅读框。在一些实施例中,开放阅读框对在包括质粒的质粒寄主细胞上授予从可选择表型和可筛查表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在一些实施例中,开放阅读框对在包括噬菌体基因组的噬菌体寄主细胞上授予从可选择表型和可筛查表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,异源核酸序列包括第二开

放阅读框。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,开放阅读框操作地连锁到能够在质粒寄主细胞和噬菌体寄主细胞中的至少一个中引导开放阅读框的表达的表达控制序列。在一些实施例中,表达控制序列对于噬菌体基因组是内源的。在一些实施例中,表达控制序列位于异源核酸序列内。

[0206] 在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,从质体、粘粒和人工染色体中选择质粒。在一些实施例中,人工染色体是 BAC 或者 YAC。

[0207] 在制作多个重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,起始噬菌体基因组的序列是已知的。在制作多个重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,起始噬菌体基因组的序列是未知的。

[0208] 在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,起始噬菌体基因组对不能感染噬菌体寄主细胞的噬菌体进行编码。在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,起始噬菌体基因组对能够感染噬菌体寄主细胞的噬菌体进行编码。

[0209] 在制作重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,该方法进一步包括为第二异源核酸序列交换异源核酸序列的至少一部分。

[0210] 在另一个方面中,提供了制作重组噬菌体基因组的方法中的重组噬菌体基因组制作的一种方法。

[0211] 在另一个方面中,提供了一种制作多个重组噬菌体基因组的方法。在一些实施例中,该方法包括:提供每个包括起始噬菌体基因组的多个重组体质粒;将至少一个异源核酸序列插入到多个质粒中的每一个的起始噬菌体基因组中以提供多个重组体质粒;以及,在质粒寄主细胞中繁衍多个重组体质粒,其中,质粒寄主细胞不是噬菌体寄主细胞。在该方法的至少一些实施例中,通过包括以下的方法来制作每个包括起始噬菌体基因组的多个重组体质粒:在允许将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将至少一个分离的起始噬菌体基因组和至少一个质粒共转化为多个噬菌体寄主细胞;以及选择包括作为将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中的结果的多个重组体质粒的噬菌体寄主细胞。在该方法的至少一些实施例中,通过包括以下的方法来制作每个包括起始噬菌体基因组的多个重组体质粒:在允许将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将至少一个分离的起始噬菌体基因组转化为包括至少一个质粒的多个质粒寄主细胞;以及选择包括作为将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中的结果的多个重组体质粒的质粒寄主细胞。

[0212] 在另一个方面中,提供了一种制作多个重组噬菌体基因组的替换的方法。在一些实施例中,该方法包括:提供至少一个起始噬菌体基因组;将至少一个异源核酸序列插入到至少一个起始噬菌体基因组中的每一个中以提供多个重组噬菌体基因组;捕捉至少一个质粒中的多个重组噬菌体基因组以提供包括把异源核酸序列包括在内的多个重组噬菌体基因组的多个重组体质粒;以及在质粒寄主细胞中繁衍包括把至少一个异源核酸序列包括在内的重组噬菌体基因组的多个重组体质粒,其中,质粒寄主细胞不是噬菌体寄主细胞。在一些实施例中,在质粒中捕捉之前选择把至少一个异源核酸序列包括在内的多个重组噬菌体基因组。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来在至少一个质粒中捕捉多个重组噬菌体基因组:分离多个重组噬菌体基因组;在允许将多个重组噬菌体基因组插入到

至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将分离的多个重组噬菌体基因组和至少一个质粒共转化为多质粒寄主细胞;以及选择包括作为将至少一个重组噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的多个质粒寄主细胞。在该方法的一些实施例中,通过包括以下的方法来在质粒中捕捉多个重组噬菌体基因组:分离多个重组噬菌体基因组;在允许将多个重组噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将分离的多个重组噬菌体基因组转化为每个包括至少一个质粒的多个质粒寄主细胞;以及选择包括作为将多个重组噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的多个质粒寄主细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括将多个重组体质粒与所选择的质粒寄主细胞分离。

[0213] 在制作多个重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,多个重组体质粒包括多个不同的异源核酸序列。在一些实施例中,至少 5 个不同的异源核酸序列存在于多个重组体质粒中。在一些实施例中,至少 50 个不同的异源核酸序列存在于多个重组噬菌体质粒中。在一些实施例中,至少 500 个不同的异源核酸序列存在于多个重组噬菌体质粒中。

[0214] 在制作多个重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,多个的重组体质粒包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少两种类型的重组噬菌体基因组。在一些实施例中,多个重组噬菌体基因组包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少 5 种类型的重组噬菌体基因组。在一些实施例中,多个重组噬菌体基因组包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少 50 种类型的重组噬菌体基因组。在一些实施例中,多个重组噬菌体基因组包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少 500 种类型的重组噬菌体基因组。

[0215] 在制作多个重组噬菌体基因组的方法的一些实施例中,该方法进一步包括利用第二异源核酸序列来替代多个质粒中的每一个中的异源核酸序列的至少一部分,其中,第二异源核酸序列包括与第一异源核酸序列相比的插入、缺失和置换中的至少一个,因此提供每个包括不同的第二异源序列的多个不同的质粒。在一些实施例中,至少 5 个不同的第二异源核酸序列存在于多个重组体质粒中。在一些实施例中,至少 50 个不同的异源核酸序列存在于多个重组体质粒中。在一些实施例中,至少 500 个不同的异源核酸序列存在于多个重组体质粒中。

[0216] 在另一个方面中,提供了重组噬菌体基因组的集合。在一些实施例中,集合中的重组基因组包括至少一个起始噬菌体基因组、至少一个异源插入序列和在起始基因组中插入至少一个异源插入序列的至少一个位点。在一些实施例中,集合中的重组基因组包括至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 种不同类型的起始噬菌体基因组。在一些实施例中,集合中的重组基因组包括至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 种不同类型的异源插入序列。在一些实施例中,集合中的重组基因组包括至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 个在至少一个起始基因组中插入至少一个异源插入序列的不同的位点。

[0217] 在重组噬菌体基因组的集合的一些实施例中,重组噬菌体基因组的起始噬菌体基因组的序列是未知的,起始噬菌体基因组的序列是已知的。

[0218] 还提供了包括重组噬菌体基因组的集合之一的重组噬菌体的集合。

[0219] 在重组噬菌体基因组和重组噬菌体的集合的一些实施例中,至少一个异源核酸序列包括开放阅读框。

[0220] 还提供了包括把重组噬菌体基因组包括在内的质粒的质粒寄主细胞的集合。

[0221] 在另一个方面中,提供了一种在包括至少一个靶形细胞类型的靶形细胞种群中表达开放阅读框的方法。在一些实施例中,该方法包括从重组噬菌体的集合中选择感染至少一个靶形细胞类型的至少一个噬菌体。在一些实施例中,该方法包括:在足以由噬菌体感染至少一个靶形细胞类型的条件下,向至少一个噬菌体提供至少一个靶形细胞类型;以及足以在至少一个靶形细胞类型中表达至少一个开放阅读框在的条件下,培养至少一个细胞类型。在该方法的一些实施例中,至少一个开放阅读框对在靶形细胞类型上授予从可选择表型和可筛查表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在该方法的一些实施例中,至少一个开放阅读框编码对至少一个靶形细胞类型是致死的或者有条件致死的蛋白质。

[0222] 详细描述

除非在本文被另外定义,与本公开结合使用的科学和技术术语应当具有那些本领域普通技术人员通常所理解的意义。此外,除非上下文另外要求,单数项应当包括复数并且复数项应当包括单数。通常,在本文描述的与生物化学、酶学、分子与细胞生物学、微生物学、遗传学和蛋白质和核酸化学和杂交所结合使用的命名法以及其技术是现有技术中的那些公知的且常用的。通过引用将在本文的引用的某些参考文献和其他文档明确地合并于此。另外地,据此通过引用将在本文引用的所有通用蛋白质资源/蛋白序列数据库(UniProt/SwissProt)记录合并于此。在冲突的情况下,包括限定的本说明书将进行支配。材料、方法和示例仅仅是说明性的且并非意图进行限制。

[0223] 除非另外指出,一般根据现有技术中众所周知的和贯穿本说明书所引用和讨论的在一般以及特定参考文献中描述的常规方法来执行本公开的方法和技术。例如请参见:纽约、N. Y. 胡马纳出版社(2009)的 Clokie 等的 Bacteriophages: Methods and Protocols (抗菌素:方法和协议)、卷 1 和 2 (Methods in Molecular Biology (分子生物学的方法), 卷 501 和 502);纽约冷泉港实验室、冷泉港实验室出版社(2001)萨姆布鲁克等的 Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆:实验手册)的 3d 版本;例如,请参见奥苏贝尔等的格林出版协会(1992 和 2002 的附录)的 Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学现代方法);纽约冷泉港实验室、冷泉港实验室出版社、哈洛和拉内的 Antibodies: A Laboratory Manual (Antibodies: A Laboratory Manual) (1990);牛津大学出版社(2003)、泰勒和德里卡默的 Introduction to Glycobiology (糖生物学入门);N. J 沃辛顿生化有限公司的 Worthington Enzyme Manual (沃星顿酶手册);CRC 出版社的 Handbook of Biochemistry: Section A Proteins (生物化学手册:章节 A 蛋白质)的卷 I (1976);CRC 出版社的 Handbook of Biochemistry: Section A Proteins (生物化学手册:章节 A 蛋白质)的卷 II (1976);冷泉港实验室出版社的 Essentials of Glycobiology (糖生物学要点) (1999)。

[0224] 本公开涉及用于某蛋白质的序列数据库条目(例如,通用蛋白质资源/蛋白序列数据库或 GENBANK 记录)和在因特网上公布的基因序列以及因特网上的其他信息。本领域技术人员理解,包括序列数据库条目的关于因特网的信息会不时地更新,以及,例如,用于指代特定序列的附图标记能够改变。在对序列信息的公共数据库或因特网上的其他信息进行参考的情况下,可以明白,这样的改变能够出现,并且因特网上的信息的特定实施例能够变化不定。因为本领域技术人员能够通过因特网上搜索而找到等同信息,所以对因特网

网页地址或序列数据库条目的参考证实正被讨论的信息的可用性和公共传播。

[0225] 在公开和描述目前的质粒、基因组、细胞、噬菌体、组成物、方法和其他实施例之前,应当理解,在本文使用的术语仅仅用于描述特定实施例的目的并且不意图进行限制。必须指出,如在说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指示物,除非上下文清楚地另外指示其他。

[0226] 如在本文所使用的术语“包括”的意义和“包括有”或“包含”是一样的,并且是可兼的或开放的并且不排除附加的、未描述的构件、要素或方法步骤。

[0227] 如在本文所使用的,术语“活体外”指的是发生在人工环境中——例如,在试管或反应容器中、在细胞培养中、在陪替氏培养皿(Petri dish)中等等、而不是在有机体(例如,动物、植物或微生物)内的事件。

[0228] 如本文所使用的,术语“活体内”指的是出现在有机体(例如,动物、植物或微生物)内的事件。

[0229] 如本文所使用的,术语“分离”指的是物质或实体:(1)其已经与当在最初产生时(不管在自然界中还是在实验设置中)其所相关联的至少一些成分分开,和/或(2)其已经靠人力被产生、准备和/或制造。分离的物质和/或实体可以与它们在最初所相关联的其他成分分开至少大约10%、大约20%、大约30%、大约40%、大约50%、大约60%、大约70%、大约80%、大约90%或更多。在一些实施例中,分离菌剂大于大约80%、大约85%、大约90%、大约91%、大约92%、大约93%、大约94%、大约95%、大约96%、大约97%、大约98%、大约99%或大于大约99%纯净。如本文所使用的,如果物质基本上不含其他成分,则物质是“纯净的”。

[0230] 如在本文所使用的术语“肽”指的是短多肽,例如典型地包含小于大约50氨基酸并且更典型地小于大约30氨基酸的那个。如在本文所使用的术语包括对结构的以及因此生物的机能进行模拟的类似物和模拟物。

[0231] 术语“多肽”包括自然地出现的蛋白质和非自然地出现的蛋白质两者,以及其片段、突变体、衍生物和类似物。多肽可以是单体的或者聚合体的。此外,多肽可以包括每个具有一个或多个不同的活性的许多不同的域。为了免除怀疑,“多肽”可以是大于两个氨基酸的任何长度。

[0232] 术语“分离蛋白质”或“分离多肽”是借助于其起源或派生的源(1)未与在其天然状态中伴随其自然伴生组分相关联的、(2)存在于在自然界中未发现的纯净中的(其中能够关于其他细胞材料的存在来断定纯净(例如,其不包含来自相同的种类的其他蛋白))、(3)由来自不同种类的细胞表达的、(4)没有发生在自然界中(例如,其是在自然界中发现的多肽的片段或其包括在自然界中未发现的氨基酸类似物或衍生物或者除标准肽键以外的连锁)的蛋白质或多肽。因此,在不同于多肽从其自然地发起的细胞的细胞系统中化学地合成或用合成法合成的多肽将与自然伴生组分“分离”。也可以使用在现有技术中公知的蛋白质纯化技术通过分离来使多肽或蛋白质基本上不含自然伴生组分。如因此定义的,“分离”没有必然地要求已经物理上从合成如此描述的蛋白质、多肽、肽或低聚肽的细胞中移除如此描述的蛋白质、多肽、肽或低聚肽。

[0233] 如在本文所使用的术语“多肽片段”指的是与诸如自然地出现的蛋白质的全长多肽相比具有例如氨基末端和/或羧基末端缺失等的缺失的多肽。在实施例中,多肽片段是其中片段的氨基酸序列和自然地出现的序列中的对应的位置一致的邻接序列。片段典型地

至少是 5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸长,或至少 12、14、16 或 18 个氨基酸长,或至少 20 个氨基酸长,或至少 25、30、35、40 或 45 个氨基酸,或至少 50 或 60 个氨基酸长,或至少 70 个氨基酸长。

[0234] 术语“融合蛋白质”指的是包括耦合到异源氨基酸序列的多肽或片段的多肽。融合蛋白质是有用的,这是因为它们能够被构造为包含能够来自两个或更多不同的蛋白质的两个或更多期望的功能要素。融合蛋白质包括来自所感兴趣的多肽的至少 10 个邻接的氨基酸、或至少 20 个或 30 个氨基酸、或至少 40、50 或 60 个氨基酸,或至少 75、100 或 125 个氨基酸。包括在融合蛋白质内的异源多肽通常长度是至少 6 个氨基酸、或长度是至少 8 个氨基酸,或长度是至少 15、20 或 25 个氨基酸。包括诸如 IgG Fc 区域的较多的多肽以及甚至诸如包含绿色荧光蛋白(“GFP”)发色团的蛋白质之类的整个蛋白质的融合具有特定效用。能够通过具有对不同的蛋白质或肽进行编码的核酸序列的框中构造对多肽或其片段进行编码的核酸序列并且然后表达融合蛋白质来重组地产生融合蛋白质。替换地,能够通过将多肽或其片段交联到另一个蛋白质来化学地产生融合蛋白质。

[0235] 如本文所使用的,如果对蛋白质进行编码的核酸序列具有与对第二蛋白质进行编码的核酸序列类似的序列,则蛋白质对第二蛋白质具有“同源性”或者是“同源的”。替换地,如果两个蛋白质具有类似的氨基酸序列,则蛋白质对第二蛋白质具有同源性。(因此,术语“同源蛋白质”被定义为意指两个蛋白质具有类似的氨基酸序列)如本文所使用的,在氨基酸序列的两个区域之间的同源性(尤其是关于预测的结构类似性)被解释为暗示功能方面的类似性。

[0236] 当参考蛋白质或肽使用“同源的”时,认识到,不一致的残基位置往往因保守氨基酸置换而不同。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基由具有具备类似的化学性质(例如,电荷或疏水性)的侧链(R 组)的另一个氨基酸残基代替的一个氨基酸置换。通常,保守氨基酸置换基本上将不改变蛋白质的功能性质。在两个或更多氨基酸序列因保守置换而不同于彼此的情况下,同源性的百分比序列一致性或程度可以向上调整为做置换的保守性质的修正。进行该调整的手段对于本领域技术人员是公知的。例如,请参见 *Methods Mol. Biol.* (方法分子生物学) 24:307-31 和 25:365-89, 1994、皮尔森。

[0237] 以下六个组均包含对于互相是保存性置换的氨基酸:1) 丝氨酸、苏氨酸;2) 天冬氨酸、谷氨酸;3) 天门冬酰胺、谷氨酰胺;4) 精氨酸、赖氨酸;5) 异亮氨酸、白氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸,以及 6) 苯基丙氨酸、酪氨酸、色氨酸。

[0238] 典型地使用序列分析软件来测量也被称为百分比序列一致性的用于多肽的序列同源性。例如,请参见威斯康星州、53705、麦迪逊、大学大道 910 号、威斯康星大学生物技术中心的 Genetics Computer Group (GCG) 的序列分析软件包。蛋白质分析软件使用分配给各种置换、缺失和包括保守氨基酸置换的其他改性的同源性的测量来匹配类似的序列。例如,GCG 包含诸如“Gap”和“Bestfit”的程序,其能够与缺省参数一起使用,以确定在诸如来自不同种类的有机体的同源多肽之类的密切相关的多肽之间的或在野生型蛋白质和其突变蛋白质之间的序列同源性或序列一致性。例如,请参见 GCG 版本 6.1。

[0239] 当将特定多肽序列与包含来自不同的有机体的许多序列的数据库相比较时的示例性算法是计算机程序 BLAST (阿尔恰菲等的 *J. Mol. Biol.* (分子生物学期刊)215:403-410 (1990);自然遗传学 3:266-272 (1993) 的 Gish and States (主旨和状态);马登等的

Meth. Enzymol. (酶学方法)266:131-141(1996);阿尔恰菲等的 Nucleic Acids Res. (核酸研究)25:3389-3402 (1997);张和马登的 Genome Res. (基因组调查)7:649-656 (1997)), 尤其是 blastp 或 tblastn (阿尔恰菲等的 Nucleic Acids Res. (核酸研究)25:3389-3402 (1997))。

[0240] 用于 BLASTp 的示例性参数是:期望值:10 (默认);滤膜:凹陷(默认);打开间隙的成本:11 (默认);扩展间隙的成本:1 (默认);最大排列:100 (默认);字尺寸:11 (默认);描述的数量:100 (默认);处罚基质:BLOWSUM62。对于同源性相比较的多肽序列的长度通常将至少是大约 16 个氨基酸残基、或至少大约 20 个残基、或至少大约 24 个残基、或至少大约 28 个残基、或超过大约 35 个残基。当搜索包含来自许多不同的有机体的序列的数据库时,比较氨基酸序列可以是有用的。能够提供除现有技术中已知的 blastp 以外的算法来测量使用氨基酸序列的数据库搜索。例如,能够使用 FASTA——GCG 版本 6.1 中的程序来比较多肽序列。FASTA 提供查询和所搜索的序列之间的最好的重叠的区域的排列和百分比序列一致性。皮尔森、Methods Enzymol (酶学方法)183:63-98 (1990)。例如,能够在其缺省参数(2 的字尺寸和 PAM250 打分矩阵)的情况下使用 FASTA 来确定氨基酸序列之间的百分比序列一致性,如在通过引用被合并于本文的 GCG 版本 6.1 中提供的。

[0241] 在一些实施例中,如果聚合物分子(例如,多肽序列或核酸序列)的序列是至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或者至少 99% 相同的,则它们被认为是彼此“同源的”。在一些实施例中,如果聚合物分子的序列是至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或者至少 99% 类似的,则它们被认为是彼此“同源的”。术语“同源的”必然地指的是至少两个序列(核苷酸序列或者氨基酸顺序)之间的比较。在一些实施例中,如果两个核苷酸序列编码的多肽对于至少一段的至少大约 20 个氨基酸是至少大约 50% 相同的、至少大约 60% 相同的、至少大约 70% 相同的、至少大约 80% 相同的或者至少大约 90% 相同的,则它们被认为是同源的。在一些实施例中,同源核苷酸序列的特征在于编码一段至少 4-5 个唯一地指定的氨基酸的能力。对于将被考虑为同源的核苷酸序列,必须考虑这些氨基酸相对于彼此的一致性和近似的间隔两者。在长度小于 60 个核苷酸的核苷酸序列的一些实施例中,通过编码一段至少 4-5 个唯一地指定的氨基酸的能力来确定同源性。在一些实施例中,如果两个蛋白质序列对于至少一段至少大约 20 个氨基酸是至少大约 50% 相同的、至少大约 60% 相同的、至少大约 70% 相同的、至少大约 80% 相同的或者至少大约 90% 相同的,则它们被认为是同源的。

[0242] 如本文所使用的,“改性衍生物”指的是与参考多肽序列在主要的构造序列中基本上是同源的、但是其例如在活体内或者活体外包括化学制剂和生物化学改性或者其合并于参考多肽中未发现的氨基酸的多肽或者其片段。这样的改性例如包括乙酰化、羧化作用、磷酸化作用、糖基化作用、泛素化、例如利用放射性核素的加标签,以及各种酶改性,如将由本领域的技术人员容易地理解的。用于对多肽加标签的各种方法以及对这样的目的有用的各种取代基或标签在现有技术中是公知的,并且包括诸如  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  和  $^3\text{H}$  的放射性同位素,结合到加标签的反配体(例如,抗体)的配体,荧光团,化学发光菌剂,酶和能够充当用于加标签的配体的特定结合对成员的反配体。标签的选择取决于所要求的灵敏度、易于与引



物接合、稳定性需求和可用的使用仪器。用于对多肽加标签的方法在现有技术中是公知的。例如,请参见奥苏贝尔等的 Greene Publishing Associates(格林出版协会)(1992 和 2002 的附录)的 Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学现代方法)。

[0243] 如本文所使用的,“多肽突变体”或者“突变蛋白质”指的是与诸如原生型或野生型蛋白质之类的参考蛋白质或者多肽的氨基酸序列相比,其序列包含一个或多个氨基酸的插入、复制、缺失、重排或置换的多肽。突变蛋白质可以具有其中在一位置的单个氨基酸已经被改变为另一个氨基酸的一个或多个氨基酸点置换、其中一个或多个氨基酸在参考蛋白质的序列中被分别地插入或是缺失的一个或多个插入和 / 或缺失,和 / 或在氨基或者羧基末端的任何一个或两者的氨基酸序列的截断。与参考蛋白质相比,突变蛋白质可以具有相同的或者不同的生物活性。

[0244] 在一些实施例中,突变蛋白质例如具有对于其对应方参考蛋白质的至少 85% 的整体序列同源性。在一些实施例中,突变蛋白质具有对于野生型蛋白质至少 90% 的整体序列同源性。在其他的实施例中,突变蛋白质展现至少 95% 的序列一致性,或者 98%、或者 99%、或者 99.5% 或者 99.9% 的整体序列一致性。

[0245] 如本文所使用的,“用于亲和纯化的多肽标签”是具有能够用于分离或者纯化融合到第一“标签”多肽的所感兴趣的第二蛋白质或者多肽序列的结合配偶体的任何多肽。若干示例在现有技术中是公知的并且包括 6 组氨酸标签、标志表位、c-myc 表位、链锁状球菌 -TAGII、生物素标签、谷胱甘肽 5 转移酶(GST)、几丁质结合蛋白(CBP)、麦芽糖结合蛋白(MBP)或金属亲和性标签。

[0246] 如本文所使用的,“重组体”指的是(1)已经从自然地出现的环境移除的、(2)未与在自然界中发现基因的多核苷酸所有或部分相关联的、(3)操作地连锁到未连锁到在自然界中的多核苷酸,或没有发生在自然界中的多核苷酸的例如基因或蛋白质的生命分子。能够关于克隆的 DNA 分离、化学地合成的多核苷酸类似物或通过异源系统生物合成的多核苷酸类似物以及通过这样的核酸编码的蛋白质和 / 或 mRNA 来使用术语“重组体”。因此,例如,通过微生物合成的蛋白质是重组体,——例如,如果其是从由存在于细胞之中的重组体基因合成的 mRNA 合成的话。

[0247] 术语“多核苷酸”、“核酸分子”、“核酸”或“核酸序列”指的是至少 10 碱基长度的核苷酸的多聚形。术语包括 DNA 分子(例如, cDNA 或基因组或合成的 DNA)和 RNA 分子(例如, mRNA 或合成的 RNA)以及包含非天然的核苷酸类似物、非本土 internucleoside 键,或两者的 DNA 或 RNA 的类似物。核酸能够处于任何拓扑构型中。例如,核酸能够是单链的、双链的、三链的、四重的、部分双链的、分岔的、急转的、环状的,或者处于扣锁构型中。

[0248] “合成的”RNA、DNA 或混合聚合物是在细胞外产生的一个,例如用化学合成法合成的一个。

[0249] 如在本文所使用的术语“核酸片段”指的是与全长参考研核核苷酸序列相比具有例如 5' 末端或 3' 末端缺失的缺失的核酸序列。在实施例中,核酸片段是其中片段的核苷酸序列和自然地出现的序列中的对应的位置一致的邻接序列。在一些实施例中,片段至少 10、15、20 或 25 个核苷酸长,或至少 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140 或 150 个核苷酸长。在一些实施例中,核酸序列的片段是开放阅读框序列的片段。在一些实施例中、这样的片段对通过开放阅读框核苷酸序列编码的蛋白质的多肽片段(如在本文定义的)

进行编码。

[0250] 如本文所使用的,有机体的基因组中的内源核酸序列(或者该序列的编码蛋白质产物)在本文被认为是“重组体”——如果异源序列的位置邻近于内源核酸序列,使得内源核酸序列的表达被改变的话。在该上下文中,不管异源序列是本身内源的(起源于相同的寄主细胞或其子代)还是外源的(起源于不同的寄主细胞或其子代),异源序列都是没有自然地靠近内源核酸序列的序列。作为示例,对于寄主细胞的基因组中的基因的天然启动子,能够(例如,由同源重组)来替代启动子序列,使得该基因具有改变的表达模式。该基因现在将变为“重组体”,这是因为其与自然地在其旁边的至少一些序列分开。

[0251] 核酸也被考虑为“重组体”——如果其包含没有对基因组中的对应的核酸自然地出现的任何改性。例如,内源编码序列被考虑为“重组体”——如果其包含例如通过人的干预人工地引入的插入、缺失或点突变。“重组体核酸”也可以包括整合到在异源位点的寄主细胞染色体中的核酸和呈现为附加体的核酸构造。

[0252] 如本文所使用的,措词参考核酸序列的“简并变体”包括能够根据标准遗传码转译的核酸序列,以提供和从参考核酸序列转译的氨基酸序列一致的氨基酸序列。术语“简并低聚核苷酸”或“简并引物”用于表示能够与一个或多个特定片段内的在序列中不必然地一致但是彼此同源的目标核酸序列杂交的低聚核苷酸。

[0253] 在核酸序列的上下文中的术语“百分比序列一致性”或“一致的”指的是当被排列用于最大对应时是相同的两个序列中的残基。序列一致性比较的长度可以超过一段至少大约九个核苷酸、通常至少大约 20 个核苷酸、更通常至少大约 24 个核苷酸、典型地至少大约 28 个核苷酸、更典型地至少大约 32 个,以及甚至更典型地至少大约 36 或更多个核苷酸。存在能够用于测量核苷酸序列一致性的现有技术中已知的许多不同的算法。例如,能够使用作为威斯康星州、麦迪逊的 Genetics Computer Group (GCG) 的威斯康星程序包版本 10.0 中的程序的 FASTA、Gap 或 Bestfit 来比较多核苷酸序列。FASTA 提供查询和所搜索的序列之间的最好的重叠的区域的排列和百分比序列一致性。皮尔森、Methods Enzymol. (酶学方法) 183:63-98 (1990)。例如,能够使用在其缺省参数(6 的字尺寸和用于打分矩阵的 NOP AM 因子)的情况下的 FASTA 或使用在其缺省参数的情况下的 Gap 来确定核酸序列之间的百分比序列一致性,如在通过引用被合并于本文的 GCG 版本 6.1 中提供的。替换地,能够使用计算机程序 BLAST 来比较序列(阿尔恰菲及其他的 J. Mol. Biol (分子生物学期刊) 215:403-410 (1990); 自然遗传学 3:266-272 (1993) 的 Gish and States (主旨和状态); 马登等的 Meth. Enzymol (酶学方法) 266:131-141 (1996); 阿尔恰菲等的 Nucleic Acids Res (核酸研究) 25:3389-3402 (1997); 张和马登的 Genome Res (基因组调查) 7:649-656 (1997)), 尤其是 blastp 或 tblastn (阿尔恰菲等的 Nucleic Acids Res (核酸研究) 25:3389-3402 (1997))。

[0254] 当参考核酸或其片段时,术语“相当的同源性”或“相当的类似性”指示,当与另一个核酸(或其互补链)利用合适的核苷酸插入或缺失最佳对准时,存在在至少大约 76%、80%、85% 或至少大约 90%、或至少大约 95%、96%、97%、98% 或 99% 的核苷酸碱基中的核苷酸序列一致性,如由以上讨论的诸如 FASTA、BLAST 或 Gap 之类的序列一致性的任何公知的算法测量的。

[0255] 替换地,当在严格的杂交条件之下核酸或其片段与另一个核酸、与另一个核酸的

链,或与其互补链杂交时,相当的同源性或类似性存在。在核酸杂交实验的上下文中的“严格杂交条件”和“严格冲洗条件”取决于许多不同的物理参数。核酸杂交将受诸如盐浓度、温度、溶剂、杂交种类的碱基组成、互补区域的长度和在杂交核酸之间的核苷酸碱基失配的数量这样的条件影响,如将由本领域的技术人员容易地理解的。本领域普通技术人员了解如何改变这些参数来实现杂交的特定严格性。

[0256] 通常,在特定集合的条件下对于特定 DNA 杂交体在熔点( $T_m$ )之下在大约  $25^{\circ}\text{C}$  执行“严格的杂交”。在特定集合的条件下对于特定 DNA 杂交体低于  $T_m$  在大约  $5^{\circ}\text{C}$  的温度执行“严格的冲洗”。 $T_m$  是靶序列的 50% 杂交以完美地匹配探针的温度。请参见纽约冷泉港实验室、冷泉港实验室出版社(1989) 萨姆布鲁克等的 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验手册) 的 2d 版本、页 9.51。用于在本文的目的,对于溶液相杂交“严格的条件”被定义为在 8 - 12 小时在  $65^{\circ}\text{C}$  在 6xSSC (其中 20xSSC 包含 3.0 M NaCl 和 0.3 M 柠檬酸钠)、1% SDS 中,后面是在 20 分钟的在  $65^{\circ}\text{C}$  的 0.2xSSC、0.1% SDS 中的两个冲洗中的含水杂交(即,不含甲酰胺)。将由熟练工人理解的是,在  $65^{\circ}\text{C}$  的杂交将取决于包括杂交的序列的长度和百分比一致性的许多因素来以不同的速率发生。

[0257] 如在本文所使用的,“表达控制序列”指的是影响它们操作地连锁到的编码序列的表达所必需的多核苷酸序列。表达控制序列是控制核酸序列的转录、转录后的事件和转译的序列。表达控制序列包括合适的转录开始、终止、启动子和增强子序列;诸如叠接和聚腺苷酸化信号的高效的 RNA 处理信号;使细胞质 mRNA 稳定的序列;增强转译效率的序列(例如,核糖体结合位点);增强蛋白质稳定性的序列;以及当期望时,增强蛋白质分泌的序列。这样的控制序列的本质取决于寄主有机体而不同:在原核生物中,这样的控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。术语“控制序列”意图至少包括其存在对表达是必不可少的任何成分,并且也能够包括其存在是有利的附加的成分,例如,前导序列和融合配偶体序列。

[0258] 如本文所使用的,“操作地连锁的”或“可操作地连锁的”表达控制序列指的是其中表达控制序列与所感兴趣的基因是邻接的以控制所感兴趣的基因的连锁,以及反式或隔开一定距离作用以控制所感兴趣的基因的表达控制序列。

[0259] 如本文所使用的,“质粒”意图指代能够输送其已经连锁到的另一个核酸的核酸分子。一种类型的质粒是“质体”,其通常指的是附加的 DNA 片段可以被绑扎到其中的环状双链 DNA 环,而且包括诸如由聚合酶链式反应(PCR)进行的放大或由利用限制酶的环状质体的处置引起的那些之类的线性双链分子。其他质粒包括粘粒、细菌人工染色体(BAC)和酵母人工染色体(YAC)。另一种类型的质粒是病毒质粒,其中,附加的 DNA 片段可以被绑扎到(以下更详细地讨论的)病毒基因组中。某些质粒能够在它们被引入其中的寄主细胞中进行自主复制(例如,质粒具有在寄主细胞中起作用的复制起点)。一旦引入到寄主细胞中,其他质粒就能够被整合到寄主细胞的基因组中,并且因此与寄主基因组一起被复制。此外,某些质粒能够引导它们操作地连锁的基因的表达。这样的质粒在本文被称为“重组体表达质粒”(或简称为“表达质粒”)。

[0260] “重组体质粒”是噬菌体基因组已经被插入其中的质粒。在一些实施例中,起始噬菌体基因组被插入。在一些实施例中,重组噬菌体基因组被插入。在一些实施例中,起始噬菌体基因组被插入在质粒中并且然后被改性,以在质粒中产生重组噬菌体基因组。

[0261] 如本文所使用的,术语“重组体寄主细胞”(或者简单地称“重组体细胞”或者“寄主细胞”)意图指的是诸如重组体质粒的重组体核酸已经被引入其中的细胞。在一些实例中,词“细胞”由指定细胞的类型的名称来代替。例如,“重组体微生物”是重组体寄主细胞(其是微生物寄主细胞)。应当理解,这样的术语意图不仅仅指特定主体细胞,而且指这样的细胞的子代。因为由于突变或者环境影响某些改性可能发生在后代中,所以事实上,这样的子代可能不和母细胞一致,但是仍然被包括在如在本文所使用的术语“重组体寄主细胞”、“重组体细胞”和“寄主细胞”的范围内。重组体寄主细胞可以是分离细胞或者在培养物中生长的细胞系或者可以是存在于活组织或者有机体的细胞。

[0262] 如本文所使用的,“抗菌素”指的是感染细菌的病毒。类似地,“古生菌噬菌体”指的是感染古生菌的病毒。术语“噬菌体”用于指代两种类型的病毒,但是在某些实例中,如由上下文指示的,也可以用作具体指代抗菌素或古生菌噬菌体的简写形式。抗菌素和古生菌噬菌体是通过利用一些或所有寄主生物合成机制来繁殖内部细菌/古生菌的专性胞内寄生物(即,感染细菌的病毒)。尽管不同的抗菌素和古生菌噬菌体可以包含不同的材料,但它们都包含核酸和蛋白质,并且在某种情况下能够被封装在类脂膜中。取决于噬菌体,核酸能够是 DNA 或者 RNA,而不是两者,并且其能够以各种形式存在。

[0263] 如本文所使用的,“异源核酸序列”是位于基因组中其没有正常地出现的位置的任何序列。异源核酸序列可以包括没有自然地出现在细菌/古生菌和/或噬菌体中的序列,或者其可以仅仅包括自然地存在于细菌/古生菌和/或噬菌体中的但是位于基因组中的非正常地出现的位置的序列。在一些实施例中,异源核酸序列不是自然的噬菌体序列;在一些实施例中,其是自然的噬菌体序列,虽然来自不同的噬菌体;尽管在又一些其他实施例中,其是自然地出现在起始噬菌体的基因组中但是然后被移动到其没有自然地出现的另一个位点的序列,使其在该新的位点为异源序列。

[0264] “起始噬菌体”或者“起始噬菌体基因组”是与还没有被遗传工程或者这样的噬菌体的基因组改性的自然或者人为环境分离的噬菌体。

[0265] “重组噬菌体”或“重组噬菌体基因组”是包括已经通过将异源核酸序列插入到基因组中被转基因的基因组的噬菌体,或者噬菌体的基因组。在一些实施例中,通过 DNA 重组技术将起始噬菌体的基因组改性以在定义的位点将异源核酸序列引入到基因组中。在一些实施例中,在没有内源噬菌体基因组核苷酸的对应的丢失的情况下引入异源序列。换句话说,如果碱基 N1 和 N2 在起始噬菌体基因组中是相邻的,则在 N1 和 N2 之间插入外源序列。因此,在结果得到的重组基因组中,异源序列两侧是核苷酸 N1 和 N2。在一些情况下,异源序列被插入,并且内源核苷酸被移除或者被替代为外源序列。例如,在一些实施例中,插入外源序列来代替被移除的内源序列的一些或所有。在一些实施例中,从远离插入外源序列的位点的噬菌体基因组中的位置将内源序列移除。

[0266] “噬菌体寄主细胞”是能够由噬菌体感染以产出子代噬菌体颗粒的细胞。

[0267] 如本文所使用的,“操作地连锁的”或“可操作地连锁的”表达控制表达式序列指的是其中表达控制表达式序列与所感兴趣的编码序列是邻接的以控制所感兴趣的编码序列的连锁,以及反式或隔开一定距离作用以控制编码序列的表达的表达式序列。

[0268] “编码序列”或“开放阅读框”是对多肽或蛋白质进行编码的核苷酸的序列。编码序列的界标是起始密码子和终止密码子。

[0269] 如在本文所使用的术语“表达控制序列”指的是影响它们操作地连锁到的编码序列的表达的多核苷酸序列。表达控制序列是控制核酸序列的转录、转录后的事件和转译的序列。表达控制序列包括合适的转录开始、终止、启动子和增强子序列；诸如叠接和聚腺苷酸化信号的高效的 RNA 处理信号；使细胞质 mRNA 稳定的序列；增强转译效率的序列（例如，核糖体结合位点）；增强蛋白质稳定性的序列；以及当期望时，增强蛋白质分泌的序列。这样的控制序列的本质取决于寄主有机体而不同：在原核生物中，这样的控制序列通常包括启动子、核糖体结合位点和转录终止序列。术语“控制序列”意图至少包括其存在对表达是必不可少的所有组件，并且也能够包括其存在是有利的附加的成分，例如，前导序列和融合配偶体序列。

[0270] 如本文所使用的，“可选择标记”是授予拥有标记的细胞在存在或不存在分别地抑制或者激发没有表达标记的类似的细胞的生长的菌剂的情况下进行生长的能力的标记。借助于这样的细胞的可选择标记的表达，这样的细胞也能够被说成具有“可选择表型”。例如，氨苄青霉素抗性基因（AmpR）在拥有和表达基因的细胞上授予在有氨苄青霉素的情况下生长的能力。（请参见苏特克里弗 J. G. 的 1978 八月的美国国家科学院院刊；75(8)：3737-3741）其他非限制性示例包括授予对氯霉素、卡那霉素和四环素的耐受性的基因。其他标记包括 URA3、TRP 和 LEU，其允许分别地缺乏所述尿嘧啶、色氨酸和白氨酸的情况下的生长。

[0271] 如本文所使用的，“可筛查标记”是能够被用作识别表达标记的细胞的基础的可检测的标签。借助于这样的细胞的可筛查标记的表达，这样的细胞也能够被说成具有“可筛查表型”。适当的标记包括示踪用放射性同位素、荧光标签、核磁共振活性标签、发光标签、发色团标签、用于 PET 扫描仪的正电子发射同位素、化学发光标签，或酶标签。荧光标签包括但不限于绿色荧光蛋白（GFP）、荧光素和若丹明。化学发光标签包括但不限于荧光素酶和  $\beta$  半乳糖苷酶。酶标签包括但不限于过氧化物酶和磷酸酶。组氨酸标签也可以是可检测的标签。在一些实施例中，将异源核酸引入细胞中，并且细胞然后表达是或包括标签的蛋白质。例如，所引入的核酸能够包括用于操作地连锁到在细胞中为活性的调节序列的 GFP 的编码序列。

[0272] 如本文所使用的，“噬菌体基因组”包括自然地出现的噬菌体基因组和其衍生物。通常，衍生物拥有在与亲本相同的寄主中繁衍的能力。在一些实施例中，自然地出现的噬菌体基因组和衍生物噬菌体基因组之间的仅仅的差异是以下中的至少一个：如果基因组是线性的，从噬菌体基因组的至少一端的缺失和添加；或者，如果基因组是环状的，从基因组中的至少一个点的缺失和添加。

[0273] 如本文所使用的，“质粒寄主细胞”是能够通过至少若干细胞分裂周期寄主给定质粒类型的细胞。因此，质粒寄主细胞能够通过至少若干细胞分裂周期来将被引入细胞的质粒复制并且将质粒的拷贝配分到每个子代细胞。例如，酵母细胞是用于酵母人工染色体（YAC）质粒的质粒寄主细胞。

[0274] 如本文所使用的，“噬菌体寄主细胞”是从特定类型的噬菌体基因组 DNA 形成噬菌体的细胞。在一些实施例中，噬菌体基因组 DNA 通过经由噬菌体的细胞的感染而被引入细胞。在一些实施例中，使用转化或者任何其他适当的技术，噬菌体基因组 DNA 被引入细胞。在一些实施例中，当被引入细胞时，噬菌体基因组 DNA 基本上是纯化的。在一些实施例中，

当被引入细胞时,噬菌体基因组 DNA 存在于质粒中。在一个非限制性的示例性实施例中,噬菌体基因组 DNA 存在于被引入噬菌体寄主细胞的 YAC 中。继噬菌体寄主细胞的溶解之后,然后将噬菌体基因组 DNA 复制并且封装到噬菌体颗粒中。“噬菌体寄主细胞”的定义有必要能够从一个噬菌体到另一个噬菌体而改变。例如,大肠杆菌可以是用于特定类型的噬菌体的噬菌体寄主细胞,而肠道沙门氏菌不是。

[0275] 如本文所使用的,“感受态的噬菌体寄主细胞”是噬菌体颗粒能够感染的并且其中噬菌体的基因组能够从细胞引导噬菌体颗粒的产生的噬菌体寄主细胞。因此,不是所有“噬菌体寄主细胞”都是“感受态的噬菌体寄主细胞”,但是所有“感受态的噬菌体寄主细胞”都是“噬菌体寄主细胞”。

[0276] 如本文所使用的,关于将第一核酸序列插入到第二核酸序列中的处理所使用的术语“非序列特定处理”是其中在插入之前不确定在第二核酸序列中进行插入的位点的处理。

[0277] 如本文所使用的,“转座酶系统”包括转座酶或能够引导转座酶的表达的核酸,以及能够由酶活动化的遗传成分。典型地遗传成分包括在为活动化所必需的任一端的序列和用于插入到目标核酸中的内部异源序列。转座酶系统的非限制性示例包括 Mos1 (mariner) (请参见雅克布森等的 PNAS USA (美国科学院院刊),卷 83、页 8684 - 8688 (1986))、Mu、Tn5 (可以从 epicentre<sup>®</sup> 获得的套件和试剂(www.epicentre.com) 以及转座因子(请参见美国专利 No. 6, 218, 185))。

[0278] 如本文所使用的,相对于将异源核酸序列插入到诸如噬菌体基因组的第二核酸序列中的位点的“预先确定的位置”意思指在将异源核酸序列插入到第二核酸序列中之前所选择的位点。

#### [0279] A. 噬菌体

抗菌素和古生菌噬菌体是通过利用一些或所有寄主生物合成机制来繁殖内部细菌 / 古生菌的专性胞内寄生物(即,感染细菌 / 古生菌的病毒)。尽管不同的噬菌体可以包含不同的材料,但它们都包含核酸和蛋白质,并且可以由类脂膜覆盖。取决于噬菌体,核酸能够是 DNA 或者 RNA,而不是两者,并且其能够以各种形式存在。核酸的尺寸取决于噬菌体而改变。最简单的噬菌体仅仅具有尺寸是几千核苷酸的基因组,而更复杂的噬菌体可以在它们的基因组中具有超过 100000 的核苷酸,在少数实例中,超过 1000000。噬菌体颗粒中的不同种类的蛋白质的数量和每种蛋白质的量将取决于噬菌体而改变。蛋白质在感染中起作用,并且在环境中使核酸免受核酸酶。

[0280] 噬菌体有许多不同的尺寸和形状。大多数噬菌体尺寸范围是直径从 24-200nm。头部或衣壳由一个或多个不同的蛋白质的许多拷贝组成。如果核酸存在,它位于头部中,其充当用于头部的保护涂层。许多然而并非所有噬菌体具有附着于噬菌体头部的尾部。尾部是在感染期间核酸经过的空心管。尾部的尺寸能够改变,并且一些噬菌体即使地不具有尾部结构。在更复杂的噬菌体中,尾部由在细菌的感染期间进行收缩的收缩性鞘围绕。在尾部的末端,噬菌体具有基片和附着于其的一个或多个尾丝。在将噬菌体结合到细胞时涉及基片和尾丝。不是所有的噬菌体都具有基片和尾丝。在这些实例中,在将噬菌体颗粒结合到细菌 / 古生菌时涉及其他结构。

[0281] 感染处理中的第一步骤是将噬菌体吸附到细胞。由尾丝或由缺乏尾丝的那些噬菌体上的一些同功结构来介导本步骤,并且本步骤是可逆的。通常通过噬菌体具有的尾丝的

类型来确定附着于细胞上的特定受体的尾丝和噬菌体的寄主专一性(即,其能够感染的细菌/古生菌)。细菌/古生菌受体的本质因不同的细菌/古生菌而改变。示例包括的外表面上的蛋白质、脂多糖、菌毛和脂蛋白。这些受体位于细胞上来用于其他目的,并且噬菌体已经发展为使用这些受体来用于感染。

[0282] 经由尾丝将噬菌体附着到细胞是较弱的一种,并且是可逆的。由基片的一个或多个成分来介导噬菌体到细胞的不可逆的结合。缺乏基片的噬菌体具有变得紧紧地结合到细胞的其他方式。

[0283] (对于具有鞘的那些噬菌体)噬菌体到细胞的不可逆的结合导致鞘的收缩,并且通过细菌/古生菌包膜来推动空心尾丝。不具有收缩性鞘的噬菌体使用其他机制来获得通过细菌/古生菌包膜的噬菌体颗粒。一些噬菌体具有消化包膜的各种成分的酶。

[0284] 当噬菌体已经通过包膜时,来自头部的核酸穿过空心尾部并且进入细胞。通常,实际地进入细胞的仅有的噬菌体分量是核酸。噬菌体的其余保持在细胞外。对该规则存在一些例外情况。这不同于其中大部分病毒颗粒通常进入细胞的动物细胞病毒。

[0285] 溶解性或毒性噬菌体是仅能够在细菌/古生菌上繁殖并且在生存期的末端通过溶解杀死细胞的噬菌体。裂解性噬菌体的生存期从潜伏期开始。在隐蔽期期间,不能够在细胞内部或者外部发现感染性的噬菌体颗粒。噬菌体核酸接管寄主生物合成机制,并且制作噬菌体指定的 mRNA 和蛋白质。存在噬菌体引导的大分子的合成的有序表达,就像人们在动物病毒感染中看到的。早期 mRNA 对于噬菌体 DNA 合成和用于切断寄主 DNA、RNA 和蛋白质生物合成所需要的早期蛋白进行编码。在一些情况下,早期蛋白实际上使寄主染色体劣化。在制作噬菌体 DNA 之后,制作后期 mRNA 和后期蛋白。后期蛋白是包括细菌细胞的溶解所需要的噬菌体以及蛋白质的结构蛋白质。接下来,在细胞内累积阶段中,将核酸和已经被制作的结构蛋白质组装,并且传染性的噬菌体颗粒在细胞内累积。在溶解和释放阶段期间,细菌/古生菌由于噬菌体溶解蛋白质的累积而开始溶化,并且细胞内噬菌体被释放到培养基中。接受感染细胞释放的颗粒的数量能够高达 1000 或更多。

[0286] 可以通过噬菌斑试验来枚举裂解性噬菌体。噬菌斑是空白区,其从细菌/古生菌的溶解导致在固体培养基上生长的细菌的/古生菌的菌苔。在每个噬菌斑从单个感染的噬菌体引起的噬菌体的足够低的浓度执行试验。引起噬菌斑的感染颗粒被称作 PFU (噬斑形成单位)。

[0287] 溶源或温和噬菌体是能够在细胞中经由裂解周期繁殖或者进入静止状态的那些。在该静止状态中,大部分噬菌体基因未被转录;噬菌体基因组存在于阻遏状态中。阻遏状态中的噬菌体 DNA 被称作原噬菌体,这是因为其不是噬菌体,但是其有产生噬菌体的潜能。大多数情况下,噬菌体 DNA 实际地整合到寄主染色体中,并且与寄主染色体一起被复制并且被传递到子代细胞上。怀有原噬菌体的细胞不会有害地受原噬菌体的存在的影响,并且溶源状态可能无限地持续。怀有原噬菌体的细胞被叫作溶素原。

[0288] 溶源现象的机制在噬菌体之间不同。在范例中,噬菌体  $\lambda$ 、 $\lambda$  DNA 是具有在 5' 末端的小的单链区域的双链线型分子。这些单链末端是互补的(粘性末端)使得它们能够是碱基对并且产生环状分子。在细胞中,环的自由端能够被绑扎以形成共价封闭环。A 通过噬菌体编码的酶催化的位点特定的重组事件出现在环状噬菌体 DNA 上的特定位点与寄主染色体上的特定位点之间。该结果是噬菌体 DNA 到寄主染色体中的整合。制作称作阻遏物的噬

菌体编码的蛋白质,其结合到称作操纵基因的噬菌体 DNA 上的特定位点,并且关掉除阻遏基因之外的大多数噬菌体基因的转录。结果是被整合到寄主染色体中的稳定阻遏噬菌体基因组。每个温和噬菌体将仅仅阻遏其自己的 DNA 而非来自其他噬菌体的 DNA,因此阻遏是非常具体的(对具有相同的噬菌体的超感染的免疫性)。

[0289] 在溶原性细菌/古生菌遭受不利条件的任何时候,能够终止溶源状态。该处理被称作诱导。促成溶源状态的终止的条件包括:干燥、遭受 UV 或电离辐射、遭受突变化学制剂,等等。不利条件导致毁坏阻抑蛋白的蛋白酶(recA 蛋白质)的产生。这进而导致噬菌体基因的表达、整合处理和溶解性繁殖的反转。

[0290] 在本公开的一些实施例中,起始噬菌体基因组包括至少 5 千碱基(kb)、至少 10 kb、至少 15 kb、至少 20 kb、至少 25 kb、至少 30 kb、至少 35 kb、至少 40 kb、至少 45 kb、至少 50 kb、至少 55 kb、至少 60 kb、至少 65 kb、至少 70 kb、至少 75 kb、至少 80 kb、至少 85 kb、至少 90 kb、至少 95 kb、至少 100 kb、至少 105 kb、至少 110 kb、至少 115 kb、至少 120 kb、至少 125 kb、至少 130 kb、至少 135 kb、至少 140 kb、至少 145 kb、至少 150 kb、至少 175 kb、至少 200 kb、至少 225 kb、至少 250 kb、至少 275 kb、至少 300 kb、至少 325 kb、至少 350 kb、至少 375 kb、至少 400 kb、至少 425 kb、至少 450 kb、至少 475 kb、至少 500 kb 或更多。

[0291] 在本公开的一些实施例中,起始噬菌体是从有尾噬菌体目、微小噬菌体科、覆盖噬菌体科、复层病毒科、光滑病毒科、囊状噬菌科、丝状噬菌体科、脂毛噬菌体科、古噬菌体科、芽生噬菌体科和微小纺锤形噬菌体科中选择的目的成员。在一些实施例中,噬菌体目有尾噬菌体目的成员,并且是从肌病毒科、长尾噬菌体科和短尾噬菌体科中选择的科的成员。

[0292] 在本公开的一些实施例中,噬菌体能够高效地感染古生菌。在一些实施例中,古生菌是广古生菌。在一些实施例中,古生菌是泉古菌门。在本公开的一些实施例中,噬菌体能够高效地感染细菌。在一些实施例中,细菌是从放线菌、产水菌门、装甲菌门、拟杆菌、嗜热丝菌门、衣原体、绿弯菌、产金菌门、蓝细菌、脱铁杆菌门、异常球菌、网团菌门、迷踪菌门、纤维杆菌门、厚壁菌门、杆菌门、芽单胞菌门、硝化螺旋菌门、浮霉菌门、变形菌门、螺旋菌、互养菌属、柔膜菌门、脱硫杆菌纲、热袍菌门中选择的门的成员。在一些实施例中,噬菌体能够高效地感染从杆菌、李氏菌属、葡萄球菌中选择的至少一个厚壁菌门。在一些实施例中,噬菌体能够高效地感染从氧化亚铁硫杆菌、气单胞菌属、伯克氏菌属、奈瑟氏菌属、希瓦氏菌属、柠檬酸细菌属、肠杆菌属、欧文氏菌属、埃希氏杆菌属、克雷伯氏杆菌属、克吕沃氏菌属、摩根氏菌属、沙门氏菌、志贺氏菌属、耶尔森氏菌属、考克斯氏体属、立克次氏体、军团杆菌、禽杆菌属、嗜血杆菌属、巴斯德氏菌属、不动杆菌属、摩拉克氏菌属、假单胞菌属、弧菌、黄单胞菌属中选择的至少一个变形菌门。在一些实施例中,噬菌体能够高效地感染从类菌质体、螺原体属和脲原体中选择的至少一个柔膜菌门。

#### [0293] B. 异源核酸序列

在一些实施例中,异源核酸序列被插入起始噬菌体基因组中以产生重组噬菌体基因组。在一些实施例中,重组噬菌体基因组被进一步改性为产生不同的重组噬菌体基因组。

[0294] 异源核酸序列能够是任何核酸序列。在一些实施例中,异源核酸序列的长度是至少 100 碱基、至少 200 碱基、至少 300 碱基、至少 400 碱基、至少 500 碱基、至少 600 碱基、至少 700 碱基、至少 800 碱基、至少 900 碱基、至少 1 千碱基(kb)、至少 1.1 kb、至少 1.2 kb、



至少 1.3 kb、至少 1.4 kb、至少 1.5 kb、至少 1.6 kb、至少 1.7 kb、至少 1.8 kb、至少 1.9 kb、至少 2.0 kb、至少 2.1 kb、至少 2.2 kb、至少 2.3 kb、至少 2.4 kb、至少 2.5 kb、至少 2.6 kb、至少 2.7 kb、至少 2.8 kb、至少 2.9 kb、至少 3.0 kb、至少 3.1 kb、至少 3.2 kb、至少 3.3 kb、至少 3.4 kb、至少 3.5 kb、至少 3.6 kb、至少 3.7 kb、至少 3.8 kb、至少 3.9 kb、至少 4.0 kb、至少 4.5 kb、至少 5.0 kb、至少 5.5 kb、至少 5.5 kb、至少 6.0 kb、至少 6.5 kb、至少 7.0 kb、至少 7.5 kb、至少 8.0 kb、至少 8.5 kb、至少 9.0 kb、至少 9.5 kb、至少 10 kb 或更多。在一些这样的实施例中，异源核酸序列包括小于或等于能够被封装到包括噬菌体基因组的噬菌体颗粒中的异源核酸序列的最大长度的长度。在一些这样的实施例中，异源核酸序列包括小于或等于从 1 kb、2 kb、3 kb、4 kb、5 kb、6 kb、7 kb、8 kb、9 kb 和 10 kb 中选择的长度的长度。

[0295] 在一些实施例中，异源核酸序列的长度从 100 到 500 碱基、从 200 到 1000 碱基、从 500 到 1000 碱基、从 500 到 1500 碱基、从 1 kb 到 2 kb、从 1.5 kb 到 2.5 kb、从 2.0 kb 到 3.0 kb、从 2.5 kb 到 3.5 kb、从 3.0 kb 到 4.0 kb、从 3.5 kb 到 4.5 kb、从 4.0 kb 到 5.0 kb、从 4.5 kb 到 5.5 kb、从 5.0 kb 到 6.0 kb、从 5.5 kb 到 6.5 kb、从 6.0 kb 到 7.0 kb、从 6.5 kb 到 7.5 kb、从 7.0 kb 到 8.0 kb、从 7.5 kb 到 8.5 kb、从 8.0 kb 到 9.0 kb、从 8.5 kb 到 9.5 kb 或者从 9.0 kb 到 10.0 kb。

[0296] 在一些实施例中，异源核酸序列的长度与重组噬菌体的基因组的总长度之比是至少 0.05、至少 0.10、至少 0.15、至少 0.20 或者至少 0.25。在一些实施例中，重组噬菌体的基因组的长度与对应的起始噬菌体的基因组的长度之比是至少 1.05、至少 1.10、至少 1.15、至少 1.20 或者至少 1.25。

[0297] 在一些实施例中，在没有内源起始噬菌体基因组序列的丢失的情况下，异源核酸序列被插入起始噬菌体基因组中。在一些实施例中，插入的异源核酸序列替代内源起始噬菌体基因组序列。在一些这样的实施例中，异源核酸序列替代小于异源核酸序列的长度的一定量的内源基因组序列。因此，重组噬菌体基因组的长度比起始噬菌体基因组的长度长。在一些这样的实施例中，异源核酸序列替代大于异源核酸序列的长度的一定量的内源基因组序列。因此，重组噬菌体基因组的长度比起始噬菌体基因组的长度短。在一些这样的实施例中，异源核酸序列替代等于异源核酸序列的长度的一定量的内源基因组序列。

[0298] 在一些实施例中，异源核酸序列包括开放阅读框。

[0299] 在一些实施例中，开放阅读框对在包括质粒的质粒寄主细胞上授予从可选择表型和可筛选表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在这样的实施例中，质粒包括能够在质粒寄主细胞中引导开放阅读框的表达的表达控制序列。在一些实施例中，可选择表型或可筛选表型用于识别包括把包括对在包括质粒的质粒寄主细胞上授予从可选择表型和可筛选表型中选择的至少一个表型的标记进行编码的开放阅读框的噬菌体基因组包括在内的质粒的寄主细胞。在一些实施例中，噬菌体基因组之外的质粒的部分包括对在包括质粒的质粒寄主细胞上授予从可选择表型和可筛选表型中选择的至少一个表型的标记进行编码的开放阅读框。在一些实施例中，噬菌体基因组之外的质粒和被插入噬菌体基因组中的异源核酸序列两者都对这样的标记进行编码。在一些实施例中，由质粒序列中的开放阅读框编码的标记和由被插入噬菌体基因组中的异源核酸序列中的开放阅读框编码的标记是不同的。

[0300] 在一些实施例中,开放阅读框对在包括噬菌体基因组的噬菌体寄主细胞上授予从可选择表型和可筛查表型中选择的至少一个表型的标记进行编码。在这样的实施例中,开放阅读框操作地连锁到能够在噬菌体寄主细胞中引导开放阅读框的表达的表达控制序列。表达控制序列能够位于异源核酸序列中,或者其能够在内源噬菌体基因组序列中(即,其能够是存在于起始噬菌体基因组之中的序列)。例如,开放阅读框能够被插入内源噬菌体开放阅读框序列下游的或者代替其的噬菌体基因组中。

[0301] 在一些实施例中,开放阅读框对充当能够通过由包括把开放阅读框包括在内的异源核酸序列的重组噬菌体所感染的噬菌体寄主细胞的筛查而识别的标记的蛋白质进行编码。作为示例且不进行限制,这样的标记的示例包括示踪用放射性同位素、荧光标签、核磁共振活性标签、发光标签、发色团标签、用于 PET 扫描仪的正电子发射同位素、化学发光并且,或酶标签。荧光标签包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP)、荧光素,并且若丹明化学发光标签包括但不限于荧光素酶和  $\beta$  半乳糖苷酶。酶标签包括但不限于过氧化物酶和磷酸酶。组氨酸标签也能够用作可检测的标签。在一些实施例中,将异源核酸引入细胞中,并且细胞然后表达是或包括标签的蛋白质。在一些实施例中,开放阅读框对不是由噬菌体寄主细胞正常地产生的蛋白质进行编码。这么蛋白质能够被用作能够通过筛查——例如,通过使用免疫测定法检测蛋白质而识别的标记。在一些实施例中,在试验中检测可筛查标记以识别样本中的噬菌体寄主细胞的存在。例如,噬菌体寄主细胞能够是污染食品加工厂的细菌细胞类型,并且继重组噬菌体与样本的混合之后对细胞中的可筛查标记的表达的检测能够被用作检测由噬菌体寄主细胞对食品加工厂的污染的试验。

[0302] 在一些实施例中,开放阅读框对从核酸酶、核酸内切酶、蛋白酶、糖苷酶、聚糖酶、水解酶、裂合酶、酯酶、磷酸二酯酶、纤维素酶、细胞溶解酶和激酶中所选择的蛋白质进行编码。在一些实施例中,蛋白质是除核酸酶、核酸内切酶、蛋白酶、糖苷酶、聚糖酶、水解酶、裂合酶、酯酶、磷酸二酯酶、纤维素酶、细胞溶解酶和激酶中的至少一个以外的任何蛋白质。

[0303] 在一些实施例中,开放阅读框对列在表 1 中的蛋白质进行编码。

[0304] 表 1

蛋白质的常用名称	EC	底质
纳豆激酶	3. 4. 21. 62	蛋白质、淀粉状蛋白
分散蛋白 B	3. 2. 1. 52	beta-1,6 - N - 乙酰基 - D - 氨基葡萄糖
海藻酸裂解酶	4. 2. 2. 3	海藻酸盐
海藻酸裂解酶	4. 2. 2. 11	海藻酸盐
NucA	3. 1. 30. 2	DNA, RNA
葡聚糖内切酶	3. 2. 1. 4	纤维素、地衣淀粉、谷物 beta-D - 葡聚糖
枯草杆菌蛋白酶	3. 4. 21. 62	蛋白质
AlpP		自身溶解
脱氧核糖核酸酶 A		DNA, RNA
Aqualysin	3. 4. 21. 62	蛋白质
endX	3. 1. 21. -	DNA
如同枯草杆菌蛋白酶的蛋白酶		蛋白质
葡聚糖 endo - 1,3 - beta - 葡糖苷酶 A1	3. 2. 1. 39	beta - 1, - 真菌细胞壁中的 3 - 葡聚糖
耐热核酸酶	3. 1. 31. 1	DNA, RNA
Mycolysin	3. 4. 24. 31	蛋白质, P1' 中的疏水性残基
DNA 酶 I	3. 1. 21. 1	DNA
蛋白酶 K	3. 4. 21. 64	蛋白质
Streptogrysin-C	3. 4. 21. -	类似于糜蛋白酶的蛋白质,可能地专门用于如同几丁质的蛋白质
Streptogrysin-D	3. 4. 21. -	蛋白质,大脂肪族或芳香族胺基酸
Streptogrysin-A	3. 4. 21. 80	蛋白质,大脂肪族或芳香族胺基酸
Streptogrysin-B	3. 4. 21. 81	蛋白质,大脂肪族或芳香族胺基酸
黄原胶裂解酶		黄原胶
beta - D - 葡聚糖酶		黄原胶
ManA		endo - beta - 1,4 - 甘露糖
群体感应分子		
胶凝糖裂合酶		胶凝糖
Sphingase		胶凝糖和类似的聚集体

[0305] 在一些实施例中,异源核酸序列包括至少一个第二开放阅读框。在一些实施例中,第一和至少一个第二开放阅读框操作地连锁到相同的表达控制序列。在一些实施例中,第

一和至少一个第二开放阅读框操作地连锁到不同的表达控制序列。

[0306] 在一些实施例中,利用不同的异源核酸序列来使存在于重组噬菌体基因组之中的异源核酸序列的所有或部分缺失和/或将其替代。例如能够在质粒寄主细胞中执行缺失和/或替换。在一些实施例中,异源开放阅读框被改性对由起始开放阅读框编码的蛋白质或多肽的变体或者突变蛋白质进行编码。在一些实施例中,这是使用定向进化完成的。

[0307] 在一些实施例中,由异源开放阅读框编码的蛋白质或多肽被改性为减少由存在于噬菌体寄主细胞之中的蛋白酶进行的分裂。例如,计算算法能够用于识别已知的蛋白酶分裂位点,并且能够使用保存性置换来改性开放阅读框的序列以移除这些位点。替换地,定向突变用于将开放阅读框序列发展为对具有对存在于噬菌体寄主细胞之中的或者噬菌体寄主细胞的培养中的至少一个蛋白酶的增加的耐受性的产物进行编码。

[0308] 当被以噬菌体寄主细胞表达时,异源开放阅读框也能够变得更有效来增强其稳定性。例如请参见 <http://www.nature.com/nmeth/journal/v6/n5/full/nmeth0509-322.html>。

[0309] 在一些实施例中,异源开放阅读框包括对多肽标签进行编码的序列,使得开放阅读框的表达产物包括融合到由开放阅读框编码的多肽或蛋白质的标签。

### [0310] C. 噬菌体工程方法

#### 1. 噬菌体基因组的分离

任何适当的方法用于将噬菌体基因组从噬菌体培养物和/或分离的噬菌体和/或浓缩噬菌体制剂分离。例如,使用以下的基于柱的、基于 PEG 的、基于过滤的和氯化铯离心方法中的一个或多个。

#### [0311] 基于柱的:

基于电荷和/或亲和来经由色谱法进一步浓缩噬菌体培养物的高滴度的裂解物,允许大量裂解物的浓缩为非常小的量。使噬菌体经过柱且然后洗提为小量提供了用于噬菌体的 DNA 采收的材料,以用于进一步的基因组操纵。

#### [0312] 基于 PEG 的:

高浓度的聚乙二醇的存在允许活性噬菌体颗粒从较低滴度、大量噬菌体材料的沉淀。这类标准处置允许大于一百倍浓度的噬菌体裂解物,允许恢复大量 DNA 以用于进一步基因组操纵。

#### [0313] 基于过滤的:

过滤裂解物以移除大的细胞碎片,后面是 100kDa 尺寸范围中的过滤,这允许保持噬菌体颗粒,同时丢去噬菌体裂解物制剂中的水和盐。这是用于浓缩噬菌体以分离大量 DNA 以用于进一步噬菌体基因组操纵的又一技术。

#### [0314] 氯化铯离心:

通过利用 DAN 酶处置浓缩的裂解物来进一步纯化浓缩的裂解物以移除污染的寄主 DNA,后面是氯化铯梯度的离心用于纯化离开细胞碎片的噬菌体颗粒。这些高度纯化的裂解物将产生非常清洁的 DNA,用于稍后操纵。

#### [0315] DNA 的纯化

不管噬菌体颗粒的纯化方法,可选地利用蛋白酶和氯仿来处置噬菌体裂解物,以移除噬菌体涂层,后面是基于柱的 DNA 纯化或者恢复的 DNA 的乙醇沉淀。在该步骤恢复的所有

DNA 为进一步捕捉和操纵作准备,如以下略述的。

#### [0316] 噬菌体基因组 DNA 的可选排序

如果起始噬菌体基因组序列是未知的,则能够可选地使用以下处理来生成全序列。

[0317] 使用下一代排序来生成重叠群:下一代排序方法生成能够用于组装邻接碎片的噬菌体序列的大量数据。该序列不足以能够通过单程来封闭整个噬菌体基因组。a 在不同的重叠群之间存在缺口染色体。

[0318] 利用 PCR 的缺口填充:引物被设计为退火到重叠群的末端。将这些引物组合使用以对噬菌体基因组 DNA 进行 PCR。仅仅来自彼此靠近的重叠群的引物将放大产物。能够通过传统桑格排序来对这些 PCR 产物进行排序,以封闭重叠群之间的缺口染色体。

[0319] 利用桑格排序找到末端:能够直接地离开噬菌体基因组 DNA 来进行修改的桑格排序。这要求大量 DNA (1-5ug / rxn) 并且是相当昂贵的,但是假定 PCR 不能用于捕捉该最终序列时,该技术能够用于离开噬菌体的末端进行排序。这将完成噬菌体基因组序列。

[0320] 下一代排序应当生成用于这样的小的基因组的整个基因组。然而,总是观测到缺口染色体。因为噬菌体排序不是常见活动,所以这技术的必要性不是通常已知的。对于大量进来的噬菌体的可靠的排序,需要该技术。

#### [0321] 2. 噬菌体基因组的捕捉

能够在质粒中捕捉分离噬菌体基因组。适当的质粒的示例包括细菌人工染色体(BAC)和酵母人工染色体(YAC)。许多适当的技术和变体在现有技术中是已知的。在本文的一些实施例中,质粒是 YAC。示例性过程如下。

#### [0322] BAC 中的捕捉:

##### 1. 同源重组

在大肠杆菌中很好地建立 BAC 克隆,以在环状低拷贝质体中传播大 DNA。大尺寸的噬菌体 DNA 提出对使用限制片段和连接酶的经典克隆技术的挑战。为了绕过该问题,同源重组能够用于将线性 BAC 质粒与线性噬菌体 DNA 粘连。在野生型大肠杆菌中,同源重组(HR)有用地产生带有噬菌体的 BAC (噬菌体-BAC),也是很罕见的。为了支持期望用于克隆噬菌体 DNA 的水平,可选地采用  $\lambda$  红色重组系统。 $\lambda$  噬菌体蛋白质的表达 *exo*、*bet* 和 *gam* 共同地提供将 HR 频率提高到更有用的水平以用于将目标噬菌体基因组克隆到 BAC 中,以用于产生噬菌体 BAC 的方式。在 BACDNA 和噬菌体基因组的末端的 DNA 序列中的同源性提供侵占大肠杆菌同源重组机构以将噬菌体重组到产生噬菌体 BAC 的 BAC 质粒中的手段。

##### [0323] 2. 末端修复 / 绑扎 / 同源重组

接合体到线性噬菌体的末端上的绑扎提供重组到线性化 BAC 质粒中的手段。接合体通常但不必然地是 40-60bp 长并且与 BAC 质粒中的插入位点两侧的 DNA 是同源的。通过具有缺乏 3' 和 5' 核酸外切酶活性的聚合酶的 dNTP 的添加而在噬菌体基因组 DNA 的 3' 末端处对单个核苷酸突出物的添加能够用于利用互补单个核苷酸添加绑扎在接合体上。

##### [0324] 3. 末端修复 / 末端转移酶 / 同源重组

利用末端转移酶来为线性化质粒和线性噬菌体加尾部提供制作能够经由切口平移与 DNA 聚合酶 I 粘连的多核苷酸神经束的问候尾部的一种方式。有尾部的且切口平移的噬菌体和质粒被转化为大肠杆菌并且被选择用于使用质粒中的可选择标记。

[0325] 替换地,利用末端转移酶来为噬菌体 DNA 加尾部考虑被粘连到在接合体的 3' 末端

具有问候六聚物的噬菌体的接合体。利用具有 5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶的切口平移考虑通过由在重组体接合点的 DNA 聚合所引起的双链体形成将粘连到噬菌体 DNA 的接合体。大肠杆菌的转化和选择产生包括克隆的噬菌体的菌落。

#### [0326] YAC 中的捕捉

##### 1. 同源重组

对于其基因组排序是已知的抗菌素提供使用酿酒酵母中的双链断裂修复来将基因组重组到环状酵母人工染色体(YAC)中的手段。具有可选择标记复制酵母质粒首先被线性化,并且“拼接的”低聚核苷酸被设计为包含来自线性抗菌素基因组的 3' 末端的序列的 40bp 以及来自酵母质粒中的双链断裂两侧的 DNA 的 40bp。噬菌体基因组、拼接低聚核苷酸和线性化酵母质粒被共转化为酿酒酵母并且被沉积在选择性培养基上。该过程表示提供对于经由在质粒和噬菌体基因组的末端通过 DNA 重组具有形成的环的那些线性化质粒选择的方式的克隆 DNA 或代型策略。然后对于在 YACDNA 和噬菌体 DNA、仅仅在噬菌体 DNA 的克隆已经成功的情况下出现的 DNA 结构之间的接合点的存在来筛查能够在选择性培养基上生长的酵母的菌落。

#### [0327] 2. 末端修复 / 结扎 / 同源重组

接合体到线性噬菌体的末端上的绑扎提供重组到线性化酵母质粒中的手段。接合体通常但不必然地是 40-60bp 长并且与 YAC 质粒中的插入位点两侧的 DNA 是同源的。噬菌体基因组的 3' 末端处的单个核苷酸突出物是通过具有缺乏 3' 和 5' 核酸外切酶活性的聚合酶的 dNTP 的添加来引入的,且能够用于利用互补单个核苷酸添加绑扎在接合体上。具有质粒 DNA 的这些末端修复的噬菌体的转化将导致绑扎的接合体和噬菌体主链之间的同源重组,导致全长噬菌体基因组到 YAC 中的捕捉。酵母质粒包含可选择标记。能够在缺乏氨基酸的培养基上选择包含环状 YACDNA (即,其主要经由同源重组而出现)的细胞。对于噬菌体 DNA 的存在筛查这些菌落以确认噬菌体 DNA 的克隆。

#### [0328] 3. 末端修复 / 末端转移酶 / 同源重组

利用末端转移酶为线性化质粒和线性噬菌体加尾部提供制作多核苷酸神经束的互补尾部的方式(例如,利用聚腺苷为噬菌体加尾部并且利用聚胸腺嘧啶为质粒加尾部)。这些能够被共同退火,并且利用 DNA 聚合酶 I 经由切口平移被稳定,以产生同源性的较长区域。有尾部的且切开平移的噬菌体和质粒被转化为酵母并且被选择用于使用质粒中的可选择标记。

[0329] 利用末端转移酶为噬菌体 DNA 加尾部考虑将被粘连到噬菌体的接合体。这些接合体具有在接合体的 3' 末端的问候六聚物。利用具有 5' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶的切口平移考虑通过由在重组体接合点的 DNA 聚合所引起的双链体形成将粘连到噬菌体 DNA 的接合体。尽管没有共价地粘连,扩展提供退火的片段的稳定化。质粒与调整的噬菌体 DNA 的共转化和酵母中的选择考虑利用克隆的噬菌体的菌落形成。

#### [0330] 捕捉的噬菌体基因组的检测

##### 1. YAC 到噬菌斑

通过玻璃细珠溶解中断怀有包含噬菌体的 YAC 的酵母转化体,因此从转化的细胞释放 YAC。在标准噬菌斑试验中,携带噬菌体的释放的 YAC 被电穿孔到合适的噬菌体寄主细胞中并且被沉积。我们已经从携带噬菌体基因组的 YAC 的转化产生了噬菌斑。至今,已经使用

大肠杆菌噬菌体(T3 和 T7)和沙门氏菌噬菌体(Felix01)成功地完成这一点。这些结果表明能够从克隆的噬菌体基因组产生功能噬菌体。

#### [0331] 2. BAC 到噬菌斑

通过包括噬菌体基因组的 BAC 的大构造 DNA 纯化来执行 BAC 到噬菌斑。这些 DNA 被电穿孔到适当的细菌寄主菌株中。尽管它们在它们在其中繁衍的大肠杆菌上没有噬菌斑,但它们将在原点的它们的寄主(例如,杆菌)上噬菌斑。

#### [0332] 3. 基于 Phi29 / 排序读出

酵母系统在没有对寄主细胞的有害效应的情况下提供工程化和繁衍噬菌体基因组的方式。然而,携带噬菌体基因组的 YAC 典型地没有维持在每个细胞的高拷贝中。为了促进用于噬菌体和工程噬菌体的存在的试验,使用来自能够在活体外拷贝基因组的抗菌素 phi29 的 DNA 聚合酶将这些 YAC 放大。这些底质能够被用于进行转化和排序。

[0333] 携带噬菌体基因组的 BAC (噬菌体 BAC)也没有维持在每个细胞的高拷贝中。为了促进用于噬菌体和工程噬菌体的存在的试验,使用来自能够在活体外拷贝基因组的抗菌素 phi29 的 DNA 聚合酶将这些噬菌体 BAC 放大。这些底质能够被用于进行转化和排序。

#### [0334] 3. Phi29/RFLP 读出

利用 Phi29 对于噬菌体 YAC 和噬菌体 BAC 的放大考虑利用限制酶的分析以识别限制片段长度多态性(RFLP),以用于快速的全基因组分析。这些产物在琼脂糖凝胶剂上运行,并且经由溴化乙锭着色被分析。

#### [0335] 3. 将异源序列插入到噬菌体基因组中——可选柄状物插入

若干技术能够用于将异源核酸序列插入到克隆的噬菌体基因组中。方法的某些实施例如下。在方法的一些实施例中,使用通过在本文公开的方法所制作的 YAC 或者 BAC 克隆。

[0336] 噬菌体具体地是基因紧凑的,其中在它们的 DNA 中没有非活性区。发现能够容许改变位点可能是有挑战的当在工程化之前噬菌体基因组的序列不是已知的或者仅仅不完全已知的时,该情形可能是甚至更有挑战。我们已经发现,一旦标识位点,在那里产生将允许在该位点携带的基因的容易交换的处理在许多实施例中非常地有用。产生对在噬菌体基因组中在特定位置的位点进行工程化的便利允许在那里在巨大便利的情况下进一步工程化。

[0337] 在一种方法中,经由转位子跳跃的已知碎片的 DNA 的随机的递送会递送可选择标记来标识插入以及可选地新颖的限制性位点两者。转位子递送能够提供噬菌体基因组中的所有位点的随机取样。在向噬菌体基因组左的特定位置递送转位子之后,能够针对生存性(它们形成噬菌体颗粒的能力)来测试结果得到的重组噬菌体。如果重组噬菌体已经携带可选择标记,该测试同时地对于容许遗传变化的插入位点以及噬菌体和容许插入的异种核酸的尺寸的插入位点进行试验。选择被容许的任何插入事件,用于与位点一起记下和传达,以用于将来的基因改造和转基因递送。能够使用诸如以下的基因改造的任何适当的方法。

#### [0338] A. 定点突变递送

定点突变允许人们选择特定位置并且定制其以用于转基因的将来递送。该方式的某些实施例的一个优点是选择用于转基因的最优表达的位点的能力和基于生存性的可能性来预先筛查位点的能力。如上,针对生存性并且针对容许插入来对定位突变体进行测试。

#### [0339] B. 存在的位点限制 / 绑扎(即合理的递送)

在该方法中,限制酶用于使噬菌体基因组裂开,并且利用可兼容末端的柄状物然后被插入噬菌体基因组中。通过噬菌体中的独特限制性位点的数量来限制方式。

#### [0340] C. 柄状物递送的检测

上述所有用于柄状物递送的方法产生具有小于 100% 的以被递送到分子的基因组柄状物为结束的噬菌体基因组的噬菌体基因组。转位子递送和传统的克隆能够考虑可选择标记的递送,以发现携带工程分子的细胞。例如,在酵母中,能够通过缺乏尿嘧啶的情况下使细胞生长来选择 URA3 标记。在细菌中,标记能够是授予对阻止噬菌体成熟所需要的细胞机制的抗生素(例如,四环素或氯霉素)的耐受性的基因。用于柄状物插入的检测的其他方法包括诸如绿色荧光蛋白的荧光标记的使用,或者如果插入的频率足够高,易于检测 PCR 标记。我们已经成功地利用 PCR 作为用于柄状物插入的主要检测方法而完成噬菌体插入。

#### [0341] 4. 将包括开放阅读框的异源序列插入到噬菌体基因组中

##### A 重组工程(在有关的有机体中在活体内)

柄状物递送步骤将把新颖的限制性位点递送到所感兴趣的位点,图允许更进一步容易的操纵。在该位点的噬菌体的线性化将防止噬菌体复制。许多噬菌体是高度重组的,要求 DNA 的同源重组作为它们的生存期的一部分。向在所感兴趣的转基因有效载荷的两侧的切口的位点提供具有同源性的 DNA 允许这些 DNA 碎片的重组。在转化为寄主有机体之后的对于能存活的噬菌体颗粒的选择递送携带在这些位点的转基因的能存活的噬菌体。

##### [0342] B. 重组工程(活体外)

在柄状物位点将噬菌体颗粒线性化,后面是同源 DNA (到线性位点) 的重组工程,允许经由同源重组将转基因有效载荷 DNA 递送到噬菌体基因组。

##### [0343] C. 重组(在酵母中)

酵母细胞是高度重组的。对在柄状物位点切口位点噬菌体 YAC 进行线性化,并且提供与切口位点同源的 DNA,后面是共转化为酵母,这允许使用同源 DNA 作为模板来修复切口位点。这将把转基因运送到噬菌体基因组中。然后能够如以下描述的测试这些的噬菌体 YAC,用于插入到在柄状物位点的适当的转基因有效载荷。

##### [0344] D. 切割 / 粘贴

传统的克隆技术可用于递送在柄状物位点的转基因有效载荷。被递送到柄状物位点的独特的限制性位点能够用于线性化噬菌体。能够通过绑扎到这些线性化位点来递送有效载荷,并且能够通过转化为所感兴趣的寄主并且选择能存活的噬菌体颗粒来选择重组体。

##### [0345] E. 插入物的检测

大多数情况下,对于运送异源开放阅读框的噬菌体来富集能存活的噬菌体子代。为了验证这一点,能够通过插入位点的 PCR 或通过由开放阅读框编码的产物的表型表达来试验噬菌体。也能够使用酶活性测定。运送有效载荷酶的任何噬菌体应当表达高水平的酶。

##### [0346] F. 同时地递送选择性标记和转基因

在一些情况下,与可选择标记同时递送转基因来作为化合物基因盒的一部分。这样的基因盒包含所感兴趣的转基因和可选择标记两者,并且两侧是到噬菌体染色体的同源性。将该分子转化为包含噬菌体 YAC 的酵母细胞允许具有噬菌体 DNA 的同源重组。能够通过用于可选择标记的合适的培养基上生长来选择这些重组体分子。重组体将包含转基因和可选择标记两者。



### [0347] 5. 从工程 DNA 产生噬菌体颗粒

#### 直接转化

我们已经发现,我们的工程噬菌体能够如同噬菌体 YACDNA 被直接地转化为合适的寄主细胞。这些噬菌体 YAC 复制、切除并且打包到能够反复感染的噬菌体颗粒中。

### [0348] 噬菌体 DNA 的放出,后面是转化

不是所有噬菌体将容许在末端具有外来 DNA。为了缓解这一点,为了移除外源 DNA 而进行的质粒的线性化能够用于改善转化效率。为此,克隆质粒能够被设计为允许质粒的平面切割以放出概括原始的噬菌体基因组的噬菌体 DNA。通过利用噬菌体提出物来培育该 DNA 的对末端的更进一步保护例如允许末端的保护以提高转化效率。

### [0349] 转移介导转化

往往通过在细胞的表面上受体存在还是不存在来确定噬菌体寄主范围。使用基本上相同的复制、转录和转译机构的密切相关的有机体可以实际地对不同的噬菌体交叉耐受。另外,一些细菌寄主与其他相比更容易转化。考虑到这一点,从基因方面易处理的、相关的菌株能够用于制作噬菌体爆发菌落。噬菌体基因组 DNA 被转化为爆发菌落菌株,经过一段时间以后被恢复,并且然后噬菌体裂解物遭受灵敏寄主,用于将裂解物繁衍到较高的滴度裂解物中。转移转化允许从否则不可转化的寄主恢复噬菌体。

### [0350] 6. 选择具有优化属性的噬菌体

#### 表型筛查

能够对重组噬菌体和重组噬菌体的库进行筛查以识别所感兴趣的表型。在一些实施例中,省略示例 1-5 的方法中的一些筛查步骤,并且直接地使用表型筛查来作为用于所感兴趣的重组噬菌体的试验。例如,筛查生物膜移除或者细菌检测。

### [0351] 蛋白质生产筛查

在一些实施例中,用于存在于重组噬菌体之中的异源核酸序列的表达产物的酶活性测定给出最优噬菌体属性的很好的指示。例如,具有高水平的荧光素酶表达或者高水平的木聚糖酶表达的噬菌体从生物膜基质中移除木聚糖。

### [0352] 最可行的噬菌体的选择

在一些实施例中,竞争实验识别携带所感兴趣的属性(可选地包括所选择的生长特性)的噬菌体。在某些实施例中使用将噬菌体共同混合以及在混合感染的末端恢复支配的噬菌体以识别携带所感兴趣的属性的组合的噬菌体。

### [0353] D. 选择将异源核酸序列插入到噬菌体基因组中的位点

被插入噬菌体基因组中的异源开放阅读框的表达将受许多因素的影响,包括:在噬菌体生存期中表达的定时、启动子(转录)强度、核糖体结合位点(转译)强度、mRNA 稳定性、蛋白质降解速率、密码子使用,及其他。算法能够用于识别和预测具有期望表达属性的噬菌体基因组内的位点。

[0354] 经验算法基于针对时间特性和绝对表达水平中的至少一个两者的对自然噬菌体蛋白质的蛋白质组学的分析。例如,噬菌体蛋白质能够被加标签,并且能够随着时间的过去和/或在不同的条件下监测表达水平。识别展现期望的表达性状的噬菌体蛋白质。在一些实施例中,在相对高的水平表达噬菌体蛋白质。在一些实施例中,在相对长期的噬菌体生存期表达噬菌体蛋白质。在一些实施例中,噬菌体蛋白质是诸如衣壳成分的结构蛋白质。一

且识别展现期望的表达性状的噬菌体蛋白质,包括开放阅读框的异源核酸序列被插入噬菌体基因组中以替代对所识别的蛋白质进行编码的开放阅读框,或者将开放阅读框放置在展现期望的表达性状的蛋白质的开放阅读框的下游的异源核酸序列内。

[0355] 计算算法用于识别噬菌体基因组序列内的噬菌体启动子。在拉维妮等的 *Bioinformatics* (生物信息学) 的卷 20、号 5、页 629-635 (2004) 中提供一种这样的算法。对公知的启动子展现序列同源性的启动子是特别有用的,这是因为,可以预料,这样的启动子很可能展现期望的功能特性。能够使用可在 <https://salis.psu.edu/software/> (据此通过引用合并于此) 得到的 RBS 计算器来估计内源噬菌体基因组序列的核糖体结合位点 (RBS) 强度。被预测具有高效率的 RBS 序列是特别有用的。

[0356] 也能够使用 DNA 序列同源性来识别已知在其他良好表现的噬菌体中在高水平被表达的开放阅读框(例如, T7、T3、T4 和  $\lambda$  噬菌体的开放阅读框)。在一些实施例中,异源核酸序列替代这样的开放阅读框或者被放置在这样的开放阅读框的下游。DNA 序列同源性的缺乏能够用于识别非必要的并且很可能容许插入的开放阅读框。

[0357] 许多噬菌体具有类似的基因组结构。基于这些基因组结构,主体噬菌体和良好表现的噬菌体之间的序列比较用于识别用于将异源核酸序列插入到主体噬菌体中的位置。例如,在像 T7 的噬菌体中存在早期、中期和晚期基因,其对应于其中它们被表达并且与基因组中的位置相关联的时间序列。因此,主体噬菌体内的同源位置能够被识别,并且异源核酸序列被插入所识别的位置中。

[0358] 利用关于除序列以外的噬菌体的少量其他信息,微阵列实验能够识别在表达的早期、中期和晚期阶段哪些基因被开启。这是得到新颖的噬菌体的详细表达分布图的快速方法。

[0359] 在本文公开的方法和质粒也使得用实验方法对到噬菌体基因组中的若干不同的插入的并行测试是可行的。在一些实施例中,测试多个插入位点以凭经验识别来自哪些异源开放阅读框的插入位点被利用期望的特性来表达。在一些实施例中,插入位点是随机的。在一些实施例中,插入位点是在预先确定的位置。在一些实施例中,所测试的插入位点是至少一个随机插入位点和至少一个预先确定的插入位点的组合。

[0360] 在一些实施例中,包括多个插入的异源核酸序列的噬菌体位于噬菌体基因组内的不同的位点。在一些实施例中,插入的序列是相同的。在一些实施例中,多个插入的异源序列包括至少两个不同的异源序列。在一些实施例中,插入的异源序列包括在噬菌体生存期的不同的阶段以不同的水平表达的开放阅读框。

[0361] 噬菌体溶解是用于表达被插入噬菌体基因组中的异源开放阅读框的竞争因素。如果噬菌体杀死太早的寄主细胞,则开放阅读框表达可能没有达到期望水平。能够改变噬菌体生存期以增强异源开放阅读框表达。例如,能够通过改变溶解蛋白质的核糖体绑定序列来减小溶解蛋白质(诸如细胞溶解酶和穿孔素)的表达,因此扩展噬菌体生存期并且延迟溶解。在一些实施例中,该处理用于增加在噬菌体生存期期间的总异源开放阅读框表达和在噬菌体生存期期间的最大异源开放阅读框表达中的至少一个。

[0362] E. 制作工程噬菌体的集合以及工程噬菌体的集合的方法

在本文公开的方法虑及重组噬菌体的多样集合的高通量生成。该集合能够被设计为包括多个不同的起始噬菌体基因组、多个插入的异源核酸序列以及异源核酸序列到起始噬菌

体基因组中的多个不同的插入位点中的至少一个。

[0363] 在一个方面中,提供了一种制作多个重组噬菌体基因组的方法。该方法能够包括:提供每个包括起始噬菌体基因组的多个重组体质粒;将至少一个异源核酸序列插入到多个质粒中的每一个的起始噬菌体基因组中以提供多个重组体质粒;以及,在质粒寄主细胞中繁衍多个重组体质粒。质粒寄主细胞能够是噬菌体寄主细胞或者能够是不是噬菌体寄主细胞的细胞。

[0364] 在该方法的至少一些实施例中,通过包括以下的方法来制作每个包括起始噬菌体基因组的多个重组体质粒:在允许将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将至少一个分离的起始噬菌体基因组和至少一个质粒共转化为多个噬菌体质粒寄主细胞;以及选择包括作为将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中的结果的多个重组体质粒的噬菌体质粒寄主细胞。

[0365] 在该方法的至少一些实施例中,通过包括以下的方法来制作每个包括起始噬菌体基因组的多个重组体质粒:在允许将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将至少一个分离的起始噬菌体基因组转化为包括至少一个质粒的多个质粒寄主细胞;以及选择包括作为将至少一个起始噬菌体基因组插入到至少一个质粒中的结果的多个重组体质粒的质粒寄主细胞。

[0366] 在另一个方面中,提供了一种制作多个重组噬菌体基因组的替换的方法。在一些实施例中,该方法包括:提供至少一个起始噬菌体基因组;将至少一个异源核酸序列插入到至少一个起始噬菌体基因组中的每一个中以提供多个重组噬菌体基因组;捕捉至少一个质粒中的多个重组噬菌体基因组以提供包括把异源核酸序列包括在内的多个重组噬菌体基因组的多个重组体质粒;以及在质粒寄主细胞中繁衍包括把至少一个异源核酸序列包括在内的重组噬菌体基因组的多个重组体质粒,其中,质粒寄主细胞不是噬菌体寄主细胞。

[0367] 在该方法的一些实施例中,在质粒中捕捉之前选择把至少一个异源核酸序列包括在内的多个重组噬菌体基因组。

[0368] 在一些实施例中,通过包括以下的方法来在至少一个质粒中捕捉多个重组噬菌体基因组:分离多个重组噬菌体基因组;在允许将多个重组噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将分离的多个重组噬菌体基因组和至少一个质粒共转化为多个质粒寄主细胞;以及选择包括作为将至少一个重组噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的多个质粒寄主细胞。

[0369] 在一些实施例中,通过包括以下的方法来在至少一个质粒中捕捉多个重组噬菌体基因组:分离多个重组噬菌体基因组;在允许将多个重组噬菌体基因组插入到至少一个质粒中以提供多个重组体质粒的条件下,将分离的多个重组噬菌体基因组转化为每个包括至少一个质粒的多个质粒寄主细胞;以及选择包括作为将多个重组噬菌体基因组插入到质粒中的结果的重组体质粒的多个质粒寄主细胞。

[0370] 在一些实施例中,方法进一步包括将多个重组体质粒与所选择的质粒寄主细胞分离。

[0371] 方法能够用于制作每个包括重组噬菌体基因组的多个噬菌体。

[0372] 在一些实施例中,多个重组体质粒包括多个不同的异源核酸序列。异源核酸序列能够以一个或多个方式不同。例如,异源核酸序列能够包括把不同的产物包括在内的不同

的开放阅读框。替换地或另外地,异源核酸序列能够包括不同的表达控制序列,其在噬菌体感染生存期期间以不同的方式——诸如以不同的最大程度的表达或者以不同的时间分布图来引导开放阅读框的表达。例如,表达控制序列能够在启动子或者核糖体结合位点方面不同。异源核酸序列也能够在长度或核苷酸组成方面不同。在一些实施例中,多个异源插入序列由每个与每个其他序列的差别是在核苷酸水平处的至少 1%、至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45% 或者至少 50% 序列组成。在一些实施例中,多个异源插入序列由包括开放阅读框的序列组成,并且每个开放阅读框与每个其他的开放阅读框序列的差别是在核苷酸水平处的至少 1%、至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45% 或者至少 50%。在一些实施例中,多个异源插入序列由包括开放阅读框的序列组成,并且每个开放阅读框对每个与每个其他的开放阅读框编码产物的差别是在氨基酸水平处的至少 1%、至少 2%、至少 3%、至少 4%、至少 5%、至少 6%、至少 7%、至少 8%、至少 9%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45% 或者至少 50% 的产物进行编码。

[0373] 在一些实施例中,多个重组体质粒包括多个不同的异源核酸序列,并且至少 5 个不同的异源核酸序列存在于多个重组体质粒中。在一些实施例中,至少 10、至少 15、至少 20、至少 25、至少 30、至少 35、至少 40、至少 45、至少 50、至少 60、至少 70、至少 75、至少 80、至少 85、至少 90、至少 95、至少 100、至少 200、至少 300、至少 400 或者至少 500 个不同的异源核酸序列存在于多个重组噬菌体质粒中。

[0374] 在一些实施例中,多个重组体质粒包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少两种类型的重组噬菌体基因组。在一些实施例中,存在于多个质粒之中的重组噬菌体基因组基于相同的起始噬菌体基因组。因此,在这样的实施例中,异源序列被插入在相同的噬菌体基因组中的不同的位点。在其他的实施例中,存在于多个质粒之中的重组噬菌体基因组基于至少两个不同的起始噬菌体基因组。

[0375] 在一些实施例中,多个重组体质粒包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少 5 种类型的重组噬菌体基因组。在一些实施例中,多个重组噬菌体基因组包括其中异源核酸序列被插入在不同的位置的至少 10、至少 15、至少 20、至少 25、至少 30、至少 35、至少 40、至少 45、至少 50、至少 60、至少 70、至少 75、至少 80、至少 85、至少 90、至少 95、至少 100、至少 200、至少 300、至少 400 或者至少 500 种类型的重组噬菌体基因组。

[0376] 在一些实施例中,利用第二异源核酸序列来替代多个质粒中的每一个中的异源核酸序列的至少一部分,其中,第二异源核酸序列包括与第一异源核酸序列相比的插入、缺失和置换中的至少一个,因此提供每个包括不同的第二异源序列的多个不同的质粒。在一些实施例中,多个重组体质粒包括多个不同的第二异源核酸序列,并且至少 5 个不同的第二异源核酸序列存在于多个重组体质粒中。在一些实施例中,至少 10、至少 15、至少 20、至少 25、至少 30、至少 35、至少 40、至少 45、至少 50、至少 60、至少 70、至少 75、至少 80、至少 85、至少 90、至少 95、至少 100、至少 200、至少 300、至少 400 或者至少 500 个不同的第二异源核酸序列存在于多个重组噬菌体质粒中。

[0377] 还提供了重组噬菌体基因组和 / 或包括重组基因组的重组噬菌体的集合。集合包

括重组噬菌体基因组以及具有包括至少一个起始噬菌体基因组、至少一个异源插入序列和在至少一个起始基因组中插入至少一个异源插入序列的至少一个位点的重组基因组的噬菌体。在一些实施例中,集合包括至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 种不同类型的起始噬菌体基因组。在一些实施例中,集合包括至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 种不同类型的异源插入序列。在一些实施例中,集合包括至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 个在至少一个起始基因组中插入至少一个异源插入序列的不同的位点。因此,在一些实施例中,在相同的起始噬菌体基因组中在至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 个不同的位点插入单个异源插入序列。在其他的实施例中,多于一个异源插入序列存在于集合中和 / 或多于一个起始噬菌体基因组存在,并且存在至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500 或者 1000 个将异源核酸序列插入到存在于集合之中的噬菌体基因组中的不同的位点。

[0378] 在一些实施例中,重组噬菌体基因组的集合没有被封装到噬菌体颗粒中。例如,在一些实施例中,重组噬菌体基因组的集合存在于诸如 YAC 的质粒中。在一些实施例中,以分离或者纯化形式来存储质粒。在其他的实施例中,质粒存在于能够是诸如冷冻甘油存料或者在固体或者液体培养基上生长的任何形式的诸如酵母的质粒寄主细胞中。

[0379] 在一些实施例中,重组噬菌体基因组的集合被封装到噬菌体颗粒中。

[0380] 在一些实施例中,集合的所有或者基本上所有的成员共同存在于诸如包含噬菌体颗粒的液态培养物或者包含不同的酵母细胞的库的液态培养物之类的混合物中。在其他的实施例中,将集合的所有或基本上所有的成员与彼此分离地存储,诸如存储在不同的培养物中或者作为不同的冷冻甘油库存料来存储。

[0381] 在一些实施例中,对噬菌体或噬菌体染色体的集合进行筛查以识别共有有一个或多个特征的集合的子集。例如,如果集合包括来自不同的起始噬菌体的噬菌体基因组,则能够对集合进行筛查以识别能够感染特定类型的细菌或者细菌的类型的组合的集合的成员。替换地,能够对集合进行筛查以识别表达高于某一水平的异源开放阅读框产物的集合的成员。

[0382] 示例

示例 1 :用于克隆和转基因噬菌体的 YAC 系统

#### 1. 噬菌体捕捉 :

以下面的方式克隆和操纵 T3。使用 DH10B 作为寄主来使 T3 生长,在路尼亚肉汤(LB)+2mM 氯化钙中生长。经由在 4° C 整夜地利用 10% 聚乙二醇 -8000 的培育来浓缩噬菌体裂解物,后面是离心。沉淀物在 SM 缓冲剂(Maniatis)中是再悬浮的。使用诺根噬菌体 DNA 套件(Cat# 46700 <http://www.norgenbiotek.com/display-product.php?ID=383>)从浓缩的 T3 裂解物准备 DNA。T3 的基因组序列(NCBI 登记入册 #\_NC\_003298)用于设计寡核苷酸来将 T3 捕捉到 pYESIL 质粒中(在 [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com) 可得到的序列)。

[0383] 寡核苷酸被转化为感受态的 MaV203。在没有色氨酸的情况下转化的细胞被沉积在合成的完全培养基上,为 pYESIL 上的 TRP 选择。通过 PCR 筛查在合成的完全尿嘧啶培养基上生长的菌落,以示出成功的捕捉。

[0384] 2. YAC 到噬菌斑 :

准备玻璃珠裂解物(试剂盒高阶遗传组装套件),并且玻璃珠裂解物被电穿孔到 TOP 10 大肠杆菌中。转化与 LB+2 mM 氯化钙顶层琼脂混合,并且沉积在 LB+2 mM 氯化钙琼脂平板上。整夜的培育披露与捕捉的噬菌体相对应的噬菌斑。捕捉的噬菌体典型地产出酶转化  $1 \times 10^2$  至  $1 \times 10^4$  噬菌斑。

[0385] 3. 荧光素酶插入:

进行下面的插入:T3::0.7 luc, T3::0.7DRluc, T3::4.3DRluc 和 T3::0.7IceuILuc。在噬菌体 T3 中构建若干遗传构造,包含荧光虫荧光素酶。这些与基因盒一起构建,包含完整的荧光素酶,后面是 URA3 并且然后是小片段的荧光素酶。这些基因盒作为三个 PCR 产物被放大,一个包含荧光素酶和对噬菌体中的位点的侧翼、第二包含具有对其他两个 PCR 产物的侧翼同源性的 URA3 产物,并且第三包含荧光素酶的片段和对噬菌体染色体手的不同的位点的同源性。

[0386] 在所有情况下(0.7 和 4.3 基因位点,产生 3PCR 产物,并且 3PCR 产物如上所述被共转化为包含 T3-YAC 的酵母。通过缺乏尿嘧啶的情况下使细胞生长来选择重组。对于基因盒的存在通过 PCR 来筛查在缺乏尿嘧啶的情况下生长的菌落。通过 PCR 是阳性的菌落经受 YAC 到噬菌斑的技术(如上所述)以恢复能存活的噬菌体。对于基因盒的存在通过 PCR 来随后筛查这些噬菌体。

[0387] 以稍有不同的方式产生了 T7 luc。通过使用两个双链体寡核苷酸转化 T7 dspB 的基因组 DNA、pYESIL 来在 pYESIL 中捕捉了 T7 dspB (Proceedings of the National Academy of Sciences(美国国家科学院院刊)2007 年七月 3 日,卷 104、编号 27、页 11197 - 11202 的 T. K. Lu 和 J. J. 柯林斯的“Dispersing Biofilms with Engineered Enzymatic Bacteriophage (分散的生物膜与工程酶的噬菌体)”)。

[0388] 如上所述,这些被共转化为酵母。T7 噬菌体被示出能够 YAC 到噬菌斑,如上所述。由玻璃珠裂解物来纯化 T7-dspB YAC,并且利用 EcoRI 和 HindIII 来切开 T7-dspB YAC。通过 PCR 来放大荧光素酶。

[0389] 还产生了双链体寡核苷酸来修复 HindIII 切 YAC 主链。切噬菌体 YAC、荧光素酶 PCR 产物和双链体修复寡核苷酸被共转化为酵母,并且在缺乏色氨酸的培养基上被选择,导致单个 TRP+ 菌落。工程噬菌体 YAC 被 PCR 确认并且经由如上所述的 YAC 到噬菌斑技术被转换为噬菌体颗粒。

[0390] 4. 噬菌体表达:

大肠杆菌细胞的整夜培养物被稀释 1/100 并且成长为 LB + 1 mM 氯化钙中的对数生长中期(大致 2 个半小时)。细胞如所示被稀释并且以总共 100  $\mu$ l 利用大量过剩的噬菌体被感染(每个感染  $1 \times 10^7$  个噬菌体)。允许感染继续进行,在 37 度 C 不震动。在 90 分钟之后,100  $\mu$ l 的 Promega 稳定 Glo 荧光素酶检测试剂被添加到 20  $\mu$ L 的感染,并且在 Promega GloMax 20 / 20 上立即读取感染。不同的工程噬菌体示出表达水平的一些变体,但是 T7::Luc、T3::0.7Luc、T3::DRLuc、T3::4.3DRLuc 和 T3::0.7IceuILuc 都表达可检测水平的荧光素酶。

[0391] 示例 2:检测具有工程噬菌体的细菌

在该示例中,相对低数量的大肠杆菌 NEB-10  $\beta$  细胞与  $3 \times 10^8$  PFU/mL 的工程抗菌素 T3::0.7 luc 混合,并且通过移除 20  $\mu$ L 的溶解产物并且将其与 100  $\mu$ L 的包含萤光素的检

测试剂组合来每十分钟测量荧光素酶产生。(图 11。)一式三份地准备三个不同浓度的细胞。使用一式三份匹配的样本的 10 倍连续稀释(从  $10^0$  到  $10^{-8}$  的 10 倍稀释)在实验之后确定存在于每个样本中的细菌的数量。使用该方法,测试样本被确定为具有大肠杆菌的浓度  $6 (\pm 4.6)$ 、 $60 (\pm 45.8)$  和  $600 \pm (458.0)$  细胞。对于两个较高的浓度(60 和 600),噬菌体的添加后的 40 分钟观察到样本中的最大光产生。然而,在 20 分钟以及也在 30 分钟高于检测的下限测量可检测信号。对于最低的浓度(6 细胞),噬菌体添加后的 30 分钟产生了最大信号。

[0392] 使用 Promega 20/20 单管光度计和 Promega 荧光素酶试验套件试剂来执行检测。总之,包含  $20 \mu\text{L}$  的噬菌体传染包含管被放置在光度计内部,并且  $100 \mu\text{L}$  的荧光素酶试验底质(包含 ATP、荧光素和稳定剂的专有的溶液)被添加为总共  $120 \mu\text{L}$ 。利用 10s 整合来获取光产生。

[0393] 通过测量包含与合适浓度的底质(荧光素)的混合的噬菌体( $3 \times 10^8$  PFU/mL)的培养基(LB)来确定检测的下限(113.7 RLU)。下限被定在 10 样本(98.6 RLU)加 3 倍标准差( $SD = 5.06$  RLU)的平均。

[0394] 示例 3 :检测具有工程噬菌体的细菌

设计和进行该实验来确定在 T3::0.7 luc / 大肠杆菌配对中的检测的最小时间。

[0395] 大肠杆菌的对数生长期培养物 ( $2.5 \times 10^7$  CFU/mL) 被  $3 \times 10^8$  PFU/mL 的 T3::0.7 luc 感染,并且在微管中被分成  $20 \mu\text{L}$  等份。每十分钟,通过添加  $100 \mu\text{L}$  的 Promega 荧光素酶检测试剂,通过测量来自三个等份的光产生,获得三倍的读取。在图 12 中示出了结果。

[0396] 我们发现在第一时间我们在感染后 10 分钟测量培养物,已经存在大量信号用于检测( $51,393 \pm 28,152$  RLU)。如在先前的实验中,使生成的信号最大的时间是 40 分钟。

[0397] 从 10 分钟时间点向后推断,这些数据暗示在 5 分钟的检测。

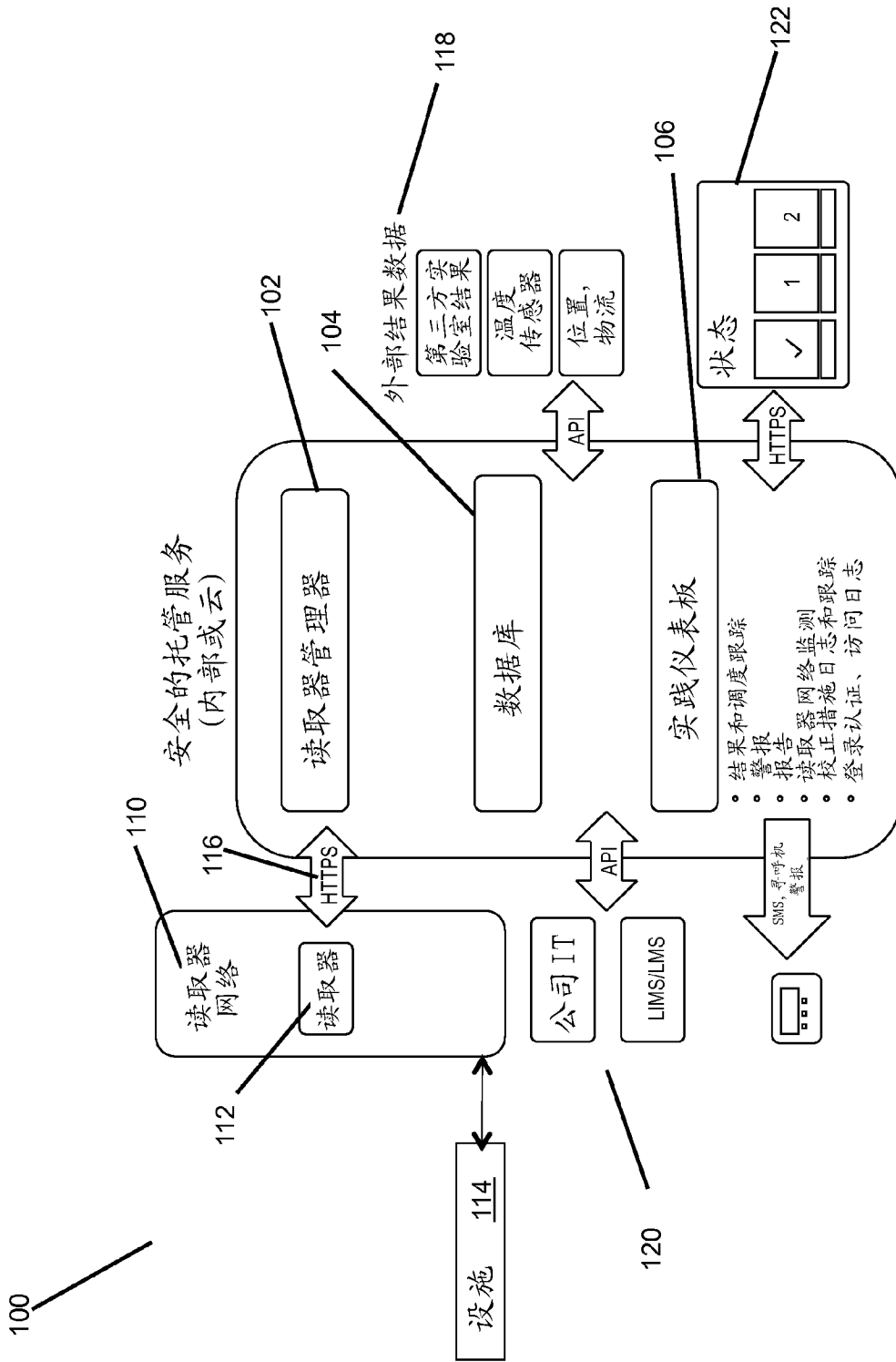


图 1



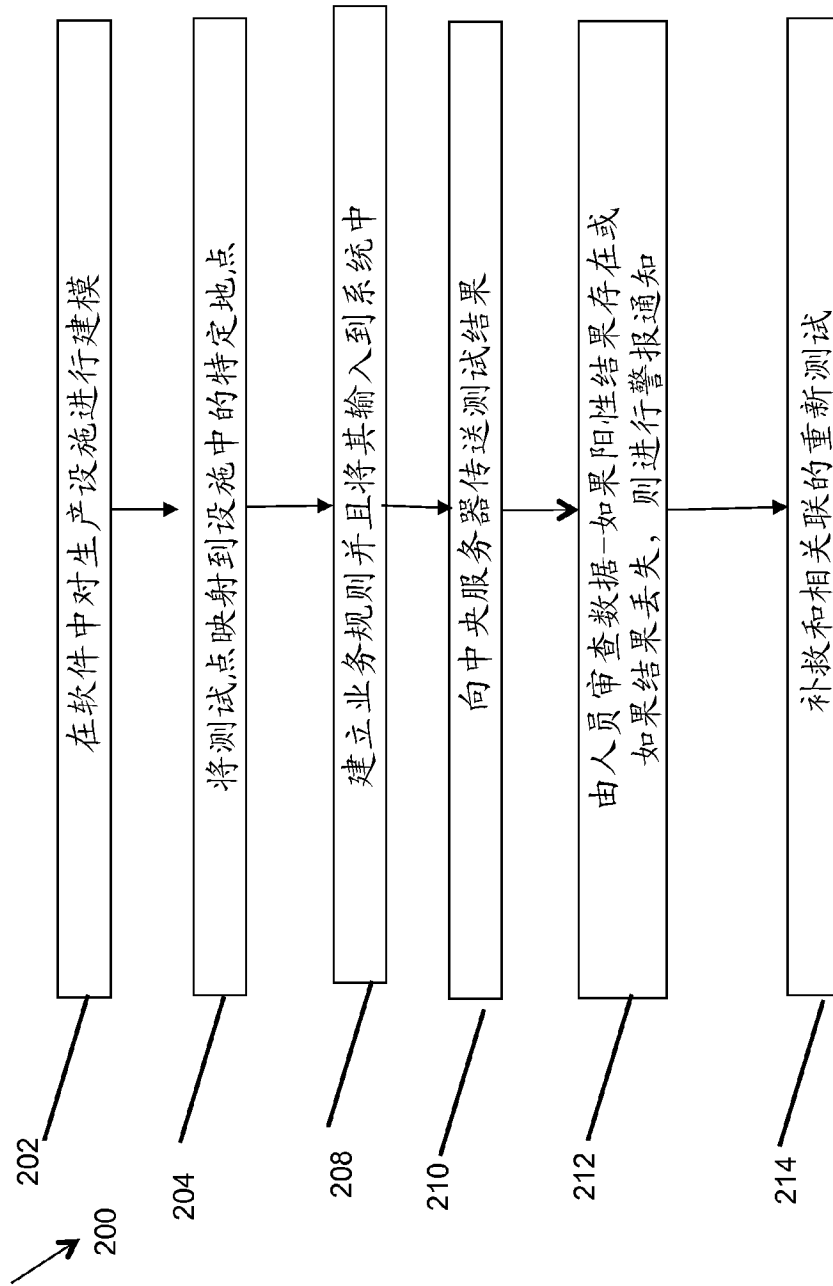


图 2

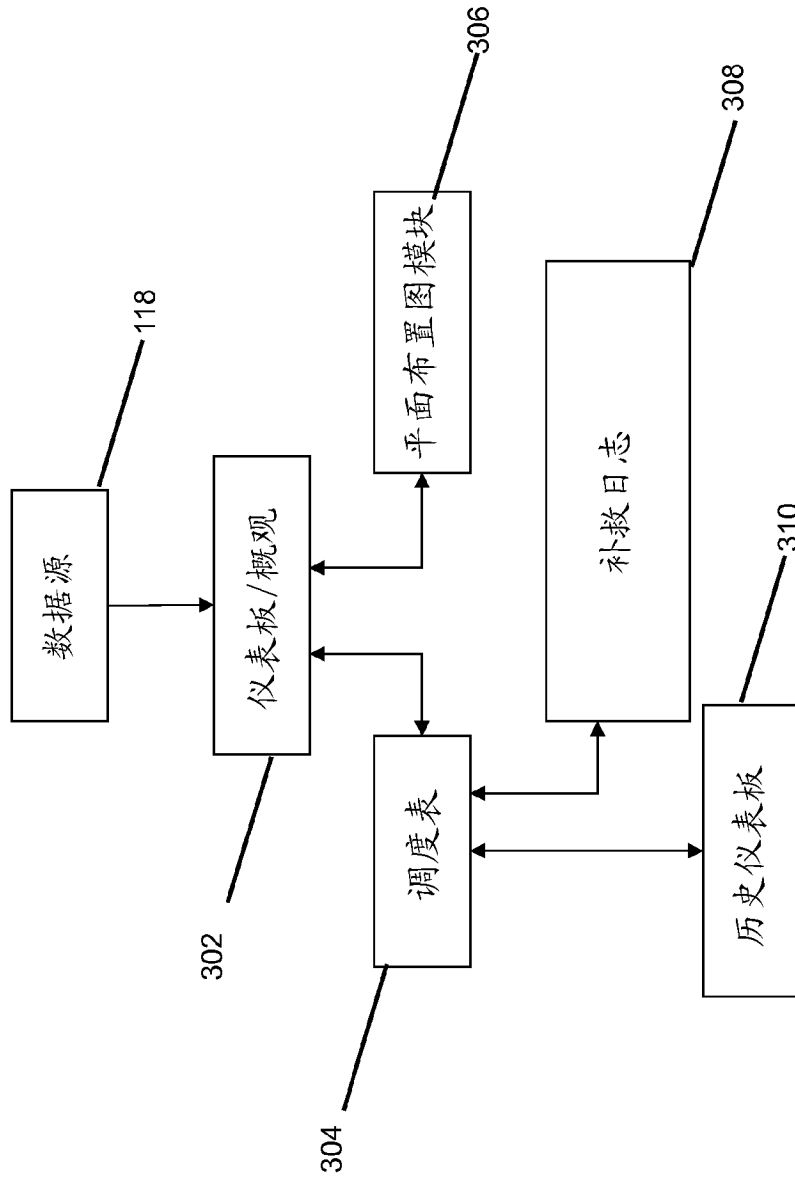


图 3

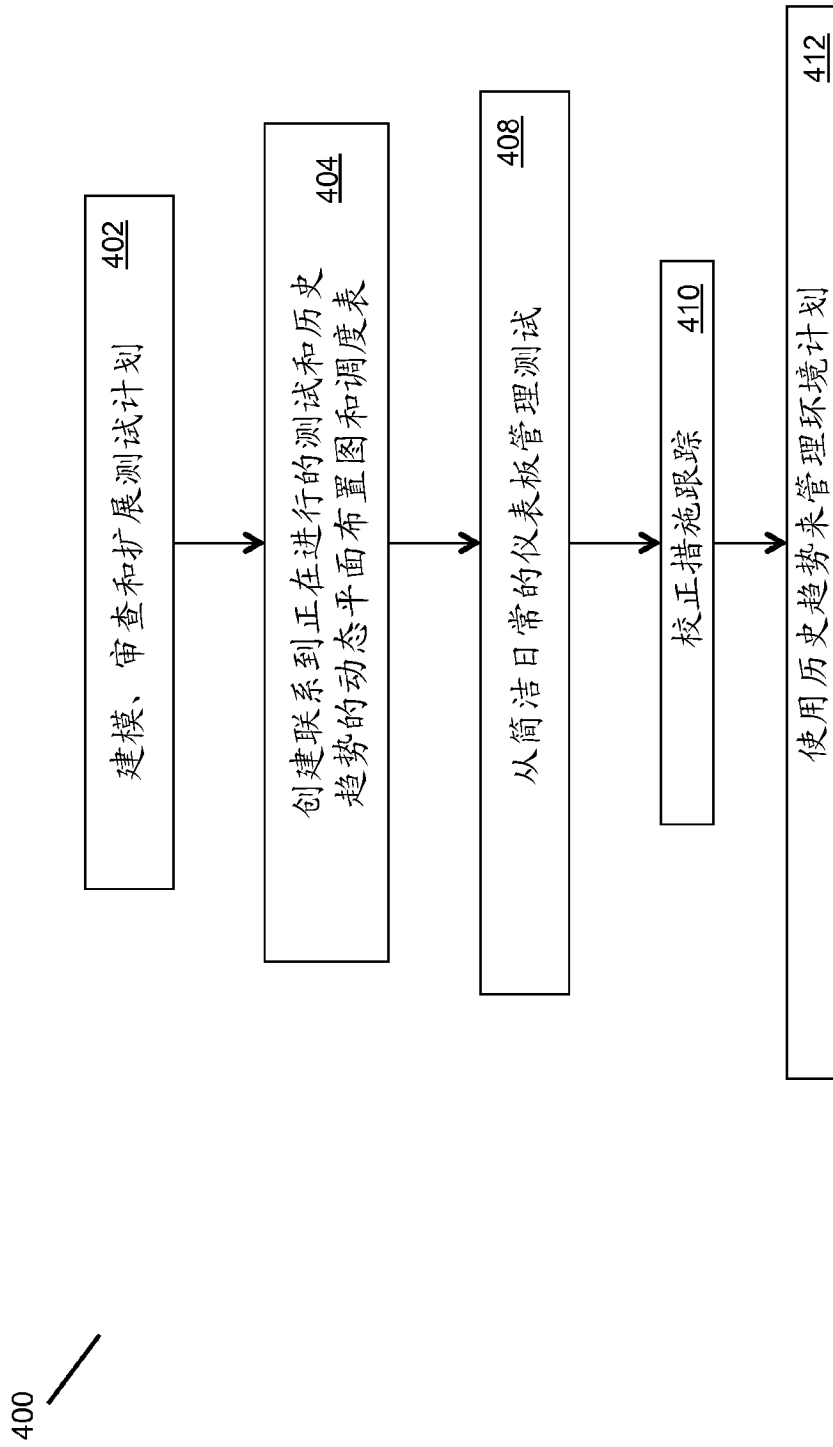


图 4

仪表盘 平面布置图 补救 报告 调度表

状态 日期/时间

日常测试 90%完成

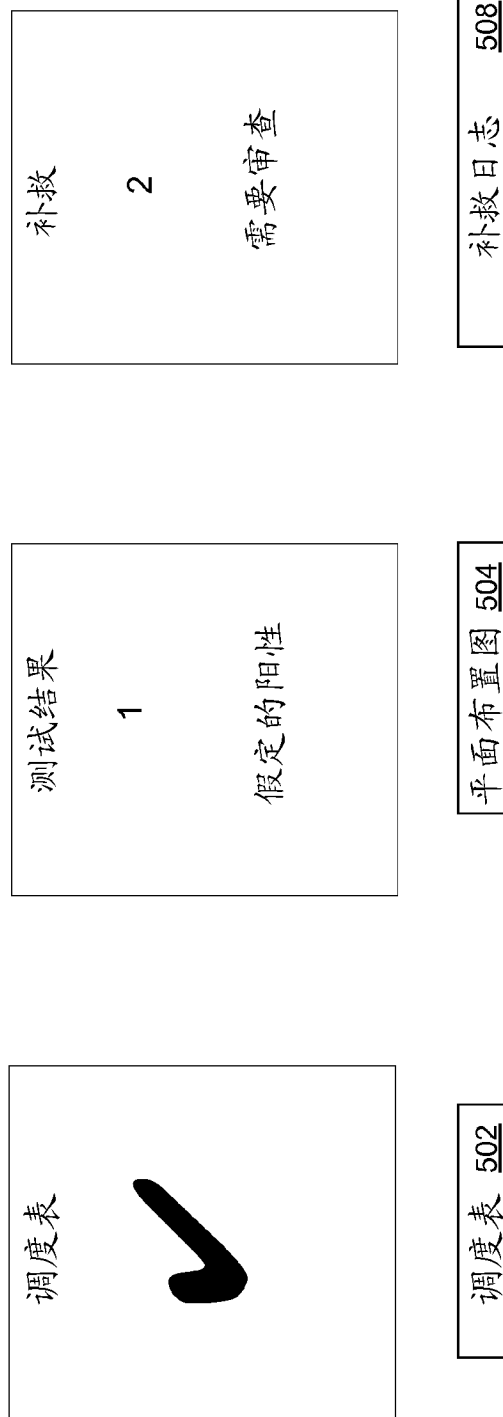


图 5

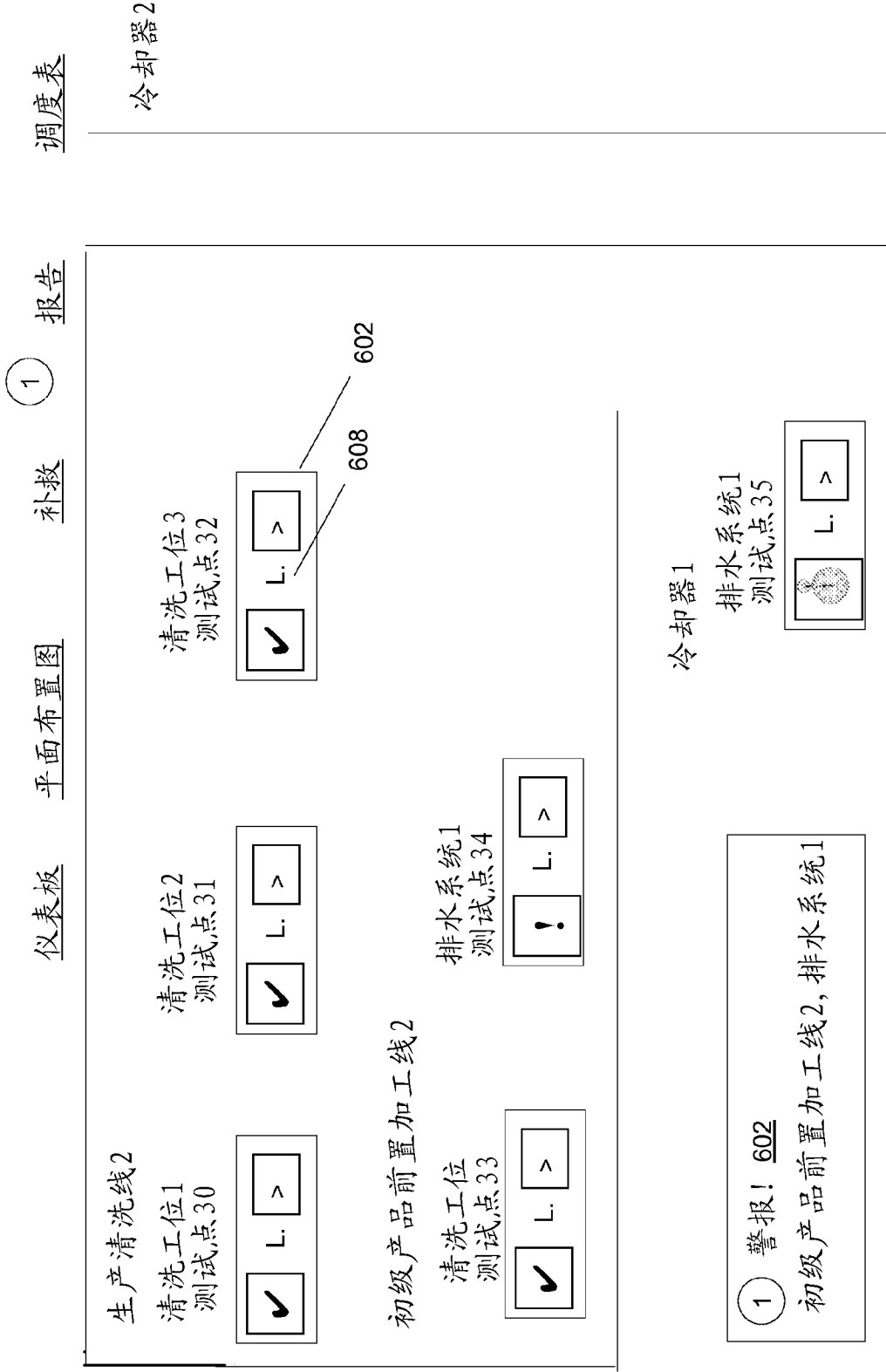


图 6

仪表板 平面布置图 ① 补救 报告 调度表



测试的 M-TH

房间: 初级产品前置加工线2  
位置: 排水系统1  
测试点 34 详情

区: 3      开始: 日期

98 总的 拭子	94% 阴性	6% 阳性
----------------	-----------	----------

测试结果	测试类型	日期
假定的阳性	李氏菌属	今天
假定的阳性	李氏菌属	先前的日期

报告

补救历史

图 7

仪表板    平面布置图    补救    报告    调度表

开放的补救

补救

位置    测试点    日期    活动    状态    REF. SOP    用户    措施

初级产品前置加工线2	排水系统1; 34	今天	清洁	开放	#####	姓名	完成
------------	-----------	----	----	----	-------	----	----

供审查

位置

测试点    日期    活动    状态    REF. SOP    用户    措施

冷却器1	88	先前的日期	清洁完成	已审查	#####	姓名	已审查
------	----	-------	------	-----	-------	----	-----

历史

位置

测试点    日期    活动    状态    REF. SOP    用户    措施

初级产品前置加工线2	45	先前的日期	检查	关闭	#####	姓名	✓
------------	----	-------	----	----	-------	----	---

完整的历史

图 8

仪表板 平面布置图 补救 报告 调度表

1	2	3
4	5	6
7	8	9
10	11	12
13	14	15
16	17	18
19	20	21
22	23	24
25	26	27
28		

初级产品前置加工线1						
测试点	类型	收集时间	应得结果	拥有者	注释	
清洗工位1	李氏杆菌种类	9:30:00	12:30:00	姓名	拭子喷嘴头	
切割工位1	沙门氏菌样本	9:30:00	12:30:00	姓名	拭子主切割表面	
排水系统1	李氏杆菌种类	9:30:00	12:30:00	姓名	切割工位下的排水系统	
排水系统2	李氏杆菌种类	9:30:00	11:00:00	姓名	接近出口的排水系统	
冷却器1						
前置加工线1						
生产清洗线1						

编辑调度表  
 添加新的测试点  
 修改调度表

图 9a



仪表板 平面布置图 补救 报告 调度表

1 2 3  
4 5 6 7 8 9  
10 11 12 13 14 15  
16 17 18 19 20 21  
22 23 24 25 26 27  
28

编辑调度表  
添加新的测试点  
修改调度表

星期	测试点	位置	类型	收集时间	拥有者	取样注解
星期一	41	主要的走道	L. 种类	12:30:00	姓名	防滑垫前方的取样区域
	42	冷却单元1	L. 种类	12:30:00	姓名	寻找水坑
	43	冷却单元2	L. 种类	12:30:00	姓名	对冷却器下方的油滴盘取样
	44	下面的排水系统(冷却单元)	L. 种类	11:00:00	姓名	围绕炉栅取样, 寻找静水
星期二						
星期三						
星期四						

图 9b

仪表板 平面布置图 补救 报告 调度表

区域	测试点	ID	区	开始	%阴性测试	月1, 年2	月2, 年2	月12, 年1	月11, 年1
生产清洗线2	清洗工位1	38	2	日期	98%	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓	✓✓X ✓	✓✓✓ ✓
切割工位线2	清洗工位	39	3	日期	95%	✓✓X ✓	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓	✓✓X ✓
冷却器1	排水系统	40	3	日期	97%	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓
前置加工线1	包装工位	41	2	日期	99%	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓	✓✓✓ ✓

报告

搜索

导出

报告

图 10

大肠杆菌时间-浓度曲线

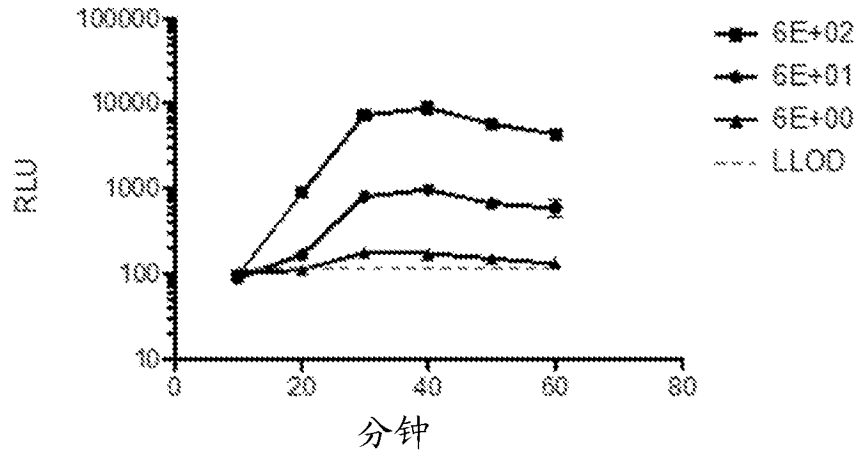


图 11

大肠杆菌最小检测时间

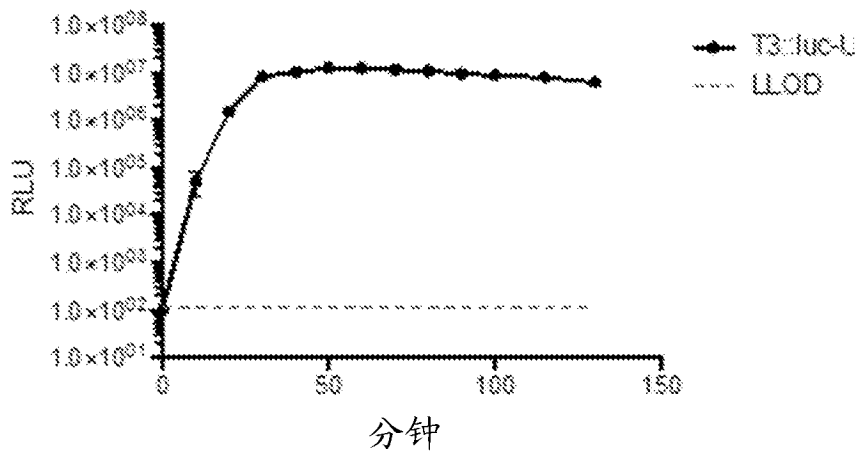


图 12