

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992748 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.16

(22) Дата подачи заявки
2018.05.17

(51) Int. Cl. G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)
G01N 33/558 (2006.01)

(54) ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ, КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ И/ИЛИ ОТСЛЕЖИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ДРУГИХ
АНАЛИТОВ

(31) 62/507,895

(32) 2017.05.18

(33) US

(86) PCT/US2018/033222

(87) WO 2018/213604 2018.11.22

(88) 2018.12.27

(71) Заявитель:

ЛОКУС АГРИКАЛЧЕ
АЙПИ КОМПАНИ, ЛЛК;
ИНТЕЛЛИДЖЕНТ МАТЕРИАЛ
СОЛЮШНС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Зорнер Пол, Матур Эрик Дж., Коллинз
Джош, Белл Говард, Шибата Скотт
Алан (US)

(74) Представитель:

Тагбергенова М.М., Тагбергенова А.Т.
(KZ)

(57) Настоящее изобретение обеспечивает способы и анализы для мультиплексного обнаружения аналитов, используя нанокристаллы, которые единообразны по морфологии, размеру и составу на основании их уникальных оптических характеристик. Описанные способы и анализы чрезвычайно пригодны для обнаружения микроорганизмов и/или агентов на основе микроорганизмов в комплексной пробе окружающей среды.

A1

201992748

201992748

A1

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ АНАЛИЗЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ, КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И/ИЛИ ОТСЛЕЖИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ДРУГИХ АНАЛИТОВ

5 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка испрашивает приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/507,895, поданной 18 мая 2017 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

10 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сельское хозяйство, лесное хозяйство и другие способы производства продуктов питания, пищевых добавок, волокон и природных материалов становятся все в большей степени сложными в связи с различными экологическими проблемами. Такие проблемы включают резистентность вредителей, чрезвычайные температуры и вредители.

15 Для повышения урожайности и защиты сельскохозяйственных культур от патогенов, вредителей и заболеваний, фермеры сильно зависят от применения синтетических химических веществ и минеральных удобрений; тем не менее, при чрезмерном использовании или неправильном применении, эти вещества могут стекать в наземную воду, вымываться в грунтовую воду и испаряться в воздух. В качестве
20 источников загрязнения воздуха и воды, эти вещества во все возрастающем объеме тщательно проверяются, что превращает их ответственное использование в экологический и коммерческий императив. Даже при надлежащем использовании, чрезмерная зависимость и длительное использование определенных минеральных удобрений и пестицидов оказывает вредные изменения на почвенные экосистемы, уменьшает
25 толерантность к стрессу, увеличивает резистентность вредителей и препятствует росту и жизнеспособности растений и животных.

Для глобального расширения возможностей сельского хозяйства для выращивания значительно большего количества пищевых продуктов и пищевых добавок, а также для
30 значительно увеличения выработки лесными хозяйствами волокон и структурных материалов, все в большей степени используются микроорганизмы. Микроорганизмы, такие как бактерии, дрожжи и грибы, и их побочные продукты, используются во многих отраслях, включая сельское хозяйство, животноводство и лесоводство, и рекультивацию почв, воды и других естественных источников.

Сельхозпроизводители в возрастающей степени осуществляют применение
35 биологических агентов, таких как живые микроорганизмы, био-продукты, имеющие

происхождение из этих микроорганизмов, и их комбинации, например, в качестве пестицидов. Эти биологические агенты имеют важные преимущества по сравнению с другими общепринятыми пестицидами. Эти преимущества включают: 1) менее вредные по сравнению с общепринятыми химическими пестицидами; 2) более эффективные и специфические; 3) часто быстрее биоразлагаются, что приводит к меньшему загрязнению окружающей среды.

Несмотря на существование огромного потенциала для применения микроорганизмов и агентов на основе микроорганизмов, способность обнаруживать и/или отслеживать такие микроорганизмы и агенты на основе микроорганизмов в окружающей среде ограничена. Способность обнаруживать или отслеживать микроорганизмы и агенты на основе микроорганизмов будет чрезвычайно благоприятной для сельского хозяйства, включая для применений на выращиваемых сельскохозяйственных культурах, декоративных растениях, травяных культурах, лесоматериалах и растениях.

Таким образом, обнаружение микроорганизмов, включая патогены, а также полезные микроорганизмы, или агенты на основе микроорганизмов, в поле будет отображать вариации в окружающей среде и способствовать осуществлению надлежащих действий для улучшения жизнеспособности растения. Кроме того, обнаружение и мониторинг микробных патогенов в окружающей среде также может быть благоприятным для содействия здоровью людей.

Традиционные процедуры, используемые для обнаружения микроорганизмов, обычно включают культивирование образцов и обнаружение активности микроорганизмов. В целом, целевые микроорганизмы инокулируют в культуральную среду, специфическую для таких целевых микроорганизмов, которая обеспечивает все питательные вещества для их роста. Образец может представлять собой необработанную натуральную пробу, или он может представлять собой пробу, которая была предварительно обработана путем, например, мембранной фильтрации.

В способах обнаружения обычно используют по меньшей мере один аналитический реагент, который связывается со специфической мишенью и продуцирует обнаруживаемый сигнал. Эти аналитические реагенты типично включают зондовую молекулу, такую как антитело или олигонуклеотид, которая связывается с мишенью с высокой степенью специфичности и аффинности, и обнаруживаемую метку, такую как ковалентно связанную флуоресцентную молекулу красителя, которая может быть обнаружена с помощью подходящего оборудования. Типично, связывающие свойства зондовой молекулы определяют специфичность способа обнаружения, и способность

поддаваться обнаружению ассоциированной метки определяет чувствительность способа обнаружения.

Несмотря на то, что способы обнаружения с применением флуоресцентных красителей обладают существенными преимуществами, такими как высокая чувствительность, низкий фон и точное измерение, и часто обеспечивают пригодные результаты в медико-биологическом исследовании, они не являются подходящими для обнаружения и отслеживания микроорганизмов и агентов на основе микроорганизмов для сельскохозяйственного производства. Причины включают 1) наиболее широко используемые флуорофоры представляют собой ароматические органические молекулы, которые имеют как полосы поглощения, так и полосы испускания, локализованные в УФ/видимой части спектра; 2) продолжительность жизни испускания флуоресценции обычно является короткой, порядка от 1 до 100 нс; 3) часто не представляется возможным интегрировать флуоресцентный сигнал в течение длительного времени обнаружения вследствие фотообесцвечивания; и 4) для обнаружения флуорофоров необходимо специальное оборудование.

Таким образом, существует потребность в устройствах и способах для обнаружения и/или отслеживания полезных микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов, и патогенов в окружающей среде быстро и просто, без необходимости существенных стадий приготовления проб, для получения точной диагностической информации.

20

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает способы и устройства для эффективного и точного обнаружения, количественного определения и/или отслеживания микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов, и/или других аналитов в пробах окружающей среды и пробах продуктов питания. Пробы могут представлять собой, например, почву, воду, масло, отходы, пищу, листву и/или биологические пробы из сельскохозяйственных животных или других животных.

Аналиты могут представлять собой микроорганизмы, агенты на основе микроорганизмов и/или аналиты, обусловленные присутствием или активностью микроорганизмов. Микроорганизмы могут представлять собой полезные микроорганизмы или патогены, включая сельскохозяйственные патогены.

В предпочтительных вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает диагностические анализы в месте эксплуатации для быстрого, эффективного и точного обнаружения, количественного определения и/или отслеживания аналитов, представляющих интерес. Благоприятно, одновременно может быть обнаружено много

35

аналитов. Кроме того, аналиты могут быть обнаружены при низких концентрациях, в комплексных пробах, и с минимальным приготовлением пробы или без приготовления пробы.

Благоприятно, в анализах согласно настоящему изобретению применяют
5 настраиваемые нанокристаллы в качестве меток обнаружения для идентификации присутствия, и/или количественного определения, одного или нескольких аналитов, представляющих интерес (например, полезных микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов и/или патогенов). Эта настраиваемость облегчает отфильтровывание помехи фона, например, от хромофоров в пробе. Эта настраиваемость также
10 предоставляет возможность обнаружить несколько аналитов в одно и то же время. Этот анализ может обнаружить, например, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 или больше аналитов одновременно из единичной пробы.

Нанокристаллы характеризуются однородной морфологией и однородным размером. Дополнительно, нанокристаллы могут обладать их собственными
15 уникальными оптическими и магнитными свойствами, такими как спектральные профили оптического испускания, спектральные профили оптического поглощения, профиль зависимости оптической мощности, оптические заметности продолжительности жизни (время нарастания и затухания), и поверхностная функциональность. Например, нанокристаллы могут быть поверхностно модифицированными, что дает им возможность
20 специфически связываться с аналитом (ами), представляющим (и) интерес. Поверхностная модификация может осуществляться, например, путем связывания нанокристаллов с антителами, белками, аптамерами, нуклеотидами и/или другими соединениями.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой неорганические люминесцентные или электромагнитно активные материалы, которые
25 поглощают энергию, оказывая действия на них, и впоследствии испускают поглощенную энергию. В одном варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой стоксовые (преобразующие с понижением частоты) фосфоры. Фосфоры, которые поглощают энергию в форме фотона и испускают фотон с зоной более низкой частоты (более низкая энергия, большая длина волны), представляют собой фосфоры,
30 преобразующие с понижением частоты.

В другом варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой анти-стоксовые (преобразующие с повышением частоты) фосфоры. Фосфоры, которые поглощают энергию в форме двух или больше фотонов с низкой частотой и испускают в зоне с более высокой частотой (более высокая энергия, более короткая длина волны),
35 представляют собой фосфоры, преобразующие с повышением частоты.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой частицы, содержащие редкоземельный элемент (RE). RE элементы включают иттрий и элементы семейства лантаноидов (Ln), то есть, лантан (La), церий (Ce), празеодимий (Pr), неодимий (Ne), прометий (Pm), самарий (Sm), европий (Eu), гадолиний (Gd), тербий (Tb), диспрозий (Dy), гольмий (Ho), эрбий (Er), тулий (Tm), иттербий (Yb) и лютеций (Lu).

Является благоприятным применять нанокристаллы с различными длинами волн возбуждения и/или испускания, и/или различными скоростями нарастания и затухания, для обнаружения больше одного аналита в единичном анализе.

Способ может включать стадии: обеспечение пробы окружающей среды или пробы продуктов питания, в которой предполагается наличие аналита, представляющего интерес, контактирование пробы с множеством нанокристаллов, и обнаружение нанокристаллов, которые связаны с аналитом.

Микроорганизмы, которые могут быть обнаружены, количественно определены и/или отслежены в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваясь только ими, бактерии, археобактерии, дрожжи, грибы, вирусы, простейшие и многоклеточные организмы. Агенты на основе микроорганизмов, которые представляют собой аналиты в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваясь только ими, композицию, содержащую микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и другие побочные продукты роста микроорганизмов. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы обнаружения продукта, продуцируемого организмом (таким как животное или растение), в ответ на микроорганизм и/или агент на основе микроорганизма.

Благоприятно, анализы согласно настоящему изобретению можно использовать для облегчения отслеживания аналитов в окружающей среде или пищевой цепи.

Анализы согласно настоящему изобретению можно использовать в различных условиях, включая, но не ограничиваясь только ими, сельскохозяйственные культуры, сельскохозяйственные животные, лесное хозяйство, управление травяным покровом, декоративные растения, пастбища, аквакультура, утилизация отходов, пищевая цепь и здоровье животных.

В специфических вариантах осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают стадию применения пробы к субстрату для облегчения осуществления аналитического анализа. При этом поверхность субстрата может быть ассоциирована с, например, антителами, белками, аптамерами, нуклеотидами и/или другими соединениями, которые специфически связываются с, или другим образом

ассоциированы с аналитом. В этих анализах можно использовать, например, формат с боковым сдвигом, многолуночный набор или микроструйные форматы.

В специфическом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает формат анализа с боковым сдвигом или микроструйный формат, при котором нанокристаллы в обнаруживаемой метке могут представлять собой преобразующий с повышением частоты фосфор (UCP). В одном варианте осуществления, устройство обнаружения обнаруживает преобразующие с повышением частоты эмиссионной длины волны. В другом варианте осуществления, устройство обнаружения обнаруживает фосфорную заметность продолжительности жизни.

Способность к регулировке размера, морфологии, поглощения, испускания, времени нарастания, времени затухания, плотности энергии и других свойства частиц фосфора, таких как преобразующие с повышением частоты нанокристаллы (UCNC) или субмикронные частицы фосфора, предоставляет возможность образования материалов с широким кругом отличительных характерных признаков. Адаптивность редкоземельной UCNC платформы существенно повышает способность иметь широкую способность обнаружения, используя единственную считывающую систему. Дополнительно, способности оптически подгонять уникальные идентифицирующие области спектров редкоземельной наночастицы или субмикронной частицы обеспечивают чрезвычайно благоприятные мультиплексные возможности.

Способы согласно настоящему изобретению способствуют быстрому, чувствительному и недорогому, обнаружению и/или количественному определению представляющих интерес микроорганизмов и/или агентов на основе микроорганизмов в комплексных пробах. Применение нанокристаллов в качестве меток в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает быструю, мультиплексную и специфическую платформу для анализа, способную обнаружить низкие уровни целевых аналитов в комплексных пробах окружающей среды и пробах продуктов питания, таких как, например, в отношении проб продуктов питания, сельского хозяйства и сельскохозяйственных животных.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает способы и устройства для эффективного и точного обнаружения, количественного определения и/или отслеживания микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов и/или других аналитов. Аналиты могут быть обнаружены в пробах окружающей среды или пробах продуктов питания, таких как в пробах почвы, воды, пищи, отходов, масла, растений и биологических пробах

из животных. Микроорганизмы могут представлять собой, например, полезные микроорганизмы или патогены, включая сельскохозяйственные патогены и животные патогены.

В способах согласно настоящему изобретению применяют нанокристаллы в качестве меток обнаружения для обнаружения одного или нескольких представляющих интерес аналитов (например, полезных микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов и/или патогенов). Благоприятно, несколько аналитов может быть обнаружено одновременно в единичном анализе.

В соответствии с настоящим изобретением, нанокристаллы проявляют настраиваемые физические свойства и, благоприятно, имеют контролируемые однородность размеров, конфигурационную селективность и поверхностную функциональность. Например, нанокристаллы могут быть поверхностно-модифицированными для предоставления им возможности специфически связываться с представляющим интерес аналитом. Поверхностная модификация может осуществляться путем связывания нанокристаллов, например, с антителами, белками, аптамерами, нуклеотидами и/или другими соединениями.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способы обнаружения аналита в пробе, включающие стадии:

контактирование пробы с множеством нанокристаллов, где нанокристаллы являются поверхностно-модифицированными с помощью компонента, который специфически связывается с целевым аналитом,

отделение нанокристаллов, связанных с аналитом, от несвязанных нанокристаллов, и

обнаружение нанокристаллов, которые связаны с аналитом.

Микроорганизмы, которые обнаружены, количественно определены и/или отслежены в соответствии с настоящим изобретением, могут представлять собой любой прокариотический или эукариотический микроскопический организм, включая, но не ограничиваясь только, ими бактерии (например, споры или вегетативные, грамположительные или грамотрицательные), археобактерии, дрожжи, грибы (например, нитчатые грибы и грибковые споры), вирусы, простейшие или многоклеточные организмы. В некоторых случаях, особый интерес представляют собой те микроорганизмы, которые являются патогенными. Термин “патоген” используется для обозначения любого патогенного микроорганизма. В других случаях микроорганизм является полезным

В специфическом варианте осуществления, способ используется для обнаружения, необязательно в комплексной пробе окружающей среды, патогенов, которые вызывают позеленение цитрусовых. Позеленение цитрусовых, также известное как болезнь цитрусовых "Жёлтый дракон" (HLB), вызывается ограниченной флорой проکاریотической α -протеобактерией со сложными питательными потребностями вида *Candidatus Liberibacter*., *Ca. africanus*, и *Ca. L. americanus*.

Способы, описанные в настоящей заявке, пригодны для применения на любом дереве или другом растении, которое было инфицировано или может быть инфицировано патогеном, вызывающим позеленение цитрусовых. Примеры растений включают, но не ограничиваясь только ими, любой культивар из рода *Citrus*, включая, но не ограничиваясь только ими, *Citrus sinensis* (апельсины сорта напель), лимон (*C. limon*), лайм (*C. latifolia*) грейпфрут (*C. paradise*), горький апельсин (*C. aurantium*), и мандарин (*C. reticulata*).

В других специфических вариантах осуществления, анализы согласно настоящему изобретению используются для обнаружения, количественного определения и/или отслеживания патогенов растений, которые вызывают фитофтороз картофеля, настоящую мучнистую росу винограда, эпикоккоз, вирус табачной мозаики, бактериальный ожог и/или пайерсову болезнь.

Проба может представлять собой, но не ограничиваясь только ими, пробу воды, почвы, пищи, растения, воздуха, отходов, биологические пробы из животных, пили, и пробы, собранные с поверхностей.

Сбор можно осуществлять с помощью любого из различных способов, включая, но не ограничиваясь только ими, применение губки, салфетки, тампона (например, раневой волокнистый продукт), пленки, щетки (например, имеющие жесткие или деформируемые щетинки), и др., и их комбинации.

В одном варианте осуществления, аналит представляет собой агент на основе микроорганизма. Агенты на основе микроорганизмов в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваясь только ими, композицию, которая содержит микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и другие побочные продукты роста микроорганизмов. В специфических вариантах осуществления, агент на основе микроорганизма представляет собой микробиологическое поверхностно-активное вещество или микотоксин.

Анализы согласно настоящему изобретению можно использовать для облегчения отслеживания микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов и других аналитов в окружающей среде или пищевой цепи.

В предпочтительных вариантах осуществления, нанокристаллы представляют собой монодисперсные частицы в кристаллической форме, имеющие кристаллическую решетку, содержащую редкоземельный элемент, однородный трехмерный размер и однородную полиэдрическую морфологию. Предпочтительно, монодисперсные частицы способны к самосборке в сверхрешётки вследствие их однородного размера и формы.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой неорганические люминесцентные или электромагнитно активные материалы, которые поглощают энергию, оказывая действия на них, и впоследствии испускают поглощенную энергию. Такие нанокристаллы могут действовать в качестве фосфоров, которые продолжают излучать свет в течение больше 10^{-8} секунд после удаления поглощенного света. Период полужизни послесвечения, или фосфоресценции, фосфора типично находится в диапазоне от приблизительно 10^{-6} секунд до нескольких дней.

В определенных вариантах осуществления, нанокристаллы в соответствии с настоящим изобретением представляют собой стоксовые (преобразующие с понижением частоты) фосфоры. Фосфоры, которые поглощают энергию в форме фотона и испускают фотон с зоной более низкой частоты (более низкая энергия, большая длина волны), представляют собой фосфоры, преобразующие с понижением частоты.

В других вариантах осуществления, нанокристаллы представляют собой анти-стоксовые (преобразующие с повышением частоты) фосфоры. Фосфоры, которые поглощают энергию в форме двух или больше фотонов с низкой частотой и испускают в зоне с более высокой частотой (более высокая энергия, более короткая длина волны), представляют собой фосфоры, преобразующие с повышением частоты. Преобразующие с повышением частоты фосфоры могут облучаться, например, с помощью излучения ближний инфракрасного спектра, низкой энергии, большей длины волны, и испускать излучение в видимой части спектра, которое имеет более высокую энергию и более короткую длину волны.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы представляют частицы, содержащие редкоземельные элементы (RE). RE элементы включают иттрий и элементы семейства лантаноидов (Ln), то есть, лантан (La), церий (Ce), празеодимий (Pr), неодимий (Ne), прометий (Pm), самарий (Sm), европий (Eu), гадолиний (Gd), тербий (Tb), диспрозий (Dy), гольмий (Ho), эрбий (Er), тулий (Tm), иттербий (Yb) и лютеций (Lu).

В определенных вариантах осуществления, преобразующие с понижением частоты нанокристаллы согласно изобретению могут возбуждаться при длине волны в интервале от 1 нм до 400 нм, предпочтительно, в интервале от 10 нм до 400 нм.

В других вариантах осуществления, преобразующие с повышением частоты нанокристаллы согласно изобретению могут возбуждаться при длине волны в интервале от 700 нм до 2000 нм, предпочтительно, в интервале от 800 нм до 1500 нм, более предпочтительно, 900 нм до 1000 нм. В специфическом варианте осуществления, преобразующие с повышением частоты нанокристаллы могут возбуждаться при длине волны от 960 нм до 980 нм.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы согласно изобретению излучают свет при длине волны от 400 нм до 12000 нм.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы, используемые в настоящем анализе, могут быть комбинированы со вторым репортером, таким как квантовые точки, углеродные нанотрубки, а также магнитные и легированные красителем наночастицы. Комбинирование нанокристаллов с другими сдвигающими длину волны и поглощающими материалами предоставляет возможность дополнительного мультиплексирования и функциональности. Две комплементарные частицы, такие как восходящий нанокристалл и нисходящая квантовая точка, которая поглощает и испускает восходящего нанокристалла с аналогичными иммобилизованными антителами, будут связываться с мишенью. При активации с помощью света 980 нм, квантовая точка сама не испускает, но если находится вблизи восходящего нанокристалла, то нанокристалл будет переносить необходимую энергию для активации квантовой точки. Единственная возможность, когда две частицы находятся достаточно близко, если они связываются со специфической мишенью. В микроструйной системе, эффекты связывания количественно определены в реальном времени.

Добавление магнитных свойств нанокристаллам предоставляет возможность более быстрого времени обработки перед анализом, так как частицы могут быть переданы для анализа с помощью магнита. Магнитные свойства также можно считывать во время обнаружения. Редкоземельные кристаллы, комбинированные с другими металлами, проявляют различные свойства, такие как парамагнитные и ферромагнитные.

Органические красители, которыми покрыты нанокристаллы, образуют фильтр и могут положительно влиять на спектральные помехи. Линии лантанидов иногда перекрывают и дополняют органические материалы, предоставляя возможность блокирования определенных участков в спектре для получения единичных испусканий.

Множественные нанокристаллы, обладающие различными размерами, продолжительностями жизни и/или морфологиями, можно комбинировать и вводить в или на комплексную пробу окружающей среды, обеспечивая множественные уникальные обнаруживаемые метки, которые могут использоваться для обнаружения множественных

аналитов. Редкоземельные нанокристаллы обеспечивают преимущества в связи с этих относительно длинным затуханием продолжительности жизни флуоресценция, что связывается, например, с трехвалентными редкоземельными (или лантанидными) металлами.

5 Является благоприятным применять нанокристаллы с различными длинами волн возбуждения и/или испускания для обнаружения больше одного аналита в единичном анализе путем применения различных меток для идентификации предпочтительных мишеней. Например, представляется возможным генерировать множественные спектрально разделенные цвета (например, синий, зеленый и красный) с помощью
10 инфракрасного (ИК), ультрафиолетового (УФ), или электронного возбуждения для измерения длин волн испускания флуоресценции, амплитуд интенсивностей и количества аналитов в одно и то же время. В особенности, иммуногистохимическое применение конъюгатов нанокристаллов с захваченными молекулами предоставляет возможность чувствительного обнаружения небольших количеств аналита в пробах окружающей
15 среды.

Благоприятно, свойства мультиплексирования анализа с использованием нанокристаллов реализуют возможность обнаружить предоставляющий интерес аналит в комплексной пробе окружающей среды или пробе продуктов питания без препятствия со стороны компонентов пробы. Например, нанокристаллы с настраиваемыми
20 характеристиками предоставляют возможность количественного определения представляющих интерес аналитов из интерферирующих хромофоров, которые присутствуют в пробах почвы или растений.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение также обеспечивает способ получения нанокристаллов. В способе применяют стадии: в реакционном сосуде, растворение по меньшей мере одного предшественника соли металла в растворителе с
25 образованием раствора; помещение реакционного сосуда в нагретую соляную баню, имеющую температуру по меньшей мере приблизительно 340° C.; применение нагрева с солевой бани для быстрого разложения предшественников солей металлов в растворе с образованием монодисперсных частиц; выдерживание реакционного сосуда в солевой
30 бане в течение времени, достаточного для увеличения размера монодисперсных частиц; удаление реакционного сосуда из солевой бани; и закаливание реакции при температуре окружающей среды для растворителя.

Благоприятно, настоящее изобретение обеспечивает чувствительный анализ с чувствительностью обнаружения для микроорганизма на уровне 10^3 КОЕ/мл и ниже. В
35 предпочтительных вариантах осуществления чувствительность составляет 10^2 КОЕ/мл,

более предпочтительно, 10^1 КОЕ/мл. Таким образом, анализ может обнаруживать микроорганизмы в комплексной пробе в диапазоне от 10^1 КОЕ/мл до 10^9 КОЕ/мл и выше.

Настоящее изобретение также обеспечивает чувствительный анализ с чувствительностью обнаружения для агентов на основе микроорганизмов всего лишь
5 0,001 нг/мл.

Благоприятно, анализы можно осуществлять в поле. В определенных вариантах осуществления, анализы осуществляют в пределах 1000, 500, 250, 100, 50, 20, 10, 5 или даже 1 ярд или меньше от места получения пробы. Кроме того, анализ может быть осуществлен, например, в течение 60, 45, 30, 20, 10, 5 или даже 1 минуты или меньше от
10 времени отбора пробы.

В одном варианте осуществления, способы можно использовать для одновременного обнаружения одного или больше аналитов в комплексной пробе окружающей среды. Обнаружение можно осуществлять в течение 60 минут или меньше, 50 минут или меньше, 40 минут или меньше, 30 минут или меньше, 20 минут или меньше,
15 10 минут или меньше, или 5 минут или меньше. В предпочтительных вариантах осуществления, анализ осуществляют более быстро и/или с меньшим препаратом пробы, чем анализы с использованием ПЦР или стандартного ELISA. Результаты можно считывать сразу после завершения анализа и/или сохранить и/или передавать в другое местонахождение. Например, результаты можно передавать электронного для хранения
20 и/или дальнейшего анализа. Результаты могут быть переданы, например, в электронное облако для хранения или другую базу данных для хранения.

Эти средства можно использовать для осуществления контроля качества и определения спецификаций продукта, как сразу после получения, а также в поле фермера непосредственно перед применением. Это облегчает быстрый выпуск продукта, что
25 является чрезвычайно благоприятным для локальной системы микробиологической ферментации, а также для любой системы, он является более быстрым, более дешевым и более точным, чем любые другие существующие в настоящее время способы.

Анализы согласно настоящему изобретению также можно использовать для подтверждения характеристик микробиологического продукта, приобретенного
30 потребителем. Этот аспект согласно изобретению имеет большую ценность, так как многие биологические вещества теряют эффективность со временем и становятся значительно менее эффективными ко времени их приобретения или использования. Этот аспект также помогает контролировать запасы и определять, какие продукты не соответствуют спецификации с единичными микроорганизмами или те, которые содержат
35 несколько.

Питание, рост и надлежащее функционирование растений зависит от количества и распределения мощных популяций природной микрофлоры, которая, в свою очередь, оказывает влияние на плодородие почвы, возделывание, влажность, температуру, аэрацию, органический материал и многие другие факторы. Продолжительная засуха, переменные осадки и другие изменяемые факторы окружающей среды, включая пролиферацию нематод и других вредителей, влияние этих факторов и воздействие разнообразия почв и жизнеспособности растений. Эти изменяемые факторы окружающей среды проявляют себя в различных измерениях, включая географию, сезонность в этом году, и различия в разные годы. Они также существуют в пределах конкретного хозяйства и даже в пределах небольшой площади, такой как акр, или меньше или для различных видов животных или даже индивидуальных животных в пределах видов. Используя анализы согласно настоящему изобретению для определения, точно и аккуратно, присутствия микроорганизмов (полезных и патогенных) и экологии в пределах мета- и микроокружений обеспечивает значительно больше возможностей для фермеров, регуляторных представителей, контролирующих представителей, основных производителей, дистрибьютеров в цепочке поставок и других организаций или индивидуальных лиц, желающих лучше продвигать свои активы, контролировать патогены и оптимизировать эффективность и экономические показатели их бизнесов.

20 **Нанокристаллы**

Нанокристаллы, пригодные в соответствии с настоящим изобретением, представляют собой неорганические люминесцентные или электромагнитно активные материалы, которые поглощают энергию, оказывая действия на них, и впоследствии испускают поглощенную энергию. Такие нанокристаллы могут действовать в качестве фосфоров, которые продолжают излучать свет в течение больше 10^{-8} секунд после удаления поглощенного света. Период полужизни послесвечения или фосфоресценции, фосфора типично находится в диапазоне от приблизительно 10^{-6} секунд до нескольких дней.

Нанокристаллы согласно изобретению могут иметь различные оптические свойства на основании их состава, их размера и/или их морфологии (или формы). В одном варианте осуществления, изобретение относится к комбинации по меньшей мере двух типов нанокристаллов, где каждый тип представляет собой множество монодисперсных частиц, имеющих единственную чистую кристаллическую фазу кристаллической решетки, содержащую редкоземельный элемент, однородный трехмерный размер, и однородную полиэдрическую морфологию; и где типы монодисперсных частицы

отличаются друг от друга по составу, по размеру или по морфологии. В предпочтительном варианте осуществления, типы монодисперсных частиц имеют такой же состав, но различные морфологии.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы в соответствии с настоящим изобретением представляют собой стоксовые (преобразующие с понижением частоты) фосфоры. Фосфоры, которые поглощают энергию в форме фотона и испускают фотон с зоной более низкой частоты (более низкая энергия, большая длина волны), представляют собой фосфоры, преобразующие с понижением частоты.

В другом варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой анти-стоксовые (преобразующие с повышением частоты) фосфоры. Фосфоры, которые поглощают энергию в форме двух или больше фотонов с низкой частотой и испускают в зоне с более высокой частотой (более высокая энергия, более короткая длина волны), представляют собой фосфоры, преобразующие с повышением частоты. Преобразующие с повышением частоты фосфоры, например, облучаются с помощью ближнего инфракрасного спектра, низкой энергии, большей длине волны света, и испускают излучение в видимой части спектра, которое имеет более высокую энергию и более короткую длину волны.

В одном варианте осуществления, нанокристаллы представляют собой частицы, содержащие редкоземельный элемент (RE). RE элементы включают иттрий и элементы семейства лантаноидов (Ln), то есть, лантан (La), церий (Ce), празеодимий (Pr), неодимий (Ne), прометий (Pm), самарий (Sm), европий (Eu), гадолиний (Gd), тербий (Tb), диспрозий (Dy), гольмий (Ho), эрбий (Er), тулий (Tm), иттербий (Yb) и лютеций (Lu).

В специфическом варианте осуществления, нанокристаллы согласно изобретению имеют кристаллическую решетку, содержащую редкоземельный элемент, которая может представлять собой решетку, содержащую иттрий, или решетку, содержащую лантанид. Решетка содержит иттрий (Y) или лантанид (Ln) в его +3 окисленном состоянии. Заряд в решетке сбалансирован присутствием аниона, такого как галогенид (фторид, F^- , который является предпочтительным), оксид, оксисульфид, оксигалогенид (например, OCl), сульфид и др. Щелочные металлы, то есть, литий (Li), натрий (Na), калий (K), рубидий (Rb), и цезий (Cs) и/или щелочно-земельные металлы бериллий (Be), магний (Mg) кальций (Ca), стронций (Sr) и барий (Ba) также могут быть компонентом кристаллической решетки основы. Щелочные металлы или щелочноземельные металлы часто называются “модификаторы решетки”.

Нанокристаллы могут быть разного размера. В одном варианте осуществления, кристаллы согласно изобретению могут быть описаны как нанокристаллы с их

наибольшим измерением в диапазоне от приблизительно 1 нм до 1000 нм по размерам, предпочтительно, от 5 нм до 750 нм, более предпочтительно, от 10 нм до 500 нм, наиболее предпочтительно, от 20 нм до 400 нм. Большие кристаллы, с по меньшей мере одним измерением приблизительно от 1 мкм до 400 мкм, составляют другой вариант осуществления изобретения. Размер кристалла зависит от стехиометрического соотношения элементов, составляющих кристалл, или стехиометрического соотношения предшественника, используемого для приготовления частицы, а также длины времени реакции.

Нанокристаллы, используемые в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно имеют единственную чистую кристаллическую фазу RE-содержащей решетки. В одном варианте осуществления, нанокристалл представляет собой α , β , или кристалл кубической фазы. В предпочтительном варианте осуществления, нанокристалл представляет собой гексагональную частицу (β)-фазы.

Для синтеза моодисперсных частиц согласно изобретению, щелочной металл или щелочноземельный металл, присутствующий в решетке, может определять симметрию кристаллов, обеспечивая морфологический контроль над частицами, а также независимую настраиваемость других свойств частиц, таких как оптические свойства люминесцентной частицы. Например, симметрия кристаллов LiYF_4 , NaYF_4 , и KYF_4 является тетрагональной, гексагональной и тригональной, соответственно.

Химический состав частиц согласно изобретению обеспечивает уникальные полиэдрические морфологии. Репрезентативные иттрий-содержащие решетки включают, но не ограничиваясь только ими, LiYF_4 , BaYF_5 , $\text{BaY}_2\text{F}_8\text{NaYF}_4$, KYF_4 , $\text{Y}_2\text{O}_2\text{S}$, Y_2O_3 , и другие. Лантанид-содержащая решетка может представлять решетку, содержащую любой элемент семейства лантаноидов. Репрезентативные лантанид-содержащие решетки включают, но не ограничиваясь только ими, LaF_3 , CeF_3 , PrF_3 , NeF_3 , PmF_3 , SmF_3 , EuF_3 , GdF_3 , TbF_3 , DyF_3 , HoF_3 , ErF_3 , TmF_3 , YbF_3LuF_3 , NaGdF_4 , Gd_2OS_2 , LiHoF_4 , LiErF_4 , CeO , SrS , CaS , GdOCl , и другие.

В одном варианте осуществления, химический состав частицы может содержать легирующие примеси и модификаторы решетки, которые придают уникальные свойства композиции.

Морфология нанокристаллов может быть сферической, гексагональной, кубической, палочкообразной, ромбовидной, различной формы, такой как грибовидная или гантелевидная. Благоприятно, UCNC не являются фотоотбеливателями и предоставляют возможность высокой плотности энергии возбуждения в течение продолжительной экспозиции с одновременной интеграцией сигнала. Их можно хранить

бессрочно без снижения эффективности светоиспускания и, следовательно, они могут предоставлять возможность повторного облучения и анализа. В отличие от ранее известных неорганических маркеров, нанокристаллы являются однородными и обеспечивают оптимальный сигнал на основании их концентрации. Если кристаллы являются аморфными, распределение атомов не согласовано, то присутствуют дефекты в структурах и излучаемый оптический сигнал не может быть количественно определен. Изобретение обеспечивает преимущество однородной морфологии кристаллов. Аналогично дистанционному управлению, инфракрасное импульсное излучение испускается кристаллом во время теста. Эти свойства облегчают количественное определение представляющих интерес аналитов в комплексной пробе окружающей среды.

А. Преобразующие с понижением частоты фосфоры

Преобразующие с понижением частоты фосфорные материалы включают RE элемент легированные оксиды, RE элемент легированные оксисульфиды, RE элемент легированные фториды. Примеры преобразующих с понижением частоты фосфоров включают, но не ограничиваясь только ими, $Y_2O_3:Gd$, $Y_2O_3:Dy$, $Y_2O_3:Tb$, $Y_2O_3:Ho$, $Y_2O_3:Er$, $Y_2O_3:Tm$, $Gd_2O_3:Eu$, $Y_2O_2S:Pr$, $Y_2O_2S:Sm$, $Y_2O_2S:Eu$, $Y_2O_2S:Tb$, $Y_2O_2S:Ho$, $Y_2O_2S:Er$, $Y_2O_2S:Dy$, $Y_2O_2S:Tm$, $Y_2O_2S:Eu$ (красный), $Y_2O_3:Eu$ (красный), и $YVO_4:Eu$ (красный). Другими примерами преобразующих с понижением частоты фосфоров являются натрийгадолиний фториды, легированные другими лантаноидами, например, $NaGdF_4:Tb$, где Tb может быть заменен на Eu, Dy, Pr, Ce и др. Фториды лантаноидов также известны как преобразующие с понижением частоты фториды, например, TbF_3 , EuF_3 , PrF_3 и DyF_3 .

В. Преобразующие с повышением частоты фосфоры

Преобразующие с повышением частоты фосфоры, имеющих происхождение из RE-содержащих кристаллических решёток основ, такие как описанные выше, легированные с помощью по меньшей мере одной активаторной пары, включающей сенсibilизатор (также известен как поглотитель) и испускатель. Подходящие преобразующие с повышением частоты фосфорные кристаллические решётки основ включают: натрий иттрий фторид ($NaYF_4$), лантан фторид (LaF_3), лантан оксисульфид, RE оксисульфид (RE_2O_2S), RE оксифторид ($RE_4O_3F_6$), RE оксихлорид ($REOCl$), иттрий фторид (YF_3), иттрий галлат, гадолиний фторид (GdF_3), барий иттрий фторид ($BaYF_5$, BaY_2F_8), и гадолиний оксисульфид, где RE может представлять собой Y, Gd, La, или другие лантаноидные элементы. Подходящие активаторные пары выбирают из: иттербий/эрбий,

иттербий/тулий, и иттербий/гольмий. Также можно использовать другие активаторные пары, подходящие для преобразования с повышением частоты.

Путем комбинирования RE-содержащих кристаллических решёток основ с только этими тремя активаторными парами, обеспечиваются по меньшей мере три фосфора с по
 5 меньшей мере тремя различными спектрами испускания (красное, зеленое и синее излучение в видимой части спектра). В основном, поглотитель представляет собой иттербий и излучающий центр может быть выбран из: эрбия, гольмия, тербия и тулия; однако, другие преобразующие с повышением частоты частицы фосфора согласно изобретению могут содержать другие поглотители и/или испускатели. Молярное
 10 соотношение поглотитель:излучающий центр типично составляет по меньшей мере приблизительно 1:1, в большинстве случаев по меньшей мере приблизительно от 3:1 до 5:1, предпочтительно по меньшей мере приблизительно от 8:1 до 10:1, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно от 11:1 до 20:1, и типично меньше, чем приблизительно 250:1, обычно, меньше, чем приблизительно 100:1, и в большинстве
 15 случаев меньше, чем приблизительно от 50:1 до 25:1, хотя практикующим специалистом могут быть выбраны различные соотношения на основании желательных характеристик (например, химические свойства, эффективность производства, длины волн возбуждения и испускания, квантовая эффективность или другие факторы, которые необходимо учитывать). Например, повышение концентрации Yb незначительно изменяет свойства
 20 поглощения, что является полезным для биомедицинским применений. Дополнительно, введение легирующих примесей других редкоземельных и переходных металлов, изменения концентраций легирующих примесей, и модификации кристаллических решёток основ, все эти факторы обеспечивают дальнейшую настраиваемость относительно спектральных профилей, а также времени нарастания и затухания.

Оптимальное соотношение поглотителя (например, иттербия) к излучающему центру (например, эрбию, тулию или гольмию) изменяется, в зависимости от конкретной пары поглотитель/испускатель и желательного спектрального профиля и продолжительности жизни. Например, соотношение поглотитель:испускатель для пар Yb:Er типично находится в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 100:1, в
 30 то время как соотношение поглотитель:испускатель для пар Yb:Tm и Yb:Ho типично находится в диапазоне от приблизительно 500:1 до приблизительно 2000:1. Эти различные соотношения обуславливаются различными согласующимися энергетическими уровнями Er, Tm или Ho по отношению к уровню Yb в кристалле. Для большинства применений, преобразующие с повышением частоты фосфоры подходяще могут содержать
 35 приблизительно 10-30% Yb и либо: приблизительно 1-2% Er, приблизительно 0,1-0,05%

Но, или приблизительно 0,1-0,05% Тm для оптимальной квантовой эффективности, хотя также применяются и другие препараты.

В других вариантах осуществления, неорганические фосфоры оптимально возбуждаются инфракрасным излучением от приблизительно 900 до 1000 нм, предпочтительно от приблизительно 960 до 980 нм. В качестве примера, но не ограничиваясь только ими, микрокристаллический неорганический фосфор формулы $\text{YF}_3:\text{Yb}_{0,10}\text{Er}_{0,01}$ проявляет максимальную интенсивность люминесценции при длине волны возбуждения приблизительно 980 нм. Преобразующие с повышением частоты фосфоры согласно изобретению типично имеют максимум испускания, которое находится в видимом-ближнем инфракрасном диапазоне. Например, специфические активаторные пары имеют характерные спектры испускания: пары иттербий-эрбий имеют максимальное испускание в красной (660 нм) или зеленой (540 нм) областях видимого спектра, в зависимости от фосфорной основы; пары иттербий-гольмий (535 нм) в основном максимально испускают в зеленой области, иттербий-тулий типично имеют максимальное испускание в синем (480 нм), красном (635 нм) и инфракрасном (800 нм) диапазоне, и иттербий-тербий обычно испускают максимально в зеленом (545 нм) диапазоне. Например, $\text{Y}_{0,80}\text{Yb}_{0,19}\text{Er}_{0,01}\text{F}_2$ испускает максимально в зеленой области спектра.

Фосфорные частицы согласно изобретению могут возбуждаться при 915 нм вместо 980 нм, где поглощение воды значительно более высокое и больше тканей нагревается. Выбранное (ые) соотношение (я) будет (ут) зависеть в основном от конкретной (ых) пары (пар) поглотитель-испускатель, и может быть рассчитано на основании референтных значений в соответствии с желательными характеристиками. Также представляется возможным контролировать морфологию частиц путем изменения соотношения активаторов без изменения свойств испускания радикально для большинства соотношений, но в определенный момент может происходить закаливание.

С. Свойства частиц на основании состава, морфологии и размера

Свойства монодисперсных частиц можно подгонять различными путями. Свойства монодисперсных частиц, характерное поглощение и спектры испускания, можно подгонять путем модификации их состава, например, путем выбора кристаллической решётки основы, и/или путем легирования. Благоприятно, принимая к сведению их однородную полиэдрическую морфологию, монодисперсные частицы проявляют анизотропные свойства. Частицы одинакового состава, но различной формы, проявляют различные оптические свойства вследствие их формы и/или размера.

В одном варианте осуществления, монодисперсные частицы изменяются по составу и/или форме для обеспечения различных продолжительностей жизни затухания. Наличие различных спектральных продолжительностей жизни затухания предоставляет возможность уникальным частицам фосфора дифференцироваться друг от друга.

5 Способность иметь монодисперсные частицы одинакового состава, но с различными морфологиями в соответствии с изобретением предоставляет возможность применять один состав (в особенности в регулируемых отраслях, таких как фармацевтика или медицинские устройства), но различать их морфологии по их уникальным оптическим свойствам.

10 Таким образом, дополнительно к их характерным спектрам поглощения и испускания, которые можно получить, время нарастания и затухания монодисперсных частиц согласно изобретению также можно регулировать путем размера и морфологии частиц. Время нарастания измеряют от момента, когда первый фотон возбуждения поглотился до момента, когда наблюдали первый фотон испускания. Время затухания
15 определяют согласно уклону затухания испускания, или времени, которое необходимо фосфору для прекращения испускания после выключения источника возбуждения. Его также описывают как время, которое необходимо для опустошения электронов из возбужденных энергетических уровней. Путем изменения соотношения легирующих примесей, время нарастания и время затухания можно надежно изменять.

20 Типично, возбужденное состояние популяции затихает экспоненциально после выключения возбуждающего импульса по кинетике первого порядка, согласно закону затухания, $I(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$, согласно которому для единичного экспоненциального спада $I(t)$ = зависимость от времени интенсивность, I_0 = интенсивность в момент времени 0 (или амплитуда), и τ = среднее время, когда фосфор (или фторофор) остается в возбужденном
25 состоянии (или $\langle t \rangle$) и равно продолжительности жизни. (Продолжительность жизни τ обратно пропорциональна общей скорости затухания, $\tau = (T + k_{nr})^{-1}$, где в момент времени t после возбуждения, T представляет собой скорость эмиссии и k_{nr} представляет собой нерадиоактивную скорость затухания). В целом, обратная пропорциональность продолжительности жизни представляет собой сумму скоростей, которая опустошает
30 возбужденное состояние. Продолжительность жизни люминесценции легко может быть определена с помощью наклона графика $\ln I(t)$ относительно t (равного $1/\tau$). Оно также может представлять собою время, необходимое для снижения интенсивности до уровня ее исходного значения (время 0). Таким образом, для любой данной известной длины волны испускания, можно мониторить различные параметры, подходящие по
35 экспоненциальному закону затухания, для идентификации предпочтительного фосфора

или группы фосфоров, таким образом разрешая их применения, например, для разработки уникальных кодов для защиты от подделок, подписей или меток/маркеров.

В большинстве случаев, продолжительности жизни контролируются изменениями в составе кристаллов или суммарного размера частиц. Тем не менее, путем 5 контролирования морфологии и единообразия частиц, как в случае монодисперсными частицами согласно изобретению, специалист может создать частицы с визуально отличающимися морфологиями, обладающими продолжительностями жизни, которые являются специфическими для такой морфологии, в то же время поддерживая идентичные химические составы для различных морфологий. Этот характерный признак 10 предоставляет возможность для чрезвычайно комплексной оптической заметности или маркерности, которые можно использовать в анализах идентификации и мультиплексных анализах или анализах в различных областях, таких как, например, анализы, биомедицинские, оптические вычисления, а также применять для безопасности и установления идентичности.

Размер и морфологию частиц можно контролировать с помощью различных 15 условий реакции, таких как стехиометрическое соотношение предшественников солей металлов, скорость нагревания солевой бани и времени реакции. Начальная скорость нагревания в солевой бани является важной для определения морфологии путем отбора тех кристаллографических плоскостей, которые будут подвергаться наиболее быстрому 20 росту. Конечный размер частиц определяется с помощью общего времени реакции в солевой бане, а также соотношениями предшественников. После достижения температуры солевой бани в реакционных сосудах, чем больше времени сосуд остается в солевой бане, тем более крупные частицы могут расти.

25 D. Сборка сверхрешётки

Вследствие их однородности по размеру и морфологии, монодисперсные частицы согласно изобретению способны к самосборке в структуры сверхрешёток. Эти структуры 30 сверхрешёток представляют конформацию с минимальной свободной энергией для сборки. Это однородное построение приводит к получению монодисперсных частиц однородного размера и морфологии в соответствии с изобретением. Сверхрешётки образуются посредством межповерхностной самосборки, создавая иерархические структуры с порядками на различных шкалах длины.

Сверхрешётки монодисперсных частиц согласно изобретению могут быть образованы путем суспендирования частиц в растворителе и последующей их капельной 35 отливки на поверхность. Поскольку растворитель медленно испаряется, то частицы сами

упорядочиваются в сверхрешётку как в позиционном, так и ориентационном порядке. Можно использовать любой растворитель, который диспергирует частицы, такой как, но не ограничиваясь только ими, бензол, четырёххлористый углерод, хлорбензол, хлороформ, циклогексан, диметилформаид, диметилсульфоксид, этанол, гептан, гексан, пентан, тетрагидрофуран, толуол, где предпочтительными являются неполярные органические растворители, такие как гексан.

Сверхрешётки согласно изобретению могут представлять собой прозрачные пленки монодисперсных частиц согласно изобретению, в особенности с монодисперсными наночастицами согласно изобретению. Для образования сверхрешётки, составляющие частицы должны быть идентичными или практически идентичными по размеру и форме. Если оба условия соответствуют однородности, то образуются упорядоченный, монослой частиц. Благоприятно, монодисперсные частицы согласно изобретению соответствуют этим критериям для однородного размера и однородной морфологии. Вследствие небольшого размера и однородности частиц согласно изобретению, отсутствует рассеяние света и в результате этого получают прозрачную пленку.

Функционализация нанокристаллов

В одном варианте осуществления, нанокристаллы функционализируют с помощью одной или несколько захватываемых молекул. Это можно осуществлять, например, путем связывания нанокристаллов с антителами, белками, полипептидами, аптамерами, нуклеотидами и/или другими соединениями, которые специфически связываются с аналитом, таким как целевой микроорганизм или агент на основе микроорганизма. В другом варианте осуществления, целевой аналит также может представлять собой любую из возможных хозяев-биомолекул, индицированных экспрессировать в ответ на инфицирование патогенным микроорганизмом.

“Специфический”, как используется в настоящей заявке, относится к антителу, или другой структуре, которая исключительно распознается мишенью, к которой она специфична или которая имеет значительно более высокую аффинность связывания с мишенью, к которой она специфична, по сравнению со связыванием с молекулами, к которым она неспецифична. Аффинность связывания изменяют силу взаимодействия между эпитопом и антиген-связывающим сайтом антител. Антитела с более высокой аффинностью будут связывать большие количества антигена за более короткий период времени, чем антитела с низкой аффинностью. Таким образом, константа аффинности связывания будет изменяться в широких пределах от ниже 10^5 моль⁻¹ до выше 10^{12} моль⁻¹.

В предпочтительном варианте осуществления, антитело может включать полную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи или ее фрагмент и могут представлять собой, но не ограничиваясь только ими, Fab, модифицированные Fab, Fab', модифицированные Fab', F(ab')₂, Fv, однодоменные антитела (например, VH или VL или VHH), scFv, би-, три или тетра-валентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты любых из перечисленных выше структур (см., например, Holliger и Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136; Adair и Lawson, 2005, Drug Design Reviews - Online 2(3), 209-217). Антитела могут быть специфичными, например, к белкам, или эпитопам белков, которые экспрессируются на поверхности
 5
 10 целевых микроорганизмов.

Антитела, включая химерные антитела, могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением. Химерные антитела представляют собой такие антитела, кодируемые генами иммуноглобулинов, которые были генетически сконструированы таким образом, чтобы гены легких и тяжелых цепей состояли из сегментов генов иммуноглобулинов, принадлежащих к различным видам. Эти химерные антитела могут
 15
 20 быть менее антигенные. Мультивалентные антитела могут содержать множественные специфичности или могут быть моноспецифичными.

Антитела для применения в настоящем изобретении могут быть приобретены или они могут быть созданы с использованием различных способов, включая способы фагового дисплея, известные в данной области техники. Также для экспрессии антител
 25 можно использовать мыши или другие организмы, включая других млекопитающих.

Антитело могут быть из любого класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или подкласса молекулы иммуноглобулина. В одном варианте осуществления антитело для применения в настоящем изобретении представляет собой антитело класса IgG и может
 30
 35 быть выбрано из любого из IgG подклассов IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Антитело для применения в настоящем изобретении может включать одну или несколько мутаций для изменения активности антитела.

Примеры антигенов включают, но не ограничиваясь только ими, молекулы клеточной поверхности, которые представляют собой стабильные или нестабильные
 30
 35 компоненты плазматической мембраны, включая периферические, посторонние, секреторные, интегральные или трансмембранные молекулы. В других вариантах осуществления, молекула расположена на внешней поверхности плазматической мембраны клетки. В других вариантах осуществления, антигенная детерминанта не экспонирована на поверхности, но вместо этого, она экспонирована, например, при лизисе клетки. В определенных вариантах осуществления, антиген представляет собой молекулу

известной структуры и имеет известную или описанную функцию, включая, но не ограничиваясь только ими, гликобелки, липобелки, и белки, заякоренные в клеточную стенку; эпитоп антигена также может представлять собой небелковую биомолекулу

В другом варианте осуществления, поверхностный антиген и/или эпитоп
 5 поверхностного антигена может быть отобран на основании информации геномной последовательности. Идентификация антигенов может включать использование биологического программного обеспечения, известного в данной области техники (см., например, Bioinformatics Approach for Cell Surface Antigen Search of *Helicobacter pylori*, Ragini Tiwari и др., Journal of Pharmacy Research 2012,5(11),5184-5187) на основании
 10 информации последовательности специфического мотива, представляющего интерес. В качестве примера, такие программы, как SignalP, LipoP, PSORTb, и TMHMMS можно использовать для фильтрации и селекции представляющего интерес антигена.

Специфически, сервер SignalP 4.1 предсказывает наличие и локализацию сайтов расщепления сигнального пептида в аминокислотных последовательностях из различных
 15 организмов: грамположительные прокариоты, грамотрицательные прокариоты и эукариоты. Способ включает предсказание сайтов расщепления и предсказания сигнального пептида /несигнального пептида на основании комбинации нескольких искусственных нервных систем. Адрес вебсайта следующий:
www.cbs.dtu.dk/services/SignalP.

20 Сервер TMHMM предсказывает трансмембранные спирали в белках путем поиска гидрофобных аминокислот. Алгоритм предсказывает число спиралей и особо выделенных спиральных длин пептидов. Веб-адрес следующий: www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM. Сервер lipoP предсказывает липобелки с помощью доступных липобелковых сигнальных пептидов. Веб-адрес следующий: www.cbs.dtu.dk/services/LipoP.

25 PSORTb предсказывает сайт локализации и ассоциированную вероятность. Субклеточную локализацию белков получают на основании информации аминокислотной последовательности. На субклеточную локализацию белков оказывает влияние несколько характерных признаков, присутствующих в первичной структуре белка, таких как присутствует сигнального пептида или трансмембранные альфа-спирали. Веб-адрес
 30 следующий: <http://www.psort.org/psortb/>.

Благоприятно, способы согласно настоящему изобретению можно использовать для обнаружения микроорганизмов, которые сложно или невозможно выращивать в культуре, или которые могут расти в культуре, но только очень медленно. В связи с тем, что способы согласно настоящему изобретению могут обнаружить очень низкое
 35 количество микроорганизмов, то не является необходимым выращивание

микроорганизмов из пробы в культуре для повышения их количества перед осуществлением анализа согласно настоящему изобретению. Таким образом, анализ согласно настоящему изобретению можно использовать для обнаружения микроорганизмов, которые не поддаются культивированию в стандартных лабораторных условиях, или в культурах, занимаемых больше времени, чем 1, 2, 5, 10, 24, 72 или больше часов до удвоения количества, или которые совершенно не могут расти в культуре. Таким образом, анализ согласно настоящему изобретению можно использовать для обнаружения, количественного определения и/или отслеживания полезных микроорганизмов, таких как *pasteuria*, а также патогенов, которые вызывают позеленение цитрусовых и заболевания «зебра-чипсы». Также можно обнаруживать вирусы.

Захватываемые молекулы для таких сложно поддающихся культивированию микроорганизмов могут основываться на антигенах, идентифицированных, как описано выше, а также путем метагеномного секвенирования. Метагеномика представляет собой исследование генетического материала, восстановленного непосредственно из проб окружающей среды. Для общепринятого секвенирования необходима культура идентичных клеток в качестве источника ДНК. Тем не менее, многие микроорганизмы в пробах окружающей среды не могут быть культивированы, и, следовательно, не могут быть секвенированы. Преимущества в биоинформатике, усовершенствования амплификации ДНК и повышение вычислительных возможностей значительно способствовали анализам последовательностей ДНК, восстановленных из проб окружающей среды, предоставляя возможность адаптации дробного секвенирования к метагеномным пробам. Случайный характер дробного секвенирования обеспечивает, что многие из этих организмов, которые в других способах будут незамеченными, используя традиционные технологии культивирования, путем представлены по меньшей мере в виде нескольких сегментов последовательностей.

Геномы патогенных микроорганизмов часто содержат островки патогенности, приобретенные путем горизонтального переноса генов. Эти островки генов инкорпорируют в геном патогенных организмов, но они типично отсутствуют из непатогенных родственных видов. ДНК последовательности островков патогенности часто кодируют факторы вирулентности, которые являются чрезвычайно хорошими мишенями для специфических антител. Эти последовательности островков патогенности могут быть идентифицированы с помощью биоинформационного анализа, субклонированы, экспрессированы и использоваться в качестве чистого антигена для создания антител.

Первая стадия анализа метагеномных данных часто охватывает осуществление определенных стадий предварительной фильтрации, включая удаление дублирующих, низкокачественных последовательностей и последовательностей возможно эукариотического происхождения. После этого, в метагеномном анализе типично используют два подхода для аннотации кодирующих участков в собранном контиге. Первый подход состоит в идентификации генов на основании гомологии с генами, которые уже общедоступны в базах данных последовательностей, путем простых BLAST поисков. Второй подход, неэмпирический, использует сущностные характеристики последовательности для предсказания кодирующих участков на основании обучающих последовательностей генов из родственных организмов. Этот подход используется такими программами, как GeneMark и GLIMMER. Этот подход облегчает обнаружение кодирующих участков, для которых отсутствуют гомологи в базах данных последовательностей.

Метагеномное секвенирование особенно предпочтительно пригодно для исследования вирусных сообществ. Поскольку в вирусах отсутствует совместно используемый универсальный филогенетический маркер (как 16S РНК для бактерий и археобактерий, и 18S РНК для эукариот), то единственным путем для доступа к генетическому разнообразию вирусного сообщества из пробы окружающей среды является путем метагеномики.

В соответствии с настоящим изобретением, метагеномное секвенирование может быть осуществлено, например, на пробе листьев, имеющий комплексную смесь микроорганизмов. Метагеномное секвенирование можно использовать для идентификации кодирующих последовательностей ДНК, которые впоследствии могут быть клонированы и сконструированы для экспрессии пептидов и/или полноразмерных белков, которые впоследствии можно использовать для создания антител для применения в анализах бокового сдвига (или других анализов) для обнаружения, количественного определения и/или отслеживания неспособного к культивированию микроорганизма.

В одном варианте осуществления, поверхность нанокристаллов может быть покрыта модификатором поверхности, например, полимерами, такими как полиакриловая кислота и сополимеры, такие как малеиновая кислота/полиакриловая кислота и блок-сополимеры, или слой инертного диоксида кремния для предоставления возможности или улучшения конъюгации захватываемой молекулы к поверхности частицы. Нанокристаллы, конъюгированные с каждым типом захватываемой молекулы, имеют уникальную и единообразную морфологию, размер и/или состав, продуцируя уникальный оптический характерный признак продолжительности жизни.

В одном варианте осуществления, конъюгацию захватываемой молекулы осуществляют с использованием способа, известного в данной области техники. В основном, конъюгацию осуществляют с применением активирующего реагента карбоновой кислоты для связывания с нуклеофилами. В специфическом варианте осуществления, конъюгацию захватываемых молекул осуществляют с помощью N-гидроксисукцинимид (NHS) и/или Сульфо-NHS для приготовления аминокреакционноспособных сложных эфиров карбоксилатных групп для химического мечения, перекрестного сшивания и твердофазной иммобилизации. Дополнительно к NHS сложным эфирам и тиолам, сложные имидоэфиры также можно использовать в качестве аминокреактивных функциональных групп, которые инкорпорированы в реагенты для перекрестного сшивания и мечения белков.

Форматы анализов

В специфических вариантах осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают стадию, с помощью которой целевые микроорганизмы и/или агенты на основе микроорганизмов в пробе окружающей среды становятся прикрепленными, или другим образом связанными, с субстратом. Эту стадию также можно осуществлять, например, путем обработки поверхности субстрата с помощью захватываемых молекул, например, антител, белков, нуклеотидов и других соединений, которые специфически распознают целевой микроорганизм и/или агент на основе микроорганизма. Захватываемые молекулы могут представлять собой одинаковые или различные молекулы, используемые для функционализации поверхности нанокристаллов к специфическому захвату мишени, представляющей интерес.

Стадию разделения в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять с помощью способов, хорошо известных в данной области техники. Метод разделения может включать, но не ограничиваясь только ими, промывку, перфузию и диализ.

Несмотря на то, что в основном не является необходимым, в определенных вариантах осуществления согласно настоящему изобретению, технологии обогащения, такие как применение парамагнитных UCNC, можно использовать для обогащения пробы, таким образом дополнительно усиливая чувствительность и/или селективность.

А. Анализы бокового сдвига

В предпочтительном варианте осуществления, в настоящем изобретении используют анализ бокового сдвига, который применяется для тестирования наличия, отсутствия и/или количественного определения представляющего интерес аналита в пробе. В одном варианте осуществления используют “сэндвич” анализ, согласно
5 которому антитело (или другую связывающую жидкость) иммобилизуют на твёрдой подложке для захвата целевого аналита, таким образом облегчая обнаружение и/или количественное определение путем наблюдения связанного аналита.

В одном варианте осуществления, анализ согласно изобретению осуществляют на тестовой полоске бокового сдвига. Тестируемые полоски бокового сдвига имеют твёрдую
10 подложку, на которой расположены зона приема пробы и целевая зона (ы) захвата. Твёрдая подложка также обеспечена для капиллярного тока пробы из зоны приема пробы в целевую зону (ы) захвата, где тестируемая полоска бокового сдвига подвергается воздействию подходящей несущей жидкости пробы. Материалы для такой твёрдой подложки могут представлять собой, например, органические или неорганические
15 полимеры, и природные и синтетические полимеры. Более специфические примеры подходящих твёрдых подложек включают, но не ограничиваясь только ими, стекловолокно, целлюлозу, нейлон, поперечно-сшитый декстран, различные хроматографические бумаги, DiomatTM и нитроцеллюлоза. В предпочтительном варианте осуществления, материал твёрдой подложки представляет собой нитроцеллюлозу. В
20 дальнейшем варианте осуществления, тестируемые полоски бокового сдвига могут содержать одну или несколько целевых зон захвата.

В одном варианте осуществления, тестируемые полоски бокового сдвига сконструированы для применения с устройством, которого направляет предпочтительную длину волны света, например, инфракрасного, видимого, УФ света, или с электронным
25 пучком, и, в свою очередь, захватывает отраженную длину волны, испускаемую нанокристаллами при стимуляции. Такое устройство предпочтительно представлено в портативной форме.

В дальнейшем варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает чрезвычайно чувствительную, специфическую и способную к количественному
30 определению диагностическую платформу, использующую анализ бокового сдвига с редкоземельными нанокристаллами, связанными с олигонуклеотидами или антителами, способную считываться, например, с помощью камеры мобильного телефона. Для анализа отсутствует необходимость амплификации ДНК и его можно применять для обнаружения большого количества различных сельскохозяйственных патогенов. В специфическом

примере, анализ можно использовать для обнаружения *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (бактериальный ожог) у маниоки.

Способы обнаружения сельскохозяйственных болезней исторически требовали проведения лабораторных анализов, ограничивая их применение в установках с ограниченными ресурсами. Традиционные анализы бокового сдвига, несмотря на то, что более легко используются в полевых условиях, типично являются менее чувствительными, чем лабораторные способы, такие как ПЦР. Когда оптическое считывающее устройство комбинируют с анализом бокового сдвига, то на порядок улучшают величину измерения по сравнению с визуальным снятием показаний; однако оптические считывающие устройства являются непомерно дорогостоящими для применения пользователями.

В одном варианте осуществления, анализ согласно настоящему изобретению решает эту проблему путем использования нанокристаллов, конъюгированных с олигонуклеотидами, которые затем используют в формате анализа бокового сдвига. Высокая эффективность и чувствительность нанокристалла устраняет необходимость стадии амплификации ДНК и применения оптического считывающего устройства. Более того, считыватель может использовать некомплексную технологию, такую как светодиодный фонарик и камеру. Фонарик и камера могут представлять собой, например, те, которые обычно находятся в стандартном мобильном телефоне.

Благоприятно, запись результатов с помощью мобильного телефона (или сходного устройства) облегчает передачу и обобщение данных. Это можно использовать для создания более сбалансированного набора данных, из которого, например, с помощью компьютерного считывания можно получать данные для лучшего предсказания вспышек сельскохозяйственных болезней.

В специфическом варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает формат анализа бокового сдвига, в котором нанокристаллы в обнаруживаемой метке составляют преобразующий с повышением частоты фосфорный репортер. Последующая потоковая методика предоставляет возможность применения репортера, такого как нанокристаллы, покрытые захватываемыми молекулами. В определенных вариантах осуществления, скорость течения может быть более быстрой, а время истечения более коротким по сравнению с общепринятыми анализами.

Твёрдая подложка обеспечивается для капиллярного истечения пробы из зоны приема пробы в целевые зоны захвата, когда тестируемая полоска бокового сдвига подвержена воздействию подходящей несущей жидкости пробы.

В одном варианте осуществления, тестируемые полоски бокового сдвига или микроструйные устройства могут содержать одну или несколько зон приема образцов/каналов, которые предоставляют возможность применения множественных проб. Каждая из проб может содержать различный аналит, или могут содержать
 5 одинаковый аналит. В другом варианте осуществления, зона приема пробы содержит абсорбирующую прокладку, которая может быть импрегнирована буферными солями и поверхностно-активными веществами, которые делают пробу подходящей для взаимодействия с обнаруживающей системой.

В дальнейшем варианте осуществления, тестируемые полоски бокового сдвига
 10 могут содержать одну или несколько целевых зон захвата. Поверхность зон захвата модифицирована с помощью компонента, который специфически связывается с представляющим интерес аналитом, например, микроорганизмом или агентом на основе микроорганизмов в пробе окружающей среды. Модификацию поверхности зон захвата можно осуществлять путем связывания твердой подложки, например, с антителами,
 15 белками, нуклеотидами и/или другими соединениями. Такая модификация может представлять собой такую же модификацию или другую модификацию, применяемую к нанокристаллами. Каждая из зон захвата аналита может связывать различные виды аналита, или может связывать одинаковые виды аналита. В тестируемых полосках бокового сдвига, где каждая из зон захвата аналита связывает одни и те же виды аналита,
 20 связывание может происходить при различных концентрациях аналита. Зона захвата может иметь любую форму, до тех пор, пока она протягивает поток пробы и растворителя из зоны приема пробы с помощью зон захвата аналита.

В одном варианте осуществления, тестируемые полоски бокового сдвига проявляют толерантность для изменений значений pH (например, pH 2-12), ионной силы,
 25 вязкости и биологических матриц, способствуя малому количеству, если вообще присутствуют, ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Преобразующая с повышением частоты люминесценция основана на поглощении двух или более низкоэнергетических (большая длина волны, типично инфракрасных) фотонов с помощью нанокристалла с последующим испусканием единственного
 30 высокоэнергетического (более короткая длина волны) фотона. Некоторые аспекты анализов бокового сдвига с использованием UCP были описаны в Corstjens и др. (2014), Feasibility of Lateral Flow Test for Neurocysticercosis Using Novel Up-Converting Nanomaterials and a Lightweight Strip Analyzer, PloS Negl. Trop. Dis. 8(7):e2944, которая полностью включена в настоящую заявку в качестве ссылки.

В. ПЦР анализы

В другом варианте осуществления, материалы и способы согласно настоящему изобретению комбинируют с ПЦР процедурами для создания высокочувствительного анализа. Включение равных по размерам нанокристаллов UCP в ПЦР продукты, созданные путем амплификации, используя один (или оба) ПЦР праймер(а), связанных с нанокристаллами на 5' конце олигонуклеотидных праймеров, обеспечивает лучшие характеристики анализов при сравнении со стандартными репортерными молекулами, используемыми для обнаружения.

Благоприятно, в отличие от обычно используемым репортерных молекул (например, щелочной фосфатазы и пероксидазы хрена), сигналы, продуцируемые из нанокристаллов, позволяют избежать фоновой флуоресценции и отсутствия интерференции с другими биологическими молекулами. Дополнительно, поскольку UCP сигнал продолжается вплоть до 20 лет, то сигнал может быть временно интегрирован для повышения чувствительности анализа. Благоприятно, однородность размера и морфологии нанокристаллов предоставляет возможность стехиометрического связывания UCP с олигонуклеотидом, что улучшает чувствительность, количественное определение и динамический диапазон анализа.

Дополнительно, пары нанокристаллического репортера с комплементарными оптическими свойствами можно использовать в различных однородных системах и анализах, созданных для определения совместной локализации специфических целевых маркеров на единичной последовательности, белку, клетке и др. Комплементарные пары нанокристаллов проявляют уникальные оптические свойства, таким образом, что в непосредственной близости друг к другу, испускание из нанокристалла А будет активировать нанокристалл В. В специфическом примере, композиция $\text{NaYF}_4:\text{YbTm}$, имеющая возбуждение при 980 нм и испускание при 800 нм, может возбуждать композицию $\text{NaYF}_4:\text{YbTmNd}$, имеющую возбуждение при 808 нм и уровень испускания приблизительно при 980 нм.

Оптически комплементарные нанокристаллические репортеры предоставляют возможность (1) идентификации совместно локализованных мишеней, (2) идентификации специфических событий связывания в гомогенной смеси (без разделения), и (3) мультиплексной идентификации присутствия маркеров вместе со специфическими олигонуклеотидными последовательностями, а совместно локализованных. Для анализа мишеней, которые предположительно являются малозаметными целевыми числами, можно легко внедрять недорогостоящую концентрацию целевых видов, используя, например, хорошо известные технологии на основе магнитных микроносителей.

С. Мульти-луночные анализы

В другом варианте осуществления, анализ согласно изобретению можно осуществлять в мульти-луночных наборах, например, 8, 12, 24, 48, 96, 192, 384--луночных наборах, с настройками высокой пропускной способности.

Аналиты

Настоящее изобретение обеспечивает способы и устройства для эффективного и точного обнаружения, количественного определения и/или отслеживания микроорганизмов, агентов на основе микроорганизмов, и/или других аналитов в пробах окружающей среды.

Аналиты могут представлять собой микроорганизмы, агенты на основе микроорганизмов и/или аналиты, обусловленные присутствием или активностью микроорганизмов. Микроорганизмы могут представлять собой полезные микроорганизмы или патогены, включая сельскохозяйственные патогены.

Микроорганизмы, которые могут быть обнаружены, количественно определены и/или отслежены в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваясь только ими, бактерии, археобактерии, дрожжи, грибы, вирусы, простейшие и многоклеточные организмы. Агенты на основе микроорганизмов, которые могут быть аналитами в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваясь только ими, композицию, содержащую микроорганизмы, метаболиты микроорганизмов и другие побочные продукты роста микроорганизмов. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы обнаружения продукта, продуцируемого организмом (таким как животное или растение) в ответ на микроорганизм и/или агент на основе микроорганизма.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение дополнительно обеспечивает способы обнаружения продукта, продуцируемого структурой (таким как животное или растение) в ответ на микроорганизм и/или агент на основе микроорганизма.

В одном варианте осуществления, способ обнаруживает продукт, продуцируемый структурой, инфицированным сельскохозяйственным патогеном. Структура может представлять собой растение или часть растения, включая листок, стебель, корень и цветок. Проба окружающей среды может включать, но не ограничиваясь только ими, растворимые растительные экстракты и нерастворимый растительный экстракт.

В определенных вариантах осуществления, продукт, продуцируемый организмом в ответ на микроорганизм и/или агент на основе микроорганизма, может представлять

собой белок, полипептид, нуклеотид и/или другую молекулу. Продукт может секретироваться в пробу из окружающей среды или пробу пищевых продуктов.

А. Полезные микроорганизмы

5 Микроорганизмы, которые могут быть обнаружены в соответствии с настоящим изобретением включают, но не ограничиваясь только ими, бактерии, архебактерии, дрожжи, грибы, вирусы, простейшие, или многоклеточные организмы.

В одном варианте осуществления, микроорганизмы представляют собой бактерии, включая грамположительные и грамотрицательные бактерии. Эти бактерии могут представлять собой, но не ограничиваясь только ими, например, *Escherichia coli*, *Rhizobium* (например, *Rhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*, и *Rhizobium etli*), *Bradyrhizobium* (например, *Bradyrhizobium japonicum*, и *B. parasponia*), *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquifaciens*), *Azobacter* (например, *Azobacter vinelandii*, и *Azobacter chroococcum*), *Arhrobacter* (например, *Agrobacterium radiobacter*), *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* (Kluyver)), *Azospirillum* (например, *Azospirillum brasiliensis*), *Azomonas*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Klebsiella*, *Clavibacter* (например, *C. xyli subsp. xyli* и *C. xyli subsp. cynodontis*), цианобактерии, *Pantoea* (например, *Pantoea agglomerans*), *Sphingomonas* (например, *Sphingomonas paucimobilis*), *Streptomyces* (например, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces aureus*, и *Streptomyces kasugaensis*), *Streptoverticillium* (например, *Streptoverticillium rimofaciens*), *Ralslonia* (например, *Ralslonia eulropha*), *Rhodospirillum* (например, *Rhodospirillum rubrum*), *Xanthomonas* (например, *Xanthomonas campestris*), *Erwinia* (например, *Erwinia carotovora*), *Clostridium* (например, *Clostridium bravidaciens*, и *Clostridium malacusomae*), и их комбинации.

В определенных вариантах осуществления, способы используются для обнаружения и/или отслеживания *Bacillus subtilis* в окружающей среде. В одном варианте осуществления, микроорганизм включает штаммы *Bacillus subtilis*, такие как, например, *B. subtilis* var. *locuses* штаммы В1 и В2, которые являются эффективными продуцентами сурфактина.

В одном варианте осуществления, микроорганизм представляет собой грибы (включая дрожжи), включая, но не ограничиваясь только ими, например, *Starmerella*, *Mycorrhiza* (например, везикулярная-древовидная микориза (VAM), древовидная микориза (AM)), *Mortierella*, *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Thraustochytrium*, *Penicillium*, *Phythium*,

Entomophthora, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium venenatum*, *Aspergillus*, *Trichoderma* (например, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum*, *T. viride* и *T. hamatum*), виды *Rhizopus*, эндофитные грибы (например, *Piriformis indica*), *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii sequela* и *Saccharomyces torula*), *Debaromyces*,
 5 *Issalchenkia*, *Kluyveromyces* (например, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*), *Pichia spp* (например, *Pichia pastoris*), дрожжи-убийцы, такие как *Wickerhamomyces* (например, *Wickerhamomyces anomalus*) и их комбинации.

Более специфически, способ можно использовать для обнаружения одного или нескольких жизнеспособных грибковых штаммов, способных бороться с вредителями, к
 10 биоремедиации, усилить восстановлению масла и других полезных целей, например, *Starmerella bombicola*, *Candida apicola*, *Candida batistae*, *Candida floricola*, *Candida riidocensis*, *Candida stellate*, *Candida kuoi*, *Candida sp. NRRL Y-27208*, *Rhodotorula bogoriensis sp.*, *Wickerhamiella dimericqiae*, а также любые другие штаммы, продуцирующие софоролипид, филогенетической ветки *Starmerella*.

В другом варианте осуществления, микроорганизм представляет собой дрожжи. Различные виды дрожжей являются подходящими для продуцирования в соответствии с настоящим изобретением, включая, но не ограничиваясь только ими, *Saccharomyces* (например, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii sequela* и *Saccharomyces torula*), *Debaromyces*, *Issalchenkia*, *Kluyveromyces* (например, *Kluyveromyces lactis*,
 20 *Kluyveromyces fragilis*), *Pichia spp* (например, *Pichia pastoris*), и их комбинации.

В определенных вариантах осуществления, микроорганизмы могут быть выбраны из штаммов дрожжей-убийц. В другом варианте осуществления, микроорганизмы представляют собой штаммы *Wickerhamomyces anomalus*.

Wickerhamomyces anomalus, также известен как *Pichia anomala* и *Hansenula*
 25 *anomala*, часто связан с производством пищевых продуктов и зерна. Он способен расти в различных источниках углерода при низком значении pH, при высоком осмотическом давлении, и при небольшом содержании кислорода или без кислорода, предоставляя возможность его выживания с различных условиях окружающей среды.

В специфических вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает
 30 способ обнаружения штамма дрожжей *W. anomalus* и его мутанты в окружающей среде. Процедуры для получения мутантов хорошо известны в области микробиологии. Например, с этой целью в широких масштабах используются ультрафиолет и нитрозогуанидин. В одном варианте осуществления, микроорганизм представляет собой дрожжи филогенетической ветки *Starmerella*, такие как *Starmerella bombicola*.

В одном варианте осуществления, микроорганизм представляет собой археобактерии, или эубактерии, включая, но не ограничиваясь только ими, *Methanобактерии*, *Methanococci*, *Methanomicrobia*, *Methanopyri*, *Halобактерии*, *Halococci*, *Thermococci*, *Thermoplasmata*, *Thermoproetoi*, *Psychrobacter*, *Arthrobacter*, *Halomonas*,
 5 *Pseudomonas*, *Hyphomonas*, *Sphingomonas*, *Archaeoglobi*, *Nanohaloархеобактерии*, экстремофильные археобактерии, такие как термофилы, галофилы, ацидофилы, и психрофилы, и их комбинации.

В одном варианте осуществления, микроорганизм представляет собой вирус, включая, но не ограничиваясь только ими, аденовирус, цитомегаловирус, вирусы
 10 семейства вирусов герпеса, ветряную оспу, грипп, риновирус, корь, паротит, энтеровирусы и другие.

В специфических вариантах осуществления, микроорганизмы для продукции SLP могут представлять собой виды *Candida*, виды *Cryptococcus*, *Cyberlindnera samutprakarnensis* JP52 (T), *Pichia anomala*, виды *Rhodotorula* или виды *Wickerhamiella*.

15 В дальнейших специфических вариантах осуществления, микроорганизмы для продукции MEL могут представлять собой виды *Pseudozyma*, виды *Candida*, виды *Ustilago*, виды *Schizonella* или виды *Kurtzmanomyces*.

Другие штаммы микроорганизмов, включая, например, другие штаммы микроорганизмов, способных расщеплять полимеры или накапливать существенные
 20 количества, например, гликолипид-биологических поверхностно-активных веществ, ферментов, растворителей, или других полезных метаболитов, также можно использовать в соответствии с настоящим изобретением. Например, полезные метаболиты в соответствии с настоящим изобретением включают маннопротеин, бета-глюкан и другие метаболиты, которые имеют био-эмульгирующие свойства и свойства уменьшать
 25 поверхностное/межфазное натяжение.

В. Патогены

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение обеспечивает способы обнаружения патогенов в пробах окружающей среды. Патогены могут включать, но не
 30 ограничиваясь только ими, представителя любого из рода *Yersinia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Eberthella*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Bacteroides*, *Listeria*, *Erysipelothrix*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Pasteurella*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*,

Streptobacillus, Calymmatobacterium, Legionella, Treponema, Borrelia, Leptospira, Actinomyces, Nocardia, Rickettsia, Micrococcus, Mycobacterium, Neisseria или *Campylobacter*.

Патогены также могут включать, но не ограничиваясь только ими, патогенный вирус, такой как, представитель папилломавирусов, парвовирусов, аденовирусов, герпесвирусов, вируса коровьей оспы, арена аренавирусов, коронавирусов, риновирусов, респираторно-синцитиальных вирусов, вирусов гриппа, пикорнавирусов, парамиксовирусов, реовирусов, ретровирусов, рабдовирусов или вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

Патогены дополнительно могут включать, но не ограничиваясь только ими, представителя любого из рода *Taenia, Hymenolepsis, Diphyllbothrium, Echinococcus, Fasciolopsis, Heterophyes, Metagonimus, Clonorchis, Fasciola, Paragonimus, Schistosoma, Enterobius, Trichuris, Ascaris, Ancylostoma, Necator, Wuchereria, Brugi, Loa, Onchocerca, Dracunculus, Naegleria, Acanthamoeba, Plasmodium, Trypanosoma, Leishmania, Toxoplasma, Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, Enterocytozoa, Strongyloides* или *Trichinella*.

В соответствии с настоящим изобретением, патогены могут включать, но не ограничиваясь только ими, грибы, такие как, например, трихофития, гистоплазмоз, бластомикоз, аспергиллёз, криптококкоз, споротрихоз, кокцидиоидомикоз, паракокцидиоидомикоз, мукомикоз, кандидоз, дерматомикоз, прототеккоз, питириаз, мицетома, паракокцидиоидомикоз, феогифомикоз, *Pseudallescheriasis*, трихоспория или пневмоцистоз.

В одном варианте осуществления, патогены в соответствии с настоящим изобретением могут включать, но не ограничиваясь только ими, вирус папулезного стоматита крупного рогатого скота (BPSV), вирус герпеса крупного рогатого скота (BVH), вирусную диарею крупного рогатого скота (BVD), вирус ящура (FMDV), вирус болезни синего языка (BTV), вирус везикулярной болезни свиней (SVD), вирус репродуктивно-респираторного синдрома у свиней (PRRS), вирус везикулярного стоматита (VSV) и везикулярную экзантему вируса свиней (VESV).

В специфических вариантах осуществления, патоген в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой *Neisseria meningitides, Streptococcus agalactiae, Staphylococcus aureus, Porphyromonas gingivalis, Chlamydia pneumoniae, Bacillus anthracis, Streptococcus suis, Echinococcus granulosus, Streptococcus sanguinis*, и *Helicobacter pylori*.

В одном варианте осуществления, патоген в соответствии с настоящим изобретением может продуцировать токсические молекулы, которые представляют угрозу для здоровья человека и роста сельскохозяйственных структур. Например, *Aspergillus flavus* и *Aspergillus parasiticus* продуцируют афлатоксин B1 (AFB1), чрезвычайно

токсичный афлатоксин, который может загрязнять зерновые культуры и другие сельскохозяйственные культуры, такие как арахис, кукуруза, рис и соя. Другие токсины, продуцируемые патогеном, включают, но не ограничиваясь только ими, охратоксин А, ботулинический токсин, токсин Шига 1, токсин Шига 2 и стафилококковый энтеротоксин В.

Растения

Растения, которые можно тестировать в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, включают: пропашные культуры (например, кукуруза, соя, сорго, арахис, картофель, и др.), полевые культуры (например, люцерна, пшеница, зерновые и др.), древесные культуры (например, волошский орех, миндальный орех, пекан, фундук, фисташки и др.), цитрусовые культуры (например, апельсин, лимон, грейпфрут и др.), плодовые культуры (например, яблоки, груши и др.), травяные культуры, декоративные культуры (например, цветущие растения, вьющиеся растения и др.), овощные культуры (например, томаты, морковь др.), лозовые культуры (например, виноград, земляника, черника, ежевика и др.), лесные культуры (например, сосна, ель, эвкалипт, тополь и др.), организованные пастбища (любая смесь растений, используемая для поддержания пастбищных животных).

Дальнейшие растения, которые могут иметь преимущества от продуктов и способов согласно изобретению, включают все растения, которые относятся к суперсемейству Viridiplantae, в особенности, однодольные и двудольные растения, включая кормовые или бобовые культуры, декоративные растения, продовольственные сельскохозяйственные культуры, деревья или кустарники, выбранные, в частности, из следующей группы: виды *Acer*, виды *Actinidia*, виды *Abelmoschus*, *Agave sisalana*, виды *Agropyron*, *Agrostis stolonifera*, виды *Allium*, виды *Amaranthus*, *Ammophila arenaria*, *Ananas comosus*, виды *Annona*, *Apium graveolens*, виды *Arachis*, виды *Artocarpus*, *Asparagus officinalis*, виды *Avena* (например, *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida*), *Averrhoa carambola*, *Bambusa* sp., *Benincasa hispida*, *Bertholletia excelsea*, *Beta vulgaris*, виды *Brassica* (например, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [канола, масличный рапс, репа масличная]), *Cadaba farinosa*, *Camellia sinensis*, *Canna indica*, *Cannabis sativa*, виды *Capsicum*, *Carex elata*, *Carica papaya*, *Carissa macrocarpa*, виды *Carya*, *Carthamus tinctorius*, виды *Castanea*, *Ceiba pentandra*, *Cichorium endivia*, виды *Cinnamomum*, *Citrullus lanatus*, виды *Citrus*, виды *Cocos*, виды *Coffea*, *Colocasia esculenta*, виды *Cola*, *Corchorus* sp., *Coriandrum sativum*, виды *Corylus*, виды *Crataegus*, *Crocus sativus*, виды *Cucurbita*, виды *Cucumis*, виды *Cynara*, *Daucus carota*, виды *Desmodium*, *Dimocarpus longan*,

виды *Dioscorea*, виды *Diospyros*, виды *Echinochloa*, *Elaeis* (например, *Elaeis guineensis*,
Elaeis oleifera), *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Erianthus* sp., *Eriobotrya japonica*, *Eucalyptus*
 sp., *Eugenia uniflora*, виды *Fagopyrum*, виды *Fagus*, *Festuca arundinacea*, *Ficus carica*, виды
Fortunella, виды *Fragaria*, *Ginkgo biloba*, виды *Glycine* (например, *Glycine max*, *Soja hispida*
 5 или *Soja max*), *Gossypium hirsutum*, виды *Helianthus* (например, *Helianthus annuus*),
Hemerocallis fulva, виды *Hibiscus*, виды *Hordeum* (например, *Hordeum vulgare*), *Ipomoea*
batatas, виды *Juglans*, *Lactuca sativa*, виды *Lathyrus*, *Lens culinaris*, *Linum usitatissimum*,
Litchi chinensis, виды *Lotus*, *Luffa acutangula*, виды *Lupinus*, *Luzula sylvatica*, *Lycopersicon*
 виды (например, *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon*
 10 *pyriforme*), виды *Macrotyloma*, виды *Malus*, *Malpighia emarginata*, *Mammea americana*,
Mangifera indica, виды *Manihot*, *Manilkara zapota*, *Medicago sativa*, виды *Melilotus*, виды
Mentha, *Miscanthus sinensis*, виды *Momordica*, *Morus nigra*, виды *Musa*, виды *Nicotiana*,
 виды *Olea*, виды *Opuntia*, виды *Ornithopus*, виды *Oryza* (например, *Oryza sativa*, *Oryza*
latifolia), *Panicum miliaceum*, *Panicum virgatum*, *Passiflora edulis*, *Pastinaca sativa*, *Pennisetum*
 15 sp., виды *Persea*, *Petroselinum crispum*, *Phalaris arundinacea*, виды *Phaseolus*, *Phleum*
pratense, виды *Phoenix*, *Phragmites australis*, виды *Physalis*, виды *Pinus*, *Pistacia vera*, виды
Pisum, виды *Poa*, виды *Populus*, виды *Prosopis*, виды *Prunus*, виды *Psidium*, *Punica granatum*,
Pyrus communis, виды *Quercus*, *Raphanus sativus*, *Rheum rhabarbarum*, виды *Ribes*, *Ricinus*
communis, виды *Rubus*, виды *Saccharum*, *Salix* sp., виды *Sambucus*, *Secale cereale*, виды
 20 *Sesamum*, *Sinapis* sp., виды *Solanum* (например, *Solanum tuberosum*, *Solanum integrifolium*
 или *Solanum lycopersicum*), *Sorghum bicolor*, виды *Spinacia*, виды *Syzygium*, виды *Tagetes*,
Tamarindus indica, *Theobroma cacao*, виды *Trifolium*, *Tripsacum dactyloides*, *Triticosecale*
rimpaui, виды *Triticum* (например, *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*,
Triticum hybernum, *Triticum macha*, *Triticum sativum*, *Triticum monococcum* или *Triticum*
 25 *vulgare*), *Tropaeolum minus*, *Tropaeolum majus*, виды *Vaccinium*, виды *Vicia*, виды *Vigna*,
Viola odorata, виды *Vitis*, *Zea mays*, *Zizania palustris*, виды *Ziziphus*.

Дальнейшие примеры растений, представляющих интерес, включают, но не
 ограничиваясь только ими, кукурузу (*Zea mays*), *Brassica* sp. (например, *B. napus*, *B. rapa*,
B. juncea), с особенностями те виды *Brassica*, которые пригодны в качестве источников масла
 30 из семян растений, люцерну (*Medicago sativa*), рис (*Oryza sativa*), рожь (*Secale cereale*), сорго
 (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), просо (например, дохн (*Pennisetum glaucum*), просо
 обыкновенное (*Panicum miliaceum*), просо итальянское (*Setaria italica*), просо пальчатое
 (*Eleusine coracana*)), подсолнечник (*Helianthus annuus*), сафлор (*Carthamus tinctorius*),
 пшеница (*Triticum aestivum*), сою (*Glycine max*), табак (*Nicotiana tabacum*), картофель
 35 (*Solanum tuberosum*), арахис (*Arachis hypogaea*), хлопчатник (*Gossypium barbadense*,

Gossypium hirsutum), батат (*Ipomoea batatas*), маниок (*Manihot esculenta*), кофе (виды *Coffea*), кокос (*Cocos nucifera*), ананас (*Ananas comosus*), цитрусовые деревья (виды *Citrus*), какао (*Theobroma cacao*), чай (*Camellia sinensis*), банан (виды *Musa*), авокадо (*Persea americana*), инжир (*Ficus casica*), гуава (*Psidium guajava*), манго (*Mangifera indica*),
 5 оливки (*Olea europaea*), папайю (*Carica papaya*), ценью (*Anacardium occidentale*), макадамию (*Macadamia integrifolia*), миндаль (*Prunus amygdalus*), сахарную свеклу (*Beta vulgaris*), сахарный тростник (виды *Saccharum*), овес, ячмень, овощные культуры, декоративные культуры и хвойные культуры.

Овощные культуры включают томаты (*Lycopersicon esculentum*), салат-латук
 10 (например, *Lactuca sativa*), стручковую фасоль (*Phaseolus vulgaris*), лимскую фасоль (*Phaseolus limensis*), горох (виды *Lathyrus*), и представителей рода *Cucumis*, такие как огурец (*C. sativus*), каталуп (*C. cantalupensis*), и мускусная дыня (*C. melo*). Декоративные культуры включают азалию (виды *Rhododendron*), гортензию (*Macrophylla hydrangea*), гибискус (*Hibiscus rosasanensis*), розы (виды *Rosa*), тюльпаны (виды *Tulipa*), нарциссы
 15 (виды *Narcissus*), петунии (*Petunia hybrida*), гвоздику (*Dianthus caryophyllus*), пуанзецию (*Euphorbia pulcherrima*) и хризантему. Хвойные растения, которые могут применяться при практическом осуществлении изобретения, включают, например, сосны, такие как сосна ладанная (*Pinus taeda*), сосна Эллиота (*Pinus elliotii*), сосна орегонская (*Pinus ponderosa*), сосна скрученная широкохвойная (*Pinus contorta*) и сосна лучистая (*Pinus radiata*);
 20 дугласовая пихта (*Pseudotsuga menziesii*); тсуга западная (*Tsuga canadensis*); ель ситхинская (*Picea glauca*); красное дерево (*Sequoia sempervirens*); настоящие пихты, такие как серебристая пихта (*Abies amabilis*) и пихта бальзамическая (*Abies balsamea*); и туи, такие как туя гигантская (*Thuja plicata*) и каллитропис нутканский (*Chamaecyparis nootkatensis*). Растения согласно вариантам осуществления включают
 25 сельскохозяйственные культуры (например, кукурузу, люцерну, подсолнечник, капусту, сою, хлопчатник, сафлору, арахис, сорго, пшеницу, просо, табак и др.), такие как растения кукурузы и сои.

Газонные травы включают, но не ограничиваясь только ими: мятлик однолетний (*Poa annua*); райграс однолетний (*Lolium multiflorum*); мятлик сплюснутый (*Poa compressa*); овсяница красная (*Festuca rubra*); колониальная полевица (*Agrostis tenuis*);
 30 полевица болотная (*Agrostis palustris*); житняк гребенчатый (*Agropyron desertorum*); пырей пустынный (*Agropyron cristatum*); овсяница жестковатая (*Festuca longifolia*); мятлик луговой (*Poa pratensis*); ежа обыкновенна (*Dactylis glomerate*); райграсс пастбищный (*Lolium perenne*); овсяница красная (*Festuca rubra*); полевица белая (*Agrostis alba*); мятлик
 35 обыкновенный (*Poa trivialis*); овсяница овечья (*Festuca ovine*); сглаженный костер (*Bromus*

inermis); овсяница тростниковая (*Festuca arundinacea*); тимopheевка (*Phleum pratense*); бархатная полевица (*Agrostis canina*); бескильница плакучая (*Puccinellia distans*); пырей Сми́та (*Agropyron smithii*); бермудская трава (виды *Cynodon*); августинова трава (*Stenotaphrum secundatum*); цойсия японская (виды *Zoysia*); гречка заметная (*Paspalum notatum*); аксонопус афинский (*Axonopus affinis*); стоножковая трава (*Eremochloa ophiuroides*); кикуйя (*Pennisetum clandestinum*); паспалум приморский (*Paspalum vaginatum*); грамова трава (*Bouteloua gracilis*); бизонова трава (*Buchloe dactyloids*); бутелоуа коротконисходящая (*Bouteloua curtipendula*).

Растения, представляющие интерес, дополнительно включают зерновые растения, которые обеспечивают семена, представляющие интерес, масличные культуры и зернобобовые культуры. Семена, представляющие интерес включают семена зерновых культур, таких как кукуруза, пшеница, ячмень, рис, сорго, рожь, просо и др. Масличные культуры включают хлопчатник, сою, сафлору, подсолнечник, капусту, маис, люцерну, пальму, кокос, лен, клеверину, оливковое дерево и др. Зернобобовые культуры включают бобовые и горох. Бобовые включают гуаровые плоды, рожковое дерево, пажитник, сою, фасоль обыкновенную, вигну китайскую, маш, лимскую фасоль, стручковую фасоль, чечевицу, нут и др.

Заболевания растений

Примеры болезней растений, которые могут быть обнаружены в соответствии с настоящим изобретением, включают следующие:

Болезни пшеницы: фузариозная болезнь (*Fusarium graminearum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *Microdochium nivale*), туфулезная снежная болезнь (*Typhula* sp., *Micronectriella nivalis*), пыльная головня (*Ustilago tritici*, *U. nuda*), мокрая головня (*Tilletia caries*), пятнистость листьев (*Mycosphaerella graminicola*) и септориоз колосковой чешуи пшеницы (*Leptosphaeria nodorum*);

Болезни кукурузы: головня (*Ustilago maydis*) и бурая пятнистость листьев или плодов (*Cochliobolus heterostrophus*);

Болезни цитрусовых: меланоз (*Diaporthe citri*), парша (*Elsinoe fawcetti*), пенициллиумовая гниль (*Penicillium digitatum*, *P. italicum*), и позеленение цитрусовых (виды *Candidatus Liberibacter*);

Болезни яблок: монилиальная гниль (*Monilinia mali*), настоящая мучнистая роса (*Podosphaera leucotricha*), альтернариоз (*Alternaria alternata* яблочный патотип), парша (*Venturia inaequalis*), горькая гниль (*Colletotrichum acutatum*) и гниль корневой шейки (*Phytophthora cactorum*);

Болезни слив: парша (*Venturia nashicola*, *V. pirina*), чёрная пятнистость (*Alternaria alternata* патотип груши песчаной), ржавчина (*Gymnosporangium haraeum*) и фитофторозная плодовая гниль (*Phytophthora cactorum*);

5 Болезни персиков: бурая гниль (*Monilinia fructicola*), парша (*Cladosporium carpophilum*), и меланозная гниль (*Phomopsis* sp.);

Болезни винограда: антракноз (*Elsinoe ampelina*), гломереллёзная гниль (*Glomerella cingulata*), чёрная гниль (*Guignardia bidwellii*), ложная мучнистая роса (*Plasmopara viticola*) и серая гниль (*Botrytis cinerea*);

10 Болезни хурмы японской: антракноз (*Gloeosporium kaki*) и пятнистость листьев (*Cercospora kaki*, *Mycosphaerella nawae*);

Болезни растения семейства тыквенных: антракноз (*Colletotrichum lagenarium*), мишеневидная пятнистость листьев (*Corynespora cassiicola*), чёрная микосфереллёзная гниль тыквенных (*Mycosphaerella melonis*), фузариозный вилт (*Fusarium oxysporum*), ложная мучнистая роса (*Pseudoperonospora cubensis*) и фитофторозная гниль (*Phytophthora* sp.);

15

Болезни томатов: бурая пятнистость (*Alternaria solani*), плесень листвы (*Cladosporium fulvum*) и фитофторозная гниль (возбудители *Phytophthora*);

Болезни крестоцветных овощных культур: альтернариоз (*Alternaria japonica*), white spot (*Cercospora brassicae*) и ложная мучнистая роса (*Peronospora parasitica*);

20 Болезни рапса: прель (*Sclerotinia sclerotiorum*) и серая пятнистость листьев (*Alternaria brassicae*);

Болезни сои: пурпурное окрашивание семян (*Cercospora kikuchii*), *sphaceloma scad* (*Elsinoe glycines*), гниль бобов и стеблей (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*), ржавчина (*Phakopsora pachyrhizi*) и бурая гниль стеблей (*Phytophthora sojae*);

25 Болезни фасоли адзуки: серая гниль (*Botrytis cinerea*) и прель (*Sclerotinia sclerotiorum*);

Болезни обыкновенной фасоли: серая гниль (*Botrytis cinerea*), склеротиниозная гниль сеянцев (*Sclerotinia sclerotiorum*) и антракноз обыкновенной фасоли (*Colletotrichum lindemthianum*);

30 Болезни арахиса: пятнистость листьев (*Cercospora personata*), бурая пятнистость листьев (*Cercospora arachidicola*) и склероциальная южная гниль (*Sclerotium rolfsii*);

Болезни картофеля: бурая пятнистость (*Alternaria solani*) и фитофторозная гниль (возбудители *Phytophthora*);

Болезни хлопчатника: фузариозный вилт (*Fusarium oxysporum*);

Болезни табака: бурая пятнистость листьев или плодов (*Alternaria longipes*), антракноз (*Colletotrichum tabacum*), ложная мучнистая роса (*Peronospora tabacina*) и фитофтороз табака (*Phytophthora nicotianae*);

5 Болезни сахарного тростника: церкоспорозная пятнистость листьев (*Cercospora beticola*), пятнистость листьев (*Thanatephorus cucumeris*), корневая гниль (*Thanatephorus cucumeris*), и корневая гниль *Aphanomyces* (*Aphanidermatum cochlioides*);

Болезни роз: чёрная пятнистость (*Diplocarpon rosae*) и настоящая мучнистая роса (*Sphaerotheca pannosa*);

10 Болезни хризантемы и растений *asteraceous*: ложная мучнистая роса (*Bremia lactucae*) и пятнистость листьев (*Septoria chrysanthemi-indici*);

Болезни различных растений: болезни, вызываемые видами *Pythium* (*Pythium aphanidermatum*, *Pythium debarianum*, *Pythium graminicola*, *Pythium irregulare*, *Pythium ultimum*), серая гниль (*Botrytis cinerea*), прель (*Sclerotinia sclerotiorum*), и черная ножка (*Rhizoctonia solani*), вызываемая видами *Rhizoctonia*;

15 Болезнь дайкона: альтернариоз (*Alternaria brassicicola*);

Болезни газонной травы: долларовая пятнистость (*Sclerotinia homeocarpa*), бурая пятнистость и большая пятнистость (*Rhizoctonia solani*);

Болезнь бананов: сигатока (*Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola*, *Pseudocercospora musae*); и

20 Болезни семян или болезни на ранних стадиях роста различных растений, вызываемые бактериями рода *Aspergillus*, рода *Penicillium*, рода *Fusarium*, рода *Tricoderma*, рода *Thielaviopsis*, рода *Rhizopus*, рода *Mucor*, рода *Phoma* и рода *Diplodia*.

Заболевания может представлять собой переносимое корнями, листьями, присутствующее в сосудистой системе растений или переносимое насекомыми
25 заболевание и включают все бактериальные, вирусные и грибковые патогены растений.

Все патенты, патентные заявки, выделенные заявки и публикации, на которые приведены ссылки или процитированы в настоящей заявке, полностью включены путем ссылки, включая все фигуры и таблицы, в той части, что они не противоречат
30 существенным идеям настоящей заявки.

Следует принять во внимание, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, представлены только для иллюстрации и что квалифицированными специалистами в данной области техники могут быть осуществлены различные модификации или изменения в свете изобретения и они
35 охватываются сущностью и объемом настоящей заявки.

Первоначальная формула изобретения

1. Способ обнаружения целевого аналита в пробе окружающей среды или продуктов питания, включающий стадии:

5 контактирование пробы с множеством нанокристаллов, где нанокристаллы являются поверхностно-модифицированными с помощью структуры, которая специфически связывается с аналитом в пробе,

 отделение нанокристаллов, связанных с аналитом в пробе, от несвязанных нанокристаллов, и

10 обнаружение нанокристаллов, которые связаны с аналитом.

2. Способ по пункту 1, где нанокристаллы имеют уникальную и единообразную морфологию, размер и/или состав, образуя уникальную оптическую заметность.

15 3. Способ по пункту 2, где уникальная оптическая заметность проявляется временем нарастания и/или затухания.

4. Способ по пункту 1, где нанокристаллы представляют собой преобразованные с повышением частоты частицы фосфора.

20 5. Способ по пункту 1, где нанокристаллы содержат по меньшей мере один редкоземельный элемент, выбранный из лантана (La), церия (Ce), празеодимия (Pr), неодимия (Ne), прометия (Pm), самария (Sm), европия (Eu), гадолиния (Gd), тербия (Tb), диспрозия (Dy), гольмия (Ho), эрбия (Er), тулия (Tm), иттербия (Yb) и лютеция (Lu).

25 6. Способ по пункту 1, где нанокристаллы имеют размер в диапазоне от 4 нм до 400 нм.

30 7. Способ по пункту 1, где нанокристаллы излучают свет в течение больше 10^{-8} секунд.

8. Способ по пункту 1, где нанокристаллы могут возбуждаться при длине волны от 900 нм до 1000 нм.

9. Способ по пункту 8, где нанокристаллы возбуждаются при длине волны от 960 нм до 980 нм.
10. Способ по пункту 1, где нанокристаллы излучают свет при длине волны от 400 нм до 12000 нм.
11. Способ по пункту 1, где нанокристаллы представляют собой β -фазные частицы.
12. Способ по пункту 1, где нанокристаллы комбинируют со вторым репортером, выбранным из квантовых точек, углеродных нанотрубок, частиц золота, частиц серебра, и магнитных или легированных красителем частиц.
13. Способ по пункту 1, где структура, которая специфически связывается с аналитом, представляет собой антитело, белок, аптамерный полипептид или полинуклеотид.
14. Способ по пункту 1, где геномный анализ используют для идентификации специфического эпитопа из информации генетической последовательности неподдающегося культивированию микроорганизма или смешанной популяции микроорганизмов, и где продуцируют связующий агент к генетически идентифицированному эпитопу, который специфически связывается с неподдающимся культивированию микроорганизмом.
15. Способ по пункту 1, где аналит представляет собой бактерию, дрожжи, грибы, или вирус.
16. Способ по пункту 1, где аналит представляет собой сельскохозяйственный патоген.
17. Способ по пункту 16, где сельскохозяйственный патоген выбирают из патогенов, которые вызывают пожелтение цитрусовых, фитофтороз картофеля, настоящую мучнистую росу винограда, эпикоккоз, вирус табачной мозаики, бактериальный ожог и/или пайерсову болезнь.
18. Способ по пункту 1, где проба представляет собой почвенный или растительный материал.

19. Способ по пункту 18, где проба представляет собой растительную ткань.

20. Способ по пункту 1, где анализ представляет собой агент на основе микроорганизма.

5

21. Способ по пункту 20, где агент на основе микроорганизма представляет собой микробиологическое поверхностно-активное вещество или микотоксин.

10 22. Способ по пункту 1, где проба представляет собой пищу и анализ представляет собой микотоксин.

23. Способ по пункту 1, где проба представляет собой биологическую пробу из животного.

15 24. Способ по пункту 23, где биологическая проба представляет собой пробу крови, фекалий, слизи, слюны или ткани.

25. Способ по пункту 1, где проба представляет собой пробу воды.

20 26. Способ по пункту 25, где пробу воды выбирают из питьевой воды, грунтовой воды, наземной воды и сточной воды.

27. Способ по пункту 1, где проба представляет собой коммерческий продукт, который содержит микроорганизмы.

25

28. Способ по пункту 27, где продукт предназначен для применения в сельском хозяйстве.

29. Способ по пункту 27, где продукт представляет собой пищевой продукт.

30

30. Способ по пункту 29, где микроорганизмы представляют собой пробиотики.

31. Способ по пункту 29, где микроорганизмы являются патогенными.

32. Способ по пункту 1, где аналит представляет собой микроорганизм и чувствительность обнаружения для аналита составляет 10^1 КОЕ/мл или меньше.
- 5 33. Способ по пункту 1, где нанокристаллы настроены для избегания помех фона от встречающихся в природе хромофоров в пробе.
34. Способ по пункту 1, где множество независимо настраиваемых нанокристаллов помещают в мультиплексную решетку на единичную подложку для облегчения анализа множества аналитов из единичной пробы.
- 10 35. Способ по пункту 1, где одновременно анализируют 5 или больше аналитов
36. Способ по пункту 1, где способ осуществляют в пределах 100 ярдов от места получения пробы.
- 15 37. Способ по пункту 1, где способ осуществляют в пределах 10 минут от времени получения пробы.
38. Способ по пункту 1, где стадию обнаружения осуществляют за одно считывает
20 данных.
39. Способ по пункту 1, где обнаружение можно осуществить меньше, чем за 20 минут.
- 25 40. Способ по пункту 1, где обнаружение, количественное определение и/или отслеживание аналита осуществляется фермером, регуляторным представителем, контролирующим представителем или дистрибьютером.
41. Способ по пункту 1, где анализ осуществляют в любой точке в цепочке поставок от
30 момента сразу после продукции коммерческого продукта до момента непосредственно перед использованием продукта.
42. Способ по пункту 1, где данные индивидуальных тестов передаются в базу данных, в которую может быть осуществлен доступ из местонахождения, которое удалено от
35 местонахождения, где осуществляют тест.

43. Способ по пункту 42, где данные используют для оценки характеристик полезных микроорганизмов или оценки движения патогенов.
- 5 44. Способ по пункту 1, который осуществляют, используя анализ бокового сдвига или микроструйный анализ.
45. Способ по пункту 44, где анализ бокового сдвига или микроструйный анализ представляет собой иммуноанализ.
- 10 46. Способ по пункту 44, где анализ осуществляют, используя портативное устройство обнаружения.
47. Способ по пункту 46, где портативное устройство обнаружения содержит
15 светодиодный индикатор и камеру.
48. Способ по пункту 47, где портативное устройство обнаружения представляет собой мобильный телефон.
- 20 49. Способ по пункту 44, где анализ осуществляют, используя технологию множественного потока.
50. Способ по пункту 44, где тестовая полоска бокового сдвига имеет твёрдую подложку, включающую одну или несколько зон приема образцов и одну или несколько
25 целевых зон захвата.
51. Способ по пункту 50, где твёрдая подложка представляет собой нитроцеллюлозные или сконструированные микроструйные каналы, вытравленные или залитые в пластмассовый или стеклянный субстрат.
- 30 52. Способ по пункту 48, где целевая зона захвата была поверхностно модифицирована для специфического связывания микроорганизмов или агентов на основе микроорганизмов в пробе окружающей среды.
- 35 53. Устройство для осуществления анализа по любому из пунктов 1 - 52.

54. Устройство, по пункту 53, включающее нанокристаллы, которые являются поверхностно-модифицированными с помощью компонента, специфически связывающегося с целевым аналитом.

5

55. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы имеют уникальную и единообразную морфологию, размер и/или состав, образуя уникальную оптическую заметность.

56. Устройство, по пунктам 55, где уникальная оптическая заметность проявляется во времена нарастания и/или затухания.

10

57. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы представляют собой преобразованные с повышением частоты частицами фосфора.

58. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы содержат по меньшей мере один редкоземельный элемент, выбранный из лантан (La), церий (Ce), празеодимий (Pr), неодимий (Ne), прометий (Pm), самарий (Sm), европий (Eu), гадолиний (Gd), тербий (Tb), диспрозий (Dy), гольмий (Ho), эрбий (Er), тулий (Tm), иттербий (Yb) и лютеций (Lu).

15

59. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы имеют размер в диапазоне от 4 нм до 400 нм.

20

60. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы излучают свет в течение больше 10^{-8} секунд.

25

61. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы могут возбуждаться при длине волны от 900 нм до 1000 нм.

62. Устройство, по пункту 61, где нанокристаллы возбуждаются при длине волны от 960 нм до 980 нм.

30

63. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы излучают свет при длине волны от 400 нм до 12000 нм.

64. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы представляют собой β -фазные частицы.
65. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы комбинируют со вторым репортером,
5 выбранных из квантовых точек, углеродных нанотрубок, частиц золота, частиц серебра, и магнитных или легированных красителем частиц.
66. Устройство, по пункту 54, где структура, которая специфически связывается с
10 аналитом, представляет собой антитело, белок, аптамерный полипептид, или полинуклеотид.
67. Устройство, по пункту 54, где нанокристаллы настроены для избегания помехи фона от встречающихся в природе хромофоров в пробе.
- 15 68. Устройство, по пункту 54, где множество независимо настраиваемых нанокристаллов помещают в мультиплексную решетку на единичную подложку для облегчения анализа множества аналитов из единичной пробы.
69. Устройство, по пункту 54, где указанное устройство может передавать данные
20 индивидуальных тестов в базу данных, в которую может быть осуществлен доступ из местонахождения, которое удалено от местонахождения, где осуществляют тест.
70. Устройство, по пункту 54, которое представляет собой анализ бокового сдвига или микроструйный анализ.
25
71. Устройство, по пункту 70, где анализ бокового сдвига или микроструйный анализ представляет собой иммуноанализ.
72. Устройство, по пункту 54, включающее, в качестве одного компонента устройства,
30 портативный блок обнаружения.
73. Устройство, по пункту 72, где портативный блок обнаружения содержит светодиодный индикатор и камеру.

74. Устройство, по пункту 73, где портативный блок обнаружения представляет собой мобильный телефон.

5 75. Устройство, по пункту 54, где анализ осуществляют, используя технологию множественного потока.

76. Устройство, по пункту 54, где тестовая полоска бокового сдвига имеет твёрдую подложку, включающую одну или несколько зон приема образцов и одну или несколько целевых зон захвата.

10 77. Устройство, по пункту 76, где твёрдая подложка представляет собой нитроцеллюлозные или сконструированные микроструйные каналы, вытравленные или залитые в пластмассовый или стеклянный субстрат.

15 78. Устройство, по пункту 76, где целевая зона захвата была поверхностно модифицирована для специфического связывания микроорганизмов или агентов на основе микроорганизмов в пробе окружающей среды.

20 79. Анализ для обнаружения целевой полинуклеотидной последовательности, используя ПЦР, где указанный способ включает применение последовательностей праймера для амплификации указанной целевой полинуклеотидной последовательности, где по меньшей мере одна из указанных последовательностей праймера связана с нанокристаллом.