



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102695718 A

(43) 申请公布日 2012. 09. 26

(21) 申请号 201080059804. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 12. 22

G07K 14/31 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/531 (2006. 01)

2009-296642 2009. 12. 28 JP

G01N 33/569 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 06. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/073186 2010. 12. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02011/081075 JA 2011. 07. 07

(71) 申请人 龟甲万株式会社

地址 日本千叶县

(72) 发明人 志贺一树

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

权利要求书 1 页 说明书 17 页 附图 2 页

(54) 发明名称

金黄色葡萄球菌抗原的提取方法、金黄色葡萄球菌抗原的提取用试剂及金黄色葡萄球菌的判定方法

(57) 摘要

本发明提供一种金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,其特征在于,使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上的酸的、pH5. 0 以下的提取试剂从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及/或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原。本发明还提供一种金黄色葡萄球菌的判定方法。

1. 一种金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,其特征在于使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的1种以上的酸的、pH5.0以下的提取试剂从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及/或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原。

2. 根据权利要求1所述的金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,所述提取试剂含有选自阴离子性表面活性剂、两性离子表面活性剂、阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂中的1种以上的表面活性剂。

3. 根据权利要求2所述的金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,所述表面活性剂为选自EMAL NC35、MEGA-8、TritonX-100、Tween20、LEOCOL SC70、LEOCOL TD90、RHEODOL TW-0120、Brij721、QUARTAMIN 86W、QUARTAMIN24P、CHAPS、CHAPSO、AMPHITOL 20N及AMPHITOL 24B中的1种以上。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原是青霉素结合蛋白2',甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原是青霉素结合蛋白2。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,在25~100℃下进行抗原的提取。

6. 一种金黄色葡萄球菌的判定方法,其包括以下工序:使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的1种以上的酸的、pH5.0以下的提取试剂,从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及/或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原的工序;通过使用了金黄色葡萄球菌抗原的抗体的免疫测定法对所提取的金黄色葡萄球菌抗原进行检测的工序;根据其检测结果判定所述被检体中的金黄色葡萄球菌是甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌还是甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌的工序。

7. 根据权利要求6所述的金黄色葡萄球菌的判定方法,所述免疫测定法选自由乳胶凝集法、比浊法、放射免疫测定法、酶免疫测定法、凝胶内沉降反应、流式细胞术、免疫印迹法、斑点杂交法、荧光抗体法、免疫色谱法及抗体阵列组成的组。

8. 一种用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂,其含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的1种以上的酸且pH为5.0以下。

9. 根据权利要求8所述的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂,其含有选自阴离子性表面活性剂、非离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂及两性离子表面活性剂中的1种以上的表面活性剂。

10. 一种用于检测金黄色葡萄球菌的免疫测定试剂盒,其含有权利要求8或9所述的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂。

金黄色葡萄球菌抗原的提取方法、金黄色葡萄球菌抗原的提取用试剂及金黄色葡萄球菌的判定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及金黄色葡萄球菌抗原的提取方法、金黄色葡萄球菌抗原的提取用试剂及金黄色葡萄球菌的判定方法。

[0002] 本申请是与国家等委托讨论成果有关的专利申请(适用平成 20 年度、21 年度及 22 年度独立行政法人科学技术振兴机构、前端计测分析技术·机器开发事业、产业技术力强化法第 19 条的专利申请)。

背景技术

[0003] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*、*S. aureus*)是在人或动物中引起各种疾病的病原性细菌的一种。当金黄色葡萄球菌将食物污染、并在此处进行增殖时,则会产生菌体外毒素(肠毒素)。当摄入含肠毒素的食物时,在 2~6 小时后会表现急性胃肠炎的症状,之后引起呕吐、腹痛、腹泻。为重症时,伴随着微热,还会引起血压降低、胸闷、意识不清、脉搏减少等显著的中毒症状,还有需要紧急入院的情况。

[0004] 作为金黄色葡萄球菌的一种的甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(以下也称作 MRSA)是成为严重社会问题的医院内感染症的病原菌。近年来除了甲氧西林之外,还可见对于包含青霉素类及头孢烯类抗生素的 β 内酰胺的其他多种抗生素也显示抵抗性的各种多药耐药性 MRSA。MRSA 由于具有这种多药耐药性,因而感染时的治疗很困难。另一方面,金黄色葡萄球菌还包含甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(以下也称作 MSSA)。

[0005] 最近,还开发了对 MRSA 为有效的治疗方法,但另一方面从副作用的问题或者预防新型的耐性菌出现的观点出发,优选对于感染了没有多药耐药性的 MSSA 的患者也统一地使用对于感染了 MRSA 的患者的治疗方法。即,极为重要的是早期发现 MRSA 并对 MRSA 感染者或 MRSA 污染位置进行适当的处置,同时极为重要的是在检测金黄色葡萄球菌时,可靠地区分该菌是 MRSA 还是没有多药耐药性、应该进行与 MRSA 不同处置的 MSSA,并分别进行适当的处置。

[0006] 一直以来,为了判定金黄色葡萄球菌是 MRSA 还是 MSSA,进行使用稀释法、纸片敏感试验等通过培养来讨论相对于实际药剂的抵抗性的方法。但是,这些方法具有培养时间需要很长时间、根据培养中的各种因子(接种菌浓度、培养温度、培养基组成、所使用的药剂等)及操作者的熟练程度等结果有所不同的问题。

[0007] 另一方面,提出了利用非放射性试验(例如参照非专利文献 1、2)或使用了抗 PBP2' 的抗体的放射免疫测定法及酶免疫测定法(例如参照专利文献 1、非专利文献 3)等将是否带有作为 MRSA 所特有的蛋白质、青霉素结合蛋白(PBP1、PBP2、PBP3 及 PBP4)的全新代替酶的“PBP2'”作为 MRSA/MS SA 辨别的关键,检测该 PBP2' 的方法。但是,这些方法需要通过超离心分离法调制含抗原的细胞膜级分的复杂操作,利用普通的检查设施伴有困难。另外,这些方法中由于使用尿素作为变性剂进行抗原的提取,因而在之后的免疫测定中由于尿素残留于反应体系中,测定时间需要数小时,因而在日常检查中使用是不方便的。

[0008] 进而,还已知利用基于 PCR 法基因工程技术对编码多药耐药性金黄色葡萄球菌所产生的 PBP2' 的基因即 *mecA* 进行检测、并以试验菌株中的该基因的保有状况为指标进行 MRSA 鉴别的方法(例如参照非专利文献 4)。但是,*mecA* 的保有状况未必仅反映金黄色葡萄球菌的多药耐药性,还已知有尽管保有 *mecA* 基因但没有多药耐药性的金黄色葡萄球菌。

[0009] 另一方面,作为不进行细胞膜级分的超离心分离等复杂操作、从 MRSA 中提取 PBP2' 抗原的方法,已知有利用碱金属的氢氧化物、碱土类金属的氢氧化物、胺的水溶液等进行提取的方法(例如参照专利文献 2)。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献 1 :日本特开平 5-339289 号公报

[0013] 专利文献 2 :专利第 3638731 号公报

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献 1 :D. M. O' Hara 等, FEBS Lett. Vol. 212, No. 2, p237-241, (1987)

[0016] 非专利文献 2 :J. L. Gerberding 等, Antimicrobial Agents and Chemotherapy Vol. 35, No. 12, 2574-2579, (1991)

[0017] 非专利文献 3 :K. Sekiguchi 等, Microbiol. Immunol. Vol. 39, p545-550, (1995)

[0018] 非专利文献 4 :生方等, J. Clin. Microbiol. , Vol. 30, p. 1728-1733, (1992)

[0019] 非专利文献 5 :Gerber, Journal of Clin. Micro. , pp. 187-189, (1983)

发明内容

[0020] 发明要解决的问题

[0021] 如上所述,金黄色葡萄球菌的检测不能说仅检测 MRSA 即足以,事实上重要的是首先是否能检测到金黄色葡萄球菌,在此基础上区别其是 MRSA 还是没有多药耐药性的 MSSA, 然后进行适当的处置。但是,考虑此情况,基于通过上述方法仅提取 PBP2' 并对其利用任何方法进行的想法的检测方法,在可靠性方面仍有改善的余地。

[0022] 具体地说,在仅提取 PBP2' 进行检测的方法的情况下,当在作为检测对象的菌(检体)的提取物中检测到 PBP2' 时,可以判断此检体是 MRSA。但是,未检测到 PBP2' 时,仅由该结果并不能判断检体是 MSSA。其原因在于,作为未检测到 PBP2' 的理由,除了检体为 MSSA 的情况之外,还假设有检体并非金黄色葡萄球菌或者虽然是金黄色葡萄球菌(MRSA 或 MSSA)、但供至试验的检体量过少或者是在若干误操作等不适当的检测条件下进行试验等的多个理由。

[0023] 为了确认检体是 MSSA,将 PBP2' 及 PBP2 提取并进行检测的操作,在此基础上有必要确认未检测到 PBP2'、仅检测到 PBP2。另外,对于未检测到 PBP2'、且也未检测到 PBP2 的检体而言,认为还有需要进行再测定或更改测定顺序并进行包含菌种确认等进一步处理的情况。通过着眼于仅检测 PBP2' 的方法很难应对该方面。

[0024] 作为从微生物中提取抗原的公知方法之一例,例如已知使用亚硝酸从链球菌属的微生物提取抗原的“微型亚硝酸提取法”(例如参照非专利文献 5)。但是,发明人进行确认时发现,该提取法并不适于从金黄色葡萄球菌进行的抗原提取、例如提取 PBP2' 及 / 或 PBP2 的目的。

[0025] 即,期待可以同时且高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2、并能够以可进行检测的形态将两者保持在提取液中的提取方法;以及对提取的 PBP2' 及 PBP2 进行检测、根据其结果能够简单且更为可靠地判定成为所述判定对象的金黄色葡萄球菌是甲氧西林耐药性还是甲氧西林敏感性。

[0026] 本发明的目的在于提供可以同时且高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2、并能够以可进行检测的形态将两者保持在提取液中的提取方法以及用于该方法的提取试剂。进而本发明还提供对使用这种提取方法及提取试剂获得的提取物中的抗原进行检测、根据其结果能够更为可靠地判定被检体是 MRSA 还是 MSSA 的金黄色葡萄球菌的判定方法。

[0027] 用于解决问题的方案

[0028] 发明人进行了深入讨论,结果发现通过使用含有特定酸的酸性水溶液可以从金黄色葡萄球菌中将两抗原提取、将两抗原保持在提取液中;进而利用免疫测定法对提取物中的两抗原分别进行检测,可以达成上述目的,进而完成本发明。

[0029] 即,通过本发明提供一种金黄色葡萄球菌抗原的提取方法,其特征在于,使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上酸的、pH5.0 以下的提取试剂,从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及 / 或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原。通过该方法,可以同时且有效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2。另外,可以将 PBP2' 及 PBP2 稳定地保持在提取物中。

[0030] 另外,通过本发明提供一种金黄色葡萄球菌的判定方法,其包括以下工序:使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上酸的、pH5.0 以下的提取试剂,从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及 / 或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原的工序;通过使用了金黄色葡萄球菌抗原的抗体的免疫测定法对所提取的金黄色葡萄球菌抗原进行检测的工序;根据其检测结果判定所述被检体中的金黄色葡萄球菌是甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌还是甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌的工序。通过该方法,根据所得提取物中的抗原的检测结果,可以更为可靠地判定被检体是 MRSA 还是 MSSA。

[0031] 另外,通过本发明提供一种用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂,其含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上的酸且 pH 为 5.0 以下。通过该试剂,可以同时且高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2,另外可以将 PBP2' 及 PBP2 稳定地保持在提取物中。

[0032] 进而,通过本发明提供用于检测金黄色葡萄球菌的免疫测定试剂盒,其包含用于对上述金黄色葡萄球菌抗原进行提取的试剂。通过该试剂盒,根据所得提取物中的抗原的检测结果,可以更为可靠地判定被检体是 MRSA 还是 MSSA。

[0033] 发明的效果

[0034] 通过本发明,可以同时且高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2,另外可以将 PBP2' 及 PBP2 稳定地保持在提取物中。另外,通过本发明还可根据所得提取物中的抗原的检测结果,更为可靠地判定被检体是 MRSA 还是 MSSA。

附图说明

[0035] 图 1 是所制作的抗体阵列的设计图。

[0036] 图 2 是所得 MSSA 及 MRSA 的抗体阵列的测定图像。

具体实施方式

[0037] [术语的说明]

[0038] 在本说明书中进行使用时,“金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)”是指作为人或动物的皮肤、消化管(肠)常在菌(肠内细菌)的葡萄球菌之一。也是引起人的脓肿等各种表皮感染症或食物中毒、肺炎、脑膜炎、败血症等致死性感症病的病原菌。

[0039] 在本说明书中进行使用时,“甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌(*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*:MRSA)”是指获得了对抗生素甲氧西林的耐药性的金黄色葡萄球菌,包含除了甲氧西林以外对包括青霉素系及头孢烯系抗生素的 β 内酰胺剂的其他多种抗生素也显示抵抗性的各种多药耐药性 MRSA。而本说明书中使用的“甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(*Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*:MSSA)”是指具有对甲氧西林的敏感性的金黄色葡萄球菌。

[0040] 在本说明书中进行使用时,“PBP2'(青霉素结合蛋白质 2')”是指肽聚糖合成酶,是与金黄色葡萄球菌原本具有的 4 种细胞壁合成酶的青霉素结合蛋白质:PBP1、PBP2、PBP3 及 PBP4 不同的交联酶,是 MRSA 所特有的蛋白质。即,MRSA 具有 PBP2',而 MSSA 没有 PBP2'。予以说明,MRSA 及 MSSA 均具有 4 种青霉素结合蛋白质:PBP1、PBP2、PBP3 及 PBP4。

[0041] 在本说明书中进行使用时,“金黄色葡萄球菌抗原”以包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原两者的意义进行使用,具体地说,除了金黄色葡萄球菌原本具有的 4 种青霉素结合蛋白质:PBP1、PBP2、PBP3 及 PBP4 之外,还含有甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌所特有的蛋白质 PBP2',优选为 PBP2 及 PBP2'。在本说明书中进行使用时,“甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原”是指青霉素结合蛋白质 2'(PBP2')。在本说明书中进行使用时,“甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原”是指 PBP2'以外的金黄色葡萄球菌抗原,优选为 PBP2。

[0042] 以下对本发明的实施方式具体地进行说明。

[0043] [实施方式 1:金黄色葡萄球菌抗原的提取方法]

[0044] 本实施方式所涉及的金黄色葡萄球菌抗原的提取方法的特征在于,使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上的酸、且 pH5.0 以下的提取试剂,从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及/或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原。

[0045] (提取试剂中的酸)

[0046] 本实施方式所涉及的提取方法中可以使用的提取试剂含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上的酸。通过使用这些酸,可以优异地达成本发明的目的。

[0047] (提取试剂的 pH)

[0048] 本实施方式所涉及的提取方法中可以使用的提取试剂具有 5.0 以下的 pH。提取试剂的 pH 只要是 5.0 以下则无特别限定,更优选为 4.5 以下、进一步优选为 4.0 以下。另外,本发明的提取试剂优选按照提取时的 pH 达到 5.0 以下进行调整。例如,使用 MRSA 的菌体

悬浮液等制成试样时,优选混合该菌体悬浮液和本发明的提取试剂时的 pH 为 5.0 以下。另外,作为提取试剂中的上述酸的浓度优选为 0.05M ~ 0.5M。

[0049] (提取试剂中的表面活性剂)

[0050] 本实施方式所涉及的提取方法中可以使用的提取试剂中还可任意地添加各种表面活性剂。由此,可以更为高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2。作为表面活性剂可以使用选自阴离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂、非离子性表面活性剂及两性离子表面活性剂中的任意表面活性剂。

[0051] 例如作为阴离子性表面活性剂,可举出羧酸盐型及磺酸盐型(例如烷基苯羧酸盐、烷基苯磺酸盐、烷基磺酸盐、磺基琥珀酸酯盐等)、硫酸酯盐型(例如烷基硫酸酯盐、聚氧化烯烷基醚硫酸酯盐或聚氧乙烯月桂基醚硫酸酯盐等)及磷酸酯盐型(例如烷基磷酸酯盐、聚氧化烯烷基醚磷酸酯盐或聚氧化烯烷基芳基醚磷酸酯盐等)。这些物质可以使用市售品,例如为聚氧乙烯月桂基醚硫酸钠时,以 EMAL (注册商标)20C (花王公司制)等的商品名出售,为聚氧乙烯壬基苯基醚硫酸钠时,以 EMAL (注册商标)NC-35 (花王公司制)的商品名出售。

[0052] 作为阳离子性表面活性剂,可举出烷基胺盐型(例如单甲基胺盐酸盐、二甲基胺盐酸盐、三甲基胺盐酸盐)、季铵盐型(例如十二烷基三甲基氯化铵、十六烷基三甲基溴化铵、溴化十六烷基吡啶、苄基三乙基氯化铵、双十二烷基二甲基溴化铵、苄基二甲基苯基氯化铵、四己基氯化铵、硬脂基二甲基苄基氯化铵、硬脂基三甲基氯化铵、月桂基三甲基氯化铵等)等。这些物质可以使用市售品,例如为硬脂基三甲基氯化铵时,以 QUARTAMIN (注册商标)86W (花王公司制)等的商品名出售,为月桂基三甲基氯化铵时,以 QUARTAMIN (注册商标)24P (花王公司制)等的商品名出售。

[0053] 作为非离子性表面活性剂,可举出醚型(例如聚氧乙烯烷基醚、五乙二醇单十二烷基醚、八乙二醇单十二烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯异辛基苯基醚等)、酯型(月桂酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯等)、酯醚型(聚氧乙烯山梨糖醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯己糖醇酐脂肪酸酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯聚乙二醇)、烷醇酰胺型(月桂酸二乙醇酰胺、油酸二乙醇酰胺、硬脂酸二乙醇酰胺)、烷基苷型(辛基葡萄糖苷、癸基葡萄糖苷、月桂基葡萄糖苷)、葡糖酰胺型(辛酰基-N-甲基-葡糖酰胺、壬酰基-N-甲基-葡糖酰胺、癸酰基-N-甲基-葡糖酰胺)。这些物质可以使用市售品,例如作为聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酯以 tween20 等商品名出售,作为聚氧乙烯辛基苯基醚以 Triton (商标)X-100 等商品名出售,作为辛酰基-N-甲基-葡糖酰胺以 MEGA-8 等商品名出售。作为优选的表面活性剂的例子,可举出聚氧乙烯异辛基苯基醚类(例如 TritonX-100 等)、聚氧乙烯壬基苯基醚类(例如 NP40 等)、聚氧乙烯山梨糖醇酯类(例如 Tween80 等)、聚氧乙烯十二烷基醚类(例如 Brij (注册商标)58 等)、聚氧乙烯硬脂基醚类(例如 Brij (注册商标)721 等)、辛基葡萄糖苷等。另外,作为优选例可举出聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯(RHEODOL TW-0120;花王公司制)、异十三烷基醇乙氧基化物 9 摩尔加成体(LEOCOL TD-90、Lion Corp. 制)、高级烷基(例如碳数 12 ~ 14 的烷基等)上加成有聚环氧丙烷和聚环氧乙烷的化合物(LEOCOLSC70、Lion Corp. 制)。

[0054] 作为两性离子表面活性剂,可举出烷基甜菜碱型(月桂基二甲基氨基乙酸甜菜碱、硬脂基二甲基氨基乙酸甜菜碱、十二烷基氨基甲基二甲基磺丙基甜菜碱、十八烷基氨基甲基二甲基磺丙基甜菜碱)、CHAPS (3-(3-胆酰胺丙基)二甲基铵基)-1-丙磺酸, CHAPSO

(3-(胆酰胺丙基)二甲基铵基)-2-羟基-1-丙磺酸)等磺酸盐型、氧化胺型(月桂基二甲基胺 N-氧化物、油基二甲基胺 N-氧化物)等。这些物质可以使用市售品,例如为烷基甜菜碱型时,以 AMPHITOL (注册商标) 24B (花王公司制) 等商品名出售,为氧化胺型时,以 AMPHITOL (注册商标) 20N (花王公司制) 等商品名出售。

[0055] 上述各种表面活性剂中, EMAL (注册商标) NC35、MEGA-8、TritonX-100、tween20、LEOCOL SC70、LEOCO LTD90、RHEODOL TW-0120、Brij (注册商标) 721、QUARTAMIN (注册商标) 86W、QUARTAMIN (注册商标) 24P、CHAPS、CHAPSO、AMPHITOL (注册商标) 20N、AMPHITOL (注册商标) 24B 等是优选的表面活性剂的一例。利用其可以更为高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2。

[0056] 本发明的提取试剂中所含表面活性剂的浓度通常为 0.01% (w/w) 以上、优选为 0.01 ~ 5% (w/w)、更优选为 0.05 ~ 5.0% (w/w)、进一步优选为 0.05 ~ 1.0% (w/w)、更进一步优选为 0.1 ~ 1.0% (w/w)。通过使表面活性剂的浓度为 0.01% (w/w) 以上,提取效果变得充分。另外,通过使表面活性剂的浓度为 5.0% (w/w) 以下,由于即便将浓度进一步提高也难以观察到提取效率的进一步改善,因而很经济,另外由于表面活性剂不会对之后的各种测定体系造成不良影响,因此在表面活性剂的除去或稀释等中不会发生操作变得复杂的问题,优选。

[0057] 表面活性剂只要不损害本发明的目的效果,则可并用多种,还可单独使用。

[0058] 本发明的提取试剂只要不损害本发明的目的效果,除了上述成分之外还可含有保存材料、缓冲剂等。

[0059] (金黄色葡萄球菌抗原的提取条件)

[0060] 本实施方式所涉及的金黄色葡萄球菌抗原的提取方法是使用上述提取试剂从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取金黄色葡萄球菌抗原。本发明的提取方法的提取条件只要是金黄色葡萄球菌抗原的提取良好进行的条件则无特别限定,设定对于良好地提取抗原合适的温度及提取时间。抗原的提取温度优选为室温以上、具体地为 25 ~ 100℃。由此可以更有效率地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2。抗原的提取时间优选为 1 分钟 ~ 60 分钟左右,根据情况也可以是更长的时间。

[0061] 提取温度越高,则提取所需要的时间可以越短,例如在 100℃ 下进行提取时,提取时间大致可以为 1 分钟 ~ 3 分钟左右,在 95℃ 下进行提取时,提取时间大致为 5 分钟 ~ 10 分钟,在 25 ~ 37℃ 左右下进行提取时,提取时间优选为 60 分钟左右。

[0062] 通过本实施方式所涉及的提取方法,可以高效率地从 MRSA 及 MSSA 两者中提取抗原。进而,所提取的两抗原在提取液中均难以被分解,在提取物中稳定地保持 PBP2' 及 PBP2 的方面具有优势。

[0063] [实施方式 2:金黄色葡萄球菌的判定方法]

[0064] 本实施方式所涉及的金黄色葡萄球菌的判定方法包括以下工序:使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上的酸的、pH5.0 以下的提取试剂,从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及 / 或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原的工序;通过使用了金黄色葡萄球菌抗原的抗体的免疫测定法对所提取的金黄色葡萄球菌抗原进行检测的工序;根据该检测结果判定所述被检体中的金黄色葡萄球菌是甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌还是甲氧西林敏

感性金黄色葡萄球菌的工序。通过该方法,可以更为高效地将作为 MRSA 所特有的抗原的 PBP2' 和 MRSA 及 MSSA 中共同存在的 PBP2 两者提取,同时可以将两者稳定地保持在提取物中,因此可以在后面的免疫测定体系中对两者进行检测,可以可靠地判定检测对象的菌(被检体)是 MRSA 还是 MSSA。

[0065] (提取金黄色葡萄球菌抗原的工序)

[0066] 本实施方式中的提取金黄色葡萄球菌抗原的工序由于基本上具有与上述实施方式 1 所涉及的提取金黄色葡萄球菌抗原的方法相同的构成及作用效果,因此对于与实施方式 1 相同的内容适当地省略说明。

[0067] (所提取的抗原在提取试剂中的稳定性)

[0068] 使用本实施方式中的提取试剂从金黄色葡萄球菌中提取金黄色葡萄球菌抗原的工序的特征在于,在高效率地从 MRSA 及 MSSA 的两者提取抗原的同时,所提取的两抗原在提取液中均难以被分解。提取由于是为了利用后面的免疫测定法等实施金黄色葡萄球菌抗原的检测而进行,因此如果所提取的抗原在提取液中立即发生分解,则对检测造成障碍,无法正确地进行之后的 MRSA/MSSA 判定。通过本实施方式的提取工序,由于所提取的抗原在提取试剂中不会被分解、稳定地存在,因而具有优势。

[0069] 当将所提取的金黄色葡萄球菌抗原供至免疫测定法时,根据需要使用适当的缓冲剂或碱、优选磷酸氢二钾、磷酸氢二钠或氢氧化钠等对使用本发明的提取试剂提取的金黄色葡萄球菌的提取液进行中和,调整成对于免疫测定体系适合的 pH 条件、具体地说优选调整至 pH6.0 ~ 8.0。

[0070] 另外,使用本发明的提取试剂提取金黄色葡萄球菌的抗原之后,还优选使用任意方法将细胞残屑或粒状物、或其他的不溶物除去。这些除去例如可通过离心分离、过滤器过滤等进行。

[0071] (提取的金黄色葡萄球菌抗原的检测)

[0072] 接着,本实施方式中通过使用了金黄色葡萄球菌抗原的抗体的免疫测定法对提取的金黄色葡萄球菌抗原进行检测。本实施方式中的“抗体”是指对特定的肽或多糖类、低分子化合物等各种分子进行识别并形成键合/交联的、统称为“抗体”的蛋白质,还包含其变体、修饰体。已知有来自小鼠、兔子、山羊的各种抗体,另外还可利用培养细胞产生特定的单克隆抗体、还可使用基因重组技术在大肠菌或真核生物细胞内产生特定的单克隆抗体、还包含其重组体。另外,上述各种抗体的片段也为本发明的范围内。作为抗体的片段,可举出 F(ab')₂ 段、Fab' 段等。另外,当抗体为单克隆抗体时,球蛋白类型并无特别限定,例如可举出 IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 等。另外,单克隆抗体还可以是人化抗体。

[0073] 作为金黄色葡萄球菌抗原的抗体可以使用抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体,它们可分别是多克隆抗体、也可以是单克隆抗体,但更优选单克隆抗体。抗 PBP2 抗体特异性识别 PBP2。抗 PBP2' 抗体特异性识别 PBP2'。抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体可根据该领域中公知的方法进行制作,例如可根据专利第 3638731 号公报所记载的方法进行制作。另外,还可购买市售的抗体。

[0074] 作为免疫测定方法可以使用各种公知的免疫测定法,例如通常的免疫测定法、例如乳胶凝集法、比浊法、放射免疫测定法(例如 RIA 法、RIMA 法)、酶免疫测定法(例如 ELISA 法、EIA 法)、凝胶内沉降反应、流式细胞术、免疫印迹(western blotting)法、斑点杂交法、

荧光抗体法(例如 FIA 法、IFMA 法)、免疫色谱法、抗体阵列等,但并非限定于这些。这些免疫测定方法本身在该领域中是周知的,本领域技术人员可以容易地进行。对于一般的技术方法的详细内容可以参照公知的总论、书籍等。

[0075] 另外,本实施方式中的免疫测定法中为了检测抗体,还可使用将能够产生信号的标记物质与抗体本身相结合的标记抗体。此时,除了直接结合之外,还可使用利用亲和素-生物素或链霉亲和素-生物素体系或二次抗体将抗体与标记物质进一步结合的物质,包含在本发明的技术范围内。作为此处使用的二次抗体可以使用能够与一次抗体相结合的抗体。

[0076] 作为标记使用酶时,例如可使用过氧化物酶、微过氧化物酶、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、碳酸脱氢酶、乙酰胆碱酯酶、荧光素酶、丙二酸酯脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶等作为标记。作为利用这些酶进行标记的方法,可举出用过碘酸将酶的糖链氧化,使抗体或外源凝集素的氨基酸键合在所产生的醛基上的方法或者向酶中导入马来酰亚胺基或吡啶硫基等,与存在于抗体或外源凝集素的 Fab' 段的巯基相键合的方法等。

[0077] 作为标记使用酶时,将试验试样与标记抗体孵育后,对游离的标记抗体进行洗涤后除去,然后作用上述标记酶的底物,通过发色等测定反应,从而可以检测标记抗体。例如用过氧化物酶进行标记时,通过作为底物的过氧化氢、作为发色试剂的二氨基联苯胺或 O-苯二胺的组合,产生褐色或黄色。用葡萄糖氧化酶进行标记时,作为底物可以使用例如 2,2'-连氨基-二-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS))等。

[0078] 作为标记使用荧光色素时,例如可以使用 FITC (异硫氰酸荧光素)或 TRITC (四甲基罗丹明 B 异硫氰酸酯)等荧光色素对抗体进行标记。抗体与荧光色素的结合可通过常规方法进行。

[0079] 作为标记使用显色标记物质时,例如可使用胶体金属及着色乳胶等作为标记。作为胶体金属的代表例,可举出金胶体、银胶体、硒胶体、碲胶体或铂胶体等各个作为分散粒子的金属胶体粒子。胶体金属的粒子的大小通常优选直径 3~60nm 左右。另外,作为着色乳胶的代表例,可举出用红色及蓝色等各个着色料进行了着色的聚苯乙烯乳胶等合成乳胶。作为乳胶可使用天然橡胶乳胶等天然乳胶。着色乳胶的大小可以从直径数十 nm~数百 nm 左右内选择。这些显色标记物质可直接使用市售品,还可进行加工或者利用其本身公知的方法进行制造。

[0080] 抗体与显色标记物质的结合可通过常规方法进行。例如显色标记物质是作为金溶胶的分散粒子的金胶体粒子时,通常可通过在室温下混合抗体和金溶胶将两者物理地结合。

[0081] 予以说明,作为标记除上述之外还可使用放射性同位素标记(例如 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 等)等,包含在本发明的范围内。

[0082] (ELISA)

[0083] 作为本实施方式的免疫测定法,可使用酶免疫测定法(ELISA)。“酶免疫测定法”(ELISA)是指使用进行了酶标记的抗体定量地对抗体的抗原进行检测的方法,定量性、简便性、可靠性(重现性)优异,在临床检查等中被广泛使用。酶免疫测定法是众所周知的技术,对于一般的技术手段的详细情况可参照公知的总论、书籍等。作为酶免疫测定法,已知有若

干种方法,其中最为广泛使用的是被称作夹心 ELISA 的使抗原结合在固定有抗体的板上、并利用其他抗体检测所结合的抗原的方法。

[0084] 作为夹心 ELISA 法的固相用载体可举出玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶类、天然或经修饰的纤维素类、聚丙烯酰胺类、辉长岩(gabbros)及磁铁矿(magnetite)。固相用载体的材料只要能够结合抗体则可具有任何可能的结构轮廓。例如可以是微球等球形或者如试管或微孔板的孔的内部表面等的圆筒形。另外,上述表面可以是平坦的,例如薄片、膜、试验片、芯片、玻片等。优选的载体是硝基纤维素膜、用硝基纤维素进行了包被的玻片、96-孔板及聚苯乙烯或羧基微球。本领域技术人员能够理解或者通过日常实验能够更加确信多数其他载体适于结合抗体或抗原。

[0085] 上述的酶免疫测定法(ELISA)不仅限于使用酶作为标记的 ELISA,还包含使用放射性同位素作为标记的放射免疫分析法(RIA)或使用荧光物质作为标记的荧光免疫分析(FIA)等改变法。在使用这些各个免疫化学的测定法时,必须进行格外的条件、操作等的设定,可参照公知的总论、书籍等。

[0086] 作为本实施方式中的免疫测定法,可以使用 ELISA 法、其中可使用夹心 ELISA。

[0087] (免疫色谱法)

[0088] 作为本实施方式的免疫测定法可使用免疫色谱法。免疫色谱法是指检体利用毛细管现象移动到膜上时,由检体中的抗原和标记抗体及捕捉抗体这三者形成免疫复合体,通过目视可确认该标记物的聚集的测定方法。由于不需特别的装置、另外也不需洗涤操作,因而可以简单地测定。免疫色谱法是众所周知的技术,对于一般的技术手段的详细情况可参照公知的总论、书籍等。

[0089] 免疫色谱法大致上分开使用补足试剂部位和标记试剂部位。补足试剂部位中固定有用于补足抗原的抗体。作为补足试剂部位中使用的固相用载体,只要是由显示毛细管现象的微细多孔性物质构成的惰性载体且与所使用的第一试剂、标记试剂、被检测物质等不发生反应,则其材质并无特别限定。具体地说可举出聚氨酯、聚酯、聚乙烯、聚氯乙烯、聚偏氟乙烯、尼龙、硝基纤维素或乙酸纤维素等纤维素衍生物等构成的纤维状或无纺纤维状基质、膜、滤纸、玻璃纤维滤纸、布、棉等。优选为纤维素衍生物或尼龙的膜、滤纸、玻璃纤维滤纸等,更优选为硝基纤维素膜、混合硝基纤维素酯(硝基纤维素与乙酸纤维素的混合物)膜、尼龙膜、滤纸。

[0090] 用于将抗体固相化的浓度优选为 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 10\text{mg/ml}$ 的浓度、更优选为 $10 \mu\text{g/ml} \sim 1\text{mg/ml}$ 的浓度。

[0091] 标记试剂部位包含用于检测抗原而进行了标记的抗体。标记可以适当使用上述的标记手段。

[0092] 免疫层析通过组合用于提供这 2 个部位和检体的玻璃滤器、吸收用滤纸等来构建。所用介质的形态及大小并无特别限定,只要是在实际操作方面及结果观察的方面适当即可。为了使操作更为简便,还可以在表面形成判定部位的层析介质的里面设置由塑料等形成的支撑体。该支撑体的性状并无特别限定,当通过目视判定进行测定结果的观察时,支撑体优选具有与标记物质所产生的色彩不类似的色彩,通常优选为无色或白色。

[0093] (抗体阵列)

[0094] 作为本实施方式的免疫测定法可以使用抗体阵列。抗体阵列是指将多个抗体固定

在支撑体上,检测与其相对应的反应(低分子化合物或其他蛋白质的结合等)的方法。通过使用该抗体阵列,可以同时对本发明的 PBP2 及 PBP2' 抗原的多个抗原或蛋白质进行评价,可迅速进行检测。

[0095] 作为抗体阵列的支撑体只要是本技术领域通常使用的支撑体则无特别限定,例如可举出膜(例如硝基纤维素膜、尼龙膜、PVDF(聚偏氟乙烯)膜)、玻璃(例如玻璃玻片)、塑料、芯片、针、滤器、微球、纸、膜、纤维束、凝胶、金属(例如金薄膜)、陶瓷等,但并非限定于这些。尼龙、硝基纤维素及 PVDF(聚偏氟乙烯)等的膜适于用作本发明阵列中的支撑体。

[0096] 利用抗体阵列的抗原的检测随所用抗体阵列的形态而不同,例如可通过对从试样提取的抗原进行标记、接着使其与抗体阵列上的各抗体发生反应而进行,或者还可通过使用进行了固相化的抗体和标记抗体实施夹心分析而进行。标记可以适当使用上述的标记手段。

[0097] 抗体阵列可以利用本技术领域周知的方法将抗体固定在支撑体上来制作。作为将抗体固定在支撑体上的方法,可举出例如利用共价键进行固定的方法;利用非共价相互作用(例如离子键、疏水性相互作用、氢键、范德华力、偶极子-偶极子键合)进行固定的方法;利用静电结合进行固定的方法,但考虑到实验的重现性,优选利用共价键进行固定的方法。另外,当支撑体为玻璃、塑料、金薄膜等时,还可通过使抗体所含氨基酸的官能团与支撑体表面上的官能团发生反应/键合,将抗体固定在支撑体上。

[0098] 本实施方式中的抗体阵列可使用为了制造蛋白质或核酸阵列所使用的任意方法进行制作。例如可以使用作为具备开叉针或喷墨打印机的机器人打印机的微型点样机将抗体点样在阵列上。作为点样的抗体浓度优选为 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 10\text{mg/ml}$ 的浓度、更优选为 $10 \mu\text{g/ml} \sim 1\text{mg/ml}$ 的浓度。点的大小优选半径 0.01mm 以上且 10mm 以下、更优选半径 0.05mm 以上且 2mm 以下。作为抗体阵列的制造方法例如记载于日本特表 2010-533842 中。

[0099] 利用抗体阵列的检测当使用与底物反应并发光的酶作为标记物质时,例如可以用 CCD (Charge Coupled Devices) 相机等对整个阵列区域进行图像拍摄,将发光量作为亮度值进行测光。作为这种抗体阵列的测定装置可举出荧光影像分析仪 LAS 300 (FUJIFILM 公司制)。

[0100] 抗原抗体反应及检测工序的反应条件、反应所用的试剂成分等可以在达成本发明目的的范围内最佳化。本发明的 PBP2 及 PBP2' 抗原这两抗原的检测可单独进行、也可依次进行、还可同时进行。当选择例如免疫色谱法或抗体阵列那样,同时使用多个抗体、可同时检测各个抗原的存在的检测体系时,则检测操作变得更为简单、可进行效率良好的检测和判定。

[0101] (使用了提取物的 MRSA/MSSA 的判定)

[0102] 本实施方式所涉及的金黄色葡萄球菌的判定方法的特征在于,在上述提取工序、检测工序之后,根据其检测结果,判定所述被检体中的金黄色葡萄球菌是甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌还是甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌。

[0103] 进行使用上述各种抗原检测方法检测 PBP2' 及 PBP2 的工序的结果判定,提取物中检测到 PBP2' 的检体是“MRSA”。此外,检测到 PBP2、但未检测到 PBP2' 的检体是“MSSA”。

[0104] 另一方面,对于未检测到 PBP2' 且也未检测到 PBP2 的检体而言,则暗示该菌不是金黄色葡萄球菌,或者虽然是金黄色葡萄球菌(MRSA 或 MSSA),但检体量过少或者是在有任

何错误操作等不适当的检测条件下进行的试验。本发明的方法在这种情况下可以立即进行再测定或者重新修改测定顺序,在此方面也较仅检测 PBP2' 的方法的可靠性更为优异。

[0105] [实施方式 3:用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂]

[0106] 本实施方式所涉及的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂是含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的 1 种以上的酸且 pH 为 5.0 以下的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂。通过该试剂可以同时且高效地从金黄色葡萄球菌中提取 PBP2' 及 PBP2。

[0107] 本实施方式所涉及的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂基本上具有与实施方式 1 中具体说明过的提取试剂相同的构成及作用效果。因而,对于与实施方式 1 相同的内容适当省略说明。本实施方式所涉及的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂可以组合上述各成分进行调制。另外,本实施方式所涉及的用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂根据需要含有选自阴离子性表面活性剂、非离子性表面活性剂、阳离子性表面活性剂及两性离子表面活性剂中的 1 种以上的表面活性剂。

[0108] 本发明的提取试剂只要不损害本发明的目的效果,则除了上述成分之外还可含有保存材料、缓冲剂等。另外,本发明的提取试剂还可以以将全部构成成分混合的状态装在一个容器内,或者也可以分成两种成分以上收纳在多个容器内、在使用时进行混合调制。

[0109] [实施方式 4:用于检测金黄色葡萄球菌抗原的免疫测定试剂盒]

[0110] 本实施方式所涉及的用于检测金黄色葡萄球菌的免疫测定试剂盒是包含上述用于提取金黄色葡萄球菌抗原的试剂的用于检测金黄色葡萄球菌的免疫测定试剂盒。通过该试剂盒,可以根据所得提取物中的抗原的检测结果,更为可靠地判定试验菌株是 MRSA 还是 MSSA。本实施方式所涉及的用于检测金黄色葡萄球菌的免疫测定试剂盒还可根据需要包含收纳上述提取试剂的容器、抗原检测手段、测定方法的说明书和根据需要的被检物质(抗原)的标准品等。例如作为含有抗原的免疫测定手段作为抗原检测手段的用于检测金黄色葡萄球菌的免疫测定试剂盒是本实施方式所涉及的免疫测定试剂盒的优选一例。

[0111] 实施例

[0112] 以下示出实施例更为具体地说明本发明,但以下所记载的内容并不限定本发明的技术范围。予以说明,只要没有特别限定,则实施例中的“%”及“份”是指重量%及重量份。

[0113] (实施例 1) 葡萄球菌抗原提取试剂的调制和从 MRSA 的金黄色葡萄球菌抗原的提取

[0114] 1. MRSA 检体的调制

[0115] 将 3.7g 的 Brain Heart Broth (Merck 公司产品编号 110493)溶解于 100ml 的水中,进行 121°C、20 分钟的高压釜灭菌后制成培养基。向该培养基中接种 MRSA 的临床分离株,在 37°C 下培养 48 小时。培养结束后通过离心分离将菌体回收,溶解于 10ml 的 20mM 磷酸缓冲液(pH7.2)中。接着,将溶解的 MRSA 菌体液(50 μ l)分注入微管中,通过离心分离将上清除去。

[0116] 2. 使用了金黄色葡萄球菌抗原提取试剂的从 MRSA 中的抗原提取

[0117] 调制由 0.1M HCl 构成的葡萄球菌抗原提取试剂以及由 0.1M HCl 及 2.0%(w/w)各种表面活性剂构成的葡萄球菌抗原提取试剂(均是 pH5.0 以下)。表面活性剂使用作为阴离子性表面活性剂的 EMAL NC35 (花王公司制);作为非离子性表面活性剂的 MEGA-8 (同仁化学公司制)、TritonX-100 (和光纯药工业公司制)、Tween20 (和光纯药工业公司制)、Brij721

(SIGMA 公司制);作为阳离子性表面活性剂的 QUARTAMIN86W (花王公司制)、作为两性离子表面活性剂的 CHAPS (同仁化学公司制)、AMPHITOL 20N (花王公司制)。

[0118] 在所述 1. 中记载的上清除去后的 MRSA 菌体中分别添加上述各种提取试剂及作为对照的 0.1M 氢氧化钠溶液或 0.1M 亚硝酸溶液(200 μ l) 进行悬浮。在沸水中将该菌悬浮液煮沸 2 分钟进行提取。在冰上将提取工序后的菌悬浮液冷却后,将 0.1MNaOH (200 μ l) 和 100mM 磷酸缓冲液(pH8.0、20 μ l) 添加至菌悬浮液中,中和至 pH6.0 ~ 8.0。之后,以 1500 \times g 离心分离 5 分钟,获得上清,接着获得用于免疫抗体测定法的检体。

[0119] 3. 抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体的制作及固相化

[0120] 特异性检测 PBP2 及 PBP2' 的抗体(抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体)可根据公知的方法制作(例如根据专利第 3638731 号公报所记载的方法)。从所得的单克隆抗体中利用公知的挑选方法发现在夹心 ELISA 法中可优选使用的“固相用抗体”和“标记用抗体”的组合。予以说明,标记用抗体中通过使用公知方法(例如根据 P. TIJSSEN :Enzyme Immunoassay, 东京化学同人,216-241 所记载的方法)的化学修饰来结合生物素。

[0121] 使用 0.1M PBS (pH7.5)稀释上述“固相用”的抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体至达到 2 μ g/ml 的浓度,以每孔 50 μ l 分注到板中,在 25 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时,从而将抗体固相化。之后,每孔用 200 μ l 含 0.05% 的 Tween20、150mM 的氯化钠的 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH7.2) (TB S-T)洗涤 3 次。接着每孔添加 200 μ l 含 2%B SA 的 TBS 缓冲液(pH7.0),使其反应 1 小时,进行封闭。然后使用 TBS-T 洗涤 3 次。

[0122] 4. 使用了固相化抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体的免疫测定

[0123] 向固相化有抗体的微孔板中每孔分注 50 μ l 用稀释液(1%BSA TBS-Tween 0.1%)稀释了 10 倍的检体,在 25 $^{\circ}$ C 下进行抗原抗体反应 1 小时。之后,每孔用 200 μ l TBS-T(Tween20 浓度为 0.1%)洗涤 3 次。然后,将结合有生物素的标记用抗 PBP2 抗体及抗 PBP2' 抗体用稀释液(1%BSA TBS-Tween 0.1%)稀释至 1.0 μ g/ml,以每孔 50 μ l 分注至板中,在 25 $^{\circ}$ C 下进行抗原抗体反应 1 小时。

[0124] 每孔用 200 μ l TBS-T (Tween20 浓度为 0.1%)洗涤 3 次后,将使用稀释液(1%BSA TBS-Tween 0.1%)调制成 1 μ g/ml 的链霉亲和素键合过氧化物酶(Thermo 公司产品编号 21126)以每孔 50 μ l 分注至板中,在 25 $^{\circ}$ C 下使其反应 30 分钟。

[0125] 每孔用 200 μ l TBS-T(Tween20 浓度为 0.1%)洗涤 3 次后,每孔添加 100 μ l 加入有 o- 苯二胺 1mg/ml、过氧化氢 0.5 μ l/ml 的 25mM 柠檬酸缓冲液(pH5.0),进行发色反应 10 分钟后,每孔添加 30 μ l 用纯水稀释至 90 倍的浓硫酸溶液,停止反应。使用酶标仪(Molecular Devices 公司制 SPECTRAMax)测定波长 490nm 的吸光度。将结果示于表 1。

[0126] (结果及讨论)

[0127] 关于使用 PBP2'、PBP2 各自的抗体进行测定的结果,将代替检体使用放入了稀释液(TBS-T)进行测定的吸光度作为空白,把将该空白减去后的结果示于表中。如表 1 所示,对使用含盐酸的提取试剂或含盐酸及表面活性剂的提取试剂进行了提取的检体而言,PBP2' 及 PBP2 两者的测定值均明显高于空白,能够检测 PBP2' 及 PBP2 两者。另外确认,根据表面活性剂的种类,提取效率中可见差异,在与盐酸组合使用 QUARTAMIN 86W、AMPHITOL 20N、Brij721 等时,获得特别高的吸光度。予以说明,使用盐酸以外的其他酸(乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸)时也获得相同的结果。

[0128] 另一方面,当使用利用氢氧化钠的碱性提取试剂时,对于 PBP2' 可以测定,但测定 PBP2 时的吸光度变为 0、无法进行检测。这说明具有以下的可能:在碱性条件下利用氢氧化钠不能良好地提取 PBP2,或者即便被提取、之后 PBP2 在提取液中被分解、无法作为测定值进行检测。而且,使用了亚硝酸的方法中,无法同时检测 PBP2、PBP2'。其原因虽不清楚,但推测是非专利文献 5 所公开的使用了亚硝酸的抗原提取法是为了提取糖链等碳水化合物性的抗原而使用的,对于提取 PBP2、PBP2' 等蛋白性抗原的目的没有效果。

[0129] 表 1

提取试剂	吸光度 (ΔOD_{490nm})	
	PBP2'	PBP2
0.1M 盐酸 /2%EMALNC35	0.046	0.095
0.1M 盐酸 /2%MEGA-8	0.024	0.049
0.1M 盐酸 /2% Triton X-100	0.043	0.052
0.1M 盐酸 /2%tween20	0.057	0.048
0.1M 盐酸 /2%Brij721	0.161	0.132
0.1M 盐酸 /2% QUARTAMIN86W	0.362	0.160
0.1M 盐酸 /2%CHAPS	0.048	0.068
0.1M 盐酸 /2%AMPHITOL20N	0.145	0.176
0.1M 盐酸	0.025	0.043
0.1M 氢氧化钠	0.080	0.000
0.1M 亚硝酸	0.000	0.000

[0131] (实施例 2) 利用免疫印迹法的 MRSA 的检测

[0132] 根据实施例 1 所记载的方法从 MRSA 的临床分离株中提取抗原,根据 Shagger 等人的方法进行电泳。此时,作为标准品同时电泳纯化抗原。电泳后,根据 Towbin 等人的方法 (Towbin et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 76, p. 4350-4354 (1979)) 将电泳后的提取抗原固定在 PVDF 膜上。接着,利用含 2%B SA 的 TBS 缓冲液对 PVDF 膜上的蛋白非固定化部分进行封闭。

[0133] 在封闭后的 PVDF 膜上滴加用 1%BSA TBS-Tween 0.1% 稀释至 1000 倍的 PBP2' 或 PBP2 的多克隆抗体,室温下放置 1 小时。之后,用 TBS-T (Tween20 浓度为 0.1%) 洗涤该 PVDF 膜,将未反应的多克隆抗体除去。接着,滴加用 0.1%BSA (TBS-Tween 0.1%) 稀释至 5000 倍的过氧化物酶标记抗小鼠 IgG 抗体(市售品)在室温下放置 30 分钟。之后,再次用 TBS-T (Tween20 浓度 0.1%) 洗涤 PVDF 膜,接着用纯化水洗涤 PVDF 膜。滴加发光检测试剂盒 ECL-PLUS (GE 公司制产品编号 RPN2132)4ml,使用发光检测装置 LAS-3000 (富士胶卷公司制)累积 6 分钟检测条带。在为 PBP2 时于 81kDa 附近检测到条带,在为 PBP2' 时于 78kDa 附近检测到条带。

[0134] (结果和讨论)

[0135] 结果示于表 2。将可确认条带的情况显示为+、将无法确认条带的情况显示为-。

如表 2 所示,本提取方法可以同时提取 PBP2、PBP2' 两者。

[0136] 另外,与实施例 1 的结果同样,在使用利用氢氧化钠的碱性提取试剂时,虽然可检测到 PBP2' 的条带、但无法确认 PBP2 的条带。而且,在使用亚硝酸的方法中, PBP2、PBP2' 均无法检测。

[0137] 表 2

提取试剂	条带确认的有无	
	PBP2'	PBP2
0.1M 盐酸 /2%EMALNC35	+	+
0.1M 盐酸 /2%MEGA-8	+	+
0.1M 盐酸 /2% Triton X-100	+	+
0.1M 盐酸 /2%tween20	+	+
0.1M 盐酸 /2%Brij721	+	+
0.1M 盐酸 /2% QUARTAMIN86W	+	+
0.1M 盐酸 /2%CHAPS	+	+
0.1M 盐酸 /2%AMPHITOL20N	+	+
0.1M 盐酸	+	+
0.1M 氢氧化钠	+	-
0.1M 亚硝酸	-	-

[0138] (实施例 3) 使用了本发明的金黄色葡萄球菌判定方法的 MRSA 及 MSSA 的辨别

[0140] 以确认可通过使用本发明的金黄色葡萄球菌的判定方法来进行 MRSA、MSSA 的辨别为目的,使用预先确认为 MRSA 或 MSSA 的临床分离株各 3 株,进行 MRSA 和 MSSA 的辨别试验。根据与实施例 1 相同的方法,分别培养菌,将回收的菌体悬浮在作为本提取试剂的 0.1M HCl + 2.0% tween20 溶液 200 μ l (pH5.0 以下)中。在沸水中将菌悬浮液煮沸 2 分钟,冰上冷却后,向该菌悬浮液中添加 0.1M NaOH (200 μ l) 和 100mM 磷酸缓冲液 (pH8.0、20 μ l),中和至 pH6.0 ~ 8.0。之后,以 1500 \times g 离心 5 分钟,将上清作为检体,供至实施例 1 的 4. 所记载的免疫测定法。

[0141] (结果和讨论)

[0142] 结果示于表 3。结果的显示是将与空白相比吸光度明显增高的检体表示为+、吸光度未上升的检体表示为-。如表 3 所示,MRSA 株的 3 株均保持 PBP2、PBP2' 两者,实际上检测到了两种抗原,确认为 MRSA。而 MSSA 株没有 PBP2'、仅检测到 PBP2。

[0143] 由这些结果可知,本提取方法对于 MRSA 和 MSSA 的辨别是有效的。

[0144] 表 3

[0145]

		检测抗原	
		PBP 2	PBP 2'
MRSA	株 1	+	+
	株 2	+	+
	株 3	+	+
MSSA	株 1	+	-
	株 2	+	-
	株 3	+	-

[0146] (实施例 4) 利用抗体阵列法的 MRSA、MSSA 的辨别

[0147] 以确认可通过使用本发明的金黄色葡萄球菌的判定方法来进行 MRSA、MSSA 的辨别为目的,使用预先确认了为 MRSA 或 MSSA 的临床分离株 MRSA、MSSA 各 29 株,进行利用抗体阵列法的 MRSA 的辨别试验。根据与实施例 1 相同的方法,分别培养菌,将回收的菌体悬浮在作为本提取试剂的 0.1M HCl + 2.0% AMPHITOL 20N 溶液 200 μ l (pH5.0 以下) 中。在沸水中将菌悬浮液煮沸 2 分钟,冰上冷却后,向该菌悬浮液中添加 0.1M NaOH (200 μ l) 和 100mM 磷酸缓冲液 (pH8.0、20 μ l),中和至 pH6.0 ~ 8.0。之后,以 1500 \times g 离心 5 分钟,将上清作为检体。

[0148] 抗体阵列的制作

[0149] 制作图 1 所示布局的抗体阵列。阵列用的玻片使用 PATH Slide (GENTEL BIOSCIENCES 公司),以各 0.5mg/ml 的浓度用微型注射点样机将实施例 1 中使用的固相用抗 PBP2 抗体、抗 PBP2' 抗体点样在玻片上。另外,作为阳性对照,以 1.0 μ g/ml 的浓度点样生物素化 BSA。制作的玻片在室温下放置 6 小时后,使用之前一直保存于 4 $^{\circ}$ C。

[0150] 使用载玻片孵育池 16 孔 (GE Healthcare No. 10486046) 和芯片夹 (GE Healthcare No. 10486081) 用封入区块将阵列的周围划分。向各孔中每孔添加 100 μ l 含 2% BSA 的 TBS 缓冲液 (pH8.0),使其反应 1 小时进行封闭。接着,向各孔中放入 TBS-T 100 μ l 进行洗涤,重复操作 3 次。接着,将从菌株中提取的样品以每孔各 50 μ l 分注至孔中,在 25 $^{\circ}$ C 下进行抗原抗体反应 1 小时。之后,每孔用 100 μ l TBS-T (Tween20 浓度为 0.1%) 洗涤 3 次。接着,每孔分注 50 μ l 使用稀释液 (1% BSA TBS-Tween 0.1%) 将结合有生物素的标记用 PBP2 抗体、PBP2' 抗体分别调整至 10.0 μ g/ml 浓度的混合液,在 25 $^{\circ}$ C 下进行抗原抗体反应 1 小时。

[0151] 每孔用 100 μ l TBS-T 洗涤 3 次后,每孔分注 50 μ l InteliteAB (Kikkoman Corp. 制) 的生物素化荧光素酶 - 链霉亲和素复合体,使其反应 30 分钟。之后,每孔用 100 μ l TBS-T 洗涤 3 次,再每孔用 100 μ l TBS 洗涤 1 次。

[0152] 抗体阵列的测定使用作为发光检测装置的荧光影像分析仪 LAS300 (FUJIFILM 公司制)。向各孔中分别添加 100 μ l 的含荧光素、ATP 和镁离子的 InteliteAB 的荧光素酶发光底物液使其发光,测定 5 分钟的发光。

[0153] (结果和讨论)

[0154] 图 2 中示出所得 MSSA 和 MRSA 各一株的抗体阵列测定图像。图中用黑色表示检测到发光的部分。测定 MSSA 时,点样有抗 PBP2 抗体的部分发光,表示检测出 PBP2。而点样有抗 PBP2' 抗体的部分不发光,表示在检体中没有 PBP2'。因此,可以辨别该检体是 MSSA。另

外,测定 MRSA 时,点样有 PBP2、PBP2' 抗体的部分均发光,表示检体中含有 PBP2、PBP2'。因此可辨别该检体为 MRSA。

[0155] 表 4 表示用抗体阵列测定 MRSA、MSSA 各 29 株时的辨别结果。结果表示为就检查数而言记载的检测出各抗原的检体的个数。有关抗原的检测,将在固相化的抗体的位置上测定到较空白高 10 倍以上发光量的情况判定为检测到抗原。如表 4 所示,MRSA 株的 29 株均同时检测到 PBP2、PBP2' 两者的抗原,可确认为 MRSA。而 MSSA 株没有 PBP2'、仅检测到 PBP2。

[0156] 由这些结果可知,本发明的判定方法对于辨别 MRSA 和 MSSA 是有效的。

[0157] 表 4

[0158]

		检测抗原	
		PBP 2	PBP 2'
MRSA	检测数	29	29
	检查数	29	29
MSSA	检测数	29	0
	检查数	29	29

[0159] (实施例 5) 利用免疫色谱法的 MRSA、MSSA 的辨别

[0160] 以确认可通过使用本发明的试验方法来进行 MRSA、MSSA 的辨别为目的,使用预先确认了为 MRSA 或 MSSA 的临床分离株 MRSA29 株、MSSA29 株,进行利用免疫色谱法的 MRSA 的辨别试验。免疫色谱试验片如下所述根据常规方法制作。

[0161] 分别用金胶体标记实施例 1 中使用的标记用抗 PBP2 抗体、抗 PBP2' 抗体,喷雾在聚苯乙烯无纺布上。将其作为标记试剂部位。另一方面,将实施例 1 中使用的固相用抗 PBP2 抗体、固相用抗 PBP2' 抗体分别涂布在同一个硝基纤维素膜上,使得成为 2 根测试线,充分将其干燥。作为对照用试剂将 Anti-Mouse IgG 同样地涂布在硝基纤维素膜上,充分将其干燥。将其作为补足试剂部位。

[0162] 将上述制作的部位 2 个、用于提供检体的玻璃滤器、吸收用滤纸组合,制成免疫色谱试验片。

[0163] 与实施例 4 同样地从 MRSA29 株、MSSA29 株中提取抗原,将其作为测定样品。将测定样品 100 μ l 投入至制作的免疫色谱试验片的检体供给部位,15 分钟后目视确认补足试剂部的测试线。

[0164] (结果和讨论)

[0165] MSSA 仅 PBP2 检测用测试线确认显色。而 MRSA 在 PBP2 检测用测试线、PBP2' 检测用测试线双方均可确认测试线。表 5 表示测定的检查数和检测数。由这些结果可知本发明的判定方法对于辨别 MRSA 和 MSSA 是有效的。

[0166] 表 5

		检测抗原	
		PBP 2	PBP 2'
[0167]	M R S A	检测数	2 9
		检查数	2 9
	M S S A	检测数	0
		检查数	2 9

[0168] 以上根据实施例说明了本发明。该实施例仅为示例、本领域技术人员可以理解的是该实施例可以有各种变形例、该变形例也处于本发明的范围内。

[0169] 产业上的可利用性

[0170] 如上所述,通过本发明可以早期地发现MRSA、对MRSA感染者或MRSA污染位置进行适当的处置,另外在检测金黄色葡萄球菌时,可以可靠地区分该菌是MRSA还是应该进行与MRSA不同应对方法的MSSA,并分别进行适当的处置,对于金黄色葡萄球菌的检查和诊断、特别是日常的检查和诊断非常有用。

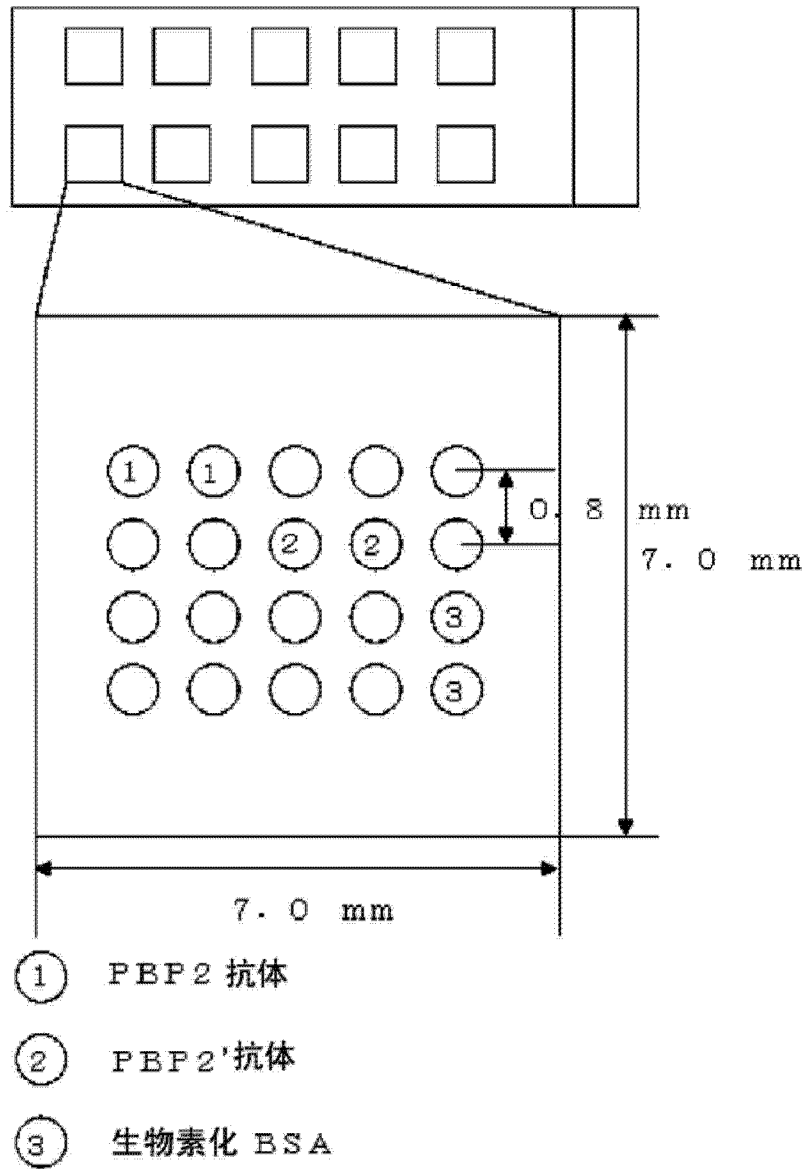
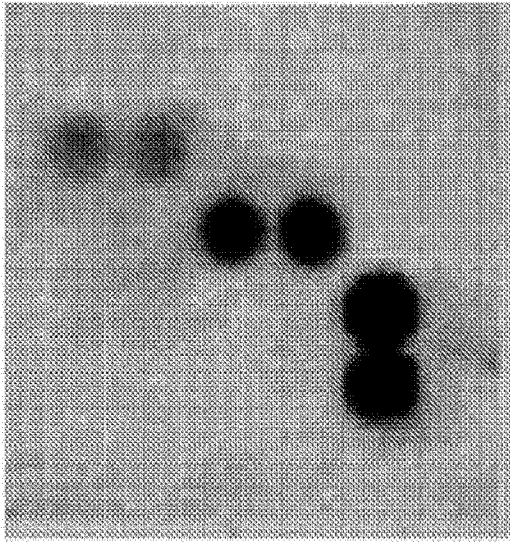


图 1

MRSA 测定图像



MSSA 测定图像

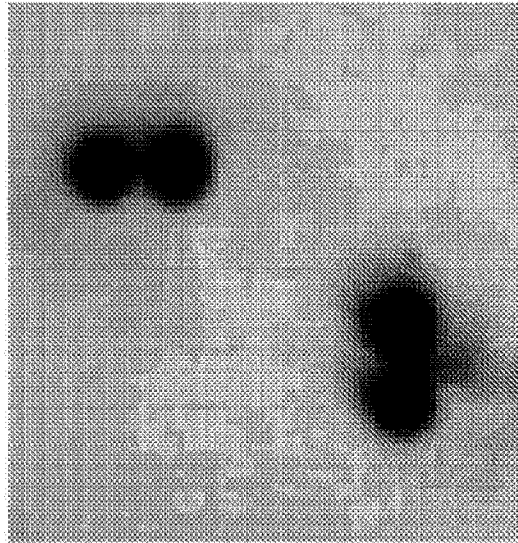


图 2

专利名称(译)	金黄色葡萄球菌抗原的提取方法、金黄色葡萄球菌抗原的提取用试剂及金黄色葡萄球菌的判定方法		
公开(公告)号	CN102695718A	公开(公告)日	2012-09-26
申请号	CN201080059804.9	申请日	2010-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	龟甲万株式会社		
申请(专利权)人(译)	龟甲万株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	龟甲万株式会社		
[标]发明人	志贺一树		
发明人	志贺一树		
IPC分类号	C07K14/31 G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56938 C07K14/31		
代理人(译)	刘新宇		
优先权	2009296642 2009-12-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种金黄色葡萄球菌抗原的提取方法，其特征在于，使用含有选自盐酸、乙酸、柠檬酸、磷酸、硫酸及硝酸中的1种以上的酸的、pH5.0以下的提取试剂从被检体中的金黄色葡萄球菌中提取包含甲氧西林耐药性金黄色葡萄球菌抗原及/或甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌抗原的金黄色葡萄球菌抗原。本发明还提供一种金黄色葡萄球菌的判定方法。

提取试剂	吸光度 (ΔOD_{490nm})	
	PBP2'	PBP2
0.1M 盐酸 /2%EMALNC35	0.046	0.095
0.1M 盐酸 /2%MEGA-8	0.024	0.049
0.1M 盐酸 /2% Triton X-100	0.043	0.052
0.1M 盐酸 /2%tween20	0.057	0.048
0.1M 盐酸 /2%Brij721	0.161	0.132
0.1M 盐酸 /2%QUARTAMIN86W	0.362	0.160
0.1M 盐酸 /2%CHAPS	0.048	0.068
0.1M 盐酸 /2%AMPHITOL20N	0.145	0.176
0.1M 盐酸	0.025	0.043
0.1M 氢氧化钠	0.080	0.000
0.1M 亚硝酸	0.000	0.000