



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102482346 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200980159211. 7

G01N 33/536 (2006. 01)

(22) 申请日 2009. 06. 24

G01N 33/569 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/50 (2006. 01)

10-2009-0020935 2009. 03. 11 KR

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

WO 8802028 A1, 1988. 03. 24,

2011. 11. 10

WO 8802028 A1, 1988. 03. 24,

(86) PCT国际申请的申请数据

Cristina Ryffel et al.. Seqence

PCT/KR2009/003412 2009. 06. 24

comparison of mecA genes isolated from

(87) PCT国际申请的公布数据

methicillin-resistant Staphylococcus

WO2010/104245 EN 2010. 09. 16

aureus and Staphylococcus epidermidis.

(83) 生物保藏信息

《Gene》. 1990, 第1卷 (第94期),

KCLRF-BP-00202 2009. 02. 18

Cristina Ryffel et al.. Seqence

KCLRF-BP-00203 2009. 02. 18

comparison of mecA genes isolated from

KCLRF-BP-00204 2009. 02. 18

methicillin-resistant Staphylococcus

(73) 专利权人 狄诺纳有限公司

aureus and Staphylococcus epidermidis.

地址 韩国首尔

《Gene》. 1990, 第1卷 (第94期),

审查员 李翠莹

(72) 发明人 宋亨根 尹相淳 金海贞 池吉龍

申美香 文裕利

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限

公司 11285

代理人 张广育 胡洪慧

(51) Int. Cl.

G07K 16/12 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书16页

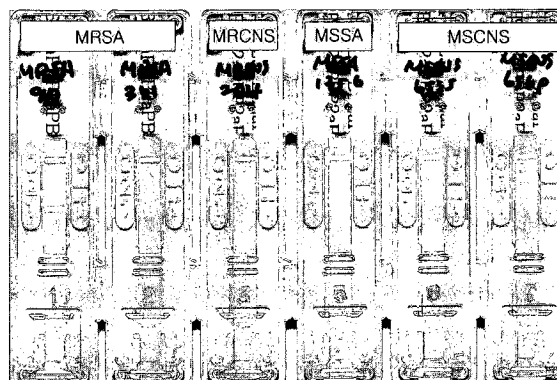
序列表4页 附图18页

(54) 发明名称

对甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌特异的抗体及其用于甲氧西林抗性葡萄球菌的检测方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及抗在金黄色葡萄球菌甲氧西林抗性菌株 (MRSA) 中特异性表达的蛋白的抗体, 以及用于检测 MRSA 的方法和试剂盒。通过使用用于检测 PBP2a 的 PBP2a 特异性抗体和用于检测蛋白质 A 的蛋白质 A 特异性抗体, 本发明能够快速且准确地检测 MRSA。



1. 一种与包含青霉素结合蛋白 2a (PBP2a) 片段的多肽特异性结合的单克隆抗体, 其中所述 PBP2a 片段具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 并且其中所述单克隆抗体由登记号为 KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204 的杂交瘤细胞产生。
2. 一种杂交瘤细胞, 所述杂交瘤细胞产生权利要求 1 的单克隆抗体, 并且具有登记号 KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204。
3. 一种用于检测甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的试剂盒, 包含青霉素结合蛋白质 2a (PBP2a) 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体, 并且其中所述 PBP2a 特异性抗体由登记号为 KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204 的杂交瘤细胞产生。
4. 权利要求 3 的试剂盒, 其中所述 PBP2a 特异性抗体是与由具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸的 PBP2a 片段构成的多肽特异性结合的抗体。
5. 权利要求 3 的用于 MRSA 检测的试剂盒, 其中所述试剂盒被应用于 ELISA 法或侧流免疫谱测定。
6. 权利要求 3 的用于 MRSA 检测的试剂盒, 其中所述蛋白质 A 特异性抗体为从以蛋白质 A 免疫的鸡中获得的多克隆抗体。
7. 一种用于检测甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 的组合物, 包含青霉素结合蛋白质 2a (PBP2a) 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体, 并且其中所述 PBP2a 特异性抗体由登记号为 KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204 的杂交瘤细胞产生。
8. 权利要求 7 的用于 MRSA 检测的组合物, 其中所述 PBP2a- 特异性抗体是与由具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸的 PBP2a 片段构成的多肽特异性结合的抗体。
9. 权利要求 7 的用于 MRSA 检测的组合物, 其中所述蛋白质 A 特异性抗体为从以蛋白质 A 免疫的鸡中获得的多克隆抗体。

对甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌特异的抗体及其用于甲氧西林抗性葡萄球菌的检测方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明提供了针对在金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的甲氧西林抗性株 (MRSA) 中特异性表达的蛋白质的抗体, 和用于检测 MRSA 的方法和试剂盒, 所述方法和试剂盒包括所述抗体, 从而可从其他金黄色葡萄球菌株中快速且准确地选择性区分并检测 MRSA。

背景技术

[0002] 金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 是医院感染和非医院感染的最常见病原体之一。金黄色葡萄球菌 *S. aureus* 的代表类型包括: 甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA)、甲氧西林抗性凝固酶阴性葡萄球菌 (MR-CNS)、甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA) 和甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球菌 (MS-CNS)。在这些细菌中, MRSA 是最常见医院细菌之一, 感染免疫力弱的患者。然而, 仅很少的抗菌药物被开发, 因此由该细菌引起的患者感染率非常高。

[0003] 目前, MRSA 感染可通过以下方法诊断: (1) 在培养的细菌上进行抗生素敏感性测试, (2) 从培养细菌菌落检测 MRSA 特异的基因, 和 (3) 从培养的细菌菌落中检测 MRSA 特异的蛋白。虽然大部分医院使用方法 (1), 但是获得测试结果至少需要 2-3 天。特别是对于小型医院, 通过观察培养细菌中 MRSA 特异的蛋白检测感染的方法很难进行, 因为该方法可能再需要另外一天或两天。因此, 经常不进行诊断测试就使用抗生素。在实践中, 方法 (2) 和 (3) 对于普通诊所太复杂而难以进行, 使得仅为研究目的而进行这些方法。

[0004] 以这些目前可获得的方法, MRSA 感染的检测被延迟, 经常的情况是失去最佳的治疗时间点或者施用了不合适的抗生素。因此, 非常需要开发用于快速且准确检测 MRSA 的方法和试剂盒。

附图说明

[0005] 图 1a 至 1c 显示了, 根据本发明的实施方案, 金黄色葡萄球菌的菌株中青霉素结合蛋白 2a (下文称作 PBP2a) 氨基酸序列的种间同源性。

[0006] 图 2 显示了, 根据本发明的实施方案, 含 PBP2a 的细菌中多个 PBP2a 蛋白的氨基酸同源性, 目的是选择金黄色葡萄球菌特异的序列。

[0007] 图 3 显示了, 根据本发明实施方案, 细菌表达的多肽的电泳结果, 其中所述多肽通过使用 PBP2a 特异性引物获得。在所述凝胶上, M 列分别显示 175kDa、83kDa、62kDa、47.5kDa、32.5kDa 和 26kDa 的分子量标志。1 列是前蛋白质表达物, 2 列是 37kDa His-PBP2a 表达, 3 列是纯化后获得的蛋白。

[0008] 图 4 显示了, 根据本发明的实施方案, 其中显示 His-PBP2a 特异性抗体形成的 ELISA 分析结果, 与 His-凝固酶 (阴性对照抗原) 比较。

[0009] 图 5a 和 5b 显示本发明的单克隆抗体展示的对 His-PBP2a 的亲合度。具体地, 图 5a 是 His-PBP2a 被稀释并通过 ELISA 测定的曲线图, 而图 5b 是本发明的单克隆抗体被稀释

并通过 ELISA 测定的曲线图。

[0010] 图 6 的曲线图显示了,根据本发明的实施方案,测定本发明的单克隆抗体展示的对蛋白质 A 的亲合性的 ELISA 结果。

[0011] 图 7a 和 7b 显示使用本发明的单克隆抗体在 MRSA、MSSA 和 MS-CNS 中检查的 PBP2a 的存在情况。具体地,图 7a 是免疫印迹测定的结果,而图 7b 是 ELISA 的结果。

[0012] 图 8a 是夹心 ELISA 的简单操作思路。图 8b 是(快速)侧流免疫谱测定(lateral flow immunographic assay)的简单操作思路。

[0013] 图 9a 至 9c 显示了,PBP2a 抗原可以通过以下方式检测:从本发明的单克隆抗体制备包被抗体和检测抗体对,并且使用这样的抗体对。具体地,图 9a 显示了夹心 ELISA 的结果,其中与生物素结合的本发明的单克隆抗体被用作检测抗体。图 9b 显示了夹心 ELISA 的结果,其中本发明的 6G10 单克隆抗体被用作检测抗体,并且本发明的'9C6'单克隆抗体作为包被抗体。图 9c 显示了夹心 ELISA 结果,其中 His-PBP2a 被连续稀释。

[0014] 图 10a 和 10b 显示了,MRSA 可以通过使用本发明的单克隆抗体从其他金黄色葡萄球菌选择性检测。图 10a 是这样的测试结果,即其中使用从本发明的单克隆抗体构建的抗体对通过夹心 ELISA 测定从 5 株 MRSA 和 1 株 MSSA 收集的裂解物。图 10b 显示了这样的测试结果,即其中使用从本发明的单克隆抗体构建的抗体对通过夹心 ELISA 检查多个菌株中 PBP2a 的存在情况。

[0015] 图 11 显示了使用从本发明的单克隆抗体构建的抗体对的侧流免疫测定的结果。

[0016] 图 12 显示了其中抗-蛋白质 A 多克隆抗体被用于检测蛋白质 A 存在情况的夹心 ELISA 结果。

[0017] 图 13 显示了其中使用了抗-蛋白质 A 多克隆抗体的侧流免疫测定的结果。

[0018] 图 14a 至 14e 显示了使用本发明的单克隆抗体和抗-蛋白质 A 多克隆抗体的 MRSA 的检测结果。图 14a 是夹心 ELISA 的结果,而图 14b 至 14e 是侧流免疫测定的结果。

具体实施方式

[0019] 【技术问题】

[0020] 认识到以上所述的问题,本发明人研究了用于 MRSA 感染的检测方法并提供了本发明,本发明通过使用 PBP2a 特异性单克隆抗体和蛋白质 A 特异性抗体能够以快速且准确的方式检测 MRSA。

[0021] 因此,本发明的一个目的是提供一种与包含青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)片段的多肽特异性结合的单克隆抗体,其中所述 PBP2a 片段具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸。

[0022] 本发明的另一个目的是提供一种产生所述单克隆抗体的杂交瘤细胞,其中所述杂交瘤细胞的登记号为 KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204。

[0023] 本发明的又一个目的是提供一种用于 MRSA 检测的方法,包括以下步骤:使测试样本与 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体接触;检测抗原-抗体复合物的形成。

[0024] 本发明的再另一个目的是提供一种用于 MRSA 检测的试剂盒,所述试剂盒包含 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体。

[0025] 本发明的再另一个目的是提供一种用于 MRSA 检测的组合物,所述组合物包含 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体。

【0026】 【技术方案】

【0027】 为了实现上述目的,本发明提供了一种与包含 PBP2a 片段的多肽特异性结合的单克隆抗体。所述 PBP2a 片段优选具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

【0028】 本发明还提供了一种产生所述单克隆抗体的杂交瘤细胞。所述杂交瘤细胞的登记号为 KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204。

【0029】 本发明还提供一种用于 MRSA 检测的方法,包括以下步骤:使测试样本与 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体接触;检测抗原-抗体复合物的形成。

【0030】 本发明还提供一种用于甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 检测的试剂盒,所述试剂盒包含 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体。

【0031】 本发明还提供一种用于甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌 (MRSA) 检测的组合物,所述组合物包含 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体。

【0032】 以下是本发明的更详细描述。

【0033】 对于本发明,术语“单克隆抗体”是指本发明所属领域广泛为人所知的单克隆抗体。单克隆抗体显示高特异性,即对单个抗原位点特异(单一特异性的)。与包括不同抗体(每个抗体识别每个不同的表位)的多克隆抗体不同,单克隆抗体识别每个抗原的单个表位。本发明的单克隆抗体能够通过常规克隆和细胞融合技术制备。例如,可通过将目标免疫原(抗原)注射进入野生小鼠或养殖小鼠(即 BALB/c)制备天然单克隆抗体或人单克隆抗体。

【0034】 这样的抗体可以被单独注射或与佐剂结合注射,可以通过载体表达,或者可以以 DNA 或融合蛋白的形式诱导免疫应答。融合蛋白可以是由免疫应答诱导的肽偶联的载体蛋白质。这样的载体蛋白质的实例包括但不限于 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S-转移酶、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白。在该情况下,肽作为运载蛋白质的半抗原发挥作用。

【0035】 下文简单地提供了单克隆抗体的制备方法。将选出的动物加强免疫之后,取出脾脏收集脾细胞。然后使用本发明所属技术领域已知的技术将脾细胞与骨髓瘤细胞融合 [Kohler and Milstein, Nature 256 :495-497 (1975) ;and Harlow and Lane, Antibodies : A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Laboratory, New York (1988)]。获得杂交瘤细胞后,通过常规技术(例如,通过有限稀释)进行克隆,然后培养产生所需单克隆抗体的克隆。单克隆抗体提供以下益处:提高利用抗原-抗体复合物的诊断和分析技术的选择性和特异性。另一个益处是,这样的单克隆抗体无污染,因为它们是通过杂交瘤培养生产的。

【0036】 对于本发明,术语“杂交瘤”为本领域技术人员广泛所知,是指由抗体产生细胞和无限增殖细胞融合产生的细胞。例如,杂交瘤可以是与骨髓瘤细胞融合产生的细胞。杂交瘤能够持续提供抗体。

【0037】 对于本发明,术语“检测标签”是指用于检测免疫复合体的标签。这样的检测标签的实例包括但不限于:放射性同位素、酶、化学发光化合物、荧光物质(如荧光素)、藻胆蛋白、镧系元素螯合物、罗丹明、酶辅因子和生物素。

【0038】 对于本发明,术语“测试样本”是指任何生物材料,包括细胞、组织和生物流体 (biofluid)。

【0039】 对于本发明,术语“抗原-抗体复合物”是指 PBP2a(或蛋白质 A)和识别所述 PBP2a(或蛋白质 A)的相应抗原的复合物,因此所述复合物可以用于确定 PBP2a(或蛋白质

A) 在所给样本中存在与否。

[0040] 本发明的PBP2a特异性抗体可以是与包含具有SEQ ID NO :1的氨基酸的PBP2a片段的多肽特异性结合的抗体,该片段在PBP2a序列中显示低程度的种间同源。所述PBP2a特异性抗体优选可以是单克隆抗体。

[0041] 此外,所述具有SEQ ID NO :1的氨基酸的PBP2a片段可以纯化自所述MRSA株,或者可以通过使用载体以重组蛋白的形式制备。所述PBP2a片段优选可以通过使用EcoR I和Xho I作为限制性内切酶进行载体克隆而获得。

[0042] 所述多肽被构建为包含对MRSA的PBP2a特异的N末端区,这是通过在金黄色葡萄球菌多个株中同源分析PBP2a发现的(参见实施例1-1)。

[0043] 因此,本发明的抗体可以将所述多肽识别为抗原,从而检测PBP2a的存在情况。所述抗体优选可以是单克隆抗体。可使用常规抗体制备技术制备所述单克隆抗体。抗体优选产生自选自杂交瘤KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203和KCLRF-BP-00204(由保藏号表示)的杂交瘤。所述杂交瘤于2009年2月18日保藏于韩国细胞系库(Korean Cell LineBank)。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,可以使用PBP2a特异性引物制备大量抗原(参见实施例1-2)。然后将所述抗原腹腔内注射至小鼠。之后,对产生多克隆抗体的小鼠进行选择,其中多克隆抗体显示出针对PBP2a的最高抗体滴度,但对His-凝固酶(用作阴性对照)却显示出低度的亲和性(参见实施例1-3)。通过融合所述小鼠的脾脏细胞和骨髓瘤细胞制备杂交瘤。从所述杂交瘤产生PBP2a特异性单克隆抗体(参见实施例2)。

[0045] 由于本发明的单克隆抗体表现出PBP2a特异性识别,它们可以检测MRSA和MR-CNS,已知它们含有PBP2a。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,由ELISA证实了本发明的单克隆抗体具有PBP2a抗原特异性(参见实施例3)。由免疫印迹测定或ELISA证实,本发明的单克隆抗体可以用于检测MRSA(参见实施例4)。此外,在本发明的一个实施方案中,从本发明的单克隆抗体中选择单克隆抗体对,并且发现使用这样的单克隆抗体对可以通过夹心ELISA或免疫色谱测定检测MRSA(参见实施例5)。

[0047] 本发明的单克隆抗体可以,但不限于,是与能够产生可检测信号的检测标签结合的单克隆抗体。这样的检测标签可以是选自以下的一种或多种:酶、荧光物质、发光和放射性材料。更详细地,检测标签的实例包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。

[0048] 所述检测标签可直接地或通过偶联物(即,本领域已知的连接物)间接地偶联或结合至本发明的单克隆抗体。合适的酶的实例包括:辣根过氧化物酶、乙酰胆碱酯酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、苹果酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和转化酶。合适的辅基的实例包括:链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素。合适荧光材料的实例包括:伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯、藻红蛋白和藻胆蛋白。合适发光材料的实例包括:鲁米诺、异氨基苯二酰肼(isoluminol)和光泽精。合适生物发光材料的实例包括:萤光素酶、萤光素和水母蛋白。合适放射性材料的实例包括: ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^{14}C 和 ^3H 。

[0049] 待用于本发明的杂交瘤细胞系可以是登记号为KCLRF-BP-00202、KCLRF-BP-00203或KCLRF-BP-00204的杂交瘤细胞。所述杂交瘤细胞系于2009年2月18日保藏于韩国细

胞系库。

[0050] 产生这样的杂交瘤的技术为本领域技术人员广泛知晓,优选通过抗体产生细胞和无限增殖细胞(例如,骨髓瘤细胞)融合制备杂交瘤。

[0051] 在本发明的一个实施方案中,在杂交瘤中小鼠脾细胞和小鼠杂交瘤细胞融合,通过其证实可以产生 PBP2a 特异性单克隆抗体(参见实施例 2)。

[0052] 可以将本发明的 MRSA 检测方法用于通过检测抗原-抗体复合物的存在情况来检测 MRSA,在所述方法中使 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体各自与测试样本接触。

[0053] 所述 PBP2a 特异性抗体可以是与包含具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 PBP2a 片段的多肽特异性结合的抗体。所述与包含具有 SEQ IDNO:1 的氨基酸的 PBP2a 片段的多肽特异性结合的 PBP2a 特异性抗体是本发明的单克隆抗体。

[0054] 蛋白质 A 是在金黄色葡萄球菌中特异性表达的蛋白,其在 MRSA 和 MSSA 中特异性表达,但不在 MR-CNS 或 MS-CNS 中表达。

[0055] 所述蛋白质 A 特异性抗体可以,但不必须,是从以蛋白质 A 免疫的鸡中获得的多克隆抗体。

[0056] 本发明的检测方法能够通过使用 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体二者检测 MRSA。由于蛋白质 A 存在于 MRSA 中,但不存在于 MR-CNS 中,所述两菌株不能仅通过使用 PBP2a 特异性抗体来区分,但可以通过使用 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体二者轻易地区分。

[0057] 由于蛋白质 A 对很多抗体中 Fc 区的亲和性,通过使用抗体检测蛋白质 A 有困难。然而,已知来自鸡的抗-蛋白质 A 抗体不表现这种对蛋白质 A 的结合性质(Larsson A, **Sjöquist** J. 1989 ;27(12) :2856-7. J ClinMicrobiol.)。因此,抗-蛋白质 A 抗体通过用蛋白质 A 免疫鸡制备(参见实施例 6-1)。

[0058] 在本发明的实施方案中,证实了产生蛋白质 A 的菌株 MRSA 和 MSSA 可以以如上制备的蛋白质 A 特异性抗体通过夹心 ELISA 或免疫色谱测定检测(参见实施例 6-2 和 6-3)。

[0059] 因此,本发明的 MRSA 检测方法(1)通过 PBP2a 特异性抗体检测 PBP2a,(2)通过蛋白质 A 特异性抗体检测蛋白质 A,从而能够特异性检测 MRSA,MRSA 含有 PBP2a 和蛋白质 A 二者。换言之,可得出这样的结论,即当在(1)和(2)两项检测中都观察到阳性抗原-抗体反应时,存在 MRSA。

[0060] 在本发明的一个实施方案中,通过如上所述的(1)和(2)的抗原-抗体反应检测 MRSA 的存在情况。参见实施例 7。

[0061] 检测所述抗原-抗体复合物存在情况的方法包括但不限于:放射性免疫分析、ELISA(酶联免疫吸附测定)、夹心免疫分析和侧流免疫谱测定。抗原-抗体复合物的检测涉及使用直接或间接标记的抗体。上文描述了可用的检测标签。所述方法是本领域技术人员广泛知晓的。例如,在 ELISA 的情况下,将测试样本与本发明的单克隆抗体或蛋白质 A 特异性抗体接触,所述抗体包被在微量滴定板、膜、测试条等之上。在一个实施方案中,可用本发明的单克隆抗体或用蛋白质 A 特异性抗体包被微量滴定板孔,并且用 BSA 封闭未占据的结合位点。用测试样本孵育所述包被的孔,并对其检查以确定抗原-抗体复合物的存在情况。可如上所述将所述抗体标记,用于检测。

[0062] 具体地,如果使用夹心免疫分析和侧流免疫谱测定,可以使用从本发明的单克隆

抗体制备的抗体对进行 MRSA 检测。参见图 8。这样的抗体对可以是利用本发明的单克隆抗体之一的任何抗体。优选将从 KCLRF-BP-00202 杂交瘤产生的单克隆抗体用作检测抗体, 将从 KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204 杂交瘤产生的单克隆抗体用作包被抗体。

[0063] 在本发明的一个实施方案中, 通过选择单克隆抗体对并利用所述单克隆抗体对, 可以通过夹心免疫分析和侧流免疫谱测定实现 MRSA 检测。具体地, 进行了 MRSA 的有效检测, 其中从 KCLRF-BP-00202 杂交瘤产生的单克隆抗体被用作检测抗体, 从 KCLRF-BP-00203 或 KCLRF-BP-00204 杂交瘤产生的单克隆抗体被用作包被抗体。参见实施例 5。

[0064] 本发明的 MRSA 检测试剂盒包含 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体。

[0065] 所述 PBP2a 特异性抗体可以是与包含具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸的 PBP2a 片段的多肽特异性结合的抗体。所述 PBP2a 特异性抗体优选是本发明的单克隆抗体。

[0066] 可用于本发明的所述试剂盒系统可包含但不限于: ELISA 板、深插入装置 (deep-stick device)、免疫色谱测定、径向分隔免疫测定装置、流过装置 (flow-through device) 等。优选可以使用以免疫色谱条或装置形式提供的诊断试剂盒。在免疫色谱诊断中, 测试血清中包含的抗原与结合至胶体金颗粒的微量抗体反应。然后, 当通过毛细作用迁移通过硝酸纤维膜上的微孔时, 所述抗原结合至捕获抗体从而在所述条上出现颜色, 使得通过肉眼可观察到阳性和阴性信号。

[0067] 这样的试剂盒优选使用 ELISA 或侧流免疫谱测定。如前所述, 当使用夹心免疫测定和侧流免疫谱测定时, 使用本发明的单克隆抗体制备的抗体对可用于 MRSA 检测。

[0068] 可用于本发明的试剂盒可以是但不限于包含以下组分的试剂盒: 固相支持物; 本发明的单克隆抗体和蛋白质 A 特异性抗体; 和 ELISA 反应流体, 其含有用于与抗原反应的酶标抗体溶液和用于发出酶反应信号的染料试剂。更具体地, 所述酶标抗体溶液可以是山羊抗小鼠 Ig-HRP (合适浓度下每孔 50-150 μ l)。所述染料试剂可选自四甲基联苯胺 (TMB)。终止溶液可选自 1N HCl 和 1N H₂SO₄。

[0069] 本发明的用于 MRSA 检测的组合物包含 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体。

[0070] 所述 PBP2a 特异性抗体可以是与包含具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸的 PBP2a 片段的多肽特异性结合的抗体。所述 PBP2a 特异性抗体优选可以是本发明的单克隆抗体。

[0071] 除了所述 PBP2a 特异性抗体和蛋白质 A 特异性抗体外, 所述组合物还可以包含用于免疫测定的载体、能够产生可检测信号的检测标签、溶剂 (resolvent) 和清洗剂。此外, 在标记物质是酶的情况下, 所述组合物还可包含底物和反应终止剂。合适载体的实例包括但不限于, 可溶载体, 例如本领域已知的生理可接受的缓冲溶液 (例如, PBS); 不可溶载体, 例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚酯、聚丙烯腈、氟树脂、交联葡聚糖、多糖、大分子 (包括铺在乳胶、纸、玻璃、金属、琼脂糖及其结合物上的金属磁性微粒)。

[0072] 如上所述, 通过使用用于检测 PBP2a 的 PBP2a 特异性抗体和使用用于检测蛋白质 A 的蛋白质 A 特异性抗体, 本发明能够快速且准确地检测含有 PBP2a 和蛋白质 A 二者的 MRSA。

[0073] 参考以下实施例进一步解释本发明。但是, 这些实施例不应以任意方式解释为限制本发明的范围。

[0074] < 实施例 1 >

[0075] 制备对 MRSA 中 PBP2a 特异的多克隆抗体

[0076] <1-1> 确定 PBP2a 中的特异性位点

[0077] 使用 SIB BLAST NetworkService(ExpASY Proteomics Server, <http://au.expasy.org/tools/blast/>) 来测量金黄色葡萄球菌 PBP2a 的种间同源性。结果显示在图 1 中。

[0078] 在图 1a 至 1c 中, 绿色表示高同源性, 所有显示绿色的部分都来自具有 PBP2a 的细菌。对于具有 PBP2a 的细菌, 使用 SIB BLASTNetworkService(ExpASY Proteomics Server, <http://au.expasy.org/tools/blast/>) 来确定显示低同源性的序列组。

[0079] 如图 2 中所示, N 末端显示低同源性, 而 C 末端显示相对高同源性。此外, 在与转肽酶功能有关的 C 末端部分, 观察到了相似 PBP2a 中的高度同源性。因此, N 末端部分 (SEQ ID No :1) 被选作 PBP2a 蛋白质中的 MRSA 特异性位点。PBP2a 的整个氨基酸序列在 SEQ ID No :2 中提供。

[0080] <1-2>PBP2 抗原

[0081] 在表 1 所示的条件下, 对从 MRSA 菌落提取的基因 DNA 进行 PCR。使用如下表 2 中的 PBP2a 特异性引物。

[0082] 表 1 :PCR 条件

[0083]

	反应温度和持续时间	循环数
变性	95°C 7min	
循环	95°C 30s 58°C 30s 72°C 1min 30s	30 个循环
延伸	72°C 7min	

[0084] 表 2 :PBP2a 特异性引物

[0085]

正义	SEQ ID NO. 3	5' -GGAATTCGGTATATATTTTTATGCTTC-3'
反义	SEQ ID NO. 4	5' -TCTCGAGAGTACCTGAGCCATAATC-3'

[0086] 使用限制性酶 EcoR I 和 Xho I 将 988bp 碱基的所得 PCR 产物克隆至 pET 载体, 然后表达 PBP2a 蛋白。电泳观察 PBP2a 蛋白, 其结果显示在图 3 中。图 3 显示了使用所述 PBP2a 特异性引物产生了约 37kDA 的蛋白。

[0087] <1-3> 制备抗 PBP2a 的多克隆抗体

[0088] 将来自实施例 1-1 的所述 PBP2a 重组蛋白腹腔内注射给 6 周的雌性 BALB/c 小鼠 (每只鼠注射 50 μg)。使用弗氏佐剂, 将小鼠以 1 个月的间隔免疫 3 次。然后, 从尾收集血液, 在 14000rpm 下离心 2-3 分钟以获得血清上清液。从所述血清中获得包括 PBP2a 抗体的多克隆抗体。

[0089] 通过其中孔被所述重组抗原包被的间接 ELISA 测量所述多克隆抗体的抗体滴度。结果显示在表 3 和 4 以及图 4 中。His-凝固酶被用作对照, 目的是更好地确定抗 PBP2a、不

抗 His 的抗体滴度。

[0090] 表 3 :多克隆抗体中抗 His-PBP2a 的抗体滴度

[0091]

血清稀释	His-PBP2a 10ng/孔				
	#1小鼠	#2小鼠	#3小鼠	#4小鼠	#5小鼠
1/1,000	0.883	1.339	1.376	1.711	1.150
1/10,000	1.695	1.705	1.965	1.892	1.878
1/100,000	0.964	0.640	0.879	0.511	0.997
1/1,000,000	0.123	0.061	0.162	0.222	0.143

[0092] 表 4 :抗 His- 凝固酶的多克隆抗体的抗体滴度

[0093]

血清稀释	His-凝固酶 10ng/孔				
	#1小鼠	#2小鼠	#3小鼠	#4小鼠	#5小鼠
1/1,000	0.285	0.481	0.741	0.553	1.235
1/10,000	0.007	0.067	0.047	0.012	0.061
1/100,000	0.000	0.008	0.006	0.002	0.004
1/1,000,000	-0.001	0.000	-0.003	-0.002	-0.002

[0094] 如表 3 和 4 以及图 4 中所示,最高抗体滴度来自于所述五只小鼠中的 #3 小鼠。结合 His-PBP2a 的抗体显示了对 His-PBP2a 的高亲和性,但显示了对 His- 凝固酶 (阴性对照抗原) 的低亲和性。

[0095] < 实施例 2>

[0096] 制备对 MRSA 的 PBP2 特异的单克隆抗体

[0097] <2-1> 制备杂交瘤

[0098] 产生单克隆抗体的杂交瘤细胞产生自实施例 1-3 中的 #3 小鼠,所述 #3 小鼠显示最高的抗 PBP2a 的多克隆抗体滴度。具体地,采集脾脏以得到单细胞悬液。用 RPMI 1640 (Hyclone) 洗涤所述悬液两次,使用台盼蓝染色进行细胞计数。

[0099] 至于待与所述脾细胞融合的细胞,使用了 SP2/0 或 X63 小鼠骨髓瘤细胞系 (ATCC CRL-1581, ATCC CRL-1580)。如对所述脾细胞进行的一样,对所述骨髓瘤细胞进行洗涤和细胞计数。在将所述脾细胞和所述骨髓瘤细胞的混合物 (所述脾细胞与所述骨髓瘤细胞的比例为 1 : 5) 离心之后,去除上清液。在 1 分钟内逐渐加入 1500ml 预热的 (37°C) 50% 聚乙二醇。将样本静置 1 分钟。然后加入 RPMI-1640 (Hyclone) 进行系列稀释。随后将所述样本离心并用含有 1×HAT 的 RPMI 1640 (20% FBS, 次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷) 悬浮。将所述溶液放在 96 孔板中 (每孔 100 μl), 然后在 37°C 在 5% CO₂ 的培养箱中培养。

[0100] <2-2> 分离和选择杂交瘤

[0101] 在对所述杂交瘤 (来自实施例 2-1, 骨髓瘤细胞与脾细胞融合) 进行 HAT 饲喂后,一旦在孔中出现菌落,收集 200ul 上清液。通过 ELISA 选择单克隆抗体。

[0102] 具体地,为了选择单克隆抗体,以重组 PBP2a 蛋白 (每孔 100ng) 包被 ELISA 板,然后向其中加入 100ul 上述上清液。用山羊抗小鼠 Ig-HRP 进行 ELISA。

[0103] 通过 ELISA 筛选抗体阳性杂交瘤后,将这些杂交瘤移入含有 HFCS (杂交瘤融合和克隆添加剂, Roche) 的 24 孔板并在其中培养。一旦菌落占据约所述的板 50-70%,再次筛

选抗体阳性杂交瘤,通过有限稀释克隆所选的杂交瘤(单细胞克隆)。将所述杂交瘤扩展至显示产生抗体的最后克隆,这样制备了如表 5 中所示的产生抗 PBP2a 抗原的单克隆抗体的三个杂交瘤。

[0104] 表 5:产生抗 PBP2a 抗原的单克隆抗体的杂交瘤

[0105]

	克隆 #
1	6G10-46-63
2	9C6-52-40
3	17A10-2-2

[0106] 所述杂交瘤于 2009 年 2 月 18 日保藏于韩国细胞系库,收到对于克隆 6G10-46-63 的登记号为 KCLRF-BP-00202;对于克隆 9C6-52-40 的登记号为 KCLRF-BP-00203;对于克隆 17A10-2-2 的登记号为 KCLRF-BP-00204。

[0107] <2-3> 分离和纯化单克隆抗体

[0108] 进行操作用于大量纯化从实施例 2-2 得到的杂交瘤克隆。腹膜内注射 0.5ml 弗氏不完全佐剂,10 天之后,将悬浮于 0.5ml 的 PBS 的 5×10^6 个杂交瘤细胞注射至腹腔内。

[0109] 在注射杂交瘤后 10 至 14 天之间从腹腔内收集腹水并离心。加入 0.02% 叠氮化钠作为防腐剂。根据单克隆抗体的同种型,使用蛋白质 A 或 G 琼脂糖珠纯化所述抗体。将获得的所述三个不同克隆的单克隆抗体分别标记为: '6G10'、'9C6' 和 '17A10'。

[0110] <实施例 3>

[0111] ELISA 确证所述单克隆抗体的抗原特异性

[0112] <3-1>ELISA 确定所述单克隆抗体的 PBP2a 抗原特异性

[0113] 将 ELISA 板 (Maxisorp, Nunc) 在每个稀释之后于 37 °C 孵育一小时,用于 His-PBP2a 包被,所加入的 His-PBP2a 以 PBS 系列稀释(初始为 10ng/孔)。将所述板在 37°C 在 3% BSA/PBS 中继续孵育另外 1 小时,进行封闭。

[0114] 在用 PBS 稀释后,将实施例 2-3 的单克隆抗体加入所述孔中(每孔 1 μ g)并孵育一小时以使抗原抗体反应进行。然后,将所述孔洗涤 3 次。在以 Ig-HRP(辣根过氧化物酶, Dinona) 处理结合的抗体后,将所述孔在 37°C 孵育 30 分钟。

[0115] 在孵育之后,将所述孔再次洗涤 3 次。用 TMB 溶液作为颜色反应的底物处理所述孔(每孔 50 μ l),然后使颜色反应进行 10 分钟。加入终止溶液(每孔 50 μ l)停止所述反应。对于根据本发明的实施方案制备的单克隆抗体,在 450nm 测量显色强度。结果显示在图 5a 中。图 5b 显示这样的结果,即其中所述孔被 His-PBP2a(每孔 10ng)包被,加入系列稀释的抗体(初始为 500ng/ml)。

[0116] 如图 5a 和 5b 中所示,各个单克隆抗体显示出对抗原不同程度的结合。

[0117] <3-2>ELISA 确定所述单克隆抗体的蛋白质 A 抗原特异性

[0118] 蛋白质 A——一种金黄色葡萄球菌特异性蛋白——已知与抗体的 Fc 区结合 (Larsson A, **Sjöquist J.** 1989 ;27(12) :2856-7. J ClinMicrobiol./Lindmark R,

Sjöquist J. 1983 ;62 :1-13. J. Immunol. Methods)。因此,使用对蛋白质 A 低亲和性的抗体可以增加所述抗体的 PBP2a 特异性。在这一点上,本发明人通过 ELISA 检查了实施例 2-3 中制备的单克隆抗体与蛋白质 A 结合的程度。

[0119] 将来自金黄色葡萄球菌的蛋白质 A (Fluka Inc.) 以 PBS 系列稀释 (初始为 100ng/孔) 加入至 Maxisorp 板 (Nunc.) 中,然后将其在每个稀释后在 37°C 孵育 1 小时,进行包被。然后,在 37°C 在 3% BSA/PBS 中孵育另外 1 小时,进行封闭。将从实施例 2-3 获得的单克隆抗体稀释后以 1ug/孔加入上述制备的孔。将所述孔孵育 1 小时,使得抗原-抗体反应被诱导,然后洗涤三次。在以 Ig-HRP (辣根过氧化物酶, Dinona) 处理结合的抗体后,将所述孔在 37°C 孵育 30 分钟。然后用 TMB 溶液 (每孔 50ul) 作为底物处理所述孔进行颜色反应,使反应进行 10 分钟。通过加入终止溶液 (每孔 50ul) 来终止所述反应。对于根据本发明的实施方案制备的单克隆抗体,在 450nm 下测量显色强度。结果显示在图 6 中。

[0120] 图 6 显示,各个单克隆抗体显示出不同程度的对蛋白质 A 的特异性,表明使用本发明实施方案的单克隆抗体的免疫测定的能够不受蛋白质 A 影响地进行。

[0121] < 实施例 4 >

[0122] MRSA 检测

[0123] <4-1> 从 MRSA 类细菌分离细胞裂解物

[0124] 对于本实施例,提供了由 Chungbuk National University Hospital 分离/鉴定的细菌株。用 PBS 将所述细菌洗涤 2 次,然后悬浮在细菌裂解缓冲液 (B-PER buffer, Pierce) 中孵育 30 分钟。然后,在 -70°C 进行 2 次冻融步骤。然后将所述细胞在 14,000rpm 下离心 25 分钟。从离心后收集的上清液中获得每个细菌株的裂解液。进行 Bradford 测定以定量蛋白水平,其结果显示在下表 6 中。

[0125] 表 6 :细菌裂解物的吸光度和浓度

[0126]

	562nm 吸光度		浓度 (ug/ml)		
	未稀释	稀释 1/2	未稀释	稀释 1/2	平均值
MSSA 1765	1.083	0.857	445	325	385
MSSA 1886	1.528	1.077	1001	875	938
MRSA 80	2.009	1.382	1602	1637	1620
MRSA 85	1.951	1.351	1530	1560	1545
MRSA 97	1.317	1.051	737	810	774
MRSA 361	2.152	1.689	1781	2405	2093
MRSA 1395	1.353	1.079	782	880	831
MRSA 1672	1.962	1.430	1544	1757	1650
MRCNS 204	1.577	1.223	1062	1240	1151
MSCNS 6535	1.674	1.224	1184	1242	1213

[0127] <4-2> 以免疫印迹测定进行 MRSA 检测

[0128] 进行免疫印迹测定以测试从实施例 2-3 得到的单克隆抗体是否可以用于检测 MRSA、MSSA 和 MS-CNS 中的 PBP2a。

[0129] 详细说明如下。在 10% SDS-PAGE (1ug/泳道) 上电泳金黄色葡萄球菌的裂解蛋白,将其电转移至硝酸纤维素膜上。然后,在室温下在 5% BSA/PBS 中孵育 1 小时,以停止

不存在蛋白质区域的反应。加入以 PBS 稀释的实施例 2-3 的单克隆抗体 (1 μ g/ml), 将所述膜继续孵育 1 小时以诱导抗原 - 抗体反应, 然后洗涤 3 次。在以 Ig-HRP (辣根过氧化物酶, Dinona) 处理所结合的抗体后, 将所述膜在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 洗涤 3 次。用针对反应酶的 ECL (增强的化学发光, PIERCE) 处理后, 将所述膜曝光至 X-射线胶片。结果显示在图 7a 中。

[0130] 如图 7a 中所示, 约 70kDa PBP2a 仅在 MRSA 中出现, 这表明 MRSA 可使用本发明实施方案制备的单克隆抗体有效地检测。

[0131] <4-3> 以 ELISA 测定进行 MRSA 检测

[0132] 将 ELISA 板 (Maxisorp, Nunc) 在每个稀释之后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 用于 MRSA 裂解物包被, 所加入的 MRSA 裂解物以 PBS 系列稀释 (初始为 10ng/孔)。将所述板在 3% BSA/PBS 中在 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 1 小时, 进行封闭。在以 PBS 稀释后, 将实施例 2-3 的单克隆抗体加入所述孔中 (每孔 1 μ g) 并孵育 1 小时, 以使抗原 - 抗体反应进行。

[0133] 然后, 将所述孔洗涤 3 次。在以 Ig-HRP (辣根过氧化物酶, Dinona) 处理所结合的抗体后, 将所述孔在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。在孵育后, 将所述孔再洗涤 3 次。以 TMB 溶液 (每孔 50 μ l) 作为底物处理所述孔进行颜色反应, 使反应进行 10 分钟。通过加入终止溶液 (每孔 50 μ l) 停止所述反应。在 450nm 下测量所述颜色反应的强度。结果显示在图 7b 中。

[0134] 图 7b 显示, 尽管所述单克隆抗体之间存在差异, 但是由实施例 2-3 得到的单克隆抗体表现出对 MRSA 的亲合性高于对 MSSA 的亲合性。

[0135] <实施例 5>

[0136] 使用抗体对进行 MRSA 检测

[0137] <5-1> 选择单克隆抗体对

[0138] 为了将抗体应用于免疫测定, 例如夹心 ELISA 和快速试剂盒, 抗体必须成对地 (不是由单个抗体) 识别所给的抗原 (After R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, Kuby Immunology, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 162) (参见图 8a 和 8b)。

[0139] 为了确定最合适的识别 PBP2a 抗原的抗体对, 将实施例 2-3 中得到的单克隆抗体以 PBS 稀释作为捕获抗体 (每孔 100ng), 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时并包被在 Maxisorp 板上。然后, 将所述孔在 3% BSA/PBS 中孵育 1 小时并封闭。将以 PBS 系列稀释的 His-PBP2a 以 10ng/孔的量加入所述孔中, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 然后结合至所述包被的抗体。

[0140] 将所述孔洗涤 3 次后, 将与生物素结合的单克隆抗体以 PBS 1 : 1000 稀释, 以 100 μ l/孔的量加入所述孔中, 孵育 1 小时以使与所述抗原结合。

[0141] 在将所述板洗涤 3 次后, 将所述抗原 - 抗体复合物在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟, 同时用链霉亲和素 - 辣根过氧化物酶 (HRP) 处理。再次洗涤 3 次后, 以 TMB 溶液 (每孔 50 μ l) 作为反应酶的底物处理所述孔, 使底物 - 酶反应进行 10 分钟。加入终止溶液 (每孔 50 μ l) 终止所述反应。在 450nm 测量所述颜色反应的强度。结果显示在图 9a 中。

[0142] 图 9a 显示, 来自从实施例 2-3 得到的单克隆抗体的抗体对可以有效地识别 PBP2a 抗原。具体地, 当 6G10 单克隆抗体被用于检测并且 9C6 单克隆抗体用于包被时, 对于所给相同浓度的 His-PBP2a 的检测效率最高。

[0143] 图 9b 显示, 当 6G10 单克隆抗体没有结合至生物素而直接与 HRP 结合用于检测目的时, 对 His-PBP2a 的亲合性随用于包被的抗体类型而异。

[0144] 图 9b 表明, 抗体对表现出对所给 (相同) 浓度的 His-PBP2a 的亲合性差异, 但本

发明的单克隆抗体能够有效地识别 PBP2a 抗原。

[0145] 图 9c 显示在 His-PBP2a 的每个系列稀释后所述抗体对结合亲和性的变化。

[0146] 图 9c 表明,在系列稀释后观察到了抗体对的结合亲和性的差异,但本发明的单克隆抗体能够有效地识别 PBP2a 抗原。

[0147] <5-2> 使用抗体对以夹心 ELISA 进行 MRSA 检测

[0148] 将 Maxisorp 板 (Nunc.) 在每个稀释之后于 37°C 孵育 1 小时,用于作为捕获抗体的单克隆抗体包被,所述单克隆抗体用 PBS 系列稀释(初始为 100ng/孔)。将所述板在 3% BSA/PBS 中于 37°C 继续孵育 1 小时,进行封闭。将在 PBS 中系列稀释的实施例 4-1 的 MRSA 和 MSSA 的裂解物加入所述孔中(初始为 100ng/孔),并且在每个稀释后在 37°C 孵育 1 小时以使它们与所述包被抗体结合。

[0149] 在 3 次洗涤后,将实施例 2-3 得到的 '6G10' 单克隆抗体结合至 HRP(辣根过氧化物酶)。然后,将所述抗体以 PBS 1 : 1000 稀释加入所述孔中(100u1/孔),将所述孔孵育 1 小时进行抗体-抗原结合。

[0150] 再次洗涤 3 次后,以 TMB 溶液(每孔 50u1)作为颜色反应的底物处理所述孔 10 分钟。然后,使底物-酶反应进行 10 分钟。加入终止溶液(每孔 50u1)终止所述反应。在 450nm 测量所述颜色反应的强度。结果显示在图 10a 中。

[0151] 图 10a 表明,从实施例 2-3 得到的抗体可有效地将 MRSA 与 MSSA 区分开,从而有效地检测 MRSA。具体地,如果 '6G10' 单克隆抗体被用作检测抗体且 '17A10' 单克隆抗体被用作包被抗体,那么检测效率最高。

[0152] 图 10b 显示的结果为,通过使用 '6G10' 单克隆抗体作为检测抗体且 '17A10' 单克隆抗体作为包被抗体,对 4 株 MRSA、1 株 MR-CNS、2 株 MSSA 和 2 株 MS-CNS 检测的 PBP2a 存在情况。

[0153] 图 10b 显示,对于其中存在 PBP2a 的 MRSA 和 MR-CNS,得到了大值。

[0154] <5-3> 使用抗体对以免疫色谱测定进行 MRSA 检测

[0155] 测试了本发明实施方案的单克隆抗体对是否能够以快速试剂盒形式用于侧流免疫谱测定,所述试剂盒使用金缀合的检测抗体。

[0156] 步骤详细描述如下。将在从本发明的单克隆抗体中选择的所述捕获抗体包被在所述膜上,将所述检测抗体与金缀合,干燥并组装至所述装置。在所述组装的装置中,处理 100u1 如从实施例 4-1 所得到的每个细胞系的裂解物。20 分钟后观察到的结果显示在图 11 中。

[0157] 如图 11 所示,使用所述单克隆抗体对,在 MRSA 和 MR-CNS(都有 PBP2a)观察到了所述测试株系(T)的阳性反应。

[0158] <实施例 6>

[0159] 使用蛋白质 A 特异性多克隆抗体进行 MRSA 检测

[0160] <6-1> 选择蛋白质 A 特异性多克隆抗体

[0161] 由于蛋白质 A 对很多抗体的 Fc 区有亲和性,在通过使用抗体检测蛋白质 A 可能会出现困难。但是,已知来自鸡的蛋白质 A 抗体不呈现这种对蛋白质 A 的结合。因此,如下的实施例使用来自鸡的抗-蛋白质 A 抗体 (ABCPA-0500, Arista) 进行 (Larsson A, **Sjöquist J.** 1989 ;27(12) :2856-7. J Clin Microbiol. /Lindmark R, **Sjöquist J.** 1983 ;62 :

1-13. J. Immunol.)。

[0162] <6-2> 以夹心 ELISA 进行 MRSA 检测

[0163] 将 Maxisorp 板 (Nunc.) 在每个稀释后于 37°C 孵育一个小时,用于作为捕获抗体的单克隆抗体包被,所述单克隆抗体以 PBS 系列稀释(初始为 100ng/孔)。将所述板在 3% BSA/PBS 中在 37°C 继续孵育 1 小时,进行封闭。将在 PBS 中系列稀释的来自实施例 4-1 的裂解物(初始为 100ng/孔)加至所述孔中,在每个稀释后在 37°C 孵育 1 小时,以与所述包被的抗体结合。

[0164] 在 3 次洗涤后,将兔抗-蛋白质 A-HRP 抗体 (Sigma) 以 PBS 1 : 1000 稀释加入所述孔中 (100u1/孔) 并孵育 1 小时,进行抗原-抗体结合。

[0165] 再次洗涤 3 次后,以 TMB 溶液(每孔 50u1)作为颜色反应的底物处理所述孔 10 分钟。然后,使底物-酶反应进行 10 分钟。加入终止溶液(每孔 50u1)终止所述反应。在 450nm 测量所述颜色反应的强度。结果显示在图 12 中。

[0166] 如图 12 所示,在 MRSA 和 MR-MSSA(两个菌株都存在蛋白质 A)中观察到了高水平的蛋白质 A。

[0167] <6-3> 免疫色谱测定

[0168] 测试了在实施例 6-1 中举例说明的抗鸡蛋白质 A 的多克隆抗体对是否可以以快速试剂盒形式用于侧流免疫谱测定,所述试剂盒使用金缀合的检测抗体。

[0169] 步骤详细描述如下。将在从本发明的单克隆抗体中选择的所述捕获抗体包被在所述膜上,将所述检测抗体与金缀合,干燥并组装至所述装置。在所述组装的装置中,处理 100u1 如从实施例 4-1 所得到的每个细胞系的裂解物。20 分钟后观察到的结果显示在图 13 中。

[0170] 如图 13 所示,仅在 MRSA 和 MSSA(都有蛋白质 A)观察到了所述测试株系(T)的阳性反应。

[0171] <实施例 7>

[0172] 通过使用所述单克隆抗体和蛋白质 A 特异性多克隆抗体进行 MRSA 检测

[0173] 在成对的孔系统中,将抗-PBP2a 单克隆抗体(以 PBS 系列稀释,初始为 100ng/孔)加至一组孔中,而将抗-蛋白质 A 多克隆抗体(以 PBS 系列稀释,初始为 100ng/孔)加至另一组孔中。对于抗原包被,将 Maxisorp 板 (Nunc.) 以所述抗体在每个稀释后在 37°C 孵育 1 小时。将所述板在 3% BSA/PBS 中在 37°C 继续孵育 1 小时,进行封闭。将用 PBS 系列稀释的来自实施例 4-1 的裂解物(初始为 100ng/孔)加至所述孔中,并在每个稀释后在 37°C 孵育 1 小时以使与所述包被抗体结合。

[0174] 在 3 次洗涤后,将用 PBS 以 1 : 10,000 稀释的 '6G10' 抗-PBP2a 单克隆-HRP 抗体加至所述 PBP2a 孔中(每孔 100u1)。同时,将用 PBS 以 1 : 10,000 稀释的兔抗-蛋白质 A-HRP 抗体加至所述蛋白质 A 孔中(每孔 100u1)。再次洗涤 3 次后,以 TMB 溶液(每孔 50u1)作为颜色反应的底物处理所述孔,使反应进行 10 分钟。加入终止溶液(每孔 50u1)终止所述反应。在 450nm 测量所述颜色反应的强度。结果显示在图 14a 中。

[0175] 如图 14a 所示,MRSA 显示出高程度的对 PBP2a 和蛋白质 A 抗原二者的反应。

[0176] 此外,建立了用于进行侧流免疫谱测定的装置,其中包被抗体和金缀合物中的每一个均被组装为适于 PBP2a 和蛋白质 A。在所述装置中,处理 100u1 如从实施例 4-1 所得到的每个细胞系的裂解物。20 分钟后观察到的结果显示在图 14b 至 14e 中。

[0177] 如图 14b 至 14e 所示, MRSA 显示出高程度的对 PBP2a 和蛋白质 A 抗原二者的反应。

[0178]



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)

110 744, 서울시 중구 연남동 26번지 서울대학교 의과대학 법안연구소 7층
TEL : +82-2-3689-7915, FAX : +82-2-742-0021, http://cellbank.snu.ac.kr, kclb@plaza.snu.ac.kr
Korean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WIPO
Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, KOREA

国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约

国际表
原始保藏收据

依据第 7.1 条发出

To: 狄诺纳有限公司

253-6 Donggodo-Ri, Gemma-myun, Iksan-Si, Jeoubuk, 韩国

I. 微生物说明	
保藏人给出的识别参考号: PBP2a-6G10	国际保藏单位给出的登记号: KCLRF-BP-00202
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
上文 I 说明的微生物具有:	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学描述	
<input checked="" type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用以十字叉标记)	
III. 接收和确认	
该国际保藏单位收到上文 I 说明的微生物, 收到日期是 2009 年 2 月 18 日。	
IV. 国际保藏单位	
名称: 主管 韩国细胞系研究机构 地址: Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	签名: 日期: 2009 年 2 月 23 日

[0179]



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)

110-744, 서울시 용문구 영선동 28번지 서울대학교 의과대학 방암연구소 7층
TEL : +82-2-3688-7915, FAX : +82-2-742-0021, http://cellbank.snu.ac.kr, kclb@plaza.snu.ac.kr
Korean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WIFO
Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, KOREA

国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约

国际表
原始保藏收据
依据第 7.1 条发出

To: 狄诺纳有限公司

253-6 Donggodo-Ri, Gemma-myun, Iksan-Si, Jeoubuk, 韩国

I. 微生物说明	
保藏人给出的识别参考号: PBP2a-9C6	国际保藏单位给出的登记号: KCLRF-BP-00203
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
上文 I 说明的微生物具有:	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学描述 <input checked="" type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用以十字叉标记)	
III. 接收和确认	
该国际保藏单位收到上文 I 说明的微生物, 收到日期是 2009 年 2 月 18 日。	
IV. 国际保藏单位	
名称: 主管 韩国细胞系研究机构 地址: Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	签名: 日期: 2009 年 2 月 23 日

表 BP/4 (KCLRF Form 17)

1 页

[0180]



한국세포주은행 (KCLB, Korean Cell Line Bank)


110-744, 서울시 용문구 연천동 28번지 서울대학교 의과대학 방암연구소 7층
 TEL : +82-2-3688-7915, FAX : +82-2-742-0021, http://cellbank.snu.ac.kr, kclb@plc28.snu.ac.kr
 Korean Cell Line Bank; Korean Cell Line Research Foundation, International Microorganism Depository Authority approved by WIPO
 Cancer Research Institute, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul 110-744, KOREA

国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约

国际表
原始保藏收据
 依据第 7.1 条发出

To: 狄诺纳有限公司

253-6 Donggodo-Ri, Gemma-myun, Iksan-Si, Jeoubuk, 韩国

I. 微生物说明	
保藏人给出的识别参考号: PBP2a-17A10	国际保藏单位给出的登记号: KCLRF-BP-00204
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
上文 I 说明的微生物具有:	
<input checked="" type="checkbox"/> 科学描述 <input checked="" type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用以十字叉标记)	
III. 接收和确认	
该国际保藏单位收到上文 I 说明的微生物, 收到日期是 2009 年 2 月 18 日。	
IV. 国际保藏单位	
名称: 主管 韩国细胞系研究机构 地址: Cancer Research Institute Seoul National University College of Medicine 28 Yongon-dong, chongno-Gu Seoul, 110-744, Korea	签名:  日期: 2009 年 2 月 23 日

[0001]

序列表

<110> 狄诺纳有限公司
 <120> 对甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌特异的抗体及其用于甲氧西林抗性葡萄球菌的检测方法和试剂盒
 <130> OPI20090562KR
 <150> KR20090020935
 <151> 2009-03-11
 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> MRSA特异-PBP2a区

 <400> 1
 Gly Ile Tyr Phe Tyr Ala Ser Lys Asp Lys Glu Ile Asn Asn Thr Ile
 1 5 10 15
 Asp Ala Ile Glu Asp Lys Asn Phe Lys Gln Val Tyr Lys Asp Ser Ser
 20 25 30
 Tyr Ile Ser Lys Ser Asp Asn Gly Glu Val Glu Met Thr Glu Arg Pro
 35 40 45
 Ile Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Val Lys Asp Ile Asn Ile Gln Asp
 50 55 60
 Arg Lys Ile Lys Lys Val Ser Lys Asn Lys Lys Arg Val Asp Ala Gln
 65 70 75 80
 Tyr Lys Ile Lys Thr Asn Tyr Gly Asn Ile Asp Arg Asn Val Gln Phe
 85 90 95
 Asn Phe Val Lys Glu Asp Gly Met Trp Lys Leu Asp Trp Asp His Ser
 100 105 110
 Val Ile Ile Pro Gly Met Gln Lys Asp Gln Ser Ile His Ile Glu Asn
 115 120 125
 Leu Lys Ser Glu Arg Gly Lys Ile Leu Asp Arg Asn Asn Val Glu Leu
 130 135 140
 Ala Asn Thr Gly Thr His Met Arg Leu Gly Ile Val Pro Lys Asn Val
 145 150 155 160
 Ser Lys Lys Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Lys Glu Leu Ser Ile Ser Glu
 165 170 175
 Asp Tyr Ile Asn Asn Lys Trp Ile Lys Ile Gly Tyr Lys Met Ile Pro
 180 185 190
 Ser Phe His Phe Lys Thr Val Lys Lys Met Asp Glu Tyr Leu Ser Asp
 195 200 205
 Phe Ala Lys Lys Phe His Leu Thr Thr Asn Glu Thr Glu Ser Arg Asn
 210 215 220
 Tyr Pro Leu Glu Lys Ala Thr Ser His Leu Leu Gly Tyr Val Gly Pro
 225 230 235 240
 Ile Asn Ser Glu Glu Leu Lys Gln Lys Glu Tyr Lys Gly Tyr Lys Asp

[0002]

245 250 255
 Asp Ala Val Ile Gly Lys Lys Gly Leu Glu Lys Leu Tyr Asp Lys Lys
 260 265 270
 Leu Gln His Glu Asp Gly Tyr Arg Val Thr Ile Val Asp Asp Asn Ser
 275 280 285
 Asn Thr Ile Ala His Thr Leu Ile Glu Lys Lys Lys Lys Asp Gly Lys
 290 295 300
 Asp Ile Gln Leu Thr Ile Asp Ala Lys Val Gln Lys Ser Ile Tyr Asn
 305 310 315 320
 Asn Met Lys Asn Asp Tyr Gly Ser Gly Thr
 325 330

<210> 2
 <211> 668
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> PBP2a蛋白

<400> 2
 Met Lys Lys Ile Lys Ile Val Pro Leu Ile Leu Ile Val Val Val Val
 1 5 10 15
 Gly Phe Gly Ile Tyr Phe Tyr Ala Ser Lys Asp Lys Glu Ile Asn Asn
 20 25 30
 Thr Ile Asp Ala Ile Glu Asp Lys Asn Phe Lys Gln Val Tyr Lys Asp
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ile Ser Lys Ser Asp Asn Gly Glu Val Glu Met Thr Glu
 50 55 60
 Arg Pro Ile Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Val Lys Asp Ile Asn Ile
 65 70 75 80
 Gln Asp Arg Lys Ile Lys Lys Val Ser Lys Asn Lys Lys Arg Val Asp
 85 90 95
 Ala Gln Tyr Lys Ile Lys Thr Asn Tyr Gly Asn Ile Asp Arg Asn Val
 100 105 110
 Gln Phe Asn Phe Val Lys Glu Asp Gly Met Trp Lys Leu Asp Trp Asp
 115 120 125
 His Ser Val Ile Ile Pro Gly Met Gln Lys Asp Gln Ser Ile His Ile
 130 135 140
 Glu Asn Leu Lys Ser Glu Arg Gly Lys Ile Leu Asp Arg Asn Asn Val
 145 150 155 160
 Glu Leu Ala Asn Thr Gly Thr His Met Arg Leu Gly Ile Val Pro Lys
 165 170 175
 Asn Val Ser Lys Lys Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Lys Glu Leu Ser Ile
 180 185 190
 Ser Glu Asp Tyr Ile Asn Asn Lys Trp Ile Lys Ile Gly Tyr Lys Met
 195 200 205
 Ile Pro Ser Phe His Phe Lys Thr Val Lys Lys Met Asp Glu Tyr Leu
 210 215 220
 Scr Asp Phe Ala Lys Lys Phe His Leu Thr Thr Asn Glu Thr Glu Scr
 225 230 235 240

[0003]

Arg Asn Tyr Pro Leu Glu Lys Ala Thr Ser His Leu Leu Gly Tyr Val
 245 250 255
 Gly Pro Ile Asn Ser Glu Glu Leu Lys Gln Lys Glu Tyr Lys Gly Tyr
 260 265 270
 Lys Asp Asp Ala Val Ile Gly Lys Lys Gly Leu Glu Lys Leu Tyr Asp
 275 280 285
 Lys Lys Leu Gln His Glu Asp Gly Tyr Arg Val Thr Ile Val Asp Asp
 290 295 300
 Asn Ser Asn Thr Ile Ala His Thr Leu Ile Glu Lys Lys Lys Lys Asp
 305 310 315 320
 Gly Lys Asp Ile Gln Leu Thr Ile Asp Ala Lys Val Gln Lys Ser Ile
 325 330 335
 Tyr Asn Asn Met Lys Asn Asp Tyr Gly Ser Gly Thr Ala Ile His Pro
 340 345 350
 Gln Thr Gly Glu Leu Leu Ala Leu Val Ser Thr Pro Ser Tyr Asp Val
 355 360 365
 Tyr Pro Phe Met Tyr Gly Met Ser Asn Glu Glu Tyr Asn Lys Leu Thr
 370 375 380
 Glu Asp Lys Lys Glu Pro Leu Leu Asn Lys Phe Gln Ile Thr Thr Ser
 385 390 395 400
 Pro Gly Ser Thr Gln Lys Ile Leu Thr Ala Met Ile Gly Leu Asn Asn
 405 410 415
 Lys Thr Leu Asp Asp Lys Thr Ser Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Gly Trp
 420 425 430
 Gln Lys Asp Lys Ser Trp Gly Gly Tyr Asn Val Thr Arg Tyr Glu Val
 435 440 445
 Val Asn Gly Asn Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ile Glu Ser Ser Asp Asn
 450 455 460
 Ile Phe Phe Ala Arg Val Ala Leu Glu Leu Gly Ser Lys Lys Phe Glu
 465 470 475 480
 Lys Gly Met Lys Lys Leu Gly Val Gly Glu Asp Ile Pro Ser Asp Tyr
 485 490 495
 Pro Phe Tyr Asn Ala Gln Ile Ser Asn Lys Asn Leu Asp Asn Glu Ile
 500 505 510
 Leu Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Gly Gln Gly Glu Ile Leu Ile Asn Pro
 515 520 525
 Val Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Ala Leu Glu Asn Asn Gly Asn Ile
 530 535 540
 Asn Ala Pro His Leu Leu Lys Asp Thr Lys Asn Lys Val Trp Lys Lys
 545 550 555 560
 Asn Ile Ile Ser Lys Glu Asn Ile Asn Leu Leu Asn Asp Gly Met Gln
 565 570 575
 Gln Val Val Asn Lys Thr His Lys Glu Asp Ile Tyr Arg Ser Tyr Ala
 580 585 590
 Asn Leu Ile Gly Lys Ser Gly Thr Ala Glu Leu Lys Met Lys Gln Gly
 595 600 605
 Glu Ser Gly Arg Gln Ile Gly Trp Phe Ile Ser Tyr Asp Lys Asp Asn
 610 615 620

[0004]

Pro Asn Met Met Met Ala Ile Asn Val Lys Asp Val Gln Asp Lys Gly
625 630 635 640

Met Ala Ser Tyr Asn Ala Lys Ile Ser Gly Lys Val Tyr Asp Glu Leu
645 650 655

Tyr Glu Asn Gly Asn Lys Lys Tyr Asp Ile Asp Glu
660 665

<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> MRSA 特异-PBP2a正向引物

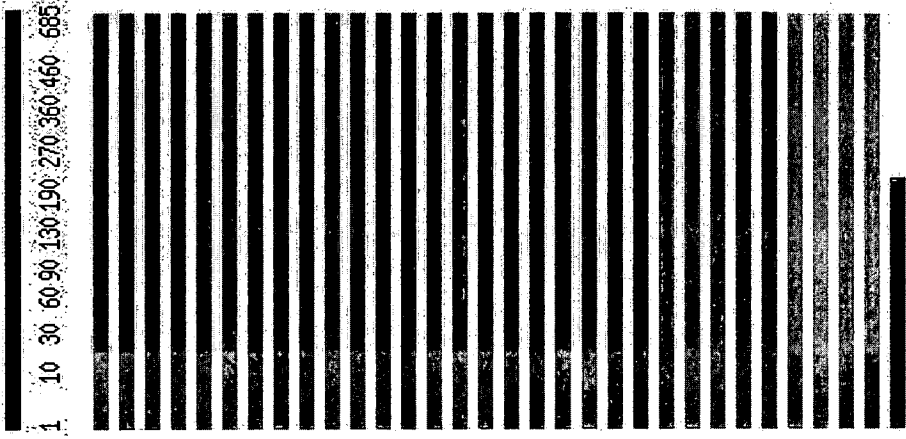
<400> 3
ggaattcggg atatattttt atgcttc 27

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

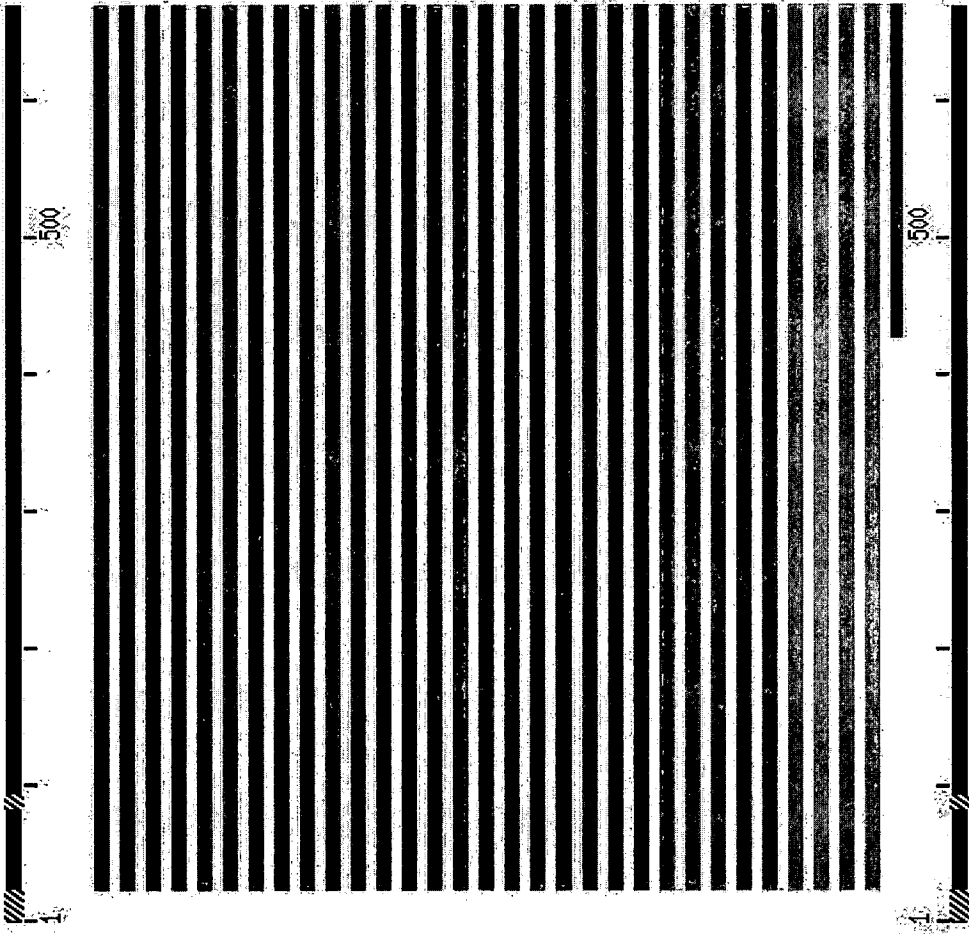
<220>
<223> MRSA 特异-PBP2a反向引物

<400> 4
tctcgagagt acctgagcca taatc 25

命中序列上的匹配 (平方根尺度)



查询序列上的匹配

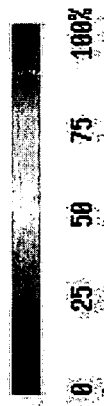


提交物

Q53707_STARU
 PBF_STARU
 Q93IC2_STARU
 Q5HJH3_STARC
 Q799P0_9STAP
 Q4GXY5_9STAP
 Q4GXY4_9STAP
 Q54286_STARU
 Q2PF50_STARU
 Q7A8C6_STAHN
 Q7A209_STAAH
 Q66K07_STARR
 Q5HK31_STAEQ
 Q54113_STARN
 Q7DHH4_STARU
 Q79AS7_STREP
 Q3T5M1_STARU
 Q4LAC5_STAHJ
 Q617E7_STARU
 Q4GXY3_9STAP
 Q4GXY2_STACP
 Q54283_9STAP
 Q4GXX9_9STAP
 Q4GXX8_STACP
 Q4GXX7_9STAP
 Q4GXY1_STACP
 Q4GXY0_9STAP
 Q54277_9STAP
 Q2VTQ2_9STAP
 P96818_9STAP
 Q54272_9STAP
 Q9K_IC9_STARU

提交物

被SEG遮盖的
低复杂度区域



同一性

图 1a

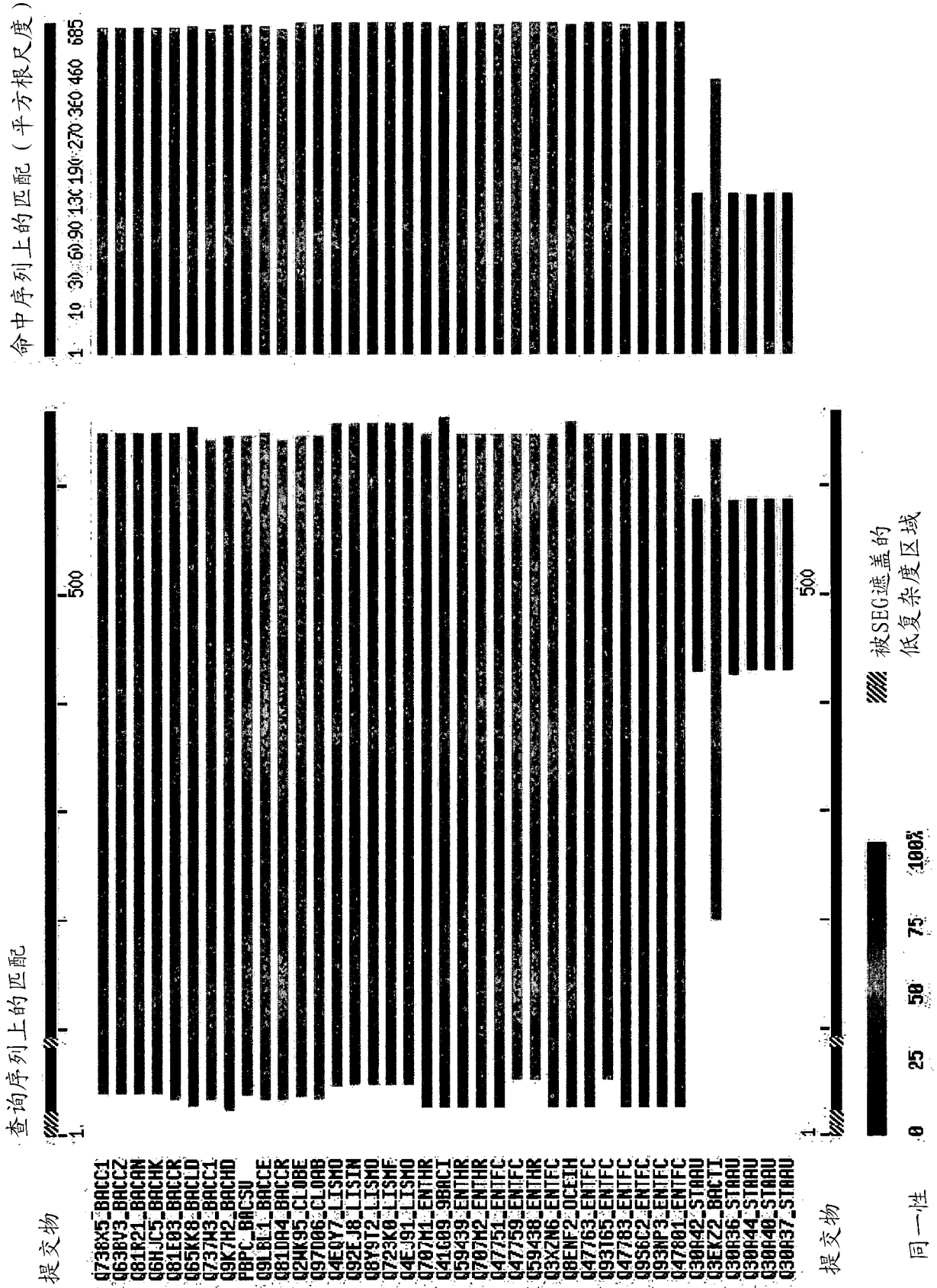


图 1b

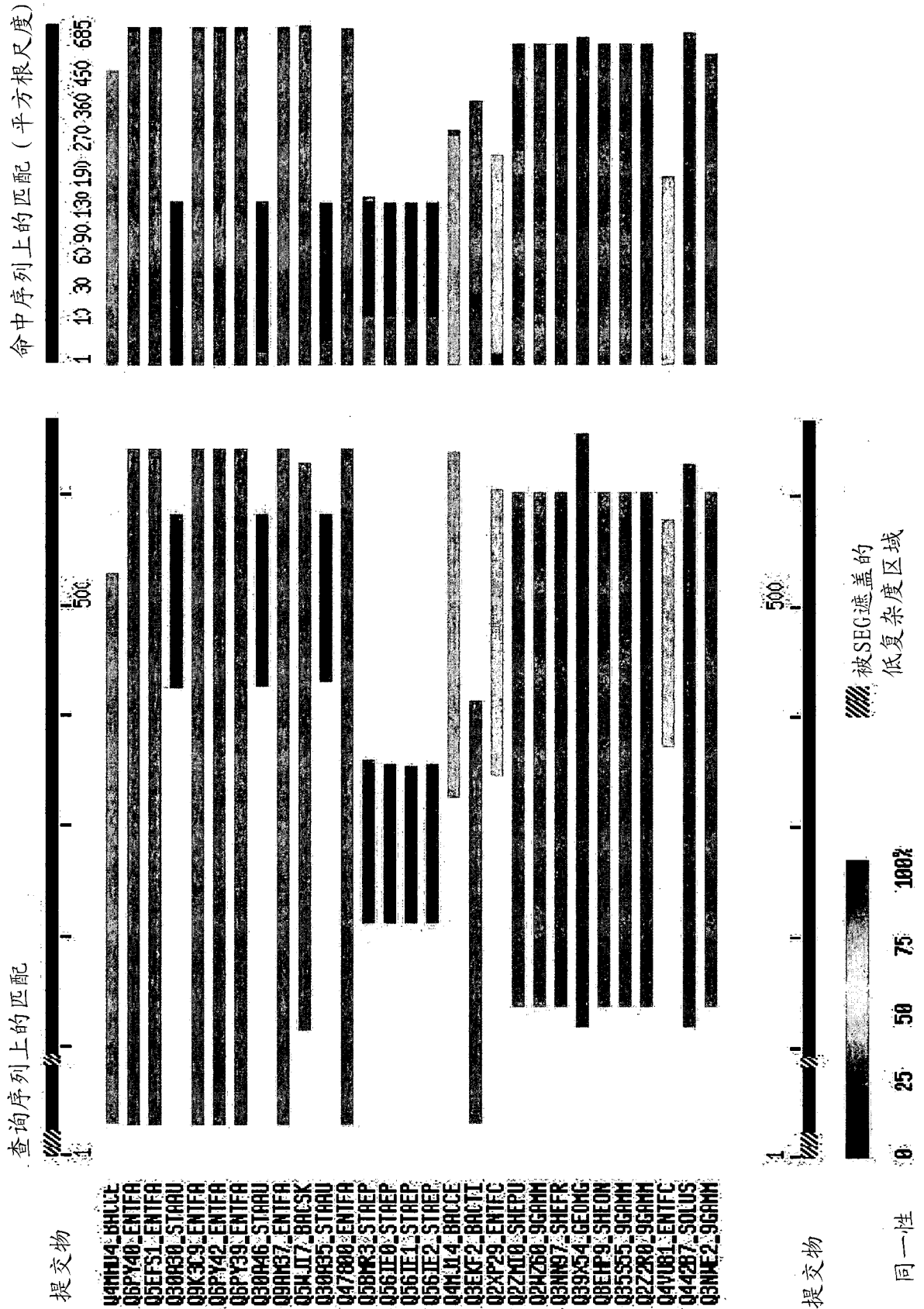


图 1c

青霉素结合蛋白3 [pbp3] [苏云金芽孢杆菌konkukian
亚种]

661-AA

对比

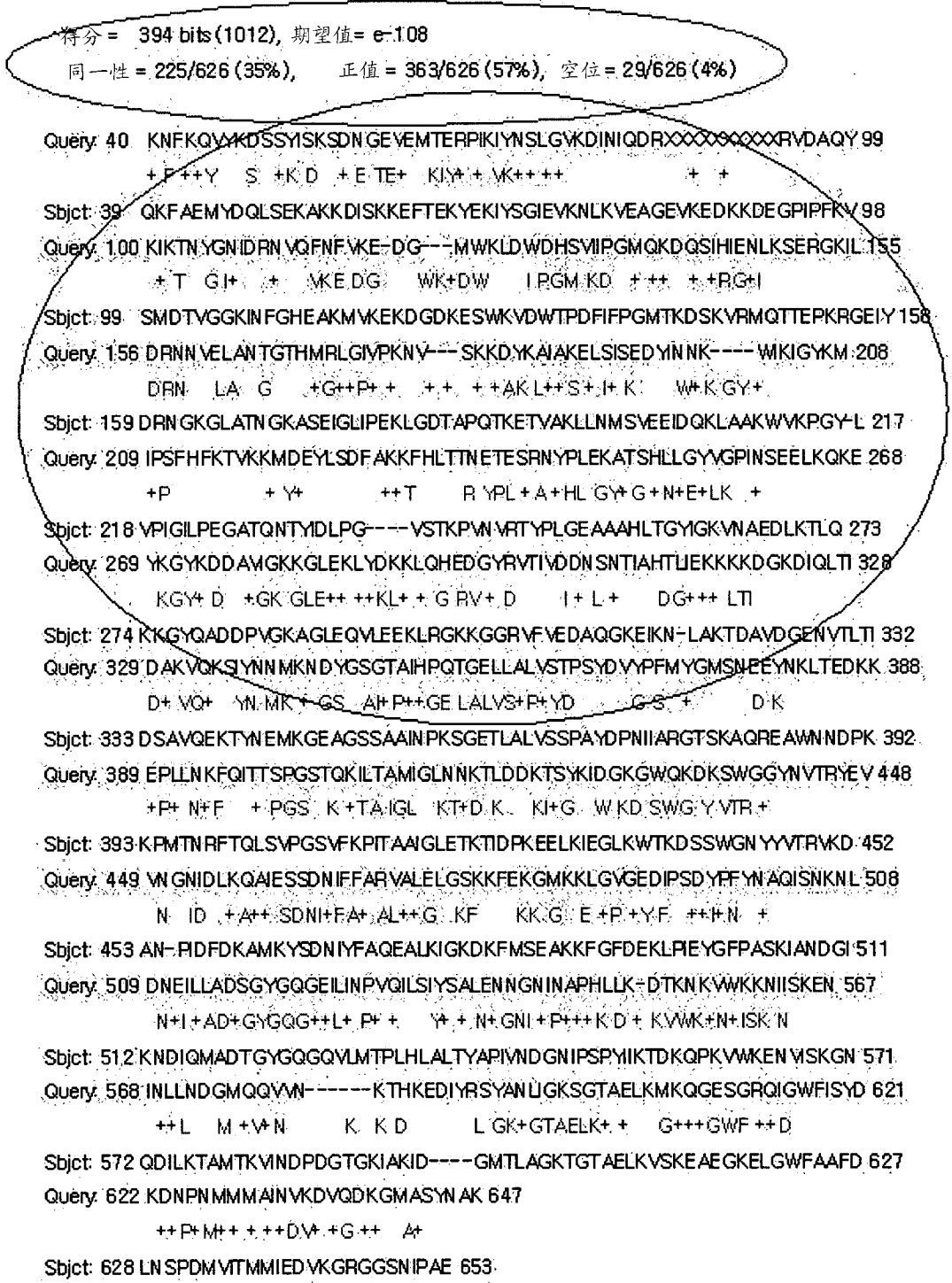


图 2

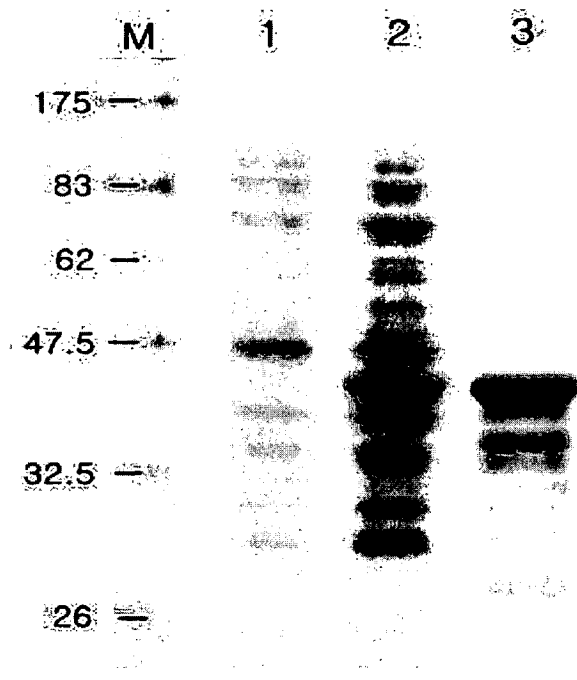


图 3

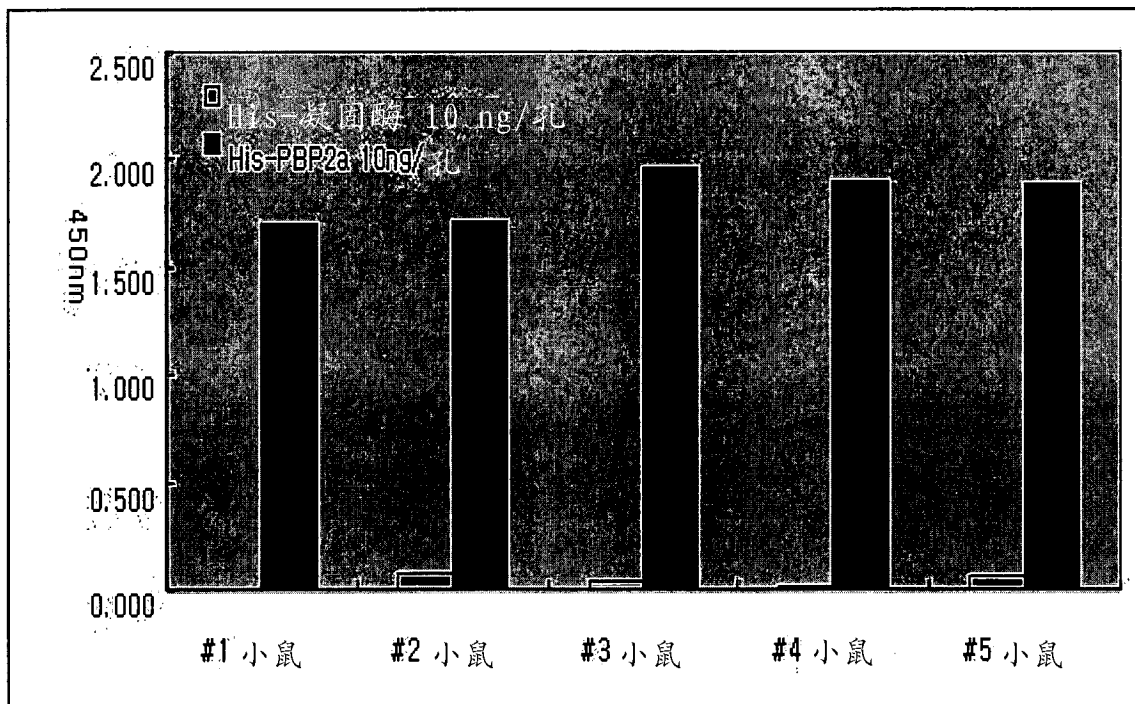


图 4

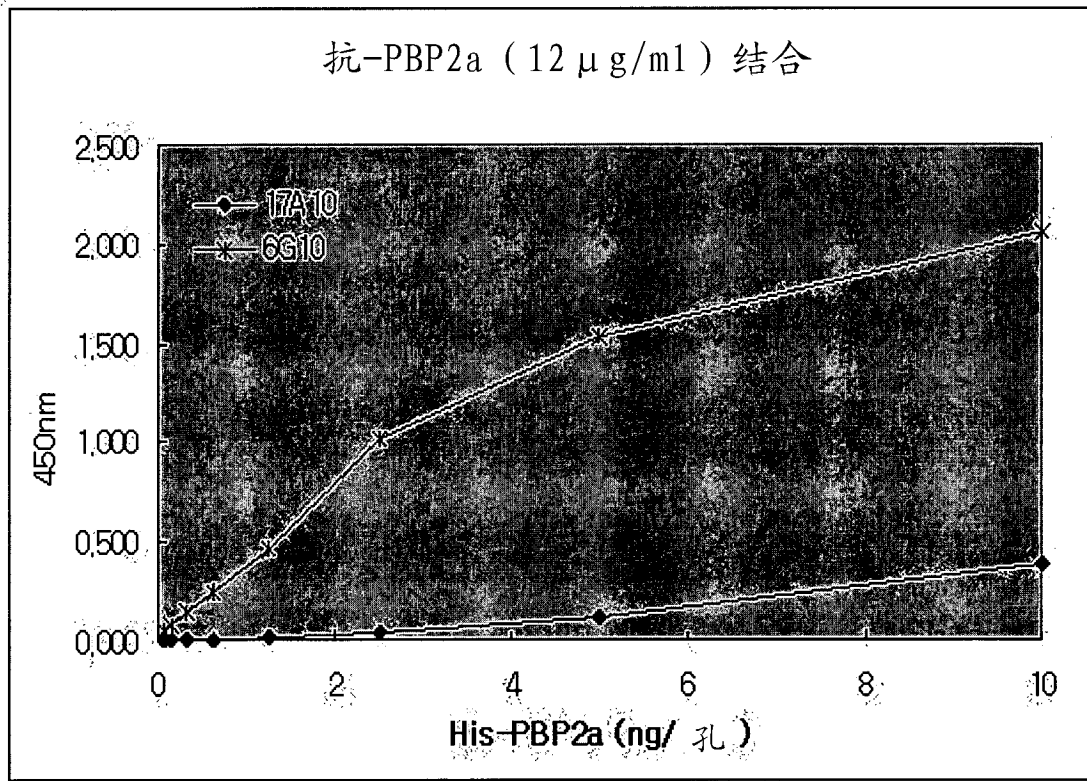


图 5a

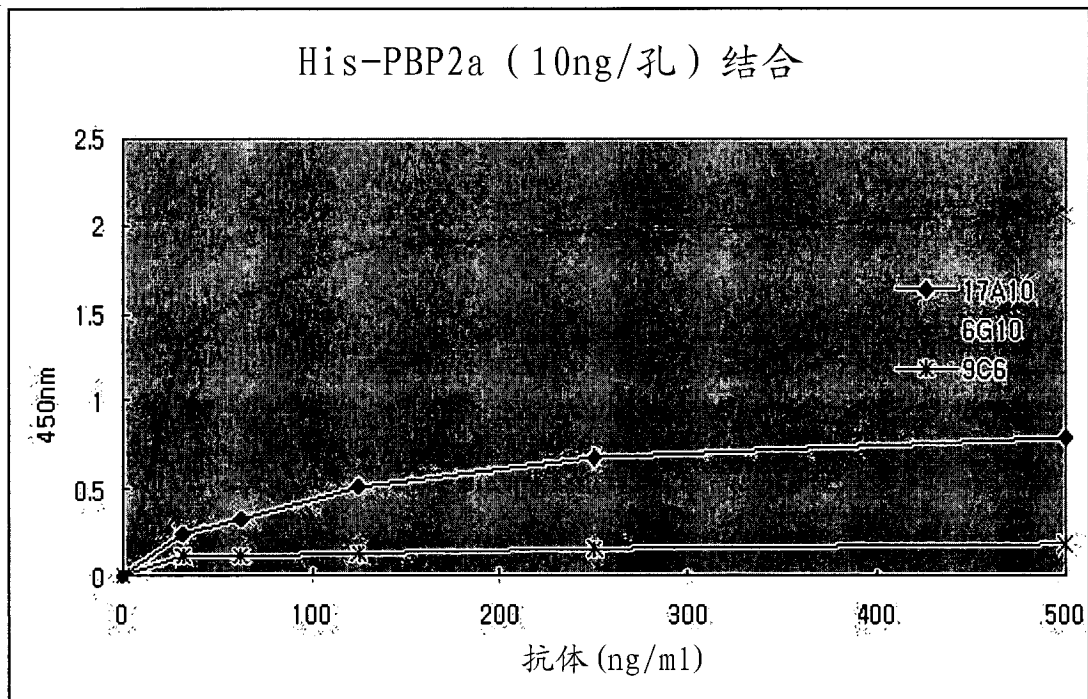


图 5b

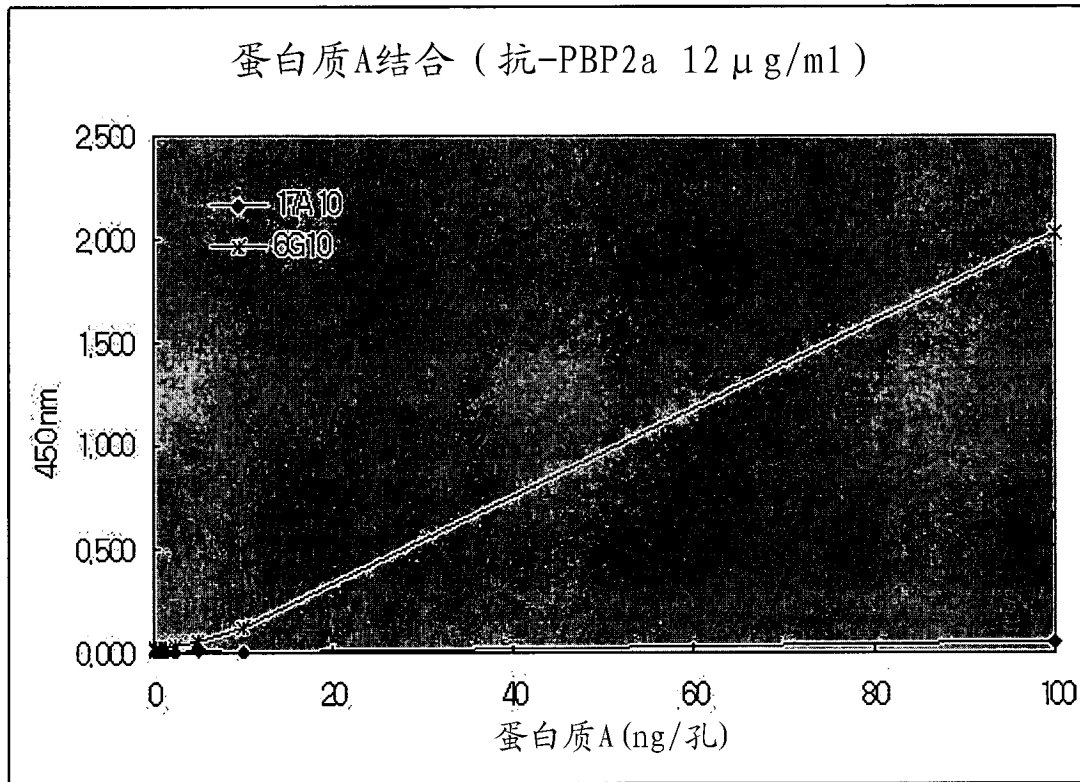


图 6

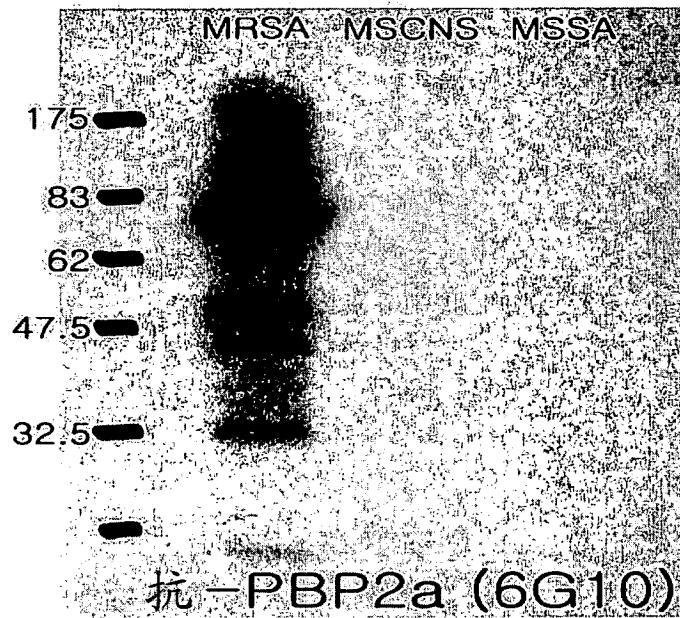


图 7a

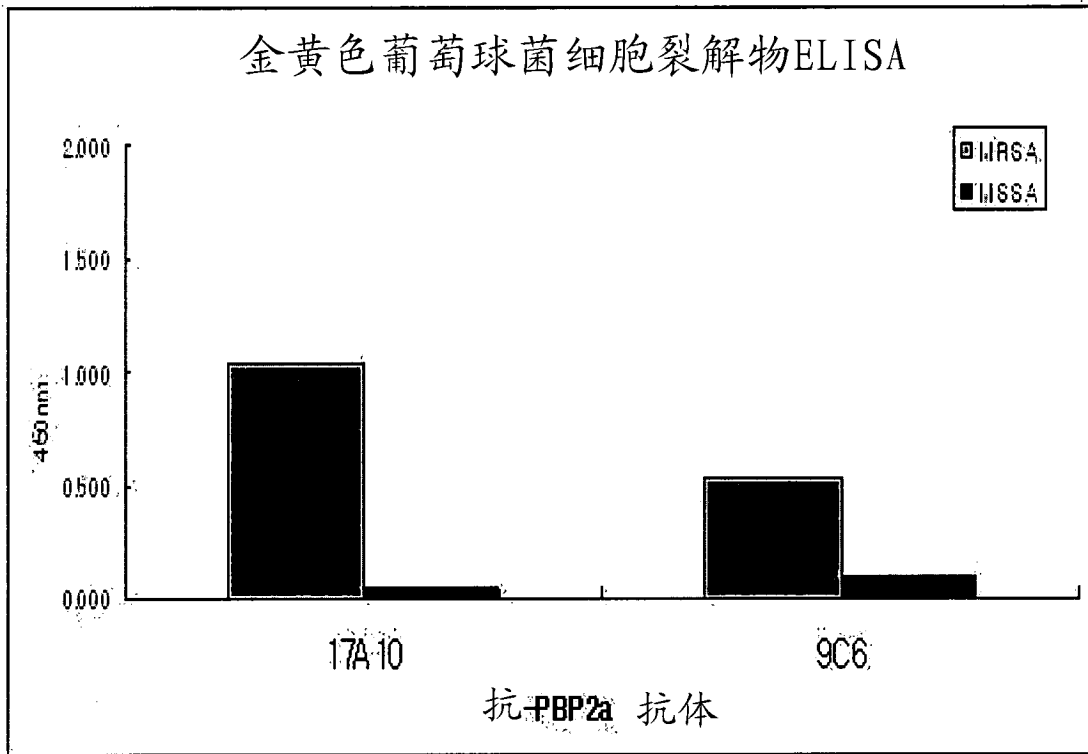


图 7b

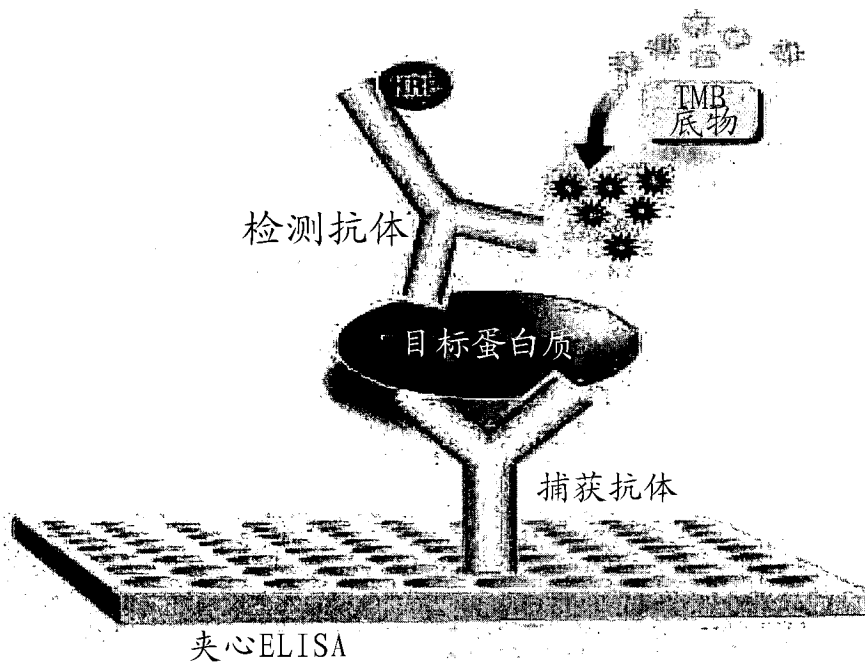


图 8a

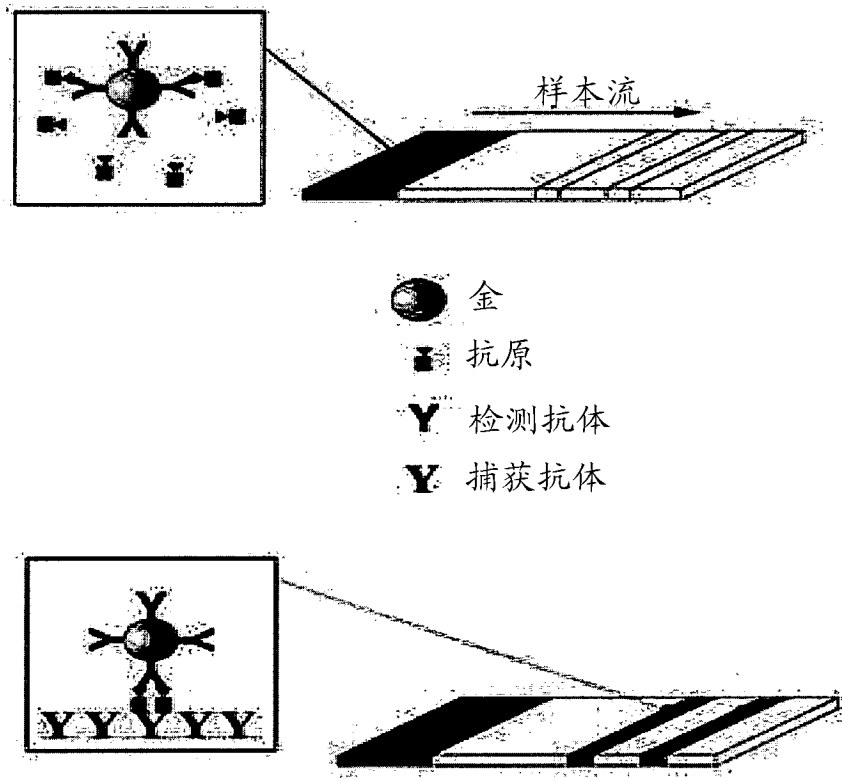


图 8b

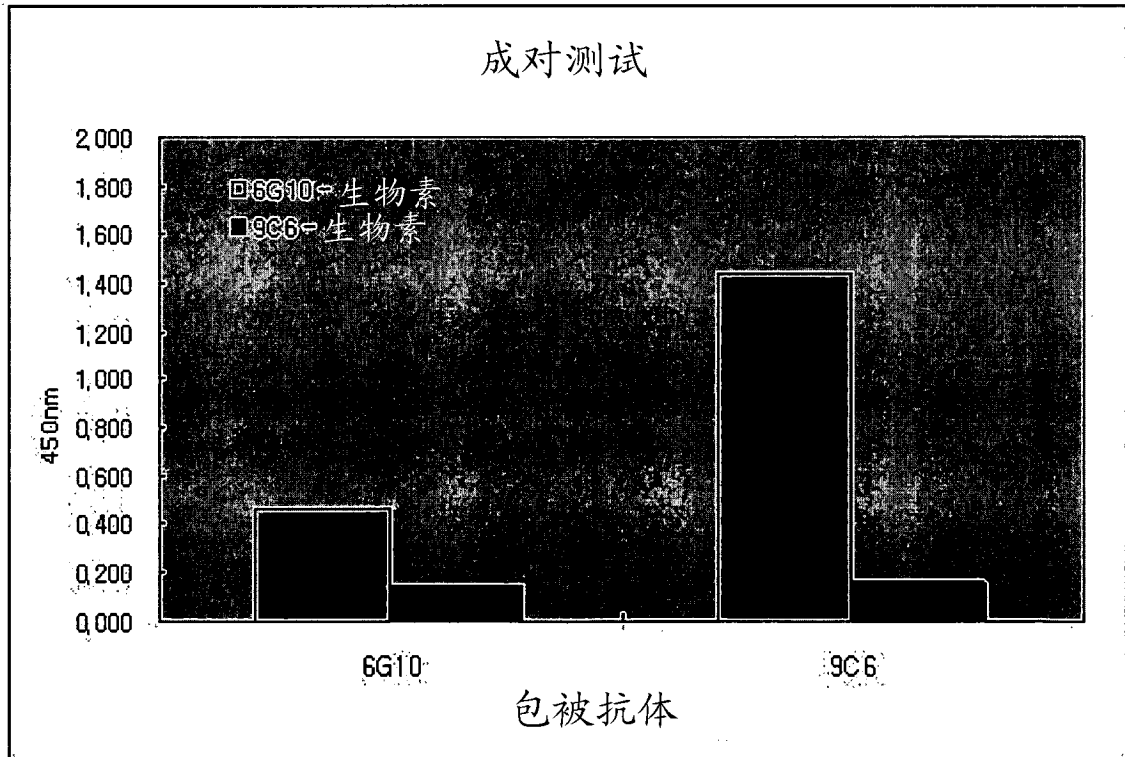


图 9a

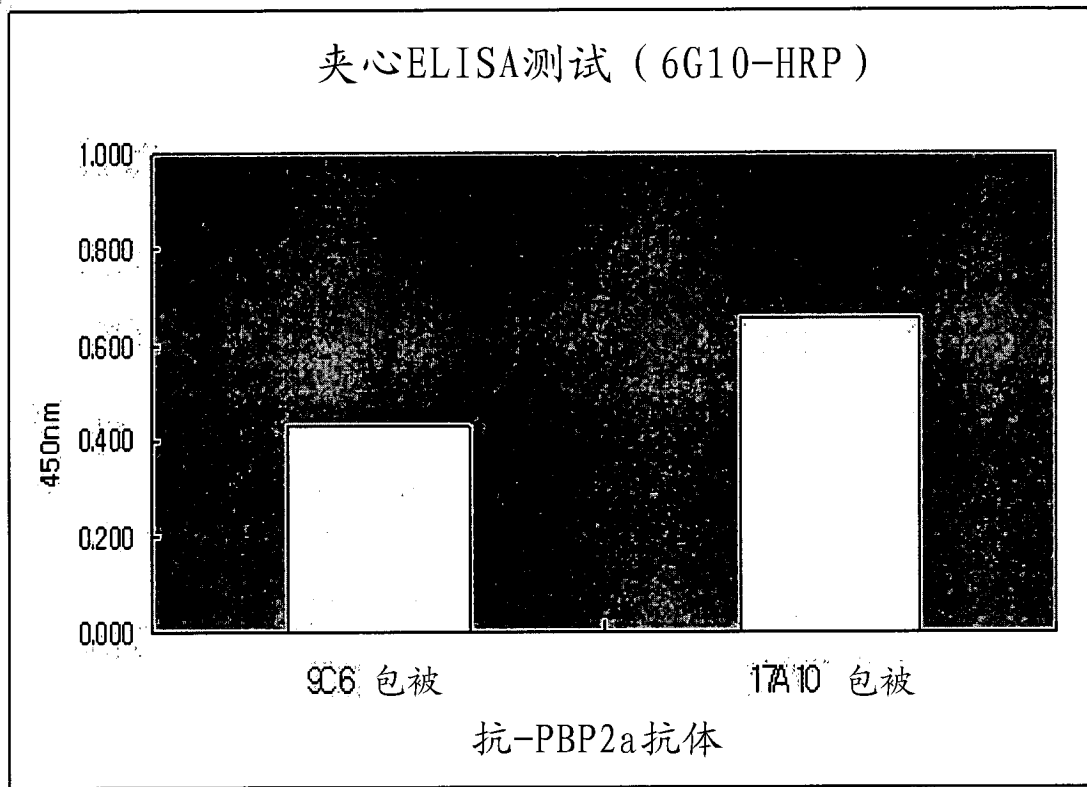


图 9b

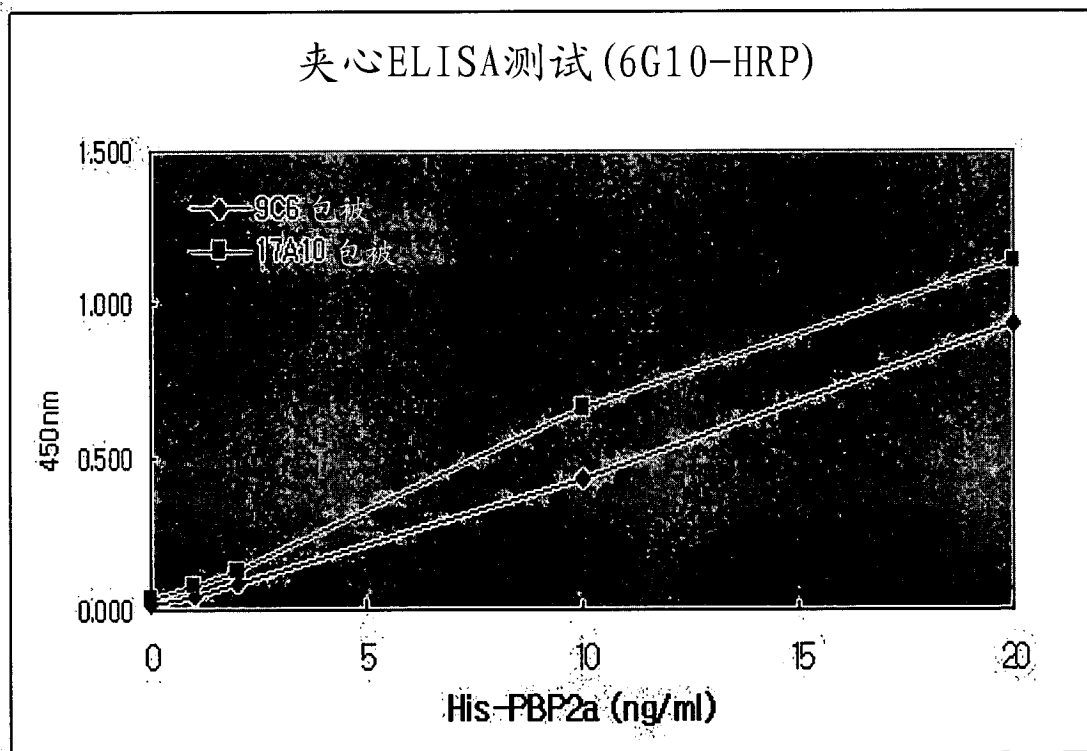


图 9c

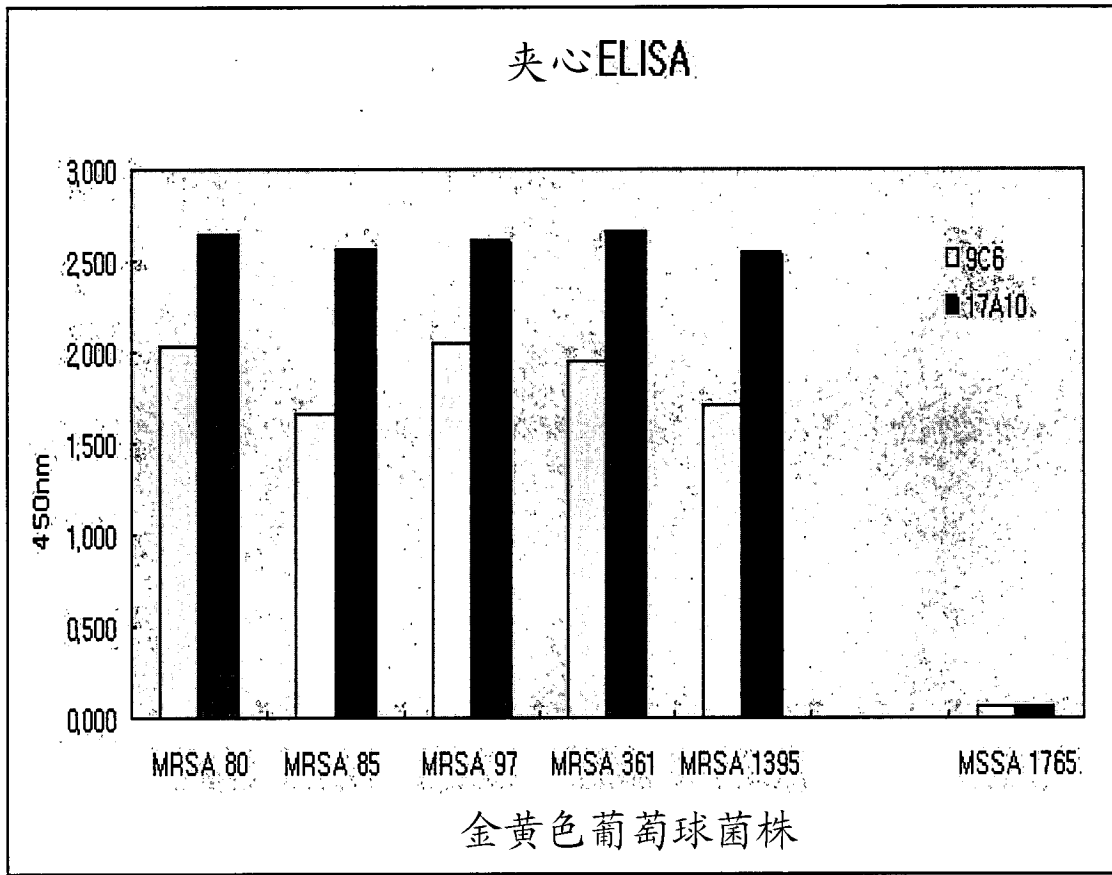


图 10a

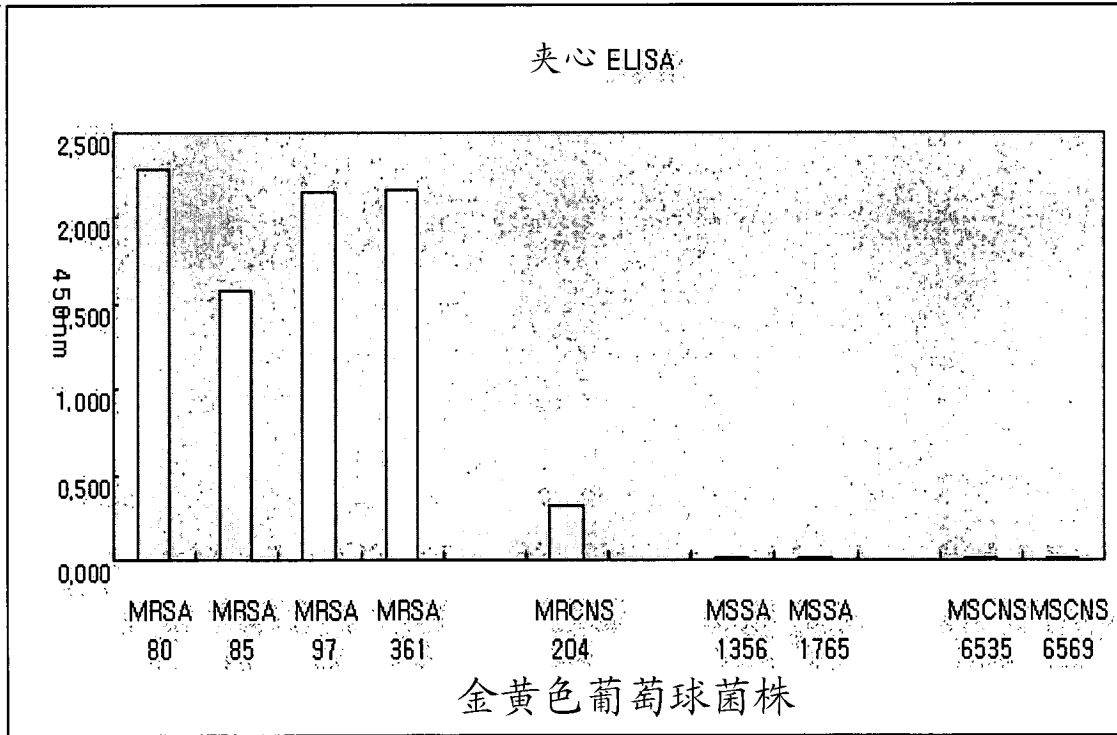


图 10b

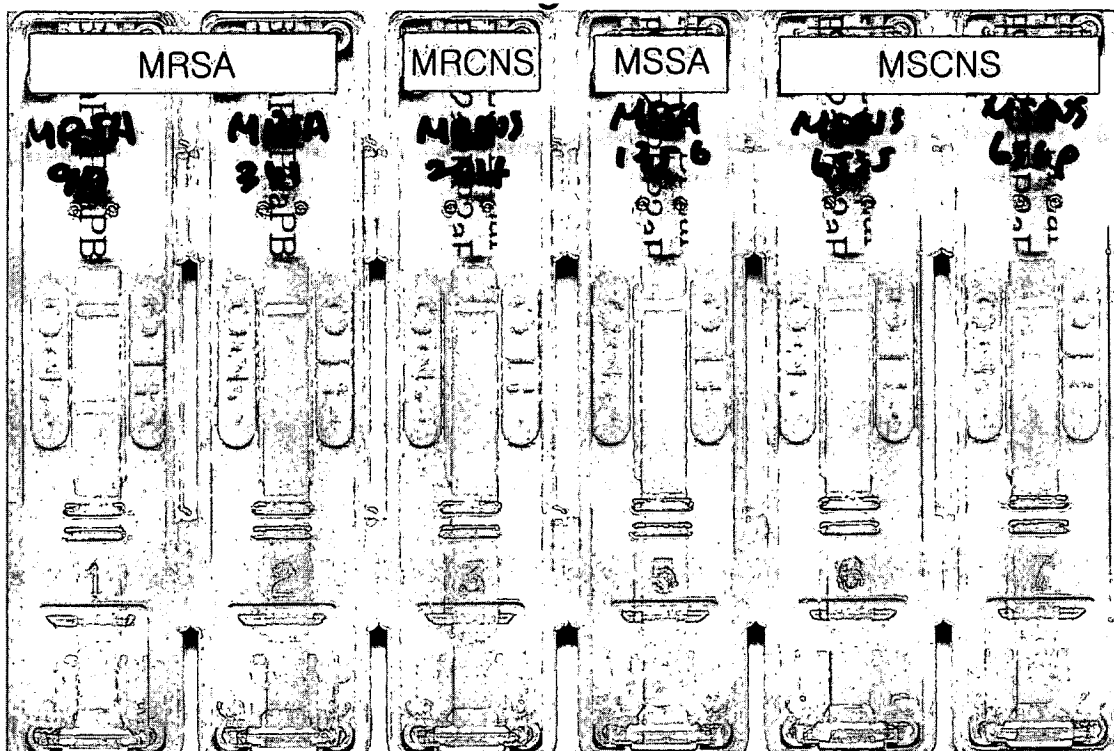


图 11

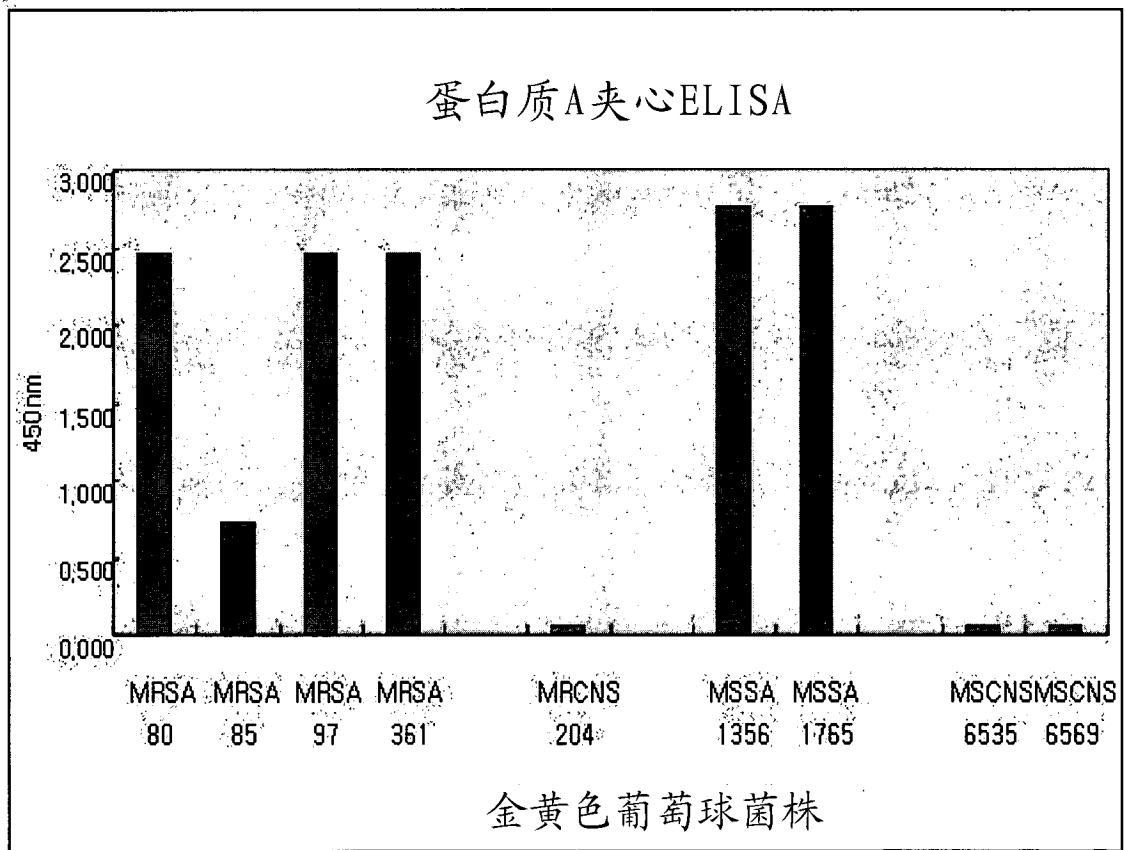


图 12

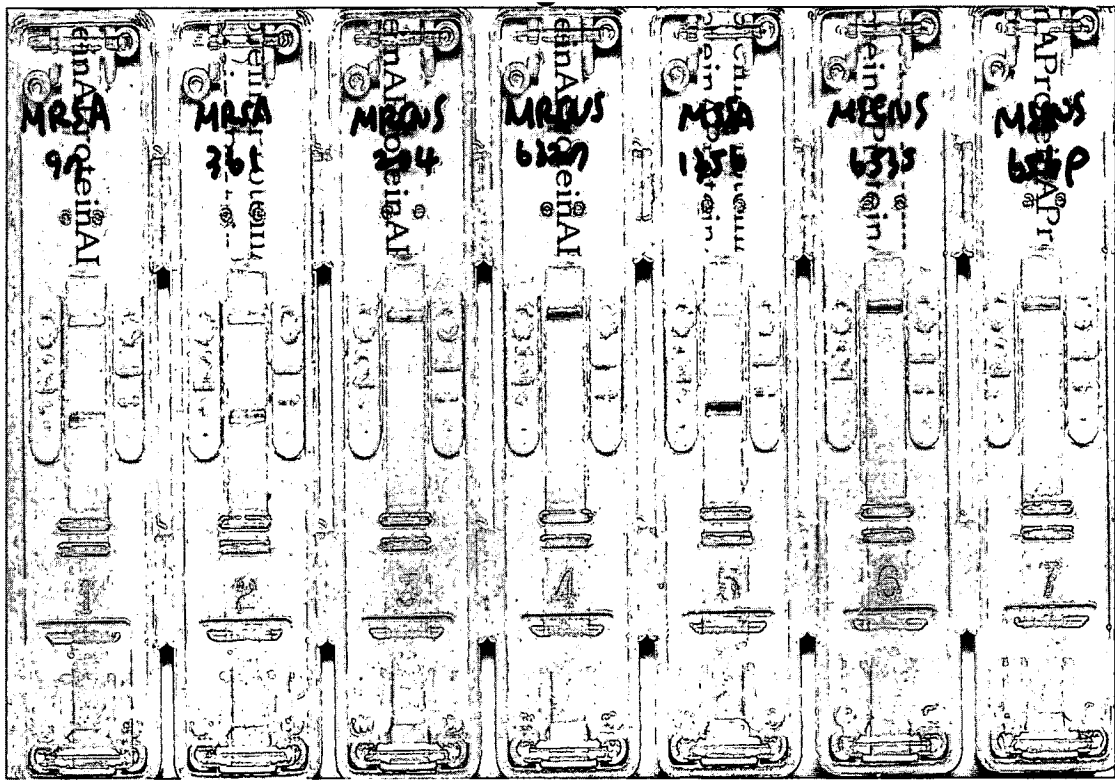


图 13

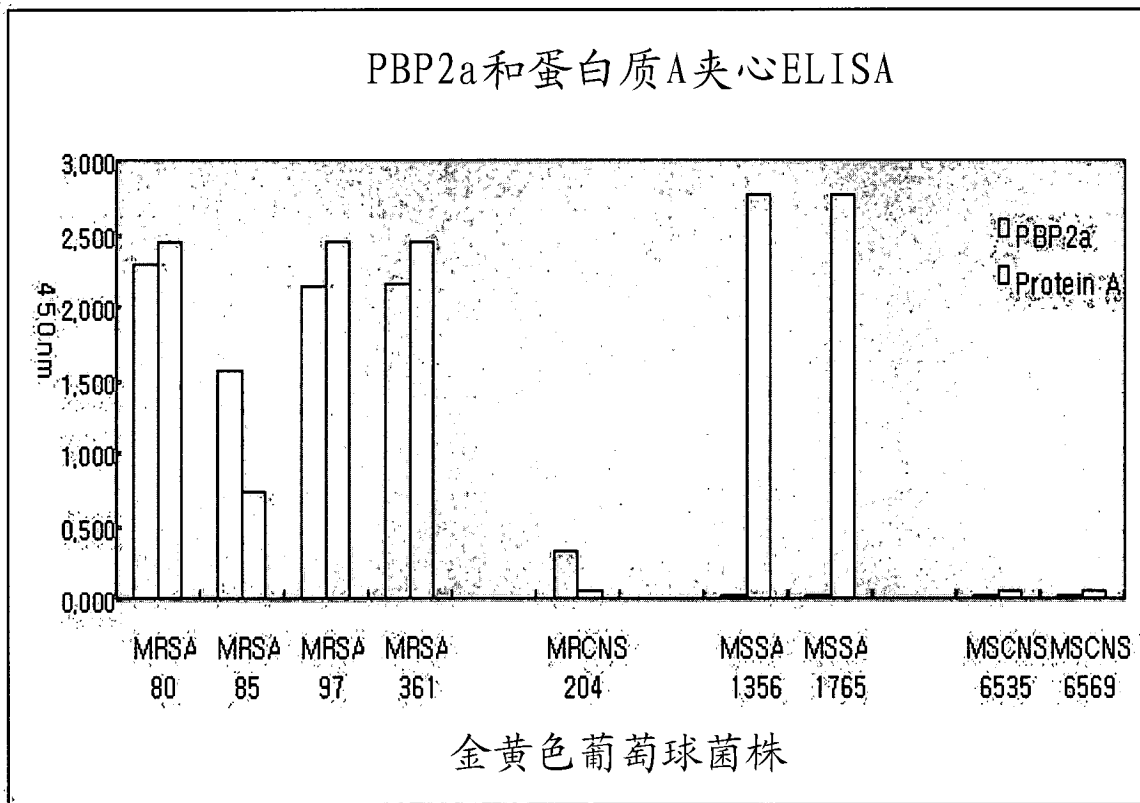


图 14a

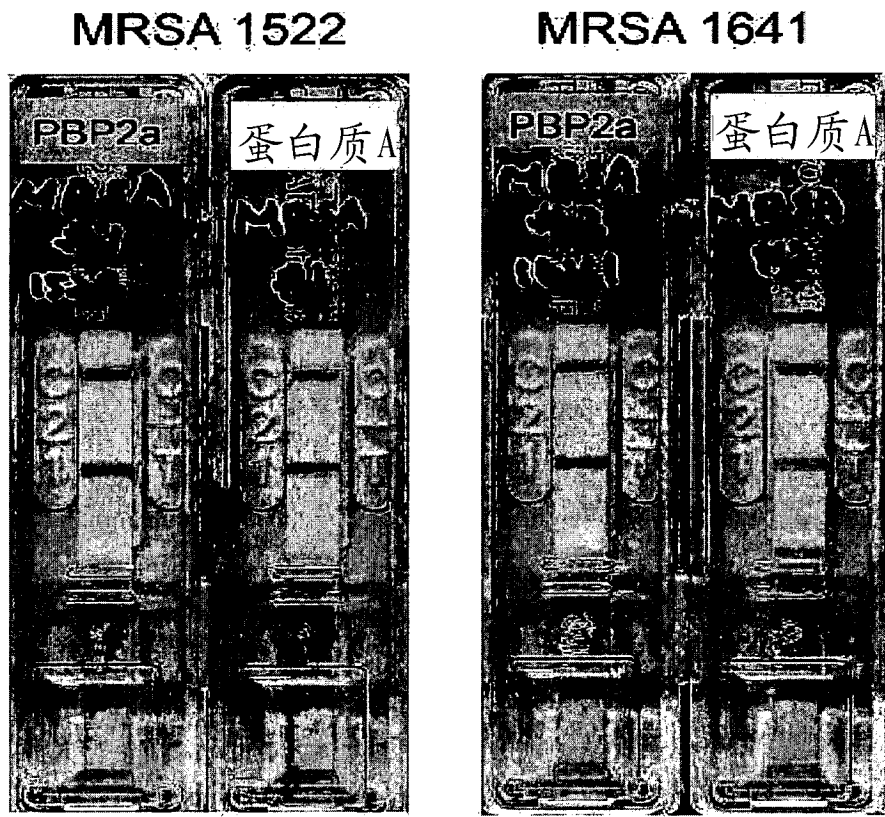


图 14b

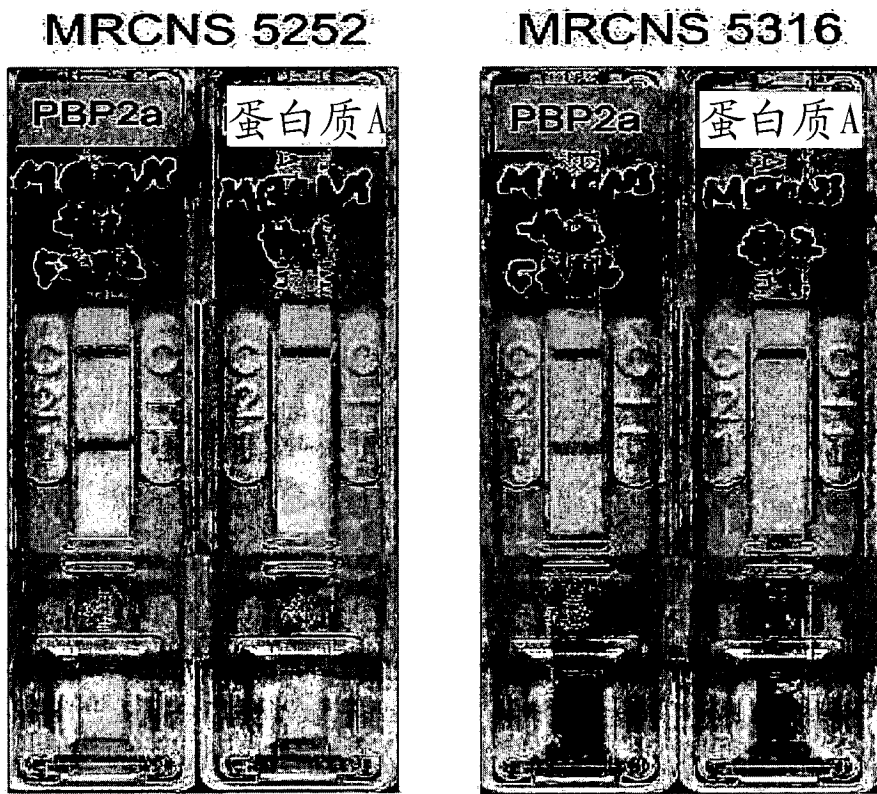


图 14c

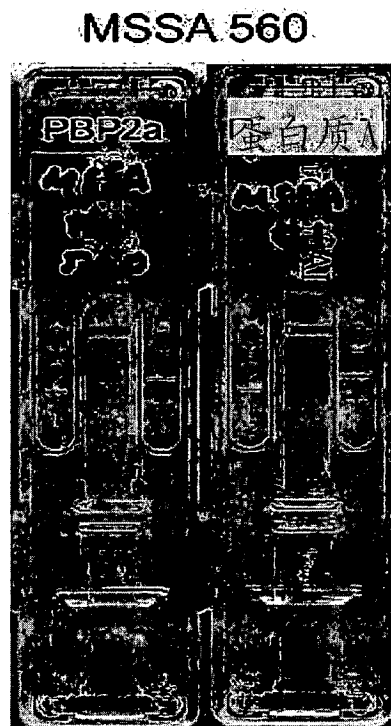


图 14d

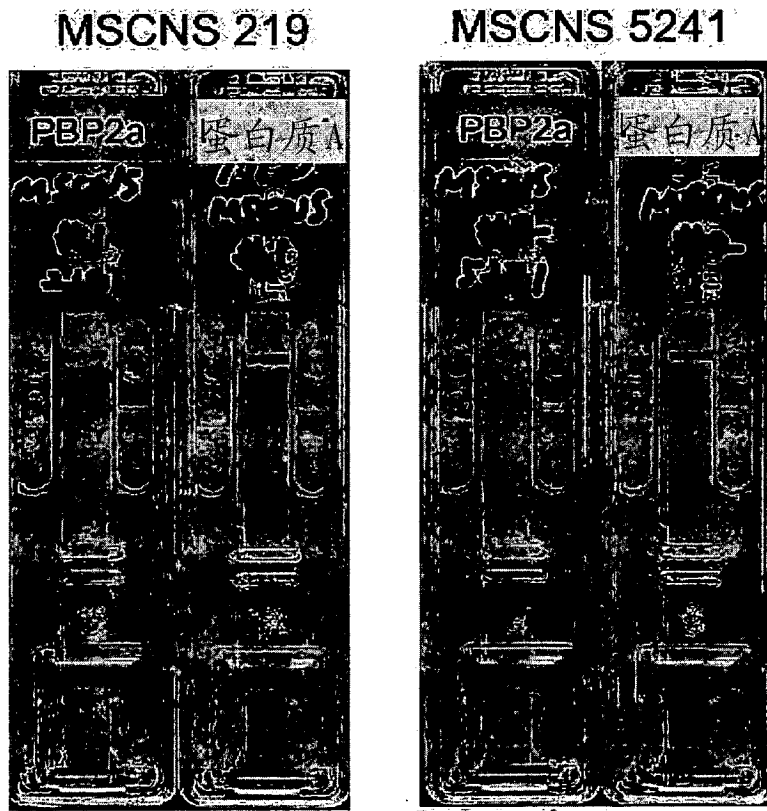


图 14e

专利名称(译)	对甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌特异的抗体及其用于甲氧西林抗性葡萄球菌的检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN102482346B	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN200980159211.7	申请日	2009-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	狄诺纳有限公司		
申请(专利权)人(译)	狄诺纳有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	狄诺纳有限公司		
[标]发明人	宋亨根 尹相淳 金海贞 池吉龍 申美香 文裕利		
发明人	宋亨根 尹相淳 金海贞 池吉龍 申美香 文裕利		
IPC分类号	C07K16/12 G01N33/536 G01N33/569 G01N33/50		
CPC分类号	C07K16/1271 G01N33/56938		
审查员(译)	李翠莹		
优先权	1020090020935 2009-03-11 KR		
其他公开文献	CN102482346A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及抗在金黄色葡萄球菌甲氧西林抗性菌株(MRSA)中特异性表达的蛋白的抗体，以及用于检测MRSA的方法和试剂盒。通过使用用于检测PBP2a的PBP2a特异性抗体和用于检测蛋白质A的蛋白质A特异性抗体，本发明能够快速且准确地检测MRSA。

