[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
C12Q 1/14 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480041218.6

[43] 公开日 2007 年 2 月 14 日

[11] 公开号 CN 1914512A

[22] 申请日 2004.12.17
[21] 申请号 200480041218.6
[30] 优先权
[32] 2003.12.30 [33] US [31] 60/533,171
[86] 国际申请 PCT/US2004/042794 2004.12.17
[87] 国际公布 WO2005/071416 英 2005.8.4
[85] 进入国家阶段日期 2006.8.1
[71] 申请人 3M 创新有限公司
地址 美国明尼苏达州
[72] 发明人 布林达·B·拉克希米
帕特里克·A·马赫
拉里·G·马丁
[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司
代理人 刘 慧 杨 青
权利要求书 4 页 说明书 20 页

[54] 发明名称

增强细胞的细胞壁组分的信号检测的方法

[57] 摘要

本发明涉及增强细胞壁组分的信号检测的方法，其中该方法涉及使细胞溶胞以形成细胞壁碎片并分析细胞壁碎片。

1. 增强细胞的细胞壁组分的信号检测的方法，该方法包括：

提供包括细胞的试样；

使细胞溶胞以形成包括细胞壁碎片的溶胞产物；和

对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析；

其中细胞壁组分相对于未溶胞细胞中的相同组分显示增强的信号。

2. 权利要求 1 的方法，其中细胞壁组分包括细胞壁蛋白。

3. 权利要求 2 的方法，其中细胞壁蛋白为蛋白 A。

4. 权利要求 2 的方法，其中细胞壁蛋白为聚集因子。

5. 权利要求 1 的方法，其中细胞壁组分包括荚膜多糖或细胞壁碳水化合物。

6. 权利要求 1 的方法，其中使细胞溶胞包括使细胞接触溶胞剂。

7. 权利要求 6 的方法，其中溶胞剂包括选自以下的酶：溶葡萄球菌素、溶菌酶、肽链内切酶、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶、内-β-N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶、和 ALE-1、及其组合。

8. 权利要求 6 的方法，其中溶胞剂包括盐、增溶剂、还原剂、酸、碱、或其组合。

9. 权利要求 1 的方法，其中使细胞溶胞包括使细胞物理溶胞。

10. 权利要求 1 的方法，其中细胞包括一种或多种微生物。

11. 权利要求 10 的方法，其中微生物包括革兰氏阳性菌。

12. 权利要求 11 的方法,其中革兰氏阳性菌包括金黄色葡萄球菌。

13. 权利要求 10 的方法，其中微生物包括革兰氏阴性菌。

14. 权利要求 1 的方法，其中细胞未进行培养。

15. 权利要求 1 的方法，其中该方法另外包括对溶胞产物作细胞内组分方面的分析。

16. 权利要求 15 的方法，其中细胞包括抗生素抗性微生物。

17. 权利要求 15 的方法，其中细胞内组分包括细胞膜。

18. 权利要求 17 的方法，其中细胞膜包括膜蛋白。

19. 权利要求 18 的方法，其中膜蛋白为细胞质膜蛋白。

20. 权利要求 19 的方法，其中细胞质膜蛋白为 PBP2'。

21. 权利要求 1 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括鉴定细胞壁组分。

22. 权利要求 1 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括量化细胞壁组分。

23. 权利要求 1 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括用荧光免疫色谱法分析。

24. 权利要求 1 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括用 ELISA 分析。

25. 权利要求 1 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括用声波传感器分析。

26. 权利要求 1 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括进行比色分析。

27. 增强金黄色葡萄球菌所特有的细胞的细胞壁组分的信号检测的方法，该方法包括：

提供包括未培养的细胞的试样；

使未培养的细胞溶胞以形成包括细胞壁碎片的溶胞产物；和

对细胞壁碎片作金黄色葡萄球菌所特有的细胞壁组分方面的分析；

其中金黄色葡萄球菌所特有的细胞壁组分相对于未溶胞细胞中的相同组分显示增强的信号。

28. 权利要求 27 的方法，其中细胞壁组分包括细胞壁蛋白。

29. 权利要求 28 的方法，其中细胞壁蛋白为蛋白 A。

30. 权利要求 27 的方法，其中使未培养的细胞溶胞包括使未培养的细胞接触溶葡萄球菌素。

31. 权利要求 27 的方法，其中该方法另外包括对溶胞产物作细胞内组分方面的分析。

32. 权利要求 31 的方法，其中细胞内组分包括细胞膜。

33. 权利要求 32 的方法，其中细胞膜包括膜蛋白。

34. 权利要求 33 的方法，其中膜蛋白为 MRSA 所特有的细胞质膜蛋白。

35. 权利要求 34 的方法，其中细胞质膜蛋白为 PBP2'。

36. 权利要求 27 的方法，其中对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析包括量化细胞壁组分。

37. 权利要求 27 的方法，其中试样包括浓度低于 5×10^4 cfu/ml 的金黄色葡萄球菌。

38. 增强金黄色葡萄球菌所特有的细胞的细胞壁组分的信号检测的方法，该方法包括：

提供包括未培养的细胞的试样；

使未培养的细胞与溶葡萄球菌素接触以形成包括细胞壁碎片的溶胞产物；和

对细胞壁碎片作蛋白 A 方面的分析；

其中细胞壁碎片中的蛋白 A 相对于未溶胞细胞的细胞壁中的蛋白 A 显示增强的信号。

增强细胞的细胞壁组分的信号检测的方法

发明背景

对通常使用的抗生素抗性细菌的出现成为日益严重的问题，严重危及受感染个体的治疗。因此，在早期和以相对迅速的方式测定这种细菌的存在以赢得对这种细菌更好的控制变得越来越重要。这还可应用于多种其它微生物。

非常感兴趣的这种微生物之一为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)(“*S. aureus*”)。这种病原体引起广谱感染，包括：表面损害如小的皮肤脓肿和创伤感染；系统的和危急生命的状况如心内膜炎、肺炎和败血病；以及 toxinoses 如食物中毒和中毒性休克综合症。一些菌株(如，甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌)除了对几种选择的抗生素之外对所有抗生素有抗药性。

用于检测微生物(特别是抗生素抗性细菌)的当前技术通常是费时的，并且典型地牵涉培养纯形式的细菌。用于鉴定与急性感染有关的致病性葡萄球菌(即，人类和动物中的金黄色葡萄球菌，和动物中的中间型链球菌(*S. intermedius*)和猪葡萄球菌(*S. hyicus*))的这种技术之一基于微生物的凝血能力。已经描述了至少两种不同的凝固酶试验：用于游离凝固酶的试管试验和用于结合型凝固酶或聚集因子的载玻片试验。试管凝固酶试验典型地涉及将在脑心浸汁中的过夜培养物与重构血浆混合，将混合物培养 4 小时，并通过将用于凝块形成的试管慢慢地倾斜观察试管的凝块形成。对于金黄色葡萄球菌已经推荐试验进行过夜培养，因为少量菌株形成凝块可能需要比 4 小时更久的时间。载玻片凝固酶试验典型地更快和更经济；然而 10%到 15%的金黄色葡萄球菌菌株可能产生阴性结果，其需要通过试管试验再次检查分离物。

虽然在本领域中已经描述了检测金黄色葡萄球菌以及其它微生物的方法，但是改善的检测方法将是有利的。

发明内容

本发明提供增强细胞壁组分的信号检测的方法，其中该方法涉及使细胞溶胞形成细胞壁碎片并分析细胞壁碎片中感兴趣的组分。具体地，该方法可用于检测微生物(特别是金黄色葡萄球菌)所特有的细胞壁的一种或多种组分。

在一个实施方案中，本发明提供增强细胞的细胞壁组分的信号检测的方法。该方法包括：提供包括细胞的试样；使细胞溶胞以形成包括细胞壁碎片的溶胞产物；对细胞壁碎片作细胞壁组分方面的分析；其中细胞壁组分相对于未溶胞细胞中的相同组分显示增强的信号。

在另一个实施方案中，提供增强金黄色葡萄球菌所特有的细胞的细胞壁组分的信号检测的方法。该方法包括：提供包括未培养的细胞的试样；使未培养的细胞溶胞以形成包括细胞壁碎片的溶胞产物；和对细胞壁碎片作金黄色葡萄球菌所特有的细胞壁组分方面的分析；其中金黄色葡萄球菌所特有的细胞壁组分相对于未溶胞细胞中的相同组分显示增强的信号。

在另一个实施方案中，提供增强金黄色葡萄球菌所特有的细胞的细胞壁组分的信号检测的方法。该方法包括：提供包括未培养的细胞的试样；使未培养的细胞与溶葡萄球菌素接触以形成包括细胞壁碎片的溶胞产物；和对细胞壁碎片作蛋白 A 方面的分析；其中细胞壁碎片中的蛋白 A 相对于未溶胞细胞的细胞壁中的蛋白 A 显示增强的信号。

当术语“包括”及其变体出现在说明书和权利要求中时不具有限制性含义。

如本文中使用的，“一”、“一个”、“该”、“至少一个”、和“一个或多个”可互换地使用。

上述的本发明的发明内容不用于描述本发明的各自公开的实施方案或每一个执行方式。下述的描述更具体地举例说明示例性的实施方案。在本申请的几处，通过列举实施例提供指导，所述实施例可以不同组合使用。在每种情况中，列举实施例只是代表性的，不应将其解释为排它性列举。

示例性实施方案的详细说明

本发明提供增强细胞的细胞壁组分的信号检测的方法，所述细胞得自例如原核和真核生物。该方法涉及将试样中的细胞(其可经过培养或未经过培养)溶胞以形成细胞壁碎片，和分析细胞壁碎片中的感兴趣组分。

具体地，本发明的方法可用于检测感兴趣的物种(如，感兴趣的微生物)所特有的一种或多种细胞壁组分，和选择性地检测感兴趣的物种(如，感兴趣的抗生素抗性微生物)所特有的一种或多种细胞内组分。在本文中，认为分析的细胞壁碎片为细胞壁的固体碎片。也就是说，认为它们在溶胞时未被溶解；细胞壁仅仅被打碎。另外，分析的细胞壁组分仍然是细胞壁碎片的部分(即，在细胞壁中或在细胞壁上)。也就是说它们在溶胞时未被溶解。显著地，这增强细胞壁组分相对于未溶胞细胞中的相同组分的信号。

特别感兴趣的微生物包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、原生动物、支原体、酵母菌、病毒、甚至和脂质包膜病毒。特别相关的生物体包括肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、或葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)、链球菌(*Streptococcus* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、肠球菌(*Enterococcus* spp.)、埃希氏杆菌(*Esherichia* spp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、利斯特氏菌(*Listeria* spp.)、弧菌(*Vibrio*

spp.)、以及疱疹病毒、曲霉(*Aspergillus* spp.)、镰孢(*Fusarium* spp.)、和假丝酵母(*Candida* spp.)的成员。特别的致命性生物体包括金黄色葡萄球菌(包括抗药性菌株如甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA))、表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、无乳链球菌(*S. agalactiae*)、化脓链球菌(*S. pyogenes*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、万古霉素抗性肠球菌(VRE)、万古霉素抗性金黄色葡萄球菌(VRSA)、万古霉素中间体抗性金黄色葡萄球菌(VISA)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、绿脓假单孢菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)、黑色曲霉(*Aspergilllus niger*)、烟曲霉(*A. fumigatus*)、棒曲霉(*A. clavatus*)、茄病镰孢(*Fusarium solani*)、尖孢镰孢(*F. oxysporum*)、厚垣镰孢(*F. chlamydosporum*)、单核细胞增生利斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、副溶血弧菌(*V parahemolyticus*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella cholerasuis*)、伤寒沙门氏菌(*S. typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)、光滑假丝酵母(*C. glabrata*)、克鲁斯氏假丝酵母(*C. krusei*)、和多重抗药性革兰氏阴性杆菌(MDR)。

对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌也是感兴趣的，特别感兴趣的是革兰氏阳性菌，如金黄色葡萄球菌。典型地，这些可以通过检测细菌所特有的细胞壁组分如细胞壁蛋白质的存在而进行检测。此外，特别感兴趣的还有抗生素抗性微生物，包括 MRSA、VRSA、VISA、VRE、和 MDR。典型地，这些可以通过另外地检测细胞内组分如膜蛋白的存在而进行检测。

本发明胜过用于分析这种微生物样品的常规技术之处在于微生物所特有的细胞壁组分的信号得到增强。这种细胞壁组分包括例如细胞壁蛋白质如蛋白 A 和识别粘着基质分子的微生物表面组分(MSCRAMMs)如纤维蛋白原结合蛋白(如，聚集因子)、纤连蛋白结合蛋白、胶原蛋白结合蛋白、肝素/肝素相关多糖结合蛋白、等等。蛋白 A 和聚集因子如纤维蛋白原结合因子和聚集因子 A、B、和 Efb 还在检

测金黄色葡萄球菌的存在的方法中特别有用。感兴趣的其它细胞壁组分包括荚膜多糖和细胞壁碳水化合物(如，磷壁酸和脂磷壁酸)。

感兴趣的这种微生物或其它物种可以在试样中进行分析，所述试样可衍生自任何来源，如生理液体如，血液、唾液、眼晶状体液、滑液、脑脊液、脓、汗液、分泌液、尿、粘液、分泌的乳液、等等。另外，试样可衍生自身体部位，如，伤口、皮肤、鼻孔、头皮、指甲、等等。

本领域中描述了用于检测微生物如金黄色葡萄球菌的不同的患者取样技术。这种取样技术也适合于本发明的方法。常见的是通过擦拭患者鼻孔得到样品。特别优选的取样技术包括用无菌的药签或取样装置拭抹主体(患者)的前鼻孔。例如，一个药签用于从每个主体取样，即，将一个药签用于两个鼻孔。取样可以通过例如将干燥的或用适当溶液润湿的药签(如购自 Puritan, East Grinstead, UK 的那些，商业名称“Pure-Wraps”)插入主体鼻孔的前部顶端并将药签沿着鼻孔粘膜表面旋转两个整转。然后典型地将药签直接培养或用适当的溶液提取，溶液典型地包括水，其选择性地与缓冲剂和至少一种表面活性剂组合。

除生理液体之外，其它试样可包括其它液体以及溶解于液态介质中的固体。感兴趣的样品可以包括工艺物流、水、污物、植物或其它植被、空气、(如，污染的)表面、等等。

试样(如，液体)可经过事先处理，如粘性流体的稀释。试样(如，液体)可在被注入到样品端口之前经过其它处理方法，如浓缩，其通过过滤、离心、蒸馏、透析等等进行；稀释、过滤、天然组分的灭活、加入试剂、化学处理、等等。

细胞壁组分的信号增强作为试样中细胞溶胞的结果存在。在本发明的方法中，溶胞操作可包括使细胞与溶胞剂接触或物理地使细胞溶

胞。溶胞操作可以在常规条件下进行，诸如例如在约 5℃到约 37℃的温度下进行，优选在约 15℃到约 25℃的温度下进行。显著地，溶胞操作可以使用未培养的细胞进行，即，直接的试样，虽然也可使用培养的细胞。

通过使细胞溶胞形成细胞壁碎片和得到的细胞壁组分的信号增强，可以评价具有相对低浓度的感兴趣的物质的样品。因此，有利地，本发明的方法具有改善的灵敏度。例如，对于某些实施方案，试样可以包括相对低浓度的微生物，特别是金黄色葡萄球菌。这种相对低的浓度包括例如低于每毫升为约 5×10^4 集落形成单位(“cfu”) (cfu/ml)，低于约 5×10^3 cfu/ml，低于约 1000 cfu/ml，甚至低于约 500 cfu/ml。微生物如金黄色葡萄球菌也可在例如 5×10^7 cfu/ml 的高水平被检测到。

适当的溶胞剂包括例如酶如溶葡萄球菌素溶菌酶、内肽酶、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酸酰胺酶、内-β-N-乙酰基氨基葡萄糖苷酶(glucosaminidase)、和 ALE-1。如果期望，可使用不同的酶组合。溶葡萄球菌素为检测金黄色葡萄球菌存在的特别有用的方法。

其它溶胞剂包括盐(如，离液盐)、增溶剂(如，洗涤剂)、还原剂(如，DTT、DTE、半胱氨酸、N-乙酰基半胱氨酸)、酸(如，HC1)、碱(如，NaOH)。如果期望，可使用不同的这些溶胞剂的组合。

溶胞操作还可以通过以物理方式使细胞溶胞进行。物理溶胞可以通过将试样与玻璃珠涡流、超声、煮沸而进行，或使试样经过高压如使用弗氏细胞压碎器进行。

如果期望，本发明的方法可另外包括分析溶胞产物中的细胞内组分，其可能与细胞膜有关或无关。细胞内组分对于分析抗生素抗性微生物如 MRSA、VRSA、VISA、VRE、和 MDR 特别有用。这些微生物

所特有的细胞内组分包括膜蛋白。这种膜蛋白的例子包括细胞质膜蛋白、外膜蛋白、和细胞膜蛋白。细胞质膜蛋白如青霉素结合蛋白(PBP)(如，PBP2'或 PBP2a)可为抗生素抗性微生物所特有的具体特征。例如，细胞质膜蛋白 PBP2'为 MRSA 所特有的。

本发明的方法不仅涉及检测细胞壁组分的存在，而且优选鉴定这种细胞壁组分，其可以用于鉴定以细胞壁组分为特征的微生物。在某些实施方案中，分析细胞壁碎片中的细胞壁组分包括将该细胞壁组分进行定量。

根据本发明方法中使用的分析技术，可以使用相对小量的试样。虽然可使用高达 1-2 毫升(ml)的试样量，但是，有利地，约为 50 微升(μl)的试样对于某些方法来说足够了。

根据本发明方法中使用的分析技术，检测时间可相对较短。例如，检测时间可低于约 300 分钟，低于约 250 分钟，低于约 200 分钟，低于约 150 分钟，低于约 100 分钟，低于约 60 分钟，甚至低于约 30 分钟。

这种分析技术可为本领域技术人员已知的多种常规方法中的任一种。例如，所述方法可以包括使用荧光免疫色谱法(如，在美国专利 5,753,517 中所述的快速分析物测量方法)；声波传感器、ELISA (如，比色 ELISA)；和其它比色技术(如，包括聚联乙炔(PDA)材料的比色传感器)，如在美国专利申请公开 2004/0132217、2002 年 12 月 19 日提交的美国专利申请 10/325,276、和同一日期提交的申请者的受让人的题为“Colorimetric Sensors Constructed of Diacetylene Materials”的待决申请____(Attorney Docket No. 60422US002)中所述的那些；以及表面胞质基因共振(SPR，使用得自 Biacore, Upsala, Sweden 的类型的生物传感器)。

酶联免疫吸附试验(ELISA)基于两个重要的生命现象：1)抗体区分

几乎无限多的特异性外源化合物的判别能力和 2)酶特异性催化可检测的化学反应的能力。结合和可溶性抗体对外源化合物的这种组合，以及这些反应通过随后的由连接于可溶性抗体的酶催化的反应而检测，提供了非常灵敏和特异性的外源化合物的测量。这种技术为本领域技术人员公知的。

表面胞质基因共振(SPR)为基于表面胞质基因共振的光学技术，其测量传感器表面附近的折射率的变化。当光从光密介质(即，具有较高折射率的介质)传输到低密度介质(即，具有更低折射率的介质)时，如果光接触界面的角度大于临界角，则在两种介质之间的界面处发生全内反射(TIR)。当发生 TIR 时，电磁的“消散波”远离界面传送到具有更低折射率的介质中。如果为界面包覆某些导电性材料(如，金或银)的薄层，则消散波可在导体表面与自由电子构象耦合，称为表面胞质基因。这种谐振耦合在特定的入射光角度处发生，吸收光能量并且引起在该角度的反射光强度降低的特征。表面电磁波产生第二消散波，以增强的电场透入到低密度介质中。共振角对于许多因素是敏感的，所述因素包括入射光的波长和导电薄膜的性质和厚度。然而，最重要地是，角度取决于表面胞质基因的消散波所传播进入的介质的折射率。当其它因素保持不变时，由此，共振角为低密度介质的折射率的直接度量，该角度对介质折射率的改变非常敏感。SPR 消散波随距离界面的距离按指数规律衰变，并且有效地渗入到具有较低折射率的介质中约一个波长的深度。因此，只有非常接近界面的折射率的改变才可以检测。这种技术可以使用得自 Biacore, Upsala，Sweden 的类型的生物传感器进行。

在本发明的某些实施方案中，分析细胞壁组分的方法可以涉及检测至少一种物理性质的改变，可以包括引起波相位（wave phase）和/或波速改变的粘度改变和/或质量改变。在某些实施方案中，这种改变可以通过生物传感器检测。

如本文中使用的，“生物传感器”是指检测至少一种物理性质的改变并且根据可检测的改变产生信号的装置。使用生物传感器检测改变的装置可以包括电化学装置、光学装置、电光学装置、声学机械装置等。例如，电化学生物传感器利用电位计和电流计测量，而光生物传感器利用吸光性、荧光、可见光检测、或发光和渐逝波(evanescent wave)。对于某些实施方案，可使用采用检测用声学机械装置的生物传感器，如表面声波(SAW)生物传感器。采用声学机械装置的生物传感器和这种生物传感器的组件在例如美国专利 5,076,094、5,117,146、5,235,235、5,151,110、5,763,283、5,814,525、5,836,203、和 6,232,139 中有所描述。

压电基 SAW 生物传感器通常根据它们检测质量或粘度的细微变化的能力工作。如美国专利 5,814,525(Renschler 等人)中所述，压电基声学机械装置的类别可以根据它们的检测方式进一步再分成表面声波(SAW)、声学板模式(acoustic plate mode，APM)、或石英晶体微量天平(QCM)装置。APM 装置基于与 SAW 装置类似的原理工作，不同之处在于使用的声波可以用与液体接触的装置操纵。类似地，施用于 QCM(典型地为 AT 切割的石英)装置上的两个相对电极的交流电压诱导厚度剪切波型，其共振频率与涂层材料的质量改变成比例地改变。

可通过用于构造生物传感器的压电材料的晶体切削测定声波传播的方向(如，在与波导管平行或与波导管的平面垂直的平面中)。因为来自液体接触表面的声阻尼，其中大多数声波(如，瑞利波、大多数兰姆波)传播进出平面的 SAW 生物传感器典型地不用于液体检测应用。

对于液体样品介质，可优选使用剪切水平面声波生物传感器(SH-SAW)。SH-SAW 传感器典型地从压电材料构造，所述压电材料具有允许波的传播以剪切水平模式旋转的晶体切削和取向，即，与波导管定义的平面平行，引起接触检测表面的液体中声阻尼损失降低。剪切水平声波可包括如，厚度切变模式(TSM)、声学板模式(APM)、surface

skimming bulk waves(SSBW)、勒夫波、漏泄声波(LSAW)、和Bleustein-Gulyaev(BG)波。

具体地，勒夫波传感器可以包括支持SH波模式的衬底如ST石英的SSBW或36° YXLiTaO_3的漏泄波。可优选通过应用薄的声学引导层或波导层将这些模式转化为勒夫波模式。这些波为频率依赖性的，并且可以在波导层的剪切波速度比压电衬底的剪切波速度更低时产生。

可优选波导材料为表现出一种或多种以下性质的材料：低的声损耗、低导电率、在水和水溶液中的耐用和稳定性、相对低的声速、疏水性、较高的分子量、高度交联的、等等。在一个实施例中，已经使用 SiO_2 作为石英衬底上的声波导层。其它热塑性和交联聚合物型波导材料的例子包括如，环氧树脂、聚甲基丙烯酸甲酯、酚醛树脂(如，NOVALAC)、聚酰亚胺、聚苯乙烯、等等。用于本发明的检测柱体的与声音-机械传感器使用的其它可能适合的波导材料和结构可在例如与此同一日期提交的申请者的受让人的题为“Acoustic Sensors and Methods”PCT申请_____(Attorney Docket No. 60209WO003)中描述。

或者，还可以将QCM装置与液体样品介质使用。采用声音-机械装置和组件的生物传感器可在例如美国专利5,076,094 (Frye 等人)、5,117,146 (Martin 等人)、5,235,235 (Martin 等人)、5,151,110 (Bein 等人)、5,763,283 (Cernosek 等人)、5,814,525 (Renschler 等人)、5,836,203 (Martin 等人)、和6,232,139 (Casalnuovo 等人)中描述。剪切水平SAW装置可得自不同的制造商，如 Sandia Corporation, Albuquerque, New Mexico。关于本发明可使用的一些SH-SAW生物传感器也可如Branch等人，“Low-level detection of a *Bacillus anthracis* simulant using Love-wave biosensors on 36° YX $LiTaO_3$”，Biosensors and Bioelectronics，19,849-859(2004)中所述。

如本文中讨论的，本发明的方法可用于不同的检测系统和组件(如包括生物传感器的检测柱体)，其可以在例如 2003 年 12 月 3 日提交的美国专利申请 60/533,169、与其同一日期提交的标题为“Acousto-Mechanical Detection Systems and Methods of Use”的 PCT 申请_____(Attorney Docket No. 59468W0003)和与其同一日期提交的标题为“Detection Cartridges, Modules, Systems, and Methods”的 PCT 申请_____(Attorney Docket No. 60342W0003)中找到。

在一些实施方案中，生物传感器包括将感兴趣的金黄色葡萄球菌生物分子附着于压电生物传感器表面的反应物(如，抗体)。如果金黄色葡萄球菌存在，则分析试样中裂解的细胞中的蛋白 A，其为金黄色葡萄球菌所特有的并且可用固定在生物传感器表面上的蛋白 A 特异性抗体检测。

另外，裂解的细胞如金黄色葡萄球菌细菌从细胞的内部释放蛋白质标识物(与细胞的细胞壁部分相反)。这种蛋白质标识物可以通过金黄色葡萄球菌反应性分子检测。这种技术特别适合于检测甲氧西林抗性金黄色葡萄球菌(MRSA)。在一些实施方案中，采用金黄色葡萄球菌抗体作为金黄色葡萄球菌反应物。“金黄色葡萄球菌抗体”是指免疫球蛋白，其具有特异性结合于给定抗原(包括其抗原结合片段)的能力。术语“抗体”意在包括任何同种型(IgG、IgA、IgM、IgE、等等)的全部抗体，和还与外源化合物如蛋白质特异性反应的得自脊椎动物如哺乳动物的抗体片段。

可使用常规技术将抗体分段并且以与完整抗体同样的方法进行用于应用的片段筛选。因此，该术语包括能够选择性地与某种蛋白质反应的抗体分子的蛋白酶裂解部分或重组制备部分的片段。这种蛋白水解和/或重组片段的非限制性例子包括 Fab、F(ab')2、Fab、Fv、和包含通过肽连接器结合的 VL 和/或 VH 结构域的单链抗体(scFv)。scF'v 可进行共价或非共价连接以形成具有两个或多个结合部位的抗体。抗体可

使用本领域技术人员已知的任何可检测的部分进行标记。在一些方面中，结合于希望测量的被分析物的抗体(一次抗体)不被标记，但是代之以通过结合特异性结合于一次抗体的被标记的二次抗体或其它试剂间接地检测。

本领域已知多种金黄色葡萄球菌抗体。例如，金黄色葡萄球菌抗体购自 Sigma-Aldrich 和 Accurate Chemical. 另外，金黄色葡萄球菌抗体在美国专利 4,902,616 中描述。典型地，采用的抗体浓度最低为 2 纳克/毫升。优选地，抗体浓度最低为 100 纳克/毫升。例如，可采用 50 微克/毫升的浓度。典型地，采用不超过约 500 微克/毫升。如前所述，优选将金黄色葡萄球菌抗体固定在生物传感器的表面上。

可将本文中所述的一种或多种分析技术与电和/或电化学方法结合。微生物代谢通常引起导电性和电容增加，引起阻抗降低。因此，适合这些原理的测量已经在文献中用于检测细菌。例如，已经开发了可再次用的体声波阻抗传感器，用于检测微生物。这些生物体能够将它们的代谢性氧化还原反应物转换为可以计量的电信号。因此，电化学方法也可用于检测细菌生物体。该方法包括直接电势检测、光协助型电势计检测(LAPS)和电流检测。已经用电化学方法监控与使用辣根过氧化物标记抗体的氧化还原反应结合的 ELISA 技术。其它变体包括与电流检测结合的免疫过滤技术。这种技术在 D. Ivinitski 等人，Biosensors & Bioelectronics，14, 599-624 (1999)中描述。

实施例

现在参考本发明人预见的几个具体的实施方案描述本发明，其可以使说明书是可利用的。尽管如此，对于本发明的非实质性改变，包括目前没有预见的改变，可构成其等价物。因此，本发明的范围将不会受本文中所述的细节和结构所限制，其只由权利要求及其等价物限制。

实施例 1. ELISA 检测

制备具有抗体的板

对聚苯乙烯微孔滴定板(Costar 96 Well Cell Culture Cluster，平底带盖，经过组织培养处理的，非火成的，聚苯乙烯板，目录编号 3596，Coming Incorporated, Coming, NY)涂布 10 微克/毫升的 ChromPure 兔 IgG (完整分子，目录编号 011-000-003，Jackson ImmunoRcsearch Laboratories, West Grove, PA)抗体。通过将抗体在 0.1 M 碳酸氢钠, pH 9.6(Sigma-Aldrich St. Louis, MO)中稀释制备抗体溶液。将涂有抗体的板在 37℃培养一小时。

板的洗涤

然后通过吸入 0.25 毫升的“PBS 缓冲剂”溶液并将其分配到每个孔中对板进行洗涤，洗涤重复 5 个循环，其中“PBS 缓冲剂”溶液包括 0.02 M 磷酸钠(Sigma-Aldrich)和 0.15 M 氯化钠(Sigma-Aldrich)，其中已经加入 0.05%体积-体积(v/v)的聚氧乙烯(20)单月桂酸山梨醇酐酯(商业名称吐温 20，得自 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)，溶液 pH 为 7.5。

板的封闭

通过将 Carnation 脱脂奶粉(Nestle USA, Inc., Solon, OH)与上述洗液以 2 重量/容量%型负载混合制备 blotto 溶液。向每个孔加入一部分 blotto 溶液(0.2 ml)并将板在 37℃培养 1 小时。然后如上所述对板进行洗涤。

细菌悬浮液制备

金黄色葡萄球菌细菌得自 The American Type Culture Collection, Rockville, MD，商业名称“ATCC 25923”。通过用细菌接种 5-10 毫升制备好的无菌 Tryptic Soy Broth(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)使细菌在肉汤培养物中生长过夜(17-22 小时，37℃)。将培养物通过离心洗涤(8,000-10,000 rpm，15 分钟，在 Eppendorf 型号 5804R 离心机(Brinkman Instruments, Westbury, NY)并再悬浮在包含 0.2% (w/v)

PLURONIC L64表面活性剂(BASF Corporation, Mount Olive, NJ)的PBS缓冲剂中)并用此溶液通过离心洗涤另外的3次循环。

细菌稀释

然后将经过洗涤的细菌悬浮液稀释在以下溶液中。

溶液 1 为具有 0.2% (w/v) PLURONIC L64 表面活性剂 (BASF Corporation)的 PBS 缓冲剂。

溶液 2 为通过将 0.01 M Tris-HCl、1 mM EGTA、1% Triton X-100、2.5 mM 焦磷酸钠、1 mM 磷酸钠、和 1μg/ml 亮肽素(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)合并制得的缓冲液。

溶液3为通过将上述的溶液2与3微克/毫升的溶葡萄球菌素(目录编号 L-4402, Sigma-Aldrich)合并制得的溶胞缓冲剂。

将金黄色葡萄球菌细菌在三种溶液中的每一种中以 5 倍系列稀释，稀释为 10^8、$2x10^7$、$4x10^6$、$8x10^5$、和 $1.6x10^4$/毫升。

同样地制备表皮葡萄球菌 ATCC 12228 (美国标准菌库, Rockville, MD)的培养物并将表皮葡萄球菌细菌只是以 10^8/毫升再悬浮在溶液3中用于比较。

抗原溶液的 ELISA 试验

将每种抗原制剂和稀释物的样品以及不含细菌的每种溶液的样品加入到先前经过涂覆、封闭、和洗涤的板中。通过将 0.1 ml 样品溶液加入到板上相隔的微孔中将每个样品一式两份涂板。将板在 37℃培养 1 小时。然后如上对板进行洗涤并向适当的孔中加入 0.1 ml 的一次抗体溶液。

一次抗体为生物素酰化的兔抗金黄色葡萄球菌 IgG(生物素兔抗金黄色葡萄球菌，目录编号 YVS6887，Accurate Chemical and Scientific Company, Westbury, NY)和生物素酰化的小鼠抗蛋白 A IgG (单克隆的抗蛋白 A 克隆，SPA-27, 生物素结合物，目录编号 B-3150, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。将这些抗体在 blotto 中稀释到 5 微克/毫升并向适当的孔中加入 0.1 毫升的一次抗体溶液。将板在 37℃培养 1 小时。

培养之后，如上对板进行洗涤并向适当的孔中加入 0.1 毫升的链霉亲和素-碱性磷酸酶结合物(SA-AP, Jackson ImmunoResearch Laboratories)制剂。链霉亲和素-碱性磷酸酶结合物(SA-AP)制剂通过将链霉亲和素-碱性磷酸酶结合物(目录编号 016-050-084, Jackson ImmuoResearch Laboratories)在 blotto 中稀释到 0.5 微克/毫升制得。将板在 37℃培养 1 小时，然后如上洗涤。

在洗涤之后，向适当的孔中加入 0.1 毫升部分的碱性磷酸酶底物制剂。碱性磷酸酶底物制剂为根据制造商说明书制备的磷酸对硝基苯酯底物(pNPP,产品编码 50-80-00, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。然后将板在室温下培养 15 分钟。在 15 分钟的培养期之后，加入 0.1 毫升的 5%(w/v)乙二胺四乙酸二钠(Sigma-Aldrich)以终止酶催化的底物显色。

用 Bio-Tek 型号的 EL808 微孔滴定板读板器(Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT)在 405 纳米读板，结果如以下表 1 中所示(N/A =不适用(即，未测量到))。

表 1.

ELISA 结果 (在 405 nm 的吸光度)		细菌浓度 cfu/ml					
一次抗体	溶液	10^8	$2x10^7$	$4x10^6$	$8x10^5$	$1.6x10^5$	缓冲液
兔-生物素	PBS-L64 缓冲液	2.730	1.107	0.376	0.192	0.192	0.267
兔-生物素	未溶胞的金黄色葡萄球菌	2.126	0.679	0.235	0.163	0.534	0.144
兔-生物素	溶胞的金黄色葡萄球菌	4.000	4.000	4.000	4.000	1.321	0.162
兔-生物素	溶胞的表皮葡萄球菌	0.300	N/A	N/A	N/A	N/A	0.134
鼠-生物素	PBS-L64 缓冲液	3.895	1.322	0.409	0.243	0.157	0.166
鼠-生物素	未溶胞的金黄色葡萄球菌	4.000	1.246	0.371	0.265	Na	0.136
鼠-生物素	溶胞的金黄色葡萄球菌	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	0.194
鼠-生物素	溶胞的表皮葡萄球菌	0.715	N/A	N/A	N/A	N/A	0.267

实施例 2.

荧光试验检测

细菌悬浮液的制备和稀释

金黄色葡萄球菌细菌得自 The American Type Culture Collection, Rockville, MD，保藏号“ATCC 25923”。通过用细菌接种 5-10 毫升制备好的无菌 Tryptic Soy Broth(Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)使细菌在肉汤培养物中生长过夜(17-22 小时，37℃)。将培养物通过离心洗涤(8,000-10,000 转/分(rpm)，15 分钟，在 Eppendorf 型号 5804R 离心机(Brinkman Instruments, Westbury, NY)中，并再悬浮在包含 0.2 重量/容量(w/v)%的 PLURONIC L64 表面活性剂(BASF Corporation, Mount Olive, NJ)的 PBS 缓冲剂中)并用此溶液通过离心洗涤另外的 3 次循环。

然后将经过洗涤的金黄色葡萄球菌 25923 悬浮液以 10 倍系列稀释，从 10^5 到 10^3/毫升在两个不同的稀释剂中稀释(E5 到 E3)。第一种为 RAMP 试样缓冲液 No.1(Response Biomedical Corporation, Burnaby, BC, Canada)，第二种与第一种相同，只是加入溶葡萄球菌素(Sigma-Aldrich)以得到 3 微克/毫升的溶液。还运行单独的缓冲液样品(E0)。

根据制造商的指导说明在 RAMP 荧光试验读板器(Response Biomedical Corporation, Burnaby, BC, Canada)上进行试验。结果在以下表 2 中给出。

表 2

用完整的和溶胞的金黄色葡萄球菌 25923 进行的 RAMP 试验		
样品浓度 (cfu/ml)	完整的细胞-金黄色葡萄球菌 25923(dUnits)	溶胞的细胞金黄色葡萄球菌 25923(dUnits)
E5	51.4	999
E4	55.7	108.3
E3	55.8	83.8
E0	44.8	56.5

实施例 3. 比色检测

在聚碳酸酯膜上涂布聚二乙炔脂质体

将二乙炔 $HO(O)C(CH_2)_2C(O)O(CH_2)_4$-C≡C-C≡C$(CH_2)_4O(O)C(CH_2)_{12}CH_3$ (根据美国专利申请公开 2004/0132217 的实施例 6 制备)和 1,2-dimeristoyl-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(DMPC, 化学式量(F.W.)678，得自 Sigma-Aldrich, 目录编号 P2663)的(60/40)制剂以 200 nm 直径孔隙(Avestin, Inc., Ottawa, Canada)涂布在 25 mm 直径的多孔性聚碳酸酯膜上以制造比色检测器样品。使用手持挤压法涂布膜。

将 60/40 的二乙炔/DMPC 混合物称重到玻璃小瓶中并悬浮在 HEPES 缓冲液(5 mM, pH 7.2)中以制备 1 mM 的溶液。然后使用 Misonix XL202 探针超声波仪将溶液进行探针超声处理 2 分钟并置于 4℃冰箱中约 20 小时。这个过程形成聚二乙炔(PDA)脂质体悬浮液。

将待涂布的聚碳酸酯膜置于手持挤出系统(商业名称 LIPOFAST，得自 Avestin, Inc., Ottawa, Canada)的不锈钢室中。用膜覆盖 TEFLON 基质的底部 O 形圈。要小心以避免使膜挠曲和/或起皱。将上面的 TEFLON O 形圈块置于不锈钢外套内的膜的上面。然后通过手动固定不锈钢盖将室密封。将气密注射器(Hamilton 500 微升(μl))充满二乙炔脂质体的悬浮液并将其附着于基质，将第二个注射器附着于另一个盖。慢慢地推动第一个注射器的脂质体以恒定的均匀压力通过室。

膜在表面上捕获脂质体，允许澄清的缓冲液慢慢地流过并流入到第二个注射器中。这个动作被认为是通过涂层一次。在本实施例用作检测器的膜样品使用 2 次的涂层通过。第二次通过与第一次一样，将第二个 0.5 毫升(ml)部分的脂质体应用于已进行涂覆的膜上。将包含过滤后的缓冲液的第二注射器取下并将内容物抛弃。将不锈钢端盖旋松并取出 TEFLON O 形圈块。将湿膜取出并使其覆层侧向上置于载玻片上并置于 5℃冰箱中至少 3 小时。然后将样品在包含 $CaSO_4$ 的干燥器中干燥 30 分钟并暴露于 254 纳米(nm)的紫外线灯下 30-90 秒。

将涂覆 PDA 的底物(25 毫米(mm)圆形)切成四份。将四份样品的每个作为样品用于实验。将底物置于 24 孔微量滴定板的相隔的孔中。通过将 10 倍的 PBS 液体浓集物(购自 EMD Biosciences, San Diego, CA)稀释十倍制备磷酸盐缓冲盐溶液。这产生具有以下盐组成的 PBS 缓冲溶液：10 mM 磷酸钠、137 mM 氯化钠、2.7 mM 氯化钾。另外向 PBS 缓冲液中加入 0.2%(w/v) PLURONIC L64 表面活性剂(可购自 BASF Corporation, Mount Olive, NJ)产生 PBS L64 缓冲溶液。通过将 250μl 的

包含完整金黄色葡萄球菌细菌 ATCC 25923 的 PBS L64 缓冲溶液与 250μl 的抗体溶液混合制备完整的细菌样品溶液。抗体溶液包含在 PBS L64 缓冲溶液中的浓度为 100μg/ml 的兔抗金黄色葡萄球菌(目录编号 YVS6881, Accurate Chemical and Scientific Corp.)。使用在 PBS L64 缓冲溶液中包括 3 微克/毫升溶葡萄球菌素(目录编号 L-4402, Sigma-Aldrich)的溶胞缓冲液制备在 PBS L64 缓冲溶液中包含溶胞的金黄色葡萄球菌细菌 ATCC 25923 的样品。溶胞的细菌样品溶液包括与如上所述制备的 250μl 的抗体溶液混合的在 PBS-L64 中的 250μl 溶胞的金黄色葡萄球菌细菌 ATCC 25923。如以下表 3 中报告的，用于试样中的细菌浓度为 0 到 10^5 cfu/ml。使细菌和抗体溶液的混合物静置 5 分钟，然后加入到包含涂覆 PDA 的底物的 24 孔板中。还制备了对照样品用于比较。对照样品不含细菌，只包括与 250μl 的如上所述制备的抗体溶液混合的 250μl 的 PBS-L64 缓冲液。

使用数字照相机每 5 分钟照一张照片。使用得自 Adobe Systems Incorporated (San Jose, CA)的商业名称为 ADOBE PHOTOSHOP 5.0 版的软件扫描照片，以得到每个传感器的 RGB(红色、绿色、蓝色)通道值。如通过方程 $CR = ((PR_{最初}-PR_{样品})/IPR_{最初})$给出的，使用红色和蓝色通道值测定比色响应(CR)，其中 PR =样品的红色值%，其通过方程 $PR = R_{值}/(R_{值} + B_{值})*100$ 给出，其中 $R_{值}$和 $B_{值}$分别相应于聚二乙炔传感器的红色和蓝色通道的值。以下表 3 中的数据表示在 15 分钟测量的对照样品和包含细菌的样品(完整的或溶胞的样品)之间比色响应的差异。

表 3

比色响应的差异		
细菌浓度 (cfu/ml)	得自对照与完整细菌的比色响应差异(Δ红色分数)	得自对照与溶胞细菌的比色响应差异(Δ红色分数)
0	0	0
100	0.05	0.17
1,000	0.05	0.58
10,000	0.05	0.52
100,000	0.04	0.64

不脱离本发明的范围和精神实质的本发明的多种改变和变化对于本领域技术人员来说是显而易见的。应该理解，本发明不受本文提出的示例性实施方案和实施例的过度限制，并且这种实施例和实施方案只是作为例子存在，本发明的范围仅由权利要求限制。

专利名称(译)	增强细胞的细胞壁组分的信号检测的方法		
公开(公告)号	CN1914512A	公开(公告)日	2007-02-14
申请号	CN200480041218.6	申请日	2004-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	明尼苏达州采矿制造公司		
申请(专利权)人(译)	3M创新有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	3M创新有限公司		
[标]发明人	布林达B拉克希米 帕特里克A马赫 拉里G马丁		
发明人	布林达·B·拉克希米 帕特里克·A·马赫 拉里·G·马丁		
IPC分类号	G01N33/569 C12Q1/14 C12Q1/04 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	C12Q1/04 G01N33/5306 G01N33/5005		
代理人(译)	刘慧 杨青		
优先权	60/533171 2003-12-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及增强细胞壁组分的信号检测的方法，其中该方法涉及使细胞溶胞以形成细胞壁碎片并分析细胞壁碎片。

表 1.

ELISA 结果 (在 405 nm 的吸光度)		细菌浓度 cfu/ml					
一次抗体	溶液	10^8	$2x10^7$	$4x10^6$	$8x10^5$	$1.6x10^5$	缓冲液
兔-生物素	PBS-L64 缓冲液	2.730	1.107	0.376	0.192	0.192	0.267
兔-生物素	未溶胞的金黄色葡萄球菌	2.126	0.679	0.235	0.163	0.534	0.144
兔-生物素	溶胞的金黄色葡萄球菌	4.000	4.000	4.000	4.000	1.321	0.162
兔-生物素	溶胞的表皮葡萄球菌	0.300	N/A	N/A	N/A	N/A	0.134
鼠-生物素	PBS-L64 缓冲液	3.895	1.322	0.409	0.243	0.157	0.166
鼠-生物素	未溶胞的金黄色葡萄球菌	4.000	1.246	0.371	0.265	Na	0.136
鼠-生物素	溶胞的金黄色葡萄球菌	4.000	4.000	4.000	4.000	4.000	0.194
鼠-生物素	溶胞的表皮葡萄球菌	0.715	N/A	N/A	N/A	N/A	0.267