

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12Q 1/04 G01N 33/53

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00109639.7

[43]公开日 2002年1月9日

[11]公开号 CN 1330153A

[22]申请日 2000.6.19 [21]申请号 00109639.7

[71]申请人 苏荣仁

地址 100010 北京市朝内南小街南竹杆胡同 80 号
华智大厦 208 室

[72]发明人 伊庆燧

[74]专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄健

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 血液中的幽门螺杆菌抗原

[57]摘要

本发明涉及在被感染个体的血液中发现和检测幽门螺杆菌(*H. pylori*) 抗原。此幽门螺杆菌抗原是幽门螺杆菌细胞的组分,其包括但不限于 DNA, RNA, 核苷酸、蛋白和肽片段。幽门螺杆菌 DNA、RNA 及核苷酸片段抗原通过聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)或 DNA 杂交方法或其它扩增方法检测。幽门螺杆菌蛋白或肽或其它抗原组分可通过免疫检定或免疫印迹法用幽门螺杆菌抗体检测,该抗体优选是通过亲和柱纯化的抗体。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1、血液中的幽门螺杆菌抗原，其是通过聚合酶链反应，用一对特异性检测幽门螺杆菌的引物检测的。

2、权利要求 1 的幽门螺杆菌抗原，其中所述血液是血浆。

5 3、权利要求 1 的幽门螺杆菌抗原，其中所述引物对包括得自 ATTC 菌株 43504，43571，43629 和 49053 的幽门螺杆菌菌株的共有核苷酸序列。

4、血液中的幽门螺杆菌抗原，其是使用第一套和第二套特异性检测幽门螺杆菌的寡核苷酸通过连接酶链反应测定的，其中第一套中的寡核苷酸彼此是连续的，第二套与第一套互补，第二套寡核苷酸彼此是连续的。

10 5、权利要求 4 的幽门螺杆菌抗原，其中所述第一套和第二套寡核苷酸含有得自 ATTC 菌株 43504，43571，43629 和 49053 的幽门螺杆菌菌株的共有核苷酸序列。

6、权利要求 4 的幽门螺杆菌抗原，其中所述连接酶链反应是用 Pfu DNA 连接酶进行的。

15 7、血液中的幽门螺杆菌抗原，其是通过 DNA 杂交用幽门螺杆菌 DNA 探针检测的。

8、权利要求 7 的幽门螺杆菌抗原，其中所述血液包括全血、血清和血浆。

20 9、权利要求 7 的幽门螺杆菌抗原，其中所述 DNA 探针是用放射性同位素或荧光物质标记的。

10、权利要求 7 的幽门螺杆菌抗原，其中所述 DNA 杂交是在硝酸纤维素膜上制备的点状 DNA 杂交。

11、血液中的幽门螺杆菌抗原，其是通过幽门螺杆菌抗体检测的。

25 12、权利要求 11 的幽门螺杆菌抗原，其中所述的抗幽门螺杆菌抗原的抗体是亲和纯化的抗体，且其中所述检测方法是免疫检定法。

13、权利要求 12 的幽门螺杆菌抗原，其中所述免疫检定包括基础夹心检测、三联夹心检测或免疫色谱检测。

14、权利要求 11 的幽门螺杆菌抗原，其中所述血液是血清。

5 15、权利要求 11 所述的幽门螺杆菌抗原，其中所述幽门螺杆菌抗原是通过免疫印迹检测法检测的。

16、权利要求 11 的幽门螺杆菌抗原，其中所述血清进一步用解离试剂或在样本解离条件下处理。

17、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述解离试剂包括摩尔浓度至少为 1M 的氯化钠或氯化钾溶液。

10 18、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述解离试剂包括洗涤剂，其包括选自如下的至少一种物质：SDS、吐温 20、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐和 Triton X-100。

19、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述解离试剂包括有机溶剂，其包括选自如下的至少一种物质：二恶烷和乙二醇。

15 20、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述解离试剂包括一种离液剂，其选自盐酸胍、脲或硫氰酸钾。

21、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述解离试剂包括至少一种酶，该酶选自蛋白酶和脂酶。

20 22、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述样本解离条件包括将所述血清的 pH 调整至不小于 9 或不大于 3。

23、权利要求 16 的幽门螺杆菌抗原，其中所述样本解离条件包括将所述血清的温度调节至不低于 50℃。

24、诊断幽门螺杆菌感染的方法，包括检测权利要求 1 所述的血液中的幽门螺杆菌抗原。

25 25、诊断幽门螺杆菌感染的方法，包括检测权利要求 4 所述的血液中的幽门螺杆菌抗原。

26、诊断幽门螺杆菌感染的方法，包括检测权利要求 7 所述的血液中的幽门螺杆菌抗原。

27、诊断幽门螺杆菌感染的方法，包括检测权利要求 11 所述的血液中的幽门螺杆菌抗原。

说 明 书

血液中的幽门螺杆菌抗原

本发明涉及在血液(包括全血、血浆及血清)中对幽门螺杆菌(*H. pylori*)抗原及其抗原片段的发现。发现于血液中的幽门螺杆菌抗原包括但不限于幽门螺杆菌 DNA、RNA 或其片段、或者幽门螺杆菌蛋白/肽或其其它抗原组分。幽门螺杆菌 DNA 或其片段由聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、DNA 杂交、分支 DNA 信号放大检测或其它信号放大方法进行检测。其幽门螺杆菌 RNA 由 PCR、杂交或其它信号放大检测方法检测。幽门螺杆菌蛋白或肽或其其它抗原组分由免疫检测或免疫印迹实验用对幽门螺杆菌的亲合纯化抗体来检测。本发明还涉及通过检测血液中的幽门螺杆菌抗原来诊断幽门螺杆菌感染。

幽门螺杆菌(*H. pylori*)是革兰氏阴性细菌,其侵染胃粘膜并且是多数消化性溃疡病(PUD)的诱因。至今为止,溃疡及其它形式的消化不良被认为与应激反应水平或饮食习惯有关。最近,医学界已确认幽门螺杆菌是某些形式的胃疾病包括溃疡和胃癌的诱发剂。根除幽门螺杆菌促进了溃疡的愈合并大大降低了癌症和 PUD 的发病率。

幽门螺杆菌引起大部分胃和十二指肠溃疡以及消化性溃疡病(PUD)。幽门螺杆菌和 PUD 的联系最先由澳大利亚医生 Warren 和 Marshall 于 1984 年发现(Lancet I: 1311-1344)。现在,幽门螺杆菌感染被看作是胃炎的最常见病因,且从病因学角度讲,其与胃溃疡、十二指肠溃疡、胃腺癌和原发 B 细胞淋巴瘤有关。

现已证实，PUD 是可治愈的，且相当容易。多数 PUD 的病因是幽门螺杆菌感染。但是，幽门螺杆菌感染不能常规诊断，这可能是由于检测幽门螺杆菌的方法（即侵入性活组织检查）不能使医生特别是主治医师满意。因此，主治医师倾向于用抗分泌剂来治疗病发的患者。

医生需要一种简单、准确且廉价的诊断幽门螺杆菌感染的方法，以便使他们知道何时治疗病人以及何时将病人引见给胃肠病学家。但是，目前的幽门螺杆菌检测，可以归类为侵入性检查和非侵入性检查，它们都不能令人十分满意。

侵入性检查需要先使用内窥镜然后进行活组织检查。对由活组织检查方法获得的组织样本，再通过培养、组织学或快速尿素酶实验进行分析。

虽然对活组织检查样本的培养为幽门螺杆菌检验提供了最可靠的结果，但是在较好的实验室中报告的成功率仅在 70%至 80%之间 (Han, S.W. 等, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (1995), 14: 349-352)。对特殊染色的活组织检查样本的检查可以为急性或慢性炎性粘膜细胞和损伤提供直接的证据。但是，这需要内窥镜医生和病理医生的合作 (Genta, R. M. 等, *Hum. Pathol.* (1994), 25:221-226)。快速脲酶检验检测由幽门螺杆菌脲酶产生的氨引起的 pH 升高，该脲酶将脲分解为氨和二氧化碳。但是，其需要高密度的细菌，且降低该细菌量的任何事件都会造成假阴性结果 (Cutler, A. F, *Am. J. Med.* (1996), 100: 35S-39S)。

自 1990 年以来，已开发了一些非侵入性检验方法来检查幽门螺杆菌感染的存在。例如，尿素呼吸实验是基于此生物体的脲酶活性，该脲酶将用 ^{13}C 或 ^{14}C 标记的脲分解为非放射性 $^{13}\text{CO}_2$ 或放射性 $^{14}\text{CO}_2$ 。此脲呼吸实验被广泛推荐用来证实在治疗 4 周后对幽门螺杆菌的根除。

美国专利 5,716,791、5,871,942 和 5,932,430 公开了用多克隆抗体检测粪便样本中幽门螺杆菌抗原的免疫检测方法，其中多克隆抗体得自幽门

螺杆菌细胞(即 ATCC 株 43504)致敏的动物。此抗体通过 DEAE (二乙基氨基乙基纤维素)柱纯化。虽然此粪便抗原检验据报告是令人满意的,但是发现粪便样本的收集和处理是困难且令人不快的。很多患者不愿意给医生提供粪便样本,是由于令人不快的气味和缺乏方便的收集器具。

用 ELISA 对血清幽门螺杆菌抗体进行血清检验是另一种广泛使用的实验。最新技术的实例见美国专利 5262156 和 EP 0329570。已鉴定了几种主要的抗原并用于检查幽门螺杆菌抗体的免疫检测方法中。但是,这些检测方法不具血清诊断要求的特异性和灵敏性(Newell, D.G.等, Serodiam. Immunother. Infec. Dis., (1989), 3:1-6)。问题之一是由交叉反应造成的。这是由于幽门螺杆菌中的显性抗原(例如,分子量为 60Da 的假设的鞭毛蛋白)对幽门螺杆菌来说不是特异性的。一些这样的抗原发现于其它细菌如 *C. jejuni* 和 *C. coli*。在设计幽门螺杆菌免疫检测中遇到的第二个问题是株变异。在幽门螺杆菌的不同株中已观察到了抗原的实质不同。这些问题妨碍了用单一抗原设计检测方法。对幽门螺杆菌抗体检测的特异性和灵敏性已进行了改进,即使用得自不同幽门螺杆菌株的抗原混合物,该混合物富含某些抗原片段。一种检测血清中幽门螺杆菌抗体的 ELISA 试剂已市售。此检测使用细菌的全细胞裂解物作为抗原。

使用以抗原检测血清中幽门螺杆菌抗体存在的 ELISA 还有其它缺点。具体地讲,在感染已经治疗后的较长时间内(一些情况中长达 12 个月)人血清中此抗体滴度仍保持高水平。于是,用此 ELISA 得到的阳性结果并不一定说明该患者目前被感染并需要对幽门螺杆菌感染进行治疗。当面对阳性 ELISA 时,在开始抗生素治疗前,治疗医生常要求胃活组织检查以证实该细菌的存在。因此,基于抗原的 ELISA 不能排除对侵入性方法的需要。

因此,本发明的目的是设计对幽门螺杆菌感染的非侵入性的和高准确

度的诊断方法。在研究期间，发现了血液中的幽门螺杆菌抗原，它们是以 DNA 或其片段，或蛋白/肽或其其它抗原组分的形式存在于血液（包括全血、血浆和血清）中。因此，设计了检测这些幽门螺杆菌抗原的特殊方法，以提供幽门螺杆菌抗原片段存在于血液中的证据。这些方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)和 DNA 杂交，用得自幽门螺杆菌菌株的、对幽门螺杆菌具特异性的引物或寡核苷酸及/或 DNA 探针，来检测幽门螺杆菌的核酸片段。此外，还开发了免疫检测和免疫印迹实验，用针对幽门螺杆菌的亲合纯化抗体来检测幽门螺杆菌的蛋白/肽或任何抗原组分。

目前，尚没有关于血液中存在幽门螺杆菌抗原的报道。本发明第一个证明了幽门螺杆菌抗原不仅存在于血液中，并且还可以通过下面部分给出的方法检测。

本发明提供了存在于患者血液中的幽门螺杆菌抗原，并可以提供聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、DNA 杂交、RNA 杂交、分支 DNA 检测、免疫印迹及免疫检测方法进行检测。本发明还提供了通过检测血液中的幽门螺杆菌抗原来诊断幽门螺杆菌感染的方法。

本发明中使用的术语“抗原”广义地包括了在适当条件下能直接或间接引起特异性免疫反应且与该反应的产物反应（即与特异性抗体或特异性致敏的 T 淋巴细胞反应，或二者兼而有之）的任何物质。这些物质的实例包括但不限于蛋白/肽、多糖、脂类和多或寡核苷酸。

在血液中可以检测的幽门螺杆菌抗原具有特定的两种类型。第一类涉及多核苷酸或寡核苷酸，它们是幽门螺杆菌的染色体 DNA、RNA 或其片段。此类幽门螺杆菌可以通过聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)

及杂交（优选点状 DNA 杂交）方法或其它扩增方法检测。

本发明的 PCR 方法需要使用特异性检测幽门螺杆菌的一对引物。本文中术语“引物”指寡核苷酸，不论是天然的还是合成的，当置于引起与核苷酸链互补的引物产物合成的条件下，即适当温度下在四个不同核苷酸三磷酸盐和适当的酶存在下，其能作为核酸合成的引发点。本文中术语“寡核苷酸”定义为由两个或多个（优选三个以上）脱氧核糖核苷酸和/或核糖核苷酸组成的分子。其实际大小将依赖于多种因素，其依次依赖于该寡核苷酸的最终功能或用途。该寡核苷酸可以得自合成或克隆。

该引物的制备是根据在幽门螺杆菌菌株如 ATCC 株 43504、43571、43629 和 49053 的共有序列片段中发现的保守序列。优选的引物范围是长 15 至 25 碱基对(bps)，最优选的是约 20bps。当两种引物（正向引物和反向引物）长度相同并且同样的核苷酸组分基本相同时，可以获得较好的扩增。优选的用于 PCR 的血液样本是血浆。

本发明提供的 LCR 方法需要使用一种 DNA 连接酶和对幽门螺杆菌特异性的两套寡核苷酸。优选的 DNA 连接酶是 Pfu DNA 连接酶，其是从 *Pyrococcus furiosus* 中分离的热稳定 DNA 连接酶，并可以商购。LCR 用的两套寡核苷酸优选比 PCR 的引物长。如象 PCR 引物一样，LCR 寡核苷酸得自幽门螺杆菌菌株，如 ATCC 株 43504、43571、43629 和 49053 的共有序列片段中的保守序列。

LCR 的完成，是通过含靶序列的 DNA 模板的热变性的重复循环，以独特的方式将第一套针对靶 DNA 序列的两个相邻的寡核苷酸探针退火，而第二套互补寡核苷酸探针和与靶 DNA 序列相反的序列进行杂交。本文中术语“靶序列”指发现于血样中的“染色体 DNA 或其片段”。此后，DNA 连接酶可以共价连接每对相邻的探针，只要这两个相邻探针在连接上完全互补。

杂交方法需要制备幽门螺杆菌 DNA 探针。此幽门螺杆菌 DNA 探针通过从幽门螺杆菌核酸琼脂糖凝胶电泳后萃取物中切割并萃取 DNA 片段来制备。此探针一般具有至少约 25 个碱基，通常至少有约 30 个碱基，并可以多达约 10000 个碱基或更多，通常不超过约 5000 个碱基。然后，将此 DNA 片段用限制酶消化，并与宿主连接以形成重组质粒构建，其可以转染真核和原核宿主细胞。在这些宿主细胞中此 DNA 片段可以增殖并再分离。然后，可以将增殖后的 DNA 片段用放射性同位素(如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等等)标记或荧光物质标记(如用地高辛配基及生物素标记 DNA 探针与荧光检测方法结合)并用作 DNA 探针。

此杂交方法通过用变性试剂处理血液，优选是血清，的核酸样本，以使存在于固相载体如硝酸纤维素滤膜的 DNA 变性而进行。优选的变性试剂包括但不限于碱性溶液、有机试剂(例如，醇、酰胺、胺、脲、苯酚及亚砷)或某些无机离子(例如，硫氰酸根和高氯酸根)或通过升温来实现。然后，将标记的 DNA 探针加入到变性的 DNA 点状膜中。然后，检测该膜中存在的 DNA 杂交体的标记特性。如果该标记是放射性的，该膜可以用于 X-射线胶片，如果标记是荧光性的，该膜可以用荧光显微镜直接观察。

第二类抗原涉及血液中的幽门螺杆菌蛋白和/或肽，或含抗原表位的任何物质，其可以通过免疫印迹或免疫测定法来检测，优选使用抗幽门螺杆菌抗原的亲合纯化的抗体。一级或二级抗体都可能是检测或测定血液中幽门螺杆菌抗原所需要的，这依赖于检测中所用方法的种类。一级抗体是针对抗原(在该情况下是幽门螺杆菌抗原)产生的抗体。二级抗体是针对一级抗体的免疫球蛋白产生的种属抗体(如羊抗-兔 IgG)。优选用于检测的血样是血清。

免疫印迹法通过先用 SDS-PAGE 分析血样。电泳后，将蛋白质/肽带

转移至硝酸纤维素膜上，然后将其与足量的幽门螺杆菌抗体孵育。产生抗幽门螺杆菌的、针对动物种属的免疫球蛋白的一种酶标二级抗体可以加入到硝酸纤维素膜上。此方法优选的酶是碱性磷酸酶，其中该反应可以通过加入 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯检测。用于此方法中的另一个优选的酶标记物是辣根过氧化物酶，其可以通过加入 4-氯-1-萘酚或 3,3'-二氨基联苯胺以产生有色的、不溶的产物以便于观察检测。

免疫检定方法包括但不限于基础夹心检定(basic sandwich assay)、三联夹心检定(triple sandwich assay)和免疫色谱检定。

在基础夹心检定中，需要两个一级抗体，其中一个与固体载体结合而另一个用检测试剂标记。该三联夹心检定需要联合使用两个抗幽门螺杆菌的一级抗体(即，第一抗体和第二抗体)和一个抗动物种属 IgG 的二级抗体，此二级抗体用检测试剂标记。所述一级抗体中只有一个需要结合至固体载体上，该动物种属产生未结合的一级抗体，最终形成抗抗体-抗原-抗体复合物的复合物。

夹心检定的固体载体可以是塑料珠、聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯等。检测试剂可以是酶标记物(如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)、荧光或发光试剂(如荧光黄，罗明丹，或铀，鲁米诺或吡啶颜料(acridium))、放射性同位素标记(如 I^{125})，或者有色颗粒(如金、银、蓝色乳液或硒)。

基础夹心和三联夹心免疫检定都需要第一个一级抗体与幽门螺杆菌的相互作用以形成抗原-抗体复合物，然后用第二个抗幽门螺杆菌的抗体与此抗原-抗体复合物接触。

此免疫色谱实验也需要联合使用两个抗幽门螺杆菌的一级抗体。与基础和三联夹心检定相比，第一个抗体(即第一个与生物样本接触的抗体)用有色颗粒标记，第二个抗体结合固体载体如硝酸纤维素(硝酸纤维素衍生物)膜、尼龙膜、聚酯膜、过滤纸、琼脂糖或交联葡萄糖凝胶。用于此

免疫色谱检定的优选的固体载体是硝酸纤维素膜。选择性地，在样本加入点反方向的色谱带的末端附近，可将产生第一抗体的抗动物种属的二级抗体加入和/或结合至此固体载体上。此二级抗体用作在色谱进行的末端捕获未结合的有色颗粒作为对照。因此，如果此样本不含有幽门螺杆菌抗原，有色颗粒标记的第一种抗体将走过第二种抗体而不结合，因为没有抗体-抗原-抗体复合物形成。但是，因为二级抗体是抗产生第一种抗体的动物的 IgG 的，当第一抗体走过时其将结合该第一种抗体，不论此第一种抗体是否已与样本形成复合物。第一种抗体和二级抗体的结合表明色谱进行到了终点。

与血清样本有关的问题之一是感染幽门螺杆菌的患者经常在血清中带有其自身的幽门螺杆菌抗体。这些血清幽门螺杆菌抗体可以与血清幽门螺杆菌抗原形成免疫复合物，这会对本发明的免疫检定的准确性造成影响。解离此幽门螺杆菌免疫复合物的方法，包括但不限于，用解离试剂解离此复合物，或在样本解离条件下进行检定。

该解离试剂的实例，包括但不限于，高浓度盐（例如，至少 1M 的氯化钠或氯化钾）、洗涤剂（如，至少 1% 的十二烷基苯磺酸钠(SDS)、吐温 20、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐或 Triton X-100）、离液剂（例如，盐酸胍、脲或 KSCN）、有机溶剂（例如，二恶烷或乙二醇）、酶（例如，蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、胃蛋白酶，V8 蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶）或脂酶（例如，得自牛奶的脂蛋白脂酶，及得自皱褶假丝酵母的脂酶）。样本解离条件的实例包括但不限于高 pH（例如， $\text{pH} \geq 9$ ）或低 pH（例如， $\text{pH} \leq 3$ ），以及/或升高温度（例如，至少 50°C ）。

虽然已报告了一些尝试，它们为感染幽门螺杆菌的患者提供了定量及

定性的检测，但是没有一个是直接检测血样中的幽门螺杆菌。其主要原因是还没有研究人员假定幽门螺杆菌抗原可以发现于血流中。

但是，在表（即，表 1-3）中，如后面的实施例 9（表 1）及 11（表 2 和 3）所示的种种证据将表明在幽门螺杆菌感染患者的血清样本中可以并已经发现了幽门螺杆菌抗原。

基于这些发现，本发明的目的是利用血液中可检测的幽门螺杆菌抗原作为诊断幽门螺杆菌感染的工具。该诊断方法可以用来检测不同类型的幽门螺杆菌抗原，其包括但不限于聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、分支 DNA 扩增检定、杂交检定、免疫印迹、免疫沉淀、流式细胞计量术、免疫电泳及免疫检定（例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)及免疫色谱）。

PCR 是高效率扩增特定 DNA 序列的技术。用聚合酶，例如热稳定酶 Taq 聚合酶变性的重复、引物退火和延伸，导致所需 DNA 序列的指数级增加。每种 DNA 序列可以用琼脂糖凝胶电泳分离，并接着进行核苷酸测序。PCR 用血样优选的类型是血浆，这是因为如果发生溶血，得自红细胞血红蛋白的血红素分子可能干扰 PCR 扩增。

连接酶链反应(LCR)是一种 DNA 扩增技术，其可以用于检测已知核苷酸序列的痕量水平。LCR 包括循环的两步反应：(1) 高温解链步骤，其中双链靶 DNA 解链变为单链，及(2) 冷却步骤，其中两套相邻的、互补寡核苷酸退火为单链靶分子并与 DNA 连接酶连接在一起。从第一个循环中连接的产物作为下一循环的连接反应的模板，LCR 导致连接产物的指数级扩增，其方式类似于 PCR 反应中模板的指数级扩增。

PCR 和 LCR 都需要发现幽门螺杆菌特异性引物或寡核苷酸以引发此核苷酸链反应。因为在基因水平幽门螺杆菌菌株是高度多样性的(Fujimoto 等, *J. Clin. Microbiol.*, (1994), 32: 331-334)，而个体可以被一种以上菌

株感染，因此，根据在多种幽门螺杆菌菌株中发现的共有序列片段的保守序列设计引物或寡核苷酸，这是一种解决问题的手段。

已发现得自 ATCC 菌株 43504 的幽门螺杆菌细胞特别有利于制备抗粪便中幽门螺杆菌的一级抗体(见美国专利 5716791)。这是因为用得自菌株 43504 的细胞致敏产生的抗体可以跨地域和跨饮食组检测此生物体。其它幽门螺杆菌菌株，如 ATCC43571、43629、49053 已显示了相似的抗原性。因此，在这些菌株中寻找共有序列的片段是有价值的。这可以如下进行：通过用相同的限制酶(一种或多种)将得自上述幽门螺杆菌菌株的提取核酸消化，接着将消化了的幽门螺杆菌核酸片段进行琼脂糖凝胶电泳。此共有序列片段可以切除并提取。可以分析共有序列片段的核苷酸序列。然后，可将此共有序列片段的保守序列用于设计 PCR 或 LCR 用引物或寡核苷酸。

除了 PCR 或 LCR，可以用核酸杂交探针检测血样中幽门螺杆菌抗原的存在。优选核酸杂交探针不超过约 5000 个碱基。此探针序列优选至少基本上与幽门螺杆菌菌株间的共有序列片段的核苷酸序列互补。除了在多种幽门螺杆菌菌株中发现的共有序列片段外，该探针可以得自信使 RNA、cDNA，后者通过用逆转录酶将信使 RNA 逆转录或通过基因组裂解获得。对所需探针进行分离和定性后，探针的 DNA 片段可以在宿主细胞中克隆或增殖。然后，此增殖的探针可以用原子或无机基团标记，此标记最常用放射性核素，但是也可以用重金属或荧光物质。使用可以特异性结合与幽门螺杆菌抗原的单链 DNA 杂交的探针的抗体，是可行的。在此实例中，该抗体被标记以便检测。用于探针的同样类型的标记物也可以按照已知技术与此抗体结合。

放射性标记物如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等可以用于标记探针，虽然其它放射性标记物也可以使用，只要它们能提供具有足够半衰期的适宜的信号。其它

标记物包括配体，其可以作为标记抗体荧光剂的特异结合单元、化学发光剂、酶、可以作为标记配体特异结合对的抗体等。在免疫检定中也可以使用多种标记物。标记物的选择是由标记物对杂交的速率及探针结合样本 DNA 的影响决定的。需要该探针为检测 DNA 杂交用量提供足够的灵敏性。其它考虑包括探针的易于合成、易于机械操作、能自动化、方便等。

该标记物结合探针的方式随该标记物的本质而变化。对于放射性标记物，可以使用多种技术。常用的是用 α - ^{32}P -dNTP 进行切口平移，或用碱性磷酸酶进行末端磷酸水解，接着使用 γ - ^{32}P -NTP 和 T4 多核苷酸激酶进行放射性 ^{32}P 标记。或者，可以合成核苷酸，其中存在的一个或多个元素被放射性同位素替换，例如，用氘代替氢。

作为标记物的有利的酶包括水解酶，特别是酯酶和糖苷酶或氧化还原酶，特别是过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素及其衍生物、罗丹胺及其衍生物、丹酰、7-羟基香豆素等。化学发光剂包括萤火虫素及 2,3-二氢酞嗪二酮类，例如，鲁米诺。

该杂交一般使用附于水不溶性多孔载体的针对 DNA 样本的探针进行。此 DNA 样本被变性以使单链核酸被固定。对于裂解来说，化学裂解是便于使用的，通常用稀碱溶液，例如，0.1 至 1M 的氢氧化钠。该碱还可以用来使 DNA 变性。其它变性试剂包括但不限于有机溶剂如醇、酰胺、胺、脲酶、苯酚和亚砷，或某些无机离子如硫氰酸根及高氯酸根，还可以通过升高温度实现。

也可以通过免疫方法用抗幽门螺杆菌的亲合纯化抗体检测血液幽门螺杆菌，该方法包括但不限于免疫印迹法及免疫检定（如基础夹心免疫检定、三联夹心免疫检定及免疫色谱）。

免疫印迹法需经过聚丙烯酰胺凝胶电泳将血样分级分离，然后将分离后的蛋白/肽带转移至硝酸纤维素膜上，再将分离的蛋白/肽带与抗幽门螺

杆菌一级抗体作用以形成抗原-抗体复合物。然后，加入用检测试剂标记的抗一级抗体的二级抗体以显示该检测反应。

基础和三联夹心免疫检定都需要至少三个要素：抗幽门螺杆菌抗原的第一种抗体，抗幽门螺杆菌抗原的第二种抗体及检测样品（即，血样）。

第一和第二种抗体（即抗幽门螺杆菌抗原的）优选是多克隆抗体。此抗体可以通过给兔或其它动物如山羊或母牛注射幽门螺杆菌细胞获得，优选这些细胞通过超声处理破裂，或通过其它细胞破裂手段破裂，以便暴露多个抗原位点。

总之，通过先注射，接着加强注射以使该反应最大化来制备抗体。为了制备这些抗体，将抗原与辅剂例如弗氏佐剂混合以免疫动物从而加强此免疫反应。所注射抗原的量必须适于产生足量的可检测抗体。多次注射可以以规律的周期进行以使抗体的产生最佳。注射方案取决于所用动物。给动物放血，先通过检测该血液抗体的产生量。用试验性放血和酶免疫测定(EIA)检测抗体的产生。通过色谱，优选亲和柱色谱将抗体纯化。

在基础夹心检定中，如果第一种抗体结合固体载体，第二种抗体必须用检测试剂标记，其可以是已知的免疫检测法中的任何标记物。例如，酶标记物（如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶等）、荧光剂、发光试剂或放射性标记物（如荧光黄，罗明丹，钒，鲁米诺或吡啶染料和放射性同位素如 I^{125} 等），或者胶体颗粒(如金和硒等)是可以用于此免疫检定的标记物。在这些标记物中，最常用的是酶标记物如辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶。具体地讲，通过 HRP 与二氨基联苯胺、四甲基联苯胺、4-氯-1-萘酚反应，或通过其它类似的化学反应，在比色测定中可以检测 HRP 标记物。此比色测定反应产物可以在板式读数器、扫描仪、光密度计中检测或目测。通过比较样本读数和含已知量抗原的标准物的读数，可以测定幽门螺杆菌的量。优选几个标准物用于“含盖”被测样本中的标记物的浓度。

放射性同位素如 ^{125}I 碘或 β -发射体如 ^{14}C 碳是另一类常用标记物，其可以通过 γ 计数器或闪烁计数器检测。荧光标记物也可以用于标记抗体，以便通过荧光分析测定。

固体载体可以是已知用于免疫检定的任何固体载体。其可以是如 ELISA 中用的多孔板，其可以在板式读数器中读取数据。或者，它可以是能对液体或溶解于固定相中的样本进行色谱分析的一种载体。这种载体的实例包括膜如硝酸纤维素或柱色谱的介质。

下列非限制性实施例用来说明对血液中幽门螺杆菌抗原的检测。

实施例 1

制备幽门螺杆菌抗原和核酸

室温下将 ATCC 菌株 43504、43571、43629 和 49053 的幽门螺杆菌菌种保存物分别解冻并在 5ml 布鲁氏杆菌肉汤中稀释。立即将该稀释后的细菌悬浮液 0.2ml 涂布于 trypticase 大豆血液琼脂盘上，其中加有 5% 羊血。这些琼脂盘在微需氧条件下培养让细菌生长。培养后，将菌落从盘上刮下并用 PBS 洗涤两次。然后，将洗涤后的沉淀悬浮于 PBS 中。

为了从每个幽门螺杆菌菌株中收集抗原，将幽门螺杆菌细胞转移至冰冷的容器中并用 Microson XL200 超声波细胞破裂机进行 10 分钟的超声波处理。然后，在 2-8℃ 将经超声波处理的细菌悬浮液以 25000 × g 离心 30 分钟，保留上清液作为制备幽门螺杆菌抗体的免疫原。

为了从幽门螺杆菌菌株中收集核酸，可以用存在于 100mM Tris-HCl(pH8.8) 的 1% SDS 将幽门螺杆菌细胞裂解。然后，可以用等体积的苯酚/氯仿将此裂解液提取一次，随后用等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1) 提取两次。用氯仿-苯酚提取后，可以用 0.6 体积的异丙醇室温下沉淀染色

体 DNA。以 $13000 \times g$ 离心 15 分钟，用 70%乙醇洗涤此核酸沉淀，并将其溶解于 10mM Tris-HCl 和 1mM EDTA, pH8.0 中。

实施例 2

用 PCR 扩增技术检测血液中的幽门螺杆菌

用限制酶可将得自幽门螺杆菌菌株的 DNA 消化。适宜的限制酶包括但不限于 HindIII, EcoRI, BamHI, ClaI 和 XbaI。在琼脂糖凝胶上所得片段可在 Tris-乙酸-EDTA 缓冲液中走电泳。用一种购自 Boehringer Mannheim(德国)的琼脂糖凝胶提取试剂盒从该琼脂糖凝胶中提取 DNA 片段。因为幽门螺杆菌菌株在基因水平是高度多样性的，故比较每个幽门螺杆菌菌株的 DNA 片段以找到共有序列片段是有利的。

用双链 DNA 模板和二脱氧链终止方法(如 Sanger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977), 71: 1342-1346 所述)可以在两个链上确定共有序列片段的 DNA 序列。基于此共有序列片段的保守序列，可以通过下列制造商提供的方案用 DNA 合成仪合成寡核苷酸引物。用于 PCR 的引物通常长度为约 20bp 并优选 15-25bp。当两个引物长度相同并具有基本相同的核苷酸组成时，可以获得较好的扩增。优选只与此抗原的核酸特异性杂交的 PCR 引物，因为扩增的存在指示了幽门螺杆菌特异性核苷酸序列的存在。

用常规方法和实验的常规用量，依据获得典型核酸的方法，本领域技术人员可获得 DNA 编码的抗原片段。

PCR 扩增在含血浆 DNA 提取物为模板、幽门螺杆菌引物、Dynazyme 缓冲液(可购自 Finnzymes, Espoo, Finland)、所有四种脱氧核苷酸的混合物及 Dynazyme 的反应混合物中进行。血浆 DNA 的提取与提取幽门螺杆菌核酸的方式相同，不同的是在最后增加了让该提取物通过 Microcon 100 过滤器的步骤。此最后步骤是为了除去残留的非生物抑制性物质及多糖复

合物，已发现它们是有力的 PCR 抑制剂，并使 DNA 无法沉淀。

可以用矿物油将此反应覆盖并在开始 PCR 循环前在 Perkin-Elmer DNA 热循环仪(Norwalk,CT,USA)中加热至 94℃并保持 10 分钟。开始的 5 个循环参数可以为：在 94℃变性 2 分钟，在 42℃退火 1 分钟并在 72℃延伸 1 分钟。随后可以用下列参数进行 30 个循环的 PCR：在 94℃变性 2 分钟，在 59℃退火 1 分钟并在 72℃延伸 1 分钟。在最后一个循环，延伸可以进行 10 分钟。可以在 4℃下停止 PCR 反应，并在琼脂糖凝胶上对 PCR 产物进行分析。可以估计 PCR 产物的大小并与在幽门螺杆菌中发现的共有序列片段比较。

其大小等于共有序列片段的大小被视为阳性结果。可以通过 Southern 印迹杂交法用 ^{32}P CTP 标记的 DNA 探针(已由此共有序列片段扩增)证实该 PCR 产物是幽门螺杆菌序列。

或者，可以用限制酶如 AluI, HinFI 和 HaeIII 消化此 PCR 产物及共有序列片段，并通过琼脂糖凝胶电泳分析此消化物的消化图谱。相同的图谱指示该 PCR 产物得自幽门螺杆菌序列。

实施例 3

用 LCR 扩增检测血液中的幽门螺杆菌 DNA

连接酶链反应(LCR)检定需要两套的两个寡核苷酸和一个 DNA 连接酶。第一套寡核苷酸(即 Oligo A 和 Oligo B)是彼此连续的并与靶 DNA 双螺旋的一个链互补。第二套寡核苷酸(即 Oligo C 和 Oligo D)与第一套是互补的，并因此占据了靶 DNA 的第二个链上的邻近位点。所有四个寡核苷酸探针可以按照幽门螺杆菌菌株的保守序列设计并在 Applied Biosystems(Foster City, CA)寡核苷酸合成仪中合成并通过 PAGE 纯化。Oligo A 和 Oligo D 可以通过在 37℃下在腺苷 5'(γ - ^{32}P)三磷酸和多核苷酸激

酶的存在下，在 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、7mM 氯化镁和 1mM 二硫苏糖醇中孵育 30 分钟，在其 5'末端进行放射标记。然后，通过在 70℃下加热使该多核苷酸激酶失活。等量的放射标记的寡核苷酸探针 A 和 D，以及寡核苷酸探针 B 和 C 可以加入到一个 Eppendorf 管中，同时加入从血清样本中提取的 DNA 模板。每个管含有一种反应缓冲液，该缓冲液由 50mM 双-Tris pH 6.5，10mM 氯化镁，10mM 氯化铵，10mM 氯化钾，1mM 二硫苏糖醇和 1mM NAD 组成。然后，可以向每个管中加入适量的矿物油，并将这些管加热至 100℃并保持 3 分钟，随后冷却至 85℃并保持 1 分钟，并在 55℃下放置，同时加入 DNA 连接酶。优选的 DNA 连接酶是 Pfu DNA 连接酶，其得自 *Pyrococcus furiosus*。然后将这些反应管置于 DNA 热循环仪(RoboCycler, Stratagene)中并在 85℃和 50℃循环 20、30 或 40 次，每个温度 1 分钟。然后，用 95%甲酰胺终止染料将每个反应的一个等分进行 1:1 的稀释。此稀释后的样本可以在丙烯酰胺凝胶上进行分析。

实施例 4

制备幽门螺杆菌 DNA 探针

可以切掉幽门螺杆菌菌株 DNA 片段（一般至少 25 个碱基，通常至少约 30 个碱基，并可以多达约 10000 个碱基或以上，但是常常不超过约 5000 个碱基），并在电泳后从琼脂糖凝胶中提取。可以用限制酶将此 DNA 片段消化并与宿主连接以形成重组质粒构建。例如，可以用 ClaI 将此 DNA 片段消化并连接进入 ClaI 消化的 Pev-Vrf 表达宿主(Crowl 等, *Gene* (1985), 38: 31-38)。然后，可以将此重组的质粒转移至宿主细胞中，其可以是原核细胞如 *E. coli* RRI，或真核细胞如 NIH 3T3 细胞或 HeLa 细胞。此重组的质粒可以通过在此宿主细胞中复制而增殖。可以按照 So 等, *Infect. Immun.* (1978), 21: 405-411 的方法分离此重组质粒。通过用相同的

限制酶消化可以从此质粒中释放幽门螺杆菌的 DNA 片段。可以通过琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺电泳证实此释放的幽门螺杆菌 DNA 片段。然后，可以用放射性同位素(如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等)或荧光物质(如使用地高辛基和生物素标记的 DNA 探针并结合荧光检测方法)标记此增殖后的 DNA 片段并用作 DNA 探针。

实施例 5

用幽门螺杆菌 DNA 探针的点杂交制备

在水中煮沸或高压消毒可以将硝酸纤维素膜灭菌。将一个单个的灭菌膜置于琼脂的表面并用已被处理释放其 DNA 的血清点滴。例如，可以用稀碱水溶液(例如 0.1 至 1M 氢氧化钠)将此血清样本裂解。该碱还可以用来使 DNA 变性。其它的变性操作包括但不限于升高温度、使用有机溶剂(如醇、酰胺、胺、脲、苯酚和亚砷)或某种无机离子(如硫氰酸根和高氯酸根)。

将此样本变性后，在缓冲水溶液(pH 一般为约 6 至 8，通常为 7)中可以洗涤此滤膜。经裂解、变性并洗涤后，可以将此样本 DNA 点滴滤膜在升高的温度下干燥，一般为约 50 至 70°C，以将样本 DNA 固定在此滤膜上。

然后，在温和的升温下将此滤膜与不含探针的杂交溶液孵育足够的时间以将彻底润湿此滤膜。可以使用多种杂交溶液，其中含约 20%至 60%，优选 3%至 6% 体积百分比的惰性极性有机溶剂。一种普通的杂交溶液使用约 50%甲酰胺、约 0.5 至 1M 氯化钠、约 0.05 至 0.1N 枸橼酸钠、约 0.05 至 0.2%十二烷基硫酸钠(SDS)和少量的 EDTA、菲可(约 300-500 kdal)、聚乙烯吡咯烷酮(约 250-500 kdal)和血清白蛋白。在此杂交溶液中还可以含有约 0.5 至 5mg/ml 的超声变性的 DNA(例如，胎牛胸腺或鲑鱼精液)，及选

择性存在的约 0.5 至 2% 重量/体积(wt/vol)的甘氨酸。还可以含有其它添加剂，例如约 100 至 1000kdal 的硫酸葡聚糖和约 8 至 15wt%的杂交溶液。

标记 DNA 探针的量变化很大，这依赖于标记物的特性及其是否可以有效地与滤膜结合，以及该杂交的严格条件。总之，应使用化学计量基本上过量的探针以提高该探针与固定样本 DNA 的结合速度。

室温下，用含与杂交溶液类似浓度的氯化钠、枸橼酸钠和 SDS 的第二溶液清洗该滤膜后，现在可以按照标记物的本质检测此滤膜存在的双螺旋。当该标记物是放射性的时，将此滤膜干燥并用其使 X 射线底片曝光。如果此标记物是荧光物质，则可以直接用荧光显微镜观察。

此探针不需要与其杂交的序列完全互补；其中可以存在 30%或更多的错配碱基对。影响 DNA 杂交体形成的条件是熟知的并由 Croso 等, J. Bact. (1973), 115 (3): 904-911 详述。

实施例 6

制备抗幽门螺杆菌的兔多克隆抗体

新西兰白兔，先用存在于完全弗氏佐剂中的 0.5 至 1.0mg 的幽门螺杆菌抗原，通过肌肉注射进行免疫，再每隔 4 周用存在于不完全弗氏佐剂中的 0.5-1.0mg 相同抗原进行加强免疫。在第 3 次加强免疫后采集血样进行分析。一旦该抗体滴度到达了约 10^6 的所需水平，便开始放血。

将个体的血液先在 PBS 中稀释至 1×10^6 。然后将 100 μ l 的稀释后兔血清加入到幽门螺杆菌抗原包被孔中。室温下孵育 1 小时后，用 PBS 将此板洗涤 4 次并加入 100 μ l 山羊抗兔 IgG-HRP 结合物。将此板在室温下再孵育 30 分钟。用 PBS 洗涤 4 次后，向每个孔中加入 100 μ l 四甲基联苯胺(TMB)底物以染色，并在 450/650 nm 用微孔读数器检测每个孔中的颜色强度。OD 450/650 必须大于 1.0 才能用于抗体的制备。

实施例 7

制备抗体-HRP 酶结合物

选择酶辣根过氧化物酶(HRP)来与抗幽门螺杆菌抗体偶联。此抗体-HRP 酶结合物的制备是根据改良的 Nakane 方法(Nakane 等, 1978: In immunoflorescence and related staining techniques, Knapp 等编辑, p215-220, Elsvier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam)。

简言之,先用高碘酸钠对 HRP 进行氧化处理。此氧化在碳水化合物侧链上产生醛基。该抗体和氧化后的 HRP 再在碱性 pH 下混合,让该抗体上的氨基与 HRP 上的醛基反应,形成 Schieff 碱,并将抗体和 HRP 之间还原为共价键。然后,通过用 Sephacryl-S300 柱进行凝胶过滤纯化抗体-HRP 结合物。

此 HRP 可以与一级抗体如抗幽门螺杆菌的兔抗体,或与二级抗体如抗兔 IgG 的山羊抗体结合。

实施例 8

凝胶电泳和免疫印迹分析

血清样本可以通过 SDS-PAGE 进行分析。电泳后,可以通过改良的银染色方法(Oakley 等, Anal. Biochem. (1980), 105: 361-363)固定凝胶并分离蛋白。

或者,蛋白质可再通过 1amp 电印迹 1 小时转移至硝酸纤维素纸上。用封闭剂如吐温 20 和脱脂牛奶将未占据的结合位点封闭后,向此硝酸纤维素纸中加入足量的实施例 6(见上)所述的幽门螺杆菌抗体。然后,可将此硝酸纤维素纸在室温下孵育 1 小时。最后,可向此硝酸纤维素纸中加入抗产生幽门螺杆菌抗体的动物种属免疫球蛋白的二级抗体(如山羊抗兔 IgG)的碱性磷酸酶结合物。此反应可以通过加入 5-溴-4-氯-3-异丁基磷酸

(BCIP)/氮蓝四唑(NBT)检测。

实施例 9

制备游离形式的血清幽门螺杆菌抗原

血清幽门螺杆菌抗原可以游离形式及免疫复合物的形式存在。幽门螺杆菌的游离形式可以通过免疫检定或任何可以检测方法容易地检测。对于那些与血清中幽门螺杆菌抗体形成免疫复合物的抗原，它们只能在从此免疫复合物中解离后检测。

血清幽门螺杆菌抗原可以游离形式及免疫复合物的形式存在，且幽门螺杆菌的游离形式可以通过本发明的 ELISA 容易地检测，但免疫复合物不能容易地通过相同的方法检测，这个事实示于表 1。

表 1 是血清幽门螺杆菌掺加研究。被测样本都不含有幽门螺杆菌抗原。尽管血清中不存在幽门螺杆菌，但是血清样本中可能含有幽门螺杆菌抗体（即“抗体阳性样本”），这可能是由于原来的感染造成的，其与不含任何幽门螺杆菌抗体的样本（即“抗体阴性样本”）相反。在掺加组中，将已知量的幽门螺杆菌抗原(1×10^5 细菌/ml)，不论是全细菌细胞或细胞裂解液，加入到“抗体阴性”及“抗体阳性”血清样本中。在“非掺加”组中，不加入幽门螺杆菌抗原。

表 1 的结果表明在“抗体阴性”样本中，由 $OD_{450/650}$ 读数的增加反映出了幽门螺杆菌抗原的加入。相反，在“抗体阳性”样本中加入幽门螺杆菌抗原不会将 $OD_{450/650}$ 读数增加到与“抗体阴性”样本中相同的水平。一个可能的解释是加入的幽门螺杆菌抗原与血清幽门螺杆菌抗体形成了免疫复合物，其干扰 ELISA 检测。

为了将血清幽门螺杆菌抗原的免疫复合物解离，可以用解离试剂或在样本的解离条件下处理该血清样本。有四种主要的解离试剂，其对解离这

些免疫复合物很有效。第一种解离试剂是氯化钠或氯化钾的高盐溶液。优选高盐溶液的浓度至少是 1M。优选的盐是氯化钾。第二种解离试剂是含洗涤剂如 SDS、吐温 20、辛基葡糖苷、脱氧胆酸盐或 Triton X-100 的溶液。这些洗涤剂可以单独或联合使用。此洗涤剂优选的浓度大于 1%。第三种解离试剂是含离液剂如盐酸胍、脲和硫氰酸钾(KSCN)的溶液。这些离液剂的浓度可以大于 2M。第四种解离试剂是含有机溶剂如 10%二恶烷和 40%乙二醇的溶液。

或者，该血清样本可以在样本解离的条件下处理，此条件可以是高或低 pH，或者升高的温度。优选的高 pH 是 9 或更高。优选的低 pH 是 3 或更低。优选的高温是至少 50℃。

表 1. 血清幽门螺杆菌抗原掺加研究

	1×10^5 细菌/ml	不掺加
样本	OD _{450/650}	OD _{450/650}
缓冲液	3.866	0.077
Ab 阴性样本 1	3.973	0.096
Ab 阳性样本 1	0.336	0.120
Ab 阳性样本 2	0.390	0.082

实施例 10

兔抗幽门螺杆菌抗体的亲和纯化

A. 制备亲和柱

将 1 至 5 克的幽门螺杆菌细胞糊悬浮于 12.5ml PBS 缓冲液(0.1M 磷酸钠、0.15M 氯化钠，pH7.2)，其中含有辛基葡糖苷，并在室温下搅拌 30 分钟。然后将此悬液在冰浴中以最大的输出功率超声波处理 10 分钟，每分钟的超声波处理有 1 分钟的时间间隔。超声处理后，以 25000g 离心 30

分钟除去不溶物。保留上清液并用 PBS 将蛋白浓度调节为 1-3mg/ml。将在 PBS 中预平衡的氨基连接臂偶联凝胶(由 Pierce 制备)以 1-10mg 蛋白每 ml 填充凝胶的比例加入到该上清液中, 然后每毫升填充凝胶中加入存在于水中的 10-40 μ l 的 5M 硼氢化钠。再将此反应浆在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜(至少 6 小时), 同时轻轻混合。孵育后, 将此凝胶浆倒入适当大小的色谱柱中并排出过量的液体。然后, 用两个柱体积的偶联缓冲液洗脱此柱, 随后用两个柱体积的 1M Tris HCl, pH7.4 洗脱。将洗脱后的凝胶再悬浮于 1 个柱体积的 1M Tris HCl, pH7.4。再悬浮后, 每毫升填充凝胶加入 10-40 μ l 的 5M 硼氢化钠。室温下孵育所得悬浮液 1 小时, 同时温和地搅拌。然后排掉柱中的水, 用 PBS 大量洗涤以除去柱中任何未结合的抗原。

B. 通过亲和柱纯化抗体

为了纯化兔抗体, 向等体积的兔血清中缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 以沉淀幽门螺杆菌抗体。室温下搅拌 30 分钟后, 离心 30 分钟收集沉淀, 在 PBS 中再溶解并用 100 倍过量的 PBS 透析。透析后, 通过 0.2 μ m 过滤器将此溶液过滤, 并加样到此亲和柱上。加样后, 用 PBS 充分洗涤此柱直到洗脱液到达基线。此柱中的抗幽门螺杆菌特异性抗体用 3M KSCN 水溶液洗脱。收集含免疫球蛋白的馏份并用 PBS 透析, 最少换两次透析液以除去过量的 KSCN。然后, 将纯化的抗体浓缩至约 1.0-2.0mg/ml 并在 -20 $^{\circ}$ C 下保存。

实施例 11

血清抗原 ELISA 试验

用标准方法将血清从全血中分离。按照实施例 1 收集游离的血清样本。在 20 μ g/ml 和 1.0 μ g/ml 之间将亲和纯化的抗体在磷酸缓冲液中作系列稀释。将每个稀释液的 0.1ml 等份加入到 Costar Strip Plate 中, 覆盖并在

室温下孵育过夜。将此板用 PBS 洗涤一次并在室温下用存在于 PBS 中的 1%BSA 封闭 4 小时。除去 BSA 溶液后，向此抗体包被的微孔条板中加入 0.1ml 游离形式的血清样本，覆盖并室温下孵育 2 小时。然后，用 PBS/吐温洗涤液将此板洗涤 5 次。接着，向每个微孔中加入 0.1ml 与辣根过氧化物酶结合的兔抗幽门螺杆菌抗体，覆盖并在室温下孵育 1 小时。用 PBS/吐温洗涤液再将此板洗涤 5 次并在室温下与 0.1ml 四甲基联苯胺孵育 10 分钟。在 450nm 测定颜色的变化。用 0.1ml 1N 硫酸停止此反应。将获得最大光密度和最低本底的稀释液选为最佳稀释液。

表 2 和 3 代表了在不同的时间用不同患者血清样本进行的两个试验。这些试验表明了血清 ELISA 检测幽门螺杆菌的结果。第一个试验(表 2)包括 5 个对象。第二个试验(表 3)包括 3 个对象。结果以 $OD_{450/650}$ 表示。幽门螺杆菌的存在和定量可以在 450nm 波长下检测 (650nm 表示检测本底 [即该板] 的波长)。 $OD_{450/650}$ 表示了 OD_{450} 的读数减去在 OD_{650} 的读数。 $OD_{450/650} \leq 0.1$ 的样本表示阴性结果 (即，没有幽门螺杆菌感染)。

表 2. 血清 ELISA 试验(试验 1)

	$OD_{450/650}$	结果
Pos 样本#1	0.712	阳性
Pos 样本#2	0.487	阳性
Pos 样本#3	0.187	阳性
Neg 样本#4	0.076	阴性
Neg 样本#5	0.048	阴性

表 3. 血清 ELISA 试验(试验 2)

	$OD_{450/650}$	结果
Pos 样本#6	0.311	阳性
Pos 样本#7	3.846	阳性
Neg 样本#8	0.083	阴性
缓冲液	0.097	阴性

实施例 12

用亲和纯化及 DEAE 纯化的幽门螺杆菌抗体在免疫检定中的比较研究
表 4 显示了在 ELISA 中用亲和柱纯化的幽门螺杆菌抗体和 DEAE 柱纯化的幽门螺杆菌抗体之间的比较研究。

通过亲和柱纯化幽门螺杆菌抗体描述于实施例 5(见上), DEAE(二乙基氨基乙基纤维素)柱描述如下:

用 0.0175M 磷酸钾(pH6.5)室温下平衡 DEAE 柱。将含幽门螺杆菌抗体的上清液置于该柱上。收集流出馏份。检测蛋白浓度(OD_{280})并收集所有大于 0.200 的馏份。

在 20 μ g/ml 和 1.0 μ g/ml 之间将亲和纯化的和 DEAE 纯化的抗体在磷酸缓冲液中作系列稀释。将每个稀释液的 0.1ml 等份加入到 Costar EIA Strip Plate 中, 覆盖并在室温下孵育过夜。将此板用 PBS 洗涤一次并在室温下用存在于 PBS 中的 1%BSA 封闭 4 小时。将若干阳性和阴性样本在样本稀释液(PBS-BSA)中进行 1:5 稀释。将每个样本(0.1ml)加入到 DEAE 纯化抗体包被的孔或亲和纯化抗体包被的孔(作为对照)中, 并同时用 0.1ml 先已公认的 DEAE 和/或亲和纯化的兔抗幽门螺杆菌辣根过氧化物酶结合物孵育(见表 4)。室温下孵育 60 分钟后, 将样本彻底洗涤除去未结合的样本和酶标记的抗体。加入四甲基联苯胺底物并室温下孵育 10 分钟。用 0.1ml 1N 硫酸停止此颜色变化反应并在 $OD_{450/650}$ 读取各孔分光光度分析的数值以确定各样本的反应性。

表 4 清楚表明, 就低本底读数和高(更灵敏)阳性样本读数而言, 亲和纯化的抗体和亲和纯化的酶结合物产生了最好的结果。亲和纯化的抗体用于板的两侧而酶结合物作为参考标准(检测 1)。所有的其它检测结果与参考标准比较。当与参考标准比较时, 由于升高的本底(即阴性样本的较高 OD)和阳性样本的 OD 降低(检测 3), DEAE 板和 DEAE 结合物显示了假阳

性结果。用亲和板代替 DEAE 板，阳性信号升高，但是较高的本底仍然存在，这导致了假阳性结果(检测 2)。通过降低 DEAE 结合物浓度至原来的 50%，本底降低但是阳性信号也降低，这样导致了假阴性结果(检测 4)。

表 4. DEAE 和亲和纯化抗体的比较

	检测 1	检测 2	检测 3	检测 4
板	亲和	亲和	DEAE	DEAE
酶结合物	亲和	DEAE	DEAE	DEAE(半强度)
阴性对照	0.009	0.233	0.212	0.085
阳性对照	1.320	1.366	1.111	0.879
阳性样本 1	2.364	2.813	1.259	0.766
阴性样本 2	0.013	0.154	0.114	0.049
阴性样本 3	0.024	0.323	0.245	0.112
阳性样本 4	0.354	0.398	0.158	0.084

实施例 13

免疫色谱检测

免疫色谱检测装置有带有两个视窗的外部塑料盒：“加样视窗”和“结果观察视窗”。此“加样视窗”，向其中加入流动相，其中还含有“标记垫”或含第二种抗体的贮库，该抗体用检测试剂如免疫-金标记。将此垫置于加样点和“结果观察视窗”的较低边界之间。“结果观察视窗”在固定相上，其含有检验线，其用一级抗体定位，以及对照线，其用抗第二种抗体的抗体定位。此检验线在加样点和对照线之间。

为了进行检测，将 4-6 滴血清加入到该盒的样本区。该样本流经含纯化的、与免疫-金的红颜色或其它标记物偶联的幽门螺杆菌抗体的标记垫。现在含标记的抗体的样本将移动该检验条首先通过检验线，然后通过对照线。如此样本中含有幽门螺杆菌抗原，此抗体将此抗原与红色免疫-

金偶联，接着将与固定在硝酸纤维素膜上的幽门螺杆菌抗体结合，形成一条线。抗幽门螺杆菌抗体-抗原-抗体复合物被捕获时，在结果视窗中可以看到一条红色检验线（膜-抗体:抗原:抗体-红色免疫-金）。此对照线用山羊抗兔抗体点滴。当该样本流经（如果一种单克隆抗体用来偶联有色颗粒，此对照线用山羊抗小鼠点滴）时，幽门螺杆菌-免疫-金-抗体被山羊抗兔线捕获，以确保正确进行此试验。

液体样本，其中可能含有其它流动相，将从较低的部分移至较高的部分(色谱作用)，并且通过顶部吸收垫，所有过量的液体将排向此盒的上部。如果在此样本中不含抗原，只有对照线在试验的后期是看见的。如果存在抗原，将见到检验线。

经过对本发明的详细描述并参考优选的实施例，对本领域技术人员来说在不背离本发明范围的前题下，本发明的改良形式和变化形式是显而易见的，本发明的范围在权利要求中限定。

专利名称(译)	血液中的幽门螺杆菌抗原		
公开(公告)号	CN1330153A	公开(公告)日	2002-01-09
申请号	CN00109639.7	申请日	2000-06-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏荣仁		
申请(专利权)人(译)	苏荣仁		
当前申请(专利权)人(译)	苏荣仁		
[标]发明人	伊庆燧		
发明人	伊庆燧		
IPC分类号	C12Q1/04 C12Q1/68 G01N33/53		
代理人(译)	黄健		
其他公开文献	CN1207394C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及在被感染个体的血液中发现和检测幽门螺杆菌(H.pylori)抗原。此幽门螺杆菌抗原是幽门螺杆菌细胞的组分,其包括但不限于DNA, RNA,核苷酸、蛋白和肽片段。幽门螺杆菌DNA、RNA及核苷酸片段抗原通过聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)或DNA杂交方法或其它扩增方法检测。幽门螺杆菌蛋白或肽或其它抗原组分可通过免疫检定或免疫印迹法用幽门螺杆菌抗体检测,该抗体优选是通过亲和柱纯化的抗体。

	1×10^5 细菌/ml	不参加
样本	OD _{450/650}	OD _{450/650}
缓冲液	3.866	0.077
Ab 阴性样本 1	3.973	0.096
Ab 阳性样本 1	0.336	0.120
Ab 阳性样本 2	0.390	0.082