幽门螺杆菌单克隆抗体的制备及其检测应用

马健[1]，倪超[1]，王海鹰[2]，宁正祥[2]
（1.华南理工大学生物科学与工程学院，广东广州 510006）（2.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*，Hp)是一种定居于人胃部及十二指肠的微需氧革兰氏阴性菌，其长期感染导致胃炎、胃及十二指肠溃疡与胃癌。幽门螺杆菌感染主要始于儿童期，其自发性清除非常少见，及早通过检测发现并加以抗生素治疗可有效降低成人感染率。本文通过体外培养 Hp 标准菌株 ATCC43504，将其裂解液作为抗原免疫 Balb/c 小鼠，通过常规技术路线制备杂交瘤细胞。经间接 ELISA 法筛选和多次有限稀释法亚克隆得到 21 株稳定分泌抗 Hp 抗原的杂交瘤细胞株，制备腹水并用辛酸硫酸铵联合沉淀法纯化单克隆抗体。将得到的单克隆抗体在胶体金免疫层析平台上进行配对和样品检测，获得多组灵敏度和特异性相对较高的单克隆抗体组合，其中以 2-18E1 作为包被抗体，2-9H5 或 2-17E9 作为标记抗体检测细菌培养裂解物的最低限为 25 ng/mL，为 Hp 抗原检测试剂的研发提供了基础。

关键词：幽门螺杆菌；抗原；单克隆抗体；胶体金免疫层析

文章篇号：1673-9078(2015)4-228-233 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.037

Development of Monoclonal Antibodies against *Helicobacter pylori* and Their Applications to Immunological Assays

MA Jian[1], NI Chao[1], WANG Hai-ying[2], NING Zheng-xiang[2]
(1.School of Bioscience & Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)
(2.School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Helicobacter pylori* (*Hp*) is a gram-negative, microaerophilic bacterium found in the human stomach and duodenum, and long-term *H. pylori* infection is linked to the development of gastritis, gastric and duodenal ulcers, and stomach cancer. *H. pylori* infection is mainly acquired during childhood, and its spontaneous clearance is rare. Its prevalence among adults can be effectively reduced by early diagnosis and antibiotic therapy. In this study, a standard *H. pylori* strain (ATCC 43504) was cultured *in vitro*, the lysate was used as an antigen to immunize BALB/c mice, and a hybridoma cell line was prepared using conventional techniques. In total, 21 hybridoma cell lines that stably secreted anti-*H. pylori* monoclonal antibodies (mAbs) were obtained based on indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) screening and multiple rounds of limiting dilution subcloning. Ascites were prepared and mAbs were purified using ammonium sulfate precipitation methods. The pairing of mAbs and sample detection were conducted by colloidal gold immunochromatographic assays (GICAs), and multiple mAb pairs with high sensitivity and specificity were obtained. Among them, the limits of detection (LODs) of the lysates from two antibody pairs consisting of capture (mAb 2-18E1) and detection (mAb 2-9H5 and mAb 2-17E9) antibodies were 25 ng/mL. These results indicated that the GICA method can provide a basis for the development of reagents to detect *H. pylori* antigens.

Key words: *Helicobacter pylori*; antigen; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatographic assay

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种单极、多鞭毛、末端钝圆、螺旋形弯曲的革兰氏阴性细菌。Hp 的持续感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤以及胃癌的主要致病因素，世界卫生组织(WHO)已将其列为 I 级致癌物质[1]。全世界约有半数以上的人口感染 Hp，在我国部分地区成人感染率超过 70%[2~3]，因此检测该菌感染具有重要的现实意义。

目前，Hp 的检测根据检测时是否使用胃镜而分为侵入性检测和非侵入性检测[4]。侵入性检测主要有胃镜活检，细菌培养以及快速尿素酶实验等，但胃镜检测操作相对繁琐，需要仪器及操作熟练的工作人员。非侵入性检测主要有 $^{13/14}$C-快速呼吸实验(UBT)，^{15}N-

收稿日期：2014-06-20
基金项目：卫生部重大新药创制(2011ZX09506-001)；广东省战略性新兴产业核心技术攻关项目（2012A080800007）；中国博士后科学基金（2012M521593；2013T60796）
作者简介：马健(1985-)，女，硕士研究生，从事微生物学研究
通讯作者：王海鹰(1983-)，女，博士，博士后，主要研究领域为生物工程及生物制药

氮排除实验，免疫学血清抗体检测等[5~7]，其中呼吸试验和氮排除实验准确率高，但其检测成本也相对较高；Hp 抗体检测虽然灵敏度高，但由于人感染 Hp 数周后血清中才出现特异性抗体，同时人体内可能存在交叉反应性抗体（如空肠弯曲菌感染等），且 Hp 根除后体内抗体仍然会存在两年以上，故血清学阳性不能完全肯定患者有活动性感染，所以抗体检测更适用于流行病学筛查而非临床检测。

近年来，Hp 抗原检测成为 Hp 检测的另一种简便，快速的免疫学检测方法，其主要通过双抗体夹心酶联免疫法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）检测人粪便中的 Hp 抗原[8]，具有无放射性、非侵入性等特点。胶体金免疫层析技术（colloidal gold immunochromatographic assays，GICAs）是一种将胶体金标记技术、免疫检测技术和层析分析技术等多种方法有机结合在一起的固相标记免疫检测技术[9]，GICA 法相对于 ELISA 检测，其灵敏度和特异性均可与后者相当，且具有低成本、快速易操作、不依赖仪器等优势。

因此本论文采用 Hp 全菌裂解液作为抗原免疫小鼠制备得到了针对全菌的单克隆抗体，并首次尝试将得到的单克隆抗体应用于胶体金免疫层析平台的筛选和检测应用，为 Hp 抗原快速检测试剂的开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Hp 菌株 ATCC43504 购自 ATCC；哥伦比亚血琼脂基础和脑心浸液培养基购自北京陆桥；无菌脱纤维绵羊血购自广州蕊特；万古霉素，两性霉素，多粘菌素，弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自 SIGMA；甲氧苄氨嘧啶(TMP)购自上海阿拉丁；密闭培养箱以及微需氧产气袋购自日本三菱；SPF 级，6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠购自广东省实验动物中心；聚乙二醇（PEG）购自瑞士 Fluka 公司；昆明鼠和 F1 代小鼠，骨髓瘤细胞（SP2/0），胶体金溶液、胶体金试纸条制备均在广州万孚生物技术股份有限公司完成；HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 多克隆抗体购自北京中杉金桥，单克隆抗体亚型检测试剂盒购自洛阳佰奥通实验材料中心，其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Hp 体外培养及鉴定

将哥伦比亚血琼脂培养基灭菌后加入 7%（*V/V*）的脱纤维绵羊血，加入抗生素混合液后制备平板固体培养基，各抗生素组分终浓度如下：万古霉素 10 mg/L，两性霉素 5 mg/L，TMP 5 mg/L，多粘菌素 2500 U/L。往平板内加入 100 μL Hp 菌液并使用涂布器均匀涂开，后将平板倒置后放入含有微需氧产气袋的密闭培养箱中，37 ℃培养 72 h。待 Hp 生长至针尖状微透明菌落后，取含 30%甘油的脑心浸液培养基（保菌液）或者无菌 PBS 加于平板固体培养基表面，用涂布器刮下菌苔或者菌落，将其重悬后吸入无菌保存管或者离心管中，保菌液短期保存置于-80 ℃下，长期置于液氮中保存。将 Hp 灭活后，使用超声破碎仪对细胞进行破碎裂解即可获得 Hp 全菌裂解液，作为幽门螺杆菌单克隆抗体制备的抗原。

1.2.2 Balb/c 小鼠的免疫

将 Hp 全菌裂解液作为抗原与免疫佐剂混合后免疫小鼠，初次免疫每只小鼠接种 100 μg 抗原，之后每隔两周进行第二、第三、第四次免疫，剂量为每只小鼠 50 μg 抗原，第四次免疫完成之后 7 d 采用间接 ELISA 法检测小鼠血清抗体效价。在融合前三天按 100 μg 抗原每只小鼠的剂量无佐剂直接进行小鼠腹腔注射加强免疫，并准备融合实验。

1.2.3 脾细胞与骨髓瘤细胞融合[10]

融合前一周，采用常规的细胞复苏方法，复苏冻存的 SP2/0 细胞；取免疫效价符合要求的小鼠的脾脏细胞，置于无菌筛网上，用注射器胶头充分研磨脾脏，多次滴加 PBS 冲洗筛网，将收集的混合液转移至无菌离心管中，1000 r/min 离心 5 min，收集，重悬，洗涤脾细胞溶液，计数。将 SP2/0 细胞与脾细胞按 1:5~1:10 混合，800 r/min 离心 5 min，弃去上清培养基；在 1 min 内，用移液枪先慢后快地加入已于 37 ℃水浴锅预热的 PEG 溶液 1 mL，使 PEG 能与细胞充分混匀，加完后静置 10 min；在 90 s 内加入 30 mL 无血清 1640 培养基，以先慢后快的方式前 1min 加入 10 mL 培养基，后 30 s 加入 20 mL 培养基，800 r/min 离心 5 min，弃去上清；加入适量体积的已 37 ℃预热的 HAT 培养基，混匀后转移至 96 孔板中，于 37 ℃细胞培养箱中进行培养。

1.2.4 间接 ELISA 检测[10]

采用碳酸盐包被缓冲液将 HP 全菌蛋白稀释至 5 μg/mL，ELISA 孔板中每孔加入 100 μL，4 ℃包被过夜；PBST 洗涤孔板 3 次并用 BSA 封闭后，将每只免疫小鼠的血清（或是融合培养后待检测的细胞上清）分别稀释 1000、10000、100000 倍，加入反应孔中，以未免疫的小鼠血清作为阴性对照，37 ℃恒温箱内反应 1 h，采用辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠

作为二抗进行检测，加入 TMB 显色底物反应后，酶标仪读取各反应孔 OD_{450} 值。

1.2.5 抗幽门螺杆菌单克隆抗体亚类鉴定

采用小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用ELISA试剂盒（洛阳佰奥通实验材料中心）对单克隆亚类进行鉴定。碳酸盐包被缓冲液稀释抗原 HP 全菌至浓度为 5 μg/mL，4 ℃包被过夜；次日 PBST 洗涤酶标板 3 次；然后每孔加入 100 μL BSA 封闭液，37 ℃孵育 2 h；依次加入杂交瘤细胞的培养上清于酶标板中，每孔 100 μL，37 ℃孵育 2 h，PBST 洗涤 3 次；然后向酶标板中每孔加入 100 μL 酶标二抗（包括酶标的 IgG1，IgG2a，IgG2b，IgG3， IgA，IgM），37 ℃孵育 1 h，PBST 洗涤 3 次；加入 TMB 显色底物，各孔加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应后，读取 OD_{450} 值，结果呈阳性反应且数值最高的孔，其加入的酶标二抗抗体类型即是该株单克隆分泌抗体的亚类。

1.2.6 腹水制备[10]

选取 10 周大小的 F1 昆明小鼠，每只小鼠腹腔注射 300 μL 液体石蜡，3~5 d 后腹腔注射通过上述间接 ELISA 法筛选出来的阳性杂交瘤细胞，每只小鼠注射 5×10^5 个细胞，7~10 d 后，收集小鼠腹水，加入适量防腐剂（防腐剂体积为腹水体积的 0.05%），4 ℃保存腹水。

1.2.7 单克隆抗体的纯化[10]

单克隆抗体的纯化方法采用常规的辛酸硫酸铵沉淀法。腹水与醋酸钠－醋酸缓冲液（0.05 mol/L，pH 4.0）按 1:2 混合均匀，按每毫升稀释后腹水加入 27 μL 正辛酸的比例，在室温下边搅拌边逐滴加入；4 ℃静置 2 h，15000 g/min 4 ℃离心 30 min 后，用滤纸过滤收集滤液，调 pH 值至 7.2 左右，在冰浴条件下，边搅拌边缓慢加入饱和硫酸铵溶液，直至硫酸铵的饱和度达 45%，继续搅拌 30 min，冰上静置 4h 以上，10000 g/min 4 ℃离心 30 min，弃掉上清，保留沉淀；向沉淀中加入 2 mL PBS，吹打混匀，将溶液转移至透析袋中，于 PBS 缓冲液中进行透析；将透析袋内液体转移至离心管，在 4 ℃条件下，12000 r/min 离心 25 min，吸取上清，采用 SDS-PAGE 分析获得抗体的纯度。

1.2.8 辣根过氧化物酶（HRP）标记单克隆抗体（文章中没有加入 ELISA 平台检测数据，所以这个方法在本文中没有用到，整段去掉）

称取 1.25 mg 辣根过氧化物酶固体（HRP），加入 0.125 mL 蒸馏水溶解；向 HRP 溶液中加入 0.125 mL 0.06 M 过碘酸钠溶液，4 ℃避光静置 30 min，然后加入 160 mM 的乙二醇 0.125 mL，室温静置 30 min 后加入 2.5 mg 抗体；将抗体溶液置于 0.05 mM 碳酸缓冲液中，4 ℃透析 24 h，期间换液 3 次。将透析液转移至 15 mL 离心管中，加入新鲜配制的 5 mg/mL 硼氢化钠液 0.05 mL 混匀，4 ℃静置 2 h。加入等量的饱和硫酸铵溶液，4 ℃下静置 4 h，每隔 30 min 摇匀一次，4 ℃，12000 r/min 离心 20 min，弃去上清，沥干。加入 800 μL 磷酸缓冲液（0.02 M pH7.4)溶解沉淀，装入透析袋中，于 0.02 M pH7.4 磷酸缓冲液中，4 ℃透析 24 h，中间换液 3 次。将透析袋中液体吸出离心，将上清液吸出加等量甘油，混匀，-20 ℃保存。

1.2.8 胶体金检测试纸条的组装和检测

胶体金检测试纸条的组装和检测参考本课题组的方法[10]。以纯化后的 18 株 IgG 抗体各自作为包被抗体和标记抗体进行相互配对，组装胶体金免疫层析试纸条。首先将硝酸纤维素膜准确贴于 PVC 板的指定位置，使用包被液将抗体稀释至 2 mg/mL 作为检测线 T，将山羊抗小鼠抗体稀释至 2.0 mg/mL 作为质控线 C。距硝酸纤维素膜靠近样品垫一侧 6 mm 和 11 mm 处喷膜，将喷好膜的 PVC 板放于 50 ℃恒温烘箱内烘烤 12 h；然后用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 调节胶体金（由广州万孚金标车间提供）与被标记抗体的 pH 至 8.2，于 10 mL 金溶胶中加入 300 μg 抗体蛋白，充分搅拌胶体金和蛋白使其混匀，约 10 min 后，采用 3% PEG20000 溶液作为稳定剂加至 PEG20000 终含量为 0.05%，再充分搅拌 10 min。8000 r/min 离心 10 min 后，保留管底疏松的粉红色沉淀部分（胶体金标记的抗体），取 2 mL 标记后的抗体，均匀涂在 5 cm×5 cm 的玻纤上，置于干燥房内风干，组装试纸条进行检测。

2 结果与分析

2.1 Hp 体外培养

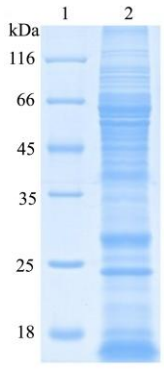


图 1 SDS-PAGE 分析幽门螺杆菌全菌抗原

Fig.1 SDS-PAGE analysis of whole-cell *H. pylori* antigens

Hp 体外培养 72 h 后，在平板上可看到明显的针尖状半透明菌落；涂片革兰染色镜检为革兰氏阴性，菌体呈海鸥状、S 状弯曲、弧形、短杆菌、球型等形

态。将 Hp 用 PBS 洗涤并重悬，56 ℃下处理 10 min 使 Hp 灭活，超声破碎后采用 SDS-PAGE 分析细菌蛋白质成分，结果如图 1 所示。

2.2 Hp 单克隆抗体的制备与鉴定

取经四次免疫后的小鼠血清进行间接 ELISA 测定，结果表明免疫后小鼠的血清抗体效价均在 100000 以上（图 2），可以进行下一步的融合实验。

两次融合实验后，经过间接 ELISA 筛选以及多次有限稀释法亚克隆，共获得 21 株稳定分泌抗 Hp 全菌的抗体细胞株。由于抗体的亚类决定了其在免疫检测中的应用和纯化方法的选择，所以我们收集获得的 21 株细胞上清培养液，利用 ELISA 对抗体亚类进行鉴定，21 株细胞所分泌的抗体亚类如表 1 所示。

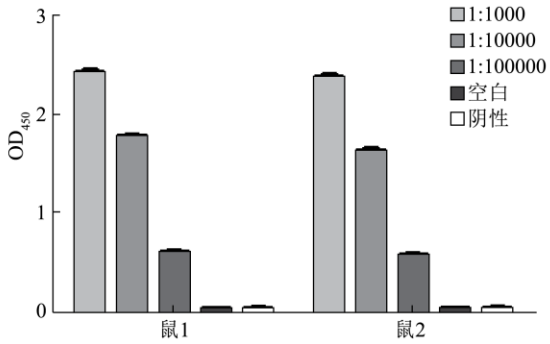


图 2 间接 ELISA 分析免疫鼠血清抗体效价

Fig.2 Indirect ELISA analysis of immune mouse serum antibody titers

表 1 单克隆抗体的亚类鉴定

Table 1 Identification monoclonal antibody subtypes

抗体亚类	细胞株						
IgG1	2-9B11	2-15C1	2-10B3	2-4E2	2-17E9	2-18E1	
IgG2a	1-2F9	2-5E1	2-10B10	2-9H5	2-17A10		
IgG2b	1-3F3	1-2D10	2-14F3	2-7H8	2-8D2	2-2C6	2-8H6
IgM	2-10E9	2-15B10	2-16G7				

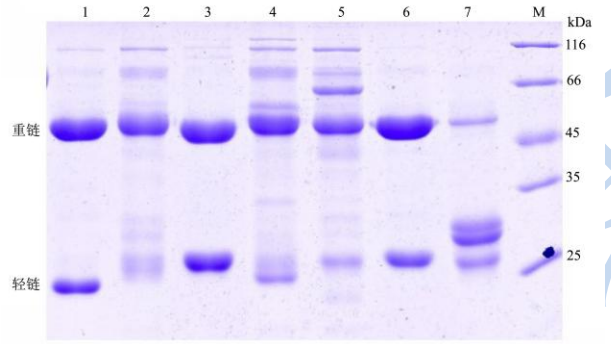


图 3 SDS-PAGE 分析纯化后的抗体

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified antibodies

注：1，2-15C1 抗体；2，2-10B3 抗体；3，2-18E1 抗体；4，2-7H8 抗体；5，2-10B10 抗体；6，2-17E9 抗体；7，2-9H5 抗体；M，蛋白分子量 marker。

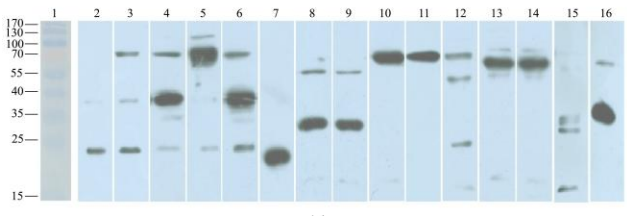


图 4 Western Blot 分析各抗体识别的 Hp 全菌抗原蛋白

Fig.4 Monoclonal antibodies recognized by *Hp* whole-cell antigens using western blot

注：1：Marker；2：2-17E9 抗体；3：2-18E1 抗体；4：2-10B10 抗体；5：2-15B10 抗体；6：2-15C1 抗体；7：1-2D10 抗体；8：1-2F7 抗体；9：2-10B3 抗体；10：1-3F3 抗体；11：2-14F3 抗体；12：2-10E9 抗体；13：2-16G7 抗体；14：2-17A10 抗体；15：2-7H8 抗体；16：2-9H5 抗体。

本文通过制备腹水获得抗体，收集到的腹水通过 ELISA 法进行效价检测，腹水效价大部分在 10^6 以上（数据未显示）。使用辛酸硫酸铵联合沉淀法纯化所有 IgG 型抗体，SDS-PAGE 分析部分纯化后抗体，选用还原性 SDS-PAGE，抗体重链大约为 50 kDa，轻链约为 25 kDa，结果如图 3 所示，图中分子量约为 66 kDa 的杂带为鼠血清中白蛋白成分，不影响后期检测结果的特异性和灵敏度。

纯化后大部分抗体采用间接 ELISA 分析抗体效价，均在 10^5 以上（数据未显示），可以用于后续胶体金免疫层析平台的研发。由于本实验采用 Hp 全菌免疫小鼠，因此制备得到单克隆抗体所识别 Hp 的抗原不同，将 Hp 全菌裂解液进行 SDS-PAGE 电泳，转膜至硝酸纤维素膜，以培养上清，稀释后的腹水或纯化后的的抗体作为一抗，HRP 标记的山羊抗小鼠为二抗进行 Western Blot 分析单克隆抗体识别 Hp 全菌的蛋白成分。结果如图 4 所示，在获得的抗体中，大部分抗体识别 Hp 的抗原大小不一致，其中 2-16G7 和 2-17A10 抗体可与实验室制备得到的 UREASEB（分子量 60 kDa）以及 HSP60（分子量 57 kDa）反应（ELISA 结果未显示），Western Blot 结果显示上述两株抗体可以同时识别 Hp 全菌中分子量为 60 左右的多条蛋白条

带；某些抗体可以识别相同的抗原，提示这些抗体可以用于夹心法检测，或者这些被识别抗原可能是 Hp 的主要优势表位。

2.3 单克隆抗体在胶体金免疫层析平台的配对与检测

将纯化后的抗体用于胶体金免疫层析平台，筛选可以配对检测 Hp 抗原的抗体组合。以纯化后的抗体组装胶体金免疫层析试纸条，18 个抗体各自作为包被抗体和标记抗体进行相互配对，一共组成 306 个组合，用组装完成的胶体金免疫层析试纸条检测不同浓度的 Hp 全菌抗原，记录检测阴性样本时无假阳性出现且可以检测不同浓度 Hp 抗原的抗体组合，结果如表 2 所示。

表 2 胶体金免疫层析平台抗体筛选抗体对

Table 2 Monodonal antibody pairs screened by GICA

包被\标记	2-15C1	2-9H5	1-3F3	2-10B10	2-10B3	2-17E9	2-18E1	2-7H8	2-8D2	2-2C6
2-9H5	-	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-
1-3F3	+	+++	-	++	-	++	++	-	-	-
2-10B10	-	+++	++		+	++	+++	++	+	++
2-10B3	-	-	-	+	-	++	++	-	-	-
2-17E9	++	+++	++	+++	+	-	+++	+	+	++
2-15B10	-	-	-	-	-	++	-	-	-	++
2-18E1	++	++++	++	+++	-	++++	-	+	+	+

注：“+”：表明该抗体组合可检测浓度至少为 10 μg/mL 的 Hp 抗原；“++”：表明该抗体组合可检测浓度至少为 1 μg/mL 的 Hp 抗原；“+++”：表明该抗体组合可检测浓度至少为 0.1 μg/mL 的 Hp 抗原；“++++”：表明该抗体组合可检测浓度至少为 0.025 μg/mL 的 Hp 抗原；“-”：表明该抗体组合检测 Hp 抗原无信号或检测阴性样品时有假阳性。

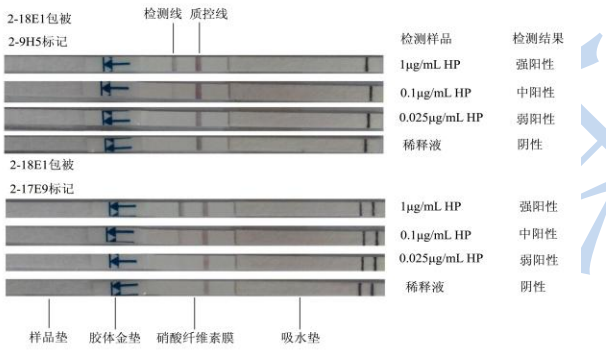


图 5 胶体金快速检测试纸条检测 Hp 抗原灵敏度

Fig.5 Sensitivity of GICAstrips to the *Hp* antigen

从表 2 可见，通过胶体金免疫层析平台的配对筛选，共获得 37 组可以双抗体加夹心检测浓度为 10 μg/mL Hp 的抗体组合，其中 11 组抗体对可以检测浓度低至 0.1 μg/mL 的 Hp 抗原说明这 11 组配对具有较好的灵敏度，以 2-18E1 抗体作为包被抗体，2-9H5，或 2-17E9 作为标记抗体时具有相对最好的灵敏度，灵敏度可达 25 ng/mL，略优于 Meridian 公司（西班牙）Immuno Card STAT HpSA Hp 抗原检测试剂说明书给出的 64 ng/mL 的灵敏度（Hp 菌株 TV1970 超声裂解液作为抗原）[11]。其胶体金检测结果图 3 所示。

3 结论

3.1 我国是 Hp 感染率较高的国家，“人-人”、“粪-口”是其主要传播途径。Hp 感染人后可以长期潜伏在人体胃部，是引起胃部疾病甚至是胃癌的主要原因，带给人们的危害是不容忽视的[12]。

3.2 现阶段，Hp 抗原检测的样品主要是粪便，但样本中 Hp 成分及含量受人胃部菌量及菌型影响大，且细菌经人消化道之后，大部分抗原会消失降解，因此此法检测灵敏度以及假阴性仍是一个急需解决的问题。目前尚未有研究分析人粪便中 Hp 蛋白的主要存在形式[13~14]。

3.3 本文采用 Hp 全菌裂解液作为抗原制备单克隆抗体，避免了单一抗原免疫后产生的单克隆抗体可能不能与全菌发生反应的缺点。在获得的抗体中，大部分抗体识别 Hp 的抗原大小不一致，其中 2-16G7 和 2-17A10 抗体可与实验室制备得到的 UREASEB（分子量 60 kDa）以及 HSP60（分子量 57 kDa）反应。Western Blot 结果显示某些抗体可以识别相同的抗原，所以可以对这些抗体进行进一步分析，应用于双抗体夹心等检测。

3.4 胶体金法作为免疫学技术之一，操作简便、快速、特异性和灵敏度较高，不仅具有巨大的发展潜力，还具有广阔的市场和应用前景。本文将得到的 18 个抗体各自作为包被抗体和标记抗体进行相互配对，一共组成 306 个组合，用组装完成的胶体金免疫层析试纸条检测不同浓度的 Hp 全菌抗原，得到了具有较高灵敏

度和较好特异性的抗体对。

3.5 总之，本文利用 Hp 全菌裂解液作为抗原免疫 Balb/c 小鼠，经筛选和亚克隆得到了 21 株能稳定分泌抗 Hp 全菌蛋白抗体的杂交瘤细胞。经鉴定，单克隆抗体的亚型大部分为 IgG 型，制备的腹水中抗体效价均在 10^6 以上，使用辛酸硫酸铵联合沉淀法纯化得到了纯度和浓度较高的单克隆抗体。在胶体金免疫层析平台筛选可用于双抗体夹心法检测的抗体组合，获得了多组抗体组合应用于胶体金免疫层析平台，其中以 2-18E1 作为包被抗体，2-9H5，2-17E9 作为标记抗体的胶体金免疫层析测试条具有相对最高的灵敏度和较好的特异性，灵敏度可达 25 ng/mL，具有开发成为检测试剂的潜力。

参考文献

[1] Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection [J].The New England Journal of Medicine, 2002, 347: 1175-1186

[2] Wong BC, Wong W, Tang VS, et al. An evaluation of whole blood testing for *Helicobacter pylori* infection in the Chinese population [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2000, 14: 331-335

[3] Teresa A, Maria JMG, Pedro U. Helicobacter pylori in Pediatrics [J]. Helicobacter, 2013, 18(Suppl. 1): 52-57

[4] Bytzer P, Dahlerup JF, Eriksen JR, et al. Diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection [J]. Danish Medical Bulletin, 2011, 58(4): C4271

[5] Vaira D, Vakil N. Blood, urine, stool, breath, money, and *Helicobacter pylori* [J]. Gut, 2001, 48(3): 287-289

[6] Cave DR, Zanten SV, Carter E, et al. A multicentre evaluation of the laser assisted ratio analyser (LARA): a novel device for measurement of $13CO_2$ in the 13C-urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori* infection [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 1999, 13: 747-52

[7] Faigel DO, Magaret N, Corless C, et al. Evaluation of rapid antibody tests for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [J]. The American Journal of Gastroenterology, 2000, 95(1): 72-77

[8] Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay [J]. Lancet, 1999, 354: 30-33

[9] LIN Li-rong, Fu Zuo-gen, DAN Bing, et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TPN17 and TPN4 [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 68(3): 193-200

[10] 倪超.HIV-1 核心蛋白 p24 单克隆抗体的制备及其在免疫检测中的应用[D].广州:华南理工大学,2013
NI Chao. Development of monoclonal antibodies against HIV-1 p24 protein and its application in immunological assays [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013

[11] Calvet X, Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, et al. Accuracy of monoclonal stool tests for determining cure of *Helicobacter pylori* infection after treatment [J]. Helicobacter, 2010, 15(3): 201-205

[12] Kusters JG, Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(3): 449-490

[13] Ali S, Zuhair MH, Ali M, el al. Extraction of the outer membrane proteins of *H. pylori* and evaluation of their presence in stool of the infected individuals [J]. Iranian Biomedical Journal, 2004, 8(2): 83-88

[14] Nobuyuki S, Masahiko W, Seigo N, et al. Production and application of new monoclonal antibodies specific for a fecal *Helicobacter pylori* Antigen [J]. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2002, 9(1): 75-78