

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

- (1) 美國(地區) 申請專利，申請日期：1999.12.14. 案號：60/170,537，☒有 ☐無主張優先權
- (2) 美 2000.05.17. 09/572,598

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

相關申請案：

本申請案主張 1999 年 12 月 14 日申請之美國臨時專利申請案序號 60/170,537、及 2000 年 5 月 17 日申請之美國發明專利申請案序號 09/572,598 之優先權，該二案併於本文作為參考文獻。

發明領域：

本發明係關於發現血液(包含全血、血漿及血清)中的幽門螺桿菌(*H. pylori*)抗原及抗原片段。於血液中發現的幽門螺桿菌抗原包含但不限於幽門螺桿菌 DNA、RNA 或其片段、或幽門螺桿菌蛋白質/胜肽或其他抗原性成分。幽門螺桿菌 DNA 或其片段係藉由聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、DNA 雜交法、支鏈 DNA 信號擴增分析法或其他信號擴增分析法檢測。其幽門螺桿菌 RNA 係藉由 PCR、雜交法、或其他信號擴增分析法檢測。幽門螺桿菌蛋白質或其胜肽或其他抗原性成分，可藉由使用抗幽門螺桿菌之親和性純化抗體的免疫分析或免疫印跡法予以檢測。本發明亦關於藉由檢測血液中之幽門螺桿菌抗原而診斷幽門螺桿菌感染。

發明背景：

幽門螺桿菌(*H. pylori*)係一種革蘭氏陰性細菌，其感染胃黏膜，且引起大多數的消化性潰瘍病(PUD)。於新近之前，潰瘍及其他型式之消化不良被認為與壓力量及飲食習

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (ㄞ)

慣有關。近年來，醫療團體已證實幽門螺桿菌為特定型式之胃部病痛包含潰瘍及胃癌的引發劑。根除幽門螺桿菌促使潰瘍痊癒，並大大地減少癌症及 PUD 之發生率。

幽門螺桿菌造成大多數的胃部及十二指腸潰瘍，以及消化性潰瘍病(PUD)。幽門螺桿菌與 PUD 間之關聯性首先由澳洲籍醫生華倫(Warren)及馬夏(Marshall)於 1984 年(Lancet I: 1311-1344)發現及發表。迄今，已接受幽門螺桿菌感染為胃炎最常見的肇因，在病原學上幽門螺桿菌涉及胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃腺癌及初期之 B 細胞淋巴瘤。

已證實 PUD 可治癒且極易治癒。PUD 大部分的肇因為幽門螺桿菌感染。然而，幽門螺桿菌感染並非可例行診斷出者，這可能由於檢驗幽門螺桿菌感染的方法於醫生，特別是初期治療之醫生(即，侵入性活組織檢視檢驗法)，而言不安全。因此，初期治療之醫生傾向於以不安全的藥劑治療具癥狀的病患。

醫生需要簡單、精確且價廉之有關幽門螺桿菌感染的診斷檢驗法，使其知道何時治療病患，以及何時將病患轉診至胃腸病學家。然而，目前可獲得之幽門螺桿菌檢驗法可被區分成侵入性檢驗法及非侵入性檢驗法，二者皆不完全令人滿意。

侵入性檢驗法需使用內視鏡，然後進行活組織檢視程序。以活組織檢視程序取得之組織樣品接著可藉由培養、組織學或快速脲酶檢驗法而分析。

雖然培養活組織檢視試樣提供有關幽門螺桿菌檢驗之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (ㄗ)

最可信賴的結果，然而於良好實驗室中成功的報告僅於 70%至 80%之間[漢(Han), S. W.等，Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.(1995)，14：349-352]。經特殊染色之活組織檢視試樣的組織學檢查可提供對於急性或慢性發炎之黏膜細胞及損傷的直接證明。不過，該種檢查需要內視鏡學家與病理學家通力合作[金達(Genta), R. M.等，Hum. Pathol.(1994)，25：221-226]。快速脲酶檢驗法檢測由幽門螺桿菌脲酶(將脲分解成氨及二氧化碳)產生之氨導致之 pH 升高。然而此法需要高密度的細菌，且任何減少細菌載入量的事物皆可能產生偽陰性[卡特(Cutler), A. F.，Am. J. Med. (1996)，100：35S-39S]。

自 1990 年以後，發展出若干非侵入性檢驗法，以檢測幽門螺桿菌感染的存在與否。例如，脲呼吸檢驗法(Urea Breath Testing)係以生物體的脲酶活性為基礎，該檢驗將標示有 ^{13}C 或 ^{14}C 之脲分解成無放射活性的 $^{13}\text{CO}_2$ 或具放射活性的 $^{14}\text{CO}_2$ 。在治療 4 週後，脲氣息檢驗法被廣泛地推薦用於確認幽門螺桿菌之根除。

美國專利案第 5,716,791、5,871,942 及 5,932,430 號揭示一種檢測糞便試樣中之幽門螺桿菌抗原的免疫分析法，該分析法係使用由經幽門螺桿菌細胞(即，ATCC 株 43504)敏感化之動物獲得之多株抗體進行。該抗體係藉由 DEAE(二乙基胺基乙基纖維素)管柱純化得者。雖然據稱該種糞便抗原檢驗法安全，但事實上糞便試樣之收集及處理困難，且令人不悅。許多病人因令人不悅的臭味，以及缺乏簡便

五、發明說明（4）

的收集裝置，而不願提供糞便樣品。

使用 ELISA 進行血清之幽門螺桿菌抗體的血清學檢驗為另一種廣被使用的檢驗法。該 ELISA 技術之實例可見於美國專利案第 5,262,156 號及歐洲專利案第 0 329 570 號。在幽門螺桿菌抗體之檢測上，已有數種主要抗原被鑑定出來，並被用於免疫分析中。然而，此等分析並未展現出血清學診斷上所需之專一性及敏感度[紐威(Newell), D.G.等，Serodian. Immunother. Infec. Dis.，(1989)，3:1-6]。問題之一來自交叉反應性。此係由於幽門螺桿菌中之顯性抗原(例如，假定分子量為 60 Da 的鞭毛蛋白質)對幽門螺桿菌不具專一性。某些此等抗原可發現於其他細菌如空腸曲狀菌(*C. jejuni*)及大腸曲狀菌(*C. coli*)。第二個遇到的問題是幽門螺桿菌的免疫分析之設計係依菌株而異。在不同株之幽門螺桿菌已觀察到該等抗原間之實質差異。此等問題阻礙了根據使用單一抗原之分析法的設計。已被採用於改良幽門螺桿菌抗體免疫分析的專一性及選擇性之一種途徑為：使用來自不同種幽門螺桿菌菌株的抗原混合物，該混合物中富含特定的抗原片段。一種檢測血清中之幽門螺桿菌抗體的 ELISA 可由商業行為獲得。此種分析法使用細菌性全細胞溶胞產物作為抗原。

採用以抗原檢測血清中存在之幽門螺桿菌抗體的 ELISA 具有其他缺點。特定言之，在感染業經治療後，人類血清中之抗體力價仍有長時間維持於高點(於某些個案中高達 12 個月)。此外，使用此種 ELISA 時不需要正試驗，

五、發明說明 (5)

這表示病患目前受感染，且需幽門螺桿菌感染。當與正型 ELISA 比較時，進行治療的醫師通常指定胃部活組織檢視，以在開始進行抗生素治療前確認細菌的存在。因此，以抗原為基礎的 ELISA 並未排除侵入性程序的需要性。

因此，本發明目的在於提供一種非侵入性且高度精確的幽門螺桿菌感染之診斷檢驗法。於研究期間，在血液中发现幽門螺桿菌抗原，該等抗原以 DNA 或其片段、或其蛋白質/胜肽或其他抗原性成分的形式存於血中(包含全血、血漿及血清)。因而設計檢測此等幽門螺桿菌抗原的特殊方法，以提供幽門螺桿菌之抗原片段係存於血中的證明。此等方法包含，但不限於，使用幽門螺桿菌專一性之引子或寡核苷酸及/或衍生幽門螺桿菌菌株之 DNA 探針，以檢測幽門螺桿菌之核酸片段的聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)及 DNA 雜交法。此外，亦發展檢測幽門螺桿菌之蛋白質/胜肽或任何抗原性成分的免疫分析法及免疫印跡法，該等方法係使用抗幽門螺桿菌之親和性純化抗體。

迄今，尚無有關幽門螺桿菌抗原存於血中之報導。本發明將首先證明幽門螺桿菌抗原不僅存於血中，尚可藉由陳述於下述段落中的方法檢測出來。

發明總論

本發明提供幽門螺桿菌抗原，該等抗原存於患者的血液中，且可藉由聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、DNA 雜交法、RNA 雜交法、支鏈 DNA 分析法、免疫印

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (b)

跡法及免疫分析法予以檢測。本發明亦提供藉由檢測血中之幽門螺桿菌抗原而診斷幽門螺桿菌感染的方法。

本發明所用之”抗原”一詞，廣泛地涵蓋在適當的條件下可以直接或間接地誘發特定的免疫反應，並與該反應的產物反應，亦即，與特定的抗體或專一性敏感化的 T-淋巴球或該二者反應的任何物質。此等物質的實例包含但不限於蛋白質/胜肽、多醣類、脂質及多-或寡-核苷酸。

特別是，有兩類特定的幽門螺桿菌抗原可在血中檢測到。第一類與多核苷酸或寡核苷酸有關，該等核苷酸為來自幽門螺桿菌的染色體 DNA、RNA 或其片段。此類幽門螺桿菌可藉由聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、及雜交法(特別是斑點 DNA 雜交法)或其他擴增方法檢測。

本發明提供之 PCR 方法需要使用一對專一用於檢測幽門螺桿菌的引子。本文所用之”引子”一詞係指一種當其被置於可誘發互補於核酸股之引子產物合成的條件(亦即，含有所有四種不同核苷酸三磷酸及合適的酵素，且於適當溫度之條件)時，可以作為核酸合成之起始點的寡核苷酸(無論是自然發生者或合成製得者)。本文所用之”寡核苷酸”係定義為包括兩個或更多個(較佳多於三個)去氧核糖核苷酸及/或核糖核苷酸之分子。寡核苷酸之實際大小決定於許多因子，而此等因子又轉而決定於該寡核苷酸之最終功能或用途。該寡核苷酸可由合成或者選殖製得。

該等引子係依在幽門螺桿菌菌株如 ATCC 菌株 43504、43571、43629 及 49053 之共有片段中發現的保守序列製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (7)

備者。較佳之引子長度範圍為 15 至 25 個鹼基對(bps)，更佳約 20bps。當兩個引子(正向及逆轉引子)為相同長度，且具有大致相同之核苷酸組成時，可得到較佳的擴增。進行 PCR 之較佳血液樣品為血漿。

本發明提供之 LCR 方法需要使用 DNA 連接酶及兩組對幽門螺桿菌具專一性的寡核苷酸。較佳之 DNA 連接酶為 Pfu DNA 連接酶，其係由 *Pyrococcus furiosus* 單離出之熱安定性 DNA 連接酶，可由商業行為購得。進行 LCR 之兩組寡核苷酸的長度較佳比 PCR 的引子長度長。如同 PCR 引子一般，LCR 寡核苷酸係由在幽門螺桿菌菌株，如 ATCC 菌株 43504、43571、43629 及 49053 之共有片段中發現的保守序列衍生者。

LCR 的進行係由重複下列循環所成：使含有目標序列的 DNA 模版加熱變性、以獨特的方式使兩組相鄰的寡核苷酸探針的第一組黏接於目標 DNA 序列，隨後黏接可與目標 DNA 序列反向的序列雜交之第二組互補性寡核苷酸探針。本文所用之“目標序列”一詞係指血液樣品中發現的“染色體 DNA 或其片段”。其後，若兩個相鄰的探針的接合點完全互補，則 DNA 連接酶可將每一對相鄰的探針共價地連接。

雜交法需要製備幽門螺桿菌 DNA 探針。該幽門螺桿菌 DNA 探針係藉由在瓊脂糖凝膠電泳之後自幽門螺桿菌之核酸萃液切割並萃取 DNA 片段而成。該探針一般具有至少約 25 個鹼基，更常為至少約 30 個鹼基，可具高達約 10,000 個鹼基或更多，通常具有不多於約 5,000 個鹼基。此 DNA

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (8)

片段接著以限制核酸內切酶消化，並與載體黏接，形成重組質體構築物，該構築物可轉移感染真核或原核宿主細胞。該 DNA 片段可在宿主細胞繁殖，及再被單離出。經繁殖出之 DNA 片段可再由放射性同位素(如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等)或螢光(例如使經異脛基洋地黃毒苷配基及生物素標示的 DNA 探針與螢光檢測法聯合使用)予以標示，並使用作為探針。

雜交法之進行方式為：在固相承載物例如硝化纖維素濾紙上，以變性劑處理來自血液(較佳血清)之核酸樣品，使 DNA 變性。較佳的變性劑包含，但不限於鹼性溶液、高溫、有機試劑(如醇類、醯胺類、胺類、脲類、酚類及亞砷類)、或某些無機離子(如硫代氰酸根離子及過氯酸根離子)。然後將經標示的 DNA 探針添加至具有變性 DNA 斑點的濾紙上。接著可依標記(label)的性質分析 DNA 雜交物的存在與否。若標記具放射活性，則濾紙可曝露於 X 光射線膜。若標記具螢光性，則該濾紙可直接使用螢光顯微鏡觀察。

第二類抗原係有關幽門螺桿菌蛋白質及/或胜肽，或任何存於血液中之含有抗原表位的物質，彼等抗原可藉免疫印跡法或免疫分析法檢測，較佳係使用抗幽門螺桿菌抗原之親和性純化抗體進行。依檢測所用之方法而定，可能需要使用一次及二次抗體檢測或測定血液中的幽門螺桿菌抗原。一次抗體為對抗抗原(在此案中為幽門螺桿菌抗原)所產生之抗體。二次抗體為對抗產生一次抗體之物種的免疫

五、發明說明 (9)

球蛋白(如山羊抗兔子 IgG)的抗體。供檢測用之較佳血液樣品為血清。

免疫分析法之進行首先係以 SDS-PAGE 分析血液樣品。電泳後，將蛋白質/胜肽鍵轉移至硝化纖維素濾紙，接著與足量之抗幽門螺桿菌抗體一起保溫培養。可將與酵素共軛，且抗產生抗幽門螺桿菌之動物物種的免疫球蛋白之抗體添加至硝化纖維素濾紙。此方法所用之較佳酵素之一為鹼性磷酸酶，其中該反應可藉由添加 5-溴-4-氯-3-碘基磷酸鹽而檢測。使用於本方法中之另一種較佳的酵素標示物為辣根過氧化酶，其可藉由添加 4-氯-1-萘酚、四甲基聯苯胺、或 3,3'-二胺基聯苯胺，使之產生視覺上為呈色之不溶性產物而檢測。

免疫分析法包括，但不限於，基本夾層分析法、三夾層分析法、及免疫層析分析法。

於基本夾層分析法中，需要兩種一次抗體，其中一種抗體鍵結於固體載體上，另一者以檢測劑標示。三夾層分析法需要組合使用兩種抗幽門螺桿菌之一次抗體(亦即，第一抗體及第二抗體)，其中僅有一種一次抗體需要鍵結於固體載體上，而抗產生未鍵結之一次抗體的動物物種之 IgG 的二次抗體乃形成抗該抗體-抗原-抗體複合物之複合物。該二次抗體係經檢測劑標示者。

夾層分析法中所用的固體載體可以是塑膠珠粒、聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯等。檢測劑可為酵素型標示物(如鹼性磷酸酶或辣根過氧化酶)、螢光或發光劑(如螢光黃、薈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (10)

薇紅、或鎔、胺基苯二醯肼、或吡錠)、放射性同位素標記(如 I^{125})或呈色粒子(如金、銀、藍膠乳、或硒)。

基本及三夾層免疫分析法二者皆需要使第一一次抗體與幽門螺桿菌交互作用，形成抗原-抗體複合物，接著使該抗原-抗體複合物與抗幽門螺桿菌之第二抗體接觸。

免疫層析分析法亦需要組合使用兩種抗幽門螺桿菌之一次抗體。與基本夾層分析法及三夾層分析法不同的是，該第一抗體(亦即，最先與生物試樣接觸之抗體)係由呈色粒子標示者。該第二抗體係鍵結於固體載體如硝化纖維素(或硝化纖維素衍生物)膜、尼龍膜、聚酯膜、濾紙、瓊脂糖、或交聯葡聚糖凝膠。免疫層析分析法所用之較佳固體載體為硝化纖維素膜。需要時可將抗產生第一抗體之動物物種的二次抗體添加及/或鍵結於靠近相對於該樣品添加位置之層析帶末端的固體載體上。此二次抗體係使用作為捕攔在層析路徑末端之未鍵結的呈色粒子的對照物。因此，若該樣品不含幽門螺桿菌抗原，則由於未形成抗體-抗原-抗體複合物，該經呈色粒子標示的第一抗體將急速通過該第二抗體，而不與之結合。不過，由於該二次抗體係抗產生該第一抗體之動物的 IgG，故而不論該第一抗體是否已與樣品形成複合物，第一抗體通過時必與該二次抗體結合。第一抗體與二次抗體間之結合表示該免疫層析路徑之末端。

處理血清樣品時之一問題點在於：經幽門螺桿菌感染之病患的血清中常帶有他/她的幽門螺桿菌抗體。此等血清

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

幽門螺桿菌抗體可與血清幽門螺桿菌抗原形成免疫複合物，如此可能影響本發明免疫分析法之精確度。分離幽門螺桿菌免疫複合物之方法包含，但不限於，以分離劑或於樣品分離條件下，分離複合物。

分離劑之實例包含，但不限於，高鹽(如至少 1M 之 NaCl 或 KCl)、清潔劑[如，至少 1%之 SDS、土溫乳化劑 20(Tween20)、辛基葡萄糖苷、去氧基膽酯、或 Triton X-100]、促混亂劑(chaotropic agents)(如胍鹽酸鹽、脲、或 KSCN)、有機溶劑(如二噁烷、或乙二醇)、酵素(如蛋白酶[例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶、V8 蛋白酶、及枯草菌蛋白酶]或脂酶[如來自牛乳之脂蛋白質脂酶、及來自皺落念珠菌(*Candida rugosa*)之脂酶])。樣品分離條件之實例包含，但不限於，高 pH(例如 pH 3)及/或高溫(如，至少 50°C)。

此外，經分離處理的血清樣品可經以蛋白質為主的試劑處理，以減少交互反應性。較佳之以蛋白質為主的試劑含有至少一種下述蛋白質：胎牛血清、豬血清、正常的山羊血清、馬血清、酪蛋白、白蛋白、明膠、及牛血清白蛋白。

發明之詳細說明：

雖然已報導多種嘗試提供病患之幽門螺桿菌感染之定量及定性測試法，但無一者係有關測試血液樣品中之幽門螺桿菌。其主要理由係由於未曾有研究者曾假設：幽門螺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

桿菌抗原可在血管中被發現。

然而，在下文實例 9(表 1)及實例 11(表 2 及 3)中所示諸表(即，表 1-3)之證據將顯示：幽門螺桿菌抗原可在，且已在，經幽門螺桿菌感染之病患的血清樣品中發現。

基於此等發現，本發明目的在於應用血液中可檢測的幽門螺桿菌抗原作為診斷幽門螺桿菌感染之工具。可用於檢測不同種幽門螺桿菌抗原的診斷方法包含，但不限於，聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)、支鏈 DNA 擴增分析法、雜交分析法、免疫印跡法、免疫沈澱法、流動細胞計數法、免疫電泳法、及免疫分析法(如，連結酵素之免疫吸著劑分析法[ELISA]、放射性免疫分析法[RIA]及免疫層析法)。

PCR 係一種以顯著的效率擴增特定 DNA 序列的技術。以聚合酶(例如熱安定酵素 Taq 聚合酶)進行變性、引子黏接及擴展的重複循環，致使所需 DNA 序列的濃度呈指數增加。每一條 DNA 序列皆可藉由瓊脂糖凝膠電泳分離，接著進行核酸定序。進行 PCR 之較佳的血液樣品類型為血漿。此乃由於若發生溶血時，來自紅血球細胞中所含的血紅蛋白之血紅素分子可能干擾 PCR 擴增。

連接酶鏈反應(LCR)為一種可用於檢測微量已知核酸序列的 DNA 擴增技術。LCR 涉及循環性的二步驟反應：(1)高溫熔解步驟，其中雙股目標 DNA 解纏繞，變成單股，及(2)冷卻步驟，其中鄰近二組互補的寡核苷酸黏接於單股目標分子，並以 DNA 連接酶彼此連接。來自一個循環之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (17)

連接作用產物作為下一循環之連接反應的模版。LCR 導致連接作用產物以類似 PCR 反應之模版的指數性擴增的方式指數性地擴增。

PCR 及 LCR 皆需要發現幽門螺桿菌專一性引子或寡核苷酸以引發核酸鏈反應。由於幽門螺桿菌菌株在基因層次上高度變異[Fujimoto 等, J. Clin. Microbiol., (1994), 32 : 331-334], 且每一個體皆可被多於一種的菌株感染, 因此, 依據在各種幽門螺桿菌菌株中發現的共有片段之保留序列設計引子或寡核苷酸係有所助益。

已發現來自 ATCC 菌株 43504 之幽門螺桿菌細胞對於製造抗糞便樣品中之幽門螺桿菌的一次抗體特別有效(參見美國專利第 5,716,791 號案)。此是由於經由使用來自菌株 43504 之細胞進行過敏化製得之抗體可以檢測地理區域與飲食群交會處之生物體。已證實其他的幽門螺桿菌菌株如 ATCC 43571、43629、49053 具有類似的抗原能力。因此, 值得在此等菌株中發現共有片段。其進行方式可藉由以相同的限制核酸內切酶消化由上述幽門螺桿菌菌株萃取的核酸, 接著使經消化的幽門螺桿菌核酸片段在瓊脂凝膠電泳上跑膠而達成。可切割並萃取出共有片段。共有片段之核苷酸序列可被分析出。接著可使用共有片段之保留序列設計 PCR 或 LCR 之引子或寡核苷酸。

除了 PCR 或 LCR 以外, 存於血液樣品中的幽門螺桿菌抗原可以使用核酸雜交探針檢測出。較佳之核酸雜交探針不多於 5,000 個鹼基。探針序列較佳係至少實質上與幽

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (14)

門螺桿菌菌株之共有片段的核苷酸序列互補者。除了在各
種幽門螺桿菌菌株中發現的共有片段以外，探針可以是由
信使 RNA、由逆轉錄酶使信使 RNA 逆轉錄或由基因組切
割而得之 cDNA。在所需探針經分離及特徵化後，探針之
DNA 片段可在宿主細胞中選殖及繁殖。接著可使用原子或
無機性基(最常使用放射性核種，但使用重金屬或螢光亦佳)
標示所繁殖之探針。使用可專一性地與幽門螺桿菌抗原之
單股 DNA 雜交的探針鍵結的抗體可能可行。在此種情形下
，可標示抗體，使之有益於檢測。用於探針之同型標記亦
可依習知技藝鍵結於抗體。

可使用放射活性標記如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等標示探針，但
是其他放射活性標記亦可使用，只要彼等標記提供具有充
足之半衰期的適當訊號即可。其他標記包含配位子，其可
作為一種下述物質之特殊鍵結分子：經標示之抗體螢光劑
(fluorescers)、化學發光劑(chemiluminescers)、酵素、可作
為經標示之配位子的特殊鍵結對分子之抗體等。亦可使用
在免疫分析法中所用的各種不同的標記。標記的選擇，決
定於該標記在探針對樣品 DNA 的雜交及鍵結速率之作用。
標記對於檢測雜交所得的 DNA 量必須提供足夠的敏感度。
其他的考量包含探針之合成容易、易於獲得儀器、自動化
能力、方便性等。

標記與探針的鍵結方式係依標記的本質而異。就放射
活性的標記而言，有多種不同的技術可以使用。一般係使
用以 α - ^{32}P -dNTP 進行缺口轉譯作用，或是以鹼性磷酸酶使

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (5)

末端磷酸鹽水解，接著使用 γ - ^{32}P -NTP 與 T4 聚核苷酸激酶標示放射活性 ^{32}P 。此外，可以合成其中一個或更多個所含之元素係經放射性同位素取代(如以氘取代氫)之核苷酸。

令人感興趣之作爲標記的酵素包含水解酶(特別是酯酶及糖苷酶)或氧化還原酶(特別是過氧化酶)。螢光化合物包含螢光黃及其衍生物、薔薇紅及其衍生物、丹醯(dancyl)、傘形酮(umbelliferone)等。化學發光劑包含蟲螢光素(luciferin)、及 2,3-二氫呋喃二酮如胺基苯二醯肼。

雜交一般係藉由使用相對於固定在水不溶性多孔質承載物之 DNA 樣品的探針進行。該 DNA 樣品業經變性，故而所固定者爲單股核酸。溶解時，慣用化學溶解，一般爲稀釋之鹼水溶液如 0.1 至 1 M NaOH。鹼亦可使 DNA 變性。其他變性劑包含，但不限於，高溫、有機試劑(如醇類、醯胺類、胺類、脲類、酚類及亞砷類)、或某些無機離子(如硫代氰酸根離子及過氯酸根離子)。

血液中的幽門螺桿菌抗原亦可藉由免疫學方法檢測，彼等方法包含，但不限於，使用抗幽門螺桿菌之經親和性純化之抗體的免疫印跡法及免疫分析法(如基本夾層免疫分析法、三夾層免疫分析法、及免疫層析法)。較佳血液樣品爲血清。

免疫印跡法需要的血液樣品部分係使用聚丙烯醯胺凝膠電泳，接著將所分離之蛋白質/胜肽鍵轉移至硝化纖維膜上。所分離之蛋白質/胜肽鍵再與抗幽門螺桿菌之一次抗體反應，形成抗原-抗體複合物。接著添加經由檢測劑標示，

五、發明說明 (16)

且抗該一次抗體之二次抗體，以顯示該檢測反應。

基本及三夾層免疫分析法二者都至少最少需要三種組件：抗幽門螺桿菌抗原之第一抗體、抗幽門螺桿菌抗原之第二抗體及受試樣品(即，血清樣品)。

第一及第二抗體(即，抗幽門螺桿菌抗原)較佳為多株抗體。此抗體可藉由以幽門螺桿菌細胞(較佳係經超音波或其他細胞擊破工具粉碎，使之含有多重抗原位置)注射兔子或其他哺乳類，如山羊或牛，的方式獲得。

一般而言，抗體係藉由初始注射，接著後續之加強注射放大反應而製得。製造抗體時，抗原與用以使動物免疫之佐劑[如弗利昂(Freunds)佐劑]結合，以擴大免疫反應。注射之抗原量必須適於誘發出足量供檢測用之抗體。在相隔一定的時間內，可以進行多重注射，使抗體產量最適化。注射時間表依所用的動物而定。將動物放血，先藉由測試血液評估抗體產量。抗體產量係使用痕量(trail)血及酵素免疫分析法(EIA)證實。抗體藉由層析(較佳，親和性管柱層析)予以純化。

於基本夾層分析法中，若第一抗體鍵結於固體載體上，則第二抗體必須以檢測劑標示，該檢測劑可以是已知之免疫計量分析法中所用的任何標記。例如酵素型標示物(如鹼性磷酸酶或辣根過氧化酶等)、螢光劑、發光劑或放射性標記(如螢光黃、薔薇紅、鎔、胺基苯二醯肼、吡及放射活性同位素 I^{125} 等)或膠體粒子(如金及硒等)，皆是標記中可用於免疫分析法者。此等標記中，最常見的為酵素型標示

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (1)

物，如辣根過氧化酶(HRP)或鹼性磷酸酶。特定言之，HRP標記可在顏色定量分析中，藉由使 HRP 與二胺基聯苯胺、四甲基聯苯胺、4-氯-1-萘酚反應或其他類似的化學反應檢測出。顏色定量反應產物可用平面讀數器、掃描器、密度計或肉眼觀察檢測。幽門螺桿菌的量可藉由使樣品讀值與彼等包含已知量抗原的標準值比較而決定。較佳係使用數種標準值，以”框出(bracket)”受試樣品中之標記濃度。

放射性同位素如 ^{125}I 碘或 β -發射體如 ^{14}C 係另一種常用的標記，彼等可藉由 γ 計數器或閃爍計數器檢測。螢光標記亦可用於以螢光計檢測標示之抗體。

固體載體可以是已知之免疫分析法所用的任何固體承載物。該固體載體可為 ELISA 用之承載物如多孔盤，其可於平面讀數器中讀取。或者，該固體載體可為容許樣品呈液體或溶於固定相之層析分析法進行者。此等承載物之實例包含例如管柱層析法中所用的硝化纖維素或基質膜。

下述非用以限定之實例包含於本文，以說明血液中幽門螺桿菌抗原之檢測法。

實例 1

幽門螺桿菌抗原及核酸的製備

ATCC 菌株 43504、43571、43629 及 49053 之幽門螺桿菌菌種貯液分別置於室溫解凍，並在 5 毫升布魯塞拉(Brucella)培養液中稀釋。稀釋後，立即將 0.2 毫升稀釋之細菌懸浮液塗佈於補充以 5%羊血之胰蛋白酶分解大豆血瓊

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (8)

脂培養皿上。該等培養皿於微量需氧的條件下培養，使細菌生長。培養後，將菌落刮離培養皿，以 PBS 洗滌兩次。經洗滌之沈澱物懸浮於 PBS。

收集來自各幽門螺桿菌菌株之抗原時，係將幽門螺桿菌細胞轉移至冰冷的容器中，並以 Microson XL200 超音波細胞粉碎器進行超音波 10 分鐘。經超音波處理的細菌懸浮液於 2-8℃，以 25,000xg 離心 30 分鐘。將懸浮液保存作為製造幽門螺桿菌抗體之免疫原。

為自各幽門螺桿菌菌株收集核酸，可使用於 100 mM Tris-HCl(pH 8.8)中之 1% SDS 溶解幽門螺桿菌細胞。接著可以相同體積的酚/氯仿萃取該溶胞產物一次，再以相同體積之酚/氯仿/異戊醇(25:24:1)萃取兩次。在氯仿/酚萃取後，可於室溫下，使染色體 DNA 於 0.6 倍體積異丙醇中沈澱。於 13,000 xg 離心 15 分鐘後，核酸沈澱物以 70%乙醇洗滌，並溶解於 10 mM Tris-HCl 及 1 mM EDTA(pH 8.8)中。

實例 2

使用 PCR 擴增法檢測血液中之幽門螺桿菌 DNA

由幽門螺桿菌菌株取得之 DNA 可經限制核酸內切酶消化。適當的限制核酸內切酶包含，但不限於，HindIII、EcoRI、BamHI、ClaI、及 XbaI。所得片段可在置於 Tris-乙酸鹽-EDTA 緩衝液中之瓊脂糖凝膠上跑電泳。DNA 片段可用購自柏林格曼哈明(Boehringer Mannheim，德國)之瓊脂糖凝膠萃取套組，自瓊脂糖凝膠上萃取。由於幽門螺桿

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (19)

菌菌株在基因層次有高度變異，因此有益於藉由比較來自各幽門螺桿菌菌株的 DNA 片段，發現共有片段。

兩股上共有片段之 DNA 序列，可使用雙股 DNA 模板及二去氧鏈終止程序[如山格(Sanger)等，於 Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1977)，71：1342-1346 說明者] 予以決定。依據共有片段之保留序列，可使用 DNA 合成儀，依下述製程合成寡核苷酸引子。PCR 引子長度一般約 20 bp，較佳範圍為 15-25 bp。當二引子長度相同，且具有大致相同的核苷酸組成時，可獲得較佳之擴增。僅與抗原專一性核酸雜交之 PCR 引子為較佳，因為有擴增時，表示存有幽門螺桿菌專一性核苷酸序列。

編碼抗原之 DNA 片段可由熟習技藝之人士於獲得樣本核酸後，使用慣用方法及慣用量之實驗而獲得。

PCR 擴增法可以在含有下列物質的混合物中進行：作為模板的血漿 DNA 萃取物、幽門螺桿菌抗原引子、迪那然(Dynazyme)緩衝液[可購自芬蘭，伊斯普(Espoo)，菲然(Finnzymes)]、四種去氧核苷酸之混合物、及迪那然]。血漿 DNA 係以如幽門螺桿菌細胞之核酸萃取法的相同方法予以萃取，但最後加添一使萃取物通過微康(Microcon) 100 濾器的步驟。此最後步驟係用以去除殘留之非生物性抑制物質以及複合多醣(已知為強力的 PCR 抑制劑)，並使 DNA 沈澱作用消失。

可先使反應覆以礦物油，並加熱至 94℃，歷時 10 分鐘以後，再於柏金-艾爾墨(Perkin-Elmer) DNA 熱循環器[

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (50)

美國，加州，諾沃克(Norwalk)]中開始 PCR 循環。前 5 個循環的參數可以為：94℃變性 2 分鐘、42℃黏接 1 分鐘、及於 72℃擴展 1 分鐘。接著使用下述參數進行 30 個循環：94℃變性 2 分鐘、59℃黏接 1 分鐘、及於 72℃擴展 1 分鐘。於最後一個循環期間，擴展可以是 10 分鐘。可使 PCR 反應停留於 4℃，PCR 產物亦可在瓊脂糖凝膠上分析。PCR 產物的大小可與在幽門螺桿菌菌株中發現的共有片段評估及比較。

當其大小與該共有片段的大小相同時，判定為陽性結果。PCR 產物可藉由南方印跡雜交法，以由共有片段擴增的經 ^{32}P CTP 標示之 DNA 探針確認為幽門螺桿菌序列。或者，PCR 產物與共有片段可經限制酶如 AluI、HinfI 及 HaeIII 消化，消化物可藉瓊脂糖凝膠電泳分析消化圖樣。相同的圖樣表示 PCR 產物係衍生自幽門螺桿菌序列。

實例 3

使用 LCR 擴增法檢測血液中之幽門螺桿菌 DNA

連接酶鏈反應(LCR)分析需要兩組二種寡核苷酸及 DNA 連接酶。第一組寡核苷酸[即，寡核苷酸 A(Oligo A)及寡核苷酸 B]彼此相連，且互補於目標 DNA 雙股中之一股。第二組寡核苷酸[即，寡核苷酸 C 及寡核苷酸 D]互補於第一組，因此位居於目標 DNA 第二股上之相鄰位置。所有四種寡核苷酸探針皆可依幽門螺桿菌菌株之保留序列設計，且可在應用生物系統[Applied Biosystems(加州，福斯

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (ㄣ)

特市(Foster city))] 寡核苷酸合成儀上合成，及以 PAGE 純化。可藉由使寡核苷酸 A 及寡核苷酸 D 在 37℃，腺苷酸 5'(γ - ^{32}P)三磷酸酯及多核苷酸激酶存在下，在 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、7 mM MgCl_2 及 1 mM 二硫蘇糖醇中，保溫 30 分鐘，而使其 5'端經放射線標示。接著可使多核苷酸激酶在 70℃加熱，而不活化。可將等量之各經放射線標示的寡核苷酸探針 A 及 D，以及各寡核苷酸探針 B 及 C，連同由血清樣品萃取出之 DNA 模板，一起加至微量試管(eppendorf tube)中。各個試管含有由下列組分組成的反應緩衝液：50 mM 雙-Tris pH 6.5、10 mM MgCl_2 、10 mM KCl、1 mM 二硫蘇糖醇及 1 mM NDA。再於每一試管上覆蓋適量的礦物油，試管加熱至 100℃，歷時 3 分鐘，接著冷卻至 85℃，歷時 1 分鐘，再保持於 55℃，同時添加 DNA 連接酶。較佳之 DNA 連接酶為衍生自 *Pyrococcus furiosus* 之 Pfu DNA 連接酶。接著可將反應試管置於 DNA 熱循環器[RoboCycler，史崔塔金(Stratagene)]中，於 85℃ 及 50℃間循環 20、30 或 40 次，每一溫度歷時 1 分鐘。每一反應的等分試樣(aliquot)可經 95%甲醯胺終止染料 1:1 稀釋。此經稀釋的樣品可於丙烯醯胺凝膠上分析。

實例 4

幽門螺桿菌 DNA 探針之製備

來自幽門螺桿菌菌株之幽門螺桿菌 DNA 片段(一般具有至少 25 個鹼基，更常為至少約 30 個鹼基，可具高達約

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

10,000 個鹼基或更多，但通常具有不多於約 5,000 個鹼基)可在電泳後，自瓊脂糖凝膠切割及萃取出來。此 DNA 片段可經限制核酸內切酶消化，並與載體黏接，形成重組質體構築物。例如，該 DNA 片段可經 ClaI 消化，並黏接於經 ClaI 消化之 Pev-Vrf 表現載體[克勞爾(Crowl)等，基因(Gene)(1985)，38：31-38]。該重組質體可使宿主細胞(可為原核細胞，如大腸桿菌 RRI，或真核細胞如 NIH 3T3 細胞或 Hela 細胞)轉形。該重組質體可藉由在宿主細胞中複製而繁殖。該經繁殖的重組質體可依據梭(Se)等，Infect. Immun.(1978)，21：405-411 所述方法單離。可以相同的限制核酸內切酶消化該質體，而釋出來自幽門螺桿菌之 DNA 片段。經釋出之幽門螺桿菌 DNA 片段可進行瓊脂糖凝膠電泳或聚丙烯醯胺電泳。此經繁殖之 DNA 可再由放射性同位素(如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 等)或螢光(例如使經異羥基洋地黃毒苷配基及生物素標示的 DNA 探針與螢光檢測法聯合使用)予以標示，並使用作為探針。

實例 5

使用幽門螺桿菌 DNA 探針製備斑點雜交

硝基纖維素濾紙可藉由在水中煮沸或高壓蒸氣滅菌法予以滅菌。將一張無菌濾紙放置於瓊脂表面，並以業經處理而釋出 DNA 之血清予以沾染(spotted)。例如，血清樣品可以用稀釋之鹼水溶液(如 0.1 至 1 M NaOH)予以溶解。其他變性劑包含，但不限於，高溫、有機試劑(如醇類、醯胺

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (21)

類、胺類、脲類、酚類及亞砷類)、或某些無機離子(如硫代氰酸根離子及過氯酸根離子)。

待樣品變性後，濾紙可以在緩衝水溶液(通常於 pH 約 6 至 8，一般為 7)中洗滌。待溶解、變性、洗滌後，該經樣品 DNA 沾染的濾紙可在高溫下(一般約自 50°C 至 70°C)乾燥，以使樣品 DNA 固定於濾紙上。

接著可使濾紙與不含探針的雜交溶液在略為昇高的溫度中保溫一充分的時間，使濾紙完全濕潤。多種雜交溶液可予以使用，包括約 20 至 60，較佳 30 體積百分比之惰性極性有機溶劑。一般的雜交溶液係使用約 50%甲醯胺、約 0.5 至 1 M 氯化鈉、約 0.05 至 0.1 N 檸檬酸鈉、約 0.05 至 0.2%十二烷基硫酸鈉(SDS)、及微量 EDTA、氟考(ficoll，約 300-500 仟道耳)、聚乙烯吡咯烷酮(約 250-500 仟道耳)及血清白蛋白。該雜交溶液中亦可包含約 0.5 至 5 毫克/毫升之經超音波振盪的變性 DNA(例如牛胸腺或鮭魚精子)，及視需要之約 0.5 至 2%重量/體積甘油。亦可包含其他添加劑，如約 100 至 1,000 仟道耳，且含量約為雜交溶液的 8 至 15 重量%之硫酸葡聚糖。

經標示的 DNA 探針的含量範圍變化大，全依該標記的性質、其是否可以適度地鍵結於濾紙、以及雜交強度而定。一般而言，應使用大體上超過該探針之化學計量的量，以增強探針與該固著的樣品 DNA 間之鍵結速率。

在室溫下，以具有該雜交溶液中提供的類似濃度之氯化鈉、檸檬酸鈉及 SDS 的第二溶液浸洗濾紙後，可依標記

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (4)

的性質分析存於濾紙上的二倍體。若標記具放射活性，則可將濾紙乾燥，並曝露於 X 光底片。若標記為螢光，則可直接使用螢光顯微鏡檢視。

該探針與其所雜交的序列間不需完全互補；其可有 30% 或更多的錯誤配對。影響 DNA 雜交體形成的條件為已知，且由克羅沙 (Crosa) 等詳細說明於 J. Bact. (1973)，115(3)：904-911。

實例 6

製造抗幽門螺桿菌之兔子多株抗體

紐西蘭白兔先經肌內注射含有 0.5 至 1.0 毫克幽門螺桿菌抗原之完全弗利昂 (Freund's) 佐劑，使之免疫化，每四週再追加注射 0.5 至 1.0 毫克含於不完全弗利昂佐劑中的相同抗原。在第三次追加注射以後，測試血液，以供分析。一旦抗體力價到達約 10^6 的所需量時，開始進行放血。

每隻動物的血先於 PBS 中稀釋至 1×10^6 。接著將 100 微升經稀釋的兔子血清加至經幽門螺桿菌抗原塗佈之孔中。在室溫保溫 1 小時後，該培養皿經 PBS 洗滌 4 次，再添加 100 微升山羊抗兔子 IgG-HRP 共軛體。使培養皿於室溫下繼續保溫 30 分鐘。以 PBS 洗滌 4 次後，於每孔中添加 100 微升四甲基聯苯胺 (TMB) 受質，使顏色顯色，使用微孔讀數器，於 450/650 nm 測每孔的顏色強度。OD 450/650 必須大於 1.0，使之有資格用於抗體之製造。

五、發明說明 (35)

實例 7

抗體-HRP 酵素共軛體之製備

選擇用酵素辣根過氧化酶(HRP)與抗幽門螺桿菌抗體共軛。抗體-HRP 酵素共軛體之製法係依據納肯(Nakane)之改良方法[納肯等，1978：免疫螢光及相關之染色技術(In immunofluorescence and related staining techniques)，柯納普(Knapp)等編輯，第 215-220 頁，艾利沙伯/北荷蘭生物醫學出版社(Elisiver/North-Holland Biomedical Press)，阿姆斯特丹]。

簡言之，先以偏高碘酸鈉對 HRP 進行氧化處理。此氧化反應在醯側鏈生成醛基。接著於鹼性 pH 下，混合抗體與氧化的 HRP，使抗體上的胺基與 HRP 上的醛基反應，形成席夫鹼(Schiff base)，並還原成抗體與 HRP 間的共價鍵。該抗體-HRP 酵素共軛體再經 sephacryl-300 管柱進行凝膠過濾而純化。

HRP 可共軛於一次抗體如抗幽門螺桿菌之兔子抗體，或二次抗體如抗兔子 IgG 之山羊抗體。

實例 8

凝膠電泳與免疫印跡分析

血清樣品可藉由 SDS-PAGE 予以分析。待電泳後，可將凝膠固定，並可藉由奧克雷(Oakley)等之改良的銀染色法，Anal. Biochem.(1980)，105：361-363，分解蛋白質。

或者，可在 1 安培下，進行電印跡 1 小時，將蛋白質

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (58)

佳之鹽為 KCl。第二類分離試劑為含有清潔劑如 SDS、土溫乳化劑 20、辛基葡萄糖苷、去氧基膽酯、及 Triton X-100 之溶液。此等清潔劑可單獨使用或任意組合使用。清潔劑之較佳濃度係大於 1%。第三類分離試劑為含有促混亂劑 (chaotropic agents) 如胍鹽酸鹽、脲、及硫代氰酸鉀 (KSCN) 之溶液。此等促混亂劑的濃度應至少大於 2 M。第四類分離試劑為含有有機溶劑如 10% 二噁烷及 40% 乙二醇之溶液。

或者，可在樣品分離條件下處理血清樣品，樣品分離條件可為高或低 pH，或高溫。較佳之高 pH 為 9 或更高。較佳之低 pH 為 3 或更低。較佳之高溫為至少 50°C。

此外，經分離處理之血清樣品可用以蛋白質為主的試劑處理，以減少交聯反應。較佳之蛋白質為主的試劑包含下列蛋白質中之至少一者：胎牛血清、豬血清、正常的山羊血清、馬血清、酪蛋白、白蛋白、明膠、及牛血清白蛋白。

實例 10

兔子抗幽門螺桿菌抗體之親和性純化

A. 親和性管柱之製備

將 1 至 5 克之幽門螺桿菌細胞糊懸浮於 12.5 毫升之含有辛基葡萄糖苷的 PBS 緩衝液 (0.1 M 磷酸鈉、0.15 M NaCl，pH 7.2)，並於室溫攪拌 30 分鐘。接著使懸浮液於冰浴中，以最大輸出能超音波振盪 10 分鐘，每超音波振盪 1 分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (29)

鐘即中斷 1 分鐘。待超音波振盪後，不溶物質藉由在 25,000 g 下離心 30 分鐘而去除。保留上清液，蛋白質濃度以 PBS 調至 1-3 毫克/毫升。接著將於 PBS 中預平衡之胺基聯結(Aminolink)偶合膠[由派爾斯(Pierce)製造]，以每毫升充填凝膠 1-10 毫克蛋白質的比例加至上清液中，再於每毫升充填凝膠中添加 10-40 微升含於水中之 5 M 氰基硼氫化鈉。接著使反應漿液在 4℃，緩緩混合下，保溫隔夜(至少 6 小時)。保溫後，將凝膠漿液倒入適當大小的層析管柱中，傾出過量液體。管柱再以兩個管柱體積量的偶合緩衝液、及兩個管柱體積量的 1 M Tris-HCl(pH 7.4)依序溶離。經洗滌之凝膠再懸浮於 1 管柱體積量的 1 M Tris-HCl(pH 7.4)緩衝液中。再次懸浮後，在每毫升充填凝膠中添加 10-40 微升 5 M 氰基硼氫化鈉。所得懸浮液於室溫保溫下，緩緩攪拌 1 小時。將管柱中的水排出，以 PBS 廣泛洗滌，以去除管柱中任何未偶合的抗原。

B.以親和性管柱純化抗體

純化兔子抗體時，將等體積量的硫酸銨飽和溶液緩緩加至等體積量之兔子血清中，以沈澱幽門螺桿菌抗體。待於室溫攪拌 30 分鐘後，沈澱物藉離心 30 分鐘予以收集，再溶解於 PBS 中，並在超出 100 倍的 PBS 中滲析。滲析後，溶液經由 0.2 微米的濾膜過濾，並填充於親和性管柱。填充後，管柱以 PBS 廣泛洗滌，直至溶離液達到基線。接著以含於水中之 3 M KSCN 使管柱中之抗幽門螺桿菌專一

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

包含 3 個受試個體。結果以 OD_{450/650} 表示。幽門螺桿菌抗原之存在與量可在 450 nm 波長處測得(650 nm 表示測得背景[即，培養皿]的波長)。OD_{450/650} 表示 OD₄₅₀ 處之讀值減掉 OD₆₅₀ 處之讀值。OD_{450/650} 為 0.1 之樣品代表陰性結果(即，沒有幽門螺桿菌感染)。

表 2 血清 ELISA 試驗(實驗 1)

	OD _{450/650}	結果
Pos 樣品 #1	0.712	陽性
Pos 樣品 #2	0.487	陽性
Pos 樣品 #3	0.187	陽性
Neg 樣品 #4	0.076	陰性
Neg 樣品 #5	0.048	陰性

表 3 血清 ELISA 試驗(實驗 2)

	OD _{450/650}	結果
Pos 樣品 #6	0.311	陽性
Pos 樣品 #7	3.846	陽性
Neg 樣品 #8	0.083	陰性
緩衝液	0.097	陰性

實例 12

經親和性純化及 DEAE 純化的幽門螺桿菌抗體間在免疫分析法上之比較研究

表 4 說明經親和性管柱純化之幽門螺桿菌抗體及經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (2)

DEAE 管柱純化的幽門螺桿菌抗體間，在 ELISA 上的比較研究。

以親和性管柱進行幽門螺桿菌抗體之純化作用說明於實例 5(前文)。DEAE(二乙胺基乙基纖維素)管柱說明如下：

在室溫下，以 0.0175 M 磷酸鉀(pH 6.5)平衡 DEAE 管柱。在管柱上放置含有幽門螺桿菌抗體之上清液。收集溶離部分。測定蛋白質濃度(OD₂₈₀)，匯集所有大於 0.200 的部分。

經親和性純化與經 DEAE 純化的抗體以磷酸鹽緩衝液系列稀釋至 20 微克/毫升與 2.0 微克/毫升之間。將各稀釋液的 0.1 毫升等分試樣加至柯斯達 EIA 帶培養皿，加蓋，在室溫中保溫隔夜。培養皿以 PBS 洗滌一次，在室溫中，以含於 PBS 之 1% BSA 阻斷 4 次。數種陽性試樣及陰性試樣在樣品稀釋液(PBS-BSA)中作 1：5 稀釋。將各樣品(0.1 毫升)加至 DEAE 抗體塗佈之帶的孔或加至親和性純化抗體塗佈之帶的孔(作為對照組)，同時與 0.1 毫升先前接受之經 DEAE 及/或親和性純化之兔子抗幽門螺桿菌辣根過氧化酶共軛體(見表 4)一起保溫。在室溫中保溫 60 分鐘後，充分洗滌樣品，以去除未鍵結的樣品以及經酵素標示的抗體。在室溫下添加四甲基聯苯胺，保溫 10 分鐘。以 0.1 毫升 1 N 硫酸停止顏色發展，培養孔在 OD 450/650 nm 光譜下讀值，以測定各樣品的反應性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

表 4：經 DEAE 與親和性純化之抗體的比較

	分析 1	分析 2	分析 3	分析 4
培養皿	親和性	親和性	DEAE	DEAE
共軛體	親和性	DEAE	DEAE	DEAE(一半強度)
負對照組	0.009	0.223	0.212	0.085
正對照組	1.320	1.366	1.111	0.879
陽性樣品 1	2.364	2.813	1.259	0.766
陰性樣品 2	0.013	0.154	0.114	0.049
陰性樣品 3	0.024	0.323	0.245	0.112
陽性樣品 4	0.354	0.398	0.158	0.084

表 4 清楚說明：經親和性純化之抗體及經親和性純化之共軛體，在所謂的低背景讀值及高度(更敏感)陽性樣品讀值上產生最好的結果。將經親和性純化之抗體使用於培養皿及共軛體兩方面，作為參考標準(分析 1)。其他所有的分析結果皆與該參考標準作比較。當與該參考標準比較時，DEAE 培養皿及 DEAE 共軛體，由於高背景值(即，具有比陰性樣品更高之 OD)顯示偽陽性結果，且陽性樣品的 OD 減少(分析 3)。以 DEAE 培養皿取代親和性培養皿時，提高陽性訊息，但仍存有較高的背景值，而得到偽陽性結果(分析 2)。將 DEAE 共軛體濃度降為原始濃度的 50%時，背景值減少，但陽性訊息亦減少，顯示偽陰性結果 (分析 4)。

實例 13

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明(34)

免疫層析分析

免疫層析分析裝置具有一個其上含兩個視窗：”樣品添加視窗”及”結果觀察視窗”之外置塑膠盒。移動相可由該”樣品添加視窗”添加，其上亦含有”標示墊片(label pad)”或含有第二抗體之貯藏器，係由檢測劑如免疫金標示者。將墊片放置在樣品添加點與”結果觀察視窗”下緣之間。”結果觀察視窗”覆蓋於靜相上，其含有沾染第一一次抗體之試驗線，以及沾染抗第二一次抗體之抗體的對照線。試驗線在樣品添加視窗與對照線之間。

進行試驗時，將 4-6 滴血清加至塑膠盒的樣品區域。流經含有經純化的幽門螺桿菌抗體之標示墊片與免疫金或其他標記的紅色偶合。樣品(現在含有經標示的抗體)將試驗帶上移，使之首先通過試驗線，再通過對照線。若樣品含有幽門螺桿菌抗原，則抗體會鍵結於與紅色免疫金偶合之抗原，並轉而鍵結在呈線狀之沾染於(固定於)硝化纖維素膜上的幽門螺桿菌抗體。當幽門螺桿菌抗體-抗原-抗體複合物被捕獲時，在結果視窗可以看到紅色試驗線(膜-抗體:抗原:抗體-紅色免疫金)。對照線經山羊抗兔子抗體沾染。當樣品流過時，幽門螺桿菌-免疫金-抗體被山羊抗兔子線捕獲(若使用單株抗體與呈色粒子偶合時，對照線應被山羊抗老鼠沾染)，以確保步驟之進行正確。

樣品液(可能含有其他移動相)可由較低部分移行至較高部分(層析效應)，且所有多餘的液體會被置於頂端之吸收墊片拉向塑膠盒的較高部分。若樣品中不含抗原，則在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明（ 35 ）

試驗終了時，只能看見對照線。若抗原存在，則只能看見試驗線。

經由本發明之詳細說明以及參考較佳具體例後，熟習技藝之人士應顯見，只要不違逆如下文附記之申請專利範圍所定義的本發明範疇，任何修改或變異皆為可能。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：)

血液中幽門螺桿菌抗原

本發明係關於發現並檢測受感染個體之血液中的幽門螺桿菌(*H. pylori*)抗原。幽門螺桿菌抗原係來幽門螺桿菌細胞之成分，其包含，但不限於 DNA、RNA 及核苷酸、蛋白質或胜肽之片段。幽門螺桿菌 DNA、RNA 及核苷酸片段可藉由聚合酶鏈反應(PCR)、連接酶鏈反應(LCR)或 DNA 雜交法或其他擴增法檢測。幽門螺桿菌蛋白質或其胜肽或其他的抗原性成分可藉由使用抗幽門螺桿菌之抗體，較佳係由親和性管柱純化得之抗體之免疫分析或免疫印跡法予以檢測。本發明進一步提供用於檢測血清樣品中之幽門螺桿菌抗原之免疫分析方法、診斷套組及免疫層析分析裝置。

英文發明摘要 (發明之名稱：**Helicobacter Pylori Antigens in Blood**)ABSTRACT

The present invention relates to the finding and detection of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) antigens in blood of infected individuals. The *H. pylori* antigens are components of *H. pylori* cells which include, but not limited to DNA, RNA, and fragments of nucleotides, proteins or peptides. *H. pylori* DNA, RNA, and fragments of nucleotides can be detected by polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR), or DNA hybridization methods or other amplification methods. *H. pylori* proteins or peptides or other antigenic components thereof can be detected by immunoassays or immunoblot using an antibody against *H. pylori*, preferably an antibody purified by an affinity column. The present invention further provides immunoassay methods, diagnostic kits, and an immunochromatographic assay device for detection of *Helicobacter pylori* antigens in serum samples.

六、申請專利範圍

及

檢測該血清樣品中幽門螺桿菌之存在。

6.如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該第一及第二抗體之一係鍵結於固體載體，另一者則經檢測劑標示。

7.如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該固體載體為聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯或硝化纖維素膜。

8.如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該檢測劑包括選自由下列組群所成之至少一者：檢測劑可為酵素型標示物、螢光或發光劑、放射性活性標記及呈色粒子。

9.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該酵素型標示物包括鹼性磷酸酯或辣根過氧化酶。

10.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該螢光或發光劑包括選自由下列組群所成之至少一者：螢光黃、薔薇紅、鎔、胺基苯二醯肼及吖。

11.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中該呈色粒子包括選自由下列組群所成之至少一者：金、銀、藍膠乳、及硒。

12.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第一抗體係鍵結於該固體載體，而該第二抗體係經該酵素型標示物標示。

13.如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該第一抗體係經該呈色粒子標示，而該第二抗體係鍵結於該固體載體。

14.如申請專利範圍第 5 項之方法，進一步包括以分離劑或樣品分離條件處理該血清樣品的步驟。

15.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該分離劑包括

六、申請專利範圍

具有至少 1M 莫耳濃度之 NaCl 或 KCl。

16.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該分離劑包括清潔劑，該清潔劑包括選自由下列組群之至少一者：SDS、土溫乳化劑 20、辛基葡萄糖苷、去氧基膽酯及 Triton X-100。

17.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該分離劑包括有機溶劑，該有機溶劑包括選自由下列組群之至少一者：二噁烷及乙二醇。

18.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該分離劑包括選自由下列組群所成之促混亂劑：胍鹽酸鹽、脲及硫代氰酸鉀。

19.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該分離劑包括選自由下列組群所成之至少一種酵素：蛋白酶及脂酶。

20.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該樣品分離條件包括將該體液之 pH 調至不低於 9 或不高於 3。

21.如申請專利範圍第 14 項之方法，其中該樣品分離條件包括將該血清樣品之溫度調至不低於 50°C。

22.如申請專利範圍第 14 項之方法，進一步包括使該血清樣品與以蛋白質為主之試劑反應。

23.如申請專利範圍第 22 項之方法，其中該以蛋白質為主之試劑包括選自由下列組群之至少一者：胎牛血清、豬血清、正常的山羊血清、馬血清、酪蛋白、白蛋白、明膠、及牛血清白蛋白。

24.如申請專利範圍第 5 項之方法，進一步包括：

製備抗產生對抗該第二抗體之動物物種的抗體之二次

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

六、申請專利範圍

抗體；及

使該第二複合物與該二次抗體接觸，形成第三複合物。

25.如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該二次抗體係經包括選自由下列組群所成之至少一種檢測劑標示者：酵素型標示物、螢光或發光劑、放射性活性標記及呈色粒子。

26.一種檢測血清樣品中的幽門螺桿菌之診斷套組，包括：

抗幽門螺桿菌之第一抗體，其中該第一抗體係經親和性管柱純化，且該第一抗體鍵結於一固體載體；及

經檢測劑標示之抗幽門螺桿菌的第二抗體，其中該第二抗體係藉親和性管柱予以純化者；及

適於檢測或擴增該檢測劑的試劑。

27.如申請專利範圍第 26 項之診斷套組，進一步包括以蛋白質為主之試劑，該以蛋白質為主之試劑包括選自下列組群之至少一者：胎牛血清、豬血清、正常的山羊血清、馬血清、酪蛋白、白蛋白、明膠、及牛血清白蛋白。

28.如申請專利範圍第 26 項之診斷套組，進一步包括分離劑，該分離劑包括選自下列組群之至少一者：至少 1M 之 NaCl、至少 1M 之 KCl、胍鹽酸鹽、脲、硫代氰酸鉀、SDS、土溫乳化劑 20、辛基葡萄糖苷、去氧基膽酯、Triton X-100、二噁烷、乙二醇、蛋白酶及脂酶。

29.如申請專利範圍第 26 項之診斷套組，其中該檢測劑為辣根過氧化酶，該試劑為四甲基聯苯胺受質。

30.一種檢測血清樣品中的幽門螺桿菌之診斷套組，包

六、申請專利範圍

括：

抗幽門螺桿菌之第一抗體；

抗幽門螺桿菌之第二抗體；

抗產生對抗該第二抗體之動物物種的抗體之二次抗體，其中該二次抗體係經包括選自由下列組群所成之至少一種檢測劑標示者：酵素型標示物、螢光或發光劑、放射性活性標記及呈色粒子；及

適於檢測或擴增該檢測劑的試劑；

其中，該第一抗體與該第二抗體係經親和性管柱予以純化。

31.如申請專利範圍第 30 項之套組，其中該檢測劑為辣根過氧化酶，該試劑為四甲基聯苯胺受質。

32.一種檢測血清樣品中的幽門螺桿菌之免疫層析分析裝置，包括：

具有樣品添加區及結果觀察區之固體載體，其中該血清樣品係添加至該樣品添加區；

抗幽門螺桿菌之第一抗體，其中該第一抗體係經呈色粒子標示，且該第一抗體連接於該樣品添加區與該結果觀察區之間；

抗幽門螺桿菌之第二抗體，其中該第二抗體係鍵結於該結果觀察區之層析介質上；

其中，該第一抗體與該第二抗體係經親和性管柱予以純化。

33.如申請專利範圍第 32 項之免疫層析分析裝置，其中

六、申請專利範圍

該固體載體為硝化纖維素膜、聚酯膜、或尼龍膜。

34.如申請專利範圍第 32 項之免疫層析分析裝置，其中該呈色粒子係由下列組群選出者：金、銀、藍膠乳、及硒。

35.如申請專利範圍第 32 項之免疫層析分析裝置，進一步包括抗產生對抗該第一抗體之動物物種的抗體之二次抗體，該二次抗體係鍵結於比該第二抗體之該樣品添加區更遠之該結果觀察區邊緣。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

申請日期	89.12.12.
案 號	89126726
類 別	G01N 33/569

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	血液中幽門螺桿菌抗原
	英 文	Helicobacter Pylori Antigens in Blood
二、發明 創作人	姓 名	1.伊慶燧 2.洪忠和
	國 籍	1.2.美國
	住、居所	1.2.美國 加州 94030 米爾布列 極區道 500 號
三、申請人	姓 名 (名稱)	九毓生物科技股份有限公司
	國 籍	中華民國
	住、居所 (事務所)	台灣省台北縣汐止市建成路 56 巷 69 弄 1 號 11 樓之 2
	代 表 人 姓 名	伊慶燧

裝

訂

線

五、發明說明()

或者，可在 1 安培下，進行電印跡 1 小時，將蛋白質轉移至硝化纖維素濾紙。以阻斷劑如土溫乳化劑-20 及脫脂乳阻斷未經佔領的鍵結位置後，將如實例 6(前文)所述之足量的幽門螺桿菌抗體添加於該硝化纖維素濾紙上。接著可使該硝化纖維素濾紙在室溫下保溫 1 小時。最後，可將對抗產生抗幽門螺桿菌抗體之動物物種的免疫球蛋白(如山羊抗兔子 IgG)的二次抗體之鹼-磷酸酶共軛體加至硝化纖維素濾紙上。反應可藉由添加 5-溴-4-氯-3-苄基磷酸鹽(BCIP)/硝基藍四唑鎗(NBT)予以檢測。

實例 9

自由態血清幽門螺桿菌抗原之製備

血清幽門螺桿菌抗原可以自由態及免疫複合物的形式存在。自由態的幽門螺桿菌抗原可藉由免疫分析法或任何抗原檢測方法迅速測得。至於彼等抗原與血清幽門螺桿菌抗體免疫複合之抗原，僅可在其與該免疫複合物分離後測得。

有關血清幽門螺桿菌抗原係以自由態及免疫複合物的形式存在，且自由態的幽門螺桿菌抗原可藉由本發明之 ELISA 迅速測得，但該免疫複合物無法由相同方法迅速測得的證據乃證明於表 1。

表 1 為血清幽門螺桿菌之攪合研究。受試樣品中，無一者含幽門螺桿菌抗原。然而，雖然血清中沒有幽門螺桿菌抗原之存在，但相對於不含任何血清樣品幽門螺桿菌抗體(即，"抗體陰性樣品")者，或許由於先前遭感染的關係

五、發明說明 ()

，其可能含有幽門螺桿菌抗體(即，"抗體陽性樣品")。於攪合組，在"抗體陰性"及"抗體陽性"的血清樣品中，皆添加已知量的幽門螺桿菌抗原(1×10^5 個細菌/毫升)，該抗原為全細菌細胞或細胞溶胞產物。於"非攪合"組，不添加幽門螺桿菌抗原。

表 1 的結果顯示：在"抗體陰性"樣品中，幽門螺桿菌抗原之添加反映於 $OD_{450/650}$ 讀值增加。相反地，在"抗體陽性"樣品中添加幽門螺桿菌抗原時，其不會使 $OD_{450/650}$ 的讀值增加，而維持於如同"抗體陰性"樣品的相同量。一種似乎合理的解釋為：所添加的幽門螺桿菌抗原已與血清幽門螺桿菌抗體形成免疫複合物，其會干擾 ELISA 測定。

表 1 . 血清幽門螺桿菌之攪合研究

	1 x 10 ⁵ 個細菌/毫升	非攪合
試樣	$OD_{450/650}$	$OD_{450/650}$
緩衝液	3.866	0.077
Ab 陰性樣品 1	3.973	0.096
Ab 陽性樣品 1	0.336	0.120
Ab 陽性樣品 2	0.390	0.082

分離血清幽門螺桿菌抗原之免疫複合物時，可用分離試劑或在樣品分離條件下處理血清樣品。分離免疫複合物時廣用之分離試劑有 4 種主要類型。第一類分離試劑為 NaCl 或 KCl 之高鹽溶液。較佳之高鹽濃度為至少 1 M。較

五、發明說明()

性抗體溶離。匯集含有免疫球蛋白的部分，在 PBS 中滲析，PBS 至少更換兩次，以去除過量的 KSCN。然後將純化的抗體濃縮至約 1.0-2.0 毫克/毫升，並貯存於-20℃。

實例 11

血清抗原 ELISA 試驗

以標準方法，自全血中分離血清。經親和性純化的抗體在磷酸鹽緩衝液中系列稀釋至 20 微克/毫升與 1.0 微克/毫升之間。將各稀釋液之 0.1 毫升等分試樣加至柯斯達 EIA 帶培養皿(Costar EIA Strip Plate)，加蓋，在室溫中保溫隔夜。培養皿以 PBS 洗滌一次，在室溫中，以含於 PBS 中之 1% BSA 阻斷 4 次。去除 BSA 溶液後，將 0.1 毫升自由態血清樣品加至經抗體塗佈之微孔帶培養皿，加蓋，在室溫中保溫 2 小時。培養皿再經 PBS/吐溫洗液洗滌 5 次。然後，將 0.1 毫升與辣根過氧化酶共軛的兔子抗幽門螺桿菌加至各微孔中，加蓋，在室溫中保溫 1 小時。培養皿再次經 PBS/吐溫洗液洗滌 5 次，接著，於室溫中，以 0.1 毫升四甲基聯苯胺顯色 10 分鐘。在 450 nm 下測定顏色發展。以 0.1 毫升 1 N H₂SO₄ 停止反應。選擇產生最大光學密度及最低背景值的稀釋液作為最適稀釋液。

表 2 及 3 表示在不同時間，以不同血清樣品進行的兩組實驗。此等實驗顯示幽門螺桿菌之血清 ELISA 試驗結果。第 1 組實驗(表 2)包含 5 個受試個體。第 2 組實驗(表 3)

六、申請專利範圍

1.一種偵測幽門螺桿菌感染之方法，包括檢測血液中幽門螺桿菌(*H. pylori*)抗原，該抗原係藉由使用一對專一用於檢測幽門螺桿菌之引子進行聚合酶鏈反應(PCR)予以檢測。

2.一種偵測幽門螺桿菌感染之方法，包括檢測血液中幽門螺桿菌抗原，該抗原係藉由連接酶鏈反應(LCR)，使用DNA連接酶及專一性檢測幽門螺桿菌的第一組及第二組寡核苷酸，第一組之寡核苷酸彼此相連，第二組互補於第一組，第二組寡核苷酸彼此相連。。

3.一種偵測幽門螺桿菌感染之方法，包括檢測血液中幽門螺桿菌抗原，該抗原係藉由DNA雜交法，使用幽門螺桿菌DNA探針檢測者。

4.一種偵測幽門螺桿菌感染之方法，包括檢測血清中幽門螺桿菌抗原，該抗原係藉由抗幽門螺桿菌之抗體使用免疫分析法或免疫印跡分析法予以檢測。

5.一種檢測血清樣品中的幽門螺桿菌抗原之方法，包括：

製備該血清樣品；

製備抗幽門螺桿菌之第一抗體，其中該第一抗體係藉親和性管柱予以純化；

使該血清樣品與該第一抗體接觸，形成第一複合物；

製備抗幽門螺桿菌之第二抗體，其中該第二抗體係藉親和性管柱予以純化；

使該第一複合物與該第二抗體接觸，形成第二複合物；