

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/205

A61K 39/106 A61K 38/16

G01N 33/569

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98802028.9

[43]公开日 2000 年 2 月 16 日

[11]公开号 CN 1244871A

[22]申请日 1998.1.26 [21]申请号 98802028.9

[30]优先权

[32]1997.1.24 [33]GB [31]9701487.2

[32]1997.5.22 [33]GB [31]9710629.8

[86]国际申请 PCT/GB98/00220 1998.1.26

[87]国际公布 WO98/32768 英 1998.7.30

[85]进入国家阶段日期 1999.7.23

[71]申请人 科特克斯(英国)有限公司

地址 英国弗林特郡

[72]发明人 A·W·克里普斯 R·L·克兰西

L·麦克沙尼 C·J·史密斯

D·R·泰里曼

B·霍

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 黄革生

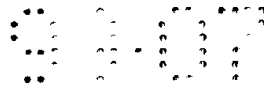
权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 幽门螺杆菌抗原群

[57]摘要

本发明提供了一组幽门螺杆菌新型抗原,并公开了这些抗原在诊断幽门螺杆菌感染中的用途,包括上述诊断的具体方法及可用于这种方法中的试剂盒。此外,还提供了这些抗原的新型抗原性片段,以及含有至少一种抗原或者含一种或多种抗原性片段的疫苗。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4



权 利 要 求 书

1. 一种蛋白质，它是幽门螺杆菌抗原，在变性及还原条件下测得其分子量在约43kDa至约53kDa之间。

2. 权利要求1的蛋白质，其分子量约为43kDa，并在其氨基末端有以下氨基酸序列：

M D L ? V L G I N T A

3. 权利要求1的蛋白质，其分子量约为43kDa，并在其氨基末端有以下氨基酸序列：

M R V P K (S) K G F A I L S K

4. 权利要求1的蛋白质，其分子量约为53kDa，并在其氨基末端有以下氨基酸序列：

? ? G K A P D F K P A

5. 一种蛋白质，它是幽门螺杆菌抗原，并具有以下特征：

(i) 在变性及还原条件下测得其分子量约为54kDa，并有以下N末端氨基酸序列：

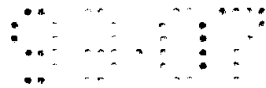
M L K(V) I(E) K(V or S) L E(S) I;

(ii) 在天然（非变性）条件下测得其分子量约为370kDa，并有以下N-末端氨基酸序列：

M(K) L T I - L E V(E);

(iii) 在天然（非变性）条件下测得其分子量约为140kDa，并有以下N末端氨基酸序列：

M Y I P Y V I E;



(iv)在天然(非变性)条件下测得其分子量约为90kDa, 并有以下N末端氨基酸序列:

M N L D C(S) L Q V

(v)在变性和还原条件下测得其分子量约为15.9-16.9kDa, 并有以下N末端氨基酸序列:

G K I G I F F G T D S G N A E A I A E K;

(vi)在天然(非变性)条件下测得其分子量约为344kDa, 并有以下N末端氨基酸序列:

M L V T K L A P D F L A P ? V; 或

(vii)具有以下N末端氨基酸序列的一种超氧化物歧化酶:

M F T L R E L P F A K D S N G D F L S P

其中上述序列中括号内字母表示括号前氨基酸的可替代氨基酸。

6. 权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质的抗原性片段。

7. 权利要求6的抗原性片段, 其具有以下序列:

M D L ? V L G I N T A;

? ? G K A P D F K P A;

M L K(V) I(E) K(V 或 S) L E(S) I;

M R V P K(S) K G F A I L S K;

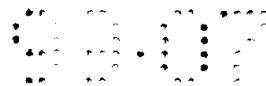
M(K) L T I - L E V(E);

M Y I P Y V I E;

M N L D C(S) L Q V; 或

G K I G I F F G T D S G N A E A I A E K;

M L V T K L A P D F L A P ? V; 或



M F T L R E L P F A K D S N G D F L S P

8. 含有至少一种如权利要求1至5中任一项的蛋白质或至少一种如权利要求6或7的抗原性片段的抗原组合物。

9. 权利要求8的抗原组合物，其中进一步含有一种或多种其他幽门螺杆菌抗原和/或它们的片段。

10. 权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质、权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9所限定的抗原组合物，其特征在于可用于检测和/或诊断幽门螺杆菌。

11. 检测和/或诊断幽门螺杆菌的一种方法，包括：

(a) 使待检样品与至少一种如权利要求1至5中任一项所限定的抗原性蛋白质、至少一种如权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9所限定的一种抗原组合物接触；及

(b) 检测幽门螺杆菌抗体的存在情况。

12. 权利要求11的方法，其中所述样品为唾液样品。

13. 权利要求11的方法，其中所述样品为血液样品。

14. 至少一种如权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质、至少一种如权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9所限定的抗原组合物在检测和/或诊断幽门螺杆菌中的用途。

15. 权利要求11至13中任一项的方法或权利要求14的用途，其中检测和/或诊断是在体外进行的。

16. 用于检测和/或诊断幽门螺杆菌的试剂盒，其中含至少一种如权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质，至少一种如权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9所限定的抗原组合物。

17. 能在受试者体内刺激免疫应答的组合物，内含至少一种如权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质，至少一种如权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9所限定的抗原组合物。

18. 权利要求17的组合物，它是疫苗组合物，其中还可任意含有一种或多种佐剂。

19. 至少一种如权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质、至少一种如权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9的抗原组合物在制备免疫原性组合物、优选疫苗中的用途。

20. 权利要求17或18所限定的免疫原性组合物在受试者体内诱导免疫应答中的用途。

21. 治疗或预防受试者感染幽门螺杆菌的一种方法，包括对受试者施用有效量的至少一种如权利要求1至5中任一项所限定的蛋白质、至少一种如权利要求6或7所限定的抗原性片段或者权利要求8或9所限定的抗原组合物。

22. 权利要求21的方法，其中所述至少一种蛋白质、至少一种抗原性片段或抗原组合物是以疫苗的形式施用的。

说明书

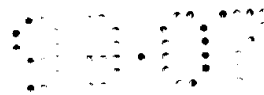
幽门螺杆菌抗原群

本发明涉及幽门螺杆菌新型抗原，或其抗原性片段，这些抗原或其片段在检测幽门螺杆菌中的应用及包含这些抗原或其片段的试剂盒，含有这些抗原或其片段的疫苗，以及分离这些抗原的方法。

肠道感染在哺乳动物，尤其在人体内，通过活化共同粘膜免疫系统，激发了粘膜分泌物（如唾液）中的免疫应答。尽管该应答通常以IgA抗体的出现为特征，但常常伴随引起了血清中的抗体应答。但分泌物（包括唾液）中的免疫应答在抗原（如细菌或病毒）从体内排除后迅速减弱。因此，粘膜分泌物中抗体的存在反映了当前感染，即同期感染。例如，就微生物感染而言，粘膜分泌物中的抗体，即后文所指的分泌型抗体，反映了微生物的当前定居状态，如定居在肠道内，因而可用于监控同期感染。另一方面，当微生物从体内排除后，血清抗体还将持续一段时间。故血清抗体检验阳性既反映抗原的过往存在又反映抗原的当前存在，对临床意义不大。而分泌型抗体检验阳性则指示当前或同期有微生物感染。

诊断幽门螺杆菌的感染可经显微镜检查，胃粘膜活检标本的微生物学培养或尿素酶检测，尿素呼吸检验(urea breath test)或用ELISA法检测血清中特异性抗体的存在。预计幽门螺杆菌在胃粘膜部位的感染会刺激胃分泌物中的IgA抗体应答。但结果发现粘膜分泌物中的幽门螺杆菌特异性抗体是IgG类而非预期的IgA类。如果有的话，也只是检测到极少量的IgA抗体。因而AU-A-9067676涉及粘膜分泌液中特异于幽门螺杆菌抗原的IgG的检测，并提供了监控哺乳动物体内由该微生物所致的当前（即同期）感染的方法。相关学术出版物为Witt等，粘膜免疫学前沿，卷1，693-696页（1991）。

在美国胃肠道学协会年会的会议录中，幽门螺杆菌阳性病人唾液中IgG抗体的存在已引起了一些注意。Czinn等在1989年的会议录中公



布了这种抗体的存在，此后，Larsen等人于1991年五月的会议录中总结道：唾液中的IgG水平是抗生素治疗过程中评估治疗反应的一种实用性的非侵入性标志。在1992年4月的会议录中，Landes等证实了前人的观察结果，并发现，对于幽门螺杆菌阳性病人、尤其是其它检验方法不太实用的大范围群体或幼儿群体来说，测量针对幽门螺杆菌的唾液IgG是一种简单的非侵入性检验。

WO-A-9322682公开了一种方便可信的体外幽门螺杆菌检验法。该检验利用了抗原制剂与受检哺乳动物粘膜分泌液中的IgG抗体进行反应。

WO-A-9625430揭示了幽门螺杆菌的一种新型抗原，可用于诊断性检验以鉴定幽门螺杆菌的感染。

对于鉴定、分离并因此提供能用于诊断性检验的幽门螺杆菌新型抗原的需求从未间断。这些抗原应该是特异性的，确信可纯化的，并在这种检验中的良好专一性和无假阳性结果为其特征。此外，它们也许能作为可有效用于治疗或预防幽门螺杆菌感染之疫苗的基础。

故，第一方面，本发明提供了一种蛋白质，它是幽门螺杆菌抗原，在变性和还原条件下测得其分子量在约43kDa至约53kDa之间。

在一个较优选的实施方案中，该抗原性蛋白质的分子量为约43kDa，并在其氨基末端有以下氨基酸序列：

M D L ? V L G I N T A
Met-Asp-Leu- ? -Val-Leu-Gly-Ile-Asn-Thr-Ala.

在第二个较优选的实施方案中，该抗原性蛋白质的分子量约为43kDa，并在其氨基末端有以下氨基酸序列：

M R V P K(S) K G F A I L S K

在本发明此方面的第三个较优选实施方案中，该抗原性蛋白质的分子量约为53kDa，并在其氨基末端有以下氨基酸序列：

? ? G K A P D F K P A
? - ? -Gly-Lys-Ala-Pro-Asp-Phe-Lys-Pro-Ala

本发明的第二方面提供一种蛋白质，它是幽门螺杆菌的抗原，并

具有以下特征:

i)在变性及还原条件下测得的分子量约为54kDa, 并有以下N-末端氨基酸序列:

M L K (V) I (E) K (V 或 S) L E (S) I;

ii)在天然(非变性)条件下测得的分子量约为370kDa, 并有以下N-末端氨基酸序列:

M (K) L T I - L E V (E);

iii)在天然(非变性)条件下测得的分子量约为140kDa, 并有以下N-末端氨基酸序列:

M Y I P Y V I E;

iv)在天然(非变性)条件下测得的分子量约为90kDa, 并有以下N-末端氨基酸序列:

M N L D C (S) L Q V;

v)在变性及还原条件下测得的分子量约为15.9-16.9kDa, 并有以下N-末端氨基酸序列:

G K I G I F F G T D S G N A E A I A E K;

vi)在天然(非变性)条件下测得的分子量约为344kDa, 并有以下N-末端氨基酸序列:

M L V T K L A P D F L A P ? V; 或

vii)有以下N-末端氨基酸序列的一种超氧化物歧化酶:

M F T L R E L P F A K D S N G D F L S P

上述序列中, 括号内的氨基酸可替代括号前氨基酸。

本文所述的所有蛋白质中任一种的部分或片段本身也可能有抗原性, 因此, 第三方面, 本发明提供了本发明中蛋白质的抗原性片段。具体地说, 本发明提供了有以下序列的抗原性片段:

M D L ? V L G I N T A
Met-Asp-Leu- ? -Val-Leu-Gly-Ile-Asn-Thr-Ala;

? ? G K A P D F K P A
? - ? -Gly-Lys-Ala-Pro-Asp-Phe-Lys-Pro-Ala.

M L K(V) I(E) K(V 或 S) L E(S) I;

M R V P K(S) K G F A I L S K;

M(K) L T I - L E V(E);

M Y I P Y V I E;

M N L D C(S) L Q V;

G K I G I F F G T D S G N A E A I A E K;

M L V T K L A P D F L A P ? V; 或

M F T L R E L P F A K D S N G D F L S P

其中，上述序列中，括号内的字母表示可替代括号前氨基酸的一些氨基酸。

由于分子量测定操作的局限性，本文所述抗原的分子量必需表示为近似数。分子量专指在天然（非变性）条件或变性条件下所测得的值。本领域的技术人员均知不同的人或甚至同一人在不同情况下操作所得结果可能会有轻微差异，故本说明书所引用的近似分子量数值在读取时应考虑有 $\pm 5\%$ 、甚至 $\pm 10\%$ 的波动。

技术人员应能理解片段的序列可能会有一些变动，但仍保持抗原性不变。可用本领域技术人员熟知的一些方法检验诸片段和/或其变体的抗原性。这些变体亦构成本发明的一部分。

本发明的抗原性蛋白质或其片段可以纯化的或分离的制剂形式单独提供，或作为与其它幽门螺杆菌抗原性蛋白质的混合物的参与部分

来提供。

故第四方面，本发明提供一种抗原组合物，内含一种或多种本发明的蛋白质和/或一种或多种其抗原性片段。这样的组合物可用于检测和/或诊断幽门螺杆菌。在其中一个实施方案中，该组合物含有一种或多种其他幽门螺杆菌抗原或其片段。

第五方面，本发明提供一种检测和/或诊断幽门螺杆菌的方法，包括：

(a)使待检样品与本发明的一种抗原性蛋白质、或其抗原性片段或一种抗原组合物接触；并

(b)检测有无幽门螺杆菌抗体。

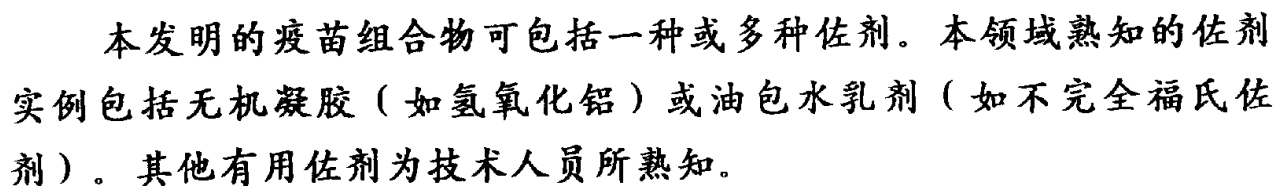
具体地说，本发明的蛋白质、其抗原性片段或抗原组合物可用于检测IgG抗体。较适宜地，待检样品可以是生物学样品，如血样或唾液标本。在WO-A-9322682中描述了用粘膜分泌物样品检测幽门螺杆菌的一种合适方法的一个例子。

本发明的第六方面提供了本发明的抗原性蛋白质、其抗原性片段或抗原组合物在检测和/或诊断幽门螺杆菌中的用途。较优选地，该检测和/或诊断于体外进行。

本发明的抗原性蛋白质、其抗原性片段或抗原组合物可作为用于体外检测和/或诊断幽门螺杆菌的试剂盒中一部分。因此，第七方面，本发明提供用于检测和/或诊断幽门螺杆菌的一种试剂盒，该试剂盒内含本发明的抗原性蛋白质、其抗原性片段或抗原组合物。

此外，本发明的抗原性蛋白质或其抗原性片段可用于诱导针对幽门螺杆菌的免疫应答。故第八方面，本发明提供了本发明的抗原、其片段或本发明的抗原组合物用于医药中的用途。

在更进一步的方面，本发明提供了可刺激受试者免疫应答的一种组合物，内含本发明的一种或多种蛋白质和/或其一种或多种抗原性片段。较适宜地，该组合物可以是一种疫苗组合物，其中任选地含有一种或其他适当的佐剂。这种疫苗组合物可以是预防性疫苗组合物或治疗性疫苗组合物。



在更进一步的方面，本发明提供了：

(a)本发明的蛋白质或一种或多种其抗原性片段在制备免疫原性组合物、较优选是疫苗中的用途;

(b)这种免疫原性组合物在诱导受试者体内免疫应答中的用途;
以及

(c)在受试者体内治疗或预防幽门螺杆菌感染的方法，包括对受试者施用有效量的本发明蛋白质、至少一种其抗原性片段，或抗原组合，较优选作为疫苗施用。

本发明各方面的较优选特点是各方面已在细节上作了必要修正时的情形。

本发明按照以下实施例进行描述，但无论如何不能将这些实施例理解成限制本发明范围。

实施例涉及一些附图，其中：

图1: 显示无细胞超声处理物在mono Q HR5/5阴离子交换柱中的洗脱曲线。含有尿素酶的级分以阴影区表示。图中还指明了0至1.0M的NaCl梯度;

图2: 显示Superose 6洗脱曲线, 表明了幽门螺杆菌的阳性病人和未感染的受试者在ELISA中的血清反应性;

图3: 显示所研究的2株幽门螺杆菌的Superose 6反应活性级分经8-25%梯度胶的非变性PAGE电泳结果;

图4: 显示Superose 6反应活性级分经8-25%梯度胶的非变性PAGE电泳后的蛋白质印迹分析结果;

图5: 显示Superose 6反应活性级分的(a)8-25%梯度胶SDS-PAGE电泳结果和(b) (a)的蛋白质印迹结果;

图6: 显示有幽门螺杆菌感染的病人在不同ELISA反应性的发生率。

实施例I

(i)细菌的培养

所用两株幽门螺杆菌，一为NCTC 11637，一为1989年分离自一位胃溃疡病人的名为“traub”的野生型菌株（澳大利亚粘膜免疫学研究所）。

从两支菌株中均分离出同样的蛋白质。对每支菌株进行培养，再用相同的方法提取蛋白质。

在37℃水浴箱，由10% CO₂、6% O₂、84% N₂组成的微嗜气性环境中，于巧克力琼脂（Oxiod公司No. 2Block Agar Base含5%去纤维的马血液的CM271）上培养细菌。

细菌培养96小时后，从培养平板上刮下菌落，收集在含PBS的试管（Trace Multicel™编号50-201-PA）中。离心（10,000g, 5分钟，RT）洗涤细胞，再重新悬浮于新鲜缓冲液中。重复洗涤一次，最终将细胞重新悬浮于0.1M Tris-HCl pH8.2中，再经超声处理破碎细胞。在置于冰浴内的冷却超声处理管内，利用9.5mm的探头，在6μ（MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator）处进行超声处理。每1ml样品超声处理5个循环，每个循环为超声处理处理30秒再静置60秒，故总的超声处理时间为7.5分钟。超声处理后，细胞碎片经离心（12,000g, 10分钟，RT）除去，将上清液先通过0.45μm的滤膜过滤，再通过0.2μm的滤膜过滤，从而得到不含细胞的蛋白质悬液。

(iii)蛋白质测定

总蛋白质浓度用BioRad公司的考马斯亮兰蛋白质测定试剂盒来测定。

(iv)层析

(a)离子交换层析

通过将于500μl Tris-HCl缓冲液中的10-15mg蛋白质样品上样于联有FPLC系统的Mono Q柱（Pharmacia Biotech公司，HR5/5）内，对该无细胞悬浮进行分级分离。用0.1M Tris-HCl缓冲液中所含的0-1M NaCl梯度进行洗脱。

于280nm波长下监控蛋白质的洗脱过程，所有洗脱下来的物质收集至0.5ml级分中。于洗脱的全过程中监测缓冲液的导电率，以确保梯度的准确性。

检验每个级分的尿素酶活性，方法是测量它们利用尿素作底物的能力。简而言之，用一块微滴板，各排孔中分别加入两种不同溶液，90 μ l/孔，一种是由3mM磷酸氢二钠加1.5% (w/v) 尿素及4 μ g/100ml酚红组成的溶液（底物溶液），一种为不含尿素的类似溶液（空白缓冲液）。然后将每级分的10 μ l样品成对加到孔中，一份样品加入底物溶液中，一份样品加入空白缓冲液中，迅速密封微滴定板。2.5分钟后，于540nm测量每孔的光吸收值。对于每对孔，均从检验值（底物溶液）中减去对照值（空白缓冲液），将所得值对收集管序号作图。

(b) 凝胶过滤层析

将那些显示有尿素酶活性的Mono Q级分汇集成三大份样品。检验每份汇集物的抗原活性。第一份汇集物显示含有抗原，对其进行浓缩，得到总蛋白质含量约为30 - 50mg/ml。将1号汇集物的等份样品（200 μ l）上样于Superose 6柱（Pharmacia）进行凝胶过滤层析。以Tris-HCl, 0.1M, pH7.2溶液作为洗脱缓冲液进行洗脱。收集各级分（0.5ml）。洗脱过程中，于280nm测定洗脱液的光密度，随后测定尿素酶活性和蛋白质含量，从而监控洗脱。

(c) 选择有反应活性的级分

通过用含有1M NaCl的Tris缓冲盐溶液按1: 10稀释样品，并用稀释后的样品包被ELISA微滴定板各孔（Nunc Maxisorb），每孔100 μ l，从而检测各级分中的抗原。使各孔静置3小时，再用含0.15M NaCl的100mM磷酸盐缓冲液洗涤。然后，用来自确认有幽门螺杆菌感染的病人的一组血清样品对包被好的板进行筛选。将血清样品用磷酸缓冲盐溶液作1: 200稀释后，加入已包被好的孔内温育1小时，然后洗涤各孔并吸干。利用山羊抗人IgG过氧化物酶，温育30分钟，然后洗板，再强化TMB底物（Cambridge Life Sciences），从而检测特异性抗体的结合。15分钟后，用1M H₂SO₄终止反应，并于450nm测量光

吸收值。

对所有级分均进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和蛋白质印迹分析 (Western blot), 以证实它们在蛋白质组成方面的差别。

(v) PAGE

利用 Pharmacia Multiphor II system 进行非变性凝胶电泳。为此, 特制备浓度为 5% 的凝胶。向 50 μ l 样品中加入 0.25% 溴酚兰 10 μ l, 混匀后取 20 μ l 加入到凝胶中进行电泳 (600w 电泳 30 分钟)。

制备在 SDS 样品缓冲液 (0.5M HCl, pH6.8 [1.0ml]; 甘油 [0.8ml]; 10% (w/v) SDS [1.6ml]; 0.8M DTT [0.4ml]; 1% 溴酚兰 [0.2ml]; 水 [0.4ml]) 中的 1mg/ml 各级分等分样品 40 μ l。在预先制好的 10% 凝胶 (BioRad) 中, 用 BioRad Mini Protean II system 对样品进行电泳。电泳缓冲液为含 SDS 的 tris - 甘氨酸 pH8.3 (15g Tris, 72g 甘氨酸, 5g SDS, 溶于 5L 蒸馏水中)。电泳完毕后, 凝胶用考马斯亮兰 R - 250 (0.1%) 的甲醇/醋酸/水 (40/10/50%) 溶液染色, 再用甲醇/醋酸/水 (40/10/50%) 脱色。所用的分子量标志为 BioRad 公司的大范围 SDS 预染标准品, 包括肌球蛋白 211,000; β - 半乳糖苷酶 117,000; 牛血清白蛋白 81,000; 卵白蛋白 49,100; 碳酸酐酶 31,400; 大豆胰酶抑制物 26,100; 溶菌酶 18,900。

(vi) 蛋白质印迹

利用蛋白质印迹分析来测定哪些肽只与幽门螺杆菌阳性病人的血清反应。对每份血清样品分开进行凝胶电泳和印迹。SDS - PAGE 凝胶电泳如上述进行, 利用 Mini Protean II Trans Blot cell (BioRad), 遵照生产商的指示, 采用不含 SDS 的 Towbin 缓冲液, 将电泳分离物转移至硝酸纤维素膜上。对于非变性凝胶, 用 Pharmacia Multiphor II 的半干印迹程序 (REF) 在不连续的缓冲液系统中进行转移。蛋白质转移后, 硝酸纤维素膜用 20mM Tris-HCl 加 500mM NaCl, pH7.5 (TBS) 洗 10 分钟, 再用含 1% BSA (牛血清白蛋白) 的 TBS 封闭 1 小时。然后, 用含 0.05% 吐温 20 的 TBS (TTBS) 洗膜, 并用按 1: 60 稀释于含 1% BSA 的 TTBS 中的血清样品探查诸膜。室温温育过夜。然后用 TTBS 洗

硝酸纤维素膜，再加抗人IgG过氧化物酶。温育3小时后，用TBS洗，再加入底物溶液（4-氯萘酚）。底物应于用前新鲜配制：将溶于20ml甲醇中的60mg 4-氯萘酚与在混合前刚刚加入60μl冰冷30% H₂O₂的100ml TBS混合。使温育过程一直持续到当用新鲜底物溶液取代原底物溶液时，原底物溶液颜色加深为止。所用的最长温育时间为30分钟。将膜转至蒸馏水中以终止反应，并经多次更换蒸馏水进行洗涤。

试验中所用的血清样品已经知道是尿呼吸检验（UBT）阳性或阴性，血清状态由ELISA证实。

(vii)氨基酸测序

用固相分析法测定了感兴趣的5条独特蛋白质条带的N-末端区域14个氨基酸。按照如上就Western分析述及的方法进行SDS-PAGE和印迹，不同之处在于此处蛋白质是转移至PDVF膜上而非硝酸纤维素膜上。对转移PDVF膜不染色。然后用相测序仪(Applied Biosystems)从固相上进行分析。

(viii)检验病人血清样品和唾液样品

从胃肠学诊所收集了22例检查胃不适症状的病人（平均年龄58.9岁，12例男性，10例女性）。组织学检查显示11例为幽门螺杆菌阳性。对检查时收集到的22份血清和13份唾液通过ELISA进行检测。对所有22例病人的唾液均进行斑点印迹分析。

(ix)ELISA检验

(a)用纯化抗原包被ELISA微滴定板

将来自Superose 6柱的各选定的、含抗原的纯化级分汇集在一起，用18.5mM Tris-HCl加 1M NaCl的溶液将提取物稀释至1-2μg蛋白质/ml。用后者的等分样品（100μl）包被（室温下温育16小时）ELISA微滴定板（Nunc Maxisorb）各孔。包被后，用含0.15M NaCl和0.01%(w/v)硫柳汞(thiomersal)的5mM磷酸盐缓冲液pH7.2，以每孔350μl重复洗孔3次，然后用1%(w/v)的Byco A蒸馏水溶液封闭（室温下，蒸馏水中90分钟）各孔（350μl/孔）。连续洗涤两次（洗涤液同前）后，这些板既可立即投入使用，亦可干燥（37℃ 16小时）后封

存。

(b) 检验血清样品

将待检血清用含有 0.07 % (u/v) 吐温 80, 0.16% (w/v) 溴酚兰, 0.25% (w/v) 明胶, 0.14M NaCl, 0.01% (w/v) N - methylisothiazolon/HCl 及 0.1% (w/v) Oxyprion 的 50mM 磷酸盐缓冲液 pH7.2 按 1: 200 稀释。将等分样品 100 μ l 加入至经抗原包被过的微滴定板的适当孔中 (见上述 (a)), 室温温育 45 分钟, 然后用含 0.15M NaCl, 0.05% (u/v) 吐温 80, 0.001% (w/v) N - methylisothiazolon/HCl 和 0.01% (w/v) Oxyprion 的 10mM Tris-HCl pH7.8 洗孔 5 次 (350 μ l/孔)。用适当稀释 (稀释液为 20mM 磷酸盐, 150mM NaCl, 0.01% (w/v) 硫柳汞, 0.1% (w/v) BSA 组分 V 及 0.05% (w/v) 8 - 苯胺基 - 1 - 萘磺酸, pH7.2) 的兔抗人 IgG 过氧化物酶偶联物 (100 μ l/孔) 室温温育 15 分钟, 对特异性抗体的结合进行检测。洗板 5 次 (方法同前) 后, 用 TMB 底物 (100 μ l/孔) 室温显色 15 分钟, 再每孔中加入 25 % (u/v) 磷酸 50 μ l 终止反应, 于 450nm 记录每一试验孔的光吸收值。

(c) 检验唾液样品

待检唾液用 1 份 Omnisal YG 缓冲液 (pH7.2, 基于磷酸的缓冲液) 稀释, 将等分样品 (100 μ l) 加入经抗原包被过的微滴定板 (见上文 (a)) 的适当孔中。室温温育 30 分钟后, 各孔洗涤 5 次 (用与血清样品检验时所用的相同缓冲液), 再用生物素 - 抗生物素蛋白偶联试验在室温检测特异性抗体的结合。简言之, 向每孔中加入兔抗人 IgG 生物素 (适当稀释于 5mM 磷酸, 0.15M NaCl, 0.05% (u/v) 吐温 80, 2.5 % (w/v) Anoronthy, 1% (u/v) 热灭活的正常兔血清, 0.01% (w/v) 硫柳汞及 2.5 % (w/v) 明胶, pH7.5) 100 μ l, 温育 30 分钟。连续洗涤 5 次 (同前) 后, 按 100 μ l/孔向适当孔中加入抗生物素蛋白 - 过氧化物酶偶联物 (适当稀释于 5mM 磷酸, 0.15N NaCl, 2% (u/v) 热灭活的正常兔血清, 0.01 % (w/v) 硫柳汞和 0.05% (w/v) 8 - 氨基 - 萘 - 1 - 磺酸, pH7.2), 温育 15 分钟, 再如前所述洗涤各孔 5 次。用 TMB 底物 (100 μ l/孔) 显色 15 分钟后, 每孔加入 25 % (u/v) 磷酸 50 μ l 终止反应, 并在

450nm记录每一检测的光吸收值。

(x)斑点印迹检验

为检验各级分和汇集级分对单一血清样本的反应性，将待检材料点样于硝酸纤维素膜片上，再按上述蛋白质印迹程序进行分析。将各级分或级分汇集物制成1mg/ml的蛋白质溶液。用铅笔和尺子将一张硝酸纤维素膜（BioRad 8.4 × 7cm 目录号162 - 0145）标记成24个小方格，小心不要使硝酸纤维素膜沾上任何蛋白质。

将每一级分或汇集物含2μg蛋白质的等分样品（2μl）小心地点样于硝酸纤维素膜上的每个标记方格内（每份样品重复点3次）。各样品点室温风干后，将每张膜浸于封闭液（含1% w/v BSA的20mM Tris-HCl, 500mM NaCl pH7.5）中室温置1小时。倾去封闭液，在吐温 - Tris缓冲盐溶液（20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0.05%v/v吐温20, pH7.5）中洗膜三次，再将膜与三种人血清型中的一种（用含1% BSA的吐温 - Tris缓冲盐溶液作1: 60v/v稀释）于室温共同温育过夜，所述三种人血清型已经过HELISAL ELISA(Cortecs)鉴定，并经临床检测确认为幽门螺杆菌阳性、临界型或阴性。温育过夜后，用吐温 - Tris缓冲盐溶液洗膜2次，再将膜浸入偶联溶液（兔抗人IgG - 辣根过氧化物酶偶联物（Dako 目录号P - 406）用含1% BSA的吐温 - Tris缓冲盐溶液稀释的1: 500v/v稀释液）中室温温育3小时。然后在吐温 - Tris缓冲盐溶液中洗膜2次，在Tris缓冲盐溶液（20mM Tris, 500mM NaCl, pH7.5）中洗膜1次，再在4 - 氯 - 1 - 萘酚溶液（60mg溶于20ml 甲醇，100ml Tris缓冲盐溶液及60μl 30%H₂O₂中）中显色2至30分钟。用水洗涤而终止显色。

在另一项研究中，将经组织病理学测定有幽门螺杆菌感染的病人的发生率对ELISA反应性作图，确定ELISA临界值。

结果

无细胞超声处理样品在Mono Q HR 5/5柱中的洗脱曲线示于图1。含有尿素酶活性的级分位于12ml至18ml的洗脱体积之间。

Mono Q HR 5/5柱汇集物在Superose 6柱中的洗脱曲线显示含尿

素酶的级分位于10至19ml的洗脱体积之间。

由Superose 6洗脱物的ELISAgam和Western印迹分析确定抗原反应性级分。已知有幽门螺杆菌感染的病人血清表现出不同于未感染受试者的ELISAgam图。Superose 6洗脱物的ELISA反应性的典型曲线示于图2。选择出一种在感染和未感染受试者之间产生最大差异的抗原制剂用于后续的诊断试验开发中。该抗原级分是在尿素酶主峰右侧选择的，尽管此处还可测出一些尿素酶活性的存在。

对反应性级分进行的非变性PAGE电泳证实以所研究的两株菌中分离出了16条可检测的蛋白质带，分子量范围在700 - 40kDa之间（表1，图3）。

表1: Superose 6柱层析收集到的反应性级分的非变性PAGE电泳.
测得各蛋白质条带的分子量。

带号	n ¹	分子量 (千道尔顿 × 10 ³)
1	9	665±42
2	10	479±32
3	10	348±29
4	10	313±27
5	8	246±16
6	10	211±20
7	7	156±25
8	10	127±16
9	10	109±15
10	9	92±7
11	7	77±3
12	8	70±3
13	9	63±3
14	7	57±3
15	6	50±5
16	5	44±3

¹发现有蛋白质带的电泳胶序号 (共10块胶)

数值均表示为平均值±SEM

免疫印迹分析证实这些蛋白质带中9个条带有免疫反应性 (表2, 图4)。

表2: 由Superose 6柱得到的反应性级分经非变性PAGE电泳后, 由蛋白印迹分析所检测到的蛋白质条带的分子量

免疫印迹带	n ¹	分子量 (千道尔顿 × 10 ³)
a ²	26	699±55
b	19	480±37
c ^{2,3}	17/26	239±17 至 326±24.9
d	11	156±25
e	12	109±8
f	9	92±5
g	13	74±3
h	9	62±5
i	11	36±7

¹发现有该条带的印迹分析膜序号 (共26张膜)

²该条带证实有尿素酶活性

³该浓染区常以单一的难区分区 (分子量范围240 - 330千道尔顿) 出现
数值均表示为平均值±SEM

用SDS - PAGE分析非变性PAGE电泳中所见的5个主要区带, 结果测得每个区带有7至9个亚成分 (表3)。

表3: 非变性PAGE中所发现的5个主区带的亚单位分析

主区带	n ¹	估计分子量范围 (千道尔顿 × 10 ³)	主要亚单位 (千道尔顿 × 10 ³)
(i)	9	664±42	i-1 101±0.7 i-2 91±7.8 i-3 79±2.8 i-4 72±3.5 i-5 63±0.7* i-6 61±1.2 i-7 53±3.8
(ii)	10	479±32	ii-1 105 ii-2 96 ii-3 80.5 ii-4 75±2.3 ii-5 65±4* ii-6 60±2.6** ii-7 50±1.8
(iii)	8-10	范围:246±16至348±39	iii-1 90±4.2 iii-2 86±3.5 iii-3 75±2 iii-4 64±5.1* iii-5 52±3.8 iii-6 48±4.5 iii-7 29±5.8 iii-8 24±2.5 iii-9 18±4
(iv)	10-8	范围:211±20至246±16	iv-1 82±3.4 iv-2 73±2.1 iv-3 67±2 iv-4 58±1.2 iv-5 48±3.2 iv-6 34±2.6 iv-7 17±2.9
(v)	10-7	范围:109±15至156±25	v-1 86±4.1 v-2 75±1.7 v-3 70±1.7 v-4 65±1.4 v-5 62±3 v-6 56±1.2 v-7 52±1.2 v-8 46±2.1 v-9 43±1.7

¹发现有条带的电泳胶序号

*尿素酶阳性

++强印迹

数值均表示为平均数±SEM

反应性级分的SDS - PAGE分析证实有32种可检测到的亚单位组分, 其中18种与阳性血清有免疫反应性(表4, 图5)

表4: 由Superose 6柱层析所得的反应性级分经SDS - PAGE, 再经蛋白印迹测得的各亚单位组分的分子量。

免疫印迹带	n ¹	分子量 (千道尔顿 × 10 ³)
a	4	112±5.4
b	5	100±4.8
c	26	86.2±4.3
d	24	78.1±3.6
e	17	71.2±2.9
f ₁	29	65.4±3.1
f ₂	26	62±3.3
g	14	57.1±2.0
h	27	52.2±2.3
i ₁	27	47.6±1.9
i ₂	20	43.9±2.2
j	12	37.7±2.1
k ₁	16	34.1±1.2
k ₂	5	31.6±1.1
L ₁	22	27.5±1.6
L ₂	13	23.2±1.5
m	12	15.2±1.5
n	12	13.2±1.2

数值均表示为平均值±标准误差

n¹指29张免疫印迹膜上可测出该条带的膜序号

仔细检查凝胶分析的结果, 鉴定出10个特有的亚单位组分。其中6个为主区带(表5)。对其中5种蛋白质进行N末端氨基酸测序显示, 其中一种蛋白质相当于WO - A - 9625430所公开的抗原, 另2种为新蛋

白质(数据库中未见有相应序列的描述)。剩下2种显示与已知N末端序列完全一致(表6)。

表5: 反应性级分经凝胶分析鉴别出的特有亚单位组分

估计分子量 kDa	主要组分
86	是
78	是
72	是
62-65	是
57	否
52	是
44-48	否
38	否
23-27	否
13	是

表6: 反应性抗原级分中鉴别出的5种蛋白质的N端氨基酸序列

近似分子量	序列	注释
52	Met-Val-Thr-Leu-Ile-Asn-Asn-Glu-Asp-Asp	公开于 WO-A-9625430
53	Met-Asp-Leu-?-Val-Leu-Gly-Ile-Asn-Thr-Ala	新
43	?-?-Gly-Lys-Ala-Pro-Asp-Phe-Lys-Pro-Ala	新
57	Ala-Lys-Glu-Iso-Lys-Phe-Ser-Asp	热休克蛋白B
62-65	Met-Lys-Lys-Ile-Ser-Arg-Lys-Glu	尿素酶B亚单位



对包含新型抗原的反应性级分在诊断性ELISA中的应用进行检测。测得唾液样品的临界值为0.7个ELISA单位，血清样品的临界值为2.5个ELISA单位（图6）。

表7显示血清和唾液ELISA及斑点印迹分析与经组织学检测幽门螺杆菌感染相比的性能。结果显示血清和唾液均高度灵敏，并有很好的阳性和阴性预测价值。唾液斑点印迹分析效果尽管不如唾液或血清的ELISA效果好，但也可接受。

表7：经ELISA或斑点印迹所测得的唾液和血清抗体与经组织学（活检标本）测得的结果比较

检验项目	例数	灵敏性	特异性	准确性	阳性预测价值	阴性预测价值
唾液斑点印迹	22	90.0	81.8	86.4	83.3	90.0
唾液ELISA	13	100.0	85.7	92.3	85.7	100.0
血清ELISA	22	100.0	90.9	95.4	91.6	100.0

实施例2

(a)在适当条件下培养幽门螺杆菌，将细胞收获于磷酸盐缓冲液（PBS）中。然后多次离心以去除细胞碎片及琼脂等其他杂质，加3次新鲜PBS，得到洗好的细胞沉淀；

(b)将洗净的细胞重新悬浮于0.1M Tris-HCl缓冲液pH7.2中，准备用于离子交换层析。然后对细胞悬浮液进行足够强度和足够时间的超声处理（对于含有来自100块琼脂平板的细胞的10ml样品，6μ处理30秒，休息60秒，重复25次）以确保细胞完全破碎；

(c)再离心悬浮液以去除细胞碎片，获得含可溶性细胞蛋白质的上清；

(d)再通过离子交换层析对(c)步骤所得溶液进行分级分离，其中使用强阴离子交换树脂，如 Mono Q[®]或 Q - Sepharose[®] (Pharmacia)，并采用洗脱缓冲液中NaCl浓度以预定方式由0升至1.0M的梯度进行洗脱。再检测各级分中有无尿素酶的存在。

(e)然后汇集含有尿素酶的级分并进行凝胶渗透层析, 所使用树脂对于球状蛋白质的截留范围为 $5 \times 10^3 - 5 \times 10^6$ Da;

(f)选择相应峰的方法是:

(i)对所有级分进行尿素酶试验, 鉴别出有尿素酶活性的蛋白质峰;

(ii)分析所有显示尿素酶阳性的级分及紧邻尿素酶峰但分子量(明显)较小的其它蛋白质峰, 方法是用汇集幽门螺杆菌阳性个体的人血清制成的IgG, 对天然蛋白质及经变性(SDS)处理产生的其蛋白质片段进行蛋白质印迹分析; 和

(iii)选择出经上述方法电泳分离后显示能与阳性血清汇集物的人IgG反应但不与由幽门螺杆菌阴性血清制得的类似血清汇集物反应的那些蛋白质条带。

对所鉴别出的每条带进行N末端氨基酸分析, 将序列与可从计算机数据库中获得的已知蛋白质序列进行比较。

说明书附图

图1

无细胞超声处理物在mono Q HR 5/5阴离子交换柱中的洗脱图。含有尿素酶峰值的级分用阴影表示。图中还显示了NaCl的0至1.0M梯度。

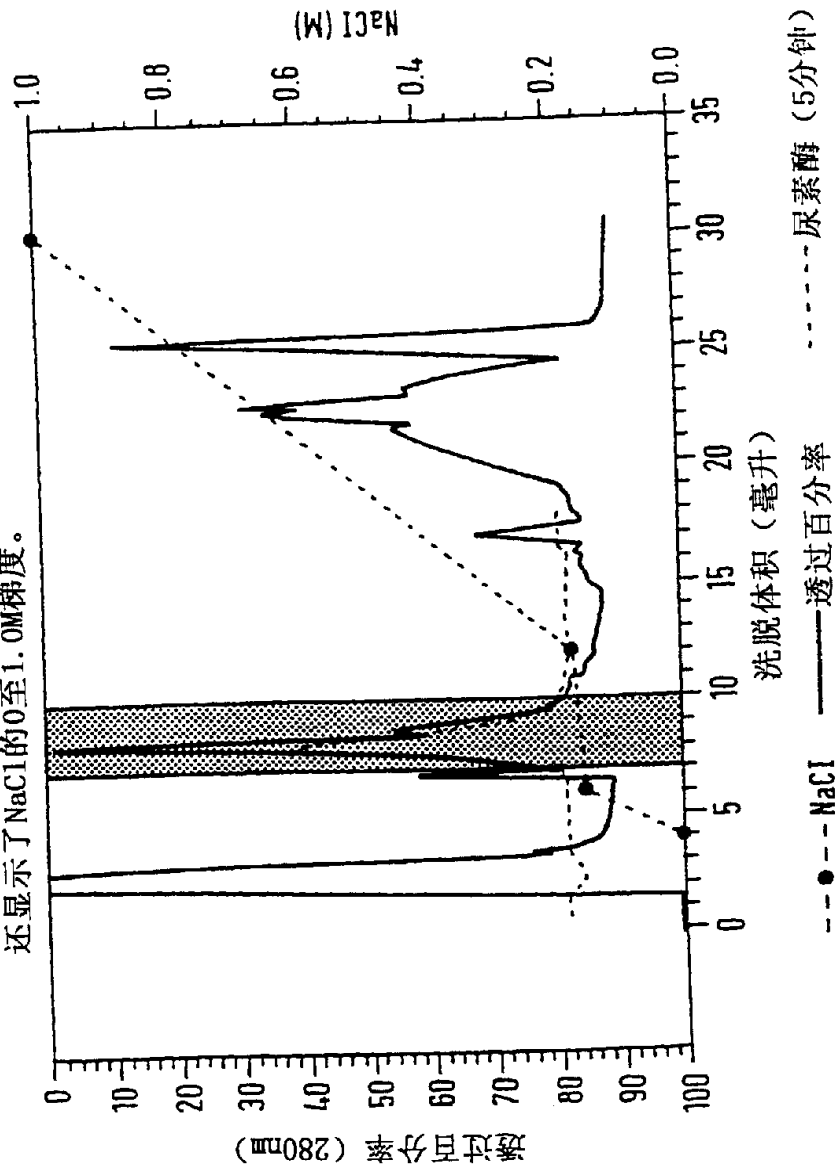


图2

Superose 6柱洗脱曲线。显示幽门螺杆菌阳性病人和未感染受试者的血清在ELISA中的反应性

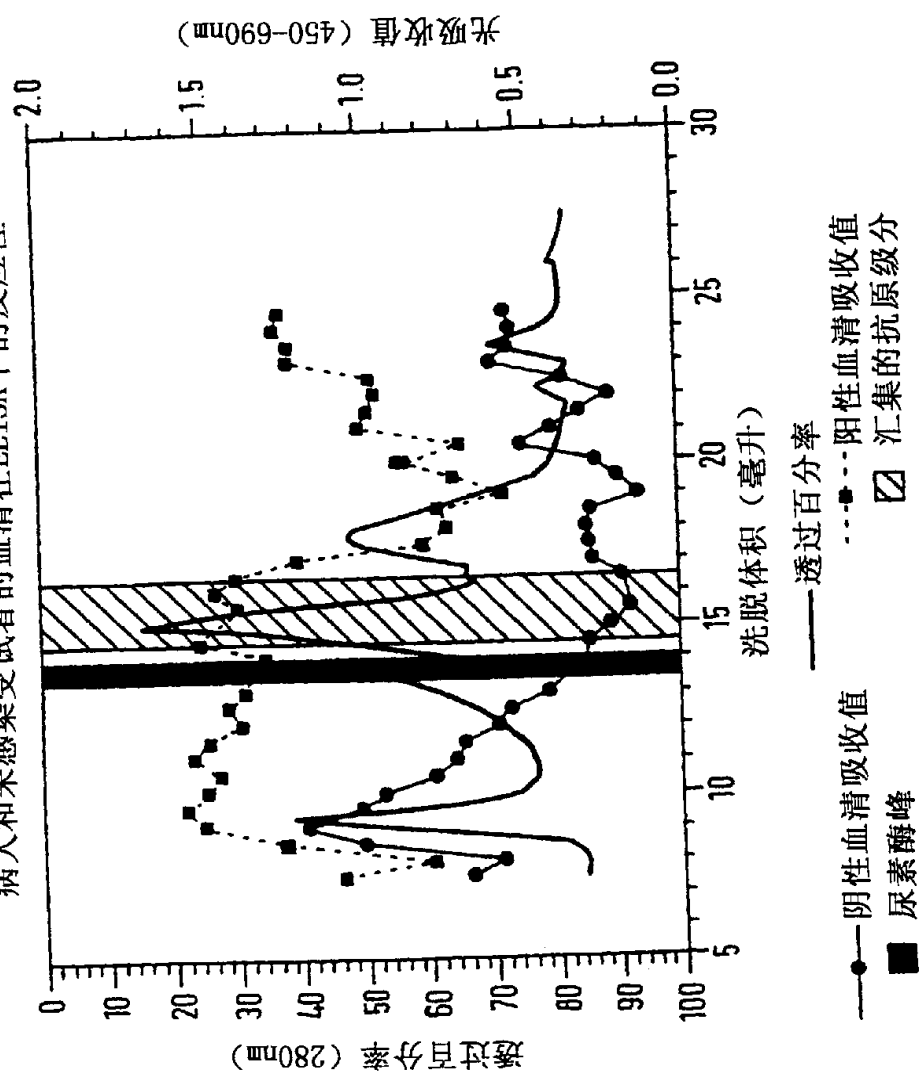
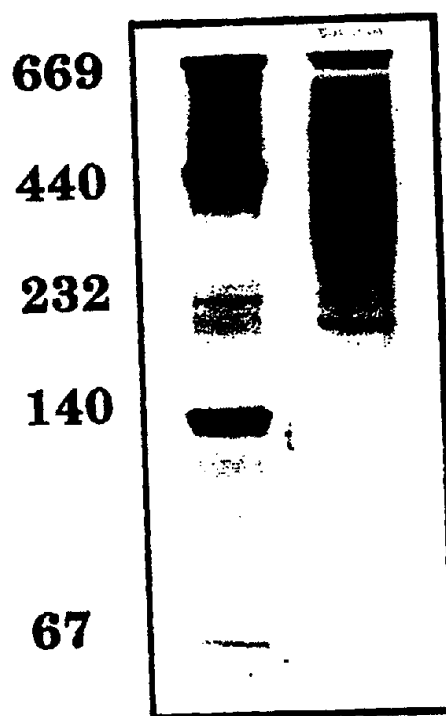


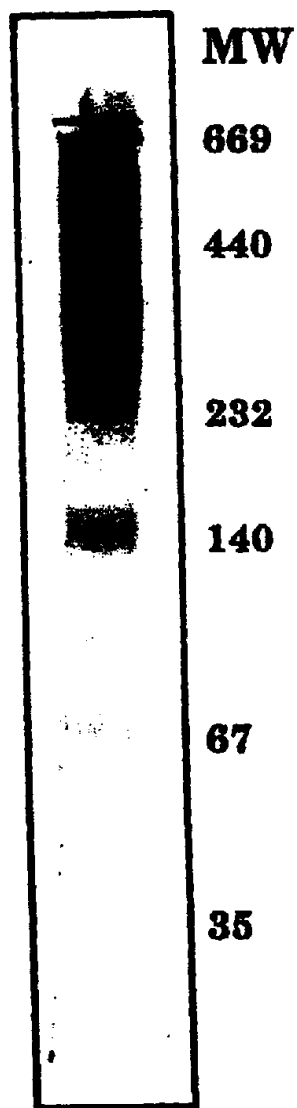
图 3

MW



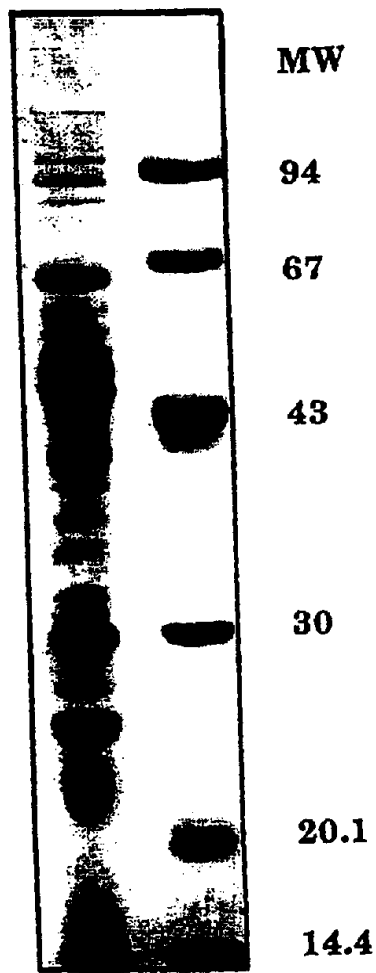
Superose 6柱层析
级分的非变性PAGE

图 4



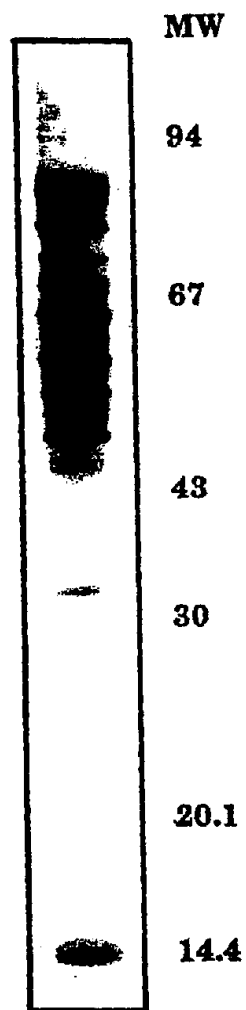
Superose 6柱层析
级分经非变性PAGE
后的Western印迹

图5a



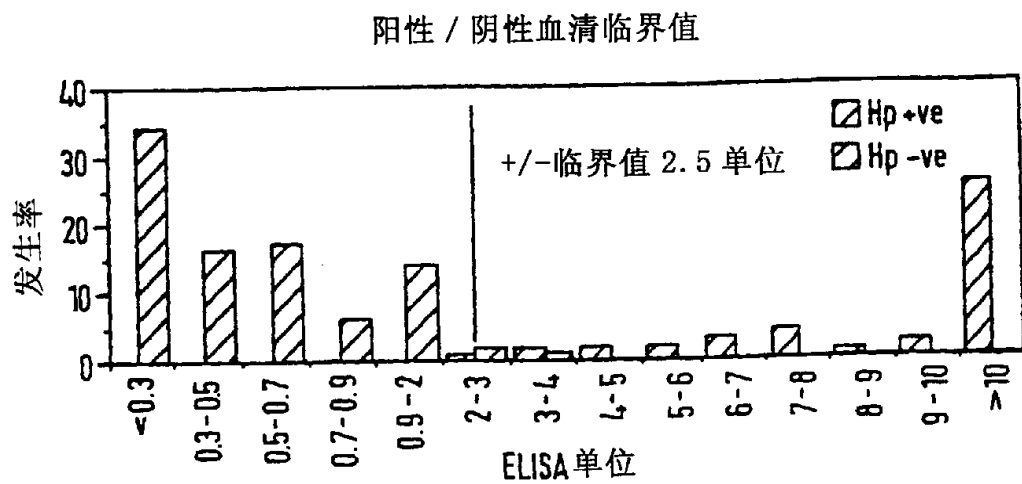
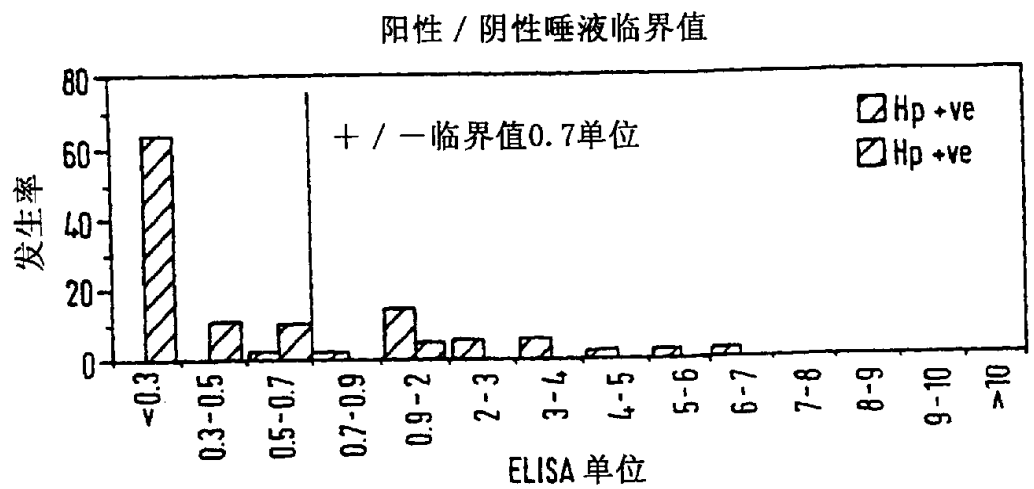
Superose6柱层析
级分的SDS-PAGE电泳结果

图5b



Superose 6柱层析
级分经SDS-PAGE电泳后
的蛋白质印迹分析结果

图 6



有幽门螺杆菌感染的病人相对于
ELISA反应性的发生率