

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/569

C07K 16/12 C07K 16/40

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00814237.8

[43] 公开日 2002 年 11 月 27 日

[11] 公开号 CN 1382259A

[22] 申请日 2000.10.12 [21] 申请号 00814237.8

[30] 优先权

[32]1999.10.12 [33]EP [31]99120351.4

[32]2000.3.16 [33]EP [31]00105592.0

[32]2000.3.31 [33]EP [31]00107028.3

[32]2000.5.10 [33]EP [31]00110110.4

[86] 国际申请 PCT/EP00/10058 2000.10.12

[87] 国际公布 WO01/27613 德 2001.4.19

[85] 进入国家阶段日期 2002.4.12

[71] 申请人 康奈科斯优化研究和发展有限公司

地址 德国马丁斯瑞德

[72] 发明人 C·瑞特 G·古尔曼 P·海普尼

A·瑞吉斯 H·米勒

E·汉德勒

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 8 页 说明书 58 页 附图 9 页

[54] 发明名称 检测粪便中抗酸微生物的改进方法

[57] 摘要

本发明涉及一种检测哺乳动物被抗酸微生物感染的方法,其中,(a)所述哺乳动物的粪便样品与(aa)一种受体,在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该受体形成复合物的条件下共同培养;或与(ab)两种不同的受体,在允许来自所述抗酸微生物的抗原与两种受体形成复合物的条件下共同培养,其中如(aa)中所述的受体或如(ab)中所述的受体特异地与一种抗原相结合,至少对一些哺乳动物来说,该抗原通过肠道后表现为一种结构,该结构与天然结构相当或在哺乳动物被抗酸微生物、其抽提物或溶菌产物或者源于该抗酸微生物的蛋白、蛋白片段或合成肽所感染或免疫后产生的抗体与该结构相抗;和(b)检测如(a)项中描述的至少一种抗原-受体复合物的形成。优选地,该抗酸微生物是细菌,尤其是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylorvi*),肝螺旋杆菌(*Helicobacter hepaticus*),空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)或结核分枝杆菌(*Mycobacteriumtu*

berculosis)。而且,该受体优选地与过氧化氢酶的表位相结合。另外,本发明还涉及包含所述组分的诊断和药用组合物与测试装置,以及含有这些组分的包装。

1. 一种检测哺乳动物被抗酸微生物感染的方法，其中
 - (a) 所述哺乳动物的粪便样品与 (aa) 一种受体，在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该受体形成复合物的条件下共同培养；或与 (ab) 两种不同的受体，在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该两种受体形成复合物的条件下共同培养，其中如 (aa) 中所述的受体或如 (ab) 中所述的受体特异地与一种抗原相结合，至少对一些哺乳动物来说，该抗原通过肠道后表现为一种结构，该结构与天然结构相当或在哺乳动物被抗酸微生物、其抽提物或溶菌产物或者源于该抗酸微生物的蛋白、蛋白片段或合成肽所感染或免疫后产生的抗体与该结构相抗；和
 - (b) 检测如 (a) 项中描述的至少一种抗原-受体复合物的形成。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述的微生物是抗酸细菌。
3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，所述的抗酸细菌是属于下述的属，即螺杆菌属 (*Helicobacter*)，弯曲杆菌属 (*Campylobacter*) 或分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)。
4. 如权利要求 3 所述的方法，其中，所述的细菌属于下述的种：幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*) 空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 或结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。
5. 如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的方法，其中，所述抗原是过氧化氢酶，脲酶或金属蛋白酶抗原，优选幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原。
6. 如权利要求 1 至 5 中任意一项所述的方法，其中，所述的受体是抗体、其中的片段或其衍生物或者适体。
7. 如权利要求 1 至 6 中任意一项所述的方法，其中，为进行检测使用了另外的受体混合物，其中若所述的受体作为所述抗原的检测剂，则所述的受体混合物具有捕获所述抗原的能力，若所述的受体作为所述抗原的捕获剂，则所述的受体混合物具有检测所述抗原的能力。
8. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述的受体混合物是多克隆抗血清。

9. 如权利要求 8 所述方法, 其中, 所获得的多克隆抗血清抗所述微生物的溶菌产物。

10. 如权利要求 9 所述的方法, 其中, 所述的溶菌产物是富含抗原的溶菌产物。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的方法, 其中, 所述的溶菌产物是减少了优势免疫抗原的溶菌产物。

12. 如权利要求 8 所述的方法, 其中, 所获得的多克隆抗血清抗纯化的或(半)-合成产生的抗原。

13. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述的抗原是过氧化氢酶, 脲酶或金属蛋白酶抗原。

14. 如权利要求 1 至 13 中任意一项所述的方法, 其中, 所述的受体或受体混合物结合构象表位。

15. 如权利要求 5 至 14 中任意一项所述的方法, 其中所述的与过氧化氢酶表位相结合的抗体的重链具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3, 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: NYWIH

CDR2: YINPATGSTSYNQDFQD

CDR3: EGYDGFDS

16. 如权利要求 15 所述的方法, 其中, 编码所述抗体重链的 DNA 序列具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3, 更优选具有下述全部三种 CDRs 的抗体的重链:

CDR1: AACTACTGGA TTCAC

CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTTCT TACAATCAGG
ACTTTCAGGA C

CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

17. 如权利要求 5 至 14 中任意一项所述的方法, 其中所述的与过氧

化氢酶表位相结合的抗体的轻链具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3 , 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: SASSSVNYMY

CDR2: DTSKLAS

CDR3 QQWSSNPYT

18. 如权利要求 17 所述的方法, 编码所述抗体的轻链 DNA 序列具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3 , 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTA AAA TTACATGTAC

CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

19. 如权利要求 5 到 24 中任意一项所述的方法或检测, 其中, 所述的与过氧化氢酶表位相结合的抗体的重链具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3 , 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: DTYVH

CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3: PIYYASSWFAY

20. 如权利要求 19 所述的方法, 其中, 编码所述抗体重链的 DNA 序列具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3 , 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: GACACCTATGTGCAC

CDR2: AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAAATATGACCC GATATTCCAGGCC

CDR3: CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC

21. 如权利要求 5 至 14 中任意一项所述的方法，其中所述的与过氧化氢酶表位相结合的抗体的轻链具有至少下列 CDRs 中的一种，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: KASQDVGTSVA

CDR2: WTSTRHT

CDR3: QYSSSPT

22. 如权利要求 21 所述的方法，其中，编码抗体轻链的 DNA 序列具有至少下列 CDRs 中的一种，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs 的抗体的轻链：

CDR1: AAGCCAGTCAGGATGTGGTACTTCTGTTGCC

CDR2: TGGACATCCACCCGGCACACT

CDR3: CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

23. 如权利要求 5 至 14 中任意一项所述的方法，其中，所述与 β -脲酶表位相结合的抗体的重链具有至少下列 CDRs 中的一种，优选 CDR3：

DR1: GFTFSSHFMS

CDR2: SISSGGDSFYPSLKG

CDR3: DYSWYALDY

或：

CDR1: GYAFSTSWMN

CDR2: RIYPGDGDNTNYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

24. 如权利要求 23 所述的方法，其中，编码所述抗体重链的 DNA 序列具有至少下列 CDRs 中的一种，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATGAAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG
C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAC

或:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATGTCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

25. 如权利要求 5 至 14 中任意一项所述的方法, 其中, 所述与 β -脲酶表位相结合的抗体的轻链具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3, 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSEISIS

CDR3: QQSNTWPLT

或:

CDR1: HASQNINVWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

26. 如权利要求 25 所述的方法, 其中, 编码所述抗体轻链的 DNA 序列具有至少下列 CDRs 中的一种, 优选 CDR3, 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC AC

CDR2: TAT GGTCTGAGT CTATCTCT

CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

or:

CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA GC

CDR2: AAG GCTTCCA ACT TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

27. 如权利要求 5 至 26 中任意一项所述的方法, 其中, 所述抗体的重链和轻链的可变区具有如图 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6 或 7 和 8 所示的氨基酸序列。

28. 如权利要求 5 至 27 中任意一项所述的方法, 所述抗体的重链和轻链的可变区的编码区具有如图 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6 或 7 和 8 所示的 DNA 序列。

29. 如权利要求 1 至 28 中任意一项所述的方法, 其中, 在将所述粪便样品与所述抗体一起温育前, 先对所述粪便样品进行下列操作:

(a) 将所述粪便样品以 1:3 到 1:25 的比例, 优选约为 1:5 到 1:10, 特别优选 1:5 的比例重悬于重悬缓冲液中, 和

(b) 在混合振荡器上混合。

30. 如权利要求 1 至 29 中任意一项所述的方法, 其中, 如步骤 (b) 中所形成的至少一种抗原-受体复合物/抗原-受体, 受体混合物复合物的检测是通过免疫学方法进行的。

31. 如权利要求 1 至 30 中任意一项所述的方法, 其中, 所述的如步骤 (b) 中所形成的至少一种抗原-受体复合物/抗原-受体, 受体-混合物复合物的检测是通过 ELISA, RIA, Western 印迹或免疫层析的方法进行的。

32. 如权利要求 30 或 31 所述的方法, 其中, 在所述的 RIA 或 ELISA 中, 同一受体既用于与固相结合又用于检测所述表位。

33. 如权利要求 1 至 32 中任意一项所述的方法, 其中, 所述的受体固定到支持物上。

34. 如权利要求 1 至 33 中任意一项所述的方法, 其中, 所述的受体是单克隆鼠抗体。

35. 如权利要求 1 至 34 中任意一项所述的方法, 其中, 所述的方法是一步 ELISA。

36. 如权利要求 1 至 34 中任意一项所述的方法, 其中, 所述的方法是三步 ELISA。

37. 如权利要求 33 所述的方法，其中，所述支持物的材料是多孔材料。

38. 如权利要求 33 和 37 所述的方法，其中所述支持物的材料是检测条。

39. 如权利要求 33, 37 或 38 所述的方法，其中，所述支持物的材料由纤维素或纤维素的衍生物组成。

40. 如权利要求 1 至 39 中任意一项所述的方法，其中，呼吸凝集物，胃气，牙菌斑，唾液，粘液涂片，活组织检查，全血或血清代替粪便样品用于检测。

41. 如权利要求 1 至 40 中任意一项所述的方法，其中，所述的方法是自动化方法。

42. 如权利要求 1 至 41 中任意一项所述的方法，其中所述的哺乳动物是人。

43. 一种单克隆抗体、其片段或其衍生物，其 V 区与如权利要求 15 到 26 中任意一项所述的 CDRs 相结合。

44. 如权利要求 43 所述的单克隆抗体，其片段或其衍生物，它具有至少一个如图 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6 或 7 和 8. 所述的 V 区。

45. 如权利要求 43 和 44 所述的单克隆抗体，其片段或其衍生物，其是鼠抗体、其片段或其衍生物或者嵌合体，优选人源化的抗体、其片段或衍生物。

46. 一种适体，其与如权利要求 43 到 45 中任意一项所述的单克隆抗体、其片段或衍生物相同的表位特异结合。

47. 一种表位，其被如权利要求 43 到 45 中任意一项所述的单克隆抗体、其片段或其衍生物，或如权利要求 46 所述的适体特异结合。

48. 一种抗体，其片段或其衍生物，其特异地结合于如权利要求 47 所述的表位。

49. 诊断组合物，包含至少一种如上述权利要求中的任意一项所定义的受体，其可任选地固定到支持物上，其中，所述的诊断组合物可任选地进一步包含如上述权利要求中任意一项所定义的受体混合物，其可任选地固定到支持物上。

50. 一种用于检测至少一种如上述权利要求中任意一项所定义的表位的检测装置，其包括：

(a) 固定于支持物上的至少一种如上述权利要求中任意一项所定义的受体；

(b) 一种制备和分析所述粪便样品的装置；和可任选的

(c) 如上述任意一项权利要求所定义的受体混合物。

51. 一种用于检测至少一种如上述权利要求中任意一项所定义的表位的检测装置，其包括：

(a) 至少一种如上述权利要求中任意一项所定义的受体，其中，所述的受体与胶体金，乳胶颗粒或其它着色颗粒相偶联，所述着色颗粒的大小典型地在 5 nm 到 100 nm 的范围，优选在 20 nm 到 60 nm，特别优选在 40 nm 到 60 nm (金)和 200 nm 到 500 nm (乳胶)的范围；

(b) 制备和分析粪便样品的装置；和可任选的

(c) 一种如上述权利要求中任意一项所定义的受体混合物。

52. 一种试剂盒，其包括：

(a) 至少一种，如上述权利要求中任意一项所定义的、可任选地固定于支持物上的受体；还可任选的包括

(b) 一种制备和分析所述粪便样品的装置；和可任选的

(c) 如上述任意一项权利要求所定义的受体混合物。

53. 一种组合物，优选包含至少一种上述受体的药物制剂，其可任选地与药理学上可接受的支持物和/或稀释剂相结合。

54. 一种包括如权利要求 49 所述的诊断组合物，如权利要求 50, 51 所述的检测装置或如权利要求 52 所述的试剂盒的包装。

检测粪便中抗酸微生物的改进方法

本发明的说明书涉及许多已公开的文献。这些文献的相关主题引入本说明书作为参考。

本发明涉及一种检测哺乳动物被抗酸微生物感染的方法，其中，(a) 所述哺乳动物的粪便样品与 (aa) 一种受体，在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该受体形成复合物的条件下共同培养；或与 (ab) 两种不同的受体，在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该两种受体形成复合物的条件下共同培养，其中如 (aa) 中所述的受体或如 (ab) 中所述的受体特异地与一种抗原相结合，至少对一些哺乳动物来说，该抗原通过肠道后表现为一种结构，该结构与天然结构相当或在哺乳动物被抗酸微生物、其抽提物或溶菌产物或者源于该抗酸微生物的蛋白、蛋白片段或合成肽所感染或免疫后产生的抗体与该结构相抗；和 (b) 检测如 (a) 项中描述的至少一种抗原-受体复合物的形成。优选地，该抗酸微生物是细菌，尤其是幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylorvi*)，肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*)，空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 或结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。而且，该受体优选地与过氧化氢酶，金属蛋白酶或脲酶的表位相结合。另外，本发明还涉及包含所述组分的诊断和药用组合物与测试装置，以及含有这些组分的包装。

目前，有多种侵染性，半侵染性或非侵染性的用于检测哺乳动物体被微生物病原体或寄生虫感染的方法。所有侵染性的方法均是以内窥镜检查和活组织检查为先决条件。若使用侵染性技术，受检者的自然完整性就会被破坏，例如在活组织检查中。通过活组织检查获得样品耗时、耗资而且通常会给病人造成损伤。由于特定微生物感染，例如幽门螺杆菌，无需在全部的胃粘膜中分布，因此通过活组织检查，在非感染位点获得的样品可能造成假阴性的结果。所有侵染性方法的另一缺陷是：所有的检测结果均受早期质子泵抑制剂，铋或抗生素治疗的影响。

半侵染或非侵染诊断方法记录参数的变化，而这些参数可以在不干扰生物体的情况下测定。为达到这一目的，优选采用体液和分泌物，例如血清，呵气，尿液，唾液，汗液或粪便进行分析。用直接的方法检测病原体或寄生虫的存在，可以通过电子显微镜，光学鉴定 (optical characterisation)，质谱法，放射性降解产物测定或特异的酶反应等手段检测其组分或降解产物。但是这些方法常常需要昂贵和尖端的仪器 (例如，所述的呵气检测)。相比之下，间接检测方法用于检测宿主生物体对病原体或寄生虫的反应，例如宿主血清或唾液中抗病原体抗原抗体的出现。既然在多数情况下使用侵染性技术对生物体的干扰对生物体产生损害，而且需要昂贵且尖端的仪器并有损健康，非侵染性技术由于从上述体液或分泌物中取样相对简便而为人们所采用。而且，既然并非每一个宿主都通过相同的途径与某一特定的病原体或寄生虫起反应，宿主的反应发生延迟，也可能在所述病原体或寄生虫从生物体中去除之后仍继续反应，所以直接的方法总应是优选的。因此，理想的是通过非侵染性的方法，在体液或分泌物中直接检测病原体或寄生虫来进行诊断。与间接方法不同这一方法可以检测到当前的感染状态。

而且，诊断方法也应当考虑到其他方面而予以优化：高再现性，灵敏性和特异性，可靠性和所用材料的质量稳定性，低消耗地用该方法进行生产和操作，应用简单无须昂贵和尖端的仪器均是需要考虑的参数。

鉴于上述原因，在医学诊断中用的越来越多的是基于高选择性和特定种类的物质 (例如抗体，受体，凝集素和适体 (aptamer)) 对某些分子结构的结合亲和力的方法，所述的分子结构可通过它们对所要分析的相关物质的高特异性进行筛选。主要可能的方法是将这些物质固定在固体表面并偶联放射性核素、与适当底物引发颜色反应的酶 (例如，ELISA=酶联免疫吸附测定) 或具有高度特异亲和力的着色颗粒来发展廉价，简单而省时的方法以检测体内自然产生的物质或身体异物。

在开发这些检测方法的起始阶段唯一使用的是多克隆抗体。然而，它们具有几个本领域技术人员所公知的缺陷，其中最主要的是其可用性有限和经常发生交叉反应。通过开发制备单克隆抗体的方法 (Köhler & Milstein (1975))，受体分离和其直接在宿主细胞系统中表达的进展，对

特异碳水化合物具有高亲和力的凝集素的开发和对单链核酸分子（适体）能够特异地与分子结构相结合的发现使上述缺陷中的大部分得以排除。目前，检测方法的特异性和敏感性能够通过相对简单的方法得以优化。

鉴于其高特异性，这种方法特别适合于检测单独的、确定的底物，例如半抗原、肽或蛋白，只要所识别的结构元件在待检测的样品群中是恒定的且对于待检测的底物来说是特异性的。而且，它们适合于在体液中进行测定，因此对于在这一样品基质中直接检测病原体而言，它们是显而易见的选择。据此，现有技术中介绍了从粪便中诊断下述病原体的方法，例如 *Entamoeba histolytica* (Hague (1993), 传染病杂志 167: 247-9), 肠道出血大肠杆菌 (*Escherichia coli*) (EHEC, Park (1996), 临床微生物学杂志 34: 988-990), *Vibrio cholerae* (Hasan (1954), FEMS 微生物通讯 120: 143-148), Toro 病毒样颗粒 (Koopmans (1993) 临床微生物学杂志 31: 2738-2744) 或 *Taenia saginata* (Machnicka (1996), 应用寄生虫学 37: 106-110)。

对于所有的人，上述病原体的共同特征在于，它们均是在宿主的肠道内可以存活并可繁殖。从而，它们具有在降解和消化系统活跃的肠道内能够存活和繁殖的机制。从而大量完整的或基本完整的病原体或寄生虫可以随粪便排出。通常，易于从粪便或所制备的粪便样品中利用检测试剂例如可以识别完整的病原体或寄生虫的抗体检测到它们。

但也有大量的病原体和寄生虫由于受感染的组织（肺、胃、胰腺、十二指肠和肝脏）与胃肠道相关而存在于粪便中，但另一方面，它们自身不能在肠道内生存和/繁殖。这些病原体和寄生虫包括，例如幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*), 肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*), 结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和其它分枝杆菌，肺炎衣原体 *Chlamydia pneumoniae*, 嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*), 肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*) 等等。其中的一些病原体可以在例如痰中检测到。但是痰中的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 仅可能在很短的一段时间内检测到，即包含病原体的腔已打开时。而且由于存在下述的事实使检测更加困难，即，并不是总能获得待检者的痰样品进行检测。这适用于例如，婴儿，昏迷的病人或动物。其它病原体，例如，嗜

肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 可以通过经肾脏进入尿液的抗原特异地检测出来。但也只有当存在于尿液中的抗原量足以检测出来时才可能进行。在粪便中检测是一种很好的替代选择。然而这些生物体, 通过肠道就伴随着肠道菌群的降解消化机制的猛烈攻击。这种情况下, 可观察到的病原体特异的分子结构可能受到破坏或者它们的浓度大大降低。

对其它抗酸细菌而言也存在病原体在肠道中降解而影响在粪便样品中进行可靠的检测的问题。在受感染的病人胃中的细菌数量比寄居于肠道中的其它细菌要少。而且, 这些细菌或细菌片断在离开胃部之后还要经过富含蛋白酶的长长的肠道。在这些环境的影响下, 在粪便中只能发现少数的完整蛋白。无法想象, 总是某些蛋白的相同片段可以完好无损地通过肠道。从中得出的另一结论是对于进行 ELISA 所必须的, 即同一抗原两表位的结合, 并不象其出现在天然蛋白中的抗原中时那么必须, 而且定位相近的两个表位最有可能在需要同一分子上的两个表位参与的检测方法中表现出阳性结果。理想的情况是, 在同一分子中只有一个表位是检测中所需的。另外, 在受感染的病人的粪便中所检测出的抗原分布表明在通过肠道的过程中抗原加工的个别特征。缓解这一问题的第一种方法已由欧洲专利文献 EP-A 0 806 667 所公开。在这一申请中介绍了特定的幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 菌株溶菌可以诱导产生多克隆抗体。这些抗体可以识别更多的来自不同地理区域的菌株的变异体。但在该申请中并没有说明血清所识别的是那些抗原。尽管尽可能实现标准化, 但事实上免疫血清仍然可能不同, 因此上述申请中所提及的方法只能算作广泛应用的次优化方案。另外, 还必须持续免疫新动物以提供多克隆血清。相应的方法既耗时又耗资。

理想的是, 单一的或有限数量的特异于这一病原生物体/寄生虫的试剂即可以对抗酸病原生物体/寄生虫的感染作出可靠的检测。更主要地, 这种方法将会大大地降低相关检测方法的费用。因此, 本发明所强调的技术问题就是, 提供一种相应的检测方法或相应的试剂。

这一技术问题由权利要求中所述的实施方案得以解决。

由此, 本发明涉及一种检测哺乳动物被抗酸微生物感染的方法, 其中, (a) 所述哺乳动物的粪便样品与 (aa) 一种受体, 在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该受体形成复合物的条件下共同培养; 或与 (ab) 两种不同的

受体，在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该两种受体形成复合物的条件下共同培养，其中如 (aa) 中所述的受体或如 (ab) 中所述的受体特异地与一种抗原相结合，至少对一些哺乳动物来说，该抗原通过肠道后表现为一种结构，该结构与天然结构相当或在哺乳动物被抗酸微生物、其抽提物或溶菌产物或者源于该抗酸微生物的蛋白、蛋白片段或合成肽所感染或免疫后产生的抗体与该结构相抗；和 (b) 检测如 (a) 项中描述的至少一种抗原-受体复合物的形成。

在本发明中，术语“抗酸微生物”包括任何微生物，只要其具有适应宿主的特性/机制使其能够耐受消化道的理化影响，并能通过优选的免疫学检测或通过使用适体将其检测出来。这样的抗酸微生物的例子包括幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)，肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticum*)，结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)，假结核分枝杆菌 (*Mycobacterium pseudotuberculosis*)，和 (*Mycobacterium cansassii*)。

本发明所用到的术语“哺乳动物粪便样品”是指任何可用于本发明检测方法的粪便样品。尤其包括由公知的方法制备的用于诊断检测的粪便样品。样品的制备可通过下述例如，依照 RIDASCREEN[®] 内变形虫属酶免疫测定 (R-Biopharm GmbH, Darmstadt) 方法进行。

本领域的技术人员可轻易地调整“允许复合物形成的条件”；参见 Harlow 和 Lane，出处同上。这些条件是，例如生理条件。

本发明所用到的术语“在通过肠道后表现为一种 [...] 结构，该结构与天然结构相当”，是指该抗原表位通过肠道后可被一种受体例如，单克隆抗体、其衍生物或片段，或由所获得抗的还未通过肠道的或就在肠道的相同抗原/表位的适体所识别。换句话说，该与上述物质特异结合的表位/抗原，就其结构而言是完整的或基本完整的，通过肠道而未被降解。该表位/抗原天然结构的来源可以是例如，由弗氏压碎器破碎并进一步依照标准方法 (参见，例如，Sambrook 等.，"分子克隆实验操作手册"，第二版，1989，CSH 出版社，冷泉港 美国) 纯化的细菌提取物，或通过标准方法 (例如 Sambrook 等.，出处同上) 纯化的细菌裂解物。

依照本发明，术语“通过肠道后表现为一种 [...] 的结构，在哺乳动物被抗酸微生物、其抽提物或溶菌产物或源于该抗酸微生物的蛋白或蛋白片

段或合成肽所感染或免疫后所产生的抗体与该结构相抗"是指由受体所识别的该表位与由哺乳动物, 优选人, 的免疫系统所呈递的表位相当。抗原呈递机制及导致抗原加工的机制和由此产生的抗体的种类是本领域所公知的并在下述文献中有所描述, 例如, Janeway 和 Travers, 的免疫学, 第二版 1997, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg。这些表位可能与天然表位不同。可以通过自然感染(合成肽除外)或免疫使哺乳动物与所述微生物或蛋白或片段或合成肽相接触。对于免疫, 可以使用所述微生物/蛋白的提取物, 裂解物, 合成肽等。合适的免疫方法是本领域所公知的, 并在下述文献中有所描述, 例如 Harlow 和 Lane, 出处同上。合适的抗体也可以通过例如免疫和/或筛选替代品例如合成肽, 由重组所产生的蛋白, 提取物, 裂解物或部分消化的蛋白。

"合成肽"包括具有至少一个天然抗原或已通过肠道的抗原的表位的肽。所述的肽可以具有与所述的抗原或其中的片段相同的一级结构。但是, 它们也可以有不同的一级结构(基本的氨基酸序列, 例如保守替换)。

此处所用的术语"特异结合"是指所述的受体对非感染哺乳动物样品中的表位没有或基本没有活性。通常所述的受体仅与出现在粪便样品中抗原的表位相结合。

依照本发明的这一实施方案, 所制备的粪便样品可以结合到例如, 固相上, 此感染介质可以用标记受体检测。如果通过肠道后呈现的抗原(仍)以(同源)二聚体或多聚体形式出现, 则可以将相同的受体既作为捕获剂又作为检测剂。

另外, 对本发明的方法来说重要的是, 成功的检测仅需要一个, 在以基本不变的方式通过肠道后, 可以检测到的抗原蛋白表位。这一表位在同源二聚体或多聚体中可出现几次。找到这种可检测形式表位的可能性明显高于在检测分析中需要检测一个以上表位的情况。

最终, 本发明的仅需要一个受体的方法在成本和操作的标准化方面具有优势。

依照本发明的惊人发现 来自所述微生物的特异抗原在通过肠道后具有一种, 对于检测来说, 基本不变的表位结构, 第二个实施方案也应视为是对本发明至关重要的。这一实施方案基于不同受体结合到同一抗原的

不同表位这一事实。此处，术语“基本上”是指在侵染个体中所述的表位及相应微生物感染可检出高于 70%，优选至少 75%，更优选高于 85%，特别优选高于 90%，更特别优选高于 95% 最优选高于 98%。理想的是，100% 的受感染个体被检测出感染。

依照本发明我们惊讶地发现，仅以一个特异地结合于抗酸微生物抗原表位的受体，或以两个特异地结合于同一抗原两个表位的受体，就可以以一种相对可靠的方式诊断出这些细菌/病原体的感染。本发明也体现在，具有所述特性的其它表位由其它受体识别，例如单克隆抗体，或其片段或衍生物或适体。后面的实施方案适合于进一步提高诊断的可靠性。有益的是，这些其它受体可以是抗体，片段或衍生物，其可特异地识别脲酶，优选 β -脲酶，26 kDa 蛋白或 Hsp 60，所有的均优选来自幽门螺杆菌 (*H. Pylori*)。对一个或更多这些蛋白/蛋白片段的检测可以在同一实验中进行或用同一样品的不同部分进行独立地实验。

本发明的结果是惊人的，主要是由于本领域此前的研究结果与此相背离。例如，对于幽门螺杆菌 (*H. Pylori*)，已发现主要抗原在 ELISA 中并不表现所期望的特异性和灵敏性；参见 Newell 等，传染病的血清诊断免疫治疗 (Serodiag. Immunother. Infect. Dis.) 3 (1989), 1-6。而且，EP-A-0806667 中说，鉴于幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 菌株的变异性，不可能用受体，例如单克隆抗体，可靠地检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 感染。

与本领域的上述情况相比，本发明的方法是有益的，这主要是由于其允许仅用一种受体进行相对可靠的诊断。例如，在 ELISA 中，检测使用成对的受体，例如抗体，其片段或衍生物或者适体，两个成对受体与同一抗原的相同或不同表位相结合。例如，幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) 过氧化氢酶形成由几个相同的亚单位构成的多聚体结构。因此，在 ELISA 或其他分析中，同一受体既可用于捕获受体也可以用于检测受体。本发明方法的另一优点是该方法是一种直接的非侵染性方法，其增加了上述的对病人的有益性和所检测疾病阶段的可靠性。

在一优选实施方案中所述的抗酸微生物是抗酸细菌。

许多抗酸细菌是目前本领域所公知的。在一特定的优选实施方案中所述的抗酸细菌属于螺旋杆菌属 (*Helicobacter*)，弯曲杆菌属

(*Campylobacter*) 或分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)。

在另一特定的优选实施方案中, 所述的细菌属于幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticum*) 空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 或结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。

在又一特定的优选实施方案中所述的受体是抗体, 其片段或衍生物或适体。

在本发明的范围内单克隆抗体的"片段"或"衍生物"与该单克隆抗体具有相同的结合特异性。这样的片段或衍生物可以通过标准的方法制备; 参见例如 Harlow 和 Lane, "抗体, 实验操作手册", CSH 出版社, 冷泉港, 美国 1988。片段的例子包括 Fab-, F(ab')₂ 或 Fv-片段。scFv 片段是衍生物的实例。衍生物也可以是通过化学方法制备的, 与所述抗体具有相同结合特性或具有改进的结合特性的物质。这样的物质可以通过例如, 拟肽 (peptidomimetics) 或不同噬菌体展示周期 (different cycles of phage display 以改善结合特性为目的的筛选所产生。依照本发明, 适体是指核酸例如 RNA; ssDNA (ss = 单链), 经修饰的 RNA 或经修饰的 ssDNA, 其与大量的具有高特异性和亲和性的靶序列相结合。术语"适体"是本领域所公知并已被定义的, 例如在 Osborne 等., 生物化学现代观 1(1997), 5-9 或 Stull 和 Szoka, 药学研究 12 (1995), 465-483。

在本发明的范围内, 术语"抗原-抗体复合物"并不仅仅包括所述抗原与天然抗体所形成的复合物, 还包括所述抗原与抗体的片段或衍生物所形成的复合物。

本发明包括仅应用单克隆抗体、其片段或其衍生物或者适体的实施方案, 也包括在同一次检测中使用不同类型检测试剂的实施方案。因此, 可能仅列举两个实施方案, 其中第一单克隆抗体与第二抗体衍生物一起使用, 或第一适体与第二抗体片段共同使用。在这一方面, 所用的术语"第一"和"第二"指第一和第二检测试剂。但并不表示总是使用两个抗体或其衍生物或片段。

使用单克隆抗体, 其片段或衍生物或使用适体易于保持诊断方法的可靠性标准, 这意味着与目前已知的方法和为上述目的所提出的方法相比具

有更大的优势。而且，这种方法也不需要持续的免疫和随后依所需检测新的动物，例如，依照欧洲专利文献 EP-A 0 806 667 中介绍的方法。

在本发明的又一优选实施方案中的抗原是一种过氧化氢酶抗原，优选来自幽门螺杆菌 (*H. Pylori*)。所述的过氧化氢酶具有特殊的优势，即它在目前已知的所有抗酸细菌中都能检测到。依照本发明，作为另一个优势，所述的过氧化氢酶对肠道的消化作用具有很强的抗性，这使检测得以大大简化。毕竟，所述的过氧化氢酶或其片段通过肠道后是以优势结构存在，例如以四聚体形式，这便于仅使用一种受体进行检测。

依照本发明我们惊讶地发现，在其粪便检测到抗酸细菌感染的哺乳动物种群，特别是病人中，这一种群的所有成员都在粪便中表现出一致的过氧化氢酶表位再现性，因此极可能仅用一种相应的受体，优选单克隆抗体，其片段或衍生物或适体进行相对可靠的诊断。具体地说，由于过氧化氢酶具有四聚体抗原结构，这一诊断可以很好地在，例如 ELISA 或相似布置的固相系统中进行。

所述的过氧化氢酶特别优选是幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 的过氧化氢酶

在另一优选实施方案中，所述抗原是金属蛋白酶，特别优选来自幽门螺杆菌 (*H. pylori*)。

在再一优选实施方案中，所述抗原脲酶，特别是来自幽门螺杆菌 (*H. pylori*)。

在又一优选实施方案中，用于检测的受体混合物有另外的用途，若所述受体用作该抗原的检测剂则使用具有捕获所述抗原功能的受体混合物，若所述受体用作该抗原的捕获剂则使用具有检测功能的受体混合物。本发明的这一实施方案为高可靠性的诊断，特别是对于那些通过肠道后不以二聚体或多聚体构象存在的抗原。这一实施方案使得在大部分标准化的免疫检测方法中使用的两种受体类型中的一种是单克隆抗体，而第二种受体类型可以是，例如多克隆血清。

在另一优选实施方案中，所述的受体混合物是多克隆抗血清。

在另一特别优选实施方案中，获得了抗微生物，优选幽门螺杆菌 (*H. pylori*)，溶菌产物的多克隆抗血清。

在又一特别优选的实施方案中，所述的溶菌产物是富含抗原的溶菌产

物。

在又一优选实施方案中，所述的溶菌产物是减少了优势免疫抗原的溶菌产物。

上述的两个实施方案还包含下述事实，即所述的溶菌产物是富含抗原的溶菌产物，优选富含过氧化氢酶且具有减少了优势免疫抗原的溶菌产物，优选主要是脲酶。具体地说，所述的组合提供了获得高免疫收率的可能性，其特别适合于本发明。在实施方案中具体描述了进行相应的富集和排除的方式。

依照本发明的又一优选实施方案获得了抗纯的或（半）人工合成抗原的多克隆抗血清，优选来自幽门螺杆菌（*H. pylori*）。

依照本发明，所述的受体，优选单克隆抗体、其片段或衍生物，或适体可识别并特异结合线性的或构象表位。在又一优选实施方案中，至少一种受体与构象表位相结合。

在一特定实施方案中，所有的受体均与构象表位相结合。

在一特定实施方案中，与过氧化氢酶表位相结合的所述抗体 [HP25.2m/2H10] 的重链具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: NYWIH

CDR2: YINPATGSTSYNQDFYD

CDR3: EGYDGFDS

在又一特定实施方案中，编码与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.2m/2H10] 重链的 DNA 序列具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: AACTACTGGA TTCAC

CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTTCT TACAATCAGG
ACTTTCAGGA C

CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

在又一特定实施方案中，所述与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.2m/2H10] 的轻链具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: SASSSVNYMY

CDR2: DTSKLAS

CDR3: QWSSNPYT

而且，在又一特定实施方案中，编码与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.2m/2H10] 轻链的 DNA 序列具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTA AA TTACATGTAC

CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

在又一特定实施方案中，所述与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.6m/1B5] 的重链具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: DTYVH

CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3: PIYYASSWFAY

在又一特定实施方案中，编码所述与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.6m/1B5] 重链的 DNA 序列具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs：

CDR1: GACACCTATGTGCAC

CDR2: AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAAATATGACCCGATATTC

CAGGCC**CDR3: CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC**

在又一特定实施方案中，所述与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.6m/1B5] 的轻链具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: KASQDVGTSVA**CDR2: WTSTRHT****CDR3: QQYSSSPT**

而且，在又一特定实施方案中，编码所述与过氧化氢酶表位相结合的抗体 [HP25.6m/1B5] 轻链的 DNA 序列具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: AAGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC**CDR2: TGGACATCCACCCGGCACACT****CDR3: CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG**

在另一优选实施方案中，对 β -脲酶特异的抗体是由杂交瘤 HP8m/4H5-D4-C9 或 HP9.1m/3C2-F8-E2 所产生的抗体，上述杂交瘤于 1998 年 6 月 23 日依照布达佩斯条约保存于德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ)，保藏号为 DSM ACC2360 和 DSM ACC2362。在附图中描述的对 β -脲酶 [HP8m/1 H5-G2-B4] 特异的抗体是由所保藏的杂交瘤 HP8m/4H5-D4-C9 的子克隆所产生的。由母克隆和子克隆所产生的抗体均由同一 DNA 序列编码并具有相同的特性。

本发明所述方法的另一优选实施方案中，与所述 β -脲酶表位相结合的抗体重链具有至少一个下述的 CDRs，优选 CDR3，更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: GFTFSSHFMS

CDR2: SISSGGDSFYPSLKG

CDR3: DYSWYALDY

或:

CDR1: GYAFSTSWMN

CDR2: RIYPGDGDNTYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

本发明所述方法的另一优选实施方案中, 编码所述与 β -脲酶表位相结合的抗体重链的 DNA 序列具有至少一个下述的 CDRs, 优选 CDR3, 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATGAAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAC

或:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATGTCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

本发明所述方法的另一优选实施方案中, 所述与 β -脲酶表位相结合的抗体轻链具有至少一个下述的 CDRs, 优选 CDR3, 更优选具有下述全部三种 CDRs:

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSEISIS

CDR3: QQSNTWPLT

或:

CDR1: HASQNINWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

另外, 编码所述抗体轻链的 DNA 序列优选具有下述的 CDRs:

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC AC

CDR2: TAT GGTTCAGAGT CTATCTCT

CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

或:

CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA GC

CDR2: AAG GCTTCCAAC TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

另外, 优选具有所述 CDRs 的重链和轻链同时出现于一种抗体、其片段或衍生物, 所述的抗体、其片段或衍生物特异地与优选来自幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 的过氧化氢酶或 β -脲酶或其片段相结合。本发明还包括下述的实施方案, 在这些实施方案中, 这些重链和轻链与其它重链和轻链相结合, 其中, 所述的结合特性得以必要地维持或提高。相应的方法是本领域所公知的。特别优选的抗体在其重链和轻链的可变区具有如图 1 和 2, 3 和 4, 5 和 6 或, 7 和 8 所示的氨基酸序列, 或该区域由其中所示的 DNA 序列所编码。

依照本领域所公知的方法, 所述的 CDRs 可整合到多种 FRs (构架区)。

在优选实施方案中下述步骤在将粪便样品与所述抗体共同培养之前进行: 将所述粪便样品以 1:3 到 1:25 优选 1:10, 特别优选 1:5 的比例重悬于

重悬缓冲液中，并在震荡混合器上混合。一种样品缓冲液的例子是：150 mM PBS，0.1% SDS。在一优选实施方案中，重悬缓冲液由 150 mM PBS，0.5% 动物血清，0.1% 去污剂。动物血清可以选自牛，小鼠，大鼠或猪，去污剂可以选自离子去污剂（优选 Tween 20），非离子去污剂（优选 SDS）或两性去污剂（特别优选 Chaps）。

在另一实施方案中，本发明的检测方法也用于在胃气、呼吸冷凝物、唾液、牙菌斑、粘液涂片、活组织、全血或血清中检测幽门螺杆菌（*H. pylori*）。可以通过给病人喝含冷 CO₂ 的饮料使胃气以“打嗝”的形式释放出来而获得。所述的气可以收集在适当的容器中，或以本领域人员所知的方式，例如通过如德国专利文献 DE 19718925 所述的装置或如德国专利文献 DE 19505504 中所述装置获得呼吸冷凝物。用这种方法所获得的冷凝物可以以液体的形式用于本发明的检测，该方法的所有步骤均如前所述，只是用此处所述的样品替代粪便样品。牙菌斑和粘液涂片也可依照本领域所知的方法获得，并且可以象唾液、全血和血清一样，以合适的浓度用于本发明的检测，仅需对重悬缓冲液作些改动。

在又一优选实施方案中，至少一个在（b）步骤中形成的抗原-受体复合物/抗原-受体-受体-混合复合物通过免疫学方法检测。

在又一优选实施方案中，至少一个在（b）步骤中形成的抗原-受体复合物/抗原-受体-受体-混合复合物通过 ELISA, RIA, Western blot 或免疫层析的方法检测。这些方法是本领域所公知的；参见 Harlow 和 Lane, 部分引用。

在本发明的方法的特别优选实施方案中，在免疫学方法，具体地说是 RIA 或 ELISA 中，同一受体既用于固相结合又用于检测抗原表位。由于捕获受体可以非修饰的形式结合于固相，例如微量滴定板上，用于检测的受体可以任意地进行标记。另一方面，所述的受体可以是没有标记的，而所述微生物的表位，优选细菌表位可通过第三标记受体检测，所述的第三标记受体优选的是抗体、其片段或衍生物，或适体，种属特异性的或 Ig-种类特异性的抗体或相应的适体。抗体的标记物，例如用放射性或荧光标记物是本领域已知的；参见 Harlow 和 Lane, 部分引用。对适体的应用是相同的。上述的实施方案特别适合于检测过氧化氢酶，其在通过肠道后可选择

地以四聚体形式出现。在这一实施方案中当然也可以联合使用抗体、其中的片段或衍生物和适体，例如联合使用与同一抗原不同表位相结合的抗体等。

三步 ELISA 是一种检测方法，其包括用捕获抗体包被平皿，加入样品和连接物（例如已标记的检测抗体）和其间的清洗步骤。一步 ELISA 与三步 ELISA 间的区别在于样品和所用的连接物加入到用捕获抗体预包被的平皿与应用是在同一步骤中完成的。

在本发明的另一优选实施方案中，所述的单克隆抗体是鼠单克隆抗体。

另外，在另一优选实施方案中所述的受体是固定到支持物上的。进行常规检测时，将受体，优选所述抗体、其片段或衍生物或适体固定到支持物上是特别有益的。而且，抗体-支持物/适体-支持物可以打包作为成套工具，或作为试剂盒。

在另一特定优选实施方案中所述支持物的材料是多孔材料。

在另一特定优选实施方案中所述的支持材料是一检测条。

另外，在另一优选实施方案中所述的支持物由纤维素或其衍生物组成。

其粪便、胃气、呼吸凝集物等可用本发明的方法分析的哺乳动物可以是一种动物，例如驯养的动物如猫或狗，实用动物如猪或其他类型的动物如小鼠、虎、沙土鼠或白鼬。

在另一优选实施方案中所述的哺乳动物是人。

在另一优选实施方案中本发明的方法是自动化的方法。自动化的方法可以是例如通过机器人进行操作，让机器人进行操作过程中的一些或全部步骤。相关的机器人是本领域所公知的。

而且本发明涉及具有 V 区的单克隆抗体、其中的片段或其衍生物，其具有上述联合的 CDRs 或由上述的杂交瘤产生。

在这种情况下，具有至少一个如图 1 和 2、3 和 4、5 和 6 或 7 和 8 所示 V 区的单克隆抗体、其中的片段或其衍生物为优。优选地，此抗体含有两个如图 1 和 2、3 和 4、5 和 6 或 7 和 8 所示的 V 区。而且这些 V 区优选地由如图 1 和 2、3 和 4、5 和 6 或 7 和 8 所示的 DNA 序列所编码。

在本发明的一个特定优选实施方案中，所述的单克隆抗体、其中的片段或其衍生物是鼠抗体或其片段或衍生物或嵌合体，优选人源化的抗体、

其片段或衍生物。所述的衍生物也可以是融合蛋白。而且，所述的抗体优选经标记的，例如通过一种胶体，利用放射性、荧光，磷光或化学发光物质标记。

嵌合人源化抗体和人抗体和所述的其它衍生物的生产是本领域所公知的。（例如 Vaughan 等., 1998; Orlandi 等., 1989, Harlow 和 Lane, 部分引用）。

本发明还涉及与所述单克隆抗体、其片段或其衍生物特异结合相同表位的适体。上述适体可根据本领域所公知的方法生产。

此外，本发明涉及被上述的抗体、其片段或其衍生物或者适体特异结合的表位。

而且，本发明进一步涉及能特异结合本发明所述表位的抗体，衍生物或其中的片段。这些抗体可以是例如单克隆抗体，其可通过标准的方法用所述的表位作为半抗原/抗原组分所生产。

而且本发明涉及诊断组合物，其包括至少一个选择性地固定于支持物上的受体，优选至少一个上述定义的单克隆抗体，其片段或衍生物或者适体。

而且，本发明涉及检测至少一种上述定义的表位的检测装置，其包括（a）至少一个上述定义的固定于支持物上的受体，优选单克隆抗体、其片段或衍生物或者适体；（b）制备和分析粪便样品的装置，和可选择的上述定义的受体的混合物。

本发明进一步涉及一种检测装置，该装置包括（a）至少一种上述定义的受体，优选一种单克隆抗体、其片段或衍生物或者一种适体，所述的受体与颗粒大小范围典型地在 5 nm 到 100 nm，优选 20 nm 到 60 nm（颗粒大小为 40 nm 到 60 nm 的金和 200 nm 到 500 nm 的乳胶是特别优选的）的胶体金，乳胶颗粒或其他有色颗粒相连接；（b）一种制备和分析粪便样品的装置；和可任选的（c）上述定义的受体混合物。

而且，本发明还涉及一种试剂盒，其包括（a）至少一种上述定义的受体，优选一种单克隆抗体、其片段或衍生物或者一种适体，所述的受体与可任选地固定于支持物上；和可任选的（b）一种制备和分析粪便样品的装置；和可任选的（c）上述定义的受体混合物。

所述的装置除用于制备和分析粪便样品外，所述的组合物和检测装置和试剂盒也可以带有制备（如果需要）和分析胃气，呼吸凝集物，唾液等的装置。

本发明还涉及一种包含至少一种上述的受体，可任选地与制药上可接受的支持物和/或稀释剂相结合的组合物。该组合物优选地是一种药物制剂。

制药上可接受的支持物的例子是本领域的技术人员所公知的。它们包括磷酸盐缓冲的盐溶液，水，乳剂如油/水乳剂，不同类型的去污剂，无菌溶液等。可通过已知的常规方法来制备包含上述支持物的药物制剂。这些药物制剂可以在合适的剂量范围内施用于个体，例如每病人每天1 μ g到100 mg。可以有多种施用形式，例如静脉内的，腹膜内的，皮下的，肌内的，局部的或真皮内的。主治医师可以根据临床情况选择施用剂量。本领域的技术人员可知所述的剂量依赖于多种因素，例如大小，体表，年龄，性别，或病人的大致情况，也依赖于所使用的特定药物制剂，持续时间和应用的种类以及可能与之同时施用的其它药物制剂。

最后，本发明还涉及包含本发明的诊断组合物，本发明的检测装置或本发明的试剂盒的包装。

本发明的诊断组合物的组分本发明的检测装置和/或本发明的试剂盒可以包装于如小瓶或细管的容器内，可任选地置于缓冲液和/或溶液中。可能将一种或多种组分包装于一个容器中。

附图描述：

图 1: 编码对过氧化氢酶特异的单克隆抗体 [HP25.2m/2H10]重链 V 区的已克隆 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 2: 编码对过氧化氢酶特异的单克隆抗体 [HP25.2m/2H10]轻链 V 区的已克隆 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 3: 编码对过氧化氢酶特异的单克隆抗体 [HP25.6m/1B5] 重链 V 区的已克隆 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 4: 编码对过氧化氢酶特异的单克隆抗体 [HP25.6m/1B5] 轻链 V 区的已克隆 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 5: 编码对脲酶特异的第二单克隆抗体 (DSM ACC2360) 轻链的 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 6 编码对脲酶特异的第二单克隆抗体 (DSM ACC2360) 重链的 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 7: 编码对脲酶特异的第二单克隆抗体 (DSM ACC2362) 轻链的 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 8: 编码对脲酶特异的第二单克隆抗体 (DSM ACC2362) 重链的 DNA 序列。所编码的氨基酸以单字母代码表示。以下划线表示由 Kabat 等所述的 CDR 区域 1-3。

Fig. 9: 在摄入奥美拉唑 (Omeprazol), 甲硝唑 (Metronidazol) 和克拉霉素 (Clarithromycin) 后, 对幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阳性病人的根除治疗过程。

实施例 1: 幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原的分离

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 的培养

幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) (菌株 NCTC 11637) 涂布在加有 10% 马血清和两性霉素 B、万古霉素和 Cefsoludin (Sigma Chemicals) 的 Wilkins chalkers 琼脂平板上, 在微需氧大气 (Anaerocult GasPAk, Merck) 中 37 °C 条件下培养 3 或 4 天。将两个平皿中的内容悬浮于加有 350 ml 添加了上述抗生素的 BHIB 培养基的一个 1 升的瓶 (Schott) 中, 用混有 10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂ 的混合气体熏 10min, 然后将瓶子封起来。培养物于 37 °C 下在旋转摇床上振荡培养两天。接下来, 将瓶中的培养物在无菌条件下装入一个 10 升的瓶中, 并将瓶子用 4, 7 升 BHIB-培养基填满。再于 37 °C 下在旋转摇床上培养两天。随后, 全部离心, 5, 000 g 离心 15min, 倾出上清, 将菌体称重。为保存这些菌体可将其以 2:1 (w/v) 的比例悬浮于加有 15% 丙三醇的生理盐水中, 在 -80 °C 条件下冷冻。为检测所培养细菌的一致性, 在检测脲酶, 氧化酶和过氧化氢酶活性的同时进行显微镜检。

实施例 2: 幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) 抗原的制备

制备幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 溶菌产物

pH 7.5 的 PBS 以 1:10 的比例加入幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) 菌体 (实施例 1) 中, 冰浴重悬。细菌细胞在冰上用小超声探头 (Sonifer, Branson) 以 25 - 30% 的强度进行超声处理 10 × 60s, 每两次处理间隔 60s。破碎的细菌细胞在 4 °C 条件下 10, 000 rpm (Sorvall, 5534) 离心 2 × 20min。将上清液作为产生多克隆抗血清的抗原制品。

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 过氧化氢酶的制备

裂解缓冲液 (20 mM Tris HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 0.05% 叠氮化钠和 10% (v/v) 异丁醇) 以 1:2 (w/v) 的比例加到冷冻的菌体中, 在吊挂摇床 (overhead shaker) 中于室温 (RT) 下振荡直至全部溶解, 其后再振荡约 15min。以 20, 000 rpm (Sorvall, SS-34) 在 4 °C 条件下离心 20 min 后, 倾出上清并经 0.45 μm-过滤器过滤。

澄清的上清液用缓冲液 A (20 mM Tris HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 1 mM

PMSF, 0.05% 叠氮化钠)以 1:3 的比例稀释后转到用缓冲液 A 平衡的 SourceQ 柱 (16/10) (Pharmacia)上。从 SourceQ 柱中流出的包括过氧化氢酶, 不含幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 的主要抗原例如脲酶, Hsp60 和烷基氢过氧化物还原酶。

为分离过氧化氢酶, 将从 SourceQ 柱中流出的物质进行分子筛层析 (Superdex 200) (16/60)。所述的过氧化氢酶与另一分子大小约为 150 kDa 的蛋白 (嗜中性白细胞活化蛋白, NAP) 以约等量的比例一起分离出来。

为获得高纯度的过氧化氢酶, 可向 SourceQ-柱流出物中添加 2 M 醋酸钠溶液, pH 4.9, on 40 mM 醋酸钠转到 SourceS 柱 (8/28)上。用缓冲液 A 洗去非结合蛋白后, 过氧化氢酶用缓冲液 B (40 mM 醋酸钠, 1 M NaCl, pH 4.9), 以线性 NaCl 梯度(在缓冲液 A 中添加 0% 到 100%的缓冲液 B)进行洗脱。过氧化氢酶在约 370 mM NaCl 处被洗脱出来。

实施例3: 过氧化氢酶的性质:

通过还原条件下的 SDS PAGE 可知所述的纯化蛋白的分子量约为 58 kDa 纯度 90%。

为鉴定所分离的蛋白进行了微量测序。所述蛋白在 SDS PAGE 凝胶中用 LysC 蛋白酶切割。提取出的蛋白混合物经 RP-HPLC 分离。对 LysC 肽进行序列分析, 得到下述的氨基酸序列:

ERLHDTIGESLAHVTHK

这一序列与幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 过氧化氢酶中相应的 LysC 肽 (Manos J. 等. (1998) 螺旋杆菌 3 (1), 28-38; Genbank 接受号 AAC16068.1) 一致。

实施例 4: 多克隆抗体和单克隆抗体 (pab; mab) 的生产

多克隆抗血清的生产:

抗幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 溶菌产物的多克隆抗血清, 带有极少主要抗原如脲酶, Hsp60 和烷基氢过氧化物还原酶 (参见实施例 2: 分离和纯化) 的幽门螺杆菌溶菌产物, 富含过氧化氢酶 (例如向溶菌产物中加入过氧化氢酶) 的幽门螺杆菌溶菌产物, 抗纯过氧化氢酶的多克隆抗血清, 可用

含过氧化氢酶表位的相应免疫制剂免疫所选择的哺乳动物（例如 小鼠，兔，山羊等）而获得。

所述的抗体可通过血清蛋白 A 亲和层析进行纯化，并可用作夹心 ELISA（参见 实施例 9）中的捕获抗体，以评估所述单克隆抗体是否适用于在病人的粪便中进行抗原检测。

多克隆兔抗血清可通过由幽门螺杆菌溶菌产物的多克隆抗体（Herbertshausen）产生。通过蛋白 A 亲和层析从这些抗血清中纯化出多克隆抗体，将其用作夹心 ELISA（参见 实施例 9）中的捕获抗体以评估所述单克隆抗体是否适用于在病人的粪便中进行抗原检测。

单克隆抗体的制备:

以本领域的技术人员所公知的方法 (Harlow & Lane, 1988; Peters & Baumgarten, 1990) 制备所述的单克隆抗体。

免疫

由幽门螺杆菌溶菌产物（参见 实施例 2）产生的抗原制剂用于免疫小鼠 (BALB/c × C57/Black, F1 代, 8-12 周龄)。用 50 μ g 抗原与弗氏完全佐剂 (Difco), 以 1:1 的比例进行乳化经腹膜内注射 (200 μ l/小鼠) 方式进行基础免疫。每四个月加强注射一次, 每只小鼠注射 25 μ g 混有弗氏非完全佐剂的抗原。从小鼠眼眶后血中获得的抗血清作为 ELISA（参见 融合筛选）中的阳性对照。

融合

最后一次免疫后两天, 摘除小鼠的脾, 将脾细胞与含 5:1 比例 PEG 4000 的杂交瘤 P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580; Kearney 等., 1979) 细胞融合。融合细胞悬浮于 HAT 培养基 (添加有次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶核甙 (100 \times 浓度; Sigma) 的克隆培养基 (= RPMI 1640 培养基, 20% FCS, 200 U/ml rhIL-6)) 中, 以 $2-6 \times 10^4$ 细胞/孔的密度加入 96-孔微滴定板。将所述杂交瘤在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 和相对湿度 95% 的条件下培养。

通过直接 ELISA 的方法进行融合筛选:

在 96-孔微滴定板 (MaxiSorb, Nunc) 上进行直接 ELISA, 对克隆盘 (融合后约 10 天) 中含所述抗体的培养物上清液进行筛选:

用 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含于免疫抗原的碳酸盐缓冲液, pH 9.6 包被所述的 ELISA 平板 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 过夜, 5 $^{\circ}\text{C}$)。吸除包被溶液, 仍游离的结合位点用含 2% 脱脂奶粉的 PBS (w/v) 封闭 (200 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 1 h, 室温)。用含 0.025% Tween 20 (v/v) 的 PBS, pH 7.3 洗平板两次后, 初级克隆培养物上清液非稀释地滴加到孔中 (100 $\mu\text{l}/\text{孔}$), 所述平板在室温下培养 1-2 小时。抗血清用作阳性对照, 上述培养基作为阴性对照。再次清洗后, 用含于 PBS 中的过氧化物酶标记的二抗 (含 0.1% 牛血清白蛋白的兔抗鼠 Ig-POD (DAKO), 20min, 室温) 进行抗体结合检测。所述的过氧化物酶使无色底物四甲基联苯胺 (TMB, Sigma) 变为有色复合物。清洗并敲击平板四次后, 加入所述底物溶液 (含 TMB + H_2O_2 的 K-Blue, Neogen 或柠檬酸缓冲液, pH 4.5)。10min 后加入 1 N 硫酸终止反应。与无色的阴性培养物上清液相比, 产生抗原-特异性抗体的培养物上清液被明显着色。

建立和培养所述杂交瘤:

为获得单克隆, 依照有限稀释分析的原理将阳性克隆再克隆两次 (Coller & Coller, 1983)。第一次再克隆在添加了次黄嘌呤和胸腺嘧啶脱氧核苷 (100 \times 浓度; Sigma) 的克隆培养基中进行, 第二次再克隆在克隆培养基中进行。通过直接 ELISA 的方法检测再克隆的抗原特异性。最后, 最终的克隆适应于扁瓶中的产物培养基 (含 5% IgG-还原型 FCS 的 RPMI 1640 培养基)。所述细胞低温保存, 生产培养物上清液用于抗体纯化。

实施例 5: 培养物上清液中所得抗体的鉴定

根据其对受幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) 感染病人的粪便样品在夹心 ELISA 中的良好反应性 (参见表 2), 从全部 30 个特异 (产生抗免疫抗原的抗体) 中选出 10 个克隆。

定型

用定型试剂盒 IsoStrip (Roche Diagnostics) 利用所确立的克隆在

所述培养物上清液中对所述单克隆抗体定型。结果是：8种 IgG1-克隆类型和1种 IgG2a-克隆类型（参见表 2）

Western 印迹

在 Western 印迹中，检测了所述培养物上清液特异识别免疫抗原的能力。每胶 15 μ g 纯化抗原在还原样品缓冲液 (Laemmi, 1970) 中煮沸，施于 12%-SDS 聚丙烯酰胺微型凝胶 (8.6 cm \times 7.7 cm \times 0.1 cm, Biometra)。25-30 mA 下电泳分离后，用半干印记技术将所述蛋白（抗原）固定在硝酸纤维素膜上。

用含 2%脱脂奶粉的 PBS 将膜封闭 (30 min, 室温)。用 TBS/Tween 20 (0.2%) 洗膜 3 次每次 5 min。为进行下述培养步骤，将上述的膜用带有 34 杂交道的载网平板夹在杂交印记筛选装置中 (Schleicher and Schu II)。在形成的每一道中加入 250 μ l TBS/Tween 20 和 250 μ l 待检测的杂交瘤培养物上清液。在室温下振荡培养 2 h。

在用 TBS/Tween 20 清洗三次后，所述的膜与连接 POD 的第二抗体(兔抗鼠 Ig-POD, DAKO) 共同培养 1h。将膜洗三次，添加 3, 3'-二氨基联苯胺 底物溶液 (DAB, Sigma) 即可观察到免疫复合物。通过不溶的过氧化物酶底物即可观察到与抗体结合的蛋白带。

在 Western blot 中，6 个杂交瘤培养物上清液表现出相应于过氧化氢酶 (58 kDa) 的一条带，三个是阴性的，但其在 ELISA 中表现为与天然抗原呈现阳性反应。它们可能识别构象表位。表 2 是上述结果的小结。

实施例 6: 从杂交瘤培养物上清液中纯化单克隆抗体

通过经改进的蛋白-G 亲和层析 (Pharmacia Biotech, 1994) 从无血清杂交瘤上清液中纯化单克隆抗体。

经过滤的 (0.45 μ m) 培养物上清液直接导入蛋白 G 基质中。通过测定 280 nm 下的光密度来检测流出物或洗脱物中的蛋白。用 150 mM PBS, pH 7.2 洗后, 用 0.1 M 甘氨酸/HCl 进行洗脱直到检测剂的背景值。所述的-G 基质

用 0.1 M 甘氨酸/HCl, pH 2.7 再生。

实施例 7: 结合物的产生

将单克隆抗体与过氧化物酶 (POD) 偶联以应用于 ELISA

所述单克隆抗体在外部与 (POD) 偶联。聚-POD 连接物由 MicroCoat (Bemned, Germany) 获得, HRP (辣根过氧化物酶)-葡聚糖连接物由 DAKO (Copenhagen, Denmark) 获得。

单克隆抗体与生物素偶联以用于 ELISA

纯化后, 将所述单克隆抗体生物素酰基化以便在 ELISA 中用作检测抗体。单克隆抗体与生物素和 POD 的偶联依本领域所公知的方法 (Harlow & Lane, 1988) 进行。

单克隆抗体以约 1-2 mg/ml 的浓度进行连接。偶联前, 将所述抗体在 0.1 M 醋酸钠缓冲液, pH 8.3 和 0.1 M 碳酸氢钠缓冲液, pH 8.3 中透析进行再缓冲。每 1mg 抗体滴加 50 μ g N-羟基琥珀酰亚胺基生物素 (NHS-d-生物素; Sigma) 在 DMSO 中混合。将混合物在室温下培养 1 小时。然后生物素酰基化的抗体通过在 0.15 M PBS, 0.05% NaN_3 , pH 7.5 中充分透析与非偶联的 NHS-d-生物素相脱离。

将单克隆抗体与胶体金偶联以用于快速免疫学检测:

所述单克隆抗体 (mab) 连接到胶体金上以用于快速的免疫学检测。这是依照标准方法 (Frens, 1973; Geoghegan 和 Ackerman, 1977; Slot 等., 1985) 进行的。为生产胶体金, 200 ml 0.01% 金亚氯酸盐- (HAuCl_4)-溶液加热至沸腾, 在继续加热的过程中添加 2 ml 1% 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 以还原。

为将单克隆抗体偶联到胶体金上, 稳定所需的大量 IgG 与金溶液混合,

于室温下温育 15 min。对偶联理想的 IgG 浓度和合适的 pH 值是针对每一单克隆抗体分别确定的。多聚体或蛋白，例如牛血清白蛋白 (BSA) 以 1% 加入到偶联试剂中以稳定金 IgG 结合物。通过将金 IgG 结合物离心从偶合试剂中去除不与 IgG 偶合的金胶体和游离 IgG。优选在 4℃ 下进行储存，并将 0.05% 的 NaN_3 加入到上述金 IgG 连接物缓冲液中。

实施例 8: 纯化的单克隆抗体的鉴定:

通过表面胞质团共振光谱 (SPR 光谱) 检测抗体-抗原相互作用

通过 SPR 光谱，可以测定单克隆抗体的亲和常数。这样可以找到用于 ELISA 快速检测的合适抗体。

在 Pharmacia BiAcCore 上进行表面胞质团光谱测定

所有的步骤均依照生产商的介绍在 Pharmacia BiAcCore Processing Unit CA 186 (BiAcCore 方法手册) 上进行。

过氧化氢酶通过 BiAcCore CM5 传感芯片的葡聚糖基质的胺偶联固定。为激活葡聚糖基质，将 45 μl 1:1-混合的 0.05M N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 0.2 M 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基) 碳化二亚胺 (EDC) 溶液以 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速加到所述传感芯片。然后所述过氧化氢酶 (35 μl ; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 在 10 mM 醋酸钠中 pH 5.0) 结合到葡聚糖基质上。剩余的 NHS 酯用 1 M 乙醇胺 (35 μl) 灭活。不与葡聚糖基质共价连接的过氧化氢酶通过用 HCl (10 mM; 15 μl) 使传感芯片再生而除去。

通过添加对所述过氧化氢酶-特异的单克隆抗体，它们与固定的氧化氢酶起反应，测定了结合到检测剂上的附着物的质量。所应用的不同浓度的抗体溶液的浓度范围在 20 到 670 nM。每种浓度的抗体均通过固定在传感器芯片上的过氧化氢酶以 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速注入。

结果:

抗体吸附常数 (k_{on}) 和解吸常数 (k_{off}) 的比值可以通过共振信号

(BIAevaluation software 3.0)的时程计算。测定了6个针对过氧化氢酶的单克隆抗体的亲和力:

表 1: 过氧化氢酶单克隆抗体亲和力测定结果:

单克隆抗体	$k_{on} [M^{-1} s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
HP25.2m/2H10	1.44E+05	3.90E-05	2.71E-10
HP25.6m/1G4	1.41E+05	2.52E-05	1.79E-10
HP25.6m/1B5	5.67E+04	3.86E-05	6.81E-10
HP25.6m/4E3	4.92E+04	5.96E-05	1.21E-09
HP25.6m/1A5	3.91E+04	4.77E-05	1.22E-09
HP25.6m/1H4	7.12E+04	4.12E-05	5.79E-10

$$K_D = k_{off} : k_{on}$$

选择用于人粪便ELISA的抗体配对

在检测所述培养物上清液时,表现最低检测限度的抗体通过 SPR 表位重叠的方法进行确定,并测定了亲和常数。检测了确定的结合(没有表位重叠,高吸收速率常数,低解吸速率常数)的抗原在夹心粪便 ELISA 中的检测限度。

实施例 9: 在病人的样品中筛选单克隆抗体培养物上清液(混合的多克隆/单克隆系统)

所述的通过直接 ELISA (实施例 4)表现特异抗原识别的单克隆抗体作为培养物上清液在夹心 ELISA 中对其病人识别和抗原检测限度进行了分析。

作为源于内部的样品,使用粪便样品,其感染状态(0和4组)由组织学分析和/或 ^{13}C 尿素呼吸检测确定其感染状态。在作为参考的检测中组 0 病人显示幽门螺杆菌-阴性结果,组 4 病人显示幽门螺杆菌-阳性结果。

所述 ELISE 平板(微滴定板 MaxiSorb; Nunc)用 100 μ l of 多克隆兔

抗-过氧化氢酶抗体或多克隆兔抗-幽门螺杆菌抗体在 50℃ 下包被过夜 (pab; 约 20 μ g IgG/ml 0.1 M 碳酸盐缓冲液, pH 9.5)。为封闭游离的结合位点, 每孔滴加 200 μ l 150 mM PBS pH 7.2 和 0.2% 鱼胶 (w/v) 在室温下温育 30min。然后, 将该 ELISA 平板用 250 μ l 加有 0.025% Tween 20 的 PBS (洗涤缓冲液 1) 洗两次。人粪便以 1:10 (w/v) 的比例悬浮于 150 mM 添加 2% 脱脂奶粉和 1 mM EDTA 的 PBS 中。

为确定抗原检测限度, 幽门螺杆菌-阴性的粪便样品悬液与 50 ng/ml 过氧化氢酶 (参见 实施例 3) 混合并用幽门螺杆菌-阴性的粪便悬液按 1:2 稀释。每孔 100 μ l 所述粪便悬液温育 1 h (对病人的样品进行双重检测)。敲空所述 ELISA 平板, 用洗涤缓冲液 2 (加有 0.2% Tween 20 的 PBS) 漂洗后再用洗涤缓冲液 2 洗四次。然后加入 100 μ l 杂交瘤培养物上清液 (在 PBS 中按 1:5 的比例稀释) 在室温下温育 60min。通过加入过氧化物酶-连接的第二抗体 (兔抗鼠 IgG-POD, DAKO) 检测结合抗体。在下一步骤中所述的过氧化物酶将加入的无色 POD 底物四甲基联苯胺 (TMB, Sigma) 转变为兰色产物。5 到 10 min 后优选 10min 后通过加入 1 N 硫酸 (100 μ l/孔) 终止反应。通过 ELISA 读数仪 (MWG Spektral) 测定上述着色反应的强度。在 450 nm 下测定, 以 620 nm, 优选 630 nm 作为参考波长。检测前加入抗体或底物溶液, 所述 ELISA 平板用洗涤缓冲液 1 洗三至四次。

确定仍可测定出的大于或等于两倍零值 (不添加抗原的幽门螺杆菌-阴性的粪便样品) 的消灭值作为检测限度。

将针对幽门螺杆菌溶菌产物的多克隆捕获抗体的, 敏感度为 68% (在 25 个阳性样品中 17 个被正确地检测出来) 特异性为 82% (17 个幽门螺杆菌-阴性的样品中, 3 个是假阳性) 的单克隆抗体 HP25.2m/2H10 用于夹心 ELISA。病人对更多单克隆抗体 (培养物上清液) 的识别参见表 3。

表 2: HP25.2m/2H10: 在夹心 ELISA 中的敏感性和特异性(捕获抗体: 针对幽门螺杆菌的单克隆抗体)

粪便样品	患者的感染状况	捕获抗体: 针对幽门 HP 的单克隆抗体 检测抗体: HP25.2m/2H10(培养物上清液) OD ₄₅₀₋₆₃₀	评估: 截断: 0.1: OD ₄₅₀₋₆₃₀ = 0.1
CX0010	阳性	0.25	阳性
CX1014	阳性	0.75	阳性
CX1029	阳性	0.18	阳性
CX1038	阳性	0.09	阴性
CX1052	阳性	0.11	阳性
CX2008	阳性	0.63	阳性
CX2009	阳性	0.32	阳性
CX2016	阳性	0.07	阴性
CX2019	阳性	0.59	阳性
CX2029	阳性	0.52	阳性
CX0213	阳性	0.04	阴性
CX294-1	阳性	0.14	阳性
CX3098	阳性	0.13	阳性
CX3146	阳性	0.05	阴性
CX3148	阳性	0.08	阴性
CX3234	阳性	0.18	阳性
CX4003	阳性	0.17	阳性
CX4006	阳性	0.25	阳性
CXT001	阳性	0.23	阳性

CXT002	阳性	0.53	阳性
CXT003	阳性	0.12	阳性
CXT004	阳性	0.03	阴性
CXT005	阳性	0.03	阴性
CXT006	阳性	0.31	阳性
CXT007	阳性	0.08	阴性
CX1008	阴性	0.29	阳性
CX1031	阴性	0.08	阴性
CX1049	阴性	0.7	阳性
CX1051	阴性	0.09	阴性
CX0142	阴性	0.03	阴性
CX0185	阴性	0.03	阴性
CX0189	阴性	0.08	阴性
CX0193	阴性	0.03	阴性
CX2010	阴性	0.08	阴性
CX2018	阴性	0.09	阴性
CX0220	阴性	0.03	阴性
CX0231	阴性	0.03	阴性
CX0258	阴性	0.02	阴性
CX3008	阴性	0.09	阳性
CX3011	阴性	0.08	阴性
CX3033	阴性	0.07	阴性
CX3035	阴性	0.09	阴性

缩写: pab: 多克隆抗体; HP: 幽门螺杆菌 (*H. pylori*)

表 3: 针对过氧化氢酶的单克隆抗体的鉴定:

融合/克隆	同型	WB (ag)	NWG (ng/ml)	经校正检测的粪便样品	
				阳性样品	阴性样品
HP25.2m/2H10	IgG2a, K	+	1.5	17/25	14/17
HP25.6m/1G4	IgG1, K	+	1.5	4/5	2/2
HP25.6m/1 B5	IgG1, K	+	3-6	3/5	2/2
HP25.6m/1 H4	IgG1, K	+	3-6	2/5	2/2
HP25.6m/4E3	IgG1, K	+	6	2/5	2/2
HP25.6m/1A5	IgG1, K	+	6	2/5	2/2
HP25.6m/5E4	IgG1, K	-	1.5	1/5	2/2
HP25.6m/4A12	IgG1, K	-	1.5	1/5	2/2
HP25.6m/5F4	IgG1, K	-	1.5	1/5	2/2

缩写: ag: 抗原; WB: Western blot; NWG: 检测限度

结果:

表 3 概括了同型检测, Western 印迹分析, 检测限度的确定和针对病人中过氧化氢酶的单克隆抗体检测结果。上述数据显示通过单克隆抗体检测天然过氧化物酶的良好检测结果与病人中的良好检测并不相关。

在混合的多克隆抗体/单克隆抗体夹心 ELISA 系统中所述的单克隆抗体 HP25.2m/2H10 表现出 68% 敏感性和 82% 的特异性。在只有单克隆的 ELISA 系统中使用纯化的单克隆抗体(而非培养物上清液)其敏感性和特异性还有望提高。在此情况下, 无论是针对相同抗原表位的单克隆抗体(参见 实施例 10), 还是针对同一抗原不同表位的两个不同的单克隆抗体(参见 实施例 12)都可用作捕获和检测抗体。

实施例 10: 在人粪便中通过 ELISA (单纯的单克隆抗体系统) 检测幽门螺杆菌

菌 (*H. pylori*)

为进行所述检测, 处理来自 10 不同医院或肠胃诊所的病人的粪便样品。由 ^{13}C 尿素呼吸检测和/或胃活组织组织学分析检测所述的幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 状态。所述待检测的粪便样品进行编号使实验室工作人员不知道其感染状态。

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 粪便夹心ELISA (三步 ELISA)

所述的 ELISA 平板 (MaxiSorb; Nunc) 用 $100\mu\text{l}$ 单克隆抗体溶液 ($2.0\mu\text{g}$ HP25.2m/2H10/ml, 0.1 M 碳酸盐缓冲液, pH 9.5) 在 37°C 下包被 1 h。为封闭游离的结合位点, 每孔滴加 $200\mu\text{l}$ 150 mM PBS 和 0.2% 鱼胶 (w/v) 在室温下温育 30min。然后, 将该 ELISA 平板用 $250\mu\text{l}$ 洗涤缓冲液 1 (加有 0.025% Tween 的 PBS) 洗两次。人粪便以 $1:10$ (w/v) 的比例悬浮于 150 mM 添加 2% 脱脂奶粉和 1 mM EDTA 的 PBS 中。为确定抗原检测限度, 将纯化的幽门螺杆菌过氧化物酶中加入到已知浓度的来自幽门螺杆菌-阴性的病人的粪便悬液。将上述粪便悬液在 7000g 下离心 5 分钟。每孔 $100\mu\text{l}$ 所述粪便悬液温育 1 h。敲空所述 ELISA 平板, 用洗涤缓冲液 2 (加有 0.2% Tween 的 PBS) 冲洗并洗涤四次。然后加入 $100\mu\text{l}$ 生物素偶联的单克隆抗体在室温下温育 60min。通过加入链霉抗生物素与 POD 的结合物检测结合抗体。在下一步骤中所述的 POD 将加入的无色底物 TMB (Sigma) 转变为兰色产物。5 到 10 min 后优选 10min 后通过加入 1 N 硫酸 ($100\mu\text{l}$ /孔) 终止反应。通过 ELISA 读数仪 (MWG Spektral) 测定上述着色反应的强度。在 455nm 下测定, 以 620 nm , 优选 630 nm 作为参考波长。

表 4: 通过ELISA用所述的单克隆抗体 HP25.2m/2H10 作为捕获和检测抗体在粪便中检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 过氧化氢酶

病人	临床状态	HP 粪便ELISA OD(455-630)			
			2013	阴性	0.049
			2014	阴性	0.046
1001	阴性	0.069	2015	阴性	0.048
1002	阴性	0.104	2017	阴性	0.050
1007	阴性	0.053	2018	阴性	0.061
1008	阴性	0.042	2023	阴性	0.056
1010	阴性	0.043	2024	阴性	0.051
1012	阴性	0.055	2028	阴性	0.102
1017	阴性	0.052	2033	阴性	0.050
1021	阴性	0.045	2034	阴性	0.077
1022	阴性	0.068	2043	阴性	0.045
1024	阴性	0.036	3123	阴性	0.055
1025	阴性	0.046	3213	阴性	0.119
1027	阴性	0.057	3214	阴性	0062
1030	阴性	0.061	3224	阴性	0048
1031	阴性	0.037	3225	阴性	0065
1032	阴性	0.056	3236	阴性	0 043
1034	阴性	0.048	4004	阴性	0 089
1035	阴性	0.033	5004	阴性	0 079
1040	阴性	0.037	5007	阴性	0 055
1046	阴性	0.046	5008	阴性	0 156
2002	阴性	0.056	5009	阴性	0 076
2006	阴性	0.032	5010	阴性	0.073
2007	阴性	0.027	5012	阴性	0.051
2010	阴性	0.039	5013	阴性	0.057
2012	阴性	0.041	5017	阴性	0.064

5018	阴性	0.033
5019	阴性	0.017
5020	阴性	0.017
5021	阴性	0.019
5022	阴性	0.020
5024	阴性	0.015
5025	阴性	0.017
5027	阴性	0.022
5028	阴性	0.021
5030	阴性	0.019
5031	阴性	0.014
5033	阴性	9.018
5034	阴性	0.013
5035	阴性	0.018
5036	阴性	0.031
5040	阴性	0.024
5042	阴性	0.026
5046	阴性	0.021
5052	阴性	0.020
5056	阴性	0.523
5057	阴性	0.023
5060	阴性	0.055
5063	阴性	0.022
5064	阴性	0.017
5065	阴性	0.035
5066	阴性	0.024
5067	阴性	0.088
5068	阴性	0.021
6002	阴性	0.078

6005	阴性	0.019
6008	阴性	0.013
6019	阴性	0.034
7005	阴性	0.025
7006	阴性	4.556
7009	阴性	0.030
7013	阴性	9.024
8004	阴性	0.023
8047	阴性	0.021
213	阳性	0.879
294	阳性	4.097
444-1	阳性	0.201
1003	阳性	0.475
1013	阳性	4.087
1014	阳性	0.105
1015	阳性	2.469
1028	阳性	0.096
1029	阳性	4.466
1037	阳性	2.485
2001	阳性	0.083
2003	阳性	0.817
2005	阳性	1.508
2008	阳性	4.247
2009	阳性	1.597
2016	阳性	2.651
2022	阳性	0.135
2029	阳性	3.953
2032	阳性	3.400
2035	阳性	3.384

2039	阳性	0.053
2040	阳性	4.602
2041	阳性	0.200
2042	阳性	4.592
3146	阳性	1.742
6014	阳性	2.572
3149	阳性	0.989
3153	阳性	4.590
3570	阳性	4.567
3577	阳性	4.566
3215	阳性	4.540
3219	阳性	4.486
3220	阳性	4.518
3231	阳性	4.706
3234	阳性	4.567
3235	阳性	4.616
3241	阳性	3.671
3243	阳性	4.582
4003	阳性	4.700
4005	阳性	0.401
4006	阳性	4.694
4018	阳性	4.142
4019	阳性	2.366
4020	阳性	1.468
5001	阳性	4.490
5002	阳性	3.917
5003	阳性	4.321
5006	阳性	4.826
77	阳性	0.067

5011	阳性	0.071
53	阳性	4.773
70	阳性	1.084
5016	阳性	0.101
68	阳性	4.611
5069	阳性	1.079
CXT 5	阳性	0.602
5072	阳性	4.151
5075	阳性	4.307
5076	阳性	4.516
CXT 4	阳性	0.268
5078	阳性	1.022
6001	阳性	4.441
6004	阳性	4.296
CXT 3	阳性	2.126
6018	阳性	4.656
6020	阳性	0.427
7001	阳性	2.717
CXT 2	阳性	4.479
7002	阳性	4.143
7003	阳性	0.149
7004	阳性	4.543
CXT 1	阳性	0.953
8026	阳性	0.025
8033	阳性	0.784
67	阳性	0.589
5029	阳性	0.675
64	阳性	1.785
58	阳性	0.304

5039	阳性	3.391
CXT 13	阳性	3.785
6013	阳性	1.972
CXT 12	阳性	0.157
5048	阳性	1.695
5050	阳性	0.490
CXT 10	阳性	0.247
5053	阳性	4.232
5055	阳性	4.364
CXT 9	阳性	2.455
5058	阳性	3.886
5059	阳性	4.450

CXT 8	阳性	4.374
5061	阳性	4.032
CXT 7	阳性	0.647
CXT 6	阳性	4.592

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) ELISA (n = 1821)

		幽门螺杆菌 (<i>H. pylori</i>) 感染状态	
		阳性	阴性
幽门螺杆菌(<i>H. Pylori</i>) 粪便夹心ELISA	阳性	89	6
截断 OD ₄₅₀₋₆₂₀ : 0.09	阴性	5	82

灵敏度: 94.7%

特异性: 93.2%

表 4 表明通过粪便夹心 ELISA 的方法分析幽门螺杆菌-阴性 (*H. pylori*-阴性) 和幽门螺杆菌-阳性 (*H. pylori*-阳性) 的粪便样品的结果。这里所述单克隆抗体, 优选 HP25.2m/2H10, 既用作捕获抗体又用作检测抗体 (POD-标记) 以检测来自粪便样品的所述的幽门螺杆菌 (*H. Pylori*) 抗原过氧化氢酶。所述的过氧化氢酶是极为稳定的抗原, 其可通过消化道而不发生改变并可在粪便样品中检测出来。在仅基于一个过氧化氢酶-特异的

纯单克隆 ELISA 系统，对 182 个粪便样品的分析敏感性为 94.7% 特异性为 93.2%。这一敏感性和特异性导致高阳性和阴性预测值，使检测幽门螺杆菌（*H. pylori*）感染，仅通过所述样品以高可信度的、廉价的和非侵染性的粪便分析以确定根除治疗提供了可能。可能地，通过针对过氧化氢酶不同抗原表位的不同单克隆抗体的结合或两种不同抗原（例如 过氧化氢酶/脲酶）检测系统的结合提高上述的敏感性和特异性。

由于一步 ELISA 检测的发展，与下述三步 ELISA 检测（实施例 11 和 12）相比可用性得以提高。

实施例 11：在三步 ELISA 检测法中寻找合适的抗体配对

依照实施例 10 进行检测。

为寻找合适的抗体配对，针对过氧化氢酶（参见表 3）的，已经纯化且其中一些是生物素酰化的（参见实施例 7）单克隆抗体进行了处理。首先所述的单克隆抗体相互滴定以寻找用作捕获和检测抗体的理想的浓度。然后用经优化的 ELISA 系统检测病人的粪便样品，确定幽门螺杆菌阴性的人的粪便（零-粪便）中过氧化氢酶（表 5）。

有关病人识别和抗原检测限度的单克隆抗体参见表 5。

表 5: 寻找针对过氧化氢酶的单克隆抗体配对的结果 (三步 ELISA)

生物素酰化的检测抗体	捕获抗体				
	25. 2m/2H10	25. 6m/1B5	25. 6m/1G4	25. 6m/1A5	25. 6m/1H4
25. 6m/2H10	N: 0. 03 G4: 7-8 G0: 2	0. 1 7 2	0. 03 8 2	0. 1 7 2	0. 03 8 2
25. 6m/1B5	N: 0. 1 G4: 8 G0: 2	0. 1 7 1	0. 1 5 2	0. 03 7 2	0. 3 8 2
25. 6m/1G4	N: 0. 3 G4: 6-8 G0: 1-2	0. 1 7 2	0. 1 8 4	0. 01 8 2	0. 1 8 2
25. 6m/1A5	N: 0. 3 G4: 6-7 G0: 2	0. 1 7 2	0. 3 5 2	0. 1 7 2	0. 3 8 2
25. 6m/1H4	N: 0. 1 G4: 8 G0: 3	0. 3 	0. 1 4-7 2	0. 3 7 2	0. 1 8 2

病人识别 (检测 8 临界-阳性 G4和4 临床-阴性 G0样品)

N = 在零-粪便中所述过氧化氢酶检测限度 [ng/ml]

临界阳性-阳性 = 在检测中是特定的未定状态的样品

在一步ELISA中寻找合适的抗体配对

为寻找合适的抗体配对, 针对过氧化氢酶(参见表 9)的, 已经纯化且其中一些是生物素酰化的 (参见实施例 7) 单克隆抗体进行了处理。

不同捕获和检测抗体的组合 (参见表 6) 用 27 幽门螺杆菌-阳性和 17 幽门螺杆菌-阴性的病人样品在一步 ELISA 中进行检测。

一步夹心 ELISA

2-8℃下用 100μl 的 mab 溶液 (2.0μg 捕获抗体/ml 碳酸盐缓冲液, 0.1 M, pH 9.5) 包被 ELISA 平板 (MaXiSorb Lockwell; Nunc) 过夜。用 PBS 将如此包被的 ELISA 平板洗涤两次。加入每孔 200μl 封闭缓冲液 (0.3% BSA; 在 PBS 中的 5% 山梨醇), 并在 2-8℃ 下温育过夜以封闭仍然游离的结合部位。吸干 ELISA 平板, 在循环干燥炉上于 2-8℃ 下干燥过夜, 然后与干燥剂袋一起于 28℃ 下储存。

将患者的粪便悬浮在样品缓冲液 (150 mM PBS + 0.5% 动物血清 + 1 mM EDTA + 0.1% 去污剂), 比例为 1:5 (0.1g 粪便样品 + 500μl 样品缓冲液), 持续约 30 秒 (Vortex), 然后在 3000g 下离心 5 分钟。向此平板施用每孔 50μl 的上清液。

然后, 向此粪便悬浮液中直接加入已用样品缓冲液中稀释过的 50μl POD 标记的抗体。该平板在振荡器上温育 1 小时。用洗涤缓冲液 (75 mM PBS, 0.25% Tween) 洗涤 5 次, 然后将过氧化酶底物 TMB (四甲基联苯胺) 加到该单组分底物 (Seramun) (100μl/孔)。10 分钟后, 加入 1N 盐酸 (100μl/孔) 终止酶反应。然后以 630nm 为参照波长在 450nm 下测定着色的强度。

表 6: 针对过氧化氢酶的单克隆抗体配对的结果 (一步ELISA)

POD 标 记的 抗体	捕获抗体								
	25. 2m /2H10	25. 6m /1B5	25. 6m /1A5	25. 6m /4A12	25. 6m /1G4	25. 6m /1H4	25. 6m /3D6	25. 6m /2E12	25. 6m /5E4
25. 2m /2H10	-	24 14	24 11	22 13	23 14	24 12	19 14	24 12	22 15
25. 6m /1B5	G4: 23 G0: 12	-	23 13	20 14	23 12	23 12	18 12	23 10	22 12
25. 6m /1H4	G4: 21 G0: 9	24 13	24 14	- 11	24 11	- 15	20 15	25 12	24 20
25. 6m /4A12	G4: 20 G0: 13	20 12	20 17	- 13	20 13	25 3	19 13	20 13	20 15
25. 6m /3D6	G4: 17 G0: 15	24 9	24 12	21 13	23 8	23 13	- 9	22 9	22 14

患者识别 (检测27份临界阳性G4和17份临床阴性G0样品); 截断: $OD_{450-630nm}$: 0.15。

抗体组合 HP25. 6m/1B5 (捕获抗体) 和 HP25. 2m/2H10-POD (检测抗体) 证明是非常有利的, 因为具有良好的患者识别 (校正检测为 24/27 幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阳性和 14 /17 幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阴性 样品), 对人粪便中的幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原 (过氧化氢酶) 的强大的信号检测强度。

实施例 12: 通过一步ELISA法检测人粪便中的幽门螺杆菌 (*H. pylori*)

为进行该实验, 对来自 10 个不同医院或胃肠病诊所的患者的粪便进行处理。通过 ^{13}C 尿素呼吸实验和/或胃活组织检查的组织学分析, 测定幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阴性或幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阳性的状况。

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 粪便夹心ELISA (一步实验)

2-8℃下用 100 μ l HP25.6m/1B5) /ml 碳酸盐缓冲液, 0.1 M, pH 9.5) 包被 ELISA 平板 (MaXiSorb Lockwell; Nunc) 过夜。用 PBS 将如此包被的 ELISA 平板洗涤两次。加入每孔 200 μ l 封闭缓冲液 (0.3% BSA; 在 PBS 中的 20% 山梨醇), 并在 2-8℃下温育过夜以封闭仍然游离的结合部位。吸干 ELISA 平板, 在循环干燥炉上于 28℃下干燥过夜, 然后与干燥剂袋一起于 2-8℃下储存。将患者的粪便悬浮在样品缓冲液 (150 mM PBS + 0.5% 动物血清+1 mM EDTA + 0.1%去污剂), 比例为 1:5 (0.1g 粪便样品+500 μ l 样品缓冲液), 持续约 30 秒 (Vortex), 然后在 3000g 下离心 5 分钟。向此平板施用每孔 50 μ l 的上清液 (二倍到三倍测定)。然后, 向此粪便悬浮液中直接加入已在样品缓冲液中稀释过的 50 μ lPOD 标记的抗体 HP25.2m/2H10-葡聚糖 POD)。该平板在振荡器上温育 1 小时。

用洗涤缓冲液 (75 mM PBS, 0.25% Tween) 洗涤 5 次, 然后将过氧化酶底物 TMB (四甲基联苯胺) 加到该单组分底物中 (100 μ l/孔)。10 分钟后, 加入 1 N 盐酸 (100 μ l/孔) 终止酶反应。然后以 630nm 为参照波长, 在 450nm 下测定着色的强度。

表 7: 在总共119份粪便样品的分析中, 一步ELISA实验结果与黄金标准的比较

检测样品编号	¹³ C呼吸检测结果	胃活组织检测结果	一步ELISA检测结果
1001	n. d.	阴性	0.033
1002	n. d.	阴性	0.022
1007	n. d.	阴性	0.015
1008	n. d.	阴性	0.032
1010	n. d.	阴性	0.016
1012	n. d.	阴性	0.026
1017	n. d.	阴性	0.026
1021	n. d.	阴性	0.014
1022	n. d.	阴性	0.018
1024	n. d.	阴性	0.018
1025	n. d.	阴性	0.022
1027	n. d.	阴性	0.044
1030	n. d.	阴性	0.021
1031	n. d.	阴性	0.014
1032	n. d.	阴性	0.014
1034	n. d.	阴性	0.023
1035	n. d.	阴性	0.068
1040	n. d.	阴性	0.058
1046	n. d.	阴性	0.023
2002	n. d.	阴性	0.019
2006	n. d.	阴性	0.017

2007	阴性	n. d.	0.019
2010	n. d.	阴性	0.070
2012	阴性	n. d.	0.040
2013	阴性	n. d.	0.040
2014	阴性	n. d.	0.016
2015	n. d.	阴性	0.027
2017	阴性	阴性	0.034
2018	阴性	阴性	0.030
2023	n. d.	阴性	0.031
2024	阴性	n. d.	0.023
2028	n. d.	阴性	0.049
2033	阴性	阴性	0.040
2034	阴性	阴性	0.083
2043	n. d.	阴性	0.083
3123	阴性	n. d.	0.013
3213	n. d.	阴性	0.035
3224	阴性	n. d.	0.014
3225	n. d.	阴性	0.025
4004	n. d.	阴性	0.044
5004	n. d.	阴性	0.045
5007	n. d.	阴性	0.014
5008	n. d.	阴性	0.015
5009	n. d.	阴性	0.028
5010	n. d.	阴性	0.058
5012	n. d.	阴性	0.030

5013	n. d.	阴性	0.031
5017	n. d.	阴性	0.027
5018	n. d.	阴性	0.033
5019	n. d.	阴性	0.010
5020	n. d.	阴性	0.192
5021	n. d.	阴性	0.023
5022	n. d.	阴性	0.017
5024	n. d.	阴性	0.011
5025	n. d.	阴性	0.015
5027	n. d.	阴性	0.026
5028	n. d.	阴性	0.020
5030	n. d.	阴性	0.033
5031	n. d.	阴性	0.013
5033	n. d.	阴性	0.014
5035	n. d.	阴性	0.028
5036	n. d.	阴性	0.022
5040	n. d.	阴性	0.024
5042	n. d.	阴性	0.053
5046	n. d.	阴性	0.018
5052	n. d.	阴性	0.015
5056	n. d.	阴性	1.919
9011	n. d.	阴性	0.647
9012	n. d.	阴性	0.026
9013	n. d.	阴性	0.022
9015	n. d.	阴性	0.032
9019	n. d.	阴性	0.040
9022	n. d.	阴性	0.029
213	n. d.	阳性	0.752
444	n. d.	阳性	0.241

1003	n. d.	阳性	0.446
1013	n. d.	阳性	3.809
1014	n. d.	阳性	0.316
1015	n. d.	阳性	2.693
1028	n. d.	阳性	0.959
1029	n. d.	阳性	4.336
1037	n. d.	阳性	2.152
2005	阳性	n. d.	1.289
2008	n. d.	阳性	3.814
2009	阳性	n. d.	1.050
2016	n. d.	阳性	1.564
2029	阳性	阳性	4.347
2032	阳性	阳性	2.661
2035	n. d.	阳性	3.632
2039	阳性	阳性	0.694
2040	n. d.	阳性	3.189
2041	阳性	阳性	1.195
2042	阳性	阳性	4.350
3146	阳性	n. d.	4.189
3219	阳性	阳性	4.267
3220	阳性	阳性	4.138
3231	阳性	阳性	4.332
3234	阳性	阳性	3.989
3241	阳性	阳性	1.580
3570	阳性	n. d.	4.147
4003	n. d.	阳性	4.140
4005	阳性	阳性	0.298
4006	n. d.	阳性	4.228
6027	n. d.	阳性	4.244

6040	n. d.	阳性	3.105
6050	n. d.	阳性	3.806
6052	n. d.	阳性	4.221
6064	n. d.	阳性	4.225
6065	n. d.	阳性	4.210
7001	n. d.	阳性	2.584
7002	n. d.	阳性	4.245
7003	n. d.	阳性	2.236
7020	n. d.	阳性	0.038
8026	n. d.	阳性	0.013
8033	n. d.	阳性	1.269
9001	n. d.	阳性	3.765
9002	n. d.	阳性	4.049
9003	n. d.	阳性	3.674
9006	n. d.	阳性	0.992
9007	n. d.	阳性	0.052
9008	n. d.	阳性	4.165

9009	n. d.	阳性	0.033
9014	n. d.	阳性	4.042
9017	n. d.	阳性	4.276
9018	n. d.	阳性	0,44
9022	n. d.	阳性	1.961
T 01	阳性	n. d.	2.083
T02	阳性	n. d.	1.722
T 03	阳性	阳性	3.871
T 04	阳性	阳性	4.463
T 05	阳性	阳性	2.368
T 07	阳性	阳性	0.785
T09	阳性	n. d.	1.480
T10	阳性	n. d.	0.768
T13	n. d.	阳性	2.211
T70	阳性	n. d.	0.675
T 77	阳性	n. d.	0.038
T88	阳性	n. d.	1.377

n. d.: 未检测

截断: (OD_{450-630nm}): 阳性 >0.18; 阴性 <0.13

(n=199)

一步检测

方法	黄金标准	
	阳性	阴性
阳性	94	3
阴性	6	96

灵敏度: 94%

特异性: 97%

结果:

表 7 显示了采用一步粪便夹心 ELISA 法检查幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阴性和幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阳性粪便样品的结果。将单克隆抗体 (HP25.6m/1B5; HP25.2m/2H10) 用于检测粪便样品中幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原过氧化氢酶。在纯单克隆 ELISA 系统中对 199 份粪便样品进行检查, 该分析是以前述的过氧化氢酶特异性单克隆抗体为基础的, 其灵敏度为 94%, 而特异性为 97%。

实施例 13: 通过优化的一步 ELISA 法检测人粪便中的幽门螺杆菌 (*H. pylori*)

为进行该实验, 对来自 10 个不同医院或胃肠病诊所的患者的粪便进行处理。通过胃活体组织检查的组织分析检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 的状况。这些实验在外部 GLP 实验室进行, 其中对测试样品进行编号, 以使实验室工作人员不知道样品的感染状况。

优化的一步夹心 ELISA:

2-8℃ 下用 100 μ l 的 mab 溶液 (2.0 μ g HP25.6m/1B5) /ml 碳酸盐缓冲液, 0.1 M, pH 9.5) 包被 ELISA 平板 (MaXiSorb Lockwell; Nunc) 过夜。用 PBS 将如此包被的 ELISA 平板洗涤两次。加入每孔 200 μ l 封闭缓冲液 (0.3% BSA; 在 PBS 中的 5% 山梨醇), 并在 2-8℃ 下温育过夜以封闭仍然游离的结合部位。吸干 ELISA 平板, 在循环干燥炉上于 28℃ 下干燥过夜, 然后与干燥剂袋一起于 2-8℃ 下储存。

将患者的粪便悬浮在样品缓冲液 (150 mM PBS + 0.5% 动物血清 + 1 mM EDTA + 0.1% 去污剂), 比例为 1:5 (0.1g 粪便样品 + 500 μ l 样品缓冲液), 持续约 30 秒 (Vortex), 然后在 3000g 下离心 5 分钟。向此平板施用每孔 50 μ l 的上清液。然后, 向此粪便悬浮液中直接加入已在样品缓冲液中稀释过的

50 μ l POD 标记的抗体 (200fM /ml 的 HP25.2m/2H10-葡聚糖 POD 标记)。该平板在振荡器上温育 1 小时。用洗涤缓冲液 (75 mM PBS, 0.25% Tween) 洗涤 5 次, 然后将过氧化酶底物 TMB (四甲基联苯胺) 加到该单组分底物 (Seramun) (100 μ l/孔)。10 分钟后, 加入 1 M 硫酸 (100 μ l/孔) 终止酶反应。然后以 630nm 为参照波长, 在 450nm 下测定着色的强度。

表 8: 幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 粪便夹心 ELISA (优化的一步测试)

通过优化的一步 ELISA, 采用单克隆抗体 HP25.6m/1B5; HP25.2m/2H10 检测粪便中的幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 过氧化氢酶。

病人编号	组织学检测结果	HP 粪便 ELISA
CX 7042	阴性	0.022
CX 12070	阴性	0.018
CX 9138	阴性	0.013
CX 12080	阴性	0.015
CX 12076	阴性	0.071
CX 7028	阴性	0.019
CX 9046	阴性	0.013
CX 12077	阴性	0.025
CX 9109	阴性	0.012
CX 9120	阴性	0.018
CX9144	阴性	0.014
CX 12032	阴性	0.017
CX 2067	阴性	0.037
CX8010	阴性	0.017
CX 12027	阴性	0.043
CX12085	阴性	0.012

CX 2105	阴性	0.016
CX 9029	阴性	0.028
CX 9101	阴性	0.013
CX9119	阴性	0.073
CX 9129	阴性	0.022
CX 9174	阴性	0.029
CX 12079	阴性	0.016
CX 12092	阴性	0.031
CX 2066	阴性	0.043
CX 5115	阴性	0.022
CX 7035	阴性	0.076
CX 9024	阴性	0.018
CX 9136	阴性	0.014
CX 12065	阴性	0.017
CX 12084	阴性	0.014
CX 2044	阴性	0.028
CX7032	阴性	0.048
CX 8011	阴性	0.014

CX 8050	阴性	0.015
CX 9056	阴性	0.014
CX 6067	阴性	0.016
CX 9041	阴性	0.036
CX9157	阴性	0.021
CX 12042	阴性	0.014
CX9134	阴性	0.016
CX 9160	阴性	0.015
CX 9171	阴性	0.042
CX 9025	阴性	0.017
CX 9150	阴性	0.014
CX 2050	阴性	0.013
CX 2057	阴性	0.021
CX 9184	阴性	0.018
CX 11021	阴性	0.009
CX 7043	阴性	0.024
CX7036	阴性	0.016
CX 7047	阴性	0.015
CX 9064	阴性	0.06
CX 8002	阴性	0.015
CX9115	阴性	0.016
CX 9189	阴性	0.063
CX 9195	阴性	0.015
CX 12059	阴性	0.028
CX 8015	阴性	0.015
CX 9137	阴性	0.052
CX 9187	阴性	0.015
CX 9047	阴性	0.017
CX 9166	阴性	0.019

CX 12064	阴性	0.031
CX 2070	阴性	0.018
CX 6081	阴性	0.05
CX 9104	阴性	0.013
CX 9167	阴性	0.017
CX 9196	阴性	0.027
CX 9066	阴性	0.016
CX 10010	阴性	0.012
CX 9061	阴性	0.014
CX 9170	阴性	0.013
CX11012	阴性	0.03
CX 2064	阴性	0.024
CX 5101	阴性	0.025
CX7021	阴性	0.045
CX 9105	阴性	0.013
CX 12016	阴性	0.019
CX 6070	阴性	0.013
CX2101	阴性	0.021
CX 8014	阴性	0.016
CX 9169	阴性	0.014
CX 12088	阴性	0.017
CX 9121	阴性	0.033
CX 9023	阴性	0.055
CX 12071	阴性	0.022
CX 10003	阴性	0.028
CX 12047	阴性	0.02
CX 9089	阴性	0.017
CX 9107	阴性	0.032
CX 2061	阴性	0.03

CX 11013	阴性	0.014
CX 9092	阴性	0.017
CX1202{	阴性	0.049
CX 12024	阴性	0.023
CX 9125	阴性	0.019
CX2107	阴性	0.025
CX 9039	阴性	0.032
CX 12046	阴性	0.013
CX11024	阴性	0.053
CX 12012	阴性	0.015
CX 12040	阴性	0.028
CX 2087	阴性	0.027
CX 9028	阴性	0.018
CX 9176	阴性	0.014
CX 10007	阴性	0.019
CX 12089	阴性	0.012
CX 7048	阴性	0.041
CX9114	阴性	0.019
CX 12019	阴性	0.028
CX 9052	阴性	0.015
CX 9181	阴性	0.014
CX 12058	阴性	0.055
CX 9030	阴性	0.023
CX 9059	阴性	0.015
CX10005	阴性	0.028
CX 10039	阴性	0.018
CX9190	阴性	0.015
CX9164	阴性	0.016
CX 10044	阴性	0.023

CX 9110	阴性	0.027
CX 9127	阴性	0.018
CX12013	阴性	0.022
CX 5105	阴性	0.017
CX 9178	阴性	0.037
CX 10024	阴性	0.015
CX 2098	阴性	0.038
CX 10008	阴性	0.015
CX 10034	阴性	0.016
CX 9162	阴性	0.513
CX 12023	阴性	0.023
CX 2091	阴性	0.225
CX 12034	阴性	0.022
CX 12039	阴性	0.019
CX 9085	阴性	0.022
CX 10029	阴性	0.03
CX11022	阴性	0.031
CX 2073	阴性	0.035
CX 12017	阴性	0.017
CX 9141	阴性	0.024
CX 10026	阴性	0.014
CX 12003	阴性	0.038
CX 9050	阴性	0.038
CX 9086	阴性	0.017
CX 10013	阴性	0.036
CX 12062	阴性	4
CX 6063	阴性	3.537
CX 9133	阳性	0.023
CX 9188	阳性	0.017

CX 9192	阳性	0.014
CX 2048	阳性	0.548
CX 2078	阳性	0.296
CX 8009	阳性	0.695
CX 9145	阳性	1.778
CX 9076	阳性	0.09
CX 9072	阳性	0.024
CX 5148	阳性	0.213
CX 11004	阳性	0.477
CX 2093	阳性	0.271
CX 12060	阳性	1.205
CX 7053	阳性	2.436
CX 11006	阳性	0.13
CX 8001	阳性	4
CX 2100	阳性	1.539
CX 5113	阳性	0.583
CX 7029	阳性	0.155
CX 10020	阳性	1.335
CX 2099	阳性	3.403
CX 12018	阳性	0.927
CX 7037	阳性	4
CX 2083	阳性	3.896
CX 4001	阳性	0.678
CX 5125	阳性	4
CX 9130	阳性	2.499
CX 11008	阳性	3.367
CX 9194	阳性	4
CX 12028	阳性	3.671
CX 4016	阳性	2.545

CX 4013	阳性	4
CX 9135	阳性	4
CX 11001	阳性	4
CX2106	阳性	2.71
CX 2094	阳性	4
CX 9082	阳性	1.769
CX 5123	阳性	3.773
CX 6076	阳性	4
CX 9155	阳性	4
CX 7030	阳性	3.661
CX 9128	阳性	4
CX 12035	阳性	4
CX 10023	阳性	3.426
CX 2060	阳性	4
CX 12041	阳性	4
CX 9045	阳性	1.382
CX 9096	阳性	1.653
CX 2056	阳性	4
CX 12002	阳性	2.441
CX 6061	阳性	0.018
CX 11020	阳性	4
CX 9147	阳性	3.758
CX 9078	阳性	3.686
CX 5147	阳性	4
CX 7023	阳性	4
CX 9131	阳性	4
CX 9156	阳性	4
CX 10019	阳性	13.438
CX 12026	阳性	3.941

CX 9079	阳性	3.628
CX 4023	阳性	4
CX 9031	阳性	3.273
CX 5116	阳性	4
CX 9077	阳性	3.929
CX 4012	阳性	4
CX 5106	阳性	3.648
CX 12095	阳性	4
CX 10002	阳性	3.698
CX 11005	阳性	4
CX 9093	阳性	4
CX 11014	阳性	3.465
CX 9051	阳性	4
CX 10028	阳性	3.799
CX 4017	阳性	4
CX 9182	阳性	4
CX 9099	阳性	4
CX 12022	阳性	4
CX 2079	阳性	3.884
CX 9102	阳性	3.524
CX 2076	阳性	3.593
CX 9177	阳性	4
CX 9088	阳性	2.14
CX 6072	阳性	4
CX 7038	阳性	4
CX 9123	阳性	4
CX 12074	阳性	4
CX 9055	阳性	4
CX 9036	阳性	4

CX 6078	阳性	4
CX 2069	阳性	3.778
CX 9043	阳性	3.727
CX 12050	阳性	3.516
CX 5119	阳性	4
CX 9113	阳性	4
CX 9068	阳性	3.857
CX 2092	阳性	4
CX 10050	阳性	4
CX 9053	阳性	3.874
CX 4015	阳性	3.784
CX 12075	阳性	3.717
CX 9027	阳性	3.718
CX 9080	阳性	4
CX 9098	阳性	4
CX 9112	阳性	4
CX 9175	阳性	4
CX 9063	阳性	4
CX 12020	阳性	4
CX 9158	阳性	4
CX 9198	阳性	3.874
CX 9165	阳性	4
CX 9034	阳性	3.874
CX 12055	阳性	3.754
CX 6074	阳性	4
CX 6082	阳性	4
CX 6069	阳性	4
CX 9193	阳性	4
CX 9149	阳性	4

CX 9106	阳性	4
---------	----	---

截断: OD_{450-640nm} : 0.15

n= 357

		历史	
		阴性	阳性
HP 粪便 ELISA	阳性	141	6
	阴性	7	203

灵敏度: 95 % 置信区间 (95%): 90.5-98.1 %

灵敏度: 97 % 置信区间 (95%): 93.9-98.0 %

结果:

表 8 显示了通过粪便夹心 ELISA 法检查幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阴性和幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阳性粪便样品 (第一次诊断) 的结果。将单克隆抗体 (捕获抗体: HP25.6m/1B5; 检测抗体: HP25.2m/2H10-POD) 用于检测粪便样品中幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原过氧化氢酶。在纯单克隆 ELISA 系统中对粪便样品进行分析, 该分析是以过氧化氢酶特异性单克隆抗体为基础的, 其灵敏度为 95%, 而特异性为 97%。

实施例 14: 根除/根除控制过程

只有通过直接检测幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原而不是血清中的抗原才可以进行根除控制, 因为在感染之后, 幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗体在血液中仍存在数月。因此, 与血清幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 实验相比, 所述的夹心粪便 ELISA 提供了评价根除成功的可能性。图 9 显示了在应用奥美拉唑 (Omeprazol), 甲硝唑 (Metronidazol) 和克拉霉素 (Clarithromycin) 之后根除治疗幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 阳性患者的过程。在开始治疗的 6 天后, 在粪例中再也不能检测到幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 抗原。

表 9 显示了在根除研究中 HP 粪便 ELISA 的结果。在根除治疗的 4-6 周后,

取粪便样品。将 ^{13}C -呼吸实验用作参照实验。
根据实施例 12 进行这些实验(一步 ELISA)。

表 9: 根除控制-通过一步ELISA法检测粪便的幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 过氧化氢酶。取样: 根除治疗4-6周后。

病人编号	^{13}C -呼吸检测	HP粪便 ELISA 450-630nm			
131	阴性	0.024	187	阴性	0.014
132	阴性	0.012	188	阴性	0.017
138	阴性	0.024	194	阴性	0.020
147	阴性	0.016	195	阴性	0.015
148	阴性	0.014	199	阴性	0.013
149	阴性	0.019	205	阴性	0.035
151	阴性	0.018	206	阴性	0.020
154	阴性	0.012	213	阴性	0.018
155	阴性	0.011	215	阴性	0.014
158	阴性	0.013	216	阴性	0.034
159	阴性	0.023	217	阴性	0.014
161	阴性	0.025	219	阴性	0.014
165	阴性	0.013	223	阴性	0.086
166	阴性	0.014	224	阴性	0.020
167	阴性	0.183	227	阴性	0.139
168	阴性	0.016	245	阴性	0.094
172	阴性	0.015	246	阴性	0.120
177	阴性	0.015	250	阴性	0.019
180	阴性	0.146	251	阴性	0.042
182	阴性	0.026	253	阴性	0.034
			255	阴性	0.033
			256	阴性	0.041
			270	阴性	0.053

271	阴性	0.033
275	阴性	0.040
283	阴性	0.036
284	阴性	0.018
296	阴性	0.170
303	阴性	0.064
308	阴性	0.029
310	阴性	0.025
311	阴性	0.013
312	阴性	0.049
315	阴性	0.021
318	阴性	0.037
319	阴性	0.044
320	阴性	0.057
322	阴性	0.019
324	阴性	0.017
326	阴性	0.154
327	阴性	0.016
328	阴性	0.015
329	阴性	0.266
330	阴性	0.035
331	阴性	0.013
337	阴性	0.015
338	阴性	0.051
339	阴性	0.021
350	阴性	0.037
353	阴性	0.019
356	阴性	0.023

357	阴性	0.025
358	阴性	0.057
359	阴性	0.023
360	阴性	0.073
366	阴性	0.018
367	阴性	0.018
368	阴性	0.029
369	阴性	0.028
152	阳性	0.365
156	阳性	0.264
160	阳性	3.851
162	阳性	2.021
169	阳性	0.112
179	阳性	0.573
181	阳性	2.886
186	阳性	2.084
196	阳性	0.282
220	阳性	0.905
240	阳性	2.837
252	阳性	1.606
278	阳性	3.173
300	阳性	0.840
325	阳性	3.898
334	阳性	2.946
361	阳性	0.269
161/179	阳性	0.263
9		

与参照实验相比,本研究(97名患者)表现出94%的灵敏度和95%的特异性(截断: $OD_{450-630}$: 0.15)。

实施例14表明HP粪便ELISA不仅可以用于幽门螺杆菌(*H. pylori*)的第一次诊断,而且用于根除的控制和根除过程的佐证。

实施例15: 来自杂交瘤细胞系的免疫球蛋白的功能性可变区的克隆和序列检测

根据Chomczynski (Chomczynski, 1987)从产抗体杂交瘤细胞系中分离总RNA。

然后,根据常规的方法合成相应的cDNA。

通过PCR扩增编码各个抗体的Kappa轻链和重链Fd片段(VH或CH1)的DNA区域。使用表10中所述的寡核苷酸引物组,从单杂交瘤细胞系中分离的cDNA作为模板。

所用的引物组导致在重链Fd片段的5'-*Xho*I和3'-*Spe*I酶切位点,和Kappa轻链的5'-*Sac*I和3'-*Xba*I酶切位点。为了PCR扩增编码重链Fd的DNA片断,将11种不同的5'-VH引物(MVH 1-8和MULH 1-3)各自与3'-VH引物M1gG2a [HP25.2m/2H10]组合,或与3'-VH引物M1gG1 [HP25.6m/1B5]一起使用。为了扩增编码Kappa轻链的DNA片断,将11种不同的5'-VK引物(MUVK 1-7和MULK 1-4)各自与3'-VK引物3'MUCK组合。

在所有的PCR扩增中使用以下的温度程序: 94°C下变性30秒, 52°C引物结合60秒, 72°C下聚合90秒。此程序持续40个循环,然后在72°C下进行10分钟以完成所述片断。

通过琼脂糖凝胶电泳分离PCR扩增的结果,并分离预期分子量的DNA带。对于抗体(HP25.2m/2H10),采用酶*Xho*I和*Spe*I(重链)或*Sac*I和*Xba*I(轻链)对分离的带进行限制消化。将所得片断在已先用限制酶*Xho*I和*Spe*I或*Sac*I和*Xba*I将质粒载体Bluescript KS (Stratagene)酶切之后,克隆至此质粒载体上。对依次制备克隆重链和轻链片断的质粒制品测

序。选择编码免疫球蛋白 (VH 或 VL) 的重链和轻链功能可变区的序列。这样，可以精确鉴定各杂交瘤细胞系的一个功能性 VH 和一个功能性 VL 区域。图 1 和图 2 显示了功能性 VH 和 VL 序列。VH 区域的第一组 4 个氨基酸通过再克隆完成。根据常规方法 (Sambrook 等., 1989) 进行克隆和测序。

对于抗体 HP25.6m/1B5，将所分离的带直接测序，并鉴定功能性轻链和功能性重链。采用酶 *XhoI* 和 *SpeI* (重链) 或 *ScaI* 和 *XbaI* (轻链) 依次将重链 Fd 片断和轻链限制酶切消化，将所得片段再克隆到已用限制酶 *XhoI* 和 *SpeI* 和 *SacI* 和 *XbaI* 分别酶切的质粒载体 pB111HisEx (Connex) 上，然后，再次对其进行测序。

这样，可以精确地鉴定该杂交瘤细胞系的一个功能性 VH 和一个功能性 VL 区域。该功能性 VH 和 VL 序列如图 3 和图 4 所示。对于 VH 和 VL 序列，成熟的 N 末端在已通过先导引物测序进行检测后进行了描述。根据常规方法 (Sambrook 等., 1989) 进行克隆和测序。

表 10: PCR 扩增免疫球蛋白重链和轻链功能可变区所用的引物列表 (沿 5'-3' 方向)

MVH1	(GC) AG GTG CAG CTC GAG GAG TCA GGA CCT
MVH2	GAG GTC CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT
MVH3	CAG GTC CAA CTC GAG CAG CCT GGG GCT
MVH4	GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGG GCA
MVH5	GA (AG) GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGA GGA
MVH6	GAG GTG AAG CTT CTC GAG TCT GGA GGT
MVH7	GAA GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA
MVH8	GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT
MULK1	GGG GAG CTC CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT CCT GCT AT
MULK2	GGG GAG CTC CAC CAT GGA TTT TCA AGT GCA GAT TTT CAG
MULK3	GGG GAG CTC CAC CAT GGA GWC ACA KWC TCA GGT CTT TRT A

MULK4 GGG GAG CTC CAC CAT GKC CCC WRC TCA GYT YCT KGT
MIgG1 TAT GCA ACT AGT ACA ACC ACA ATC CCT GGG
MIgG2a GAG AGA GGG GTT CTG ACT AGT GGG CAC TCT GGG CTC
MUVK1 CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT
MUVK2 CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGC AGC CGC CC
MUVK3 CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA
MUVK4 CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA
MUVK5 CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA
MUVK6 CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA
MUVK7 CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA
MULH1 GGG CTC GAG CAC CAT GGR ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT
MULH2 GGG CTC GAG CAC CAT GRA CTT CGG GYT GAG CTK GGT TTT
MULH3 GGG CTC GAG CAC CAT GGC TGT CTT GGG GCT GCT CTT CT
3 'MUCK GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A

参考文献

- Coller & Coller, 1983: Coller, H. A., Coller, B. S., Meth. Enzymol. 121: 412-417
- Harlow & Lane, 1988: Harlow, E., Lane, D., 抗体: 实验操作手册, 冷泉港实验室, 纽约
- Kearney 等., 1979: Kearney, 免疫学杂志 123: 1548-1550
- Laemmli, 1970: Laemmli, E. K., 自然, 227: 680-685
- Peters & Baumgarten, 1990: Peters, J. H., Baumgarten, H. (editors), Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, Berlin
- Fägerstam 等., 1990: Fägerstam, L. G. 等, J. Mol. Recognit. 3: 208-214
- Malmqvist, 1996: 方法 9: 525-532
- Eschweiler 等., 1993: Eschweiler, B., 等., Zentralbl. F. Bakt. 280: 73-85
- 药物生物技术, 1994: 单克隆抗体纯化手册
- Chomczynski, 1987: 生物化学年评 162: 156-159
- Sambrook 等., 1989: 分子克隆实验手册, 冷泉港实验室, 纽约, 第二版
- Vaughan 等., 1998: 自然生物技术 16: 535-539
- Orlandi 等., 1989: 美国国家科学院汇编 86: 3833-3837
- Janeway & Travers, 1997: 免疫学, 第二版 Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
- Osborne 等., 1997: 化学生物学现代观 1: 5-9
- Stull 和 Szoka, 1995: 药学研究 12: 465-483
- Frens, 1973: 自然生理科学 241, 20-23
- Geoghegan 和 Ackerman, 1977: 组织化学和细胞化学杂志, 25(11), 1187-1200
- Slot, 1985: 欧洲细胞生物化学杂志 38, 87-93
- Manos 等., 1998: 螺旋杆菌 3 (1), 28-38

- Haque, 1993: 传染病学杂志167: 247-9
- Park, 1996: 临床微生物学杂志 34: 988-990
- Hasan, 1994: FEMS 微生物通讯 120:143-148
- Koopmans, 1993: 临床微生物学杂志 31:2738-2744
- Machnicka, 1996: 应用寄生虫学 37:106-110

E V Q L L E Q P G A
GAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGCCTGGGGCT 30

E L A K P G A S V K
GAACTGGCAAACCTGGGGCCTCAGTGAAG 60

M S C K A S G Y T F
ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTT 90

T N Y W I H W V K Q
ACTAACTACTGGATTCACTGGGGTGAAACAG 120

R P G Q G L K W I G
AGGCCTGGACAGGGTCTGAAATGGATTGGA 150

Y I N P A T G S T S
TACATTAATCCTGCCACTGGTTCCACTTCT 180

Y N Q D F Q D R A T
TACAATCAGGACTTTCAGGACAGGGCCACT 210

L T A D K S S T T A
TTGACCGCAGACAAGTCCTCCACCACAGCC 240

Y M Q L T S L T S E
TACATGCAGCTGACCAGCCTGACATCTGAG 270

D S S V Y Y C A R E
GACTCTTCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAG 300

G Y D G F D S W G Q
GGGTACGACGGGITTGACTCCTGGGGCCAA 330

G T T L T V S S
GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA 360

图 1

E L V L T Q S P A I
 GAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATC 30
 M S A S P G E K V T
 ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC 60
 M T C S A S S S V N
 ATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAT 90
 Y M Y W Y Q Q K S G
TACATGTACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGC 120
 T S P K R W I Y D T
 ACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA 150
 S K L A S G V P A R
TCCAAATTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGC 180
 F S G S G S G T S Y
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC 210
 S L T L S S M E A E
 TCTCTCACACTCAGCAGCATGGAGGCTGAA 240
 D A A T Y Y C Q Q W
 GATGCCGCCACTTATTACTGCCCAGCAGTGG 270
 S S N P Y T F G G G
AGTAGTAATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGG 300
 T K L E I K
 ACCAAGCTGGAGATAAAA 330

图 2

```

+1   E   V   Q   L   Q   Q   S   G   A   E
      GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGGCAGAG  30
+1   L   V   K   P   G   A   S   V   K   L
      CTTGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTCAAGTTG  60
+1   S   C   T   S   S   G   F   N   I   K
      TCCTGCACATCTTCTGGCTTCAACATTA  90
+1   D   T   Y   V   H   W   M   K   Q   R
      GACACCTATGTGCACTGGATGAAACAGAGG 120
+1   P   E   Q   G   L   E   W   I   G   K
      CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAAG 150
+1   I   D   P   A   N   G   K   T   K   Y
      ATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAAATAT 180
+1   D   P   I   F   Q   A   K   A   T   M
      GACCCGATATTCCAGGCCAAGGCCACTATG 210
+1   T   A   D   A   S   S   N   T   A   Y
      ACAGCAGACGCATCCTCCAATACAGCCTAC 240
+1   L   Q   L   S   S   L   T   S   E   D
      CTGCAACTCAGCAGCCTGACTTCTGAGGAC 270
+1   T   A   V   Y   Y   C   A   L   P   I
      ACTGCCGTCTATTACTGTGCTCTCCCCATT 300
+1   Y   Y   A   S   S   W   F   A   Y   W
      TATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTACTGG 330
+1   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   A
      GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 360

```

图 3

+1 D I V M T Q S H K F
GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC 30

+1 M S T S V G D R V S
ATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC 60

+1 I T C K A S Q D V G
ATCACCTGCAAAGGCCAGTCAGGATGTGGGT 90

+1 T S V A W Y Q Q K P
ACTTCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCT 120

+1 G H S P K L L I Y W
GGGCACTCTCCTAAATTAAGTATTTACTGG 150

+1 T S T R H T G V P D
ACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT 180

+1 R F T G S G S G T D
CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT 210

+1 F I L T I S N V Q S
TTCATTCTCACCAATTAGCAATGTGCAGTCT 240

+1 E D L A D Y F C Q Q
GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAA 270

+1 Y S S S P T F G G G
TATAGCAGCTCTCCCACGTTTCGGAGGGGGG 300

+1 A K V E I K
GCCAAGGTGGAAATAAAA 330

图 4

+1 D I L L T Q S P A I L S V S P G E
 GACATCTTGC TGACTCAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA GTCCAGGAGA 50
 +1 R V S F S C R A S Q S I G T R I H
AAGAGTCAGT TTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC 100
 +1 W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y
ACTGGTATCA ACAAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAAGTAT 150
 +1 G S E S I S G I P S R F S G S G S
GGTTCTGAGT CTATCTCTGG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
 +1 G T D F S L S I N S V E S E D I A
 AGGGACAGAT TTTAGTCTTA GCATCAACAG TGTCGAGTCT GAAGATATTG 250
 +1 D Y Y C Q Q S N T W P L T F G A
 CAGATTATTA CTGTCAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
 +1 G T K L E L K
 GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350

5
 72

+1 E V Q L L E Q S G A E L V K P G A
 GAGTGCAGC TGCTCGAGCA GTCTGGAGCT GAGCTGGTGA AGCCTGGGGC 50
 +1 S V K I S C K A S G Y A F S T S W
 CTCAGTGAAG ATTTCCCTGCA AGGCTTCTGG CTACGCATTC AGTACCTCCT 100
 +1 M N W V K Q R P G K G L E W I G
GGATGAACTG GGTGAAACAG AGGCCCTGGAA AGGGTCTTGA GTGGATTGGA 150
 +1 R I Y P G D G D T N Y N G K F K G
CGGATTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTCAAGGG 200
 +1 K A T L T A D K S S S T A Y M Q L
CAAGGCCACA CTGACTGCAG ACAAATCCTC CAGCACAGCC TACATGCAAC 250
 +1 N S L T S E D S A V Y F C V R E
 TCAACAGCCT GACATCTGAG GACTCTGCCG TCTACTTCTG TGTAAGAGAG 300
 +1 D A Y Y S N P Y S L D Y W G Q G T
GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTACTGGG GTCAAAGGAAC 350
 +1 S V T V S S
 CTCAGTCACC GTCTCCTCA 400

6

+1 E L Q M T Q S P S L S A S L G D
 GAGTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCAGT CTGTCGCAT CCCTGGAGA 50
 +1 T I T I T C H A S Q N I N V W L S
 CACAATTACC ATCACTTGC C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTGGTTAA 100
 +1 W Y Q Q K P G D I P K L L I Y K
GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGAGATATCC CTA~~AACTATT~~ GATCTATAAG 150
 +1 A S N L H T G V P S R F S G S G S
GTTCCAACT TGCACACAGG CGTCCCATCA AGGTTAGTG GCAGTGGATC 200
 +1 G T G F T L V I S S L Q P E D I A
 TGGAACAGGT TTCACATTAG TCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGACATTG 250
 +1 T Y Y C Q Q G R S Y P L T F G A
 CCACTTACTA CTGT CAACAG GGTCCAAGTT ATCCTCTCAC GTTCGGTGCT 300
 +1 G T K L E L K
 GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350

+1 E V Q L L E E S G G L V K P G G
 GAGTGCAGC TGCTCGAGGA GTCGGGGGA GGCTTAGTGA AGCCTGGAGG 50
 +1 S L Q L S C S A S G F T F S S H F
 GTCCCTGCAA CTCCTCTGTT CAGCCTCTGG ATTCACTTTC AGTAGCCATT 100
 +1 M S W V R Q T P E K R L E W V A
 TCATGTCTTG GGTTCGCCAA ACTCCAGAGA AGAGGCTGGA GTGGGTCGCA 150
 +1 S I S S G G D S F Y P D S L K G R
 TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGCCG 200
 +1 F A I S R D N A R N I L F L Q M S
 ATTCGCCATC TCCAGAGATA ATGCCAGGAA CATCCTGTTC CTGCAAATGA 250
 +1 S L R S E D S A M Y F C T R D Y
 GCAGTCTGAG GTCGTGAGGAC TCGGCCATGT ATTTCTGTAC AAGA GACTAC 300
 +1 S W Y A L D Y W G Q G T S V T V S
 TCTTGGTATG CTTTGGACTA CTGGGGTCAA GGAACCTCAG TCACCGTCTC 350
 +1 S
 CTCA 400

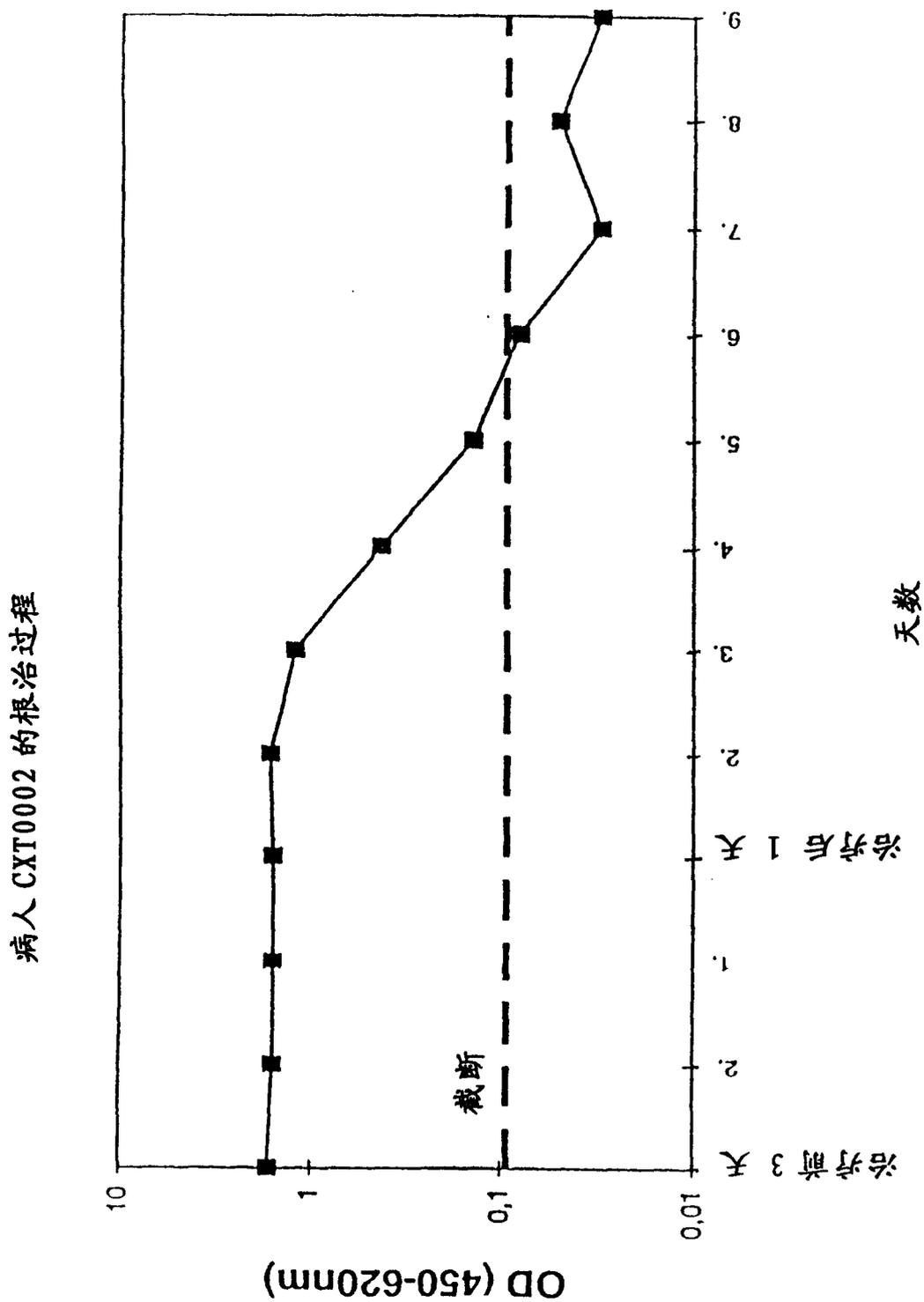


图 6

专利名称(译)	检测粪便中抗酸微生物的改进方法		
公开(公告)号	CN1382259A	公开(公告)日	2002-11-27
申请号	CN00814237.8	申请日	2000-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	康奈科斯优化研究和发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	康奈科斯优化研究和发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	康奈科斯优化研究和发展有限公司		
[标]发明人	C瑞特 G古尔曼 P海普尼 A瑞吉斯 H米勒 E汉德勒		
发明人	C·瑞特 G·古尔曼 P·海普尼 A·瑞吉斯 H·米勒 E·汉德勒		
IPC分类号	C07K14/195 C07K14/205 C07K14/35 C07K16/12 C07K16/40 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/497 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/558 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/121 C07K16/40 C07K2317/565 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/56922 G01N33/5695 G01N33/573 G01N2333/908 G01N2333/96486 G01N2333/98 Y10S435/975		
优先权	1999120351 1999-10-12 EP 2000105592 2000-03-16 EP 2000107028 2000-03-31 EP 2000110110 2000-05-10 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明涉及一种检测哺乳动物被抗酸微生物感染的方法,其中,(a)所述哺乳动物的粪便样品与(aa)一种受体,在允许来自所述抗酸微生物的抗原与该受体形成复合物的条件下共同培养;或与(ab)两种不同的受体,在允许来自所述抗酸微生物的抗原与两种受体形成复合物的条件下共同培养,其中如(aa)中所述的受体或如(ab)中所述的受体特异地与一种抗原相结合,至少对一些哺乳动物来说,该抗原通过肠道后表现为一种结构,该结构与天然结构相当或在哺乳动物被抗酸微生物、其抽提物或溶菌产物或者源于该抗酸微生物的蛋白、蛋白片段或合成肽所感染或免疫后产生的抗体与该结构相抗;和(b)检测如(a)项中描述的至少一种抗原-受体复合物的形成。优选地,该抗酸微生物是细菌,尤其是幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*),肝螺旋杆菌(*Helicobacter hepaticus*),空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)或结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)。而且,该受体优选地与过氧化氢酶的表位相结合。另外,本发明还涉及包含所述组分的诊断和药用组合物与测试装置,以及含有这些组分的包装。

```

*1 D I L L T Q S P A I L S V S P G E
GACATCTTGC TGACTCAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA GTCAGGAGA 50
*1 R V S F S C R A S Q S I G T R I H
AAGAGTCAGT TTCTCCTGC A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGAATAC 100
*1 W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y
AGTGGTATCA ACAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAAGTAT 150
*1 G S E S I S G I P S R F S G S G S
GGTCTGAGT CTATCTCTGG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
*1 G T D F S L S I N S V E S E D I A
AGGGACAGAT TTTAGTCTTA GCATCAACAG TGTGAGTCT GAAGATATTG 250
*1 D Y Y C Q Q S N T W P L T F G A
CAGATTATTA CTGTCAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
*1 G T K L E L K
GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350
  
```