

· 基础论著 ·

标记人血清抗体 IgG 胶体金免疫法对不同标本幽门螺杆菌抗原的测定

贾克东 丁元军 刘东林 刘晖 罗斌

【摘要】 目的 探讨胶体金免疫法检测患者不同体液中幽门螺杆菌(*H. pylori*, HP)抗原的可行性。**方法** (1)筛选高效价人抗-*H. pylori* 免疫血清,依次应用盐析和层析技术分离纯化获得抗-HP 血清 IgG;(2)采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记纯化的抗-HP 抗体,制成金标抗体;(3)将纯化的特异性人抗-HP 抗体固定于硝酸纤维素膜上,制成胶体金标免疫反应模板。分别取粪便、胃液、血清与反应模板结合,然后与金标记的人抗-HP 抗体于 37℃ 进行反应,阳性结果呈现肉眼可见的红斑。**结果** 分别以金免疫 HP 抗原检测、尿素酶实验、血清学抗体检测 3 种方法对 60 例患者进行检测对比。HP 抗原金免疫检测以胃液准确性最高,为 69.04%,粪便检测次之,为 57.14%,血清检测准确性最低,为 40.48%;检测胃液与传统的尿素酶实验的符合率为 61.67%,与血清 HP 抗体检测的符合率为 65%。**结论** 胶体金免疫法测定 HP 抗原诊断 HP 感染是可行的,本方法具有操作简便、快速的特点,尤其以胃液和粪便检测效果更好,但该项实验的敏感性和特异性有待进一步提高。

【关键词】 幽门螺杆菌;金标免疫法;抗原诊断

Detection of Helicobacter pylori antigen with gold-labeled IgG purified from H. pylori infected patients JIA Ke-dong, DING Yuan-jun, LIU Dong-lin, LIU Hui, LUO Bin. Department of Gastroenterology, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China

Corresponding author: JIA Ke-dong, Email: jiakedong@tom.com

【Abstract】 Objective To approach the feasibility and accuracy to detect *Helicobacter pylori* antigen in different samples by colloidal gold immunoassay. **Methods** (1)The sera with high titer anti-*H. pylori* antibody were gathered. IgG was purified and enriched through ammonium sulfate precipitation and protein A resin affinity chromatography. (2) The colloidal gold were prepared with citrate tri-sodium reduction method. Purified human anti-*H. pylori* IgG was labled with colloidal gold, which named gold-tagged-antibody. (3) Purified human anti-*H. pylori* IgG was fixed on the

基金项目: 江西省卫生厅学术与技术带头人资助项目

作者单位: 330006 南昌市, 江西省人民医院(贾克东、刘东林、刘晖、罗斌); 江西省景德镇市第二人民医院(丁元军)

通讯作者: 贾克东, Email: jiakedong@tom.com

membrane of nitrocellulose. Samples of gastric juice, feces and sera were added on the membrane where antigen-antibody combined, respectively. The result was shown by gold-tagged-antibody and with red spot on the nitrocellulose membrane when considered as positive sample. **Results** The samples of gastric juice, feces and serum of 60 patients were detected for *H. pylori* antigen by *H. pylori* antigen immune-gold test, the accuracy of gastric juice is 69.04%, 57.14% of feces and 40.48% of serum. The consistent rates between this method and routine urease test and serologic antibody test are 61.67% and 65%, respectively. **Conclusions** It is feasible to detect *H. pylori* infection by colloidal gold immunoassay through anti-*H. pylori* IgG obtained from sera of *H. pylori* infected patients, but the sensitivity and specificity need to be improved in the future.

【Key words】 *Helicobacter pylori*; Antigen detection; Infection diagnosis

幽门螺杆菌是目前人类感染率较高的慢性细菌感染之一。目前,临床上比较常用的诊断 HP 感染方法有侵入性的胃镜下尿素酶实验、非侵入性的同位素标记的尿素呼气实验和血清特异性抗体检测,前者患者不容易接受,而同位素检查需要昂贵的设备并可产生放射性污染,血清学检查不能考核疗效,因而均不能很好地满足临床需要^[1,2]。抗原检测是近年 HP 感染诊断的发展方向,大量文献报道通过酶联免疫吸附实验(ELISA)检测粪便抗原诊断 HP 感染不仅具有较高的敏感性和特异性,还可判断根治的疗效^[3,4]。但该方法步骤复杂,结果判断需要特殊仪器,底物对操作人员及环境有危害。胶体金免疫测定技术是上世纪 90 年代国外兴起的一种诊断技术,具有快捷迅速、灵敏准确、安全简便的特点^[5]。近年来,国内有文献报道该项技术应用于 HP 抗原的快速检测,但大多采用国外试剂盒,迄今尚未见到关于国内成熟试剂盒的文献报道^[6]。本研究应用 HP 感染者血清 IgG 与胶体金结合,以探讨该技术应用于幽门螺杆菌抗原检测的可行性。

材料与方法

一、材料

枸橼酸三钠,氯化金(上海润捷化学试剂有限公司);胎牛血清白蛋白(上海生工生物工程有限公司);Protein A 层析柱(GenScript 公司);硝酸纤维素膜(上海捷瑞生物有限公司);胃 HP-Ab 检测盒(上海美康生物工程有限公司);快速尿素酶试验检测试剂盒(珠海市丽拓发展有限公司);高速低温离心机(Beckman 公司);蛋白核酸测定仪(BIO-RAD 公司)。

二、方法

1. 抗-HP 血清的纯化:HP 抗体血清分别用 50%、40%、33% 饱和硫酸铵盐析,提取特异性 IgG 蛋白,以 PBS 溶解沉淀,充分透析后将抗体蛋白加入装有 Protein A 柱层析,用 0.2 mol/L 甘氨酸洗脱,收集洗脱液,1 mol/L Tris 调 pH 值至中性,透析浓缩即可获得特异性 HP-Ab IgG 蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定其纯度。

2. 胶体金的制备^[7]:以去离子水溶解氯化金,使其终浓度为0.1 g/L,每100 ml加入1%枸橼酸三钠水溶液2 ml,加热煮沸15~30 min,溶液颜色由紫色最终变为酒红色,冷却后补充失水至原体积。

3. 免疫胶体金的制备^[7]:目测法确定稳定胶体金的最适抗体蛋白浓度。取上述制备的胶体金溶液,用0.1 mol/L K₂CO₃调至pH 7.6,在搅拌状态下加入纯化的人HP抗体,10 min后加入1/4体积5% BSA液,3500 r/min,4℃下离心20 min,弃沉淀。再以13 500 r/min离心35 min(4℃),小心吸弃上清液,用1% BSA悬起较疏松的红色沉积物至原体积1/5,即为免疫胶体金。

4. 斑点金免疫法检测HP抗原:0.01 mol/L PBS活化硝酸纤维素膜,再将10 μl纯化的人HP抗体IgG滴加至纤维素膜上,待完全渗入后,用含1% BSA的PBS液封闭,0.01 mol/L PBS洗涤,以此为反应模板进行检测。检测时,再将稀释的待测标本(胃液、粪便、血清)滴加在硝酸纤维膜上,5~10 min后用0.01 mol/L PBS洗涤,最后在反应区加入金标记的人HP抗体,5~10 min后再用0.01 mol/L PBS洗涤即可。结果判定:以硝酸纤维素膜反应区上出现红色斑块且边缘清晰者为阳性,反之为阴性。结果确定时间为5~8 min。

结 果

一、HP Ab-IgG 多克隆抗体的制备

人免疫血清经盐析和ProteinA蛋白亲和层析纯化后电泳,纯化后的人HP抗体蛋白显示多条成分区带,其中一条最粗大的条带,分子量150 kD左右,与免疫球蛋白IgG分子量一致。核酸蛋白测定仪测定蛋白含量:人HP抗体浓度为2.78 mg/ml。

二、斑点金免疫法测定HP抗原

共检测60例患者的胃液、粪便及血清,以RUT实验和血清抗体检测两项完全一致作为金标准,其中两项检测均为阳性者31例,均阴性者11例纳入实验,以评价斑点金免疫法的检测效果,结果见表1。

表1 胶体金免疫检测胃液和粪便及血清HP抗原(例)

“金标准”判定	胃液HP抗原检测		粪便HP抗原检测		血清HP抗原检测合计	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	22	9	20	11	8	23
阴性	4	7	7	4	2	9
合计	26	16	27	15	10	32

结果呈现明显红色斑点判定为阳性标本,阴性标本不显色或呈现浅颜色的模糊斑点(图1)。胃液标本有22例显示阳性斑点,本检测法的敏感性为70.96%(22/31),特异性为63.64%(7/11),准确性为69.04%;粪便标本20例显示阳性斑点,本法的敏感性为64.51%(20/31),特异性为36.36%,准确性为57.14%;血清标本8例显示阳性斑点,敏感性为25.81%(8/31例),特异性为81.81%

(9/11), 准确性为 40.48%。



图1 血清抗体 IgG 胶体金法测定 HP 抗原显色
A 强阳性 B 弱阳性 C 阴性

讨 论

目前,幽门螺杆菌感染的诊断方法中最简便、成本最低廉、仅有极小侵袭性的是血清学抗体测定,但血清学阳性只能说明曾感染过或现在正在感染,不能用于对近期 HP 根除效果的判断^[8]。采用免疫学方法测定幽门螺杆菌抗原是当前 HP 感染诊断方法的一个研究热点,HP 侵入、定植胃黏膜后可释放一些菌体外膜蛋白,如尿素酶、蛋白酶、细胞毒素,热休克蛋白等可溶性抗原物质,这些物质进入血中以后,只有小部分被特异性抗体中和清除,大部分以游离状态存在于周围血液循环中。HP 菌体外膜蛋白脱落形成的可溶性 HP 抗原,血中浓度维持必须依赖于胃黏膜 HP 的持续感染和繁殖。因此,检测血清 HP 可溶性抗原可反映患者胃黏膜是否存在 HP 现时感染。另一方面,正常胃黏膜上皮细胞每 1~3 天更新 1 次,在更新过程中,这些脱落的上皮细胞及定植在其表面的 HP 进入胃肠道,最后随粪便排出体外。因此,胃液及粪便也可作 HP 特异性抗原的待测标本,采用酶联免疫法测定粪 HP 抗原,借以诊断 HP 的现症感染,已获得了较好的诊断效果,其敏感性和特异性一般在 90%~98%^[9,10]。

本研究采用胶体金偶联血清抗-HP IgG 检测 HP 抗原,结果显示该方法检测胃液、粪便、血清 HP 抗原的敏感性分别为 70.96%、64.51%、25.81%;特异性分别为 63.64%、36.36%、81.81%,准确性以胃液抗原测定最高(69.04%),粪便抗原测定次之(57.14%),血清最低(40.48%)。分析原因可能与 HP 在胃肠道的分布有关,HP 随胃黏膜上皮细胞一起脱落到胃肠腔,从胃、十二指肠向下消化道移动的过程中 HP 菌体及其他抗原成份的分布密度逐步下降,至直肠肛管降至最低。

研究发现,应用该法测定 3 种标本 HP 抗原的总体敏感性和特异性与其他传统 HP 诊断方法比较并不高。其中准确性最高的为胃液组,但其敏感性和特异性只有 70.96% 和 63.64%,粪便组的敏感性(64.51%)和特异性(36.36%)更是低

于文献报道的酶联免疫粪便抗原检测。分析原因主要与本法采用的抗体有关,本法应用患者血清作为抗体来源,尽管经过反复提取,其抗体活性和特异性均不高,不能满足临床检测的需要。本研究目的是探索该方法的可行性,为进一步建立胶体金快速诊断方法创造条件。结果证实该方法检测 HP 抗原具有操作简便、快速、准确、无创伤,结果判断无须依靠任何仪器等优点,具有很大的发展前景。今后如能改变 HP 抗体的纯化方法,采用特异性 HP 抗原亲和层析法提取高特异性及高活性的 HP 抗体,或者借助于杂交瘤技术或分子生物学技术制备高活性和高亲和力的特异性 HP 抗体,检测效率有望得到较大提高,在此基础上有望制备更为简便的 HP 抗原胶体金快速免疫诊断试剂盒以供临床应用。

参 考 文 献

- 1 刘厚钰. 幽门螺杆菌感染检测的选择. 中华消化杂志, 1998, 18: 259-263.
- 2 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志, 2000, 8: 1084-1088.
- 3 胡伏莲, 成虹, 李江, 等. 幽门螺杆菌粪便抗原检测及其与胃粘膜抗原检测的对比研究. 中华医学杂志, 2000, 80: 820-822.
- 4 杨光, 李鸣, 许燕萍, 等. 粪便抗原检测诊断幽门螺杆菌现症感染. 胃肠病学和肝脏病学杂志, 2003, 12: 172-176.
- 5 王东勇, 张松乐. 免疫胶体金技术在快速诊断中的应用. 中国卫生检验杂志, 2003, 13: 391-392.
- 6 李君, 罗丹, 宋耀虹. H pylori SA 快速试纸在检测幽门螺杆菌粪便抗原中的应用价值. 医学研究杂志, 2006, 35: 29-31.
- 7 董志伟, 王琰, 主编. 抗体工程. 第2版. 北京: 北京医科大学出版社, 2005. 287-289.
- 8 张丽, 张建中. 中国检验幽门螺杆菌感染方法诊断效能的分析. 世界华人消化杂志, 2007, 15: 649-654.
- 9 Melz DC. Stool testing for *Helicobacter pylori* infection: yet another noninvasive alternation. Am J Gastroenterol, 2000, 95: 546-548.
- 10 Monterio L, Demascarel A, Sarraquera AM, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. Am J Gastroenterol, 2001, 96: 353-366.

(收稿日期: 2008-06-15)

(本文编辑: 温少芳)

贾克东, 丁元军, 刘东林, 等. 标记人血清抗体 IgG 胶体金免疫法对不同标本幽门螺杆菌抗原的测定 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(1): 1-5.