

# 幽门螺杆菌尿素酶抗原的分离和纯化

张建中 陈晶晶 杨昭徐 蒋秀高 田筱玲 侯曼苓 卞宗芳

A 本研究采用层析技术,以 Sephadex G200 分离幽门螺杆菌尿素酶,从幽门螺杆菌超声破碎物离心上清中一次提纯了尿素酶抗原,产物接近电泳纯并保持了良好的抗原性,我们对 55 份抗幽门螺杆菌抗体阴性标本和 50 份阳性标本检测发现,符合率达 100%,假阴性和假阳性均为零,大样本临床标本检测也取得了很好的结果,提示此法纯化的抗原用于 ELISA 检测血清抗幽门螺杆菌抗体具有良好的应用前景,为大量用于幽门螺杆菌感染的临床诊断和流行病学调查奠定了基础。

关键词: 幽门螺杆菌; 柱层析; 尿素酶; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 免疫印迹

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, 简称 Hp) 感染的诊断方法近年来有了很大进展,特别是酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清中抗 Hp 抗体的方法,因其为非侵入性检测方法,且经济、简便而倍受重视,所用抗原成分的特异性是关系到此方法诊断符合率高低的关键。Hp 尿素酶为 Hp 菌共有的特异性抗原成分,我们采用层析技术,以 Sephadex G200 分离 Hp 尿素酶,以期得到较高纯度、具有良好抗原性的 Hp 尿素酶蛋白,建立特异性 Hp 感染 ELISA 检测方法。

## 材料和方法

1. 菌株选择及细菌培养: 用尿素酶实验选择出高尿素酶活性的幽门螺杆菌菌株,包括国际标准菌株 NCTC 11637 和北京地区分离菌株 CAPM Z-4、CAPM53、CAPM75 和 CAPM112 株等,经过系统鉴定后分别接种于含 10% 脱纤维羊血的布氏琼脂平板中,置混合气体 (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub>) 环境, 37℃ 培养三天后收菌。

2. 细菌破碎及预处理: 将收集的 Hp 菌用生理盐水洗涤一遍后,用凝胶过滤脱洗液 (0.05mol/L Tris-HCl, pH8.0, 含 0.005% 的硫柳汞) 将菌稀释至适当浓度 (约 14 亿菌/ml), 经超声破碎 (在冰浴下进行) 后,高速离心 (12000r/min, 30min) 后取上清备用。

本项目受国家自然科学基金和卫生部青年基金资助

作者单位: 102206 北京, 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 (张建中, 陈晶晶, 蒋秀高), 首都医学院附属北京天坛医院消化内科 (杨昭徐, 田筱玲, 侯曼苓, 卞宗芳)

3. 凝胶过滤过程及脱洗峰尿素酶活性检测: 选用 Sephadex G200 (粒度 40~120μm, Pharmacia 公司), 柱型为 2.8×75cm, 在 2201 COMBICO LDRAC 1 型凝胶过滤成套设备 (LKB 公司生产) 中进行, 每次抗原上柱量 15~30ml, 脱洗液采用 0.05mol/L Tris-HCl, pH8.0, 脱洗速度为 18 滴/分钟, 收集、检测及记录系统均为自动进行, 每管收集 50 滴, 每隔 5 管测定一次尿素酶活性, 尿素酶试剂由本实验室配制。

4. 尿素酶提纯效果分析: 将凝胶过滤后尿素酶活性峰成分与相应菌全菌蛋白、上柱液及离心残渣进行 SDS-PAGE 分析, 观察尿素酶提纯效果, 浓缩胶采用 5% 浓度, 分离胶采用 11% 浓度, 电泳采用 Tris-甘氨酸缓冲系统, 凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色。

5. 纯化尿素酶成分抗原性免疫印迹 (Western blot) 分析<sup>[1]</sup>: 将 Hp 全菌及经凝胶过滤得到的尿素酶活性峰, SDS-PAGE 后用电泳将各蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 经 5% 脱脂奶粉封闭过夜后, 放入 1:50 稀释的兔抗 Hp 抗血清中, 室温振荡 2 小时, 用 0.05% Tween 20-TBS 洗膜三次后, 浸泡于 1:200 稀释的 HRP-SPA 中, 室温振荡 2 小时, 用 Tween 20-TBS 洗三次后, 用底物显色液 (6mg 4-氯-1-萘酚溶于 2ml 冷甲醇, 与含 6μl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 10ml TBS 混合) 浸泡, 室温振荡 10~30 分钟, 至显色满意后, 倾去显色液, 用蒸馏水浸泡过液, 照像记录 Western blot 结果。

6. 纯化抗原用于抗 Hp 血清抗体的效果观察: 用 ELISA 方法对免疫印迹分析等证实的 50 例阳性标本和 50 例阴性标本, 以及 1675 例临床标本进行检测, 以 A 值 (吸光度, 原为光密度 OD 值) 大于阴性对照的 2.1 倍作为阳性诊断标准, 临床标本同时作胃粘膜组织 Hp 培养和病理组织学检查进行对照。

**结 果**

1. 在凝胶过滤脱洗过程中,第55~80管出现第一峰,第110~190管出现多峰融合峰,第一峰与后面各峰完全分离(见图1)。尿素酶活性峰位于第一峰内。

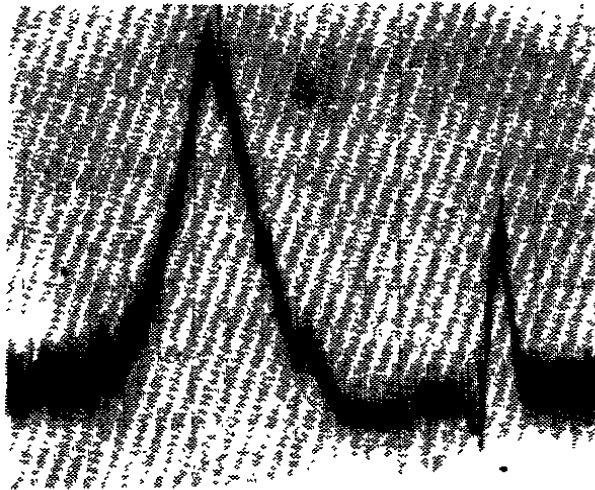


图1 Hp 蛋白 Sephadex G200凝胶过滤洗脱曲线  
Fig 1. Purification of *H. pylori* urease with Sephadex G200 Column

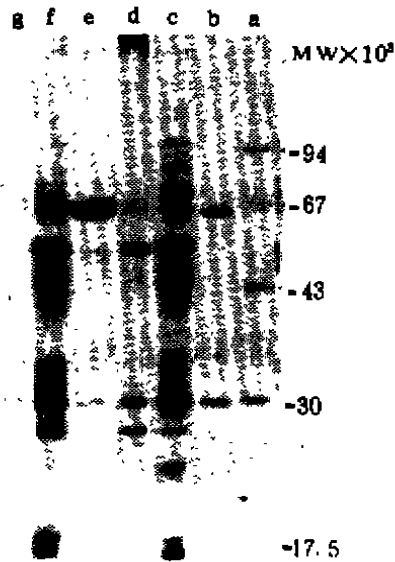


图2 尿素酶活性峰 SDS-PAGE 分析  
Fig 2. SDS-PAGE analysis of purified *H. pylori* urease

a, g: M. W. marker, b: urease activity peak, c: *H. pylori* whole cells, d: pro-purified solution, e: 1-12K r/min deposition, f: 1K r/min deposition

2. SDS-PAGE 结果显示,尿素酶活性峰内

只含有分子量为30000和66000两条蛋白带,几乎不含其它杂蛋白成分,30000和66000蛋白仍保持很高的浓度(见图2)。

3. Western blot 结果显示,30000和66000蛋白仍保持很高的抗原性,且尿素酶活性峰中未见其它抗原性反应条带出现(见图3)。

4. 血清抗体检测结果显示,对50例阳性标本和55例阴性标本检验符合率为100%,对1675例临床标本检测与胃粘膜组织 Hp 培养和病理组织学检菌对照,其敏感性为98%,特异性为96%,阳性预报值为98%,阴性预报值为96%。

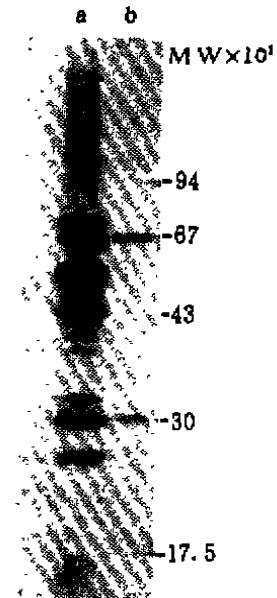


图3 尿素酶活性峰 Western blot 分析  
Fig 3. Western blot analysis of purified *H. pylori* urease

a: *H. pylori* whole cells, b: urease activity peak

**讨 论**

由于抗 Hp 菌药物在临床的广泛应用,影响了组织学检菌和细菌培养的准确性,但对血清抗体检测的结果无明显干扰。血清学方法病人易于接受,经济、方便、易于普及应用,且血清抗 Hp 抗体检测用于 Hp 感染诊断的符合率较高<sup>[2]</sup>,已被广泛采用。但第一代全菌抗原和第二代超声破碎抗原均易与空肠弯曲菌成分等发生交叉反应,出现假阳性结果,因此第三代 Hp 纯

化抗原应运而生,特别是Hp菌尿素酶,因其在菌体中含量高、抗原性强,且为Hp的共同特异性成分,已受到人们的高度重视。目前用于Hp尿素酶抗原的提取方法很多,有细菌经压力破碎后离心(25000×g, 30min)粗提Hp菌尿素酶者<sup>[3]</sup>;有经正辛基葡萄糖粗提后,用agarose A-1.5m柱提取Hp菌高分子量相关蛋白(MH-CAP,内含Hp菌尿素酶)者<sup>[4]</sup>;也有使用Sephacryl S400、BioGel P100柱或Superose 12 HR 10/30柱<sup>[5]</sup>层析和多种亲和层析柱分离Hp菌尿素酶,除亲和层析外均存在提取后尿素酶纯度较差、回收率低等问题。我们应用Sephadex G200柱从Hp超声破碎物离心上清中一次提纯了Hp菌尿素酶抗原,产物接近电泳纯并保持了良好的抗原性,与亲和层析法相比,简化了程序、降低了成本,为大量用于临床和流行病学调查血清标本的检测奠定了基础。此提纯程序在国内尚未见报道。

Hp菌与空肠弯曲菌等有明显的交叉反应<sup>[6]</sup>,纯化的Hp菌尿素酶抗原因不含交叉抗原成分,而且Hp菌尿素酶抗原特异性强,用于抗Hp菌尿素酶抗体检测,可基本排除因交叉反应而产生的假阳性反应,使ELISA检测结果更可靠且易于判断。考虑到不同株Hp菌尿素酶间的抗原性差异,可有选择性地通过多株Hp菌尿素酶抗原的混合应用,达到最大限度地减少检测过程中的假阴性。我们对55份Hp抗体阴

性标本和50份Hp抗体阳性标本检测发现,符合率达100%,假阴性和假阳性均为零;在首都医学院附属天坛医院用双盲法进行的大样本标本检测中,应用纯化的尿素酶抗原检测血清中抗幽门螺杆菌抗体也取得了很好的结果,敏感性和特异性分别为98%和96%。提示此法纯化的尿素酶抗原代替Hp全菌抗原用于ELISA检测血清Hp抗体具有良好的应用前景。

### 参 考 文 献

- 1 金灵,苏新. Biotin-Avidin 免疫转移技术. 生物化学与生物物理学进展, 1989, 16:148.
- 2 Taha AS, Reid J, Boothmann P, et al. Serological diagnosis of Helicobacter pylori-evaluation of four tests in the presence or absence of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Gut, 1993, 34(4):461.
- 3 Dent JC, McNulty CAM, Uff JS, et al. Campylobacter pylori urease: a new serological test. Lancet, 1988, 1:1002.
- 4 Evans DJ, Evans Jr DJ, Graham DY, et al. A sensitive and specific serologic test for detection of campylobacter pylori infection. Gastroenterol 1989, 96(4):1004.
- 5 Rathbone BJ, Healy RV. Campylobacter pylori and gastroduodenal disease. Blackwell Scientific Publications, 1989, P39~41.
- 6 Newall DG. Identification of the outer membrane proteins of Campylobacter pyloridis and antigenic cross-reactivity between C. pyloridis and C. jejuni. J Gen Microbiol, 1987, 133:163.

(收稿:1994-11-19 修回:1995-03-20)

## STUDY ON PURIFICATION OF H. PYLORI UREASE ANTIGEN

Zhang Jianzhong\*, Chen Jingjing, Yang Zhaoxu, et al

\*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

*H. pylori* urease was purified with Sephadex G200 Colum from *H. pylori* that had subjected to ultrasonication. The products only contained *H. pylori* urease (SDS-PAGE showed 30kD and 66kD *H. pylori* urease subunits only) and showed good antigenic characteristics. The further use of ELISA for detecting the antibodies against *H. pylori* showed extreme sensitivity and specificity.

**Key words:** *H. pylori*; Urease; Column chromatography; SDS-PAGE; Western-blot