

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738(2014)12 - 1278 - 04

## 抗幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位单克隆抗体制备和鉴定及其应用

丁焕弟<sup>1</sup>, 韩莹<sup>2</sup>, 黄安根<sup>1</sup>, 孟圆<sup>1</sup>, 胡华新<sup>1</sup>, 李晓彤<sup>1\*</sup><sup>1</sup>厦门大学生命科学学院, 杂交瘤和抗体技术中心; <sup>2</sup>厦门大学附属第一医院检验科, 福建 厦门 361005)

**[摘要]** 目的 制备抗幽门螺杆菌(Hp)的单克隆抗体(mAb), 并对该 Hp mAb 进行分析鉴定, 建立一种检测患者由于 Hp 感染而在血清中产生 Hp 抗体的竞争 ELISA 检测方法。方法 用灭活的 Hp 免疫 BALB/c 小鼠, 通过杂交瘤技术制备 Hp mAb。我们采用 Hp 混合蛋白包括毒素相关蛋白 A(CagA)、空泡毒素 A(VacA)和尿素酶以及灭活的 Hp 菌体筛选阳性杂交瘤细胞株, 用 ELISA 和 Western blot 等技术对所获得的 Hp mAb 进行鉴定。利用辣根过氧化物酶(HRP)标记所筛选的 Hp mAb 来建立一个可检测患者血清中 Hp 抗体的竞争 ELISA。结果 通过大规模的杂交瘤筛选, 我们选择了 1 株将其命名为 C3 Hp mAb, 其抗体亚型为 IgG2a, 腹水效价可达  $1 \times 10^7$ 。Western blot 法、ELISA 和质谱检测结果显示, 该 C3 Hp mAb 能特异地识别 Hp 的尿素酶 B 亚单位。用这个 C3 Hp mAb, 我们建立了一种可检测患者血清中 Hp 抗体的竞争 ELISA。结论 成功获得一种可以特异识别 Hp 尿素酶 B 亚单位的 mAb, 建立了一种可检测患者血清中 Hp 抗体的竞争 ELISA。

**[关键词]** 幽门螺杆菌; 单克隆抗体; 竞争 ELISA**[中图分类号]** R392.11, R446.61, Q813.2, S855.1+2 **[文献标志码]** A

DOI:10.13423/j.cnki.cjemi.007177

## Preparation, identification and application of monoclonal antibody against urease subunit B of *Helicobacter pylori*

DING Huandi<sup>1</sup>, HAN Ying<sup>2</sup>, HUANG Angen<sup>1</sup>, MENG Yuan<sup>1</sup>, HU Huaxin<sup>1</sup>, LI Xiaotong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Hybridoma and Antibody Center, School of Life Science, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare and characterize the monoclonal antibody (mAb) against *Helicobacter pylori* (Hp) and establish a competitive ELISA used for detection of Hp antibodies in the sera of Hp-infected patients. **Methods** BALB/c mice were immunized with inactivated Hp to generate Hp mAb using the hybridoma technology. Hp mixed proteins including cytotoxin-associated gene A (CagA), vacuolating cytotoxin A (VacA) and urease, as well as inactivated Hp were applied to screen positive hybridoma. Selected Hp mAb was analyzed and characterized with ELISA and Western blotting, and then labeled with horseradish peroxidase (HRP) for establishing a competitive ELISA to detect Hp antibodies in the sera of Hp-infected patients. **Results** One Hp mAb named as C3 was selected after screening large amount of hybridoma, and the C3 Hp mAb was special for IgG2a subtype with the affinity titer of  $1 \times 10^7$ . Western blotting, ELISA and mass spectrum analysis indicated that the C3 Hp mAb could recognize Hp urease subunit B specifically. Using the C3 Hp mAb, we developed a competitive ELISA which could be used to detect Hp antibodies in the sera of Hp-infected patients. **Conclusion** We successfully obtained one mAb that could specifically recognize Hp urease subunit B and developed a competitive ELISA using the Hp mAb.

**[Key words]** *Helicobacter pylori*; monoclonal antibody; competitive ELISA

1982年 Warren 和 Mashall 首次发现一种革兰氏阴性微需氧细菌, 称为幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp)<sup>[1]</sup>。目前, Hp 感染被公认为是慢性胃炎, 胃溃疡的重要病因, 50% 以上人群的上游消化道都寄居着幽门螺杆菌<sup>[2]</sup>。目前检测 Hp 的常用方法采用细

菌分离培养、组织染色、快速尿素酶试验等<sup>[3]</sup>, 但细菌分离培养、组织染色等方法操作较复杂, 而且多需要在胃镜下进行, 增加患者的痛苦; 虽然应用比较广泛的尿素酶呼气试验无需在胃镜下进行, 检测也不复杂, 但是该方法需要用半衰期很长的<sup>13</sup>C放射性

收稿日期: 2014 - 06 - 18; 接受日期: 2014 - 09 - 24

基金项目: 福建省科技重点项目(2011Y0050); 厦门市科技计划项目(3502Z20123009); 国家基础科学人才培养基金(J1310027)

作者简介: 丁焕弟(1987 -), 女, 河北保定人, 硕士研究生

Tel: 15933789348; E-mail: dinghuandi1125@163.com

\* Corresponding author, 李晓彤, E-mail: xltli@xmu.edu.cn

物质,具有一定的局限性,因此研究者们希望能研发出更好的检测方法。

Hp 菌体表达一系列蛋白如毒素相关基因 A (cytotoxin-associated gene A, CagA)、空泡毒素 A (vacuolating cytotoxin A, VacA)、尿素酶(urease)、热休克蛋白(heat shock protein, Hsp)和氧不敏感的 NADPH 硝基还原酶等,因此当 Hp 感染机体后会诱导机体产生不同的抗体<sup>[4]</sup>,理论上检测患者血清中的这些 Hp 抗体有可能作为诊断是否感染 Hp 的指标之一。基于这种理论,国外研究者率先开展了应用 ELISA 直接或间接检测血清中的 Hp 抗体以证实 Hp 感染的研究<sup>[5-6]</sup>,但是由于对因 Hp 感染导致血清中 Hp 抗体产生的变化规律了解有限,由不同抗原刺激所产生的抗体消长不一致,所以用血清学来检测 Hp 感染迄今未能用于临床检测。在我国也没有针对检测病人血清中抗 Hp 抗体发展而来的有效 ELISA 检测方法。本研究希望首先获得高效价且能特异识别 Hp 的单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb),再以这样的 Hp mAb 为基础,探索建立一种可间接检测出患者血清中 Hp 抗体的竞争 ELISA,以期为临床 Hp 感染的诊断提供新方法。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 为本中心保存细胞株,6 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠为厦门大学实验动物中心提供,聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、次黄嘌呤甲氨喋呤胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine aminopterin thymidine, HAT)培养基、次黄嘌呤胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine thymidine, HT)培养基、抗体亚型鉴定试剂盒为 Sigma 公司产品,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;RPMI1640 培养基和小牛血清购自 Gibco 公司。HRP 标记试剂盒购自泰天和生物公司。蛋白 G 亲和层析柱为 GE 公司产品。作为免疫抗原所用的灭活幽门螺杆菌由中国食品药品检定研究院提供,而检测抗原则是购自 CalBioReagents 公司,从 Hp 提取的 Hp 混合蛋白包括 CagA、VacA 和 urease。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物免疫** 用终浓度为 4 mL/L 甲醛灭活 Hp 菌 24 h,把 Hp 配制成  $1 \times 10^7$  菌落集成单位(colony-forming units, CFU)/mL 作为抗原,皮下多点注射免疫 BALB/c 小鼠。每 10 d 免疫 1 次,每次每只免疫 100  $\mu$ L,经过第 3 次免疫后 1 周,小鼠眼眶采血,ELISA 检测小鼠抗血清效价,稀释 2 万倍以上 P/N > 2 方进行融合,融合前 3 d 用 2 倍抗原量尾静脉加强免疫 1 次。

**1.2.2 Hp mAb 的制备** 取小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 用 PEG 法进行融合<sup>[7]</sup>,将小鼠的脾细胞和复苏的 Sp2/0 骨髓瘤细胞按照 3:1 的比例混合,在 37 $^{\circ}$ C 500 g/L PEG 条件下融合,融合后的细胞铺 96 孔板、加入 HAT 选择性培养基中培养。

**1.2.3 单克隆杂交瘤细胞的筛选与克隆** 细胞融合后,待细胞长到一定时段,采用间接 ELISA<sup>[8]</sup>检测细胞培养上清。用灭活的 Hp 菌体及 Hp 混合蛋白 CagA、VacA 和 urease 包被酶标板,筛选能同时识别 Hp 混合蛋白及 Hp 菌体的阳性细胞孔,筛选出的阳性孔采用有限稀释法经过 3 次克隆化,得到可稳定分泌特异性抗体的单克隆杂交瘤。

**1.2.4 Hp mAb 的纯化与效价检测** 采用 10 周龄的 BALB/c 雌鼠腹腔接种杂交瘤细胞诱生 mAb。在接种杂交瘤细胞 1 周前,向 BALB/c 雌鼠腹腔注射液体石蜡,每只注射 500  $\mu$ L,1 周后,取杂交瘤细胞计数,每只 BALB/c 小鼠腹腔注射  $10^6$  个杂交瘤细胞,10~14 d 后收集腹水。离心取上清液,以蛋白 G 进行亲和纯化。纯化后的抗体采用间接 ELISA,梯度稀释纯化后的抗体,测定抗体的效价。

**1.2.5 Hp mAb 亚型及特异性鉴定** 取杂交瘤培养上清,采用 Sigma 公司的小鼠 mAb 亚型鉴定试剂盒进行抗体亚型鉴定,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。用灭活的大肠杆菌、短小芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄短球菌、幽门螺杆菌包被酶标板,采用间接 ELISA,分别与我们获得的 Hp mAb 进行实验,以证实 Hp mAb 的特异性。

**1.2.6 Western blot 法鉴定筛选出的 Hp mAb 的特异性** 将甲醛灭活的 Hp 菌体,首先进行 SDS-PAGE;转膜后用 TBST 配置 50 g/L 的脱脂奶粉进行封闭,室温 2 h;加入 TBST 稀释的 Hp mAb,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,室温孵育 45 min, TBST 充分洗涤 3 次;加入 ECL 底物显影,观察 Hp mAb 与 Hp 的结合情况。

**1.2.7 质谱鉴定 Hp mAb 所识别的抗原** 将筛选到的 Hp mAb 免疫沉淀 Hp 混合蛋白,沉淀下来的蛋白进行 SDS-PAGE,再将考马斯亮蓝染色后的蛋白条带切下,采用液质联用仪 AB SCIEX Triple TOF 5600 进行鉴定,鉴定结果用 ProteinPilot 软件分析。

**1.2.8 竞争 ELISA 检测方法的建立** 用 HRP 标记抗体试剂盒,对获得的 Hp mAb 进行 HRP 标记。用棋盘滴定法确定竞争 ELISA 中 Hp 抗原包被浓度、酶标 Hp mAb 浓度:灭活 Hp( $10^7$  CFU/mL)依次稀释成 1:250、1:500、1:1 000 和 1:2 000 包被酶标板;HRP 标记的 Hp mAb 稀释倍数为 1:1 000、1:2 000、1:4 000 和 1:8 000,选取抑制率最高的条件定为包被浓度和酶标 Hp mAb 浓度,然后按常规法进行竞争 ELISA 检测。

**1.2.9 竞争 ELISA 检测患者血清抗 Hp 抗体** 选取 5 份临床标准 Hp 阳性血清,1 份标准 Hp 阴性血清分别稀释 2、8、32、128、512、2 048 倍,空白对照只加显色底物及终止液。将稀释血清与 HRP 标记的 Hp mAb 混合后加入到包被有 HP 抗原的酶标板上,反应适当时间后测定血清的抑制率,抑制率计算公式为:抑制率 =  $(A_{\text{阴性血清}} - A_{\text{样品}}) / (A_{\text{阴性血清}} - A_{\text{参比对照}}) \times 100\%$ ,确定合适的血清稀释度。

**1.2.10 竞争 ELISA 重复性试验** 通过我们确定的竞争 ELISA,重复检测同一样品,重复 3 次,比较检测结果的差异。

**1.2.11 统计学分析** 数据采用 SPSS17.0 处理,组间比较采用 *T* 检验,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 单克隆杂交瘤细胞的筛选** 本实验通过杂交瘤技术,进行细胞融合,融合率约为90%。每株阳性克隆经过3次亚克隆后可稳定分泌 Hp mAb,我们将其中1株阳性杂交瘤细胞,命名为 C3。该 C3 杂交瘤细胞经过数次传代、冻存和复苏后,仍能稳定分泌 Hp mAb。

**2.2 C3 Hp mAb 效价检测** 间接 ELISA 检测杂交瘤细胞培养液中 C3 Hp mAb 的效价为  $2 \times 10^4$ 。将杂交瘤细胞制备腹水后,使用蛋白 G 进行亲和纯化,纯化后浓度调整为 2 mg/mL,采用间接 ELISA 检测抗体效价,每孔设 3 个复孔。纯化后的 C3 Hp mAb 效价在  $3 \times 10^6$  以上(图 1)。

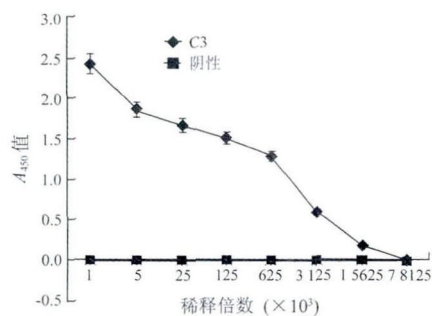


图 1 C3 Hp mAb 效价检测

**2.3 C3 Hp mAb 亚型鉴定** 采用亚型鉴定试剂盒,通过 ELISA 检测 C3 Hp mAb 的亚型,每孔设 3 个复孔,重复 3 次。结果显示 C3 Hp mAb 的亚型是 IgG2a(图 2)。

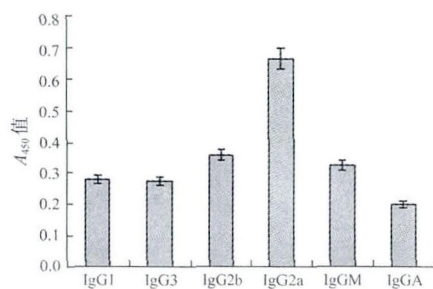
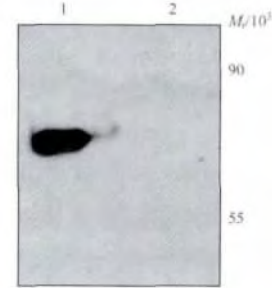


图 2 C3 Hp mAb 亚型的鉴定

**2.4 C3 Hp mAb 特异性的检测** 特异性检测结果表明我们筛选出的 C3 Hp mAb 不会与大肠杆菌、短小芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄短球菌发生交叉反应,能特异地识别幽门螺杆菌。

**2.5 C3 Hp mAb 的免疫印迹及其所识别的抗原分析** 将甲醛灭活的幽门螺杆菌以及阴性对照金黄色葡萄球菌制样后,进行 SDS-PAGE,以我们制备的 C3 Hp mAb 为一抗,结果发现 C3 Hp mAb 可识别 Hp 蛋白中相对分子质量 ( $M_r$ ) 在 55 000 ~ 90 000 的条带

(图 3)。将该 C3 Hp mAb 免疫沉淀 Hp 混合蛋白,再把沉淀下来的蛋白做质谱鉴定,鉴定结果分析表明,我们筛选到的 C3 Hp mAb 所识别的抗原为幽门螺杆菌尿素酶 B 蛋白(Urease B, UreB)。



1: 幽门螺杆菌; 2: 金黄色葡萄球菌。

图 3 C3 Hp mAb 的 Western blot 法检测

**2.6 竞争 ELISA 检测方法的建立** 用 HRP 成功标记 C3 Hp mAb 后,通过棋盘滴定实验,最后确定包被抗原幽门螺杆菌 ( $10^7$  CFU/mL) 稀释度为 1:2 000, HRP-C3 Hp mAb 的稀释度为 1:1 000 时,反应时间为 60 min。

**2.7 竞争 ELISA 检测患者血清中 Hp 抗体** 以阴性患者血清为对照,检测 5 例医院提供的阳性患者血清,空白对照为只加底物和终止液为对照孔。结果显示,随着血清稀释倍数的增加, A 值呈上升的趋势(图 4)。患者血清在稀释度为 8 ~ 32 倍时,通过计算抑制率,均在 70% 以上,结果表明我们的竞争 ELISA 可以检测到患者血清中的 Hp 抗体。

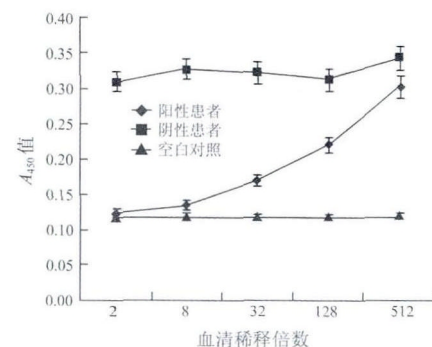
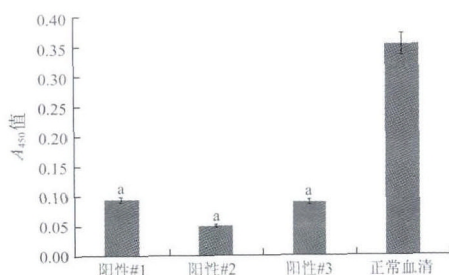


图 4 利用竞争 ELISA 方法检测患者血清

**2.8 竞争 ELISA 重复性试验** 通过确定的竞争 ELISA,重复检测相同的样品,重复 9 次,血清稀释 8 倍,比较检测结果的差异(图 5)。我们发现经过 9 次的重复试验,仍能够看到正常血清和 Hp 感染者血清中 Hp 抗体的显著差异 ( $P < 0.05$ ),说明我们建立的竞争 ELISA 检测方法有很好的重复性。



<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常血清。

图5 竞争 ELISA 检测患者血清 Hp 抗体

### 3 讨论

Hp 感染与胃癌、慢性胃炎、胃溃疡等疾病密切相关,能够诱发多种临床症状,已被 WHO 列为 I 类致癌因子<sup>[9]</sup>。临床上 Hp 的检测通常分为侵入性方法和非侵入性方法<sup>[10]</sup>,前者包括组织学检测、尿素酶试验、细菌分离培养和 PCR 检测等,非侵入性方法包括尿素酶呼吸试验、粪便抗原试验和血清学检测<sup>[11]</sup>。任何一项检测方法在检测 Hp 感染的实例中都有局限性,须要多项检测结合起来才能作为临床诊断的依据,即使是组织学的检测阳性率也不能达到 100%,而目前作为诊断标准的胃镜活检,尿素酶快速试验和分离培养鉴定等侵入性的检测会给大多数患者带来痛苦。再者,目前 Hp 的感染人群主要是儿童,一些侵入性的检测就变得不适用。因此非侵入性的检测变得十分必要,而尿素酶呼吸试验具有一定的放射性,并且要求特殊的仪器,使用也受到限制。粪便抗原检测采用夹心 ELISA 检测 HpSA (*Helicobacter pylori* stool antigen) 用为鉴定 Hp 感染<sup>[12]</sup>。该方法的灵敏度和特异性可以和尿素酶呼吸试验相媲美,Gościński 等<sup>[13]</sup>的研究结果表明,其灵敏度和特异性可达到 88.9% 和 96.2%,该方法比较适合婴幼儿的诊断。但是粪便抗原检测方法目前尚欠成熟,测试标本的大量保存和处理比较难以接受,其应用也受到一定限制。血清学的检测有针对抗原的检测,也有针对抗体的检测。Hp 的抗原,如 CagA、VacA、UreaA 等已有许多相关研究,但由于这些蛋白并不只是表达在感染 Hp 的人群中,导致其特异性非常低。采用血清学检测针对 Hp 抗体的竞争 ELISA 检测可兼具粪便抗原检测的优点,并且由于几乎所有的 Hp 感染患者都会产生特异的 Hp IgG、IgA 抗体<sup>[14]</sup>,使得这种检测的特异性得到保障。因此建立检测 Hp 抗体的灵敏和稳定的方法变得十分必要。韩国的 Seo 等<sup>[15]</sup>试图建立一个针对检测 Hp 抗体的高灵敏 ELISA 定量检测的方法,Ueda 等<sup>[16]</sup>针对日本

的儿童患者研究结果表明,粪便抗原的检测结果和血清 Hp 抗体的检测结果基本一致, Hp 抗体检测的灵敏度和特异性可达到 91.2% 和 97.4%。而在中国,目前还未见到类似检测血清 Hp 抗体的竞争 ELISA 的相关报导,这也是为什么我们开展了这方面的研究,希望我们的初步研究结果可为我国的研究者提供一些借鉴。

本实验通过杂交瘤技术及利用灭活的 Hp 菌体及其混合蛋白进行双筛,以便保证 Hp mAb 的特异性。但是我们采用购自 Cal Bioreagents 从 Hp 提取的 Hp 混合蛋白含有 CagA、VacA、urease 等。为鉴定 C3 Hp mAb 所识别的抗原,我们先用 C3 Hp mAb 免疫沉淀 Hp 混合蛋白,然后经过 Western blot 法和考马斯亮蓝染色蛋白胶相比较,再将检测到的蛋白条带用 TripleTOF5600 (AB SCIEX) 进行质谱鉴定并用 ProteinPilot 分析。结果表明,我们获得的 C3 Hp mAb 所识别的抗原是 UreB。此外,我们的检测结果还表明该 C3 Hp mAb 具有效价高且特异性好。利用该 C3 Hp mAb 所建立的竞争 ELISA 对 5 例临床 Hp 阳性患者的血清进行检测,检测结果表明该竞争 ELISA 可检出患者血清中的 Hp 抗体,该检测结果与临床 Hp 的检测结果一致。虽然我们检测的 Hp 患者血清数量有限,还有待于进一步的研究测试,以提高该方法的可信度及灵敏度并解决其定量标准的问题。另外,人们对用检测血清学中的 Hp 抗体来达到诊断 Hp 的方法仍有不少质疑,但是我们相信本研究获得的实验结果有可能为解答这种疑问打下基础,并为该领域里的我国科技研究工作者提供借鉴。

### 参考文献:

- [1] Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration [J]. *Lancet*, 1984, 1(8390): 1311-1315.
- [2] Garza-González E, Perez-Perez GI, Maldonado-Garza HJ. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(6): 1438-1449.
- [3] McNulty CA, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Helicobacter*, 2011, 16(Suppl): 10-18.
- [4] Tang RX, Luo DJ, Sun AH, et al. Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(30): 4816-4822.
- [5] Goodwin CS, Blincow E, Peterson G, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Campylobacter pyloridis*: correlation with presence of *C. pyloridis* in the gastric mucosa [J]. *J Infect Dis*, 1987, 155(3): 488-494.

(下转第 1286 页)



- 2013, 4(4): 361–369.
- [6] Parikh DA, Durbin-Johnson B, Urayama S. Utility of serum CA19-9 levels in the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma in an endoscopic ultrasound referral population [J]. J Gastrointest Cancer, 2014, 45(1): 74–79.
- [7] Shukla VK, Gurubachan, Sharma D, et al. Diagnostic value of serum CA242, CA19-9, CA15-3 and CA125 in patients with carcinoma of the gallbladder [J]. Trop Gastroenterol, 2006, 27(4): 160–165.
- [8] Agarwal AK, Kalayarsan R, Javed A, et al. Role of routine 16b1 lymph node biopsy in the management of gallbladder cancer: an analysis [J]. HPB (Oxford), 2014, 16(3): 229–234.
- [9] Ychou M, Duffour J, Kramar A, et al. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer [J]. Dis Markers, 2000, 16(3/4): 105–110.
- [10] Leerapun A, Thaikrua L, Pisesongsa P, et al. Clinical features and prognostic factors for liver cancer from a referral center in northern Thailand [J]. J Med Assoc Thai, 2013, 96(5): 531–537.
- [11] Makawita S, Dimitromanolakis A, Soosaipillai A, et al. Validation of four candidate pancreatic cancer serological biomarkers that improve the performance of CA19.9 [J/OL]. BMC Cancer, 2013, 13: 404.
- [12] 曹领改, 蓝兴国, 魏德强, 等. 抗人 CA15-3 单克隆抗体的制备、鉴定及化学发光检测体系的建立 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(1): 66–70.
- [13] 国家食品药品监督管理局. YY/T 1178-2010, 糖类抗原 CA19-9 定量测定试剂(盒)化学发光免疫分析法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [14] Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. Serum tumor markers in pancreatic cancer—recent discoveries [J]. Cancers (Basel), 2010, 2(2): 1107–1124.
- [15] Rosty C, Goggins M. Early detection of pancreatic carcinoma [J]. Hematol Oncol Clin North Am, 2002, 16(1): 37–52.
- [16] Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer [J]. Gut, 2007, 56(8): 1134–1152.
- [17] Vainshtein JM, Schipper M, Zalupski MM, et al. Prognostic significance of carbohydrate antigen 19-9 in unresectable locally advanced pancreatic cancer treated with dose-escalated intensity modulated radiation therapy and concurrent full-dose gemcitabine: analysis of a prospective phase 1/2 dose escalation study [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2013, 86(1): 96–101.
- [18] Bauer TM, El-Rayes BF, Li X, et al. Carbohydrate antigen 19-9 is a prognostic and predictive biomarker in patients with advanced pancreatic cancer who receive gemcitabine-containing chemotherapy: a pooled analysis of 6 prospective trials [J]. Cancer, 2013, 119(2): 285–292.
- [19] Golden DW, Novak CJ, Minsky BD, et al. Radiation dose  $\geq$ 54 Gy and CA19-9 response are associated with improved survival for unresectable, non-metastatic pancreatic cancer treated with chemoradiation [J/OL]. Radiat Oncol, 2012, 7: 156.
- [20] Haas M, Heinemann V, Kullmann F, et al. Prognostic value of CA 19-9, CEA, CRP, LDH and bilirubin levels in locally advanced and metastatic pancreatic cancer: results from a multicenter, pooled analysis of patients receiving palliative chemotherapy [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(4): 681–689.

## (上接第 1281 页)

- [6] Newell DG, Johnston BJ, Ali MH, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of *Campylobacter pylori*-associated gastritis [J]. Scand J Gastroenterol, 1988, 142 (Suppl): 53–57.
- [7] 杨 赟, 丁宇婷, 龚慧婷, 等. Mucin 16 蛋白的表达纯化及单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2012, 28(9): 960–963.
- [8] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 42–45.
- [9] 郭晓临, 李 莉, 都妹妍, 等. 幽门螺杆菌 CagA 菌株感染对 IL-8 蛋白在胃癌组织中表达的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(4): 380–382.
- [10] Pourakbari B, Ghazi M, Mahmoudi S, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by invasive and noninvasive tests [J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(3): 795–798.
- [11] Dzierzanowska-Fangrat K, Lehours P, Mégraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection [J]. Helicobacter, 2006, 11 (Suppl 1): 6–13.
- [12] Makristathis A, Pasching E, Schütze K, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(9): 2772–2774.
- [13] Gościński G, Przondo-Mordarska A, Iwańczak B, et al. *Helicobacter pylori* antigens in stool specimens of gastritis children before and after treatment [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2003, 36(3): 376–380.
- [14] 李 涛, 邹莉霞. 幽门螺杆菌诊断方法评析 [J]. 贵州医药, 2010, 34(9): 850–851.
- [15] Seo JH, Jun JS, Youn HS, et al. Development of an ELISA for quantitative detection of immunoglobulin G (IgG) and IgA antibodies to *Helicobacter pylori* for use in Korean patients with H. pylori-associated diseases [J]. Gut Liver, 2013, 7(4): 437–442.
- [16] Ueda J, Okuda M, Nishiyama T, et al. Diagnostic accuracy of the E-plate serum antibody test kit in detecting *Helicobacter pylori* infection among Japanese children [J]. J Epidemiol, 2014, 24(1): 47–51.