

doi: 10.3969/j.issn.2095-0411.2023.02.010

定量检测幽门螺杆菌感染的胶乳比浊试剂研究

刘心恺¹, 宋厚煜², 张 炯², 付 浩², 赵希岳¹

(1. 常州大学 药学院, 江苏 常州 213164; 2. 常州爱复康生物科技有限公司, 江苏 常州 213164)

摘要: 将重组表达的幽门螺杆菌 (Hp) 上的尿素酶 B (UreB) 蛋白与黏附素 (HpaA) 蛋白通过化学反应, 偶联到聚苯乙烯微球上, 并置换到保存液中, 制备出幽门螺杆菌的抗体检测试剂 2 (R_2)。结合抗原抗体反应特性及降低血清中非特异性吸附, 制备出幽门螺杆菌的抗体检测试剂 1 (R_1)。 R_1 与 R_2 搭配使用构成了定量检测人血清中幽门螺杆菌的抗体检测胶乳试剂盒。可以发现, 制备 20 mL 胶乳 R_2 , 包被幽门螺杆菌 UreB 蛋白与 HpaA 蛋白各 1.6 mg, 同时聚苯乙烯微球粒径为 190 nm 时, 试剂效果最好。该试剂盒通过对 1 000 例常州本地随机临床样本与室间质评样本进行评测, 发现常州本地随机临床样本的阳性率为 34.6%, 室间质评样本的检测结果与上海临床检验中心公布结果一致, 试剂盒性能较好。

关键词: 幽门螺杆菌抗体检测; 胶乳增强比浊法; 试剂盒制备; 性能评价

中图分类号: R 446.62

文献标志码: A

文章编号: 2095-0411(2023)02-0084-09

Preparation of latex-enhanced immunoturbidimetric reagents for quantitative detection of helicobacter pylori infections

LIU Xinkai¹, SONG Houyu², ZHANG Jiong², FU hao², ZHAO Xiyue¹

(1. School of Pharmacy, Changzhou University, Changzhou 213164, China; 2. Changzhou Aifukang Biological Technology Co., Ltd., Changzhou 213164, China)

Abstract: The urease protein and HpaA protein of the recombinant expressed *Helicobacter pylori* (Hp) were chemically coupled to the polystyrene microspheres and replaced in a suitable preservation solution, to prepare *Helicobacter pylori* antibody detection reagent 2 (R_2). A *Helicobacter pylori* antibody detection reagent 1 (R_1) was prepared by combining the reaction characteristics of antigen and antibody and reducing the non-specific adsorption in serum. The combination of R_1 and R_2 forms a latex kit for quantitative detection of *Helicobacter pylori* antibodies in human serum. The results showed that the best reagent was prepared by coating *Helicobacter pylori* urease protein and HpaA

收稿日期: 2022-09-25。

基金项目: 苏北科技专项资助项目(SZ-LYG2017016); 常州市爱复康生物科技有限公司研发资助项目(KYH15020329)。

作者简介: 刘心恺(1995—), 男, 江苏泰州人, 硕士生。通信联系人: 赵希岳(1965—), E-mail: xyzhao@cczu.edu.cn

引用本文: 刘心恺, 宋厚煜, 张炯, 等. 定量检测幽门螺杆菌感染的胶乳比浊试剂研究[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2023, 35(2): 84-92.

each 1.6 mg with 20 mL latex R_2 and polystyrene microspheres 190 nm in diameter. The kit was test-
ed on 1 000 random clinical samples collected in Changzhou and samples for external quality assess-
ment. The results showed that positive rate of the random samples was 34.6%, and test results of the
external quality evaluation samples were consistent with the results announced by the Shanghai Clini-
cal Laboratory Center. As a result, the performance of the kit is good.

Key words: helicobacter pylori antibody detection; latex enhanced turbidimetric method; preparation
of test kit; performance of evaluation

幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori, Hp) 是人
类胃癌的 I 类癌源, Hp 形态如图 1 所示^[1]。2021
年底,美国卫生及公共服务部发布的第 15 版致癌物
报告中首次将幽门螺杆菌列为一类致癌物^[2]。幽门
螺杆菌是人类最常见的感染细菌之一。世界卫生组
织报告,发展中国家 Hp 患病率约为 50.8%,发达
国家的 Hp 患病率约为 34.7%^[3]。据统计, Hp 感染者基本都伴有慢性胃炎,约 95% 的十二指肠溃
疡、近 70% 的胃溃疡^[4]和 63.4% 的胃癌患者^[5]体内都发现了幽门螺杆菌感染。幽门螺杆菌导致胃癌
的发生流程如图 2 所示。胃癌高发人群的防治重在防,若能在 Hp 感染早期诊断出来,早发现早治
疗,则治疗成本较低。常用的 Hp 抗生素有阿莫西林、克林霉素、替硝唑与左氧氟沙星。通过三联治
疗,即抑酸药雷贝拉唑与任意 2 个抗生素联用,可有效杀死 Hp;通过四联治疗,即抑酸药雷贝拉唑、
枸橼酸铋钾与任意 2 个抗生素联用,也可杀死 Hp,从而切断胃癌的发生流程。

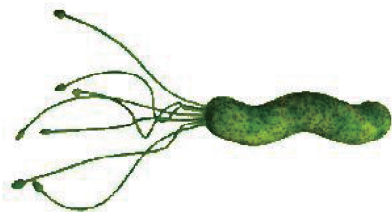


图 1 Hp 形态图

Fig.1 Shape of Hp

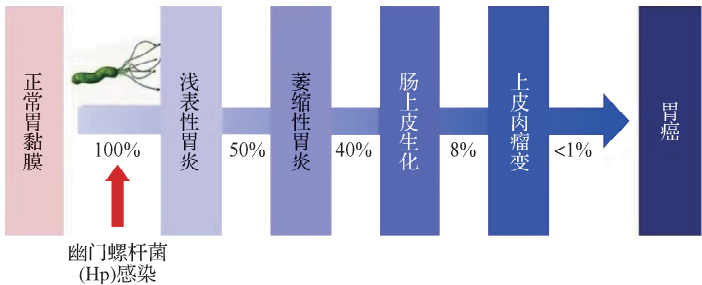


图 2 Hp 诱导胃癌发生的流程

Fig.2 Hp causes gastric cancer process

胃癌筛选方法如图 3 所示,对于胃癌高发人群,
需要先进行胃镜检查,并且通过血清样本检测胃功
能 3 项:胃蛋白酶原,促胃泌素 17,幽门螺杆菌。
若幽门螺杆菌为阴性且胃镜检测没有萎缩,则无胃
癌风险;若幽门螺杆菌为阳性,胃镜检测到萎缩或
没萎缩,均需要实施根除幽门螺杆菌治疗。胃癌诊
断方案一为胃镜病理、钡餐造影、肿瘤相关标记物
以及 C13/C14 呼气试验检测^[6],这些检测手段成本
高,不适合大规模国民筛查,适合胃癌高发人群,
具体情况见表 1。胃癌诊断方案二为 PG I /PG II /
G17 血清学筛查、Hp 粪便抗原检查与 Hp 抗体检

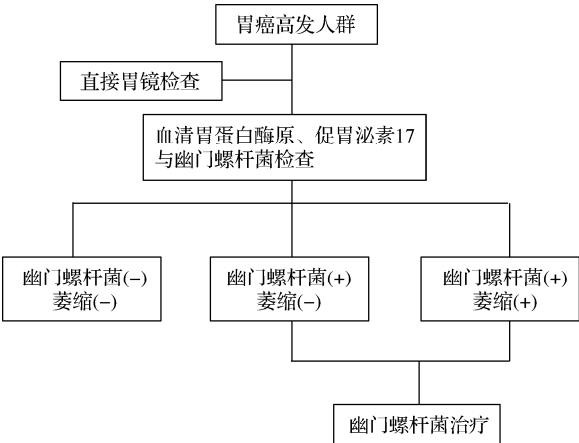


图 3 Hp 引发的胃癌筛选方法

Fig.3 Hp-induced gastric cancer screening method

查，这些检测手段成本低，适合大规模国民筛查，具体情况见表 2。粪便 Hp 抗原检测作为一种非侵入性方法，具有简便、经济的特点，同时标本留取方便。由于检测的是 Hp 抗原，因此可准确反映 Hp 的现症感染情况，阳性则可认定为现症感染。Hp 粪便抗原检查属于定性检测，具有较高传染风险，因此也不适合大规模国民筛查。

感染 Hp 后，人体会产生尿素酶抗体以及 CagA（细胞毒素相关蛋白 A）与 VacA（空泡毒素）抗体。尿素酶包括分型尿素酶 A 与尿素酶 B。尿素酶 B（UreB）活性强，尿素酶 A 活性弱，所以选择 UreB 抗体作为检测目标^[7]。Hp 感染分为良性（Ⅱ型）与恶性（Ⅰ型），只要 CagA 与 VacA^[8]检测均为阴性，则不会导致胃癌。CagA 是 Hp 致病岛上基因的编码产物，可导致宿主出现严重的炎症反应。VacA 是由 Hp 代谢产生的，VacA 会使组织细胞产生空泡，重排细胞骨架，甚至产生毒素。另外，发现 Hp 的外膜蛋白中包含一种黏附素（HpaA）蛋白^[9]，该黏附素蛋白为 Hp 所特有，其主要作用是帮助 Hp 黏附于胃壁。因此，将 HpaA 也作为 Hp 检测的重要标志物，通过 HpaA 抗体辅助检测 Hp。

表 1 中国胃癌临床诊断工具
Table 1 Clinical diagnostic tools for gastric cancer in china

检测手段	优点	缺点	总体评价
胃镜病理	金标准	痛苦，费用高	具有侵入性，费用高，不易普及
钡餐造影	用时短，传统胃癌检测手段	射线，费用高，不适合胃病早期诊断	对诊断进展期或弥散性胃癌更有价值
肿瘤相关标记物	血清检测，无创	不适合胃病早期诊断	如 CEA 在胃癌的胃液中阳性率为 50%
C13/C14 呼气试验	无抽血，操作简单	设备贵，费用高，不适合流行病学调查	操作简单，成本高，不适合流行病学调查

表 2 胃癌筛查方案
Table 2 Screening programs for gastric cancer

检测手段	优点	缺点	总体评价
PG I /PG II /G17 血清学筛查	无痛苦，定量准确	需抽血	在胃萎缩阶段诊断并检测病变变化，操作简单、耗时少、痛苦小、安全、非侵入、经济
Hp 粪便抗原检查	操作简单，不需特殊仪器	射线，费用高，不适合胃病早期诊断	国内尚未成熟
Hp 抗体检查（胶体金法）	血、唾液与尿液都可检测	Hp 抗体滴度可维持半年以上，无法反映 Hp 现在的感染状态	可以判定是否感染过 Hp，适合大规模普筛

鉴于目前市面上的主流是 Hp 抗体定性检测（定性检测是指判断是否感染，即阳性或阴性），但是预防 Hp 感染的关键是定量检测（定量检测是指检测出标本中所含有的某一特定物质具体的量），同时，定量检测也对 Hp 治疗过程中的评估起重要作用。课题组旨在开发 Hp 抗体定量检测试剂盒，通过 UreB 为研究对象，HpaA 作为辅助，将二者包被制成试剂盒，来检测血清样本中的 Hp 抗体含量，从而对 Hp 感染者进行筛选诊断，精准、快速且便捷地检测 Hp 感染情况，为 Hp 流行病学普筛提供参考。

1 实验部分

1.1 实验试剂与设备

实验试剂:聚苯乙烯微球购自东莞市汉诺生物技术有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国赛默飞科技有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购自上海生工生物工程有限公司;牛血清白蛋白(BSA)购自上海泰坦科技股份有限公司;EDAC与ProClin-300购自美国sigma公司;一水吗啉乙磺酸(Mes)与三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自苏州亚科科技股份有限公司;UreB与HpaA蛋白均购自上海桂康生物科技有限公司;蛋白凝胶电泳试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;其他常用药剂购自国药集团药业股份有限公司。实验所用试剂均为分析纯。

实验设备:紫外可见分光光度计(岛津,UV2600);垂直电泳槽、恒压仪(上海天能科技有限公司);超声波细胞破碎机(SCIENTZ, JY 92-11);恒温水浴振荡器(菲普仪器, THZ-82 A);高速低温离心机(贝克曼, Avanti J-25);全自动生化分析仪(日立, 7170 S)。

1.2 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定蛋白纯度

按照说明书配制12%的SDS-PAGE胶,胶厚度1.0 mm,梳齿15个,取UreB, HpaA各5 μ g与loading buffer上样缓冲液混合,95 $^{\circ}$ C加热5 min,作为上样液。90 V电泳25 min,然后调节电压至120 V继续电泳60 min,将胶用清水在微波炉加热5 min,洗去SDS和电泳指示带,再用染色液(考马斯亮蓝R250)微波炉加热染色10 min,最后用清水在微波炉中加热5 min,脱去背景色,白色背景拍照得到纯度鉴定电泳图^[10]。

1.3 BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度

估测电泳原质量浓度为10 mg/mL,用PBS将UreB质量浓度稀释为原质量浓度的1/5和1/6,确保检测质量浓度在试剂盒标准曲线线性范围内(0.2~0.8 mg/mL),用同样方法将HpaA质量浓度稀释为原质量浓度(估测原质量浓度为2 mg/mL)的1/3和1/4。向96孔酶标板加入标准品BSA 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL,每孔10 μ L,另起一排加入稀释后的UreB和HpaA,每孔10 μ L。用排枪向加过标品和样品的孔中加入反应工作液($V(R_1):V(R_2)=1:50$),将酶标板震荡5~10 s,放入37 $^{\circ}$ C培养箱,孵育30 min,吸收波长为560 nm,通过酶标仪读板,绘制标曲,根据标曲计算UreB和HpaA的质量浓度。

1.4 Hp 抗体检测胶乳试剂制备

1.4.1 校准品制备

对雄性山羊注射UreB和HpaA蛋白,使山羊免疫系统产生相应的UreB和HpaA抗体^[9]。5个月,当羊血清达到较高效价,抽血,室温下放置3.5 h,2~8 $^{\circ}$ C过夜。4 000 r/min离心10 min,获取羊抗血清,最后通过硫酸铵沉淀进行提纯^[11],获得UreB和HpaA蛋白的羊多抗。通过日本进口的Hp胶乳试剂定量检测羊多抗的效价。

1.4.2 试剂1制备

分别称取12.11 g Tris, 10 g PEG-6000, 0.93 g EDTA-2Na, 15 g NaCl,加入纯化水850 mL,玻璃棒搅匀,用移液器吸取100 μ L Triton X-100与100 μ L ProClin-300,搅匀,盐酸调pH至7.45,补水至1 L,即得试剂1(R_1)。

1.4.3 试剂 2 制备

1) 微球活化

将 400 μL 直径 190 nm 羧基化的聚苯乙烯微球加入 19 mL、pH 为 6.0 的 Mes 缓冲液中, 加入 264 μL , 2 mg/mL EDAC 与 400 μL , 2 mg/mL NHS。在摇床 200 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30 min, 离心去除上清液中剩余的活化剂, 保留沉淀, 通过 10 mL, 5 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液将活化的胶乳微球重悬, 得到活化的 190 nm 胶乳微球溶液^[12]。

2) 蛋白质偶联

取 UreB 与 HpaA 蛋白各 1.6 mg 混合于 10 mL, 5 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 混匀后, 加入步骤 1) 中得到活化的 190 nm 胶乳溶液。在 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 转速的摇床中反应 1 h, 得到表面偶联 UreB 和 HpaA 蛋白的胶乳微球^[13]。

3) 胶乳微球的封闭

向步骤 2) 中得到的溶液中加入 2 mL, 1 mol/L 的 Tris 封闭剂, 在 200 r/min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 的摇床中反应 1 h, 用封闭剂将微球表面未反应的活化基团中和。

4) 储存液的置换

将步骤 3) 中得到的混合溶液 12 500 r/min 离心 45 min, 去除上清液, 去掉剩余的交联剂、交联副产物、抗原以及封闭剂, 底部沉淀即为偶联上抗原的胶乳微球, 在上述沉淀中加入 20 mL 储存液(10%乙二醇, 1% BSA, 20 mmol/L EDTA-2Na, 0.1% NaN_3 , 120 mmol/L 甘氨酸), 振荡器振匀, 并经超声仪超声处理, 得到分布均一的胶乳悬浮液。

5) 去除不均匀大微粒

将步骤 4) 中得到的胶乳悬浮液 6 000 r/min 离心 6 min, 移液器吸取上层均匀胶乳, 去除大颗粒微球形成的沉淀, 即得试剂 2。微球偶联蛋白通过 BCA 试剂盒检测, 离心后控制上清液中残留蛋白偶联率 80% 以上, 偶联后的粒径变化不大, 通常不作评价。37 $^{\circ}\text{C}$ 加速 14 d 进行稳定性检测, 变异系数上下浮动 10% 以内为合格。

1.4.4 Hp 试剂校准品溶液的制备

取 1 支 100 IU/mL 含有 UreB 和 HpaA 的抗体冻干品, 1 mL 纯化水复溶, 用纯化水稀释为 100, 50, 25, 10, 0 IU/mL (cut-off 值为 10 IU/mL, 校准品配制为 10 IU/mL, 便于提高检测准确度), 振匀, 作为 Hp 抗体检测试剂多点定标的校准品^[14]。

1.5 性能检测

在日立 7170 S 生化分析仪上, 将 Hp 检测试剂与校准品反应, 形成定标线。试剂中嵌合的 UreB 和 HpaA 蛋白胶乳微球与血清样本中的 UreB 和 HpaA 抗体相遇后, 特异性结合, 形成复合物, 产生一定浊度。与定标线比对, 计算出样本中 UreB 与 HpaA 抗体的质量浓度^[15]。

具体检测步骤与本课题组之前所用方法相同, 参考文献 [11], 只有 4 处不同, 分别为: 主波长为 546 nm; R_1 加样量为 160 μL ; R_2 加样量为 40 μL ; 样本加样量为 4 μL 。

对 Hp 试剂盒的性能评价分为 5 个步骤: ① 定标; ② 检测准确度 (测阴性样本与阳性样本); ③ 普筛随机临床样本; ④ 检测权威样本 (上海临床检验中心的室间质评样本) ⑤ 检测限^[16]。

2 结果与讨论

2.1 UreB 与 HpaA 蛋白质量评价

2.1.1 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴别纯度

Hp 的 UreB 与 HpaA 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳如图 4 所示。

凝胶电泳显示, UreB 蛋白电泳条带在 42 ku 左右, 与理论计算 40 ku 接近, 通过灰度扫描软件, 测算纯度为 95%; HpaA 电泳条带在 28 ku 左右, 与理论计算 28 ku 一致, 通过灰度扫描软件, 测算纯度为 91%^[17]。

2.1.2 检测 UreB 与 HpaA 蛋白的质量浓度

BCA 试剂盒绘制标准曲线如图 5 所示^[18], 纵坐标为蛋白质量浓度 (mg/mL), 横坐标为 562 nm 处的 OD 值, 然后根据稀释后 UreB 和 HpaA 的 OD 值代入标准曲线, 再乘以稀释倍数, 取平均值, 得到 UreB 与 HpaA 蛋白质量浓度分别为 5.8 mg/mL 与 3.6 mg/mL。

2.2 Hp 胶乳试剂检测

Hp 试剂的校准品为 UreB 与 HpaA 蛋白羊多抗, 外观为淡黄色。Hp 试剂 R₁ 外观无色透明, R₂ 为乳白色液体。R₁ 各组分的作用为: Tris-HCl 缓冲液提供一个稳定的 pH 环境^[19]; PEG-6000 促进 R₁ 与 R₂ 反应, 增强试剂灵敏度^[20]; Triton X-100 能够降低表面张力, 起助悬作用^[21]; ProClin-300 抑制细菌生长速度; NaCl 能保持溶液的总离子强度稳定, 保证溶液内物质的稳定^[22]; EDTA-2Na 作为金属屏蔽剂, 对体系中的蛋白质起保护作用^[23]。试剂 R₂ 的机理是: 偶联了 UreB 与 HpaA 蛋白的聚苯乙烯微球, 遇到人血清中的 UreB 与 HpaA 抗体, 发生免疫反应。

2.2.1 确定校准曲线

如图 6 所示, 校准品活性为 0, 10, 25, 50, 100 IU/mL 时, 反应度依次为 20, 536, 1 386, 2 445, 4 182。该试剂盒与纯化水的反应度为 20, 小于 200, 说明背景值较低, 不易出现假阳性^[24]。UreB 抗体活性为 100 IU/mL 时, 反应度为 4 182, 反应曲线轻微减缓, 这是校准曲线的普遍现象, 原因是试剂中包被蛋白的微球不足, 抗原无法将所有的抗体捕获并形成络合物, 导致反应度下降。但是由于文中所测 Hp 样本的活性不超过 50 IU/mL, 所以该校准曲线不影响正常使用。

2.2.2 准确度检测

试剂盒的 cut-off 值参考日本进口 HP 胶乳检测

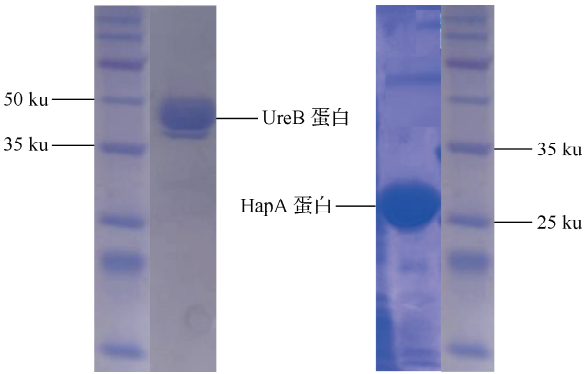


图 4 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig.4 SDS-PAGE gel electrophoresis

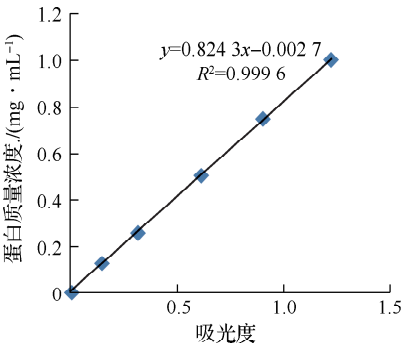


图 5 BCA 蛋白质量浓度测定

Fig.5 Determination of BCA protein concentration

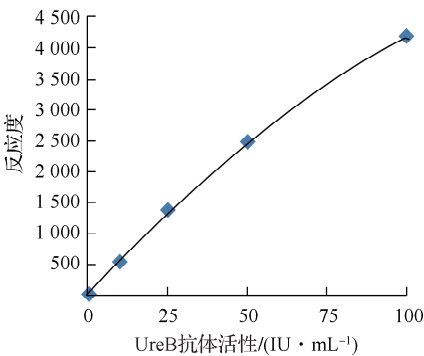


图 6 Hp 抗体检测试剂与校准品反应的定标线

Fig.6 Calibration line of the reaction between the Hp antibody test reagent and the certified reference material

试剂（荣研化学株式会社），通过检测收集到的阳性与阴性样本，最终将 Hp 项目的 cut-off 值定为 10 IU/mL。大于 10 IU/mL 即为阳性，小于等于 10 IU/mL 即为阴性，原因是试剂灵敏度有限，只能将不确定因素控制在 10 IU/mL 以内，无法达到绝对的 0 IU/mL^[24-27]。

检测 2 支阴性样本与 3 支阳性样本，结果与相符，见表 3。测试 K01 号与 K07 号样本，测值分别为 4.7，2.1 IU/mL，测值均小于临界值 10 IU/mL，与事实相符（“—”代表阴性，“+”代表阳性）。测试 3 支收集于宜兴五院的临床阳性样本（Y01~Y03 号），测值均大于临界值 10 IU/mL，与事实相符。

Y01 号样本测值稍低，说明其 UreB 与 HpaA 抗体含量较低，Y03 号样本测值最高，说明该样本中 UreB 与 HpaA 抗体含量高。感染 Hp 的患者体内 UreB 与 HpaA 抗体的含量会因其感染所处阶段而有所差异，另外，强壮的个体比虚弱的人更容易产生免疫性抗体，从而抗体含量不同^[28-30]。

2.2.3 样本普筛与室间质评样本检测

试剂盒对一定时期内（2021 年 6 月至 2022 年 6 月）常州本地的 1 000 例临床样本（样本编号：1~1 000）进行检测，见表 4。测试阳性率为 34.6%，说明该试剂盒检测本次收集样本得到的阳性率与官方报道一致（官方报导，国民 Hp 阳性率 30%~50%）。进一步测试上海临床检验中心（2022 年第 2 次）的 5 支室间质评样本（编号：2 221~2 225），发现该试剂盒的检测结果与上海临床检验中心公布的预期值一致，说明试剂盒测试准确度较高。实验过程中发现，仅偶联 UreB 蛋白，在检测弱阳性样本 2 223 时，测值为 0；而同时偶联 UreB 与 HpaA 两种蛋白时，测值为 12.3，超过 Cut-off 值，即刚好显示阳性。因此，UreB 与 HpaA 蛋白混合使用对提高试剂盒的灵敏度起重要作用。原因是 UreB 是幽门螺杆菌的代谢产物，HpaA 是 Hp 外膜的重要组成部分，二者都能与血清样本中对应的抗体进行特异性结合，产生叠加效应，因此，更容易捕获到血清样本中的 Hp 抗体。

2.2.4 检测限

根据表 4 样本普筛实验，发现试剂盒对测值 0.3 IU/mL 以上样本的检测精密度高，低于 0.3 IU/mL 的样本检测精密度较差，变异系数大于 10%，因此，试剂盒的检测限应不大于 0.3 IU/mL。

3 结 论

将聚苯乙烯微球与 Hp 上的蛋白偶联，成功制备了 Hp 抗体检测试剂盒，并用其检测了大量临床样本，包括室间质评临床样本与 1 000 支常州本地临床血清样本。室间质评样本的检测数值与预期结

表 3 准确度测试

Table 3 Accuracy testing

样本编号	检测数值/ (IU · mL ⁻¹)	预期
K01	4.7	—
K07	2.1	—
Y01	242.6	+
Y02	32.3	+
Y03	70.1	+

表 4 样本普筛与室间质评样本的评测

Table 4 Test of large number of samples and interlaboratory quality assessment samples

样本编号	检测数值/ (IU · mL ⁻¹)	预期
1	1.0	—
2	24.5	+
3	0.9	—
4	6.4	—
...	0.9	—
998	4.7	—
999	56.8	++
1 000	2.5	—
2 221	70.1	++
2 222	0.3	—
2 223	12.3	+-
2 224	56.8	++
2 225	6.1	—

说明：“—”表示阴性；“+”表示阳性；“+-”表示弱阳性；“++”表示强阳性。

果一致,常州本地临床血清样本的阳性率与国家报道的国民感染率基本一致。因此,该试剂盒检测性能较好,可以为HP检测提供支持。

文中试剂盒只能初步检测出是否感染Hp,无法确定是Ⅰ型还是Ⅱ型。下一步课题组将研发检测Cag与VacA蛋白,将其制成检测试剂盒,从而确定Hp分型,以期为国民胃癌普筛提供更多临床诊断辅助支持。

参考文献:

- [1] MISHIRO T, SHIBAGAKI K, FUKUYAMA C, et al. KLF4 mutation shapes pathologic characteristics of foveolar-type gastric adenoma in helicobacter pylori-naive patients[J]. The American Journal of Pathology, 2022, 192(9): 1250-1258.
- [2] MARONEY M J, CIURLI S. Nickel as a virulence factor in the class I bacterial carcinogen, helicobacter pylori[J]. Seminars in Cancer Biology, 2021, 76: 143-155.
- [3] NGAIZA A I, YAHAYA J J, MWAKIMONGA A K, et al. Histologic detection of helicobacter pylori by the immunohistochemical method using anti-helicobacter pylori polyclonal antibody: a cross-sectional study of patients with gastric pathologies at the muhimili national hospital in dar-es-salaam, tanzania[J]. Arab Journal of Gastroenterology: the Official Publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology, 2022, 23(1): 7-14.
- [4] YORULMAZ A, EMIROĞLU H H, GÜMÜŞ M D, et al. The relationship between helicobacter pylori infection and nodular antral gastritis in pediatric patients[J]. Journal of the National Medical Association, 2022, 114(4): 440-450.
- [5] FLACH C F, MOZER M, SUNDQUIST M, et al. Mucosal vaccination increases local chemokine production attracting immune cells to the stomach mucosa of helicobacter pylori infected mice[J]. Vaccine, 2012, 30(9): 1636-1643.
- [6] 李亚强,刘正新. 早期胃癌的诊断进展[J]. 国际消化病杂志, 2014, 34(5): 332-333, 337.
- [7] 蔡靓,李克生,杜惠芬,等. 幽门螺杆菌尿素酶B基因的克隆表达及活性测定[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(3): 283-288.
- [8] 韩梅娇,金晓明,牟海滨,等. 慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌cagA、vacA基因相关性研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(6): 497-499, 559.
- [9] 栗俊杰,杨致邦,张任飞,等. 幽门螺杆菌HpaA重组蛋白的表达及免疫效果检测[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(6): 493-496.
- [10] 周志军,李策生,李陶敬,等. 检测人凝血因子Ⅷ蛋白质含量的BCA法的优化及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(10): 1488-1492.
- [11] 宋厚煜,刘心恺,张炯,等. COVID-19抗体检测试剂盒的制备与应用[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2021, 33(3): 75-81.
- [12] 邓加武,李文良,毛立,等. 山羊源副流感病毒3型JS2013株HN基因的原核表达与抗原性分析[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(6): 596-601.
- [13] 曹正国,李成章. 常用蛋白交联方法及其对胶原的影响[J]. 国外医学, 2001, 24(4): 187-191.
- [14] 高玲,冯品宁,喻雄文,等. 胶乳增强免疫比浊法测定胃蛋白酶原Ⅱ的不精密度和线性观察[J]. 检验医学, 2012, 27(2): 122-125.
- [15] 黄永富,许文荣,曹兴建. 全自动生化分析仪检测系统过程能力与不确定度的研究[J]. 国际检验医学, 2010, 31(7): 650-652.
- [16] 温珠妹,郑丽萍,柳丽娟,等. 乙型肝炎病毒前S1抗原化学发光免疫法与酶联免疫法检测试剂的临床比对[J]. 福建医药杂志, 2014, 36(2): 73-75.
- [17] 焦志勇,陈旻湖,朱森林,等. 表达UreB/hlyE融合蛋白的重组减毒鼠伤寒沙门疫苗菌预防幽门螺旋杆菌感染[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(6): 787-789.

- [18] 郭静, 高文君, 朱小梅, 等. C-端设计定点突变提高 *Streptomyces Avermitilis* 壳聚糖酶稳定性及催化活性[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2022, 34(5): 82-92.
- [19] RODRIGUEZ C, HUANG F, MILLERO F J. The partial molal volume and compressibility of tris and tris-HCl in water and 0.725 m NaCl as a function of temperature[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2015, 104: 41-51.
- [20] MU J Q, ZHONG H P, ZOU H, et al. Acid-sensitive PEGylated paclitaxel prodrug nanoparticles for cancer therapy: effect of PEG length on antitumor efficacy[J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2020, 326: 265-275.
- [21] YU Q, MOU X L, GUO L Y, et al. Triton X-100-directed synthesis of carbon nitride and nitrogen-doped carbon for ethylene dichloride dehydrochlorination[J]. Carbon, 2022, 196: 110-119.
- [22] LASHKARY M, MOGHADDAM M, ASGHARZADE A, et al. Titanium dioxide nanoparticle is involved in mitigating NaCl-induced calendula officinalis L. by activation of antioxidant defense system and accumulation of osmolytes[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166: 31-40.
- [23] ELABD H, YOUSSEF H, MAHBOUB H H, et al. Growth, hemato-biochemical, immune-antioxidant response, and gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) received nano iron oxide-incorporated diets[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2022, 128: 574-581.
- [24] 陆丽霞, 夏蓉. 钆剂造影、幽门螺杆菌检测对社区胃炎病变筛查的研究[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(3): 478-480.
- [25] 陈陆, 徐东, 宋玉杰, 等. 利用 RIBA 试验确定 HCV 抗体检测的 cut-off 值及比较分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2022, 29(9): 1465-1468.
- [26] 魏庆玲, 梁睿, 李冬秀, 等. 应用 GSP 筛查新生儿 G6PDd 的性能验证及 cut-off 值设定[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(14): 1926-1929.
- [27] 韩玮玮, 金齐力, 刘嘉清, 等. 六种国产乙型肝炎表面抗体 ELISA 试剂盒符合率及 cut-off 值探讨[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(4): 621-628.
- [28] 王克成, 潘诗茜, 丛琳. 新型冠状病毒疫苗接种对 ELISA 检测 HIV 抗体的影响[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(10): 1360-1363.
- [29] 郝润英, 李佳, 袁茜, 等. 染色体核型、性激素、免疫性抗体检测在女性生殖异常患者中的应用[J]. 河北医药, 2022, 44(9): 1354-1356, 1360.
- [30] 杜永丽, 陈丽波. 生殖免疫性抗体检测诊断不孕不育的价值研究[J]. 基层医学论坛, 2022, 26(25): 96-98.

(责任编辑:李艳,周安迪)