

幽门螺杆菌鞭毛蛋白 A (FlaA) 单克隆抗体的制备与鉴定

邱席¹, 刘伟², 庄睿娟¹, 陈亚琼², 邓晨希², 王团老^{1*}

(1. 厦门大学药学院, 福建 厦门 361102; 2. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102)

摘要: 幽门螺杆菌 (Hp) 鞭毛蛋白 A (FlaA) 可作为临床诊断标志物, 但目前国内尚无识别 FlaA 蛋白的特异性抗体。该研究构建了 flaA 基因表达载体, 表达并纯化了 FlaA 重组蛋白, 并以此重组蛋白为抗原免疫 BALB/C 小鼠, 通过杂交瘤细胞技术制备 FlaA 单克隆抗体。最后对抗体的亚型、效价、亲和力、特异性、识别表位等进行鉴定。实验共获得 5 株能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 2G2、2G10、3E2、3E4 和 4H3。经间接 ELISA 和 Western-blot 验证, 单克隆抗体能特异性识别幽门螺杆菌 FlaA, 亲和常数均达到 10^7 以上, 效价均达到 $1:1.0 \times 10^5$ 。结果表明成功制备出高亲和力、高效价、特异性好的 FlaA 单克隆抗体, 具有潜在的临床应用价值。

关键词: 幽门螺杆菌; 鞭毛蛋白 A (FlaA); 单克隆抗体

中图分类号: Q 936 **文献标志码:** A

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种螺旋菌, 在人类胃中定植, 与胃炎, 胃溃疡和十二指肠溃疡以及胃癌密切相关^[1-2]。1994 年, 国际癌症研究机构已将其列为第一类致癌因子^[3]。但是目前临床上对于幽门螺杆菌的诊断方法并不是很理想, 本研究旨在探索更好地诊断方法。

幽门螺杆菌的鞭毛伸出菌体外约 2.5 μm , 鞭毛自细胞膜长出后, 游离于细胞膜外; 伸出菌体外的鞭毛主要为鞭毛鞘包裹的鞭毛丝, 而鞭毛丝主要由 FlaA 和 FlaB 聚合形成的蛋白二聚体组成, 其中 FlaA 是主要的鞭毛蛋白^[4]; flaA 核苷酸序列高度保守, 不同幽门螺杆菌的鞭毛蛋白 A 的核苷酸序列的同源性可达到 90% 以上^[5], 且还具有良好的免疫原性和反应原性; 综合以上特点, 本研究选择幽门螺杆菌的鞭毛蛋白 A 为抗原, 通过传统的杂交瘤技术制备其单克隆抗体, 并对其特性进行鉴定, 为新的 Hp 检测技术的建立奠定实验基础。

收稿日期: 2020-07-20 **录用日期:** 2020-09-25

***通信作者:** xmuibrwtil@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料和试剂

限制性内切酶 *Sac I*、*Xho I*，T4 DNA 连接酶均购于 Takara 公司；质粒小量提取试剂盒和 PCR 产物胶回收试剂盒均购自上海生工；大肠杆菌 DH5 α 菌株，骨髓瘤细胞 SP2/0-Ag14，载体 PET-28a（本实验保存），6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(SPF 级) (厦门大学实验动物中心提供)，弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基蝶呤、PEG1500 购自 Sigma 公司，胎牛血清和小牛血清 (Hyclone 公司)，RPMI-1640，DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司，IPTG (购自 Biosharp 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 抗原的制备

1) 重组质粒的构建：根据在 NCBI 上查到的 Hp-FlaA 的基因序列，设计引物，并委托上海生工生物工程股份有限公司进行合成。按照高保真 PCR 的 50 μ L 体系，引物 10 mmol，模板 200 ng。按 94 $^{\circ}$ C 2 min, 98 $^{\circ}$ C, 10 s, 68 $^{\circ}$ C, 45 s, 72 $^{\circ}$ C, 10 min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min 的温度体系制备目的片段。通过 *Sac I* 与 *Xho I* 双位点酶切、T4 连接酶将目的片段与载体 PET-28a 重组。将连接产物转化至 Top10 感受态，挑菌落，扩大培养，用小提质粒试剂盒提取质粒。并用 *Sac I* 与 *Xho I* 限制性内切酶，37 $^{\circ}$ C，酶切 1 h，经琼脂糖凝胶电泳验证。

2) 蛋白的表达、纯化与复性：将连接产物涂卡那霉素抗性板，37 $^{\circ}$ C，培养箱过夜，挑菌落置 5 mL 卡那霉素抗性培养基中，IPTG 诱导后，离心收菌；SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色，脱色。挑阳性菌落，扩增至两瓶 800 mL 的含卡那霉素抗性的 LB 培养基中，IPTG 诱导后离心收菌，并超声破碎；取上清和少许沉淀 SDS-PAGE 电泳验证蛋白表达位置。用 2M 尿素洗涤沉淀两次，然后 8M 尿素溶解，4 $^{\circ}$ C 梯度透析复性。

1.2.2 单克隆抗体的制备

1) 小鼠的免疫：将纯化的 FlaA 融合蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化，BALB/c 小鼠四肢及背部皮下多点注射融合蛋白 50 μ g/只。2 周后进行第 2 次免疫，将纯化的 HpFlaA 融合蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂充分混合，四肢及背部皮下多点注射加强免疫，2 周后第 3 次免疫，同第 2 次。第 3 次免疫后 7~10 d 眼球取血间接 ELISA 测血清抗体效价。于融

合前 3 d 选择抗体滴度最高的 1 只小鼠脾脏加强免疫 100 μg。

2) 细胞融合：在融合之前准备饲养层细胞，取一只 13 d 左右的小鼠的胸腺和一只 8 周的小鼠的腹腔巨噬细胞作为饲养细胞。脾免 3 d 后，无菌取脾脏制成单细胞悬液与生长状态良好的 SP2/0 细胞融合，采用常规 PEG 促融合方法，融合后的细胞，接种 96 孔板，置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。

3) ELISA 和杂交瘤细胞的筛选：将 0.5 μg/mL 的抗原包被 96 孔酶标板，以融合 10 d 之后杂交瘤细胞的上清为一抗，以 SP2/0-Ag14 细胞上清为阴性对照，以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。P: 杂交瘤细胞上清的 OD_{450nm} 值；N: SP2/0-Ag14 细胞上清的 OD_{450nm} 值；P/N≥2.1 为阳性。将阳性孔中的细胞进行有限稀释克隆化，直至出现阳性单克隆，并扩大培养，及时冻存。

4) 腹水的制备和抗体的纯化：BALB/c 小鼠腹腔注射 500 μL 无菌液体石蜡，10 天后，接种杂交瘤细胞 1×10⁶~2×10⁶ 个/只，待小鼠腹部明显膨胀，抽取腹水，12000 r/min，离心 10 min，取上清。0.45 μm 滤器过滤，将过滤后腹水用 Protein G 进行纯化，纯化后经 PBS 4 °C 透析后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.2.3 单克隆抗体的特性鉴定

1) 单抗亚型的鉴定：根据单克隆抗体亚型检测试剂盒（Thermo scientific 公司）说明书，对抗体进行分型。

2) 用间接 ELISA 的方法计算亲和常数。以 0.25 μg/mL 和 0.5 μg/mL 的抗原浓度包被酶标板，将抗体倍比稀释，以抗体浓度为横坐标，OD_{450 nm} 值为纵坐标做图，曲线会出现一个平台期，表示抗原被全部结合，此时的 OD_{450nm} 为 100%，找出 50% 的 OD_{450nm}，代入公式，即可得亲和常数^[6]。

$$Ka = \frac{(n-1)}{2(n[Ab']_t - [Ab]_t)} \quad n = \frac{[Ag]_t}{[Ag']_t}$$

式中 [Ag]_t、[Ag']_t 为不同的包被原浓度(mol/L)，[Ab]_t、[Ab']_t 为对应的单抗浓度(mol/L)。

3) 单抗效价检测（ELISA）：对纯化后的抗体用间接 ELISA 方法检测效价，设置阴性对照(N)，P/N≥2.1 的抗体稀释倍数即为抗体的效价。

4) Western blot 鉴定单抗特异性：将实验室自制的 His 标签蛋白和 HpFlaA 蛋白在 95 °C 变性 5 min 后进行常规 SDS-PAGE 电泳检测。220 mA 恒流，55 min 转移到硝酸纤维素膜上，

5%的牛奶（PBST 配制）封闭 1 h；用 5%的 BSA 将单克隆抗体和 His 标签抗体稀释，室温孵育 1 h，PBST 洗 3 次，每次 7 min，HRP 标记的羊抗鼠二抗，用 PBST 1:5000 稀释，室温孵育 1 h，PBST 洗 3 次，每次 7 min，使用化学发光液显色。

5) 样本的来源和处理：临床样本为患者的粪便，由北京新兴四寰生物技术有限公司筛选提供。其中 5 份阳性样本[3 份弱阳（“+”），2 份强阳（1 份“++”，1 份“+++”）]，3 份阴性（“—”）样本。用天平称取相同量黄豆粒大小的粪便样本，用 PBS 溶解，作为抗原。

2 结果与分析

2.1 抗原的制备

2.1.1 重组质粒的构建

我们根据目的片段的基因序列设计引物，通过聚合酶链式反应将模板扩增得到 1300 bp 左右的基因片段（图 1(a)），与预期相符。将重组质粒 PET-28a-HpflaA 经 *Sac* I 和 *Xho* I 限制性内切酶双酶切后（图 1(b)），得到了 1300 bp 左右的片段，与 PCR 结果相当，为目的基因片段，且测序结果完全正确，证明重组质粒构建成功。

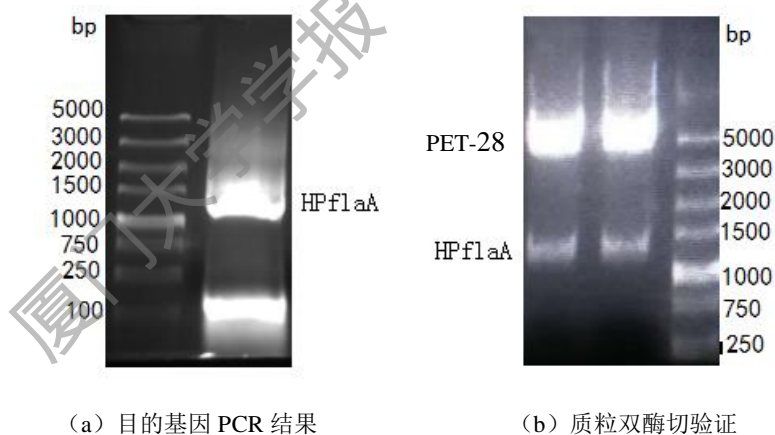


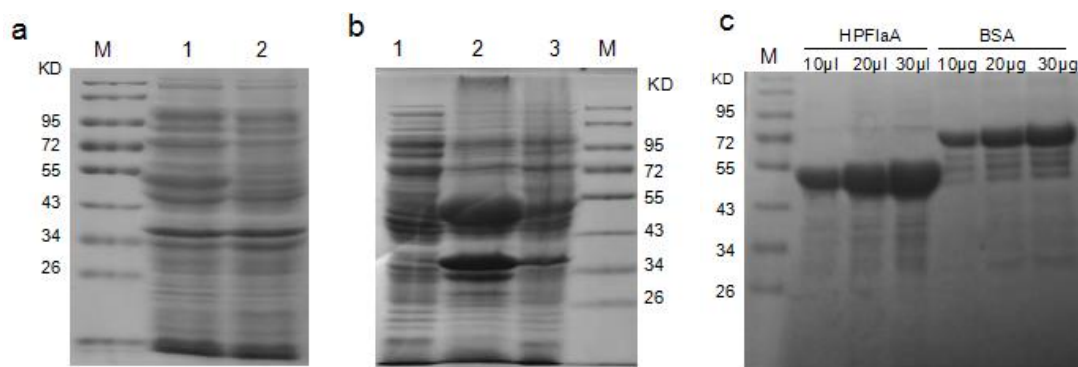
图 1 重组质粒 PET-28a-HpflaA 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid PET-28a-HPflaA

2.1.2 重组蛋白的表达纯化

将质粒转化至大肠杆菌，涂板，挑菌落进行 IPTG 小量诱导，经 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色（图 2(a)），结果显示，在 54 kD 左右有一条清晰条带，而未诱导的无此条带，说明为阳性菌落。随后将阳性菌落大量扩增，经超声破碎，离心，将大肠杆菌的裂解液，上清和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定（图 2(b)），结果显示蛋白在沉淀中大量表达。我们从包涵体中

对 FlaA 进行纯化，经 SDS-PAGE 验证，以 $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 BSA 为对照，纯化的 FlaA 抗原浓度达到 $3\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ (图 2(c))，且纯化后杂蛋白减少，纯度较高可用于免疫小鼠。



(a) 少量诱导重组蛋白的表达, 1. 诱导后, 2. 未诱导; (b) 重组蛋白可溶性鉴定, 1. 上清, 2. 沉淀, 3. 全菌体; (c) 纯化后重组蛋白的浓度鉴定。

图 2 重组蛋白的表达

Fig. 2 Expression and purification of recombinant protein

2.2 单克隆抗体的制备和鉴定

2.2.1 单克隆杂交瘤细胞株的构建与筛选

小鼠免疫 3 次后，眼球取血，以未免疫小鼠的血清为阴性对照，间接 ELISA 法测定小鼠血清效价。选用效价最高的小鼠进行脾脏加强免疫，进行细胞融合。

细胞融合后 10 d 左右，取细胞上清，通过间接 ELISA 法进行融合检测,共得到了 196 个阳性孔。由于此时所得的阳性孔中的细胞并不是有一个杂交瘤细胞增殖而来，所以为了得到单克隆细胞需要对阳性孔进行有限稀释克隆化，进行了 6 轮克隆化，共得到了 5 株能单克隆杂交瘤细胞株。取这 5 株杂交瘤细胞上清进行 ELISA 验证，以 SP2/0-Ag14 上清为阴性对照 (NC)。图 3 表明这 5 株杂交瘤细胞株 (2G2、2G10、3E2、3E4 和 4H3) 都能稳定分泌 FlaA 特异性抗体。

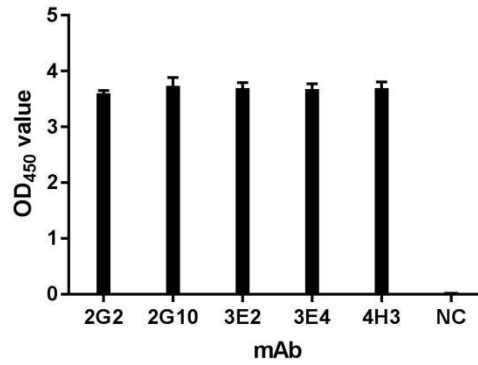


图3 间接 ELISA 筛选杂交瘤细胞株

Fig. 3 Screening of hybridoma cell lines by indirect ELISA

2.2.2 抗体的分型

抗体分型结果决定单抗后续的纯化和应用方法。收集杂交瘤细胞上清，根据单克隆抗体亚型检测试剂盒说明书，对抗体进行分型。结果如表 1 所示，显示 5 株单克隆抗体（2G2、2G10、3E2、3E4 和 4H3）均为 IgG1。

表 1 单克隆抗体亚型鉴定

Tab. 1 Subtype identification of monoclonal antibodies

抗体名称	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	GAM-HRP
2G2	3.29	0.003	0.003	0.006	0.043	3.05
2G10	2.851	0.002	0.011	0.009	0.023	4.46
3E2	2.957	0.006	0.008	0.008	0.012	3.513
3E4	2.862	0.007	0.007	0.008	0.012	2.794
4H3	2.469	0.007	0.013	0.008	0.011	2.45

2.2.3 腹水的制备与纯化

我们采用小鼠体内诱生腹水的方法大量制备抗体，并用 Protein G 层析介质进行纯化。将纯化后的抗体通过 SDS-PAGE 电泳并用考马斯亮蓝染色，脱色后，结果显示(如图 4)获得高纯度 5 株单克隆 FlaA 抗体。并测纯化后抗体的浓度，2G2 为 4.9 mg/mL，2G10 为 5.1 mg/mL，3E2 为 0.95 mg/mL，3E4 为 5.1 mg/mL，4H3 为 3.5 mg/mL。从 SDS-PAGE 电泳图中可以看出单抗的重链约为 54 kD，轻链约为 26 kD。每个抗体有两条重链两条轻链，所以单抗的分子量约为 160 kD。

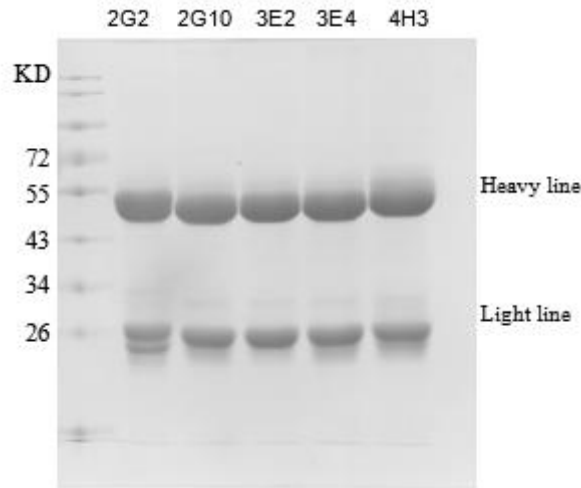


图 4 SDS-PAGE 检测单克隆抗体的纯度

Fig. 4 The purity of post-purified mAbs was identified by SDS-PAGE

2.2.4 抗体的亲和常数的测定

通过间接 ELISA 法得到单抗的亲和曲线,如图 5 所示,在曲线上找出 50% 的 OD_{450} 值,代入公式,得到 2G2、2G10、3E2、3E4 和 4H3 的亲和常数 K_a 分别为 2.7×10^7 , 1.7×10^8 , 8.0×10^7 , 1.1×10^8 , 1.1×10^8 L/mol。5 株单克隆抗体的亲和常数均大于 10^7 , 表明单克隆抗体的亲和力较高。

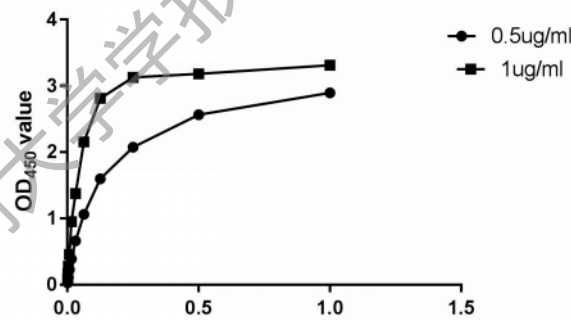


图 5 间接 ELISA 测定 2G2 单抗的亲和曲线

Fig. 5 Affinity curves of the 2G2 mAb detected by indirect ELISA

2.2.5 抗体的效价检测

对纯化后的抗体用间接 ELISA 方法检测效价,结果如图 6 所示。设置阴性对照 (NC) 5 株单克隆抗体 2G2、2G10、3E2、3E4、4H3 的效价分别为 1:128 000, 1: 2 048 000, 1: 1024 000, 1: 1024 000, 1: 2 048 000, 其中 2G10 和 4H3 效价最高。

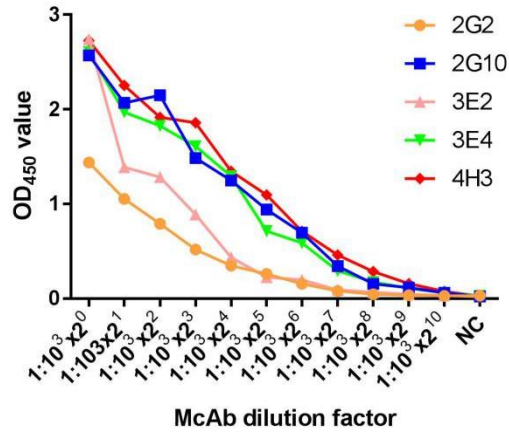
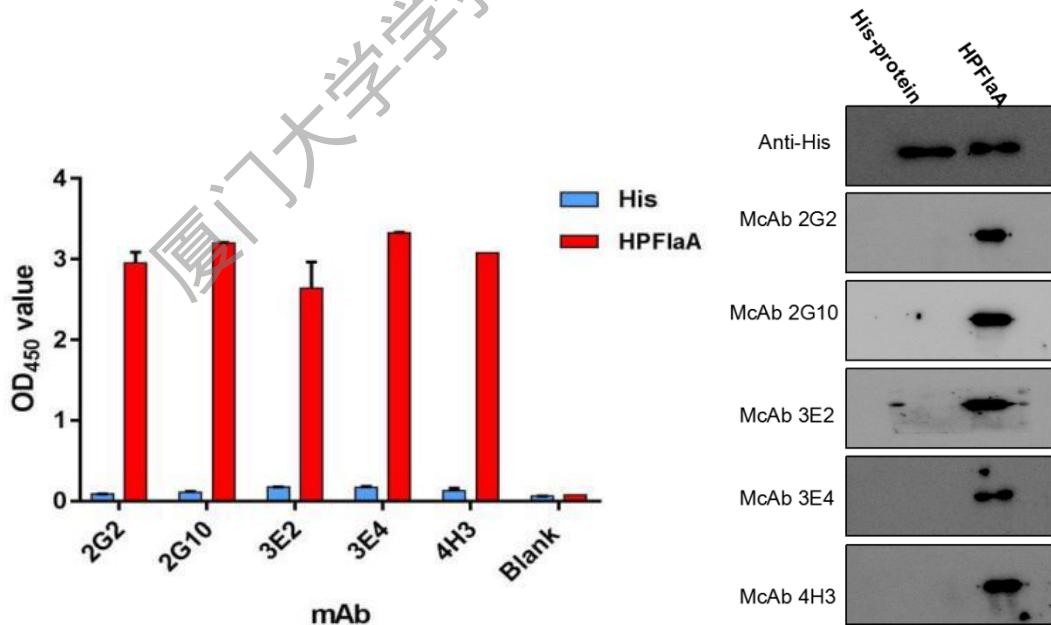


图 6 单克隆抗体效价

Fig. 6 Titrers of purified antibodies

2. 2. 6 抗体的特异性检测

采用间接 ELISA 法和 Western blot 同时验证抗体的特异性。将实验室自制的带 His 标签的蛋白和 HpFlaA 同时包被酶标板，以 5 株单克隆抗体为一抗，结果如图 7(a)所示，单克隆抗体只能和 HpFlaA 反应。同时以 His 标签抗体和五株单克隆抗体为一抗，进行 Western blot 验证。如图 7(b)所示，五株单克隆抗体均不与自制的 His 蛋白反应，只特异性识别目标蛋白，与 ELISA 结果相同。



(a) 间接 ELISA 检测单克隆抗体的特异性

(b) Western-blot 检测单克隆抗体的特异性

图 7 单抗特异性的检测

Fig. 7 Specific detection of the monoclonal antibodies

2.2.7 双抗夹心 ELISA 的初步建立

采用棋盘法将 5 株单克隆抗体分别作为包被抗体,其对应的标记生物素的抗体作为检测抗体,进行配对筛选。结果如表 2 所示,2G2-2G2-Bio, 2G2-2G10-Bio, 2G2-3E4-Bio, 2G2-4H3-Bio, 2G10-3E4-Bio, 2G10-2G10-Bio, 2G10-4H3-Bio, 3E4-3E4-Bio, 3E4-4H3-Bio 为阳性配对。其中 2G2-3E4-Bio 的反应值稍高于其他配对,但是仍然不理想,所以后续需要对此体系进行优化,以达到较好的准确度和灵敏度,并用于检测临床样本。

表 2 双抗夹心 ELISA 筛选配对抗体

Tab. 2 Double antibody sandwich ELISA for pairwise interaction analysis

包被抗体	检测抗体					
	Bio-2G2	Bio-2G10	Bio-3E2	Bio-3E4	Bio-4H3	
2G2	0.116	0.231	0.131	0.263	0.221	P
	0.009	0.009	0.036	0.024	0.029	N
2G10	0.116	0.214	0.107	0.193	0.196	P
	0.014	0.011	0.035	0.026	0.035	N
3E2	0.04	0.095	0.081	0.136	0.128	P
	0.01	0.025	0.06	0.031	0.043	N
3E4	0.125	0.172	0.119	0.231	0.223	P
	0.006	0.007	0.029	0.018	0.006	N
4H3	0.09	0.17	0.104	0.192	0.178	P
	0.01	0.01	0.029	0.014	0.014	N

注: P 表示待测孔 OD₄₅₀ 值, N 表示阴性对照 OD₄₅₀ 值.

2.2.8 双抗体夹心 ELISA 检测临床样本

采用上述双抗体夹心法中配对效果最好的一组 2G2-3E4 (以 2G2 为包被抗体,以 3E4 为检测抗体)去检测临床样本,其中 5 份阳性样本[3 份弱阳(“+”),2 份强阳(1 份“++”,1 份“+++”)],3 份阴性(“-”)样本,检测结果如表 3 所示。

表 3 双抗体夹心 ELISA 检测临床样本

Tab. 3 Detecting clinical samples by Double antibody sandwich ELISA

样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8	NC
临床检测结果	+	+	+	++	+++	-	-	-	-
ELISA 检测结果	+	±	-	++	+++	-	-	-	-

注：NC 为阴性对照。

通过结果可以发现，虽然对于 3 份弱阳性临床样本，出现了一份漏检，但是 3 份阴性样本的检测结果均正确，未出现假阳性；2 份强阳性样本的检测结果均正确。所以可以初步断定本文所建立的双抗体夹心体系可以用来检测临床样本。

3 讨论

目前，对于 Hp 感染的诊断方法依据是否依赖胃镜检查分为两类，一类是依赖于胃镜活检的侵袭性检查法，包括快速尿素酶实验，胃黏膜直接涂片染色镜检，基因检测方法等，缺点是，胃镜检查操作繁琐，对患者造成疼痛，不适合儿童，妊娠期妇女；另一类是不依赖于胃镜活检的非侵袭性检查法，包括 $^{13/14}\text{C}$ 呼气试验， ^{15}N -氮排除实验，免疫学血清抗体测定等， $^{13/14}\text{C}$ 呼气试验在临床上应用普遍，优点是准确率较高，但是价格昂贵或伴有放射性污染；免疫学血清抗体测定检测，特异性较高，但是患者并不是感染上 Hp 后体内立刻出现特异性抗体，而且在 Hp 根除后抗体仍然可以存在几个月甚至一年，还存在交叉反应性抗体^{[7][8]}。侵袭性检查法和非侵袭性检查法对于感染幽门螺杆菌的诊断都不让人十分满意，而近年来发现，检测粪抗原技术是一种价格低廉、安全、准确、患者依从性好的诊断方法^[8]。Hp 定植在人胃粘膜上皮细胞，上皮细胞脱落时会携带含 Hp 抗原的 Hp 代谢产物，死亡菌体一起通过粪便排出体外^[9]，因此，可通过检测粪 Hp 抗原推断患者是否感染 Hp。幽门螺杆菌的毒力因子主要有尿素酶、鞭毛、黏附素、热休克蛋白、细胞毒素相关蛋白 A 和空泡毒素等^{[10][11]}。因为目前已有人成功制备出 Hp 全菌体、UreB、HpaA 和空泡毒素等重要毒力因子的单克隆抗体，而本文成功制备出 FlaA 的单克隆抗体，所以可以通过将幽门螺杆菌不同毒力因子的单克隆抗体以及全菌蛋白的单克隆抗体同时去检测临床粪便样本，进而比较出检测效果最好，准确度最高，灵敏度最好的单克隆抗体，以建立更准确，迅速，灵敏的粪抗原检测方法。但是由于粪便成分比较复杂^{[12][13]}，且不同患者粪便中的 Hp 抗原成分的量也有差异，而 Hp 的不同抗原成分的单克隆抗体，在检测时可以互为补充，以最大限度的降低临床上对 Hp 患者的漏检率，大大提高诊断 Hp 感染的准确率，预防由于 Hp 感染所诱发的疾病，有较好的应

用前景。

本研究成功构建了 PET-28a-flaA 重组表达质粒,通过原核表达系统成功表达出 HpFlaA 融合蛋白。以纯化的融合蛋白为抗原免疫 BALB/C 小鼠,通过传统的杂交瘤技术成功制备出 5 株能稳定分泌抗 HpFlaA 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。对纯化后的单抗进行性质鉴定,结果表明抗体具有纯度好,亲和力高,特异性好,效价高的特点。本研究还将 5 株单克隆抗体通过棋盘法进行配对,以建立较好的双抗夹心 ELISA 检测体系,结果表明以 2G2 为包被抗体以 3E4 为检测抗体的检测体系反应值较好,并用此体系检测 8 份临床样本(其中 3 份阴性,2 份强阳性,3 份弱阳性),通过结果可以发现,3 份阴性样本的检测结果均正确,未出现假阳性;2 份强阳性样本的检测结果均正确;但是对于 3 份弱阳性临床样本,却出现了一份漏检,和一份不确定的结果,推测可能是因为本文所建立的双抗夹心检测方法的准确度较好,但是灵敏度还存在缺陷,所以在检测弱阳性样本时,由于其中所含 HpFlaA 抗原较少,未达到检测体系的检测下限,所以出现了漏检。

因此需要进一步优化 2G2-3E4 双抗夹心 ELISA 体系,以达到更好地灵敏度,降低检测下限,从而降低漏检率,再用优化后的体系检测大量的临床样本,进一步验证其准确性和灵敏度,为 HpFlaA 检测试剂盒的制备奠定实验基础。

参考文献:

- [1] KOSTRZYNSKA M, BETTS J D, AUSTIN J W, et al. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(3):937-946.
- [2] GU H Y. Role of flagella in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*[J]. Current microbiology, 2017, 74(7): 863-869.
- [3] FIREMAN Z, TROST L, KOPELMAN Y, et al. *Helicobacter pylori*: seroprevalence and colorectal cancer[J]. Isr Med Assoc J, 2000, 2(1):6-9.
- [4] 罗微,王倩,陈铁龙.幽门螺杆菌鞭毛研究概述[J].中国病原生物学杂志,2015,10(9):852-857.
- [5] JI W S, Hu J L, QIU J W, et al. Polymorphism of flagellin A gene in *Helicobacter pylori*[J]. World Journal of Gastroenterology, 2001(6):783-787.
- [6] 姚静静,胡晓飞,韩俊岭,等.黄曲霉毒素单克隆抗体的制备及基于该抗体的黄曲霉毒素免疫学检测方法的建立[J].动物营养学报,2019,31(3):1405-1414.
- [7] MICHEL M, COOPER N, JEAN C, et al. Does helicobacter pylori initiate or perpetuate immune thrombocytopenic purpura?[J]. Blood, 2004, 103(3):890-896.
- [8] 叶翠莲,姜和,蔡家利,等.幽门螺杆菌 HpaA 蛋白单克隆抗体的制备及其初步应用[J].中国生物制品学杂志,2011,24(1):83-87.
- [9] CHANG M C, WU M S, WANG H H, et al. Helicobacter pylori stool antigen (HpSA) test-a simple, accurate

- and non-invasive test for detection of *Helicobacter pylori* infection[J]. Hepato Gas Troenterology,1999,46(25):299.
- [10] Geis G, Leying H, Suerbaum S, et al. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella[J]. Journal of Clinical Microbiology,1989,27(3):436-441.
- [11] 李妍,宁云山,洪燕华,等.抗幽门螺杆菌单克隆抗体的制备与鉴定[J].南方医科大学学报,2006(4):425-427.
- [12] Vaira D, Malfertheiner P, Megraud F, et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay[J]. The Lancet,1999,354(9172):30-33.
- [13] 王佐好,谢立群,刘彩虹,等.粪便抗原检测临床诊断幽门螺杆菌感染的可靠性研究[J].胃肠病学,2015,20(2):78-80.

Generation and characterization of monoclonal antibody against *Helicobacter pylori* flagellin A

QIU Xi¹, LIU Wei², ZHUANG Ruijuan¹, CHEN Yaqiong², DENG Chenxi², WANG Tuanlao^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: Flagellin A (FlaA) serves as a diagnostic marker for *Helicobacter pylori*, but the specific antibody against FlaA is not available. In this study, we generated the expression plasmid for FlaA gene, expressed and purified the recombinant FlaA protein. This purified FlaA was used to immunize BALB/c mice to generate monoclonal antibody through hybridoma technology. Finally, we characterized the subtype of immunoglobulin, purity, titer, affinity and specificity of the antibodies by indirect ELISA experiments. In this experiment, a total of 5 hybridoma cell lines capable of stably secreting monoclonal antibodies were obtained and named as 2G2, 2G10, 3E2, 3E4 and 4H3; The subtypes of all 5 strains antibody were determined as IgG1, and the titers were up to 1: 2.0×10⁶ for all five monoclonal antibodies. The binding affinity to antigen was up to 1.0×10⁷. Indirect ELISA and Western-blot confirmed that the monoclonal antibodies can specifically recognize Hp-FlaA. The results demonstrated that we have successfully generated the monoclonal antibody specifically against Hp-FlaA with high-affinity and high-sensitivity, which has potential significance for clinical diagnosis of Hp.

Keywords: *Helicobacter pylori*; flagellin A (FlaA); monoclonal antibodies