文章编号:1000-5404(2005)13-1329-03

论著

酵母菌烯醇化酶单克隆抗体的制备及鉴定

宋秋荷,王　鲁,郝　飞,唐书谦,钟白玉,叶庆俏　(第三军医大学西南医院皮肤科,重庆 400038)

提　要: 目的　制备并鉴定抗酵母菌烯醇化酶单克隆抗体杂交瘤细胞株。**方法**　用面包酵母烯醇化酶做抗原,用细胞融合技术制备单克隆抗体,并采用 ELISA 法对单克隆抗体进行筛选和鉴定。**结果**　建立了 2 株持续分泌抗面包酵母烯醇化酶单克隆抗体的杂交瘤细胞株。其中 3G5-F3-F5 小鼠腹水单克隆抗体的最高稀释度达 1∶12 800;单克隆抗体的重链属 IgG1 亚类,轻链属 κ 型;Western Blotting 证实单抗能与面包酵母的烯醇化酶抗原(4.8×10^4)特异性地结合。**结论**　本研究建立了抗酵母菌烯醇化酶杂交瘤细胞株单克隆抗体,为快速诊断系统性念珠菌感染打下了实验基础并创造了条件。

关键词: 念珠菌;烯醇化酶;杂交瘤;单克隆抗体
中图法分类号: R345.79; R392.11; R394-33　　**文献标识码**: A

Preparation and identification of monoclonal antibody against enolase of baker's yeast

SONG Qiu-he, WANG Lu, HAO Fei, TANG Shu-qian, ZHONG Bai-yu, YE Qing-yi (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To prepare and identify monoclonal antibodies (McAbs) against enolase of baker's yeast. **Methods**　Monoclonal antibodies against enolase of baker's yeast were prepared by the lymphocyte hybridoma technique and screened by using ELISA. **Results**　Two cell lines of hybridoma constantly secreted McAbs against enolase of yeast. The titer of McAbs from mouse hydroperitonia reached to 1∶12 800. The McAbs belonged to IgG1 Kappa isotypes. Western blotting showed that the McAbs could specifically react to the antigen of enolase (48×10^3) of yeast. **Conclusion**　The McAbs established by our method could be highly specific for enolase of yeast, which provides a basic condition for development of rapid diagnosis method for systemic Candida infection.

Key words: yeast; enolase; lymphocyte hybridoma; monoclonal antibody

抗生素、免疫抑制剂及皮质类固醇在临床上得到广泛应用,器官移植、导管插管,以及放疗、化疗等治疗的开展,使得免疫抑制和免疫缺陷的患者不断增加,导致近 20 年来系统性真菌感染率的逐年上升,且病死率高[1]。国内统计系统性真菌感染率占住院患者病死率的 29%,在国外则占院内感染的 25%[2]。系统性念珠菌感染率跃居系统性真菌感染的第 1 位。由于念珠菌菌体成分抗原性较弱,且与其它病原微生物存在交叉反应,加之系统性真菌感染本身的特征,目前尚缺乏快速有效的非培养实验检测手段用于系统性念珠菌感染的诊断[3]。本研究针对酵母菌糖酵解途径中关键的胞内酶-烯醇化酶成功地制备了单克隆抗体杂交瘤细胞,并对其分泌的抗体进行了某些生物学特性的鉴定,为建立快速诊断系统性念珠菌感染打下实验室基础。

1　材料与方法

1.1　抗原的来源

面包酵母烯醇化酶购于美国 Sigma 公司进口原装。分子质量 4.8×10^4, -20 ℃冷藏。

1.2　动物免疫

参考 Marot-Leblond 等[4] 的方法。6～8 周雌性 BLAB/c 小鼠 20 只(16～18 g,购于第三军医大学实验动物中心)。将烯醇化酶与福氏不完全佐剂乳化后经 BALB/c 小鼠的双侧后足垫注射进行免疫。每只每次注射 100 μg,每周 1 次,连续 5 周(首次注射用时加入卡介苗 75 mg/kg);在细胞融合前 3 d 再行加强免疫 1 次。

1.3　BALB/c 小鼠骨髓瘤细胞(Sp2/0 细胞)的培养

Sp2/0 细胞(第三军医大学基础医学部微生物学教研室冻存株)复苏后,先后在 20% 和 10% 的完全性 1640 培养液中进行

作者简介:宋秋荷(1970-),女,山东省泰安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事医学真菌学方面的研究,现在九江学院医学部皮肤科。电话:(023)63845478
通讯作者:王　鲁,电话:(023)68752779,E-mail: wlwwh 2003@Yahoo.com.cn
收稿日期:2004-06-11;修回日期:2004-09-17

扩大培养，达对数生长期。

1.4 细胞融合、抗体筛选及克隆化培养

1.4.1 细胞融合 参考徐志凯[5]的方法，按常规取加强免疫后的 BALB/c 小鼠脾细胞与 Sp2/0 细胞，在 50% 聚乙二醇（PEG，MW4000，Sigma）作用下融合，细胞融合率为 75.17%。融合后的杂交瘤细胞在含 20% 小牛血清的氨甲喋呤、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷（HAT 液）选择性培养液培养。

1.4.2 ELISA 确定筛选 已知酵母菌烯醇化酶（20 μg/ml）为抗原包被酶标板，封闭后与杂交瘤细胞培养上清液 37 ℃孵育 1 h，洗涤后加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG（工作浓度 1∶5 000），孵育及洗涤同上，加邻-苯二胺（OPD）底物显色 20 min 后终止反应，以上每步均以 PBS + Tween20 洗涤液洗涤 3 次，每次 3 min。同时设阴性和空白对照，筛选出能分泌抗体的杂交瘤细胞。

1.4.3 克隆筛选，克隆化、亚克隆化培养 筛选出阳性单抗后进行常规的有限稀释直至克隆细胞抗体阳性率为 100%。对最后筛选出的阳性单克隆细胞进行扩大培养，同时对该株杂交瘤细胞进行反复冻存和复苏，每次复苏后其细胞培养上清液均做 ELISA，随后用制备成功的单克隆抗体杂交瘤细胞株诱生 BALB/c 小鼠腹水单抗。

1.5 抗酵母菌烯醇化酶单克隆抗体的鉴定

1.5.1 染色体的鉴定 秋水仙素处理传代培养单抗杂交瘤细胞，0.075 mol/L 氯化钾溶液低渗处理后，固定、铺片。10γ、Giemsa 染色，封片。

1.5.2 单克隆抗体亚类的鉴定 用鼠源性单克隆抗体亚型检测试剂盒（购买于 Roche 公司的 IsoStrip 试剂盒）鉴定。

1.5.3 SDS-PAGE 及 Western Blotting 检测 酵母菌烯醇化酶蛋白行 SDS-PAGE；转膜后用 BALB/c 小鼠腹水单抗做一抗，HRP 标记的羊抗鼠 IgG（工作浓度 1∶5 000）做二抗，3,3 二氮基联苯二胺盐酸盐（DAB）显色。

2 结果

2.1 细胞融合及抗体检测

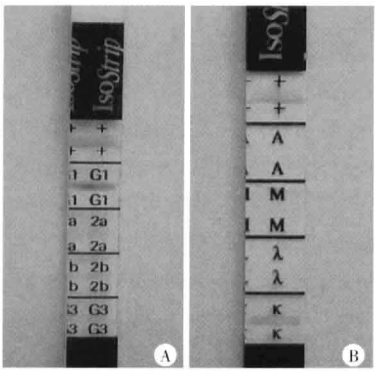
在融合试验的 576 孔中，433 个孔有杂交瘤细胞生长，杂交瘤形成率为 75.17%。经 ELISA 法筛选到 213 个阳性孔，占杂交瘤 49.19%，选取其 *D* 值最高的单个细胞克隆生长孔继续做克隆筛选，克隆化和亚克隆化培养。确定了两株细胞作适当扩大培养后，液氮保存并再进行克隆培养。

2.2 杂交瘤细胞的克隆培养及腹水抗体诱生

两株杂交瘤细胞，在克隆化及扩大培养过程中经过 3 次克隆化、亚克隆后阳性克隆率为 100%。这两株杂交瘤细胞株定名为 3G5-F3-F5、4G6-F3-C7，该 2 株细胞在扩大培养及反复冻存复苏后，其分泌特异性抗体的能力能持续保持。取 3G-5F-3F5 细胞株以 5×10^6/ml 细胞悬液，对经液体石蜡预处理过的 BALB/c 小鼠作腹腔注射以诱生腹水。用 ELISA 检测到腹水抗体的最高稀释滴度为 1∶12 800。2 株杂交瘤细胞增殖旺盛，经反复冻存、复苏后细胞生长良好，分泌抗体性能稳定。

2.3 单克隆抗体亚类的鉴定

经浓缩后的细胞培养上清，用 Roche 公司鼠源性单克隆抗体亚型检测试剂盒——IsoStrip 试剂盒检测后确定出建立的抗酵母菌烯醇化酶单克隆抗体 3G5-F3-F5 的重链为 IgG1 型、轻链为 κ 链（图 1）。



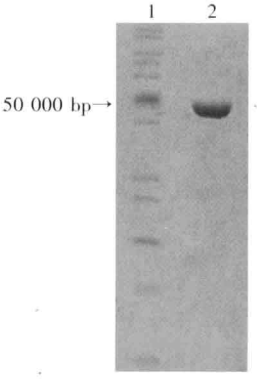
A：Heavy chain belonged to IgG1；B：Light chain belonged to Kappa

图 1 抗烯醇酶单抗亚类的鉴定

Fig 1 Identification of monoclonal antibody against enolase

2.4 单克隆抗体的特异性检测

用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 证实单克隆抗体能与面包酵母菌烯醇化酶发生特异性结合（图 2）。



1：Protein marker；2：Protein of enolase

图 2 12%SDS-PAGE

Fig 2 12% SDS-PAGE

2.5 染色体的鉴定及检测

正常 BALB/c 小鼠脾细胞染色体的数目恒定为 40 对，且均为端着丝点；而同品系的 Sp2/0 细胞的染色体在 62 ~ 68 对不等，部分染色体的着丝点为中间着丝点和亚中间着丝点。杂交瘤细胞的染色体数目的变化在于其数量上等于两种亲本染色体数目的总合，结果大多数为端着丝点染色体，但存在有一定数量的标志性的中间着丝点和亚中间着丝点染色体（图 3）。

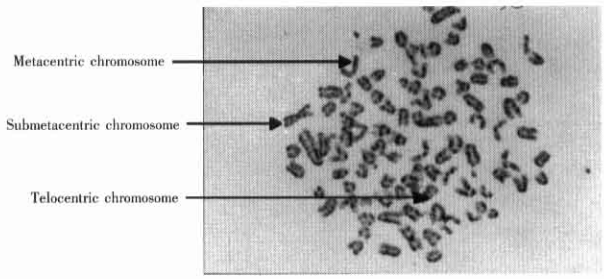


图 3　杂交瘤细胞的染色体　(Giemsa × 1 000)

Fig 3　Chromatosome of hybridoma　(Giemsa × 1 000)

3　讨论

烯醇化酶属胞浆内酶类，又称 2-磷酸-D 甘油盐水解酶，是生物体内糖酵解途径中关键的胞内酶，催化磷酸甘油盐转化为磷酸烯醇式丙酮盐，同时也在糖异生过程中催化逆向反应，由 440 个氨基酸组成，分子质量在 $(4.5 \sim 4.8) \times 10^4$，是白念珠菌胞内含量最为丰富的蛋白质之一，且具有高度的保守性。现大多数学者公认念珠菌烯醇化酶(enolase) 的分子质量为 4.8×10^4[6]。

到目前，已经有大量的实验证实了该酶蛋白的 α 螺旋、β 片层及 β 转角区域的结构有很强的保守性，且编码酵母菌属烯醇化酶的基因之间有高度的同源性。如啤酒酵母的烯醇化酶与深红酵母的同源性为 76.5%[7]，同白念珠菌烯醇化酶的同源性高达 87%[8]。烯醇化酶只有在系统性念珠菌感染时才会大量地释放至宿主体内，而寄生于浅表部位的念珠菌一般不会释放该酶到宿主的体内[9]。多数播散性念珠菌病患者如系统性白念珠菌患者的血清抗体可以识别该酶，是由于基因同源性导致有相同的抗原决定族的表达或抗原决定族的拟生物的表达[3]，由此说明该蛋白酶有较高的属的同源性。所以本研究在制备抗念珠菌烯醇化酶单克隆抗体的时候选择了美国 Sigma 公司出售的面包酵母烯醇化酶(纯度达 99.9%)做为免疫性抗原。

烯醇化酶是可刺激机体产生明显的细胞免疫和体液免疫反应的免疫原，在系统性念珠菌感染患者血清中的含量明显增高，其含量变化可以监控病情[10]。最近研究表明：念珠菌烯醇化酶在感染的机体中与纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白溶酶相连，二者相互作用对真菌侵袭组织屏障有重要的意义[11]。由此也可知烯醇化酶在念珠菌系统性感染时是一个敏感性的检测指标[12]。Mitsutake 等[3]对临床中已经确诊的 39 例系统性念珠菌病患者分别用 Cand-Tec assay、Pastorex candida assay、鲎试验和斑点免疫法对应性地检测血清中的热不稳定性蛋白、甘露聚糖、β-葡聚糖和烯醇化酶，对比检测结果，发现 4 种检测方法的阳性率分别为 76.9%、25.6%、84.4% 和 71.8%，特异性分别是 76.9%、25.6%、84.4%，它们的敏感性分别是 87.5%，100%，87.5%，而烯醇化酶的特异性是 100%，敏感性是 71.8%，因此烯醇化酶抗原可以作为系统性念珠菌感染时的一个重要的血清学检测指标。

本研究用纯酵母菌烯醇化酶免疫 BALB/c 小鼠，经细胞融合、克隆培养，获得抗酵母菌烯醇化酶单克隆抗体的杂交瘤细胞 2 株。在抗体的制备过程中，我们采用 ELISA 法对杂交瘤细胞进行筛选。单抗的重链和轻链的确定为今后开展更为深入的应用性研究提供依据。抗酵母菌烯醇化酶单克隆抗体的制备，为建立快速诊断系统性念珠菌感染实验室诊断方法奠定了较好的基础，尤其是系统性白念珠菌感染。我们将进一步研究抗酵母菌烯醇化酶单克隆抗体和快速诊断系统性念珠菌感染的检测。

参考文献：

[1] Niewerth M, Korting H C. Phospholipases of Candida albicans[J]. Mycoses, 2001, 44(9-10): 361 - 367.

[2] Nitz M, Ling C C, Otter A, *et al*. The unique solution structure and immunochemistry of the Candida albicans beta-1, 2-mannopyranan cell wall antigens[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3440 - 3446.

[3] Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, *et al*. Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(8): 1918 - 1921.

[4] Marot Leblond A, Grimaud L, Nail S, *et al*. New monoclonal antibody specific for Candida albicans germ tube[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(1): 61 - 67.

[5] 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. 1 - 142.

[6] Han Y, Morrison R D, Cutler J E. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to Candida albicans vaginal infection[J]. Infect Immun, 1998, 66(12): 5777 - 5776.

[7] Sundstrom P, Jensen J, Balish E. Humoral and cellular immune responses to enolase after alimentary tract colonization or intravenous immunization with Candida albicans[J]. J Infect Dis, 1994, 170 (2): 390 - 395.

[8] Chang C Y, Chou H, Tam M F, *et al*. Characterization of enolase allergen from Rhodotorula mucilaginosa [J]. J Biomed Sci, 2002, 9(6 Pt 2): 645 - 655.

[9] Franklyn K M, Warmington J R. Cloning and nucleotide sequence analysis of the Candida albicans enolase gene[J]. FEMS Microbiol Lett, 1993, 111(1): 101 - 107.

[10] Gitlits V M, Toh B H, Sentry J W. Disease association, origin, and clinical relevance of autoantibodies to the glycolytic enzyme enolase [J]. J Investig Med, 2001, 49(2): 138 - 145.

[11] Pitarch A, Diez Orejas R, Molero G, *et al*. Analysis of the serologic response to systemic Candida albicans infection in a murine model [J]. Proteomics, 2001, 1(4): 550 - 559.

[12] Jong A Y, Chen S H, Stins M J, *et al*. Binding of Candida albicans enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells [J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 8): 615 - 622.

(编辑　陈聪连)