论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0976-03

单克隆抗体 Mab03.2C1-C2 靶抗原性质的初步研究

孙仁美[1],王 鲁[2],宋秋荷[3],唐书谦[1],郝 飞[1],叶庆佾[1] ([1]第三军医大学西南医院皮肤科,重庆市皮肤性病研究所,重庆 400038;[2]重庆市第一人民医院皮肤科,重庆 400011;[3]江西九江医学院皮肤科,九江 332000)

提 要:目的 分析抗白念珠菌芽管胞壁外膜抗原单抗 Mab03.2C1-C2 靶抗原的性质,探讨该抗原用于实验室检测的可行性。**方法** 制备单克隆抗体,通过 SDS-PAGE 及 Western Blotting 法分析该单抗所识别的抗原的分子量。体外诱导形成不同长度的芽管,分析其表面靶抗原的形成情况。不同的生化方法处理芽管,采用间接免疫荧光方法,对单抗靶抗原表位性质进行分析。取口腔念珠菌病患者的真菌涂片标本,用 IIF 方法观察体外诱导培养之芽管与体内白念芽管表面抗原分布异同。**结果** 体外诱导 30 min 后白念珠菌芽管表面方可检测到靶抗原。体内白念菌丝与体外诱导菌丝表面靶抗原分布不同。靶抗原表位可能位于 N-糖链上。**结论** Mab03.2C1-C2 靶抗原为白念菌丝形成过程中生成的新成分,可能参与白念致病过程。靶抗原为糖蛋白,抗原性显著,对临床应用于系统性白念珠菌感染的检测有意义。

关键词: 白念珠菌;芽管;靶抗原;单克隆抗体

中图法分类号: R379.4; R392.11; R446.62 **文献标识码:** A

Characterization of target antigen of new monoclonal antibody 03.2C1-C2 specific for *Candida albicans* germ tube

SUN Ren-mei[1], WANG Lu[2], SONG Qiu-he[3], TANG Shu-qian[1], HAO Fei[1], YE Qing-yi[1] ([1]Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Dermatology, The First People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400011, [3]Department of Dermatology, Jiangxi Jiujiang Medical College, Jiujiang 332000, China)

Abstract: Objective To analyze the characterization of the target antigen of the monoclonal antibody (Mab) 03.2C1-C2 against germ tube of *Candida albicans*, and explore the possibility of Mab03.2C1-C2 application in the laboratory examination. **Methods** SDS-PAGE and Western blotting were used to analyse the molecular weight of antigens recognized by Mab03.2C1-C2. The distribution of the target antigens on the surface of the germ tube induced *in vitro* were analyzed. The epitope of the target antigen were analysed *via* indirect immunofluorescence (IIF). **Results** The target antigen recognized by Mab03.2C1-C2 could be detected 30 min after the germ tube formation. The distribution of the target antigens were different between the germ tube formated *in vitro* and *in vivo*. The epitope might locate in the N-carbohydrate chain. **Conclusion** New protein-glycoprotein that is the target antigen of Mab03.2C1-C2 was produced during the formation of the *C. albicans* germ tube. Strong antigenicity of glycoprotein is of certain value on quick diagnosis of Systemic *C. albicans*.

Key words: *C. albicans*; germ tube; target antigen; monoclonal antibody

白念珠菌(*Candida albicans*)是念珠菌感染中居于首位的病原菌。系统性念珠菌病缺乏特异的临床症状和体征,血培养阳性率低。临床研究常需采用血清学方法早期快速、准确的协助诊断系统性白念珠菌感染。因血清抗体的检测有一定的局限性[1],现研究多集中于检测患者血液中的念珠菌抗原成分及代谢物。本实验通过对抗白念珠菌芽管胞壁外膜抗原单抗之靶抗原的性质研究,以探讨其应用于实验室检测的价值。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和实验动物

白念珠菌标准株 ATCC-90028 购于第三军医大学军事预防医学院。都柏林念珠菌 CCCCMIDC8a 及类星形念珠菌 CCCCMIDC7 购于南京皮肤性病研究所。我实验室经生物梅里埃 ATB FUNGUS Ⅱ鉴定板条鉴定的临床分离菌株:白念珠菌 120 株,热带念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、高里念珠菌、副克柔

作者简介:孙仁美(1980-),女,山东省烟台市人,硕士研究生,主要从事医学真菌学方面的研究。电话:(023)68754491,E-mail:sunrenmei@163.com

通讯作者:王 鲁,E-mail:wlwwh2003@Yahoo.com.cn

收稿日期:2006-02-05;修回日期:2006-04-20

念珠菌、葡萄牙念珠菌、近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌各 1 株。实验动物为 6～8 周雌性 BALB/c 小鼠，购于第三军医大学实验动物中心。

1.2　静止相 ATCC-90028 带芽管孢子的诱导

静止相 ATCC-90028 孢子制备参考王鲁[2]方法。将静止相 ATCC-90028 孢子转种于不完全 1640 液、L-DMEM、H-DMEM、完全 1640 液（10%，20%，50% 血清）、血清共 7 种培养基于 37 ℃，60 r/min 振荡 3 h；3 000 r/min 离心 15 min，得带芽管白念珠菌孢子。4℃保存备用。

1.3　临床分离白念珠菌芽管诱导

白念珠菌转种到沙堡氏固体培养基 24 h 后，孢子转种于 1640 液中，37 ℃、120 r/min 振荡 3 h；3 000 r/min 离心 15 min，得带芽管白念珠菌孢子。4 ℃保存备用。

1.4　单克隆抗体的制备

将获得的单克隆抗体细胞株[3]，采用 BALB/c 小鼠体内诱导-腹水法制备腹水单抗，用间接免疫荧光法（IIF）测定抗体效价。

1.5　靶抗原分子量测定

抗原提取物经 SDS-PAGE 及 Western blot 分析分子量[3]。

1.6　单抗靶抗原性质分析

1.6.1　不同诱导时间后形成白念珠菌　芽管表面靶抗原分布分别收集诱导 10～120 min 的 ATCC-90028 带芽管孢子。

1.6.2　白念珠菌菌丝表面靶抗原分布　用 1640 培养基中，37 ℃、120 r/min 振荡 12 h 后收集 ATCC-90028 及临床分离白念珠菌菌丝。选取临床口腔念珠菌病患者口腔真菌涂片，镜检菌丝阳性者标本风干，4 ℃保存备用。

1.6.3　抗原耐热性　将 ATCC-90028 带芽管孢子 PBS 悬液置 100 ℃煮沸不同时间，进行抗原包被。

1.6.4　靶抗原表位类型鉴定　1% 过碘酸室温避光 1 h；0.25% 胰酶 37 ℃ 1 h；甲醇、氯仿、冰醋酸（1∶1∶1）去糖脂混合液室温 30 min；0.1 mol/L 氢氧化钠 37 ℃ 5 h；0.01 mol/L 的硼氢化钠和 0.5 mmol/L 的氢氧化钠的 PBS 液室温 30 min。上述试剂处理 ATCC-90028 带芽管孢子后，做抗原包被。

1.7　靶抗原种特异性分析

用 1640 液、L-DMEM、H-DMEM 血清于 37 ℃、26 ℃诱导念珠菌菌丝形成。念珠菌的孢子、菌丝做抗原包被，用 IIF 法检测抗原的种特异性。

1.8　间接免疫荧光

1.8.1　抗原包被　用 ATCC-90028 带芽管孢子及孢子做抗原包被载玻片，分别做阳性及阴性对照；将过碘酸、胰酶等处理过做抗原包被载玻片。

1.8.2　IIF 法　腹水单抗为Ⅰ抗（1∶100 稀释），FITC 标记的羊抗鼠 IgG（工作浓度 1∶50）为Ⅱ抗，行常规 IIF。

2　结果

2.1　ATCC-90028 芽管及临床分离白念珠菌芽管诱导结果

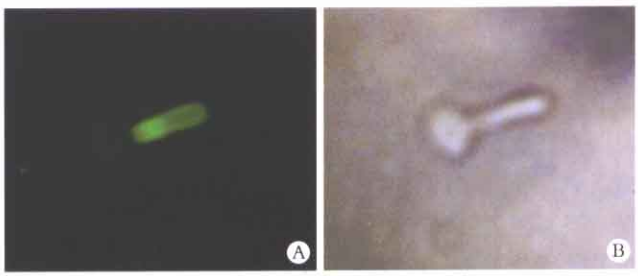
静止相 ATCC-90028 带芽管孢子的 1640 液芽管诱导率 > 95%。L-DMEM、H-DMEM、完全 1640 液（10%，20%，50% 血清）、血清均可诱导 ATCC-90028 芽管形成。临床分离株白念珠菌不完全 1640 液芽管诱导率 >65%。

2.2　腹水单抗的效价

IIF 检测腹水抗体滴度可达 1∶25 600。

2.3　单抗靶抗原性质

不同培养液诱导 3 h 后所形成的白念珠菌芽管表面荧光均为阳性。不完全 1640 液诱导 30 min 后才可发现白念珠菌芽管表面荧光阳性，且荧光不均一，初始形成的芽管顶端及末端荧光均为阴性或弱阳性，已形成的芽管表面荧光亦不均一（图 1）。



A：荧光显微镜；B：光镜

图 1　白念芽管诱导 40 min（间接免疫荧光法 ×1 000）

21 例临床口腔念珠菌感染患者假膜涂片，经实验室最终鉴定为白念珠菌。1640 液诱导 ATCC-90028 12 h 后菌丝表面荧光不均一，多数芽颈处有荧光阴性或减弱现象。临床口腔白念珠菌病假膜涂片中，白念珠菌菌丝表面荧光较均一。100 ℃煮沸 5 min 后，IIF 结果显示 ATCC-90028 芽管表面荧光阴性。说明靶抗原变性后与单抗不结合。

2.4　抗原表位性质

过碘酸处理后 ATCC-90028 及临床分离白念珠菌芽管 IIF 阴性；胰酶及去糖脂混合液处理后两组芽管 IIF 阳性；延长胰酶处理时间，芽管表面荧光有所减弱，结果说明靶抗原为糖蛋白。氢氧化钠处理后芽管 IIF 阴性说明表位可能位于 N-糖链上。

2.5　靶抗原种特异性

单抗可与 120 株临床分离白念珠菌的芽管特异结合，与孢子不结合。除光滑念珠菌外其他 9 株念珠菌均诱导出菌丝。单抗不与都柏林念珠菌、类星形念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、高里念珠菌、副克柔念珠菌、葡萄牙念珠菌、近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌孢子及菌丝特异结合，说明该靶抗原种特异性好。

3　讨论

白念珠菌为双相性真菌，在一定条件下由孢子形态转化为菌丝形态而致病力增强。黎斌等[4]通过白念珠菌两相间胞壁提取物电泳结果比较，认为白念珠菌由孢子相向菌丝相转变时，在胞壁上有新的蛋白质合成和原有的蛋白含量增加。Okamoto 等[5]发现，致

病性白念珠菌生成的芽管含有特异性抗原成分，此抗原能增强菌体黏附上皮细胞及内皮细胞的能力，并能阻止中性粒细胞对菌体的吞噬杀伤作用。而且形成芽管的白念珠菌能穿透上皮细胞膜，从而使其可在宿主细胞中寄生。因此白念芽管或菌丝相特异性抗原的检测对系统性白念珠菌病有较大的价值[4]。国内已有研究用免疫酶斑点法检测白念芽管特异性抗原来诊断系统性白念珠菌病，并认为该方法敏感性高，特异性强[6]。本实验研究之芽管单抗的靶抗原，通过 IIF 实验显示，白念孢子表面不存在相同的抗原成分。且不同的芽管形成条件下，芽管表面均有该靶抗原形成，即外界生长环境不影响该抗原在白念芽管表面的形成。对该抗原用于血清学检测有一定的研究意义。

实验显示，1640 液诱导 30 min 后才可检测到芽管表面有靶抗原形成，且分布不均一，初始形成的芽管顶端及末端荧光为阴性或弱阳性。芽管诱导 30 min 时光镜下可见白念珠菌孢子已出芽，而 IIF 未检测出新出芽表面有靶抗原存在。该结果对白念珠菌芽管致病机制方面有一定的参考性。诱导培养的假菌丝表面靶抗原不均一分布，以芽颈处靶抗原少或无。临床标本涂片光镜下可见白念菌丝常无芽颈，即为真菌丝。IIF 显示白念真菌丝表面荧光较均一。该结果提示体外诱导培养对白念菌丝的形成有一定的影响，其具体机制尚需进一步分子生物学方面研究验证。

Mab03.2C1-C2 对应的靶抗原为糖蛋白，为了鉴定靶抗原的决定簇是在糖链部分还是多肽部分，用过碘酸、蛋白酶处理抗原，观察其与单抗结合的情况。过碘酸可使糖链的相邻羟基氧化、开环，破坏了糖链原有的结构，用蛋白酶消化抗原后，其糖肽仍保留与单抗结合的能力。弱碱使表位 O-糖链破坏，而弱碱处理后的芽管仍可与单抗相结合，说明靶抗原表位可能位于 N-糖链上。

本实验我们同时采用 IIF 与间接 ELISA 两种方法对芽管抗原进行表位性质分析。ELISA 方法敏感，影响因素较多，实验费时。研究表明间接 ELISA 最终结果与 IIF 法一致，因此在靶抗原种特异性分析中我们只采取了 IIF 法。

Mab03.2C1-C2 为国内首例特异性针对白念珠菌芽管壁外膜的单克隆抗体，识别抗原的分子量为 156、48、22、12 $\times 10^3$[3]。到目前为止，国外有 1 例即法国学者 Agnes 等[7]于 2000 年制备抗白念芽管胞壁外膜单克隆抗体杂交瘤细胞株 10B1-F10，识别的是分子质量从 25 ~ 166 $\times 10^3$ 之间的一组抗原分子。在靶抗原种特异性实验中，我们发现 10 种常见非白念的念珠菌孢子或菌丝表面不存在可与单抗相结合的抗原成分。类星形念珠菌表面无可与单抗相结合的抗原成分，说明 Mab03.2C1-C2 特异性优于 Mab10B1-F10。在单抗特异性研究中，我们发现与白念珠菌生物形态学相近的都柏林念珠菌的孢子及芽管或菌丝[8]不能与该单抗发生特异结合，充分说明该靶抗原种特异性良好。

初步实验研究表明[9]，Mab03.2C1-C2 在体外能抑制白念珠菌芽管形成，减少白念珠菌对上皮细胞及内皮细胞的黏附，从而推测该单抗能降低白念珠菌的侵袭力，具有一定抗白念珠菌毒力的作用。与 Okamoto 等[5]研究结果一致，该靶抗原在白念菌丝相致病过程中有一定作用。Mab03.2C1-C2 结合抗原后抑制芽管形成提，提示该抗原在调控芽管形成过程中可能发挥其他作用，可为今后白念菌丝相致病机制提供进一步研究价值。

本实验通过对 Mab03.2C1-C2 靶抗原性质的分析，为该抗原用于血清学检测及分子生物学方面研究菌相转换调控机制的深入研究打下基础。

参考文献：

[1] 牟兆钦. 念珠菌感染的血清学和生化诊断研究进展[J]. 中华医院感染学杂志，1996，6(2)：124－126.

[2] 王 鲁，叶庆佾，唐书谦. 白念珠菌芽管特异性抗原的研究[J]. 中华皮肤科杂志，1994，27(3)：136－138.

[3] 宋秋荷，王 鲁，李忠元，等. 抗白念珠菌芽管单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及其对血清芽管诱导率的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志，2005，19(11)：650－653.

[4] 黎 斌，王 鲁，蒋 戈，等. 白念珠菌孢子相、菌丝相胞壁提取物 SDS-PAGE 分析[J]. 中华皮肤科杂志，2003，36(11)：656－657.

[5] OKAMOTO K，ASHIMOTO A，TANAKA Y，*et al*. Germ tube formation and proteinase activity of Candida albicans in relation to virulence for mice[J]. Kansenshogaku Zasshi，1993，67(5)：466－472.

[6] 谢卫红，叶庆佾，廖兴元. 免疫酶斑点法(IEDA)检测白色念珠菌芽管特异性抗原的临床研究[J]. 第三军医大学学报，1999，21(11)：846－848.

[7] 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.

[8] MAROT LEBLOND A，GRIMAUD L，DAVID S，*et al*. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for identification of Candida albicans and Candida dubliniensis[J]. J Clin Microbiol，2004，42(11)：4956－4960.

[9] 唐 玮，王 鲁，唐书谦，等. 单抗 Mab03.2C1C2 影响白念珠菌芽管形成及粘附作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(9)：901－903.

（编辑 陈聪连）