DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.01.040
第22卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 1
2000年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2000

文章编号:1000-5404(2000)01-0097-02

技术方法

三株抗白念珠菌单克隆抗体的制备与鉴定

Preparation and identification of three strains of monoclonal antibody (McAb) against candida albicans

王 鲁[1],张 雪[2],刁庆春[1],刘荣卿[1],钟白玉[1], (第三军医大学附属西南医院:[1]皮肤科;[2]检验科;重庆 400038)

提 要 目的:为进一步研究白念珠菌保护性抗体以及系统性念珠菌病早期诊断奠定基础。方法:运用细胞融合、间接ELISA、IIF、SDS-PAGE及免疫印迹等技术,制备并鉴定抗白色念珠菌单克隆抗体。结果:建立了3株分泌抗白念珠菌胞壁单克隆抗体杂交瘤细胞株1B5、3E8、4C7,亚类分析显示1B5为IgM,3E8和4C7为IgG_1,3株单抗皆能使白念珠菌孢子和芽管染上荧光,1B5单抗能识别白念珠菌胞壁外膜上分子量约为32×10^3u抗原成分。结论:制备成功3株抗白念珠菌胞壁外膜成分单克隆抗体,其中1B5单抗是抗白念珠菌胞壁外膜上分子量约为32×10^3u抗原成分的单克隆抗体。

近年来,白念珠菌已从一种少见的致病菌转变为医源感染中最常见的病原菌之一[1,2]。由该菌所致的系统性感染,死亡率高达38%~59%[3],原因之一为对该病的诊断困难,二为治疗困难。在系统性念珠菌病患者中,血培养阳性率低;检测白念珠菌抗体或代谢产物,虽然敏感性好,但特异性差,且不能达到早期诊断的目的;寻求一种抗白念珠菌特异抗体以检测相应抗原,也许是系统性念珠菌病早期诊断的方向。近来许多研究结果提示了体液免疫在抗系统性念珠菌病中起着重要的作用,为抗白念珠菌保护性抗体免疫及其抗体参与系统性白念珠菌感染治疗的研究提供一定理论依据[4]。本研究运用杂交瘤技术,制备出抗白念珠菌胞壁外膜成分单克隆抗体,为进一步抗白念珠菌保护性抗体的筛选、鉴定、保护机制的探讨以及系统性念珠菌病早期诊断研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

为我科真菌保存菌珠——白念珠菌19(白19)。重新培养、鉴定[5]。

1.2 静止相白念珠菌孢子及菌丝相(带芽管的孢子)培养[6]

1.3 单克隆抗体的制备[7]

1.3.1 动物免疫 参见Sundstrom方法[8]。免疫动物选用6~8周龄BALB/C小鼠,免疫方案包括5次腹腔内菌液注射,每周1次,每次菌量为活的静止相白19孢子2×10^5,融合前3 d腹腔内加强免疫1次。

1.3.2 细胞融合、克隆筛选、克隆化培养[7]

1.3.3 抗体检测方法 采用间接ELISA法。

1.3.3.1 步骤 一定浓度活的静止相白19孢子悬液加入酶联板中(0.1 ml/孔),37℃干燥;甲醇固定10 min。以下按常规ELISA法操作步骤进行。阳性对照为免疫小鼠血清,阴性对照为1640培养液。

1.3.3.2 方阵滴定 略。

1.3.4 单克隆抗体的生产及效价测定[7]

1.4 单抗的鉴定

1.4.1 单抗亚类的鉴定

1.4.2 核型的分析

1.4.3 间接免疫荧光染色 静止相白19孢子和带芽管的孢子分别做抗原,已制备的抗白19孢子胞壁外膜单克隆抗体做为Ⅰ抗,Ⅱ抗为羊抗鼠荧光抗体。按常规间接免疫荧光染色步骤进行荧光染色。

1.4.4 白念珠菌胞壁外膜成分DTT提取物的制备[6]

1.4.5 SDS-PAGE[9] 对白19孢子胞壁外膜成分DTT提取物进行垂直板SDS-PAGE。浓缩胶为5%,分离胶为10%。停止电泳后取出凝胶进行银染或电转移。

1.4.6 免疫印迹[9] 按前述方法对白19孢子胞壁外膜成分DTT提取物进行垂直板SDS-PAGE。再通过转移电泳,将凝胶上的蛋白成分转移至NC膜上;PBS漂洗,封闭液中37℃封闭2 h。以1B5腹水单抗为Ⅰ抗(1B5腹水单抗用抗体稀释液稀释成1∶1 000),羊抗鼠酶标抗体做为Ⅱ抗(酶标抗体用抗体稀释液稀释成1∶1 000)。在底物溶液中显色10~20 min。

2 结果

2.1 抗白念珠菌胞壁外膜抗原单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立

2次成功融合,8块板获483个克隆生长孔。经间接ELISA检测出阳性反应孔3个。连续克隆化培养3次,3株杂交瘤细胞仍持续分泌抗体。培养中细胞生长良好,并可诱生富含单克隆抗体的腹水。经反复冻存复苏后,仍保持分泌抗体的能力。我们将这3株杂交瘤细胞分别命名为1B5、3E8、4C7。

作者简介:王 鲁(1963.12),男,山东省莱阳市人,博士,主治医师,主要从事医学真菌方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754114-73080

收稿日期:1999-06-22;修回日期:1999-12-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 单克隆抗体的效价测定

用间按 ELISA 法测抗体效价。已知抗原仍用活的静止相白$_{19}$孢子悬液。杂交瘤腹水抗体稀释度从 1∶100～1∶25 600。1B5 效价为 1∶3 200,3E8 效价为 1∶6 400,4C7 效价为 1∶800。若将包被的已知抗原改用白$_{19}$DTT 胞壁提取物后,3 株杂交瘤腹水单抗的效价均超过 1∶25 600。

2.3 单抗的鉴定

①核型分析:杂交瘤细胞株 1B5 的染色体数目为 96 条,3E8 为 83 条,4C7 为 91 条。②单抗亚类:琼脂扩散试验结果显示:1B5 单抗为 IgM、3E8 和 4C7 单抗为 IgG$_1$。③间接免疫荧光染色:3 株杂交瘤细胞的腹水单抗 1B5、3E8 和 4C7 皆能使白念珠菌孢子和芽管表面产生很强的荧光。④SDS-PAGE 和免疫印迹结果显示,静止相白$_{19}$孢子胞壁 DTT 提取物中的在分子量大约为 32×10^3u 处可见一酶染色阳性带,这表明 1B5 单抗能识别静止相白$_{19}$孢子胞壁外膜上分子量大约为 32×10^3u 的抗原成分,并与之发生反应。

3 讨论

3.1 免疫原的选择

在白念珠菌致病性研究中,该菌对宿主组织的粘附,被认为是致病的起始环节[4]。这种粘附的发生,是白念珠菌胞壁外层特殊成分与其"靶子"表面的特殊结构相互作用的结果。白念珠菌胞壁通常分为 3 层[10],由甘露聚糖和蛋白质组成胞壁外层,其功能主要是介导粘附和提供表面抗原。本法直接用活的白念珠菌孢子作为免疫原,以制备抗白念珠菌胞壁外层(外膜)成分的单克隆抗体。

3.2 ELISA 检测系统

本法采用间接 ELISA 法检测系统,检测、筛选阳性单抗克隆孔,遇到以下困难:①用以检测单抗的已知抗原为活的白念珠菌孢子,按常规方法将其包被于酶联板后易被洗脱,影响检测系统的敏感性;②不知该检测系统的最适检测单抗用已知抗原浓度和最适检测用阳性抗体的工作效价;③该检测系统的检测可靠性如何。按我们改进的抗原免 就基本上解决了酶联孔中已包被白念珠菌易被洗脱的问题。再者,我们对本研究采用的间接 ELISA 法检测系统,先进行方阵滴定,求得该检测系统的最适检测用已知抗原浓度(白$_{19}$孢子悬液浓度为 1×10^7/ml)和最适检测用阳性抗体工作效价(1∶800);同时在实验中,检测板中各孔的 OD 值随抗体、抗原稀释度的增高而呈阶梯形降低,无"花板"出现,因此,我们能确定该检测系统检测效果好,可信度高。

3.3 抗白念珠菌胞壁外膜成分单克隆抗体的制备、鉴定

我们用活的白念珠菌孢子作为抗原,建立了 3 株分泌抗白念珠菌胞壁外膜成分的单克隆抗体杂交瘤细胞株——4C7、3E8、1B5。用孢子作已知抗原,间接 ELISA 法测定腹水单抗的效价,1B5 为 1∶3 200,3E8 为 1∶6 400,4C7 为 1∶800。单抗亚类分析显示 1B5 为 IgM、3E8 和 4C7 为 IgG$_1$。白念珠菌胞壁抗原成分复杂,其中单用二巯基苏糖醇(DTT)提取白念珠菌胞壁成分获得的胞壁提取物主要来自白念珠菌胞壁外层。本文用 DTT 法提取白念珠菌胞壁成分,先证实 DTT 胞壁提取物能与本文制备的单抗发生阳性反应,再将 DTT 胞壁提取物进行 SDS-PAGE 和免疫印迹,结果显示 1B5 单抗能与 DTT 白念珠菌胞壁提取物中分子量大约为 32×10^3u 抗原成分发生反应。因此,我们认为 1B5 单抗是抗白念珠菌孢子胞壁外膜上分子量为 32×10^3u 大小抗原的单克隆抗体。

作为抗白念珠菌胞壁外膜成分的单克隆抗体,通过间接免疫荧光染色,应使白念珠菌孢子表面染上荧光。本研究用这 3 株腹水单抗,分别对白念珠菌$_{19}$孢子、芽管进行间接免疫荧光染色,皆使孢子和芽管表面产生很强的荧光。这也进一步证实了 3 株单抗是抗白念珠菌胞壁外膜成分的单克隆抗体。

关键词 白念珠菌;单克隆抗体

中图法分类号 R379.4∶R329－33 文献标识码 B

参考文献

[1] Jarvis W R. Epidemiology of nosocomial fungal infection, with emphasis on candida species[J]. Clin Infect Dis, 1995, 20(6):1 526－1 530.

[2] Voss A, Le-Noble J L, Verduyn F M, *et al*. Candidemia in intensive care unit patients: risk factor for moratality[J]. Infection, 1997, 25(1):8－11.

[3] Wey S B, M Mori, M Pfaller, *et al*. Hospital-acquired candiemia: the attributable mortality and excess length of stay[J]. Arch Intem Med, 1988, 148(12):2 642－2 645

[4] Mathews R C. Pathogenicity determinants of candida albicans: potential argets for immunotherapy[J]. Microbiology, 1994, 140: 1 505－1 511.

[5] 廖万清. 真菌病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1989. 226－229.

[6] 王 鲁,叶庆佾. 白念珠菌芽管特异性抗原初步研究[J]. 中华皮肤科杂志, 1994, 3(2):136－138.

[7] 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.

[8] Sundstrom P M, Tam M R, Nichols E J, *et al*. Antigenic differences in the surface mannoproteins of candida albicans as revealed by monoclonal antibodies[J]. Infect Immun, 1988, 56(3): 601－606.

[9] 金东雁,黎孟枫 译. 候云德 校. 分子克隆实验指南[M]. 成都:四川科学技术出版社, 1995. 800－887.

[10] Poulain D. Antigenic variability of candida albicans[J]. Crit Rev Microbiol, 1985, 12(3):223－234.

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net