

白色念珠菌烯醇化酶双抗体夹心 ELISA 定量检测方法的建立

胡毓安, 史利宁, 李芳秋*, 李 伟, 马春芳

(南京军区南京总医院临床中心实验科, 江苏 南京 210002)

[摘要] 目的:建立定量检测白色念珠菌烯醇化酶(enolase,Eno)的双抗体夹心 ELISA 法,并应用于不同真菌培养上清液的检测,探讨其在侵袭性念珠菌感染中潜在的诊断价值。方法:将白色念珠菌 Eno 单抗作为包被抗体,HRP 标记的羊抗 Eno 作为检测抗体,利用重组白色念珠菌 Eno 蛋白作为标准品评价该方法的精密度、线性范围、最低检测下限等性能指标。用建立的双抗体夹心 ELISA 法定量检测不同真菌培养上清和白色念珠菌在不同温度下培养上清中 Eno 水平。结果:Eno 浓度为 20 ng/ml 和 5 ng/ml 时,批内和批间精密度分别为 6.61%、9.19%和 6.98%、13.81%,最低检出下限为 1.25 ng/ml,线性范围为 1.25~50.00 ng/ml。白色念珠菌 37℃培养 24 h 时的上清中 Eno 含量为 3.06 ng/ml,培养 120 h 时 Eno 水平上升到 33.43 ng/ml,Eno 水平与白色念珠菌菌丝含量呈正相关。本方法与近平滑念珠菌有微弱交叉反应,与热带念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌、新型隐球菌和酿酒酵母均无交叉反应。结论:成功建立了定量检测白色念珠菌 Eno 的双抗体夹心 ELISA 法,在侵袭性念珠菌感染研究中具有潜在的应用价值。

[关键词] 侵袭性念珠菌病;白色念珠菌;烯醇化酶;ELISA;定量检测

[中图分类号] R446.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)06-826-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140629

Development of a sandwich ELISA for quantitative detection enolase of *Candida albicans*

Hu Yu'an, Shi Lining, Li Fangqiu*, Li wei, Ma Chunfang

(Department of Central Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a sandwich ELISA for quantitative detection enolase of *Candida albicans*, and apply the assay to detect enolase levels in supernatant of common fungi cultures. To investigate the potential diagnostic value of enolase in invasive candidiasis. **Methods:** Anti-enolase of *Candida albicans* monoclonal antibody was employed as coating antibody, HRP-conjugated goat polyclonal antibody against *Candida albicans* enolase was used as detecting antibody. The performance parameters of the sandwich ELISA including precision, linear range and limit of detection were verified by using recombinant *Candida albicans* enolase. Then the developed assay was applied to determine enolase levels in supernatant of pathogenic fungi cultures such as common *Candida spp.* *Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae* for preliminary evaluation. **Results:** The intra and inter-coefficient of variation was 6.61%, 9.19% and 6.98%, 13.81% at the concentration of 20 ng/ml and 5 ng/ml respectively. The limit of detection was 1.25 ng/ml. The linear range was 1.25~50.00 ng/ml. The level of enolase in *Candida albicans* culture after incubated in 37℃ for 24 h was 3.06 ng/ml and gradually increased to 33.43 ng/ml at 120 h after incubated in 37℃, consistent with growth of hyphae. The sandwich ELISA was weak cross-reactive to *Candida parapsilosis* and no cross-reactivity to *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* and *Saccharomyces cerevisiae* was found. **Conclusion:** A sandwich ELISA for quantitative detection enolase of *Candida albicans* was developed, which had the potential to be applied to study invasive candidiasis.

[Key words] invasive candidiasis; *Candida albicans*; enolase; ELISA; quantitative detection

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(06):826-830]

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81302536);江苏省科技支撑计划-社会发展项目(BE2009673);南京军区医学科技创新重点课题(10Z027)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: njlifq@163.com

念珠菌属是人体常见的共生菌,在人体免疫力低下和生理屏障被破坏时,可引起危及生命的侵袭性念珠菌病(invasive candidiasis, IC)。IC 早期缺乏特异性症状,临床医生难以及时诊断,其致死率可高达 40%~55%^[1-2],IC 中白色念珠菌仍是最常见的致病菌,约占 50%^[3-5]。现有的 IC 实验室诊断金标准如血培养,由于敏感性低(约 50%)、结果回报时间长,导致 IC 诊断和治疗的延误,是造成 IC 高病死率的部分原因。寻找可靠有效的 IC 诊断抗原标志物,并建立定量检测方法,可以弥补血培养的不足,提高 IC 的实验室诊断水平并用于疗效监测。

烯醇化酶(enolase, Eno)存在于念珠菌细胞壁与胞浆内,约由 440 个氨基酸组成,分子量在 45 000~48 000 之间。Eno 是白念珠菌中含量最丰富的可溶性蛋白、重要的菌丝相蛋白^[6-7],是 IC 感染过程中的免疫优势抗原^[8-13],在念珠菌能量代谢中起重要作用,与白色念珠菌生长密切相关^[14-15]。前期研究中,建立了定性检测 Eno 的双抗体夹心 ELISA 法,检测白色念珠菌培养上清发现 Eno 水平与白色念珠菌菌丝生长状态呈正相关,提示 Eno 是一个潜在的 IC 诊断标志物^[16]。在本研究中,实现了白色念珠菌 Eno 的定量检测,并用念珠菌培养上清初步评价该方法的检测性能,为今后将该方法应用于 IC 患者检测奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌、新型隐球菌和酿酒酵母均为本科微生物室临床分离菌株,经科玛嘉显色培养基和 VITEK2-compact 全自动细菌鉴定仪(梅里埃公司,法国)鉴定。

白色念珠菌 Eno 重组蛋白、抗 Eno 单克隆抗体及羊抗 Eno 多克隆抗体^[24]为本室制备及纯化;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)(上海国源生物技术有限公司);RPMI1640(Gibco 公司,美国),小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),其他试剂均为分析纯。酶联仪(Model 680 型, Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 培养上清制备

参照文献^[16]进行。

1.2.2 HRP 标记的羊抗 Eno 制备

按改良过碘酸钠法标记。

1.2.3 双抗体夹心 ELISA 测定

用抗 Eno 单克隆抗体包被微孔板,HRP 标记的羊抗 Eno 多克隆抗体作为检测抗体,用方阵滴定法选择最佳反应条件。具体检测流程如下:抗 Eno 单克隆抗体用 0.05 mol/L CBS(pH9.6)稀释,100 μ l/孔包被微孔板,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用 0.01 mol/L PBST(含 0.05% Tween20 的 PBS)洗板 5 次,每次 3 min;每孔加入封闭液 200 μ l(含 5%脱脂奶粉的 0.01 mol/L PBST),37 $^{\circ}$ C 温育 2 h;用 PBST 洗板 5 次,每次 3 min;微孔板置于 4 $^{\circ}$ C 保存。检测时每孔加入待测样本 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;0.01 mol/L PBST 洗板 5 次,每次 3 min;加入 HRP 标记羊抗 Eno 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 1 h;0.01 mol/L PBST 洗板 5 次,每次 3 min;加入底物液 TMB-H₂O₂ 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 15 min;加入 50 μ l 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止反应,使用测试波长 450 nm、参比波长 630 nm 读取吸光度值。标准品稀释液和空白对照为含 20%小牛血清的 RPMI1640 培养液。Eno 标准品为本室纯化的白色念珠菌 Eno 重组蛋白(经 BCA 法测定浓度为 1.394 mg/ml),浓度设置为:50.00、20.00、10.00、5.00、2.50、1.25、0 ng/ml(空白对照)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行线性回归分析。

2 结果

2.1 双抗体夹心 ELISA 条件优化

棋盘滴定法选定单克隆抗体浓度为 2.1 μ g/ml, HRP 标记 Eno 多抗稀释度为 1:1 000。

2.2 双抗体夹心 ELISA 主要性能指标

精密度:将 Eno 重组蛋白用 0.01 mol/L PBS 稀释为 20 ng/ml(高浓度)和 5 ng/ml(低浓度),同一批次检测 20 份,计算批内精密度;连续检测 20 批次,计算批间精密度。Eno 浓度为 20、5 ng/ml 时,批内和批间精密度分别为 6.61%、9.19%和 6.98%和 13.81%。

cut-off 值和最低检测下限:用上述方法测定培养基(含 20%小牛血清的 RPMI1640 培养液)吸光度值为 0.019 ± 0.011 ($n = 20$),以 0.052 ($\bar{x} + 3s$) 为 cut-off 值。将重组蛋白用培养基稀释为 5.000、2.500、1.250 和 0.625 ng/ml,每个浓度重复检测 10 次,吸光度值见表 1。以 $\bar{x} - 2s > 0.055$ (cut-off) 为标准,最低检出下限为 1.25 ng/ml。

标准曲线和线性范围:将 Eno 重组蛋白用培养基稀释为 50.00、20.00、10.00、5.00、2.50 和 1.25 ng/ml,培养基作为空白对照,用吸光度值和浓度进行回归分

表 1 不同 Eno 浓度吸光度值
Table 1 Optical density of different levels of Eno (n=10)

指标	吸光度值			
	5.000 ng/ml	2.500 ng/ml	1.250 ng/ml	0.625 ng/ml
\bar{x}	0.402	0.208	0.145	0.096
s	0.055	0.012	0.018	0.031
$\bar{x}-2s$	0.291	0.184	0.109	0.034

析,回归方程为 $y = 0.044 1x + 0.085 8$, 决定系数 $R^2 = 0.997 (F = 1 645, P < 0.001)$, 标准曲线见图 1,线性范围为 1.25~50.00 ng/ml。

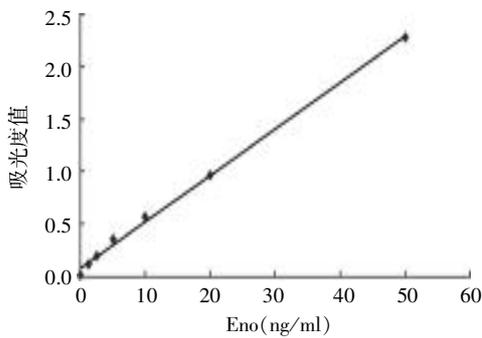


图 1 双抗体夹心 ELISA 法定量检测 Eno 标准曲线

Figure 1 Standard curve of the sandwich ELISA for quantitative detection of Eno detection

2.3 培养上清 Eno 检测结果

不同真菌培养上清中 Eno 检测结果:涂片结果显示,培养 4 h 时白色念珠菌和热带念珠菌出现菌丝生长,近平滑念珠菌于培养 48 h 观察到明显的菌丝生长。37℃培养 24 h,白色念珠菌培养上清中 Eno 浓度为 3.06 ng/ml,随培养时间延长至 120 h,上清中 Eno 浓度增加至 33.43 ng/ml。近平滑念珠菌 37℃培养 48 h,上清可检测出少量 Eno(1.03 ng/ml),但随后一直保持低水平,培养 120 h 上清中 Eno 浓度仅为 3.17 ng/ml。在整个培养过程中,热带念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌和新型隐球菌、酿酒酵母培养上清内未检测出 Eno(图 2)。

不同温度下白色念珠菌培养上清中 Eno 检测结果:25℃培养 24 h 后,涂片可见假菌丝的比例低于同期的 37℃培养物,上清中 Eno 浓度为 0.34 ng/ml。25℃培养 48 h,上清中 Eno 浓度为 2.68 ng/ml,此时 37℃培养上清中 Eno 浓度为 7.16 ng/ml。不同培养温度下 Eno 浓度均随时间延长而增加。在整个观察期间,25℃培养液中白念珠菌菌丝的生长弱于 37℃培养液,培养上清中 Eno 含量始终低于 37℃培养上清,与 37℃相比 Eno 浓度增长呈缓慢趋势,至培养 120 h,培养上清中 Eno 含量为 5.57 ng/ml(图3)。

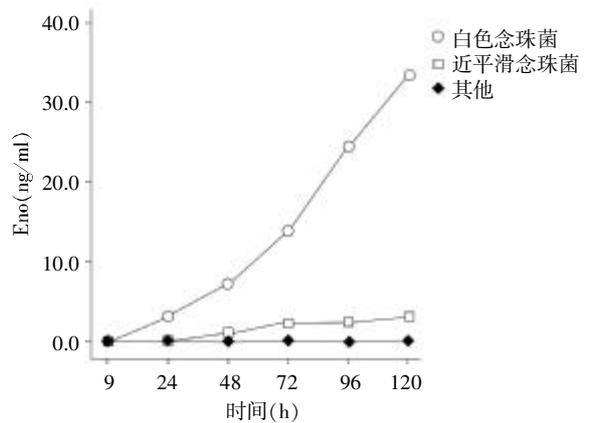
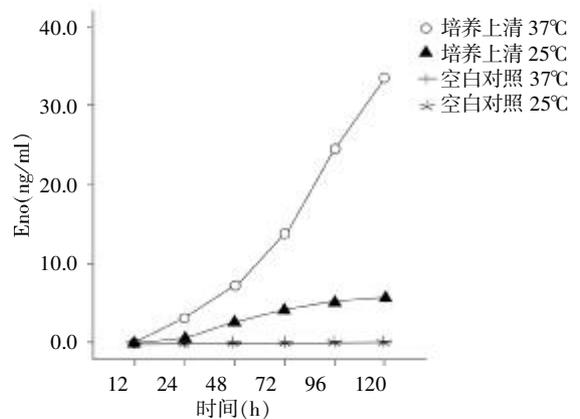


图 2 不同真菌培养上清 Eno 含量

Figure 2 Levels of Eno in the supernatant of fungi cultures



不同温度下均以 RPMI1640 作为空白对照。

图 3 不同温度下白色念珠菌培养上清中 Eno 含量

Figure 3 Concentration of Eno in the supernatant of *Candida albicans* culture incubated in 37℃ and 25℃

3 讨论

目前广泛用于临床的 IC 诊断抗原标志物为 1,3-β-D 葡聚糖(1,3-β-glucan, BG),是存在于除接合菌和隐球菌以外的真菌细胞壁成分,虽然敏感性适中,但可以为 IC 诊断提供直接依据,弥补了血培养的不足。欧洲癌症-侵袭性真菌感染治疗研究协作组和美国国立变态反应和传染病研究院真菌病研究组(EORTC/MSG)将 BG 纳入侵袭性真菌感染临床诊断和拟诊的微生物学标准^[17]。在 BG 检测中有些容易造成假阳性的因素,如透析、输注白蛋白注射液、静脉导管置入、抗肿瘤药物中的类似成分、手术纱布污染、某些细菌感染等,限制了 BG 在侵袭性念珠菌感染中的诊断作用^[18-19],另外 BG 为泛真菌的抗原标志物,其阳性结果不能提供念珠菌属或种的信息,因此研究者们致力于寻找新的用于 IC 诊断的抗原标志物。

Walsh 等和 Mitsutake 等^[20-21]曾报道在 IC 患者外周血中会出现 Eno 抗原血症,Eno 检测 IC 的敏感性和特异性为 71.8%~75.0%和 96.0%~100.0%。他们认为 Eno 抗原检测是对血培养方法的有益补充,如果和甘露聚糖、BG 联合检测可以提高 IC 检测的准确性。国外学者的研究结果证实,除念珠菌细胞壁多糖成分外,念珠菌细胞壁或胞浆蛋白也可成为 IC 诊断的潜在抗原标志物。用于诊断 IC 的理想抗原标志物应该具有以下特征:①在念珠菌属或种内保守,与人及其他微生物同源性低,不发生交叉反应;②在侵袭性感染早期,患者血清或其他无菌液体中即有足量该抗原出现,能够实现 IC 的早期诊断;③其含量变化能反映疾病进展程度或治疗效果;④便于开展,易于操作,结果重复率好,各实验室结果有较强可比性;⑤可以提供菌种信息和药敏数据;⑥可以实现多通道检测^[22]。Mitsutake 等^[21]用于 Eno 检测的多克隆抗体采用白色念珠菌菌体纯化 Eno 蛋白免疫家兔后获得,不能区分不同念珠菌所致感染,检测灵敏度为 5 ng/ml。Walsh 等^[20]使用的检测模式和本研究类似,也采用了单抗和多抗的检测组合,Eno 的检出下限为 0.5~1.0 ng/ml,但未对不同念珠菌感染的特异性进行评价。以上两位学者的研究均未实现 Eno 的定量检测。

在前期研究的基础上,本研究建立了定量检测 Eno 的双抗体夹心 ELISA 法,其方法学性能指标如精密性、特异性、线性范围符合临床实验要求,最低检测下限与文献报道一致。对常见真菌培养上清中 Eno 含量和白色念珠菌不同培养温度下培养上清中 Eno 含量的定量检测结果,支持了本课题组前期研究的定性结果^[16]。随着培养时间延长,白色念珠菌菌丝生长逐渐增多,培养上清中 Eno 含量逐渐上升;37℃培养温度下白色念珠菌菌丝生长优于 25℃培养温度下,前者培养上清中 Eno 含量始终高于后者。培养上清中 Eno 定量检测结果显示,Eno 含量随白色念珠菌菌丝生长而增加,提示检测 Eno 水平可以反映白色念珠菌侵袭性生长的发生,本文认为实现 Eno 的定量检测有助于评估 IC 的发生和监测治疗效果。不同真菌培养上清 Eno 定量检测显示,白色念珠菌培养上清中 Eno 含量可直观反映菌丝生长状态,尽管近平滑念珠菌和热带念珠菌培养过程中菌丝生长旺盛,但培养上清中 Eno 含量维持低水平或不能检出,说明建立的 ELISA 法可特异识别白色念珠菌 Eno 蛋白,与近平滑念珠菌有微弱交叉反应,与其他念珠菌如新型隐球菌、酿酒酵母无交叉反应。本研究认为此结果与所选用检测抗体组合的特

异性相关,另外,氨基酸序列比对结果(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)显示,白色念珠菌 Eno 与都柏林念珠菌 Eno 同源性最高(97.6%),与热带念珠菌、近平滑念珠菌和光滑念珠菌同源性分别为 90.68%、85.65%和 69.86%,与人 Eno 同源性为 64.75%。近平滑念珠菌 Eno 与白色念珠菌 Eno 的同源性较高也可能是造成弱交叉反应性的原因。本研究认为,所建立的定量检测 Eno 双抗体夹心 ELISA 法有望用于特异诊断白色念珠菌引发的 IC,为临床正确选择抗真菌药物提供依据。

综上所述,本研究成功建立了定量检测白色念珠菌 Eno 的双抗体夹心 ELISA 法,对念珠菌培养上清中天然 Eno 抗原的检测方法与前期研究相符。将用该方法进一步评估 Eno 在 IC 早期诊断、疗效监测和预后预测中的价值。

[参考文献]

- [1] Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, et al. *Candida albicans* versus non-*albicans* intensive care unit-acquired bloodstream infections; differences in risk factors and outcome[J]. *Anesth Analg*, 2008, 106(2): 523-529
- [2] Kett DH, Azoulay E, Echeverria PM, et al. *Candida* bloodstream infections in intensive care units; analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(4): 665-670
- [3] Marriott DJ, Playford EG, Chen S, et al. Determinants of mortality in non-neutropenic ICU patients with candidaemia[J]. *Crit Care*, 2009, 13(4): R115
- [4] Guo F, Yang Y, Kang Y, et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China; a multicentre prospective observational study[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(7): 1660-1668
- [5] Cortes JA, Reyes P, Gomez C, et al. Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2011, 28(2): 74-78
- [6] Angioletta L, Facchin M, Stringaro A, et al. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics[J]. *J Infect Dis*, 1996, 173(3): 684-690
- [7] Lee KH, Kim SY, Jung JH, et al. Proteomic analysis of hyphae-specific proteins that are expressed differentially in cakem1/cakem1 mutant strains of *Candida albicans* [J]. *J Microbiol*, 2010, 48(3): 365-371
- [8] Pitarch A, Nombela C, Gil C. Proteomic profiling of serologic response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 470(4): 369-411
- [9] Clancy C J, Cheng S, Nguyen MH. Antibody-based strate-

- gy to identify *Candida albicans* genes expressed during infections[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 470(2):169-185
- [10] Pitarch A, Jimenez A, Nombela C, et al. Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit; Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-Candida enolase antibodies on quantitative clinical platforms[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2008, 2(4):596-618
- [11] Pitarch A, Nombela C, Gil C. Prediction of the clinical outcome in invasive candidiasis patients based on molecular fingerprints of five anti-Candida antibodies in serum [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(1):M110-M4010
- [12] 马春芳, 陆静芬, 孔倩倩, 等. 念珠菌优势抗体检测方法的建立及临床诊断价值评估[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(11):1138-1141
- [13] 李芳秋. 重新认识特异性抗体对侵袭性真菌病的诊断价值[J]. *医学研究生学报*, 2012, 25(4):337-340
- [14] Sundstrom P, Aliaga GR. Molecular cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of *Candida albicans* enolase, an abundant, immunodominant glycolytic enzyme[J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(21):6789-6799
- [15] 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
- [16] 胡毓安, 李芳秋, 马春芳, 等. 白念珠菌烯醇化酶双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(8):565-568
- [17] De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(12):1813-1821
- [18] Peman J, Zaragoza R. Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings[J]. *Mycoses*, 2010, 53(5):424-433
- [19] Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A, et al. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1->3)-beta-D-glucan antigens [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26(11):755-766
- [20] Walsh TJ, Hathorn JW, Sobel JD, et al. Detection of circulating candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(15):1026-1031
- [21] 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
- [22] Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis; how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care[J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 56(9):1284-1292

[收稿日期] 2014-02-23