

分类号

密级

UDC

编号

南方医科大学

硕士学位论文

曲霉抗原捕获方法的建立及其在侵袭性曲霉病诊断中的初步应用

Establishment of *Aspergillus* antigen capture method and its
preliminary application in diagnosis of invasive aspergillosis

蒋苏苏

导师姓名

王艳芳

专业名称

临床检验诊断学

培养类型

专业型硕士

论文提交日期

2023年5月14日

曲霉抗原捕获方法的建立及其在侵袭性曲霉病诊断中的初步应用

Establishment of *Aspergillus* antigen capture method and its preliminary application in diagnosis of invasive aspergillosis

课题来源：国家自然科学基金资助项目（81873974）

学 位 申 请 人	蒋苏苏
导 师 姓 名	王艳芳
专 业 名 称	临床检验诊断学
培 养 类 型	专业型
培 养 层 次	全日制硕士
所 在 学 院	第二临床医学院

答辩委员会主席	黄宪章	教授
答辩委员会成员	袁小澎	主任技师
	胡炎伟	教授
	杨孜欢	教授
	侯铁英	主任技师

2023 年 5 月 14 日 广州

曲霉抗原捕获方法的建立及其在侵袭性曲霉病诊断中的初步应用

硕士研究生：蒋苏苏

指导教师：王艳芳

摘 要

侵袭性曲霉病（invasive aspergillosis, IA）是一种全身性播散性真菌感染性疾病，烟曲霉是其主要致病菌，占 90%以上。近年来，由于免疫抑制剂及激素等药物的使用，免疫低下的患者增多，导致侵袭性曲霉病的发病率和死亡率逐年升高。而曲霉病起病隐匿，临床表现无影响特异性，因此曲霉病的早期诊断极为困难。

目前 IA 诊断金标准是无菌组织的病理诊断，但是缺点是操作是有创的。分子诊断方法灵敏，但由于真菌 DNA 提取困难、不同厂家试剂标准化困难，目前尚未获批用于临床。真菌细胞壁中多糖和糖蛋白含量丰富，已用于多种真菌感染的诊断。临床诊断 IA 商品化试剂盒主要针对烟曲霉半乳甘露聚糖 (glactomannan, GM)或糖蛋白抗原及其抗体，但其在不同患者人群检测性能差异较大，目前仍难以解决临床感染患者多、早期诊断困难的现状。

本实验室前期对曲霉诊断试剂的研发进行了多种不同尝试：一方面，针对具有诊断价值的烟曲霉特异性甘露糖蛋白（Afmp1p）采用原核和真核表达，制备抗体并建立抗原检测体系，但经重组表达的 Afmp1p 难以达到结构复杂的真菌天然糖蛋白的糖基化程度，因此，未能建立有效检测临床样本的体系。另一方面，尝试采用培养 7 天的烟曲霉粗提抗原，免疫小鼠后获得针对曲霉属抗原的单抗，并建立可检测曲霉属培养上清的检测体系，该检测体系虽具有很好的

特异性，但是无法检测患者血清中的抗原。与商品化试剂研发过程相比，推测原因可能为所用免疫原为临床分离烟曲霉、且培养 7 天的天然抗原，与曲霉早期肿胀孢子和菌丝结构存在差异。因此，本课题拟采用购自美国菌株保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC）的烟曲霉标准菌株、提取培养 24 小时的烟曲霉早期裂解抗原作为免疫原，以获取针对烟曲霉早期抗原的小鼠单克隆抗体，建立曲霉抗原捕获的酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）体系，并初步评价其临床应用价值，以期获得可能具有早期诊断价值的试剂盒。

第一部分：烟曲霉单克隆抗体的制备与鉴定

采用培养 24 小时的烟曲霉（ATCC 菌株）生长早期裂解抗原作为免疫原，采用皮下、腹腔和肌肉注射等多种方案免疫 BALB/c 小鼠，选取血清抗体效价最高的小鼠提取脾细胞并与小鼠骨髓瘤细胞进行细胞融合，融合后的杂交瘤细胞经 ELISA 和间接免疫荧光（Indirect immunofluorescence, IFA）筛选，得到了 18 株（F1~F18）稳定分泌抗烟曲霉抗体的杂交瘤细胞。对其中 17 株细胞产生的腹水进行纯化，最终得到了 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体，并对这组抗体进行免疫学特性鉴定。经 ELISA 鉴定发现，7 株抗烟曲霉小鼠单抗为 IgG1 型抗体，特异性针对培养 24 小时的烟曲霉早期裂解抗原，与 18 种临床常见的其他真菌（白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌（酵母相）、黑曲霉、黄曲霉、土曲霉、构巢曲霉、镰刀菌、毛霉、微小根毛霉、葡萄牙念珠菌、季也蒙念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌、尖端赛多孢菌、多育荚节孢霉等）裂解抗原无交叉反应；另外 8 株为 IgM 型抗体，与烟曲霉早期和晚期抗原均有反应，且与多种不同真菌存在一定交叉反应，主要与黄曲霉、土曲霉、黑曲霉和构巢曲霉结合，考虑为曲霉属特异性抗体。免疫印迹（Western blotting, WB）进一步证明：7 株 IgG1 型抗体结合烟曲霉早期裂解抗原，主要结合条带均为 25kDa，而 8 株 IgM 型抗体可同时与烟曲霉早期（37-100kDa）和晚期抗原（50-250kDa）结合，结合谱与伯乐 GM 检测试剂盒中抗

烟曲霉大鼠单抗的结合谱相似。进一步经 IFA 鉴定发现, 13 株抗体与烟曲霉肿胀孢子及早期菌丝体细胞壁有不同程度的结合。生物素 (biotin) 标记小鼠单抗, 测定其效价, 对抗烟曲霉小鼠单抗结合表位性质和相关性分析, 发现 F1 和 F4 结合糖蛋白表位 (相关分析提示结合相同位点), F9 和 F11 识别抗原的糖蛋白表位, F8 和 F16 结合蛋白表位 (且为同一位点), 其余 9 株则识别蛋白表位, 提示成功获得可识别不同抗原性质、识别不同抗原表位的小鼠单抗, 为后续建立烟曲霉抗原捕获 ELISA 的抗体配对提供可能。

第二部分: 曲霉抗原捕获 ELISA 的建立与优化

使用第一部分实验得到的 15 株抗体, 结合其免疫学特性和标记抗体效价情况, 对单克隆抗体进行组合配对和优化, 检测烟曲霉 ATCC 菌株和烟曲霉临床分离株 (称: 烟曲霉 HK 菌株) 分别培养早期 (24 小时) 和晚期 (4 天) 的上清, 得到以识别糖蛋白表位的 IgM 单抗 F1 为捕获抗体, 以生物素 (biotin) 标记的 F1 (biotin-F1) 为检测抗体的最佳配对组合。再通过方阵滴定试验最终确定捕获抗体 F1 包被浓度为 $10\mu\text{g/ml}$, biotin-F1 和 HRP-链霉亲和素的工作比例均为 1:1000 的 ELISA 体系, 其检测培养早期和晚期的烟曲霉 ATCC 菌株上清与烟曲霉 HK 菌株上清的灵敏度均为 1:10000~1:100000, 灵敏度高于实验室前期建立的曲霉属抗原检测体系, 与临床感染常见的土曲霉、马尔尼菲篮状菌、新型隐球菌和白念珠菌的培养上清无交叉反应, 但与黄曲霉和临床相对少见的特异青霉、构巢曲霉有微弱交叉反应, 这提示我们新建立的 ELISA 体系特异性针对曲霉感染, 尤其是烟曲霉 (占致病曲霉菌的 90%)。

第三部分: 曲霉抗原捕获 ELISA 的初步临床评价

由于 IA 临床确诊标本获取困难, 本研究拟以曲霉感染模拟血清初步评价检测体系的灵敏度, 并测定样本前处理对检测效果的影响, 以明确是否需要对患者血清进行预处理。将不同稀释比例的烟曲霉培养上清与正常人混合血清混合制成曲霉感染模拟血清, 采用不加热、混合后 37°C 孵育 30min 和参考 Bio-

rad 商品化 GM 检测试剂盒(Platelia™ *Aspergillus* Ag)中 R7 (EDTA 酸性溶液)处理 (300 μ l 稀释上清+100 μ l R7, 金属浴 100°C 加热 6min; 10000g 离心 10min, 取上清检测) 这 3 种血清预处理方法, 检测结果显示使用 R7 处理后的血清检测 A450 值高于另两种方法的检测值, 检测模拟血清的灵敏度为 1:100~1:1000, 对比 Bio-rad GM 检测试剂盒的灵敏度 (1:1000), 发现我们新建立的体系的灵敏度劣于该商品化试剂盒。

以第二部分建立的双抗体夹心抗原捕获 ELISA 体系, 检测 120 份处理后正常人血清原液以确定 cut off 值为 0.462。进一步用我们建立的 F1/biotin-F1 体系检测 74 例侵袭性曲霉病患者血清 (其中确诊 2 例、拟诊 51 例、疑诊 21 例), 发现检测结果均为阴性。推测检测结果的差异可能与血清抗原量、样本的收集与保存、血清预处理等均有关。后续我们可对抗体标记方式进行改进, 放大检测效果, 提高检测灵敏度。另外也可对免疫原的选择做出改进, 以获得灵敏度更高的抗体。

关键词: 侵袭性曲霉病 烟曲霉 早期诊断 单克隆抗体 ELISA

Establishment of *Aspergillus* antigen capture method and its preliminary application in diagnosis of invasive aspergillosis

Name: Jiang Susu

Supervisor: Wang Yanfang

ABSTRACT

Invasive aspergillosis (IA) is a systemic disseminated fungal infectious diseases, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) is the main pathogen, accounting for more than 90%. In recent years, due to the use of immunosuppressants, hormones and other drugs, the number of patients with low immunity has increased, leading to an increase in the incidence rate and mortality of invasive aspergillosis year by year. However, the onset of IA is hidden, and the clinical manifestation does not affect the specificity, making early diagnosis of IA is extremely difficult.

At present, the gold standard for IA diagnosis is pathological diagnosis of sterile tissue, but the disadvantage is that sampling is invasive. Molecular diagnostic methods are sensitive, but due to difficulties in extracting fungal DNA and standardizing reagents from different manufacturers, they have not yet been approved for clinical use. Fungal cell walls are rich in polysaccharides and glycoproteins, which have been used for the diagnosis of various fungal infections. The clinical diagnosis IA commercialization kit mainly targets *A. fumigatus* galactomannan (GM) or glycoprotein antigens and their antibodies. However, its detection performance varies greatly among different patient populations, and it is still difficult to solve the

current situation of a large number of clinical infected patients and difficulties in early diagnosis.

In the early stage of this experiment, various attempts were made to develop diagnostic reagents for *Aspergillus*. On the one hand, antibodies were prepared and antigen detection systems were established for the diagnostic value of *A.fumigatus* specific mannoprotein (Afmp1p) by prokaryotic and eukaryotic expression. However, the recombinant Afmp1p was difficult to achieve the glycosylation level of complex fungal natural glycoproteins, and therefore, an effective system for detecting clinical samples was not established. On the other hand, an attempt was made to extract antigens from *A.fumigatus* after 7 days of cultivation. After immunizing mice, monoclonal antibodies(MAb) targeting *Aspergillus* antigens were obtained, and a detection system capable of detecting *A.fumigatus* culture supernatant was established. Although it has good specificity, it cannot detect antigens in patient serum. Compared with the development process of commercial reagents, it is speculated that the possible reason is that the immunogen used is a natural antigen of clinically isolated *A.fumigatus*, which has been cultured for 7 days, and there are differences in the early swelling spores and hyphal structure of *A.fumigatus*. Therefore,our project aims to use the standard strain of *A.fumigatus* purchased by ATCC, extract the early lysis antigen of *A.fumigatus* cultured for 24 hours as the immunogen, and obtain mouse MAb targeting the early antigen. Next, we will establish an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) system for *Aspergillus* antigen capture and preliminarily evaluate its clinical application value, in order to obtain a possible early diagnostic kit.

Part I: Preparation and identification of MAb against *A.fumigatus*.

We used *A.fumigatus* (ATCC strain) lysate antigen cultured for 24 hours as an immunogen and immunized BALB/c mice with various regimens including subcutaneous, intraperitoneal, and intramuscular injections. Select the mouse with the highest serum antibody titer to extract spleen cells and fuse them with mouse NS-1 cells. The fused hybridoma cells were screened by ELISA and Indirect

immunofluorescence (IFA), and 18 strains (F1-F18) of hybridoma cells stably secreting anti *A.fumigatus* antibodies were obtained. We purified the ascites produced by 17 cell strains, and ultimately obtained 15 strains of anti *A.fumigatus* MAb, which were identified for their immunological characteristics.

In ELISA, We found that 7 strains of anti *A.fumigatus* MAb were IgG1. They specifically target early lysis antigens of *A.fumigatus* cultured for 24 hours. These antibodies do not cross react with 18 clinically common fungal lysis antigens (includes *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Talaromyces marneffeii* (TM, yeast phase), *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizomucor minimus*, *Candida portugalii*, *Candida jiemonica*, *Candida glabrata*, *Candida kerrula*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Sedospora apicalis*, *Arthrospora polypodata*). The other 8 strains are IgM, which react with early (cultured for 24 hours) and late (cultured for 4 days) antigens of *A.fumigatus*, and have certain cross reactions with various different fungi (mainly combined with *A.flavus*, *A.terreus*, *A.niger*, and *A.nesting*). We consider them to be *Aspergillus* specific antibodies. Western blotting (WB) further confirmed that 7 IgG1 type antibodies bind to early lysis antigens of *A.fumigatus*. The main binding bands are all 25kDa. And 8 IgM type antibodies can bind to both early (37-100kDa) and late (50-250kDa) antigens of *A. fumigatus*, with a binding spectrum similar to R6 from Platelia™ *Aspergillus* Ag/Bio-Rad. In IFA, thirteen of the antibodies were bound to the swollen spores of *A.fumigatus* and the somatic cell cell wall of the early hyphae to varying degrees. Next, we labeled the MAb with biotin and measured its potency. This suggests that we have successfully obtained MAb that can recognize different antigenic properties and different antigenic epitopes, and provide the possibility for the subsequent establishment of antibody pairing for *Aspergillus* antigen capture ELISA

Part II: Establishment and optimization of *Aspergillus* antigen capture ELISA

Using the 15 antibodies obtained from the first part of the experiment, combined with their immunological characteristics and labeled antibody titers, the MAb were paired and optimized. By detecting the supernatants of ATCC and clinical isolates of *A.fumigatus* (referred to as HK) cultured in early and late stages, IgM MAb F1, which recognizes glycoprotein epitopes, was obtained as the capture antibody. Biotin labeled F1 (biotin-F1) was used as the optimal pairing for antibody detection. Finally, the capture antibody F1 coating concentration was determined to be 10μg/ml, biotin-F1 and Streptavidin-HRP working ratio is 1:1000, the sensitivity of detecting ATCC strain supernatant and HK strain supernatant in early and late culture is 1:10000~1:100000, which is higher than that of *Aspergillus* antigen detection system established in the early laboratory. There was no cross reaction with the culture supernatant of common clinical infections such as *A.terreus*, *TM*, *Cryptococcus neoformans*, and *Candida albicans*. However, there was a weak cross reaction with *A.flavus* and relatively rare clinical infections such as *Specific Penicillium* and *A.nesting*. This suggests that our newly established ELISA system specifically targets *Aspergillus* infection, especially *A.fumigatus* (accounting for 90% of pathogenic *Aspergillus*).

Part III: Preliminary clinical evaluation of *Aspergillus* secreted antigen capture ELISA

Due to the difficulty in obtaining clinical specimens for IA, our study aims to preliminarily evaluate the sensitivity of the detection system by simulating *Aspergillus* infection serum, and determine the impact of sample pretreatment on the detection effect to determine whether pretreatment of patient serum is necessary. We mixed the culture supernatant of *A.fumigatus* with different dilution ratios and mixed serum from normal individuals to create a simulated *Aspergillus* infection serum. The serum was treated without heating, incubated at 37 ° C for 30 minutes after mixing,

and treated with reference to R7 (EDTA acidic solution) from Platelia™ *Aspergillus* Ag. The test results showed that the A450 value of the serum treated with R7 was higher than that of the other two methods. The sensitivity of the simulated serum detection was 1:100~1:1000. It was found that the sensitivity of our newly established system was inferior to Platelia™ *Aspergillus* Ag(1:1000).

We detected 120 normal human serum (R7 treated) samples using F1/biotin-F1 to determine a cutoff of 0.462. Furthermore, we tested the serum of 74 patients with invasive aspergillosis using F1/biotin-F1 (including 2 proven, 51 probable, and 21 possible), and found that the test results were all negative. It is speculated that the differences may be related to serum antigen levels, sample collection and preservation, and serum pretreatment. In the future, we can improve the antibody labeling method and amplify the detection effect to improve detection sensitivity. In addition, we can also make improvements in the selection of immunogens to obtain antibodies with higher sensitivity.

KEYWORDS: invasive aspergillosis; *Aspergillus fumigatus*; Early diagnosis; monoclonal antibody; ELISA

目 录

前言	1
第一部分 抗烟曲霉单克隆抗体的制备与鉴定	5
1.材料.....	5
1.1 主要试剂.....	5
1.2 耗材与设备	6
1.3 主要仪器.....	6
1.4 菌株与细胞.....	7
1.5 实验动物.....	7
1.6 真菌抗原与单克隆抗体.....	7
1.7 主要溶液配制	8
2.实验方法.....	9
2.1 烟曲霉全细胞裂解抗原的制备与鉴定.....	9
2.2 动物免疫.....	10
2.3 免疫小鼠血清抗体效价测定	11
2.4 杂交瘤细胞的制备与鉴定.....	11
2.5 单克隆抗体腹水的制备与纯化.....	13
2.6 单克隆抗体的免疫学特性鉴定.....	14
2.7 生物素标记单克隆抗体及效价测定.....	17
2.8 单克隆抗体识别抗原表位相关性分析.....	17
3.实验结果.....	18
3.1 免疫小鼠血清抗体效价测定	18
3.2 杂交瘤细胞株的建立.....	19
3.3 抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的免疫学特性鉴定	19
3.4 生物素标记抗体效价测定.....	32
3.5 单克隆抗体识别抗原表位相关性分析.....	33
4.讨论.....	34
第二部分 曲霉抗原捕获 ELISA 的建立与优化	38
1.材料.....	38
1.1 主要试剂.....	38
1.2 耗材与设备	38
1.3 主要仪器.....	38
1.4 菌株与细胞.....	39
1.5 抗原与抗体.....	39
1.6 主要溶液配制	39

2.实验方法.....	39
2.1 真菌培养上清的制备.....	39
2.2 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 的建立	40
3.实验结果.....	42
3.1 捕获抗体和检测抗体之间的最佳配对.....	42
3.2 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 的优化条件的确立	47
3.3 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 灵敏度测定	49
3.4 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 特异度测定	50
4.讨论.....	51
第三部分 曲霉抗原捕获 ELISA 的初步临床评价	54
1.材料.....	54
1.1 主要试剂和实验材料.....	54
1.2 主要仪器.....	54
1.3 血清样品.....	54
2.实验方法.....	55
2.1 ELISA 检测正常人血清 cutoff 值设定.....	55
2.2 待测模拟血清的制备前处理.....	55
2.3 F1/biotin-F1 体系检测正常人和烟曲霉感染患者模拟血清	55
2.4 商品化伯乐 GM 检测试剂盒检测烟曲霉感染患者模拟血清	56
2.5 侵袭性曲霉病患者血清的预处理.....	56
2.6 曲霉抗原检测结果判定.....	56
2.7 数据分析.....	56
3.实验结果.....	56
3.1 F1/biotin-F1 体系检测烟曲霉感染患者模拟血清的灵敏度	57
3.2 商品化伯乐 GM 检测试剂盒检测烟曲霉感染患者模拟血清	57
3.3 F1/biotin-F1 体系检测临床侵袭性曲霉病患者血清标本	58
4.讨论.....	59
参考文献.....	62
附录 中英文对照缩略词汇表	67

前 言

侵袭性曲霉病 (invasive aspergillosis, IA) 是一类由曲霉菌引起的深部真菌感染性疾病。曲霉菌属由 339 种丝状真菌组成^[1], 其主要致病菌包括烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、土曲霉 (*A. terreus*)、黑曲霉 (*A. niger*) 和黄曲霉 (*A. flavus*)^[2]等, 其中烟曲霉是主要的致病菌, 占 90% 以上^[3-5]。曲霉菌在自然界中分布广泛, 其产生的分生孢子广泛分布于环境中, 随着人们的呼吸, 分生孢子进入呼吸道, 进而沉积在肺泡上皮细胞, 孢子发芽且菌丝延长, 并突破肺泡侵入血管壁沿血管侵袭, 从而导致 IA 的发生^[5, 6]。在正常情况下, 人们可通过先天免疫系统清除进入人体的曲霉分生孢子, 然而, 在先天性或获得性免疫缺陷病患者、器官移植患者、肿瘤患者、长期应用激素或免疫抑制剂等患者体内, 由于他们的免疫功能低下, 进入体内的分生孢子无法被正常清除而致病^[7], 因此, 烟曲霉被认为是一种机会性致病菌。由于宿主免疫状态不同, 曲霉菌可引起各种临床综合征, 包括侵袭性肺曲霉病 (invasive pulmonary aspergillosis, IPA)、慢性肺曲霉病 (chronic pulmonary aspergillosis, CPA) 和过敏性疾病等^[8]。近年来, 肺曲霉病的发病率和死亡率都在逐年升高, 估计每年有 1600 万例肺部感染^[9], 以及数十万的患者死亡^[10]。其中肺曲霉病中主要以 IPA 为主, 有研究表明, IPA 的患病率高达 15%^[11], 此种感染多见于宿主免疫抑制低下、粒细胞减少或缺乏者, 其死亡率可高达 50% 以上^[12], 严重影响着患者的生命健康。

由于曲霉病起病隐匿, 主要临床表现包括咳嗽、发热、呼吸困难以及咯血, 但早期症状不典型, 无明显特异性临床表现。影像学虽具有某些特征性表现, 如 CT 主要表现包括多发性或弥漫性病变、新月征、结节影、晕轮征等^[13], 但并非每个患者都有这类典型 CT 表现^[14]。而由于曲霉病的临床表现、症状、体征以及影像学特征等均不典型, 因此, 曲霉病的早期诊断极为困难, 而这也在一定程度上延误了抗真菌治疗的开展, 进一步导致高死亡率。目前, 为了降低 IA 的发病率和死亡率, 在临床上医生一般多采用结合患者的病史、临床症状、影像学检查结果、相关特异性检验、病理等进行综合判断^[14], 提前采用抗真菌

药物治疗。然而，经验性抗真菌药物治疗不仅会导致胃肠道反应、肝肾毒性等药物不良反应的发生，还会促使耐药菌株的出现，从而进一步增加曲霉病的治疗难度。

侵袭性肺曲霉病的诊断金标准是从肺组织活检标本中检出曲霉菌菌丝，或无菌部位组织病理检出真菌^[15]。但这种方法需要通过侵入性手段获取标本，要求操作人员有丰富的经验和专业知识，且对 IA 高危人群取材风险较大，且真菌培养耗时长，过程中容易受到空气中曲霉孢子的污染，存在较高的假阳性和假阴性等问题。2021 年 EORTC/MSG 关于侵袭性真菌病定义共识的修订及更新指出：血培养培养出曲霉菌，几乎总是代表污染，很少提示侵袭曲霉感染^[15]。另外，分子诊断技术包括荧光定量 PCR、第二代基因测序等，虽然也可以作为曲霉感染的微生物学证据，但这些方法在临床上均未得到广泛应用。主要原因包括真菌 DNA 提取困难、不同 PCR 试剂之间标准化困难、标本易受环境中曲霉污染导致出现假阳性的可能，以及无法区分慢性阻塞性肺疾病（Chronic obstructive pulmonary disease, COPD）患者中可能出现的呼吸道曲霉菌定植的情况等，这些缺点都限制了其在临床诊断的应用。因此，寻找一种敏感、高效、特异性高、创伤小的早期诊断方法对控制患者病情及改善患者预后具有重要价值。

近年来，侵袭性真菌病免疫学诊断方法的研究热点集中于真菌抗原的捕获上。曲霉菌细胞壁含有多种抗原，主要由多糖和糖蛋白组成，其中多糖成分占 90% 以上，包括半乳甘露聚糖（Galactomannan, GM）、1,3- β -葡聚糖、1,3- α -葡聚糖、几丁质以及甘露聚糖等^[16]。目前普遍被国内外认可的血清真菌抗原诊断方法包括 1,3- β -葡聚糖、半乳甘露聚糖试剂盒。其中，1,3- β -葡聚糖是大多数真菌细胞壁的共有成分，因此，1,3- β -葡聚糖缺乏种属特异性，无法据此区分曲霉属和其他真菌。另外，在患者经免疫球蛋白治疗或者输注白蛋白后，1,3- β -葡聚糖检测容易出现假阳性，而且由于检测成本高，不利于动态监测。2021 年 EORTC/MSG 关于侵袭性真菌病定义共识的修订及更新也指出：1,3- β -葡聚糖指标不是诊断任何侵袭性霉菌病的真菌学证据，只有当遇到患有血液系统恶性肿

瘤（伴或不伴中性粒细胞减少），造血干细胞移植所致中性粒细胞减少，ICU 中新生儿侵袭性念珠菌病风险较高（>10%）的患者，如胃肠外科手术后反复吻合口瘘、上消化道穿孔、坏死性胰腺炎患者怀疑伴有感染等这些临床情况时，G 试验才适用于拟诊侵袭性真菌病，适用范围有限^[15]。曲霉半乳甘露聚糖(GM)是一种热稳定多糖，是曲霉菌细胞壁的主要成分之一，包括一个线性甘露聚糖核心和短而分枝的 β -1,5 连接的呋喃半乳糖(Galf)链^[17]，该结构具有抗原性^[18, 19]。GM 随着曲霉菌丝生长而分泌释放，可在早期感染释放入血液及其他体液标本中，可以在曲霉菌感染患者的血液或其他体液中检测出，是 IA 早期诊断标志物之一^[20]。GM 检测的商业化试剂盒（Platelia™ *Aspergillus* Ag/Bio-Rad）已被欧美国家及 FDA 批准用于 IA 的诊断，其试验标本以血清和 BALF 为主，其结果以吸光度指数 (GM index, GMI) 报告，EORTC/MSG 的指南中推荐 GMI $\geq$ 1.0 为阳性，作为曲霉感染的微生物指标之一。此外，针对糖蛋白的免疫层析侧流装置（lateral-flow device, LFD）和国产的丹娜曲霉 GM 试剂盒（Dynamiker）也已应用于临床。据文献报道，GM 可在临床症状出现前 5~8 天被检出^[21, 22]，但 GM 试剂盒检测的特异度和敏感度差异较大，特异度从 38%~98%不等^[23]，而敏感度从 30%~100%不等^{[24][25]}。原因主要有以下几点：1）患者服用了某些抗生素，比如半合成青霉素等，或进食了含有 GM 的食物，均可导致假阳性结果^[26]；2）GM 试剂盒与拟青霉属和青霉属真菌存在一定的交叉反应，也可能导致出现假阳性结果；3）部分免疫力低下患者如化疗患者、血液肿瘤患者预防性使用抗真菌药物治疗，会导致血液内的 GM 抗原被快速清除从而出现假阴性的结果^[27]；4）商品化 GM 试剂盒检测血清样品前需对样品进行加热前处理，使血清中蛋白质沉淀，然而，这同时也会导致 GM 糖蛋白出现沉淀，从而出现假阴性结果。GM 抗原诊断侵袭性肺曲霉病以两次 GM 抗原检测阳性为标准的特异性达到 91%，但敏感性相对较低(72%)^[28]。有研究结果显示，在对诊断侵袭性曲霉病的样本选择中，BALF 的诊断性能是优于血清的^[29]，但即使是检测 BLAF，其临界值在不同患者人群中也有差异，且难以界定各个人群的截断值范围^[30]。另外，进口试剂盒检测 GM 抗原费用昂贵，部分患者难以承担连续监

测的经济负担。因此，为实现 IA 的早期诊断和早期治疗，减轻社会负担，提高曲霉抗原检测体系的灵敏度、特异度和稳定性，曲霉抗原诊断的国产试剂研发成为重中之重。

为研发可用于曲霉诊断的免疫学诊断试剂，本实验室前期进行了多种尝试：一方面，针对具有诊断价值的烟曲霉特异性甘露糖蛋白（Afmp1p）采用原核^[31]和真核^[32]表达，制备了针对 Afmp1p、Afmp2p、Afmp4p 的多株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体及兔多克隆抗体^[33]抗体并建立抗原检测体系，但经重组表达的 Afmp1p 难以达到结构复杂的真菌天然糖蛋白的糖基化程度^[31]，或表达后制备的单抗所建立的检测体系灵敏度不佳^[32]，因此，未能建立有效检测临床样本的体系。另一方面，尝试利用 37℃ 培养 7 天的烟曲霉菌丝体裂解抗原、25℃ 培养 3~4 周的分泌抗原和烟曲霉甲醛灭活孢子分别为免疫原制备了一组抗烟曲霉小鼠单抗^[32]，并建立了以 IgG1 抗体 9D47A1 为捕获抗体，另一 IgG1 型抗体 7E11A1 为检测抗体，可检测曲霉属抗原的双抗体夹心 ELISA 检测体系^[34]。虽具有很好的特异性，然而这些抗体建立的抗原捕获 ELISA 体系的特异性及敏感性均不理想，难以应用至临床样本的检测。原因可能在于本实验室前期研究中选取的免疫原为培养 7 天以上的烟曲霉裂解或分泌抗原，烟曲霉的生长时间过长，其抗原成分可能与早期曲霉的肿胀孢子和菌丝结构存在差异所致，难以得到针对早期抗原的抗体。因此，为制备针对烟曲霉生长早期抗原的抗体，我们应尽量缩短烟曲霉的培养时间，本研究拟采用培养 24 小时的烟曲霉 ATCC 菌株生长早期裂解抗原作为免疫原，制备一组针对烟曲霉早期抗原的小鼠单克隆抗体，通过对得到的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的免疫特性鉴定与表位分析，对抗体进行配对组合，从而建立曲霉分泌抗原捕获 ELISA 检测体系，并用该体系对临床样品进行检测，初步评价曲霉分泌抗原捕获 ELISA 在侵袭性曲霉病诊断和鉴别诊断中的作用。

第一部分 抗烟曲霉单克隆抗体的制备与鉴定

烟曲霉菌是在自然环境中广泛存在的一种机会性致病菌，是侵袭性曲霉病的主要致病菌，主要感染免疫力低下的人群^[35]。近年来，随着广谱抗生素以及激素和免疫抑制剂等的大量使用，IA 的发病率和病死率越来越高。由于真菌培养和分子诊断等方法的局限性，目前 IA 的诊断热点仍聚焦于曲霉抗原的捕获上，包括针对 GM 抗原的曲霉抗原检测试剂盒和针对糖蛋白的免疫层析侧流装置^[36]等。

本实验室前期研究利用了多种烟曲霉抗原作为免疫原制备了多株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体，包括 37°C 培养 7 天的烟曲霉菌丝体裂解抗原、25°C 培养 3~4 周的分泌抗原、烟曲霉甲醛灭活孢子等。另外，本实验室还利用烟曲霉细胞壁重组甘露聚糖蛋白 Afmp1p、Afmp2p、Afmp4p 制备了多株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体及兔多克隆抗体。然而这些抗体建立的抗原捕获 ELISA 体系的特异性及敏感性均不理想，难以应用至临床样本的检测。

本研究旨在 IA 的早期诊断，因此选择使用 37°C 培养 24h 的烟曲霉，机械裂解法制备的早期烟曲霉全细胞裂解抗原作为免疫原，为获得较好的免疫效果，采用不同佐剂（弗氏佐剂、Quickantibody 佐剂），采用不同免疫途径（皮下、腹腔和肌肉注射）等不同免疫方案，制备烟曲霉或曲霉属特异性抗体，通过对得到的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的免疫学特性研究和识别抗原位点分析，为进一步建立曲霉感染早期诊断方法奠定基础。

1. 材料

1.1 主要试剂

胎牛血清（Fetal Bovine Serum, FBS）、DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）培养基、RPMI-1640 无血清培养基和庆大霉素均购于 GIBCO 公司；山羊血清购于四季青公司；ECL 化学底物发光检测试剂盒购于 Bio-Rad 公司；辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase, HRP）标记的山羊抗小鼠 IgM 和山羊抗

小鼠总 IgG、荧光素 (FITC) 标记的山羊抗小鼠 IgM 和山羊抗小鼠 IgG 均购于 Abcam 公司; 弗氏不完全佐剂以及弗氏完全佐剂、聚乙二醇 1450 (PEG1450)、HT 培养基 (50×) 和 HAT 培养基添加剂 (50×) 均购于 Sigma 公司; QuickAntibody 快速免疫佐剂和 TMB 显色液购于北京 Biodragon 公司; 高碘酸钠和胰蛋白酶购于上海麦克林生化科技股份有限公司; 胰蛋白酶抑制剂购于上海源叶生物科技有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸钠、碳酸氢钠、无水乙醇、氯化钠、重蒸苯酚、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、甲醇、浓盐酸、乙酸钠、十二烷基硫酸钠 (SDS)、浓 H_2SO_4 、 β -羟基乙醇、氢氧化钠、过硫酸铵、甘油、四甲基乙二胺、30% 丙烯酰胺等其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 耗材与设备

细胞冻存管、0.22 μm /0.45 μm 细菌滤器、50ml 螺口离心管均购于广州昂飞生物科技有限公司; 各个规格离心管、一次性塑料吸管、定性滤纸等耗材均购于上海生工生物有限公司; 聚偏二氟乙烯膜 (PVDF 膜) 购于德国默克公司; 陶瓷研磨珠 (0.1mm/0.5mm) 购于广州市元岗宏纳仪器批发部; 无菌培养容器透气封口膜购于广州市普博仪器有限公司; 神奇滤布购于北京智杰方远科技有限公司; 各个规格的加样枪头购于生工生物工程有限公司及广州万莱康生物科技有限公司; 96 孔聚苯乙烯微孔板购于厦门怡新美科技器材公司; 各规格玻璃试管、玻璃漏斗、锥形瓶、玻璃量筒、平皿、一次性细胞计数板、一次性接种环、玻璃刻度吸管、比色皿 (10mm) 均源自南方医科大学珠江医院中心实验室。

1.3 主要仪器

台式离心机为德国 Hettich 公司产品; 大型落地摇床、微生物培养箱、二级生物安全柜、紫外分光光度计 NanoDrop 2000C 以及高速冷冻离心机均为 Thermo Fisher 公司产品; 真空离心浓缩仪和冷冻干燥机为德国 CHRIST 公司产品; 洗板机和酶标仪为 BioTek 公司产品; 电子天平为德国赛多利斯公司产品; 全自动样品快速研磨仪为上海净信实业发展有限公司产品; 倒置显微镜为德国 NIKON 公司产品; 化学发光成像系统和蛋白电泳仪为 Bio-Rad 公司产品; pH 仪为梅特勒-托利多公司产品; 二氧化碳细胞培养箱为英国 RS BIOTECH 公司产品;

脱色摇床和恒温水浴锅为英国 GRANT 公司产品；恒温金属浴为杭州米欧仪器有限公司产品。

1.4 菌株与细胞

烟曲霉标准菌株 1 株，保藏号为 ATCC46645，购自美国菌株保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)；烟曲霉临床分离株，由香港大学玛丽医院提供，简称 HK 菌株。

NS-1 小鼠骨髓瘤细胞购自美国 ATCC 细胞库，由本实验室细胞库中冻存保种。

1.5 实验动物

BALB/c 小鼠若干，雌性，4~8 周龄，SPF 级，体重 20~25g，购自广东省实验动物中心。

1.6 真菌抗原与单克隆抗体

烟曲霉 ATCC 菌株、烟曲霉 HK 菌株、白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌（酵母相）、黑曲霉、黄曲霉、土曲霉、构巢曲霉、镰刀菌、毛霉、微小根毛霉、葡萄牙念珠菌、季也蒙念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌，尖端赛多孢菌、多育荚节孢霉等真菌裂解抗原,真菌重组抗原（烟曲霉特异性甘露糖蛋白 Afmp1cr^[37]、马尔尼菲篮状菌特异性重组蛋白 Mp1p^[38]、新型隐球菌重组蛋白 Cpl1 和白念珠菌重组蛋白 Csa2^[39]）均为本实验室前期制备；抗烟曲霉小鼠单克隆抗体 9D47A1 属 IgG1 亚类^[32]，为本实验室前期制备，用于实验室前期建立曲霉属抗原检测体系，可识别曲霉属通用抗原。葡聚糖购买自爱尔兰 Megazyme 公司产品,烟曲霉 ATCC 菌株 24h 裂解抗原乙醇沉淀多糖为实验室前期制备，制备过程简述如下：采用乙醇分级沉淀法：将烟曲霉裂解上清与 4 倍体积的无水乙醇溶液充分混匀，4℃静置沉淀过夜；4℃，5000rpm 离心 10min，弃上清并用蒸馏水充分重悬沉淀，再加入蒸馏水 4 倍体积的无水乙醇，4℃静置 1h；4℃，5000rpm 离心 10min 弃上清，无水乙醇重复洗涤沉淀 3 次后再次离心弃上清，加入蒸馏水与蒸馏水约 1/10 体积的活性炭粉充分溶解沉淀，室温下磁力搅拌脱色 3h，过滤并离

心即得到烟曲霉乙醇沉淀多糖抗原。R6 为 Bio-rad 商品化曲霉 GM 试剂盒 (Platelia™ *Aspergillus* Ag) 抗体。

上述真菌裂解抗原以及小鼠单克隆抗体均用于对本研究中新制备的小鼠抗烟曲霉单克隆抗体的鉴定。

1.7 主要溶液配制

(1) 沙氏液体培养基 (pH 5.6): 10g 蛋白胨, 20g 葡萄糖充分溶解于去离子水中, 用稀盐酸调整 pH 值至 5.6, 定容至 1L, 随后高压灭菌备用。

(2) 20×PBS(pH 7.4): 称取 58.02g 十二水合磷酸氢二钠, 4.56g 磷酸二氢钠以及 175.3g 氯化钠, 用超纯水溶解后, 定容至 1L, 高压灭菌备用。应用时稀释相应浓度的 PBS。

(3) 10×TBS (pH 7.5): 称取 80g 氯化钠和 24.2g 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 在超纯水中充分溶解, 再用稀盐酸调 pH 值至 7.5, 定容至 1L。高压灭菌备用。应用时稀释成相应浓度的 TBS。

(4) 0.1% TBST: 在 1L 1×TBS 缓冲液中加入 1ml 吐温 20。

(5) 0.1% PBST: 在 1L 1×PBS 缓冲液中加入 1ml 吐温 20。

(6) 0.5% PBST: 在 1L 1×PBS 缓冲液中加入 5ml 吐温 20。

(7) 10% AP: 将 1g 过硫酸铵 (AP) 溶于 10ml 超纯水中, 将溶解后的 AP 溶液分装, 置于-20℃保存。

(8) 10% SDS: 称取 1g 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶于 10ml 超纯水中, 加热搅拌至充分溶解后, 于常温保存。

(9) 5×电泳缓冲液: 称取 94g 甘氨酸, 15.1g Tris 和 5g 十二烷基硫酸钠, 完全溶于 1L 的超纯水中, 4℃保存。应用时稀释成 1×电泳缓冲液。

(10) 5×转印缓冲液: 称取 14.5g 甘氨酸和 29g Tris, 充分溶于超纯水中, 定容至 1L, 4℃保存。应用时配置成 1×转印缓冲液: 甲醇 120ml+5×转印缓冲液 150ml+H₂O 480ml。

(11) 6×loading buffer: 量取 1M Tris-HCl(pH 6.8) 3.5ml, 3ml 甘油, 0.6ml β-羟基乙醇, 称取 1g 十二烷基硫酸钠, 1.2mg 溴酚蓝, 用蒸馏水溶解, 而后定

容至 10ml, 分装后于-20℃保存备用。

(12) 考马斯亮蓝染色液: 称取考马斯亮蓝 R250 0.25g, 甲醇 50ml, 冰醋酸 10ml, 去离子水 40ml, 充分溶解后经定性滤纸过滤。

(13) 脱色液: 量取甲醇 92ml, 冰醋酸 16ml, 双蒸水 92ml 充分混匀, 避光保存。

(14) 免疫印迹封闭液 (5%脱脂奶粉-TBST 溶液): 称取脱脂奶粉 2g, 加入至 40ml 0.1%TBST 中, 充分混匀。

(15) 样品稀释液: 含 0.1%BSA, 0.1%吐温和 0.1% proclin 300 的 $1 \times$ PBS 溶液。

(16) 简易酶稀释液: 取羊血清 200ml, 10% 苯酚红 3ml, 吐温 20 5ml, proclin 300 1ml, $1 \times$ PBS 定容至 1L, 4 度保存备用。

(17) 抗体包被液: 称取二水合磷酸二氢钠 1.4g, 十二水合 Na_2HPO_4 15g, 加去离子水定容至 1L。

(18) 0.25%酪蛋白封闭液: 称取 Tris base 1.21g, 明胶 2g, 蔗糖 20g, 酪蛋白钠盐 2.5g, 硫柳汞 0.2g, 去离子水溶解定容至 1L。高压备用, 温度下降至 60℃ 加入 5ml 吐温 20。

(19) 终止液 (1M H_2SO_4): 量取 55.6ml 浓 H_2SO_4 , 加入 944.4ml 水中。

(20) 0.05M 乙酸钠溶液 (PH4.5): 4.1g 乙酸钠 (6.8g 三水乙酸钠) +5ml 冰乙酸, 加纯水配置成 1L。

(21) 0.2M 高碘酸钠溶液: 称取 2.14g 高碘酸钠溶于 50ml 0.05M 乙酸钠溶液, 使用时需稀释 10 倍用。

(22) 胰蛋白酶溶液: 称取 5g 胰蛋白酶溶于 10ml 纯水中, 于-20℃冻存, 使用时用 PBS 稀释至 1mg/ml。

(23) 胰蛋白酶抑制剂溶液: 称取 100mg 胰蛋白酶抑制剂溶于 1ml 纯水中, -20℃冻存, 使用时用 PBS 稀释至 0.1mg/ml。

2. 实验方法

2.1 烟曲霉全细胞裂解抗原的制备与鉴定

鉴于前期实验室利用热灭活的烟曲霉肿胀孢子、烟曲霉乙醇沉淀多糖和烟曲霉培养 24h 全细胞裂解抗原作为免疫原分别免疫小鼠，发现烟曲霉裂解抗原的免疫原性明显优于肿胀孢子和烟曲霉乙醇沉淀多糖^[40]，因此我们使用的免疫原为实验室前期制备和鉴定的烟曲霉 24 小时全细胞裂解抗原。制备方法简述如下：取沙氏肉汤保种的 ATCC46645 菌株 100 μ l，以三点接种法接种于沙保弱葡萄糖琼脂培养基。于 28 $^{\circ}$ C 培养 3-5d，待培养基上长满烟绿色的粉末状菌落时收获烟曲霉分生孢子，过滤后得到烟曲霉分生孢子悬液并计数，计数方法参考牛鲍计数板计数原理^[41]；在基本培养基中加入终浓度为 1×10^6 /ml 的烟曲霉分生孢子悬液，35 $^{\circ}$ C，150rpm 振荡培养 24h，经离心沉淀、灭菌滤纸过滤得到菌丝体并反复洗涤 10 次；将菌丝体置于组织研磨仪中进行研磨（研磨参数为 65Hz，10min），经显微镜下观察后确定无明显菌丝及孢子结构，确保研磨充分；于 4 $^{\circ}$ C，14000rpm 离心 20min，取上清经 0.22 μ m 细菌滤器过滤，并利用真空离心浓缩仪对过滤后的烟曲霉裂解上清进行浓缩，即为全细胞裂解抗原。BCA 法定量烟曲霉全细胞裂解抗原的蛋白浓度。

2.2 动物免疫

共 8 只雌性 BALB/c 小鼠，分为 3 组进行免疫，分别为烟曲霉全细胞裂解抗原皮下免疫组（编号为 F77 和 F78）、烟曲霉全细胞裂解抗原肌肉免疫组（编号为 F79 和 F80）以及烟曲霉全细胞裂解抗原+烟曲霉热灭活菌丝体腹腔免疫组（编号为 F93、F94、F95 和 F100）。

2.2.1 烟曲霉 24h 全细胞裂解抗原皮下免疫组

2 只 BALB/c 小鼠，全程采用烟曲霉全细胞裂解抗原皮下免疫的方案。免疫方案简述如下：首次免疫使用裂解抗原与弗氏完全佐剂 1:1 等体积混合后置于自动乳化机上完全乳化，取完全乳化后的免疫原试剂于小鼠皮下多点以及足垫处注射，抗原量 300 μ g/只；以后每隔 7 天以弗氏不完全佐剂与等体积裂解抗原充分乳化后以同样的方式于小鼠皮下多点注射，总共 6 次免疫。期间，分别在第 3 次、第 4 次、第 5 次和第 6 次免疫后，采微量小鼠尾静脉血，用间接 ELISA 法测定免疫小鼠血清抗体效价。

2.2.2 烟曲霉全细胞裂解抗原肌肉免疫组

2 只 BALB/c 小鼠，全程采用烟曲霉全细胞裂解抗原肌肉免疫方案。免疫方案简述如下：首次免疫使用烟曲霉裂解抗原与 QuickAntibody 快速免疫佐剂与等体积充分混合后，于小鼠后腿肌肉注射，抗原量为 225 μ g/只。分别于第 21 天和第 42 天按相同的方式加强免疫 1 次。在第 35 天和第 56 天采微量小鼠尾静脉血进行间接 ELISA 法测抗体效价。

2.2.3 烟曲霉全细胞裂解抗原+烟曲霉热灭活菌丝体混合腹腔免疫组

4 只 BALB/c 小鼠，全程采用烟曲霉全细胞裂解抗原+烟曲霉热灭活菌丝体腹腔免疫方案。免疫方案如下：首次免疫均为弗氏完全佐剂 200 μ l 腹腔注射，以后每隔 7 天，F93 为裂解抗原 600 μ g 腹腔注射；F94 为裂解抗原 600 μ g 和热灭活菌丝体 200 μ l (3×10^7)交替腹腔注射；F95 为热灭活菌丝体 200 μ l 腹腔注射；F100 为热灭活菌丝体 200 μ l 和裂解抗原 600 μ g 交替腹腔注射，共 8 次免疫。自第 3 次免疫后，分别在每次免疫后采微量小鼠尾静脉血，用间接 ELISA 法测定免疫小鼠血清抗体效价。

2.3 免疫小鼠血清抗体效价测定

取烟曲霉裂解抗原包被板条，包被浓度为 5 μ g/ml，100 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过夜。拍干后加入 300 μ L/孔的 0.25% 酪蛋白封闭液，4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。将小鼠免疫血清和正常未免疫小鼠血清（作为阴性对照）进行倍比稀释，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴下孵育 1h，用 0.1% PBST 洗板 5 次后拍干；加入按 1:3000 比例稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠总 IgG，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴下孵育 30min，洗板 8 次后拍干。加入 TMB（HRP 底物）显色液，100 μ l/孔，室温下避光孵育 10min 后，用 1M H_2SO_4 终止反应。使用酶标仪检测在波长 450nm 处的吸光度。免疫血清样本 A450 值与阴性对照值之比 ≥ 2.1 时，小鼠免疫血清所对应的最大稀释度即为抗体效价。

2.4 杂交瘤细胞的制备与鉴定

2.4.1 饲养细胞的制备

取 1 只 3~4 周龄的正常雌性 BALB/c 小鼠，去眼球后放血，待血流尽后颈椎

脱臼法处死，于 5%酒精中浸泡消毒 5min，在安全柜内无菌操作下取出小鼠脾脏，用眼科剪剪碎后在铜网上细细研磨并制成细胞悬液，用无血清 RPMI-1640 培养基（Roswell Park Memorial Institute-1640）（含庆大霉素 50 μ g/ml）反复洗涤 3 次，1000rpm 离心 5min，除去上清，用 36ml 含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞，60 μ l/孔均分至 96 孔细胞培养板中，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养待用。

2.4.2 小鼠 NS-1 细胞的复苏与培养

取-80 $^{\circ}$ C液氮罐内冻存的 NS-1 小鼠骨髓瘤细胞 1 支，立即放 37 $^{\circ}$ C水浴中快速溶解。无菌操作下吸取细胞悬液转移至 37 $^{\circ}$ C预热的 5ml 无血清杂交瘤细胞培养基中，室温下 1000rpm 离心 10min，弃上清后加入 5ml 预热的含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞，而后转移至 25cm²细胞培养瓶中，再加入培养基 5ml，置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养，每天观察细胞生长状况，定时换液，待细胞培养至对数生长期后，转入 75cm²细胞培养瓶中继续培养。

2.4.3 细胞融合

取免疫后血清效价较高的小鼠，去眼球放血，待血流尽后采用颈椎脱臼法处死，在 75%酒精中浸泡消毒 5min，于安全柜内无菌操作取出小鼠脾脏，剪碎后在铜网上研磨并制成细胞悬液，用无血清 RPMI-1640 培养基（含庆大霉素 50 μ g/ml）反复洗涤 3 次，洗至最后一次时进行细胞计数。取先前培养的 NS-1 骨髓瘤细胞洗涤 3 次并计数，将之与免疫小鼠脾细胞悬液按照 1:6 的比例混合，室温下 1000rpm 离心 10min，弃去上清；在 37 $^{\circ}$ C水浴中，1min 内缓慢逐滴匀速加入 1ml 37 $^{\circ}$ C预热的 PEG1450，边加边轻柔震荡混匀，并分别于 1min、2min、3min、4min、5min 内加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml RPMI 1640 终止融合，然后加入 10ml 含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养基洗涤，室温下 1000rpm 离心 5min，弃去上清。最后加入 36ml 含 15% FBS 的 RPMI-1640 培养基重悬细胞，约 60 μ l/孔，平均分至 96 孔细胞培养板上，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中培养过夜。

2.4.4 阳性克隆的筛选和亚克隆化

融合细胞后，第 2 日在 96 孔板中加入 2 $\times$ HAT 选择培养基，120 μ l/孔，以后

每隔 2~3 天用 1×HAT 选择培养基换液一次，约换液 4-5 次。待融合的细胞克隆长至约占孔底面积的 1/10 大小时，参照本部分 2.3 建立的间接 ELISA 法筛选阳性克隆。将初筛为阳性克隆的杂交瘤细胞转移至 24 孔细胞培养板中用 HT 培养液对其进行扩大培养。观察细胞状态，待细胞生长良好时，使用间接 ELISA 法进行复测，复测仍为阳性者再用 IFA 进行鉴定，IFA 步骤如下：沙氏营养肉汤中加入适量烟曲霉 ATCC 菌株分生孢子悬液，于摇床中 37℃，150rpm 培养 5h，而后静置培养 3h，使用无菌 1×PBS 洗涤菌落沉淀 3 次后，用适量 PBS 重悬菌落，取适量菌落制备免疫荧光涂片，晾干后浸泡于甲醇：丙酮体积比为 3：7 的溶液中，置于 -30℃ 固定 20min 后吹干，每孔分别加入 1:1000 稀释后的免疫鼠血清（阳性对照）、杂交瘤细胞培养上清、1:1000 稀释的正常小鼠血清（阴性对照）、含 15%FBS 的 RPMI-1640 细胞培养液（阴性对照），20μl/孔，置于湿盒中，37℃ 孵育 1h，0.1%PBST 洗涤 5 次后吹干。加入 1：40 比例稀释的荧光素（FITC）标记的山羊抗小鼠 IgG 避光孵育 30min，0.1%PBST 洗涤 5 次后吹干，0.25%伊文蓝 37℃ 避光染色 10min，0.1%PBST 洗涤 15min，吹干后甘油封片；荧光显微镜下观察结果并拍照。经 ELISA 和 IFA 筛选和鉴定后，阳性者采用有限稀释法进行亚克隆化，克隆化 2~3 次直至阳性率达 100%时，挑选分泌抗体效价高的杂交瘤细胞株进行扩增培养，置于液氮罐中冻存。

2.5 单克隆抗体腹水的制备与纯化

2.5.1 单克隆抗体腹水的制备

提前 1 周在小鼠腹腔内注射弗氏不完全佐剂 0.5ml，采用之前的方法复苏阳性杂交瘤细胞株，置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养，取对数生长期的细胞，离心收集细胞，用预冷的无血清 1640 培养基洗涤 2 次并进行细胞计数，用适量 1640 重悬细胞，按照每只小鼠 $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞/200μl 对小鼠进行腹腔注射，腹水大约在 1~2 周后产生，用 7 号注射针头收集腹水，离心并收集腹水上清，立即加入叠氮钠使其终浓度为 0.1%，4℃ 保存备用。

2.5.2 单克隆抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化收集到的单克隆抗体腹水。具体操作方法如下：

将腹水与 4℃、12000rpm 离心 30min，在腹水中加入 2 倍体积的乙酸钠缓冲液（0.06M、pH4.4），室温下搅拌并在 30min 内逐滴缓慢加入辛酸（每毫升稀释后腹水加入辛酸 33μl），4℃ 静置 2 小时，4℃、12000rpm 离心 30min，用定性滤纸过滤上清，并加入 1/10 体积的 0.1M PBS，用 NaOH 将 pH 值调至 7.4，冰浴搅拌下，缓慢加入固体硫酸铵 0.277g/ml（终浓度为 45%-50%），4℃ 静置过夜，4℃、12000rpm 离心弃上清，将沉淀溶于适量 0.01M PBS 中，4℃ 透析去除多余的硫酸铵，离心后收集抗体，用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计测定抗体蛋白浓度，并经 8%SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定抗体纯度（上样蛋白量为 10μg/孔；80V 跑浓缩胶，120V 跑分离胶 1h；将电泳后的凝胶置于考马斯亮蓝染色液 R250 中，室温下摇床上染色 1h；然后倒掉染色液，倒入脱色液直至完全覆盖凝胶块，于室温下摇床慢摇脱色 3h，期间视情况需更换脱色液 3~4 次至背景色完全脱去）。鉴定后抗体 4℃ 保存备用（用于生物素标记）或加入 50%甘油分装后冻存于-80℃ 备用（用于包被）。

2.6 单克隆抗体的免疫学特性鉴定

2.6.1 单克隆抗体亚类鉴定

采用间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体的亚类：包被烟曲霉裂解抗原包被 5μg/ml，50μl/孔，4℃包被过夜；拍干后加入 0.25%酪蛋白封闭液，300μL/孔，4℃封闭过夜后拍干。加入杂交瘤细胞培养上清，50μL/孔，37℃水浴孵育 1h，0.1% PBST 洗板 5 次后拍干，分别加入按 1:1000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠总 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgM，每孔 50μl，37℃水浴孵育 30min，洗板 8 次后拍干；加入 TMB 显色液，50μl/孔，室温下避光显色 10min 后，1M H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测定 A₄₅₀ 值。

2.6.2 单克隆抗体特异性鉴定

(1) 间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体特异性

包被烟曲霉 ATCC 菌株、烟曲霉 HK 菌株、白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌（酵母相）、黑曲霉、黄曲霉、土曲霉、构巢曲霉、镰刀菌、毛霉、微小根毛霉、葡萄牙念珠菌、季也蒙念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平

滑念珠菌、热带念珠菌、尖端赛多孢菌、多育荚节孢霉等真菌裂解抗原和烟曲霉乙醇沉淀多糖等真菌抗原包被浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ ，商品化葡聚糖（包被浓度 $5\mu\text{g/ml}$ ）、重组真菌抗原（烟曲霉 Afmp1cr、马尔尼菲篮状菌 Mp1p、新型隐球菌 Cpl1 和白念珠菌 Csa2）包被浓度为 $0.5\mu\text{g/ml}$ ， $50\mu\text{l/孔}$ ， 4°C 包被过夜。拍干后加入 0.25%酪蛋白封闭液， $300\mu\text{L/孔}$ ， 4°C 封闭过夜后拍干。加入单克隆抗体 $5\mu\text{g/ml}$ ， $50\mu\text{L/孔}$ ，以 9D47A1 和伯乐商品化试曲霉抗原检测试剂盒中抗 GM 大鼠单克隆抗体-HRP（R6）为对照，以稀释液为阴性对照， 37°C 水浴孵育 1h，0.1% PBST 洗板 5 次后拍干；加入按 1:3000 比例稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG（R6 组不加入此试剂，洗涤后直接显色），每孔 $50\mu\text{l}$ ， 37°C 孵育 30min，洗板 8 次后拍干。加入 TMB 显色液， $50\mu\text{l/孔}$ ，室温下避光显色 10min 后， $1\text{M H}_2\text{SO}_4$ 终止反应。酶标仪检测 A450。

（2）IFA 法鉴定单克隆抗体特异性

沙氏营养肉汤中加入适量烟曲霉 ATCC 菌株、构巢曲霉和黄曲霉分生孢子悬液，以及马尔尼菲篮状菌、白念珠菌和新型隐球菌孢子悬液于摇床中 37°C ，150rpm 培养 5h，而后静置培养 3h，使用无菌 $1\times\text{PBS}$ 洗涤菌落沉淀 3 次后，用适量 PBS 重悬菌落，取适量菌落制备免疫荧光涂片，晾干后浸泡于甲醇：丙酮体积比为 3：7 的溶液中，置于 -30°C 固定 20min 后吹干。IFA 操作步骤见 2.4.4，荧光显微镜下观察结果并拍照。

2.6.3 WB 鉴定单克隆抗体与烟曲霉全细胞裂解抗原的结合反应

抗原：分别培养 24h 和培养 4d 的烟曲霉 ATCC 全细胞裂解抗原；培养 4d 的烟曲霉 HK 全细胞裂解抗原。WB 步骤简述如下：抗原上样量为 $30\mu\text{g/孔}$ ，在上样前与 loading buffer 充分混合后 100°C 加热 10min，使蛋白变性；在电泳槽内加入稀释好的电泳液，80V 跑浓缩胶，转为 120V 跑分离胶 1h。将 SDS-PAGE 凝胶进行转印，按纤维垫、滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸、纤维垫的顺序，除去气泡后夹紧，固定于转印槽中，在转印槽内加入配制好的转印液，200mV 冰上转膜 75min。转膜结束后，拆开夹子，标注蛋白转印面的 PVDF 膜及蛋白转膜范围，5%脱脂奶粉（4 度保存预冷）室温封闭 2 小时。使用 5%脱脂奶粉-TBST 溶液将

单克隆抗体稀释至工作浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ ， 4°C 摇床上孵育过夜。 0.1% TBST 溶液洗膜后分别与相应的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG/IgM 反应，避光室温下摇床上孵育 1h。再次洗膜后，将 ECL 显色液 A、B 液 1: 1 混合，现配现用显色，使用 Bio-Rad 成像系统进行曝光拍照。

2.6.4 单克隆抗体识别抗原表位性质分析

用煮沸法、强碱处理法、高碘酸钠处理法和蛋白酶解法处理烟曲霉全细胞裂解抗原后，包被板条以检测处理后抗原与单克隆抗体的反应，根据处理前后的检测结果比对，判断对应单克隆抗体结合的表位性质是蛋白表位、糖表位还是糖蛋白表位。煮沸法和蛋白酶解法可以水解蛋白从而去除蛋白表位的影响；强碱处理法和高碘酸钠处理法可以水解聚糖和氨基酸的连接，去除多糖表位的影响。

具体方法如下：（1）煮沸法：将烟曲霉裂解抗原以 PBS 稀释为浓度 $5\mu\text{g/ml}$ ， 100°C 加热 10min， 16000g 离心 5min 后加样， $50\mu\text{l/孔}$ ， 4°C 包被过夜， 0.25% 酪蛋白封闭液快速封闭 2h。（2）强碱处理法：将烟曲霉裂解抗原以 50mM 氢氧化钠溶液稀释为浓度 $5\mu\text{g/ml}$ 常温包被， $50\mu\text{l/孔}$ 密封过夜，PBS 洗涤 3 次，拍干后 0.25% 酪蛋白封闭液快速封闭 2h。（3）高碘酸钠处理法：将烟曲霉裂解抗原分别以 0.02M 高碘酸钠溶液（处理组）/ 0.05M 乙酸钠溶液（对照组）包被， $5\mu\text{g/ml}$ ， $50\mu\text{l/孔}$ ，分别置于 4°C 反应 0.5h/1h；结束后弃液以 PBS 洗 4 次（ $150\mu\text{l/孔}$ ），每次 3min；以 0.25% 酪蛋白封闭液 $300\mu\text{l/孔}$ ， 37°C 快速封闭。（4）蛋白酶解法：将烟曲霉裂解抗原分别以 1mg/ml 胰蛋白酶溶液（处理组）/PBS（对照组）包被， $5\mu\text{g/ml}$ ， $50\mu\text{l/孔}$ ，分别置于 $4^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$ 反应 4h；结束后弃液以 PBS 洗 4 次（ $150\mu\text{l/孔}$ ），每次 3min；再加入 0.1mg/ml 胰蛋白酶抑制剂溶液， $50\mu\text{l/孔}$ ，常温反应 10min；结束后弃液以 PBS 洗 4 次（ $150\mu\text{l/孔}$ ），每次 3min；以 0.25% 酪蛋白封闭液 $300\mu\text{l/孔}$ ， 37°C 快速封闭。

ELISA 检测：取上述制备的板条，以等浓度未处理抗原包被板条作为对照，加入新制备的抗烟曲霉小鼠单抗，浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ ， $50\mu\text{l/孔}$ ， 37°C 孵育 1h； 0.1% PBST 洗 5 次，拍干；加入羊抗小鼠 IgG-HRP（1:3000，20%山羊血清简易

酶稀释液), 50 μ l/孔, 37°C 孵育 30 分钟; 0.1%PBST 洗 10 次, 每 5 次拍干 1 次; 加 TMB 显色液, 50 μ l/孔, 避光室温孵育 10min; 加入 1M H₂SO₄ 终止显色反应, 测定 450nm 处的吸光度。

2.7 生物素标记单克隆抗体及效价测定

2.7.1 单克隆抗体的生物素标记

将纯化后单克隆抗体用 0.01M PBS 缓冲液稀释至 2mg/ml, 再配制 10mM 的生物素溶液 (将 2.2mg 生物素溶于 500 μ l 双蒸水); 根据抗体亚类选择不同量的生物素溶液 (IgG 取 27 μ l, IgM 取 5 μ l) 加入到 1ml 浓度为 2mg/ml 的抗体中, 冰上孵育 2h 进行标记; 标记后的抗体 4°C 透析过夜, 期间换液 6 次。收集的标记抗体加入等体积甘油混匀后分装, 于 -80°C 冰箱保存备用。

2.7.2 生物素标记抗体的效价测定

使用 ELISA 法测定生物素标记抗体的效价, 步骤简述如下: 包被烟曲霉裂解抗原板条 5 μ g/ml; 加入梯度稀释的标记抗体, 50 μ l/孔, 37°C 水浴孵育 1h, 0.5%PBST 溶液洗板 5 次后拍干; 然后加入 1:1000 的 HRP 标记的链霉亲和素 (Streptavidin), 50 μ l/孔, 37°C 水浴孵育 30min, 0.5%PBST 溶液洗板 10 次后拍干; 加入 TMB 50 μ l/孔避光孵育 10min, 1M H₂SO₄ 终止反应; 酶标仪测定 A450 值。

2.8 单克隆抗体识别抗原表位相关性分析

采用竞争抑制 ELISA 分析单克隆抗体识别抗原表位, 步骤如下: 包被烟曲霉裂解抗原板条 5 μ g/ml 后先加入 100 μ g/ml 未标记的待检单克隆抗体 25 μ l, 再加入 1:1000 稀释的标记抗体 25 μ l, 37°C 水浴 30min, 0.5%PBST 洗板 5 次后拍干; 加入 50 μ l/孔的 1:1000 稀释的链霉亲和素-HRP, 37°C 水浴 30min, 0.5%PBST 洗板 10 次, 拍干; 加入 50 μ l/孔的 TMB 显色液, 室温避光孵育 10min, 再加入 50 μ l/孔的 1M H₂SO₄ 终止, 酶标仪读 A450 值。以单克隆抗体对同一生物素标记单克隆抗体的抑制率为阳性对照, 以无关单克隆抗体对标记单克隆抗体的抑制率为阴性对照, 计算各个单克隆抗体之间的抑制率。抑制率计算公式: $(1 - \text{各孔的 A450 值} / \text{阴性对照 A450 值}) \times 100\%$ 。结果判读: 以抑制率 > 75% 判断为表位

相关，25%<抑制率<75%为不完全相关，抑制率<25%为完全不相关。

3. 实验结果

3.1 免疫小鼠血清抗体效价测定

3 组免疫小鼠，共 8 只，免疫后均存活，方案 1（烟曲霉 24h 全细胞裂解抗原皮下免疫组）免疫 6 次后采小鼠尾静脉血测定血清抗体效价；方案 2（烟曲霉 24h 全细胞裂解抗原肌肉免疫组）免疫 3 次后采小鼠尾静脉血测定血清抗体效价；方案 3（烟曲霉 24h 全细胞裂解抗原+烟曲霉热灭活菌丝体腹腔免疫组）免疫 8 次后采小鼠尾静脉血测定血清抗体效价。结果如表 1-1 所示，皮下免疫组的小鼠血清抗体效价最高，达到 1:40000，且小鼠 F78 血清检测 A450 值比 F77 高，其次为腹腔免疫组，达到 1:20000，而肌肉免疫组最弱为 1:1000 和 1:10000，考虑原因可能为烟曲霉全细胞裂解抗原成分复杂，以多糖为主，而多糖的免疫原性较弱，难以引起机体有效的免疫应答。最终选择 F78 号小鼠和 F100 号小鼠进行加强免疫。

表 1-1 烟曲霉 24h 全细胞裂解抗原免疫小鼠血清抗体效价测定

Table 1-1 Determination of serum antibody titer of mice immunized with *A. fumigatus* lysate antigen

免疫小鼠序号	免疫方案	免疫次数	抗体最高效价
F77	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 300 μg	6 次	1:40000
	皮下多点注射（弗氏佐剂）		
F78	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 300 μg	6 次	1:40000
	皮下多点注射（弗氏佐剂）		
F79	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 225 μg	3 次	1:1000
	肌肉注射（QuickAntibody 快速免疫佐剂）		
F80	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 225 μg	3 次	1:10000
	肌肉注射（QuickAntibody 快速免疫佐剂）		

F93	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 600μg, 腹腔注射	8 次	1:20000
F94	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 600μg, 热灭活菌丝体 200μl (3×10 ⁷)交替腹腔注射	8 次	1:10000
F95	热灭活菌丝体 200μl (3×10 ⁷)腹腔注 射	8 次	1:10000
F100	烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原 600μg, 热灭活菌丝体 200μl (3×10 ⁷)交替腹 腔注射	8 次	1:20000

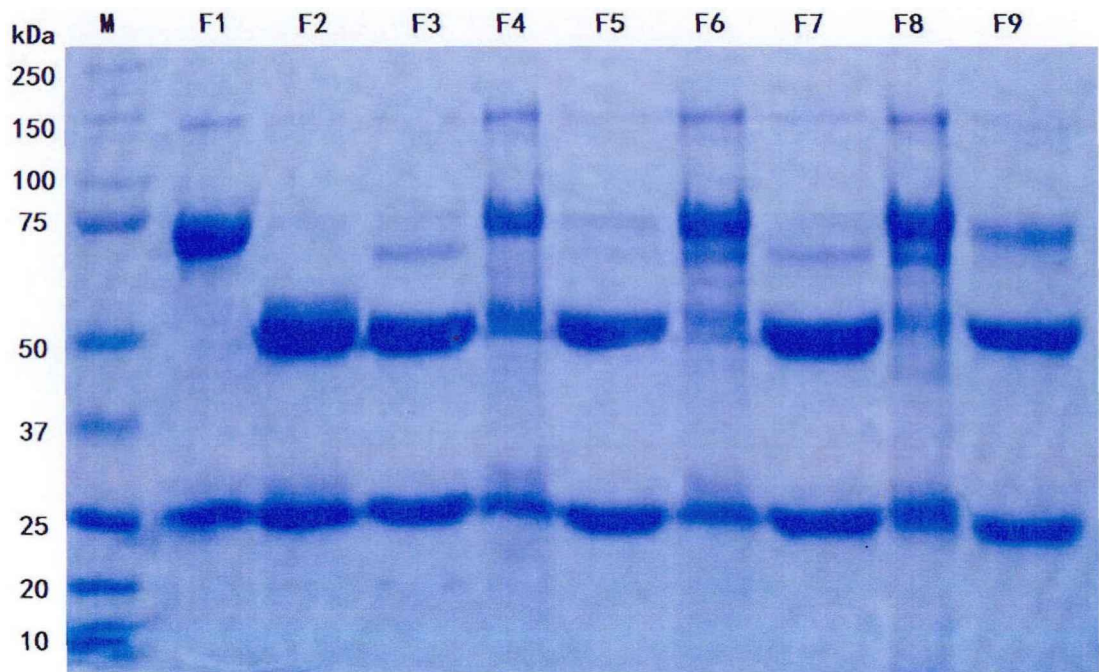
3.2 杂交瘤细胞株的建立

包被烟曲霉 24h 全细胞裂解抗原，采用间接 ELISA 方法筛选阳性的杂交瘤细胞，与 IFA 结合鉴定，最终获得 18 株分泌抗烟曲霉抗体的杂交瘤细胞株，分别命名为 F1~F18，并进行亚克隆建株保存。

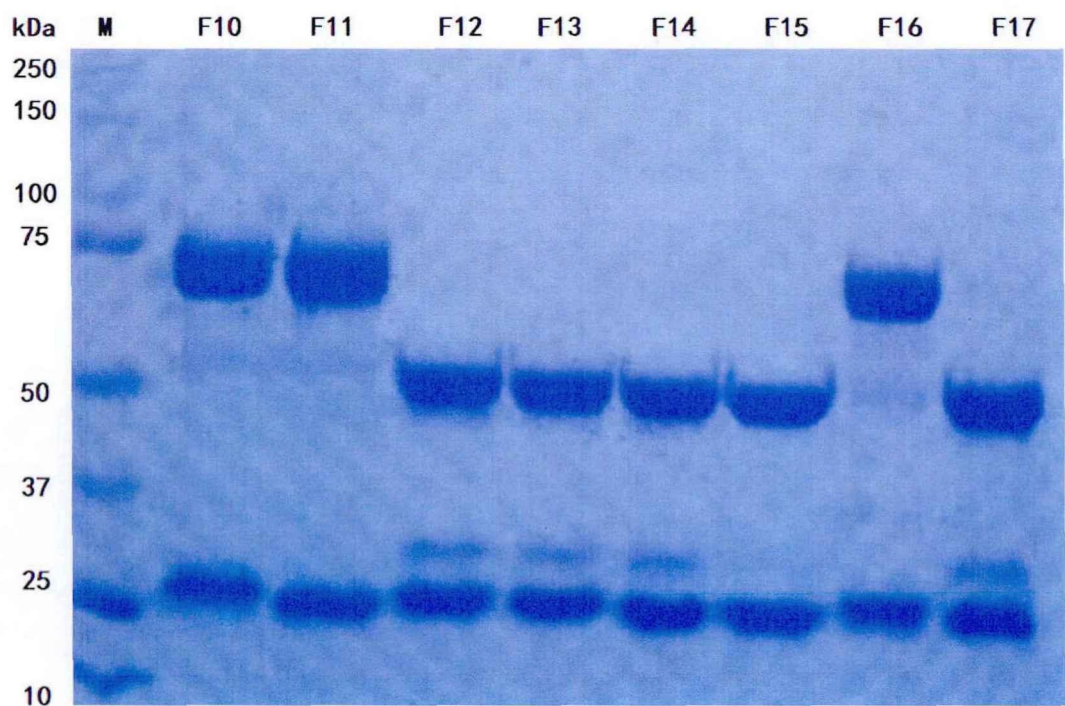
3.3 抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的免疫学特性鉴定

3.3.1 单克隆抗体纯度鉴定

制备腹水时，由于 F18 细胞株产生腹水极慢，因此只纯化了 17 株单克隆抗体，分别为 F1~F17。使用 SDS-PAGE 鉴定纯化的 17 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的纯度，结果如图 1-1 所示，F1、F4、F6、F8、F9、F10、F11 和 F16 条带集中于 25kDa 和 75kDa，符合 IgM 型抗体凝胶电泳的特征，而 F2、F3、F5、F7、F12、F13、F14、F15 和 F17 条带集中于 25kDa 和 50kDa，符合 IgG 型抗体凝胶电泳的特征。另外，图中条带集中，无明显杂条带，提示从腹水中纯化下来的抗体纯度较高。



A



B

图 1-1 SDS-PAGE 鉴定 17 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体(图 A, B)

Figure 1-1 SDS-PAGE identification of 17 strains of mouse MAb against *A. fumigatus*
M: 蛋白 Marker; 泳道 1-17 分别为抗体 F1-F17

3.3.2 单克隆抗体亚类和纯化抗体效价测定

经间接 ELISA 鉴定单克隆抗体亚类显示，18 株单克隆抗体中有 8 株为 IgM 型抗体(编号：F1、F4、F6、F8、F9、F10、F11 和 F16)；10 株为 IgG1 型抗体，分别为 F2、F3、F5、F7、F12、F13、F14、F15、F17 和 F18。

使用间接 ELISA 检测纯化单克隆抗体的抗体效价，如图 1-2 所示，其中 F1、F2、F9 和 F13 的检测下限为 0.05 μ g/ml；F4 和 F6 检测下限为 0.2 μ g/ml；F5、F8、F10、F11、F12、F14、F15、F16 和 F17 检测下限为 0.0031 μ g/ml；而 F3 和 F7 的检测下限则只有 50 μ g/ml，考虑这两株细胞未在小鼠体内产生有效抗体，或抗体未纯化下来。

表 1-2 抗烟曲霉小鼠单抗亚类鉴定及效价测定汇总表

Table1-2 Subclass identification and potency determination of anti *A. fumigatus* mouse MAbs

抗体编号	抗体亚类	检测下限 (μ g/ml)
F1	IgM	0.05
F2	IgG1	0.05
F3	IgG1	50
F4	IgM	0.2
F5	IgG1	0.0031
F6	IgM	0.2
F7	IgG1	50
F8	IgM	0.0031
F9	IgM	0.05
F10	IgM	0.0031
F11	IgM	0.0031
F12	IgG1	0.0031
F13	IgG1	0.05
F14	IgG1	0.0031
F15	IgG1	0.0031
F16	IgM	0.0031
F17	IgG1	0.0031

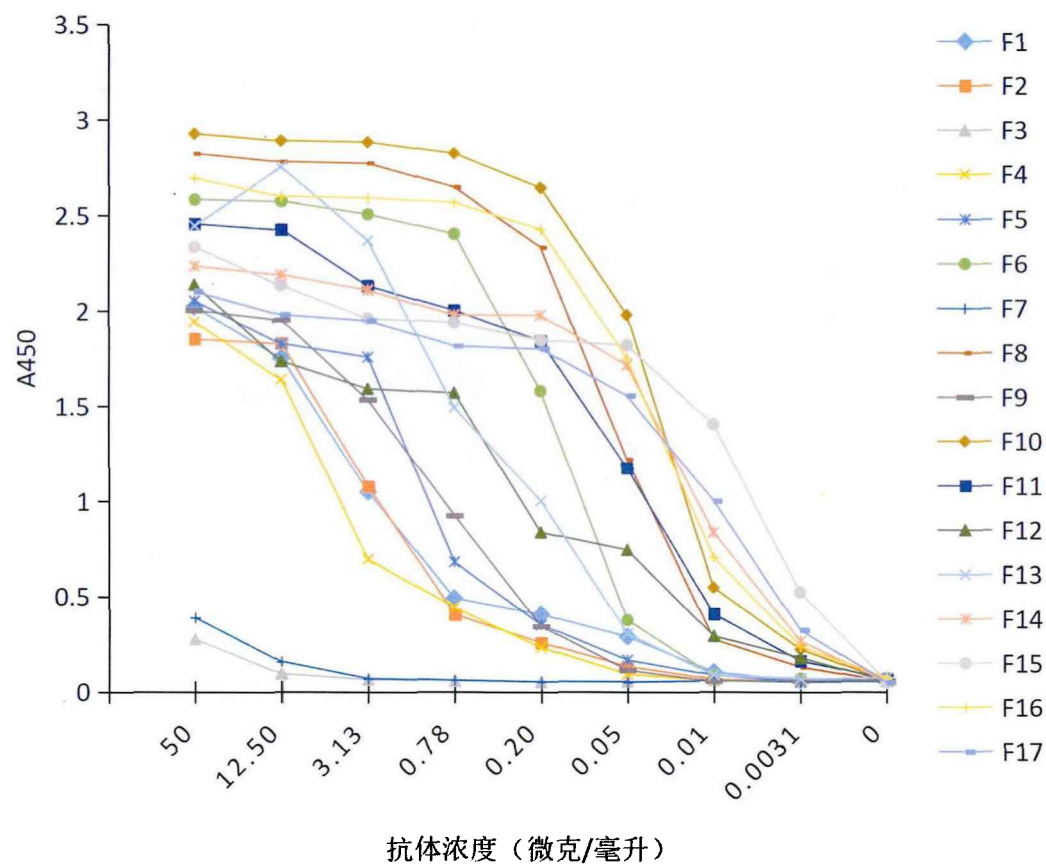


图 1-2 间接 ELISA 法检测纯化的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体效价

Figure 1-2 The titer of purified anti-*A. fumigatus* mouse MAb detected by indirect ELISA

3.3.3 单克隆抗体特异性鉴定

(1) ELISA 法鉴定纯化单克隆抗体的特异性

使用间接 ELISA 检测纯化单克隆抗体与不同真菌裂解抗原（烟曲霉 ATCC 菌株、烟曲霉 HK 菌株、白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌（酵母相）、黑曲霉、黄曲霉、土曲霉、构巢曲霉、镰刀菌、毛霉、微小根毛霉、葡萄牙念珠菌、季也蒙念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌，尖端赛多孢菌、多育荚节孢霉）及重组抗原（烟曲霉特异性甘露糖蛋白 Afmp1cr、马尔尼菲篮状菌重组蛋白 Mp1p、新型隐球菌重组蛋白 Cpl1 和白念珠菌重组蛋白 Csa2）的结合，为对比新制备抗烟曲霉小鼠单抗和实验室之前制备的抗烟曲霉小鼠单抗和商品化试剂盒中单抗的优劣，以 9D47A1^[32]和伯乐商品化

曲霉抗原检测试剂盒中抗 GM 大鼠单克隆抗体-HRP (R6) 为曲霉对照, 以稀释液为阴性对照。结果表明 (表 1-3), 除 F3 和 F7 外, 本次纯化的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体均与烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原和烟曲霉 HK 4d 裂解抗原结合, 其中 8 株 IgM 型抗体与黑曲霉、土曲霉、黄曲霉和构巢曲霉有较为明显的交叉反应, 其中 F1, F4 与商品化试剂盒中的抗烟曲霉大鼠单抗 R6 的结合谱系较为相似, 但是与烟曲霉 Afmp1cr 无交叉, 提示其结合靶点可能不是 Afmp1cr; F6、F8 和 F16 还与镰刀菌有交叉反应; 7 株 IgG1 型抗体则只特异性与烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原及其乙醇沉淀多糖发生反应, 与烟曲霉 HK 菌株抗原、烟曲霉 Afmp1cr 以及其他 22 种真菌抗原均无结合, 提示这组抗体结合的抗原可能仅仅存在于烟曲霉 ATCC 菌株, 且结合位点与烟曲霉 Afmp1cr 无交叉。对比发现, 9D47A1 则不与烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原及其沉淀多糖反应, 而与烟曲霉 HK 4d 裂解抗原和黑曲霉、土曲霉、黄曲霉和构巢曲霉裂解抗原均有结合反应, 说明 9D47A1 可能只能识别晚期的曲霉抗原, 同时也反映出不同来源烟曲霉菌株的抗原存在差异。另外, 结合纯化单克隆抗体效价, 考虑 F3 和 F7 这两株细胞未在小鼠体内产生有效抗体, 或抗体未能纯化下来, 后续抗体特性鉴定实验将排除 F3 和 F7 这两株抗体。

表 1-3 间接 ELISA 法鉴定抗烟曲霉小鼠单抗的特异性
Table 1-3 Identification of mouse MAb against *A.fumigatus* by indirect ELISA

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	9D47A1	R6	阴参
烟曲霉 ATCC	++	++	-	+	+	+	-	+	++	+	+	++	++	++	++	+	+	-	++	-
烟曲霉 HK	+++	-	-	+++	-	+++	-	+++	++	+++	++	-	-	++	-	+++	-	+++	++	-
黑曲霉	+++	-	-	+++	-	+	-	++	++	+	++	-	-	-	-	+	-	+++	+++	-
土曲霉	++	-	-	++	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	-
黄曲霉	+++	-	-	++	-	+	-	++	++	++	++	-	-	-	-	+	-	+	++	-
构巢曲霉	+++	-	-	+++	-	++	-	+++	+++	++	++	-	-	-	-	++	-	+++	+++	-
马尔尼菲篮状菌	++	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
新型隐球菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
镰刀菌	-	-	-	-	-	+++	-	+++	+	+++	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
白念珠菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
季也蒙念珠菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
克柔念珠菌	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
近平滑念珠菌	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
光滑念珠菌	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
热带念珠菌	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-
葡萄牙念珠菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 1-3 间接 ELISA 法鉴定抗烟曲霉小鼠单抗的特异性(续)
Table 1-3 Identification of anti *Aspergillus fumigatus* mouse MAbs by indirect ELISA (continued)

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	9D47A1	R6	阴参
微小根毛霉	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
毛霉	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
多有英节孢霉	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尖端赛多孢菌	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
烟曲霉 ATCC	+++	++	-	+++	+++	++	-	+++	++	+++	+	+++	++	++	++	++	+++	-	++	-
乙醇沉淀多糖																				
β葡聚糖	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
烟曲霉 Afmplcr	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
马尔尼菲篮状菌																				
Mplp	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
白念珠菌 Csa2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
新型隐球菌 Cpl1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.0>A450 值>0.5 为“+”; 2.0>A450 值>1.0 为“++”3.0>A450 值>2.0 为“+++”; A450 值>3.0 为“++++”

(2) IFA 鉴定单克隆抗体的特异性

将烟曲霉 ATCC 分生孢子培养到孢子肿胀及出芽阶段并制备涂片，IFA 检测除 F3 和 F7 外的 15 株纯化单克隆抗体与烟曲霉肿胀孢子及早期菌丝的免疫反应。结果如表 1-4 所示：13 株纯化单克隆抗体可与烟曲霉菌丝体出现不同程度的结合，而 F2 和 F14 这两株抗体与烟曲霉菌丝体不结合。根据荧光密度分布（图 1-3a 和 b）判断：13 株单克隆抗体主要结合于烟曲霉肿胀孢子以及早期菌丝体细胞壁的表面。另外，IgM 型抗体（如 F1、F4、F9、F11 和 F16 等）则与构巢曲霉和黄曲霉有不同程度的交叉反应，F1、F4、F6 和 F10 还与马尔尼菲篮状菌有微弱反应，而 IgG1 型抗体（如 F5、F12、F12、F15 和 F17 等）与马尔尼菲篮状菌、构巢曲霉、黄曲霉、白念珠菌和新型隐球菌均无交叉反应。综合抗体与不同真菌的免疫荧光结果，F1、F4、F9、F11 和 F16 对烟曲霉以及其他曲霉种属培养早期的曲霉肿胀孢子和菌丝具有相对较好的结合反应，提示有作为后续用于诊断抗体的潜力。

表 1-4 IFA 鉴定 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体与不同真菌的免疫反应

Table 1-4 Immunological responses of 15 MAbs against *A.fumigatus* to different fungi by IFA

抗体	类型	真菌种类					
		烟曲霉 ATCC	马尔尼菲篮状菌	构巢曲霉	黄曲霉	白念珠菌	新型隐球菌
F1	IgM	+++	+	+++	+	-	-
F4	IgM	++	+	+	+	-	-
F6	IgM	±	±	±	±	-	-
F8	IgM	+	-	+	+	-	-
F9	IgM	+++	-	+++	+	-	-
F10	IgM	+	±	+++	±	-	-
F11	IgM	+++	-	+++	+++	-	-
F16	IgM	+	+	+++	+++	-	-
F2	IgG1	-	-	-	-	-	-

F5	IgG1	+	-	-	-	-	-
F12	IgG1	+	-	-	-	-	-
F13	IgG1	++	-	-	-	-	-
F14	IgG1	-	-	-	-	-	-
F15	IgG1	++	-	-	-	-	-
F17	IgG1	+	-	-	-	-	-

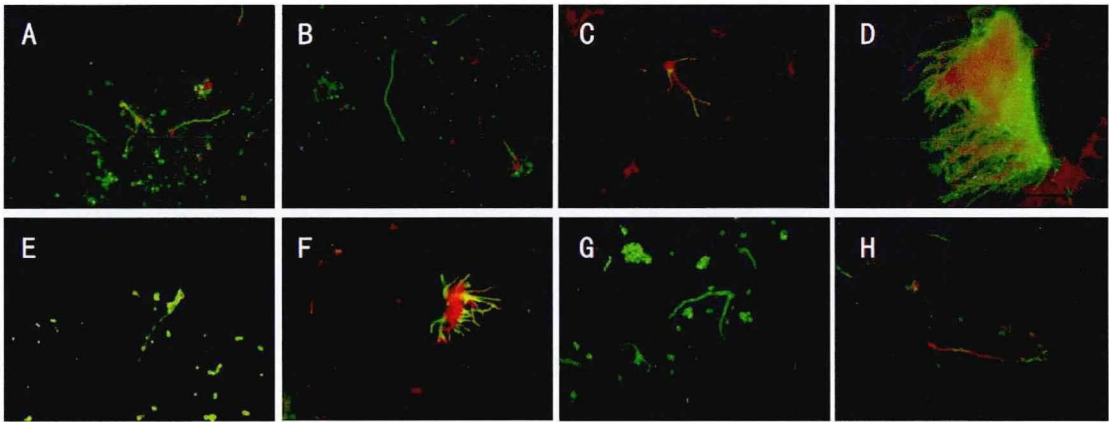


图 1-3a IFA 鉴定 8 株 IgM 型抗体与烟曲霉菌丝及肿胀孢子的结合反应

Figure. 1-3a Identification of immune responses of 8 IgM strains to *A.fumigatus* hyphae and swollen spores by IFA

A-H, 依次为 烟曲霉小鼠单抗 F1, F4, F6, F8, F9, F10, F11, F16

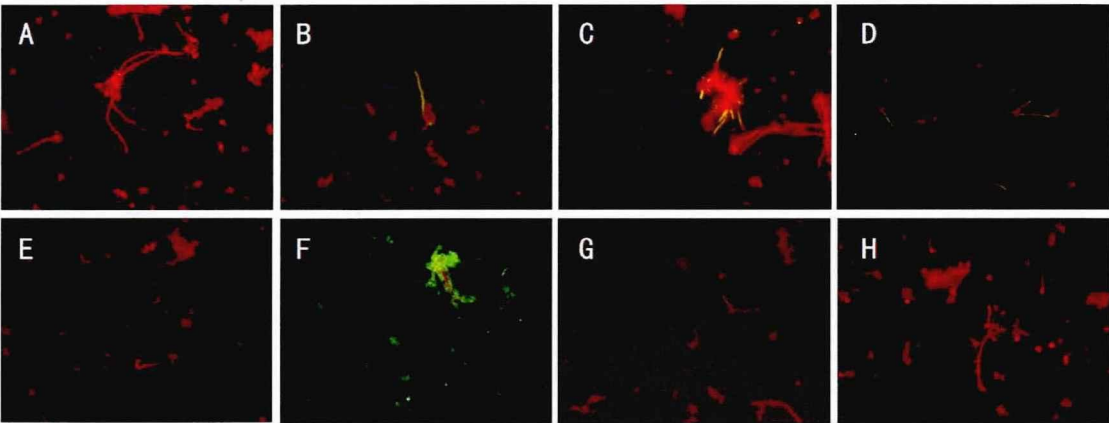


图 1-3b IFA 鉴定 7 株 IgG1 型抗体与烟曲霉菌丝及肿胀孢子的免疫反应

Figure 1-3b Identification of immune responses of 7 IgG1 strains to *A.fumigatus* hyphae and swollen spores by IFA

A-H, 依次为 烟曲霉小鼠单抗 F2, F5, F12, F13, F14, F15, F17, 阴参

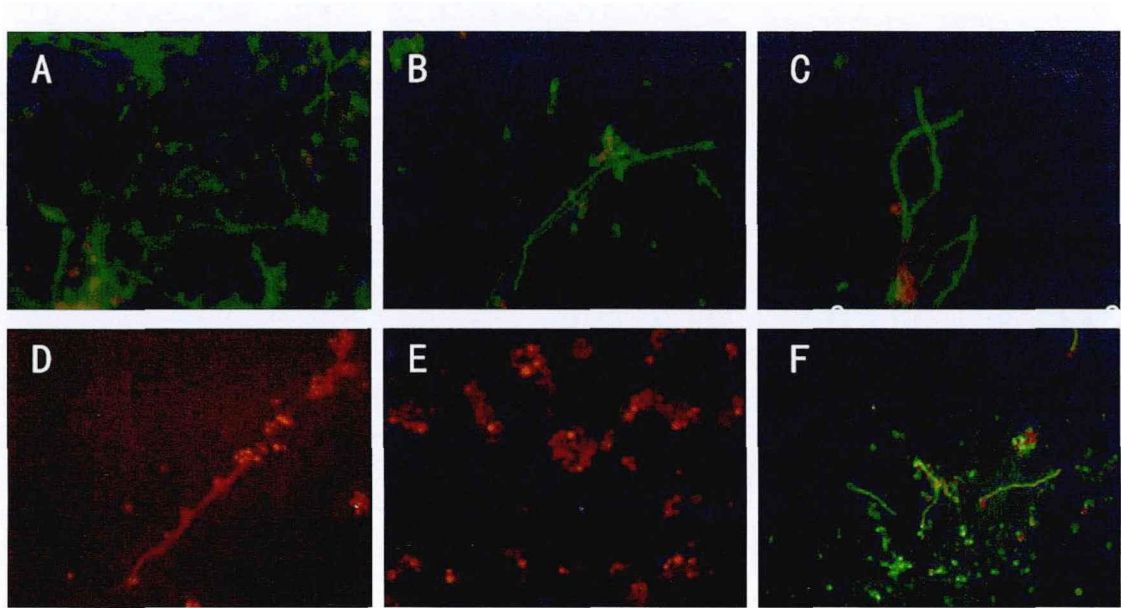


图 1-3c IFA 鉴定 F1 与不同真菌的结合

Figure 1-3c Identification of F1 binding to different fungi by IFA

A: 马尔尼菲篮状菌; B: 构巢曲霉; C: 黄曲霉; D: 白念珠菌; E: 新型隐球菌; F: 烟曲霉

3.3.4 WB 鉴定单克隆抗体与烟曲霉裂解抗原的结合

采用 WB 对 15 株抗烟曲霉小鼠单抗进行鉴定，并以 9D47A1 和伯乐 GM 试剂盒中 R6 作为曲霉对照。结果发现（见表 1-5 和图 1-4），本次制备的 8 株 IgM 型抗体（F1、F4、F6、F8、F9、F10、F11、F16）与烟曲霉 ATCC 菌株和 HK 菌株均有结合，且与培养 24h 和 4d 的烟曲霉裂解抗原均有结合：F1、F4 与 ATCC 24h 裂解抗原结合条带范围在 50-100kDa，结合 ATCC 和 HK 4d 裂解抗原的条带范围在 50-250kDa；F6、F8-F11 和 F16 与 ATCC 24h 裂解抗原结合条带范围在 37-100kDa，其中 F6 和 F16 不与 ATCC 4d 裂解抗原结合，只分别与 HK4d 裂解抗原的 50-250 kDa 和 50-100 kDa 结合，F8-F11 则与 HK 4d 裂解抗原的 50-100kDa 结合。而 IgG1 型的 7 株抗体（F2、F5、F12、F13、F14、F15、F17）与烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原在 25kDa 处结合，而不与培养 4d 的烟曲霉裂解抗原结合（F12 与 HK 4d 裂解抗原的 50-250 kDa 有微弱结合）。另外，9D47A1 不与 ATCC 24h 裂解抗原结合，与 ATCC 和 HK 菌株裂解抗原的结合条

带范围为 75-250kDa；R6 与 ATCC 24h 裂解抗原结合条带范围在 50-100 kDa，与 ATCC 和 HK 菌株裂解抗原的结合条带范围为 50-250 kDa。

综合来看，本次制备的 8 株 IgM 型抗体的结合范围与 R6 相似，既结合早期抗原也结合晚期抗原，较 9D47A1 广，而 7 株 IgG1 型抗体则只结合烟曲霉 ATCC 早期抗原，与 ELISA 的结果相符，提示我们这 8 株 IgM 型抗体更为接近商品化试剂盒中使用的抗体，可能可以用于对侵袭性曲霉病早期诊断的研究中。

表 1-5 WB 鉴定 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体与不同分离株烟曲霉抗原的结合反应

Table 1-5 Identification of 15 strains of MAb against *A. fumigatus* by WB

抗体	抗体类型	抗体结合条带		
		ATCC 24h 裂解抗原	ATCC 4d 裂解抗原	HK 菌株 4d 裂解抗原
F1	IgM	50-100kDa	50-250kDa	50-250kDa
F4	IgM	50-100kDa	50-250kDa	50-250kDa
F6	IgM	37-100kDa	-	50-250kDa
F8	IgM	37-100kDa	50-100kDa	50-100kDa
F9	IgM	37-100kDa	50-100kDa	50-100kDa
F10	IgM	50-100kDa	50-100kDa	50-100kDa
F11	IgM	37-100kDa	50-100kDa	50-100kDa
F16	IgM	37-100kDa	-	50-100kDa
F2	IgG1	25kDa	-	-
F5	IgG1	25kDa	-	-
F12	IgG1	25kDa	-	50-250kDa
F13	IgG1	25kDa	-	-
F14	IgG1	25kDa	-	-
F15	IgG1	25kDa	-	-
F17	IgG1	25kDa	-	-
9D47A1	IgG1	-	75-250kDa	75-250kDa
R6		50-100 kDa	50-250kDa	50-250kDa

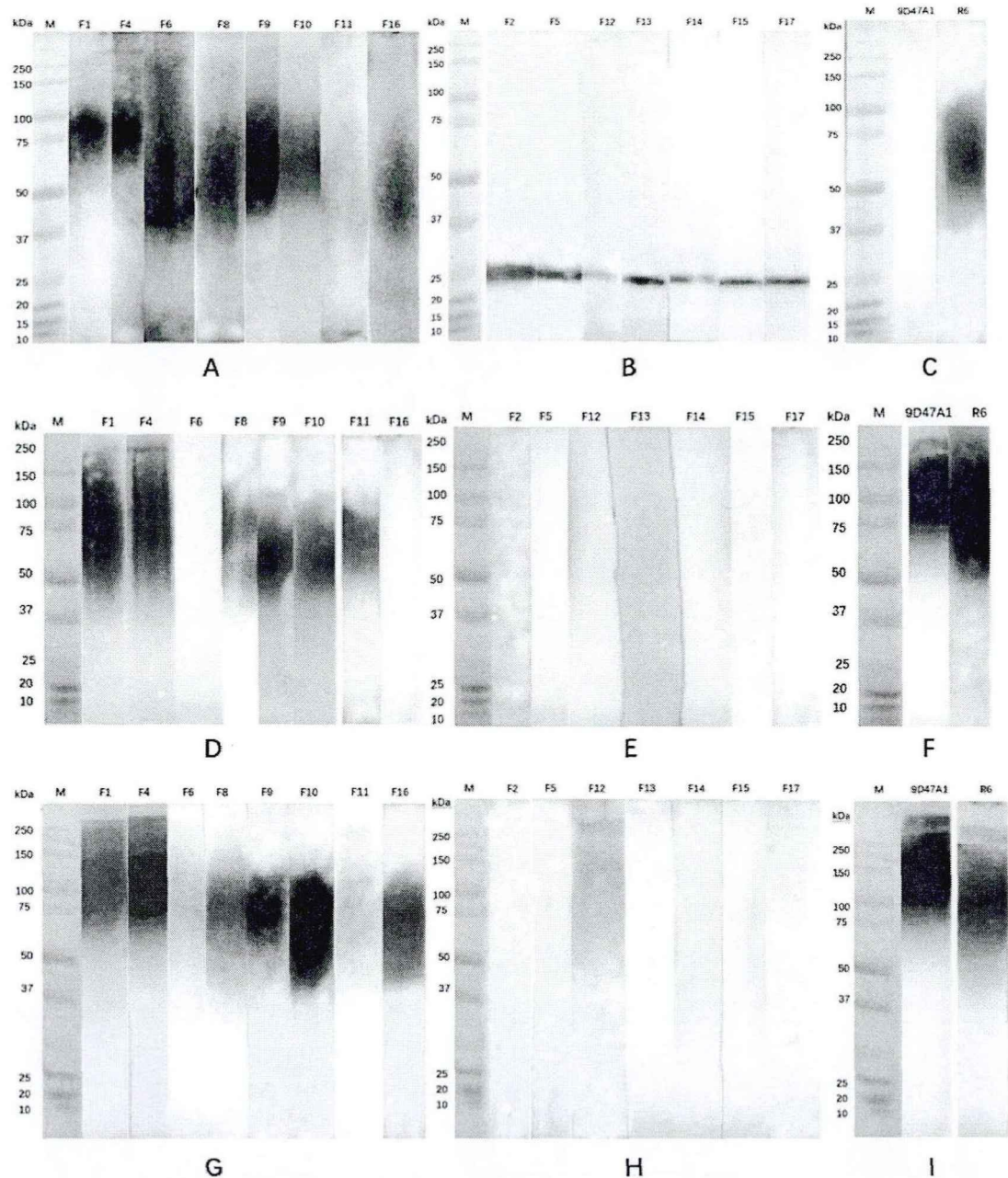


图 1-4 WB 鉴定 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体与不同分离株烟曲霉抗原的结合反应

Figure1-4 Identification of 15 strains of MAb against *A. fumigatus* by WB

A-C: 15 株抗体与 9D47A1 和 R6 与烟曲霉 ATCC 24h 裂解抗原的结合反应；D-F: 15 株抗体与 9D47A1 和 R6 与烟曲霉 ATCC 4d 裂解抗原的结合反应；G-I: 15 株抗体与 9D47A1 和 R6 与烟曲霉 HK 4d 裂解抗原的结合反应；

3.3.5 单克隆抗体识别抗原结合位点性质分析

采用 4 种方法（煮沸法、强碱处理法、高碘酸钠处理法和蛋白酶解法）处理烟曲霉裂解抗原后，并分别与 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体反应，根据处理前后的检测结果比对，判断对应单克隆抗体结合的表位性质是蛋白表位、糖表位还是糖蛋白表位。煮沸法和蛋白酶解法可以水解蛋白从而去除蛋白表位的影响；强碱处理法和高碘酸钠处理法可以水解聚糖和氨基酸的连接，去除多糖表位的影响。

结果如表 1-6 所示，煮沸法中，A450 值降低大于 0.4 的有 F2、F8、F10、F12、F13、F15、F16、F17，考虑可能为蛋白表位；而 F9 和 F11 在煮沸处理后出现了 A450 值上升，可疑为多糖表位，在蛋白破坏后表位暴露更加充分；而强碱处理法破坏聚糖与氨基酸结合后，仅 F1、F4 的数值变化较明显（>0.5），考虑与多糖表位结合；在高碘酸钠处理破坏多糖后，F1、F4 和 F11 数值下降明显（>0.5），考虑与多糖表位结合；在蛋白酶解法破坏蛋白后发现，全部 15 种抗体 A450 值均有不同程度的下降，考虑均与蛋白表位结合。

综合上述 4 种处理方法的结果：抗体 F1、F4、F11 识别抗原表位性质为糖蛋白表位，F9 可疑识别糖蛋白表位，F6 可疑识别蛋白表位，而 F2、F5、F8、F10、F12、F13、F14、F15、F16 和 F17 识别抗原的蛋白表位。

表 1-6 单克隆抗体识别抗原结合表位性质鉴定

Table 1-6 Identification of antigen-binding epitope properties recognized by MAb against *A.*

fumigatus

抗体 编号	抗体 亚类	Δ 值				评价
		煮沸法	强碱处理法	高碘酸钠处理法	蛋白酶解法	
<i>F1</i>	<i>IgM</i>	<i>0.205</i>	<i>0.589</i>	<i>0.898</i>	<i>1.916</i>	糖蛋白表位
F2	IgG1	0.425	0.275	0.115	1.699	蛋白表位
<i>F4</i>	<i>IgM</i>	0.119	0.699	1.019	1.506	糖蛋白表位
F5	IgG1	0.349	0.218	-0.028	1.715	蛋白表位
F6	IgM	0.05	-0.002	-0.455	0.462	可疑蛋白表位
F8	IgM	0.673	0.119	-0.4	1.435	蛋白表位

<i>F9</i>	<i>IgM</i>	-0.138	0.105	0.069	1.741	可疑糖蛋白表位
F10	IgM	0.559	0.401	-0.331	1.376	蛋白表位
<i>F11</i>	<i>IgM</i>	-0.443	0.132	0.505	0.762	糖蛋白表位
F12	IgG1	0.355	0.087	0.042	1.992	蛋白表位
F13	IgG1	0.57	0.198	-0.241	1.933	蛋白表位
F14	IgG1	0.353	0.264	-0.001	2.023	蛋白表位
F15	IgG1	0.285	0.184	0.03	1.871	蛋白表位
F16	IgM	0.691	0.21	-0.411	1.389	蛋白表位
F17	IgG1	0.403	0.185	0.031	1.964	蛋白表位

Δ值=对照组 A450 值-处理组 A450 值

3.4 生物素标记抗体效价测定

生物素标记抗体并测定其抗体效价，以无关的生物素标记马尔尼菲篮状菌抗体 biotin-M12^[42]和生物素为阴性对照，结果如图 1-5 所示，以阳性检测值减去相应稀释度阴性对照检测值等于 2.0 时的生物素标记抗体稀释度为工作浓度。由此可见，biotin-F1、biotin-F8、biotin-F10 和 biotin-F16 的工作浓度在 1:1000~1:8000 之间，而其余标记抗体均效价过低 (<1: 1000)，有可能因为生物素标记导致抗体的空间结构发生改变^[43]。

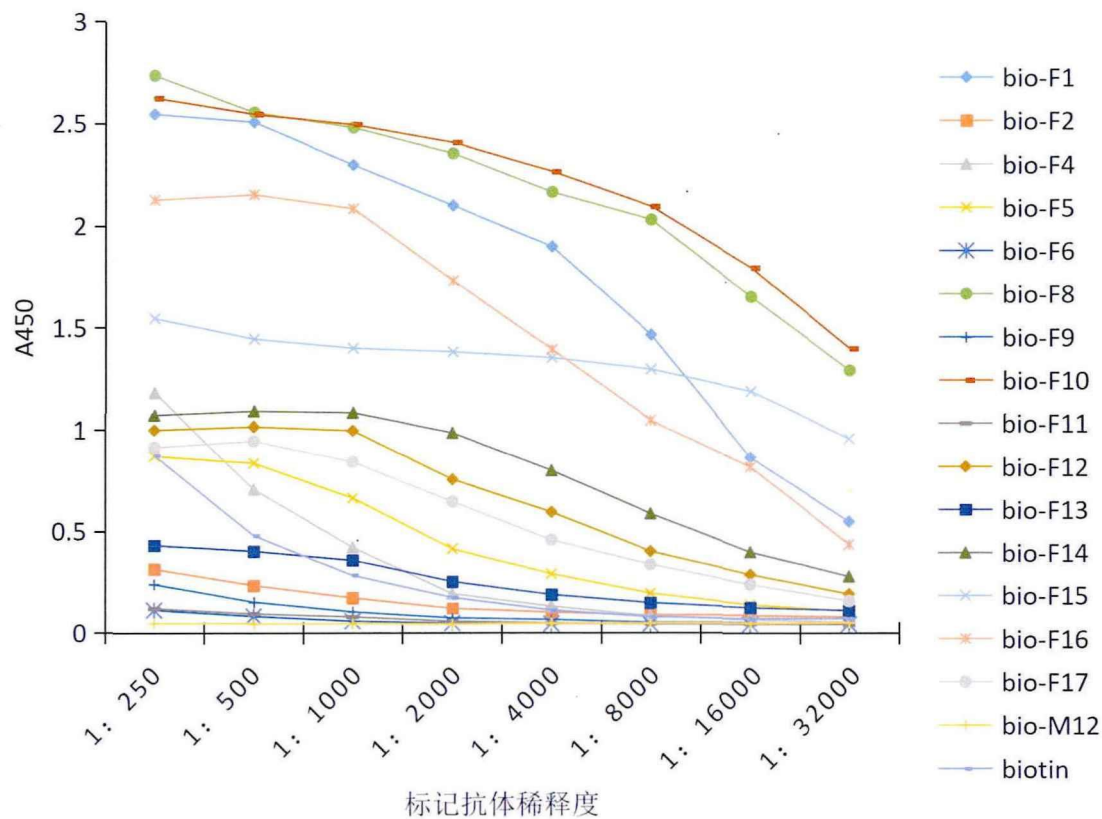


图 1-5 生物素标记的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体效价测定

Figure 1-5 Determination of the titer of biotin labeled MAb against *A. fumigatus*

3.5 单克隆抗体识别抗原表位相关性分析

采用竞争 ELISA 实验分析 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的抗原结合表位，由于部分生物素标记抗体效价过低，因此本实验仅纳入部分生物素标记抗体，结果仅供参考。根据公式计算抑制率显示，单克隆抗体 F1、F4、F8、F10、F13 和 F16 对自身的抑制率均>75%，考虑实验结果可靠；F1 和 F4 相互间抑制率>85%，表明这两株单克隆抗体的结合位点相同；同样的，F8 和 F16 相互间抑制率>84%，表明这两株单克隆抗体的结合另一个相同位点，另外，F10 与这两株抗体的抑制率>66%，说明 F10 与 F8 和 F16 有部分结合位点相同；而 F13 与其余单克隆抗体抑制率均<20%，说明其单独结合另一个位点。（表 1-7）

表 1-7 竞争 ELISA 分析抗烟曲霉小鼠单克隆抗体识别抗原结合位点

Table 1-7 Competitive ELISA analysis results of antigen binding sites recognized by MAb against *A. fumigatus*

抗体	抑制率 (%)					
	F1	F4	F8	F16	F10	F13
biotin-F1	<u>95</u>	<u>85</u>	2	0	0	0
biotin-F4	<u>89</u>	<u>89</u>	4	6	19	9
biotin-F8	13	4	<u>88</u>	<u>93</u>	<u>72</u>	2
biotin-F16	22	15	<u>84</u>	<u>91</u>	<u>66</u>	1
biotin-F10	19	15	<u>95</u>	<u>95</u>	<u>90</u>	0
Biotin-F13	1	2	0	0	0	<u>91</u>

4. 讨论

这些年来，随着化疗药物、免疫抑制剂、激素、广谱抗菌药以及其他药物的广泛使用，再加上器官移植技术等侵入性诊疗的普遍开展，以及获得性免疫缺陷综合征和患恶性肿瘤的患者人数不断增加，导致了侵袭性真菌病的发病率呈不断上升趋势。其中，IA 是最常见的侵袭性真菌病之一，由于临床表现及症状体征不典型，影像学表现无明显特异性，早期难以诊断，容易导致抗真菌治疗的不及时，从而发生不良预后以及高死亡率。据报道，侵袭性曲霉病的病死率超过 50%^[44]，重症监护病房死亡率高达 80%^[45]，给社会 and 患者家庭带来了沉重负担。

IA 的诊断包括真菌培养、组织病理、分子诊断、血清学诊断等^[46]，但由于真菌培养耗时长，组织病理诊断需要侵入性操作，对于免疫力低下的患者来说风险极大，而分子诊断容易因环境污染而出现假阳性，因此目前的研究热点仍为血清学诊断。目前针对曲霉抗原较为敏感和特异的血清学检测方法主要是 GM 试验，多用于 IA 的早期诊断以及患者抗真菌药物疗效的监测。但由于个体免疫力的不同，以及服用或进食某些药物和食物的影响，外加与其他真菌例如青霉属和拟青霉属存在交叉反应等原因，GM 检测的敏感度和特异度在不同患者人群中诊断性能相差较大，无法满足临床需求。因此，迫切需要一个具备有敏感度和特异度的新的曲霉抗原检测体系。

本实验室前期研究利用了多种生长晚期的烟曲霉抗原包括 37℃ 培养 7 天的烟曲霉菌丝体裂解抗原、25℃ 培养 3~4 周的分泌抗原、烟曲霉甲醛灭活孢子等作为免疫原，并制备了多株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体^[32]。另外，本实验室还利用烟曲霉细胞壁重组甘露聚糖蛋白 Afmp1p、Afmp2p、Afmp4p 制备了多株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体及兔多克隆抗体。然而这些抗体建立的曲霉抗原捕获 ELISA 体系的特异性及敏感性均不理想，难以应用至临床样本的检测。

因此，为实现 IA 的早期诊断，本研究使用 37℃ 摇床培养 24h 的生长早期烟曲霉标准菌株，采用机械裂解法裂解菌落，将得到的烟曲霉全细胞裂解抗原作为免疫原，采用皮下、腹腔和肌肉注射共 3 种免疫方式，通过对免疫小鼠血清抗体效价的测定，发现采取皮下多点免疫方案的小鼠血清效价最高，其次为腹腔免疫。然后我们选取血清抗体效价最高的小鼠提取脾细胞并进行细胞融合，通过选择培养、ELISA 和 IFA 筛选融合后的细胞，得到了 18 株稳定分泌抗烟曲霉抗体的杂交瘤细胞。对其中 17 株细胞（F1~F17）产生的腹水进行纯化，我们得到了 1 组抗烟曲霉小鼠单克隆抗体，并对这 17 株抗体进行了免疫学特性鉴定。

ELISA 鉴定结果显示，17 株抗体中有 8 株属于 IgM 型抗体，分别为 F1、F4、F6、F8、F9、10、F11 和 F16；其余 9 株属于 IgG1 型抗体，分别为 F2、F3、F5、F7、F12、F13、F14、F15 和 F17，经 SDS-PAGE 鉴定均显示纯度较高。经 ELISA 鉴定发现，除 2 株（F3，F7）抗体可能丢失外，IgG1 型的 7 株抗体均只特异性针对培养 24h 的烟曲霉 ATCC 裂解抗原，而 8 株 IgM 型抗体则与黄曲霉、土曲霉、黑曲霉和构巢曲霉均发生交叉反应，且既识别早期（培养 24h）烟曲霉裂解抗原，也识别晚期（培养 4 天）烟曲霉裂解抗原，考虑这 8 株抗体可能为曲霉属特异性抗体。以实验室既往研发针对曲霉属抗原的小鼠单抗（9D47A1）和 Bio-rad 商品化试剂盒中所用大鼠单抗（R6）与多种不同真菌的结合来看，相较于 9D47A1，抗体 F1 和 F4 识别相同的抗原表位，而且其结合谱系与 R6 相似，提示可能具有相似的诊断价值，需要后续更多验证，其他 6 株 IgM 型抗体则相对与其他几种真菌抗原（如镰刀菌）更多交叉反应，但不排除后续用于诊断真菌感染的可能性。进一步 IFA 鉴定 15 株单克隆抗体与烟曲霉、黄曲霉、构巢曲

霉、马尔尼菲篮状菌、白念珠菌和新型隐球菌的结合,结果发现,其中13株抗体均与烟曲霉菌丝和肿胀孢子有不同程度的结合。其中IgM型单克隆抗体中的F1、F4、F9、F11和F16对烟曲霉以及其他曲霉种属培养早期的曲霉肿胀孢子和菌丝具有相对较好的结合反应,提示有作为后续用于诊断抗体的潜力,而IgG1型的7株抗体为烟曲霉早期抗原特异性抗体,与WB结果显示IgG1型抗体主要结合于烟曲霉ATCC菌株培养24h裂解抗原的25kDa处一致。烟曲霉生长过程中,细胞壁的变化是动态的,并且随着分生孢子的肿胀、萌发,以及向菌丝的转变而迅速发生,这个过程中产生的抗原也随之发生变化^[47]。因此我们有理由认为IgG1型抗体只特异性识别烟曲霉早期抗原;而IgM型抗体与培养24h和4d的烟曲霉裂解抗原均有不同程度的结合,主要部位集中在50~250kDa,提示IgM型抗体识别的烟曲霉抗原靶点涵盖感染全程,与ELISA和IFA的结果一致。

通过对抗烟曲霉小鼠单抗结合烟曲霉裂解抗原表位性质鉴定的分析,我们发现,抗原经煮沸处理降解蛋白后,与抗体F2、F8、F10、F12、F13、F15、F16和F17的结合降低,F9和F11则出现了A450值上升的现象,但由于碳水化合物表位在高温下虽具有热稳定性,但长期暴露在高温下也会导致降解,因此热处理对抗原抗体结合的影响只能用作于蛋白质表位结合的额外证据。另外,通过蛋白酶对抗原进行修饰,使抗体结合减少或消除,可以有力证明抗体结合抗原表位具有蛋白成分,因此我们用胰蛋白酶处理抗原后发现,15种抗体与抗原的结合均有不同程度的下降,这证明了15株抗体与抗原的结合表位均具有蛋白成分。考虑到抗体还可能与抗原表位的多糖成分进行结合,我们又采用了强碱处理法水解聚糖与氨基酸的连接,高碘酸钠处理法裂解多糖碳碳键,破坏多糖结构以去除抗原中的碳水化合物成分。结果发现,抗原经碱处理后,仅与F1、F4的结合有明显下降;而经高碘酸钠处理后F1、F4和F11的结合明显下降,这证明了F1、F4和F11与抗原的多糖表位结合。由于强碱只能水解聚糖 β -羟基与丝氨酸、苏氨酸O端连接,而与酪氨酸、羟赖氨酸O端连接的聚糖,或通过天冬酰胺N端连接的聚糖不会被强碱裂解,这可能表明抗体F1和F4,与抗体F11

的结合位点有所不同。综合 4 种方法的结果我们发现, F1、F4、F11 识别抗原的糖蛋白表位, F2、F5、F6、F8、F10、F12、F13、F14、F15、F16 和 F17 则识别抗原的蛋白表位, 而 F9 与经煮沸后的抗原结合上升, 可能多糖表位在蛋白被破坏后暴露更加充分, F9 可疑识别糖蛋白表位。通过分析不同抗体识别不同抗原表位性质, 对于后续建立检测体系抗体的选择以及待测样本是否可进行加热等前处理的提供一定参考价值。

通过对部分抗烟曲霉小鼠单抗结合烟曲霉裂解抗原表位相关性的分析, 我们发现 F1 和 F4 结合同一位点, F8 和 F16 结合另一相同位点, F13 则单独结合另一位点, 提示目前所制备抗体至少识别四种以上的抗原表位, 使后续配对选择抗体成为可能。

鉴于生物素-亲和素系统具有特异度和灵敏度高、稳定性好等优点, 且一个蛋白质分子可以与多个生物素分子联结^[48], 具有多级放大作用, 可以极大地提高检测方法的灵敏度, 因此, 本研究采用生物素标记抗烟曲霉小鼠单克隆抗体, 效价测定发现, biotin-F1、biotin-F8、biotin-F10 和 biotin-F16 的工作浓度在 1:1000~1:8000 之间, 可用于后续抗体配对实验。而其余 11 株标记抗体均效价过低, 有文献报道^[49], 生物素标记蛋白质后, 有可能影响蛋白质的空间结构, 干扰与其相对应抗体的特异性结合, 从而影响蛋白质的免疫活性, 这可能是导致抗体标记效价不高的原因之一; 另外, 标记时, 生物素与抗体的比例也会很大的影响生物素标记 IgG 重链的效果^[43]。

综上所述, 本部分研究得到了 15 株特异性针对曲霉属的单克隆抗体以及 4 株生物素标记抗体, 15 株抗烟曲霉小鼠单抗可识别烟曲霉不同菌株、不同培养时间产生的抗原, 而且抗原表位性质和结合位点不同, 为我们下一步的配对实验的方案设计、建立具有特异性的曲霉抗原捕获 ELISA 提供依据。

第二部分 曲霉抗原捕获 ELISA 的建立与优化

以烟曲霉 ATCC 菌株全细胞裂解抗原为免疫原，制备了一组抗烟曲霉小鼠单克隆抗体，通过对这组单克隆抗体的特异性和免疫学特性研究，证明了这组单克隆抗体中大部分抗体具有烟曲霉特异性，以及其所识别的抗原表位存在明显差异。本部分研究在利用单克隆抗体识别抗原表位的专一性和双抗体夹心捕获抗原的原理，采用生物素-链霉亲和素免疫检测系统的放大效应以提高检测的敏感性，通过抗烟曲霉特异性单克隆抗体的组合配对以及优化，筛选最佳抗体组合，建立双抗体夹心抗原捕获的酶联免疫测定方法。

1. 材料

1.1 主要试剂

沙保弱葡萄糖琼脂培养基购于广州迪景微生物科技公司；辣根过氧化物酶（Horseradish peroxidase, HRP）标记的山羊抗小鼠 IgM 和山羊抗小鼠总 IgG 购于 Abcam 公司；TMB 显色液购于北京 Biodragon 公司；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、浓 H_2SO_4 、甘油等其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 耗材与设备

0.22 μm /0.45 μm 细菌滤器、50ml 螺口离心管均购于广州昂飞生物科技有限公司；各个规格离心管、一次性塑料吸管等耗材均购于上海生工生物有限公司；无菌培养容器透气封口膜购于广州市普博仪器有限公司；神奇滤布购于北京智杰方远科技有限公司；各个规格的加样枪头购于生工生物工程有限公司及广州万莱康生物科技有限公司；96 孔聚苯乙烯微孔板购于厦门怡新美科技器材公司；各规格玻璃试管、玻璃漏斗、锥形瓶、玻璃量筒、平皿等均源自南方医科大学珠江医院中心实验室。

1.3 主要仪器

大型落地摇床、微生物培养箱、二级生物安全柜以及高速冷冻离心机均为

Thermo Fisher 公司产品；洗板机和酶标仪为 BioTek 公司产品；恒温水浴锅为英国 GRANT 公司产品。

1.4 菌株与细胞

烟曲霉标准菌株 1 株，保藏号为 ATCC46645，购自美国菌株保藏中心；烟曲霉临床分离株，由香港大学玛丽医院提供，简称 HK 菌株。

1.5 抗原与抗体

抗烟曲霉小鼠单克隆抗体为第一部分所制备，9D47A1 和 HRP-7E11A1 为先前本实验室制备。

1.6 主要溶液配制

(1) 沙氏液体培养基 (pH 5.6): 10g 蛋白胨, 20g 葡萄糖充分溶解于去离子水中, 用稀 HCl 将 pH 值调至 5.6, 定容至 1L, 高压灭菌备用。

(2) 20×PBS(pH 7.4): 称取 4.56g 磷酸二氢钠, 58.02g 十二水合磷酸氢二钠, 175.3g 氯化钠, 超纯水溶解后定容至 1L, 121℃高压灭菌备用。应用时稀释成 1×PBS。

(3) 0.05%吐温 20-水溶液: 500μl 吐温 20 加去离子水定容至 1L, 充分混匀, 然后经 0.22μm 细菌滤膜过滤后 4 度保存备用。

(4) 20%山羊血清简易酶稀释液: 取羊血清 200ml, 苯酚红 3ml, 吐温 20 5ml, proclin 1ml, 1×PBS 定容至 1L, 4 度保存备用。

(5) 抗体包被液: 称取二水合磷酸二氢钠 1.4g, 十二水合磷酸氢二钠 15g, 加去离子水定容至 1L。

(6) 0.25%酪蛋白封闭液: 称取 Tris 碱 1.21g, 明胶 2g, 蔗糖 20g, 酪蛋白 2.5g, 硫柳汞 0.2g, 去离子水溶解定容至 1L。高压备用, 温度下降至 60℃加入 5ml 吐温 20。

(7) 终止液 (1M H₂SO₄): 量取 55.6ml 浓 H₂SO₄, 加入 944.4ml 水中。

2. 实验方法

2.1 真菌培养上清的制备

2.1.1 真菌分生孢子悬液的制备

取沙氏液体培养基保种的烟曲霉 ATCC 菌株和烟曲霉 HK 菌株各 100 μ l，以三点接种法分别接种于沙保弱葡萄糖琼脂培养基，28 $^{\circ}$ C 培养，待培养基上长满烟绿色的绒毛状菌落时（约 3-5d）即可收获孢子。

将无菌棉签在 0.05%吐温 20-水溶液中蘸湿，在菌落的表面轻柔刮取孢子，将棉签置于生理盐水中，使分生孢子悬浮于生理盐水中。将混悬液滴至覆盖有神奇滤布的无菌漏斗中过滤得到真菌分生孢子悬液，用一次性吸管吸取适量悬液于显微镜下观察，镜下无明显菌丝结构即可开始计数。

将分生孢子悬液稀释 100 倍，滴加适量于一次性细胞计数板下进行定量计数，并 4 度保存备用。孢子计数参考牛鲍计数板计数原理，镜下孢子定量计数公式如下：

$$\text{孢子数/ml} = 1 \text{ 个中方格孢子数} \times 10 \text{ (中方格总数)} \times \text{稀释倍数} \times 10^3$$

用同样的方法制备黄曲霉、土曲霉、黑曲霉、构巢曲霉、白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌、桔青霉、特异青霉孢子悬液并计数。

2.1.2 真菌分泌抗原的制备

将两种烟曲霉（ATCC 分离株和 HK 分离株）孢子悬液加至沙氏液体培养基中，调整分生孢子的初始浓度为 4×10^6 /ml，置于 37 $^{\circ}$ C，150rpm 摇床中振荡培养，分别于培养 24h 和 4d 时过滤收集培养上清，上清中即含有烟曲霉分泌抗原。

用同样的方法制备黄曲霉、土曲霉、黑曲霉、构巢曲霉、白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌、桔青霉、特异青霉 4d 培养上清。

2.2 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 的建立

根据 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的免疫学特性以及表位分析结果，在识别不同抗原结合表位的抗体之间相互配对，以筛选抗原捕获抗体和检测抗体之间的最佳组合。实验方法简述如下：包被各株纯化的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体，10 μ g/ml、50 μ l/孔，4 $^{\circ}$ C 包被过夜；加入 300 μ l/孔的 0.25%酪蛋白封闭液，4 $^{\circ}$ C 封闭过夜；分别加入不同稀释度（1:10 和 1:100）的 4 种烟曲霉培养上清（分别培养 24h 和 4d 的烟曲霉 ATCC 菌株和 HK 菌株培养上清），以样品稀释液和沙

氏液体培养基作为阴性对照, 37°C 水浴孵育 1h, 0.5%PBST 洗板 5 次后拍干; 分别加入 1:1000 稀释的生物素标记单克隆抗体作为检测抗体, 50 μ l/孔, 37°C 水浴孵育 30min, 洗板 5 次后拍干; 加入 50 μ l/孔的 HRP 标记的链霉亲和素, 37°C 水浴孵育 30min, 洗板 10 次后拍干; 加入 TMB 室温下避光孵育 10min 显色, 1M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 A450 值。

以本实验室前期建立的曲霉属抗原检测体系 (9D47A1/7E11A1-HRP 体系)^[32]作为比较, 观察是否建立较之前更为灵敏的曲霉抗原检测体系。该体系检测方法简述如下: 在包被抗烟曲霉单抗 9D47A1 (10 μ g/ml) 的板条中, 加入不同浓度的 2 株烟曲霉培养上清, 以稀释液为阴参, 另设一空白孔; 37 度水浴 60min, 0.5%PBST 洗涤 5 次, 拍干; 加入 1: 1000 稀释的 7E11A1-HRP, 37 度水浴 30min, 0.5%PBST 洗涤 10 次, 中间拍板 1 次, 拍干; 加入 TMB (北京博奥龙) 50 μ l 室温避光显色 10min, 1M H₂SO₄ 终止反应, 30min 内酶标仪 A450 读数。

2.2.1 方阵滴定试验

采用方阵滴定试验以确定捕获单克隆抗体和检测单克隆抗体的工作浓度。分别包被不同浓度 (1 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml) 的单克隆抗体, 50 μ l/孔, 4°C 包被过夜; 加入 300 μ l/孔的 0.25% 酪蛋白封闭液, 4°C 封闭过夜; 分别加入梯度稀释度的 4 种烟曲霉培养上清, 以样品稀释液和沙氏液体培养基作为阴性对照, 37°C 水浴孵育 1h, 0.5%PBST 洗板 5 次后拍干; 分别加入不同稀释度的生物素 (1:1000、1:2000、1:4000、1:8000) 标记单克隆抗体作为检测抗体, 50 μ l/孔, 37°C 孵育 30min, 洗板 5 次后拍干; 加入 50 μ l/孔的不同稀释度 HRP 标记的链霉亲和素 (1:1000、1:2000), 37°C 孵育 30min, 洗板 10 次后拍干; 加入 TMB 室温下避光孵育 10min 显色, 1M H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪测定 A450 值。

2.2.2 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 检测培养上清的灵敏度评价

将烟曲霉培养上清从 1:10 开始倍比稀释若干梯度, 用优化确立的 ELISA 体系实验条件进行检测, 确定该体系检测烟曲霉培养上清的灵敏度, 样品均以

3 个复孔检测。以检测值大于阴性对照检测值的 2.1 倍时的烟曲霉培养上清最高稀释度作为该体系检测的灵敏度，与商品化 GM 试剂盒（Bio-rad, Platelia™ Aspergillus EIA）进行比较。

商品化 GM 试剂盒（Bio-rad, Platelia™ Aspergillus EIA）检测培养上清，按照试剂盒说明书进行，步骤简述如下：样本处理：300μl 稀释后的培养上清/阴性对照 R3/临界值样品 R4/阳性对照 R5+100 μl 样本处理液 R7（EDTA 溶液），金属 100° C 加热 6min；10000g 离心 10min，取上清检测；加样：先在板条（R1）内加入 50 μl/孔 R6，再加入 50 μl/孔处理后的上清，37° C 水浴 90min；用工作浓度的洗液洗板 5 遍，拍干；加入 200 μl/孔 TMB 显色液（R9）显色，室温避光孵育，最长不超过 30min；加入 100 μl/孔终止液（R10），30min 内读 A450 值。

2.2.3 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 特异度评价

用最后优化确立的体系检测 1:100 稀释的烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉、构巢曲霉、白念珠菌、新型隐球菌、马尔尼菲篮状菌、桔青霉、特异青霉培养 4d 的真菌上清，以稀释液为阴性对照，以分析本体系对不同真菌培养上清中分泌抗原的特异性。

3. 实验结果

3.1 捕获抗体和检测抗体之间的最佳配对

根据 15 株抗烟曲霉小鼠单克隆抗体的 ELISA、IFA 和 WB 鉴定结果，以及部分抗体的表位鉴定结果，将识别不同抗原表位的单克隆抗体之间互相配对，筛选最佳配对组合。共筛选 144 对组合（表 2-1），结果显示，捕获抗体为 F1 和 F2、F6、F8、F9、F12、F15、9D47A1 两两配对为捕获抗体，检测抗体为 F1 时，对检测烟曲霉 ATCC 菌株 24h 培养上清和 4d 培养上清以及烟曲霉 HK 菌株 24h 培养上清和 4d 培养上清的敏感性较高，多次实验比对之后，初步选择了 8 组配对进行进一步筛选（图 2-1），结果发现，当捕获抗体为 F1，检测抗体为 bintin-F1 时，检测烟曲霉 ATCC 菌株和 HK 菌株培养 24h 和 4d 的培养上清效果最佳，且优于先前实验室建立的 9D47A1/7E11A1-HRP 体系。

表 2-1 不同混合单克隆抗体与检测抗体 ELISA A450 值

Table.2-1 Different mixed monoclonal and detection antibodies ELISA A450 value.

捕获抗体	检测 抗体 biotin	稀释液	ATCC 24h 培养		ATCC 4d 培养		HK 24h 培养上		HK 4d 培养上	
		A450	上清 (A450)		上清 (A450)		清 (A450)		清 (A450)	
			1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
F1	F1	0.248	2.33	2.211	2.378	2.221	2.341	2.168	2.119	1.903
	F8	0.066	0.079	0.078	0.105	0.075	0.061	0.062	0.067	0.045
	F10	0.07	0.094	0.066	0.102	0.087	0.088	0.067	0.078	0.085
	F13	0.089	0.075	0.077	0.084	0.07	0.067	0.068	0.073	0.073
F1+F2	F1	0.338	2.168	2.013	2.223	2.081	2.135	2.068	2.017	1.883
	F8	0.068	0.172	0.152	0.103	0.104	0.089	0.073	0.081	0.109
	F10	0.073	0.101	0.118	0.107	0.112	0.07	0.067	0.078	0.081
	F13	0.089	0.075	0.077	0.084	0.07	0.067	0.068	0.073	0.073
F1+F6	F1	0.32	1.961	1.896	1.97	1.87	1.986	1.95	1.832	1.734
	F8	0.071	0.143	0.162	0.187	0.13	0.057	0.065	0.098	0.092
	F10	0.066	0.111	0.098	0.128	0.08	0.066	0.06	0.081	0.067
	F13	0.08	0.074	0.079	0.132	0.081	0.074	0.087	0.105	0.083
F1+F8	F1	0.228	1.897	1.823	1.826	1.772	1.865	1.718	1.746	1.629
	F8	0.076	1.159	0.248	1.364	0.175	0.069	0.07	1.248	0.571
	F10	0.075	1.016	0.125	1.125	0.128	0.071	0.079	1.127	0.157
	F13	0.073	0.072	0.072	0.095	0.075	0.066	0.066	0.103	0.078
F1+F9	F1	0.238	1.978	1.886	1.845	1.79	1.876	1.851	1.923	1.67
	F8	0.078	0.185	0.244	0.171	0.133	0.07	0.074	0.09	0.085
	F10	0.067	0.12	0.122	0.129	0.078	0.08	0.079	0.104	0.084
	F13	0.078	0.083	0.078	0.124	0.076	0.07	0.066	0.096	0.084
F1+F12	F1	0.266	1.932	1.732	1.908	1.82	1.881	1.854	1.6	1.705
	F8	0.061	0.165	0.24	0.115	0.097	0.062	0.065	0.096	0.076
	F10	0.061	0.078	0.081	0.089	0.066	0.059	0.056	0.066	0.063
	F13	0.069	0.067	0.067	0.076	0.076	0.057	0.059	0.074	0.067
F1+F15	F1	0.316	2.158	1.902	1.945	1.941	1.929	1.846	1.8	1.834
	F8	0.07	0.17	0.173	0.146	0.154	0.072	0.07	0.086	0.081
	F10	0.078	0.099	0.095	0.078	0.071	0.064	0.058	0.092	0.065
	F13	0.074	0.076	0.077	0.074	0.065	0.06	0.061	0.069	0.076
F1+9D47A1	F1	0.289	1.982	1.797	1.79	1.73	1.772	1.702	1.639	1.665
	F8	0.078	0.15	0.18	0.18	0.12	0.068	0.059	0.094	0.076
	F10	0.063	0.098	0.099	0.096	0.069	0.062	0.065	0.083	0.061
	F13	0.07	0.066	0.07	0.07	0.06	0.059	0.06	0.094	0.076
F2	F1	0.066	0.059	0.063	0.164	0.065	0.063	0.063	0.079	0.063

第二部分 烟曲霉抗原捕获 ELISA 的建立与优化

F2+F6	F8	0.061	0.06	0.069	0.077	0.058	0.055	0.053	0.058	0.055
	F10	0.057	0.065	0.06	0.108	0.067	0.069	0.051	0.1	0.062
	F13	0.076	0.062	0.061	0.147	0.071	0.074	0.06	0.087	0.061
	F1	0.064	0.086	0.067	0.643	0.076	0.075	0.066	0.12	0.072
F2+F8	F8	0.062	0.077	0.083	0.132	0.063	0.055	0.053	0.065	0.063
	F10	0.058	0.064	0.061	0.123	0.064	0.068	0.05	0.11	0.061
	F13	0.076	0.06	0.061	0.156	0.075	0.072	0.069	0.085	0.081
	F1	0.084	1.401	1.009	1.36	0.823	0.084	0.084	1.24	0.926
F2+F9	F8	0.1	1.373	0.215	1.804	0.37	0.076	0.073	1.505	0.451
	F10	0.082	0.259	0.134	0.491	0.17	0.097	0.094	1.048	0.209
	F13	0.075	0.085	0.102	0.124	0.069	0.068	0.066	0.072	0.075
	F1	0.057	0.067	0.06	0.596	0.075	0.084	0.065	0.171	0.078
F2+F12	F8	0.063	0.076	0.08	0.126	0.071	0.064	0.056	0.063	0.064
	F10	0.066	0.07	0.067	0.108	0.065	0.066	0.065	0.069	0.068
	F13	0.064	0.071	0.065	0.106	0.072	0.068	0.069	0.07	0.068
	F1	0.051	0.054	0.055	0.274	0.059	0.057	0.053	0.069	0.054
F2+F15	F8	0.052	0.067	0.054	0.073	0.059	0.051	0.046	0.057	0.051
	F10	0.054	0.059	0.059	0.061	0.055	0.056	0.058	0.075	0.058
	F13	0.057	0.059	0.063	0.07	0.069	0.067	0.058	0.06	0.053
	F1	0.049	0.049	0.052	0.177	0.05	0.052	0.055	0.062	0.045
F2+9D47A1	F8	0.051	0.053	0.052	0.058	0.051	0.051	0.048	0.059	0.053
	F10	0.054	0.071	0.064	0.064	0.052	0.065	0.05	0.069	0.06
	F13	0.056	0.061	0.061	0.08	0.063	0.056	0.055	0.055	0.053
	F1	0.047	0.055	0.053	0.196	0.051	0.078	0.05	0.11	0.059
F6	F8	0.049	0.066	0.062	0.051	0.05	0.045	0.045	0.075	0.054
	F10	0.053	0.062	0.056	0.064	0.058	0.052	0.053	0.055	0.053
	F13	0.065	0.07	0.078	0.097	0.072	0.068	0.064	0.06	0.053
	F1	0.112	0.122	0.109	0.237	0.108	0.109	0.106	0.197	0.118
F6+F8	F8	0.072	0.112	0.073	0.132	0.085	0.08	0.085	0.121	0.083
	F10	0.088	0.271	0.121	0.812	0.102	0.08	0.069	0.439	0.125
	F13	0.071	0.082	0.08	0.132	0.082	0.074	0.071	0.066	0.065
	F1	0.07	1.112	0.784	0.997	0.784	0.09	0.077	1.025	0.568
F6+F9	F8	0.074	0.819	0.164	1.283	0.25	0.072	0.067	0.896	0.283
	F10	0.1	0.241	0.113	0.721	0.116	0.089	0.089	0.339	0.129
	F13	0.074	0.081	0.089	0.128	0.082	0.075	0.071	0.066	0.065
	F1	0.062	0.074	0.067	0.589	0.084	0.095	0.07	0.185	0.086
F6+F12	F8	0.061	0.071	0.066	0.127	0.068	0.064	0.061	0.076	0.068
	F10	0.071	0.076	0.074	0.133	0.071	0.064	0.067	0.079	0.071
	F13	0.07	0.086	0.088	0.12	0.081	0.063	0.067	0.072	0.07
	F1	0.064	0.088	0.075	0.39	0.099	0.083	0.069	0.195	0.108

硕士学位论文

	F8	0.063	0.081	0.067	0.128	0.065	0.064	0.063	0.11	0.077
	F10	0.074	0.089	0.078	0.142	0.079	0.07	0.07	0.158	0.093
	F13	0.065	0.068	0.067	0.108	0.069	0.082	0.072	0.139	0.068
F6+F15	F1	0.073	0.126	0.088	0.554	0.092	0.078	0.07	0.19	0.111
	F8	0.061	0.122	0.086	0.12	0.068	0.07	0.066	0.135	0.075
	F10	0.068	0.088	0.075	0.133	0.073	0.08	0.076	0.16	0.096
	F13	0.063	0.073	0.067	0.109	0.063	0.067	0.063	0.095	0.077
F6+9D47A1	F1	0.071	0.168	0.09	0.564	0.102	0.098	0.068	0.213	0.102
	F8	0.068	0.092	0.104	0.131	0.08	0.056	0.065	0.148	0.085
	F10	0.071	0.092	0.084	0.118	0.075	0.073	0.069	0.155	0.105
	F13	0.066	0.105	0.07	0.106	0.065	0.072	0.064	0.074	0.076
F8	F1	0.128	1.074	0.652	0.967	0.673	0.119	0.123	0.894	0.496
	F8	0.086	1.103	0.152	1.099	0.234	0.105	0.091	1.066	0.178
	F10	0.133	0.548	0.136	0.647	0.144	0.104	0.14	0.703	0.222
	F13	0.064	0.114	0.072	0.112	0.066	0.065	0.06	0.094	0.073
F8+F9	F1	0.085	1.218	0.947	1.288	0.951	0.11	0.083	1.092	0.686
	F8	0.076	0.86	0.196	1.086	0.207	0.107	0.078	1.204	0.299
	F10	0.133	0.548	0.136	0.647	0.144	0.104	0.14	0.703	0.222
	F13	0.064	0.114	0.072	0.112	0.066	0.065	0.06	0.094	0.073
F8+F12	F1	0.077	1.135	0.837	1.196	0.852	0.088	0.08	1.042	0.741
	F8	0.108	0.81	0.177	1.045	0.198	0.076	0.07	1.357	0.308
	F10	0.113	0.674	0.119	0.775	0.159	0.095	0.073	0.943	0.185
	F13	0.071	0.073	0.059	0.064	0.054	0.056	0.069	0.08	0.071
F8+F15	F1	0.075	1.111	0.807	1.191	0.822	0.078	0.07	1.106	0.745
	F8	0.214	0.542	0.167	0.705	0.178	0.079	0.101	1.004	0.32
	F10	0.136	0.358	0.117	0.728	0.141	0.095	0.08	0.874	0.166
	F13	0.058	0.078	0.069	0.087	0.055	0.056	0.056	0.076	0.069
F8+9D47A1	F1	0.074	1.003	0.838	1.05	0.814	0.094	0.076	0.945	0.755
	F8	0.066	0.869	0.172	1.222	0.203	0.069	0.079	1.235	0.304
	F10	0.163	0.759	0.234	0.982	0.163	0.085	0.082	0.963	0.176
	F13	0.072	0.124	0.064	0.086	0.073	0.096	0.061	0.076	0.066
F9	F1	0.109	0.085	0.081	0.433	0.103	0.098	0.095	0.138	0.112
	F8	0.076	0.092	0.087	0.146	0.089	0.071	0.076	0.073	0.081
	F10	0.067	0.065	0.068	0.127	0.077	0.067	0.058	0.067	0.071
	F13	0.057	0.067	0.069	0.094	0.06	0.054	0.057	0.074	0.069
F9+F12	F1	0.052	0.075	0.07	0.501	0.079	0.08	0.058	0.155	0.078
	F8	0.057	0.062	0.058	0.099	0.045	0.058	0.071	0.077	0.056
	F10	0.073	0.061	0.116	0.117	0.072	0.064	0.072	0.067	0.074
	F13	0.057	0.067	0.069	0.094	0.06	0.054	0.057	0.074	0.069
F9+F15	F1	0.054	0.114	0.078	0.573	0.098	0.094	0.064	0.184	0.08

第二部分 烟曲霉抗原捕获 ELISA 的建立与优化

	F8	0.059	0.073	0.079	0.12	0.054	0.056	0.087	0.095	0.065
	F10	0.079	0.077	0.072	0.124	0.085	0.101	0.102	0.087	0.068
	F13	0.071	0.089	0.073	0.108	0.06	0.061	0.077	0.082	0.068
F9+9D47A1	F1	0.055	0.094	0.073	0.48	0.069	0.125	0.067	0.199	0.112
	F8	0.06	0.06	0.074	0.11	0.058	0.057	0.059	0.067	0.087
	F10	0.094	0.143	0.092	0.105	0.077	0.082	0.084	0.084	0.115
	F13	0.051	0.051	0.049	0.094	0.049	0.055	0.055	0.057	0.052
F12	F1	0.074	0.056	0.056	0.176	0.067	0.087	0.063	0.091	0.058
	F8	0.052	0.061	0.074	0.055	0.061	0.061	0.056	0.056	0.049
	F10	0.06	0.095	0.06	0.78	0.074	0.071	0.065	0.068	0.066
	F13	0.059	0.067	0.061	0.07	0.062	0.078	0.06	0.068	0.061
F12+F15	F1	0.046	0.053	0.048	0.149	0.05	0.052	0.052	0.073	0.056
	F8	0.049	0.05	0.05	0.05	0.086	0.049	0.049	0.053	0.051
	F10	0.072	0.071	0.08	0.076	0.095	0.065	0.064	0.066	0.074
	F13	0.052	0.047	0.044	0.047	0.049	0.052	0.046	0.05	0.053
F12+9D47A1	F1	0.052	0.059	0.052	0.178	0.054	0.065	0.054	0.111	0.067
	F8	0.056	0.053	0.047	0.051	0.047	0.05	0.046	0.055	0.05
	F10	0.074	0.084	0.077	0.075	0.073	0.064	0.062	0.069	0.067
	F13	0.048	0.052	0.054	0.059	0.056	0.052	0.048	0.047	0.051
F15	F1	0.06	0.063	0.06	0.355	0.071	0.056	0.054	0.07	0.056
	F8	0.052	0.052	0.054	0.061	0.05	0.05	0.049	0.054	0.05
	F10	0.077	0.079	0.067	0.066	0.061	0.059	0.056	0.067	0.062
	F13	0.068	0.077	0.071	0.073	0.069	0.082	0.061	0.068	0.05
F15+9D47A1	F1	0.049	0.059	0.048	0.137	0.049	0.054	0.051	0.069	0.055
	F8	0.053	0.067	0.058	0.053	0.049	0.052	0.051	0.062	0.051
	F10	0.081	0.066	0.067	0.071	0.066	0.069	0.079	0.072	0.068
	F13	0.054	0.05	0.047	0.066	0.053	0.058	0.053	0.053	0.051
9D47A1	F1	0.074	0.068	0.055	0.078	0.076	0.09	0.083	0.084	0.067
	F8	0.074	0.067	0.06	0.073	0.061	0.078	0.062	0.089	0.061
	F10	0.054	0.061	0.055	0.05	0.049	0.056	0.052	0.052	0.05
	F13	0.075	0.067	0.06	0.088	0.057	0.056	0.061	0.082	0.076

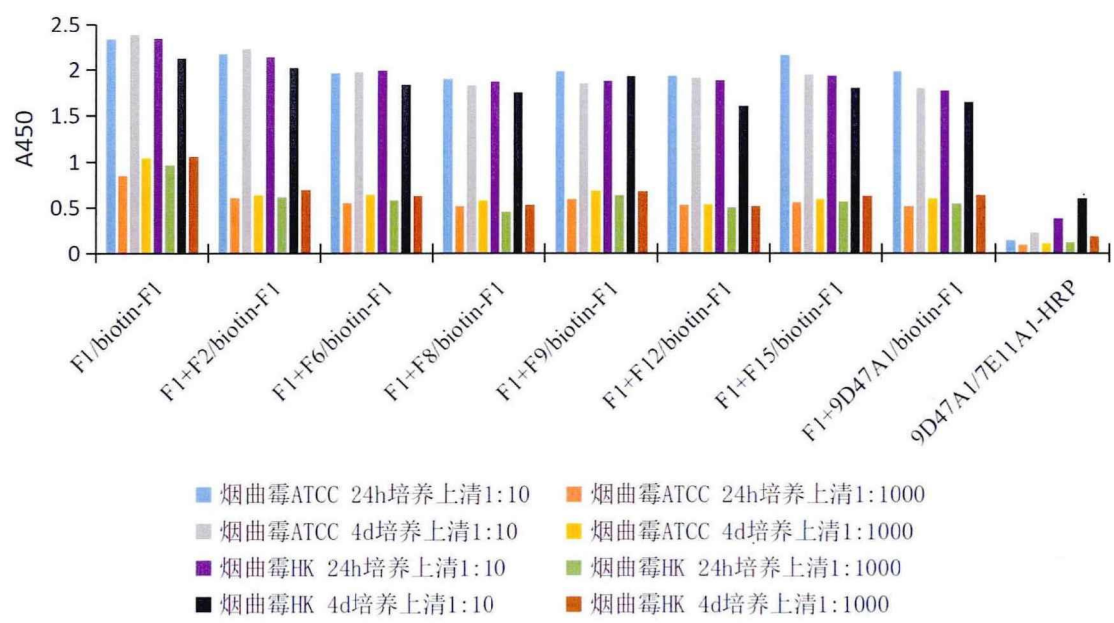


图 2-1 不同抗体的配对组合检测烟曲霉培养上清

Figure 2-1 Paired combinations of different mixed MAb and detection antibodies

3.2 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 的优化条件的确立

用方阵滴定试验确定双抗体夹心抗原捕获 ELISA 中包被抗体和检测抗体的最佳浓度，如图 2-2 和图 2-3 所示，当捕获抗体 F1 的包被浓度为 10μg/mL，检测抗体 biotin-F1 的工作浓度为 1:1000，以及链霉亲和素-HRP 的工作浓度为 1:1000 时，检测 4 种烟曲霉培养上清最佳。

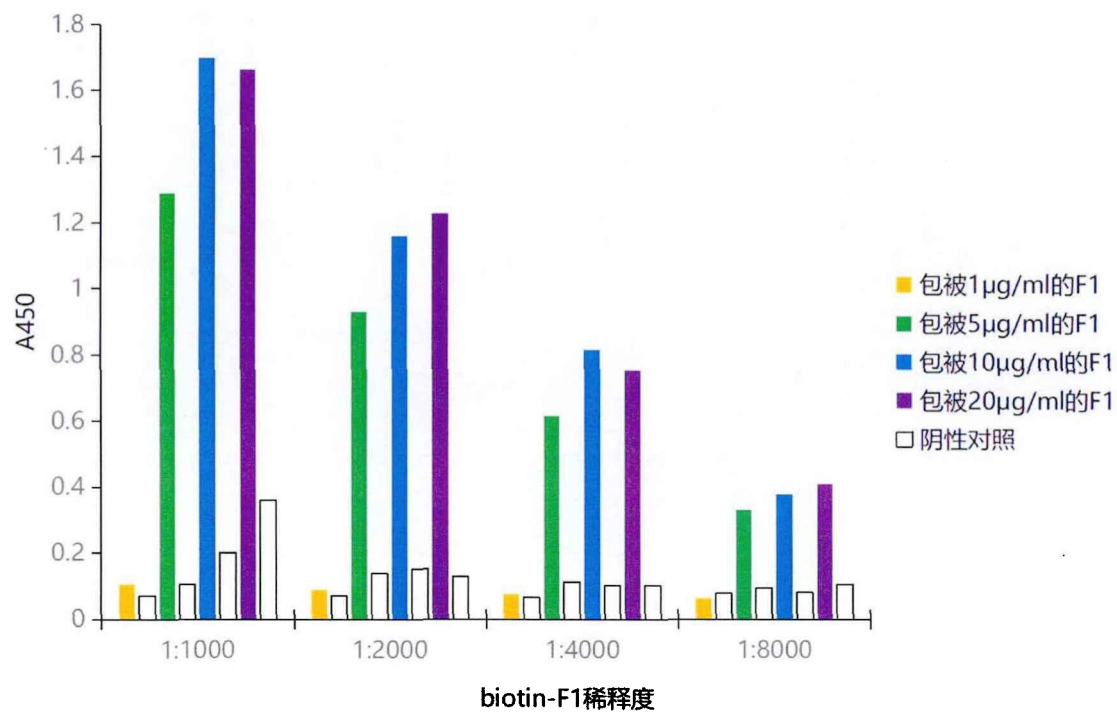


图 2-2 比较 F1 不同包被浓度和 biotin-F1 不同稀释度检测烟曲霉培养上清

Figure 2-2 Comparison of F1 with different coating concentrations and biotin-F1 with different dilutions for detection of *A. fumigatus* culture supernatant

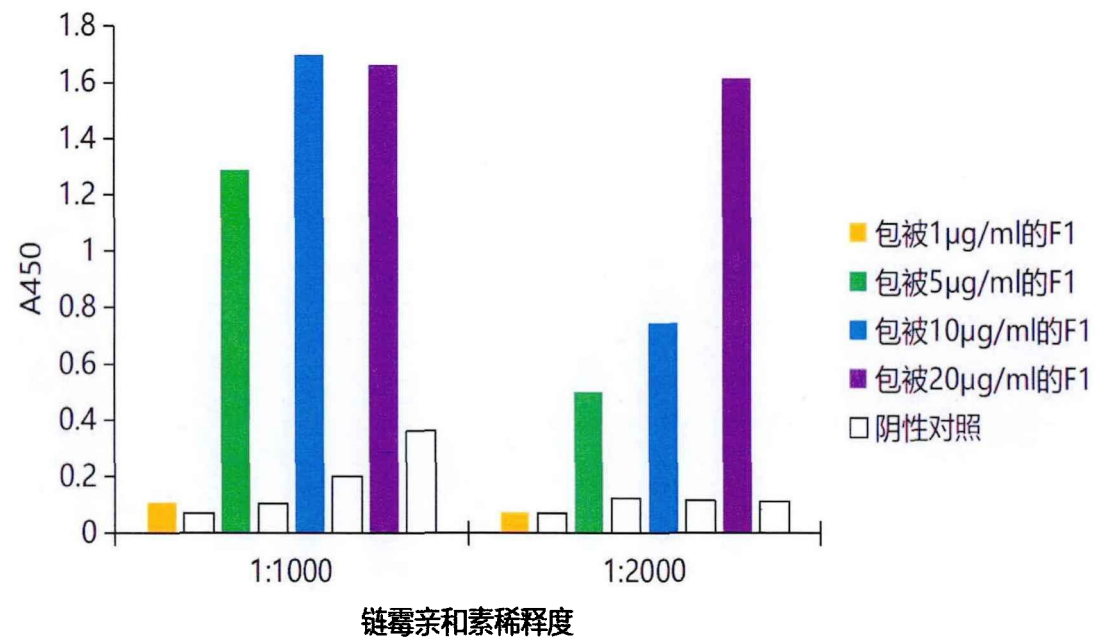


图 2-3 比较链霉亲和素-HRP 不同稀释度检测烟曲霉培养上清

Figure 2-2 Comparison of Streptavidin-HRP with different dilutions for detection of *A. fumigatus*

3.3 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 灵敏度测定

3.3.1 F1/biotin-F1 的灵敏度检测

将培养 24h 和 4d 的烟曲霉 ATCC 菌株和 HK 菌株培养上清从 1：10 开始梯度稀释，当检测 A450 值大于阴性参照的 2.1 倍时即确定为阳性。结果显示，F1/biotin-F1 体系检测 4 种烟曲霉培养上清的灵敏度为 1:10000~1:100000，且 4 种培养上清灵敏度无明显差异（见图 2-4）。

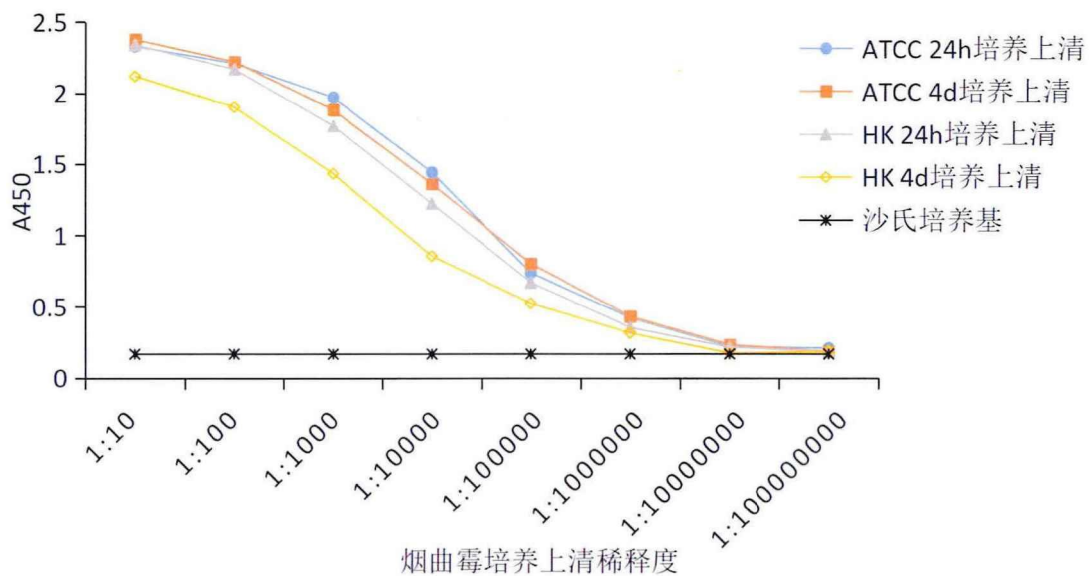


图 2-4 F1/biotin-F1 体系检测 2 株烟曲霉不同培养时间的培养上清的灵敏度检测

Figure 2-4 Sensitivity test of F1/biotin-F1 for detecting Two strains of *A. fumigatus* culture supernatant at different cultivation times

3.3.2 伯乐 GM 试剂盒检测真菌培养上清的灵敏度

按照说明书使用伯乐 GM 试剂盒检测烟曲霉 ATCC 培养 24h 上清，结果如下图所示，检测灵敏度为 1:1000-1:10000 之间，在培养上清稀释度为 1:100 时的 A450 值可达 4.0 以上。

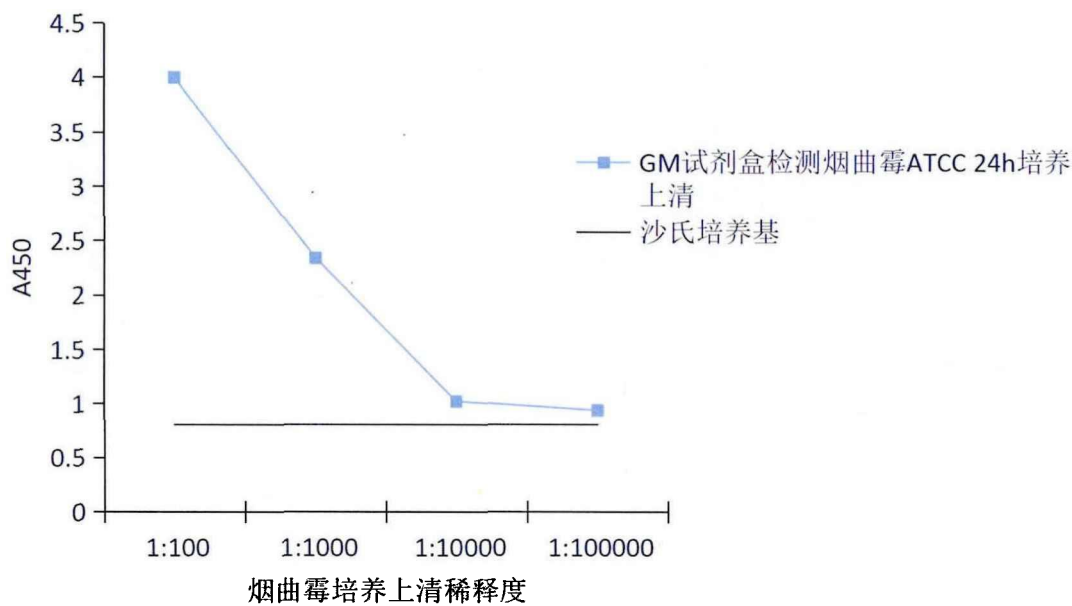


图 2-5 GM 试剂盒(Bio-rad)检测烟曲霉培养上清的灵敏度

Figure 2-5 Sensitivity of *A. fumigatus* culture supernatant detection by Platelia™
Aspergillus Ag(Bio-rad)

3.4 双抗体夹心抗原捕获 ELISA 特异度测定

将烟曲霉 ATCC、土曲霉、黄曲霉、黑曲霉、构巢曲霉、马尔尼菲篮状菌、新型隐球菌、白念珠菌、桔青霉、特异青霉共 10 种真菌 4d 培养上清 1：100 稀释，当检测 A450 值大于阴性参照的 2.1 倍时即确定为阳性。结果显示，F1/biotin-F1 体系与特异青霉和黄曲霉、构巢曲霉有交叉反应（见图 2-6），而与马尔尼菲篮状菌、白念珠菌、新型隐球菌、桔青霉、土曲霉和黑曲霉无交叉反应。

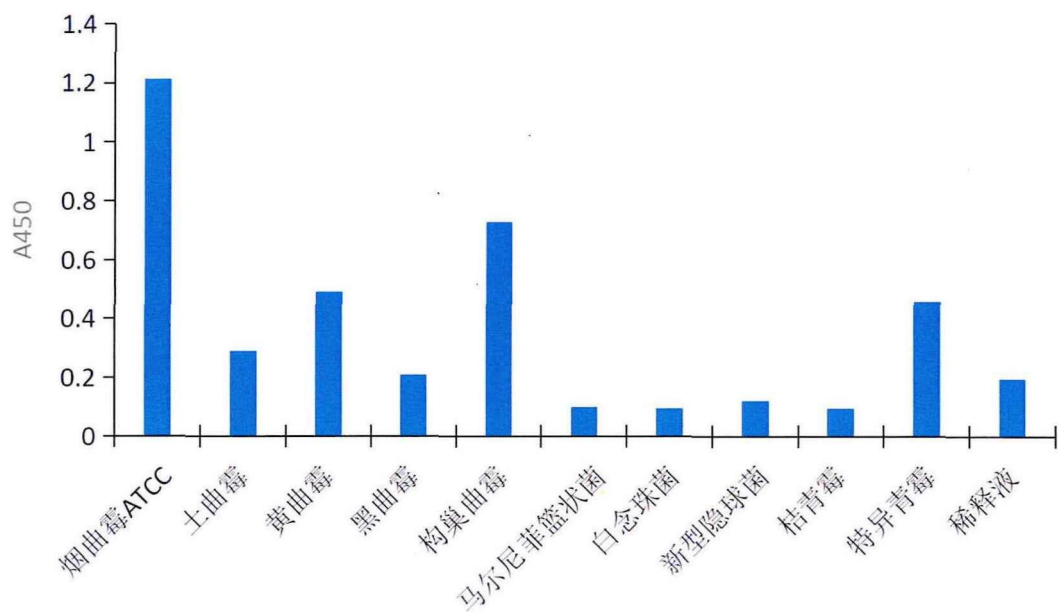


图 2-6 F1/biotin-F1 体系特异度测定

Figure 2-6 Detect the specificity of the sandwich ELISA establised with F1/biotin-F1

4. 讨论

我们在第一部分的研究中已经得到并验证了 1 组免疫学特性良好的抗烟曲霉小鼠单克隆抗体，根据前面对 15 株单克隆抗体的抗原结合表位分析，选择了 7 株单克隆抗体（F1、F2、F6、F8、F9、F12、F15）外加之前实验室得到的 9D47A1 抗体，共 8 株单克隆抗体进行相互配对，使用生物素标记效果较好的 biotin-F1、biotin-F8、biotin-F10 和 biotin-F13 作为检测抗体，共有 144 个组合。烟曲霉株与株之间有不同分型，菌株之间可能有差异，且第一部分抗体的免疫学特性鉴定中也发现了抗体在与烟曲霉 ATCC 菌株和 HK 菌株全细胞裂解抗原的反应有所不同，因此我们选择检测两株烟曲霉菌株（ATCC 菌株和 HK 菌株）的培养上清，比较不同菌株在生长过程中抗原分泌的差异；同时收集培养 24h 和 4d 的培养上清，比较分析不同培养时长下检测效果是否有不同，间接反应感染过程。

配对结果显示，捕获抗体含有 F1 的组合，以生物素标记的 F1 为检测抗体时，检测 4 种烟曲霉培养上清的灵敏度较高，且检测 4 种烟曲霉培养上清的效

果无明显差异,这提示我们选择的两株烟曲霉在生长过程中分泌的抗原可能相同,其中以 F1/biotin-F1 组合的检测灵敏度最高。在第一部分抗体的特异度检测中,我们可以看到,F1 结合烟曲霉裂解抗原乙醇沉淀多糖和多种曲霉裂解抗原,与伯乐 GM 试剂盒中 R6 的结合谱系相近,提示 F1 可能与 R6 的结合表位相同或部分相同,是作为检测抗体的较好选择。在对 144 组抗体配对组合的筛选中,我们发现 F1 既适合作为捕获抗体,也适合作为检测抗体,因此,最后我们选择了以 F1 为捕获抗体,以生物素标记的 F1 为检测抗体的配对组合。再通过方阵滴定试验对该组合进一步优化,最终建立了捕获抗体 F1 包被浓度为 10 μ g/ml, biotin-F1 和 HRP-链霉亲和素的稀释比例均为 1:1000 的 ELISA 体系,其检测 4 种烟曲霉培养上清的灵敏度均为 1:10000~1:100000。而使用伯乐 GM 试剂盒并按照说明书的步骤检测烟曲霉培养上清,发现其检测烟曲霉培养上清的灵敏度只有 1:1000~1:10000,劣于我们的 F1/biotin-F1 体系,不过 GM 试剂盒已在临床得到广泛使用,在侵袭性曲霉病的诊断中得到极大的认可,我们新建立的 ELISA 提示是否真的优于伯乐 GM 试剂盒还需进一步在临床应用中的验证。另外,在烟曲霉培养上清稀释度为 1:100 时,GM 试剂盒检测培养上清的 A450 值可达 4 以上,而 F1/biotin-F1 的 A450 值只有 2.211,这可能与检测抗体标记方式的选择有关,这也提示了我们下一步的改进方向,可通过尝试其他方式如不同标记物、不同检测体系等对体系进行进一步优化。

针对该体系检测烟曲霉 ATCC 菌株、土曲霉、黄曲霉、黑曲霉、构巢曲霉、马尔尼菲篮状菌、白念珠菌、新型隐球菌、桔青霉和特异青霉等真菌培养上清的结果来看,F1/biotin-F1 体系对烟曲霉特异度较高,与黄曲霉、构巢曲霉有交叉反应,与特异青霉也有微弱的交叉反应,而与临床常见的白念珠菌、新型隐球菌等无交叉反应,也与 GM 试剂盒常见交叉反应的真菌如马尔尼菲篮状菌和青霉属真菌无明显交叉反应;虽与特异青霉菌有轻微交叉,但该菌引起的临床感染罕见,对假阳性结果出现的影响较小。目前临床上引起侵袭性曲霉病的致病菌以烟曲霉为主,占比 90%以上,黄曲霉也是相对常见,故而特异度测定结果提示我们新建立的 ELISA 体系可用于特异性检测曲霉的感染。与实验室先前

9D47A1/7E11A1-HRP 对比, F1/biotin-F1 体系灵敏度提高。目前文献报道了不同曲霉之间 GM 水平是有差异的, 以烟曲霉为主有一定优势, 因此, 我们建立的体系很可能对侵袭性曲霉病的早期诊断起到很大的作用, 并为下一步诊断试剂盒的开发奠定基础。

综上, 我们新建立的 F1/biotin-F1 双抗体夹心 ELISA 体系在灵敏度上对比 9D47A1/7E11A1-HRP 有提高, 且特异性较好, 以烟曲霉为主, 有临床诊断侵袭性曲霉病的可能。但由于侵袭性曲霉病诊断困难, 确诊标本难以收集, 后续拟先用模拟血清验证 F1/biotin-F1 的检测性能和不同处理方案对检测效果的影响。

第三部分 曲霉抗原捕获 ELISA 的初步临床评价

上一部分我们在制备了一组抗曲霉属特异性单克隆抗体的基础上，通过配对和优化，建立了检测烟曲霉分泌抗原的双抗体夹心抗原捕获 ELISA。本部分研究中，通过与商品化的同类产品对烟曲霉培养上清中分泌抗原正常人血清、模拟血清和侵袭性曲霉病患者临床血清样品检测的比较，以及对其它类型侵袭性真菌病的临床确诊血清样品的检测，评价烟曲霉分泌抗原捕获 ELISA 在侵袭性曲霉病早期诊断和鉴别诊断中的作用。

1. 材料

1.1 主要试剂和实验材料

Platelia™ *Aspergillus* Ag 曲霉抗原检测试剂盒均购于 Bio-Rad 公司；磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、Tris 等其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯。各个规格离心管、一次性塑料吸管等耗材均购于上海生工生物有限公司；各个规格的加样枪头购于生工生物工程有限公司及广州万莱康生物科技有限公司；96 孔聚苯乙烯微孔板购于厦门怡新美科技器材公司；各规格玻璃试管、玻璃漏斗、锥形瓶、玻璃量筒、平皿等均源自南方医科大学珠江医院中心实验室。

1.2 主要仪器

台式离心机为德国 Hettich 公司产品；洗板机和酶标仪为 BioTek 公司产品；恒温水浴锅为英国 GRANT 公司产品；恒温金属浴为杭州米欧仪器有限公司产品。

1.3 血清样品

1.3.1 正常人血清

120 例健康人血清样品为 2022 年珠江医院体检中心提供。

1.3.2 侵袭性曲霉病患者血清样品

2020~2022 年在珠江医院就诊，根据 2021 年 EORTC/MSG 关于侵袭性真菌病定义共识的修订及更新中侵袭性曲霉病确诊（proven）、拟诊（probable）及

疑诊 (possible) 的诊断标准, 结合患者临床特征, 宿主因素及真菌学证据, 共收集侵袭性曲霉病患者血清 74 份, 其中确诊病例 2 份, 拟诊病例 51 份, 疑诊病例 21 份。

1.3.3 侵袭性烟曲霉患者模拟血清

用正常人混合血清按照 1:10、1:100、1:1000、1:10000、1:100000 的比例与第二部分收集的培养 24h 的烟曲霉 ATCC 菌株培养上清混合, 以模拟不同感染程度的病人血清。

2. 实验方法

2.1 ELISA 检测正常人血清 cutoff 值设定

为确立曲霉抗原捕获 ELISA 的正常值范围, 首先检测 120 例正常人血清样品。通过对正常人血清曲霉抗原检测结果的分析, 确定正常血清中曲霉抗原检测的 A450 平均数和标准差, 以平均值+3 倍标准差为 cutoff 值。

ELISA 实验步骤: 包被抗体 F1, 浓度为 10 μ g/ml, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h; 加入正常人原液, 以稀释液为阴性对照; 37 度水浴 60min, 0.5%PBST 洗涤 5 次, 拍干; 加入 1: 1000 稀释的 biotin-F1, 37 度水浴 30min, 0.5%PBST 洗涤 5 次, 拍干; 加入 1: 1000 稀释的链霉亲和素-HRP, 37 度水浴 30min, 0.5%PBST 洗涤 10 次, 中间拍板 1 次, 拍干; 加入 TMB (北京博奥龙) 50 μ l 室温避光显色 10min, 1M H₂SO₄ 终止, 30min 内酶标仪检测 A450。

2.2 待测模拟血清的制备前处理

结合本实验室前期研究发现, 正常人血清中存在一定基础水平的烟曲霉抗体, 因此, 模拟血清可能造成游离抗原水平的降低, 因此, 拟尝试直接检测模拟血清和用 EDTA 加热处理解离模拟血清中的抗原抗体复合物两性方式。模拟血清制备和预处理: ①不处理直接混合; ②混合后 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min; ③检测前加入 EDTA 并加热处理模拟血清: 按照商品化伯乐 GM 检测试剂盒中样本前处理方法, 即: 300 μ l 稀释上清+100 μ l R7, 金属浴 100 $^{\circ}$ C 加热 6min; 10000g 离心 10min, 取上清检测。

2.3 F1/biotin-F1 体系检测正常人和烟曲霉感染患者模拟血清

包被板条：包被抗体 F1，浓度为 10μg/ml，4℃ 包被过夜，37℃ 封闭 2h；

ELISA 实验步骤：加入不同稀释度的烟曲霉培养上清和模拟血清，以正常人混合血清为阴参；其他操作步骤同本章节 2.1。

2.4 商品化伯乐 GM 检测试剂盒检测烟曲霉感染患者模拟血清

按照试剂盒说明书的方法进行实验，步骤如下：样本处理：300 μl 稀释上清/R3/R4/R5+100 μl R7，金属 100℃ 加热 6min；10000g 离心 10min，取上清检测；加样：先在板条（R1）内加入 50μl R6，再加入 50μl 模拟血清，37℃ 水浴 90min；洗板：将 R2 用纯水 20 倍稀释，洗板 5 遍，拍干；显色：200μl TMB 显色液（R9），室温避光孵育 30min；终止：100μl 终止液（R10），30min 内酶标仪检测 A450。结果以 GMI 计算，即 $GMI = A450_{\text{待测样本}} / A450_{R4}$ 。

2.5 侵袭性曲霉病患者血清的预处理

血清中存在多种抗体，考虑血清样品中的曲霉抗原可能会与血清中原本存在的抗体形成抗原-抗体免疫复合物，从而影响抗原检测，因此，需对血清进行预处理。经过前面实验用不同处理方法处理模拟血清后得到结果对比，我们采取第 3 种方法处理临床血清标本，即：300 μl 稀释上清+100 μl R7，金属浴 100℃ 加热 6min；10000g 离心 10min，取上清检测。

2.6 曲霉抗原检测结果判定

检测 120 份正常人血清并确定 cutoff 值。用曲霉抗原捕获 ELISA（F1/biotin-F1）检测侵袭性曲霉病患者血清样品，样品 A450 值大于或等于 cutoff 判定为阳性，小于 cutoff 值则判定为阴性。

2.7 数据分析

用 SPSS 26.0 分析数据。对于临床血清标本的判定，以检测为阳性的临床标本例数占通过 2021 年 EORTC/MSG 关于侵袭性真菌病定义共识的修订及更新确定为确诊、拟诊或疑诊侵袭性曲霉病的标本总数的比率作为评价检测方法的灵敏度指标，而以正常标本检测为阴性的标本数占阴性标本总数的比率作为评价检测方法的特异度指标。

3. 实验结果

3.1 F1/biotin-F1 体系检测烟曲霉感染患者模拟血清的灵敏度

采用烟曲霉培养上清与正常人血清标本直接混合的方法制备烟曲霉感染患者的模拟血清，再用第二部分新建立的 F1/biotin-F1 体系检测，由于前文发现不同培养时长的两株烟曲霉培养上清的检测效果无明显差异，因此只检测烟曲霉 ATCC 24h 培养上清与正常人混合血清制成的模拟血清。如图 3-1 所示，结果表明，R7 加热处理后的模拟血清检测 A450 值较直接混合或 37° C 孵育 30min 的模拟血清检测 A450 值高，且灵敏度也有一定的提升，灵敏度为 1:100~1:1000，但较直接检测培养上清的灵敏度低。

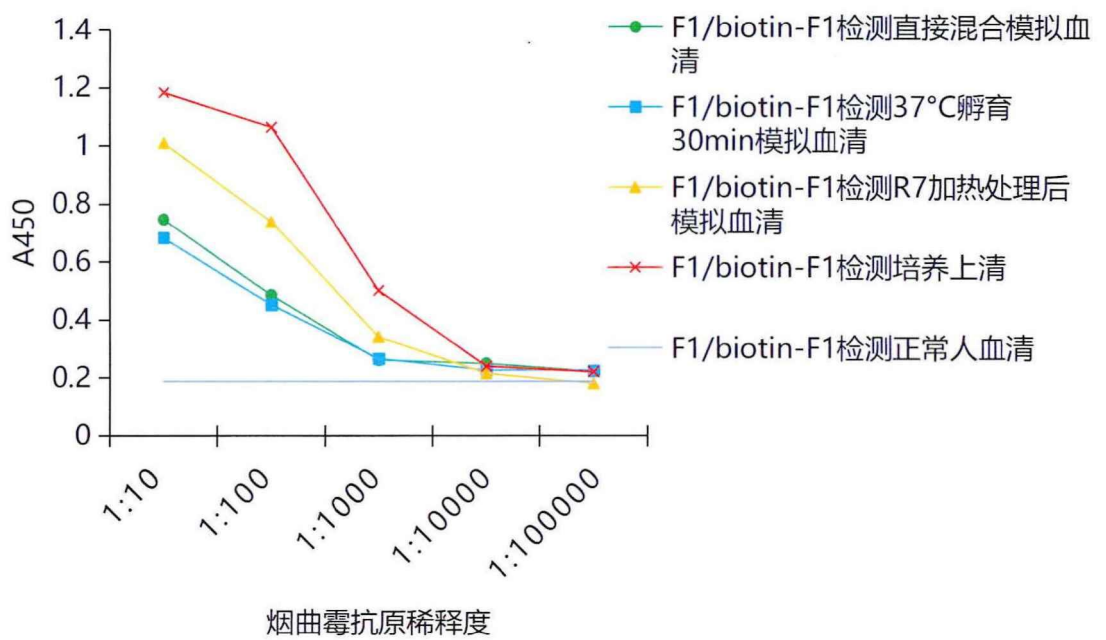


图 3-1 F1/biotin-F1 体系检测不同预处理的烟曲霉模拟血清

Figure 3-1 Detection of *A. fumigatus* antigen in simulated serum with different pre-treatments

3.2 商品化伯乐 GM 检测试剂盒检测烟曲霉感染患者模拟血清

用商品化伯乐 GM 检测试剂盒检测烟曲霉感染患者模拟血清，过程严格按照试剂盒说明书进行，发现该试剂盒检测模拟血清的灵敏度为 1:1000~1:10000，明显优于 F1/biotin-F1 体系检测用同种方法处理后模拟血清的检测效果（图 3-2）。

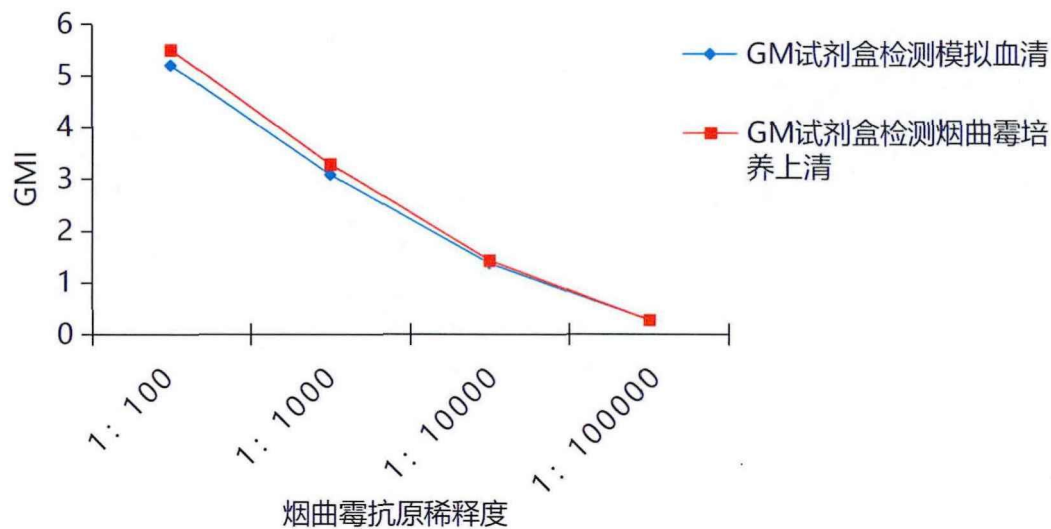


图 3-2 商品化伯乐 GM 检测试剂盒检测烟曲霉感染患者模拟血清

Figure 3-2 Detection of *A. fumigatus* antigen in simulated serum by Commercial GM antigen tested kit (Bio-Rad)

3.3 F1/biotin-F1 体系检测临床侵袭性曲霉病患者血清标本

用第二部分建立的 F1/biotin-F1 体系检测 120 例正常人血清样品，测得正常血清中曲霉抗原检测 A450 平均数为 0.22，计算的 cutoff 值为 0.462。

F1/biotin-F1 体系检测处理后的侵袭性曲霉病患者（确诊、拟诊和疑诊）血清标本 74 份，检测结果发现 A450 值均<0.462，显示无阳性结果，灵敏度为 0。

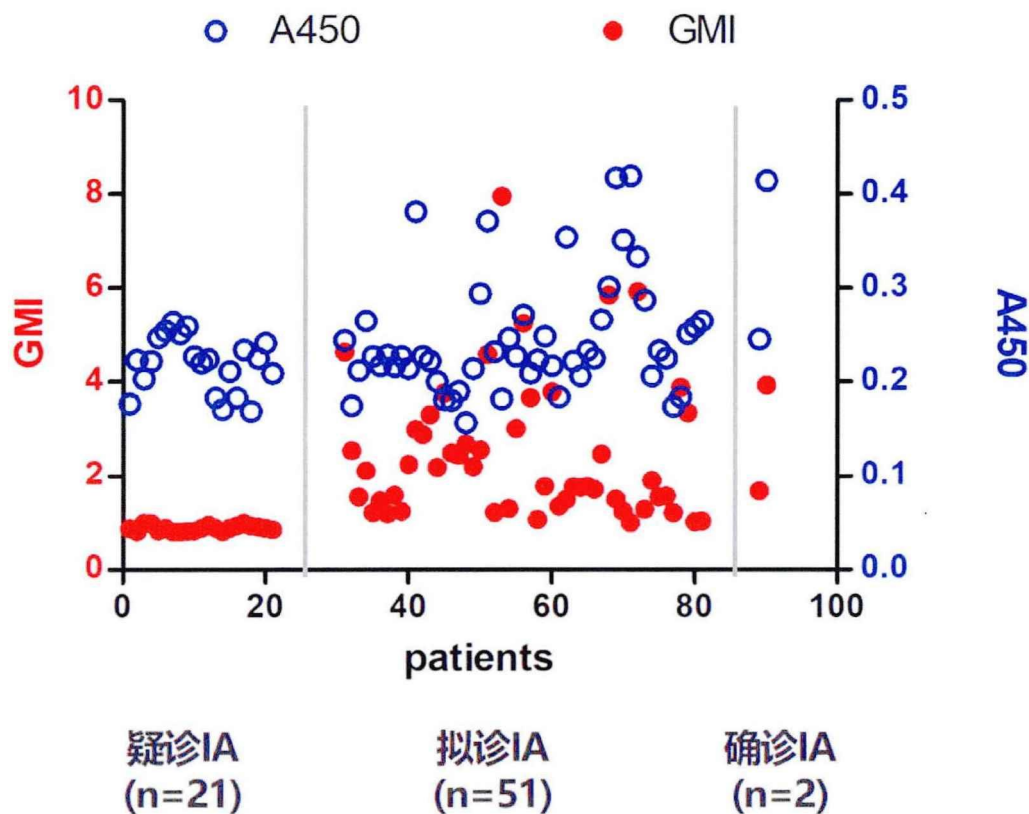


图 3-3 IA 患者血清 GMI 和 F1/biotin-F1 检测 A450 值的比较

Figure 3-3 Comparison of GMI and A450 values detected by F1/biotin-F1 in IA patients

4.讨论

本实验采用的免疫原为培养 24h 的烟曲霉全细胞裂解抗原，前两部分实验验证我们得到的抗体能够识别体外烟曲霉培养过程中分泌的早期抗原，而且结合抗体性质鉴定，初步鉴定 F1 抗体结合抗体表位为糖蛋白，与商品化 GM 试剂盒结合抗原性质类型一致，提示后续血清样本可尝试预处理观察是否可能提高抗原检出率。首先，我们采用正常人血清与烟曲霉培养上清进行混合，制备烟曲霉感染患者模拟血清。经过直接检测，发现相同稀释度后的模拟血清中的烟曲霉抗原水平较未与正常人血清混合时，有明显降低，提示正常人血清中存在烟曲霉抗体，可形成复合物降低检测灵敏度。这与本实验室在早期研究中发现正常人血清中存在一定水平的烟曲霉抗体结果一致。因此，考虑有必要对模

拟血清进行预处理，解离抗原抗体复合物以提高抗原的检出率。由于商品化 GM 试剂盒自带 R7 试剂为 EDTA 溶液，可通过加热方式解离血清中的抗原抗体复合物，该处理方式已应用于多种真菌抗原的患者血清（如曲霉抗原、荚膜组织胞浆菌抗原）的检测中^[50]。

进一步，我们尝试比较有无加热处理模拟血清，结果发现新建立的 F1/biotin-F1 体系检测采用商品化伯乐 GM 检测试剂盒中 R7 处理后模拟血清的效果最佳，灵敏度在 1:100~1:1000 之间，这表明相较于直接混合或混合后 37°C 孵育 30min，在经 R7 处理后，血清中形成的抗原抗体复合物解离并释放出游离抗原，使得 F1 检测效果提升，但与直接检测曲霉培养上清相比，灵敏度下降，提示加热处理可能也使一部分曲霉抗原降解。而与 GM 试剂盒检测模拟血清的效果对比，F1/biotin-F1 体系的 A450 值和灵敏度均较差，这表明我们建立的体系在检测人体血清时仍比不上目前市面上常用的商品化试剂盒。

用新建立体系检测 R7 处理后的 120 份正常人血清，并确定了检测 cutoff 值为 0.462。之后，我们收集了 74 份经 2021 年 EORTC/MSG 关于侵袭性真菌病定义共识的修订及更新中确定为确诊、拟诊和疑诊的侵袭性曲霉病患者的血清标本（其中确诊病例 2 份，拟诊病例 51 份，疑诊病例 21 份），确诊的 2 例 GMI 为 3.933 和 1.681，拟诊的 51 份血清里有 26 份的 GMI 在 1.0~2.0，12 份在 2.0~3.0，13 份在 3.0 以上，疑诊病例 GMI 在 1.0 以下。经 F1/biotin-F1 检测后结果发现，74 份侵袭性曲霉病患者血清的检测结果都为阴性，这可能与血清抗原量、样本的收集与保存、血清预处理等均有关系，表明该体系在应用到临床样本的检测当中还需要克服一定的困难。对于检测模拟血清和临床样本的差异，我们考虑有以下几种可能：1）体内和体外环境有很大的不同，在体外培养烟曲霉时，我们采用沙氏液体培养基，严格控制接种量，使得烟曲霉能够很好的生长，收集的培养上清中抗原量足够多；而在体内，我们制备的的抗体识别的抗原可能含量较少；2）很多病人并不是新确诊的侵袭性肺曲霉病患者，本身已经产生了抗烟曲霉抗体，这些抗体与抗原结合，使得血清中烟曲霉抗原含量下降，而现有的血清前处理方法无法有效的将抗原释放出来，导致难以检测；

3) 部分血液科病人常规进行真菌治疗, 抑制了烟曲霉早期抗原的分泌; 4) 实验中使用的病人血清标本收集周期较长, 有些标本存放时间久, 或保存不当, 抗原降解, 效价下降, 难以检测。

综上所述, 我们制备的抗烟曲霉小鼠抗体在体外无论是对烟曲霉裂解抗原, 还是培养上清中的分泌抗原都有很好的检测效果, 这证明我们的检测体系对于检测曲霉抗原是有一定作用的, 但在应用至临床中还需要克服一定的困难, 后续我们可对抗体标记方式进行改进, 放大检测效果, 提高检测灵敏度。另外也可对免疫原的选择做出改进, 以获得灵敏度更高的抗体。

参考文献

- [1] Samson R A, Visagie C M, Houbraken J, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*[J]. *Stud Mycol*, 2014,78:141-173.
- [2] Arastehfar A, Carvalho A, Houbraken J, et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics[J]. *Stud Mycol*, 2021,100:100115.
- [3] Maertens J, Theunissen K, Verbeken E, et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients[J]. *Br J Haematol*, 2004,126(6):852-860.
- [4] Pitt J I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health[J]. *J Med Vet Mycol*, 1994,32 Suppl 1:17-32.
- [5] Kwon-Chung K J, Sugui J A. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen?[J]. *PLoS Pathog*, 2013,9(12):e1003743.
- [6] Filler S G, Sheppard D C. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells[J]. *PLoS Pathog*, 2006,2(12):e129.
- [7] Denning D W, Chakrabarti A. Pulmonary and sinus fungal diseases in non-immunocompromised patients[J]. *Lancet Infect Dis*, 2017,17(11):e357-e366.
- [8] Denning D W, Page I D, Chakaya J, et al. Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource-Constrained Settings[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018,24(8).
- [9] Denning D W, Pleuvry A, Cole D C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults[J]. *Med Mycol*, 2013,51(4):361-370.
- [10] Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies[J]. *Blood*, 2012,119(8):1831-1837, 1956.
- [11] 刘纳, 鲍永霞. 曲霉菌特异性抗原抗体检测在肺曲霉病诊断中的研究进展[J]. *临床肺科杂志*, 2020,25(03):449-451.
- [12] Lass-Florl C. How to make a fast diagnosis in invasive aspergillosis[J]. *Med Mycol*, 2019,57(Supplement_2):S155-S160.

- [13]金文芳, 桂淑玉. 侵袭性肺曲霉病的临床特点及其危险因素分析[J]. 临床肺科杂志, 2018,23(06):1043-1048.
- [14]林敏杰, 张英为, 邱玉英. 肺纤维化合并肺气肿的研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2020,25(03):445-449.
- [15]李培, 林东昉. 欧洲癌症研究和治疗组织(EORTC)及真菌研究组教育与研究共同体(MSGERC)关于侵袭性真菌病定义共识的修订及更新[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021,21(04):495-500.
- [16]Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall[J]. J Biol Chem, 2000,275(36):27594-27607.
- [17]Latge J P, Kobayashi H, Debeaupuis J P, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*[J]. Infect Immun, 1994,62(12):5424-5433.
- [18]Fontaine T, Latge J P. Galactomannan Produced by *Aspergillus fumigatus*: An Update on the Structure, Biosynthesis and Biological Functions of an Emblematic Fungal Biomarker[J]. J Fungi (Basel), 2020,6(4).
- [19]Patterson T F, Thompson G R, Denning D W, et al. Executive Summary: Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis, 2016,63(4):433-442.
- [20]Fortun J, Martin-Davila P, Gomez G D L P, et al. Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis in non-hematological patients[J]. J Infect, 2016,72(6):738-744.
- [21]Acosta J, Catalan M, Del P A, et al. A prospective comparison of galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of pulmonary invasive aspergillosis in medical patients under intensive care: comparison with the diagnostic performance of galactomannan and of (1--> 3)-beta-d-glucan chromogenic assay in serum samples[J]. Clin Microbiol Infect, 2011,17(7):1053-1060.

- [22]Reiss E, Obayashi T, Orle K, et al. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections[J]. *Med Mycol*, 2000,38 Suppl 1:147-159.
- [23]Pfeiffer C D, Fine J P, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis[J]. *Clin Infect Dis*, 2006,42(10):1417-1427.
- [24]Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, et al. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study[J]. *Clin Infect Dis*, 2005,41(9):1242-1250.
- [25]Fisher B T, Westling T, Boge C, et al. Prospective Evaluation of Galactomannan and (1-->3) beta-d-Glucan Assays as Diagnostic Tools for Invasive Fungal Disease in Children, Adolescents, and Young Adults With Acute Myeloid Leukemia Receiving Fungal Prophylaxis[J]. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2021,10(8):864-871.
- [26]Yamamoto T, Oishi K, Suizu J, et al. False-positive Elevation of Beta-D-glucan and Aspergillus Galactomannan Levels Due to Mendelson's Syndrome after Rice Aspiration[J]. *Intern Med*, 2022,61(19):2935-2939.
- [27]Vena A, Bouza E, Alvarez-Uria A, et al. The misleading effect of serum galactomannan testing in high-risk haematology patients receiving prophylaxis with micafungin[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2017,23(12):1000-1001.
- [28]张维, 沈凌. 血清半乳甘露聚糖抗原及烟曲霉特异性抗体检测在侵袭性肺曲霉病诊断中的价值[J]. *检验医学*, 2019,34(01):38-41.
- [29]Ullmann A J, Aguado J M, Arikan-Akdagli S, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018,24 Suppl 1:e1-e38.
- [30]Lass-Flörl C, Samardžić E, Knoll M. Serology anno 2021-fungal infections: from invasive to chronic[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2021,27(9):1230-1241.
- [31]车小燕, 丘立文, 郝卫, 等. 抗烟曲霉菌单克隆抗体鉴定和初步应用[J]. *中国免疫学杂志*, 2002(03):175-177.
- [32]郝卫, 潘玉先, 廖志勇, 等. 1 组曲霉单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国真菌学*

- 杂志, 2008(03):129-133.
- [33] Wang Z Y, Cai J P, Qiu L W, et al. Development of monoclonal antibody-based galactomannoprotein antigen-capture ELISAs to detect *Aspergillus fumigatus* infection in the invasive aspergillosis rabbit models[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012,31(11):2943-2950.
- [34] Hao W, Pan Y X, Ding Y Q, et al. Well-characterized monoclonal antibodies against cell wall antigen of *Aspergillus* species improve immunoassay specificity and sensitivity[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008,15(2):194-202.
- [35] Prasad A, Agarwal K, Deepak D, et al. Pulmonary Aspergillosis: What CT can Offer Before it is too Late![J]. *J Clin Diagn Res*, 2016,10(4):E1-E5.
- [36] Thornton C R. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2008,15(7):1095-1105.
- [37] Yuen K Y, Chan C M, Chan K M, et al. Characterization of AFMP1: a novel target for serodiagnosis of aspergillosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2001,39(11):3830-3837.
- [38] 王艳芳, 曾磊, 陈学东, 等. 双抗原夹心 ELISA 法检测马尔尼菲青霉 Mp1p 抗体[J]. *南方医科大学学报*, 2013,33(03):439-443.
- [39] 刘玲丽. 白念珠菌特异性 Csa2 蛋白和新型隐球菌特异性 Cpl1 蛋白免疫学检测方法的建立和评价[D]. 南方医科大学, 2014.
- [40] 刘俞谷. 抗烟曲霉单克隆抗体的制备及结合表位分析[D]., 2021.
- [41] Kirkman-Brown J, Bjorndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis[J]. *Fertil Steril*, 2009,91(2):627-631.
- [42] Wang Y F, Cai J P, Wang Y D, et al. Immunoassays based on *Penicillium marneffei* Mp1p derived from *Pichia pastoris* expression system for diagnosis of penicilliosis[J]. *PLoS One*, 2011,6(12):e28796.
- [43] 王雁云, 张阳德. 生物素标记人免疫球蛋白 IgG 重链的效果评估[J]. *中国现代医学杂志*, 2012,22(12):7-9.
- [44] 吕志强, 于佳, 张蔚, 等. 侵袭性真菌感染的预后因素分析[J]. *中国医师杂志*,

- 2014(7):925-929.
- [45]杨芳, 申元英. 抗真菌药物耐药机制的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2015(18):4317-4320.
- [46]White P L, Parr C, Thornton C, et al. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. J Clin Microbiol, 2013,51(5):1510-1516.
- [47]Morelli K A, Kerkaert J D, Cramer R A. Aspergillus fumigatus biofilms: Toward understanding how growth as a multicellular network increases antifungal resistance and disease progression[J]. PLoS Pathog, 2021,17(8):e1009794.
- [48]Barat B, Wu A M. Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum[J]. Biomol Eng, 2007,24(3):283-291.
- [49]Sugawara K, Kamiya N, Hirabayashi G, et al. Voltammetric homogeneous binding assay of biotin without a separation step using iminobiotin labeled with an electroactive compound[J]. Anal Sci, 2005,21(8):897-900.
- [50]Durkin M, Estok L, Hospenthal D, et al. Detection of Coccidioides antigenemia following dissociation of immune complexes[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009,16(10):1453-1456.

附 录

中英文对照缩略词汇表

英文缩写	英文全称	中文全称
IA	Invasive aspergillosis	侵袭性曲霉病
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
WB	Western blotting	蛋白质印迹（免疫印迹）
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	烟曲霉
	<i>Aspergillus terreus</i>	土曲霉
	<i>Aspergillus niger</i>	黑曲霉
	<i>Aspergillus flavus</i>	黄曲霉
IPA	Invasive pulmonary aspergillosis	侵袭性肺曲霉病
CPA	Chronic pulmony aspergillosis	慢性曲霉菌病
BALF	Bronchoalveolarlavagefluid	支气管肺泡灌洗液
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	慢性阻塞性肺疾病
GM	Galactomannan	半乳甘露聚糖
ODI	Optical density index	光密度指数
LFD	Lateral-flow device	免疫层析侧流装置
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Dulbecco 改良 Eagle 培养基
HRP	Horseradish Peroxidase	辣根过氧化物酶
ATCC	American Type Culture Collection	美国菌株保藏中心
M	molecules per liter	摩尔每升
mM	Millimole per liter	毫摩尔每升
°C	Celsius degree	摄氏度

附 录

ml	Millilitre	毫升
μl	microliter	微升
d	Day	天
h	Hour	时
min	minute	分钟
mg	milligram	毫克
μg	microgram	微克
mm	millimetre	毫米
μm	micron	微米
rpm	revolutions per minute	转/分钟
TBS	Tris-buffered saline solution	TBS 缓冲液
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
IFA	Indirect immunofluorescence	间接免疫荧光
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640	RPMI-1640 细胞培养基
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
IgM	Immunoglobulin M	免疫球蛋白 M
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
TMB	TMB Color liquid	TMB 显色液
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SDS-PAGE	Sodium salt-Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PEG1450	PolyethyleneGlycol1450	聚乙二醇 1450
TM	Talaromyces marneffe	马尔尼菲篮状菌