

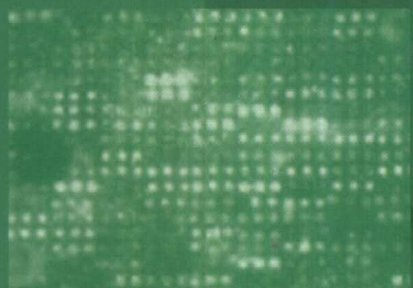
“十五”国家重点图书

现代生物技术丛书

生物技术 与疾病诊断

——兼论人类基因治疗

卢圣栋 主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

RUC
182
“十五”国家重点图书

现代生物技术丛书

生物技术与疾病诊断

——兼论人类基因治疗

卢圣栋 主编

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

·北京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物技术与疾病诊断——兼论人类基因治疗/卢圣栋主编.
—北京:化学工业出版社,2002.2
(现代生物技术丛书)
ISBN 7-5025-3617-5

I.生… II.卢… III.①生物技术-应用-疾病-
诊断②基因治疗-研究 IV.R446

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 000476 号

现代生物技术丛书
生物技术与疾病诊断

——兼论人类基因治疗

卢圣栋 主编

责任编辑:孟 嘉 杨燕玲

责任校对:李 林

封面设计:于 兵

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话:(010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市管庄永胜印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 11³/₄ 字数 275 千字

2002 年 2 月第 1 版 2002 年 2 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3617-5/Q·15

定 价:25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责退换

序

建立在分子生物学、分子遗传学、生物化学、微生物学、细胞学以及化工、计算技术等基础之上的现代生物技术(生物工程),是20世纪后半期国际上突飞猛进的技术领域之一,它为人类保健、农牧业、食品工业、环境保护以及精细化工等产业的发展提供了前所未有的动力。展望新世纪,可以预料生物技术的前景更为光辉灿烂。本丛书将就该领域的研究动态逐个进行详细介绍,这里我们仅概述其突出进展与读者分享。鉴于各领域发展迅速和编者水平有限,丛书定有遗漏和不足之处,敬请读者指正。

一、基因组和后基因组学

人类基因组计划(HGP)正式启动于1990年,这是一个跨世纪、跨国界的最伟大的生命科学与工程,经美、英、法、德、日、中6国的合作和努力,已于2001年完成全部序列测定。这一成就可以与原子弹计划和登月计划相媲美。它将对生命科学和人类健康产生巨大影响。应用各种技术,上千个与疾病相关的基因已被定位,并有近百个疾病基因被克隆。毫无疑问,这将为新药研究设计和疫苗制备提供依据,且已有多个物质进入临床试验。

与此同时,小家鼠、果蝇、线虫、拟南芥、水稻、啤酒酵母,以及多种真菌、细菌的基因组研究相继开展,其中拟南芥基因组的全序列测定业已完成。由于微生物的基因组远小于多细胞真核生物,且细菌和酵母基因中不存在内含子,因而便于分析,迄今已在酵母基因组中发现了一些与人类疾病基因同源的基因,研究这些基因在酵母中的生理功能,将有助于了解相关疾病的发病机理。

今天,一个崭新的领域——生物信息学迅速发展,它将基因的结构、蛋白质功能以及物种的进化在基因信息的基础上统一起来。这一学科的发展,对基因组和后基因组学研究及对人类健康和农业发展将产生深远的影响。

二、基因工程(重组DNA技术)

体外DNA重组技术始于1972年,首先在大肠杆菌中获得成功,继而扩展到其他微生物,生产出了多种新型发酵产品。美国批准上市的基因工程产品有人类胰岛素、人类生长因子、白介素、干扰素、牛型生长激素疫苗等,并不断有新的品种进入临床应用。重组微生物的应用,也为高等生物作为表达外源基因的宿主提供了技术和经验,如哺乳动物细胞株、昆虫细胞株、转基因动物、转基因植物,都有可能作为生产需要糖基化的重组蛋白质的宿主。

我国基因工程研究起步较晚,自1986年“863”计划实施以来,生物技术药物的研究和产业化获得迅猛发展,至1998年已有14种基因工程药物、3个基因工程疫苗和数十个重组诊断试剂投放市场。

三、转基因作物及其他农业生物工程

农业生物技术中最重要的是转基因作物 (GMC)。近十年间 GMC 发展速度极快, 1996~2001 年全球 GMC 的种植面积增长了 30 倍。2000 年达 4 420 万公顷, 比 1999 年增长 11%, 2001 年又在 2000 年的基础上增长 19%, 达 5 260 万公顷。GMC 种植面积占相关作物全球种植面积的比例依次为: 大豆 46%、棉花 20%、油菜 11%、玉米 7%。

我国 GMC 的种植面积在 13 个国家中居第四位。国产转基因 Bt 抗虫棉的育成和推广, 开创了国内基因工程农业应用的成功范例, 仅 2001 年种植面积达 60 万公顷。抗虫棉的杀虫性强, 农药用量可减少 70%~80%, 既降低了用工成本, 又保护了环境。

继获得第一代 GMC (抗除草剂、抗虫、抗病等) 之后, 第二代转基因作物已呼之欲出, 重点是进一步改良作物品质, 提高其营养水平 (如“金稻米”等), 或以植物作为生物反应器生产医疗保健产品 (如口服疫苗等)。同时, 针对旱、涝、盐碱、低温等恶劣自然环境, 培育各类抗逆作物。

此外重组根瘤菌、重组联合固氮菌, 抗病杀虫重组微生物的开发和应用也取得了明显的成效。

四、克隆动物及转基因动物

动物体细胞克隆技术的发展为生产蛋白质类药物、器官移植、挽救珍稀濒危动物以及培育优良品种等奠定了基础。最近, Wilmut 等用山羊胚胎的核转入去核未受精的卵母细胞, 产生了克隆动物——Dolly 羊, 成为科学上的重大突破, 并在多种动物中得到重复。

转基因动物的成功引导了一种新型制药工业, 即利用转基因山羊、绵羊和乳牛的乳汁来生产治疗人类疾病的蛋白类药物。转基因动物发展的另一动向是克隆修饰的猪, 为人体器官移植提供外源器官, 以缓解临床上对人体器官的迫切需求。

体细胞克隆山羊在我国的上海市转基因研究中心及陕西的中国杨凌克隆动物基地都获得了成功。

五、细胞工程和组织工程

多年来我国植物组织培养和细胞工程研究在国际上是领先的。我国学者通过花药和花粉单细胞培养培育出烟草、水稻、小麦、大麦、油菜、甘蔗等作物的新品种、新品系, 种植面积逾 100 万公顷。脱病毒快速繁殖的主要作物有香蕉、马铃薯、甘蔗、木薯、香草兰、草莓、柑橘、苹果、葡萄、花卉和观赏植物。紫草、三七等植物细胞已可在发酵罐中大量培养。我国的传统中药涉及 5 000 种左右植物, 细胞培养是中药资源开发的一个重要方面。

我国学者在动物细胞工程方面也作出了重要贡献。例如亲缘关系远近不同的鱼类可进行各种核质组合, 在变种间、属间及科间都获得了具有独特性状的

核质重组鱼。

动物发育工程中另一重大进展是干细胞株的建立，这已成为国际上研究的热点。干细胞是指未充分分化、但具有再生为各种组织器官和个体潜在功能的细胞。血液干细胞能够分化、生成整个血液系统，用造血干细胞移植来治疗白血病和一些遗传血液病，是医学界正在探索的课题。最近，以色列科学家首次从胚胎干细胞培养出人类心脏组织，它可以正常跳动，并且有新生心脏组织的电特性和机械特性。波兰科学家用脐血干细胞成功地培育出了脑细胞，有可能被用于帕金森病、脑震荡等疾病的治疗和脑部损伤的修复。美国科学家最近成功地将胚胎干细胞分化成人类骨髓中的造血先驱细胞，并进一步培养成红细胞、白血球和血小板。这些结果预示着人类有可能获得取之不尽的血源。我国科学家已成功地将干细胞体外培养成胃和肠黏膜组织，这是继利用干细胞原位培养皮肤组织全能修复之后，人类再生组织器官方面的又一重大成果。

六、环境生物工程

我国是环境污染较严重的国家，环境生物工程在防治各种污染中将起重要作用。众所周知，油轮海上倾油可引起大面积海域污染，国外虽采用“超级细菌”（含有多个降解烃类的质粒）进行海面浮油处理，但其效果尚有待改进。化学农药对土壤的污染虽可用具专一性降解能力的特种细菌处理，但作用也甚缓慢。相对而言，较为先进的方法是采用可被降解的生物农药。此外，河流、湖泊水域的污染防治、酸雨危害以及城市垃圾的处理等，也都是亟待解决的问题。

七、酶工程

酶工程是现代生物技术的重要组成部分，其特点是利用酶、含酶细胞器或细胞（微生物、植物、动物）作为生物催化剂来完成某些重要的化学反应。应用范围包括医药、食品、化学工业，诊断分析和生物传感器等。涉及的品种不少，诸如糖化酶、淀粉酶、洗涤用酶以及与 β -内酰胺抗生素生产有关的青霉素酰化酶、7-ACA酰化酶等，其市场需求、生产规模和产值均很可观，并已产生巨大的经济效益。随着酶的大量应用，各种酶反应器和固定化技术应运而生，更进一步地推动了酶工程的发展。

当代酶工程发展的趋势之一是寻找耐极端条件的酶，如耐高温、耐酸碱、耐盐等。这些酶存在于嗜高温、嗜酸碱、嗜高盐的细菌中。近年来对这些细菌的研究进展迅速，这将为酶工业提供源源不断的新型酶类。

八、新型能源和清洁能源的开拓

随着化石能源逐年减少，再生能源的研制开发已备受国际关注。虽然我国石油和煤炭储量丰富，但从长远考虑，还需对这一课题予以重视。展望未来，新型能源，特别是清洁能源的开发很有必要。

氢气是无污染的清洁能源，燃烧后不产生二氧化碳、硫、氮氧化物等有害物质，国外的燃氢汽车已研制成功。产氢的微生物甚多，值得重视的是光合细

菌，该菌可利用工业废水产氢，同时具有农用肥效的作用。

巴西和美国是燃料乙醇生产技术和商业应用比较成熟的国家。作物秸秆、废报纸等生物材料是生产再生能源的最廉价原料，所生产的燃料乙醇成本可低到每加仑 1.10 美元，虽然仍高于每加仑 0.80~0.90 美元的汽油批发价，但随着技术的改进，生产成本将会逐步降低。

九、新型生物传感器的研制

要研制新型生物传感器，需要新型的酶和生物材料，这些酶需能耐高温、酸、碱或低温。已发现的这类特殊生物材料有嗜盐细菌的紫膜，这是一种光敏材料，可转化光子为 ATP。另一个例子是磁细菌细胞中的微小磁石 (Fe_3O_4)，对细胞起导航作用。当代正竞相研制 DNA 芯片，以色列学者已用其建成简单的计算机。

生物传感器应用范围广泛，包括临床检测、免疫反应、反应罐过程检测、环保毒物检测等，不胜枚举。

十、生化工程

包括发酵工艺、过程检测与控制、反应模型建立、反应器的设计和应用，以及包括产品提取纯化、包装在内的下游加工工艺等方面，这是生物技术产业化的最后重要过程。

本丛书以应用生物技术为主，包括必要的基础知识和前景展望。丛书包括 15 个分册，即基因工程、蛋白质工程、酶工程、生物信息学、植物细胞工程、动物细胞工程、微生物工程、生物制药技术、高级生物传感器、环境生物工程、农业生物工程、糖生物工程、生物技术与疾病诊断——兼论基因治疗、组织工程、生物工程下游技术。

每册均由工作在第一线的专家撰写，概要阐述了国内外生物技术的进展和趋势。期望本丛书的出版能够对推动我国生物技术的研究开发及产业化作出微薄的贡献。

编者衷心寄语青年朋友，认识生物技术的光辉前景，祝愿你们以聪明才智为我国的生物技术作出创新贡献。

焦瑞亭 曾士学

2002 年 1 月

前 言

2000年初的一天,意外收到上海科学院植物生理研究所焦瑞身老师自美国发来的一个传真称,他正组织编写一套关于生物技术的丛书,约我协助编写《生物技术与疾病诊断——兼论人类基因治疗》这一个分册。师命不可违。我勉为其难地接受了这个在个人学识与时间上均难企及的任务。现在该分册终于面世了。如果该书对广大读者小有裨益,我将因没有完全辜负焦瑞身老师的厚望而十分高兴。

本分册共有五章。第一章由中国医学科学院基础医学研究所林嘉友教授与高扬副教授介绍单克隆抗体在疾病诊断中的应用;第二章由同一单位黄尚志教授介绍遗传性疾病及其他疾病的基因诊断技术;第三章由在美国的厦门大学生物系李庆阁副教授以及中山医科大学何蕴韶教授等介绍荧光技术与疾病诊断问题;第四章由军事医学科学院放射医学研究所陈忠斌博士与王升启教授介绍基因芯片技术在基因诊断中的应用;第五章由我简介当代人类基因治疗的研究概况。总之,本书简要介绍了自20世纪70年代现代生物技术崛起以来该领域已发展出的疾病诊断及人类疾病基因治疗方面的前沿成就与技术方法。

需要特别谈及的是关于多基因遗传性疾病的基因诊断问题。当前认为,遗传性疾病约有6 000种,约30%为传统观念上的、遵循孟德尔法则的单基因缺陷疾病;约70%为涉及多个基因的、具有对疾病的家族倾向性与易感性特点、又不遵循孟德尔法则的遗传性疾病,主要包括恶性肿瘤、心脑血管疾病、内分泌疾病、自身免疫性疾病以及中枢神经系统疾病等。本书没有专门成章系统介绍多基因疾病的基因诊断问题。一是因为当前对多基因(复杂性状)疾病相关基因的研究尚处于初步阶段,迄今尚无任何一种多基因疾病的相关基因已被完全阐明。二是因为如果某个基因的突变已被完全确认为同某种多基因疾病相关,在这项复杂而艰巨的研究工作获得了肯定结果之后,将已确认的相关突变基因作为对该病诊断的一个指标,在应用中所运用的技术手段几乎无异于诊断单基因突变的技术,因此似无必要专门列章加以介绍。随着研究工作的深入与发展,一旦某一或某些多基因疾病的相关基因被完全阐明,那时才有可能考虑是否列章专门介绍某一或某些多基因疾病的基因诊断问题。

本书的作者均为日夜忙碌在研究工作第一线的专家,他们应邀承担有关章节的写作任务,几乎全然是出于友谊与支援的考虑。我对于他们在百忙中所给予的真诚的援助与所付出的艰辛劳动表示由衷的深切感谢。我同时感谢化工出版社的有关领导的深切关注和为本书的形成及出版所付出的辛勤劳动。

本书的错误与缺点在所难免,欢迎批评与指正。

卢圣栋

2001.7.18

于中国医学科学院
中国协和医科大学
北京

“现代生物技术丛书”编委会

编委会主任 焦瑞身

编委会成员(以姓氏汉语拼音为序)

郭礼和	中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所	研究员
贾士荣	中国农业科学院生物技术中心	教授
焦瑞身	中国科学院上海植物生理生态研究所	研究员
伦世仪	江南大学	中国工程院院士 教授
俞俊棠	华东理工大学	教授
张树政	中国科学院微生物研究所	中国科学院院士 研究员
朱宝泉	上海医药工业研究院	研究员

本册主编与编写人员

主 编 卢圣栋

编写人员(以姓氏汉语拼音为序)

陈忠斌	军事医学科学院放射医学研究所
高 扬	中国医学科学院基础医学研究所
何蕴韶	中山医科大学达安基因诊断中心
黄尚志	中国医学科学院基础医学研究所
李庆阁	厦门大学生物系
林嘉友	中国医学科学院基础医学研究所
卢圣栋	中国医学科学院
王升启	军事医学科学院放射医学研究所

目 录

第一章 单克隆抗体及其在疾病诊断中的应用	1
第一节 单克隆抗体的制备和特性	1
一、单克隆抗体的制备	1
二、单克隆抗体的特性	3
第二节 在临床诊断检测中主要的单克隆抗体	3
一、针对传染病病原体的单克隆抗体	3
二、针对肿瘤特异性抗原和相关抗原的单克隆抗体	4
三、对人白细胞分化抗原的 CD 系列单克隆抗体和黏附分子单克隆抗体	5
四、针对人各类免疫球蛋白重链和轻链特异性单克隆抗体	7
五、针对内分泌激素和激素受体的单克隆抗体	8
六、细胞因子单克隆抗体	9
七、单克隆抗体体内诊断——放射免疫显像定位诊断肿瘤概况	9
第三节 单克隆抗体药物治疗研究与展望	10
一、单克隆抗体药物的临床应用	10
二、单克隆抗体药物的作用特点	11
三、单克隆抗体药物对肿瘤相关靶点的特异性作用	11
四、单克隆抗体治疗存在的问题与解决途径	11
五、近年来进入临床试验的单克隆抗体	12
参考文献	14
第二章 基因诊断	15
第一节 遗传学基础知识	15
一、遗传病的概念	15
二、遗传的分子基础	16
三、遗传病分类	20
四、遗传方式	21
第二节 基因突变及基因多态性	28
一、DNA 多态性	28
二、基因突变类型	32
第三节 基因诊断的方法及途径	34
一、基因诊断技术	34
二、基因诊断的途径	44
第四节 基因诊断策略	49
一、基因诊断的质量控制	49
二、遗传病基因诊断的伦理学问题	51
三、基因诊断的策略	52

第五节 遗传病的预防与产前基因诊断	64
一、症状前诊断和杂合子筛查	65
二、产前基因诊断	66
第六节 染色体荧光原位杂交	70
一、FISH	71
二、间期核 FISH	72
三、比较基因组杂交	72
四、原位引物延伸和原位 PCR	73
五、染色体 FISH	73
第七节 亲子鉴定和个体识别	73
一、检测方法	73
二、亲子鉴定	74
三、个体识别	76
四、几个有关的技术问题	76
参考文献	78
第三章 基因诊断新技术与荧光检测	79
第一节 荧光的基础知识	79
一、荧光的基本概念	79
二、影响荧光强度的因素	80
三、荧光淬灭与荧光共振能量转移	81
四、各向异性	82
第二节 实时荧光 PCR 原理	83
一、基因诊断与核酸扩增	83
二、PCR 产物的检测方法	83
三、实时荧光 PCR 的原理	84
第三节 实时荧光 PCR 在临床诊断中的应用	88
一、基因检测	88
二、基因分型	90
三、实时 PCR 的应用实例	93
参考文献	98
第四章 基因芯片技术在基因诊断中的应用	100
第一节 引言	100
一、基因芯片主要类型与制作原理	101
二、样品制备和基因芯片检测原理	102
三、基因芯片技术应用	105
第二节 在骨髓移植 HLA 分型中的应用	108
一、骨髓移植 HLA 分型技术现状	108
二、基因芯片技术在骨髓移植 HLA 分型中的应用	109
第三节 在地中海贫血基因检测中的应用	110
一、国内外研究进展	110

二、基因芯片及在地中海贫血检测中的应用·····	112
第四节 在细菌耐药检测中的应用·····	113
一、细菌抗生素耐药性现状及趋势·····	113
二、细菌对抗生素的耐药机制·····	114
三、检测细菌耐药性的遗传学方法·····	117
四、 β -内酰胺类抗生素耐药基因芯片制备·····	118
第五节 在分支杆菌耐药性检测中的应用·····	121
一、常见分支杆菌耐药性分子机制·····	121
二、基因芯片技术应用于分支杆菌耐药性基因突变检测·····	129
第六节 在乙型肝炎病毒耐药检测中的应用·····	130
一、HBV 治疗药物·····	130
二、HBV 核苷类药物耐药性机制·····	133
三、HBV 耐药寡核苷酸基因芯片的制备和初步应用研究·····	134
第七节 在肿瘤基因突变检测中的应用·····	138
一、寡核苷酸芯片检测点突变的影响因素·····	139
二、寡核苷酸芯片在 K-ras、N-ras 点突变检测中的应用研究·····	141
三、p53 基因突变寡核苷酸芯片设计制备·····	145
参考文献·····	148
第五章 人类基因治疗述评·····	151
第一节 基因治疗的基本技术路线·····	151
一、基因治疗的类型·····	151
二、体细胞基因治疗的技术方法·····	152
第二节 基因治疗研究概况·····	153
一、遗传性疾病的基因治疗·····	153
二、恶性肿瘤的基因治疗·····	153
三、心血管疾病的基因治疗·····	155
四、艾滋病的基因治疗·····	156
第三节 非病毒载体基因治疗·····	160
一、完全非病毒的基因转移方式·····	161
二、病毒增强的基因转移方式·····	164
参考文献·····	165
中西文名词对照·····	167

第一章 单克隆抗体及其在疾病诊断中的应用

免疫系统的任务是对“自己”和“非己”抗原的识别和应答，担负机体的免疫防御、免疫监视和免疫自稳等重要的生理功能。

对人体免疫系统功能的认识首先是从抗感染免疫开始的。1890 年 Behring 和 Kitasato 应用白喉外毒素免疫动物，发现其血清中可产生一种能中和外毒素的物质，称为抗毒素。随后，人们从免疫动物或传染病患者血清中发现有多种能与病原微生物或其产物发生特异性结合的物质，统称为抗体 (antibody)。能诱导机体产生抗体并与其发生特异性反应的物质称为抗原 (antigen)。抗原抗体间的特异性结合是建立免疫血清学诊断方法的理论基础。在抗体发现 100 多年后的今天，免疫血清学诊断方法也由单纯的免疫凝集、免疫沉淀、免疫扩散技术发展为结合不同标记物（如放射性同位素、荧光物质、酶和化学发光物质等）的免疫标记技术，检测过程和数据读取也逐步向半自动化和自动化过渡。免疫血清学诊断方法具有多指标、大样本和高度自动化等众多优点，代表现今检测技术最高水准的抗体芯片技术也已进入临床应用阶段。但是各种检测方法的基本原理仍然依赖于抗原抗体间的特异性结合。纵观免疫血清学检测技术发展的历史不难发现，这是一部抗体生产技术、标记技术和检测自动化技术发展的历史。建立一种能够持续产生特异性强、效价高的抗体制备方法是发展免疫学检测技术的基本条件之一。

早期抗体制备的相关研究主要集中在免疫途径、抗原剂量、加强免疫、免疫佐剂、抗体纯化和非特异性吸收等方面的技术开发，这些工作部分解决了抗体的特异性和效价问题，但未能解决抗体的持续产生和质量稳定的问题。1975 年 Köbber 和 Milstein 首次成功地将绵羊红细胞免疫的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，经过筛选、克隆化培养等步骤，制备出小鼠抗绵羊红细胞单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb, 简称单抗)。这一技术的问世使抗体制备和应用技术发生了革命性的变化。一旦建立分泌针对某一抗原的特异性抗体的杂交瘤细胞株，即可在体外永久培养，持续获得特异性和效价均完全相同的单克隆抗体。解决了血清学检测中试剂标准化的所有难题，在医学生物学领域产生了极大的影响。由于这一贡献，Köbber 和 Milstein 获得了 1984 年诺贝尔生物学奖。目前，这一技术已日趋完善，并在小鼠—小鼠 B 淋巴细胞杂交瘤技术基础上，又发展了人—人、人—小鼠以及大鼠—大鼠 B 淋巴细胞杂交瘤技术。除了 B 淋巴细胞杂交瘤（单克隆抗体制备技术）外，还建立了 T 淋巴细胞杂交瘤技术。

第一节 单克隆抗体的制备和特性

一、单克隆抗体的制备

应用杂交瘤技术制备抗体被视为第 2 代抗体生产技术。其基本原理为：骨髓瘤细胞可以在体外培养扩增，但不能产生特异性抗体；免疫的脾细胞可以产生抗体，但不能在体外传代扩增；应用细胞融合技术使这两种细胞杂交，经过适当的筛选过程，即可获得能在体外传代培养，又可产生特异性抗体的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞株的建立是一项十分复杂的过程（见图 1-1），高效的免疫计划、快速的筛选检测方法、及时的阳性细胞克隆是成功的关键。

一旦建立能分泌预定特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株，就可用以制备相应的单克隆抗体。目前制备单克隆抗体的方法有体内、体外和体内外结合法 3 类。

体内法是将杂交瘤细胞接种与该杂交瘤的脾细胞来源鼠（如 Balb/c 小鼠或裸鼠）腹腔内，诱生腹腔瘤和含单克隆抗体的腹水。一般从每只小鼠可获 1~10 ml 腹水，约含 10~50 mg 单克隆抗体。体内法简易可行，其缺点是产物混有正常小鼠免疫球蛋白（Immunoglobulin, Ig），给单克隆抗体纯化增添困难。产物也有可能污染微量杂质和热原，甚至有污染鼠类病毒的危险。此外，产量不高，生产 1 kg 单克隆抗体需 2 万~5 万只小鼠。当前体内法生产的单克隆抗体主要用作诊断试剂。

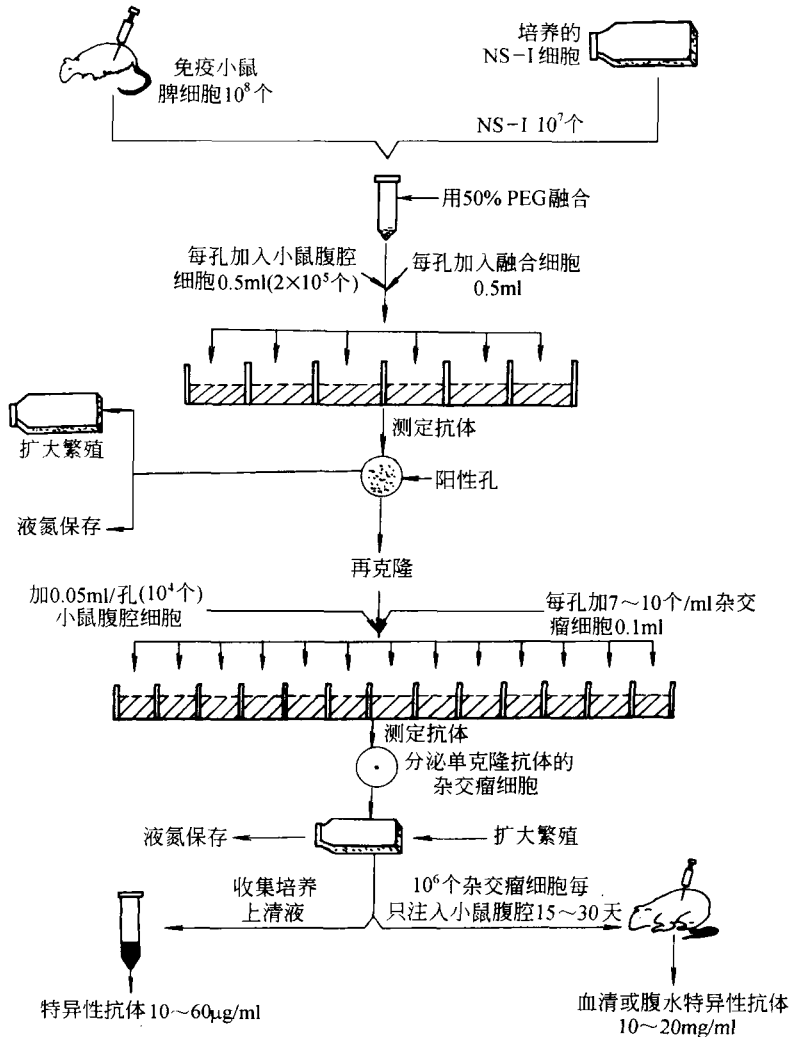


图 1-1 分泌特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株建立的流程图

用于防治疾病和提纯抗原的单克隆抗体所需量大，现正逐步采用工业化生产，即利用一定的体外培养系统在实验室内批量生产，包括采用无血清培养液支持系统的悬浮培养法、灌注培养法、微囊培养法、微载体培养法、中空纤维反应-分离器连续培养法以及 DNA 重组的细菌发酵法。体外培养法所得产物既无正常小鼠 Ig 混杂，也无鼠类病毒污染的危险，但培

养液用量大，成本高，最终产物仍混有培养液中的各种成分。

为能大批量生产，有的公司已建成体内外结合的牛淋巴液循环法。据称每头成年牛每天能提供 100 L 淋巴液，持续 50~100 天，用 100 L 淋巴液可生产 5 g 单克隆抗体。从长远看，用基因工程生产单克隆抗体可能成为一个值得注意的取代方法。

二、单克隆抗体的特性

由一个杂交瘤细胞株克隆产生的单克隆抗体是一种十分明确的生物化学制品，每个杂交瘤细胞株只能合成一类或一个亚类的 Ig，其独特型和恒定区完全相同，因此它是针对单一抗原决定簇的高度特异性的均质抗体。单克隆抗体没有常规的多克隆抗血清在实验中所表现的非特异性交叉反应。

每种单克隆抗体对相应抗原有其恒定的亲和力，而由常规技术免疫动物制取的多克隆抗血清，其亲和力有很大的批间差异。在实际工作中可根据各种单克隆抗体对抗原亲和力的大小而加以针对性使用。亲和力大的单克隆抗体可用作检测相应抗原，提高实验的敏感性，而亲和力较小的单克隆抗体可制成固相亲和层析柱，用于提纯相应抗原，增加抗原的回收率。现知单克隆抗体亲和力的大小与制取供融合用的免疫淋巴细胞的免疫抗原剂量和免疫程序有一定关系。如每次注射低剂量抗原，每两周一次，共免疫 4 次以上，建株后细胞分泌单克隆抗体的效价并不太高，但对抗原的亲和力很高。反之，用大剂量抗原免疫，所得杂交细胞则产生效价高但亲和力低的单克隆抗体。

单克隆抗体的特性赋予它用作诊断试剂的优越性，但单克隆抗体的优点在某种意义上又成了它的缺点。由于常规检测的对象大都是大分子抗原，带有许多不同的决定簇。如用高度特异性的单克隆抗体，它仅对单一抗原决定簇起反应，其敏感性显然不如多克隆抗体。目前的趋势是将几种已知针对不同抗原决定簇的单克隆抗体适当的混合后使用，可获得良好的效果。

此外，同一单克隆抗体在不同检测体系中，其血清学特性存在明显的差异。有文献报告某些抗人免疫球蛋白 M (Immunoglobulin M, IgM) 重链单克隆抗体在血凝反应中虽显示较高的效价，但在酶联免疫吸附试验 (ELISA) 中则基本不表现出抗体活性。值得注意的是，由于单克隆抗体仅针对相应抗原分子上某一抗原决定簇，在应用于 ELISA 的双抗体夹心法时，包被的抗体与该抗原决定簇结合后，使被结合的抗原不再与酶标记抗体起作用而呈现假阳性反应。即使应用两种针对不同抗原决定簇的单克隆抗体检测具有两种不同决定簇的抗原，也应考虑“空间位阻”效应，即两个决定簇相邻近时也可产生 ELISA 反应阴性。由于单克隆抗体仅能识别免疫原上的单位点，而不能与大多数的抗原形成复杂的沉淀反应所必需的网络，因此现有大多数单克隆抗体不能单独用于以免疫沉淀反应为基本原理的检测方法，如放射免疫扩散、免疫电泳或琼脂扩散。另有某些类型或亚型的单克隆抗体不能结合补体，这类单克隆抗体则不能用于补体依赖性细胞毒试验。

总之，现有资料表明，不同种类的单克隆抗体可表现不同的血清学特性，用作诊断试剂时要根据实验目的和抗体特性慎加选用。

第二节 在临床诊断检测中主要的单克隆抗体

一、针对传染病病原体的单克隆抗体

传染病病原体的检测是免疫血清学检测最重要的领域，目前重要的常见人类和动物的传染病病原体的单克隆抗体大多数已开发成为商品，如肝炎病毒 (Hepatitis virus)、乙肝病毒、HbcAg、HbsAg、人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV), HIV-1

(gp41, gp120, gp17, gp160, gp24, gp36, gp26, gp15)、HIV-2、腺病毒 (Adeno virus)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、巨细胞病毒 (Cytomegalo virus)、柯萨奇病毒 (Coxsackie virus)、登革热病毒 (Dengue virus)、EB 病毒、埃可病毒 (Echo virus)、肠道病毒 (Enterovirus)、头状瘤病毒 (Human papilloma virus)、单纯性疱疹病毒 (Simplex virus)、T 细胞病毒 (HTLV-1)、流感病毒 (*Influenza A*)、白血病病毒 (Leukemia virus)、副流感病毒 (*Parainfluenza*)、脊髓灰质炎病毒 (Polio virus)、狂犬病毒 (Rabies virus)、呼吸道合胞病毒 (Respiratory syncytia virus)、风疹病毒 (*Rubella*)、轮状病毒 (Rotari virus)、黄热病毒 (Yellow Fever virus)、水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-zoster virus)、脑炎病毒 (Encephalitis virus)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、隐孢子虫 (*Cryptosporidium*)、结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、大肠杆菌 (*E. coli*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、志贺氏杆菌 (*Shigella*)、链球菌 (*Streptococcus*)、弓形体 (*Toxoplasma*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*) 等的单克隆抗体。

上述针对病原体抗原的单抗，主要用于检出和鉴定特异性病原体。常用的检测方法有 ELISA 法、免疫斑点法、免疫金标记法、直接凝集法等实验方法。补体结合试验、中和试验和血凝试验也用于检测某些病毒感染的病人血清或体液中的抗原。

众多方法中以 ELISA 双抗体夹心法应用得最多。其基本原理是特异性的抗原抗体反应与灵敏快速的酶促反应间的有效结合。将特异性抗体 (一抗) 包被在固相载体上，捕获检测样品中的待测抗原，再与酶标记的抗体 (二抗酶结合物) 结合，最后酶作用于底物产生可见反应。底物由无色还原型变为有色氧化型的量与参与反应的酶成正比，酶又与待测样品中的抗原量成正比，测定酶促底物的变化即可计算出检测抗原的量，整个过程见图 1-2。该方法的灵敏度约为 1~0.1 ng。

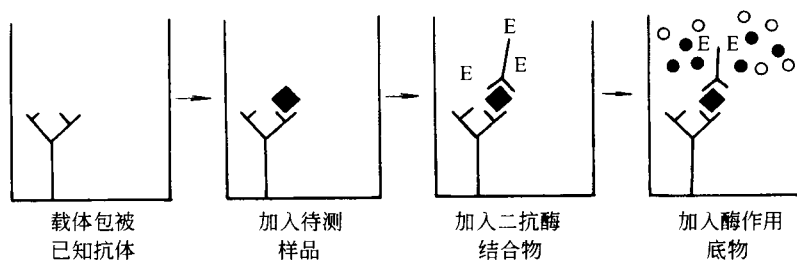


图 1-2 ELISA 双抗体夹心法

二、针对肿瘤特异性抗原和相关抗原的单克隆抗体

1. 胚胎性抗原的单克隆抗体

(1) 甲胎蛋白 (AFP) AFP 为胚胎期的功能蛋白，正常人体中含量很低，但癌症等病理情况下异常升高。婴儿脐带血中 AFP 的含量 1 000~5 000 $\mu\text{g/L}$ ，出生一年内即降到成人水平 $<40 \mu\text{g/L}$ ，而且长期不变。当胎儿宫内死亡、患急性慢性肝炎时 AFP 可见升高情况；70% 以上原发性肝细胞癌患者 AFP 含量超过 400 $\mu\text{g/L}$ 。

(2) 癌胚抗原 (CEA) CEA 是一种酸性糖蛋白。成人血清浓度极低 ($<5 \mu\text{g/L}$)，结肠癌患者中约 60%~90% 患者升高。以后发现，80% 胰腺癌患者、60% 胃癌患者、75% 肺癌患者、60% 乳腺癌患者也有高表达。

2. 糖蛋白抗原单克隆抗体

糖蛋白抗原 CA50 是一种唾液酸脂和唾液酸蛋白。应用 CA50 单抗测量正常人血清浓度约小于 $20\ \mu\text{g/L}$ 。66.6% 肺癌患者, 88.2% 的肝癌患者, 68.9% 的胃癌患者, 88.5% 卵巢癌或子宫颈癌患者, 94.4% 胰或肝管癌患者, 70% 的直肠癌、膀胱癌患者其血清浓度皆有升高。

(1) CA125 CA125 最初被认为是卵巢癌特异的, 但深入研究发现它也是一种广谱的标志物。正常值小于 $35 \times 10^3\ \mu\text{g/L}$ 。82.2% 卵巢癌患者、58% 胰腺癌患者、32% 肺癌患者其血清浓度均有不同程度的升高。

(2) CA15-3 CA15-3 是乳腺上皮表面糖蛋白的变异体。正常血清浓度小于 $40 \times 10^3\ \mu\text{g/L}$ 。乳腺癌晚期患者、75% 乳腺癌其他期患者其血清浓度明显升高。50% 肝细胞癌患者、53% 肺癌患者、34% 卵巢癌患者其血清浓度也会升高。

(3) CA19-9 CA19-9 为唾液酸化的乳-N-岩藻戊糖 II, 是一种类黏蛋白的糖蛋白成分。正常血清浓度小于 $37 \times 10^3\ \mu\text{g/L}$ 。79% 胰腺癌患者、58% 结肠癌患者、49% 肝癌患者、67% 胃癌患者、67% 胆囊癌患者其血清浓度皆有异常升高。10% 左右的肺癌、乳腺癌患者其血清浓度亦有升高。

(4) CA549 CA549 也是乳腺癌的标志物。为一种酸性糖蛋白。大部分健康女性其血清浓度小于 $11 \times 10^3\ \mu\text{g/L}$, 50% 乳腺癌患者、卵巢癌患者、40% 前列腺癌患者、33% 肺癌患者其血清浓度有异常升高。

3. 神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 单克隆抗体

血清 NSE 是神经内分泌肿瘤的特异性标志, 如神经母细胞瘤、甲状腺髓质癌和小细胞肺癌 (70% 升高)。正常人血清 NSE 水平小于 $12.5 \times 10^3\ \mu\text{g/L}$ 。

4. 前列腺特异性抗原 (PSA) 单克隆抗体

PSA 是一种糖蛋白, 是目前诊断前列腺癌的敏感指标。正常人血清中 PSA 小于 $4\ \mu\text{g/L}$, 这个正常值有随年龄增长的趋势, 50 岁以下者一般低于 $4.0\ \mu\text{g/L}$, 50~55 岁为 $4.4\ \mu\text{g/L}$, 60~69 岁为 $6.8\ \mu\text{g/L}$, 70 岁以上者为 $7.7\ \mu\text{g/L}$ 。异常升高预示前列腺癌的可能, 前列腺癌的总阳性率可达 69%~92.5%。

5. 肿瘤标志物单抗的临床应用

目前检测肿瘤抗原和肿瘤相关抗原的方法以免疫放射分析法为主, 其原理是利用同位素标记抗体与待测样品中的抗原特异性结合, 在一定条件下分离结合的抗原抗体复合物, 检测其放射活性与标准曲线比较即可计算出检测抗原的量, 见图 1-3 (a)、(b)。该方法的灵敏度为 $1\sim 0.01\ \text{ng}$ 。

肿瘤标志物单抗已广泛用于临床, 诊断相应的恶性肿瘤。在临床诊断应用中要注意其引起的假阳性和假阴性。

引起假阳性的情况包括以下几种。①良性疾病时, 如炎症性疾病会使一些肿瘤标志物增高; 肝脏疾病时, AFP、CA19-9、CEA 等指标有可能升高。②某些特殊生理变化会引起假阳性, 如妊娠时 AFP、CA125 及月经时 CA125 有可能升高。③在肿瘤手术治疗、化疗和放疗过程中也可造成假阳性。引起假阴性情况包括: ①产生肿瘤标志物的细胞数目少; ②细胞或细胞表面被封闭; ③体液中的一些抗体与肿瘤标志物形成复合物。

三、对人白细胞分化抗原的 CD 系列单克隆抗体和黏附分子单克隆抗体

白细胞分化抗原 (leukocyte differentiation antigen) 是指血细胞分化成熟的不同谱系 (lineage)、分化的不同阶段及细胞活化过程中出现或消失的细胞表面标记分子。白细胞分化