

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利说明书

G01N 33/68

G01N 33/53

G01N 33/577

[21] ZL 专利号 85105430.7

[45]授权公告日 1997 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1034976C

[22]申请日 85.7.16 [24]颁证日 97.3.6

[21]申请号 85105430.7

[73]专利权人 维尤海茨私人公司

地址 澳大利亚维多利亚州

[72]发明人 安东尼·威廉·尼纳尼

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 辛敏忠 顾柏棣

[56]参考文献

AUA2493184

PATHOLOGY 1981. 1. 1 13:547-555

PATUELOGG 1983. 1. 1 15(4)395-391

审查员 潘爱群

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图页数 10 页

[54]发明名称 鉴定制造粘蛋白抗原细胞的方法

[57]摘要

一种鉴定制造粘蛋白抗原细胞的方法, 包括从病人体内生理液, 特别是诸如血, 血清或血浆等取出的样品, 测定其小肠粘蛋白抗原 (SIMA) 或 (和) 大肠粘蛋白抗原 (LIMA) 的存在, 它可为早期诊断癌提出依据, 同时也揭示了用于鉴定的装置。

权 利 要 求 书

1. 一种检测病人中癌细胞或其他产生粘蛋白抗原的细胞存在的体外诊断方法，该方法包括将取自病人的血液、血清或血浆样品与小肠粘蛋白抗原(SIMA)和/或大肠粘蛋白抗原(LIMA)的抗体或其片段接触的步骤，和检测所述抗体或其片段与其相应抗原结合的步骤，以指示该样品中小肠粘蛋白抗原和/或大肠粘蛋白抗原的存在。

2. 根据权利要求1所述方法，其中所述SIMA和/或LIMA的抗体或其片段是用能够提供可测信号的标记物标记的。

3. 根据权利要求2所述方法，其中所述抗体或其片段是用酶或放射性同位素标记的。

4. 根据权利要求1、2或3所述方法，其中所说抗体是单克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述方法，包括步骤：

(1) 把小肠粘蛋白抗原和/或大肠粘蛋白抗原的抗体或其片段与固体支持物结合；

(2) 使所述样品与所述固体支持物接触；和

(3) 检测所述样品中是否存在与跟固体支持物相联结的抗体或其片段相结合的相应抗原。

6. 根据权利要求5所述方法，其中所述检测结合的相应抗原的步骤包括：

(4) 使大肠粘蛋白抗原和/或小肠粘蛋白抗原的抗体或其片段与所述固体支持物接触，这些抗体及其片段被标记，从而能提供检测信号；和

(5) 检测所述标记了的抗体或其片段是否与结合在固体支持物上的相应抗原相结合。

说 明 书

鉴定制造粘蛋白抗原 细胞的方法

本发明是涉及鉴别制造粘蛋白抗原细胞的方法，包括从病人体内取出生理液，再使它与小肠粘蛋白抗原和（或）大肠粘蛋白抗原的单克隆或多克隆抗体接触以鉴别细胞中粘蛋白抗原是否存在。这种技术对在探查与癌有关物质为目的的试验对鉴别健康人与得癌人之间的差异是有很大的帮助的。

癌胚抗原（CEA）是研究得最广泛的与胃肠癌有关的抗原，事实上也是在所有与肿瘤有关的抗原研究得最多的。这种抗原存在人胎儿肠道中，但不存在或以很少量存在于正常成人结肠中。癌胚抗原是1956年首先被哥德（Gold）和弗里得曼（Freedman）在人结肠癌中发现的（见参考文献9）。癌胚抗原出现这种癌病人的血液中，起初被看作成胎抗原，认为它很有希望用于人消化系统癌症的早期诊断。逐渐人们发现血液的癌胚抗原试验的特异性对早期诊断胃肠道癌没有足够的价值，因为它常常导致包括吸烟者支气管炎和肝病的新生弹性状态的增高数目（见参考文献10）。例如10%的正常人显示了假阳性结果，这些人血液中癌胚抗原虽然增加了，但并没有患癌，甚至连良性瘤也没有（见参考文献11~13），就是说也有大量的假阳性率（大约有50%的肠道癌病人血液中癌胚抗原水平未显示提高）。尽管有些局限，癌胚抗原试验对癌症患者的手术前估计和手术后仍有相当的价值。癌胚抗原试验占现代癌诊断的大约40%。

α -胚蛋白 (AFP) 是在胎儿中大量存在而在正常成人中几乎没有的另一种成胎抗原。原发性肝癌，继发肝性肝癌及大多数各种类型^型睾丸癌的患者血液中 α -胚蛋白都增加了。但在中毒性肝损伤和肝硬化病人血中 α -胚蛋白也增加。尽管它的有用性也是有限的，但 α -胚蛋白测定相当于占癌诊断的大约20%。

最近，基于单克隆抗体的放射免疫学测定与肿瘤有关的CA19-9 T M抗原已经可以在市场上买到。这种CA19-9 T M抗原试验已被证实对胰腺癌各个阶段都有很高敏感性和特异性，但对结直肠 (Colorectal) 癌，这种抗原试验敏感性似乎较低。

1980年从大肠癌中分离出一种新的粘糖蛋白抗原 (见参考文献1)，这种物质也存在于正常成人的小肠，故被命名为“小肠粘蛋白抗原 (S I M A)”。小肠粘蛋白抗原是一种成胎抗原，8-12周胎儿的整个胃肠道都可发现它，到婴儿诞生时正常情况下它就只在小肠中存在于了，但在胃肠道和其它器官的很多部位的癌中却发现了小肠粘蛋白抗原。另一种称作“大肠粘蛋白抗原” (L I M A) 的粘蛋白物质也从正常大肠中分离出来，大肠粘蛋白抗原也是一种成胎抗原，很很多癌都不同程度地产生它。广泛的组织免疫学研究证实大肠粘蛋白抗原性质上不同于小肠粘蛋白抗原，大、小肠粘蛋白抗原两者也区别于癌胚抗原。这些与肠道有关的粘蛋白抗原在胃、胆囊、肺、乳腺，口腔一些肿瘤及上述器官的潜恶状态细胞中都发现存在。(见参考文献1-8)。

用抗小肠粘蛋白抗原和抗大肠粘蛋白抗原的单克隆和多克隆抗体给正常胎儿和成人组织及不同器官的癌免疫组织化学染色的结果示在表1。

表 1：人组织中的小肠粘蛋白抗原（S I M A）及大肠粘蛋白抗原（L I M A）的免疫组织化学研究小结。

胎儿组织（8—40周）	S I M A	L I M A
胃	+	+
小肠	+	—
大肠 8—12周	+	—
13—40周	—	+
正常成人组织		
胃	—	—
小肠	+	—
大肠	—	+
胆囊	—	—
口腔	—	—
乳腺	—	—
肺	—	+
癌		
结肠癌	+	+
胃癌	+	+
口腔癌	+	+
胆囊癌	+	+
乳腺癌	+	—
肺癌	—	+

首先发现，尽管这些粘糖蛋白分子量很小，但应用抗体试验大部分患大肠癌的病人血清都可测出小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原。而在健康人对照血清中测不到或只能发现很少量小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原。开始用一小组病例的研究已经表明，小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原试验结合使用能诊断出80%的这种癌患者，而用癌胚抗原只能诊断出56%的这种癌患者。这两种肠粘蛋白抗原在诊断B和C阶段癌（Duke氏分级）也比癌胚抗原试验更为敏感。此外，在大多数直肠溃疡性结肠炎患者的血中也发现了大肠粘蛋白抗原。这些病人一般都发展成大肠癌。同样地，小肠粘蛋白抗原与大肠粘蛋白抗原都可以诊断癌的先兆状态。

本说明书中所用的小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原本语不仅限于下面详述的粘蛋白抗原，而且也包括其它抗原性质有关的可能在生理液，特别是血清或血浆中存在的部分。

根据本发明，提供一个体外诊断有癌细胞或其它产生粘蛋白抗原细胞的病人的方法。该方法包括从病人体内取出生理液样品，测定它是否有大肠粘蛋白抗原（和）或小肠粘蛋白抗原的步骤。

最可取的方法包括先从病人体内取出生理液，再使它与小肠粘蛋白抗原和（或）大肠粘蛋白抗原的单克隆或多克隆抗体接触，或与该抗体一部分片段接触或与标记了的该抗体或抗体一部分片段接触，这种标记可以为以后诊断提供探查信号。从而可以测定该抗体，抗体片段或标记了的抗体及其片段是否与相应的抗原结合。

用于这种诊断特别可取的生理液是血液。血清或血浆。

另外，还提供了体外诊断的装置和系统，以测定病人体内癌细胞或其它产生粘蛋白抗原细胞是否存在，这套装置或系统也包括了探查

病人生理液样品中小肠粘蛋白抗原和（或）大肠粘蛋白抗原是否存在的手段。

特别是本发明还提供了以病人血液，血清作为生理样品时体外测定小肠粘蛋白抗原和（或）大肠粘蛋白抗原存在与否的装置或系统。这套装置或系统包括与两种肠粘蛋白抗原起免疫反应的单克隆或多克隆抗体及它们的片段，以及显示所说抗体和它们相应抗原发生免疫反应的指示方法。

特别是在本发明实施中。诊断系统更进一步包括一种与固体支撑物连接的组分，该组分即含有(I)小肠粘蛋白抗原和（或）大肠粘蛋白抗原或(II)能与这两种之一或两种抗原都能起免疫反应的抗体。

这方面还包括一系统用不同形式指示方法的实例。一种是含有一种标记，这种标记提供了可探查的信号，这种标记与和小肠粘蛋白抗原及大肠粘蛋白抗原或二者之一起免疫反应的抗体结合。另一种指示方法是含有一种提供可探查信号的标记，这种标记与和小肠粘蛋白抗原及大肠粘蛋白抗原起免疫反应的第二抗体结合，所谓第二抗体激活了所述第一抗体，指示发生了与第一抗体结合的免疫反应。进而，指示方法可包括含有标记的葡萄球菌 A 蛋白。在任何实施中所用的标记物可能包括已知的酶，放射性成分，荧光化合物或诸如生物素等化合物。

用免疫试验测人肠粘蛋白抗原及大肠粘蛋白抗原能在直肠癌各个阶段测定这些粘蛋白抗原。测定结果使得这个系统比 CA19-9 T M 抗原试验或癌胚抗原试验更有用和更有价值。

本发明所用小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原免疫学试验除了主要用于诊断粘膜癌以外，对诊断诸如结肠炎或胃溃疡等炎症及癌的先

兆均有价值。

如上述是显而易见的，粘蛋白抗原S I M A和L I M A首先可以从分离它的来源来定性（用下面详述的方法）。进而可以用小肠粘蛋白抗原及大肠粘蛋白抗原的单克隆和多克隆抗体及免疫组织化学技术来鉴别和定性，例如“竞争”免疫试验技术，用抑制抗小肠粘蛋白抗原与特异性胃肠组织结合来测定抗原活性。

下面将进一步说明本发明。

根据本发明的小肠和大肠粘蛋白抗原免疫学试验，提供了探测病人癌细胞和其它产生粘蛋白抗原的细胞高灵敏度的诊断工具。特别是在手术前为估计肿瘤范围和外科手术及其它理疗（例如：放射治疗，化疗）后的基本数据以在可治疗阶段检测复发率和监测治疗效果。本发明的诊断系统可以首先与癌胚抗原或其它已知的现在正使用着的与肿瘤有关抗原的免疫学试验结合使用。此外，小肠粘蛋白抗原／大肠粘蛋白抗原（最好与癌胚抗原结合）诊断系统可用于普查有发展或肠道癌危险的人，例如：溃疡性结肠炎及胃溃疡病人，在这个领域初次检测后只用癌胚抗原试验是没有诊断价值的。

在本发明中，通过从大肠癌中提取的粘蛋白制剂使老鼠免疫生产了几种单克隆抗体，用在组织中的免疫组织化学染色给这些单克隆抗体分类。与类抗小肠粘蛋白抗原的抗体（与大肠癌和正常大肠反应）。免疫化学分析表明每类抗体的亲和性和差异达百倍。

下面的例子说明粘蛋白抗原的制备和特性，用于制造小肠和大肠粘蛋白抗原的多克隆和单克隆抗体的方法及根据本发明用这些单克隆抗体，体外诊断是否存在癌细胞或产生其它粘蛋白抗原的细胞。

例 1 :

A. 粘蛋白抗原的纯化和特性:

粘蛋白是从切除直肠癌组织得到样品提取出来的。从摘除肿瘤的组织得到正常大肠末端到肿瘤的区域,在用以前先用光学显微镜检查以证实它正常状态。从偶然伤亡的人的尸解中得到正常十二指肠,空肠和结肠的样品。从结肠癌(提取 L I M A 和 S I M A)。正常大肠(提取 L I M A 或正常十二指肠。空肠(提取 S I M A)的样品中用下述程序提取粘蛋白。

用于使老鼠免疫以生产单克隆抗体和筛选的粘蛋白制品是从组织学诊断作为“部分粘膜”的乙状结肠的腺癌样品制备的。把这样品组织(大约5克)切成小块,用10体积的含24 mM EDTA, 10mM 的N-乙基顺丁烯二酰亚胺, 1 mM 的盐酸苯苄胺的4 M 盐酸胍均浆。然后在20,000×g下离心20分钟,再用新鲜盐酸胍萃取一次,离心得到沉淀,把含有粘蛋白的上清液再用氯化 调至密度为1.35克/毫升,在105,000×g下离心64小时。得到的梯度分离成六个等分,密度范围从1.25—1.55克/毫升。每份都在蒸馏水中透析,测定蛋白质(用修改的Bradford方法)和已糖(参见文献21)以及用抗-S I M A 和抗-L I M A 的抗体来测定其抑制胃肠道组织的免疫荧光染色能力,从而确定其抗原活性,和用单克隆抗体的免疫学试验(详见下)来确定它的抗原活性。把含有最高抗原活性的部分再在氯化铯梯度中分级分离,重复以上测定。

(1) 大肠粘蛋白抗原: (L I M A)

大肠粘蛋白抗原位于梯度下部第2或第3部分,密度在1.30—1.55毫/毫升。大肠粘蛋白制剂是多分散的,但通常大约在

1.4 ± 0.08 处发现最高抗原活性。大肠粘蛋白抗原制剂典型的第三次氯化铯梯度离心的每个分级部分都具有抗原活性，已糖和蛋白质含量示在图 1 a，第 2 和第 3 部分的已糖/蛋白质比率 (W/W) 分别是 0.5 和 0.25。已糖，蛋白质的峰与抗原活性并不一致，第 3 部分含有大部分抗原活性。根据与酶连结的免疫学试验 (EIA) 测定，从一个典型试验中得到的大肠粘蛋白抗原总量为组织均浆液的大约 3.5%。大肠粘蛋白抗原纯化后达到千倍。在从正常大肠得到的大肠粘蛋白抗原制剂中一般测不到小肠粘蛋白抗原。在三明治免疫试验中 (即同一单克隆抗体必须与特定分子结合一次以上)，成功的应用大肠粘蛋白抗原制剂说明了为单克隆抗体辨认的抗原决定因子必须在特定分子上至少重复两次。

大肠粘蛋白抗原不能透过 7% 聚丙烯酰胺电泳说明它的分子量很大，进一步用凝胶过滤层析研究表明从 Sepharose 6 B 琼脂糖空隙能洗脱出大肠粘蛋白抗原 (它可以分离分子量约为 1×10^4 — 4×10^6 范围的球蛋白和分子量约为 10^4 — 10^6 即药用级的规格，Sepharose 2 B 也可洗出 LIMA (可分离分子量为 7×10^4 — 4×10^7 球蛋白和 10^5 — 2×10^7 的葡聚糖)。大肠粘蛋白抗原在 Sephacryl 1000 柱 (1 厘米 × 65.5 厘米) 上层析，用 10 mM 的磷酸盐缓冲液洗脱 (可分离分子量在 5×10^5 — 10^8 的葡聚糖) 洗脱曲线见图 2 a。大部分的大肠粘蛋白抗原的抗原活性在该基质上，洗脱后出现宽峰可能说明大肠粘蛋白抗原制备物的多分散性。还发现很多其它蛋白多糖分子与 LIMA 有相似的多分散度，这可能是由于其结构或凝集程度的变化影响分子量结果，但它们均无上述抗原分子的抗原性。

为了更好地估算大肠粘蛋白抗原的大小，把一系列制备物放入甘油梯度（10%—20%）进行超速离心以确定其沉降系数（用 Beckman SW 50 Ti 转头，以 22,000 转/分，离心 15 小时或用 42,000 转/分离心 5 小时，离心在 4℃ 恒温下进行）。

离心后梯度分级分离，取每部分在三明治试验系统进行抗原活性试验。一个典型的大肠粘蛋白抗原梯度表示在图 3 a。从各个离心参数计算平均分子量的沉降系数 S 值，可根据下式：

$$S = \frac{\ln R_t - \ln R_o}{w^2 \times t} \times 10^{13} \times 3600$$

其中 w 是角速度，t 是离心时间（小时），R_o 是由转轴到梯度顶部的半径，R_t 是由转轴到除去有抗原性峰的梯度部分的平均半径。从几个不同试验计算得到 S 值为 9.5 ± 1.5 。

为进一步得到大肠粘蛋白抗原性质的资料对它进行了一系列的物理，化学及酶学测定。这些结果总结在表 2 中。在三明治试验中大肠粘蛋白抗原的抗原性是稳定的，它可在 40℃ 下至少贮存 1 个月，在 100℃ 下至少贮存 5 分钟。煮沸 10 分钟或更长些时间损失 40% 活性。大肠粘蛋白抗原对煮沸的稳定性意味着这种抗原是一系列糖基化的分子，而抗原决定基包括碳水化合物或为碳水化合物所保护。把大量肠粘蛋白抗原用碱处理以切开其碳水化合物和蛋白质之间的 O—配糖键，分别用 0.01 M, 0.05 M, 0.10 M, 0.25 M, 0.50 M 的 KOH 处理（在 4℃ 下处理 2, 4 或 16 小时），处理后分别保留 85%, 70%, 55% 和 45% 的抗原活性。加入诸如 0.1 M 的 2—巯基乙醇等亲核剂，可以在较温和的条件（0.01 MKOH, 4℃,

处理4小时)下发生 β -消除反应,结果损失55%抗原活性。加之上述由于碱处理LIMA损失的部分抗原性,在甘油梯度上分析显示了平均分子量的分子沉降系数 S 值明显地降低(5.5)。这说明其分子量降低了(见图3a)欲使大肠粘蛋白抗原还原,在6M盐酸胍,0.5MN-三(羟甲基)氨基甲烷 $\text{pH } 8.1$,0.002M 乙二胺四乙酸,10mM 二硫苏糖醇在50℃下处理2,4或16小时,再用0.4M 碘乙酸在4℃下过夜烷基化,对其抗原性没有明显影响。

用一些高纯度酶酶解它以测定LIMA抗原的化学性质,进行免疫试验前把处理后样品煮沸5分钟或中和,用于胃蛋白酶以纯化酶。用一系列浓度的酶与LIMA恒温反应2,4或16小时,试验结果表明,不管是胃蛋白酶还是梭菌蛋白酶(*clostrypain*)对大肠粘蛋白抗原的抗原活性都没有任何明显的作用。(见表2)大肠粘蛋白抗原用木瓜蛋白酶消化(0.1或1.0毫克/毫升)在三明治试验中经过2,4或16小时消化后抗原活性明显丧失,仅剩20%。在竞争性ELISA试验中(该试验并不取决抗原上决定基的多价效应)。用木瓜蛋白酶消化2小时活性保留75%,4小时后65%,16小时后35%。这意味着在木瓜蛋白酶消化的温和条件下,大肠粘蛋白抗原可以降解成大部分都仅含一个抗原决定基的碎片,而这在三明治试验中是测不出的,只有在竞争试验中才能测出。其结果证明该抗原对木瓜蛋白酶有一定敏感性,但基本上是抗胃蛋白酶和梭菌蛋白酶的。

(II) SIMA (小肠粘蛋白抗原)

SIMA存在于密度1.29 g/ml与1.45 g/ml之间的2个或者3个部分,分布比较广,但是大部分抗原活性存在于密度 1.38 ± 0.05 的地方。图1b表示小肠粘蛋白抗原的典型CSC1(氯化铯)密度梯度离心中的第三部分中各组分的抗原性,

己糖和蛋白质的含量。抗原活性集中的 3, 4 两部分, 己糖和蛋白质比值。 (W_t / W_t 即重量/重量) 分别是 1.5 和 0.3, 通过 EIA 测定得知, 从典型的结肠癌样品中可以得到大约 40% 的小肠粘蛋白抗原。类似 LIMA 的提纯, 通过这些程序大约可以提纯 1000 倍左右。象小肠粘蛋白抗原一样, 大多数的结肠直肠癌组织中也含有相当多的大肠粘蛋白抗原, 而在正常的十二指肠和空肠的提取物中只有发现有小肠粘蛋白抗原, 没有发现大肠粘蛋白抗原。混杂的粘蛋白提取物通过抗大肠粘蛋白抗原单克隆抗体亲和层析柱, 可以从结肠直肠癌的小肠粘蛋白抗原样品中除去大肠粘蛋白抗原。通过单克隆或多克隆抗体的小肠免疫荧光染色的抑制作用及其与单克隆抗体的反应来鉴定制备中的小肠粘蛋白抗原。象对大肠粘蛋白抗原的叙述一样, SIMA 在三明治免疫测定中的应用, 表明了抗原部分上某个抗原决定部位的存在。

如大肠粘蛋白抗原的情况一样, 小肠粘蛋白抗原不能透过 7% 的聚丙烯酰胺电泳凝胶。不过用 Sepharose 2B 凝胶柱 (1.5 cm × 7 cm) 分析, 凝胶中显示出小肠粘蛋白抗原的存在并且分布广泛, 分子量比大肠粘蛋白抗原小得多, 琼脂糖凝胶 (Sepharose) 2B 柱用含有 4 M 盐酸胍; 25 M, pH 8.0, 的 Tris 缓冲液洗脱, 洗脱峰很多 (图 4)。小肠粘蛋白抗原同样要过 Sephacryl 1000 柱, 再次洗脱可以出现一个宽阔的小肠粘蛋白抗原峰, 其中所含小肠粘蛋白抗原比所有的大肠粘蛋白抗原的分子量都低很多。(图 2 a, 2 b)。

象上述的大肠粘蛋白抗原一样, 在 10% 到 20% 的甘油梯度之间测定了许多小肠粘蛋白抗原的 S 值, 一个典型的 SIMA 的梯度呈现在图 3 b 中。从大量实验计算得到 S 值是 4.8 ± 1.4 , 比大肠粘蛋白抗原低很多。

S I M A对碱和热的处理比L I M A更稳定，按照上述用碱处理大肠肠粘蛋白抗原的方法处理小肠粘蛋白抗原。抗原活性没有值得注意的改变。另外，煮沸5分钟。对小肠粘蛋白抗原的抗原活性亦没有明显影响，煮沸10分钟后只有6%的抗原活性丧失。（看表2）

象上述大肠粘蛋白抗原一样，小肠粘蛋白抗原用高纯度的酶消化（表2）。在三明治法酶连结免疫测定时（a Sandwich EIA）。小肠粘蛋白抗原的抗原活性不受梭菌蛋白酶的影响。用木瓜蛋白酶消化2小时，抗原活性也不受影响，然而在消化16小时后，抗原活性丧失50%。用胃蛋白酶消化，S I M A抗原活性丧失70%，与此相反，L I M A对胃蛋白酶的消化有抗性（胃蛋白酶10 μ g / ml 室温下过夜）。

表2：有关粘蛋白抗原的不同降解过程的结果。

* 处理后剩余活性百分率

	L I M A	S I M A
煮沸10分钟	60	94
碱处理	45	100
胃蛋白酶消化	100	30
木瓜蛋白酶消化（2小时）	20	100
木瓜蛋白酶消化（16小时）	20	50
梭菌蛋白酶消化	100	100
二硫化物还原作用	100	未做

许多提纯方法可以用于粘蛋白的纯化，方法如下：

1. 1 M过氯酸，用乙酸钠处理并且于70°C加热，或煮沸5分钟同样可以用于提高粘蛋白的纯度。

2. 已经证明：反复的C s c l梯度超速离心明显地改进了粘蛋白制剂的纯度。（提高10倍）

3. 利用单克隆抗体亲和层析，可以有两种方法：首先，如：用抗大肠粘蛋白抗原单克隆抗体，从小肠粘蛋白抗原制备中除去大肠粘蛋白抗原（反之亦然）；其次利用吸附作用和洗脱抗小肠粘蛋白抗原单克隆抗体上结合的粘蛋白（S I M A）的方法，从其它杂蛋白质中纯化 S I M A。

4. 利用植物凝集素柱，凝胶电泳，离子交换或者凝胶过滤层析，从正常组织或者癌组织中同样可以提纯粘蛋白抗原。

利用竞争性免疫组织化学方法和应用测定制备中小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原组分的单克隆和多克隆的 E I A 法，可以监视粘蛋白纯化的不同。

B · 多克隆抗血清的生产：

应用在这些研究中的多克隆抗 S I M A 抗血清是 M a 等人在兔子体内得到的（1980）。按照 M a 等的方法（1980）从正常大肠提取粘蛋白给兔子免疫接种的技术与生产辨认 L I M A 的多克隆抗血清的技术相似。这些类型的抗血清虽然最初用于监测粘蛋白的纯化步骤，但是相对而言，这些抗血清无特异性，有交叉反应，高度提纯的 S I M A 和 L I M A 制备的多克隆抗血清，可以用于下述的三 明治法免疫测定的两个面。

C · 单克隆抗体的制备：

免疫接种程序

大约八周的雌性 B a I b / c 小鼠，每只用大约 50 μ g 不完全纯化的癌组织粘蛋白，分 4 次皮下注射和 1 次腹膜内注射。开始时用完全弗氏佐剂（Freund's adjuvant）大约 4 周后，用同样的方法注射，改用不完全左剂。第二次免疫后大约 12 天，自小鼠尾静脉取血，并且用 E L I S A 法测定血清抗体滴度。第二次免疫三周，具有高滴度血清的小鼠通过腹膜内注射增强免疫力的辅助药，在磷酸盐缓冲液中

的 $10 \mu\text{g}$ 癌粘蛋白连续用 4 天, 第 5 天杀死小鼠, 取出脾脏与小鼠骨髓瘤细胞系进行常规的融合。

细胞融合, 杂交瘤生长, 克隆化

一个免疫小鼠的脾脏在磷酸盐生理缓冲液中 (GKN) 轻轻地梳理, 制成脾细胞悬液, 10^8 脾细胞与 5×10^7 骨髓瘤细胞 [X63-Ag8.653] [从 T-Stahelin, Hoffman La Roche 公司, 巴塞尔 (Basel), 瑞士 (Switzerland) 得到]。按照标准的程序融合, 脾细胞和骨髓瘤细胞用 1 分多钟的时间, 慢慢地与 50% 的 PEG-4000 混合。1.5 分钟后, 在 PEG 中悬浮的细胞用 7 ml GKN 溶液缓慢稀释 (超过 5 分钟), 然后用含有 10% 胎牛血清, 次黄嘌呤, 氨基嘌呤, 胸腺嘧啶的 RPMI 1640 稀释到大约 300 ml, 将这些稀释的细胞悬液注入 12 块 24 孔的多孔培养皿中 (multi-dishes)。每孔中含有 10^5 腹腔巨噬细胞, 培养基大约 7 天以后更换, 以后根据细胞生长需要而定。

经过 EIA 筛选后, 分泌抗粘蛋白抗体的杂交瘤细胞用 稀释法, 在有腹腔巨噬细胞滋养层的多孔培养皿上克隆两次。为了得到大量的单克隆抗体, 使分泌抗体的杂交瘤在 8-12 周的小鼠体内。象腹水癌一样地生长, 小鼠应提前 1-7 天用 0.5 ml 朴日斯烷 (Pristane) 腹腔内注射。注射后 2-4 周收集腹水, 并且贮于 -20°C 。当需要的时候, 用蛋白 A-Sepharose 亲和层析从腹水中提纯免疫球蛋白。

杂交瘤的筛选

(I) EIA

聚苯乙烯多孔培养皿用粗制的癌粘蛋白包被, 放置于 37°C , 3 小时。(癌粘蛋白含量 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 缓冲系 $\frac{\text{CO}_3^{2-}}{\text{HCO}_3^-}$, $\text{PH}=9.6$) 包被后, 小孔用磷酸盐缓冲液和吐温液 (PBS/Tween) 洗 4 次。培养杂交瘤的上清液在孔中保温培养 1 小时, 然后再用 PBS/Tween

洗4次，再加碱性酸酶连结的绵羊抗鼠免疫球蛋白于孔内保温培养。用PBS/Tween洗过后，再向蒸馏水洗，向孔内加入酶作用底物—磷酸对硝基苯酚。那些孔由于出现黄色产物—对硝基苯酚，而被确认为阴性孔（含有粘蛋白抗体的上清液）。

（Ⅱ） 荧光免疫组织化学

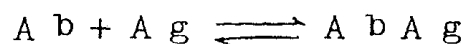
通过在EIA试验的第一轮筛选而鉴定的“阳性”杂交瘤细胞，再用免疫荧光技术筛选单克隆抗体给正常胃肠道器官和胃肠道癌切片上特有的细胞或组织染色的能力。杂交瘤培养液与玻片上的组织切片共同保温培养，用牛血清清蛋白封闭非特异性结合部位。然后组织切片与连结荧光物质的兔抗鼠免疫球蛋白共同保温培养。再洗去过量示踪抗体。组织切片用紫外光或者狭窄的兰色激发光光照射。通过荧光显微镜检查。

利用上述的方法，5种抗小肠粘蛋白抗原单克隆抗体（与正常小肠或结肠直肠癌粘蛋白反应的）和5种抗大肠粘蛋白抗原单克隆抗体（与正常大肠和结肠直肠癌粘蛋白反应的）得到鉴定。

单克隆抗体的定性

利用酶偶联抗IgG和IgM抗体（CSL）检测抗体的亚型。发现所有的单克隆抗体都是IgG的亚型。

为了充分地表示单克隆抗体的特性，它们的相对亲合力用两种方法测量，其一，通过蛋白A—Sepharose亲和层析，得到各种单克隆抗体纯净的IgG，精制的IgG用EIA滴定（滴度对蛋白浓度制做滴定曲线）曲线可以作为测量抗体相对亲合力的对照。其二，产生了竞争性EIA实验（看下文）。计算相对亲和常数利用具备抗SIMA单克隆抗体性质的SIMA制剂作为抑制剂和利用具备抗LIMA单克隆抗体性质的LIMA制剂作抑制剂，按照下面的等式进行计算。



$$K_a = \frac{[A b \cdot A g]}{[A b] \cdot [A g]}$$

在竞争性 E I A 测定中，当（粘蛋白）抗原的浓度可以产生 5% 抑制作用时。游离的和结合的抗体浓度相等的。即， $[Ab] = [AbAg]$ 。可以相对亲合常数 $K_a = \frac{1}{[Ag]}$ 。计算数据在表 3。（如果制剂不十分纯并且有杂蛋白存在时）因为真空的抗原浓度可能较低，所以 K_a 值是最小值，但是实际上可能仍是比较高的。

表 3

抗体	相对亲合常数
抗 S I M A 单克隆抗体：	(1 / m o l e)
4 D 1	4.2×10^{10}
4 C 2	3.3×10^{10}
3 C 5	2.4×10^{10}
4 D 3	1.6×10^{10}
2 A 1	1.0×10^{10}
抗 L I M A 单克隆抗体	
3 B 4	2.4×10^{10}
3 D 4	1.5×10^{10}
3 C 3	8.9×10^{10}
2 D 3	2.8×10^{10}
2 C 3	2.4×10^{10}

一方面测定是否每个抗小肠粘蛋白抗原单克隆抗体，以及另一方面是否每个抗大肠粘蛋白抗原单克隆抗体都分别结合于小肠粘蛋白抗原和大肠粘蛋白抗原分子上的相同抗原决定簇的方法，取自于 Friguet²⁰ 等人的方法（1983）。用包被于培养皿上的一定量的抗原，在所有可能的结合中，分别滴定各自的抗体。人们发现目前实验中所制备的单克隆抗体结合于抗原分子表面相同的或者是部分相同的抗原决定簇上。

例2 体外免疫诊断

为了探测血液中循环的粘蛋白，产生了两种免疫测定法，简述如下：

A·竞争性E L I S A试验

(I) 有关这种测定方法的步骤，简述在图5。初步实验表明加入肝素化或用E D T A处理或者加未经处理的血液的粘蛋白全部能够被回收，并且在稀释的血清或血浆中定量。未稀释的血清或血浆加到免疫测定的系统中将引起干扰。然而如果用稀释10倍的血浆就将不会观察到这种干扰。因此，用一系列并发溃疡性结肠炎的直肠结肠癌患者的血样和健康对照组一起，用竞争性E L I S A鉴定S I M A和L I M A。在正常人的血浆中添加S I M A和L I M A作标准。可能发现13/23（大约60%）的患不同期的结肠直肠癌患者L I M A及S I M A的含量高；4/5并发溃疡性结肠炎患者L I M A的含量高（但是无S I M A）。7名健康对照，用此种方法测定既未测到S I M A，又未测到L I M A。

(II) 为了观察低浓度的粘蛋白是否能够测定，设计了从血浆中浓缩和提取粘蛋白的方法。等体积的2 M过氯酸（P C A）。在室温15分钟内加到血浆或血清之中。8000×g，离心2分钟，除去上清液，沉淀物用与原样品体积相同的P B S分两次洗涤，混合再以8000×g，离心2分钟。上清液加P B S，最终体积是原始体积的10倍，然后在Minicon B15浓缩器中透析并浓缩10倍（Minicon B15可除去分子量150,000，Amicon Co）样品再稀释到原体积的10倍，再浓缩50倍，用过氯酸提取的结果是原样品体积的1/5，样品用前面说过的竞争性E L I S A法分析鉴定。添加不同浓度的粘蛋白于健康志愿者的血浆样品中，作为标准。39名患结肠直肠癌患者测定S I M A的结果。2名患乳腺癌，5名患溃疡性肠

炎。7各对照表明，在一些对照组的病人中S I M A抗原活性低，也能够检测。全部对照中除2名癌症病人外全处于较高水平，患者中60%的Ⅱ期结肠直肠癌（没有明显扩散），91%的Ⅲ期结肠直肠癌（有可觉察的局部淋巴结转移），86%的Ⅳ期结肠直肠癌（扩散癌，有播散到较远组织的可能，如肝）与对照组比较粘蛋白的水平升高。从一个Ⅰ期结肠直肠癌病人的血中也测到了S I M A，并且有两名Ⅰ期患者有乳腺癌。

L I M A的测定只用于稀释的血清样品，没有S I M A测定程序中的透析，浓缩步骤。仅小部分早期结肠直肠癌患者有可测定的L I M A。11%的Ⅱ期患者，Ⅲ期患者的29%，除67%的Ⅳ期患者外，血清L I M A都升高，大部分（80%）并发溃疡性结肠炎的患者循环的L I M A水平高，即便是使用这种相对来说不敏感的检测方法也高。因此这个方法在测定炎症性大肠疾患者方面可能是有价值的。

B·三明治（Sandwich）免疫测定：

上述单克隆抗体也可以用在三明治法测定中，这种测定方法，在改进检测灵敏度方面确实有不少优点，而且比上述竞争性抑制法步骤要简单的多。此外，三明治法的“信号”（如：孔中的放射性，酶标记抗体颜色）与粘蛋白的抗原浓度呈正比，这种关系大大地简化了计算而且简化了与竞争性抑制法比较时的结果处理。

这种方法的使用，可以使粘蛋白分子固定的单克隆抗体包被一个固体的表面，（用¹²⁵I或者酶标记）相同的被标记的单克隆抗体可以检测与包被抗体结合的粘蛋白（看图6）。

a·S I M A或L I M A同位素免疫测定（R I A）的程序（图6）。

1. 如果用H A多孔培养皿（millititer HA Plates）

(milliPore Corporation, USA), 培养皿的孔用以缓冲液稀释的精制单克隆抗体 IgG 和蛋白-A (大约 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 包被 (每孔 $50 \mu\text{l}$, $\frac{\text{HCO}_3^-}{\text{CO}_3^{2-}}$ 缓冲液, PH 9.6), 多孔培养皿在 37°C 保温培养 3-5 小时。

2. 加 $100 \mu\text{l}$ 血清样品或标准液, 加 $200 \mu\text{l}$ 的 0.2 M PH 5.0 乙酸钠, $70^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, 加热 15 分钟, 然后在 $9000 \times g$ 离心 10 分钟。用志愿者血清配制标准液, 含 SIMA 或 LIMAO, 1.5, 5.0, 15, 50, 150 和 $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 用含 1% BSA 的磷酸盐缓冲液稀释 ^{125}I 标记的单克隆抗体, 然后加到乙酸盐提取物的上清液中 ($100 \mu\text{l}$ 上清液加 $0.1 \mu\text{ci}$)。 39°C 下保温培养 1 小时。

4. 已包被的培养皿的孔用 PBS/Tween 洗 4 次, 并且用含 1% BSA 的 PBS 在 37°C 封闭此培养皿 30 分钟。

5. 封闭后, 培养皿用 PBS/Tween 洗 3 次。样品 (每孔 $50 \mu\text{l}$, 每个样品两个孔) 与 ^{125}I 标记抗体提前保温培养, 然后加入孔内, 在 4°C 条件下, 保温培养过夜。

6. 过夜后, 这些孔用 PBS/Tween 洗 5 次, 用滤纸吸干, 并且取出每个孔底部的滤纸片, 在 γ -计数器上计数。

规定以 μ (单位) / ml 表示 SIMA 和 LIMAO 的含量, 测定的 SIMA 和 LIMAO 的含量与对照管 SIMA 和 LIMAO 的标准蛋白含量成比例。

为了评价三明治法的可靠性和可重复性, 做了大量的实验, 表 4 表示对照血清的典型测定时, 三次测定间的变差, 血清 SIMA 的测定, 在 $1.5 \mu/\text{ml}$ 的水平上, 可变性最高 ($\text{CV} = 10\%$), 在

1.5 μ /ml 以上可以不考虑可靠性, (因此, 并非所有少于 5 μ /ml SIMA 的值都不是给定的具体值)。测定血清中 SIMA 为 5 - 500 μ /ml。那么这种方法内可变性是 5.6% 或者更少一些。

表4 SIMA 放射免疫测定的检测可变性

平均 SIMA 浓度 (μ /ml)	标准差	可变性 (%)
1.5	0.15	10.0
5.0	0.12	2.3
50	2.4	4.7
150	8.4	5.6
500	17.8	3.4

b. LIMA 酶联免疫测定 (EIA) 的程序 (图7)

1. 聚苯乙烯多孔培养皿 (Nunc 免疫板) 在碳酸氢盐缓冲系中用抗 LIMA 单克隆抗体 IgG 包被, (来自杂交瘤细胞系 2C₈) 在 37°C 下放置 3 小时, 培养皿用洗涤液 (PBS/Tween/叠氮钠, PH=7.2-7.6) 洗 2 次, 然后放干。

2. 在多孔培养皿的孔中, 每孔加入 50 μ l 的封闭液 (含叠氮钠的 PH=7.4 的 PBS 及牛血清清蛋白), 37°C 下保温培养 1 小时。

3. 加 200 μ l 的乙酸提取液 (含叠氮钠的, PH=5.0 的 0.2 M 乙酸钠) 到 100 μ l 的标准 LIMA 中或血清样品中 (标准 LIMA 溶于含叠氮钠的正常人血清中) (标准 LIMA 的抗原浓度为每毫升 0, 1.5, 5, 15, 50, 150 和 500 单位) 在 70 $\pm$ 1°C 条件下加热 15 分钟。冷却到室温。用水平转头, 在 10,000 $\times$ g 下离心 10 分钟。

4. 用洗涤液洗多孔培养皿 3 次, 放干。

5. 从用乙酸盐提取并经过热处理的标准液或者血清样品上清液取 $50\mu\text{l}$ 加到每个孔中（每个样品两个孔），于 37°C 保温 1 小时。

6. 用洗涤液洗多孔培养皿 4 次，然后放干。

7. 碱性磷酸盐酶和抗 L I M A 单克隆抗体复合物用含 1% 牛血清清蛋白的磷酸盐缓冲液 1 : 300 稀释，每孔加 $50\mu\text{l}$ ，在 37°C 下保温 1.5 小时。用洗涤液洗 4 次，用蒸馏水洗 3 次，然后放干，用（含 0.1M 氯化镁的 0.2M 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液）稀释缓冲液溶解底物（P-硝基苯酚磷酸盐），浓度为 2mg/ml 。每孔加 $100\mu\text{l}$ ，于 37°C 保温 20 分钟。

8. 每孔加入 $10\mu\text{l}$ 酶促反应抑制剂（ 0.5M 氢氧化钠）。

9. 在 405nm 处，用适当的多孔培养皿读数器读取光密度（ OD ）。

实验结果的评价

（I）以标准管平均光密度为 y 轴，以相对应的 L I M A 浓度为 x 轴。绘制标准曲线。

（II）利用每个血样的平均光密度，通过标准曲线，查相对应的 L I M A 的密度（ u/ml ）。

假如样本（L I M A 浓度大于 150u/ml ）需要另外稀释，从而得到一个可以在标准曲线上找到的数值，那么从曲线上查到的值必须乘以相应的稀释倍数，方能得到血清中 L I M A 的浓度。

实例在表 5 和图 8，图 8 是根据表 5 的数据绘制的。

表5 制作标准曲线的代表性数据

样本	记录 (O · D)	平均值	L I M A 浓度
标准 1	0 · 0 1 2 - 0 · 0 1 0	0 · 0 1 1	0
2	0 · 0 3 7 - 0 · 0 2 5	0 · 0 3 1	1 · 0 5
3	0 · 1 0 6 - 0 · 1 1 7	0 · 1 1 2	5
4	0 · 2 9 3 - 0 · 3 4 0	0 · 3 1 6	1 5
5	0 · 6 5 5 - 0 · 7 0 2	0 · 6 7 8	5 0
6	1 · 0 5 7 - 1 · 1 3 8	1 · 0 9 7	1 5 0
7	1 · 2 8 1 - 1 · 3 4 5	1 · 3 1 3	5 0 0

样本

1	0 · 6 0 7 - 0 · 6 3 3	0 · 6 2 0	4 0
2	0 · 4 4 5 - 0 · 4 4 6	0 · 4 4 5	2 3
	0 · 8 6 8 - 0 · 8 9 3	0 · 8 8 1	8 8

在表6中表示的是上述 L I M A E I A 的可重复性的实例, 表6表示含有不同浓度 L I M A 的血清样品检测两次之间的数值变化 (每项测定取三个数据) 。数值小于 $1.5 \text{ u} / \text{ml}$ (变化率 10% 的系数) 或者大于 $100 \text{ u} / \text{ml}$ (变化率 12% 的系数) 可变性最高。血清中 L I M A 浓度超过这个范围 (即 < 2 或 $> 150 \text{ u} / \text{ml}$) 即认为不可靠, 因此, 样品中若含 L I M A 大于 $150 \text{ u} / \text{ml}$ 就应该稀释后重新测定。

表 6 L I M A E I A 检测可变性试验

平均 L I M A 浓度 (u / m l)	标准离差 (u / m l)	可变性 (%)
1.5	0.15	10
5	0.30	6
50	3.7	6
150	7.0	5
500	6.0	12

c . 临床结果

表 7 罗列了一些不同疾病的患者和健康对照者血样的简要测定结果。表 7 表示检测血清中 S I M A , L I M A R I A (看上面 a) 和 C E A 的结果, 为了比较单纯 S I M A 阳性, 单纯 L I M B 阳性, 单纯 C E A 阳性, 或者三种抗原阳性之间任何组合的阳性样品数。

表 7 临床检验的简要结果

诊 断	患者 总数	测定肿瘤抗原的病人数						CEA	全阴性
		SIMA	LIMA	SIMA +LIMA	SIMA +LIMA	SIMA +CEA	SIMA +LIMA +CEA		
结肠癌	19	4			6	3		1	5
结肠粘膜	1			1					
十二指肠 疡	4				6				3
小肠恶性淋 巴瘤	3	1		2					
胃 癌——术前	2	1	1						10
术后	11		1						
治疗(未知)	30	3	10	1				1	15
胃溃疡	6	1							5
胃恶性淋巴瘤	4		3						1
食道 胃炎	2	1		1					(Postop)
食道癌	3				3				
胆囊									
胆囊癌	1	1							
胆囊炎/胆结石	17	2							15
胰脏									
胰癌	4	1							3

肺						
肺癌	3	2		2	1	3
乳房						
乳腺癌	3				1	1
乳腺恶性淋巴	5		3			2
瘤						
急性淋巴白血	3		2	1		
病						
健康对照	87	8	0			1
						78

根据这个表，L I M A 浓度 $\geq 10 \text{ u} / \text{ml}$ 即视为阳性，C E A 值 $\geq 10 \%$ 即视为阳性。病人血 S I M A 浓度 $\geq 25 \text{ u} / \text{ml}$ 视为阳性，对照经反复同样试验者 $\geq 20 \text{ u} / \text{ml}$ 亦视为阳性。

c. 其它的免疫分析程序

上述的“两相”免疫测定方向的变差，使得使用多克隆抗粘蛋白抗血清（如：兔和羊中升高）包被固体相成为可能，这将使未标记的单克隆抗体在测定时能作为“第二抗体”而加以利用，紧接着用标记的兔或绵羊抗鼠抗体测定鼠的单克隆抗体。这个体系（反之亦然，以单克隆抗体为固体包被相测定多克隆抗体也一样）比直接标定一种单克隆抗体提供了更多的阳性指征。

目前，围绕在三明治免疫测定中荧光酶底物的应用也应该受到重视。如碱性磷酸酶的底物：4 - 甲基伞酰磷酸酯（4 - methylumbelliferyl - (4 MU) - Phosphate）或 β - 半乳糖苷酶的底物 4 - 甲基伞酰 - β - 半乳糖苷（4 - mu - P - D - galactoside）。相同的单克隆抗体连结酶可以用上述的光谱光度计测定。估计灵敏度会增加 10 倍。已知的其它测定系统，如蛋白 A，抗生素蛋白 - 生物素，等也可以应用，在这些三明治免疫测定中标记的蛋白 A 是一个检测系统，那时固定相的包被抗体（单克隆的或者多克隆的）大概是一个 F (a b) 碎片，而检测抗体是一个含 F e 片段的完整分子。除多孔培养皿外，还有大量的不同的固体相可以应用于这个系统，如各种类型的带孔小珠。另外，膜也可以用作结合抗体的吸附表面。

参考文献:

1. Ma., J., De Boer, W., Ward, H. A. & Nairn, R. C. (1980 年)
“结肠癌中另一个成胎抗原”(Another Oncofoetal Antigen in
Colonic Carcinoma. 英国癌杂志 (Br. J. Cancer) 41期 325-328页.
2. Pihl. E. , Nairn. R. C. , Hughes. E. S. R. , Cuthbertson.
A. J. & Rollo. A. J. (1981 年) “粘膜结直肠癌; 免疫病理学
和预后” (Mucinous Colorectal Carcinoma: Immunopathology and
Prognosis ") 病理学 12期 439-447 页, (Pathology).
3. De Boer. W., Ma, J., Rees, J. W. & Nayman, J. (1981 年)
“在胆囊组织转化和瘤形成中不正常粘蛋白的产生——一项免疫组织
学研究” 组织病理学 5期 295-303 页 (1981) ”
Inappropriate mucin production in gall bladder metaplasia
and neoplasia an immunohistological study " Histopathology
5: 295-303.
4. De Boer. W., J. & Nayman, J. (1981 年)
“卵巢肿瘤中与肠道有关的抗原: 一项免疫组织学研究”
(Intestine-associated antigens in ovarian tumours: An
immunohistological study " 病理学 13期 547-555 页
(Pathology).
5. Ma. J., De Boer. W. & Nayman. J. (1982 年) “大肠癌中成
胎抗原的存在”(The Presence Of Oncofoetal antigens in
large bowel Carcinoma ") 澳大利亚和新西兰外科杂志 52期,
30-34 页 (Aust. & N. z. Journal Of Surgery)

6. Ma. J. , De Boer, W. & Nayman, J. (1982年)

“用荧光免疫法研究在胃肠组织转化和癌中的肠粘膜物质”,
(Intestinal Mucinous. substances in gastric intestinal
metaplasia and carcinoma studied by immunofluorescence”. 癌
49期 1664-1667 页 (Cancer).

7. Ma, J., Handley, C. J. & De Boer, W. (1983 年), “一种
卵巢肿瘤特异性粘蛋白抗原—组织免疫学和生物化学研究”
(An Ovarian tumour specific mucin antigen-immunohistological
and biochemical studies” 病理学, 15 期, 385-391 页,
(Pathology)

8. Nayman, J., De Boer, W. & Ma, J. (1983 年), “皮
肤癌中不正常的粘蛋白的产生—一种观点” (Inappropriate
mucin production in Endodermal Carcinoma—one point of
view”. 日本外科杂志 13 期 317—323 页 (Japanese Journal
of Surgery).

9. Gold. P. and Freedman. S. O. (1965 年) “人消化系统特
异性的癌胚抗原” “Specific carcino-embryonic antigens of the
human digestive system” “医学快讯” 122 期, 467—481 页
(J. Exped. Med.)

10. Mackay, I. R. (1979 年) “癌的免疫诊断”
(Immunodiagnosis of Cancer. Herberman 和 McIntire (eds),
Marcel Dekker. N. y. 255 页.

11. Cuthbertson, A. M., Hughes, E. S. R., Nairn, R. C. Nind

A. P. P. Bihl. E. (1981年) “癌胚抗原试验:它对结直肠癌诊断有用吗?” (CEA testing: Is it useful in colorectal cancer?)

澳大利亚医学杂志 170 期 (Med, J. Australia.)

12. Cuthbertson. A. M. Hughes, E. S. R., Nairn, R. C. Nind, A. P. P. 和 Pihe, E. (1981年) “结直肠癌中癌胚抗原试验”

“CEA testing in colorectal cancer” 澳大利亚医学杂志 201 期, (Med. J. Australia.)

13. Pihl. E. McNanghtan, J., Ma. J., Ward. H. A. 和 Nairn, R. C. (1980 年), “结直肠癌中癌胚抗原的免疫组织学试样. 分析段和血液水平的相互关系。”

“Immunohistological patterns of carcinoembryonic antigen in colorectal carcinoma. Correlation with staging and blood levels” 病理学 12 期 7-13 页 (Pathology).

14. Herlyn, H., Steplewski, Z., Herlyn, D., 和 Koprowski, (I. 结直肠癌—特异性抗原:用单克隆抗体方法测定。

(I. Colorectal carcinoma-Specific antigen: Detection by means of of monoclonal antibodies,) 美国科学院学报 76 期 1438 页 (1979年)(Proc, Natl. Acad. Sci. U S A.)

15. Koprowski, B. Herlyn, H., Steplewski, Z. 和 Sears, H. F., “结肠癌患者血清中的特异性抗原” (Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma.) “科学”, 212 期 53 页 (1981) (Science).

16. Magnani. J., Brocklaus. M., Smith, D., Ginsburg, V.,
Blaszcyk. M., Mitchell. D., Steplewsky, Z. 和 Koprowski. H.
“一个确定结肠癌抗原的单克隆抗体”(A monoclonal antibody
defined antigen of colon carcinoma) 科学。212期55页,
1981年 (Science)

17. Devillano, B. 和 coll. “确定肿瘤标记抗原 CA
19-9TM 单克隆抗体的放射免疫学试验” (Radioimmuno-
metric Assay for a Monoclonal Antibody defined Tumor
Markers CA 19-9TM) 临床化学29期549-552页(1983年)
(Clin. Chem.)

18. Sears. H., Herlyn. J., Delvillano. B., Steplewski,
Z 和 Koprowski, H. “结直肠癌患者的临床估计”(A clinical
evaluation of patients with colorectal cancer)
临床免疫学, 第2期141页(1982年) (Clinical
immunology)

19. Magnani. J., Steplewski. Z., Hoprowski, H., 和
Ginsburg. V. “用患者血清中19-9单克隆抗体探查胃肠道及
胰腺癌有关的抗原为粘蛋白的鉴定” (Identification
of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated
antigen detected by monoclonal 19-9 in the sera of
patients as a mucin.) 癌研究43期 5489-5492,
1983年 (Cancer Research).

20. Friguet. B., Djaradi-Ohaniance. L., Pages. J.,
Bussaro. A., 和 Goldberg. M.

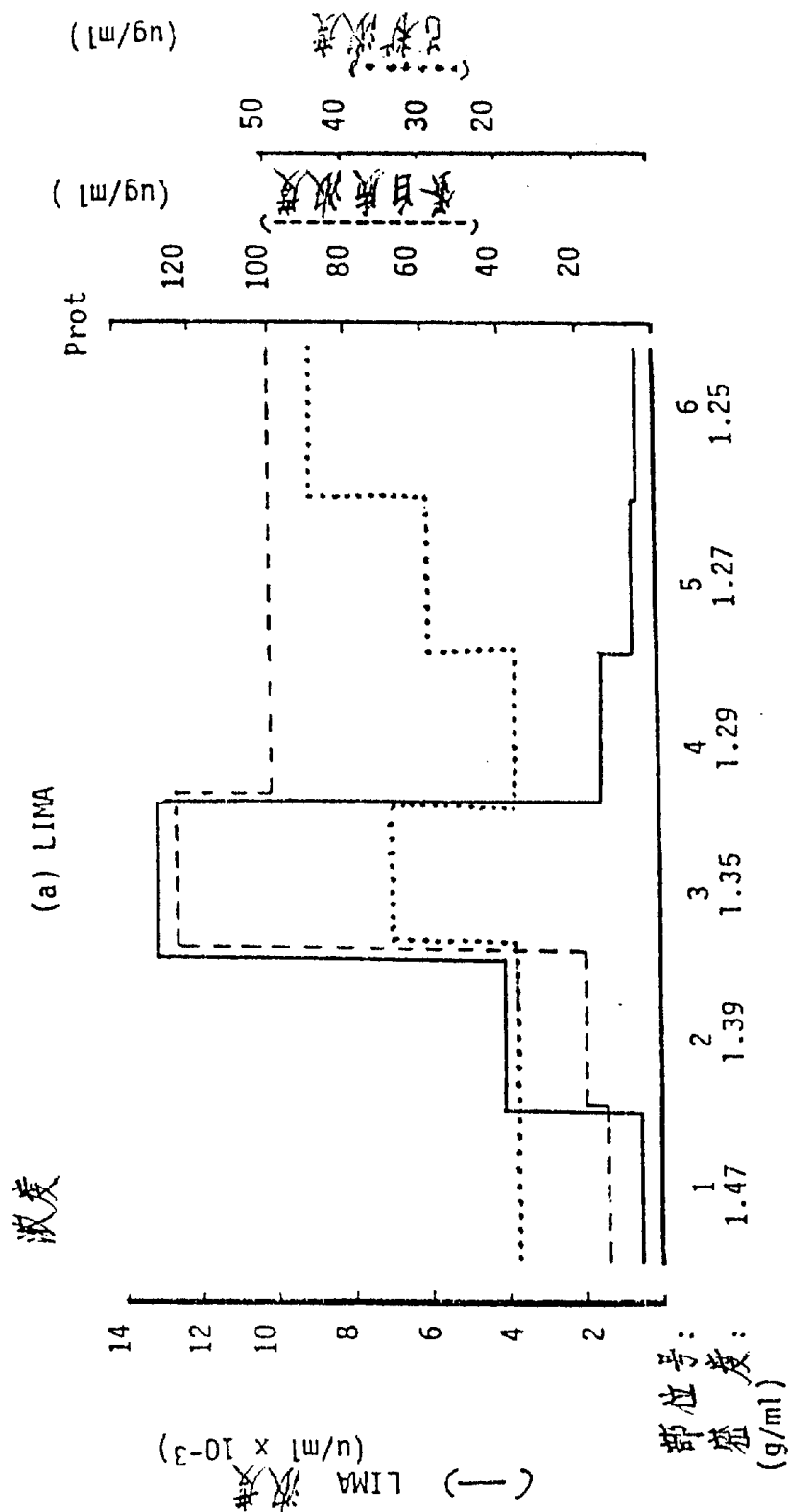
“一种方便的与酶相联的免疫吸收试验以测定单克隆抗体是否辨别
同样抗原位置,对大肠杆菌色氨酸合成酶的 β_2 亚单位特异性杂交体的应用。”

(A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for
testing whether monoclonal antibodies recognise the
same antigenic site, Application to hybridomas
specific for the β_2 -subunit of E. coli tryptophan
synthase) 免疫学方法杂志 1983 年 3 5 1 — 3 5 8 页
(J. Immunit. Methods)

21. Trerelyan, W. E. Harrison, J. S.,

“酵母代谢的研究 I。细胞碳水化合物的分级分离和微量测定。”
(Studies in yeast metabolism, I. Fractionation
and microdetermination of

图1 CsCl 梯度超速离心的典型粘蛋白抗原活性, 蛋白质和己糖



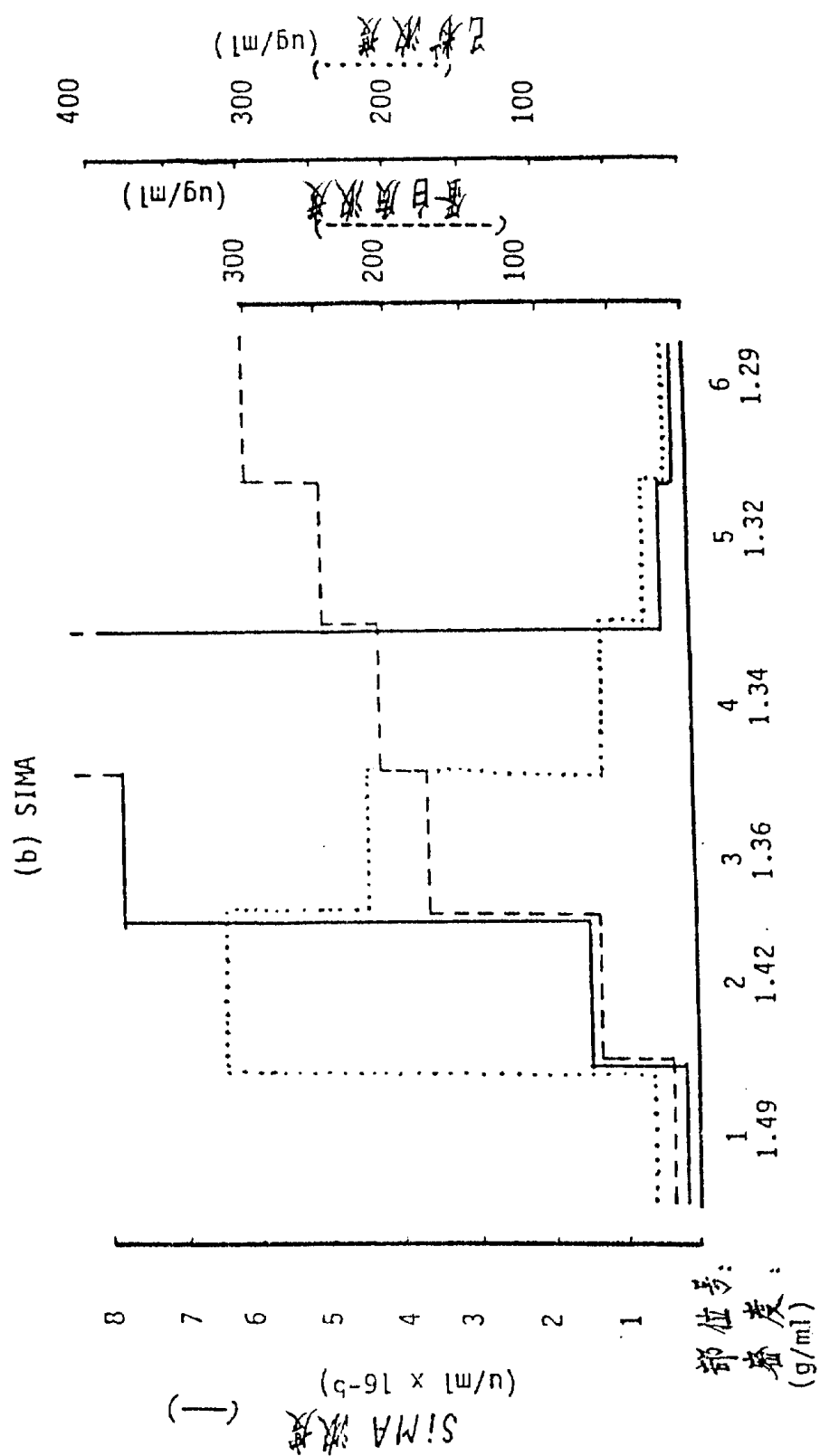
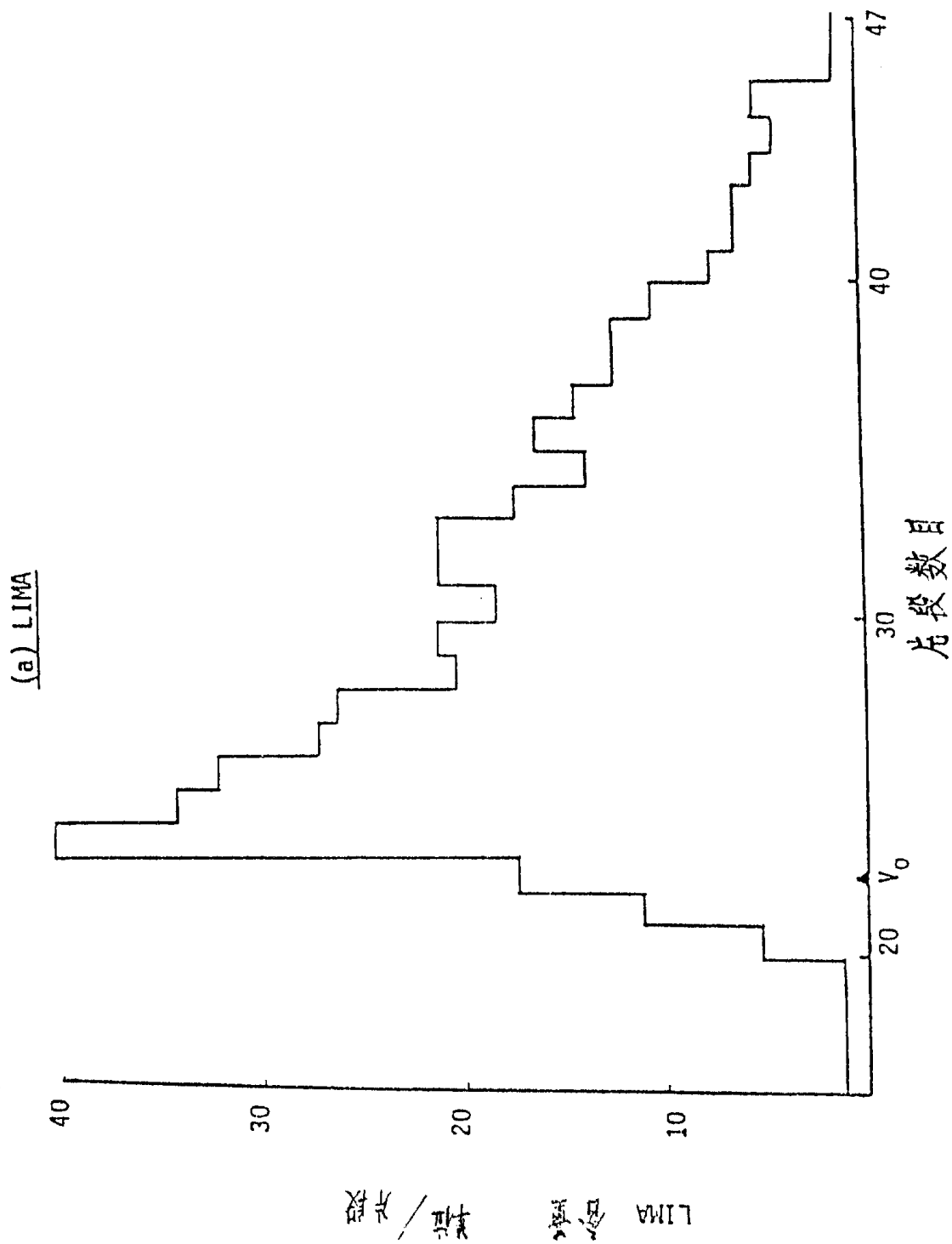


图2 典型粘蛋白制备在SEPHACRYL 1000上的凝胶过滤



(b) SIMA

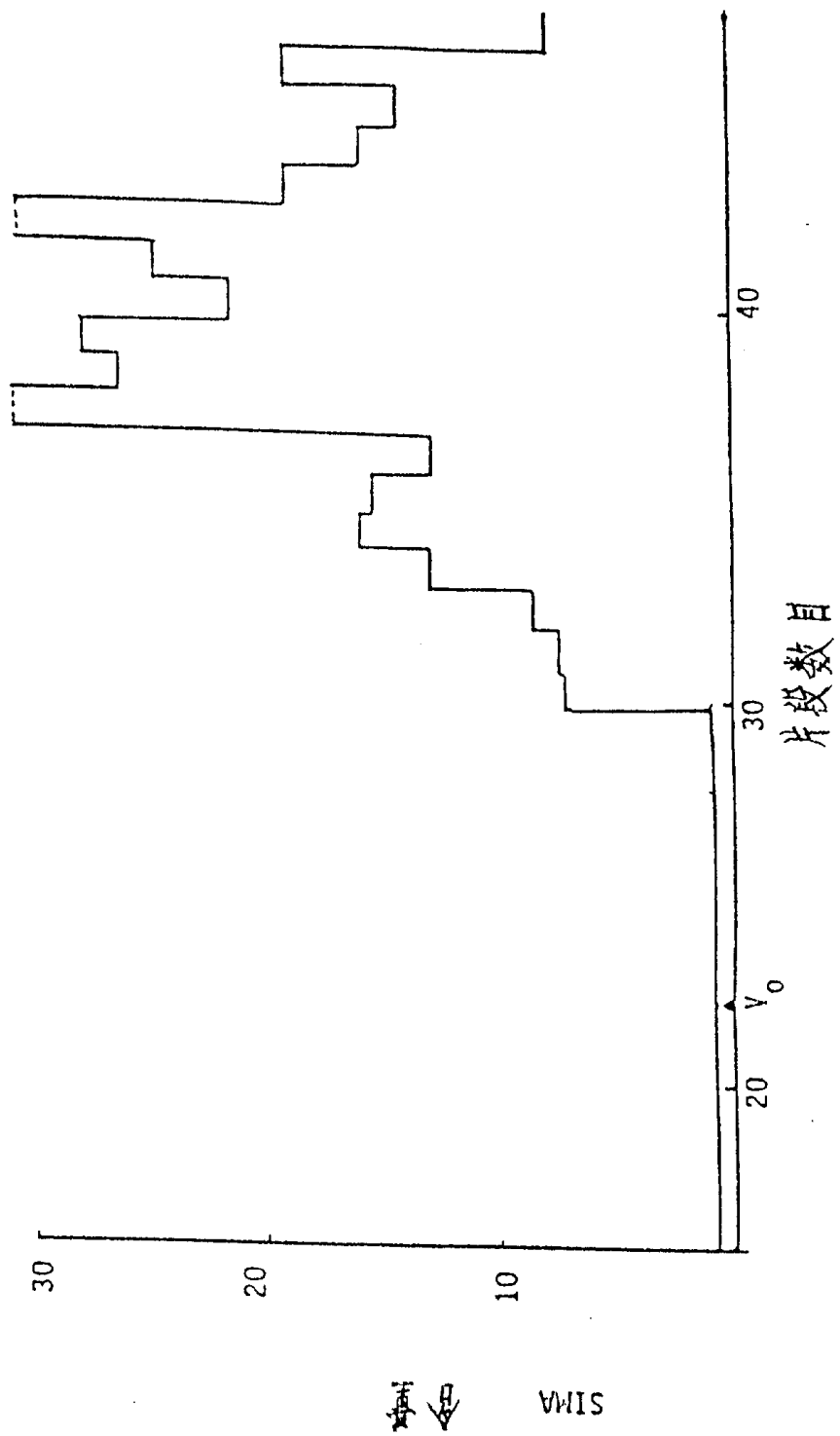
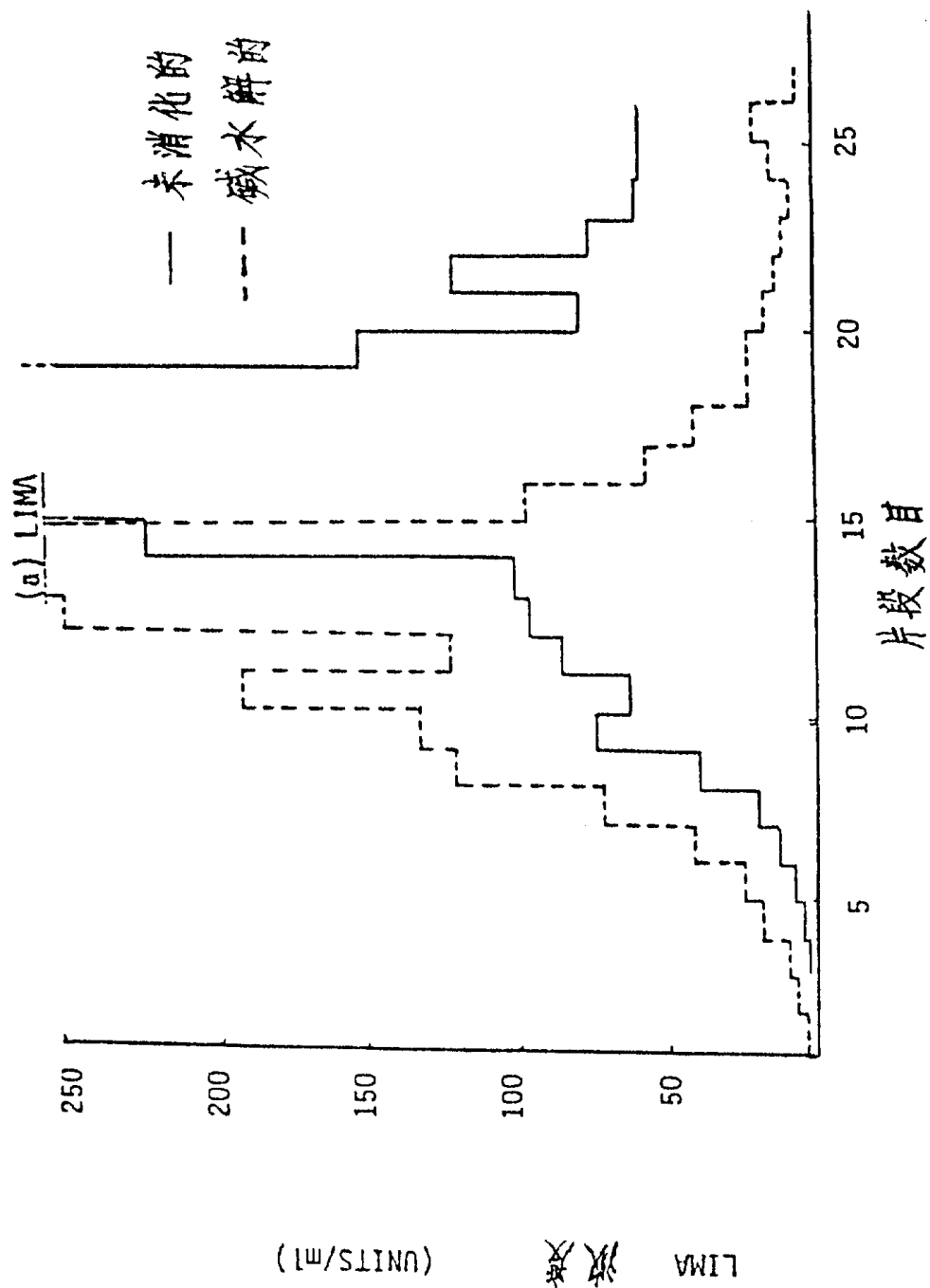


图3 粘蛋白的甘油梯度离心



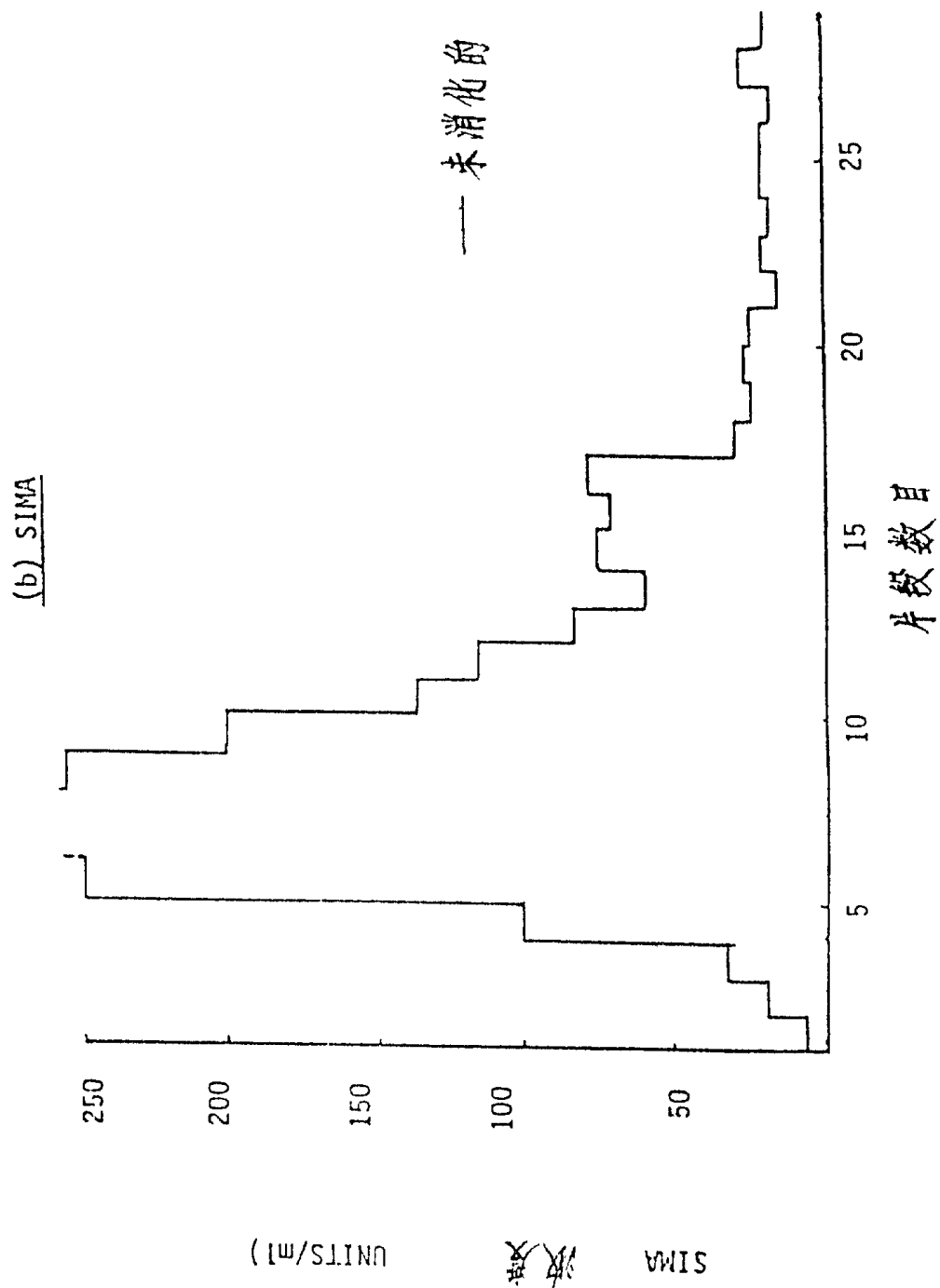
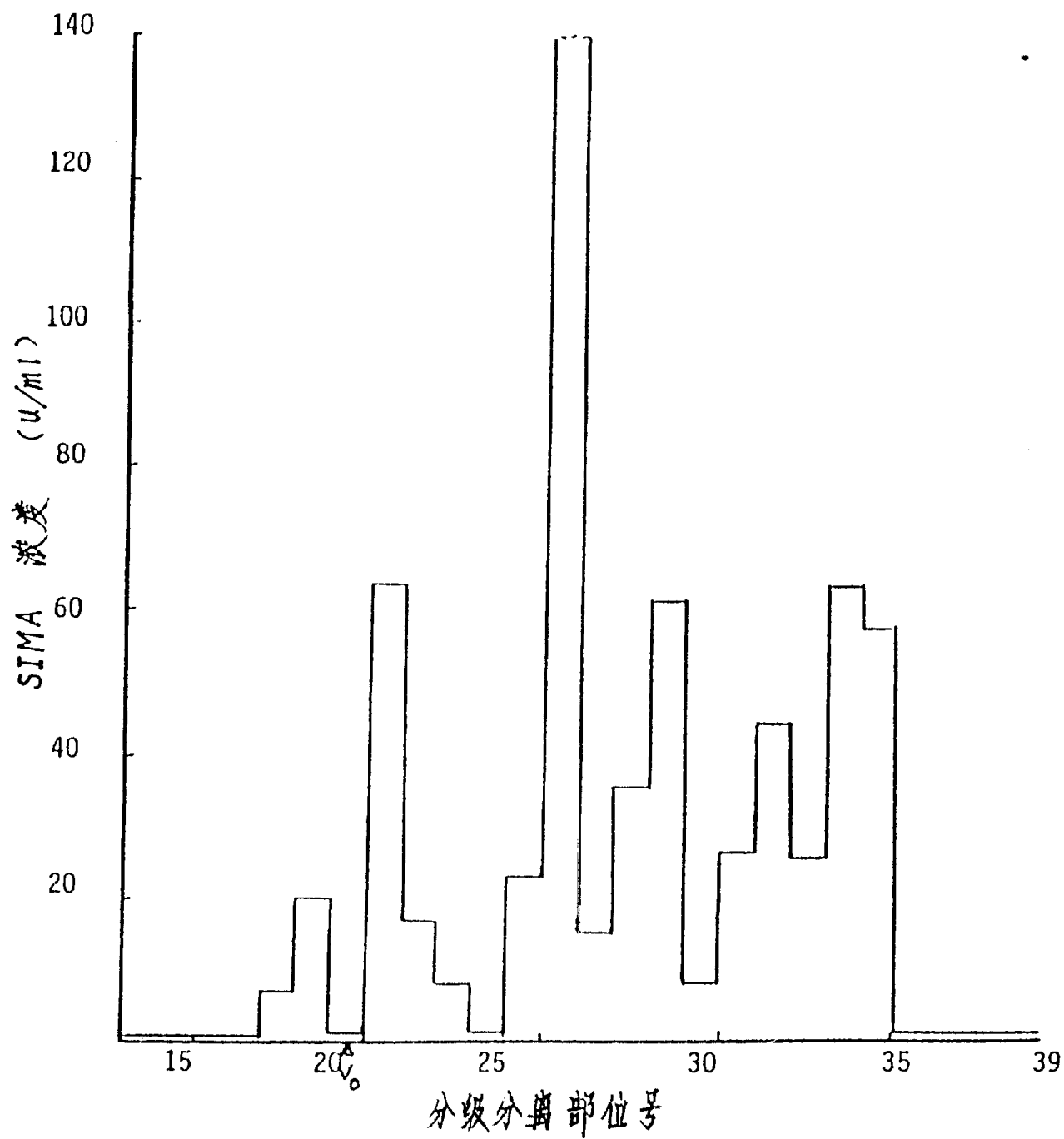


图4 典型的SIMA在 Sepharose 2B上的凝胶过滤



V_0 代表柱的无效体积

图 5 竞争性 ELISA 试验

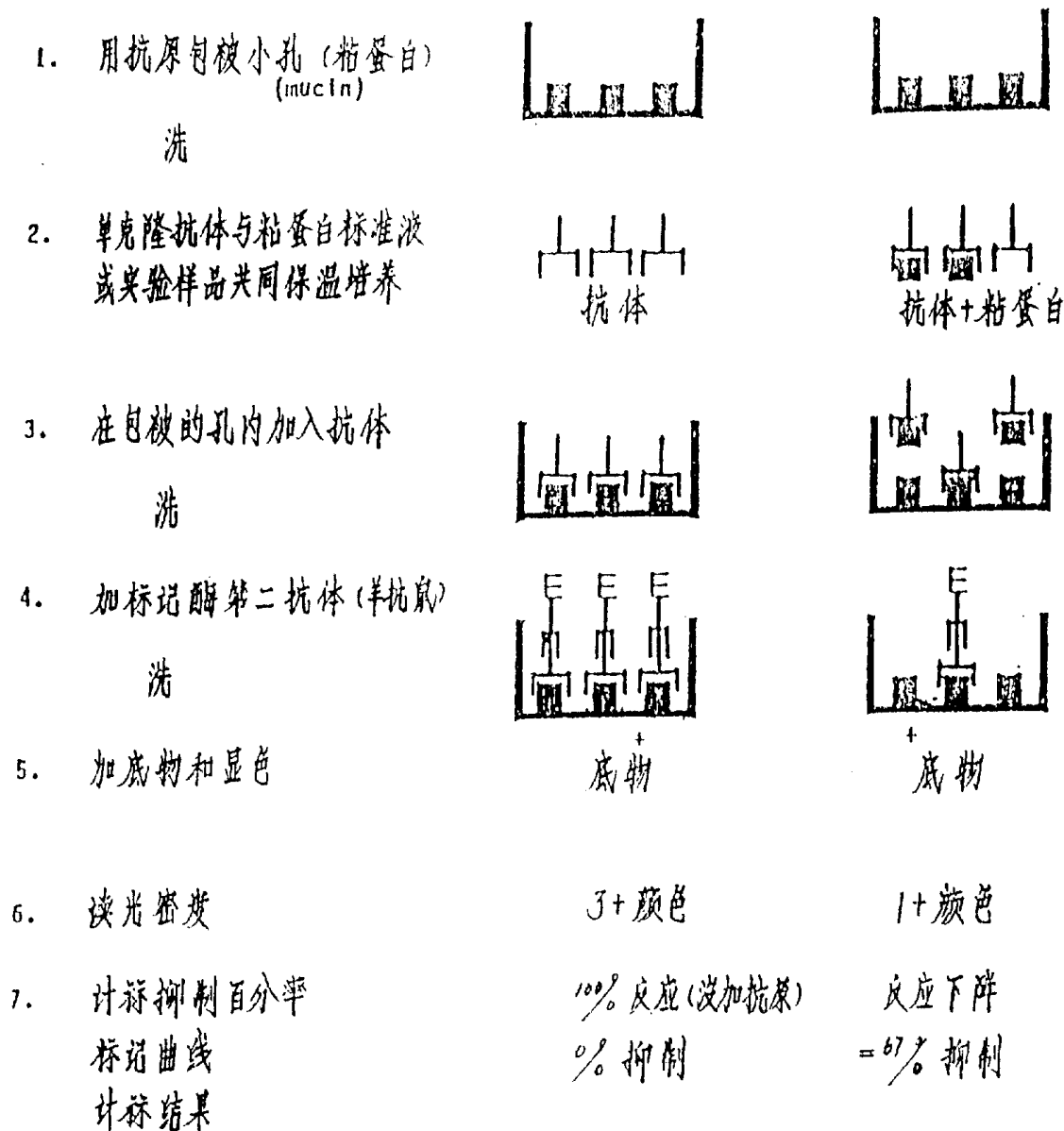
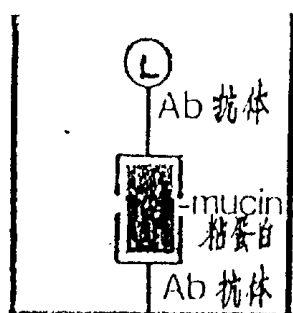
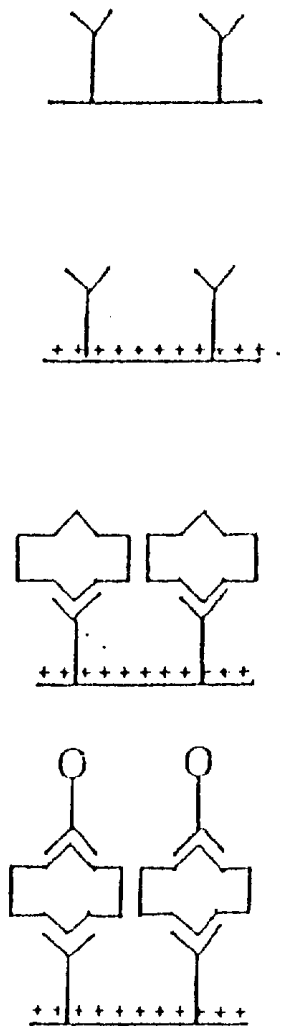


图 6 三明治放射免疫测定



1. 用单克隆抗体包被多孔培养皿的孔
2. 与第一步同时发生, 加粘蛋白抗原到已经用 ^{125}I 标记的单克隆抗体中
3. 加第二步的混合物到第一步已包被的孔中
4. 测定结合的 ^{125}I

图 7 LIM的酶免疫试验



1. 用单克隆抗LIMA抗体(Y)
包被多孔培养皿
洗

2. 用牛血清清蛋白封闭多孔培养皿

3. 加血清(标准LIMA)(☆)
LIMA与抗体结合
洗

4. 加碱性磷酸酶-已标记的
单克隆抗LIMA抗体(⊗)
洗

5. 加酶作用底物
(对-硝基苯酚磷酸盐)
显色

6. 读光密度

图8 典型的标准曲线图

