

## 110 年公務人員高等考試試題

類 科：衛生技術

科 目：生物技術學

阮籍老師

一、流感是一種急性呼吸道傳染病，具有爆發流行及嚴重併發症的特性，對於民眾的健康威脅甚鉅。請說明流感病毒檢驗操作程序和原理。(20分)

### 【擬答】

流感是由「流感病毒」所引起的急性呼吸道疾病，流感病毒有 A、B 及 C 型，D 型病毒尚未有人感染的報告。A 型和 B 型幾乎每年引起季節性的流行，C 型則以輕微的上呼吸道感染為表現，且一般認為不會造成流行。主要感染人類的 A 型流感病毒為 H1N1 與 H3N2(血球凝集素(HA, hemagglutinin)、神經胺酸酶(NA, neuraminidase)，H 有 1-16 種、N 有 1-9 種、總共有可能  $16 \times 9 = 144$  亞型，B 型流感病毒的 B/Victoria 及 B/Yamagata 兩種系。

一般流感病毒內有 7 至 8 條反義單股(-)ssRNA，每條 RNA 含有一至二個基因。以 A 型流感病毒為例，它含有八條 RNA 片段，含有 11 個基因，分別表達出血球凝集素 HA、神經胺酸酶 NA、核蛋白 NP、M1、M2、NS1、NS2、PA、PB1、PB1-F2 和 PB2。病毒顆粒表面作用抗原是血球凝集素 HA 及神經胺酸酶 NA 兩種大型蛋白。血球凝集素屬於凝集素的一種，可以協助病毒與宿主細胞的表面糖蛋白結合，使病毒的基因能順利進入細胞。神經胺酸酶則可在病毒在細胞內包裝感染及發育成熟後，切割其表面上的糖，協助病毒脫離宿主細胞。

流感造成全身性症狀較為嚴重，包括發燒、頭痛、肌肉痛、疲倦、流鼻水、喉嚨痛及咳嗽等。在臨床上，檢測流感病毒的標準方法為：

(一)病毒培養，原理是利用哺乳動物細胞 MDCK (Madin-Darbycanine kidney)、

Vero (African greenmonkey kidney epithelial cells) 細胞為宿主，或雞蛋胚胎細胞來培養檢體中的病毒，當病毒生長時細胞會產生病理變化，再用免疫螢光抗體染色鏡檢鑑別為何種病毒。優點是有病毒生長多數都能鑑別；缺點是少數病毒生長緩慢，細胞病變不明顯，報告時間久，且有些病毒是無法培養。

(二) RT-PCR 等分子生物學檢驗方法，原理是將流感病毒的核 酸萃取出作為模板，利用已知流感病毒 核酸序列引子接合後，在體外不斷的複 製放大，而獲得訊息證實流感病毒的存在。優點是快速，敏感度高，只要有核 酸序列就可以設計操作；缺點是技術門 檻高、價格昂貴，要小心診斷，報告有 病原體核酸出現時不代表疾病一定存在。藉由反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcription PCR) 檢測病毒 RNA 則是較準確的檢驗方法。RNA  $\rightarrow$  cDNA  $\rightarrow$  PCR  $\rightarrow$  以 2 的 n 次方放大  $\rightarrow$  偵測。

此兩種方法都可以檢測到亞型，但都因為需要特殊的儀式設備以及較長的檢驗時效，病毒培養需要 4-14 天，RT-PCR 需要 2-6 小時，故在一般醫療院所並不普及。

(三)常見的流感快篩試劑則是以血清學為基礎，以 ELISA 或抗原快篩技術。

因為具有快速 (10-30 分鐘) 及操作方便 (肉眼即可判讀) 的優點，為最普遍的篩檢工具。原理是免疫色層分析法，先將對抗流感病毒抗體固定在醋酸纖維試紙上，運用流體帶動檢體，結合後利用酵素呈色反應。這類試驗優點是操作簡單、報告快；缺點是病毒量低時易造成偽陰性。

HN Ab  $\rightarrow$  + HN  $\rightarrow$  HN Ab—HN  $\rightarrow$  HN Ab—HN—HN-2 抗—Alkaline phosphatae  $\rightarrow$  + 受質

(pNpp, para-nitro-phenol-phosphate) → p-nitro-phenol (A410, 呈黃色)。

二、全球十大暢銷藥物 Adalimumab (Humira, 復邁) 為一種單株抗體生物製劑, 用於臨床治療類風濕關節炎、僵直性脊椎炎、克隆氏病等自體免疫疾病。此單株抗體乃利用噬菌體表現技術 (phage display technology) 製造生產, 請說明此單株抗體之製造原理。(20 分)

【擬答】

Humira 是一種基因重組之人類免疫球蛋白 (IgG1) 單株抗體, 只含有人類胜肽序列, 因此, 是一種 fully human monoclonal antibody。Humira 是以噬菌體表現技術 (phage display technology) 得到人類重鏈和輕鏈特異區序列, 具有對人類腫瘤壞死因子 (TNF) 和人類 IgG1 重鏈和 kappa 輕鏈序列的專一性。Humira 對可溶性腫瘤壞死因子 (TNF-alpha) 有高度的親和性和專一性。Humira 是藉由哺乳動物細胞表現系統的基因重組技術而製造。

噬菌體表現技術(phage display technology): 噬菌體表現技術是將編碼所需產物的外源 DNA 片段插入噬菌體基因組, 並使之與噬菌體外殼蛋白編碼基因(gene3)或其他結構基因相融合, 然後用該重組噬菌體感染宿主細菌, 複製形成大量帶有雜合外殼蛋白 (或其他結構蛋白) 的噬菌體顆粒, 因而捕獲 cDNA library 表達文庫中與「誘餌」相互作用的蛋白質。噬菌體表現技術在病毒研究領域有廣泛運用。此技術不需用到融合瘤(hybridoma)技術。2018 年的化學諾貝爾桂冠頒給 Frances H. Arnold (阿諾)、George P. Smith (史密斯) 和 Gregory P. Winter (溫特) 爵士, 表彰她/他們透過演化的控制為人類謀取了最大的福祉。運用人工定向演化(directed evolution)所製造的酵素, 現在已被用來生產包括生質燃料和藥物等等的物質。抗體的演化可以透過一種噬菌體顯示(phage display)的方法來對抗自體免疫的疾病, 以及在某些特定的例子中治癒轉移性癌症。

運用噬菌體顯示法來進行抗體的定向演化的背後原理, 此法用於製造新藥。

基於抗體的噬菌體顯示法, Gregory P. Winter 與他的研究同仁創立了一家公司, 在 1990 年代它發展出一個完全基於人類抗體的藥物: adalimumab, 此抗體能中和一個稱為 TNF- $\alpha$  的蛋白質, 該蛋白質驅動許多自體免疫疾病的發炎反應。於 2002 年此藥物被核准醫治風濕性關節炎, 現在亦用於治療不同型態的牛皮癬和發炎性腸疾。

利用噬菌體表現技術製造生產此 Humira 單株抗體之製造原理如下:

(一)製造原理:

抗體 cDNA 基因庫基因插入噬菌體外套蛋白質 Gene 3 後, 利用噬菌體表現技術, 再經純化抗原的專一親合性篩選, 最後, 正確的選殖株再大量的細菌培養與單株抗體 humira 大量的表達與純化製造。

(二)製造步驟:

1. Purify antigen (純化抗原)。此處抗原是指人類腫瘤壞死因子 (TNF)。
2. Immunization (把抗原打到動物體內讓他們產生抗體)。
3. Library building (製造抗體 library): 整個過程包括抽取免疫後動物的免疫細胞 (lymphocytes), 從免疫細胞裡抽取 RNA, 把 RNA 轉成 cDNA, 經 PCR 放大, 選殖到 phagemid DNA 內, 再轉形到細菌裡做成細菌的 library。之後用 phage 去感染細菌, 轉成 phage library。
4. Biopanning & phage amplification: 從含有各種抗體基因的 phage library 裡面把不跟抗原反應的抗體洗掉, 抓出和抗原結合的相對應抗體。
5. Phage ELISA: 利用 ELISA 釣出 positive clones, 這個步驟是要從 biopanning 出來的一堆 phage 裡一個個挑出真的會和抗原反應的抗體。
6. Sequencing of positive clones: 定序從 phage library 釣出來的抗體, 知道序列後就可以大量生產。

7. Cloning into expression vector & purification: 把抗體的基因轉到 expression vector 後就可以大量表現和純化抗體。

三、目前美國 FDA 核發臨床用人類乳突病毒 (HPV) 分型試劑，乃利用核酸捕獲 (Hybrid capture/Nucleic acid capture assay) 檢測 HPV 去氧核糖核酸，請說明核酸捕獲的技術原理。(20 分)

【擬答】

人類乳突病毒 HPV(Human Papillomavirus)是造成子宮頸癌最確定且最常見原因，子宮頸細胞病變程度越嚴重者，與 HPV 的相關性越高。幾近 100%子宮頸癌患者皆可偵測到 HPV 的感染。

HPV 感染者在未來罹患子宮頸癌機率比未感染者高，高危險型 HPV 感染者在兩年內發現抹片異常機率为 70%。

美國 FDA 核准,準確性已被肯定。病毒檢測分高危險型 HPV 共(13 型)與低危險型 HPV (共 5 型)。採用雜交體捕捉原理 (Hybrid Capture) 及化學冷光偵測，敏感度高。HPV DNA 陽性參考值為 1pg/ml。

核酸捕獲的技術原理：

(一)樣品抽取 DNA(可能含有 HPV DNA)

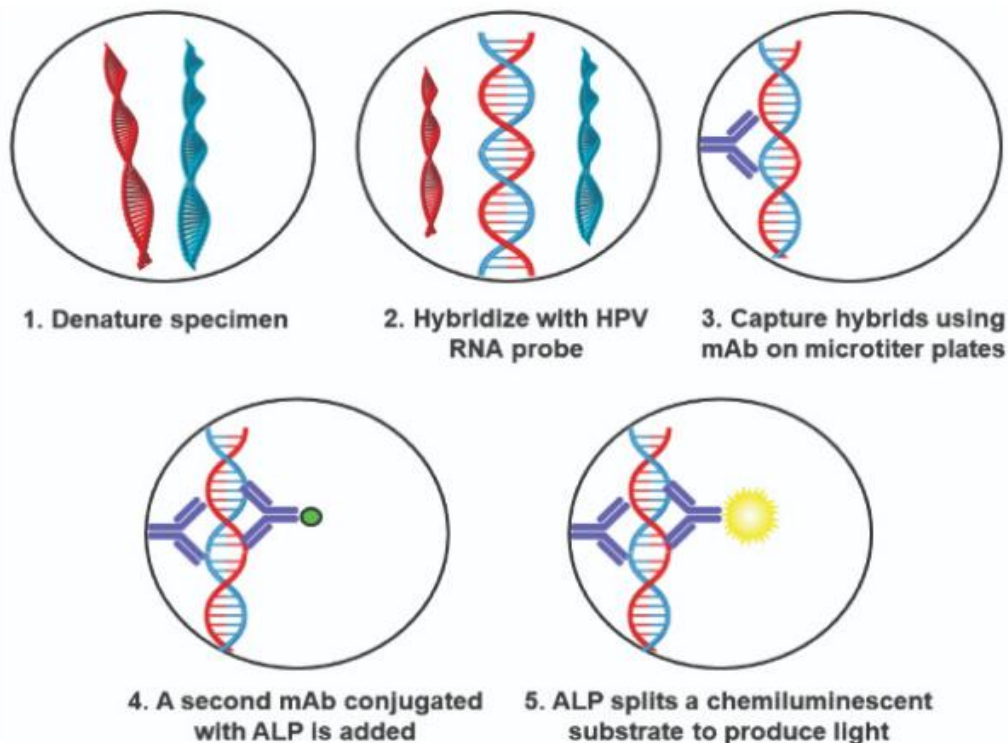
(二) Nucleic acid hybridization: 加入 HPV 特異性 RNA 探針雜合為 DNA/RNA hybrid。

(三) Capture: 在微管內 coated 雜合核酸的單株抗體，單株抗體捕獲雜合核酸。

(四)加入接合酵素 alkaline phosphatase 的二抗單株抗體。

(五)加入受質 pNPP (p-nitro-phenyl phosphate)，反應呈色(A410, 黃色)，利用化學冷光儀測定，即可測出是否 HPV 感染。

HPV DNA 病毒偵測的整個過程包括 DNA/RNA hybridization 及 monoclonal antibody capture，因此稱為 hybrid capture assay。類似 RNA 病毒的 b-DNA assay。



四、流式細胞儀 (Flow cytometry) 已廣泛應用在生醫領域之檢測，請說明流式細胞儀核酸分子檢測多重病原菌的原理和一般多重聚合酶鏈式反應 (Multiplex polymerase chain reaction) 之比較。

【擬答】

流式細胞儀(Flow cytometry)主要由流體學系統 (fluidics) 、光學與電子系統(optics and electronics)組成。待測樣本中的細胞經流體系統傳送，依序地通過雷射照射區域，細胞受雷射激發而產生訊號，訊號接收器接收到訊號後會放大訊號，將這些訊號輸入電腦分析處理，電腦再將資料處理後變成圖形顯示在螢幕上。

流式細胞儀產生並分析的信號主要有光散射信號和螢光信號，藉由光信號的強弱和波長不同，可以得到細胞大小、型態與顆粒化等資訊。螢光訊號可提供不同細胞生物學特性並應用於許多實驗中。

流式細胞儀為透過流體快速帶動粒子(如細胞)，以雷射光源激發粒子上標定的螢光後，透過螢光偵測器收集螢光訊號，並分析螢光表現，以獲得目標訊息的儀器技術，其強大之處在於能「高速的檢測單一細胞中螢光的變化」，因此流式細胞儀為細胞檢測分析熱門的方式之一。高靈敏度加上高速檢測單一細胞的特性，使流式細胞儀可從「細胞表面標記」、「細胞內目標蛋白變化」、「核內核酸分析」到「細胞功能性檢測」等延伸至多元的實驗應用。

(一)多重病原菌流式細胞儀核酸分子檢測

分子檢測多重病原菌發展高通量之核酸檢測技術，如核酸微陣列晶片和流式微珠陣列，可廣納大量特異性探針(上百至數萬)，且可依臨床檢驗或防疫分子流行病學需求，設計種別、型別等特異性探針，除可廣泛涵蓋臨床上常見病原，甚可納入可能變種及人畜共通病原，如此一來，可以極少量檢體做多重且快速的檢驗鑑定。

目前在全球漸受矚目的流式微珠陣列，主要原理為二種螢光染劑以不同比例混合出 100 種微珠，其上可固定化偵測用核酸探針或抗原/抗體，與經適當 PCR 反應或免疫反應前處理之待測物產生特異性結合後，這些微珠會流經流式細胞儀(flow cytometry)裝置，並逐一被雙股雷射光束，以便同時辨識微珠編碼及目標信號強弱。如此可高通量、快速、精確地同步偵測 100 種不同特定目標物。

以陣列式液態微珠技術，結合影像以及流式分析儀技術，開發多目標高通量檢測系統。

成功建構流式微珠陣列要件為

1. 選擇一個適合的標的作為區分菌種的依據；
2. 利用專一性雜交將具有鑑別力的標的產物與磁珠鍵結(3)提高磁珠所鍵結螢光之敏感性供流式細胞儀偵測。

(二)多重 PCR (Multiplex PCR)：又稱多重引物 PCR 或複合 PCR，它是在同一 PCR 反應體系裡加上二對以上引物，同時擴增出多個核酸片段的 PCR 反應，其反應原理，反應試劑和操作過程與一般 PCR 相同。一般 PCR 僅應用一對引物，通過 PCR 擴增產生一個核酸片段，主要用於單一致病因子等的鑑定。多重 PCR 好處是可以同時檢測或鑑定多種菌種，其 PCR 之靈敏度為 4 pg 的 DNA。如果利用一對普遍性引子及一個高專一性 Forward 引子及一個低專一性的 Reverse 引子同時擴增 18S 及 26S rDNA 基因來鑑定九種致病性酵母菌。

多種病原微生物的同時檢測或鑑定，是在同一 PCR 反應管中同時加上多種病原微生物的特異性引物，進行 PCR 擴增，可用於同時檢測多種病原體或鑑定出是那一型病原體感染，可系統組合的有：

1. 肝炎病毒的感染，在同一病人或同一供血者體內，有時存在多種肝炎病毒重疊感染，有時是 ABC 重疊；有時可能是 AB 重疊；有時是 BC 型肝炎病毒重疊。
2. 腸道致病性細菌的檢測，如傷寒、痢疾和霍亂，有時具有較相同的腸道症狀，有時痢疾霍亂同存一病人並同時發病。

## 公職王歷屆試題 (110 高考三級)

3. 性病的檢測，如梅毒、淋病及艾滋病的診斷。
4. 戰傷細菌及生物戰劑細菌的檢測，如破傷風桿菌、產氣莢膜桿菌、炭疽桿菌、鼠疫桿菌等偵檢。
5. 需特殊培養的無芽胞厭氧菌，如脆弱類桿菌、艱難桿菌的鑑定等。

### 五、請說明人類化小鼠模型 (humanized mouse models) 之製造原理和應用 (20 分)

#### 【擬答】

近年來，在免疫缺陷小鼠中利用人類血球幹細胞 (hematopoietic stem cells) 進行人類免疫系統重建的擬人化小鼠 (humanized mice) 的人類化小鼠模型 (humanized mouse models)，已成為進行醫學研究與藥物開發的重要平台。

由於自老鼠等異體物種而來的蛋白質容易在人體中啟動相關的免疫排斥反應，使得欲進入臨床使用的抗體，必需進一步降低其抗原性而進行人類化的轉置 (humanization)。

以人類血球幹細胞重建之擬人化小鼠體內，即具有人類成熟的 T 細胞與 B 細胞，其所產出的抗體，在進入人體臨床試驗時不需要再進行人類化的轉置，利用人類細胞產生的抗體可減少異體免疫排斥的反應，能更快速地生產專一性的單株抗體，對於開發新穎性的具高專一性、中和性、低免疫排斥力的人類抗體的運用潛力極高，是醫療效益上不可或缺的新領域。

人類化小鼠是指將人的細胞、組織和器官移植給小鼠，或是表達人類基因的小鼠。進化上的差異導致小鼠免疫系統對於異種細胞和組織一般具有很強的排斥作用。為解決這一障礙需破壞小鼠的自身免疫系統，再通過移植入人的組織或細胞以構建人類化小鼠。最早的免疫缺陷小鼠是裸鼠 (nude mouse)，其 *foxn1* 基因缺陷使得胸腺不能發育，缺乏成熟的 T 細胞，但由於其仍具有小鼠的 B 細胞和 NK 細胞，因此不能夠接受人的細胞重構。隨後嚴重聯合免疫缺陷 (severe combined immunodeficiency, SCID) 小鼠出現，該小鼠 T 細胞和 B 細胞都嚴重缺陷，胸腺和外周淋巴組織嚴重萎縮，這些特點使得人的細胞可以在該小鼠上重建，目前常使用的 2 種重要的人類化小鼠模型 PBL-SCID 和 SCID-hu 是通過 SCID 小鼠構建的。

#### (一) Hu-PBL-SCID 小鼠模型

將人的成熟外周血淋巴細胞 (peripheral blood lymphocyte, PBL) 注入成年免疫缺陷小鼠 (SCID 小鼠) 體內構建模型，這種人類化小鼠模型稱為 Hu-PBL-SCID 小鼠模型。此法易於操作，可以檢測到人的 T 細胞和 B 細胞的植入，但 B 細胞植入效率很低且很難檢測到髓系細胞的植入。該模型植入的 T 細胞均為活化的成熟 T 細胞，難以產生初始免疫反應。宿主的抗原呈現細胞 (APC) 不表達人白細胞抗原 (HLA) 分子，無法與植入的 T 細胞相互作用。

#### (二) SCID-Hu 小鼠模型

人類胚胎胸腺提供人 T 細胞發育場所，胚胎肝臟細胞提供前體造血細胞，淋巴結提供 T 細胞和 B 細胞相互作用場所，該模型被稱為 SCID-Hu 模型。小鼠的外周血可以檢測到人 CD4，由於人 T 細胞在同源的人胸腺上皮發育成熟，故擁有 HLA 限制性。然而除了 T 細胞，其餘造血細胞在小鼠體內的重建水平很低。

#### (三) hu-SRC-SCID 小鼠模型:

將胎肝、臍血、骨髓或外周血 G-CSF 動員來源的 HSC 移植給新生或成年的免疫缺陷小鼠，使得小鼠體內獲得人造血細胞的多系重建，以此研究完整的人造血系統及天然免疫系統。該方法的局限性在於人 T 細胞在小鼠的胸腺內發育成熟，小鼠的主要組織相容性複合體 (MHC) 稱為 H2 複合體，因此 T 細胞是小鼠 H2 限制性，缺乏人 HLA 限制性，並且儘管可在小鼠骨髓中檢測到人源分葉核白細胞、紅細胞和巨核細胞，但外周血循環中的細胞量非常有限。

## 公職王歷屆試題 (110 高考三級)

### 1. hu-BLT-SCID 小鼠模型:

將人胎肝來源的 CD34 移植的人源組織在受體小鼠體內建立了完整的人造血微環境，提高了人造血細胞的多系重建水平，尤其建立了有功能的完整的人免疫系統，包含 T、B 以及樹突細胞，並產生高含量的人 IgM 和 IgG 抗體。

### 2. hu-Tg-Mice 小鼠模型:

hu-Tg 小鼠模型指的是通過轉基因手段使人類基因在免疫缺陷小鼠體內表達(如人造血細胞所需的生長因子)，以此促進人類細胞的植入，或以此研究人類基因的功能。

### (四)人類化小鼠模型的發展:

模型	年份	建立方法	優點	缺點
hu-PBL-SCID	1988	將人外周血淋巴細胞植入SCID小鼠	主要植入CD3	僅限於成熟T細胞的研究，B細胞和髓系細胞植入率很低
SCID-hu	1988	將人胚胎肝臟和胸腺組織共同植入SCID小鼠腎被膜下	胸腺細胞可正常發育成熟，人T細胞擁有HLA限制性	除T細胞以外的其他造血細胞重建率低；需要獲取人胚胎組織
hu-SRC-SCID	1992	將人造血幹細胞植入免疫缺陷小鼠	可研究人完整造血系統及固有免疫系統	人T細胞無法在小鼠胸腺環境內獲得HLA限制性，限制了有關適應性免疫的研究
hu-BLT-SCID	2006	將人造血幹細胞聯合同源胎肝和胸腺植入新生免疫缺陷小鼠	可研究人完整造血系統(包含固有免疫和適應性免疫系統)	比其他模型更易發生GVHD；模型建立方法複雜，需要獲得胚胎組織並進行手術操作
hu-Tg Mice	2003	用轉基因技術在免疫缺陷小鼠體內表達人源基因產物	表達特異人源細胞因子，促進人源細胞植入；作為研究人源基因功能的體內實驗模型	細胞因子表達量過高會導致HSC的過度動員和耗竭；模型建立需要基因操作，方法複雜

目前在臨床使用的人性化單株抗體中，有超過 30% 是透過利用：

1. 癌化抗原專一之人類 B 淋巴球細胞：
2. 從老鼠抗體利用基因改造產生與人類細胞進行嵌合：
3. 利用嗜菌體表達抗原特定之人類 B 細胞：
4. 發展基因轉殖小鼠來進行人類抗體製造等技術，獲得所需要的單株抗體：