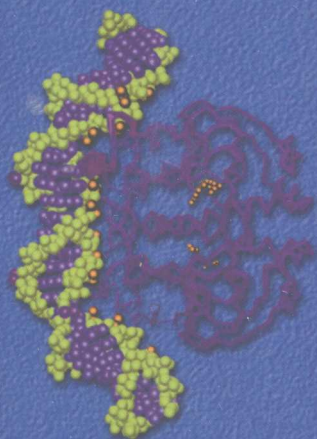


免疫球蛋白基因 与基因工程

主编 张晓伟

副主编 杨志兴 张淑梅 沙长青

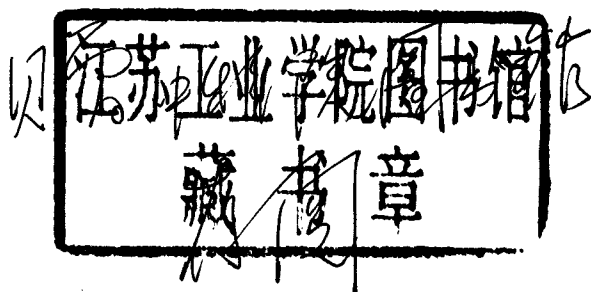


中国科学技术出版社

免疫球蛋白基因与基因工程

主 编 张晓伟

副主编 杨志兴 张淑梅 沙长青



中国科学技术出版社

·北 京·

图书在版编目(CIP)数据

免疫球蛋白基因与基因工程/张晓伟主编. —北京:中国科学技术出版社, 2000.12

ISBN 7-5046-2965-0

I. 免... II. 张... III. 免疫球蛋白-基因-遗传工程
IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 58719 号

责任编辑:吕秀齐

责任校对:孟华英 赵丽英

封面设计:赵一东

责任印制:安利平

中国科学技术出版社出版

北京海淀区白石桥路 32 号 邮政编码:100081

电话:62179148 62173865

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京印刷学院实习工厂印刷

*

开本:850 毫米×1168 毫米 1/32 印张:9.5 字数:270 千字

2000 年 12 月第 1 版 2000 年 12 月第 1 次印刷

印数:1—1000 册 定价:15.00 元

序 言

自 19 世纪后期 Kitasato 和 Behring 发现动物血清中的抗体以来,抗体或免疫球蛋白的结构、功能和表达便成为免疫学中最引人注意的重要问题。因为,免疫球蛋白是免疫系统中的基本分子,它能保护与治疗大多数的感染疾病。

最近十年中,对于各种生物中的免疫球蛋白基因的组成、结构、重排和表达方面进行了广泛而深入的研究,并且积累了大量的极为有价值的材料,取得了举世瞩目的研究成果。这些成果不仅对免疫学,同时对分子生物学都有很重要的意义。尤其是为真核分子生物学提供了许多新的理论和新的概念,如外显子——内含子组成,各种不同的拼接,特异位点或特异区的重组,基因的重排和体细胞突变等。

本书包括两个主要部分,第一部分为免疫球蛋白的基因,系本书的主体,阐述免疫球蛋白的组成,结构,重组,转录,调控及表达。同时分述(和举例书出)了小鼠和人的各种免疫球蛋白的 DNA 序列,以供参考。第二部分,考虑到随着单克隆抗体的出现及其应用,介绍了免疫球蛋白的基因工程,概要地介绍为了开发和扩展单克隆抗体的应用所进行的基因工程抗体的研究,分别介绍了嵌合抗体、单链抗体、单区抗体、改型抗体或人源化抗体的研究进展。

笔者从 80 年代初,承担了“六五”国家基金项目——“免疫球蛋白基因工程”的研究,从此开始涉足于免疫球蛋白基因及基因工程研究。在“七五”和“八五”期间,又转到了基因工程抗体的研究。在此期间,结合研究工作的需要阅读了大量的有关免疫球蛋白基因方面的文献,积累了数百篇有意义的文章,一者为满足本身工作需要,再者考虑到国内同仁已都对这方面的知识十分重视和感兴趣,所以着手撰写本书,借以推动对免疫球蛋白基因和基因工程的研究。应该指出,在编著本书中,参阅了数百篇文献,所以本书是

众多从事免疫球蛋白基因和基因工程研究者研究成果的荟萃,在此对他们致以诚挚感谢。在本书的编著过程中,原黑龙江省科学院应用微生物研究所所长杨学成教授曾给予多方支持和关注,在此深表谢意。

由于作者学识水平有限,书中缺点和错误在所难免,肯请批评指正。

编著者

2000年2月

目 录

第一章 抗体的一般性质	(1)
一、人类的免疫球蛋白	(1)
二、免疫球蛋白 IgG 的结构与功能	(3)
1. 分子的基本结构	(3)
2. 功能区的结构	(5)
3. Fab 区的结构	(6)
4. 抗原的识别	(6)
5. Fc 的结构	(8)
6. 枢纽区	(16)
7. IgG 的功能	(18)
8. 抗原的识别作用	(18)
9. IgG 与金黄色葡萄球菌蛋白 A 的相互作用	(19)
10. 补体的激活作用	(19)
11. IgG 与细胞 Fc 受体的相互作用	(21)
12. IgG 的其他功能	(22)
13. 膜结合 IgG	(23)
三、IgM 的结构和功能	(24)
1. IgM 的结构	(24)
2. IgM 的功能	(26)
3. IgA 的结构和功能	(27)
4. IgD 的结构和功能	(29)
5. IgE 的结构和功能	(31)
第二章 免疫球蛋白轻链基因	(33)
一、免疫球蛋白轻链基因的结构	(33)
1. 小鼠 V _κ 基因家系	(35)
2. 人的 V _κ 基因家系	(37)
3. 小鼠的 V _λ 基因家系	(38)

4. 人的 V_{λ} 基因家系	(38)
5. 免疫球蛋白轻链可变区基因(V_L)的数量	(38)
6. 人的免疫球蛋白轻链可变区基因数量	(40)
7. 免疫球蛋白轻链基因的结构和组成	(41)
8. 免疫球蛋白 λ 轻链基因座位的组成	(43)
二、免疫球蛋白轻链恒定区基因(C_L)的结构	(44)
1. 小鼠免疫球蛋白轻链恒定区基因	(44)
2. 人免疫球蛋白轻链恒定区基因	(45)
3. 其他种动物免疫球蛋白轻链基因	(46)
4. 免疫球蛋白轻链恒定区基因的组成	(48)
5. 免疫球蛋白轻链的假基因	(49)
6. 缺失与恶变	(49)
三、免疫球蛋白轻链可变区(V_L)基因片断的装配	(50)
1. 连接信号	(50)
2. 连接模型	(51)
3. 连接的控制	(54)
4. 在 B 细胞发育中轻链基因的重排	(55)
5. V_{κ} 与 J_{κ} 基因片段的重排	(56)
6. RS 重排	(58)
7. V_{λ} 与 J_{λ} 的重组	(58)
8. 免疫球蛋白轻链基因表达的等位基因排阻现象	(59)
第三章 免疫球蛋白重链基因	(61)
一、免疫球蛋白重链可变区基因的结构和装配	(62)
1. 免疫球蛋白重链可变区基因的结构	(62)
2. 小鼠的 V_H 基因家系	(63)
3. 人免疫球蛋白重链 V_H 基因家系	(65)
4. 免疫球蛋白重链 V_H 基因的数量	(67)
5. 免疫球蛋白重链可变区基因的组成	(72)
6. 免疫球蛋白重链可变区基因的装配	(78)
7. 在 B 细胞发育过程中免疫球蛋白重链可变区基因的重组	

过程及其顺序	(81)
8. 免疫球蛋白重链的等位基因排阻	(89)
二、免疫球蛋白重链恒定区基因	(92)
1. 小鼠免疫球蛋白重链恒定区基因	(92)
2. 人免疫球蛋白重链恒定区基因	(96)
3. 其他种动物的免疫球蛋白重链恒定区基因	(101)
4. 免疫球蛋白类别转换区	(103)
5. 免疫球蛋白重链恒定区基因的进化	(105)
第四章 免疫球蛋白重链的类别转换	(109)
一、类别转换的频率	(110)
二、在 B 细胞个体发育中的类别转换重组	(113)
三、类别转换的活性及调控	(115)
四、等型个体的模式(isotype patterns)	(117)
五、淋巴因子:转换细胞的选择和转换的诱发	(119)
六、类别转换和类别转换重组	(121)
1. 长的转录子	(121)
2. 反式拼接(trans - splicing)	(123)
3. 类别转换重组区	(123)
4. 易接近模型(accessibility model)	(125)
5. 转换区转录作用的调控	(126)
6. 保护性的甲基化作用	(126)
七、转换的免疫球蛋白的重链表达的分子生物学机制	(127)
八、类别转换重组(class switch recombination)	(129)
九、转换重组位点	(134)
第五章 免疫球蛋白基因的转录	(138)
一、重排基因片段的转录	(138)
二、Ig 启动子	(139)
1. 保守的 Ig 启动子模块(Motifs)	(139)
2. 八聚体模块	(141)
3. 控制 Ig 启动子的淋巴样细胞特异活性的机制	(142)

4. IgH 的内含子区增强子(ENH_{iH})	(143)
5. 3'IgH 增强子($ENH_{3'H}$)	(151)
6. κ 轻链内含子中增强子($ENH_{i\kappa}$)	(151)
7. κ 轻链 3'端增强子($ENH_{3'\kappa}$)	(154)
8. λ 轻链增强子	(155)
第六章 免疫球蛋白基因的表达	(157)
一、研究免疫球蛋白基因表达的细胞模型	
——肿瘤细胞,淋巴细胞及浆细胞瘤	(158)
二、在 B 细胞个体发育过程中免疫球蛋白基因的 表达	(158)
三、正常重排的免疫球蛋白基因的表达	(160)
四、不正常重排的免疫球蛋白基因的表达	(162)
五、未重排免疫球蛋白基因的表达	(161)
六、调控免疫球蛋白基因表达的过程	(162)
1. 上游启动子元件	(163)
2. 增强子元件	(165)
3. 其他启动子元件	(170)
4. 转录的起始和启动子信号	(170)
七、转录的终止和 3'末端的形成	(171)
八、RNA 的拼接	(172)
九、转录的终止	(173)
十、信息 RNA 的转换	(174)
十一、翻译和翻译后的调控	(174)
第七章 免疫球蛋白的多样性	(176)
一、生殖细胞的多样性	(178)
二、B 细胞中的组合多样性	(179)
三、抗体基因的连接位置多样性	(180)
四、抗体基因的连接插入多样性	(182)
五、超突变多样性	(183)
六、超转换多样性	(184)

七、连续重组多样性	(187)
八、抗体分子的装配多样性	(189)
第八章 免疫球蛋白的超级家系	(191)
一、T 细胞受体	(193)
1. α/β 型 T 细胞受体	(193)
2. α/β 型 T 细胞受体可变区的结构	(194)
3. α/β 型 T 细胞受体恒定区的结构	(195)
4. α/β 型 T 细胞受体和 MHC	(197)
5. γ/σ 型 T 细胞受体	(198)
6. α/β 型和 γ/σ 型的 T 细胞受体表达之间的相互关系	(203)
7. T 细胞受体的多样性及其基因的多样性	(204)
二、大的组织相容性复合物(MHC)及其多态性	(212)
1. MHC 的一般结构	(214)
2. MHC 可变区的结构	(214)
3. MHC 恒定区的结构	(218)
4. MHC 分子的多态性	(221)
5. MHC 分子多态性的遗传基础	(224)
三、免疫球蛋白超家系的进化	(226)
第九章 免疫球蛋白的基因工程	(229)
一、嵌合抗体	(231)
1. 嵌合基因转染的载体	(231)
2. 基因转染的受体细胞	(232)
3. 基因转染的方法	(233)
4. 嵌合抗体的研究	(233)
二、单链抗体的研究与应用	(242)
(一)单链抗体的研究	(244)
1. 单链抗体的特点	(244)
2. 单链抗体可变区基因的构建	(245)
(二)单链抗体基因高效表达和大量生产	(246)

1. 单链抗体基因在 E.coli 中的表达形式	(246)
2. 单链抗体在 E.coli 中表达的影响因素	(247)
3. 单链抗体和抗体片段基因在 E.coli 中获得高 效表达的一些措施	(249)
(三)用植物生产单链抗体	(249)
(四)用化学修饰法延长单链抗体的体内半衰期	(250)
(五)单链抗体在基因治疗中的应用	(252)
(六)单链抗体在癌症的诊断和治疗中的应用	(253)
(七)单链抗体在放射造影及放射免疫治疗中的应用	(257)
(八)单链抗体—酶融合蛋白在原药治疗(Prodrug)中 的应用	(258)
(九)单链抗体在工业方面的应用	(259)
(十)单链抗体在手性化合物识别中的应用	(261)
三、人源化(或改型)抗体的研究与应用	(262)
1. 人源化抗体研究所取得的进展	(263)
2. 人源化抗体或改型抗体的优点	(264)
3. 人源化抗体的研制方法	(266)
4. 人源化抗体研究实例	(267)

第一章 抗体的一般性质

一、人类的免疫球蛋白

抗体的早期分类是根据电泳迁移率的不同分成三类。其中两类属于 β_2 -球蛋白,第三类属于 γ -球蛋白。至60年代初期普遍认为所有的抗体均属 γ -球蛋白。后来发现所有抗体都具有四条肽链的基本结构,二条相同的轻链和二条相同的重链,通过链间的二硫键将其连接起来,如图1-1所示。这种由四条链组成的基本结构也可经共价连接形成多聚体,如IgM是五聚体,分泌型IgA为二聚体。各类抗体的轻链抗原性是相同的(κ 型或者 λ 型),而重链的抗原性则不同,分别为 $\mu, \sigma, \gamma, \epsilon, \alpha$ 等五种。在多聚体免疫球蛋白(IgM和分泌型IgA)中还有J链。

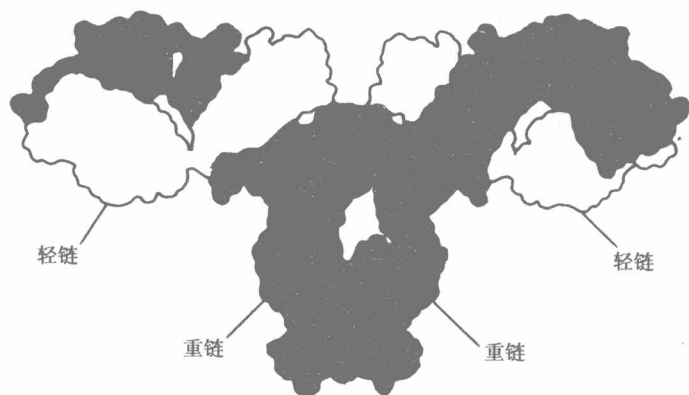


图1-1 免疫球蛋白的结构

1964年世界卫生组织在日内瓦召开了人类免疫球蛋白命名会议,会议根据各类免疫球蛋白的化学结构,主要是重链的抗原性不同,依据重链恒定区 $\mu, \sigma, \gamma, \epsilon, \alpha$ 将它们命名为IgM、IgD、IgG、IgE

和 IgA。人类免疫球蛋白的种类和特征列入表 1-1 中。

IgM 占总的血液免疫球蛋白的 10% 左右,大都限制在血管内,它形成五聚体结构,为早期免疫反应中的优势抗体,出现在抗细菌的第一道防线,具有膜结合型和分泌型两种,作为膜结合分子时,主要作为抗原的受体,其生物学特征是激活和固定液体,同时表现出很强的溶血素和凝集素的抗体活性。

表 1-1 人免疫球蛋白的物理、化学性质

	IgG				IgM	IgA					IgD	IgE
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4		IgA1	IgA2	sIgA				
重链	γ^1	γ^2	γ^3	γ^4	μ	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 1 \alpha 2$	δ	ϵ		
平均血清浓度 (mg/ml)	5	3	0.5	0.5	1.5	3	0.5	0.05	0.03	5×10^{-5}		
基本结构式	单体	单体	单体	单体	五聚体	单体	单体	二聚体	单体	单体		
结合抗原效价	2	2	2	2	5(10)	2	2	4	2	2		
分子量 ($\times 10^{-3}$)	150	150	160	150	970	160	160	415	175	190		
重链内二硫链数量	2	4	11	2	1 α	2	2	—	1	2		
重链功能区数量	4	4	4	4	5	4	4	—	4	5		
重链分子量 ($\times 10^{-3}$) (含糖基)	51	51	56	51	72	57	57	—	63	72		
每个重链恒定区与 γ -连接的糖链数量	1	1	1	1	5	2	5	—	3	6		
本区外显子残基	15	12	62	12	0	20	7	—	64	0		

α : 在 IgM 的 C μ 2 和 C μ 3 功能区之间有一个重链内二硫链。

IgG 是主要的抗体类型,在正常人血清中占总的免疫球蛋白的 70%。分布在血管内和外。IgG 是单聚体,分子是由相同的两条轻链(κ 或 λ)和相同的两条重链(γ)构成。可以分为 4 个亚类,在人体内被认为是次级的免疫反应的主要抗体。IgG 的生物学特性是能固定补体,穿过胎盘屏障并具有使异种皮肤被动致敏以及和某些细胞(单核细胞, B 淋巴细胞等)亲合的能力。

IgD 在人血清免疫球蛋白中只占不足 1% 的量, 但被普遍发现在 B 淋巴细胞表面上, 它在细胞表面上可能起着抗原受体的作用, 与 IgM 是很相似的。

IgE 虽然在人的血清中微量存在, 但已发现它结合巨大细胞表面上的特异受体和在所有个体中的嗜碱细胞, 它涉及到预防肠道寄生虫, 然而, 又与普遍的特异性变态反应相关。是异位性过敏反应中起重要作用的反应素抗体 (Reaginic antibody)。

IgA, 这一类免疫球蛋白的特点是除在血清内存在外, 还在各种外分泌液内存在, 如唾液、支气管分泌物、初乳、乳汁和泌尿生殖器的分泌物中。大约占人血清免疫球蛋白总量的 15% ~ 20%。主要以单聚体形式存在, 二聚体则为分泌的 IgA (称 sIgA)。IgA 的生物学功能是负责呼吸道、消化道等黏膜面的局部免疫防御作用。

在各类免疫球蛋白中, IgG 在血清中含量最高, 它的结构与功能也研究得比较清楚。对于它的结构研究奠定了研究其他类的基础。同时依照各类免疫球蛋白基因在染色体上的排列顺序应是 IgM 在先, 然后是 IgD、IgG、IgE 和 IgA。为了便于研究其他各类免疫球蛋白的结构, 都是以 IgG 的结构为基础, 同时也考虑到基因在染色体上的顺序, 首先阐述 IgG 的结构与功能, 随之论述 IgM、IgD、IgE 和 IgA 的结构和功能。

二、免疫球蛋白 IgG 的结构与功能

1. 分子的基本结构

根据 G. Edelman (1959) 的研究, IgM 分子是由四条多肽链、两条重链和两条轻链, 通过二硫链连接而成的。同时 Potter (1959) 发现 IgG 经过木瓜蛋白酶水解后, 形成三个大小的相等的片段, 其中两个片段, 抗原结合片段称为 Fab, 是相同的; 第三个片段可结晶片段, 称 Fc, 与前者有明显不同, 连接 Fab 与 Fc 的部分称枢纽区 (hinge region)。这就是 Potter 提出的关于抗体结构的第一个主要观点, 随后到 1962 年, Potter 也提出 IgG 分子的四条链的结构。从此之后, Edelman 的著名的化学及序列分析确定为两条同样的重

链,分子量约 50 000 和两条同样轻链,分子量为 25 000 组成的四条链结构。因此 IgG 的典型分子量约为 150 000。在 1969 年 Edelman 测定了一种骨髓病蛋白质 IgG₁(Eu)的全部氨基酸序列及二硫链的位置,它可以代表 IgG 的化学结构。其分子量为 150 000,重链由 446 个氨基酸、轻链为 215 个氨基酸组成,共计为 1320 个氨基酸。

分子结构如图 1-2 所示。为对称结构,每一个半分子由一条轻链和一条重链组成。通过一个二硫键连接。两个半分子之间再通过两个二硫键连接。同时每条链内,大约在相等的距离上也形成类似的链内二硫链。胰蛋白酶能在重链 222 位置上的赖氨酸残基处切开,形成两个 Fab 和一个 Fc 片段。

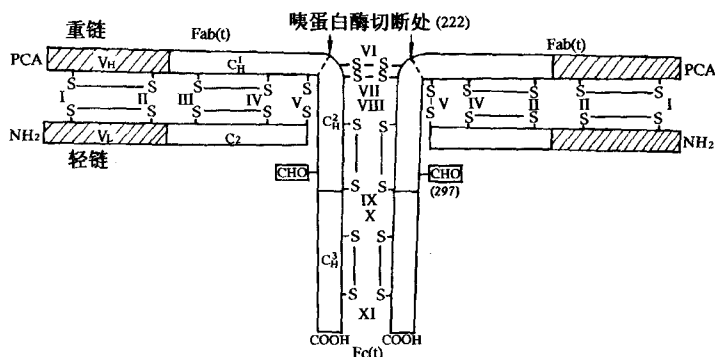


图 1-2 免疫球蛋白 IgG 的分子结构

γG: 免疫球蛋白(Eu)的肽链和二硫键排列。半胱氨酸残基,从 N 端起始,用 I - XI 表示。↑为分子在重链的 222 位置被胰蛋白酶切断成两个“抗原结合”片段和一个“可结晶”的片段。(V_H, V_L)重链和轻链的同源的可变区;(C_H, C_H, C_H)重链恒定区的同源区;(C_L)轻链与 C_H, C_H, C_H 的同源区

正如我们所知道的那样,免疫球蛋白轻链是以 λ 和 κ 两种形式存在,区别在于它们的抗血清反应不同。在人体中,κ 链较之 λ 链更为普遍存在。在小鼠中 λ 链也很少。重链可以再分成不同的亚类。它的数量依不同种而不同。在人体中有四个亚类分别为 γ¹、γ²、γ³、γ⁴。因此它们产生 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 四种亚类,应该指出人的 IgG 亚类中一级结构很相近,只是在枢纽区中有不同。亚类的存在是 IgG 的重要

性征,它表明在完成效应器功能上有差别。在一个 IgG 分子中,两条重链相同,两条轻链也相同,迄今仍未发现存有杂种分子。

单克隆抗体 IgG 蛋白质的氨基酸序列或者骨髓病的 IgG 蛋白质的氨基酸序列的比较发现轻链的羧基一半,或重链的羧基末端的 3/4,不同 IgG 分子间有很小的序列差别。但在 100 个氨基酸残基的氨基末端,两种链中都存明显的序列不同,这部分称之为可变区(variable region)。在这些可变区中,又有 3 个至 4 个比较短的序列,它变化很大,因此称为超可变区(hypovariable region)。根据不同 IgG 识别不同抗原的比较,认为这些超可变区与抗原的识别和结合有密切关系,因此被称为互补决定簇(CDRs)。从氨基酸序列的比较可看出 IgG 是由 12 个同源的功能区组成,每个具有一个链内的二硫键。轻链是由两个功能区(Domain)组成。一个相当于上述的可变区,用 V_L 表示,而另一个相当于恒定区用 C_L 表示。IgG 的重链是由四个功能区组成,Fab 的 V_H 和 C_{H1} 功能区,与 Fc 的 C_{H2} 和 C_{H3} 功能区是通过枢纽区相连接。 V_L 和 V_H 功能区形成抗原结合位点,Fc 的 C_{H2} 与 C_{H3} 功能区结合具有效应器分子的性质。应该指出在 C_{H2} 功能区中的氨基末端连接有两个分枝的糖链,插入在该功能区间。

2. 功能区的结构

整个 IgG 及 IgG 片段的结晶学研究已经揭示出,每个功能区都具有一个共同的多肽链折叠的格式,如图 1-3 所示。这是一张

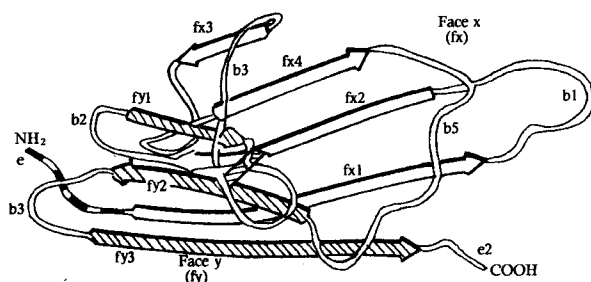


图 1-3 免疫球蛋白恒定区肽链的折叠

免疫球蛋白的折叠图,是由两条扭曲堆积的 β -片段组成,它围成紧密包围着疏水残基的内部空间。这种排列由于借助于一个在中心部位连接两个片段的内部二硫键,所以是稳定的。一个 β 片段有四个,另一个有三个反向平行的 β -链。这些链通过弯曲线或环状而连接起来,产生小的二级结构。包括在 β -片段中的氨基酸残基趋向于保守的,而在连接片段中有一个更大的残基的多样性。图1-3表明了折叠的恒定区多肽链。可变区的 β -片段比恒定区的 β -片段更易弯曲,而可变区还具有一个多余的环。

3. Fab 区的结构

四个单一的功能区以紧密的反式相互作用的两种类型构成配对,如图1-4, V_H 和 V_L 功能区以在两个三条 β -片段之间的广泛接触的方式构成配对(Y面),同时 C_H1 和 C_L 功能区由两个四条链之间的接触而配对(X面)。在这两种情况中,配对的几何学图形如图1-4,致使两个功能区靠近,类似于两个折叠对称轴彼此相连。显然,功能区的相互作用面是疏水的。对于功能区配对的拉力是使这些残基从水相环境中移开的原因。Fab排列是靠 C_H1 和 C_L 功能区之间一个二硫键维持其更加稳定。这个键使 C_L 功能区的羧基未溶部分与 C_H1 功能区的e2片段(人的IgG1)或者b1片段(人的IgG2、IgG3、IgG4)共价连接。虽然后者的这些位置在 C_H1 序列中广泛地分离开,但在保守的分子基本结构的空间中是紧密相连的。

$V_H - C_H1$ 和 $V_L - C_L$ 的顺式相互作用是很有限的,以使V-C转换区或者弯曲区(elbow bending)有灵活性。在Fab结构的结晶学分析中,这点反映出弯曲的角度,即在 $V_H - V_L$ 与 $C_H1 - C_L$ 的假二折叠轴之间的角度变化在大约 137° 和 180° 之间。

4. 抗原的识别

在Fab部分中, V_H 和 V_L 功能区之间的进一步接触形成的环称之为超可变区或互补决定簇区(CDRs),它们构成了抗原结合位点。在免疫球蛋白折叠的共同框架中,这些环状的超可变区的可变性是极其重要的,它提供给抗体识别抗原的巨大的多样性。