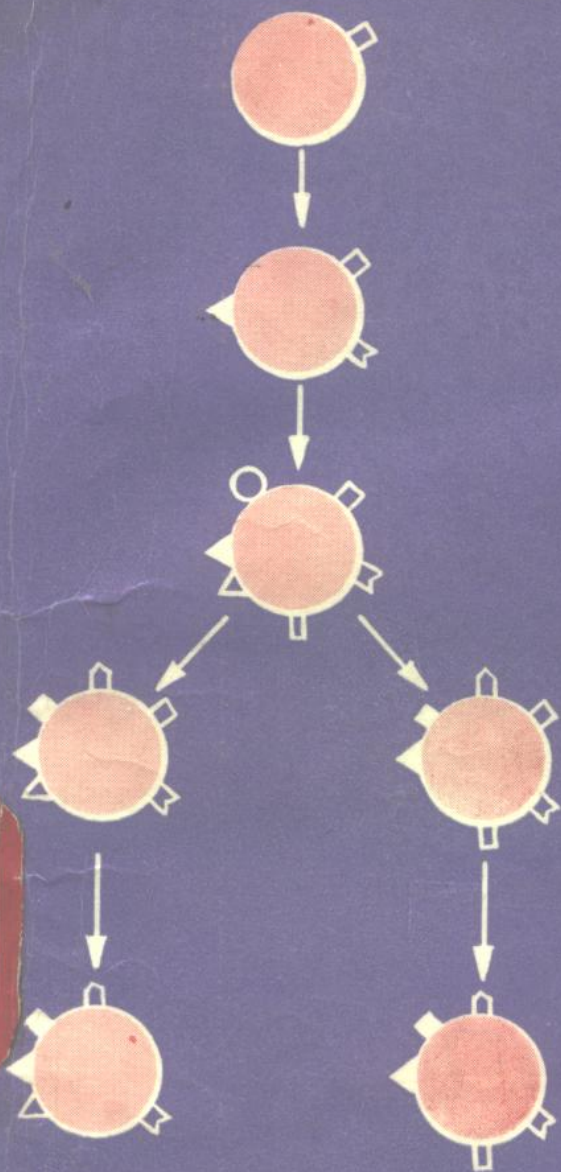


淋巴细胞的分子生物学研究与实践

朱平著

● 中国医药科技出版社



淋巴细胞的分子生物学 研究与实践

朱 平 著

中国医药科技出版社

2177/66

内 容 提 要

本书系统介绍了淋巴细胞的分子生物学研究的新理论和新发展,结合作者自己的实际工作,详尽讨论了构成淋巴细胞基本功能的一些编码基因的表达原理。书中分析了免疫球蛋白超基因家族(gene superfamily)的不同成员,例如免疫球蛋白基因,T细胞受体基因,MHC基因,淋巴因子等基因结构,基因表达的方式以及生理病理作用;分析了淋巴细胞白血病和恶性淋巴瘤在分子水平上的发病机理,基因重排和基因调控的关系,癌基因的激活,早期诊断和监测残留恶性细胞的基因诊断方法与临床意义。在附录中详细说明用于分析淋巴细胞的基因变化的技术操作规程,包括基因探针,染色体原位杂交和PCR基因扩增技术。因为PCR技术在现代医学各个领域都有广泛应用前景,肿瘤性淋巴细胞的基因重排分析已经用于临床工作,因此介绍尤为详细。适于从事免疫学,遗传学,血液学,临床检验学工作者,临床医师,大专院校教师,研究生以及高年级本科生阅读。

淋巴细胞的分子生物学研究与实践

朱 平 著

*

中国医药科技出版社 出版
(北京西外北礼士路甲38号)
(邮政编码 100810)

本社激光照排室 排版
北京市昌平精工印刷厂 印刷
新华书店北京发行所 发行

*

开本 787×1092mm^{1/32} 印张 7^{5/8} 插页

字数 161千字 印数 1—1,600

1992年4月第1版 1992年4月第1次印刷

ISBN 7-5067-0526-5/R·0462

登记证号: (京) 075号 定价 4.80元

前 言

自从 60 年代初发现了外周血的淋巴细胞不是终末细胞，而是具有多种潜在功能的，暂时处于静止期的细胞后，淋巴细胞的特征的研究成了近年最活跃，最引人注目的领域。淋巴细胞的功能研究是现代免疫学的基础。淋巴细胞来源于造血多能干细胞，多能干细胞向淋巴系祖细胞分化，从原始淋巴细胞成熟，成为小淋巴细胞。成熟的小淋巴细胞在抗原或者其他因素刺激下，又转化为原始淋巴细胞。淋巴细胞有不同的亚群，主要可以分为两大群，一群是经胸腺诱导，分泌各种淋巴因子，与细胞免疫有关的 T 细胞；一群是经骨髓诱导，分泌不同的免疫球蛋白，和体液免疫有关的 B 细胞。T 细胞按照功能还可以分为辅助性 T 细胞，抑制性 T 细胞，杀伤性 T 细胞等。淋巴细胞中另外还有自然杀伤细胞 (NK)。这些淋巴细胞在形态学上没有明显的区别，主要依赖表面受体和功能产物的不同来鉴别。随着分子生物学技术的进展，对淋巴细胞的研究，也从用细胞形态学，亚细胞结构，染色体技术探索细胞起源、分化、成熟以及肿瘤发生原理，进入到从分子水平研究免疫球蛋白、细胞表面受体、分泌因子的基因的表达序列变化的新阶段。淋巴细胞基因的表达，基因重排和基因调控的知识构成了现代分子免疫学，分子遗传学以及研究癌基因与肿瘤发生的关系的基础，为临床诊断和治疗疾病开拓了新领域。

分子生物学技术已经引起愈来愈多的临床医师，免疫学

和遗传学工作者的关注。就象 80 年代初单克隆抗体技术一样，基因分析技术在短短几年时间迅速扩展到医学生物学各个分支学科中。各个学科都力图应用这一新技术来解决自己学科的难题。1990 年 9 月，中华医学会医学遗传学会肿瘤学组和中国优生学会举办全国基因诊断讲习班，有百余名免疫学、血液学、遗传学和优生学等学科的高级专业人员参加研讨，反映了各个学科迫切希望掌握分子生物学技术的要求。本书的主要内容作为讲义的一部分，也从中得到了许多从事分子生物学、免疫学、血液学和遗传学专家的建议和帮助，最终在李书祯总编的鼓励和支持下，经过增补修订后，正式出版。

本书系统介绍了淋巴细胞的分子生物学研究的新理论和新进展，结合作者自己的实际工作，讨论了构成淋巴细胞基本功能的一些编码基因的表达原理。作者在书中分析了免疫球蛋白超基因家族 (gene superfamily) 的不同成员，例如免疫球蛋白基因，T 细胞受体基因，MHC 基因，淋巴因子等基因结构，基因表达的方式以及生理病理作用；分析了淋巴细胞白血病和恶性淋巴瘤在分子水平上的发病机理，基因重排和基因调控的关系，癌基因的激活，早期诊断和监测残留恶性细胞的基因诊断方法与临床意义。在附录中详细说明用于研究淋巴细胞的基因变化的技术操作规程，包括基因探针，染色体原位杂交和 PCR 基因扩增技术。因为 PCR 技术在现代医学各个领域都有广泛应用前景，肿瘤性淋巴细胞的基因重排分析也已经用于临床工作，因此介绍较多。

虽然作者力求在反映本学科最新进展的前提下，能深入浅出地介绍分子生物学原理的实际应用，但是限于作者水平和能力，实际效果总是不及愿望。这一领域中的工作进展日

新月异，突飞猛进，作者虽然竭力追随，也难免挂一漏万，希望读者指正。

作 者

1991年6月

目 录

第一章 免疫球蛋白与 B 细胞分化	(1)
一、免疫球蛋白的超基因家族	(1)
二、免疫球蛋白的结构	(9)
三、B 淋巴细胞和浆细胞的分化	(13)
第二章 免疫球蛋白合成的遗传学：免疫球蛋白基因 重排	(16)
一、免疫球蛋白合成的早期理论	(16)
二、人类 κ 轻链基因	(18)
三、人类 λ 轻链基因	(19)
四、重链 V_H 基因的组装	(21)
第三章 免疫球蛋白可变区片段的重排机制	(24)
一、作为重排信号的 DNA 序列	(24)
二、抗体多样性发生的遗传机制	(26)
三、免疫球蛋白基因的激活次序	(28)
四、重链恒区基因顺序和类型的转换	(29)
五、组织特异性强化子促进免疫球蛋白基因的转录	(31)
第四章 B 淋巴细胞的膜转移信号	(34)
一、参与 B 细胞对特异抗原反应的成分	(34)
二、B 细胞表面免疫球蛋白受体	(34)
三、B 细胞的 Fc 受体 ($Fc\gamma R$)	(37)
四、淋巴因子受体	(37)

五、与Ⅰ类 MHC 抗原的关系	(3 8)
六、补体受体	(3 8)
第五章 T 细胞抗原受体	(4 2)
一、T 细胞分化与表型	(4 2)
二、T 细胞受体的结构	(5 0)
三、T 细胞受体基因的组成	(5 2)
四、胸腺细胞中的 T 细胞受体基因变化	(5 2)
五、T 细胞受体多样性的发生	(5 3)
六、TCR γ / δ 受体的作用	(5 6)
第六章 人类 TCR γ 和 δ 基因及抗 TCR γ / δ 单克隆抗体	
.....	(6 0)
一、抗 TCR γ / δ 单克隆抗体的意义	(6 0)
二、TCR γ / δ 基因和蛋白	(6 0)
三、抗 TCR γ / δ 的单克隆抗体种类	(6 3)
四、TCR γ / δ 阳性淋巴细胞的功能和识别性	(6 4)
五、病理状态的免疫表型研究	(6 5)
第七章 MHC 的分子遗传学	(6 7)
一、主要组织相容复合物 (MHC)	(6 7)
二、MHC 的遗传学结构	(6 8)
三、基因和假基因	(7 0)
四、Ⅰ类 MHC 抗原的功能	(7 0)
五、T 细胞与 MHC 抗原反应	(7 1)
六、MCH 的限制性	(7 1)
第八章 抗原特异性 T 细胞辅助和抑制因子	(7 5)
一、抗原特异性 T 细胞辅助因子和抑制因子的结构	
.....	(7 5)
二、细胞免疫反应必须依赖辅助和抑制因子	(7 5)

三、细胞接触和可溶性因子	(7 6)
四、抗原特异性因子的激活	(7 7)
五、遗传限制性的意义	(7 7)
第九章 干扰素	(8 1)
一、干扰素的命名及生化概要	(8 1)
二、干扰素的产生	(8 2)
三、干扰素的作用	(8 3)
第十章 淋巴因子与白介素	(8 7)
一、淋巴因子的名称	(8 7)
二、淋巴因子的生物学特征	(8 9)
三、淋巴因子与白介素的作用	(9 0)
第十一章 淋巴系统肿瘤的基因重排和易位	(9 3)
一、单克隆抗体和基因探针	(9 3)
二、免疫球蛋白和 T 细胞受体基因	(9 6)
三、淋巴系统肿瘤的基因分析	(9 7)
四、单克隆性是否意味着肿瘤	(9 9)
五、同时有 TCR 和 Ig 基因重排的淋巴细胞	(100)
六、淋巴恶性疾病的 TCR 和 Ig 基因易位	(103)
七、基因重排和易位研究的远景	(106)
第十二章 淋巴系统肿瘤染色体易位的分子机制	(111)
一、淋巴恶性疾病的染色体重排	(111)
二、c-myc 原癌基因	(112)
三、断裂点分子学	(115)
四、免疫球蛋白基因位点的作用	(118)
五、重排的 c-myc 原癌基因失控	(118)
六、重排的 c-myc 原癌基因调节机制	(119)
七、体细胞杂交后重排 c-myc 基因的表达	(121)

八、Burkitt 淋巴瘤和肿瘤发生的多阶段性	(122)
第十三章 免疫缺陷病的分子分析	(125)
一、免疫球蛋白重链病的分子分析	(125)
二、遗传性免疫缺陷病的 TCR 和 Ig 重排	(126)
第十四章 淋巴恶性肿瘤的基因诊断	(129)
一、白血病的诊断	(129)
二、Southern blot 技术分析淋巴细胞白血病基因重排	(130)
三、T 细胞受体基因 (TCR $\alpha\beta\gamma\delta$) 检测恶性细胞克隆	(131)
四、基因分析加免疫选择法检测残留白血病细胞	(132)
五、PCR 基因扩增法检测残留恶性细胞克隆	(133)
六、PCR 检测染色体易位者的嵌合基因	(133)
七、PCR 基因扩增 TCR γ 和 TCR δ 检测残留白血病	(134)
八、PCR 扩增 Ig 的 CDR3 区基因检测残留 B 细胞 白血病	(135)
第十五章 PCR 体外基因扩增	(140)
一、PCR 技术的原理	(140)
二、PCR 基因扩增法的应用	(143)
三、PCR 获得双链 DNA 序列作为分子探针	(144)
四、扩增 DNA 片段制备针对尚未克隆的基因的探针	(145)
五、从微量的 mRNA 中产生 cDNA 文库	(147)
六、PCR 用于序列分析	(147)

七、突变分析	(149)
八、染色体步移 (反向 PCR)	(150)
九、彩色 PCR	(151)
第十六章 分析 B 细胞肿瘤基因标志的 PCR 引物	
设计	(153)
一、利用编码 Ig CDR 的基因作肿瘤标志	(153)
二、免疫球蛋白 CDR3 区和重链基因序列中 D 区 的关系	(154)
三、免疫球蛋白基因 PCR 引物的设计原则	(156)
四、PCR 分析 CDR3 编码基因检测 B 淋巴细胞肿瘤	(160)
附录一 多聚酶链反应 (PCR) 的方法学	(165)
一、注意事项	(165)
二、寡核苷酸引物	(166)
三、PCR 的缓冲液	(167)
四、Taq DNA 多聚酶	(168)
五、脱氧三磷酸核苷酸	(168)
六、靶序列	(169)
七、扩增反应	(169)
八、扩增由 mRNA 逆转录产生的 DNA	(171)
九、对 PCR 扩增的 DNA 进行序列分析	(173)
十、靶序列的定量	(180)
附录二 常用的基因诊断技术	(185)
一、分子克隆的技术简介	(185)
二、重组质粒 DNA 的制备	(187)
将重组质粒转入大肠杆菌扩增	(187)
迅速分离质粒 DNA	(189)

聚丙烯酰胺凝胶电泳	(191)
低熔点琼脂糖凝胶电泳挖块法	(192)
三、DNA 制备提纯操作规程 (血细胞)	(193)
四、用微量及特殊标本制备染色体 DNA	(194)
五、非超速离心法分离细胞总 RNA (酸性硫氰胍/酚/氯仿提取法)	(198)
六、Southern blot 转移	(200)
七、DNA 与同位素探针分子杂交	(203)
八、同位素探针标记程序	(204)
九、生物素标记探针	(205)
十、生物素探针杂交	(207)
十一、生物素显色系统	(207)
附录三 染色体原位杂交	(209)
一、概述	(209)
二、同位素标记的原位杂交方法	(209)
三、放射自显影	(210)
四、生物素-染色体原位杂交	(212)
五、实验中常见问题的讨论	(216)
附录四 常用试剂的配制	(220)
附录五 分子生物学实验室常规设备	(224)
附录六 白血病 PCR 基因诊断试剂盒说明书	(229)

第一章 免疫球蛋白与 B 细胞分化

一、免疫球蛋白的超基因家族

免疫球蛋白是人类起源最古老的一支参与免疫的成分。近年研究发现，在淋巴细胞的表面，除了膜免疫球蛋白以外，还有很多结构与免疫球蛋白很相似的成分，这些成分有相互类似的蛋白质功能区。主要的结构由变化较少的 C 区 (constant region) 和易变的 V 区 (variable region) 组成。这些结构类似的基因称为免疫球蛋白超基因家族 (immunoglobulin gene superfamily)。其中包括多基因家族：Ig, TCR, MHC I 类, MHC II 类分子, β_2 -m 分子；和单基因家族：CD2, CD3, LFA-3, Thy-1, OX-2, CD4, CD8, CTLA-4 等等。见表 1-1。分子模式图见图 1-1。

表 1-1 免疫球蛋白超基因家族的成员与分子结构

类 别	氨基酸 数 目	人类染色体 定 位	Ig 样 二硫键
免疫球蛋白			
重链 (IgM)	572(M)	14q32.33	有
κ 轻链	214(M)	2p12	有

续表

类 别	氨基酸 数 目	人类染色体 定 位	Ig 样 二硫键
λ 轻链	213(M)	22q11.12	有
T 细胞受体复合体			
TCR α 链	250(M)	14q11.2	有
β 链	282(M)	7q35	有
γ 链	286(M)	7q15	有
δ 链	272(M)	14q11.2	有
CD3 γ 链	160(H)	11q23	未定
δ 链	150(H)	11q23	未定
ε 链	185(H)	11q23	未定
主要组织相容性复合物			
I 类 重链	339(H)	6p21.3	有
β ₂ -m	99(H)	15q21-q22	有
II 类 α	229(H)	6p21.3	有
β	237(H)	6p21.3	有
β ₂ -m 相关抗原			
TL 重链	335(M)	仅见于小鼠	未定
Qa 重链	313(M)	仅见于小鼠	未定
CD1a 重链	311(H)	1	未定
T 细胞粘附分子			
CD2	322(R)	1p13	未定
LFA-3	207(H)	1	未定

续表

类 别	氨基酸 数 目	人类染色体 定 位	Ig 样 二硫键
T 细胞亚群抗原			
CD4	435(H)	12pter. p12	有
CD8 I 链	210(R)	2p12	未定
II 链	187(R)	2p12	未定
CTLA-4	188(M)	未定	未定
脑/淋巴样组织抗原			
Thy-1	111(R)	11q23	有
MRC OX-2	248(R)	3	未定
免疫球蛋白受体			
polyIgR	755(RB)	未定	有
Fc γ 2b/ γ 1R	351(M)	未定	有
神经分子			
NCAM	1072(CH)	11q23	未定
MAG	610(R)	未定	未定
Po 蛋白	219(R)	未定	未定
肿瘤抗原			
CEA	668(H)	未定	未定
生长因子受体			
PDGFR	1067(M)	5 q31-q32	未定
CSFIR	953(H)	5q33. 2- q33. 3	未定
非细胞表面分子			

续表

类 别	氨基酸 数 目	人类染色体 定 位	Ig 样 二硫键
α_1 -BGP	474(H)	未定	有
基底膜连结蛋白	339(R)	未定	有

注: M: 小鼠 H: 人类 R: 大鼠 RB: 兔 CH: 鸡

正象表 1-1 显示的, 很多免疫球蛋白超基因家族成员已经染色体上定位。例如, 人类免疫球蛋白重链基因定位在染色体 14q32; 免疫球蛋白 κ 轻链基因定位在染色体 2p11; 免疫球蛋白 λ 轻链基因定位在染色体 22q11; TCR- β 基因定位在染色体 7q34; TCR α 基因定位在染色体 14q11; TCR γ 基因定位在染色体 7p15; TCR δ 基因也定位在染色体 14q11; HLA 基因定位在染色体 6p21. 3; β_2 -m 基因定位在染色体 15; CD3 的 3 段基因定位在染色体 11q23。

脊椎动物的免疫系统能识别和区分各种各样的分子结构, 可以结合成百万种抗原。人类淋巴细胞大致有两类细胞与抗原产生免疫反应, B 细胞和 T 细胞。B 细胞来源于骨髓, 与可溶性抗原反应, 是人类免疫系统抗体分泌细胞—浆细胞的祖细胞。T 细胞来源于胸腺, 由不同的细胞亚类组成, 包括辅助细胞、抑制细胞, 以及涉及效应功能的一些有重要的免疫调节功能的细胞。T 细胞产生一些可溶性产物, 称为淋巴因子 (lymphokines)。T 细胞在迟发性过敏反应或细胞免疫反应中起主导作用。B 与 T 淋巴细胞表面参与特异免疫反应的受体分子, 即膜抗原受体, 是一种异双质体 (hetero-dimeric) 结构。B 细胞的细胞膜抗原受体由免疫球蛋白分子轻链 (L) 和

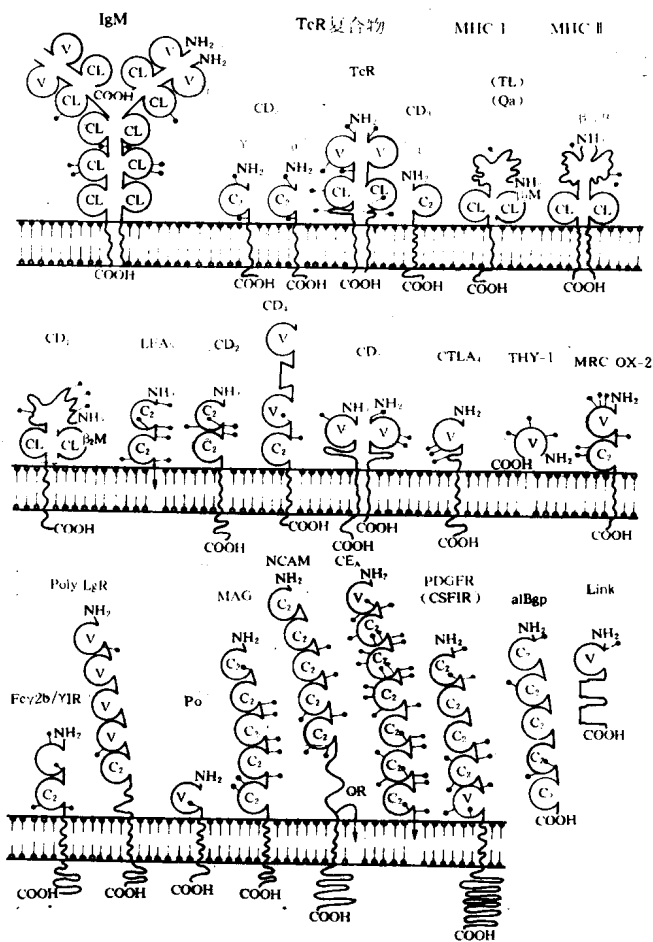


图 1-1 免疫球蛋白的超基因家族分子模式图