

生物学研究概说

抗体的 结构与功能

〔英〕 M. W. 斯图尔德 著



科学出版社

·生物学研究概说·

抗体的结构与功能

〔英〕M. W. 斯图尔德 著

张世藐 译

章静波 校

科学出版社

1987

内 容 简 介

本书为《生物学研究概说》丛书之一。它简明地概述了近年来有关抗体结构与功能研究的最新进展。讨论了免疫球蛋白和特异性抗体的分离与纯化、免疫球蛋白的一般结构、抗体-抗原反应的本质、抗体产生的调控等基本问题。

本书可供从事免疫学、遗传学、细胞生物学、分子生物学以及临床医学等科研工作者，生物系有关专业与医学院校师生参考。

M.W.Steward
Outline Studies in Biology
Antibodies: Their structure and function
Chapman and Hall, 1984

· 生物学研究概说 ·

抗体的结构与功能

〔英〕 M. W. 斯图尔德 著

张世馥 译

章静波 校

责任编辑 赵甘泉

科 学 出 版 社 出 版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年8月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1987年8月第一次印刷 印张：3 3/4

印数：0001—3,150 字数：82,000

统一书号：13031·3586

本社书号：5367·13—10

定价：0.92元

目 录

第一章	导 言	1
第二章	免疫球蛋白和特异性抗体的分离与纯化	7
2.1	血清抗体的诱导	7
2.2	免疫球蛋白的分离	9
2.3	特殊抗体的分离	11
2.4	由杂交骨髓瘤(杂交瘤)产生单克隆抗体	12
第三章	免疫球蛋白的一般结构	18
3.1	IgG的基本四链模型	18
3.2	免疫球蛋白是糖蛋白	23
3.3	氨基酸顺序研究	23
3.4	抗体结合位点	25
3.5	免疫球蛋白结构区	28
3.6	免疫球蛋白的独特型和个体基因型	30
第四章	抗体-抗原反应	37
4.1	与抗体-抗原反应有关的分子间力	37
4.2	抗体-抗原反应的测定	39
4.3	抗体-抗原反应的化学研究	42
4.4	抗体-抗原反应的热力学	45
4.5	抗体-抗原反应的动力学	58
4.6	抗体亲和性的生物学概况	60
4.7	抗体-抗原相互作用的专一性和交叉反应	67
第五章	各类免疫球蛋白的结构与生物学活性	73
5.1	免疫球蛋白G	75
5.2	免疫球蛋白A	78
5.3	免疫球蛋白M	82

5.4	免疫球蛋白E·····	86
5.5	免疫球蛋白D·····	88
5.6	抗体效应基因的功能·····	89
第六章	抗体产生的调控·····	95
6.1	抗体分子的合成与分泌·····	95
6.2	抗体生物合成的基因调控·····	97
6.3	抗体多样性的产生·····	105
参考文献	·····	108

第一章 导 言

长期以来人们便已意识到，当一个人自感染性疾病中恢复过来以后，极少再会罹患这种疾病。大约2500年前，修西的底斯 (Thucydides)* 在描述雅典的瘟疫时指出：人们都知道那些从瘟疫中复原过来的人可以照顾瘟疫病人而不必惧怕再被传染。换句话说，他们获得了免疫力。此后的数个世纪，人们作了许多努力以期人为地诱发这种免疫状态，或者对疾病产生抵抗性，其中中国人习惯用吸入天花痂屑来预防这种疾病。此外，人们也用对健康人接种病损的物质的方法来防止疾病。这个过程就是所谓的“引痘” (variolation)。然而，只是到了詹纳尔 (Jenner) 才使得诱发免疫性的方法得到了革命性的改观。他在1798年的著名报道中记录了他如何接种牛痘而使得机体产生对天花的免疫性的，并由此派生出“疫苗”这一词汇。尔后的研究证明，注射有机体产物也可诱发对感染性疾病的免疫性。因此，1888年 von Behring 证实非致死性剂量的白喉毒素可以诱生对细菌的免疫性。正是基于毒素诱导的免疫研究导致1890年 von Behring 和 Kitasato 证明，在注射破伤风毒素后对破伤风产生免疫是由于血清中出现了某种可中和毒素的“因子”的结果。这种抗毒素活性还可以通过注射免疫动物的血清而传递给正常动物。因此表明机体能够通过产生血清成分而对感染性有机体或致病性物质作出反应。这些成分可和这些因子相结合，中和它

• 古希腊历史学家，公元前471? —400? 年。——译者注

们的作用。因而，这些成分被称之为“抗体”；而那些激发产生抗体的因子称之为“抗原”。自这些早期观察后的十余年，人们又证明了抗体能特异地溶解细菌（称之为溶菌作用），使之沉积，与之凝聚（使得它们结聚在一起）。此外还证明，抗体可不必抗细菌本身，而只须通过抗细菌毒素或抗非毒性的物质（如蛋白质）来产生。

抗体和抗原的反应吸引了许多著名科学家，如P.埃里克（Paul Ehrlich）等的注意，他第一个对抗毒素与毒素沉淀反应进行了定量的研究。伟大的物理化学家阿里纽斯（Arrhenius）也曾对免疫沉淀反应很感兴趣，并杜撰了“免疫化学”这一新词汇。他说道：

“我的演讲题目称为‘免疫化学’，希望在我的讲述中藉此词汇对物质间的化学反应展开讨论。这些物质是由于在动物血液中注射异体物质所产生的，也就是说通过免疫作用产生的。此外，对那些与它进行反应的物质，如蛋白质、酵素也须从化学特性上予以讨论。”

当然，我们当前的概念比早期免疫化学的概念更为广阔，但这一定义仍然适用于现代免疫化学的概念。用现代术语可以这样重申，免疫化学是有关抗体和抗原化学以及它们相互作用机制研究的科学。

因此，这些研究清楚地指出抗体在感染的免疫反应中的重要意义。然而，当着人们对这些血清抗体进行研究的过程中，1882年麦奇尼科夫（Elie Metchnikoff）获得证据并有力地支持吞噬作用（phagocytosis）的观点，即认为机体抵抗感染的主要防御功能是白细胞吞食微生物的作用。他的这一观点遭到了主张机体防御作用主要为抗体（体液）假说的支持者的激烈反对。事实上直到1903年，A.赖特（Almroth Wright）爵士的研究指出在实际上抗体促进了对细菌

的吞噬作用，这两个免疫假说才协调了起来。说明细胞和抗体都是机体对感染的有效反应所不可缺的。然而，本书的目的着重于对抗体性质和功能的探讨，这样做并不是说细胞介导的反应是无关紧要的。

虽然，正如上述所讨论的，在免疫动物血清中存在着抗体是19世纪后期认识到的。但直到1938年对它们的化学性质的知识才有显著的进展。这一时期Tiselius和Kabat证明抗血清的抗体活性是与血清中 γ -球蛋白组分相关联的。他们所应用的是Tiselius于1937年所创立的电泳技术。图1.1显示的便是高免疫抗白蛋白血清的电泳结果。从图中可看出 γ -球蛋白水平增高。此外还可看出相同血清在以抗原卵清蛋白沉淀而消除特异性抗体后的电泳图型。由此可以清楚看出用抗原特异性沉淀可除去大量的 γ -球蛋白，从而可得出如下结论，即卵清蛋白的抗体是 γ -球蛋白。现在把作为抗体的球蛋白称为免疫球蛋白（immunoglobulins）。从这些以及尔后研究所观察到的抗体的一个特点是：它们是异质性的（he-

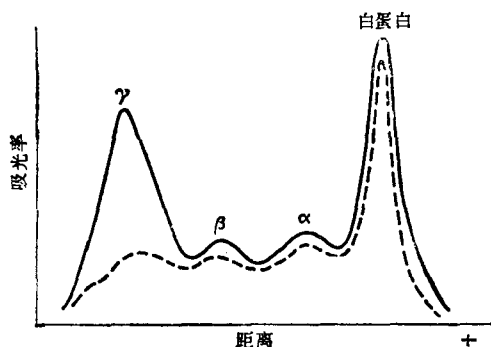


图1.1 以抗原进行抗卵清蛋白抗体作特异性沉淀前后的抗卵清蛋白抗血清的电泳。——抗原沉淀前的抗卵清蛋白；
——抗原沉淀后的抗卵清蛋白。【1】

terogeneity)。从电荷（以及氨基酸顺序）的角度看尤其是如此（图1.2）。

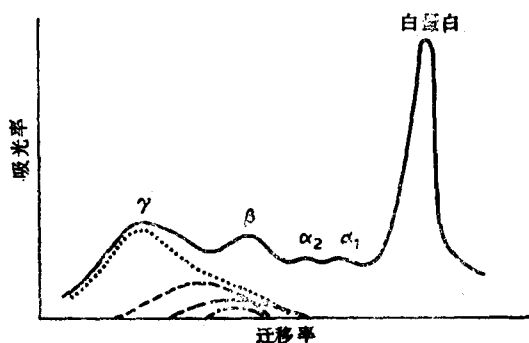


图1.2 各种类型免疫球蛋白的电泳迁移率。——全血清
IgG; ———, AgA; ——, IgM; - · - · -, IgD (仿照 [2])

作为这些观察的结果，愈来愈明显地看出，根据结构的差异而并不与它们对抗原特异性有关，可把免疫球蛋白分成不同的类型。在人类可以鉴别出5类免疫球蛋白，分别称之为免疫球蛋白G (IgG)、IgM、IgA、IgD和IgE。在其它物种中也存在相似的抗体分类。血清中最主要的免疫球蛋白是IgG，其分子量约为150,000；超速离心的沉降系数为7S。在本书以后的章节中还要详细叙述本类及其它种类免疫球蛋白的结构特征。

这种结构和功能的异质性使得抗体结构研究颇为困难。然而髓性白血病和巨球蛋白血症 (macroglobulinaemia) 患者的血和尿液中存在有均质性的免疫球蛋白，这就为研究免疫球蛋白结构提供了大量抗体的有用来源。这些抗体是形成抗体细胞瘤（骨髓瘤）的产物，称之为骨髓瘤蛋白。它们是从单种细胞（克隆）分泌的，因此这种肿瘤所产生的所

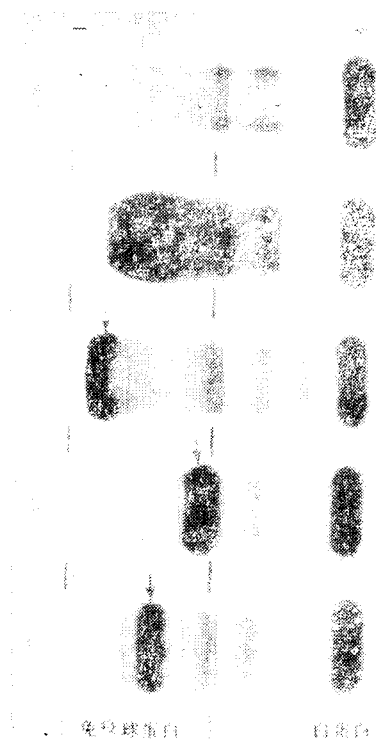


图1.3 5种人血清的醋酸纤维电泳。A为正常血清，B血清中多克隆，异质性抗体水平增高；血清C-E来自骨髓性白血病患者，呈现具有不同电泳迁移率的单克隆蛋白（箭头）（仿照 [2]）

有蛋白质都是均质性的，或是单克隆性的。图1.3例举正常人血清（A）、高免疫血清（B）和三个骨髓瘤患者的不同血清（C-E）的醋酸纤维电泳图。此外人们还获得了小鼠骨髓瘤，而且通过系列传代可连续提供均质抗体的来源。此外，长期以链球菌属或肺炎球菌强化免疫兔子，也可在一定比例

的动物中产生有限异质性的抗体，事实上其中有些也是单克隆性的（图1.4）。

新近，发展了一种技术^[4]，有可能产生无限量的均质性和单克隆的抗体，并且可特异性地抗任何所希望的抗原。这种单克隆抗体是由体细胞杂交（杂交瘤）所产生的，并对抗原分子上的单个抗原决定簇是特异性的。藉助这种方法现在已有可能产生足量的单克隆抗体以进行结构研究。关于本技术的详细内容以及它的潜在应用性将在第四章中予以叙述。

本书中将要讨论的有关抗体结构与功能的资料主要来自对以上叙述材料所得到的抗体的研究。

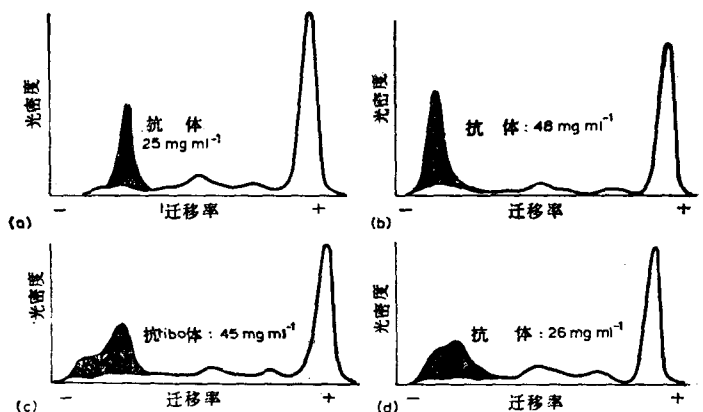


图1.4 C组链球菌免疫的兔子血清的醋酸纤维电泳。黑区表示可用C组糖类沉淀的抗体。图(a)和(b)，限制异质性的抗体，图(c)和(d)，异质性抗体（仿[3]，得到作者允许）。

第二章 免疫球蛋白和特异性抗体的

分离与纯化

2.1 血清抗体的诱导

当一个动物遭受感染或经人们有意地予以注射使之接受抗原时，它便产生抗体并在血清中呈现。为了研究这些高度异质性的蛋白质分子的化学和物理化学性质，需要分离和纯化一定的数量。然而，它们的大小、结构、电荷和生物活性的异质性都成为免疫化学家分离和纯化的一个棘手问题。

当然，在未免疫动物的血清中也存在有对抗原的广范围特异性的免疫球蛋白，但可用下述的技术进行分离。为了分离和研究特异性抗体，需要用适当的免疫程序来诱导这些高水平的抗原特异性免疫球蛋白分子。当动物经首次注射抗原，如破伤风类毒素时，在为期数天内其血中并不能检测出抗体。经过为期7—10天以后，才出现抗体，约于14—21天达高峰，之后其水平又复下降（图2.1）。抗原的这种首次反应称为初次抗体反应。如果经一定时期后，给予动物第二次注射抗原，则血中抗体水平在2—3天内开始升高，然后达到首次反应所达到的过高水平。这称之为第二次反应。这种加速反应是抗原对免疫系统形成抗体细胞刺激作用的结果，而这种免疫系统曾被以前抗原暴露所致敏了的。通常在第二次反应中高水平抗体可维持数周。一般，在初次反应中的抗体属于IgM类（超离心为19S），在第二次反应是IgG类（超速离心为7S）。因此，为了获得特异性抗体，至少需要注射抗原两次。然而，许多抗原在以盐水注射给予时，对抗体

反应的刺激是很微弱的，也就是说，它们是弱免疫原。这种弱免疫原性可以利用聚集抗原或者更经常地利用免疫佐剂加以克服。佐剂是这样的一些物质，当与抗原一起注射时，它们会增强抗体反应水平。现已知有许多佐剂（表2.1）。最广泛采用的是矿物油佐剂，它们既含有乳化剂，也含有油类。抗原以油包水形式注射可刺激持久的抗体反应。但达到这种反应的正确机制目前仍不清楚，可能与乳剂小滴中的抗原缓慢释放至动物机体有关（与长期连续注射少量抗原的情况颇为相似）。最熟知的这类佐剂为 Freund 的不完全佐剂和 Freund 的完全佐剂，它除了含有油剂之外还含有加热灭活的结核分枝杆菌。

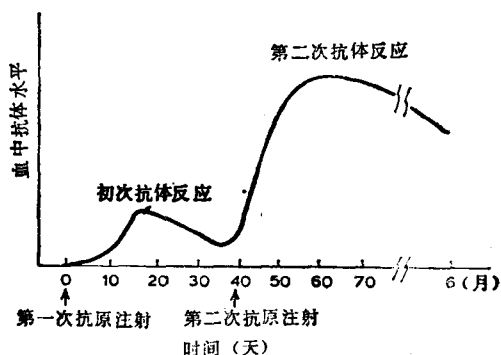


图2.1 初次和第二次的抗体反应。

为产生高水平的抗体，所应用的免疫方案将取决于许多因素，其中包括抗原剂量、佐剂的性质、感染途径（腹膜内、皮内、皮下等），以及动物的反应性。这一过程与其说是科学，不如说是一种“技艺”。然而，若已成功地诱导出适当的抗体水平，便可得到血清以及从血清的其它蛋白质中分离出特异性的抗体。

表2.1 常用的佐剂

油包水

Freund不完全佐剂

Freund完全佐剂

矿物油

氢氧化铝的抗原吸附

四胺盐

细菌

卡介苗 (BCG) 菌体

百日咳菌体

短小棒状杆菌菌体

细菌产物

内毒素

多核苷酸

多肌苷酸多-胞苷酸 (poly I-poly C)

2.2 免疫球蛋白的分离

对于免疫化学家来说, 值得庆幸的是免疫球蛋白为一类坚固的分子物质。它们可以经受各种不同的环境作用, 诸如 56℃加温、在室温下颇长时期的贮藏、经短期的高或低pH处理、甚至与去污剂或尿素接触, 它们仍保持其抗体活性。从其它胞浆蛋白(以及从它们相互间地)分离免疫球蛋白的方法的建立正是利用它们这些基本性质, 即在各种溶剂中的溶解度不同以及它们等电点相对高 (IgG的 pI = 5.8—7.3)。表2.2示出所应用的技术方法实例, 有关的详细资料可阅读参考文献〔1—5〕。仅用其中任何一种方法不能得到纯的

表2.2 分离免疫球蛋白的方法

方 法	实 例
分段沉淀	
(i) 中性盐	硫酸铵 硫酸钠 硫酸镁
(ii) 有机溶剂	乙醇
(iii) 金属离子	锌
(iv) 有机阳离子	利凡诺(乳酸-6,9-二氨基-2-乙氧基吡啶)
电泳分离	
(i) 无载体介质	自由界面电泳
(ii) 固体支持物	纤维素,丙酰胺, Pevikon淀粉凝胶区带电泳
(iii) 等电聚焦	液体介质—蔗糖梯度 凝胶介质—聚丙烯酰胺
离子交换层析	
(i) 阴离子交换器	氨乙基(AE—) 二乙氨乙基(DEAE—)和四氨乙基(QAE—) 纤维素,交联葡聚糖,琼脂糖
(ii) 阳离子交换器	羧甲基(CM—)纤维素,交联葡聚糖,琼脂糖
凝胶过滤	交联葡聚糖G-200,琼脂糖2B,4B,6B
制备超速离心	蔗糖密度梯度 盐梯度

免疫球蛋白制剂,须联合使用多种技术。

通常用分段沉淀技术从血清中得到一定浓度的免疫球蛋白。单纯的血清水透析所产生的不溶性球蛋白(epglo-bulin)和可溶性拟球蛋白(pseudoglobulin)组分可用作为

分离免疫球蛋白 (IgM) 的第一步。一百多年来, 人们已知道可用无机盐沉淀或分开蛋白质, 所使用的有硫酸铵、钠和镁。随着盐浓度的增加, 蛋白分子亲水性逐渐减弱, 尔后分子间的疏水反应将最终导致它们的沉淀。分段沉淀的基础在于不同的盐浓度下发生不同蛋白质沉淀这一事实。因此在某种硫酸铵浓度下 (例如1.2—1.8 mol/L), 免疫球蛋白沉淀了下来, 而其它蛋白质, 如白蛋白仍保留在溶液中。因此, 这一程序为分离免疫球蛋白提供了有用的第一步。进一步的纯化可以应用如表2.2所显示的其它技术来达到。现已有分离这5类免疫球蛋白 (IgG, IgA, IgM, IgE和IgD) 中任何一种的方法。这些方法可用来探讨不同种类分子间的化学与物理化学的差异。这些方法的实例列于表2.3, 但此表只是一种证例, 并不是说已十分完全。关于从人血浆标本中纯化IgG、IgM和IgA的方案则概括于图2.2。

2.3 特殊抗体的分离

分离纯抗体的一种最广泛使用的方法是利用免疫吸附剂进行亲和层析。在本质上, 这是将抗原偶联到固相颗粒而形成的一种抗原的固相形式。通常是把抗原共价地结合到诸如溴化氰激活的琼脂糖类的物质上。亲和层析的原理如图2.3所示。不纯的抗体与固相的抗原反应, 形成抗原-抗体复合物, 而所有未结合的物质都可被洗掉。由于抗体-抗原的相互反应是以非共价结合为基础的 (参阅第四章), 抗体复合物及其相应抗原可以相当容易地被诸如酸性缓冲液 (pH2.0)、稀释的氨或离液序列高的 (chaotropic) 试剂 (硫氰酸、溴化物或碘化物) 等因素所破坏, 从而产生纯的抗体制备物。当广泛采用这一技术时, 也确实存在有某些问题, 其中包括

因解离剂所引起的抗体变性，以及对抗原有最高亲和性（见第四章）的抗体事实上不易从免疫吸附剂洗脱下来的可能性。然而，这种技术确可为纯化特异性抗体提供一种方便的方法。

2.4 由杂交骨髓瘤（杂交瘤）

产生单克隆抗体

正如前面所讨论的，骨髓瘤为研究单克隆免疫球蛋白分子的结构提供了不可估量的来源。这些分子的主要局限性在于在大多数情况下我们不能真正知道针对抗体的抗原性质。

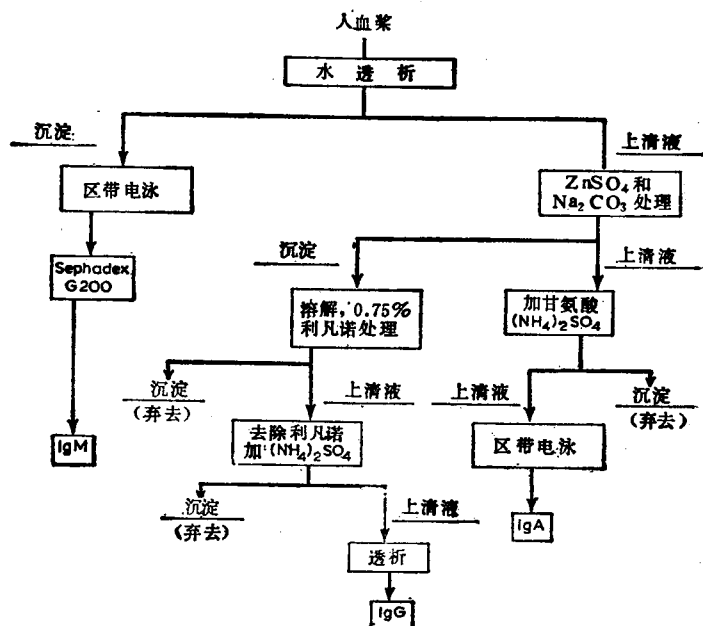


图2.2 从人血浆中纯化IgM, IgG和IgA
(仿[6], 得到原作者的同意)。