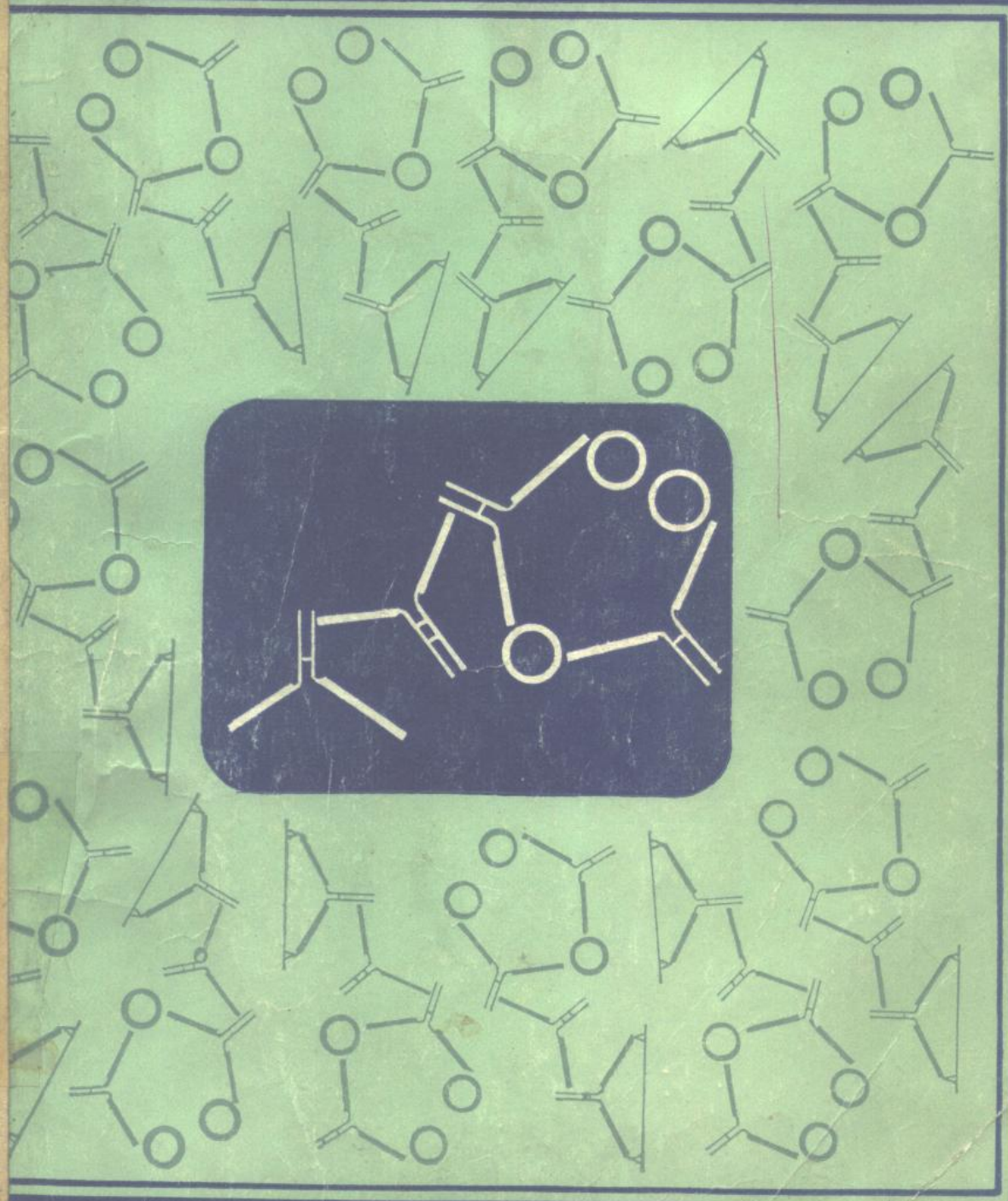


免疫细胞化学

〔美〕L. A. 斯顿伯格

原子能出版社



免疫细胞化学

L. A. 斯顿伯格

李元敏 洪松芳 余澄之 译

吴蔚 刘干中

审校

李元敏 程 违

原子能出版社

内 容 简 介

免疫细胞化学是近年发展起来的一门新的边缘学科。它将免疫学技术同组织病理学制片方法巧妙地结合在一起,因而能对组织细胞内致病的抗原进行显示和定位。免疫细胞化学技术的特异性强、灵敏度高、结果可靠,因此能够探索其他技术难以深入的领域。它对某些疾病的诊断和病因学研究,无疑是一个强有力的武器,从而打开了人们认识某些疾病的视野,并为某些疾病的防、诊、治,甚至一些疾病的分类,开辟了新的途径。

本书作者从事免疫细胞化学工作多年,继1974年第一版问世之后,又根据最新的发展改写成第二版。新版包括了该学科发展的简单回顾、有关的免疫学新知识、免疫细胞化学技术的基本原理、操作方法、注意事项和结果的讨论以及临床应用和发展前景等,内容丰富、材料新颖、附图清晰、参考文献完备。该书可供免疫学、病理学、生理学、生化学、细胞学等基础医学科、教学工作,以及内、外、神经、肿瘤、病理等科临床医生作参考。本书对国内正在或准备开展这方面工作的同志,无疑将是大有裨益的。

IMMUNOCYTOCHEMISTRY

(Second Edition)

Ludwig A. Sternberger

John Wiley & Sons, Inc., 1979

免疫细胞化学

L. A. 斯顿伯格

李元敏 洪松芳 余澄之 译

吴蔚 刘干中 审校
李元敏 程 违

原子能出版社出版

(北京2108信箱)

市政水泥制品厂印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行·新华书店经售

☆

开本787×1092 1/16·印张18·字数430千字

198 年 月 第一版·198 年 月 第一印刷

序 言

读者对《免疫细胞化学》第一版的热诚欢迎，促使我撰写这第二版。近年来有许多新的科研人员加入免疫细胞化学工作者的行列而使我倍受鼓舞。主要是由于他们的努力，致使现代免疫细胞化学技术能在其他技术发现之前作出贡献。1974年以前，免疫细胞化学技术通常只能验证其他方法所得的结果，而今，免疫细胞化学技术已经灵敏和可靠到了如此程度，它能深入到其他方法难以深入的一些研究领域。

在第二版中，我曾竭力掌握免疫细胞化学在增进了的可靠性方面的新动向。现在已没有必要编写一本主要论述方法学的书了。我们已经越来越能够做到关心结果，而不是方法了。由于免疫细胞化学的进步，使得所获成果中的多数都是令人振奋的。现今解剖学不再是一门静态的科学，而组织学已能从功能的角度来加以讨论。对这些组织功能的理解多数是靠在原位探查痕量抗原的相互作用而获得的。生物化学大多是研讨组织中诸组分的划分与分离，而免疫细胞化学则使人们可以形象地看到各个组分的原始关系，从而有助于将生化分离的产物与组织的结构和功能再综合起来分析。

对这些新的成果的讨论在本书中占了主要篇幅，然而也像第一版那样，仍旧强调了有关方法学的原理和结果。因此，尽管第一版的材料保留得很少，第二版几乎是完全重新撰写的，但是这个新版本的篇幅之长也还大约是第一版的两倍。

自从第一版于1974年问世以来，现代免疫细胞化学已能在需要高分辨力和高灵敏度的探索领域中得到多方面的应用。早先偶尔出现在免疫细胞化学技术中的一些神秘色彩现已得到消除。因而，有关方法学各章的许多材料都已能够在本版中以更为确信的态度来加以叙述了。现已无必要提示读者在组织标本制备中使用和缓的固定剂了，已越来越能用常规制作的组织标本进行免疫细胞化学染色。然而，免疫细胞化学方法能够得到其它免疫学方法所达不到的较高灵敏度，因而更要求证实其特异性。

像在第一版中一样，主要的免疫细胞化学操作程序仍叙述得足够详尽，因而读者在使用这些技术时就不必再去参考有关的原始文献了。

第一章是概论，讨论的范围包括作为发展免疫细胞化学方法及对这些方法以“原位免疫学”而加以应用的基础的免疫学基本原理。第二章至第五章涉及到免疫细胞化学方法本身。第六章至第十章讨论了免疫细胞化学贡献卓著的那些生物学和临床科学诸领域。本书作为整体来看是以这种方式撰写的，即不需要读者预先已有免疫学的知识。

正文中相互参照的地方是较多的。这主要是打算帮助那些浏览本书的或只选读某一专题而无需阅读其余各章的读者。

希望本书能对那些由于免疫细胞化学能在他们的工作中得以应用，从而也受到激励的人们作为一部入门的教科书，也希望本书能成为该领域中有经验的科学家的一本手头参考书。

Ludwig A. Sternberger

(李元敏 译)

目 录

第一章 免疫球蛋白结构; 免疫细胞化学概论	1
4-链免疫球蛋白单体的共同特性	2
免疫球蛋白 G	4
免疫球蛋白的区	7
同种异型	7
个体基因型	7
抗体的初级功能; 特异抗原结合	9
沉淀素反应	10
放射免疫测定	11
免疫球蛋白种类和抗体的二次生物学功能	14
补体	15
抗体的纯化	17
参考文献	18
第二章 免疫荧光法	20
抗体与荧光素异硫氰酸酯的结合; 原理	23
荧光素异硫氰酸酯-免疫球蛋白轭合物 (FITC-Ig) 的制备; 操作步骤	25
纯化抗体的结合	26
组织切片的制备	26
染色次序	33
显微镜观察和照像	38
特异性	39
对照	43
定量免疫荧光法	44
参考文献	46
第三章 免疫铁蛋白和免疫胶体法	49
铁蛋白与免疫球蛋白的结合; 原理	51
铁蛋白与免疫球蛋白的结合; 技术	54
染色	55
细胞膜的流动性	57
免疫铁蛋白染色的解释	58
免疫胶体法	60
杂交抗体法	61
染色	63
参考文献	65
第四章 酶标抗体	67
过氧化物酶与免疫球蛋白的一步结合法; 原理	69
过氧化物酶与免疫球蛋白的一步结合法; 操作步骤	73
过氧化物酶与免疫球蛋白的二步结合法; 原理	73
过氧化物酶与免疫球蛋白的二步结合法; 操作步骤	75
过碘酸结合法; 原理	76

过碘酸结合法:操作步骤	76
灵敏度	76
特异性	78
染色	79
酶标抗体方法学的改进与结合物对细胞的穿透力	81
参考文献	82
第五章 不标记抗体过氧化物酶-抗过氧化物酶(PAP)法	86
可溶性PAP复合物的制备	90
PAP的性质	93
灵敏度	95
方法特异性	98
为光学显微镜观察所做的染色	101
在同一张切片上用颜色对比染两种抗原	107
为电镜观察而做的包埋后染色	108
为电镜观察而做的包埋前染色	118
分辨力	121
抗体特异性	122
PAP复合物的鉴定	126
背景的鉴定	127
免疫细胞化学反应的可逆性	128
定量免疫细胞化学	130
不标记抗体PAP法的变法	133
参考文献	136
第六章 免疫应答与表面免疫细胞化学	143
B细胞与T细胞的共同功能	146
B细胞的特有功能	148
B细胞记忆	150
B细胞耐受	151
T细胞的特有功能	152
A细胞的特有功能	154
K细胞的特有功能	155
B细胞的分化	155
记忆T细胞	158
抑制T细胞:T细胞耐受	158
淋巴细胞在脾脏和淋巴结中的分布	159
参考文献	159
第七章 神经细胞化学	163
神经元特异蛋白质	164
神经胶质特异蛋白质	167
神经轴突	172
氨基能神经递质	173
肽能神经递质	179
催产素和加压素	181
黄体化激素释放激素	191

生长抑素	197
促甲状腺素释放激素	199
P 物质和脑啡肽	201
神经系统中的胃肠肽	204
前激素	205
神经系统中的垂体激素	208
参考文献	208
第八章 细胞内分泌学	219
垂体	219
下颌下腺	228
胃肠肽	228
胰腺	229
激素受体	231
参考文献	242
第九章 外科免疫细胞化学和回顾性病理学	245
垂体腺瘤	247
神经胶质瘤	248
神经内分泌程序化细胞的增生	248
淋巴瘤	249
外周血白细胞	255
结合铁的蛋白	258
卵黄囊肿瘤和肝癌	259
胚胎性癌抗原	260
前列腺肿瘤	261
家族性自主神经机能异常	261
参考文献	264
第十章 自身免疫病	267
T 抑制细胞的缺陷	268
个体基因型抗体	269
致病性	269
肾小球性肾炎	270
古德帕斯彻氏综合征	271
免疫复合病	272
自身免疫性甲状腺炎	273
胃的自身免疫性	274
红斑狼疮	274
免疫性皮肤病	276
自身免疫性肝病	276
溃疡性结肠炎	277
重症肌无力	277
多发性硬化	278
参考文献	279

第一章 免疫球蛋白结构：免疫细胞化学概论

抗体属于被称为免疫球蛋白的一类蛋白质。每种抗体的特征是它具有与某一特异的抗原决定簇发生特异性结合的能力，而与无关抗原的决定簇则不能结合。结合的特异性依赖于抗体免疫球蛋白的抗原结合部位的氨基酸的性质及其排列顺序。来源于不同细胞的抗体在它们的结合部位的氨基酸具有无穷的易变性。由于这种易变性，使得不同的抗体能够在显然是不可计数的不同抗原中进行鉴别。

然而，氨基酸的易变性并不只限于抗体的特异性结合部位，而是扩展到整个免疫球蛋白分子上的，只不过易变的程度较小罢了。因此，氨基酸顺序的可变性是所有免疫球蛋白的特征。事实上，免疫球蛋白只是由于它的抗体功能才在当初被认为是一类具有特征性的物质。因此，每一种抗体，至少就我们从免疫的动物血清中所获得的抗体来说，都是一种免疫球蛋白，然而这并不排除在抗体分子中的某一段氨基酸顺序不能参与形成与抗体功能不同的其他蛋白质的可能性。

尽管氨基酸顺序中具有易变性，但免疫球蛋白，至少是存在于血清中的那些免疫球蛋白，都具有某些共同的结构特点。所有的免疫球蛋白都具有相似的肽链组合。基本上每个免疫球蛋白都是由单体或四个肽的低聚物所组成的。这四个肽中，两个是相同的轻链，另两个是相同的重链。这一发现已经成为是具有特征性的，以致某些能与抗原决定簇发生特异性反应并存在于某些种类的淋巴细胞中的物质（145及155页）却不能被称为“抗体”，因为它们不能满足这种基本的4链结构的要求。

免疫球蛋白中特异性结合部位的结构易变性决定着对于单个抗原的选择，而分子中其余部位的易变性则对许多其它次级功能来说却是重要的，如宿主对抗非特异性抗原抗体作用时的外来物质所产生的免疫应答中的其他功能，这些次级功能大多数决定着对于抗原的处置，即一旦抗体与抗原结合后宿主对该抗原发生反应的方式。有趣的是，在进化过程中，这些功能和特异性抗原的结合作用已经合并在一个单个的分子（免疫球蛋白分子）之中了。抗体的次级免疫功能导致它与宿主防御机制中的其它效应物相结合（经过配体或受体的相互作用）。单个免疫球蛋白分子中兼有特异性抗体结合及效应物结合的两种反应性，就使抗体有可能赋予抗原具有使宿主能明确识别应被排除的物质的性质。免疫球蛋白结合抗原的能力及其次级功能是由不同的基因所决定的^[1]，这些基因在单个染色体区中是互相连接着的，这就意味着它们具有一个共同的进化谱系。实际上，免疫球蛋白在进化中是起源较晚的，它只见于脊椎动物中。甚至在脊椎动物中大量循环性免疫球蛋白的存在还只是温血动物的特征。较低等的脊椎动物虽含有较少量的循环性免疫球蛋白，但它们的免疫应答，尽管是特异性的，仍绝大部分都是靠细胞性的反应（没有抗体分泌证据的免疫特异性反应）。

高度的易变性不仅是免疫球蛋白所具有的独特现象，这是完全可以想像得到的。人们可以推测，其它的蛋白质，例如神经元特异性的蛋白质或肽（164页），也可能具有相似的遗传易变性。然而，淋巴细胞可能受到特异抗原的刺激而复制和分化。例如，由单个细胞所能产生的抗体量是极少的，而由单个细胞祖先所衍生出来的亿万个细胞组成的克隆就能产生出可被测量到的抗体量。这种细胞游离于循环系统或网状内皮系统的间隙中，因此它们的产物即

见于循环之中，从而易于得到以进行研究。然而，任何脑特异性蛋白质的量要受到不发生复制的特异性神经元有限数目的限制。免疫球蛋白是较为稳定的蛋白质，便于在实验室内处理：特异性抗体结合部位并不从免疫球蛋白分子中与非特异性的次级免疫功能有关的那些部分分离开来。某些起源于神经元的蛋白质显然容易断裂而成为效应物，例如由激素原变为激素。激素原可能不太稳定以致难于对其进行研究（205页）。

因而，免疫球蛋白显然具有三个独特的性质而有助于对它们的探查。

1. 能在给予特异性的抗原(免疫作用)后通过诱发单个细胞分化按照需要而大量产生。
2. 存在于循环系统之中。
3. 比较稳定。

由于与特异性抗原决定簇发生反应时抗体所具有的这些性质及特异性，人们对免疫球蛋白的兴趣便已从研究免疫现象时的重要物质扩展到将它当作实验试剂，而在超出免疫学以外的领域中使用了。

这种应用之一是用抗体来检测体液、提取物和培养物中的抗原。这种检测已成为医学领域中的重要诊断手段。它业已成为内分泌学中一种主要的工具。

另一方面的应用是在原位的细胞和组织内研究特异性的物质，即在不需预先提取、分级分离并希望没有出现移位的情况下来进行研究的。这就是免疫细胞化学的领域。抗体被用作试剂在光学显微镜和电子显微镜下检测处于正常环境中的特异组织成分。免疫细胞化学是应用生物化学方法的一门解剖科学。

生物化学中的大部分数据都是由细胞和组织分离出来的成分中获得的。纯度是必要的。一旦化合物被分离出来，就有可能在体外建立一个含有对某种特异功能来说所需要的各种组成部分的体外体系来获得有关它们的功能的知识。〔含有分离出来的成分的这样一个体系的例子是标记的雌二醇含有内质网的子宫内膜胞质液，以及氯化钾的混合物（pH7.8）。这一体系能通过用梯度沉降法研究4S雌激素受体转变为5S型而加以分析。对分离出来的染色质中加入5S型而不是4S型导致它与细胞核部分相结合。从这种离体模型可推论5S受体型的结合是激素在体内作用后引向核RNA合成的起始步骤^[2]。〕

免疫细胞化学方法中也需要生物化学的分离方法，因为用来通过免疫作用制备特异性抗体的抗原必须是纯化的。然而，并不像在生物化学中那样，有关分离出来的成分的知识常常是通过一个离体的含有最少必需的成分的体系综合而成的，免疫细胞化学方法则仅仅是利用分离出的成分来产生和测试特异性的抗体，但通过利用它们直接观察处于不同生理条件下的整体组织而将所获得的资料综合起来（举例来说，与合成的十肽，即黄体化激素释放激素的各种抗原决定簇发生反应的许多抗血清，能被用来对下视丘内侧基底部和视前区的石蜡切片进行染色。所有的抗血清均使神经纤维染色，但只有其中一部分能染出细胞体来，说明黄体生成激素释放激素的一些决定簇是隐蔽在细胞体内的，从而推测，当进行轴突性传递时，一种细胞体的前激素便被活化而成十肽^[3, 4]）。

4-链免疫球蛋白单体的共同特性

抗体的特异性乃是由于在免疫过程中选择在其特异性结合部位中含有对于该抗原决定簇具有高度结合亲和力的独特的氨基酸顺序的那种类型的免疫球蛋白。这种选择作用是可能的，因为预先就已存在有大量不同结构的特异性结合部位，免疫球蛋白的结合部位是在免疫

球蛋白分子的易变区，即在免疫活性细胞不同的克隆中，每一克隆产生一种在这个区域具有特征性氨基酸顺序的免疫球蛋白。一个宿主能对数目极为众多的不同抗原的决定簇产生应答，这个数目也就是它所具有的免疫活性细胞类型的数目。当免疫球蛋白与一特异性抗原决定簇结合时，可能只有易变区中的某些氨基酸与之发生直接接触。这些氨基酸从任何一个免疫球蛋白分子到另一个免疫球蛋白分子之间有着极高频率的变异：它们在免疫球蛋白肽链结构中的部位就是超变区^[5,6]。

易变区是免疫球蛋白分子中最具特征性的部分。它们的功能对免疫细胞化学反应的特异性来说是必不可少的。免疫球蛋白分子的其余部分对于模制它的单个肽链成为一个结构单位来说，以及对于抗体在细胞内或细胞上或在循环系统中与抗原发生反应之前或反应后的次级免疫功能来说都是必需的。这些次级功能包括免疫球蛋白的输运、对抗原的免疫排除作用和细胞毒性作用。次级功能常常提供对用免疫细胞化学方法从染色的病理组织所得到的观察结果进行解释的机制。免疫球蛋白中引起次级功能的结构特性也被广泛用于各种免疫细胞化学方法中，这将在后面加以讨论。次级免疫功能取决于免疫球蛋白分子中较为恒定的氨基酸顺序。具有不同特异性的各种抗体，在它们的恒定区中可含有相同的氨基酸顺序。恒定区顺序的性质决定着一种免疫球蛋白可以行使的次级功能的种类。这种顺序与特异性的结合无关，所谓氨基酸顺序的恒定性只是意味着不管免疫球蛋白与抗原决定簇结合的特异性如何，免疫球蛋白的组成总是不变的。然而，的确存在有可由一个脊椎动物产生的大量的不同恒定区顺序。这些变异中，有些决定着独特的次级功能的性质，而其它的可能就不具备特殊的生物学功能了。通常，在决定次级功能差异的恒定区氨基酸组成上的差别是广泛的。恒定区是免疫球蛋白分子所属的不同类别的特征。不同类别的免疫球蛋白可以比较容易地用层析法分离开来。人的十类免疫球蛋白（称为IgG1,2,3和4；IgM1和2；IgA1和2；IgD和IgE）可以根据重链， γ 1,2,3和4； μ 1和2； α 1和2， δ 和 ϵ 来加以鉴别。轻链不是 κ 型就是 λ 型，或它们的亚型。在任何一个免疫球蛋白单体中，两个相同的轻链与两个相同的重链相连接。因此，重链是决定免疫球蛋白的类别性质的，而轻链，在任何一类中只有一种或二种^[7,8]。尽管每一类别所特有的重链和每一种轻链的氨基酸组成都具有相对的恒定性，但仍在轻链或重链的某些位点上有由遗传所决定的具有等位基特性的单个氨基酸的改变：这样所决定的组成上的差别就称为同种异型（7页）。

当单一类别的抗体由抗血清通过层析法纯化，并且当具有特异范围的抗原反应性的抗体通过与特异性抗原反应（17页）而由这一部分分离出来时，所得到的物质在组成上和用电泳法检测时都仍是异质性的。这种异质性是由于这一事实所造成的，即在进行免疫时抗原上的每个决定簇都从可利用的库（145页）中选择出许多样式的易变区的构型的抗体，形成许多与决定簇的不同部分以不同程度的亲和性起反应并在超变区中有不同氨基酸组成的抗体。这种异质性的抗体不宜用来研究抗体的特异抗原结合部位的氨基酸顺序。已对阐明免疫球蛋白的结构做出巨大贡献的匀质性抗体，乃是由于起源于一些识别单个抗原的产生抗体的单克隆细胞。可由抗体产生细胞的单克隆瘤细胞（浆细胞瘤、多发性骨髓瘤）提供大量的这种抗体，并和可由半固体培养基上的培养物中的单个抗体产生细胞所邻近的环境介质中得到少量的这种抗体。具有有限异质性的抗体偶尔也可以从超免疫血清纯化而得。这种超免疫血清是用含有有规律地重复出现的相同氨基酸顺序的抗原（例如脂多糖、烟叶花草病毒或链球菌糖类^[9]）进行免疫而获得的。

在回到关于抗体结构与抗原功能之间关系的一般性讨论之前，让我们来讨论一个典型的

免疫球蛋白单体(例如IgG)中各链的氨基酸组成以及它们在该单体中互相连接的方式。

免疫球蛋白G

用大多数抗原进行超免疫作用后所得到的大量抗体均属于免疫球蛋白G(IgG)类。在pH8.6时IgG是各种血清蛋白中电泳泳动度最缓慢的。这一性质及其在低离子强度下的低溶解度均有助于使它通过二乙氨基纤维素柱(pH6.5—8.0),在0.005—0.02M的磷酸缓冲液中方便地将其分离出来。在这些情况下,IgG的大部便从柱上被洗脱下来(用起始缓冲液和一种输送铁的血清蛋白——触珠蛋白一起被洗脱),而其余的血清蛋白和其它类别的免疫球蛋白以及部分的IgG则仍留在柱上。IgG的分子量在145000和156000之间。它特殊的Y形(图1-1)是通过降解研究而提出的,并由电镜观察所证实(图1-2)。它们具有四个N-末端氨基酸(有时有被掩盖的氨基)。除了链内赖氨酸的氨基外还存在有4个游离氨基的事实是表明该分子乃是由4条肽链所组成的指征之一。当用木瓜酶消化时可得到一个结晶状的匀质性被称做Fc的同类片段和两个Fab片段。如果Fab是从血清的IgG部分获得的,那么在电泳检查时便是异质性的,而当得自骨髓瘤患者的IgG时则是匀质性的。

由于来自任何单个IgG分子的两个Fab片段都是相同的,所以两个特异结合部位也是相同的。每个Fab片段都含有一个对于抗原具有特异性的结合部位。Fab可阻断抗原与天然抗体的反应,并竞争地抑制在抗原与天然抗体发生反应时所观察到的二级现象。在免疫细胞化学中,Fab已被用作一种特异性的阻断剂。

用木瓜酶将IgG裂解成为三个片段是由于这种半胱氨酸活化酶首先攻击IgG的铰链区的缘故。这个区域有着不寻常的柔韧性。它可使两个Fab片段所形成的夹角有一定的自由度,至少在单个平面上是如此。结果,两个抗原结合部位之间的距离就可有变化了,而且一个抗体便可能与两个邻近而相同的抗原决定簇发生结合,即使当两个决定簇之间的距离与两个Fab部分之间的夹角最大时的距离并不完全相同时也可以结合。因此,当相同的抗原决定簇被固定于组织内或附着在具有高密度的细胞膜或亚细胞膜上,并用抗体作为一种免疫细胞化学试剂时,抗体通过其两个结合区而与抗原结合的几率是高的。因而,只有当两个结合部位同时发生解离时,才有可能将已结合的抗体除去。于是抗体的亲和力就大为增加,这是赋予免疫细胞化学方法灵敏度的因素之一(124, 128和232页)。

当存在有使氢键断裂因子(如尿素)时的轻度还原作用将IgG分裂成两个相同的轻链(L)(每链约含214个氨基酸)和两个相同的重链(每链约含446个氨基酸)。L链和H链都有可变的N-末端区和恒定的C-末端区。L链只是Fab片段的一部分,而不是Fc片段的一部分。每个L链都在其C末端的或处于H链的倒数第2个氨基酸以单个硫氢键相连接。将分离出来的L链和H链加以乙酰化,当它们在混合时仍能重新组合在一起。因此,当在还原后用凝胶过滤法分离L链和H链时必须要有尿素或丙酮存在。L链和H链的非共价键结合是由于它们的氨基酸顺序是相当同源的。这种同源包括恒定区以及易变区。例如让得自抗A(针对A的抗体)的和抗B的L链和H链在单个混合液中重新结合时,来自抗A的L链很可能与抗A的H链相结合,而来自抗B的L链与抗B的H链相结合。

Fc片段含有H链的C-末端部分,它是恒定的,因而Fc的结晶性质也是恒定的,即使取自非匀质的部分IgG时也是如此。铰链区的硫氢键使两个重链相连接。这种键的数目依免疫球蛋白的种类而异。通常是2个,但也可能是1至4个。而IgE是例外,它可能有5至15

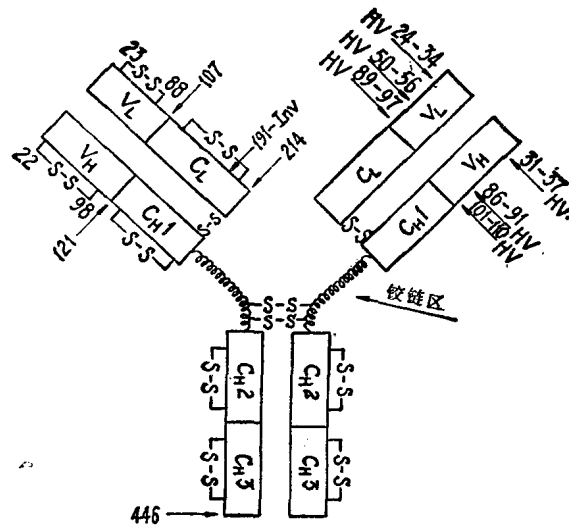


图1-1 骨髓瘤患者免疫球蛋白G的完整的氨基酸顺序是首先由Edelman及其同事^[1]报道的。两个相同的轻链(L)通过单个硫氢键与重(H)链靠近N-末端的那一半相连接。H链的恒定区(C_{H1}, C_{H2}, C_{H3})决定免疫球蛋白所属的类别(图中示人的IgG)。不论轻链存在于哪一类免疫球蛋白中,它们不是κ型就是λ型。对大量κ链进行氨基酸顺序分析的结果表明,除了Inv遗传性标志(在191的位置)以外,它们的恒定(C_L)区都是相同的。如果我们不考虑超变区(HV)中氨基酸位置24—34, 50—56和89—97,那么就可将人κ链的易变区(V_L)根据氨基酸的组成进而再分为三个亚组。不同的κ亚组总是与κ型,而不与λ型C区连接。然而,每个亚组它都可能与C_L区的等位基因型中的任何一个相连接,这表明至少有两个基因控制着单个多肽链的合成。有趣的是,分化成亚组(3κ和5λ亚组)的现象显然在进化程度较低的哺乳动物就已出现了,因为人κ链各亚组间氨基酸组成方面的差异并没有超过人和小鼠的基本κ链顺序之间的差别。轻链的超变区(HV)限于氨基酸24—34, 50—56和89—97。超变性决定着免疫球蛋白与抗原反应时L链对免疫球蛋白分子的特异性所起的作用。氨基酸23和88是通过链内硫氢键的连接而使它们并列在一起的。因而使超变区(24—34和89—97)互相靠近显然能保证与一个较小的抗原决定簇并列^[6, 8]。在IgG中重(γ)链的恒定区可被分成三个区(C_{H1}, C_{H2}和C_{H3}),三个区中的每一个区显然都能行使特异的次级功能(与抗体的一级抗原结合功能的特异性无关)。因此,补体看来像是被结合在C_{H2}区的。C_{H2}也是作为IgG结构的一部分的糖类的附着部位。根据易变区氨基酸组成的不同而不是根据超变区中的组成,将H链分成亚组。显然,H链的任何亚组都能与已知的10类免疫球蛋白重链的任何一类相结合。而链内的氢硫桥使H-链氨基酸22和98互相靠近。结果,超变区中氨基酸31—37, 86—91和101—110三个区便被集中在一起,从而显然保证它们能在发生特异性反应时与较小的抗原决定簇直接接触。L和H链的再结合研究表明,两个链都参与抗原的特异结合。

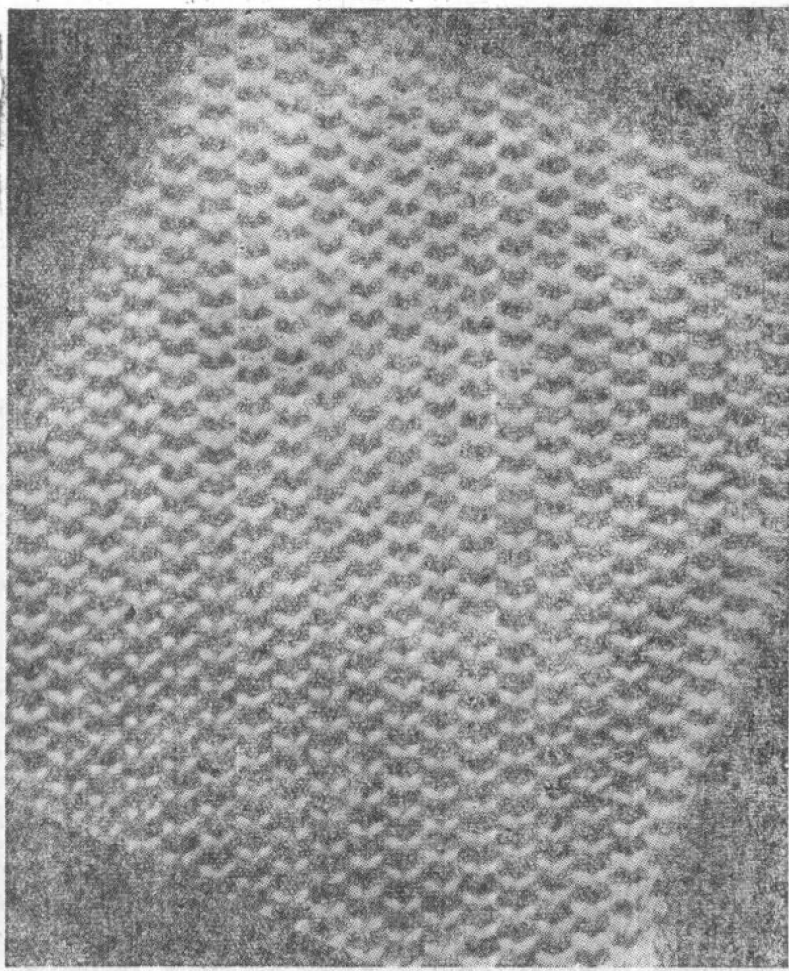


图1-2 在冷却过程中自发地形成结晶的骨髓瘤患者IgG的结构已用X射线结晶学和电镜阴性染色法进行了研究。为了去除高分辨率电镜的噪音，将原显微照相在印像纸上进行多次曝光。在每次曝光之后将像纸以和晶体周期相等的距离在晶体周期方向上移动一次。然后再在与周期不同的方向上重复这一程序。（引自 Labaw and Davies⁽¹¹⁾）

个，由此表明仍有未确定的亚类。

用胃酶进行有限性的消化时，使IgG的Fc部分断裂而Fab部分和铰链区仍保持完整。最后所得到的 $F(ab')_2$ 片段（图3-8）含有两个特异性的抗体结合部位，它们仍以硫氢键呈共价的结合。即使在没有使氢键发生键断裂的因子时，也可通过轻度还原作用从 $F(ab')_2$ 中得到只有一个特异性结合部位的片段（ Fab' ），因为两个H链仅仅是以一小段的氨基酸顺序而结合在一起的。当再氧化时 $F(ab')_2$ 便得到重组。由于连接是在H链的恒定区，所以具有不同抗体特异性的 Fab' 片段可重新组合在一起。通过这种办法所获得的具有双重特异性的抗体已被推荐用于免疫细胞化学中（62页）。

免疫球蛋白的区

X射线结晶学分析和有限的蛋白水解的结果表明,免疫球蛋白链折叠成由较为暴露的部位互相连接而成的球状区^[9,10]。轻链有两个区(一个区含有易变区 V_L ,另一个区含有恒定区 C_L ,图1-1);重链则有4个区(V_H , C_{H1} , C_{H2} 和 C_{H3}),而 μ 和 ϵ 链却都还含有一个第5区(C_{H4})。球状结构是由链内的硫氢键所造成的,这种键在每个区中将大约60至70个氨基酸残基连接在一起^[5,6]。每个区本身含有大约110个氨基酸。有趣的是,在重链类和轻链型相同的每个免疫球蛋白(如IgG1K)中,4个稳定区(C_L , C_{H1} , C_{H2} 和 C_{H3})中的2个都含有大约30%的同源氨基酸。这说明它们各自的整个链都是由一个共同的较小的蛋白质通过基因复制而进化演变来的。事实上,一个与IgG的 C_{H3} 区具有高度同源性的含有100个氨基酸的多肽(β_2 微球蛋白),已从人血清中分离了出来。这种蛋白质也存在于淋巴细胞的表面上并可能与主要的组织相容性抗原(154页)有关。因此,虽然它明显地不具有抗体能力,但它仍与免疫机制有关,这使人联想到不具备循环免疫球蛋白的无脊椎动物所表现出来的非特异免疫应答;而且它也可能并不是与许多参与脊椎动物的抗体形成和细胞免疫应答的特异性的和非特异性的非免疫球蛋白物质无关的(14和154页)。

同种异型

以氨基酸取代形式的基因标志在轻链和重链上均存在(如Km3代表K链上同种异型3,或Gm14代表在Y3链上的同种异型14)。它们是遗传性的标志,是每个个体的特征。一个杂合子个体在循环系统免疫球蛋白中可能或不能表现出他的两个等位标志。通过形成免疫球蛋白的某个亚类(如IgG1, IgG2, IgG3和IgG4)来应答抗原刺激的能力是一种遗传特异的,而在这种情况下是与Gm基因相联系的。不仅如此,缺少某些同种基因性标志可能不仅限制了一个个体对抗原刺激应答时所产生的免疫球蛋白的亚类,而且也限制了抗体本身的特异性。同样,某些抗体的特异性也主要见于抗体的一个亚类中,例如,抗破伤风毒素在IgG1中。用破伤风毒素进行免疫时能够获得成功是和存在有同种基因型标志Glm3有关的。这些发现支持了这一见解,即抗体的特异性是在遗传上预先就决定好了的,而免疫作用乃是由于对某种抗体产生的放大作用,这种抗体只不过是预先就已决定好了的贮存库中选择出来的罢了(143页)。

个体基因型

当我们用一个种系的小鼠的免疫球蛋白来免疫另一种系的小鼠时,便可获得针对同种异型决定簇的抗体。然而,如果用来源于同一种系小鼠的免疫球蛋白进行免疫,我们就往往不能获得抗体。因为动物在正常情况下对它们自身的抗原决定簇具有免疫耐受性(151和158页)。一种匀质性的免疫球蛋白,例如BALB/c骨髓瘤IgA S63,在它的超变区具有独特的氨基酸顺序;正常BALB/c小鼠充其量在它们全部异质性免疫球蛋白中也只不过含有微量的这种特殊的超变顺序而已。这种顺序的量可远远低于诱导免疫耐受力的阈值量。因此,当用蛋白质S63免疫正常BALB/c小鼠时其耐受力便遭到破坏而形成抗体。这些抗体对蛋白

质S63的超变区是具有特异性的。对抗免疫球蛋白超变区的抗体被 Nisonoff^[12]称为个体基因型的抗体。

IgA S63对磷酸胆碱具有抗体特异性。如果抗血清是由通过用这种蛋白免疫同种异型种系小鼠而产生的，那么便可在用不溶性蛋白质S129吸收之后被鉴定出个体基因型抗体来。这种不溶性蛋白S129是由具有抗二硝基苯酚反应性的BALB/c小鼠所取得的一种骨髓瘤IgA。

个体基因型的抗体也能在异种动物中产生。蛋白质315是具有抗2,4-二硝基苯酚特异性的小鼠骨髓瘤IgA。为了从经蛋白质315免疫的家兔中获得个体基因型抗体，首先用具有不同特异性的小鼠骨髓瘤IgA来吸收抗血清。然后用与N-溴乙酰-N'-2,4-二硝基苯乙二胺反应过的蛋白质315来再吸收抗血清。这种化合物是一种亲和标记，它与蛋白质315的结合部位起免疫学特异反应并与结合部位之中或其附近的赖氨酸形成共价键，从而将这些结合部位掩蔽起来。因此，用亲和标记的蛋白质315来吸收兔抗血清时，除了针对某些处于特异性结合部位之中或其附近的一些抗原决定簇的抗体以外，针对其它所有的抗原决定簇的抗体均被除掉了。于是经过吸收的抗血清就成为个体基因型的了。个体基因型抗体与蛋白质315的反应可被2,4-二硝基苯酚以及类似的配体所抑制，这说明个体基因型抗体的确是对蛋白质315的特异结合部位具有特异性的。

Sher等^[13]指出，蛋白质107（一种BALB/c小鼠骨髓瘤抗磷酸胆碱IgA）可与经蛋白质S63免疫而产生的个体基因型抗体反应。然而，在这种情况下，反应并不因磷酸胆碱的存在而发生改变。推测该抗体不是真正个体基因型的，而是对发生肿瘤S63和S107时出现的IgA中一种不常见的亚型（正常BALB/c小鼠中含量较少）具有特异性的抗体。

与特异的小鼠骨髓瘤球蛋白发生反应的个体基因型抗体和对取自不同种系小鼠的同一种抗原具有特异性的骨髓瘤球蛋白发生交叉反应的程度较低。这一结果指出，个体基因型的特异性可对免疫球蛋白多肽链的易变区提供遗传标志。

Kindt等^[14]用以C组链球菌的糖类进行超免疫的家兔所分离的匀质性免疫球蛋白作为抗原对同种异体繁殖的兔进行免疫以产生抗血清。他们用这个方法对个体基因型决定簇的遗传链锁进行了测试。大部分用C组抗原免疫过的有家族关系的兔中都产生了具有交叉反应性的个体基因型，而只有极少数无家族关系的兔产生了个体基因型。不但如此，在有关家族关系的兔中，个体基因型优先表现于重链易变区中具有共同的同种异体型标志的那些兔中。这些资料阐明了个体基因型的遗传链锁，因而，再次说明已知的抗体特异性是由遗传所决定的。

两种带有相同的个体基因型决定簇的匀质性抗体已由用C组糖类进行超免疫的单个家兔分离出来，二者都与一个不同的V_H区同种异体型联接^[14]。因为超变区（即个体基因型决定簇区）是相间地排列于V_H氨基酸顺序的很多位点的间隙中（见图1-1的说明），而不是与V_H同种异体型标志呈头尾衔接排列的，由两种链（个体基因型和同种异体型）提供，当装配多肽链时就插入其中了。这种情况支持在翻译来自两种不同基因的信息时所发生的中断、混杂或移位等现象，这是和翻译单个顺序时不同的^[14]。

偶尔，多发性骨髓瘤蛋白质是双克隆的（即产生两类匀质性免疫球蛋白，例如IgG2κ和IgAκ，κ表示与决定类别的重链相连的轻链）。已经发现这样的双克隆免疫球蛋白具有相同的个体基因型决定簇^[15, 16]，这再次提示一种免疫球蛋白肽链可能是在两个基因控制下合成的。这一发现也支持了在抗体形成中有类别变动（156页）和抗体形成时的类别变动，以及

抗体形成细胞发生克隆分化时的基因开关变化仍能保持当类别变动时个体基因型不变的观点。

经长期免疫之后形成的针对个体基因型决定簇的抗体可能通过对其抗原受体的作用而特异性地抑制或者调节免疫应答(146页)^[17]。它也可能为自家免疫性疾病的发生提供了一种发病机制(270页)。

抗体的初级功能：特异抗原结合

半抗原是一种无免疫原性的,但却是能与特异性抗体发生反应的物质。抗原决定簇是在抗原或半抗原中能与抗体发生反应的最简单的单位。

当一种半抗原(例如已知其氨基酸顺序的一个小分子肽)和一个载体(例如一个大蛋白质分子)结合时,在绝大多数情况下,进行免疫就能产生具有半抗原反应性的抗体和与载体有反应性的抗体。甚至抗半抗原的抗体也是异质的:其中绝大多数抗体对末端氨基酸具有特异性;很多抗体对末端和倒数第二位氨基酸具有特异性,而随着氨基酸序列的不断增长,则相对来说具有特异反应的抗体就越来越少。极少数抗体能与离末端氨基酸4—7个以上的氨基酸顺序发生反应。与抗半抗原抗体反应的氨基酸的数目越多,结合力就越强,结合的亲和力也就越高。高亲和力意味着对于相应的氨基酸顺序密切相应。因此,对一个抗原的高亲和力就意味着高特异性和与不同氨基酸顺序的抗原决定簇具有低交叉反应性。虽然已经发现在使用纯化抗体(20页)时能够参与结合的氨基酸也不超过4个,但一个抗原决定簇大小的限度可能较接近于包括7个氨基酸的顺序、单糖或核苷酸的残基。抗体的纯化常常是选择那些具有低结合亲和力的抗体,显然在未纯化的残余物中将与4个以上的氨基酸发生反应的抗体遗留了下来(42页)。很可能存在与四个以上的氨基酸顺序发生反应的高结合亲和力的抗体,虽然重要但只占抗体总量中很少份额的,在抗血清中检测到了可测量的抗肽抗体。

即使可与单个抗体在任何一个时间发生反应的任何一个抗原的决定簇是比较小的,然而其超变区在对一些无关抗原决定簇表现特异性来说仍是足够大的。例如小白鼠IgA浆细胞瘤蛋白质460与ε-二硝基苯酰-赖氨酸和2-甲基-1,4萘醌两者都发生结合^[18]。蛋白质460的抗原结合部位含有一个被掩盖着的硫氢基,此硫氢基只能被一个硫氢基试剂——二硝基苯酚的一个衍生物(5,5'-二硫代(2,4-二硝基苯))所失活。此衍生物是一种亲和标记,它的二硝基苯酚可以进入到原先被掩盖着的部位。当将被掩盖着的硫氢基失活之后,浆细胞瘤蛋白质便不再与2-甲基-1,4萘醌起反应,但仍与二硝基苯赖氨酸起反应。因此,在浆细胞瘤抗体中二硝基苯和2-甲基-1,4萘醌的结合部位是互不相同的。

抗原抗体的反应是可逆的。高亲和力意味着低可逆性。在免疫细胞化学方法的建立和应用中,我们必需意识到免疫反应的可逆性,因为在免疫细胞化学染色中往往先用少量含有抗体的试剂,然后再用大量缓冲液洗涤。这就会引起一定程度的解离作用,即使用最优质的抗体,其结合反应比解离反应快得多时也会如此。对高亲和力的抗体来说,其固有的结合常数平均为每克分子 10^6 — 10^9 的范围。但在免疫细胞化学中当低亲和力的抗体和组织抗原的两个抗体特异性部位相结合时却是有用的。由于一些尚不明确的原因,针对激素的抗体往往其结合常数在 10^9 的范围内。

沉 淀 素 反 应

单体的免疫球蛋白有两个抗原结合部位。大多数抗原均具有多个抗原决定簇。因此，在适当比例条件下，抗原与抗体便形成大的凝聚物而由溶液中沉淀出来。凝聚物的大小并不仅取决于抗原中决定簇的数目和抗体中的结合部位，而且还取决于结合的亲和力。如果亲和力高则迅速形成凝聚物，而凝聚物的解离作用则是微不足道的。然而，如果一种抗体制品中含有很大比例的亲和力低的抗体，不论反应物的比例如何，聚合物的形成总是缓慢的，而且并非溶液中所有的抗原或抗体都发生沉淀。不但如此，用亲和力低的抗体所获得的免疫沉淀物还可能具有高的溶解度。由此可见，对一种免疫沉淀物中蛋白质含量进行估计时，不一定需要对溶液中的全部抗体作出评价。

抗原抗体的沉淀素反应可分为三个区带：抗体过剩带（溶液中无剩余的游离抗原），等价带（溶液中既不能检出游离抗原也不能检出游离抗体）和抗原过剩带（溶液中既含有游离抗原也含有可溶性的抗原抗体复合物）。抗体和过量抗原所形成的复合物是可溶性的。因为在抗原过剩时许多抗原分子都只通过一个决定簇与抗体相结合，所以阻止了由交迭的抗原和抗体所形成的链的过度增长。可通过用等价的抗原来沉淀抗体，并将沉淀溶解在过剩的抗原中获得纯的可溶性复合物。由于这需要断开多个抗原-抗体键，所以它是一个缓慢的反应而且只是部分完全的，甚至在连续震荡下使用大量过剩抗原时也是如此。于是，蛋白质就发生较大的变性。为了在抗原量很少过剩时得到在某些免疫细胞化学的应用中所需要的抗原-抗体复合物的高产率，已建立了一些更有效的制备方法（14页）。

免疫扩散是在半固体介质中所做的一种沉淀素反应。当抗原溶液向抗体溶液的方向扩散时，在达到最适于发生沉淀作用的比例的接触点处便形成一条沉淀线（图2-7）。如果抗原溶液是由能引起不同抗体的各种成分组成，那么就可能形成一系列的沉淀线，因为各抗原成分的扩散速率是不同的。比较两种或更多的不同抗原制品向着单个抗体溶液的方向扩散时，就能根据某些抗原制剂和该抗体制剂是否只形成一条共同的沉淀线（一致性沉淀线），还是形成一些在接触点相互交叉的各自独立的沉淀线（相异性沉淀线），而确定这些抗原的一致性 or 相异性。在接触点上形成支线意味着部分的一致性。这个支线是由于抗原之一除了含有其它抗原共同的决定簇之外，还含有不相同的决定簇而造成的。

在免疫电泳中，免疫球蛋白首先用凝胶电泳法分离，然后再用特异性抗原或用对经电泳分离的免疫蛋白的抗原决定簇具有特异性的免疫球蛋白进行免疫扩散法加以分析。免疫电泳法的灵敏度可通过放射自显影法来提高。用抗免疫球蛋白与经电泳法分离出的免疫球蛋白形成免疫扩散带之后，通过洗涤去除可溶性成分，然后加入放射性标记的抗原，再通过培育和洗涤之后将敏感的照相乳胶加在制备物上。

测定抗体浓度及其差异性或者测定抗原浓度及其差异性的很多试验均依赖于在液体和半固体介质中的沉淀素反应。这些反应要求抗体与抗原结合（即初级功能）和随后由于结合而发生的沉淀作用（即次级功能）。对这种反应的检测取决于次级功能的效率。因此，即使发生抗原-抗体结合，也只能检测出实际上导致免疫沉淀反应的程度。沉淀作用的可测性限制着方法的灵敏度。免疫扩散和免疫电泳被广泛用作抗体的特异性或抗原纯度的判断标准。在免疫细胞化学染色中，用抗血清来检测组织内的抗原。这些抗血清常常是通过用不溶性抗原进行免疫而产生的。重要的是应确定在组织内所检测的抗原决定簇和用于免疫的抗原的决定簇是