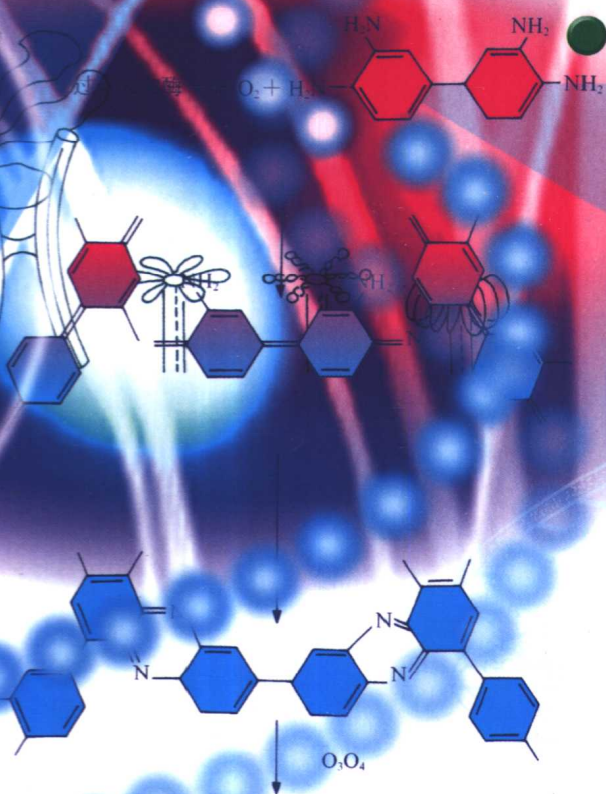


现代生物医学文库(新世纪研究生用书)

YUANWEI
JIANCE JISHU

原位检测技术

● 主 编 刘厚奇 向正华



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PUBLISHER

现代生物医学文库(新世纪研究生用书)

原位检测技术

YUANWEIJIANCE JISHU

主 编 刘厚奇 向正华

副主编 倪灿荣 关新元

编 者 编者(以姓氏笔画为序)

王凤枚 第二军医大学组织胚胎学教研室

刘厚奇 第二军医大学组织胚胎学教研室

刘善荣 第二军医大学组织胚胎学教研室

关新元 香港大学医学院临床肿瘤学系

向正华 第二军医大学组织胚胎学教研室

杨 玲 第二军医大学组织胚胎学教研室

倪灿荣 第二军医大学附属长海医院病理科

蒋 琳 上海理工大学电气工程学院

谢志芳 第二军医大学细胞生物学教研室

颜永碧 第二军医大学细胞生物学教研室



人 民 军 医 出 版 社

Peoples Military Medical Publisher

北 京

图书在版编目(CIP)数据

原位检测技术/刘厚奇,向正华主编. —北京:人民军医出版社,2002.3
ISBN 7-80157-448-6

I. 原… II. ①刘…②向… III. 原位—免疫测定 IV. R446.62

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 001997 号

人民军医出版社出版
(北京市复兴路 22 号甲 3 号)
(邮政编码:100842 电话:68222916)
人民军医出版社激光照排中心排版
北京京海印刷厂印刷
腾达装订厂装订
新华书店总店北京发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16·印张:11.5·字数:264 千字

2002 年 3 月第 1 版 (北京)第 1 次印刷

印数:0001~3000 定价:25.00 元

(购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换)

内 容 提 要

本书由多位中青年基础医学专家编写而成,共 12 章,详细讲述了抗原与抗体、染色体与核酸、标本的制备、免疫酶化学、免疫荧光技术、胶体金探针的制备、免疫电镜技术、计算机图像分析与阳性信号的定量观察、基因重组技术、核酸分子探针、原位杂交组织化学、荧光原位杂交技术等实验室常用操作技术的原理、方法和操作步骤。内容新颖,涵盖面广,图文并茂,适合医学院校研究生、基础医学科研工作者参考阅读。

责任编辑 靳纯桥 郭伟疆

447.2/61

前 言

组织细胞内的物质分布是人体形态和功能的客观体现,也表现了人体生理和病理的不同特征。原位检测技术就是利用某些物质(如抗体、酶、核酸探针、凝集素等)将某一分子从组织细胞内的众多生物分子中挑选出来,然后通过特异性酶反应显色或荧光显示等测定此分子在组织细胞原有位置上的分布范围和聚集程度,以判断此分子在组织细胞内的生理效应和病理意义。

到目前为止,原位检测技术主要包括免疫组织化学技术和核酸杂交技术两个部分。免疫组织化学的主要原理是用标记的抗体(或抗原)与组织细胞内的相应抗原(或抗体)特异性结合,经过组织化学的呈色反应之后,用普通显微镜、荧光显微镜或电子显微镜观察,从而对该抗体(或抗原)进行定性、定量检测。免疫组织化学主要是检测组织细胞内多肽、蛋白质及膜表面抗原和受体等大分子物质的存在和分布。这种方法特异性强,敏感性高,应用广泛,成为生物学和医学众多学科的重要研究手段。核酸杂交技术是用已知碱基序列带上标记物(核酸探针)与组织细胞中待测的核酸按碱基配对的原则进行特异性结合,形成杂交体,通过标记物的显示,在普通显微镜、荧光显微镜或电子显微镜下观察目标 mRNA 或 DNA 的存在与定位。核酸杂交技术主要分染色体原位杂交和细胞原位杂交。前者是研究遗传基因、抗原基因、受体基因、癌基因等在染色体上的定位与表达;后者是研究细胞某种蛋白质的基因转录物 mRNA 在胞质内的定位与表达。核酸杂交技术有很高的敏感性及特异性,它是在免疫组织化学的基础上,进一步从分子水平探讨细胞内基因的表达以及细胞功能调节机制的方法,已成为细胞分子生物学和病理生理学研究的有效手段。

为了相关专业研究生和工作人员能够成功运用原位检测技术,我们组织了具有丰富经验的专业技术人员为研究生开设了课程,并举办了全国性学习班 10 余次。在教学中,我们不断总结经验和努力完善技术,授课讲义也成了许多同行的实验指导,同学们也要求我们编写一本随身携带的操作性强的实验指导书。因此,我们组织有关技术专家共同编写了这本《原位检测技术》。本书共分 12 章,介绍了原位检测技术的基本理论、技术原理、操作程序、试剂配制的方法和疑难问题的处理。特别是在免疫酶化学技术、免疫电镜技术、荧光原位杂交技术和原位杂交组织化学技术等方面,本书反映了当今最先进和最有效的实验经验和理论成果。

本书编写得到人民军医出版社的大力支持。靳纯桥编辑也付出了辛勤的劳动。陆海英和汤淑萍实验师协助编辑和打印。在此,我们一并表示衷心感谢。由于编者水平和时间有限,本书难免有一些不妥之处,敬请读者批评指正。

刘厚奇

2001 年 12 月

目 录

第一章 抗原与抗体 刘厚奇(1)	第四节 免疫荧光染色方法 (79)
第一节 抗原..... (1)	第五节 非特异性染色的消除方法 (82)
第二节 抗体..... (5)	第六节 荧光显微镜及检测方法 (83)
第二章 染色体与核酸 杨 玲 王凤枚 刘厚奇(9)	第七节 染色标本的保存及封片 介质的制备 (86)
第一节 染色质和染色体..... (9)	第六章 胶体金探针的制备技术 谢志芳 颜永碧(88)
第二节 DNA 的结构与功能..... (16)	第一节 胶体金的制备 (88)
第三节 RNA 的结构与功能..... (21)	第二节 蛋白质-胶体金探针的制备 (89)
第四节 基因组 (23)	第三节 免疫金银法 (93)
第三章 标本的制备 ... 刘善荣 倪灿荣 刘厚奇(27)	第七章 免疫电镜技术 谢志芳 颜永碧(96)
第一节 组织和细胞的采集 (27)	第一节 免疫电镜技术的发展概述 (96)
第二节 组织和细胞的培养 (28)	第二节 免疫电镜的基本技术方法 (97)
第三节 组织和细胞的固定 (31)	第三节 胶体金标记免疫电镜技术 (100)
第四节 涂胶载玻片的制备 (33)	第四节 铁蛋白标记免疫电镜技术 (107)
第五节 组织切片技术 (34)	第八章 计算机图像分析与阳性 信号的定量观察 蒋 琳 向正华(109)
第六节 抗原的暴露和修复 (36)	第一节 计算机生物图像分析 的基本原理..... (109)
第七节 染色体的制备 (38)	第二节 图像分析在免疫组织化学 和原位杂交结果分析中的 应用..... (111)
第四章 免疫酶化学 倪灿荣(44)	第九章 基因重组技术 向正华 刘厚奇(114)
第一节 免疫酶化学的技术方法 (44)	第一节 核酸的变性与复性..... (114)
第二节 亲和免疫组化技术 (50)	
第三节 非特异性染色及消除方法 (56)	
第四节 对照的设置及结果的判断 (59)	
第五节 显色底物与衬染 (62)	
第六节 抗体的购置、保存与应用 (68)	
第五章 免疫荧光技术 倪灿荣(71)	
第一节 免疫荧光技术的原理 (71)	
第二节 荧光素 (72)	
第三节 荧光素标记抗体的方法 (74)	

第二节 工具酶..... (115)	第一节 样本的制备..... (142)
第三节 载体..... (117)	第二节 操作程序..... (146)
第四节 DNA 重组技术 (118)	第十二章 荧光原位杂交技术
第十章 核酸分子探针 向正华(124)	 关新元(167)
第一节 DNA 的缺口平移法 (126)	第一节 概述..... (167)
第二节 随机引物标记 DNA (128)	第二节 染色体荧光原位杂交技术
第三节 体外转录方法标记 RNA	 (167)
..... (130)	第三节 间期核荧光原位杂交技术
第四节 寡核苷酸的标记方法..... (134)	 (171)
第五节 放射性标记探针的纯化	第四节 比较基因组杂交技术..... (174)
..... (137)	
第十一章 原位杂交组织化学	
..... 向正华(141)	

第一章 抗原与抗体

第一节 抗 原

一、抗原的概念

抗原(antigen)是指能刺激机体免疫系统引发免疫应答而产生抗体和(或)致敏淋巴细胞,并与之发生特异性结合的物质。它与T细胞和B细胞的抗原受体特异性结合而激活这些细胞。一个完全抗原具备两方面的特性:一是刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞,即免疫原性(immunogenicity);一是与相应抗体或致敏淋巴细胞特异性结合,即免疫反应性(immunoreactivity)。某些物质不具备免疫原性但具有免疫反应性,这种物质称为半抗原(hapten)。如有些简单的有机分子(分子质量一般小于4ku)能与相应的抗体结合,但是它们本身并不能引起免疫应答,只有与大分子载体(carrier)结合后才能诱导免疫应答。这种简单的有机分子便是半抗原。

二、决定抗原免疫原性的因素

(一)化学性质

在有机大分子物质中,最有效的抗原是蛋白质。不仅天然蛋白,而且人工合成的多肽也具有比较强的免疫原性。蛋白质抗原的免疫原性在某种程度上决定于氨基酸的构成,特别是芳香族和非芳香族氨基酸的比例是一个重要参数,含有大量芳香族氨基酸尤其是酪氨酸的蛋白质往往具有更强的免疫原性。一些较弱的抗原如胶原,连接酪氨酸残基后其免疫原性明显提高。

与蛋白质相比,多糖只具有较弱的抗原性。而且只有蛋白质可以引起T细胞应答,其他的抗原只能激活B细胞。多糖对某些物种(如人、小鼠)可引起较强的抗体应答,而对其他物种(如兔、豚鼠)只引起较弱的抗体应答,甚至无应答。脂类物质不能激活淋巴细胞,但是若与蛋白质结合后,它们往往具有半抗原的功能。核酸本身也不能诱导任何形式的免疫应答,但若与蛋白质连接形成核蛋白,则能诱导抗体产生。核酸抗体也出现于某些自身免疫疾病,如系统性红斑狼疮病人的血清中。某些抗体不仅可以与天然DNA而且可以与变性DNA很好地起反应。

(二)结构复杂

一般来讲,分子的结构越复杂其抗原性就越强。天然蛋白质,不论是单纯的蛋白质还是糖蛋白、核蛋白或脂蛋白,结构都比较复杂,常有多个不同的表位(抗原决定簇),故为良好的抗原。少数结构复杂的多糖(如肺炎球菌荚膜多糖)也可作为抗原。只有一种亚单位组成的分子(例如只由一种氨基酸合成的多肽)往往不具有抗原的功能,基本不能激活淋巴细胞,引入另一种亚单位,通常能提高其免疫原性。所以,作为一种好的抗原应是由多种亚单位组成的。

(三)分子大小

小分子物质如氨基酸和单糖通常并不能激活淋巴细胞,除非与大分子载体结合。作为一种抗原,其分子质量至少要有4ku,作为

一种好的抗原,其分子质量必须超过 10ku,具有很强免疫原性的抗原其分子质量往往大于 100ku。但是也有例外,明胶的分子质量高达 100ku,但因其结构简单(直链氨基酸),在体内易降解成低分子物质,所以抗原性很弱。相反,由三个酪氨酸与 P-偶氮苯砷酸盐构成的人工抗原,其分子质量仅为 0.4ku 左右,也能引起抗体产生。

(四) 分子构象

抗原分子的构象(conformation)对于免疫原性也是至关重要的。某一分子由于变性或结构松散引起的构象改变可以导致其抗原性的改变。变性分子通常并不失去免疫原性,但由于某些原有表位丢失,新的表位出现而使其免疫原性不同于原来的分子。

(五) 异物性

异物性(foreignness)是指抗原来源的生物体与所刺激体的物种差异。胚胎期(某些物种如大鼠、小鼠可延至新生期)接触的异种蛋白常终身不起阳性应答反应。通常机体只对非己物质产生免疫应答。而且,抗原与机体的种属关系越远,其差异越大,抗原性也就越强。例如胶原(collagens)因其种系之间的差异比较小,所以其抗原性就很弱;相反,由组织相容性复合体(MHC)控制的 I 类分子即使在人群个体之间也存在差异,故具有良好的抗原性。因此限制了移植治疗的临床应用。

(六) 免疫方式

抗原性物质可以因用不同的免疫方式(主要指抗原引入机体的方式)而导致不同的免疫效果。这主要取决于抗原进入的途径、抗原剂量、免疫时间及检测时间的选择。人工免疫通常选择的是非消化管途径(皮内、皮下、静脉或腹腔等),皮内和皮下注射的抗原性物质通常存在于局部淋巴结,静脉和腹腔注射的抗原性物质往往集中于脾。

每一种抗原物质均有其最适剂量。而且大部分的抗原需要多次免疫才能取得明显的

效果,所以免疫的次数和时间间隔均需严格掌握,检测的时间也应选择在反应的最高峰。

三、抗原决定簇

免疫应答的一个重要特点是特异性。免疫应答和免疫反应具有特异性的物质基础是抗原决定簇(antigenic determinant)。所谓抗原决定簇是指抗原性物质表面决定该抗原特异性的特殊化学基团。抗原是通过抗原分子的抗原决定簇与相应淋巴细胞抗原受体结合而激活淋巴细胞,从而引发免疫应答,且通过抗原决定簇与相应的抗体特异地结合而发生反应。

抗原决定簇通常是很小的,一般由 6~8 个氨基酸、单糖或核苷酸残基组成。一种抗原分子可有一种抗原决定簇,其性质和构象就决定其特异性,但多数抗原性物质具有多种不同的抗原决定簇,也就是说一种抗原分子具有多种特异性。一般来说,只有位于抗原物质表面的抗原决定簇才具有功能(故有人称之为表位),而位于分子内部的抗原决定簇是无免疫原性功能的,但是经过理化因素的处理,使内部的抗原决定簇暴露出来后,就能发挥其作用了。因此,一种蛋白质变性以后,构象发生改变,原有的抗原决定簇所决定的特异性就会部分或全部丢失,随之新显现的抗原决定簇将决定新的特异性。

T 细胞和 B 细胞膜表面均存在特异性抗原受体,能识别相应的抗原决定簇。目前认为 B 细胞可直接识别抗原物质的抗原决定簇,而 T 细胞则不能,必须通过抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APC)对抗原处理后,在 MHC 的参与下对抗原决定簇进行识别。一般说来, B 细胞识别的抗原决定簇在分子表面,多为构象型抗原决定簇, T 细胞识别的抗原决定簇则在分子内部,多为顺序型抗原决定簇。

随着蛋白质工程技术、单克隆抗体技术、生物物理技术和计算机技术的广泛应用,已

发现了一些较适用于某些蛋白质抗原决定簇研究的方法,可以确定抗原决定簇的序列和结构特征。目前用于蛋白质抗原表位分析的方法主要有两大类。第1类是进行 Ag-Fab 复合物的 X 线衍射或磁共振分析,可以确定复合物中每个原子的空间位置、复合物的三维模型以及两个分子相互接触的范围。通过直接观察复合物的分子集团空间排列发现大约有 15 个氨基酸残基与抗体配位结合。但这类方法不能提供各氨基酸残基对结合反应所起作用的证据,而根据现有知识知道,各种氨基酸残基在抗原抗体结合过程中的作用是不一样的。第2类方法主要是分析蛋白质、多肽的某些片段或某些氨基酸在构成抗原决定簇中的作用。早期比较经典的分析方法是利用蛋白质水解酶或溴化氰将蛋白质裂解成许多连续的小片段,然后观察哪些片段能与特定的抗体或活化的 T 细胞结合。随着分子生物学理论和技术的发展,蛋白质的克隆和序列分析以及多肽合成技术的成功,使得人们一旦知道蛋白质的氨基酸序列就可以合成各种长度的多肽,产生各种不同的折叠,然后以此为探针与抗体、T 细胞或 B 细胞进行反应。

四、抗原的分类

(一)根据抗原来源与机体的亲缘关系分类

1. 异种抗原 来源于其他物种的抗原性物质称为异种抗原(xenoantigen)。各种动物血清(如马血清)、各种微生物及其代谢产物(如外毒素)对人来说都是异种抗原。

2. 同种异型抗原 来自于相同物种但基因型不同的其他个体的抗原性物质称为同种异型抗原(alloantigen)。例如人类的红细胞抗原和白细胞抗原。

3. 自身抗原 能引起自身免疫应答的自身组织成分称为自身抗原(autoantigen)。通常情况下自身物质并不具有抗原性,但在

特殊情况下(如手术、创伤、感染等),胚胎期从未与自身淋巴细胞接触过的隐蔽成分可以进入血流或淋巴道,激活自身淋巴细胞引起自身免疫应答。另外,某些生物、理化因素也可使自身成分发生改变而成为自身抗原。

(二)根据抗原在引起免疫应答时是否依赖 T 细胞分类

1. 胸腺依赖抗原 胸腺依赖抗原(thymus dependent antigen)需要在巨噬细胞及 T 细胞的参与下才能刺激 B 细胞产生抗体。绝大多数抗原属此类,如人血清球蛋白、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、类毒素及羊红细胞(SRBC)等。此类抗原除刺激机体产生抗体(IgG、IgM、IgA)外,也能引起细胞免疫和免疫记忆,不容易产生免疫耐受性。

2. 非胸腺依赖抗原 非胸腺依赖抗原(thymus independent antigen)不需要 T 细胞的辅助就能直接刺激 B 细胞产生抗体。少数抗原属此类,如肺炎球菌荚膜多糖、细菌脂多糖、聚合鞭毛素、多聚多糖、多聚 D-氨基酸及葡聚糖等。这类抗原的共同特点是其分子上具有大量重复的抗原决定簇,而且在体内不易降解。由于此类抗原不能激活 Th 细胞,故只能激发 B 细胞产生 IgM 而无 IgG 的转换,不形成免疫记忆而较易产生免疫耐受。

五、佐剂

纯化的抗原常常只具有较弱的免疫原性,所以在建立有效的疫苗时需要使用佐剂。所谓免疫佐剂(adjuvant)是指能非特异地增强机体特异性免疫应答的物质,应用时可以先将佐剂与抗原混合后同时注射,也可以预先注射,但与抗原注射的部位要相同。理想的免疫佐剂应符合下列标准:制备简单、材料来源丰富、价廉;贮存稳定,尤其能以冰冻干燥形式存在;能生物降解、无毒性、无免疫原性;辅助多种途径给予的抗原激活细胞免疫和体液免疫,既能增强原发性反应也能增强

继发性反应;与其他佐剂有协同作用,使抗原能选择性地与免疫活性细胞相互作用。但目前尚无一种佐剂能符合上述全部条件。

目前常用的佐剂有以下几类:①油性佐剂:有代表性的油性佐剂是福氏佐剂(Freund adjuvant),分为完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂两种。完全福氏佐剂是由矿物油、死的结核杆菌、抗原的盐溶液加上乳化剂混合而成的一种油包水乳剂,不完全福氏佐剂未加入死的结核杆菌。使用油性佐剂要达到最大效果需进行皮下注射,由于使用这种佐剂易在局部出现肉芽肿和持久的溃疡,造成较严重的组织损伤,因而主要用于动物实验。这种佐剂的作用主要是使抗原吸收缓慢和刺激局部巨噬细胞。②矿物盐佐剂:代表性的矿物盐佐剂是含有 K^+ 、 Na^+ 或 NH_4^+ 的硫酸铝,由于安全可靠,常用于人类。这类佐剂的作用主要是抗原吸附。③合成佐剂:如多聚肌苷酸、尿苷酸(polyI:C),多聚腺苷酸、尿苷酸(polyA:U)。其作用主要是刺激淋巴细胞。④脂质体:脂质体(liposomes)是单层或多层磷脂双分子层组成的封闭环状结构的小体,无毒、无免疫原性,能生物降解,可以携带多种抗原。⑤自然物质:主要是由真菌、寄生虫和细菌产生的物质,其中有代表性的是来自于结核杆菌的蜡质 D,它是由糖脂和肽糖脂组成,其活性必需的最小结构单位是胞壁酰二肽(muramyl dipeptide, MDP)。MDP 也是完全福氏佐剂的主要活性成分,其主要作用是激活巨噬细胞。

六、有丝分裂原

能活化淋巴细胞的物质有两大类,一类为特异性抗原;另一类为非特异性有丝分裂原,简称丝裂原或致有丝分裂素(mitogen)。抗原只能激活带有相应抗原受体的 T 细胞或 B 细胞(通常占淋巴细胞总数的 0.02%~0.1%),因此在体外培养的研究中利用抗原作为刺激物来研究细胞活化的过程是较困难

的。而有丝分裂原能激活多个细胞克隆(通常达到淋巴细胞总数的 30%~60%),故有丝分裂原也称为多克隆刺激剂。B 细胞受刺激后分化成为能分泌免疫球蛋白的浆细胞, T 细胞受刺激后可以产生多种淋巴因子,或具有杀伤细胞的效应。因此,有丝分裂原已成为体外研究活化细胞的重要实验工具。目前常用的有丝分裂原有以下几种:①刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA):为 T 细胞有丝分裂原,从大刀豆(*canavalia ensiformis*, 俗称 Jack bean)中提取。ConA 是一种纯蛋白,分子量为 102ku,由四个相同的亚单位(单体)构成,每一单体含有 237 个氨基酸残基。②植物血凝素(phytohemagglutinin; PHA):为 T 细胞有丝分裂原,从肾豆(kidney bean)中提取。PHA 是一种糖蛋白,分子量为 140ku,同 ConA 一样也是四聚体分子。但不同于 ConA 的是它由两种亚单位构成:L 型和 R 型。虽然 L 型和 R 型单体在结构上具有同源性,但具有不同的功能。L 型可以凝集白细胞,不凝集红细胞,具有多丝分裂原活性;R 型能凝集红细胞,但无有丝分裂原活性。③美洲商陆丝裂原(pokeweed mitogen, PWM):能同时活化 T 细胞和 B 细胞,由商陆(pokeweed)中提取。是一个至少由 5 种具有丝裂原活性的蛋白质构成的混合体,其中之一为多聚体,可同时作用于 T 细胞和 B 细胞,而其他四种只是 T 细胞有丝分裂原。④脂多糖(lipopolysaccharide, LPS):为 B 细胞有丝分裂原,存在于革兰阴性(G^-)细菌的外膜部分,其基本结构由 3 部分构成:特异性多糖、核心多糖和脂质 A。LPS 是 B 细胞丝裂原的典型代表,为高分子量的聚合物,故分子表面具有许多重复排列的抗原决定簇,能使 B 细胞膜部分受体发生交联。LPS 对人的 B 细胞不具有丝裂原性,而对小鼠、大鼠、豚鼠的 B 细胞具有很强的作用。此外,葡萄球菌 A 蛋白菌体(SAC)也是一种很好的 B 细胞丝裂原,能促进人的 B 细胞在

体外培养中增殖。

第二节 抗 体

一、抗体的定义

机体经抗原物质刺激后,可由 B 细胞产生抗体(antibody, Ab)。Ab 是免疫应答的主要产物,由它介导的免疫称为体液免疫。免疫球蛋白是指具有抗体活性或其化学结构与抗体相似的球蛋白。血清电泳时,抗体活性主要在 γ 球蛋白区带,因此这类蛋白过去曾称为 γ 球蛋白,但有时少量抗体活性也出现在 β 或 α_2 球蛋白区带,所以现统一称为免疫球蛋白(Ig)。但必须指出,抗体是 Ig,但 Ig 并不都具有抗体活性,如多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症等病人血清中的异常 Ig 未证实有抗体活性。Ig 是化学结构的概念,而抗体是生物学功能的概念。

二、抗体的性质和种类

(一)抗体的一般性质

由于无抗体活性的免疫球蛋白一般很少,所以人们常把抗体和免疫球蛋白视为一体。人类免疫球蛋白有 5 类,即 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE。1963 年 Porter 对 IgG 化学结构提出一个模式图,后经证实此结构模式图也适用于其它几类 Ig,都具有 IgG 的基本结构。

IgG 分子由 4 条对称的多肽链,用二硫键以共价和非共价键联结组成,其中两条长链(450~550 个氨基酸)称为重链(heavy chain,简称 H 链),两条短链(212~214 个氨基酸)称为轻链(light chain,简称 L 链),重链占 IgG 分子的 2/3,轻链占 1/3。这个四链结构是各类免疫球蛋白的基本结构,可用通式 L_2H_2 表示。 L_2H_2 称为一个单体,IgG、IgD、IgE 及血清型 IgA 都以单体形式存在,而分泌型 IgA 含 2 个单体,IgM 含有 5 个单

体。多肽链的氨基端包括 L 链的 1/2 和 H 链的 1/4 或 1/5,其氨基酸组成及排列顺序随结合抗原特异性不同而异,称为可变区(variable region, V 区)。多肽链的羧基端包括 L 链 1/2 与 H 链的 3/4 或 4/5,其氨基酸组成及排列顺序比较稳定,称为稳定区(constant region, C 区)。免疫球蛋白结合抗原的不同特异性,取决于 L 链和 H 链的 V 区氨基酸的种类和顺序的不同,而免疫球蛋白结合补体或巨噬细胞等生物学活性,则与 H 链的 C 区有关。免疫球蛋白的主要生物学功能是:①与抗原特异性结合。②活化补体。③结合 Fc 受体,如 IgG 结合巨噬细胞表面 Fc 受体可发挥调理吞噬作用;结合 NK 细胞、中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞表面 Fc 受体可发挥 ADCC(antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)作用;IgE 结合肥大细胞或嗜碱性粒细胞表面相应 Fc 受体,则介导 I 型(速发型)超敏反应。④IgG 可主动通过胎盘等。

(二)免疫球蛋白的抗原性

所有的蛋白质和许多非蛋白物质在一定条件下可作为抗原。Ig 是具有抗体活性的蛋白质,因而也是抗原物质,具有抗原性。当免疫学家制备得到第一个抗-抗体的抗体,发现抗体蛋白可作为抗原已有 50 多年,从此抗-抗体已成为研究抗体的重要物质。对 Ig 的抗原性,可用血清学方法进行测定与分析,所以可将 Ig 的抗原结构称为血清型,Ig 分子主要存在有 3 种类型的抗原决定簇:同种型、同种异型和独特型。

1. 同种型 同种型(isotypes)是指在一个物种内,H 链的某一类或亚类,L 链的某一型或亚型,所有分子的抗原决定簇的特异性是相同的。此型抗原决定簇存在于 Ig 的 C

区,根据 H 链 C 区抗原特异性的差异,可将人类 Ig 分为 5 类,即 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE,这 5 类 Ig 的 H 链抗原性不同,互不出现交叉反应,有些类的 Ig 的 H 链 C 区抗原性仍有稍许差异,借此可分若干亚类,例如 IgG 可分为 4 个亚类(IgG_{1~4}),IgM 及 IgA 各分为 2 个亚类(IgM_{1~2},IgA_{1~2}),同一类的亚类之间有强烈的交叉反应;根据 L 链 C 区抗原特异性的差异分为 κ 与 λ 两型, κ 链无亚型, λ 链 C 区因有些位点的氨基酸种类有差异而分为若干亚型,已发现有 Meg、Ke⁺Oz⁺、Ke⁻Oz⁺ 和 Ke⁺Oz⁻ 4 个亚型。为了制备抗同种型抗原的抗体,必须将 Ig 注入另一物种,例如,想获得能和人类 μ 链发生反应的抗体,必须先分离纯化人 IgM 分子,然后再把 IgM 注入兔、山羊或小鼠,人类 IgM 分子的氨基酸序列不同于兔、山羊或小鼠,因而,这些动物能识别这些差别,并把人 IgM 作为外来抗原,并作出反应,产生抗人 IgM 的抗体,此抗体可与人类中任何人的 IgM 起特异性反应,但不能和其他动物的 IgM 起反应,说明所有人的 IgM 均有共同的,而且是其他动物所没有的抗原结构。

2. 同种异型 同种异型(allotypes)是指同一物种的不同个体间,因遗传基因的不同而同类 Ig 存在有特异性不同的抗原决定簇。这主要反映在 Ig 分子的 C 区,在 C_H 和 C_L 上有一个或几个氨基酸残基的差异,例如某甲的 γ_1 链与某乙的 γ_1 链的氨基酸序列有少许差异,如输血时甲接受了乙的 Ig,则甲将产生抗乙 γ_1 链的抗体,反之亦然,如甲的血液输给了乙,则乙的体内将产生抗甲 γ_1 链的抗体,即彼此可互为抗原。

人类 Ig 的同种异型抗原已发现存在于 H 链的 $\gamma_{1~3}$ 和 α_2 链以及 L 链的 κ 链,至今尚未见 H 链的 γ_4 、 α_1 、 μ 、 δ 、 ϵ 及 L 链的 λ 有同种异型。 $\gamma_{1~3}$ 链的同种异型已发现有 30 种,以 Gm (gamma maker) 表示之,即 Gm₁ ~ Gm₃₀,即人类 IgG 有 30 个同种异型。同种

异型抗原可作为人类遗传标志,用于法医学和人类学,多次输入与自己遗传性状不同的 Ig,易引起超敏反应。

3. 独特型 独特型(idiotypes)是指存在于同一个体内,由不同 B 细胞克隆产生的 Ig 分子,其 V 区的抗原特异性各不相同。独特型抗原决定簇主要由 V 区的高变区氨基酸序列所决定,不同特异性抗体高变区的氨基酸序列各异,故它们具有不同独特型特异性,即每一种特异性抗体的抗原结合部位均有独特性,实际上,Ig 的高变区,Ig 的抗原结合部位,Ig 的独特型抗原决定簇三个完全不同的概念,指的是 Ig 分子上的同一结构,即 Ig 分子 V 区由高变区组成的凹槽结构,这是由于抗体形成细胞的遗传性有所差别,因而产生出自己特有的抗体分子,同一个体内有千万种不同的抗体形成细胞克隆,针对不同的抗原产生不同的特异性抗体,这不同的特异性抗体又各具不同的独特型抗原决定簇,这些具独特型抗原决定簇的抗体不仅能激发不同物种或同种异体产生相应的抗体,也能在自身体内刺激其他克隆的 B 细胞产生抗独特型的抗体。抗独特型的抗体是高度专一性的抗体,只能与相对应的独特型抗原决定簇起反应,而不能与其他的独特型抗原决定簇起反应。因此,抗体分子具有两重性,它既是抗体,通过抗原结合部位识别与结合抗原,另一方面,其本身又具有各种抗原决定簇,能激发相应抗体的产生,并被识别与结合。

(三) 抗体的种类

抗体种类很多,可分以下几种:

1. 根据获得抗体的途径或来源不同分为

(1)免疫抗体:患传染病后或经人工注射疫苗后产生的抗体;用已知抗原免疫动物产生的抗体;用单克隆抗体技术制备的抗体;近年还可利用基因工程制备抗体。

(2)天然抗体:是指未患传染病也未注射疫苗而在体内出现的抗体。

(3)自身抗体:是机体对自身组织成分产生的抗体。

2. 根据抗原与抗体在试管内是否出现肉眼可见的反应分为

(1)完全抗体:此抗体能与抗原结合,在一定条件下出现肉眼可见的抗原抗体反应现象。

(2)不完全抗体:此抗体能与相应的抗原结合,在一定条件下不出现可见的抗原抗体反应现象。完全抗体具有完整的 Ig 分子结构,经酶水解后的片段 Fab 或 $F(ab')_2$,可表现出不完全抗体的作用。不完全抗体与抗原结合后,抗原表面便具有抗体球蛋白的特性,如与抗球蛋白抗体作用后,则出现可见的反应。

三、抗原与抗体的反应

抗原与抗体的反应统称为免疫学反应。在体内进行的抗原抗体反应称为免疫反应,在体外进行的抗原抗体反应称为血清学反应。由于抗原的物理性状不同,参加反应的因素不同,因此在抗体抗原反应时,可表现出各种形式的反应。抗原与抗体的结合具有高度特异性,一个抗体分子有两个抗原结合点(称两价)在一个抗原分子上则可有多个结合点(称为多价)。抗原与抗体分子的结合,不受两者数量比例的限制,但如需要出现肉眼可见的反应,则抗原与抗体的量需保持一定比例。在抗原或抗体过量的条件下,不能聚合成大颗粒,因此不能出现肉眼可见的反应。主要的血清学反应有 3 个类型,即凝集反应、沉淀反应和有补体参加的各种血清学反应。

(一)免疫应答的产生

机体在抗原物质的刺激下产生特异性免疫应答的过程,可分为 3 个阶段。

1. 感应阶段(识别及加工处理抗原阶段) 当颗粒抗原初次进入体内时,首先被 APC 如巨噬细胞吞噬(可溶性抗原可直接被

T 淋巴细胞吞饮,多糖与鞭毛抗原物质可直接作用于 B 淋巴细胞)。通过巨噬细胞胞浆内溶酶体酶的作用,把抗原物质消化降解,而保留其有效的抗原决定簇(特异性抗原成分),并与 APC 的 MHC 形成复合物,转移到细胞的表面而呈递给 T 淋巴细胞。T 细胞利用抗原识别受体(TCR)与 CD_3 复合物识别抗原肽-MHC 复合物,并由 CD_3 传递信号。此外,APC 与 T 细胞表面还存在多种粘附分子,共同参与抗原呈递过程。这些粘附分子作为 T 细胞活化的协同刺激分子,启动免疫反应。

2. 反应阶段(淋巴细胞增殖分化阶段)

T 细胞在受到抗原信息的刺激及抗原呈递细胞分泌的细胞因子(cytokine)作用下,活化、增殖、分化为效应 T 细胞,同时分泌大量细胞因子,辅助 B 淋巴细胞活化、增殖、分化为浆细胞,合成和分泌抗体。在分化过程中小部分成为“记忆”细胞。由于“记忆”细胞的存在,即使抗体在体内消失很久(数月至数年或更长)以后,当相应抗原再度进入体内,仍能迅速引起较强的免疫反应(回忆反应)。

3. 效应阶段(发生免疫反应阶段) 此阶段主要包括效应 T 细胞(细胞免疫)和抗体(体液免疫)对抗原性物质的清除作用,即所谓的排异效应,以及对免疫应答的调节作用。此阶段除效应 T 细胞及抗体发挥效应外,还必须有免疫增强系统参与,如补体系统、细胞因子、单核—吞噬细胞、粒细胞以及 NK 细胞等多种免疫分子和免疫细胞。

从分子遗传学角度来分析细胞 DNA 控制抗体形成的过程。抗原信息首先是影响到细胞 DNA,再通过接受了抗原信息的 DNA 来控制抗体的合成。免疫球蛋白分子的合成可能有以下方式:DNA 对蛋白质合成的控制是通过遗传信息来完成的,DNA 的遗传信息就是 DNA 分子中特定的相邻核苷酸排列的顺序,以 DNA 核苷酸排列顺序为模板,按互补方式形成的 RNA(称为转录),即 mRNA

(称信使 RNA),其碱基排列反映着模板 DNA 的信息。信使 RNA 由胞核进入胞浆,翻译为免疫球蛋白并分泌至细胞外。

(二)影响抗体产生的因素

1. 抗原的质与量 不同性质的抗原(抗原的物理状态、生物状态及毒力强弱)对机体刺激的强弱不一,表现为抗体形成速度的快慢不一,抗体持续的时间长短不一。一般初次菌体抗原刺激,2~5d 出现抗体,初次类毒素刺激,2~3 周出现抗体。使用的抗原剂量不同,影响也不同,活菌(减毒株)用量少,死菌用量多,强毒性死菌的抗体反应好。在一定范围内,抗原的剂量增多,抗体反应量增加,但抗原量过多,超过了一定限度,抗体反应量就会受到抑制,这称为免疫麻痹(immunologic paralysis)。

2. 机体方面 ①免疫途径:免疫途径不同,抗原在体内滞留时间不同,抗原接触淋巴细胞的概率也不同。抗原在体内停留时间久者,抗体反应高。局部使用,仅引起局部淋巴结中产生抗体;黏膜表面使用,常在黏膜下淋巴细胞组织或浆细胞中形成抗体;静脉内注入抗原则引起广泛的产生抗体的免疫反应,但抗原中的毒性物质常可引起严重反应。静脉内注入抗原,只适用于急用动物血清。②免疫次数及间隔:初次免疫,抗体出现慢、效价低、持续时间短。为建立基础免疫,至少应

在一定间隔时间内连续的免疫 2~3 次,如死疫苗一般需间隔 7~10d,免疫 3 次;类毒素免疫需 4 周,免疫 2 次。一般免疫效果可保持数月至 1 年。用动物制备抗血清蛋白等抗体时,追加免疫注射,注射剂量、途径、间隔均需严加注意,以免动物发生过敏反应死亡。③机体处于发育的不同阶段,免疫细胞对抗原刺激的反应不同。根据动物实验资料,可将免疫反应分为 3 级。在胚胎期及新生儿早期,抗原可使胚胎早期相应的免疫活性细胞被清除或部分抑制,称为 0 级反应;出生后的动物不再对该同一抗原发生反应,动物形成免疫耐受(immunologic tolerance)。出生后,抗原刺激则引起免疫活性细胞增殖,产生细胞免疫应答,称为 I 级反应。出生后经过一段时间才引起浆细胞增殖,伴随抗体产生,称为 II 级反应。

3. 佐剂(adjuvants)的增强免疫作用 用佐剂伴随抗原物质注射机体,可增强抗原的免疫原性,使弱抗原物质成为有效的抗原。如明矾沉淀类毒素可刺激免疫活性细胞增殖,可推迟抗原的吸收排除,使抗原在体内持续较久。油剂、结核、蜡质等可广泛地刺激吞噬细胞的吞噬作用,刺激不成熟的浆细胞及淋巴细胞,产生较好的免疫效果。

(刘厚奇)

参 考 文 献

- 1 丁传林,王胜军. 抗原. 见:刘恭植主编. 现代医学免疫学. 南京:江苏科学技术出版社,2000:10-18
- 2 黄诒森. 免疫球蛋白. 见:刘恭植主编. 现代医学免疫学. 南京:江苏科学技术出版社,2000:19-48
- 3 王伯沅,杨 琨. 免疫组织化学的基本理论. 见:王伯沅,李玉松,黄高升,等主编. 病理学技术. 北京:人民卫生出版社,2000:354-366
- 4 Max EE. Antibodies, immunoglobulins and B-cell receptors. In: Sell S ed. Immunology, immunopathology and immunity. 5th ed. Stamford: Appleton and Lange, A Simon and Schuster Company,1996:93-140

第二章 染色体与核酸

真核生物的遗传物质主要存在于细胞核内,因它被碱性染料着色,而被称之为染色体。根据电镜分析,染色体是一种细微纤丝,

而生化成分包括 DNA、组蛋白、非组蛋白以及少量 RNA。所以,染色体是核酸的主要所在地。两者的功能也密不可分。

第一节 染色质和染色体

染色质是一种动态结构,它在有丝分裂时,浓缩组装形成染色体。在有丝分裂末期逐渐解旋。间期变成染色质。染色体和染色质之差异,只不过是同一物质在间期和分裂期的不同形态结构的表现。

一、染色质的主要成分

染色质的主要化学成分是核蛋白,它由核酸和蛋白质组成。核酸包括 DNA 与 RNA;蛋白质又包括组蛋白(histone)和非组蛋白(nonhistone)(表 2-1)。

表 2-1 染色质主要成分及构成比

成 分	DNA	RNA	组蛋白	非组蛋白
比 率	1	0.05	1	0.5~1.5

(一)DNA 为染色质的主要成分之一

DNA 是遗传信息的携带者,含量稳定,人类二倍体组含 7.0×10^{-8} g DNA,因双螺旋 DNA 为 3.14×10^{-13} g/ μ m,从比值可以看出人二倍体细胞核的 DNA 长为 1.74m。真核细胞中染色质的 DNA 中含有不同的核苷酸重复序列。这些重复的序列(repeated sequences)可分为三类:高度重复、中等重复和单拷贝序列。

(二)组蛋白是最保守的蛋白质之一

组蛋白属单纯蛋白质,溶于水、稀酸和稀碱,呈碱性。大多数存在于真核细胞核中,含量恒定,这是组蛋白的一个明显特性。凝胶电泳可将真核细胞染色质组蛋白分离出 5 种(H_1 、 H_2A 、 H_2B 、 H_3 和 H_4),又可根据赖氨酸和精氨酸的相对含量划分成 3 类:富赖氨酸、稍富赖氨酸和富精氨酸组蛋白。

富含赖氨酸组蛋白(H_1),最容易从染色质上除去。它比其它组蛋白大 2 倍。一般认为组蛋白 H_1 包含在染色体的高级结构中,因而其功能也不同于其它组蛋白,还能显示对机体和组织的特异性差异。组蛋白 H_2A 和 H_2B 在种间表现比较保守,两种富精氨酸组蛋白 H_3 和 H_4 具较强凝结染色质的作用,使得变异和进化在组蛋白分子上严格受阻。4 种组蛋白都没有种属或组织器官的特异性,且基本不随细胞的代谢状态而变化。从亲缘很远的小牛和豌豆组蛋白 H_4 的氨基酸残基的比较中发现二者均有 102 个氨基酸残基,只有 2 个氨基酸发生置换。说明组蛋白的大部分在进化过程中都保留下来,这种进化保守性在维持染色质结构和功能方面起重要作用。

组蛋白的结构作用,是把长的 DNA 分子组织成更致密的非活动形式。主要是有赖

于组蛋白碱性氨基酸所带正电荷和 DNA 分子磷酸根所带负电荷之间的静电相互吸引力。而分子的非极性区域可以与其他组蛋白或染色质非组蛋白质发生作用。

(三)数量少而种类多的非组蛋白

非组蛋白(nonhistone)是组蛋白之外的一大类染色质蛋白的总称。数量较少而种类极多,用双向凝胶电泳法可获得 500 多种不同组分的非组蛋白。其中除了维持染色质结构和催化各种酶促反应的结构蛋白及酶蛋白外,尚有少量组织特异性的调节蛋白。

非组蛋白与核质结构关系密切的,是一类称做高速泳动蛋白(high mobility group protein)的,又称 HMG 蛋白质。这类蛋白质水溶性强,在聚丙烯酰胺凝胶上电泳,有较高的迁移率。在核质中发现 HMG₁ 和 HMG₂, 而且证明它们是与 H₁ 结合在一起的;而在核体核心颗粒中发现有 HMG₁₄ 和 HMG₁₇ 存在。它们和 DNA 结合在一起,和基因活化有关。

关于非组蛋白磷酸化调节基因转录的机制,现有如下假设:①非组蛋白识别 DNA 特异位点,并与之结合;②非组蛋白与 DNA 结合后,与组蛋白接近,进而诱导了非组蛋白磷酸化;③非组蛋白因磷酸化而增加其所带的负电荷,增强了与带正电荷的组蛋白结合,减弱了组蛋白与 DNA 结合,磷酸化非组蛋白与组蛋白复合物从 DNA 上脱落;④RNA 聚合酶与裸露的 DNA 结合,开始转录。有一些实验证明。以上 4 个环节是存在的,但还有许多不清楚的地方,尚待进一步研究证实。

(四)RNA 主要为 mRNA、rRNA 和 tRNA

真核细胞中除 mRNA、rRNA 和 tRNA 外尚有一种核不均一 RNA(heterogenous nuclear RNA, HnRNA)与一种小的 RNA(small nuclear RNA, snRNA)存在。

(五)其他

此外,核内尚有少量的脂类、水和无机盐等。动物细胞核内脂类含量较多,尤其是磷

脂。核中脂类和蛋白质结合在一起组成脂蛋白,主要存在于核膜中,无机盐中含有钾、钙和镁。

二、染色质的超微结构及组装

核小体(nucleosome)是染色质和染色体的超微结构的基本单位。染色质 DNA 在细胞核内是分几个等级进行压缩的。这种压缩的最初级结构就是核小体。由核小体再进一步构成更高级的结构,使 DNA 的长度进一步压缩。无论是核小体,或是染色质的各个高层次结构,都有不同的模型,对它们的超微结构都正在进行实验探讨。

(一)核小体的组成

核小体的核心由 4 种组蛋白构成,而 DNA 盘绕在这核心的表面。构成核小体核心的组蛋白是 H₂A、H₂B、H₃ 和 H₄ 4 种,每种有 2 个分子,所以它是一个组蛋白的八聚体。应用电镜和 X 射线衍射技术对核质核心结晶进行了研究,认为核小体核心并不呈球形,而比较近似一个短的圆柱体,即 11nm×11nm×5.7nm 的粒子。DNA 长度为 146 个核苷酸对,盘绕组蛋白八聚体大约 1.75 圈。也有人在前述核小体结构的基础上提出了核小体的最新模型。按此模型,4 种组蛋白的八聚体的组合形式是, H₃ 和 H₁ 各 2 个分子集合成的四聚体在中间,由 H₂A 和 H₂B 形成的 2 个二聚体分别排在四聚体的两侧。缠绕组蛋白八聚体的 DNA 长度有 146 个核苷酸对,即只够缠绕八聚体组蛋白 1.75 圈左右。他们还认为组蛋白 H₁ 位于 DNA 超螺旋进出核小体区的一侧,即与 DNA 进出核小体的位点相接触。它是一种位于核小体之外的蛋白质。它的功能与染色质的浓缩有关(图 2-1)。

现在也把包括有 H₁ 在内的核小体称为染色小体(chromatosome),而把不包括 H₁ 的核小体核心称为核小体核心颗粒(nucleosome core particle)。许多研究工作表明,在