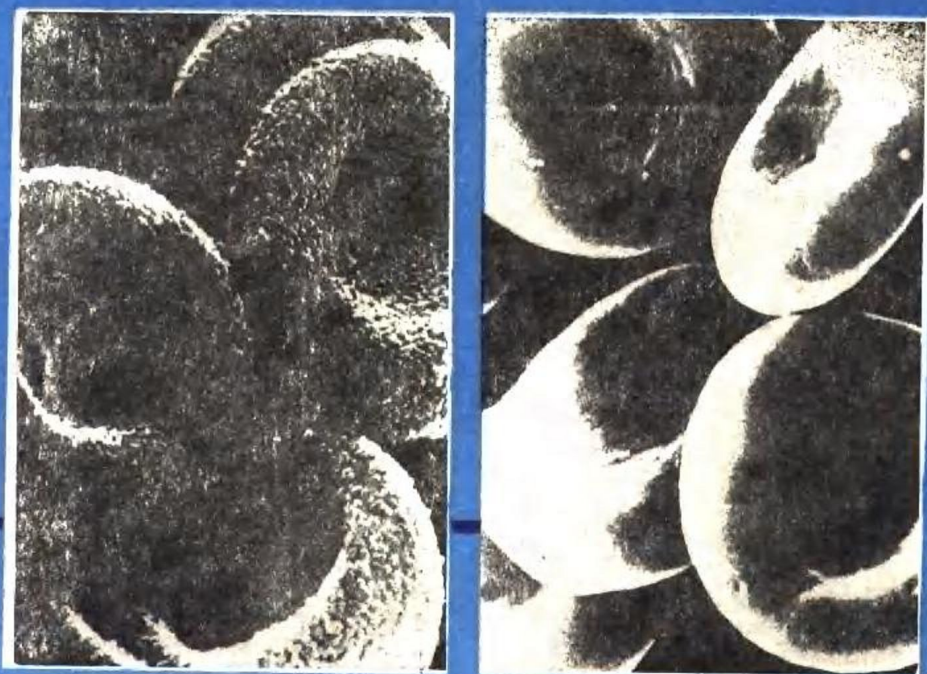


M.Z. 阿塔西
C.J. 范奥斯 主编
D.R. 阿勃索洛姆

分子免疫学

(下册)



科学出版社

内 容 简 介

由著名免疫化学家M. Z. 阿塔西等三人主编的《分子免疫学》是目前世界上最新的和内容最丰富的一本免疫学和免疫化学教科书和参考书。本书由免疫学各领域的40多位专家共同撰写而成。全书共32章，中译本分上下册出版。下册内容包括抗体抗原反应的热力学，免疫复合物，各种免疫检测法，补体的结构与功能，淋巴细胞相互作用，免疫遗传，淋巴因子，淋巴细胞抗原抗体等。

本书可供医学院校、综合性大学生物系的大学生、硕士和博士研究生，以及从事免疫学教学和研究人员参考。

M. Zouhair Atassi Carel J. van Oss Darryl R. Absolom

MOLECULAR IMMUNOLOGY

A TEXTBOOK

Marcel Dekker, Inc.

分 子 免 疫 学

(下 册)

M. Z. 阿 塔 西

C. J. 范 奥 斯 主编

D. R. 阿勃索洛姆

郑昌学 吴安然 等 译

责任编辑 吴铁双

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

*

1988年8月第 一 版 开本：787×1092 1/16

1988年8月第一次印刷 印张：18

印数：0001—2,880 字数：416,000

ISBN 7-03-000343-8/Q·65

定价：9.60 元

目 录

第16章	抗原-抗体反应的性质和热力学	(1)
第17章	凝集反应和沉淀反应	(19)
第18章	循环免疫复合物	(32)
第19章	放射免疫测定	(48)
第20章	酶免疫测定	(66)
第21章	免疫荧光: 原理和方法	(82)
第22章	免疫电子显微镜检查	(105)
第23章	补体的结构和功能	(131)
第24章	淋巴细胞的相互作用	(142)
第25章	免疫反应的基因调控	(153)
第26章	HLA 系统	(169)
第27章	小鼠主要组织相容性抗原的免疫化学	(181)
第28章	淋巴细胞抗原和受体	(194)
第29章	单核和多核吞噬细胞的 Fc受体	(213)
第30章	淋巴因子	(228)
第31章	细胞粘附和吞噬作用	(240)
第32章	细胞分离方法	(251)
附录		(263)
参考文献		(265)

第16章 抗原-抗体反应的性质和热力学

Carel J. van Oss Darryl R. Absolom

I. 引言

无论从化学还是从生物化学角度来看, 抗原-抗体 (Ag-Ab) 反应都有点异乎寻常。它所涉及的键都属弱相互作用 (主要是库仑力和范德瓦尔斯力), 而不是共价键。抗体的价已很清楚 (因抗体种类不同有两价或十价), 但多数抗原的价还未确定。而且只要涉及到各种抗原决定簇的化学组成, 那么同一抗原不同的价部位之间就常常截然不同。因此这些抗原的多价性只意味着与某一全抗血清相对应, 此血清包含各种抗体簇每一族都有一个化学上完全不同的抗体活性部位。即使在所有特异地针对某一特定抗原决定簇的抗体族里, 抗体活性部位在化学上十分相似, 却表现出对此决定簇有不同的亲和力。最后, 多数抗原实际上能以任何比例与其抗体结合。因此, 化学计量的概念多数情况下与 Ag-Ab 反应无关。熵在 Ag-Ab 反应中的作用也很不清楚, 尽管 Ag-Ab 网格的形成似乎必将伴随有序性的增加。但比较常见的是, Ag-Ab 复合物的形成伴随系统的熵有可测量的增加。因此, Ag-Ag 反应的热力学研究疑难很多, 这并不奇怪。这些困难使免疫化学甚至比许多其他学科更为复杂。

II. Ag-Ab 键的性质

A. 范德瓦尔斯键

在所有相距足够近的原子之间, 都存在相互吸引, 这是一个原子中出现的波动偶极子与此偶极子在另一原子中诱发出第二个偶极子相互作用而引起的。这种方式产生的原子间和分子间的力叫范德瓦尔斯-伦敦或分散力。原子间的范德瓦尔斯-伦敦作用, 当出现在大分子或颗粒中时, 都有相当程度的可加性, 因此它们相互作用的自由能 ΔF (例如在两个半无限平板平行体的构象中) 可表示为

$$\Delta F_{vdw} = -\frac{A}{12\pi d_0^2} \quad (1)$$

其中 A 是 Hamaker 系数 (它与作用物质的物理特性有关。当相互作用发生于液体介质中时, 它包括此液体的性质)。 d_0 是两平行体或分子间的平衡距离。许多物质的 Hamaker 系数可被测量或计算出 (Visser, 1972); 范德瓦尔斯-伦敦作用也能用 Lifshitz 法估计 (Visser, 1972; Israelachvili, 1974)。

在极性较强的液体 (如水) 中和极性较强的分子之间, 除了普遍存在的范德瓦尔斯-伦敦作用外, 还有永久偶极子间的相互作用 (范德瓦尔斯-基森力) 和永久的与诱导的偶极子间的相互作用 (范德瓦尔斯-德拜力)。以后所有这些范德瓦尔斯作用都统称为

范德瓦尔斯力（或范德瓦尔斯作用）。有一直接方可法测得物质 1 和 2（在液体介质³中）之间范德瓦尔斯力的总自由能 ΔF_{132} ：

$$\Delta F_{132} = \gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23} \quad (2)$$

这里 γ 代表下标所示物质间的面张力， ΔF_{132} 等于方程（1）中的 ΔF_{vdw} 。只要知道了各种物质的表面张力（ γ_{1v} ， γ_{2v} ， γ_{3v} ，此处 v 代表蒸气），方程（2）中各要素可由一状态方程和一计算机程序决定，或利用最近发表的表格（Neumann等，1980）。因此在只有范德瓦尔斯力起作用的情况下、（例如，葡聚糖-抗葡聚糖反应），Ag-Ab反应的自由能 ΔF_{vdw} 可直接从方程（2）得出（van Oss和Neumann，1977）。这里物质 1 代表抗原决定簇，物质 2 代表抗体活性部位，物质 3 代表液体介质。

作用 d ，距离越短范德瓦尔斯力就越大[见方程（1）]，抗原决定簇与抗体活性部位楔合得越好，范德瓦尔斯引力就越强。在抗原决定簇和抗体活性部位之间，以及在以范德瓦尔斯力相吸引的其他大分子和（或）颗粒之间的总距离可短至 2 Å（Israelachvili，1974；Pressman和Grossberg，1973；van Oss等，1980a），在理想情况下，约为 1.8 Å（van Oss等，1980a）。

B. 静电键

Ag和Ab间静电的或库仑的相互作用是由抗原决定簇上一个或多个离子化的部分与抗体活性部位上带相反电荷的离子之间的引力而产生的。它们通常是Ag和Ab分子的极性氨基酸上的 COO^- 和 NH_4^+ 基团。在某些半抗原-抗体系统中，离子化部位的数目和位置已被确定（Pressman和Grossberg，1973）。由于包围带电部位的扩散双离子层的屏蔽效应，此效应随周围的离子强度和带电部位间的距离变化很大，从而使离子作用能量的计算十分复杂（Gabler，1978）。但是， COO^- 与 NH_4^+ 基团处于离子强度 $u=0.15$ 的介质中，其间距离约 3 Å时，它们之间引力的自由能 ΔF_{e1} 约为 -7kcal/mol （Gabler，1978）或 -10mJ/m^2 ，而其结合能同Ag和Ab间的典型范德瓦尔斯力的结合能大致在同一数量级。这种数值上的近似十分重要。（van Oss和Neumann，1972；van Oss和Grossberg，1979；见下面）。

正如人们期望的那样，与细胞-细胞作用和细胞-粘着现象类似，纯粹（或主要的）静电的Ag-Ab相互作用不仅能通过决定簇上的负电荷部位吸引抗体上的正电位点而发生，也能通过带负电的抗原决定簇经由 Ca^{2+} 离子的连接与同样带负电的抗体活性部位结合而产生。LiberFi（1975）曾描述过这样的例子，涉及到合成的多肽（包含聚谷氨酸组分）。这种类型的Ag-Ab复合物能被络合剂乙二胺四乙酸（EDTA）分解。据我们所知，至今还没有描述过带有 Ca^{2+} 桥的天然存在的抗原。

在范德瓦尔斯力的情况下，在最短距离处静电引力最大。因此，抗原决定簇和抗体活性部位上带相反电荷的离子的准确楔合，特别是准确地并置，对静电键合非常有利。

C. 其他相互作用

氢键

氢键是诸如OH与C=O、NH与C=O和NH与OH基团间偶极子的相互作用。其结

合能与范德瓦尔斯相互作用及静电相互作用处于同一数量级。因为这些偶极子-偶极子作用只有当它们能在短程(2至3 Å)内反应时才有大量能量,所以它们要占主导地位就要求“楔合”非常准确,而且要有许多成功的偶然碰撞。但是,在Ag-Ab相互作用中,氢键在某些情况下起作用,例如,邻位取代的苯甲酸半抗原与抗-旁-偶氮苯甲酸抗体反应的情况(Pressman和Grossberg, 1973)。

疏水键

“疏水键”或“疏水效应”,在各种Ag-Ab相互作用中起着重要作用(Kabat, 1976)。但是,在水里疏水的决定簇之间的优先吸引,甚至在水中疏水的与亲水的决定簇之间较弱的吸引都起因于范德瓦尔斯相互作用(van Oss等, 1980a)。因此,没有必要另立一种定义含糊的作用模式,并统称之为“疏水效应”。这类键将作为范德瓦尔斯作用处理。

共价键

在抗原-抗体相互作用中,还没发现有共价键产生。

D. 范德瓦尔斯和静电的联合相互作用

有些Ag-Ab相互作用只涉及范德瓦尔斯相互作用。例如,当抗原是中性多糖(如葡聚糖)的情况(van Oss和Neumann, 1977),以及在兔抗P3抗体同P3间的反应中半抗原3-偶氮吡啶P3的情况,其中P3与兔血清清蛋白偶联(Pressman和Grossberg, 1973; van Oss等, 1979)。也有一些基本上只有静电键起作用的例子,如DNA-抗-DNA的情况,这里Ag带很强的(负)电荷,因而非常亲水,而抗体活性部位带有同样强的正电荷;在液体介质中,两个强亲水组分间的范德瓦尔斯引力是可以忽略的(de Groot等, 1980)。

然而,对许多多糖或糖蛋白抗原以及大多数多肽抗原,Ag-Ab键是由范德瓦尔斯和静电的共同作用而产生的。在这些事例中,19世纪Ehrlich提出的关于Ag-Ab相互作用的“钥匙”机制,包括最佳空间楔合以利于最适范德瓦尔斯吸引,以及电荷相反的离子最准确地并置,以便使静电引力最大。在以静电为主的结合中,如小牛血清清蛋白/抗小牛血清清蛋白(van Oss等, 1982b),一旦Ag和Ab由静电相互作用吸引到一起,多数情况下就会随之在抗原决定簇和抗体活性部位之间产生范德瓦尔斯引力,也可能在Ag和Ab的相邻组分间产生。当我们试图解离这种Ag-Ab复合物时,认识到所有这些事例中引力的双重性质是很重要的。

E. Ag-Ab反应的非化学计量

在可溶及不可溶Ag-Ab复合物形成过程中(见第17章),特别明显的是,抗原和抗体(以及其他形成复合物的物质,如阴离子和阳离子表面活性剂)能在很宽的比例范围内结合。因此,Ag-Ab反应基本上是非化学计量的。

F. 价

抗原-抗体反应的非化学计量对测定Ag和Ab的价产生了特殊困难。抗原的价只能

用Ab过量时形成的复合物来测定，而抗体的价只能用Ag过量时形成的复合物来测定。还有，在最适Ag/Ab比率时得到的沉淀（见第17章）接近于化学计量的Ag-Ab比例，此时Ag可能有点过量。

IgG、IgA、IgD和IgE类抗体是两价的，IgM类抗体是十价的（见第7章）。这对测量IgM类抗体对分子量略大于1000的抗原（或半抗原）的价是特别重要的；对于较大的抗原，空间阻碍效应引起IgM表观价的降低（Edberg等，1972）。分泌型IgA是四价的。

对抗蛋白质的全抗血清而言，多数蛋白质抗原是多价的。这种抗血清中包含有抗每个抗原决定簇的抗体。蛋白质抗原每个不同的价位点一般是一个抗原决定簇，每个位点的构像与其他价位点完全不同。特定的单克隆抗体只与这样的蛋白质抗原的一个价位点反应。一些重复型的生物多聚物可以是多价的，它们的所有抗原决定簇都相同（如DNA），或者它们可能只有两三组抗原决定簇，每组内的抗原决定簇完全一样（DNA也是这类Ag的一个例子）。另一方面，其他有重复性的生物聚合物也可以是单价的，如理想情况下绝对无分枝的葡聚糖，其主要抗原决定簇是末端非还原性糖（Kabat，1976）。

球蛋白的各种抗原决定簇，一般位于C末端，或位于三级构像外周凸出的地方（见第2章）。从已知价的球蛋白和类似的生物多聚物（如病毒）看，似乎（非常粗略地）每35到40个氨基酸就有一个抗原决定簇。我们可近似地估计某球蛋白的价 N 为

$$N \approx \left(\frac{M_w}{5000} \right)^{2/3} \quad (3)$$

其中 M_w 为蛋白质的分子量。

II. 热 力 学

A. 原理

用一普遍方式可将Ag-Ab相互作用总结为



反应的平衡常数是

$$K_{ass} = \frac{[Ag-Ab]}{[Ag] \cdot [Ab]} \quad (5a)$$

和

$$K_{diss} = \frac{[Ag] \cdot [Ab]}{[Ag-Ab]} \quad (5b)$$

其中 K_{ass} 和 K_{diss} 分别代表结合常数和解离常数，方括号表示（摩尔）浓度。仅在理想情况下 $K_{ass} = 1/K_{diss}$ 。实际上在许多情况下，阻止结合所需要的能量（相应于 K_{ass} ）少于使已存在的复合物解离所需的能量（相应于 K_{diss} ）。这种情况的出现可能是由于在Ag-Ab复合物刚刚形成之后不断形成额外的范德瓦尔斯键（van Oss和Neumann，1977；van Oss等，1979，1980a，1982b；见下文Karush，1976）。Ag和Ab分子量一般都很大，而摩尔浓度较低，所以这里使用摩尔浓度，而不用比较准确（测量也比较

困难)的活度。随使用的测量方法不同(见下面),可得到 K_{app} 或 $K_{\text{d,app}}$ 。考虑到多数抗原中抗原决定簇的异质性和多价性,以及这些抗原的抗血清中抗体的异质性,方程(4)和(5)都过于简单了。因而 K_{app} 和 $K_{\text{d,app}}$ 大体上被视为实际常数,它涉及到所有亚反应的平均值,单价半抗原与单价抗体反应这一理想情况除外。

不过,只要确定了实际平衡常数 K ,就可导出整个反应总的自由能变化 ΔF :

$$\Delta F_{\text{总}} = -RT \ln K \quad (6)$$

R 是气体常数($1.986 \times 10^{-3} \text{kcal}^*$, $8.3144 \times 10^7 \text{erg}^{**}$ 或 $8.3144 \text{焦耳/每Kelvin度/每摩尔}$), T 是Kelvin绝对温度。然而应强调指出的是,方程(6)只适用于标准状态,即使用的Ag和Ab浓度都为单位摩尔浓度***。形式上表述为:

$$\Delta F^\circ = -RT \ln K^\circ \quad (6a)$$

(其中上角 $^\circ$ 表示处于标准状态)。但在生理状态下,Ag和Ab的起始摩尔浓度偏离标准状态甚远,(即起始Ag与Ab之比不在平衡点),方程(6a)被改为:

$$\Delta F_{\text{生理}} = -RT \ln K^\circ + RT \ln K_{\text{生理}} \quad (6b)$$

或

$$\Delta F_{\text{生理}} = \Delta F^\circ + RT \ln K_{\text{生理}} \quad (6c)$$

(见Klotz, 1967)。在多数与免疫学有关的情况下, $\Delta F_{\text{生理}}$ 小于 ΔF° 。若想得知单个Ag和Ab分子间的结合能,那么气体常数 R 必须被阿佛加德罗常数即 6.022×10^{23} 除,得到玻尔兹曼常数 k 。这样,

$$\Delta F_{\text{生理}} = -kT \ln K^\circ + kT \ln K_{\text{生理}} \quad (6d)$$

(此处 k 为 1.38×10^{-16} 尔格/度,或 $1.38 \times 10^{-23} \text{J/度}$)。应注意,所有的(结合)平衡常数 K (方程6, 6a—d, 7)都应表述为L/mol。通过测量两个不同温度下的 K 值,可计算出焓 ΔH :

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (7)$$

利用范德霍夫方程可导出熵 ΔS :

$$\Delta F = \Delta H - T \Delta S \quad (8)$$

另一测定 ΔH 的方法是通过微量热法(见下面)。若 K 已知,则从方程(6)和(8)可算出 ΔF 和 ΔS 。从 K 得出的 ΔF 通常表述为千卡/摩尔,但如果知道了抗原决定簇(和抗体活性部位)的表面积,它的单位也可以是尔格/厘米²(或 mJ/m^2)。 ΔF 包括 ΔF_{vdw} 和 F_{el} ,若利用方程(7)通过在不同温度下建立平衡来测 ΔH ,那么至少要在三个不同温度下做这样的测定(van Oss等, 1982b)。

B. 亲和力 (affinity) 和亲合力 (avidity)

Ab亲和力和Ab亲合力的定义十分混乱。最好采纳Steward (1974)的定义,亲和力是抗体活性部位与其相应的均一抗原决定簇的结合能的一种热力学表述。我们还可引用Steward (1974)的话,特别是当抗体为单克隆时:“实验上,这个词在单价的半抗

* $1 \text{cal} = 4.1868 \text{J}$.

** $1 \text{erg} = 10^{-7} \text{J}$.

*** 这些是免疫化学中显著的“标准条件”,除非另行指明,即环境压力、温度和pH都保持恒定。参见表1末尾对“标准条件”的注解。

原-抗半抗原系统中有其最确切的应用”。亲合力，尽管它基于亲和力，还包含Ab的价，Ag的价和Ab异质性，某特定抗原的不同抗原决定簇的差异基因素。因此， $\Delta F_{\text{总}}$ [方程(6)]代表单克隆的抗半抗原抗体对其相应的单价半抗原的亲和力，一般也代表单克隆抗体对某抗原唯一的非重复抗原决定簇的亲和力。但是 $\Delta F_{\text{总}}$ [方程(6)]也可表示一类免疫球蛋白(如IgG)的一族抗体对某相应(多价)抗原的亲合力。为了区分这两个热力学符号，最好把它们分别标做 $\Delta F_{\text{总}}^{\text{aff}}$ 和 $\Delta F_{\text{总}}^{\text{av}}$ 。Karush (1976) 分别称之为固有亲和力 (intrinsic affinity) 和功能亲和力 (functional affinity)。

C. 动力学

反应的动力学研究



上面的反应可用温度跳跃松弛 (temperature jump relaxation) 和截流 (stopped-flow) 技术测定 (Froese和Sehon, 1974)。对此反应的动力学研究表明 (在半抗原-抗体系统中)，结合速率常数很大 ($k_{12} \approx 10^6$ 至 $10^8 \text{ mol/L}^{-1}/\text{S}$)，而且多数情况都接近此数量级。结合常数看来主要通过解离速率常数 k_{21} 来测定，解离过程变化大而且慢得多 (见表1，也见Pecht, 1982)。

IV. 结合和解离

A. 范德瓦尔斯相互作用

对于液体中两个不同物质之间的范德瓦尔斯相互作用，既可以是排斥的，也可以是吸引的，这一点还未得到普遍承认。在液体介质3中反应的物质1和2，我们可把方程(1)改写为：

$$\Delta F_{132} = \frac{A_{132}}{12\pi d_0^2} \quad (1a)$$

此处1和2分别代表抗原决定簇和抗体活性部位。 A_{132} 由以下各项组成：

$$A_{132} = A_{12} + A_{33} - A_{13} - A_{23} \quad (9)$$

其中 A_{ij} 分别为Ag与Ab分子 (A_{12})、液体分子之间 (A_{33})、Ag与液体分子 (A_{13})、Ab与液体分子 (A_{23}) 间范德瓦尔斯相互作用的Hamaker系数，Visser (1972) 证明 $(A_{13} + A_{23}) > (A_{12} + A_{33})$ ，此关系使得当

$$A_{11} > A_{33} > A_{22} \quad (10a)$$

和

$$A_{11} < A_{33} < A_{22} \quad (10b)$$

时 $A_{132} < 0$ 。可以证明 (van Oss等, 1980a) 实际运用时，即当

$$\gamma_{1v} < \gamma_{3v} < \gamma_{2v} \quad (11a)$$

$$\gamma_{1v} > \gamma_{3v} > \gamma_{2v} \quad (11b)$$

时的情况。其中 γ_{1v} 是有关物质对蒸气(V)的表面张力。这样，就能够把液体介质的表面张力 γ_{3v} 减少到某一值，使其介于Ag和Ab的表面张力之间 (更准确地说是介于抗原决定簇和抗体活性部位之间)，从而影响Ag和Ab间的范德瓦尔斯斥力，的确，仅由范德

表 1. 关于半抗原/抗半抗原^a和Ag-Ab反应的动力学和热力学数据

抗体	半抗原	k_{12} (mol/L ⁻¹ /s × 10 ⁻⁶)	k_{21} (s ⁻¹)	K_{ass}° (mol/L ⁻¹) × 10 ⁻⁶	ΔF° (kcal/mol)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (e.u./mol)	来源
抗-P-硝基苯	DHNS-NP ^b	1.8 ^a	760 ^a	0.6 ^c	-8.0	—	—	a
抗-二硝基苯	ϵ -N-DNP-氨基己酸	1.0 ^a	1.1 ^a	90 ^d	-11.2	-9.5	—	a
抗-二硝基苯	ϵ -N-DNP-氨基己酸	—	—	23 ^d	-10.3	-19.6	-30.4	a
抗-二硝基苯	2,4-二硝基苯胺	—	—	0.3 ^d	-7.3	-8.7	-5.2	a
抗-P-偶氮胂酸	N-对苯二甲酰苯胺-p-p'-二胂酸	—	—	0.3 ^e	-7.3	-0.8	+22	a
抗-D-苯基-(对-偶氮苯(甲酰胺基)乙酸	D-苯基-[p-(p-二甲氨基苯偶氮)]	—	—	0.3 ^e	-7.4	-7.3	+0.7	a
抗-P-偶氮苯基- β -乳糖苷	p-(p-二甲氨基苯偶氮)苯基- β -乳糖苷	—	—	0.16 ^e	-7.1	-9.7	-8.8	a
抗-SUP ^e 单克隆抗-DNP-赖氨酸	p-(p-氨基苯偶氮)-马尿酸 DNP-赖氨酸	—	—	34 ^e	-10.2	-21.6	-38	a
					-8.1	-16.6	-28.3	f

抗体	抗原	K_{ass}°	ΔF°	ΔH°	ΔS°	来源
兔抗葡聚糖抗体 (IgM)	葡聚糖	0.08	-6.6	—	—	g
兔抗葡聚糖抗体 (IgG)	葡聚糖	0.1	-6.7	—	—	g
羊抗小牛血清清蛋白 (IgG)	小牛血清清蛋白	50	-10.3	-6.5	+13	h
人抗-B抗体 (IgM)	人B红细胞	100—140	-10.8—11.0	—	—	i
人抗-A血清	人A红细胞	0.2—0.6	-6.8—7.8	-0.6—	-12.5—-16—+24	j
人抗-D抗体 (IgG)	人D(Rho)红细胞	300—1200	-10.6—-12.3	+9.4—+11.0	+74	k

a. 引自 van Oss 和 Grossbevg (1979) 及 van Oss (1981)。他们给出了个别的参考文献。在 Pecht (1982) 的文章里可找到各种系统更多的速率常数。

b. DHNS-NP: 4,5-二羧基-3-(P-硝基苯偶氮)-2,7-萘二磺酸。

c. 平衡透析法测得。

d. 荧光淬灭法测得。

e. SUP = $-(CH_2)_4NHCOCH-SCH_2CONH-\langle \bigcirc \rangle-N=N-\langle \bigcirc \rangle-CONHOH_2COO-$

f. Johnston 等 (1974)，来源于平衡透析法、荧光淬灭法和流动量热法。

g. Edberg 等 (1972)，来自 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀法。

h. van Oss 等 (1982b)，来源于最适速率下的沉淀——括号内的结果是用同一系统通过亲和和扩散得知。

i. Economidon 等 (1967)，来源于平衡测定。

j. Steane (1974)。

k. Green (1982)，用蛋白A作指示，平衡测定法得知。这是D/抗-D (“热”抗体)反应的异常吸热现象的典型例子，根据伴随反应的相变可圆满地解释这种现象(例如某液体组分的“融化”)，它与D/抗-D反应后D-抗原决定簇的不可逆变性十分吻合。

• 应当注意到，多数情况下 K_{ass}° 并非无量纲。各项浓度远少于一摩尔(对于蛋白质，如抗体，必须如此)，因而远非“标准状态”，这样从浓度计算出的 K_{ass} 就可能与实际值相差很大，从它导出的结合自由能值也就有较大偏差。

瓦尔斯键连接的Ag-Ab复合物可在中性pH下,用这种方法完全解离(van Oss等, 1979, 1980a)。细胞和大分子的表面张力可由接触角法(contact angle method)测得(van Oss等, 1975; Neumann等, 1980)。尽管在诸如葡聚糖(van Oss和 Neumann, 1977)、DNA(de Groot等, 1980)和对-偶氮吡啶(van Oss等, 1979)等例中,可测出微观和宏观的表面张力,但这样的宏观张力并非在所有情况下都能反映特定抗原决定簇和(或)抗体活性部位的微观表面张力。

当两个反应部位有相似性,或者当它们有不同的表面张力时,只要液体介质的表面张力大于或小于两部位的表面张力,范德瓦尔斯结合就会发生。范德瓦尔斯排斥只有当两个反应部位有不同的表面张力,并且仅当液体介质的表面张力介于二反应部位表面张力之间时,才会发生。当其中一个部位的表面张力与液体介质相同时,主要为零范德瓦尔斯作用。

B. 静电作用

由于抗原和抗体常常是两性蛋白质,所以Ag-Ab相互作用中静电成分的值和符号与pH值关系很大。在中性pH下带负电的抗原,其相应抗体通常带正电,反之亦然。因而,为了能够吸引,就要求pH值介于抗原决定簇和抗体活性部位的等电点之间。BSA-抗-BSA系统是一个典型例子,它在pH9.5时沉淀一点也不形成。(van Oss等, 1982b)。但是,一旦在中性pH下形成BSA-抗-BSA沉淀,那么pH9.5时它就再也不会解离,因为此时次级范德瓦尔斯键占主导地位,它不受pH变化的影响(van Oss等, 1979, 1982b)。

在低或高pH下可实现静电排斥(当Ag是蛋白质时)。当Ag带许多负电荷(如DNA)时,只有高pH才能引起静电排斥(de Groot等, 1980),而低pH只能导致趋向零静电相互作用。当Ag和Ab间静电引力成分的亲合力(Avidity)很低时,中性盐离子对电荷的屏蔽是有可能的,从而导致接近于零静电相互作用(de Groot等, 1980)。

C. 有助于Ag-Ab结合的条件

范德瓦尔斯相互作用

因为多数Ag-Ab反应是放热的[见方程(4)],所以低温一般有利于Ag-Ab结合。

这种趋势的一个熟为人知的例外,是抗D(Rh₀)抗体与D(Rh₀)-阳性红细胞间的反应,它在高温下更为强烈[见本章V.C和表1及Green(1982)]。

尽管范德瓦尔斯(特别是范德瓦尔斯-伦敦)相互作用对温度的依赖性并不强,但在高温时,范德瓦尔斯作用趋于比静电作用更占优势,并能补偿它们的下降,这常常使总结合能(ΔF)在相当大的温度范围内保持恒定(Mukker, 1980; van Oss等, 1982b)。

液体介质的表面张力(γ_{sv})大,会使 ΔF 的值很负[方程(2)],因而有利于结合。水的表面张力大, $\gamma_{sv} \approx 72.5 \text{ erg/cm}^2$,加入中性盐有助于进一步提高此值。鸡的抗体,在离子强度 $\mu = 1.5$,比在生理 $\mu 0.15$ 时更易形成免疫沉淀(Benedict, 1967),它们可能主要是通过范德瓦尔斯相互作用来结合。

静电相互作用

中性pH和相对低的离子强度能增进Ag-Ab库仑的结合(见IV.B部分)。低温特别有助于增加Ag-Ab键中的静电成分;静电键对Ag-Ab相互作用的放热起主要作用[方程(4)]; van Oss等, 1982b)。

D. 有利于Ag-Ab解离的条件

范德瓦尔斯相互作用

降低液体介质的表面张力(γ_{sv})将使 ΔF 变为正值[见方程(11a)和(11b)], 从而导致解离(van Oss等, 1979)。随着时间的推移, Ag-Ab键可能通过楔合的不断紧密而趋于变强[从而总平衡 d_0 降低了, 见方程(1)]。因而, 使特定的Ag-Ab复合物解离所要求的液体介质表面张力(γ_{sv})的值, 低于阻止其形成所要求的值(van Oss等, 1979)。如果抗原决定簇和抗体活性部位之间的液体(随时间)不断地被逐出, 不仅引起 d_0 的降低, 而且使 ΔF_{av} [方程(1)]从三元系统转变为二元系统, 那么这种效应就会大大增强。三元系统包括Ag和Ab与液体分子间的作用, 而在二元系统中, 抗原决定簇直接与抗体活性部位相互作用, 没有(现已逐出的)液体分子的干扰(van Oss和Neumann, 1977)。

静电相互作用

温度升高有助于Ag-Ab解离[方程(4)]。高或低pH有利于Ag-Ab静电键的断裂, 高pH(一般在9.5—10之间)比低pH(2—4)更有利, 而且变性较少。对于弱至中等强度的静电作用, 加盐(1至5 mol/L)也有助于解离, 但高活动力的静电键只在极端pH时解离(例如pH12, 见de Groot等, 1980)。能解离纯静电键的Ag-Ab复合物的pH值(或离子强度)并不比阻止其形成所要求的高(见上面; Smeenk等人, 1983)。

范德瓦尔斯力和静电的共同作用

实际上, 在所有Ag是蛋白质的Ag-Ab相互作用中, 以及其他Ag-Ab相互作用中, Ag和Ab间的键是范德瓦尔斯力和静电相互作用的总和。在这些情况下, 单独应用上述两种方法中的任何一种, 都不会引起解离。只有把上面讨论的两种方法结合起来(即降低液体介质的表面张力和提高其pH值), 才能使这样的组合键解离且不发生变性作用。

(van Oss等, 1979)。丙酸特别有效, 因为它能降低表面张力和pH值。这里温度升高一般也有利于解离。

在反应的静电成分亲合力为中等或较低的情况下, 提高离子强度就能引起静电键的解离(de Groot等, 1980); 当用于增加离子强度的盐能同时大大降低液体介质的表面张力时, 在中性左右的pH下, 能使所有复合物(亲合力最高者除外)完全解离。这种盐如氯化四甲基铵和氯化四乙基铵(Chadha和Sulkowski, 1981)以及氯唑二磷酸(Edwards等, 1982)。一些“促混乱”(Chaotropic)盐如盐酸胍和KCNS, 其部分解离能力也可归因于这些组合效应(见下面)。离子型表面活性剂也可用于同一目的,

但 这些化合物一般很难从分离后的Ag和（或）Ab中除去。

其他途径

对于高分子量的抗原与抗体形成的复合物，如果某半抗原可相当于抗原决定簇起作用，那么加入过量半抗原，因平衡向左移动[见方程（4）]而导致解离。

另一类方法基于抗原决定簇和（或）抗体活性部位可逆（或甚至不可逆）的变性，变性的方法诸如 6 至 8 mol/L 的尿素，极低的pH值，或“促混乱”盐等。这种处理引起大分子（Ag和Ab）三级构象的改变，这种改变导致减少Ag和Ab间的楔合，增加距离 d_0 （以及相反电荷间的距离），因而有利于部分解离；然而，这常常以一定程度的不可逆变性为代价。特别是在加了“促混乱”盐的情况下，其他效应也起作用，如离子屏蔽（见此节前面部分），介质表面张力的降低（见此节前部分）。当用盐酸胍时，这些效应相当显著，而对KCNS这些效应几乎为零。

V. 测量方法

A. 理论

测定抗原-抗体反应的平衡常数的方法通常是在抗体浓度恒定或知其变化的条件下准确测定游离和结合形式的抗原。本章后面描述了测定浓度的方法。结合实验的结果一般是用从质量作用定律[见方程（5a）]推导出的标准Scatchard绘图法（Steward 1977; Kabat, 1976）进行分析。下面就是用这些实验的数据进行热力学计算时常用方程的概况。这些推导基于Hardie和vanRegenmortel（1975）的工作，给出了两种Scatchard绘图的形式，它们可用来测定抗原的价、抗体的价或平衡常数。推导要采用游离的或结合的抗原或抗体结合位点这一概念。设 A = 总的抗原浓度（摩尔/升）， s = 抗原的价， sA = 抗原结合位点的总数（摩尔位点/升）， B = 总的抗体浓度（摩尔/升）， n = 抗体的价， nB = 抗体结合位点的总数，摩尔位点/升， y = 结合抗体的浓度（摩尔/升）， x = 结合抗原的浓度（摩尔/升）。平衡时，被占据的Ab位点（ $=ny$ ）的总数必须等于被占据的Ag位点（ $=sx$ ）的总数（即 $A = ny/s$ ），那么

$$sA - sx = sA - ny = \text{游离的Ag摩尔位点/升}$$

$$nB - ny = nB - sx = \text{游离的Ab摩尔位点/升}$$

从平衡考虑，必然有

$$(sA - sx) + (nB - sx) \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{12}} sx \quad (12)$$

根据质量作用定律，得出

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_{12}}{k_{21}} = \frac{sx}{(sA - sx)(nB - sx)} \quad (13)$$

或（用一等效的表述）

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_{12}}{k_{21}} = \frac{ny}{(sA - ny)(nB - ny)} \quad (14)$$

方程（13）除以 B/B 得

$$K_{ass} = \frac{sx/B}{(sA-sx)(n-sx/B)} = \frac{x/B}{(A-x)(n-sx/B)}$$

$$= \frac{r}{C(n-sr)} \quad (15)$$

$$\frac{r}{C} = K_{ass}(n-sr) \quad (16)$$

其中 $r = x/B$, $C = a - x$ 。方程 (14) 除以 A/A , 得

$$K_{ass} = \frac{ny/A}{(s-ny/A)(nB-ny)} = \frac{y/A}{(s-ny/A)(B-y)}$$

$$= \frac{r}{(s-nf)(d)} \quad (17)$$

$$\frac{f}{d} = K_{ass}(s-nf) \quad (18)$$

其中 $f = y/A$, $d = B - y$ 。

方程 (16) 一般被称为质量作用定律的Scatchard形式。在不同的抗原浓度下 r/C 对 sr 作图, 理论上可得到一条直线。假如已知Ag的价, 则从直线上可得知Ab的价和平衡常数 (被表述为结合常数), 从横轴 ($=n$) 上的截距可得知Ab的价, 因为

$$\frac{r}{C} \rightarrow 0 \quad ([Ag] \text{ 过量})$$

$$n-sr \rightarrow 0$$

$$n \rightarrow sr \quad (\text{其中 } s \text{ 为已知的Ag的价})$$

Ag浓度低时, 这类曲线常常偏离线性。结合常数从直线的斜率 ($\approx -nK_{ass}$) 得知。当抗原的价为1时, 方程 (16) 简写为 $r/C = K_{ass}(n-r)$, 这是在免疫化学中应用最广泛的表达式之一, 其中C在这种特殊情况下 (例如在半抗原-抗体实验中) 代表游离的或未结合的可透析抗原分子 (见图1A)。

由方程 (18) 可知, 在不同的Ab浓度下 f/d 对 nf 作图, 就有可能通过实验测定多价抗原的结合位点数。这种方法的优点在于它不受Ab价的影响。Ag的价从横轴上的截距获知, 鉴于

$$f/d \rightarrow 0 \quad ([Ab] \text{ 大大过量})$$

$$s-nf \rightarrow 0 \text{ 和 } nf \rightarrow s$$

二价抗体结合时的 s 值比一价抗体大一倍。

方程 (16) 可改写如下:

$$\frac{1}{C} = \frac{nK_{ass}}{r} - sK_{ass}$$

$$\frac{1}{nCK_{ass}} = \frac{1}{r} - \frac{s}{n}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{n} - \frac{1}{CK_{ass}} + \frac{s}{n} \quad (19)$$

因为此方程的形式与Langmuir吸附等温线的形式很相似, 所以称为Langmuir绘图法, 这样来强调Ag-Ab结合与吸附现象之间的相似性。

取某一范围的Ag浓度, $\frac{1}{r}$ 对 $\frac{1}{C}$ 作图, 可得到一直线关系, 其中斜率 $= 1/nK_{ass}$, 截距 $= 1/n$, 因而可通过实验测定Ab的价和平衡常数 (见图1B)。

Scatchard和Langmuir方程, 在Ag过量的条件下, 理论上都应该能作出直线图。

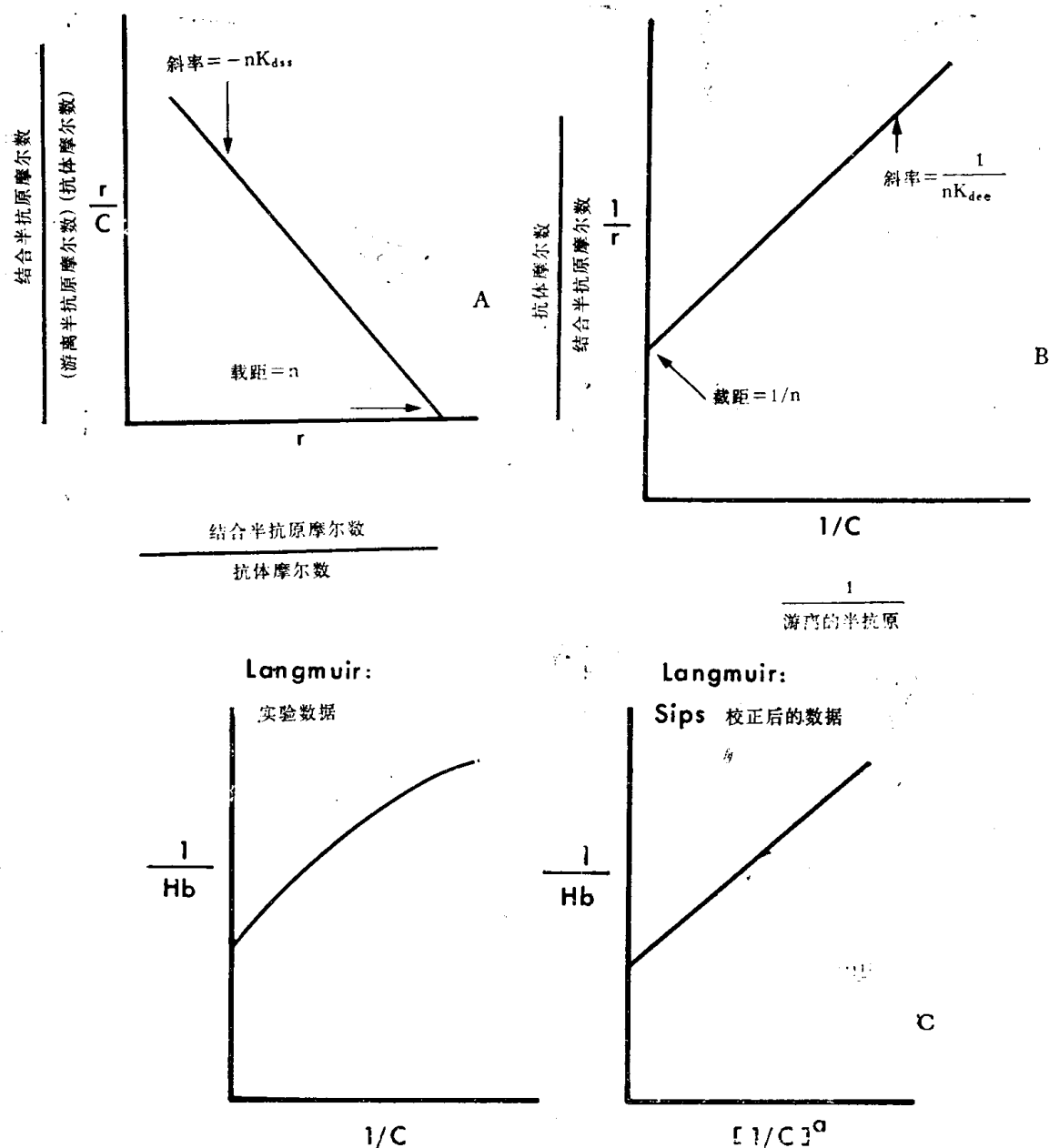


图1 (A) Scatchard图, (B) Langmuir图。 (C) Sips异质性指数。a是 $\frac{1}{C}$ 的指数, 用来减小实验曲线的弯曲, 按Langmuir图绘制得一直线。

但是, 多数抗体系统, 甚至用分离纯化的抗体, 一般还有些偏离线性。这意味着结合亲和力的差异性。其原因有: (1) 抗体对某一特殊抗原决定簇的亲合力的差异性; (2) 抗原决定簇的异质性; (3) 其他因素对抗体结合的干扰, 如空间阻碍或在结合过程中抗原决定簇的负协同效应。因而, 在Scatchard图中曲线向X轴弯曲; Langmuir图中曲线向Y轴弯曲 (见图1 A和1 B)。对于从Scatchard图外推准确的Ab价时易犯的错误, Klotz (1982) 作出了理由充分的告诫。

为了估计结合常数的异质性程度, 一般假定Ag-Ab反应的变化可用某种分布函数来描述。异质性指数表示结合常数 K_{ass} 在某平均固有结合常数附近的分布和范围。方程(16)和(18)可改写为:

$$\frac{r}{C} = K_{ass} (n - sr)$$

$$\frac{r}{n-sr} = C \cdot K_{ass} \quad (20)$$

$$\frac{\frac{f}{d} K_{ass} (s-nf)}{\frac{f}{s-nf}} = d \cdot K_{ass} \quad (21)$$

我们常常假定分布函数服从Gaussian误差函数或是Sips分布函数，后者更为方便。这样假定的前提是，当 $0 < a < 1$ 时，乘积 $C \cdot K_{ass}$ (或 $d \cdot K_{ass}$) 是一指数函数 $(C \cdot K_{ass})^a$ 或 $(d \cdot K_{ass})^a$ ，其中 a 是Sips并质指数。

这样从方程 (20) 得出：

$$\frac{r}{n-sr} = (C \cdot K_{ass})^a$$

$$\log \frac{r}{n-sr} = a \log C + a \log K_{ass}$$

从方程 (21)：

$$\frac{f}{s-nf} = (d \cdot K_{ass})^a$$

$$\log \frac{f}{s-nf} = a \log d + a \log K_{ass}$$

做完这些实验确定了 n 和 s 的值后，将 $\log[r/(n-sr)]$ 对 $\log C$ (或者 $\log[f/(s-nf)]$ 对 $\log d$) 作图，可得到最佳的线性吻合，并从直线的斜率计算出Sips异质性指数 a (见 Steward, 1977, 等) 测出的 a 值越接近 1，则结合常数异质性的范围越广。 a 值的降低相应于异质性程度的增加 (见图 1 c)。通过把两个或更多相应的抗体对同一半抗原的结合曲线 (Scatchard) 组合起来，Roholt 等对于已确知的异质性的影响能作出一种有趣的分析。图 2 说明 Scatchard 和 Langmuir 图在理论上与实验上的差别。

B. 测定Ab亲和力常数的实验方法

引言

目前有许多技术可用来测某个Ag-Ab反应的结合常数。但是，对Ab亲和力的热力学测定要求在不破坏Ag-Ab反应平衡的条件下，准确测定游离的和结合的Ag或Ag的浓度。初级反应发生后，所涉及的抗体的性质决定着Ag-Ab

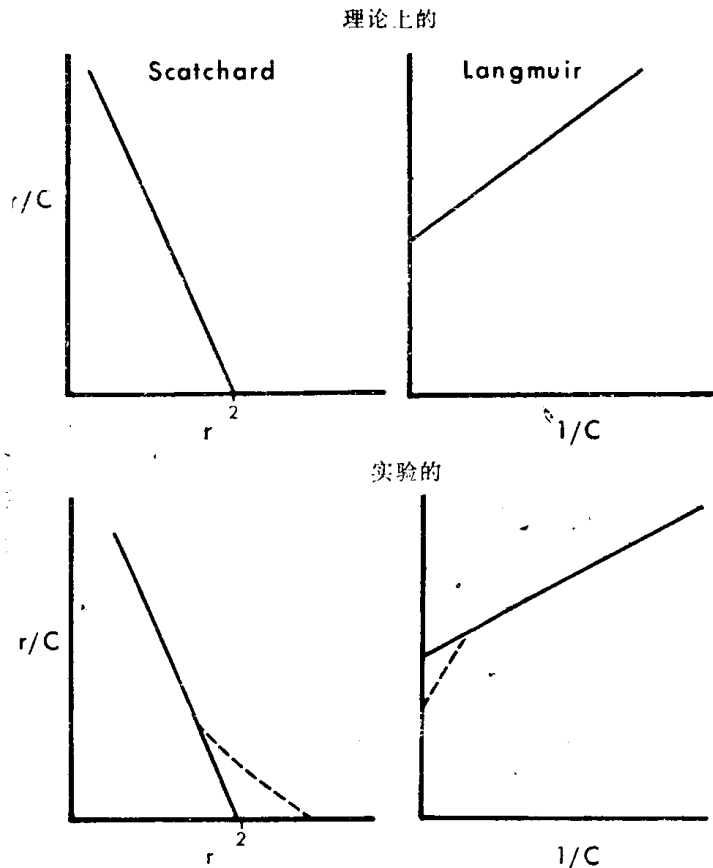


图2 理论与实验上的Scatchard和Langmuir图的比较。示出(下方)图形实际的偏离途径(虚线)如何被忽视，而主线(实线)如何简单地延伸，测知其截距。

反应的次级或三级现象（如凝集或沉淀）能否发生。考虑到影响次级或三级现象的众多变量，研究Ag-Ab相互作用性质需要采用能准确地定量测定初级反应的技术。一般来说，游离的和结合的抗原或抗体浓度的定量测定，或者用物理方法，即通过透析、选择性沉淀、离心、凝胶过滤等分离游离的和结合的组分；或者用化学方法，即利用抗原或抗体在结合后出现的性质上的变化（如荧光）。

平衡透析和超滤

当抗原比抗体分子小许多时（特别是研究半抗原-抗体反应时），平衡透析和超滤是最常用的方法。此方法要用到一种膜，它对抗原（或半抗原）通透，但对抗体分子和抗原（半抗原）-抗体复合物不通透。由于抗体的异质性，做这样的实验一般要使用不同的抗原浓度，而抗体浓度恒定，或者反过来。

平衡时，隔膜两边未结合的抗原（或半抗原）的浓度相同，在膜抗体一边的半抗原的量代表游离和结合的半抗原的总浓度。相减后可算出结合抗原（或半抗原）的量，这样从上述方法得到的数据就可算出平衡常数（Grossberg, 1973; Kabat, 1976; Steward, 1977）。

沉淀法

当抗原在抗体分子和抗原-抗体复合物不溶的条件下可溶时[例如，50%饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液，8%聚乙烯乙二醇，见第19章]，就可得到有用的数据。游离的和结合的组分的浓度很容易通过测定沉淀后的沉淀物和上清液而得知，当抗原可以放射标记时，一般用这种技术（Edberg等，1972）。快速测定亲和力时，这种方法理想的。其优点是不需要纯抗体，得出的结果与平衡透析法的结果完全一致。对于纯静电的Ag-Ab复合物，如DNA/抗-DNA，不要使用高盐浓度，因为中等或低亲和力的复合物在高离子强度下易于分解（de Groot等，1980；参见第13章II.B）。

在等价Ag/Ab比率（它可通过在凝胶中的双扩散沉淀测得，见第17章）时，通过试管中的沉淀形成，可在标准条件下测知平衡常数，进而可知 ΔF° 。然后可以把Ag或Ab放射或非放射标记，测知 $[\text{Ag-Ab}]$ ，也可知 $[\text{Ag}]$ 和 $[\text{Ab}]$ ，因为等价时 $[\text{Ag}] = [\text{Ab}]$ （van Oss等，1982b）。

分析用超离心

分析用超离心已用来测许多抗原-抗体系统的平衡常数（Kabat, 1976）。这种方法基于Ag、Ab和Ag-Ab复合物有不同的沉降速度，因此，在一重力场中，它们相互分离，可用光学方法[例如用司列伦光学（schlieren optics）]测定每个组分的量，它们相当于每个峰的面积。

平衡凝胶过滤或筛选

这项技术基于Ag、Ab和Ag-Ab复合物的分子量不同，在凝胶过滤时它们分别流出，这样可以测定各种浓度。为了不破坏平衡，这项技术要求洗脱液中有一种反应物的浓度恒定，并且一般在抗原过量的情况下进行。

不溶性抗原