



华夏英才基金学术文库

沈倍奋 陈志南 刘民培 主编

重组抗体



科学出版社

www.sciencep.com



华夏英才基金学术文库

重组抗体

沈倍奋 陈志南 刘民培 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

重组抗体技术使制备人源化抗体和人源抗体成为可能,而这是其他常规的多克隆或单克隆抗体制备方法所不可能做到的。本书共分为 22 章,向读者介绍了四个方面的技术:抗体库技术,包括组合抗体库、噬菌体抗体库、细菌和酵母展示的抗体库、核糖体展示的抗体库及其抗体库的筛选技术;重组抗体基因的改造和表达,包括抗体亲和力成熟、抗体人源化改造和稳定性改造,以及抗体基因在原核、酵母、昆虫、哺乳动物细胞、植物及转基因动物中的表达;重组抗体效应功能的提高,涉及抗体与同位素、药物、毒素结合的“导向药物”、双特异性抗体、抗体-酶融合蛋白、免疫细胞因子及细胞内抗体;抗体特异性分析和鉴定,主要介绍抗体的分离和纯化、抗体标记技术、抗体亲和力测定、抗体的抗原表位分析、抗体基因测序和结构模建,以及常用的抗体鉴定技术,如 ELISA、免疫组化、FACS 分析、免疫沉淀和 Western blot 等。

本书涵盖了当前重组抗体制备和改造中的大部分技术,因此对从事抗体研制的技术人员、生物技术公司及有关专业的大专院校师生均有一定参考价值。

图书在版编目(CIP)数据

重组抗体/沈倍奋,陈志南,刘民培主编。—北京:科学出版社,2005
(华夏英才基金学术文库)
ISBN 7-03-014638-7

I. 重… II. ①沈…②陈…③刘… III. 抗体-重组-研究 IV. R392.11
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 134455 号

责任编辑:莫结胜 彭克里 席慧 / 责任校对:包志虹

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:陈敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年5月第一版 开本:B5(720×1000)

2005年5月第一次印刷 印张:36 3/4 插页:2

印数:1—3 000 字数:723 000

定价:75.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

《重组抗体》编委会

主 编 沈倍奋 陈志南 刘民培

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

包国强 陈 伟 董红霖 冯健男 冯 强

郭 宁 韩 骅 蒋建利 黎 燕 李 玲

李学彦 李亚雄 李 郁 梁米芳 刘雪梅

刘志刚 米 力 蹇爱荣 秦卫松 商 澎

邵宁生 孙志伟 王骊丽 王贤辉 解志刚

邢金良 杨 勇 于继云 于清宏 张思河

前 言

抗体是机体防御系统的重要分子,用于识别和清除外来入侵物。为了尽可能地与各种外来物发生相互作用,免疫系统需要产生无数种特异性的抗体分子。不同抗体的全套遗传信息被储存在淋巴系统的 B 细胞中。1975 年杂交瘤技术问世,人们能够制备具有很好特异性的单克隆抗体,但这些抗体在用于人类疾病治疗时,由于单抗的异源性,会产生人抗鼠抗体反应(HAMA),同时由于抗体分子大,较难穿透血管屏障达到靶部位,而且抗体本身的效应功能有限,往往不能达到预期的杀伤靶细胞的目的。

在过去的十多年中,分子生物学的进展大大促进了抗体片段的基因操作——重组、鉴定、连接。重组抗体的基因操作不仅加深了人们对免疫球蛋白结构和功能的理解,而且通过基因融合、基因突变、重组基因表达发展了大量可用于研究、诊断和治疗的工程抗体,特别是加速了人源化抗体和人源抗体的开发,同时通过基因操作可以获得常规技术不能得到的抗体形式,使之更适合于治疗和体内诊断。到 2004 年初经美国 FDA 批准的抗体药物已有 17 种,其中 80%是重组抗体。目前正在进行临床试验的抗体药物有几百种,因此重组抗体作为药物有很广阔的前景。

本书介绍了当前重组抗体研究领域中的主要技术及发展趋势,包括抗体基因克隆,抗体库构建和筛选,抗体人源化改造和稳定性改造,抗体亲和力成熟,抗体效应功能提高及与抗体分析、鉴定等相关的技术,如抗原表位分析、抗体结构建模、抗体标记等,使人们对重组抗体的认识进一步深入。由于参与本书编写的人员较多,各部分在风格上不尽统一,有时同一目标可以用不同的方法,本书尽量采用常用可行的方法,有些地方为了方法的连续性,难免有些重复。我们的初衷是想提供一本既有一定理论,又有较强操作性的书,但重组抗体技术发展十分迅速,概念、理论和方法都在不断更新,难免有所遗漏。

本书在编写过程中得到了很多同志的支持和帮助,在此表示衷心感谢。感谢华夏英才基金资助本书的出版,感谢冯健男教授、秦卫松博士和郝付因在插图的收集和全书的审校上所做的大量工作。由于编者水平所限,本书可能存在疏漏和错误之处,恳切希望读者和同道们指正。

作 者
2004 年 8 月

目 录

前言

| | |
|-----------------------------|-----|
| 绪论 | 1 |
| 第一节 抗体分子的结构与功能 | 1 |
| 第二节 抗体多样性产生的分子机制 | 5 |
| 第三节 重组抗体的发展概况 | 14 |
| 主要参考文献 | 17 |
| 第一章 抗体基因的克隆 | 18 |
| 第一节 杂交瘤或脾细胞中抗体基因或片段的 PCR 克隆 | 18 |
| 第二节 二步克隆法 | 32 |
| 第三节 抗体基因的 RACE 克隆法 | 42 |
| 主要参考文献 | 48 |
| 第二章 组合抗体库 | 51 |
| 第一节 生物来源的抗体库 | 51 |
| 第二节 半合成抗体库 | 63 |
| 第三节 全合成抗体库 | 72 |
| 主要参考文献 | 85 |
| 第三章 天然噬菌体抗体库构建和筛选技术 | 88 |
| 第一节 天然噬菌体抗体库概述 | 88 |
| 第二节 噬菌体表面展示系统 | 90 |
| 第三节 选择感染性噬菌体与双向选择系统 | 93 |
| 第四节 Cre-LoxP 基因重组系统和高容量抗体库 | 94 |
| 第五节 高效噬菌体抗体与抗体库的高效选择 | 95 |
| 第六节 噬菌体表面展示与高亲和力抗体 | 96 |
| 第七节 天然噬菌体抗体库构建和筛选的实验方法 | 97 |
| 主要参考文献 | 116 |
| 第四章 核糖体展示技术 | 118 |
| 第一节 核糖体展示原理及特点 | 118 |
| 第二节 核糖体展示的抗体库类型及构建 | 126 |
| 第三节 核糖体展示技术具体操作实例 | 136 |
| 主要参考文献 | 141 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| 第五章 其他展示技术用于抗体库的构建 | 144 |
| 第一节 细菌表面展示技术 | 144 |
| 第二节 酵母展示技术 | 155 |
| 第三节 质粒展示技术 | 168 |
| 主要参考文献 | 174 |
| 第六章 抗体库的筛选 | 177 |
| 第一节 概述 | 177 |
| 第二节 抗体库的经典筛选法 | 179 |
| 第三节 细胞筛选法 | 186 |
| 第四节 组织筛选法 | 190 |
| 第五节 体内筛选法 | 191 |
| 第六节 蛋白质芯片筛选法 | 193 |
| 第七节 选择性感染筛选抗体库 | 194 |
| 第八节 结语 | 195 |
| 主要参考文献 | 196 |
| 第七章 抗体亲和力成熟 | 199 |
| 第一节 利用链置换和定点突变提高抗体亲和力 | 199 |
| 第二节 CDR 步移法提高抗体亲和力和特异性 | 212 |
| 第三节 结语 | 215 |
| 主要参考文献 | 215 |
| 第八章 抗体人源化改造 | 217 |
| 第一节 概述 | 217 |
| 第二节 嵌合抗体 | 217 |
| 第三节 人源化抗体 | 222 |
| 主要参考文献 | 242 |
| 第九章 重组抗体的稳定性改造 | 246 |
| 第一节 概述 | 246 |
| 第二节 重组抗体的稳定策略 | 246 |
| 第三节 dsFv 的设计、构建和表达 | 249 |
| 第四节 重组抗体及其融合蛋白的表达 | 250 |
| 第五节 细菌包含体内重组抗体的纯化及复性 | 250 |
| 主要参考文献 | 253 |
| 第十章 抗体表达 | 255 |
| 第一节 原核表达 | 255 |
| 第二节 哺乳动物细胞表达 | 259 |
| 第三节 酵母表达 | 270 |

| | | |
|-------------|--------------------------|-----|
| 第四节 | 昆虫表达 | 277 |
| 第五节 | 植物表达 | 282 |
| 第六节 | 转基因动物表达 | 288 |
| 主要参考文献 | | 292 |
| 第十一章 | 转基因小鼠产生人源抗体 | 295 |
| 第一节 | 概述 | 295 |
| 第二节 | 小鼠操作的一般规则 | 296 |
| 第三节 | 小鼠抗体基因的敲除 | 300 |
| 第四节 | 人 Ig 转基因小鼠的建立 | 314 |
| 主要参考文献 | | 320 |
| 第十二章 | 免疫结合物 | 321 |
| 第一节 | 抗体-放射性核素结合物 | 321 |
| 第二节 | 抗体-化疗药物结合物 | 325 |
| 第三节 | 免疫毒素 | 330 |
| 第四节 | 酶前体药物 | 333 |
| 主要参考文献 | | 339 |
| 第十三章 | 双特异性抗体 | 342 |
| 第一节 | 化学工程 BsAb | 342 |
| 第二节 | 细胞工程 BsAb | 344 |
| 第三节 | 基因工程 BsAb | 347 |
| 第四节 | 双特异性抗体在肿瘤诊断和治疗中的应用 | 354 |
| 第五节 | 结语 | 357 |
| 主要参考文献 | | 357 |
| 第十四章 | 抗体融合蛋白 | 359 |
| 第一节 | 概述 | 359 |
| 第二节 | 抗体-酶融合蛋白 | 359 |
| 第三节 | 抗体融合蛋白用于基因靶向性传递 | 363 |
| 第四节 | 发展前景 | 369 |
| 第五节 | 结语 | 369 |
| 主要参考文献 | | 370 |
| 第十五章 | 免疫细胞因子 | 372 |
| 第一节 | 免疫细胞因子的发展背景 | 372 |
| 第二节 | 免疫细胞因子的构建策略 | 373 |
| 第三节 | 抗体-细胞因子融合蛋白的表达系统 | 380 |
| 第四节 | 几种类型的免疫细胞因子 | 382 |
| 第五节 | 免疫细胞因子的构建及表达的操作方案 | 388 |

| | |
|---------------------------|------------|
| 第六节 结语 | 395 |
| 主要参考文献 | 396 |
| 第十六章 细胞内抗体 | 397 |
| 第一节 概述 | 397 |
| 第二节 单链抗体在细胞内不同部位表达的载体 | 397 |
| 第三节 scFv 片段在细胞内不同部位的表达 | 399 |
| 第四节 实验方案 | 399 |
| 主要参考文献 | 405 |
| 第十七章 抗体的分离和纯化 | 406 |
| 第一节 概述 | 406 |
| 第二节 盐析 | 407 |
| 第三节 离子交换层析法 | 412 |
| 第四节 亲和层析法 | 418 |
| 主要参考文献 | 426 |
| 第十八章 抗体标记 | 430 |
| 第一节 酶标记技术 | 430 |
| 第二节 荧光素标记技术 | 435 |
| 第三节 放射性核素标记技术 | 442 |
| 主要参考文献 | 451 |
| 第十九章 抗体亲和力测定 | 452 |
| 第一节 概述 | 452 |
| 第二节 电泳条带迁移法 | 452 |
| 第三节 竞争 ELISA 法 | 456 |
| 第四节 表面等离子共振法 | 457 |
| 第五节 噬菌体抗体片段亲和力的石英晶体微天平测定法 | 459 |
| 主要参考文献 | 462 |
| 第二十章 抗体的抗原表位分析 | 464 |
| 第一节 用 SPOT 法合成的肽定位抗原表位 | 464 |
| 第二节 随机肽库定位抗原的表位 | 470 |
| 第三节 用基因片段文库定位抗原表位 | 477 |
| 主要参考文献 | 486 |
| 第二十一章 抗体基因测序和结构模建 | 487 |
| 第一节 抗体基因测序 | 487 |
| 第二节 抗体结构模建 | 493 |
| 主要参考文献 | 509 |

| | |
|---------------------------|-----|
| 第二十二章 抗体鉴定技术 | 510 |
| 第一节 ELISA | 510 |
| 第二节 免疫组织化学 | 516 |
| 第三节 流式细胞术 | 529 |
| 第四节 免疫沉淀 | 536 |
| 第五节 蛋白质印迹 | 543 |
| 主要参考文献 | 555 |
| 附录 1 常用的数据 | 557 |
| 附录 2 试剂 | 560 |

绪 论

抗体是体液免疫应答的主要效应分子,存在于血液和组织液中。它们能特异性结合或识别入侵的病原微生物,因此构成机体防御系统的重要组成部分。具有抗体活性或化学结构上与抗体相似的球蛋白称为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。抗体属于蛋白质,它具有蛋白质的一般性质,即不耐热,能被多种蛋白酶水解,蛋白质变性剂亦能使抗体失活。

第一节 抗体分子的结构与功能

一、抗体分子的基本结构

所有抗体分子都有相似的结构,都由两条相同的重链(heavy chain, H链)和两条相同的轻链(light chain, L链)组成4条肽链的对称结构,轻、重链链内和链间分别借助二硫键相连(图0-1)。轻链分子质量约25kDa,而重链分子质量为50kDa左右。轻链有两个型:kappa (κ)链和 lambda (λ)链。一个抗体分子只能具有两型轻链中的一种,它们的比例在不同物种是不同的,小鼠抗体的 κ/λ 是20/1,而人抗体中该比例为2/1。重链有五类: μ 、 δ 、 γ 、 α 、 ϵ 链。五类重链决定了抗体的类别(class):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。其中有些类别还可再分亚类,例如,人IgG有四个亚类:IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄; IgA有两个亚类:IgA₁和IgA₂。小鼠IgG也有四个亚类:IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}和IgG₃。

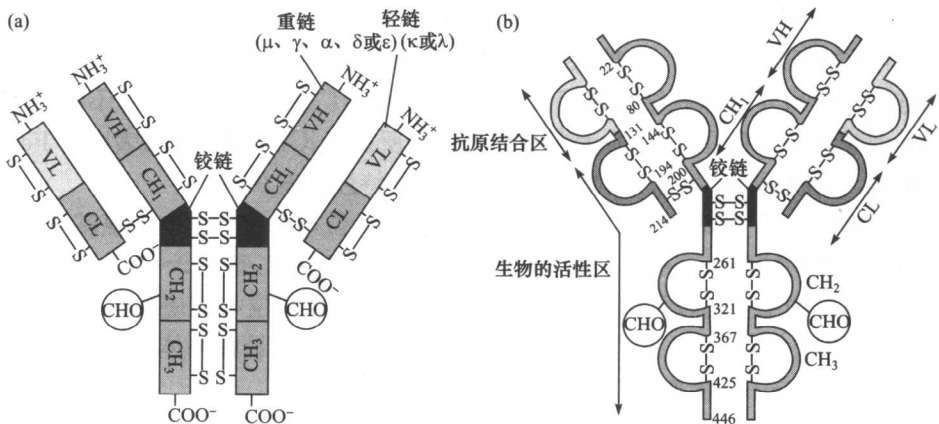


图0-1 抗体分子结构

二、抗体分子的精细结构

分析抗体分子的氨基酸序列后发现:肽链在氨基端序列变化很大,而其余部分变化不大,因此,将变化大的区域称为轻链或重链可变区,它们占轻链的 1/2、重链的 1/4;肽链上变化不大的区域称为轻链或重链恒定区,恒定区占轻链的 1/2、重链的 3/4(图 0-1)。它们的氨基酸数量、种类、排列顺序及含糖量都比较恒定,同一物种、同一类别的 Ig 恒定区氨基酸只有少数差别,但不同物种或不同类别的 Ig 则差别很大。可变区与抗原识别有关,决定抗体识别的特异性,而恒定区参与免疫应答,具有许多重要的生物学功能。

轻、重链可变区分别由 110 个左右氨基酸组成,其中有些区域的氨基酸残基变化较可变区的其他部位更大,如轻链第 24~34、50~56、89~97 位和重链第 31~35、50~65、95~102 位。这些区域称为高变区(hypervariable region, HVR),由于高变区是抗体与抗原表位直接接触的部位,因此又称为互补决定区(complementarity-determining region, CDR)。可变区中的非高变区,其氨基酸组成与序列变化相对较少,这些氨基酸残基组成可变区稳定的立体结构,即框架结构或支架结构/framework region, FR),它们夹持着 CDR,可变区的 3 个 CDR 分别被 FR1、FR2、FR3、FR4 隔开。根据 Kabat 库的资料,抗体分子各区段的氨基酸编号见表 0-1。

表 0-1 抗体分子轻、重链可变区氨基酸顺序的编号

| V 区 | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 |
|-----|------|-------|-------|-------|-------|--------|---------|
| H | 1~30 | 31~35 | 36~49 | 50~65 | 66~94 | 95~102 | 103~113 |
| L | 1~23 | 24~34 | 35~49 | 50~56 | 57~88 | 89~97 | 98~107 |

抗体的 4 条肽链中,不管是可变区还是恒定区都由折叠的球状结构域(domain)组成,每个结构域约由 110 个氨基酸残基组成。除了可变区外,IgG、IgA、IgD 的重链恒定区均由 3 个球状结构域组成,分别为 CH₁、CH₂、CH₃;IgM 和 IgE 重链恒定区由 4 个球状结构域组成,即多一个 CH₄。各结构域的功能不同,一般 CH₁ 是遗传标志所在区,CH₂ 是补体结合位点所在区,CH₃ 能与细胞表面的 Fc 受体结合,行使抗体的功能。各类人免疫球蛋白的特性见表 0-2。

在重链 CH₁ 尾部和 CH₂ 头部,位于 209~240 位,有一个约 30 个氨基酸残基组成的柔性的铰链区(hinge region),其中脯氨酸含量较高,并有 2~5 个链间二硫键。铰链区的主要功能是调节抗体可变区上抗原结合部位与相应的抗原表位匹配,促进抗原-抗体结合,此外也有利于 Ig 分子构象变化,暴露补体结合位点。至此,完整抗体分子结构如图 0-1 所示。

表 0-2 各类人免疫球蛋白的特性

| Ig 类别 | 分子质量 /kDa | 正常血清水平 / (mg/ml) | 体内半寿期/天 | 激活经典补体途径 | 通过胎盘 | 成熟 B 细胞膜上 | 结合吞噬细胞的 Fc 受体 | 黏膜转运 | 诱导肥大细胞脱颗粒 |
|------------------|-----------|------------------|---------|----------|------|-----------|---------------|------|-----------|
| IgG ₁ | 150 | 9.0 | 23 | + | + | - | ++ | - | - |
| IgG ₂ | 150 | 3.0 | 23 | +/- | +/- | - | +/- | - | - |
| IgG ₃ | 150 | 1.0 | 8 | ++ | + | - | ++ | - | - |
| IgG ₄ | 150 | 0.5 | 23 | - | + | - | + | - | - |
| IgA ₁ | 150~600 | 3.0 | 6 | - | - | - | - | ++ | - |
| IgA ₂ | 150~600 | 0.5 | 6 | - | - | - | - | ++ | - |
| IgM | 900 | 1.5 | 5 | +++ | - | + | ? | + | - |
| IgE | 190 | 0.0003 | 2.5 | - | - | - | - | - | + |
| IgD | 150 | 0.03 | 3 | - | - | + | - | - | - |

在研究抗体分子结构的过程中发现有些部位很容易被蛋白酶水解。已知木瓜蛋白酶在一定条件下可将 IgG 裂解成 3 个单独的片段,其中 2 个片段完全相同,分子质量约 45kDa,由带轻链的重链 VH-CH₁ 片段组成,这些片段仍具有结合抗原的能力,称为抗原结合片段(即 Fab)。第三个片段含有 γ 重链的 CH₂ 和 CH₃,该片段由于较易被结晶,因此称为结晶片段(即 Fc)。用胃蛋白酶代替木瓜蛋白酶裂解 IgG 分子,在 CH₂ 区域被切断,产生一个大片段和一些小片段。大片段由两个 Fab 和连接的铰链区组成,是双价的,能同时结合两个表位,因而能起沉淀和凝集反应。

三、抗体分子的立体构型

各类 Ig 的 X 射线晶体衍射分析显示,其分子的折叠基本相似。免疫球蛋白的结构域折叠成一种特有的紧密的结构称为免疫球蛋白折叠 (immunoglobulin

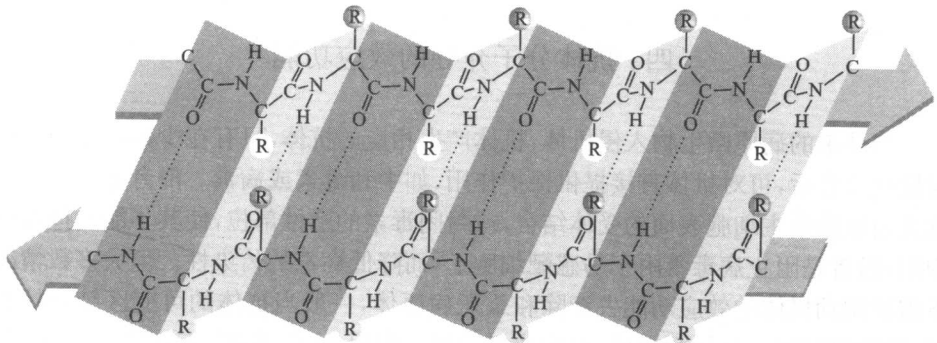


图 0-2 β 片层结构

免疫球蛋白多肽链来回折叠成多股,属于 β 折叠结构,其走向与分子结构的长轴平行,相邻的两条 β 链为反向平行,形成 β 片层, β 链间由氢键相连,氨基酸侧基垂直于片层平面

fold)。这种结构由两个 β 折叠片层(β -sheet)组成,每个片层含有反向平行的 β 链,它们由不同长度的 loop 相连,片层内部的 β 链通过氢键将一个链上的氨基与相邻链的羧基相连,此外亲水性氨基酸与疏水性氨基酸交替排列于片层平面的垂直方向。疏水性氨基酸向内,亲水性氨基酸向外。两个 β 片层间通过疏水相互作用和二硫键稳定(图 0-2 和图 0-3)。

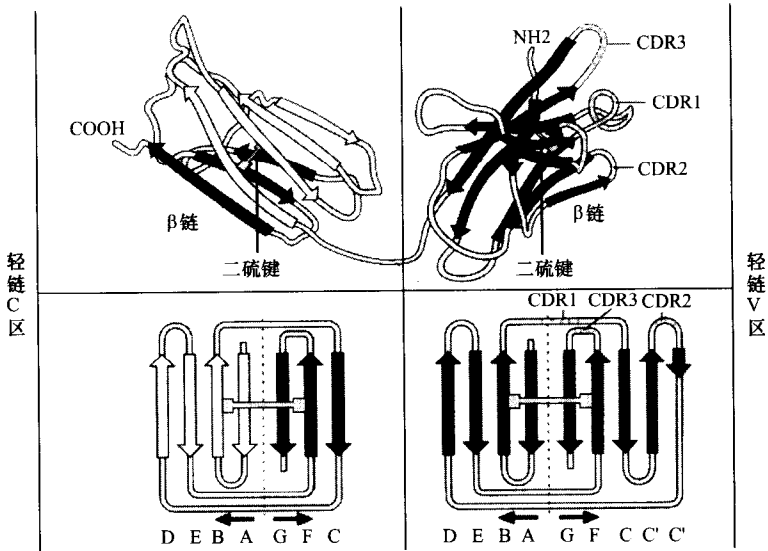


图 0-3 免疫球蛋白轻链可变区和恒定区的折叠图

每个结构域由两个 β 片层经链内疏水相互作用和二硫键联系在一起。组成每个片层的 β 链显示不同灰度的颜色。其中高变区为 CDR1、CDR2、CDR3(图上半部), β 片层打开后的单个 β 链和连接环(joining loop)间的关系显示在图的下半部分,可见,可变区较恒定区多两条 β 链

四、抗体分子介导的效应功能

当外来的病原微生物入侵机体,机体产生相应的抗体,只有在少数情况下抗体与抗原结合后,可对机体直接提供保护作用,如中和毒素或病毒。前者是通过阻断毒素与敏感宿主细胞表面的受体结合,或封闭毒素的活性部位,使其不能发挥毒性作用;后者是阻止病毒吸附于易感靶细胞上,而降低病毒的传染性。但大多数情况下需要调动机体的效应功能去清除和杀死病原体,一般当抗体的可变区结合抗原时,重链恒定区与其他蛋白质、细胞或组织相互作用,产生体液反应的效应功能,并非所有类型的抗体都有同样的效应功能。抗体分子介导的效应功能大都是通过 Fc 段引起的,因此它与抗体的类及亚类有关。现将抗体的主要效应功能做一介绍。

(一) 调理作用 (opsonization)

IgG 类抗体与颗粒性抗原(如细菌)结合后,其 Fc 段与吞噬细胞,如巨噬细胞、嗜中性粒细胞表面的 Fc 受体(FcR)结合,促进吞噬细胞对抗原的吞噬作用。单个 FcR 和单个抗体的 Fc 相互作用是非常弱的,几个抗体的 Fc 与同一个靶细胞同时结合,则产生非常强的相互作用,引发一系列信号通路的激活,使抗原-抗体复合物被吞噬。

(二) 激活补体

人类的 IgM 和大部分 IgG 抗体亚类(IgG₁、IgG₂、IgG₃)能通过经典途径激活补体,在 IgG 中结合补体的能力依次为 IgG₃ > IgG₁ > IgG₂ > IgG₄,实际上后两者激活补体的能力很弱。抗体只有与抗原结合成复合物后才能有效地激活补体,当抗原抗体结合后,抗体铰链区发生构型改变,使 Fc 段的补体结合部位暴露,补体成分 C1 与之结合,并被激活,导致补体其他成分,如 C1r、C1s、C4、C2 的连续激活,形成具有酶活性的 C3 转化酶,后者进一步酶解 C3 并形成 C5 转化酶,裂解 C5,然后开始通过 C6、C7、C8、C9 的序贯结合形成攻膜复合物(membrane attack complex, MAC)。补体激活后产生多种生物效应:细胞裂解、免疫黏附及调理作用、促进炎症反应和免疫调节作用。

(三) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)

抗体与靶细胞表面的抗原结合后,可通过其 Fc 段与巨噬细胞和 NK 细胞、中性粒细胞等细胞膜上带有 FcγR 的杀伤细胞相结合,由 FcγR 传递激活信号,通过这些激活的细胞释放 TNF、IFN-γ 等细胞因子,促进对靶细胞的杀伤作用。其中以 NK 细胞为主,它带有 FcγRIII,这是一种低亲和力受体,只能与结合于细胞表面抗原的 IgG 结合,不能结合循环中的单体 IgG。

第二节 抗体多样性产生的分子机制

人和小鼠编码抗体重链和 κ、λ 轻链的基因位于不同的染色体上,见表 0-3。

表 0-3 人和小鼠抗体基因的染色体定位

| 基因 | 重链 | κ 轻链 | λ 轻链 |
|----|-------|------|-------|
| 人 | 14q32 | 2p12 | 22q11 |
| 鼠 | 12F1 | 6c2 | 16 |

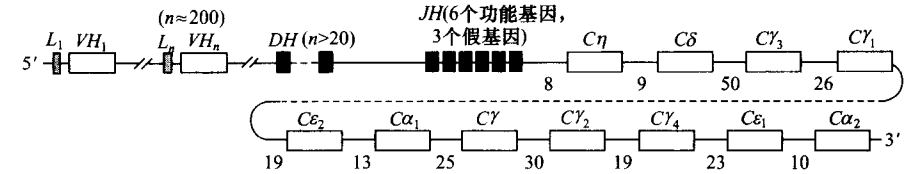
一、重链基因组、 κ 轻链基因组和 λ 轻链基因组结构

人重链基因组包括:先导序列基因(leader sequence, *L*)、可变区基因(variable region, *VH*)、多样性基因(diversity, *D*)、连接基因(joining, *JH*)和恒定区基因(constant region, *CH*)。它们之间被非编码的 DNA 隔开(图 0-4)。每个 *VH* 基因片段的 5'端有两个 *L* 基因,它们分别编码先导肽 N 端约 15 或 16 个氨基酸和 C 端 4 个氨基酸。先导肽的主要功能是引导重链穿越内质网,进入内质网腔,穿膜后先导肽被酶水解。人重链基因组中有百余个 *VH* 基因片段,共分 7 个亚群,其中无功能的假基因(pseudogene)占 1/2~2/3;具有可读框(open reading frame, ORF)能进行重排、转录和表达的功能性 *VH* 基因片段约 50 个左右。人的 *D* 基因片段接在 *VH* 基因片段之后,在 *JH* 基因群的 5'端,其特点是序列和长度多变。*D* 基因片段编码 5~9 个氨基酸,人类约有 30 个功能性 *D* 基因片段。Ig 基因重排时 *DH* 与 *JH* 首先重组,再进行 *VH-DH-JH* 重组。*VH-DH* 连接处、*D* 基因片段及 *DH-JH* 连接处编码的肽段构成 *VH* 的 CDR3。人类有 9 个 *JH* 基因片段,其中 3 个为假基因,6 个是有功能的,编码 15~17 个氨基酸,构成 *VH* 的 FR4。恒定区基因片段位于 *JH* 基因的 3'端,但它们之间有约 1000 多个碱基的间隔,其中有增强子等调控元件。人类有 11 个恒定区基因,其中 2 个为假基因,9 个功能性 *C* 基因,从 5'端起为 μ 、 δ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 4$ 、 ϵ 及 $\alpha 2$ 。除 δ 基因外,其他 8 个基因的 5'端都有一段非编码的特殊序列,称为转换区(switch region, *S*),*S* 区是重组酶识别的部位,在 Ig 的类别转换中起重要作用。每个恒定区基因由 4~6 个外显子组成,它们分别编码相应的恒定区功能域。

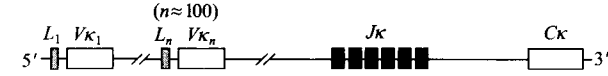
人类 κ 轻链基因组由 3 个分离的基因片段组成,即 *V κ* 、*J κ* 和 *C κ* 基因(图 0-4)。*V κ* 基因编码 κ 轻链可变区 1~95 位氨基酸,在基因组上约有 80 个左右,其中约 40~50 个 *V κ* 基因是有功能的。*J κ* 基因片段有 5 个,恒定区 *C κ* 基因为 1 个。*V κ* 与 *J κ* 基因片段重组后编码 κ 链可变区,其中第 26~32、48~55 位氨基酸为 CDR1 及 CDR2 区,*V κ* 与 *J κ* 基因连接处编码 CDR3。*J κ* 与 *C κ* 基因间也有增强子序列。

人类 λ 轻链也有 3 个基因编码,即 *V λ* 、*J λ* 和 *C λ* (图 0-4)。 λ 轻链基因的结构与 κ 链不同,具有多个 *C λ* 恒定区基因,每个 *C λ* 基因有其自己的 *J* 基因片段,形成 *J-C* 结构,*J λ* 和 *C λ* 之间有插入序列,这种 *J λ -C λ* 结构共 7 个,其中 4 个有转录功能。根据测序结果发现有百余个 *V λ* 基因,但只有 30 多个为功能性基因,共分 10 个亚群,其余均为假基因。*V λ* 与 *J λ* 重组后形成有功能的 λ 轻链基因,它们编码的功能区与 *V κ* 相似,有 CDR1、CDR2 及 CDR3。

重链定位于14号染色体



κ 链定位于2号染色体



λ 链定位于22号染色体

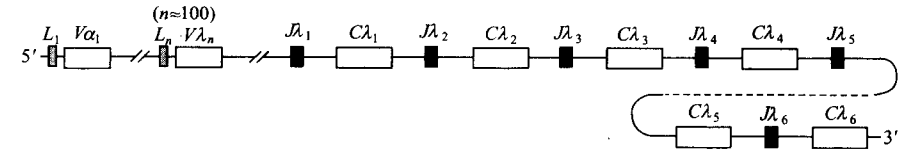


图 0-4 人 Ig 重链、轻链基因结构

二、抗体基因片段的重排及其机制

所有细胞的胚系基因组中都有 Ig 基因,但只有骨髓干细胞向 B 淋巴细胞方向分化成熟时,才发生免疫球蛋白基因的重排,使在不同染色体上的、由非编码序列隔开的 V、D、J 基因片段组合在一起,成为有功能的基因,编码抗体的不同功能域。

(一) 可变区基因重排

在 B 细胞发育过程中重链可变区基因首先重排,然后是轻链可变区基因。最后每个 B 细胞只含有一个功能性重链可变区 DNA 序列和一个轻链可变区 DNA 序列,每个这样的 B 细胞产生一种特异性抗体。重链可变区基因重排包括两个独立的过程,首先是 D-J 重排,一个 D 基因片段与一个 JH 基因连接起来,然后进行 V-DJ 重排(图 0-5),重排的基因编码完整的重链可变区。

轻链可变区基因由 V-J 重排完成,任何一个 Vκ 或 Vλ 基因与某个 Jκ 或 Jλ 基因经基因重排连在一起,成为有功能的可变区基因(图 0-5),编码轻链可变区。

(二) 可变区基因重排的机制

免疫球蛋白基因重排是通过一组酶的催化作用而完成,这一过程包括:识别重组信号、切断以及修复 DNA 等。在每个胚系 V、D 和 J 基因片段的两侧存在独特的重组信号序列(recombination signal sequence, RSS)。V 基因的 3' 端、J 基因的