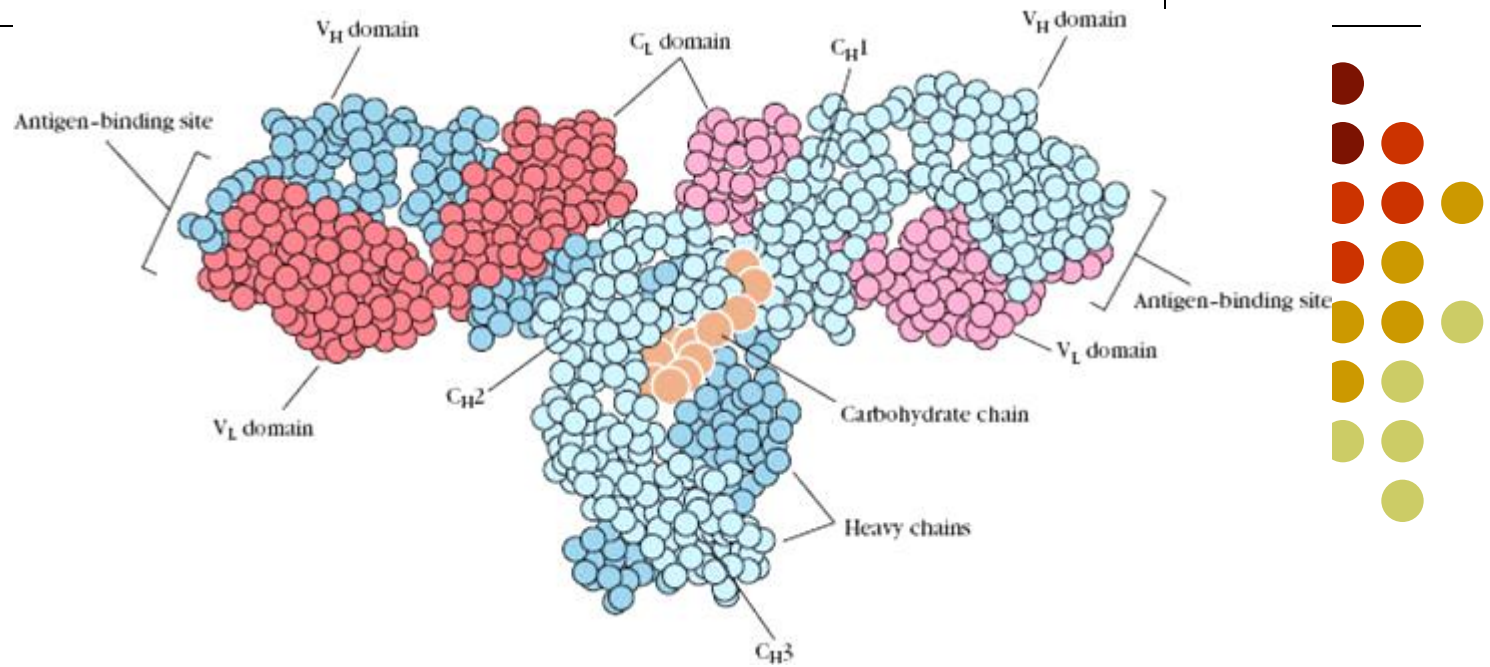


# 第四章 抗体



# 目 录

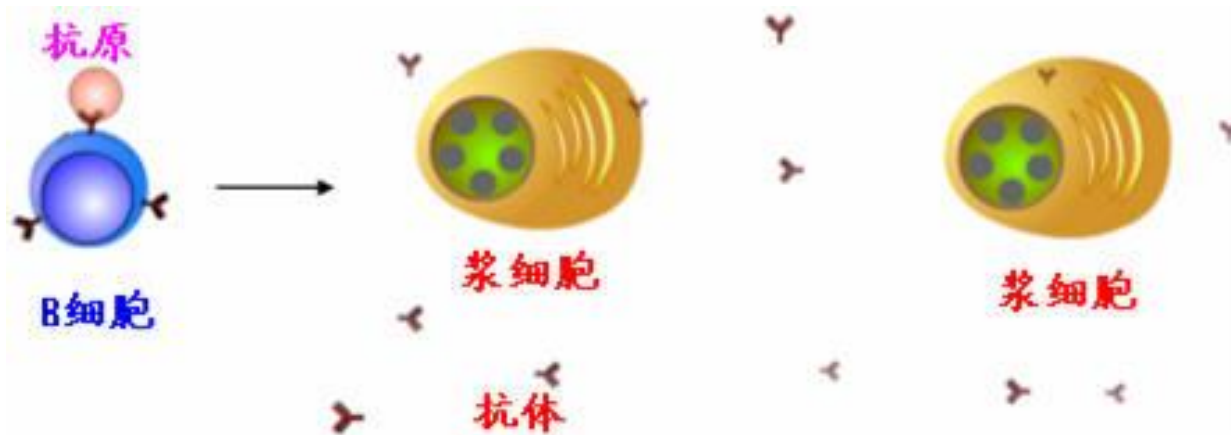


- 第一节 抗体的结构与功能
- 第二节 抗体的分类与生物学功能
- 第三节 抗体的基因与表达
- 第四节 其它Ig简介



## ➤ 抗体（antibody, Ab）

当机体受到抗原物质刺激后，由B淋巴细胞转化为浆细胞产生的能与相应抗原发生特异性结合反应的免疫球蛋白。



# Ab的发现



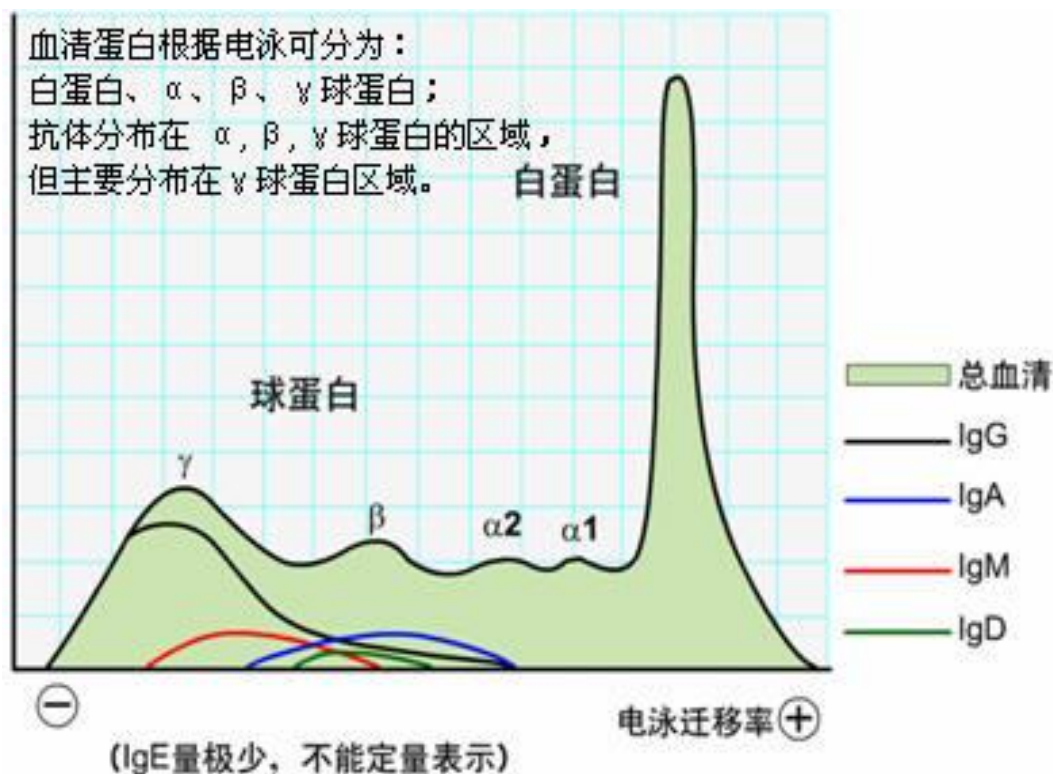
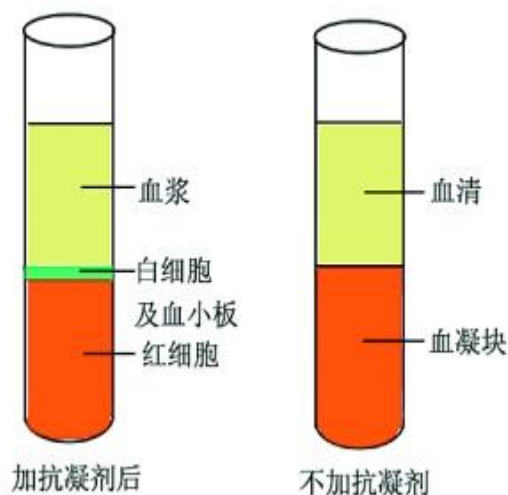
1890年，Behring 在德国 Koch 实验室从免疫的动物体内发现了第一种抗体：**白喉抗毒素**，从而挽救了成千上万的白喉患儿，使得死亡率从60%降到26%，因此于1901年获第一届诺贝尔奖。



# 第一节 抗体的结构与功能



抗体存在于体液或血液中。血液或者血浆凝固后，析出的黄色液体称为血清，含大量能与相应抗原结合的抗体分子。



正常人血清电泳分离图

## ➤ 免疫球蛋白（Immunoglobulin, Ig）

1964年世界卫生组织召开会议，对具有抗体活性或化学结构与抗体相似的球蛋白，统一命名为免疫球蛋白。

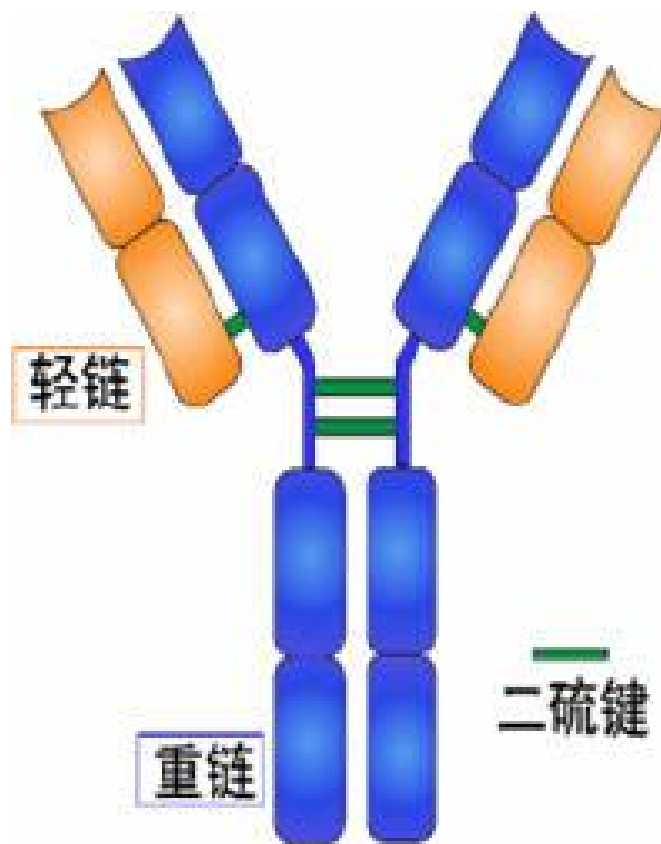
### 抗体与免疫球蛋白概念异同：

- 抗体侧重于生物学活性的描述；免疫球蛋白侧重强调其化学结构
- 当免疫系统受到抗原刺激时，就会产生免疫应答，产生免疫致敏细胞和免疫球蛋白，免疫球蛋白能和原来的刺激抗原结合，称为具有免疫活性。
- 抗体是具有免疫活性的免疫球蛋白，但免疫球蛋白不一定是抗体，如恶性骨髓瘤产生的免疫球蛋白虽然分子结构相同，但不具有免疫活性，因此不称之为抗体。

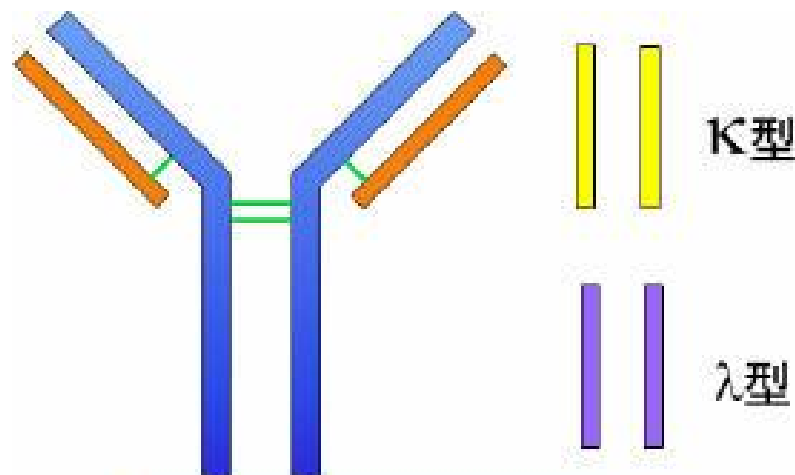
## 1.1 抗体的基本结构



- ✓ Ig分子的基本结构是由四肽链组成的，即
  - 二条相同的分子量较小的肽链（轻链，约214个氨基酸）。
  - 二条相同的分子量较大的肽链（重链，约450-550个氨基酸）组成。
- 单体是构成所有抗体的基本结构。单体间可以通过连接链J链组合为二聚体、五聚体。



- 



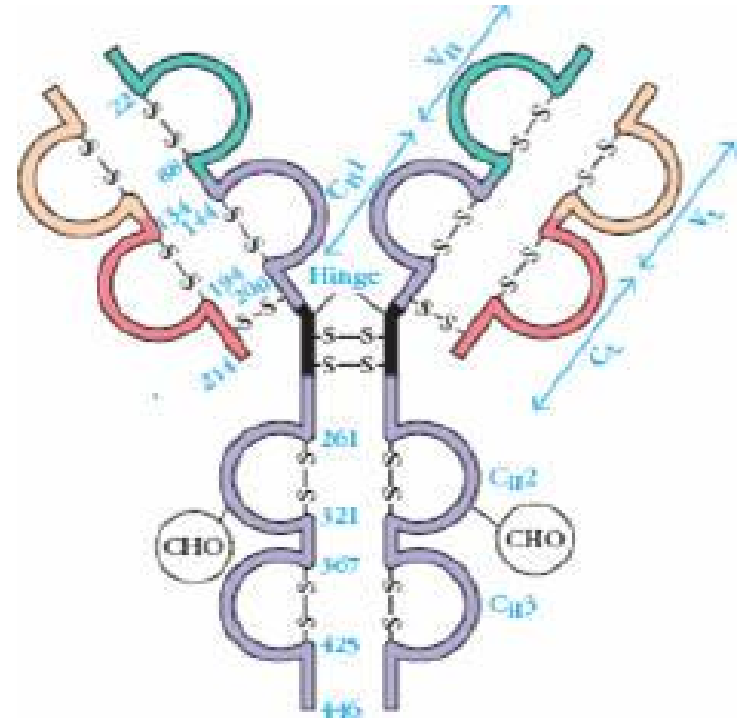
人:  $\kappa : \lambda = 2 : 1$   
 小鼠:  $\kappa : \lambda = 20 : 1$   
 牛:  $\kappa : \lambda = 1 : 20$





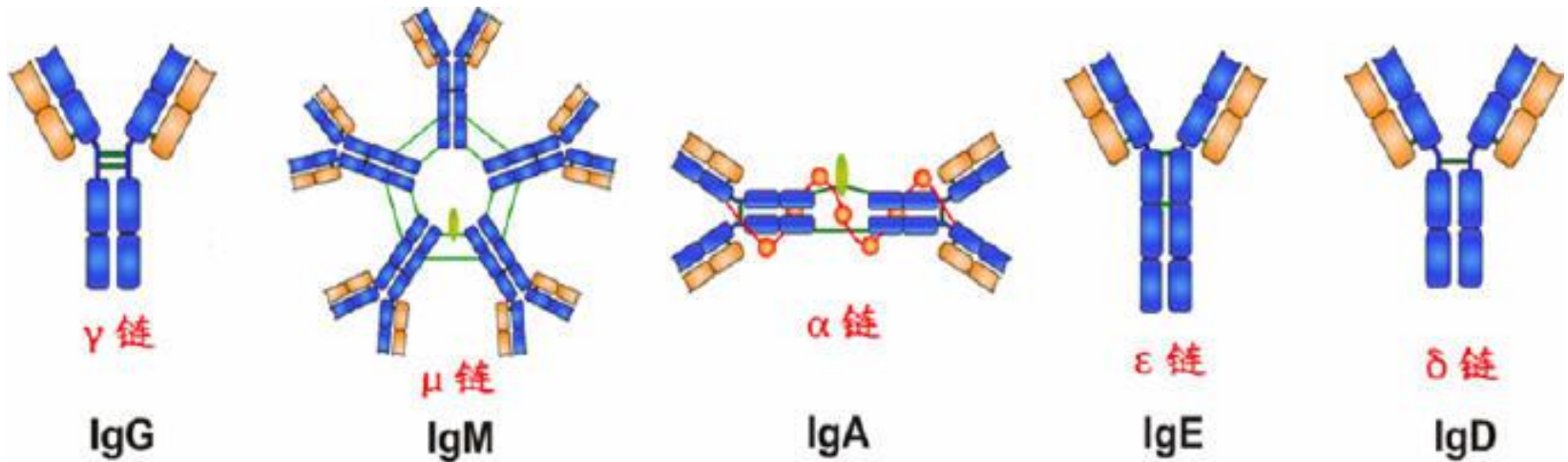
### 1.1.2 重链 (Heavy chain, H链)

- (1) 由450-550个氨基酸组成，分子量55-75kD。
- (2) 含糖数量不同。
- (3) 4-5个链内二硫键。





(4) 根据H链抗原性的不同，将重链分为： $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 。由它们组成的Ig分别为：IgG、IgA、IgM、IgD、IgE。

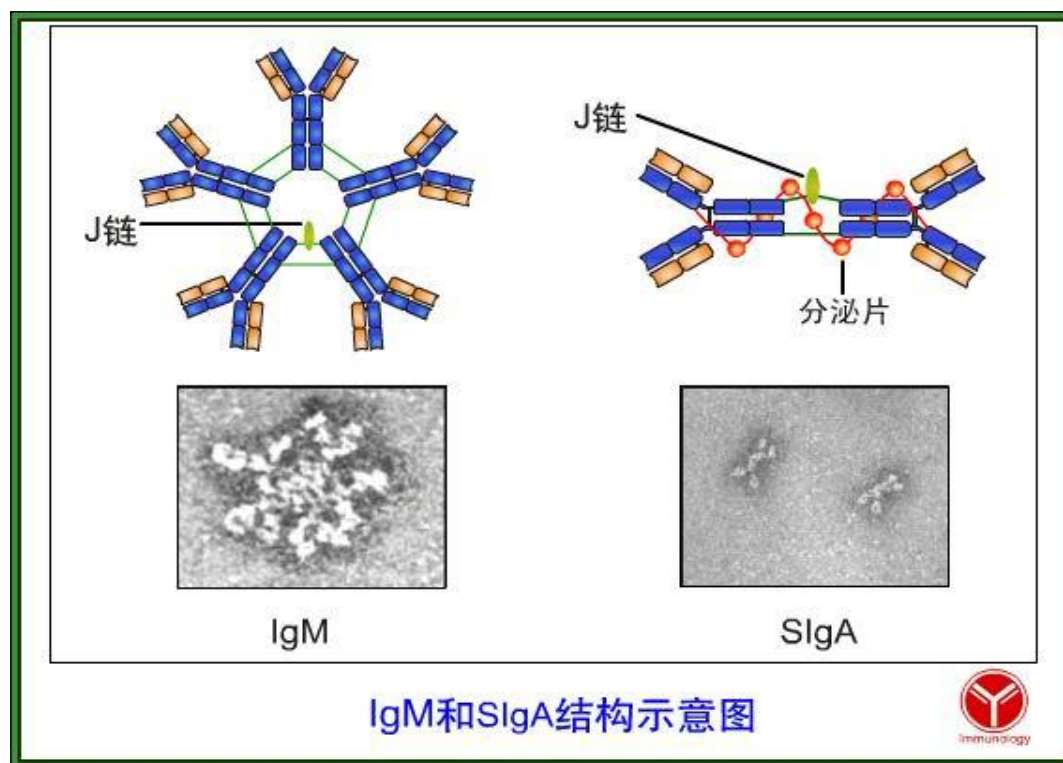


### 1.1.3 其它成分

(1) 连接链 (joining chain, J链)

(2) 分泌片 (secretory piece, SP)

单体是构成所有抗体的基本结构。连接链J链以二硫键连接到 $\mu$ 链或 $\alpha$ 链的羧基端，对抗体二聚体、五聚体的组成及在体内转运具有一定的作用。

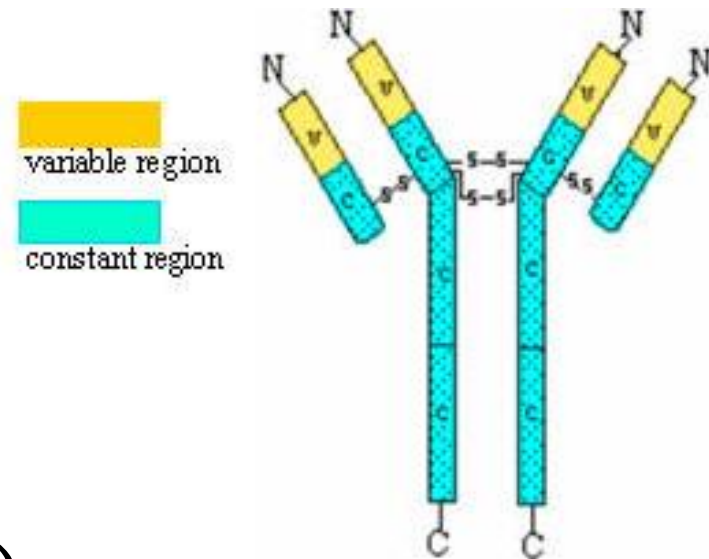




## 1.2 可变区和恒定区

通过对H链或L链的氨基酸序列比较分析，发现：

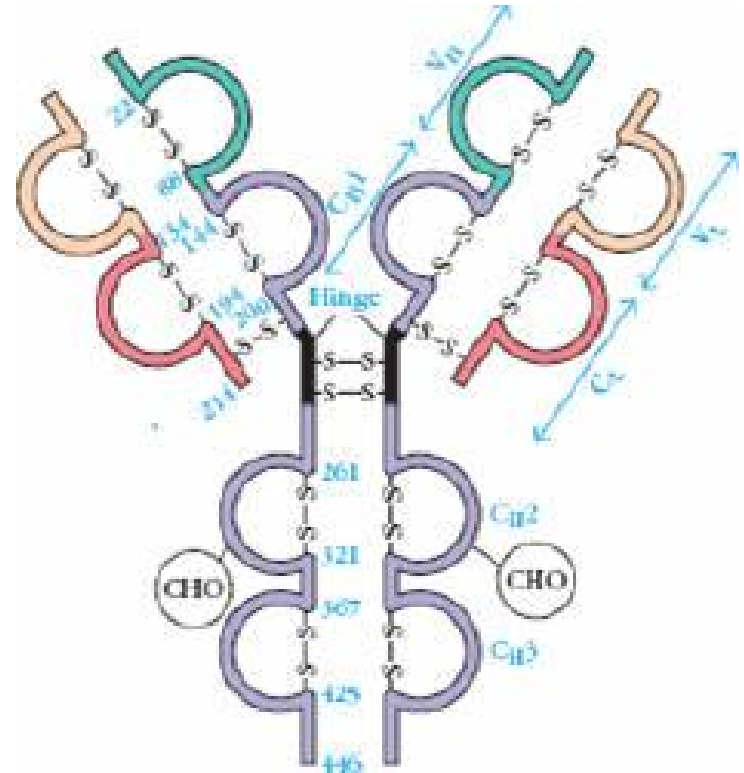
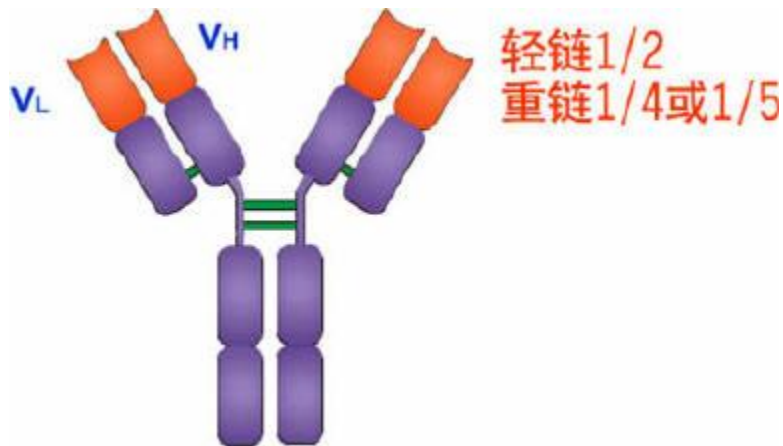
- N-末端L链的1/2和H链的1/4长度的氨基酸序列变化很大，称此区为可变区（variable region, V区）；
- C-末端L链的1/2和H链的3/4长度的氨基酸则
- 相对稳定，变化很小，称此区为恒定区（constant region, C区）。





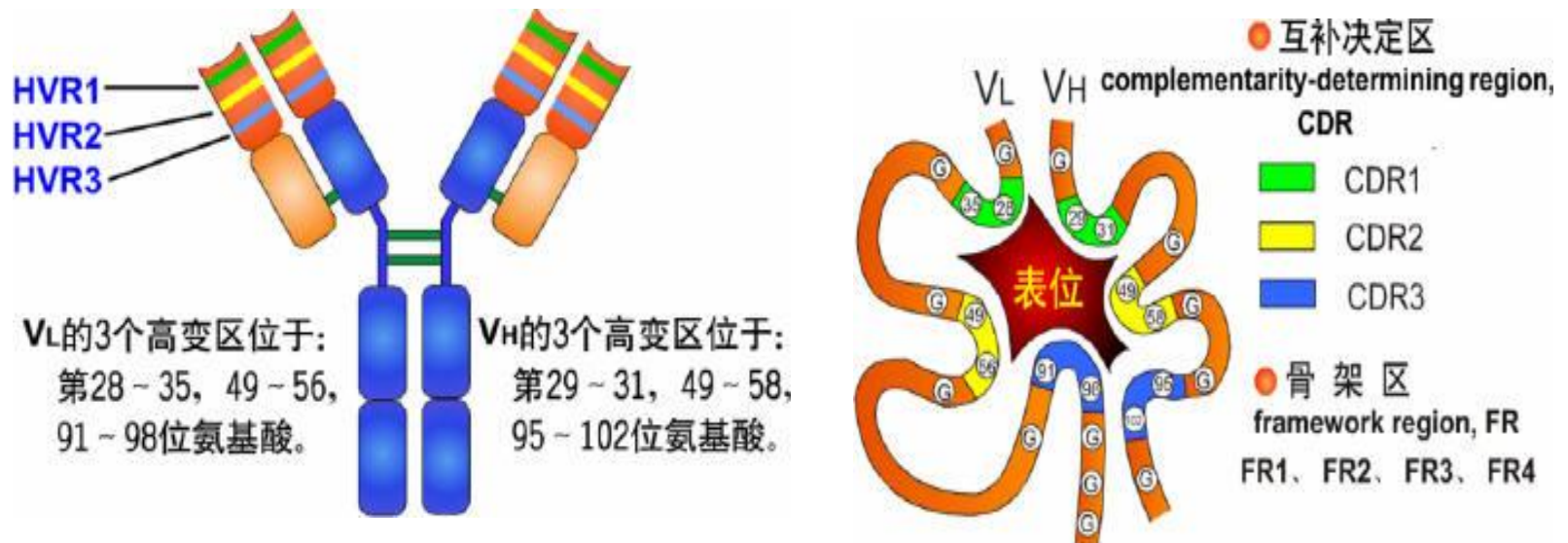
## 1.2.1 可变区 (Variable region, V区)

➤ L链近N端1/2长度序列 (VL)，H链N端1/5或1/4长度序列 (VH)，V区有一个肽环，65-75个氨基酸残基。





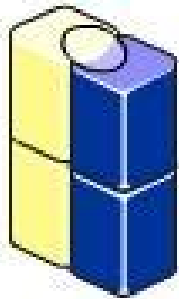
- 在可变区内，
  - 有3个区域氨基酸残基的组成和排列顺序比其他区域更易变化，称为超变区（hypervariable region, HVR）。分别称为HVR1, HVR2, HVR3。该部位在空间结构上为抗体与抗原的结合位置，也称为决定簇互补区（Complimentarity determining regions, CDR）。
  - 骨架区（framework region, FR）。



抗原肽



V<sub>L</sub>



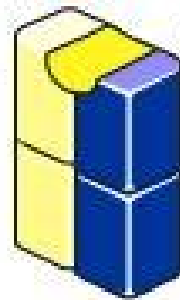
V<sub>H</sub>



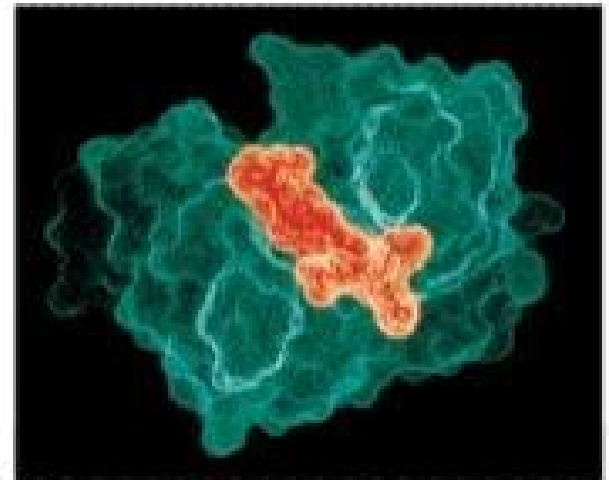
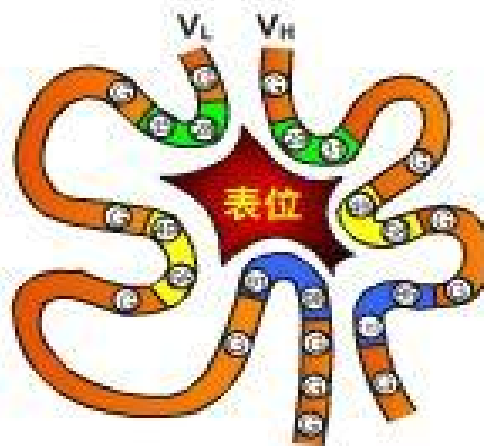
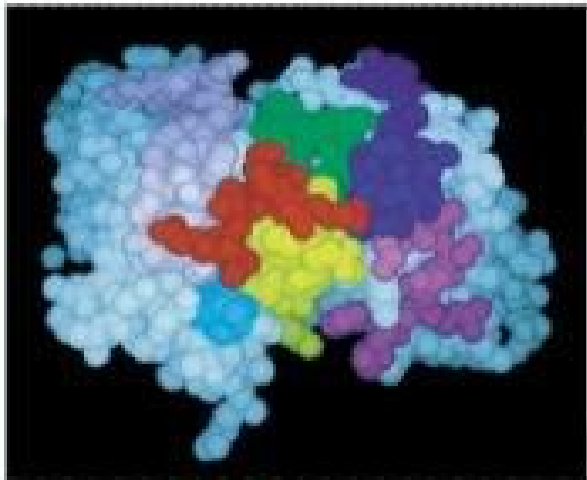
抗原肽



V<sub>L</sub>



V<sub>H</sub>

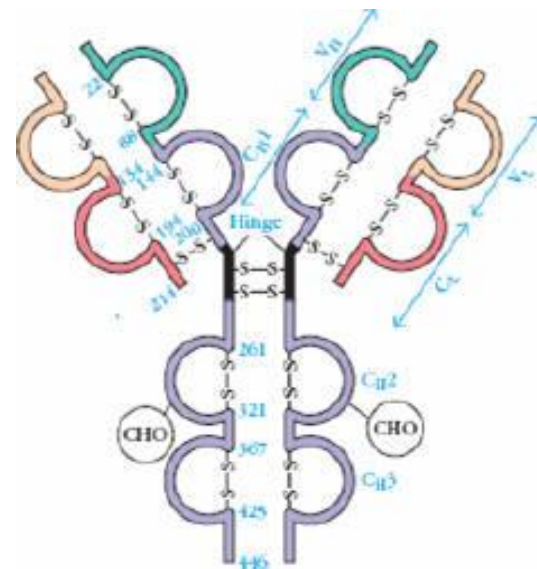
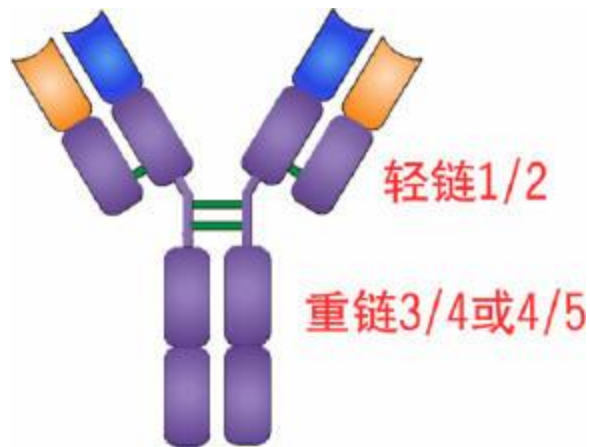


抗体的互补决定区与抗原表位结合示意图



## 1.2.2 恒定区 (constant region, C区)

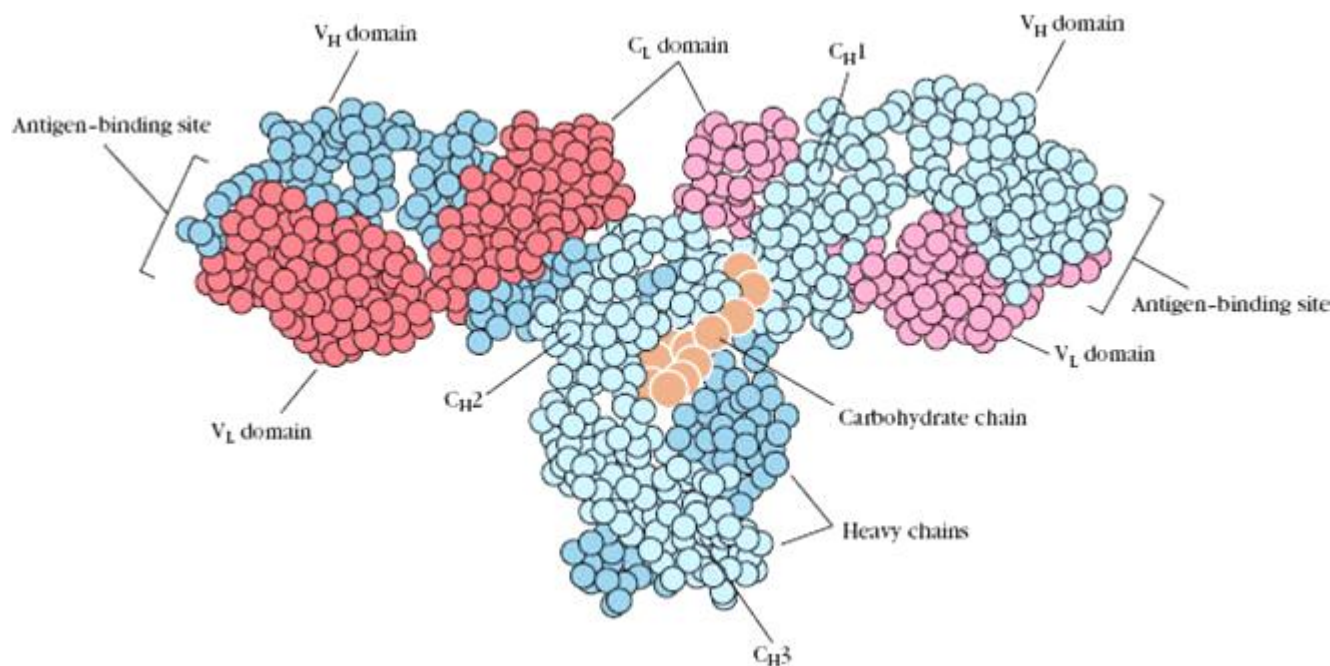
- L链近C端1/2区域, H链近C端3/4或4/5区域。
- 有补体和Fc的受体。
- 氨基酸组成在同一物种的同一类Ig中是比较恒定的, 是免疫试验中制备第二抗体、进行标记的重要基础。





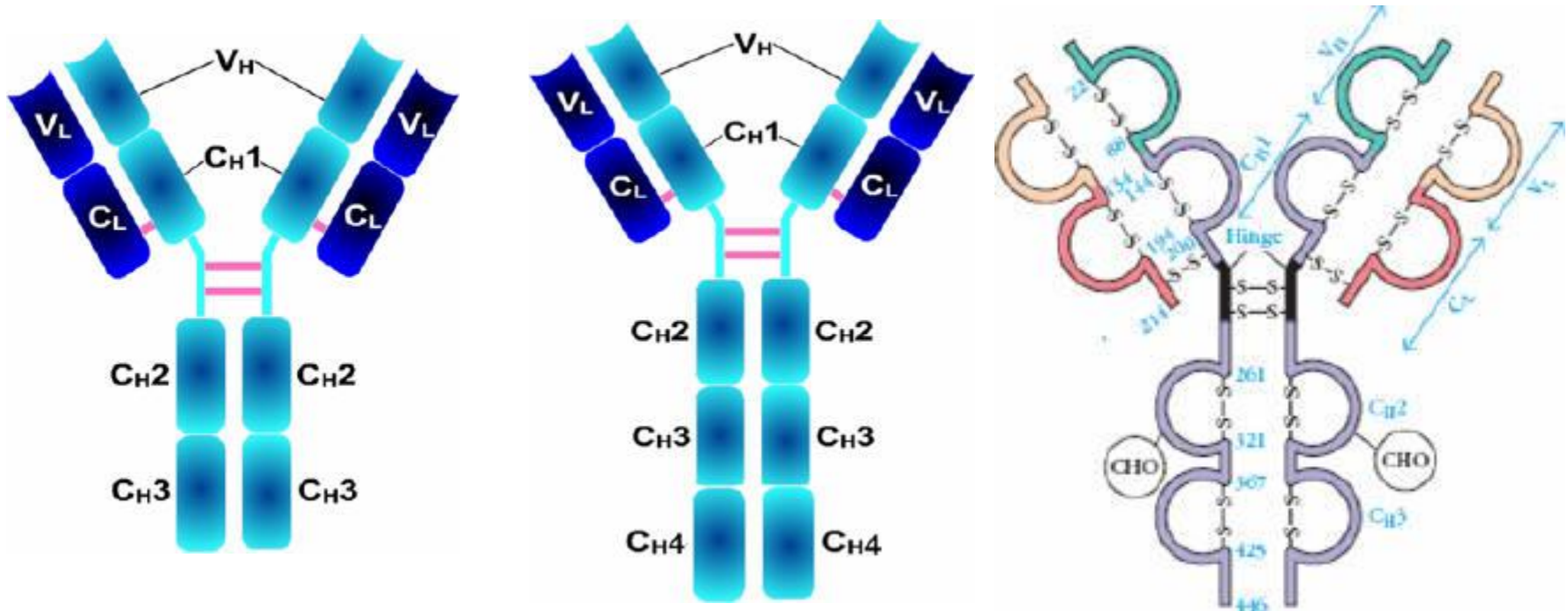
## 1.3 抗体功能区及其功能

- Ig的每条H链、L链每隔约110个氨基酸残基即由链内二硫键连接形成一个能行使特定功能的球形单位，称为**功能区或功能域（domain）**。





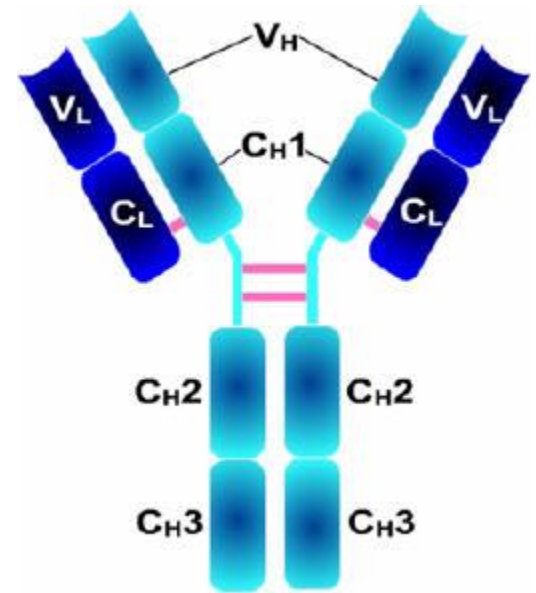
- L链功能区：2个（VL，CL各一个）
- H链功能区：IgG，IgA，IgD，4个（V区1个，C区3个），IgM，IgE，5个（V区1个，C区4个）。





### □ 1.2.3 功能区的作用：

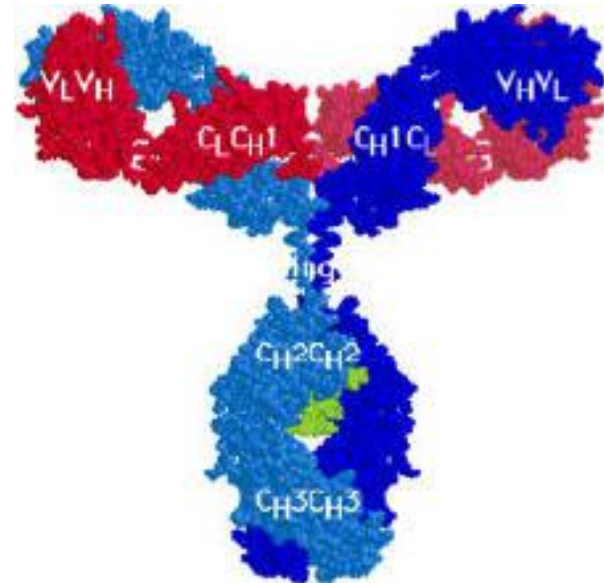
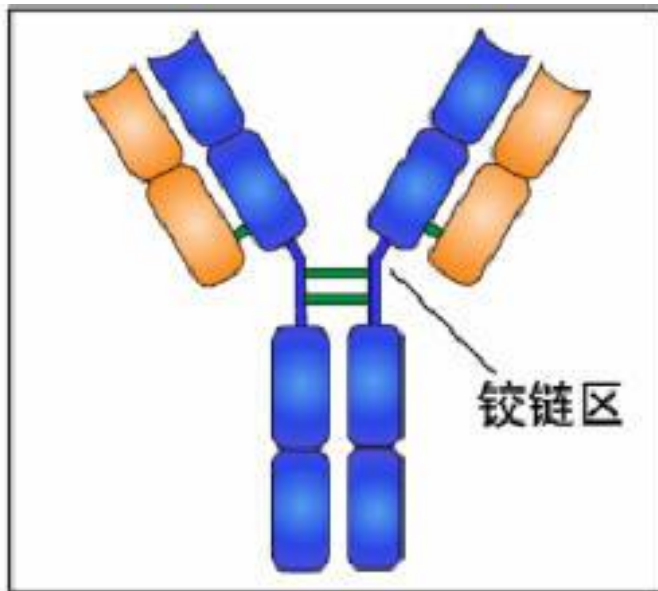
- VL和VH是抗原结合的部位。
- CL和CH1上具有同种异型的遗传标记。
- IgG的CH2和IgM的CH3具有补体C1q结合位点；IgG借助CH2部分可通过胎盘。
- CH3或CH4具有结合单核细胞、巨噬细胞、粒细胞、B细胞、NK细胞Fc段受体的功能，不同的抗体可与不同的细胞结合，产生不同的免疫效应。



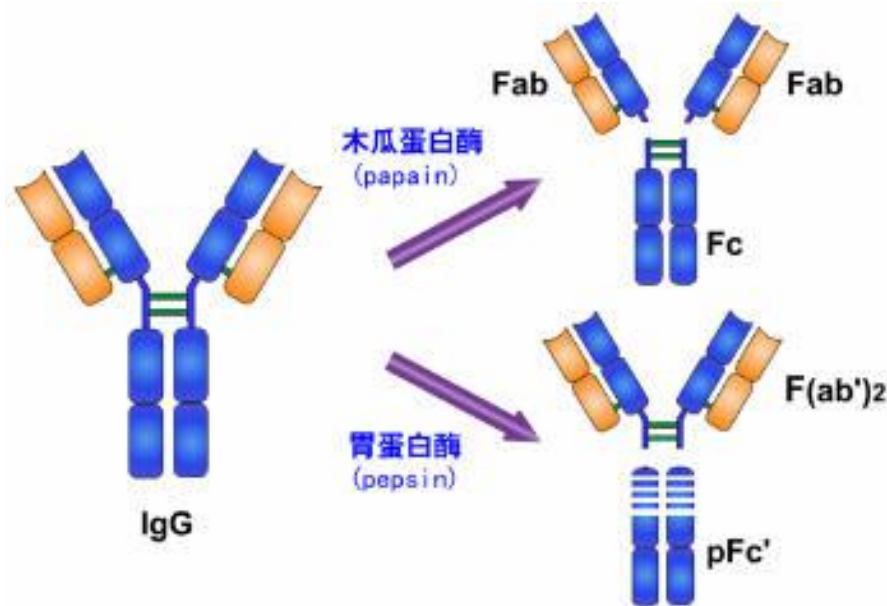


## □ 1.4 铰链区 及Ig水解片段

- ⑩ 铰链区不是一个独立的功能区，位于CH1与CH2之间；包括H链间二硫键，该区富含脯氨酸，不形成 $\alpha$ -螺旋。



- 铰链区含有木瓜蛋白酶、胃蛋白酶的水解位点。



Fab/F(ab')<sub>2</sub>  
片段

→ 可结合抗原，是单价/双价的。前者不能连  
结成较大的抗原抗体复合物，不出现凝集  
或沉淀现象，后者可出现沉淀现象。

Fc/pFc'片段

→ Ig在同种型及同种异型具有的抗原性，主  
要存在于Fc段，可用于生产二抗。



## 1.5 抗体的抗原性

抗体本身是蛋白质，因此具有抗原性！

- 同种型 (isotype)

同一种属所有个体都具有的免疫球蛋白的抗原特异性结构，其抗原决定簇主要存在于Ig的C区。

类和亚类（根据H链的抗原性不同）

五类：IgG ---  $\gamma$ (gamma)

IgA ---  $\alpha$ (alpha)

IgM ---  $\mu$ (mu)

IgD ---  $\delta$ (delta)

IgE ---  $\epsilon$ (epsilon)



亚类:

**IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4**

**IgA: IgA1, IgA2**

**IgM: IgM1, IgM2**

- 型和亚型（根据轻链C区抗原特异性不同分型）

**$\kappa$ (kappa)型、 $\lambda$ (lambda)型**

亚型( $\lambda$ 链):

**OZ(+) (或 $\lambda$ 1) : 第190位(亮氨酸)**

**OZ(-) (或 $\lambda$ 2) : 第190位(精氨酸)**

**Kern(+)(或 $\lambda$ 3) : 第154位(甘氨酸)**

**Kern(-)(或 $\lambda$ 4) : 第154位(丝氨酸)**





- 同种异型 (allotype)

同一种属不同个体之间免疫球蛋白也具有的差异性，主要反映在CH和CL分子上的一个或数个氨基酸的差异 (genetic markers---遗传标志)。

Gm因子: Gm1~30

Am因子: A2m1, A2m2

Km因子: Km1, Km2, Km3

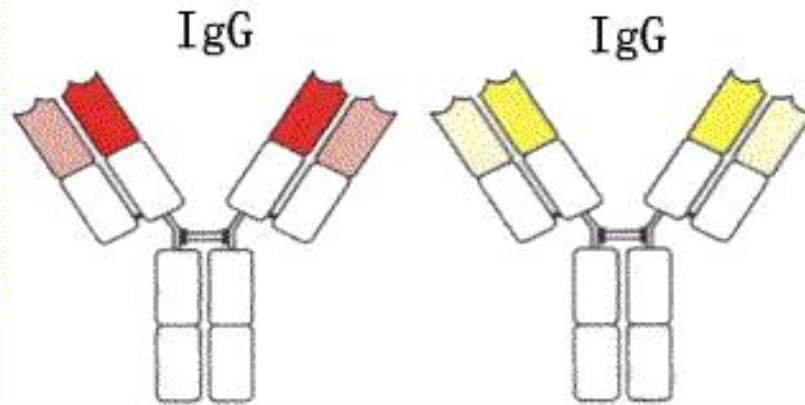
- 独特型 (idiotype)

在同一个体内，不同B细胞克隆所产生的免疫球蛋白分子V区以及T、B细胞表面抗原受体V区所具有的抗原特异性不同。

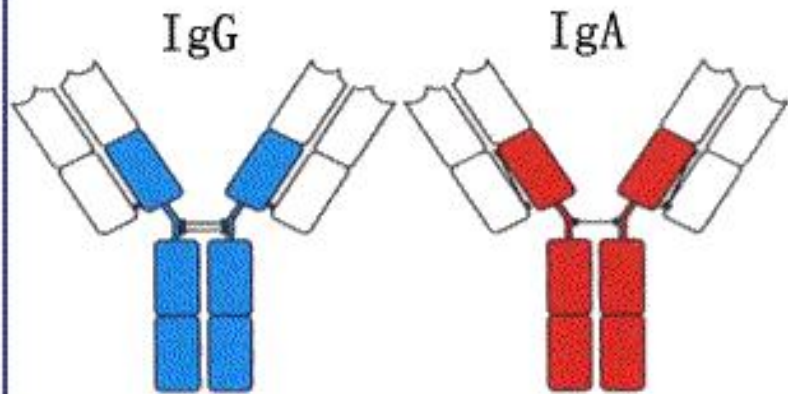




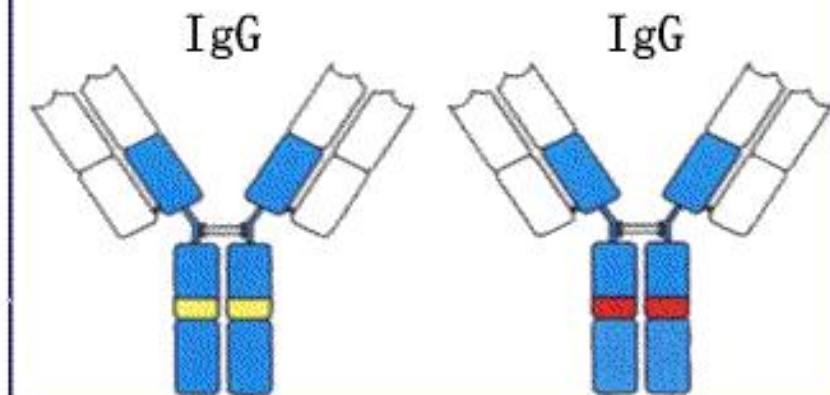
## 独特型



## 同种型



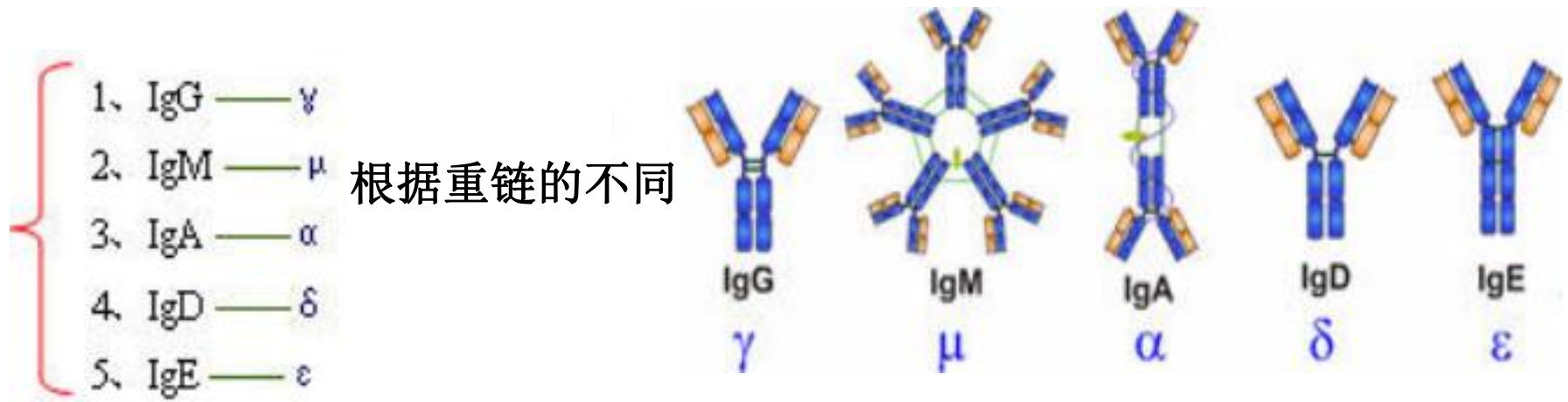
## 同种异型





## 第二节 抗体的分类与生物学功能

### ➤ 根据重链抗原性分：



根据L链恒定区结构的差异，将其分为两个型，即  $\kappa$ 、 $\lambda$  型



## 2.1 五类抗体分子的功能及特点

### ➤ IgG

- 以单体形式存在。
- 血清中的主要抗体，血清抗体总量的75~80%，半衰期长，免疫学检测常用。
- IgG是唯一能通过胎盘的抗体
- IgG是抗感染的主要抗体，也是再次应答的主要抗体。
- IgG还具有调理吞噬、介导ADCC、结合链球菌G蛋白的作用。



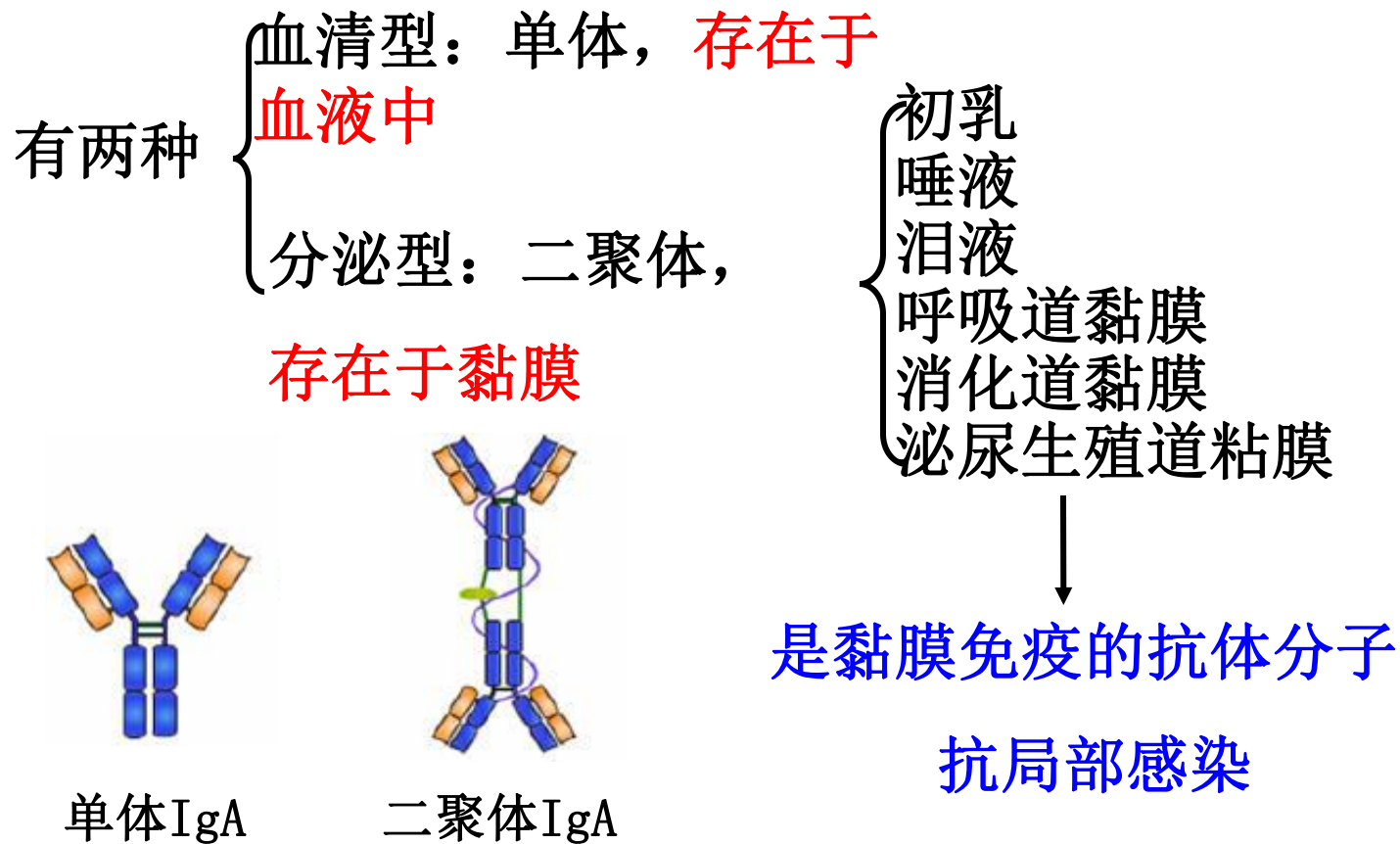
## ➤ IgM

- 分子量最大的抗体，又称巨球蛋白
- 最早合成的抗体，感染早期的主要抗体
- 占血清Ig含量的5~10%
- B细胞膜表面免疫球蛋白 (SmIgM) 是BCR的主要成分
- 参与II、III型超敏反应
- 自身抗体 自身免疫病，如；类风湿因子
- IgM不能通过胎盘 脐带血或新生儿血清中IgM水平升高表明胎儿有宫内感染



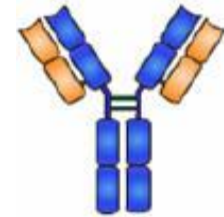
## ➤ IgA

- IgA主要由粘膜相关淋巴样组织产生。





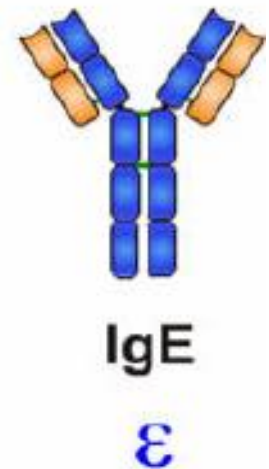
## ➤ IgD



IgD

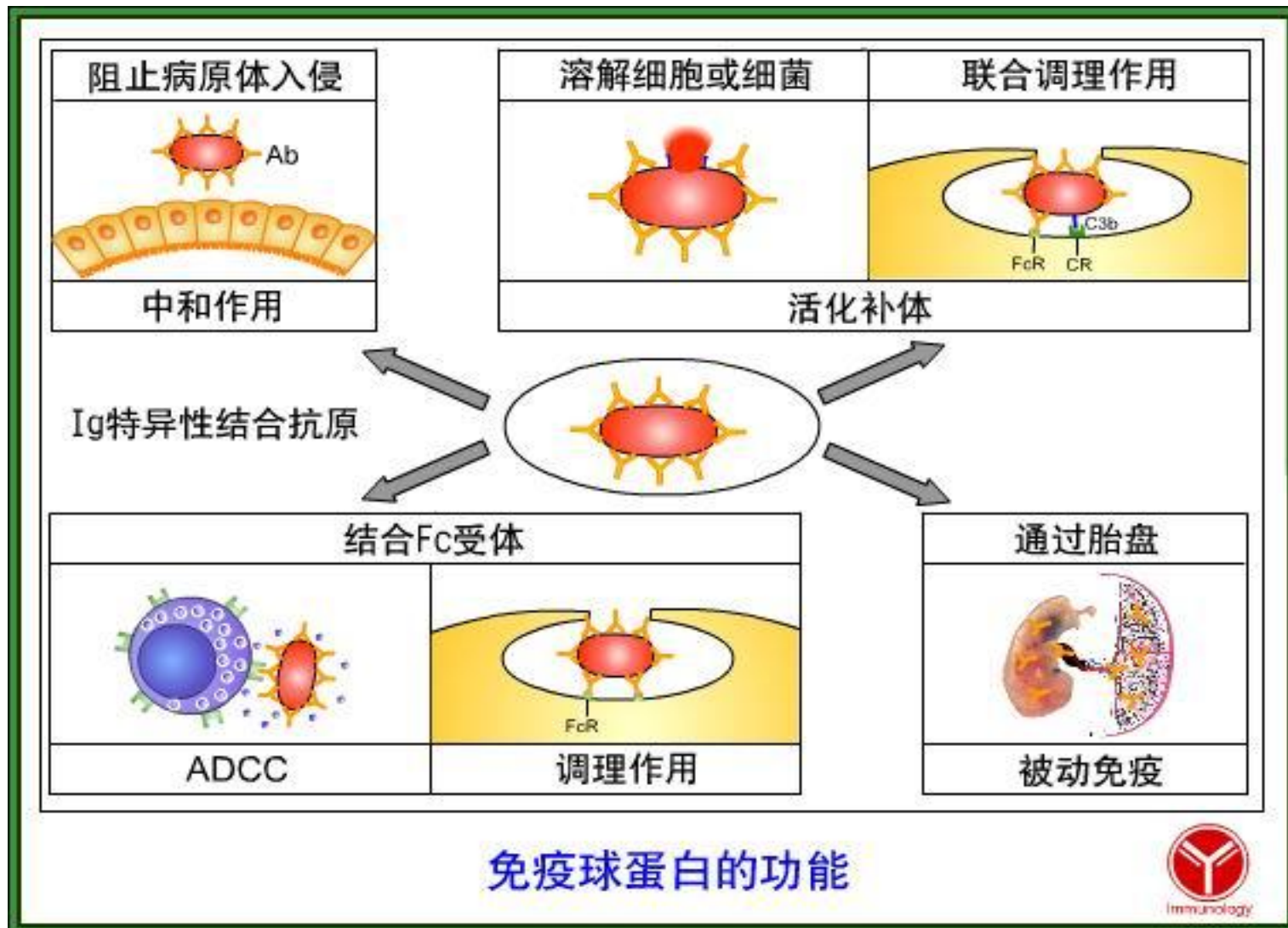
- IgD人血清中含量很低，占1%以下
- 单体结构
- 功能尚不完全清楚，可能在B细胞发育过程中具有特殊作用
- 是**B细胞的重要表面标志**，B细胞分化过程中首先出现mIgM，后来出现mIgD，**IgD是B细胞成熟的标志**

- 血清中含量最低（占Ig的0.002%）
- 呼吸道和胃肠道浆细胞产生；
- **IgE**
- 可与肥大细胞和嗜碱性粒细胞上FcεR II受体结合，引起I型超敏反应
- IgE抗寄生虫感染中发挥重要作用

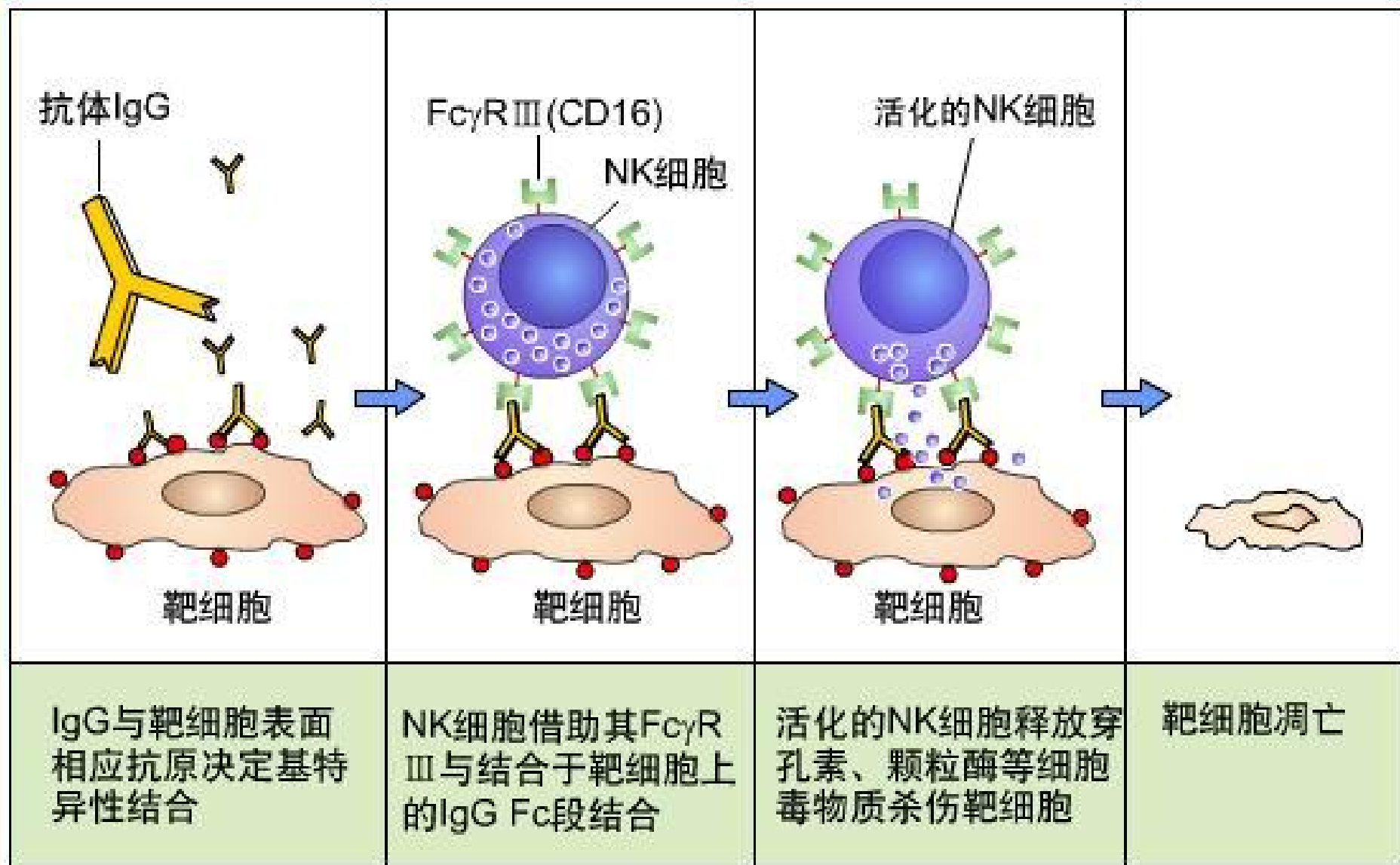




## 2.2 抗体的生物学功能







NK细胞介导的ADCC作用



- 灵长目动物、人类以及家兔的**IgG**是唯一可通过**胎盘从母体转移给胎儿的抗体**。
- 与**IgG**的**Fc**片段结构有关，切除**Fc**段后所剩余的**Fab**并不能通过胎盘。
- **IgG**通过胎盘的作用是一种重要的天然被动免疫，对新生儿抗感染有重要作用。





## 第三节 抗体的基因及表达

- 自然界中具有成千上万种的抗原！
- 机体具有产生 $10^9$ – $10^{11}$ 种不同抗原特异性抗体的能力！
- 为什么会存在这么多种抗体？

是不是每一种抗体都有单独的基因编码？



### 3.1 抗体多样性的分子基础--人类抗体基因库

- H基因库（重链基因连锁群）：第14号染色
- $\kappa$ 基因库（ $\kappa$ 链基因连锁群）：第2号染色体
- $\lambda$ 基因库（ $\lambda$ 链基因连锁群）：第22号染色体

有限的抗体基因库通过在DNA和蛋白质水平的多样性重拍组合构成了抗体的多样性。



## ➤ Ig的基因结构

**κ链：** V $\kappa$ (约60个)、 J $\kappa$ (5个)、 C $\kappa$ (1个)

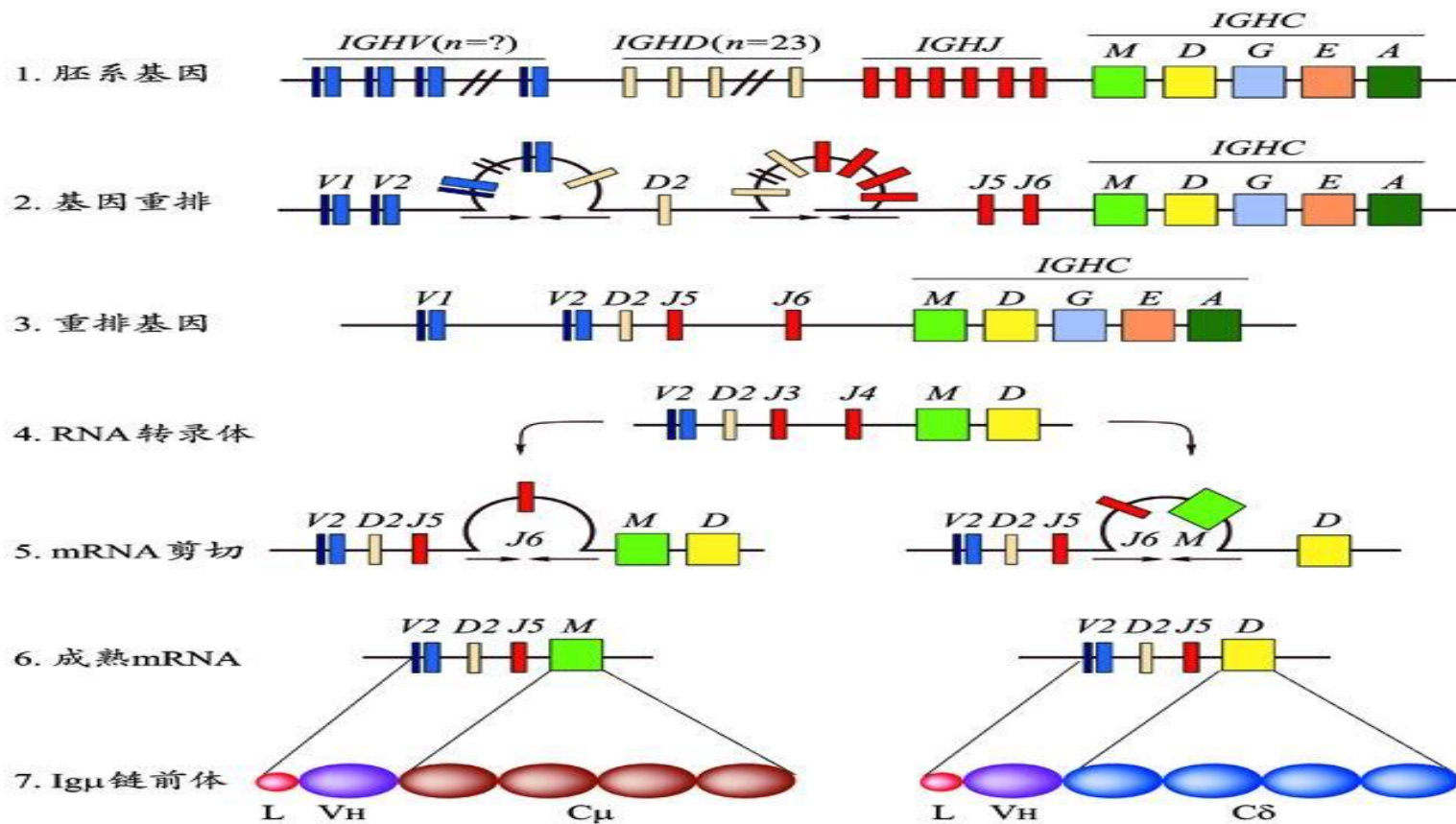
**λ链：** V $\lambda$ (约30个)、 J $\lambda$  (7个) 、 C $\lambda$ (4个)

**H 链：**

V基因(约65个)	}	V区
D基因(27个)		
J基因(6个)		
C基因(9个)		

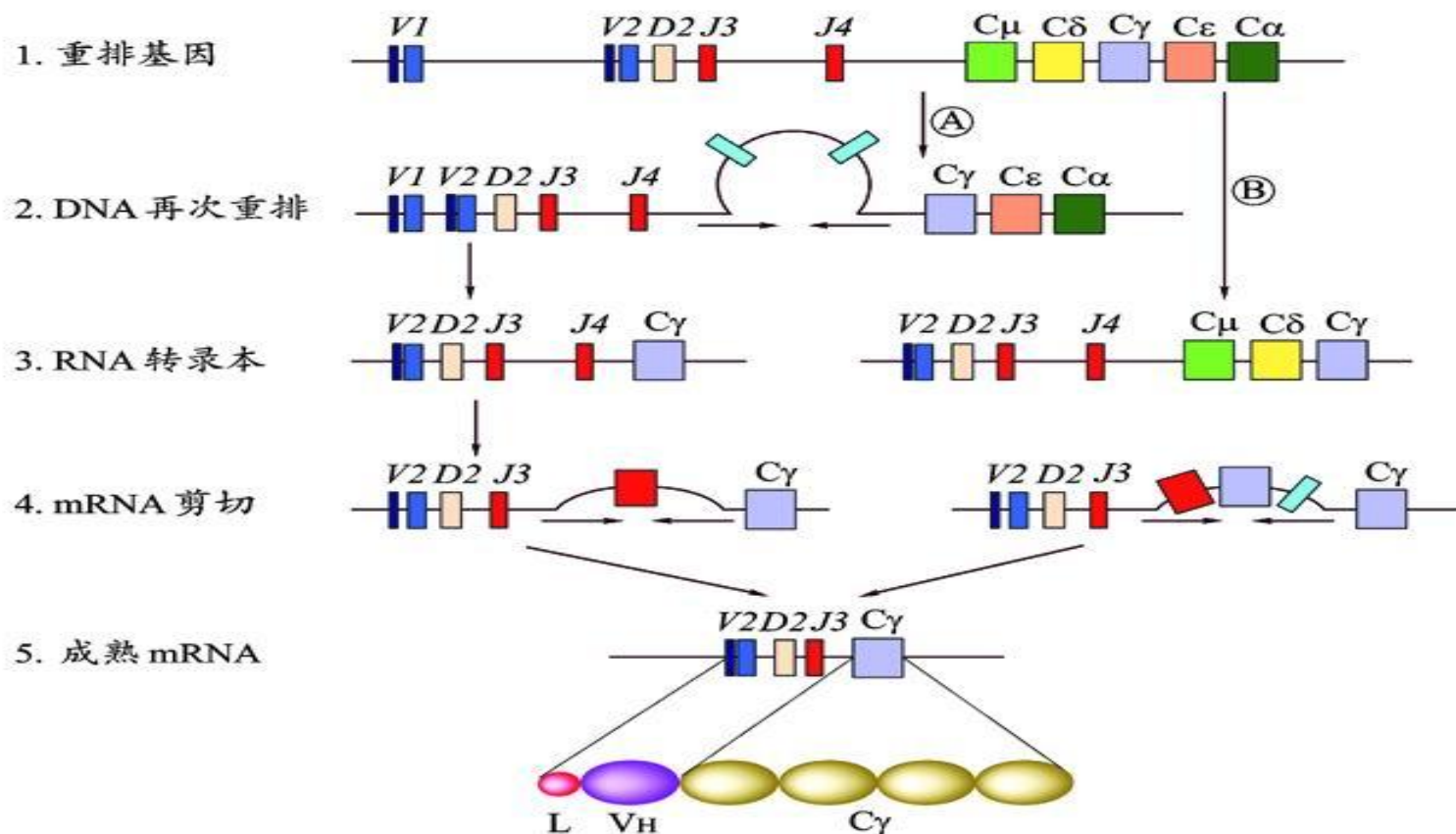
**多样性产生机制：排列组合，H链组合种类有 $65 \times 27 \times 6 \times 9$**

# 抗体基因的重排, 剪切和表达



## 四、类别转换

在T细胞（CD40L）和IL4诱导下，B细胞IgH二次重排



## 五、体细胞高突变

优化BCR抗原结合区



## ➤ 抗体多样性的遗传学基础

- (1) 胚系中众多的V、D、J基因片段；
- (2) V-D-J和V-J重排时，基因片段进行随机组合；
- (3) VDJ连接过程中的核苷酸缺失和N区的核苷酸插入；
- (4) L链H链之间随机配对组合；
- (5) 体细胞突变。
- (6) 不同Ig分子存在着结构由一定差异的膜型和分泌型。





## 3.2.2 抗体生成理论

- ✓ 克隆选择学说（clonal selection theory），或称无性繁殖系选择学说，是澳大利亚免疫学家伯内特于1958年提出的抗体形成理论。
- ✓ 克隆又称无性繁殖细胞系或无性繁殖系，是一个细胞或个体以无性方式重复分裂或繁殖所产生的一群细胞或一群个体，在不发生突变的情况下具有完全相同的遗传结构。
- ✓ 这一理论认为**动物体内存在着许多免疫活性细胞克隆**，不同克隆的细胞具有不同的表面受体，一旦某种抗原进入体内与相应克隆的受体发生结合后便选择性地激活了这一克隆，使它扩增并产生大量抗体（即免疫球蛋白），**抗体分子的特异性与被选择的细胞的表面受体相同**。



### 3.2.2 抗体生成理论

- ✓ 克隆选择学说（clonal selection theory），或称无性繁殖系选择学说，是澳大利亚免疫学家伯内特于1958年提出的抗体形成理论。
- ✓ 克隆又称无性繁殖细胞系或无性繁殖系，是一个细胞或个体以无性方式重复分裂或繁殖所产生的一群细胞或一群个体，在不发生突变的情况下具有完全相同的遗传结构。
- ✓ 这一理论认为**动物体内存在着许多免疫活性细胞克隆**，不同克隆的细胞具有不同的表面受体，一旦某种抗原进入体内与相应克隆的受体发生结合后便选择性地激活了这一克隆，使它扩增并产生大量抗体（即免疫球蛋白），**抗体分子的特异性与被选择的细胞的表面受体相同**。



### 3.2.2 抗体生成理论

- ✓ 抗体结构的多样性由体细胞突变产生;
- ✓ 已分化的免疫活性细胞只限于表达一种特异性, 这一特异性以克隆扩增的形式在体内得以保存;
- ✓ 新分化的免疫活性细胞凡能够与自身的抗原发生反应者都受到抑制, 这些克隆作为禁忌克隆而被清除;
- ✓ 在抗原激发下, 成熟的免疫活性细胞增殖并转化为浆细胞而大量产生某一种抗体;
- ✓ 早期未被自身的抗原所清除的禁忌克隆是日后发生自身免疫病的原因。



### 3.2.2 抗体的制备

- 为了研究抗体的理化性质、分子结构与功能，及应用抗体于生化诊断、治疗及预防都需要人工制备抗体。
- 目前，根据制备的原理和方法可分为三类：
  - 多克隆抗体
  - 单克隆抗体
  - 基因工程抗体

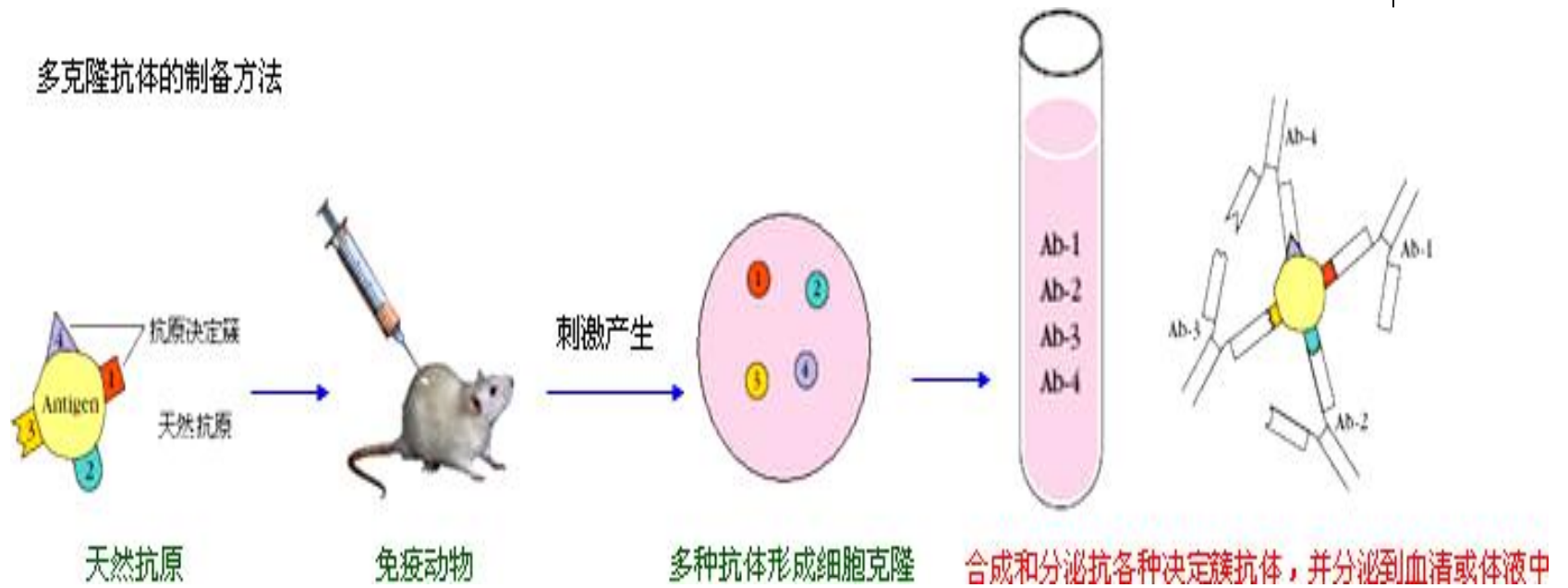


## ➤ 多克隆抗体（**polyclonal antibody, PcAb**）

- 大多数天然抗原物质(如细菌或其分泌的外毒素以及各种组织成分等)往往具有多种不同的抗原决定簇，而每一决定簇都可刺激机体产生一种特异性抗体。
- 多克隆抗体是多个抗原决定簇刺激机体后，由多个免疫淋巴细胞分泌的多种抗体的混合物。



## 多克隆抗体的制备方法



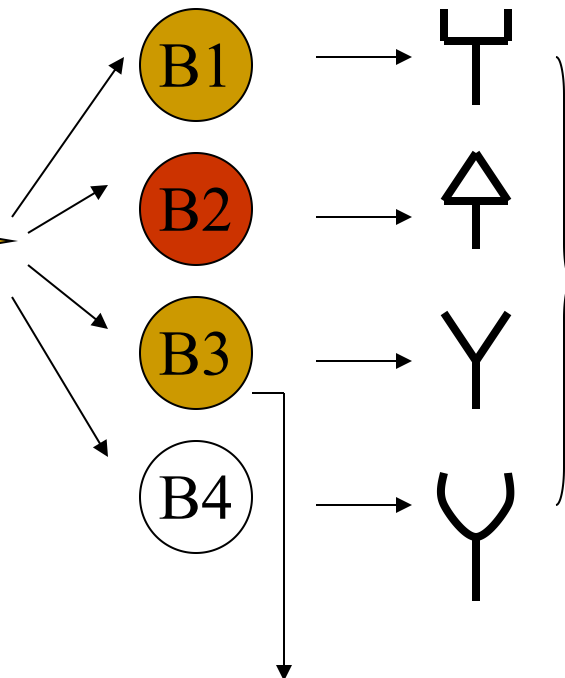
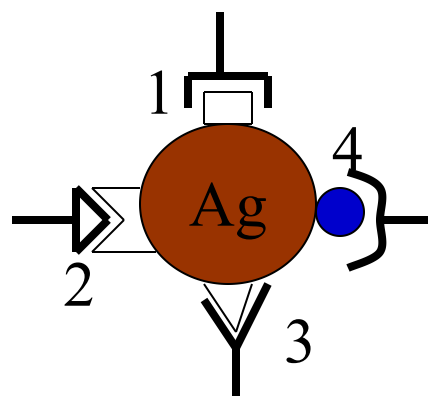


- 多克隆抗体的特点：

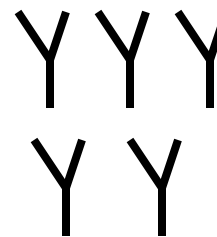
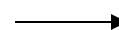
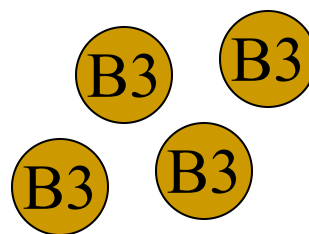
不均一性

第一代抗体！

由于这种抗体的不均一性，无论是对抗体分子结构与功能的研究或是临床应用都受到很大限制！



多克隆抗体



单克隆抗体







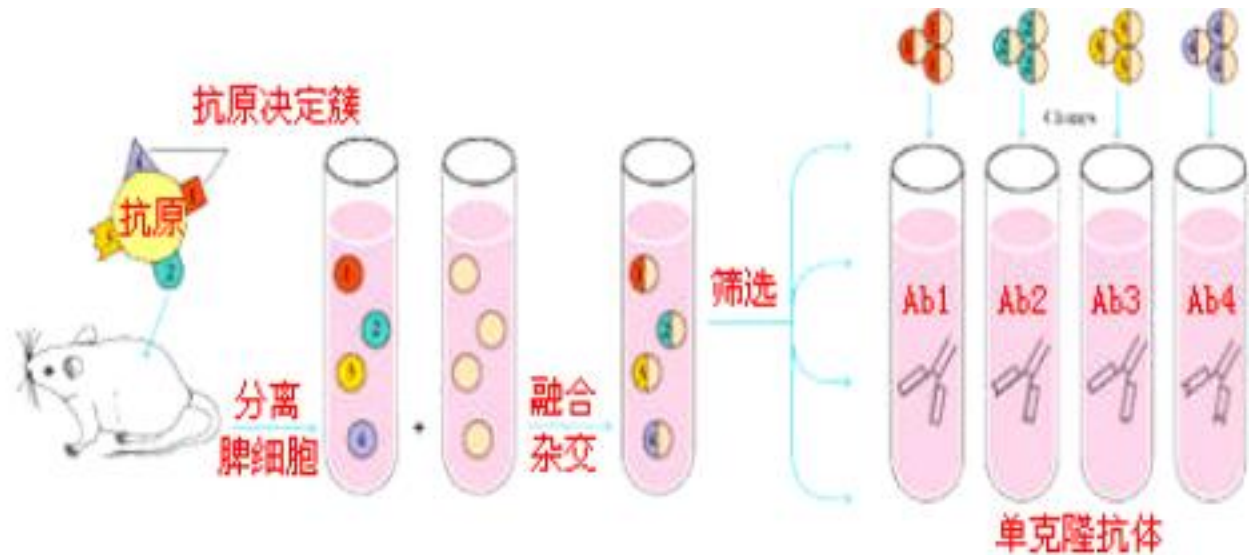
单克隆抗体 (monoclonal antibody) 由一个B细胞分化增殖的子代细胞（浆细胞）产生的针对单一抗原决定簇（表位）的抗体



Köhler  
德国



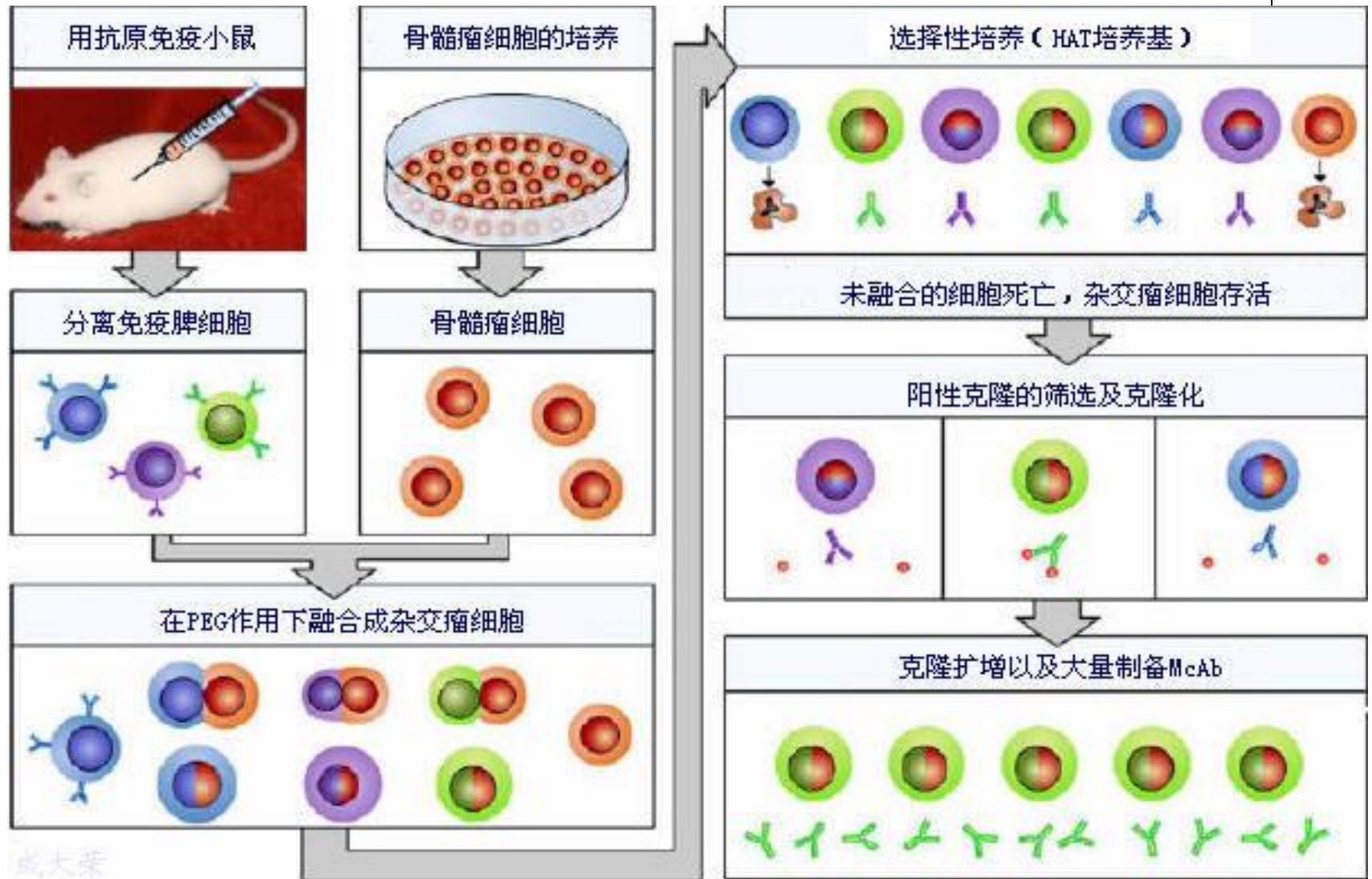
Milstein  
英国

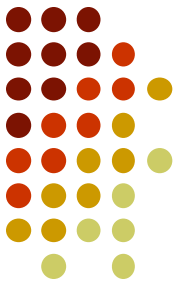


1975年Köhler和Milstein采用细胞融合技术，使免疫小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，形成杂交瘤细胞，后者可产生只针对某一特定抗原决定簇的单克隆抗体。



## ● 单克隆抗体制备过程





- 单克隆抗体的优点
  - 高度均质性
  - 高度特异性
  - 高效价
  - 来源稳定，可大量生产
  - 容易标准化

第二代抗体



## ● 单克隆抗体的应用

- (1) 诊断试剂：用于各种病原体以及肿瘤的诊断。
- (2) 治疗试剂：兽医临床上传染病的治疗；医学临床上抑制器官移植排斥、治疗自身免疫疾。
- (3) 检测试剂：各种病原体毒力因子的检测；各种免疫细胞及其它组织细胞表面分子的检测。



## ➤ 基因工程抗体

(genetically engineered antibody)

- 自1975年单克隆抗体杂交瘤技术问世以来，单克隆抗体在医学中被广泛地应用于疾病的诊断及治疗。
- 但目前绝大多数单克隆抗体是鼠源的，临床重复给药时体内产生**抗鼠抗体**，使临床疗效减弱或消失。
- 因此，医学临床上最理想的单克隆抗体应是人源的，但**人--人杂交瘤技术目前尚未突破**。



- 目前较好的解决办法是能研制基因工程抗体，  
以代替鼠源单克隆抗体用于临床
- 基因工程抗体兴起于80年代早期
- 是利用DNA重组技术，在分子水平对抗体基因进行切割、拼接或修饰，或人工合成后导入受体细胞表达，从而产生的新型抗体，也称为第三代抗体
- 研究成功的基因工程抗体有：嵌合抗体、重构抗体、小分子抗体等



## 第四节 其它Ig简介

### 4.1 其它哺乳动物Ig简介

所以哺乳动物都有IgG、IgM和IgA，也有的含有IgE，但还没有发现IgD。

### 4.2 乳中的免疫球蛋白

母体免疫球蛋白主要可通过胎盘、初乳、卵黄传递给幼畜禽，从而提供被动免疫保护。乳中主要含有IgA，IgG、IgM较少。

#### 4.2.1 人乳中免疫球蛋白特性



## 4.2.2 牛乳免疫球蛋白

➤ 含量：占总乳蛋白 2%（1-4%）

占乳清蛋白的12%（8-19%）

含量变化：初乳 50-150 mg/mL，到常乳1mg/mL.

成分：主要为IgG，IgG1 (80-90%)， IgG2(10-20%)

➤ 牛血清中IgG浓度变化很大，主要取决于牛的年龄和免疫状态

➤ 牛初乳中IgG浓度较高，随泌乳的进行快速下降

➤ 牛乳中IgG主要存在于乳清中，相反，大量的IgA和IgM与乳脂结合在一起





### 4.2.3 牛乳中免疫球蛋白的生化特性

牛IgG与其它哺乳动物IgG同源性的百分比：牛100，绵羊76、山羊75、马30、鼠28、猪25、人16

### 4.2.4 牛乳中免疫球蛋白的作用

- ◆补体激活作用：
- ◆调理素活性：增强巨噬细胞、粒细胞活性中和作用



- **免疫乳 (Immune Milk)**
- ✓ 给奶牛或山羊等哺乳动物，有选择地接种一些能够引起人或动物某些疾病的细菌、病毒，或其他外来的抗原，使其产生免疫应答，经接种的这些动物分泌的乳就是免疫乳。
- ✓ 免疫牛乳除有与牛初乳相似的功能特性外，还分泌许多淋巴因子（细胞因子）。



## 4.3 禽类Ig

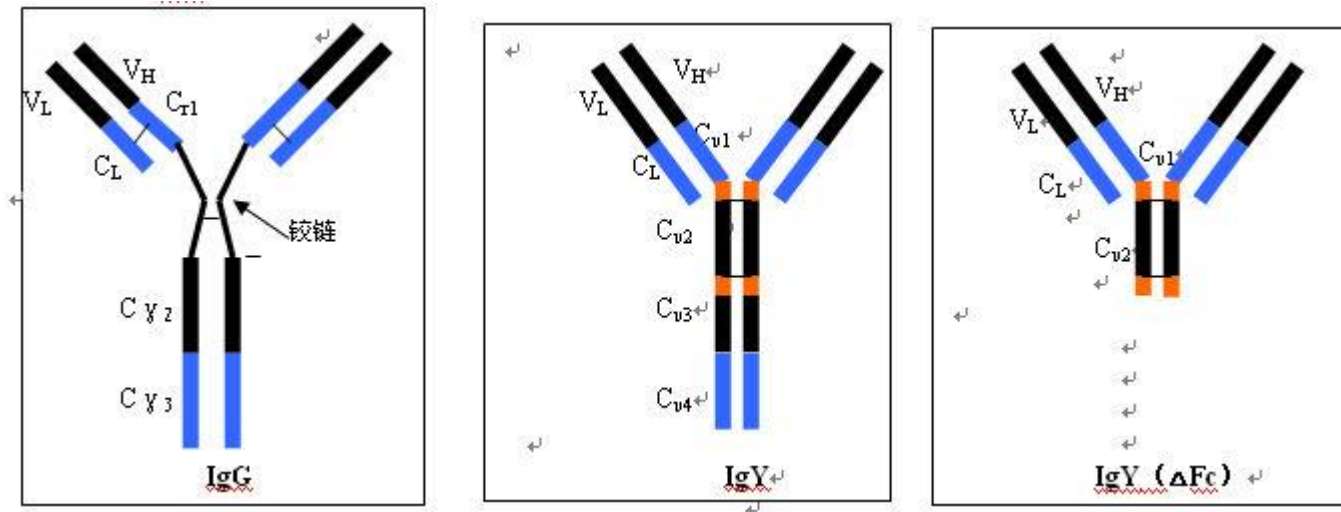
与哺乳动物一样，禽类的免疫球蛋白单体也呈Y形，由4条肽链组成。

✓禽类已确证的免疫球蛋白有3种，即IgG、IgM和IgA。目前，有些间接证据表明，禽体内很可能还存在IgD和IgE的类似物。

✓IgG：禽类IgG（IgY）是单体免疫球蛋白，全长IgY分子量180ku，沉降系数为7s。其重链比哺乳动物的重10Kd（约1功能区）。



这个附加的残基是否代表除VH、CH1、CH2和CH3外的另1个新的功能区，目前还有争议。有学者认为，它可能像人的IgG3一样只是一段延长了的绞链区。因为禽类IgG与人IgG有一些相似特征：对蛋白酶消化的敏感性增加，易于凝集，重链多出大约1个功能区的重量。





**IgY不仅存在于血清中，卵黄、泪液、精液、唾液、胆汁等外分泌液中也有，是禽血清中含量最高的IgG。它也是唯一能通过卵巢移行至卵黄中Ig。**

**卵黄IgY虽在结构上与IgG有较大差别，但同样具有抗体活性，功能与哺乳动物IgG相似，但禽类IgY与哺乳动物IgG缺乏共同抗原，所以不与哺乳动物的补体、人Fc受体等结合。故可制作口服制剂。**



**Shimizu等（1993）用蛋黄中提出的卵磷脂和胆固醇为壁材，用脱水-复水法（dehydration-rehydration）对IgY进行包埋，形成脂质体，对脂质体包埋的IgY研究表明，在pH2.8条件下培养1h，此IgY在酸性环境的稳定性显著提高。在pH1.8培养3h，IgY活性显著下降，而脂质体包埋，特别在高含量胆固醇的脂质体中，很大程度保存活性。**

# 小结



1. 抗体和免疫球蛋白的概念。
2. 免疫球蛋白的基本结构。
3. Ig的功能区及主要功能。
4. 免疫球蛋白的血清型。
5. 各类免疫球蛋白的主要特性和功能。
6. 单克隆抗体的概念。