

抗独特型抗体 Ab2 β 的制备及其应用

廖 万 国

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提 要

抗独特型抗体 Ab2 β 由于含有抗原内影像结构而表现出抗原的部分生物活性。由于 Ab2 β 具有模拟抗原的功能, 使其在蛋白质、受体及疫苗等研究领域中的应用越来越广泛。文中简述了抗独特型抗体 Ab2 β 的制备和应用及其应用所存在的问题, 并讨论了 Ab2 β 抗原内影像功能的结构基础, 旨在展望其应用前景。

关键词 Ab2 β , 抗原, 内影像

Jerne^[1] 1974 年提出了独特型免疫网络学说, 认为机体免疫系统的稳定是由抗体独特型和抗独特型免疫网络体系所维持的。经过多年的研究, 不仅证明该学说的科学性, 而且使其理论得到充分地完善和发展。抗体独特型是指位于抗体可变区内具有自体 and 异体免疫原性的抗原决定簇的总称。根据抗独特型抗体 (Ab2) 与一抗 (Ab1) 反应的特点, 可将其分为四类, 即 Ab2 α 、Ab2 β ^[2]、Ab2 γ ^[3]、Ab2 ϵ ^[4]。其中 Ab2 β 为含有抗原内影像结构的抗体, 其应具有下列特点: a. 能与抗原特异性的不同种机体产生的抗体 (Ab1) 反应; b. Ab2 和抗原能竞争结合 Ab1, 二者之间存在竞争抑制作用; c. 能诱导不同种机体产生抗原特异性的免疫应答。Ab2 β 的上述特性为人们受体蛋白的纯化及其功能研究、蛋白质结构分析及在病毒、病菌疫苗等研究中开辟了新的途径。下面就抗独特型抗体 Ab2 β 的制备方法及其应用, Ab2 β 模拟抗原功能的结构基础进行简单的综述。

1 抗独特型抗体 Ab2 β 的制备及其检测

制备抗独特型抗体 (Ab2 β) 有两条途径, 首先可从患有自身免疫疾病患者血中提取 Ab2 β 。如自糖尿病患者血中提取抗胰岛素受

体抗体、重症肌无力病人血中提取抗乙酰胆碱受体 (AChR) 抗体等^[5], 这些自体抗受体抗体大多为相应受体配体的抗独特型抗体。但经这一途径得到的抗体种类和数量都有限, 要得到足量的抗独特型抗体, 还必须采用另一条途径即免疫法制备。

制备抗独特型抗体的免疫方案有二: 一步免疫法和两步免疫法。一步免疫法又称自身抗体产生法。根据 Jerne 的免疫网络理论, 抗原诱导机体产生抗体后, 该抗体的独特型决定簇又能诱导机体产生抗抗体。因此, 应用抗原一步免疫就能制得抗独特型抗体。例如将 AChR 的激动剂 BisQ (溴化-3, 3'-((α -三甲基铵基)甲基)偶氮苯)经一个月两次免疫 Balb/c 小鼠后取脾融合, 用 AChR 检测 BisQ 的抗独特型抗体, 筛选出 BisQ 的 Ab2 β ^[6]。利用一步法免疫制备抗独特型抗体较为简单, 但应具备检测 Ab2 的手段, 如利用纯化的受体检测其配体的 Ab2, 或利用已有的 Ab1 检测 Ab2 等。当不具备上述条件时, 就应分别制备 Ab1 和 Ab2, 即采用两步免疫法制备抗独特型抗体, 其具体方法是: 首先利用抗原免疫动物制备 Ab1, 然

后利用纯化的 Ab1 免疫动物制备抗抗体。被免疫的动物如与产生 Ab1 的动物同系,就应将 Ab1 或其 Fab 片段与蛋白质载体连接制备成人工抗原^[6],或将 Ab1 自身聚合^[7],以增强其免疫原性。如属异种动物免疫,可用 Ab1 或其 Fab 段直接免疫动物^[8,9]。在制备 Ab2 时,利用抗原的多克隆抗体免疫动物比其 McAb 免疫动物更容易产生 Ab2 β ^[10]。

与检测一般抗体的方法相比,检测 Ab2 β 有其特殊性。不但要确定其抗体的特性,而且还应检验其是否含有抗原内影像结构。下面以检测吗啡^[11]和 β^- 受体阻滞剂心得舒^[12]的 Ab2 β 为例,简述检测 Ab2 β 的一般步骤:

a. 采用纯化的受体蛋白或 Ab1 的 Fab 片段检测是否存在抗抗体,其方法为常用的酶联免疫吸附法 (ELISA),放射免疫分析法 (RIA) 或免疫放射分析法 (IRMA) 等。

b. 分离提纯 Ab2, 鉴定其是否含有抗原的内影像结构。具体方法如下: (1) 竞争抑制法: Ab2 能抑制不同种动物产生的 Ab1 与抗原的结合,且抗原也能抑制 Ab2 与 Ab1 的结合,二者存在竞争抑制关系。但当 Ab2 与 Ab1 的抗原结合位点附近的独特型决定簇结合时,会产生空间障碍作用,阻止抗原与抗体结合,造成假抑制现象。排除假抑制的方法是先将抗原与 Ab1 反应一段时间,再加入 Ab2,如仍存在竞争抑制反应,就说明 Ab2 的对位为 Ab1 的抗原结合位点; (2) 模拟配体的生物活性: 能与配体竞争结合受体,具有激活或抑制受体活性的功能等; (3) 利用 Ab2 免疫动物检测其是否能诱导产生抗受体抗体。如果配体的 Ab2 能满足上述条件尤其是第二和第三条,就可说明该 Ab2 具有抗原(配体)内影像结构。

从上述可以看出,产生 Ab2 β 的前提是有抗活性部位的抗体。一般来讲,具有生物活性的抗原结构越简单,制备抗活性位点的抗体就越容易。小分子物质如 BisQ、心得舒等结构简单,整个分子可能只有一个抗原决定簇,用这些物质的人工抗原制备的抗体大多对其活性有影响,其抗体也容易诱导产生 Ab2 β 。由于蛋

白质抗原本身存在多个抗原决定簇,能诱导机体产生不同性质的抗体,给筛选抗活性中心的抗体带来困难。另外,有些物质的活性中心不具备抗原性,在未确定其抗原性质之前,制备抗活性部位的抗体带有一定的盲目性。为解决上述问题,人们采用了蛋白质点特异性的抗体制备方法^[13],即合成与蛋白质抗原活性中心相应序列的多肽,一般为 9—15 肽,利用合成肽的人工抗原免疫动物产生抗多肽的抗体,该抗体常能与完整的蛋白质抗原结合,并能对蛋白质活性产生一定影响。

2 抗独特型抗体 Ab2 β 在蛋白质研究中的应用

2.1 应用 Ab2 β 研究蛋白质活性部位的氨基酸组成

由于 Ab2 β 具有抗原抗体反应的特异性和含有抗原内影像结构的双重特性,在弄清抗独特型抗体与相应蛋白质的结合部位氨基酸组成后,即可推导出该蛋白质活性中心的氨基酸组成。如霍乱毒素主要经其 B 链 (CT-B) 与细胞膜单唾液酸神经节苷脂 (GM1) 结合,将毒素 A 链导入膜内而致病。许多研究表明 CT-B 链的 Try-88, Gly-33, Cys, Lys, Arg 以及 His-94, 13 氨基酸残基都可能参与 CT-B 与 GM1 的结合。但不清楚上述氨基酸残基在 CT-B 与 GM1 的结合中到底有什么样的作用。Ludwig 等^[14]利用 GM1 的 AB2 β 与 CT-B 及其类似物的交叉反应结果,认为 CT-B 4 位上的天冬氨酸残基为其与 GM1 结合位点的氨基酸残基。

2.2 用于受体蛋白质结构与功能关系的研究

Farid 等^[15]制备了人 TSH 的 Ab2 β , 研究表明,该抗独特型抗体在细胞膜蛋白处于还原和非还原条件下,分别识别分子量为 55—59 kD 和 195kD 的蛋白质,进一步研究发现,上述 TSH 的细胞膜受体为分子量 7kD 的双体和 55kD 的单体所组成,表明 TSHR 活力中心位于分子量为 55kD 的亚结构内。作者还利用

TSH 的 Ab2 β 研究了体外培养条件下甲状腺细胞膜 TSHR 的代谢情况,弄清了 TSHR 在细胞体外培养条件下的合成和代谢规律。

2.3 用于受体的纯化和分型

由于 Ab2 β 具有抗原内影像结构,因而能与抗原(配体)的受体特异地结合。Ab2 β 的这一特点为受体蛋白质的纯化提供了新的手段。Lambiris DJ 等^[6]利用人 H 因子的 Ab2 β 纯化其受体得到较好的结果。由于获得抗体较抗原容易,同时,单克隆抗体技术的应用又能不断提供足量和均一的抗体,且在许多情况下制备抗体亲和柱比制备小分子配体亲和柱容易得多,因此,可以预料配体的 Ab2 β 在受体的纯化和制备中将起重要作用。

虽然配体的 Ab2 β 具有配体的内影像结构,能与受体结合,但 Ab2 β 为大分子蛋白质,其与小分子配体在结构和理化性质上均相差甚远,二者在与受体结合特性方面也会不同,如上述 GM1 既能与 hLT 结合,又能与 pLT 结合,但 GM1 的 Ab2 β 能与 hLT 结合,却不能与 pLT 结合。因而 GM1 的 Ab2 β 能将 GM1 不能分开的 hLT 和 pLT 分开。这说明配体的 Ab2 β 在一定条件下可用于受体分型。

3 抗独特型抗体在疫苗研究中的应用

目前,已有许多种病毒(菌)抗原的 Ab2 β 制备成功,且动物实验证明,用 Ab2 β 免疫动物的抗毒效果与利用病毒(菌)抗原免疫动物的抗毒效果相当^[7]。Mc Namara 等^[8]将肺炎球菌(SP)的表面抗原磷酸胆碱(PC)的 Ab2 β 与 KLH 连接后免疫小鼠,小鼠经 100 μ g 抗原两次免疫后即对 SP 产生较强的抵抗力,其抗毒效果与用 SP 或 PC-KLH 免疫小鼠的抗毒效果一样。但如果其 Ab2 不与 KLH 连接而单独免疫小鼠,其抗毒效果不好。因此,在利用 Ab2 β 作为疫苗主动免疫动物时,应将抗体与载体连接,以增强其免疫原性。不过, J. R. Schreiber 等^[9]单独利用绿脓杆菌抗原的 Ab2 β 小剂量多次免疫 Balb/c 小鼠后,能得到高滴度的抗菌血清。

应用抗独特型抗体代替抗原作为疫苗的好处是:制备和纯化抗体比制备和纯化抗原容易,且单克隆抗体技术的应用可以不断提供均一、足量的抗体,有利于疫苗质量的标准化。另外,现用的许多病毒(菌)疫苗为减毒菌株,容易引起接种后感染和致热作用,而用抗体作为疫苗接种就没有上述危险。但要将抗独特型抗体代替疫苗用于人身上免疫接种,还必需进行深入地研究,搞清 Ab2 β 模拟抗原功能的结构基础。

4 Ab2 β 在实际应用中存在的问题

综上所述,Ab2 β 在蛋白质研究、疫苗研制等方面确实存在广泛的应用前景。虽然 Ab2 β 能够作为抗原的替代品模拟抗原的生物活性,但其和抗原之间结构、性质等方面的区别使 Ab2 β 应用到实际中时常要碰到许多困难和问题。这些问题主要表现在如下几个方面:

4.1 亲和力的改变 由于 Ab2 β 的抗原内影像结构不一定与抗原活性中心结构完全一致,这就不可避免地造成 Ab2 β 不可能与抗原一样对受体有同样的结合能力,多数情况下,Ab2 β 对受体有相当的亲和力,足以用来纯化受体蛋白。但有些 Ab2 β 对受体的亲和力很低,如 TSH 的 α 和 β 链的 Ab2 β 对受体(TSHR)的亲和力只有 10^{-7} mol/L,单独应用时,不能与 TSH 竞争结合 TSHR^[10]。

4.2 专一性的改变 如前所述,由于 Ab2 β 的抗原内影像结构与抗原的抗原决定簇结构不一定完全相同,这不仅造成 Ab2 β 的亲和力改变,也造成 Ab2 β 专一性的改变。例如, Viale G 等^[9]利用人乳房癌 MCF-7 细胞表面抗原 CaMBr1 的 Ab2 β 免疫 Balb/c 小鼠制备的 McAb3 2G3 与 Ab1 都能与 MCF-7 细胞表面蛋白结合,且 2G3 的亲和力大于 Ab1,但是,Ab1 能识别 MCF-7 表面的 GLP 部分,而 2G3 不能与其 GLP 结构结合。这种改变有时会带来好处,如上述的 CT-B 的 Ab2 β 由于专一性的改变而能区分 hLT 和 pLT。但当 Ab2 β 作为替代抗原用作疫苗时,出现这种情

况就会影响疫苗效果,这正是 Ab2 β 用作替代疫苗时所存在的最主要的问题。

4.3 制备 Ab2 β 的困难性 由于单克隆抗体技术的广泛应用,成功制备 McAb2 β 可以一劳永逸,但其中仍然要消耗大量的人力、物力,从制备针对抗原活性部位的 Ab1 到制备 Ab2 β ,每一步都存在机遇性和需要艰苦的劳动,令人望而却步。同时,在制备 McAb2 β 时,常由于 AblId 决定簇的低免疫原性造成融合细胞株的低阳性率,一般在 2‰—4‰,加之 Ab2 β 除具有抗体特性外,还要鉴定其是否具有抗原的生物活性,使得对 Ab2 β 的筛选更加重而繁琐。

5 Ab2 β 模拟抗原功能的结构基础

Ab2 β 由于具有抗原内影像结构而具备抗原的部分生物活性。但至今为止,有关 Ab2 β 的抗原内影像结构仍为一模糊概念,主要问题是 Ab2 β 的抗原内影像与抗原的抗原决定簇之间的相似性是表现在其氨基酸序列及空间结构上,或者仅仅是在其氨基酸极性及其结构区域的电荷分布上呢?从统计学上讲,两者的氨基酸序列不可能全部相同,但无实验证明。目前,虽然有许多抗原的 Ab2 β 制备成功,但大多只是处于制备和鉴定水平,真正从结构上进行研究的较少。在所研究过的 Ab2 β 与抗原结构关系的实验中,有三个抗原的抗原决定簇区域的氨基酸序列及二级结构与其 Ab2 β 的 CDR 区的结构相同或相似,即“GAT”系统,呼肠孤病毒 3 型(Reo3)的表面抗原及小鼠骨髓瘤细胞相关抗原 gp52 的 Ab2 β 。

C. Fougereau 等^[6]制备了由 Glu, Ala, Tyr 三个氨基酸组成的合成抗原“GAT”的 Ab2 β ,蛋白质序列分析表明其中两个 Ab2 β 的 D 区分别有 Tyr-Tyr-Glu 和 Glu-Glu-Tyr 序列,由于“GAT”的 Ab1 主要识别抗原的 Glu-Tyr 结构部分,因此,作者认为上述 Ab2 β 的 Tyr-Tyr-Glu 和 Glu-Glu-Tyr 序列为“GAT”系统的抗原内影像结构。并进一步合成了包括上述序列的两个小肽,如下:

Group20 Lys-Lys-Ala-Arg-Pro-Leu-
Tyr-Arg-His-Asp-Glu-Glu-
Tyr-Tyr

Group22 Cys-Ala-Arg-Leu-Ile-Pro-
Ser-Asp-Ala-Tyr-Tyr-Glu-
Asp-Tyr

将上述两小肽分别与 BSA 连接,免疫 Balb/c 小鼠,结果表明,该人工抗原免疫产生的抗体不仅能特异地与上述小肽反应,而且都能与“GAT”抗原反应,这就直接证明了上述 Ab2 β D 区的抗原类似结构为“GAT”抗原决定簇的内影像结构。

M. V. Williams 等^[21]发现 Reo3 型病毒表面抗原血凝素的 317—324 位氨基酸序列与其 Ab2 β 的 VH CDR2 的 43—51 位氨基酸序列相同,其 323—332 位氨基酸序列与 Ab2 β 的 VL CDR2 的 46—55 位氨基酸序列相同,且引人注目是两者都有相同的 Tyr-Ser-Glu-Ser 序列,计算机拟合的结构表明,上述 4 个相同序列区域具有相同的二级结构即 β -折叠- β -反转- β -折叠结构。于是作者合成了相当于血凝素的 317—332 区域、VH 的 43—56 区域和 VL 的 39—55 区域氨基酸序列的 3 个多肽。实验表明 a. VL 多肽、血凝素多肽和 VL-VH 多肽的结合体均能结合血凝素 Ab1,但 VH 多肽无此作用; b. VL 多肽可抑制 Ab1 与 Reo3 结合,VH 多肽不能; c. VL 和 VL-VH 多肽结合体均可抑制 Ab2 与小鼠胸腺瘤细胞结合,且能抑制 Reo3 与相关宿主细胞结合,VH 肽不能。上述结果说明该 Ab2 β VL CDR2 的 46—55 位氨基酸序列为抗原的内影像结构,Ab2 与 Ab1 以及其和 Reo3 受体的作用主要与 VL CDR2 有关,VH CDR2 可能只起维持 CDR2 立体结构的作用。

另外, S. Raychaurhuri 等^[22]最近报道了小鼠骨髓瘤细胞相关抗原 gp52 的 Ab2 β VL CDR2 区的 52, 54 和 55 位与 gp52 的 302, 304, 305 位氨基酸残基均为 Ser, Arg 和 Leu。计算机拟合 Ab2 和 gp52 的二级结构表明 gp52 的 298—310 区域与其 Ab2 VL CDR2

的二级结构非常相似,这可能说明该 Ab2 VL 的 CDR2 区为其抗原内影像结构。但由于没有合成相应的肽段,不能检测上述相似区域的抗原活性模拟能力,因而,不能肯定其相似区域为抗原内影像结构。

综上所述,机体确能产生与抗原决定簇一级及空间结构相同或相似的 Ab2 β 抗原内影像结构,该结构可位于 Ab2 轻链 CDR 区,也可位于重链的 D 区。说明 Ab2 β 模拟抗原功能的性质可能主要与其氨基酸序列及空间结构上模拟抗原的抗原决定簇结构有关,因而以 Ab2 β 代替抗原用于研究和实际应用是可行的。

但由于抗原抗体之间及其它分子之间的非共价键作用不仅与其结构上的吻合有关,而且与分子之间的各种作用力如亲水键、疏水键、静电引力等有关。因此,在不能得到足够多的研究资料的情况下,人们可以认为上述“GAT”系统、Reo3 表面抗原及 gp52 抗原的 Ab2 β 在其氨基酸序列上与抗原决定簇结构的相似性属于偶然现象。因而,还必需对有关抗原内影像结构与其功能的关系进行深入地研究。

参 考 文 献

1 Jerne N K. *Ann Immunol* (Paris), 1974; 125: 373

- 2 Jerne N K. *EMBO J*, 1982; 1: 243
- 3 Bona C A et al. In: Venter J C et al. eds, *Anti-id Antibodies and Internal Images*, New York: Liss, 1984; 14: 141
- 4 Chen P D et al. In: Bona C A et al. eds, *Biological Applications of Anti-idiotypes*, Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988; 1: 41
- 5 Erlanger B F et al. *Immunol Rev*, 1986; (94): 23
- 6 Campbell M J et al. *J Immunol*, 1990; 145: 1029
- 7 Beaclair K D et al. *Immunobiology*, 1990; 180: 208
- 8 Shinji T et al. *J Immunol*, 1990; 144: 4291
- 9 Viale G et al. *J Immunol*, 1989; 143: 4338
- 10 Fougereau M et al. In: Bona C A et al. eds, *Biological Application of Anti-idiotypes*, Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988; 1: 23
- 11 Isom C E. *Methodol Surv Biochem Anal*, 1985; 15B: 91
- 12 Guillet J G et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 1781
- 13 Posnett D N et al. *Methods in Enzymology*, 1989; 178: 739
- 14 Ludwig D S et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 3673
- 15 Farid N R et al. *Methods in Enzymology*, 1989; 178: 191
- 16 Lambris D J et al. *J Exp Med*, 1982; 155: 1400
- 17 Rimmelzwaan G F et al. *Methods in Enzymology*, 1989; 178: 375
- 18 Mcnamara M K et al. *Science*, 1984; 226: 1325
- 19 Schreiber J R et al. *J Immunol*, 1990; 144: 1023
- 20 Urbina R B et al. *J Cell Biochem*, 1987; 34(3): 151
- 21 Williams W V et al. *Viral Immunol*, 1989; 2(4): 239
- 22 Raychaudhuri S et al. *J Immunol*, 1990; 145: 76

欢迎订阅

《国外医学·生物医学工程分册》

邮发代号: 18-86 全国各地邮局均可订阅
双月刊 64 页 全年订价: 12.60 元
主办单位: 中国医学科学院生物医学工程研究所
编辑部地址: 天津市南开区龙兴里 51 号
通讯地址: 天津 25 支局 204 信箱
邮政编码: 300192

报道内容: 国外生物医学工程学科领域的新技术、新进展、新动向等综述、译文、文摘以及国际交流、资料与消息等。
读者对象: 国内生物医学工程工作者、医生和医学研究人员、高等院校有关专业师生及研究生以及有关工程技术人员。

欢迎订阅《生命科学》

《生命科学》双月刊由国家科委正式批准公开发行,国内统一刊号: CN31-1600/Q, ISSN: 1004-0374, 逢双月 15 日出刊,全年定价 18 元(含邮资)。欲订者请将款于 1993 年 3 月 15 日前信汇至中国科学院上海文献情报中心财务室收。开户银行上海工行徐办淮分理处。帐号 221—08900920。编辑部地址: 上海岳阳路 319 号中国科学院上海文献情报中心内。邮政编码: 200031