

8 生物多样性：免疫球蛋白

多样性与自然选择是生物演化的核心规律，多样性与选择也是免疫学的核心概念之一。

面对自然界如此繁多的抗原性物质，个体生物可以产生直接与抗原结合，多于 10^{12} 种类的蛋白抗体分子，被称之为抗体的多样性。而对 T 淋巴细胞非常重要的表面受体(TCR)，人的一生更可多达 10^{16} 种，多于通常估计的人体同时拥有的细胞总数(10^{13})。

在分子和细胞机理方面，在 1900 年诞生侧链学说后，对免疫球蛋白发生的诠释就不断被修改，1957 年出现克隆选择学说，1960 年代开始认知抗体蛋白质的结构，1970 年代发现编码抗体的 DNA 有特殊的重组机制。

8.1 抗体产生的机理

免疫学家曾长期试图理解抗体形成的机理。抗体形成的理论需要对已知现象做出合理性的解释：对抗原的特异性，对多种抗原的反应，第二次引入抗原导致的反应大于第一次(Glenny and Südmersen, 1921)，对自身的抗原免疫耐受。

抗体形成有直接模板学说、间接模板学说和选择学说。抗体形成的直接模板学说认为，抗原直接进入细胞，在每个免疫球蛋白产生印记，指导特异的抗体生成。起初，只是提出免疫刺激后，产生正常血清成分的细胞开始产生不同的分子(Landsteiner and Reich, 1905)。直接模板学说有几个版本，都认为抗原直接作为抗体的模板(Bail and Tsuda, 1909; Breinl and Haurowitz, 1930; Mudd, 1932; Pauling, 1940; Pauling and Delbrück, 1940; Pauling, Campbell and Pressman, 1943)。可以是围绕抗原进行抗体合成或组装(Mudd, 1932)，或抗原位点决定抗体的氨基酸序列、使之与抗原匹配(Breinl and Haurowitz, 1930)。Pauling 提出抗原指导抗体空间结构的折叠而改变其构型，从而特异结合和识别抗原(Pauling, 1940; Pauling and Delbrück, 1940; Pauling, Campbell and Pressman, 1943)。

间接模板学说认为，抗原通过改变其他(如遗传物质)，再指导特定免疫球蛋白产生。1941 年，Burnet 等提出适应酶学说，认为抗原进入产生抗体的细胞后，通过诱导酶的改变，让细胞生产对抗原特异的抗体(Burnet *et al.*, 1941)。1949 年，他们提出抗原进入细胞核或细胞浆，改变细胞的遗传物质，导致能够识别抗原的特异抗体产生(Burnet and Fenner, 1949)。这一假说，到 1955 年 Burnet 写作时出现 RNA 和蛋白质互为模板、自我标记物改变模板的复杂版本(Burnet, 1956)。

克隆选择学说认为，身体原有多种抗体(或产生抗体的细胞)，抗原选择性地刺激相应抗体产生。

8.2 侧链学说

1900 年，Ehrlich 提出侧链学说(side-chain theory)是第一个有影响的解释抗体形成过程和作用机理的学说(Ehrlich, 1900)。

Ehrlich 的侧链学说，与其早期研究不能全然分开(Ehrlich, 1878, 1885, 1897; Ehrlich and Morgenroth, 1900c; Prüll *et al.*, 2009)。1878 年，他在博士论文中提出染料与细胞结合需要“细胞特定的化学特征”。1885 年，他首次提出侧链(side-chains)，认为细胞的原生质有起细胞主要作用的化学分子核团，也有起营养作用的化学分子侧链(Ehrlich, 1885)。1897 年，Ehrlich 提出了侧链学说的雏形(Ehrlich, 1897)：细胞的侧链结合毒素，结合之后侧链不能起正常功能从而使细胞补偿性地产生更多的侧链，进入血液成为抗体，这一雏形相当接近他 1900 年的学说，只是尚未明确提出侧链定位于细胞膜。Ehrlich 虽然起初认为抗毒素结合毒素之后可以破坏毒素，后来认为抗毒素是中和毒素的作用(Ehrlich, 1898, 1899)。

1900 年的文章中, Ehrlich 全面阐述其侧链学说。他提出, 细胞的原生质有起细胞特异功能的中心部分, 也有起营养作用的侧链。根据不同细胞的需求, 侧链有所不同。侧链与营养物质结合, 营养物质的原子团与侧链相应的原子团发生特异的结合。这种结合类似于 Emil Fischer(1852-1919)提出的酶和底物的锁和钥匙的关系(Fischer, 1894)。Ehrlich 提出毒素有两部分, 结合部分(haptophore)与细胞的侧链结合, 毒性部分(toxophore)起毒性作用。如果细胞无侧链, 毒素不会对它起毒性作用, 有天然免疫。如果细胞的侧链与毒素结合足够强, 可以中和其毒性。如果给予毒素的剂量合适, 侧链结合毒素后可以不断再生, 产生新的侧链太多后, 被分泌入血液, 成为抗毒素。免疫的过程就是细胞产生和分泌侧链的过程, 血清的抗毒素或抗体来源于细胞的侧链(Ehrlich, 1900)。

他还提出, 不同的抗体可能来源于身体不同的细胞。单个抗体的免疫力可能不足, 需要多个抗体。用细菌的整体要比细菌的单个代谢产物更有效诱导多种抗体产生, 这样免疫力更强。

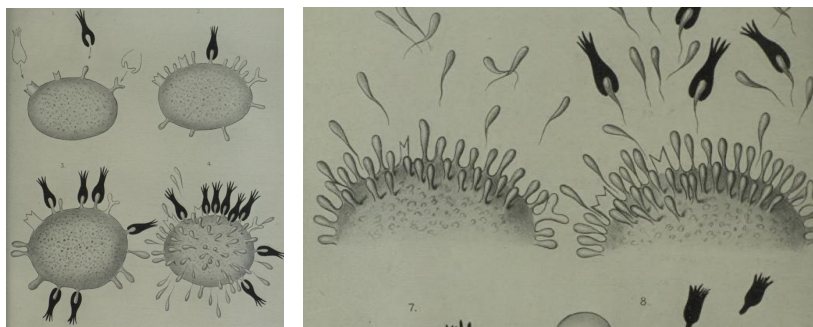


图 8-1 Ehrlich 的侧链学说

侧链学说并不是很容易解释有关抗体的相关事实(Silverstein, 2002)。首先, 如何解释免疫系统事先存在对大量抗原有特异性的抗体。其次, 侧链起营养性作用的想法也备受质疑; 其三, 如果抗体来自毒素所作用的靶细胞, 无法解释抗体存在于血液而不存在于靶器官。例如破伤风毒素作用于神经系统, 但其抗体不在神经系统内, 而在血中。

在 Ehrlich 前后, 曾有几位研究者推测抗体来源于抗原, 都被弃之不用, 对后续理论未产生影响(Hertzfeld and Klinger, 1918; Silverstein, 2009)。Ehrlich 的侧链学说考虑了抗原-抗体特异结合、抗体为体内已有分子、抗原选择性促进抗体产生等因素, 是第一个有影响力的抗体形成理论。后来知道对毒素敏感的靶细胞和抗体产生的细胞并非同一细胞, 毒素结合的靶分子也无需是抗体分子, Ehrlich 当时将与毒素结合的不同细胞和分子简单地当成同一细胞、同一分子, 成功解释了大部分抗体免疫的现象, 却并非体内的实际情况。尽管如此, 侧链学说依然为抗体本质的探索提供了一个很好的起点。

8.3 克隆选择学说

Ehrlich 的侧链学说, 是第一个选择学说(Silverstein, 2009)。

1955 年, 丹麦免疫学家 Niels Jerne (1911-1994)提出抗体形成的自然选择学说: 身体合成多种构型的抗体, 循环于体内。抗原进入身体后, 在大量的已有抗体中与其中有互补构型的抗体相结合, 抗原-抗体复合物被吞噬细胞所摄取, 抗原-抗体分开, 抗原被破坏。而

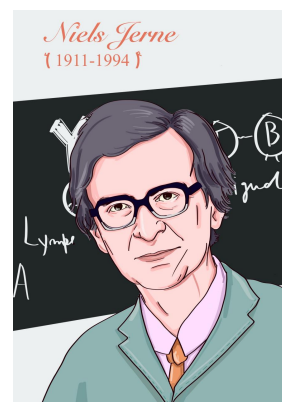


图 8-2 Jerne

抗体进入细胞后，引起细胞合成更多的同一抗体，改变血清中抗体的组成比。同一抗原再次进入体内时将遇到更多的这一抗体，而且有更多产生这一抗体的细胞，所以反应更大。

1957年，平壤出生的、当时在美国芝加哥大学的 David Talmage (1919-2014) 从过敏的实质是免疫的观点出发，认为要理解过敏就要理解抗体，从而讨论抗体的产生。他指出 Jerne 的理论在本质上与 Ehrlich 的侧链学说有相似性：都是抗原选择抗体。但他们的差别在于 Jerne 认为抗原与游离的抗体结合，而 Ehrlich 提出抗原与细胞膜表面的抗体结合。Talmage 认为细胞表面的抗体更合理，抗原选择表面有特定抗体的细胞，导致细胞增殖，产生更多的同一抗体，被选择的是细胞，产生与特定抗原亲和力的抗体的细胞 (Talmage, 1957)。



David Talmage
[1919-2014]

图 8-3 Talmage

在以上基础上，多年思考抗体形成机理的 Burnet 提出了克隆选择学说 (Burnet, 1957)。Burnet 长期研究病毒，但因参与调查疫苗事故而研究免疫学，并观察到胚胎与免疫耐受的关系 (Burnet, 1941)、第二次免疫反应大于第一次免疫反应的现象 (Burnet *et al.*, 1941)。很难用直接模板学说解释为什么第二次免疫反应大于第一次 (Glenny and Südmersen, 1921; Burnet *et al.*, 1941)。Burnet 持续认真思考免疫学理论 (Burnet, 1948, 1949)，对 Owen、Jerne 和 Talmage 的文章都很敏感，再版书的时候不断根据新的进展更新自己的理论。

1957年8月的一个周末，Burnet 写下了抗体形成的克隆选择学说 (Burnet, 1957)。他首先回顾了 Talmage (1957) 对于抗体形成理论的三种分类：直接模板、间接模板和 Jerne (1955) 的选择学说。他指出自己曾提出的区别自我和非我的“自我标记”想法，源于当时实在难以想象免疫系统怎么可能识别所有外来抗原，而这种想法现在看来是错误的。

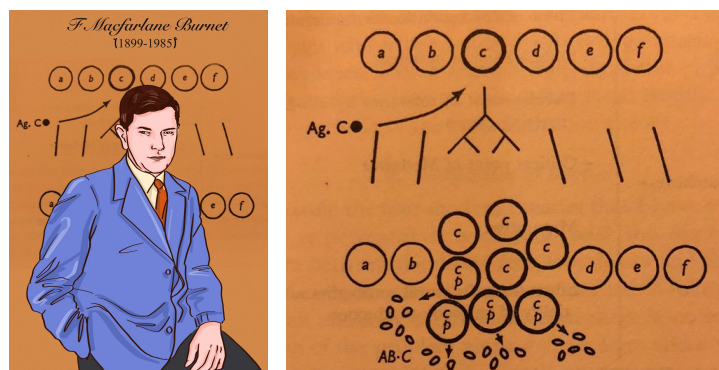


图 8-4 Burnet 及其克隆选择学说

Burnet 认为体内已有自然抗体的多样性可以很好解决区别自我和非我的问题，Burnet 在 Talmage 修饰的 Jerne 学说，即细胞水平进行的自然学说之上，提出不仅是细胞水平上的选择，而且是同种细胞的克隆(单克隆)水平上的选择导致了特异性抗体的产生。抗体生成细胞的表面含抗原结合位点，这些位点与同一细胞合成的抗体一致(它们识别同样的抗原)。这些细胞可以释放抗体，也可以增殖产生更多同样的细胞。抗原进入身体后，附着到含结合其位点的细胞上，刺激细胞增殖 (Gowans, 1957; Simonsen, 1957)。能够识别抗原的细胞得到刺激而增殖，其后代可以分泌相应的可溶性抗体，从而产生免疫反应。第二次免疫时，因为已有增殖的细胞，所以反应大于第一次。

Burnet 在美国 Vanderbilt 大学进行系列演讲后，在其后的书中更详细地进行了阐述 (Burnet, 1959)。他先复习了细菌和病毒的克隆、突变和选择。再列举了免疫的基本事实：抗体是血清中

的球蛋白，第一次和第二次免疫反应的差别，对自身的免疫耐受，淋巴组织的细胞参与免疫反应等。他明确指出产生抗体的细胞是淋巴细胞及其相关的浆细胞(Fagraeus, 1947; Coons, Leduc and Connolly, 1955)。他也分析了产生自身耐受的可能机理。在抗体形成理论方面，他回顾了 Ehrlich 的侧链理论、Haurowitz-Pauling 的直接模板理论、Burnet-Fenner 的间接模板理论、Jerne 的自然选择理论和克隆选择理论。

Burnet 也明确提出：胚胎发育早期，有多种细胞，分别可以产生不同的抗体。与自身已有抗原接触后，有反应的细胞被清除，因而有自身免疫耐受。出生后，释放抗体，或产生抗体。

Talmage 和 Burnet 都意识到，他们的假说带来两个要求：每种细胞只产生一种抗体(Talmage, 1957; Burnet, 1957); Jerne、Talmage 和 Burnet 的假说都需要个体能够产生数量很多的不同抗体。第一个要求很快被证明。第二个问题需要较长时间。

Gustav Nossal(1931-)医学院毕业后到 Burnet 实验室读研究生。他和来访的美国生物学家 Joshua Lederberg(1925-2008)合作，用针对细菌鞭毛的抗体证明脾脏来源的单个细胞只能产生一种抗体(Nossal and Lederberg, 1958; Nossal, 1958)，这一实验最后可以做到 3628 个细胞，只有两个细胞可能产生了两种抗体(或一种可以识别两个抗原的二价抗体)，而其他 3626 个细胞都只能产生一种抗体(Nossal and Mäkelä, 1960)。

1965 年，确定了产生抗体的淋巴细胞(B 淋巴细胞)的来源(Cooper, Peterson and Good, 1965)。造血干细胞产生前 B 细胞，进一步发育成为 B 细胞，受抗原刺激后成为浆细胞，浆细胞分泌抗体。

8.4 抗体蛋白质的基本结构

抗体的化学本质是蛋白质，这是多年研究的结论(e.g., Felton, 1928; Heidelberger and Kendall, 1929, 1935, 1936; McFarlane, 1935; Chow and Wu, 1936; Tiselius, 1937; Tiselius and Kabat, 1938; Pauling, 1940; Scheer, Lagsdin and Wyckoff, 1941; Scheer *et al.*, 1941)。按蛋白质电泳特征称为 球蛋白(中文曾称为丙种球蛋白)(Tiselius, 1937; Tiselius and Kabat, 1938)，按功能称为免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)。

对 Ig 的蛋白质研究得益于发现“Bence-Jones 蛋白质”。1884 年，英国医生 Henry Bence Jones(1813-1873)从当时所谓“软骨病”人的尿液分析发现后来称为 Bence Jones 蛋白质的物质(Bence Jones, 1848)。这种病人实际患多发性骨髓瘤(multiple myeloma)。从孤儿成长为科学家的 Putnam 多年研究骨髓瘤分泌的蛋白质，发现它们是 Ig (Putnam and Udin, 1953; Putnam, 1962)。Edelman 确定它们是 Ig 的轻链 (Edelman and Poulik, 1962; Edelman and Gally, 1962)，每一骨髓瘤分泌单一的(“单克隆”)Ig 轻链(Potter *et al.*, 1964)。可以用化学诱变剂导致正常鼠发生骨髓瘤(Potter and Boyce, 1962)，得到不同的骨髓瘤用于研究。发现骨髓瘤的抗体特征为 1975 年发明单克隆抗体的制备技术奠定了基础。在 1960 年代对免疫学研究帮助很大，因为科学家通过骨髓瘤可以很快获得大量同一蛋白质，从而有助于研究 Ig 的氨基酸序列。

英国国家医学研究所的 Rodney Porter(1917-1985)、美国佛罗里达大学和印第安纳大学的 Frank Putnam(1917-2006)和洛克菲勒大学的 Gerald Edelman(1929-2014)等实验室揭示了 Ig 的基本结构(Porter, 1959; Edelman and Poulik, 1961; Edelman and Gally, 1962, 1967; Putnam *et al.*, 1963; Edelman *et al.*, 1969)。Ig 可以被木瓜蛋白酶(和胰蛋白酶)切为 Fab 段和 Fc 段(Porter, 1950; Fried and Putnam, 1960;

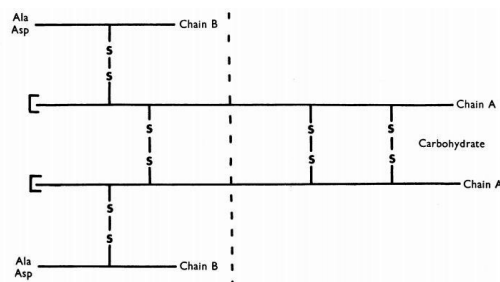


图 8-5 抗体分子结构 (Fleschman *et al.*, 1963)

Nisonoff *et al.*, 1959), 也可以通过二硫键还原分开(Edelman, 1959; Nisonoff *et al.*, 1960; Franěk, 1961), 由重链和轻链组成(Edelman and Poulik, 1961)。1963 年了解的抗体基本结构如图(Fleischman, Porter and Press, 1963)。

轻链的氨基酸序列得到确定(Hilschman and Craig, 1965; Titani *et al.*, 1965; Bennett *et al.*, 1965; Putnam, Titani and Whitley, 1966; Titani, Shinoda and Putnam, 1969)。1967 年首次确定一条轻链全部序列(Wikler *et al.*, 1967)。1969 年确定同一个 Ig 的轻链和重链全部序列后获得更准确的结构(Edelman *et al.*, 1969), 明确同一 Ig 重链和轻链的 V 区相似, 更明确了重链和轻链有多少个二硫键相连。一般哺乳动物 Ig 亚基由两条轻链和两条重链组成, 轻链两百多氨基酸残基、重链五百多氨基酸残基。两条重链之间以二硫键共价连接, 轻链也以二硫键分别与一条重链结合。重链和轻链的氨基端为可变区域(V 区), 人类的由一百一十个左右的氨基酸组成, V 区差异最大的部分被推断为抗体结合区域(Wu and Kabat, 1970)。重链的羧基部分为恒定区域(C 区)可以与补体结合, 引起补体反应。

1968 年, 美国国家健康研究院的科学家解析了 Ig 的晶体结构(Terry, Matthew and Davis, 1968)。此后进一步工作得到更精确的结果(Silverton, Navia and Davis, 1978)。

按照其 Fc 段的差别, 哺乳动物的 Ig 通常分为五类: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM。在抗原第一次刺激 B 细胞时, B 细胞表面主要是 IgM、IgD, 之后出现类型转变(class switching) (Wang *et al.*, 1970), 产生和分泌 IgG(和 IgE、IgA)。

IgD、IgE 和 IgG 的结构为典型的两条轻链和两条重链。分泌型的 IgA 是二聚体, 由两个这样的亚单位组成。IgM 是五聚体, 由五个同样的亚基组成。导致红细胞(和细菌)凝集反应的原因是一般 Ig 至少有两个抗原结合位点, 可以同时结合抗原性相同的两个细胞。而多聚体的抗体更可以结合更多具有相同抗原的细胞。

轻链有两种: κ (kappa)和 λ (lambda)。一个免疫球蛋白分子只能有两种轻链之一。

重链和轻链的氨基端组成抗原结合位点。

8.5 抗体多样性产生的多种可能模型

一个人的一生中可以产生很多种抗体, 有一种估计是 10^{12} 种抗体。

Landsteiner 发现, 动物的特异抗体不仅对毒素、对病原菌, 而且对化学分子, 包括自然界不存在的化学分子, 而且很多化学差别能够引起不同的抗体(Landsteiner, 1936)。这让人们大开眼界, 认识到多样性是识别化学特异性。

动物个体如何产生数量众多的不同抗体?

争论的核心问题在于: “多基因”对“少基因”, “种系发生细胞”对“体细胞”。一种观点认为抗体的基因来自进化过程的积累, 在个体的种系发生细胞有很多编码抗体蛋白质的基因, 甚至一一对应各种不同的抗体。另一观点认为种系发生细胞只有很少与抗体蛋白质相应的基因, 在体细胞分化过程中产生更多基因(或其重组、突变)而编码所有抗体。

曾有多个假说, 例如:

1) 多年坚持主张抗体的产生犹如酶的适应性的 Burnet 曾认为无需提出基因是抗体特异性的原因(Burnet and Fenner, 1948);

2) 分子生物学家 Lederberg 于 1959 年提出基因与抗体的关系: 抗体蛋白质的特异性由其特定氨基酸序列所决定; 产生特定抗体的细胞含相应的特定核苷酸序列; 抗体形成细胞的基因多样性源自其增殖过程中很高的自发突变率; 高突变率包括细胞增殖某些时期 Ig 的 DNA 组装随机性。每个细胞在开始成熟时, 按其基因型自发产生少量抗体; 未成熟的抗体形成细胞在遇到同源抗原时被抑制(可以是消除细胞); 成熟的抗体形成细胞在同源刺激下成为浆细胞; 抗原刺激触发成熟细胞进行增殖, 但基因型稳定, 因而细胞克隆增大, 产生同源抗体; 抗原消失后,

这些克隆仍然存在，一旦遇到同样抗原可以很快出现抗体反应(Lederberg, 1959);

3) 物理学家 Leo Szilard(1898-1964)于 1960 年提出抗体产生的理论。从细菌基因的重量和哺乳动物一个细胞内 DNA 的重量，他推算一个细胞内可有一百万种基因，他认为每一种抗原可以进入细胞内，通过结合特异的酶，解除了特异的抑制子，使得对应的抗体编码基因得以启动表达，产生抗体(Szilard, 1960)。这一理论需要在种系发生细胞就存在很多基因，不需要体细胞基因改变;

4) 1962 年，当时在美国 Wisconsin 大学的英国科学家 Oliver Smithies(1925-2017)等提出结合珠蛋白(haptoglobin)的基因可以有基因重组(特别是基因复制 duplication)和点突变(Smithies, Connell and Dixon, 1962)。1963 年，Smithies 提出同一条染色体基因重组(特别是基因交叉及其导致的倒位)是 Ig 多样性的机理之一，另一机理为 Ig 基因的碱基突变(增加或减少碱基导致移码突变)(Smithies, 1963; 1967);

5) 1965 年，加州理工学院的 William Dreyer(1928-2004)和 Claude Bennett 提出：在种系发生细胞的同一条染色体上，一部分由多个编码 V 区的序列重复组成(例如成为环状 DNA)。而编码 C 区的序列可以如细菌质粒形成过程一样在染色体之外。在体细胞分化过程中，C 区域的 DNA 只与 V 区域序列之一(多个环之一)匹配而产生独特的轻链(Dreyer and Bennett, 1965);

6) 意大利纳布纳斯国际遗传学和生物物理学实验室的科学家提出：编码 Ig 的基因其遗传密码有特殊性，同一个密码可以被翻译成为不同的氨基酸(Potter, Appella, Geisser, 1965)。也许从几百个特殊区域选其中一到两个与 C 区组成一条 Ig(Cioli and Baglion, 1966);

7) Leroy Hood(1938-)成为加州理工学院 Dreyer 的研究生，他们提出：N 端 V 区的肽段与 C 端分别由两个基因指导编码产生，之后两个肽段由酶促反应所连接称为单个肽段，或编码 N 端和 C 端的两个基因融合、或其 RNA 融合(Hood, Gray and Dreyer, 1966);

8) 剑桥的英国医学研究基金会(MRC)的分子生物学实验室(LMB)的分子生物学家 Sydney Brenner(1927-2019)与免疫学家 César Milstein(1927-2002)提出：编码共同区域的核酸序列是酶的识别位点，这种酶切割 DNA，切割后 DNA 在修复过程中在 V 区引入变异(Brenner and Milstein, 1966);

9) Edelman 提出：在进化过程中，编码 Ig 的基因发生串接重复(tandem duplication)，可能重复到 50 个左右。它们出现点突变，从而不同。在哺乳动物个体的淋巴细胞成熟过程中，出现体细胞的 DNA 交叉(somatic cross-over)，产生基因突变(Edelman and Gally, 1967);

10) 剑桥大学植物系的遗传学家提出在同一个染色体上，有多个编码 Ig 的基因重复排列，淋巴细胞成熟过程中，发生同一染色体内的交叉(intrachromosomal cross-over)，两个基因连在一起编码一个 Ig(Whitehouse, 1967)，这一假说在 Dreyer and Bennett(1965)基础上进了一步，编码 C 区的基因不再是在染色体外，而是与编码 V 区的基因同在同一条染色体上;

11) 伯克利加州大学科学家提出编码 V 区域的基因与编码 C 区域的基因需要在 DNA 或 RNA 水平连接(Koshland, Davis and Fujita, 1969);

12) 到 1970 年，Hood 和 Talmage 还认为种系发生假说更有吸引力(Hood and Talmage, 1970);

13) Edelman 提出：在淋巴细胞成熟过程中，编码 V 区的多个基因中的一个因为基因转位(translocation)而与编码 C 区的连接在一起，编码 Ig(Gally and Edelman, 1970);

14) Jerne 提出免疫器官是突变发生器官(mutant-breeding organs)，其中淋巴细胞编码 Ig 的基因出现体细胞基因突变，生成多种抗体(Jerne, 1971);

15) Salk 研究所的 Melvin Cohn (1922-2018) 提出：所有体细胞都有低频的基因突变，种系发生细胞有 25 到 50 个 V 基因，这些基因在体细胞中出现低频突变，在高变异区域的突变比其他序列高 10 到 100 倍(Cohn, 1971);

16) 英国国家医学研究所的科学家提出有三套 V 基因，都存在于种系发生细胞(Williamson,

1972)。

综上所述, 仅仅基于当时已知 Ig 的轻链和重链有 V 区和 C 区、V 区有多种氨基酸序列这一基本情况, 就可以提出多种假说。

但是, 科学不能停留在猜测。

8.6 分子生物学实验确定抗体产生的机理

只有实验能确定抗体产生的确切机理。

种系发生细胞学说认为对应于每一个抗体(包括其 V 区)都有一个特定的基因, 由此推演, 就需要细胞早期拥有较多相应的编码基因; 而体细胞变异学说认为变异导致更多基因, 早期不需要很多基因。所以, 区分这两类假说最简单的方法是检测编码 V 区基因的数量。

第一个用实验推测抗体基因数量的是美国西雅图华盛顿大学的 Ursula Storb。她取脾脏的 DNA, 放射性标记脾脏和骨髓瘤的 RNA, 看它们之间的杂交量, 而加没有标记的肝脏 RNA 作为没有抗体 RNA 的来源。她假定肝脏 RNA 竞争掉了非 Ig 的基因结合, 剩下的主要是 Ig 的基因与脾脏和骨髓瘤的 RNA 结合。以此, 她得到结果推测每半个基因组有 6 千到 1 万 4 千个序列可以编码 Ig 的 V 区。因这一数量足够大, 她认为支持抗体变异的种系发生细胞学说(Storb, 1972)。

这种方法有很多影响因素, 推测不够准确。更可靠的方法需要提取 Ig 重链或轻链的 mRNA, 在体外翻译系统证明其编码 Ig, 高度特异标记这种 mRNA 或其 cDNA, 检测它与基因组 DNA 的杂交速率, 从而推测 DNA 的拷贝数(Delovitch and Baglioni, 1973)。在不能 DNA 测序的情况下, 当时能用于分析 DNA 重复序列拷贝数的是 C_{ot} 分析(Waring and Britten, 1966; Britten and Kohne, 1968)。以此方法, 麻省理工学院的科学家提取骨髓瘤 MPC11 中编码 Ig 轻链的 mRNA, 它与肝脏或骨髓瘤的 DNA 杂交, 推测重复数为 40 到 500, 不足以支持种系发生细胞学说(Delovitch and Baglioni, 1972, 1973)。

纽约市立大学的研究者分析多种哺乳类动物的重链 V 区序列, 发现它们的变化有进化规律, 而且有限, 认为支持少基因的体细胞变异学说(Capra, Wasserman and Kehoe, 1973)。

1974 年, 多个实验室进行了 C_{ot} 分析。Storb 的结果推测有 2500 到 5000 个 κ 轻链的 V 区(V _{κ}) 基因, 继续支持种系发生细胞学说(Storb, 1974)。洛杉矶加州大学的 Williamson 推测重链的 V 区(V_H) 基因有 5000 个, 也支持种系发生细胞学说 (Premkumar, Shoyab and Williamson, 1974)。但是, 当时在瑞士 Basel 免疫研究所工作的日本科学家利根川进(1939-)等的结果都支持少基因学说。利根川进通过 MOPC70E 骨髓瘤获得的结果推算小鼠每半基因组最低可能只有一个 V 基因、最高 200 个(Tonegawa *et al.*, 1974a)。剑桥大学的科学家用 MOPC21 骨髓瘤的结果推算有 1 到 250 个 V _{κ} 基因(Rabbits *et al.*, 1974)。利根川进分析 MOPC11 骨髓瘤的 Ig 重链基因推算小鼠每半基因组可能只有一个 V_H 基因(Bernadini and Tonegawa, 1974)。瑞士科学家分析 MOPC41 骨髓瘤的结果支持只有两个拷贝的 C_H 基因(Faust, Diggelman and Mach, 1974)。用高度纯化的 MOPC41 来源的 C _{κ} 的 mRNA, 当时在 NIH 的 Philip Leder (1934-) 实验室工作的本庶佑(Tasuku Honjo, 1942-)等推测它只有 2 到 3 个拷贝, 不支持种系发生细胞学说(Honjo *et al.*, 1974)。旧金山加州大学的研究者也推测 C _{κ} 只有 3 到 4 个拷贝(Stavnezer *et al.*, 1974)。利根川进在更严谨的实验条件下得到的数据进一步支持 V _{κ} 基因数量可能为 1、不超过 200(Tonegawa *et al.*, 1974b)。

Milstein 实验室从 MOPC21 骨髓瘤纯化了编码其轻链的 mRNA, 并进行了 DNA 短片段的序列测定(Brownlee *et al.*, 1973)。进一步分析多个小片段的序列后, 他们只有一种 3' 非编码区 (3'UTR) 序列, 从而推论编码 V 区和编码 C 区的核酸序列应该在同一条 mRNA 上才能只有一种 3'UTR 序列, 同一个基因编码 V 区和 C 区两段氨基酸序列(Milstein *et al.*, 1974)。

Leder 进一步研究发现, MOPC41 的 Ig 基因编码 C 区的拷贝数只有 2 到 3, 但编码 V 区的拷贝数在 30 至 50 之间(Leder *et al.*, 1974), 他们提出在 DNA 或者 RNA 水平, 需要有迄今未知

的机理，将编码 V 区的部分与编码 C 区的部分连起来。

英国科学家还用 MOPC21 骨髓瘤进行分析推测 V 区和 C 区都只有几个拷贝(Rabbits and Milstein, 1975)。利根川进纯化 λ 和 κ 轻链的 mRNA 达到 90%以上的纯度，发现 λ 和 κ 轻链的 DNA 一样拷贝数有限，再加上当时已知的氨基酸序列，他推算约 25 种 V κ (或 V λ)，不支持种系发生细胞学说(Tonegawa *et al.*, 1976)。瑞士日内瓦大学科学家分析 MOPC41 骨髓瘤编码轻链的基因完全没有重复，重复由污染的 DNA 造成(Farace *et al.*, 1976)。本庶佑等推测 V 只有两个拷贝(Honjo *et al.*, 1976)。

1976 年，穗积信道(Nobumichi Hozumi, 1943-)与利根川进设计简单而巧妙的实验检测胚胎期的 Ig 基因与成体 Ig 基因的差别(Hozumi and Tonegawa, 1976)。他们用 Balb/c 小鼠衍生的 MOPC321 骨髓瘤纯化其编码 Ig 轻链的 mRNA，比较 12、13 天 Balb/c 鼠胚和 MOPC321 与之杂交的 DNA(编码轻链的 DNA)。他们用限制性内切酶 BamH1 将基因组 DNA 切成小段，然后看哪些片段可以杂交轻链 mRNA 所制备的放射性标记的探针。他们将轻链的 RNA 探针分成全基因的探针和 3'端的探针。

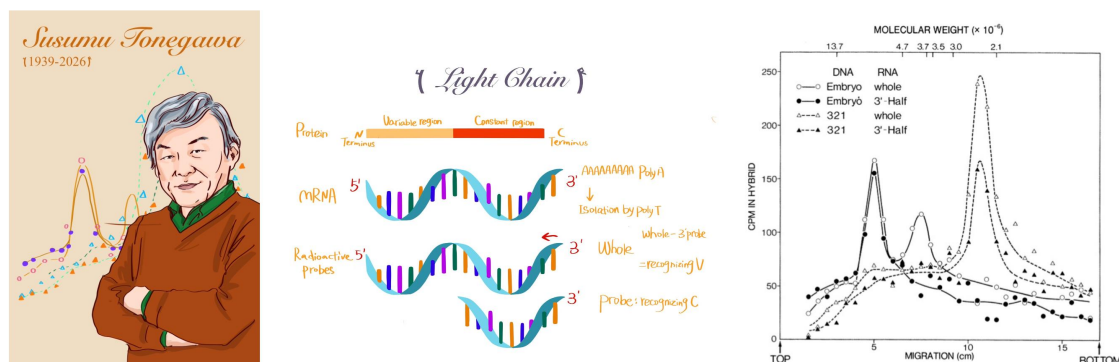


图 8-6 利根川进，实验设计，实验结果

在胚胎中，RNA 探针可以杂交到两个分子量分别为 6.0 和 3.9 百万道尔顿的 BamH1 片段，其中 6 百万道尔顿的片段与全长和 3'的两种 RNA 探针同等杂交，所以 6 百万道尔顿的片段应该含 C 区及 mRNA 的 3'非翻译区而不含 V 区。3.9 百万道尔顿的片段只与全长的 κ RNA 探针杂交、不与 3'的 κ RNA 探针杂交，所以 3.9 百万道尔顿的片段应该含 V 区和 mRNA 的 5'端非翻译区。在 MOPC321 骨髓瘤中，利根川进实验室发现只有一个 2.4 百万道尔顿的 BamH1 片段与全长和 3'的两种 κ RNA 探针分别都杂交，而且与全长探针杂交的信号强度是与 3'探针杂交强度的两倍，应该是同时含 V 区和 C 区。他们的结果提示在胚胎中编码 V 区和 C 区的 DNA 位于两个不同的片段，而成熟的免疫细胞中一个短的片段同时编码 V 区和 C 区。在染色体发生重组后，使编码 V 区的 DNA 与编码 C 区的 DNA 更接近了。他们认为不会是因为基因序列变化正好失去了 BamH1 的酶切位点，因为如果失去一个位点，长度应该是 9.9 而不是 2.4 百万道尔顿。需要同时改变几个 BamH1 切割位点的序列才能得到 2.4 百万道尔顿的片段。以后他们换了限制性内切酶也观察到类似的变化，而且用 λ 轻链也观察到类似变化(Tonegawa *et al.*, 1977a)。Tonegawa 讨论了几种 V 和 C 区基因重组的模型(Hozumi and Tonegawa, 1976; Tonegawa *et al.*, 1977a)。英国科学家用类似方法观察到胚胎与骨髓瘤来源 Ig 基因的 V 区和 C 区有染色体重组,但以为 V 和 C 区即使在骨髓瘤仍并非紧邻(Rabbits and Forster, 1978)。

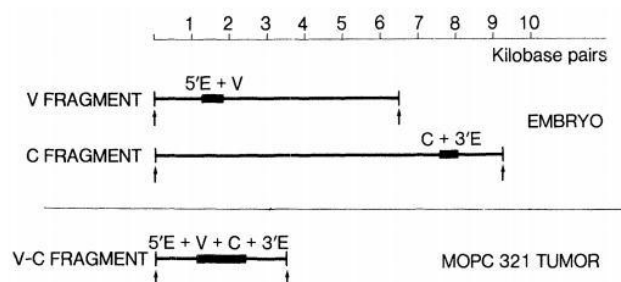


图 8-7 利根川进对结果的理解

1973 年，旧金山加州大学生物化学系的 Herbert Boyer 和斯坦福大学微生物系的 Stanley Cohen 发明重组 DNA 技术(Cohen *et al.*, 1973)。DNA 序列测定方法至 1977 年成功地建立(Wu, 1972; Maxam and Gilbert, 1977; Sanger, Nicklen and Coulson, 1977)。

技术的进步推动了基因的分析。1977 年，来源于 12 天鼠胚的 Igλ 轻链基因成为最早克隆的几个基因之一(Tonegawa *et al.*, 1977b)，它含编码 V 和 C 的部分。利根川进实验室还克隆了 HOPC2020 骨髓瘤的 λ 轻链基因，也含编码 V 和 C 的部分。用电子显微镜检测杂交推算其 V 和 C 间隔 1250 碱基对(Brack and Tonegawa, 1977)。Leder 实验室克隆了 MOPC149 骨髓瘤的两种 Vκ 基因的 DNA，发现可能有多种序列有差别的 Vκ 基因(Seidman *et al.*, 1978)。利根川进实验室克隆了全长的胚胎来源的 轻链基因和 HOPC2020 来源的 λ 轻链基因，通过分析确定 V 和 C 在淋巴细胞分化过程中应该有重组。重组应该发生在 V 和 C 之间的 J 序列，实际为 V-J 重组(Brack *et al.*, 1978)。Hood 实验室分析了 22 种 κ 链的 J 序列，胚胎不仅有多数 Vκ 序列也有多个 J 序列，在淋巴细胞成熟过程中，其中一个 Vκ、一个 Jκ 经过 V-J 的连接被选择(Weigert *et al.*, 1978)。利根川进实验室再克隆和分析鼠胚全部 Jκ 序列，其中有 5 个不同的 Jκ 序列，而成熟后浆细胞只有一个 Jκ 序列，他们分析认为在染色体 V-J 重组过程中，其间的序列失去而被选择的 Vκ 与 Jκ 连接(Sakano *et al.*, 1979)。Leder 实验室也有类似结论(Seidman, Max and Leder P, 1979)。

Hood、本庶佑和利根川进等实验室发现免疫球蛋白基因形成和类别转换有多次重组(Davis *et al.*, 1980; Kataoka *et al.*, 1980; Sakano *et al.*, 1980; Kurosawa and Tonegawa, 1982)。可变区的形成来自 V(D)J 重组：轻链可变区由 V-J 重组而形成，重链的可变区先由 D-J 重组、再由 V-DJ 重组。形成后的 VJ 或 VDJ 外显子与恒定区 C 的外显子在 RNA 剪接的过程完成。另一方面，B 细胞活化后还可以发生重链类别转换(class switch recombination, CSR)：已经重组的 VDL 可变区与重链的恒定区基因发生重组，从而产生 IgG、IgE、IgA 等。1983 年，利根川进总结结细胞染色体重组如图。

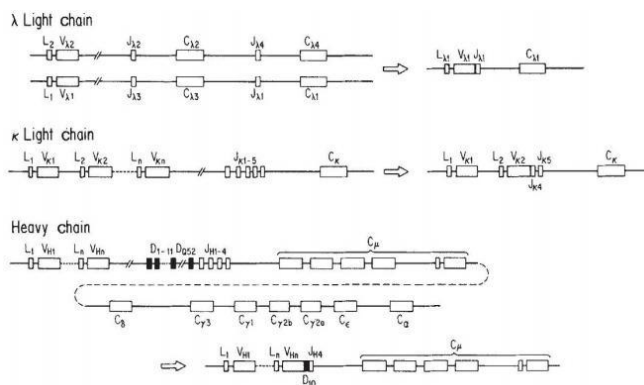


图 8-8 利根川进总结染色体重组产生编码抗体的基因

染色体重组的多样性是 Ig 序列多样性的一个重要来源。人的抗体由两条重链和两条轻链组成。人的 14 号染色体编码 Ig 重链基因, 由 2 号染色体编码 轻链, 22 号染色体编码 轻链。功能性重链基因片段包含 46 种 V 区段、23 种 D 区段、6 种 J 区段。功能性 轻链有 33 种可能的 V、5 种 J, 无 D 区段。功能性 轻链基因有 33 种 V、5 种 J, 无 D 区段。这些的组合, 加上碱基的随机筛选, P 序列增加(P nucleotide addition), 由末端转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)介导的 N 序列增加 (non-template nucleotides addition), 至少有 5×10^{13} 种可能。这不仅是 B 淋巴细胞产生抗体多样性的机理, 也是 T 淋巴细胞表面受体的多样性机理, 人的 T 细胞受体因此可以有约 10^{16} 种可能的组合。

8.7 结语

克隆选择学说的直接应用诞生了单克隆抗体技术, 它不仅可以用于检测、而且可以用于治疗(Köhler and Milstein, 1975)。

抗体是蛋白质。哺乳动物中除骆驼科动物的部分抗体缺少轻链外, 抗体亚基一般由两条轻链和两条重链组成。最初在 B 细胞表达的是膜结合的抗体 Ig 与 2 个跨膜蛋白 Ig α 、Ig β 组成的 B 细胞受体 (BCR) (Raff, Steinberg and Taylor, 1970)。BCR 受抗原刺激后, 通过 Ig α 和 Ig β 将信号转导给细胞内, 刺激 B 细胞增殖和分化成熟, 包括基因突变和选择, 抗体亲和力提高, 成为浆细胞或记忆细胞。一旦再次得到抗原刺激, 快速分泌抗体 Ig。

抗体有结合抗原的变异 V 区, 和恒定的 C 区。在幼稚 B 细胞中, 编码 V 区的有多个序列, 还有多个 J 序列, 和有限的 C 区。在重链还有位于 J 序列的 N 端的多个 D 序列。由染色体 V(D)J 重组导致特定的一种 V 序列与特定的一种 D 和/或 J 序列连接, 重组的产物作为一个外显子与 C 区一起表达成熟的 Ig 基因。因为重组过程中选择和组合的多种可能而提供抗体的多样性。不同的 V(D)J 序列彼此类似, 因而不同的序列组合都能组合形成正常的抗体框架结构; 同时不同的 V(D)J 序列又存在一些差异, 特别是编码直接结合抗原的位置的序列上, 从而在重组过程中提供抗体特异性的多样性。V(D)J 重组的机理, 特别是重组激活酶的发现, 见第 14 章第 5 节。

此外, V(D)J 重组过程中连接位点处序列的多样性还可以得到增加: DNA 断裂位点连接之前的加工、处理, 如碱基的随机筛选, P 序列增加, 末端转移酶介导的 N 序列增加等(Alt and Baltimore, 1982; Desiderio *et al.*, 1984)。

除体细胞重组之外, Ig 序列多样性还有一个来源: 体细胞超突变(somatic hypermutation)。在编码 V 区和 J 区的 DNA 序列, 特别是其编码与抗原结合位点的区域, 在特定的酶催化下会发生远高于基因组背景频率的单碱基突变。体细胞基因突变, 最早由 Lederberg 提出(Lederberg, 1959), Brenner 和 Milstein 进一步提出抗原结合区域的突变频率可能高于其他序列(Brenner and Milstein, 1966)。蛋白质序列分析(Weigert *et al.*, 1970)和基因测序发现确实有体细胞突变(Bernard, Hozumi and Tonegawa, 1978; Brack *et al.*, 1978), 而且淋巴细胞接触抗原时间越长、其 Ig 基因变异越多(Griffiths *et al.*, 1984; Berek and Milstein, 1987)。体细胞高突变的机理是活化诱导的脱氨酶(activation-induced cytidine deaminase, AID), 它催化脱氧胞嘧啶脱氨, 碱基变化及其修复导致 Ig 序列多种变化(Di Noia and Neuberger, 2007; Teng and Papavasiliou, 2007; Peled *et al.*, 2008)。

抗体多样性的产生, 依赖于编码抗体的基因的冗余拷贝、V(D)J 区段的重新排列组合, 以及编码序列的超突变。这与演化过程中生物多样性的产生是高度类似的。突变是演化的基础。在演化历史上, 在不影响原有拷贝发挥正常功能的前提下, 冗余的基因拷贝使得基因上影响原有功能的突变能够得以积累, 从而为演化出新功能、新特点的新基因提供素材, 且染色体水平上的重复还为性的出现提供了可能。在多细胞动物发育过程中起重要作用的 SOX 基因家族和 FOX 基因家族就是典型的例子。类似的基因重新排列组合, 乃至蛋白质结构域或是外显子的重

排(Exon shuffle),也是生物多样性的重要来源。在诸如流感病毒这样的病毒中尤为常见。如同B细胞克隆通过基因水平的重复、重排和突变获得多样性,从而回应抗原刺激产生大量特异性的抗体一样,生物也通过基因水平的重复、重排和其他形式的突变获得多样性,从而回应环境的选择压力,产生出以各种方式特异性适应其所处环境的全新物种。

注1: Burnet 于1929年发现第二次免疫反应大于第一次,但这一结果被英国医学杂志拒稿,他后来讲其发表于1941年无需同行评审的研究所发行的单行本中的结果(Burnet *et al.*, 1941)。他发表于1956年的书显然是1955年写作时还没有Jerne的文章。Burnet对澳大利亚的科学有很大影响,1957年他决定将Walter and Eliza Hall研究所全部集中研究免疫学,使之长期成为国际免疫学研究重镇。

注2: Gustav Nossal的曾祖父母是犹太人,因此其家庭也在希特勒时代被迫离开维也纳移民澳大利亚。他从医学院毕业后,对病毒研究很感兴趣,1957年被推荐到Burnet实验室读研究生。结果发现Burnet“转行”全部研究免疫,不再研究病毒,非常惊讶,非常不情愿。为了做实验,他读了文献,特别注意到即将从美国来其所在澳大利亚研究所访问的Joshua Lederberg的方法可以用于自己的研究。

注3: Joshua Lederberg因研究细菌间的遗传物质转移而获1958年诺贝尔奖。他当年已到澳大利亚与Burnet实验室合作,后从Wisconsin搬到Stanford创办遗传学系。

参考文献

- Ada GL and Byrt P (1969) Specific inactivation of antigen-reactive cells with ^{125}I -labelled antigen. *Nature* 222:1291-1292.
- Alt F and Baltimore D (1982) Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79:4118-4122.
- Askonas BA (1961) A study on globulin formation by plasma-cell neoplasm (5563) transplantable in mice. *Biochemical Journal* 79:33-43.
- Bail O and Tsuda KZ (1909) Versuche über bakteriolytische Immunkörper mit besonderer Berücksichtigung des normalen Rinderserums *Zeitschrift für Immunitätsforschung* 1:546-612.
- Bence Jones H (1848) On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 138:55-62.
- Bennett JC, Hood L, Dreyer WJ and Potter M (1965) Evidence for amino acid sequence differences among proteins resembling the L-chain subunits of immunoglobulins. *Journal of Molecular Biology* 12:81-87.
- Berek C and Milstein C (1987) Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunological Reviews* 96:23-41.
- Bernard O, Hozumi N and Tonegawa S (1978) Sequences of mouse immunoglobulin light chain gene before and after somatic changes. *Cell* 15:1133-1144.
- Bernardini A and Tonegawa S (1974) Hybridization studies with an antibody heavy chain mRNA. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 41:73-77.
- Bjørnebow M and Gormsen H (1943) Experimental studies on the role of plasma cells as antibody producers. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 20:649-662.
- Blundell J (1818) Experiments on the transfusion of blood by the syringe. *Medico-Chirurgical Transactions* 9:56-92.

- Blundell J (1819) Some account of a case of obstinate vomiting, in which an attempt was made to prolog life by the injection of blood into the veins. *Medico-Chirurgical Transactions* 10:296-311.
- Blundell J (1824) Researches physiological and pathological; instituted principally with a view to the improvement of medical and surgicall practice. London: E Cox and Son.
- Blundell J (1828) Lectures on the theory and practice of midwifery. *Lancet* 9:513-514.
- Blundell J (1829a) Successful case of transfusion. *Lancet* 11:413-432.
- Blundell J (1829b) Obversations on transfusion of blood—with a description of his gravitator. *Lancet* 12:321-324.
- Boyle R (1666) Tryals proposed by Mr. Boyle to Dr. Lower, to be made by him, for the improvement of transfusing blood out of one live animal into another. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 1:385-388.
- Brack C and Tonegawa S (1977) Variable and constant parts of the immunoglobulin light chain gene of a mouse myeloma cell are 1250 nontranslated bases apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:5652-5656.
- Brack C, Hiram M, Lenhard-Schuller R and Tonegawa S (1978) A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* 15:1-14.
- Breinl F and Haurowitz F (1930) Chemische Untersuchung des Präzipitates aus Hämoglobin und Anti-hämoglobin-serum und Bemerkungen über die Natur der Antikörper. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 192:45-57.
- Brenner S and Milstein C (1966) Origin of antibody variation. *Nature* 211:242-243.
- Brent L (1997) The discovery of immunologic tolerance. *Human Immunology* 52:75-81.
- Britten RJ and Kohne DE (1968) Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529-540.
- Burch PRJ and Burwell RG (1965) Self and not-self clonal induction approach to immunology. *Quarterly Review of Biology* 40:252-279.
- Burnet FM, Freeman M, Jackson AV and Lush D (1941) The production of antibodies: a review and theoretical discussion. Monograph of the Walter and Eliza Hall Institute of Research in Pathology and Medicine, No 1. Macmillan, Melbourne.
- Burnet FM and Fenner (1948) Genetics and immunology. *Heredity* 2:289-324.
- Burnet FM and Fenner F (1949) The Production of Antibodies. 2nd Editon, Macmillan, London.
- Burnet FM (1956) Enzyme, Antigen and Virus. A study of macromolecular pattern in action. Cambridge University Press, London.
- Burnet FM (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science* 20:67-68.
- Burnet FM (1959) The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Capra JD, Wasserman RL and Kehoe JM (1973) Phylogenetically associated residues within the V_{HIII} subgroup of several mammalian species. Evidence for a "pauci-gene" basis for antibody diversity. *Journal of Experimental Medicine* 138:410-427.
- Chow BF and Wu H (1936) Isolation of immunologically pure antibody. *Science* 84:316.
- Cioli D and Baglioni (1966) Origin of structural variation in Bence Jones proteins. *Journal of Molecular Biology* 15:385-388.
- Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW and Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:3240-3244.

- Cohn M (1971) The take-home lesson-1971. *Annals of the New York Academy of Sciences* 190:529-584.
- Coons AH, Leduc EH and Connolly JM (1955) Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to study of the hyperimmune rabbit. *Journal of Experimental Medicine* 102:49-60.
- Cooper MD, Peterson RDA and Good RA (1965) Delineation of the thymic and Bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature* 205:143-146.
- Cooper MD (2015) The early history of B cells. *Nature Reviews Immunology* 15:191-197.
- Cosenza H and Köhler H (1972) Specific suppression of the antibody response by antibodies to receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69:2701-2705.
- Cotton RGH and Milstein C (1973) fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature* 244:42-43.
- Cruse JM and Lewis RE (1994) David W Talmage and the advent of the cell selection theory of antibody synthesis. *Journal of Immunology* 153:919-929.
- Davis MM, Calame K, Early PW, Livant DL, Joho R, Weissman IL and Hood L (1980) An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* 283:733-739.
- Delovitch TL and Baglioni C (1972) Estimation of the reiteration of Ig genes by RNA-DNA hybridization. *Scandinavian Journal of Immunology* 1:284-285.
- Delovitch TL and Baglioni C (1973) Estimation of light-chain gene reiteration of mouse immunoglobulin by DNA-RNA hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:173-178.
- Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, Thomas E, Boss MA, Landau N, Alt FW and Baltimore D (1984) Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* 311:752-755.
- Di Noia JM and Neuberger MS (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry* 76:1-22.
- Dreyer WJ and Bennett JC (1965) The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 54:864-869.
- Edelman GM (1959) Dissociation of γ -globulin. *Journal of the American Chemical Society* 81:3155-3156.
- Edelman GM (1970) Covalent structure of a human γ G-immunoglobulin. XI. Functional implications. *Biochemistry* 9:3197-3205.
- Edelman GM and Poulik MD (1961) Studies on the structural units of the γ -globulin. *Journal of Experimental Medicine* 113:861-884.
- Edelman GM and Gally JA (1962) The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ -globulins. *Journal of Experimental Medicine* 116:207-227.
- Edelman GM and Gally JA (1967) Somatic recombination of duplicated genes: a hypothesis on the origin of antibody diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 57:353-358.
- Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gotlieb PD, Rutishauser U and Waxdal MJ (1969) The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 63:78-85.

- Ehrlich P (1877) Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 13:263-277.
- Ehrlich P (1878) Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung. Thesis, Leipzig University. (Contributions to the Theory and Practice of Histological Staining, pp. 65-98, Collected Work of Paul Ehrlich, edited by F Himmelweit. Volume 1, Histologie, Biochemie und Pathologie. Pergamon Press, London, 1956).
- Ehrlich P (1885) Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Habilitation-thesis. Berlin: Hirschwald (Translated as the Requirement of the Organism for Oxygen. An analytical study with the aid of dyes. In Collected Work of Paul Ehrlich, pp. 433-496, edited by F Himmelweit, Volume 1, Histologie, Biochemie und Pathologie. Pergamon Press, London, 1956).
- Ehrlich P (1891a) Zur Geschichte der Granula. *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes* 134-137.
- Ehrlich P (1897) Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. *Klinisches Jahrbuch* 6:299-326 (The assay of the activity of diphtheria-curative serum and its theoretical basis. In Collected Work of Paul Ehrlich, pp. 107-125, edited by F Himmelweit, Volume II, Immunitätslehre und Krebsforschung. Pergamon Press, London, 1957).
- Ehrlich P (1897) Die Wertbemessung des Diphtherieheilserums und deren theoretische Grundlagen. *Klinisches Jahrbuch* 6:299-326.
- Ehrlich P (1898) Über die Constitution des Diphtheriegiftes. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 24:597-600.
- Ehrlich P (1899) Observations upon the constitution of the diphtheria toxin. *Transactions of the Jenner Institute of Preventive Medicine* 2:1-16.
- Ehrlich P (1900) On immunity with special reference to cell life. *Proceedings of the Royal Society of London* 66:424-448.
- Ehrlich P (1906) A general review of the recent work in immunity. *Collected Studies on Immunity* 577-586.
- Ehrlich P (1907a) On immunity with special reference to the relationship between distribution and action of antigens. *Journal of the Royal Institute of Public Health* 15:321-340.
- Ehrlich P (1907b) Chemotherapeutic studies on Trypanosomes. The Third Harben Lectures. *Journal of the Royal Institute of Public Health* 15:449-456.
- Ehrlich P (1907c) Chemotherapeutische Trypanosomen-Studien. *Berliner Klinische Wochenschrift* 15:321-340.
- Ehrlich P (1910) Studies in immunity. Collected and translated by Charles Bolduan. John Wiley and Sons, New York.
- Ehrlich P and Lazarus A (1898) Histology of the Blood, Normal and Pathological. In *Specielle Pathologie und Therapie* edited by H Nothnagel, Hölder, Wien. (pp. 181-268, Collected Work of Paul Ehrlich, edited by F Himmelweit. Volume 1, Histologie, Biochemie und Pathologie. Pergamon Press, London, 1956).
- Ehrlich P and Morgenroth J (1899) Zur Theorie der Lysinwirkung (contributions to the theory of lysin action). *Berliner Klinische Wochenschrift* 36:6-8.
- Ehrlich P and Morgenroth J (1900a) Über Hämolyse. Dritte Mittheilung (On Haemolysins. Third Communication). *Berliner Klinische Wochenschrift* 37:453-458

- Ehrlich P and Morgenroth J (1900b) Über Hämolyse. Vierte Mittheilung. *Berliner Klinische Wochenschrift* 37:681–687.
- Fagraeus A (1947) Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies *in vitro*. *Nature* 159:499
- Farace M-G, Aelen M-F, Briand P-A, Faust CH, Vasali P and Mach B (1976) No detectable reiteration of genes coding for mouse MOPC 41 immunoglobulin light-chain mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 73:727-731.
- Faust CH, Diggelman H and Mach B (1974) Estimation of the number of genes coding for the constant part of the mouse immunoglobulin kappa light chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71:2491-2495.
- Ferguson-Smith MA, Aitken DA, Turleau C and de Grouchy J (1976) Localisation of the human ABO: Np-1:AK-1 linkage group by regional assignment of AK-1-9q34. *Human Genetics* 34:35-43.
- Fischer E (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 27:2985-2993.
- Fleischman JB, Porter RR and Press EM (1963) The arrangement of the peptide chains in γ -globulin. *Biochemical Journal* 88:220-228.
- Franěk F (1961) Dissociation of animal 7 S γ -globulin by cleavage of disulfide bonds. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 4:28-32.
- Fried M and Putnam FM (1960) Comparative studies of partial hydropysates of Bence-Jones proteins. *Journal of Biological Chemistry* 235:3472-3477.
- Gally JA and Edelman GM (1970) Somatic translocation of antibody genes. *Nature* 227:341-348.
- Gitlin AD and Nussenzweig MC (2015) Fifty years of B lymphocytes. *Nature* 517:139-141.
- Glenny AT and Südmersen HJ (1921) Notes on the production of immunity to diphtheria toxin. *Journal of Hygiene* 20:176-220.
- Gowans JL (1957) The effect of the continuous re-infusion of lymph and lymphocytes on the output of lymphocytes from the thoracic duct of unanaesthetized rats. *British Journal of Experimental Pathology* 38:67-78.
- Griffiths GM, Berek C, Kaartinen M and Milstein C (1984) Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl-oxazolone. *Nature* 312:271-275.
- Gross G and Eshhar Z (1989) Therapeutic potential of T cell chimeric antigen receptors (CARs) in cancer treatment: counteracting off-tumor toxicities for safe CAR T cell therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 56:59-83.
- Gross G, Waks T and Eshhar Z (1989) Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:10024-10028.
- Heidelberger M and Kendall FE (1929) A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. *Journal of Experimental Medicine* 50:809-823.
- Heidelberger M and Kendall FE (1935) A quantitative study of the precipitin reaction between type III pneumococcus polysaccharide and purified homologous antibody. III. a quantitative study and a theory of the reaction mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 61:563-591.
- Heidelberger M and Kendall FE (1936) Quantitative study on antibody purification. I. The dissociation of precipitates formed by pneumococcus specific polysaccharides and homologous

- antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 64:161-172.
- Hertzfeld E and Klinger R (1918) Chemical studies in physiology and pathology. IV Hemolysis. The complement. *Biochemische Zeitschrift* 87:36-76.
- Hilshmann N and Craig LC (1965) Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 53:1403-1409.
- Hodgkin PD, Heath WR and Baxter AG (2007) The clonal selection theory: 50 years since the revolution. *Nature Immunology* 8:1019-1026.
- Honjo T, Swan D, Nau M, Norman B, Packman S, Polsky F and Leder P (1976) Purification and translation of an immunoglobulin λ chain messenger RNA from mouse myeloma. *Biochemistry* 15:2775-2779.
- Honjo T, Packman S, Swan D and Leder P (1976) Quantitation of constant and variable region genes for mouse immunoglobulin λ chains. *Biochemistry* 15:2780-2785.
- Honjo T, Packman S, Swan D, Nau M and Leder P (1974) Organization of immunoglobulin genes: reiteration frequency of the mouse κ chain constant region gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71:3659-3663.
- Hood LE, Gray WR and Dreyer WJ (1966) On the mechanism of antibody synthesis: a species comparison of L-chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 55:826-832.
- Hood L and Talmage DW (1970) Mechanism of antibody diversity: germ line basis for variability. *Science* 168:325-334.
- Hood L, Eichmann K, Lackland H, Krause RM and Ohms JJ (1970) Rabbit antibody light chains and gene evolution. *Nature* 228:1040-1044.
- Hozumi N and Tonegawa S (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 73:3628-3632.
- Jerne NK (1955) The natural-selection theory of antibody formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 41:849-857.
- Jerne NK (1971) The somatic generation of immune recognition. *European Journal of Immunology* 1:1-9.
- Kataoka T, Kawakami T, Takahashi N and Honjo T (1980) Rearrangement of immunoglobulin γ 1-chain gene and mechanism for heavy-chain class switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77:919-923.
- Kaufmann SHE (2008) Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology* 9:705-712.
- Kehoe JM and Capra JD (1971) Localization of two additional hypervariable regions in immunoglobulin heavy chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 68:2019-2021.
- Klinman NR (1969) Antibody with homogeneous antigen binding produced by splenic foci in organ culture. *Immunochemistry* 6:757-759.
- Köhler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Koshland ME, Davis JJ and Fujita NJ (1969) Evidence for multiple gene control of a single polypeptide chain: the heavy chain of rabbit immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 63:1274-1281.

- Kurosawa Y and Tonegawa S (1982) Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *Journal of Experimental Medicine* 155:201-218.
- Landsteiner K and Reich M (1905) Über Unterschiede zwischen normalen und durch Immunisierung entstandenen Stoffen des Blutserums. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde und Infektionskrankheiten* 39:712.
- Lederberg J (1959) Genes and antibodies. *Science* 129:1649-1653.
- Leder P, Hongjo T, Packman S, Swan D, Nau M and Norman B (1974) The organization and diversity of immunoglobulin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71:5109-5114.
- Lennox ES and Cohn M (1967) Immunoglobulins. *Annual Review of Biochemistry* 36:365-402.
- Maxam AM and Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:560-564.
- McFarlane AS (1935) XLVIII an ultracentrifugal investigation of the serum proteins. *Biochemical Journal* 29:407-429.
- Milstein C, Brownlee GG, Cartwright EM, Jarvis JM and Proudfoot NJ (1974) Sequence analysis of immunoglobulin light chain messenger RNA. *Nature* 252:354-359.
- Mudd S (1932) A hypothetical mechanism of antibody formation. *Journal of Immunology* 23:423-427.
- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai and Honjo T (2000) Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potent RNA editing enzyme. *Cell* 102:553-563.
- Nisonoff A, Wissler FC and Woernley DL (1959) Mechanism of formation of univalent fragments of rabbit antibody. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1:318-322.
- Nisonoff A, Wissler FC, Lipman LN and Woernley DL (1960) Separation of univalent fragments from the bivalent rabbit antibody molecule by reduction of disulfide bonds. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 89:230-244.
- Nossal GJV (1958) Antibody production by single cells. *British Journal of Experimental Pathology* 39:544-551.
- Nossal GJV and Lederberg J (1958) Antibody production by single cells. *Nature* 181:1419-1420.
- Nossal GJV and Mäkelä O (1960) Kinetic studies on the incidence of cells appearing to form two antibodies. *Journal of Immunology* 88:604-612.
- Parks DR, Bryan VM, Oi VT and Herzenberg LA (1979) Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:1962-1966.
- Pauling L (1940) A theory of the structure and process of antibody formation. *Journal of American Chemical Society* 62:2643-2657.
- Pauling L and Delbrück M (1940) The nature of the intermolecular forces operative in biological processes. *Science* 92:77-79.
- Pauling L, Campbell DH and Pressman D (1943) The nature of the forces between antigen and antibody and of the precipitation reaction. *Physiological Reviews* 23:203-219.
- Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman MF and Scharff MD (2008) The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology* 26:481-511.
- Porter RR (1950) The formation of a specific inhibitor by hydrolysis of rabbit antiovalbumin. *Biochemical Journal* 46:479-484.
- Porter RR (1959) The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain.

- Biochemical Journal* 73:119-127.
- Potter M (1962) Plasma cell neoplasia in a single host: a mosaic of different protein-producing cell types. *Journal of Experimental Medicine* 115:339-356.
- Potter M and Fahey JL (1960) Studies on eight transplantable plasma-cell neoplasms of mice. *Journal of the National Cancer Institute* 24:1153-1165.
- Potter M and Boyce (1962) Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature* 193:1086-1087.
- Potter M, Dreyer WJ, Kuff EL and McIntire KR (1964) Heritable variation in Bence-Jones protein structure in an inbred strain of mice. *Journal of Molecular Biology* 8:814-822.
- Potter M, Appella E and Geisser S (1965) Variations in the heavy polypeptide chain structure of gamma myeloma immunoglobulins from an inbred strain of mice and a hypothesis as to their origin. *Journal of Molecular Biology* 14:361-372.
- Premkumar E, Shoyab M and Williamson AR (1974) Germ line basis for antibody diversity: immunoglobulin V_H and C_H gene frequencies measured by DNA-RNA hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71:99-103.
- Prüll C-R (2003) Part of a scientific master plan? Paul Ehrlich and the origins of his receptor concept. *Medical History* 47:332-356.
- Putnam FW (1957) Aberrations of protein metabolism in multiple myeloma; interrelationships of abnormal serum globulins and Bence-Jones proteins. *Physiological Reviews* 37:512-538.
- Putnam FW (1962) Structural relationships among normal human γ -globulin, myeloma globulins, and Bence-Jones proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 63:539-541.
- Putnam FW (1967) Gamma globulins: structure and control of biosynthesis. *Science* 158:813-814.
- Putnam FW and Udén B (1953) Proteins in multiple myeloma. I. Physicochemical study of serum proteins. *Journal of Biological Chemistry* 202:727-743.
- Putnam FW and Hardy S (1955) Proteins in multiple myeloma. III. Origin of Bence-Jones protein. *Journal of Biological Chemistry* 212:361-369.
- Putnam FW, Easley CW and Helling JW (1963) Structural study of human γ -globulin through the analysis of the tryptic peptides of Bence-Jones proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 78:231-233.
- Putnam FW, Titani K and Whitley E (1966) Chemical structure of light chains: amino acid sequence of type K Bence-Jones proteins. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 166:124-137.
- Rabbitts TH, Bishop JO, Milstein C and Brownlee GG (1974) Comparative hybridization studies with an immunoglobulin light chain mRNA fraction and non-immunoglobulin mRNA of mouse. *FEBS Letters* 40:157-160.
- Rabbitts TH and Milstein C (1975) Mouse immune genes: Studies on the reiteration frequency of light chain genes by hybridization procedures. *European Journal of Biochemistry* 52:125-133.
- Rabbitts TH, Jarvis JM and Milstein C (1975) Demonstration that a mouse immunoglobulin light chain messenger RNA hybridizes exclusively with unique DNA. *Cell* 6:5-12.
- Rabbitts TH and Forster A (1978) Evidence for noncontiguous variable and constant region genes in both germ line and myeloma DNA. *Cell* 13:319-327.
- Raff MC (1970) Two distinct populations of peripheral lymphocytes in mice distinguishable by immunofluorescence. *Immunology* 19:637-650.
- Raff MC, Steinberg J and Taylor R (1970) Immunoglobulin determinants on the surface of mouse

- lymphoid cells. *Nature* 225:553-554.
- Raff MC, Feldmann M and de Petris S (1973) Monospecificity of bone marrow-derived lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 137:1024-1030.
- Sakano H, Hüppi K, Heinrich G and Tonegawa S (1979) Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 280:288-294.
- Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W and Tonegawa S (1980) Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 286:676-683.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:5463-5477.
- Scheer Jvd, Lagsdin JB and Wyckoff RG (1941) Electrophoretic and ultracentrifugal analyses of antipneumococcal horse sera. *Journal of Immunology* 41:209-223.
- Scheer Jvd, Bohnel E, Clarke FH and Wyckoff RG (1941) An electrophoretic examination of several antipneumococcal rabbit sera. *Journal of Immunology* 44:165-174.
- Seidman JG, Leder A, Edgell MH, Polsky F, Tilghman SM, Tiemeier DC and Leder P (1978) Multiple related immunoglobulin variable-region genes identified by cloning and sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:3881-3885.
- Seidman JG and Leder P (1978) The arrangement and rearrangement of antibody genes. *Nature* 276:790-795.
- Seidman JG, Max EE and Leder P (1979) A κ -immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. *Nature* 280:370-375.
- Silverstein AM (1999) Paul Ehrlich's passion: the origin of his receptor immunology. *Cellular Immunology* 194:213-221.
- Silverstein AM (2000) The most elegant immunological experiment of the XIX century. *Nature Immunology* 2:93-94.
- Silverstein AM (2002) Paul Ehrlich's receptor immunology: the magnificent obsession. San Diego, Academic Press.
- Silverstein AM (2009) A History of Immunology. San Diego, Academic Press.
- Silverton EW, Navia MA and Davies DR (1977) Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:5140-5144.
- Slater RJ, Ward SM and Kunkel HG (1955) Immunological relationships among the myeloma proteins. *Journal of Experimental Medicine* 101:85-108.
- Smithies O (1963) γ -Globulin variability: a genetic hypothesis. *Nature* 199:1231-1236.
- Smithies O (1967) Antibody variability. Somatic recombination between the elements of "antibody gene pairs" may explain antibody variability. *Science* 157:267-273.
- Smithies O, Connell GE and Dixon GH (1962) Chromosomal rearrangements and the evolution of haptoglobin genes. *Nature* 196:232-236.
- Snapper CM and Paul WE (1987) Interferon- γ and B cell stimulating factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944-947.
- Stavnezer J, Huang RCC, Stavnezer E and Bishop JM (1974) Isolation of messenger RNA for an immunoglobulin kappa chain and enumeration of the genes for the constant region of kappa chain in the mouse. *Journal of Molecular Biology* 88:43-63.
- Storb U (1972) Quantitation of immunoglobulin genes by nucleic acid hybridization with RNA from

- myeloma and spleen microsomes. *Journal of Immunology* 108:755-764.
- Storb U (1974) Evidence for multiple immunoglobulin genes. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 57:31-38.
- Szilard L (1960) The molecular basis of antibody formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 46:293-302.
- Talmage DW (1957) Allergy and immunology. *Annual Review of Medicine* 8:239-256.
- Talmage DW (1959) Immunological specificity, unique combinations of selected natural globulins provide an alternative to the classical concept. *Science* 129:1643-1648.
- Talmage DW, Putnam FW and Titani K (1965) Single point mutation or chromosomal rearrangement. *Science* 150:1484-1485.
- Teng G and Papavasiliou FN (2007) Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual Review of Genetics* 41:107-120.
- Terry WD, Matthews BW and Davies DR (1968) Crystallographic studies of a human immunoglobulin. *Nature* 220:239-241.
- Tiselius A (1937) CLXXXII. Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochemical Journal* 31:1464-1477.
- Tiselius A and Kabat EA (1939) An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *Journal of Experimental Medicine* 69:119-131.
- Titani K, Whitley E, Avogadro L and Putnam FW (1965) Immunoglobulin structure: partial amino acid sequence of a Bence Jones protein. *Science* 149:1090-1092.
- Todd C and White RG (1910a) On the recognition of the individual by haemolytic methods. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 82:416-421.
- Todd C and White RG (1910b) On the haemolytic immune isolytins of the ox and their relationship to the question of individuality and blood relationship. *Journal of Hygiene* 10:185-195.
- Tonegawa S (1976) Reiteration frequency of immunoglobulin light chain genes: further evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 73:203-207.
- Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302:575-581.
- Tonegawa S, Bernardini A, Weimann BJ and Steinberg C (1974a) Reiteration frequency of antibody genes. Studies with κ -chain mRNA. *FEBS Letters* 40:92-96.
- Tonegawa S, Steinberg C, Dube S and Bernardini A (1974b) Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 71:4027-4031.
- Tonegawa S, Hozumi N, Matthysens G and Schuller R (1977a) Somatic changes in the content and context of immunoglobulin genes. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 41:877-889.
- Tonegawa S, Brack C, Hozumi N and Schuller R (1977b) Cloning of an immunoglobulin variable region gene from mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:3518-3522.
- Wang AC, Wilson SK, Hopper JE, Fudenberg HH and Nisonoff A (1970) Evidence for control of synthesis of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 66:337-343.
- Waring M and Britten RJ (1966) Nucleotide sequence repetition: a rapidly reassociating fraction of mouse DNA. *Science* 154:791-794.

- Weigert M, Cesari IM, Yonkovich SJ and Cohn M (1970) Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody. *Nature* 228:1045-1047.
- Weigert M, Gatmaitan L, Loh E, Schilling J and Hood L (1978) Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity. *Nature* 276:785-790.
- Whitehouse HLK (1967) Crossover model of antibody variability. *Nature* 215:371-374.
- Wikler M, Titani K, Shinoda T and Putnam FW (1967) The complete amino acid sequence of a lambda type Bence Jones protein. *Journal of Biological Chemistry* 242:1668-1670.
- Williamson AR (1972) Extent and control of antibody diversity. *Biochemical Journal* 130:325-333.
- Wu R (1972) Nucleotide sequence analysis of DNA. *Nature New Biology* 236:198-200.
- Wu TT and Kabat EA (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *Journal of Experimental Medicine* 132:211-250.
- Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T and Casali P (2012) Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nature Reviews Immunology* 12:517-531.

阅读

Burnet F (1957) A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Australian Journal of Science* 20:67-68.

Hozumi N and Tonegawa S (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 73:3628-3632.