編 号：(75) 010

内 部

出国参观考察报告

美国分子生物学研究概况

8.17
.165
C.1

科 学 技 术 文 献 出 版 社

出国参观考察报告
美国分子生物学研究概况
（内部发行）
编 辑 者：中国科学技术情报研究所
出 版 者：科学技术文献出版社
印 刷 者：中国科学技术情报研究所印刷厂
新华书店北京发行所发行　　各地新华书店经销
开本787×1092·$\frac{1}{16}$　4.25印张　90千字
统一书号：13176.6　　定价：0.40元
1976年4月出版

毛主席語录

列宁为什么说对资产阶级专政，这个问题要搞清楚，这个问题不搞清楚，就会变修正主义。要使全国知道。

自力更生为主，争取外援为辅，破除迷信，独立自主地干工业、干农业、干技术革命和文化革命，打倒奴隶思想，埋葬教条主义，认真学习外国的好经验，也一定研究外国的坏经验——引以为戒，这就是我们的路线。

目　　录

一、基因工程……（1）
二、肿瘤病毒研究概况……（7）
三、核酸的结构与功能……（18）
四、生物膜的结构与功能……（27）
五、酶的结构、功能和应用……（36）
六、多肽激素研究进展……（41）
七、生物大分子空间结构的测定……（49）
八、仪器技术在分子生物学研究工作中的
使用和发展情况……（53）
九、分子生物学的应用……（62）

美国分子生物学研究概况

中国分子生物学考察组

根据中美1975年人员交流项目，中国分子生物学考察组一行十一人，应邀于5月份访问了美国。考察组先后到了华盛顿、纽约、波士顿、麦迪逊、圣地亚哥、洛杉矶和旧金山等七个地区，共参观访问了十九个单位（十二所大学的有关的系、五个研究所和两个小型的仪器工厂）。现将了解到的美国有关分子生物学的情况，即关于基因工程、肿瘤病毒、核酸、生物膜、酶、多肽激素、生物大分子空间结构分析、分子生物学仪器技术和分子生物学的应用等方面的研究，汇报如下。

一、基 因 工 程

生物世界的物种特性都与其基因物质有关。若能把各种基因人工剪接，就可以设计制造出许多新的生物品种，为工、农、医许多问题的解决开辟新途径。例如，固氮基因若能接入植株获得成功，作物可以自己解决氮肥问题，则其经济技术价值是非常巨大的。

生物世界的统一密码在十几年前就有力地说明此种可能性的存在。1972年P. Berg 等用人工粘接末端法把噬菌体 λdvgal DNA 接入一个肿瘤病毒SV40获得成功。73年S. N. Cohn 等用限制性内切酶 EcoRI 产生的粘接末端，可以比较简便地作出自然界原不存在的新抗药性的质体。用细菌质体与蛙的核糖体 DNA 结合，造出新的质体，它可在大肠杆菌内繁殖，合成出蛙的DNA和相辅的RNA。同样，果蝇DNA也可结合于细菌的质体DNA，而在细菌内增殖。

现在，基因工程是分子生物学中最活跃的领域之一。我们在美参观的14个单位中，接触到的就有18个研究室进行这方面的工作。基因工程不仅会具有重大生产实际意义，而且对很多理论问题如染色体的结构与功能的研究也会有极大的促进。另一方面，基因工程也可能造因工出新的人造病原体。美国“科学为人民”组织发表的建议书就认为，五角大楼可能把基程作为发展生物武器来优先考虑。苏修也对基因工程特别重视，值得我们注意。

1974年美国科学院国家研究委员会生物科学部有关的一些委员在美国“科学”杂志和“美国科学院院报”发表呼吁书，要求重视基因工程即重组 DNA 分子可能会造成的生物危害。1975年2月在美国加州阿西罗莫（Asilomar）由美国科学院支持又召开了有各国科学家参加的讨论会。讨论了基因工程进展和有关限试、禁试、安全问题。会议提出了分级管理方案的报告书，但是沒有明确反对以基因工程作生物武器。

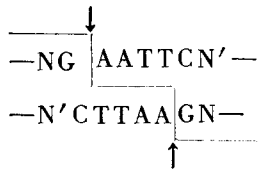
以下简单介绍基因工程发展的几个方面：

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

(一) 末端联结法

1．酶切粘接末端

用限制性内切酶 Eco RI 可以产生不对称的末端切口，称为粘接末端。在较低温度下它可以重建氢键联结，其T_m为5—6℃。用联接酶进一步再作成共价键的联结。



2．人工粘接末端

任意 DNA双链片段，先用λ外切酶处理，切去一部5′端，产生不对称末端。再用末端转移酶加 dA_n 末端于3′端。另一种DNA 双链片段，用同法加 dT_n 末端于3′端。二者末端通过dA_n和dT_n之间的H键粘接。加 DNA 聚合酶 I 和外切酶Ⅲ，以补足或切去不合适的末端。最后用联结酶完成共价键的联结。见图 1。

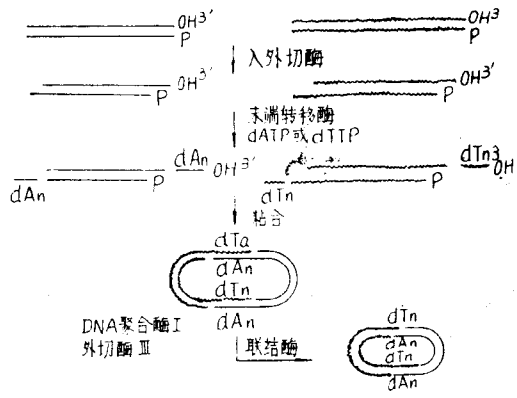


图 1

(二) 运　　载　　体

早已知道，细菌甚至高等生物细胞 可由于外源DNA的进入而改变遗传特性。这称为转化作用（transformation），其效率很低，特定基因既难进入也难拿出。现在基因工程中，常用基因运载体，可以方便的装入、运载、放大、取出特定的基因DNA。

1．细菌质体 细菌染色体外的小环DNA。

1--1．抗药性质体：最常用的是抗四环素质体pSC101。它的特点是用 EcoRI可产生理想的单切口。接入新基因后，其抗药性基因和复制性能都未受到破坏。S．N．Cohn 等用CsCl比重梯度超离心法分得纯的pSC101质体DNA，加入其他抗药性质体或蛙 DNA，再加入EcoRI把DNA都切成EcoRI片段。加温使EcoRI失活。再加联结酶将DNA 片段联结好。用大肠干菌C600rK^-mK^-作受体菌转化。这种菌无限制性内切酶和改造性甲基化酶，不会破坏进入的外源DNA。新菌株带有pSC101抗药性基因故可由含四环素培养基中筛选出。新接入的基因DNA可以增殖，并产生相应的RNA，表现出新的抗药性。用琼脂凝胶电泳可以看到新结入的基因DNA片段。用电子显微镜作异源双链分析可以看到新接入的DNA链。用分子杂交法也可证明新DNA或RNA的产生。

1-2．大肠干菌素E1质体 （ColE1）：用抗药性质体pSC101作为基因载体，有易于筛选的优点；但它受菌体染色体控制严格，每染色体只有1—2拷贝质体，复制率低。另一类质体如大肠干菌素E1质体，细菌染色体的控制松，在正常生长条件下，每染色体有约24 拷贝合成。加入氯霉素后，细菌染色体停止复制，而ColE1DNA可继续复制达每染色体1000—3000拷贝。由每公升细菌培养液可得1—2mg纯ColE1DNA。D.R.Helinski 等用此作为载体，增

殖、放大色氨酸合成基因获得成功。

色氨酸基因是由噬菌体φ80pt190 (trp^+) DNA得来。这种φ80DNA被EcoRI切开11口，成12个片段。将已被EcoRI切开单口的ColE1与之混合。经联结酶结合后，用C600trpR^- Δ trpE5菌作受体菌进行转化。trpR^-为没有色氨酸基因抑制子基因。ΔtrpE5为trpE基因完全缺欠。在无色氨酸的、含大肠干菌素的培养基中，只有含ColE1-trp 质体的菌株能生长。在含氯霉素的培养基中此质体可大量复制，达细菌总DNA的45%。

ColE1-trp质体（分子量14.3×10^6dalton）再用EcoRI酶解、凝胶电泳分离。证明其中除含 ColE1（4.2×10^6dalton）外尚含两个由φ80pt190DNA而来的片段（8.5×10^6，1.6×10^6dalton）。带ColE1-trp的菌体的邻氨基苯甲酸合成酶（ASase）和色氨酸合成酶α（TSase α）的活力都有极明显的增长。由新菌株抽出带^{3}H尿嘧啶核苷的mRNA与φ80DNA 和色氨酸操纵子DNA进行分子杂交，都表明这mRNA中含有很多trp mRNA。

1-3．共接质体：

利用ColE1作为基因载体虽然复制率高，但是在筛选上，抗大肠干菌素的性状稳定性较差，也不够理想。结合抗药性质体与ColE1的优点，可以构成一个共接的载体。不但易于筛选面且易于大量复制。

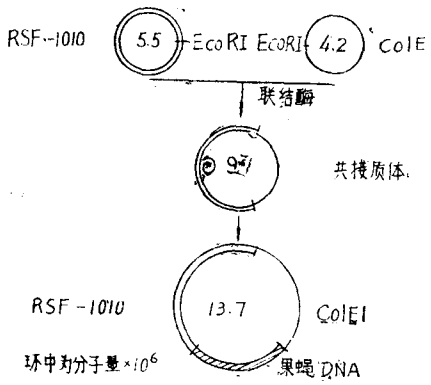


图 2

B. Weisbaum 等使用共接载体得到成功。他们首先分离出一种非传染型（Non-transmissible）抗药性因子 RSF-1010 质体。它具有抗链霉素和磺胺的特性。它和 ColE1 都是受 EcoRI 酶切只产生一个切口，变为单分子线形 DNA。二者经联结酶的联结，转化入大肠干菌C600。筛选、增殖、纯化而得到纯的 ColE1-RSF-1010共接质体。这个共接质体有两个Eco-RI的切口。在控制酶解的条件下，可以得到只有一个切口的线形共接质体DNA分子。将其与果蝇DNA的EcoRI酶解物混合，用联结酶联结。转化入大肠干菌C，用含链霉素和大肠干菌素的培养基可以筛出带有果蝇DNA的菌种（见图 2）。

用此带果蝇DNA的质体作电子显微镜部分变性谱的分析，说明带入的果蝇DNA具有很高分布的A-T区。而与原来的载体质体有明显区别。用此带果蝇DNA的质体作为模板，合成出相辅的^{3}HCRNA，和果蝇染色体作原位分子杂交（in situ hybridization）证明自显影的放射性粒子位于多节（polytene）染色体上。

D.R.Helinski等也用ColE1和抗卡那霉素质体pSC105DNA作出了ColE1-kan 的质体。pSC105经EcoRI酶解后产生5.8×10^6和4.5×10^6dalton两个片段。其中只 4.5×10^6 片段与ColE1重组结合，就可以得到抗卡那霉素抗大肠干菌素的质体。

S.N.Cohen等用pSC101 和ColE1经EcoRI酶切后结合，作出新的质体称为pSC134。它在DNA聚合酶 I 缺欠的菌株中或在氯霉素存在下都可复制。说明原来两种质体的复制子（replicon）都起作用。

2．λ噬菌体：

2-1．λ 通用转导株：

R.W.Davis等1968年注意到λ噬菌体失去某一部DNA，达总量20%仍不失活，失去再

多则失活。这一部分DNA的空间正好可作为运转其他DNA使用。进一步证明，最短的λDNA可以产生正常大小的噬斑，为缺25%的λDNA。

野生型λDNA用EcoRI酶解，可有5个切口，产生6个片段，如图3。其中EcoRI-B和C片段占21.1% λDNA。若再除去不必要的nin5区（6.1%λDNA），虽未失去必需的基因，但由于失去了必需的长度，即不能出现噬斑活力。若EcoRIB段和C段的空间用另一DNA补上，则nin5区也可去除。已作出这样的噬菌体变种λgt-λC。λgt意是通用转导物（generalized transducer）这种λgt-λC DNA被EcoRI切开有二个切口，成三个线状分子。其中部有λC片段，可用其他DNA取代。这里若沒有适当长度的DNA进入，就不能表现噬斑活力。

已经用此λgt-λC作为基因载体，获得成功。例如将大肠干菌DNA经EcoRI酶解，所得片段，插入λgt后，得到大量λgt结合运载株。由其中已选出了带联结酶和带DNA聚合酶I的株。可以在缺欠菌株中表现出有关酶的活性。由酵母DNA EcoRI片段的λgt运载株中，也选出了带酵解酶基因的株。还作出了带有噬菌体P4DNA和果蝇DNA EcoRI片段的λgt运载株，见图3。

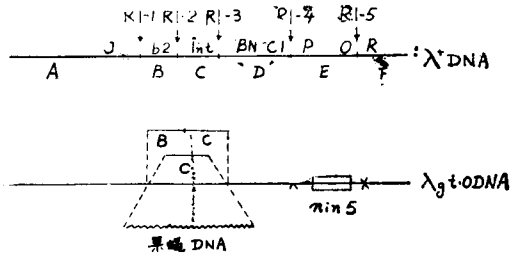


图 3

实验说明λC取代的基因不同会影响λgt运载株的繁殖效率。有些新的λgt运载株有较高的繁殖优势。

用λgt系统可以运载大至17Kbp（千碱基对）的DNA。只要用1微克外源基因DNA作种，就可建立起一个运载株。

F.R Blattner等也作出了适于运载基因的很多λ变种，特别是有三个EcoRI切口的λ CHARON4变异株。

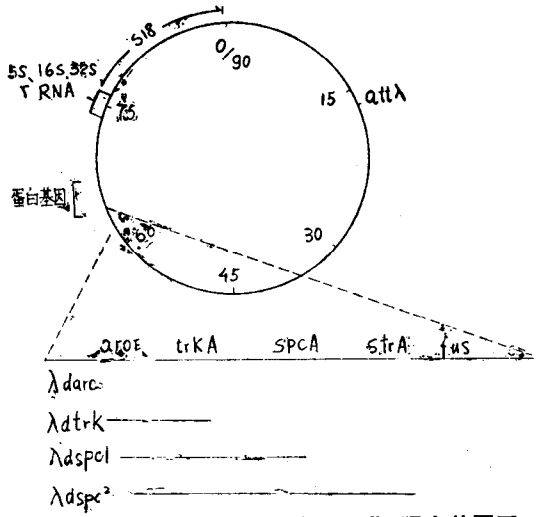


图4 λ噬菌体取出的大肠杆菌r蛋白基因图

aroE⁻ 生长需外源芳香族氨基酸
trkA 生长需要浓的K^+
spcA 对Spectinomycin敏感
strA 对链霉素敏感
fus 对Fusidic acid敏感

2-2.特殊基因转导的λ噬菌体：

利用原λ插入位点attλ缺欠菌，使λ插入其他基因位点带出特殊基因。

M. Nomura 等所作大肠杆菌核糖体蛋白（r-蛋白）基因的分离是个很成功的例子。

已知细菌核糖体是由30 S和50 S两个亚基组成。30 S亚基是由16SRNA和21个蛋白构成。50S亚基是由23SRNA，5SRNA和33个蛋白构成。这些rRNA的基因研究已经比较清楚，r蛋白基因的排列、调控、结构特点是细胞功能活动中的一个重要问题。

M. Nomura等由λ插入大肠杆菌染色体aroE附近的溶原菌，分离得带有不同长短r蛋白基因的λ变种，分别命名为λdtrk，λdspc1，λdspc2。见图4。利用这些带有r

蛋白基因的λ变种可得相当量的r蛋白基因DNA。

宿主细菌先用UV照射，其本身的蛋白质合成受到抑制，用λdspc2感染，^{14}C亮氨酸标记，则^{14}C都在新合成的蛋白上。分离蛋白样品，作双向凝胶电泳和放射自显影，可以测出各种r-蛋白的合成量。利用各别r-蛋白的抗体，也可以作免疫测定。现已找到的r-蛋白基因已达30种以上。

用异源双链法观察λdspc DNA与原λC1857S7 DNA杂交双链的电子显微镜图表明，细菌r-蛋白基因都插在λDNA的左半。

利用限制性内切酶可以切出λdspc DNA中之r-蛋白基因，用以进行离体的蛋白合成，研究其基因顺序调控。

C. C. Richardson等也用类似方法，用λC1857感染缺欠λ位点attBB′之大肠杆菌HS353，选出带DNA聚合酶Ⅲ基因的λ噬菌体。

(三) 筛　选　法

由于分离纯的基因功能单位的方法目前还比较困难，重组结入的新基因能否繁殖也需要检查，因此筛选法总是需要的。上面介绍利用抗药性的粗筛法和利用某种酶的缺欠菌株或利用某种基因蛋白产物的抗元性的专一性筛选法。D. S. Hogness介绍了一种分子杂交筛选法。可能是一个通用的方法：细菌在琼脂盘上培养。用硝酸纤维微孔膜复印后，使膜上细菌就地溶破，用^{32}PmRNA液滤过此膜。此时^{32}P活性只杂交结合在专一的菌落上。放射自显影，检查出此菌落，由琼脂盘上分离出，大量培养，这个菌株应含有该mRNA的基因。

(四) 限制性内切酶

在基因工程中是重要的工具酶。外源DNA进入菌体可以受此菌切开失活。特异性切点若受甲基化酶甲基化则不被切。已分离的各种菌株，根据R. J. Roberts 75年5月的材料，已有52株，此类酶可分为两大类。

Ⅰ型：以EcoK和EcoB为代表。内切酶与甲基化酶有共用的亚基。EcoB甲基化酶含两个不同的亚基，没有限制性内切酶活力。再加上第三个不同的亚基，则构成EcoB限制性内切酶。内切时需ATP. SAM（S-腺嘌呤核苷甲硫氨酸）和Mg^{++}。切点和甲基化位点有时不同。

Ⅱ型：以常用的EcoRI为代表。内切酶与甲基化酶无共用亚基。EcoRI内切酶含两个相同的亚基（2×29,000dalton）而EcoRI甲基化酶为另一单体（40,000 dalton），内切时只需Mg^{++}。切口作用点有180°旋转对称性，产生粘合末端。切点与甲基化位点相同。

$$\begin{array}{l} \overset{\downarrow\ Me}{5'pNpGpApApTpTpCpN'} \\ N'pCpTpTpApApGpNp5' \\ \qquad\qquad Me\ \uparrow \end{array} \qquad \text{EcoRI.}$$

$$\begin{array}{l} \overset{\downarrow\ Me}{5'pNpCpCpApGpGpN'} \\ N'pGpGpTpCpCpNp \\ \qquad\qquad Me\ \uparrow \end{array} \qquad \text{EcoR}\,\text{Ⅱ}.$$

最近H. M. Goodman 等报告EcoR1切口的专一性受条件影响。当高离子强度时，为 $\begin{matrix}NGAATTCN\\NCTTAAGN\end{matrix}$ 的六核苷酸顺序，当低离子强度时，下降为 $\begin{matrix}NAATTN\\NTTAAN\end{matrix}$ 的四核苷酸顺序。

(五) 生物危害防护

肿瘤病毒等的基因工程具有明显的生物危害性。由于动物细胞中大都有内源肿瘤病毒核酸顺序。因此，也不能轻易作动物DNA的基因工程。必要的监督防护是很重要的。

物理防护如隔离的实验室、操作室、操作箱、层流过滤操作橱和污物处理。

生物防护更为重要，如工作人员的免疫标准、受控的受体菌运载菌。特殊营养要求、抗生素要求、温度要求的菌株失去了特定的条件则无法繁殖扩散。

(六) 一 些 应 用

1．araC蛋白

它是一个调控蛋白。在l-阿拉伯糖存在下可变构为激活子，使阿拉伯糖代谢有关酶的基因开动，合成出araBAD操纵子的mRNA。但araC蛋白每细胞内只10个分子，量少无法进行研究。G. Wilcox将F′araC的质体用EcoRI切后，与ColEl结合，得带有araC蛋白基因的ColEl重组质体。转化后的大肠干菌araC蛋白产量提高10倍以上。

2．真核细胞染色体

这是基因工程领域中最大的课题，长远来看也是最重要的课题。真核细胞染色体很复杂。人的染色体含有约 3×10^6Kbp。果蝇为人的$\frac{1}{20}$，也有 1.6×10^5 kbp。果蝇染色体约有5000条带 (Chromomere)，每带有30kbp，即可能有 30 个基因，实际每带只一基因，其余DNA为调控的。巨大的染色体上基因怎么排列、调控、工作的。解决此问题要有各种纯的结构基因、调节基因、控制基因作材料，应用基因工程是个理想的办法。

D. S. Hogness, C. A. Thomas Jr和H. W. Boyer等分别用EcoRI处理果蝇 DNA，得到长短不同的片段 2×10^4到100bp。然后结入抗药性质体或ColEl，在细菌中繁殖后，再用EcoRI切出、分离。以此为模板可以合成出相应的^{3}HCRNA。利用原位分子杂交法可以看到^{3}HCRNA在染色体上的定位。方法是细胞在载玻片上鼓处理，染色体涨开而维持其形态不变，加入的^{3}HCRNA可结合在相辅DNA的位点上，自显影可看出。

已作了组蛋白基因的繁殖菌株。

E. Davidson正进行海胆染色体中重复顺序结构的基因繁殖菌株，希望得到较大量样品，研究其顺序规律。

3．酵母DNA

除了前述R. W. Davis的工作之外，W. J. Rutter和H. W. Boyer已分离出6个酵母DNA主要组分，以之与质体结合转化入细菌。同时作了酵母可溶性蛋白和膜结合蛋白的抗血清，用以筛选酵母基因表达的蛋白。

4．线粒体DNA

J. Vinograd和H. Boyer等将HeLa细胞、BSC-1细胞和LA9细胞mtDNA用EcoRI等酶

解，与质体结合，可以全长度重组入质体，并产生线粒体蛋白。

5．改进白喉毒素蛋白基因

原来生产白喉毒素菌株，毒素的毒性较强而且其合成受铁抑制，只有在低铁培基中才能合成毒素蛋白。J．R．Murphy利用β噬菌体溶原化之后带出毒素蛋白基因。此β噬菌体株DNA可以作为模板，在离体系统合成出白喉毒素蛋白。改造此基因的操纵子部位可以使其不受铁的抑制，改造其结构基因部分可使其毒素蛋白毒性降低。将性能改进的白喉毒素蛋白基因，通过溶原化，引入菌体，得到了不受铁抑制的新菌株。

6．升血压肽基因

由西德实验室合成的升血压肽结构基因引入细菌质体的工作正在H．Boyer的实验室进行。

参考资料

1．Jackson D.A., Symons R.H.and Berg P.Proc.Nat.Aeod. Sci.U.S.69 2904(1972)
2．Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer Hand Helling R. B. Proc. Nat. Acad. Sci.U.S. 70(11)3240 (1973)
3．Morroco J. F., Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H., Goodman H. M. and Helling R. B. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 71 (5) 1743 (1974)
4．Hershfield V., Boyer H. W., Yanofsky C., Lovett M. A., Helinski D. R. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 71 (9) 3455 (1974)
5．Tanaka T.,Weisblum B.,Schnös Mand Inman R. B. Biochemistry 14 2064 (1975)
6．Thomas M., Cameron J. Rand Davis R. W. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 71 (11) 4579 (1974)
7．Jaskunas S.R.,Lindahl L.and Nomura M.Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.72 (1)6(1975)
8．Kaltschmidt E., Kahan L.and Nomura M. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.72(2)446(1975)
9．Casadaban M. J.,Prco.Nat.Acad.Sci.U.S. 72 (3) 809 (1975)
10．Hamer D. H. and Thomas C. A. Jr. Chromosoma (Berl) 49 243 (1975)

二、肿瘤病毒研究概况

癌症是当今世界上严重危害人体健康的一种疾病。据介绍，1973年约有35万美国人患癌症死亡。在美国发病较多的是肺癌、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌。儿童多患急性白血病，发病率为15/10万，尤以4—6岁儿童发病率较高。由于癌症对于人体健康的严重威胁性，美国政府也不得不粉飾一下，1971年通过所谓征服癌症的法案，在每年把上千亿美元用于军备竞赛的同时，不得不规定每年有10亿美元作为癌症研究经费，以此笼络人心欺骗迷惑人民。在美国环境污染问题日益严重，对癌症病因来说，这些目前还弄不清楚的污染物质，可能就是致癌因素。环境污染，其受害者当然是工作生活在其中的劳动人民，由于资本主义制度的腐朽性，环境污染问题是无法从根本上解决的。

我们参观访问美国国立卫生研究院时，据E．O′connor介绍，1974年美国从事癌症研究的科学家约有10，000名，其中在美国国立卫生研究院就有2,000名科学家，美国政府投资6.9亿美元。

在我们访问的七个城市十六个单位中，不少单位均设有专门癌症研究机构：如国立癌症研究所、哥伦比亚大学癌症研究所、麻省理工学院癌症研究中心．威斯康辛大学McArdle

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

癌症研究实验室。哈佛大学准备在明年成立一个有几十位教授及临床设备的癌症研究所。其余，在洛克菲勒大学、加州大学旧金山分校、加州理工学院、斯坦福大学医学院、加州大学伯克利分校等单位的生物系、生化系及分子生物学系均有不少实验室或研究组从事癌症的基础理论研究。

在访问过程中，上述单位的科学家给我们介绍了大量肿瘤基础理论研究方面的研究结果，并参观了一些实验室。给我们的印象是：

1．多学科的配合。一般来说，肿瘤病毒研究课题的实验室都有病毒、细胞培养、生化分析、遗传学、免疫学、动物模型等方面组成一个较完整的实验体系，说明肿瘤病因并非某一专业知识所能解决，必需多学科配合，目前日益有更多的生化、化学、物理、工程、数学方面的科学家加入到肿瘤理论研究的队伍。而且，有相当大的一批青年科学家。

2．最显著的特点是，从事肿瘤基础理论研究的科学家人数虽多，但工作重复性大，力量比较分散，彼此竞争。在美国目前的情况下，癌症研究的课题易于申請到经费。因此，不少科学家转向癌症的研究，有名望者申請到经费，凭个人兴趣，选择比较容易出结果的课题，雇用一批助手进行研究、彼此竞争。正如，詹姆斯·D.沃特森（J．D．Watson）指出：1971年底到1972年初国家癌症研究所召集了癌症研究领域的数百名专家，搞出了一个长达1000页的国家癌症研究计划，但是这个计划很快束之高阁，在美国要集中力量来探索癌症领域中一些有希望解决的问题是很难的。从这一点可以看出，资本主义制度的腐朽性在癌症基础理论研究领域中也充分暴露出来。我国有无比优越的社会主义制度，在癌症普查和治疗方面已取得较大进展和成绩。我们在毛主席革命路线指引下，应密切联系我国癌症防治的实践，确立重点基础研究问题，大协作、多学科配合，集中优势兵力打歼灭战，我们一定能在癌症基础理论研究和解决防治实践问题方面作出更大的成绩，并有重大突破。

癌症的产生是由致癌因子所引起。病毒在癌症的发生中可能是必需的，但并非有完全的作用；化学物质、辐射、免疫缺陷及遗传因素等也都起作用。可能需要二种或多种因素适当协同作用才能致癌。近年来，美国在肿瘤病毒方面进行了很多研究。现将这次访问中了解的肿瘤病毒情况粗略简述如下。

（一）DNA肿瘤病毒

近年来，DNA肿瘤病毒引起细胞癌化过程的分子生物学机理的研究有了很大进展。

由于限制性內切酶（Restriction endonuclease）的发现，推进了DNA肿瘤病毒的分子生物学研究。限制性內切酶能识别DNA核苷酸序列上的特定部位，并切断它。如EcoRI能切—G↓AATTC—箭头所指的点，切腺病毒2五个点、SV40病毒一个点，如图5、图6所示。切肿瘤病毒DNA上某一特定核苷酸序列，来研究肿瘤病毒的某一段基因在致癌过程中的功能。

冷泉港实验室在限制性內切酶研究方面比较活跃，他们有一套分离、提纯、鉴定这类酶的方法。1974年分离和鉴定了17个限制性內切酶，其中11个是新的有不同的特点。这使他们有可能运用这些酶来研究DNA病毒的基因功能。同样，这一手段也为其它实验室所采用。

1．腺病毒（Adenovirus）的研究 腺病毒所含的DNA量七倍于SV40，但是病毒DNA的小片大约10^6道尔顿大小就能使细胞转化。

冷泉港实验室J．Sambrook等人已经得到由EcoRI作的腺病毒3，5，7，12和腺病毒2^+ND_1的DNA切点位置图，和由Sma I作的腺病毒2，5，12和腺病毒2^+ND_1的DNA

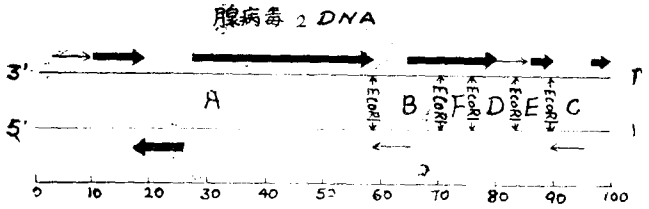


图 5

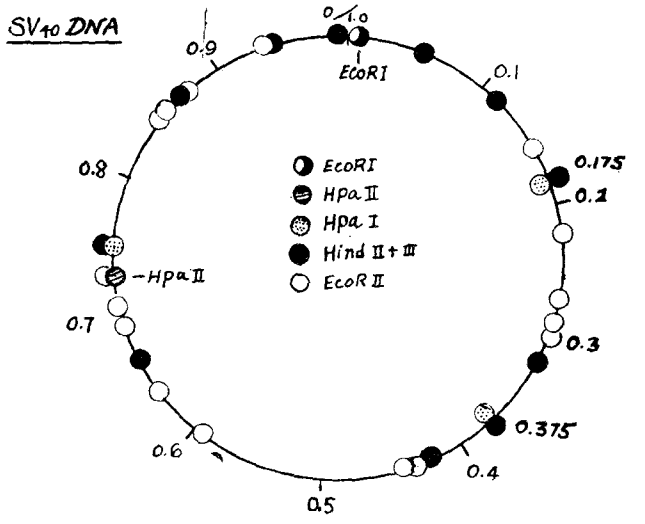


图 6

切点位置图，也接近完成Hind Ⅲ对腺病毒 2,5 和腺病毒 $2^{+}ND_1$ DNA作用点的鉴定。

他们研究了十个细胞株，它们来源于英国伯明翰，是用腺病毒2转化的鼠细胞，在转化细胞和对照细胞的DNA存在下，用P^{32}标记的HpaI 和EcoRI 切割的片段进行分子杂交，结果表明沒有一株被腺病毒2转化的鼠细胞含有病毒全部基因，十株细胞所共同的是：这病毒DNA 片段分布在左端达整个基因组大约14％的那部分，因之，基因组的这一部位必定是带有病毒保持转化状态所需的密码。腺病毒 2，5 用 EcoR I-A 和 Hind Ⅲ-G 切割的片段转化细胞的效率几乎与完整的病毒DNA相等。腺病毒 2,5DNA对于转化来说重要序列是位于基因组的极左端 Hind Ⅲ-G 切割的片段内，它约占全部病毒 DNA的7.5%。分离的腺病毒12片段和完整病毒所转化细胞的研究结果表明，转化活性是由病毒基因组左端的一个片段，大约为病毒DNA 的16％ 部分所携带。这些结果说明腺病毒 2， 5，12转化细胞的信息是在病毒基因组的左端部位，这一部分对细胞转化和保持转化是必需的。

2．SV40病毒的研究 SV40病毒DNA分子量为3.2×10^{6}道尔顿。冷泉港实验室 M. Mathews等发现，腺病毒转化的细胞含有病毒基因组的部分拷贝，而被SV40转化的大多数细胞株含有病毒DNA的完整序列。

斯坦福大学医学院生化系的P. Berg研究发现，在转化细胞中SV40 DNA与组蛋白的结合类似高等生物染色体的DNA与组蛋白的结合，5100 碱基对，3—5个基因。同样用 EcoR Ⅰ、EcoR Ⅱ、HpaⅠ、HpaⅡ、Hind Ⅲ等限制性内切酶，切割SV40 DNA的一段，约15—200 碱基对，研究缺失某一段DNA的SV40表现型。以Eco RI 的切点为0点用其它限制性内切酶把SV40 DNA在0.59或0.45图距部分切掉，SV40 病毒不会突变，把0.48图距部分切掉就不能转化猴肾细胞，复制病毒颗粒。他们还发展了一种把poly（dA·dT）插入到SV40 DNA中特定位置的方法。他们把一小段（约50个碱基对）poly（dA·dT）插入到HpaⅡ切割的位置（0.735图距）上，并制备成环状SV40DNA（如图7所示）。这种人工获得的突变种 SV40在沒有协助病毒存在时是有侵染力的，在猴肾细胞（CV—IP）单层上能产生蚀斑，但出现较晚，比野生型的DNA所产生的蚀斑要小些，插入的poly（dA·dT）序列的一部分可以通过病毒在猴肾细胞中的重复生活史而被保留下来。这种方法提示我们，今后可能人工的获得一些特定部

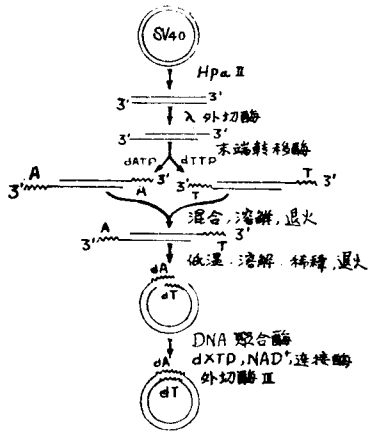


图 7

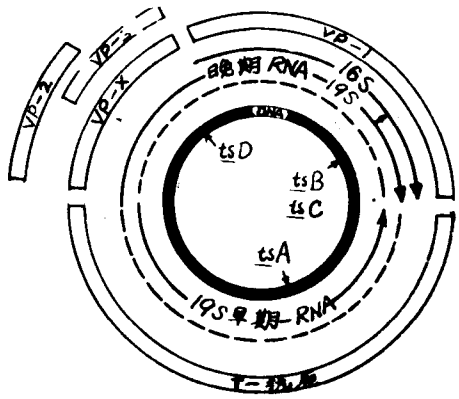


图 8

位变异的肿瘤病毒突变种，可能使它具有新的特性和转化细胞的能力。

据介绍，C．M．Croce研究了SV40DNA整合到宿主DNA上整合部位是否是特异的？他们观察种间细胞杂交的分离，证实了在很多的转化的人细胞中，C_7染色体包含着被整合的功能性病毒基因组，当转化的人细胞的C_7染色体引入到小鼠细胞时，小鼠细胞有T-抗原。同样，当转化的猴细胞和小鼠细胞杂交时，也有一个特定的染色体包含着 SV40 病毒基因组。

国立关节炎、代谢和消化病研究所的R．G.Martin利用SV40的温度敏感突变体研究正常细胞的癌变，这些突变体它的三个基因中的一个不能在高于41℃生长。把这些 SV40 温度敏感突变体注入欧洲大鼠细胞，每次使一个不同的基因失活，只有当一个叫A基因的基因失活时，癌就不能生长，这证明A基因是致癌基因。如图8箭头所示tsA部位是 SV40DNA引起癌变的部位，转录 19 S 早期mRNA，产生T-抗原，tsD、tsB、C的部位基因控制19 S 晚期mRNA的转录，翻译Vp-1、Vp-2、Vp-3病毒的特异蛋白质。R．G.Martin认为：欧洲大鼠的细胞一旦癌化后，SV40病毒就成为这些细胞的遗传物质的一部分。病毒是通过改变细胞 DNA复制的方式而致癌的。

现在已知某些DNA病毒可能与人癌有关，如从伯基特氏（Burkit）淋巴瘤中已找到一种疱疹病毒，这种病毒也可能引起鼻咽癌，在人子宫颈癌中曾发现有疱疹简二型病毒。这个问题仍是一个探索中的问题。

（二）RNA 肿 瘤 病 毒

在自然界引起动物肿瘤的病毒绝大部分是RNA肿瘤病毒。在六十年代后期就已经发现了128种不同的动物RNA肿瘤病毒。RNA肿瘤病毒的研究方面是非常活跃。

1．RNA肿瘤病毒的基因

RNA肿瘤病毒的基因组的大小是近几年来大家感兴趣的研究课题，肿瘤病毒的 RNA 有两种存在形式：一个是70 S 复合体，主要包括一些大的亚单元；一个是散聚的 35S亚单元。大量的事实支持RNA肿瘤病毒是一个多倍的基因组，至少是一个二倍体，而且更可能是三或四套相同的亚单元，每个亚单元为3×10^6道尔顿。目前RNA肿瘤病毒有四个基因研究得比较清楚（见图 9）。

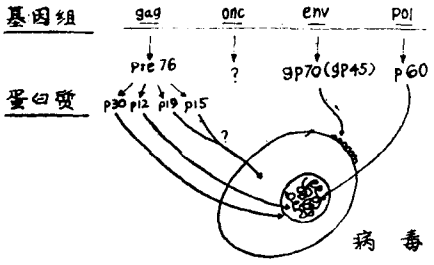


图 9

env：决定病毒外壳表面主要糖蛋白的氨基酸序列的基因，此蛋白质的分子量为70000称为gp70，此外病毒表面还有一个糖蛋白，分子量为45000称为gp45，可能是由另一个基因决定的，现在还不能完全肯定。

pol：这个基因至少包含有鸟类病毒逆转录酶的两个较小亚单元的遗传密码。哺乳动物病毒的逆转录酶只有一个亚单元，在这种病毒中，一个基因可包括整个酶的遗传密码，此酶大约为70000道尔顿。在p60中有鸟类逆转录酶和核糖核酸酶H(ribonulease H) 活性，是这个病毒的中心组成部分。

gag：决定病毒内部抗原前体的密码基因，这个基因决定的蛋白质大约为76000道尔顿，它是鸟类RNA肿瘤病毒主要的内部蛋白质前体，这些蛋白质主要为p_{30}，p_{12}，p_{19}和p_{15}。病毒中心外壳的主要蛋白质为p_{30}，p_{12} 是一个与RNA紧密连结的基本蛋白质，p_{15}，p_{19} 在病毒中的位置则不太清楚。

onc：此基因决定一个肉瘤病毒的蛋白质，这个蛋白质能够改变细胞的生长性能，并不是病毒生长必要的，因为温度敏感突变型的转化蛋白质并不影响病毒的复制。现还不知这个基因所合成的蛋白质的性质和大小，但是肉瘤病毒的非转化变种的缺失研究中说明大约16%的遗传信息可以包括于这个旦白质的合成之中，其分子量可能为40000—50000。最近加州大学旧金山分校微生物系 J.M. Bishop 等找到了ASV病毒的一个TF基因，这是一个使宿主细胞癌化的基因，这一研究结果不久他们即将发表。

关于肿瘤病毒的70SRNA基因组尚有许多问题有待于探讨，RNA是如何联结在一起的，共有多少亚单元？为什么有这么多亚单元？这个复合体是怎样作为逆转录的模板的？

2.RNA肿瘤病毒的逆转录酶

逆转录酶(Reverse Transcriptase)是一种依赖RNA为模板，合成DNA的聚合酶。由于逆转录酶的发现，在理论上使分子生物学、分子遗传学的“中心法则”（即遗传信息由DNA转录到RNA，再从RNA翻译成蛋白质的概念）得到了进一步的丰富和发展；在回答重大的实际问题，即对 RNA 肿瘤病毒怎样自我复制和如何致癌的认识方面，提供了有力的科学证据。从1970年 H.M. Temin和D.Baltimore 同时各自发现逆转录酶以来，在这方面的研究工作进行得很活跃。

S.Spiegelman,M. Green, G.L. Todaro, V. Huebner 和其它一些实验室证实，在已考察过的每一个C型RNA肿瘤病毒中都存在着逆转录酶。B型RNA肿瘤病毒也存在逆转录酶。只有两例例外，引起羊的慢性神经病的 visna 病毒和灵长类的泡沫病毒曾有人测得了有这种聚合酶活性，随即得到证实 visna 病毒能少量感染和转化鼠细胞，将这些细胞接种到小鼠体内能发展成为致死性的肿瘤，现在看来在某些病毒颗粒中测得逆转录酶活性，则暗示了它的潜在致癌性。

逆转录酶有时不易与正常细胞和转化细胞中的DNA聚合酶分清楚，现在可以根据分子量的大小，特异性模板和特异引物的利用、柱层析行为，免疫学性质以及抗菌素的抑制作用等几个方面综合鉴定区分。

加州大学旧金山分校微生物系 H. E. Varmus 等发现病毒进入宿主细胞，逆转录产生的DNA首先在细胞质中找到，说明逆转录酶在细胞质中活动数小时后，才在细胞核中发现前病毒。由分子杂交测出，此时前病毒是游离的，10 小时后前病毒与细胞 DNA 共价结合，感染

一天后发现病毒以线性形式整合于染色体中。

对于逆转录酶的深入研究有助于进一步阐明肿瘤的病毒病因。同时可能在两个方面加以应用：一是通过测定人癌患者的细胞中逆转录酶活性来证实人癌病毒病因，并可能作为人癌的早期诊断及判断治疗效果的一种手段。二是寻找高效力毒性小的抑制逆转录酶的药物，阻抑病毒使细胞转化的过程。

第一方面的工作：从1970年R. C. Gallo在人的急性成淋巴细胞白血病的细胞中发现了逆转录酶；S. Spigelman证实了人乳腺癌患者乳汁的B型颗粒中含有70S病毒RNA和逆转录酶以来，大家在这方面做了很多努力。现在已经能比较清楚地鉴定区分脊椎动物特别是人类的细胞DNA聚合酶与逆转录酶的差异。1974年5月R.C. Gallo, D. Baltimore, F. J. Bollum, A. Weissbach协商提议，把过去名称混乱的细胞DNA聚合酶命名为DNA聚合酶α、β、γ（见表1）。现在逆转录酶已从人的白血病细胞C型颗粒中纯化，但从人的其它肿瘤中未被纯化。人的白血病逆转录酶与从灵长类C型病毒中纯化的逆转录酶有免疫学密切关系，并能与DNA聚合酶α、β、γ、线粒体DNA聚合酶和末端脱氧核苷酸转移酶（Termianl Deoxynucleotidyl Transferase）相区别。

表 1

	DNA聚合酶α	DNA聚合酶β	DNA聚合酶γ	人白血病细胞的逆转录酶
在细胞的位置	细胞质	核或细胞质	未 知	细 胞 质
分子量大小	1.3×10^5	0.4×10^5	$\backsim10^5$	1.3×10^5；0.7×10^5
模板—引物的选择（在最适条件下）	DNA活化（Mg^{++}）；$dA_n\cdot d\overline{T15}\gg rA_n\cdot d\overline{T15}$（$Mn^{++}$或$Mg^{++}$）	$dA_n\cdot d\overline{T15}>rA_n\cdot d\overline{T15}$（$Mn^{++}$）；$dA_n\cdot d\overline{T15}>rA_n\cdot d\overline{T15}$（$Mg^{++}$）	$dAn\cdot d\overline{T15}<rAn\cdot d\overline{T15}$（$Mn^{++}$）$dAn\cdot d\overline{T15}>rAn\cdot d\overline{T15}$（$Mg^{++}$）	$dAn\cdot d\overline{T15}\ll rAn\cdot d\overline{T15}(Mn^{++})$*
病毒RNA高分子量的异源区间的利用	不 能	不 能	少或不能	中等或强烈
用下列来源DNA聚合酶制成的抗体(IgG)的抑制：				
SiSV或Galv	无	无	无	强 烈
Mulv	无	无	无	弱
Felv、Avlv或MpMv	无	无	无	无
细胞DNA聚合酶α	强 烈	无	无	无

注：*用$rCn\cdot d\overline{G}15$偶然的配制有同等高的活性

目前逆转录酶应用于人的白血病早期诊断和判断化疗效果的研究仍然没有什么显著进展。

最近麻省理工学院生物系和癌症研究中心R. McCaffrey等研究了人白血病细胞和正常胸腺细胞中的末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）活性。发现有12名急性成淋巴细胞白血病人（有成年人及儿童）有TdT，四名处于原始细胞危象期的慢性粒性白血病人中有一名有TdT，

在几名其它型白血病人的细胞中以及正常的循环白细胞中则没有这种酶，他们认为TdT可以作为从生化角度分类白血病细胞的标准。

第二方面的工作：在寻找抑制逆转录酶的药物方面，从发现利福霉素的某些衍生物能抑制逆转录酶活性以来，国立癌症研究所做了不少工作，R．C．Gallo曾报告过从200多种利福霉素衍生物中发现20种对肿瘤病毒逆转录酶相对强烈的抑制剂。现在发现抗菌素Geldanamycin、Maytansine等抑制细胞癌化的效果比利福霉素强几倍，目前正在研究上述物质的结构，寻找对正常细胞的毒性小抑制病毒转化能力强的药物，而且试图运用到临床治疗上去。

有关逆转录酶的研究还有许多问题，如宿主因素和宿主酶对逆转录过程中的作用等，现在还不清楚。

3．人类肿瘤的病毒病因 RNA肿瘤病毒引起动物致癌已经有了充足的科学证据。然而人类的癌症是否也是由这类病毒引起，这正是大家努力探索的课题，尽管离这个问题的明确地解决还有相当大的距离，但在这方面还是取得了不少进展：

（1）B型肿瘤病毒。由于人乳腺癌乳汁中的B型颗粒难以提取，而且又不能用任何已知的方法人工培养，因此，哥伦比亚大学癌症研究所S．Spiegelman发展了分子杂交的技术，他用小鼠乳腺癌病毒（MMV）合成H^3DNA：

$$(MMV)\ RNA \xrightarrow[H^3dTTP,\ dATP,\ dGTP,\ dCTP]{\text{逆转录酶，}\ Mg^{++}} H^3DNA。$$

用H^3DNA与人乳腺癌细胞中分离出的RNA杂交，结果证实70%的实验中放射性H^3DNA能与乳腺癌细胞中的RNA杂交，说明人癌细胞中含有和小鼠B型病毒相似的病毒所合成的DNA部分，这一实验只是人癌的病毒病因的间接证据。

（2）C型肿瘤病毒。G．Theilen等从新大陆灵长类动物长毛猴的自发纤维肉瘤中分离出一种C型病毒。而后，T．Kawakami等从灵长类动物长臂猿的自发淋巴肉瘤和粒细胞白血病中也分离出C型病毒。灵长类从系统发育上是最接近人类的动物，这些发现有理由推测人白血病细胞中可能含有相似的病毒。访问美国国立癌症研究所时，R．C．Gallo曾给我们介绍，他们从一个急性粒细胞白血病病人外周血细胞培养物中，发现并分离了连续释放典型出芽的C型病毒。在这一实验中，他们利用了一种因子CSA（Colony stimulating activity），它能维持液体悬浮培养的白血病粒细胞连续的指数生长和粒性（myeloid）分化。这个培养系统的特点是：（1）白细胞的生长和分化依赖于全人胚细胞（WHE-1）特殊培养所产生的一个因素；（2）急性或慢性粒细胞白血病病人外周血或骨髓粒细胞能够生长，但正常人或淋巴细胞白血病病人的血或骨髓的不能生长；（3）在8—10天培养中细胞数目增长10—100倍；（4）维持相同的生长动力学四个月以上，可以从最初接种的2×10^6细胞积累白细胞达1克的量；等。病人（HL-23）是61岁的妇女，诊断为急性粒细胞白血病。病人的白血病细胞株培养过程如下图：

这样得到了Ⅰ—1、Ⅰ—2和Ⅱ—1白血病细胞株。结果，Ⅰ—1、Ⅰ—2传到第十代，Ⅱ—1传到第四代时开始释放含有逆转录酶的病毒颗粒，它具有哺乳动物C型病毒逆转录酶的特性。并证实长毛猴肉瘤病毒（SiSV）和长臂猿白血病病毒（GALV）中纯化的逆转录酶抗血清对它有抑制作用。逆转录酶活性主要在蔗糖密度梯度1.16克/毫升比重的提取带上（这个密度带是RNA肿瘤病毒带），沉淀材料电镜观察可以看到大量的病毒颗粒。同时，在Ⅰ—1、Ⅰ—2和Ⅱ—1培养细胞株中，电镜观察也能看到出芽形式的典型的C型病毒。

对于这一实验，目前科学家有不同的看法。有的认为，从人的白血病细胞中分离到C型

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com