



# RNA 指导的 DNA 合成

## 关于生物遗传信息反向转录的问题

匡达人

(上海实验生物研究所)

### 一、引言

Baltimore 和 Temin 与 Mizutani 于 1970 年分别在 RNA 癌肿病毒中发现 RNA 指导的 DNA 聚合酶[RDDP(见注)]于是,生物遗传信

息的传递方向可以从 RNA 传递到 DNA 的这一设想,进一步得到了强有力的支持。这一发现,还促进了生物化学、病毒学、癌肿学等学科的大量研究,并成为研究这些学科的锐利工具。

RNA 指导的 DNA 合成,最早是在 RNA 癌肿病毒中发现的,是从这种病毒生活史中的

#### 注: 本文所用缩写如下:

RDDP: RNA 指导的 DNA 聚合酶  
DDDP: DNA 指导的 DNA 聚合酶  
RDRP: RNA 指导的 RNA 聚合酶  
DDRP: DNA 指导的 RNA 聚合酶  
RNase: 核糖核酸酶  
RN<sub>ase</sub>H: 核糖核酸酶 H  
DN<sub>ase</sub>: 脱氧核糖核酸酶  
ssRNA: 单链 RNA  
dsRNA: 双链 RNA  
ssDNA: 单链 DNA  
dsDNA: 双链 DNA  
mRNA: 信息 RNA  
rRNA: 核糖核蛋白体 RNA  
rDNA: rRNA 的基因  
dNTP: 任一脱氧核苷三磷酸  
dATP, dCTP, dGTP 及 dTTP: 分别为脱氧腺嘌呤核苷,胞嘧啶核苷,鸟嘌呤核苷及胸腺嘧啶核苷三磷酸  
3'-AdR: 3'-脱氧腺嘌呤核苷  
ddTTP: 2',3'-双脱氧胸腺嘧啶核苷三磷酸  
5-BrUdR: 5-溴脱氧尿嘧啶核苷  
Poly A, Poly C, Poly G, Poly U: 多聚腺嘌呤核苷酸,多聚

胞嘧啶核苷酸,多聚鸟嘌呤核苷酸,多聚尿嘧啶核苷酸。如果以 dA, dC, dG, dT 代替 A, C, G, U, 则是脱氧系统的核苷酸多聚物,其中 T 是胸腺嘧啶。如果以 Oligo 代替 Poly, 则是这些核苷酸的寡聚物

AMV: 鸟髓母细胞瘤病毒  
ALV: 鸟白血病病毒  
RSV: Rous 肉瘤病毒  
RAV: Rous 关联病毒  
MuLV: 鼠白血病病毒  
MuSV: 鼠肉瘤病毒  
MuMTV: 鼠乳癌病毒  
FeLV: 猫白血病病毒  
FeSV: 猫肉瘤病毒  
MP-MV: Mason-Pfizer 猴病毒  
Visna 病毒: 绵羊髓质脱失性脑炎病毒  
Reo 病毒: 肠道呼吸道病毒  
VLP: 病毒样颗粒  
PAGE: 聚丙烯酰胺凝胶电泳  
S: svedbeg, 沉降系数单位, 1S = 10<sup>-13</sup> 秒  
BHK: 幼田鼠肾细胞株  
CEF: 鸡胚成纤维细胞  
C-57 黑: 小鼠纯系  
PK-15: 猪肾细胞

中间体(DNA 前病毒)这一设想推断证实而来的,又因为这一现象是 RDDP 活力的体现,所以要谈 RNA 指导的 DNA 合成,就不能不讨论两件事,一是 RNA 癌肿病毒的 DNA 前病毒设想,二是病毒粒子(Virion)中的 RDDP。

#### (一) DNA 前病毒设想

RNA 癌肿病毒是一种动物病毒,经常与动物癌肿联系在一起,其病毒粒子的密度约为 1.16 克/毫升,大小约为 80—120 毫微米,内含

60—70 S 单链 RNA (ssRNA), 其 3'-端具有一段 200 个核苷酸左右的 Poly A。这种病毒的复制, 必须经过一个 DNA 合成阶段, 它对放线菌素 D 敏感。1970 年在这些病毒中发现了上述的 RDDP。

这种病毒的复制并不导致细胞的死亡, 却可以引起新生转化。被感染的细胞, 不管产生病毒与否, 病毒的信息总是在细胞分裂时传递至子代细胞。携带这种病毒信息的物质叫前病毒。

60 年代早期就已清楚, 前病毒的生物学行为与一般 RNA 病毒的复制型中间体, 即双链 RNA (dsRNA) 不一样。用抑制物, 特别是放线菌素 D 研究的结果说明, 前病毒是 DNA。放线菌素 D 抑制 DNA 病毒复制, 不抑制 RNA 病毒复制, 这是众所周知的。RNA 癌肿病毒虽然也是 RNA 病毒, 却受到了抑制。放线菌素 D 专门抑制以 DNA 为模板的反应, 可见 RNA 癌肿病毒与一般 RNA 病毒不一样, 其复制过程必须经过 DNA 合成这一步, 这个 DNA 就是前病毒。目前的证据支持 Temin 于 1964 年提出的 DNA 前病毒设想, 即在 RNA 癌肿病毒复制过程中, 信息传递程序是: 从病毒 RNA → 前病毒 DNA → 子代病毒 RNA。而前病毒的复制, 则是与细胞繁殖同时进行的, 其信息传递方向是 DNA → DNA。

前病毒存在的证据是:

1. 至今前病毒存在的最好证据来自对感染鸡 Rous 肉瘤病毒 (RSV) 的静止鸡胚成纤维细胞的研究。在培养液中不加血清, 细胞就不能分裂, 叫做静止细胞。但一旦加入血清, 细胞又能分裂。在静止细胞里, RSV 能感染细胞, 但要到细胞开始分裂之后, 才产生病毒。因为静止细胞本身不合成 DNA, 所以 DNA 合成的抑制物不会杀死静止细胞。如果将静止细胞同时曝露于 DNA 合成的抑制剂及 RSV, 在细胞开始分裂后, 也不能产生病毒, 说明 DNA 合成的抑制物, 虽然不会杀死静止细胞, 却使病毒不能感染, 也就是说 RNA 癌肿病毒的繁殖, 必须经过 DNA 合成这一阶段。所以这种病毒的感染与复制才会受到 DNA 合成的抑制物的影响。

2. 另一证据, 来自与上述类似的途径。1970 年 Boettigen 和 Temin, 还有 Balduzzi 和 Morgan<sup>9</sup> 曾将静止细胞同时曝露于 5-BrUdR 及 RSV, 放置 24 小时, 使病毒有足够的时间合成 DNA, 然后去掉培养液中的 5-BrUdR, 再将细胞曝光。因为 5-BrUdR 对光敏感, 曝光后, 5-BrUdR 标记的 DNA 就丧失活性。在这种情况下加入血清, 细胞虽然分裂, 却不能产生病毒。值得注意的是, 曝光并不能使含胸腺嘧啶的 DNA (即细胞本身的 DNA) 失活, 而 5-BrUdR 是脱氧的, 不能掺入到 RNA。所以在受感染的细胞中合成的 5-BrUdR 标记的 DNA, 必定是病毒信息, 而非细胞的 DNA。

3. 在感染病毒的细胞中发现 DNA 前病毒, 例如 Rosenthal 和 Baluda 等分别于 1971 年, 1972 年在感染 RSV 的鸡、鼠的细胞中发现有能与标记的病毒 RNA 杂交的 DNA, 其量多于未感染者。又如: 1971 年 Hill 和 Hillova 从感染 RSV 的老鼠细胞中抽提出一种 DNA, 具有 RSV 的信息。

## (二) 病毒粒子中的 RDDP

从遗传物质的性质可将病毒分以下几种:

1. 有些病毒的遗传物质是 ssRNA, 例如脊髓灰质炎病毒或 RNA 噬菌体, 同一 RNA 分子既是 mRNA 又是基因 RNA, 所以只要病毒 RNA 感染了细胞, 就可以立刻开始合成病毒专一的蛋白。

2. 大部分病毒, 包括大多数 RNA 病毒, 则不同, 他们的基因组是 DNA、dsRNA、或与 mRNA 互补的 RNA。这类病毒感染后, 首先是合成核酸, 通常是合成 mRNA。

有的动物病毒具有合成核酸的酶, 所以一旦感染, 立刻就可以开始核酸合成。1967 年 Kate 和 Mcauslan 最早在病毒中发现酶, 同年, Munyou 等在牛痘病毒中发现 DDRP。1968 年在 Reo 病毒中也发现 DDRP。这两种病毒核酸都是双链的, 牛痘病毒核酸是 dsDNA, Reo 病毒核酸是 dsRNA。

在 ssRNA 病毒中是否能找到酶呢? 人们先

后在滤泡性口炎病毒、新城病毒及流感病毒中发现 RNA 聚合酶。

Mizutani 用蛋白合成抑制剂环己亚胺来抑制静止细胞的蛋白合成,发现这种细胞仍然能照常感染 RSV,证明合成 RSV 核酸的酶(一种蛋白)不是感染后的细胞合成的,而是在病毒中早已存在,感染时与病毒一起带进细胞的。

以上的结果,推动 Temin 和 Baltimore 在 RNA 肿瘤病毒中寻找 RDDP。1970 年 5 月 Temin 在第 10 次国际肿瘤学会上宣布发现 RDDP,同年 6 月又与 Baltimore 同时分别报道了在 RSV 和 MuLV 中发现 RDDP 的结果。虽然发现此酶至今只有四年,却吸引了许多科学家开展在多方面的研究工作。这不仅是因为 RNA 指导的 DNA 合成这一事实,在理论上冲破了十多年来在生物学界公认的“中心法则”(Crick 1958),而且,更重要的是这个酶所具有的现实意义与应用价值。当时科学家们以为,如果这酶是肿瘤病毒或肿瘤细胞所专有的,就可以利用它专一的模板来灵敏准确地早期诊断肿瘤;如果能找到这酶的专一抑制剂,就可以不损害健康细胞而达到治疗肿瘤的目的;如果能充分了解这酶与病毒形成过程及其与细胞新生转化的关系,就可以对肿瘤病因加深了解,从而采取预防措施,来根本铲除肿瘤。但是事实并不这么乐观。无论是这酶所用模板,还是抑制剂,都缺乏上述专一性。而且最令人失望的是 RDDP 广泛存在于正常细胞和胚胎之中。

由于最早发现这个酶时,它催化 DNA 合成时所利用的模板与传统所用的 DNA 不一样,它用病毒本身的 RNA,而且对 RNase 敏感,所以叫做 RNA 依赖的 DNA 聚合酶。后来发现它并非只依赖 RNA 为模板,也可以利用 DNA 及 DNA·RNA 杂交体为模板,因此 Temin 建议改为 RNA 指导的 DNA 聚合酶。传统的中心法则认为遗传信息传递方向是由 DNA 转录为 RNA,再由 RNA 翻译成蛋白,而此酶却可以让遗传信息从 RNA 反向转录成 DNA,所以又叫做反向转录酶。

关于这方面的工作,已有高尚荫的《反向转

录酶与肿瘤病毒学说》(遗传通讯,4,31,1973)及 Temin《RNA 指导的 DNA 合成》的译文(生物科学参考资料,第二集,20,1973)等作了介绍。此外,Temin 及 Baltimore 合写过一篇评论性文章(*Adv. Virus Res.*, 17, 129, 1972),总结了 1971 年年底以前的资料。所以本文着重介绍关于 RDDP 本身的工作、最近的进展,和 RNA 指导的 DNA 合成的生物学意义。

## 二、RDDP 的性质与作用机理

RNA 肿瘤病毒有一层脂蛋白外膜,将病毒粒子包在其中。虽然完整病毒粒子也有 RDDP 活力,但外膜破损后,活力可增加 20—50 倍,说明 RDDP 位于病毒粒子的核心内。如果外膜完整,则底物 dNTP 及整个反应系统无从达到聚合酶体系,也就不能进行聚合反应。破损外膜的方法,可以用非离子去污剂(例如 Nonidet P-40, Triton X-100, Triton N-101, Tween 80, Tween 40 等)或脂肪溶剂处理,使 RDDP 释放出来与底物 dNTP 接触,不需外加模板就能合成 DNA。这种依靠内源 RNA 模板的 DNA 合成反应,叫做内源反应。

RDDP 提纯后,就与内源模板分离,此时必须外加模板,这种反应叫做外源反应。病毒 RDDP 复制某些外加模板的能力,往往可以远远超过内源模板。

但是具有重大生物学意义的是内源反应。

### (一) RDDP 聚合反应的要求

RDDP 聚合反应要求模板、引物、全部四种 dNTP 作为底物、还原剂、二价阳离子和合适的 pH 与温度等条件。

**1. 模板** RDDP 和其他 DNA 聚合酶一样,需要模板与引物,纯粹单链或纯粹双链的核酸都无模板活力,必须加一段多聚或寡聚核苷酸,这个单链核酸才有模板活力, RDDP 才能将单链修补成完整的双链核酸,因此这个酶是一个修补酶。如果作为引物的单链核酸过分地长,由于分子内自成互补的二级结构,其复制率也

不高, Poly d(AT) 可以不用引物,因为它能自成互补链。

病毒 70S RNA 是病毒 RDDP 合成 DNA 最重要的模板。但病毒 RDDP 对其同源 RNA(即 RDDP 及 RNA 模板来自同一病毒)并无专一性,例如 AMV-RDDP 复制 MuLV-RNA 及田鼠白血病病毒 RNA 比复制 AMV-RNA 更有效。

与其他 RNA(例如 rRNA, 珠蛋白 mRNA)比较, 70S RNA 是最好的模板。然而, 如果外加引物到其他 RNA, 则其他 RNA 可以成为比 70S RNA 更好的模板。例如 AMV-RDDP 用珠蛋白 mRNA-寡 dT 比用 70S RNA 模板引物系统更好。这说明 70S RNA 本身具有自己的引物, 而其他 RNA 缺乏引物。

70S RNA 本身具有引物的另一证据是: 如果将 70S RNA 加热, 破坏 H-键, 使引物脱离模板, 就丧失模板活性, 这时, 如果外加寡 dT 或寡 dG, 犹如外加引物, 则又能恢复模板活性。寡 dT 及寡 dG 之所以能作为引物, 是因为模板 70S RNA 上具有 Poly A 及寡 C 片段。

很多核苷酸均聚物的模板活力远高于同源 RNA, 例如 Poly A · dT<sub>12-18</sub>, Poly C · dG<sub>12</sub>, Poly dAT……。因此这些模板就被利用为提纯 RDDP 时测活力最灵敏的模板。

dsDNA 经过外切酶 III 处理后, 也可以成为该酶的模板。

**2. 引物** 上节谈到内源 RNA 模板本身具有引物的两个证据, 也是此酶需要引物的两个证据, 因为一旦将内源 RNA 上的引物去掉, 就失去模板活力。

另一例证就是, 所有的 mRNA(除组蛋白 mRNA 外)分子的 3'-端都有一段 Poly A, 因此加入寡 dT 后, mRNA 就可以成为很好的模板。

RDDP 要求的引物, 必须与模板互补, 形成 H-键, 并且具有 3'-OH, 作为合成产物的起始点。其长度, 最短的只要有四个核苷酸。如果核苷酸数与模板核苷酸数之比接近 1, 则模板复制率极小。

70S RNA 上的引物是什么? 有几种设想:

(1) 70S RNA 3'-端折叠成发夹形; 产物

从发夹的 3'-端起始。

这似乎不可能。第一, 如果是发夹形, 则 H-键破坏后, 70S RNA 与产物 DNA 应该以共价键结合, 不可分离。事实上 H-键破坏后, 70S RNA 就与产物分离, 沉降常数变为 10S 左右。第二, 70S RNA 的 3'-端具有 200 个核苷酸左右的 Poly A, 不可能自我互补, 形成 H-键。第三, 1973 年 Faras 等分离出来的引物是 4S RNA, 只由 80 个左右的核苷酸所组成, 而且不是均聚物, 这肯定不是 70S RNA 3'-端的均聚物 Poly A。

(2) 70S RNA 中的 4S RNA 以 H-键把其中的 35S RNA 聚集成大分子 70S RNA。例如 1973 年 Leis 等根据 AMV-RDDP 聚合反应结果所得示意图(见图 3), 这个示意图能够说明许多现象: a. 为什么产物 DNA 小于模板。b. 为什么起始点不止一个。c. 为什么在毗邻分析里, 产物与引物形成共价键时,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 的 <sup>32</sup>P 转至 rUMP 上,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 的 <sup>32</sup>P 转移至 rAMP 上。而 dGMP 及 dTMP 从来不与引物直接连接。就是说引物可以是 35S RNA, 它的 3'-核苷酸是 pU; 引物也可以是 4S tRNA, 它的 3'-核苷酸是 pA。但是 1973 年 Faras 等根据 RSV-RDDP 及 AMV-RDDP 聚合反应的数据, 却发现引物 3'-核苷酸只有 pA, 而没有 pU。所以 Faras 等的结果并不支持这种设想。

(3) 70S RNA 中的 4S RNA 与大分子 70S RNA 以 H-键结合, 成为引物。

这一设想的证据如下: 内源反应 20 分钟内的产物与 70S RNA 结合在一起, 如果加热或用其他破坏 H-键的办法处理, 则发现产物 DNA 脱离大分子 70S RNA, 而以共价键与一个小分子 RNA 结合成复合物, 这个复合物中的 DNA 与 RNA 不因加热而分离, 其 RNA 也不被 RNase H 所酶解, 足见其中的 RNA 和 DNA 不是以 H-键相结合。这个小分子 RNA 就是引物。

在这里必须简单地介绍一下 RNA 肿瘤病毒中的另一个酶, 即 RNase H 的性能; 这个酶专门切 DNA · RNA 杂交分子中的 RNA 链。

曾经用各种手段都没有能将 RNase H 与 RDDP 分离开来。病毒中的 RNase H 是外切酶,反应时要求杂交末端。但不能切链内或环状杂交 RNA,而且,可以从两个末端进行酶切。细胞及大肠杆菌内的 RNase H 则是内切酶,可以切链内的杂交 RNA 链或环形杂交分子的 RNA 链。这种酶最早是 1967 年由 Stein 和 Hausen 在小牛胸腺内发现的。1971 年 Mölling 从 AMV-RDDP 中也发现 RNase H 活力,专门酶解内源反应初期合成的 DNA·RNA 杂交分子的 RNA 链。

这第三个引物设想最有力的证据来自 Faras 等(1973),他们从 AMV 及 RSV-RDDP 的内源反应所得产物中直接分离得到引物,并加以鉴定。他们将上述产物 DNA 与引物 RNA 以共价键相结合的复合物用 DNase 处理,剩下的引物是小分子 RNA,其沉降系数是 4S,其 3'-核苷酸是 pA,它与产物 DNA 以共价键相结合。

Faras 等之所以能肯定 4S RNA 就是引物,而不是模板 70S RNA 被反应系统中的 RNase 酶降解而来的碎片,是因为在他们的实验设计里采取了控制 RNase 的措施:第一,他们不是用四种 dNTP,而只用一种 dATP(标记的),则掺入的只有一个或两个 pdA,或用 ddTTP(关于 ddTTP 的作用详见二、(三))代替 dTTP,则掺入的只有 pdA pddT 或 pdA pdA pddT。产物这样短,没有延伸到末端,就不能为病毒 RNase H 提供所需要的杂交末端。因为病毒 RDDP 中的 RNase H 是外切酶,如果没有杂交末端,就不能起作用。第二,他们所用的 RDDP 是经过纯化,不含 RNase(除 RNase H 外)的,因此不能降解 ssRNA 或 dsRNA。那么经过 DNase(不含 RNase)处理后所得 4S RNA,就不可能是模板 70S RNA 被 RNase 降解的产物,而是 70S RNA 上具有的作为引物用的小分子 RNA。

最近 Stromberg 和 Litwack(1973)发现 AMV 内的 4S RNA 与 tRNA 一样,具有接受氨基酸的能力。这个 4S RNA 可能就是内源

反应的引物。tRNA 的 3'-端核苷酸是 pA,因此这一发现也支持 Faras 等的引物设想。Sawyer 和 Dahlberg(1973)发现 4S RNA 的 RNase T<sub>1</sub> 酶解产物的指纹图谱与 tRNA 的相似。

引物分子是否 tRNA,除了上述氨基酸接受能力与酶解产物指纹图谱这两个证据之外,以目前的结构分析技术水平来说,还可以通过以下途径来肯定的:a. 引物 RNA 核苷酸排列顺序;b. 其中是否存在丰富的稀有碱基。

**3. 其他要求:** (1) 底物: 要充分发挥 RDDP 活力,需要全部四种 dNTP 作为底物。rNTP(核糖核苷三磷酸)不能代替 dNTP。(2) 二价阳离子: 病毒 RDDP 酶反应必须二价阳离子。通常用 Mg<sup>2+</sup> 及 Mn<sup>2+</sup>,但 Ca<sup>2+</sup>不能代替 Mg<sup>2+</sup> 及 Mn<sup>2+</sup>。(3) 温度: 哺乳类病毒的 RDDP 要求 37°—40°C,而鸟类病毒的则要求 40°—45°C。(4) pH: 最佳 pH 范围很广,最适是 pH8.0。(5) 还原剂: 病毒 RDDP 要充分显示活力,必需还原剂,以保护酶蛋白中的巯基被氧化。所用的还原剂,通常是 1,4-二巯基丁二醇(dithiothreitol)或者 2-巯基乙醇。

## (二) 产物

如果病毒 RDDP 内源反应时间不长(约在 20 分钟内),则其初期产物与模板大分子 70S RNA 以 H-键结合,所以用 Cs<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 密度梯度离心时,其密度与病毒 70S RNA 的一样,是 1.65 克/毫升,因为这时的 DNA 分子远远小于 70S RNA,所以出现典型的 RNA 密度。其后 70S RNA 被 RNase H 酶解,只剩下等分子的引物与产物以共价键相结合的复合物,成为 10S 左右,此时的密度介于 RNA 与 DNA 之间,即 1.54 克/毫升。如果将这一复合物用碱水解其中的 RNA 部分,剩下的是小片段 DNA。再继续反应下去,产物的密度就与典型的 DNA 一样,即 1.43 克/毫升。其中有单链的,也有双链的,但都是小片段 DNA,远比模板小得多,这就是后期产物。

毗邻分析证明,内源反应产物 DNA 包含四种脱氧核苷酸,而非均聚物。

产物 DNA 分子小于模板,原因很多,问题还没有弄清楚。

### (三) 合成的起始与延伸的方向

从上面对模板、引物及产物的分析可以概括起来说:病毒 RDDP 的内源反应以病毒 70S RNA 为模板,以 4S RNA (或者还可能有 35S RNA) 为引物,引物与模板以 H-键互相结合,引物与产物以共价键互相结合,产物从引物 3'-OH 起始聚合,然后延伸。:

RDDP 的聚合反应是从引物 3'-OH 起始,然后延伸,除了在讨论 RDDP 内源反应引物时所提出的一些证据外,还有以下证据:

1. 以 Poly dA 为模板,寡 U 为引物,  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dTTP 为底物,在病毒 RDDP 反应结束后,用碱水解,产生 2',3'-UMP $^{32}$ ,可见 U 与 dT 之间是共价键, dT 从 U 的 3'-OH 开始聚合。

2. 以 Poly dA 为模板, 5'- $^{32}\text{P}$ -(dT) $_{10}$  为引物, dTTP 为底物,用 RDDP 聚合反应的结果,  $^{32}\text{P}$  已全部掺入酸不溶性 Poly dT。但不论在酶反应之前或之后,它的 5'- $^{32}\text{P}$  都能被单酯酶切除,可见引物与合成的大分子 Poly dT 相接的不是 5'- $^{32}\text{P}$ ,而是 3'-OH。

3. 用抑制物 ddTTP 为底物,能终止聚合。ddTTP 没有 3'-OH,所以不能接到 5'-P 上去,只能接到 3'-OH 上去。接到引物 3'-OH 上去后,因为 ddTTP 本身没有 3'-OH,所以第二个底物分子就再也接不上去,起了封闭作用,于是聚合反应就到此为止,不再延伸。

但 ddTTP 不能抑制以 Poly C. 寡 dG 为模板引物的聚合反应,可见 ddTTP 首先必须掺入到聚合分子中去,才能起抑制作用。

4. Hurwitz 和 Leis (1972) 用外切酶 III 将 ds DNA 的一段各从 3'-端酶解以暴露单链末端,再用 RDDP 将两端的单链修补成双链,经过修补后的 ds' DNA,对单链专一的链孢霉核酸酶就切不动了,然而,未经修补之前,链孢霉核酸酶却可以将单链部分全部切除,只剩下双链部分。剩下的双链部分对 RDDP 就失去模板活力。

这个实验证明: RDDP 聚合反应起始于 3'-OH,聚合反应一直进行到整个单链全部成为双链为止,而且 ds DNA 没有模板活力。图示如下:

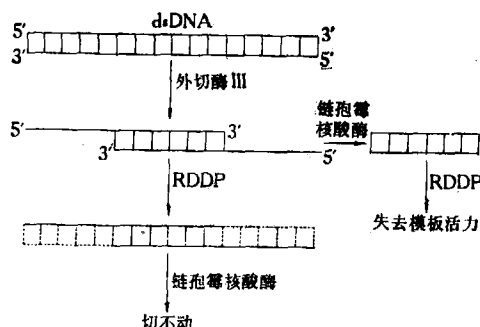


图1 示 RDDP 的聚合反应由 3'-OH 起始延伸。图中实线代表模板 DNA,虚线代表新合成的 DNA (引自 Hurwitz 和 Leis, 1972)。

### (四) RDDP 存在场所

RDDP 存在于以下场所:

1. RNA 癌肿病毒的病毒粒子核心中,例如 AMV, RSV, MuLV, MuSV, MuMTV, FeLV, FeSV 等等。

2. 非癌肿病毒,例如:

Visna 病毒: 详见三、(七)。

合胞体(或泡沫)病毒: 这类病毒在灵长类形成合胞体(即多核细胞),对放线菌素 D 敏感。

3. 感染 RNA 癌肿病毒的寄主细胞。

4. 正常细胞: 例如蛙卵,植物血球凝集素刺激分裂的细胞及其他正常细胞。

5. 胚胎细胞: 例如鸡胚及鼠胚。

6. 癌肿细胞的病毒样颗粒 (VLP)。

当 RDDP 被发现时,人们重视它的主要原因是希望通过 RDDP 的研究解决人类癌肿的病因、诊断、治疗及预防等问题。后来发现正常细胞内也存在 RDDP,那么单单在人体内发现 RDDP 就不足以诊断癌肿。进一步工作发现许多癌肿细胞中有一种颗粒,类似 RNA 癌肿病毒,叫做病毒样颗粒 (VLP),颗粒密度是 1.15—1.19 克/毫升,内含 RDDP 和 70S RNA。虽然至今不能明确人类癌肿是由某种病毒引起的,但却在许多癌细胞中找到 VLP。现将发现

VLP 的人类癌肿举例于下:

1. 白血病: 最早发现人癌肿细胞中有 RDDP 的是 Gallo (1970), 他所用的材料就是白血病细胞。Spiegelman 实验室(1972 年)发现这种 VLP 的内源反应产物 DNA 与鼠 MuLV-RNA 互补, 1973 年他们又发现这内源反应产物 DNA 与病人细胞核 DNA 顺序有关, 但与正常细胞核 DNA 则没有这种同源性。这一结果不能支持致癌基因说, 见三、(三)。

2. 着色性干皮病

3. Hodgkin 及 Burkitt 淋巴瘤: Spiegelman 实验室(1973 年)发现这种病人细胞的 VLP 类似鼠 MuLV。

4. 脑瘤: Spiegelman 实验室(1973 年)发现脑瘤 VLP 的密度是 1.17 克/毫升, 内含 70S RNA 及 RDDP。用 MuLV, MuMTV 及 Visna 病毒的 RDDP 所合成的  $^3\text{H}$ -DNA 与人脑瘤 RNA 不能杂交, 但人脑 VLP 合成的  $^3\text{H}$ -DNA 却能与相应的脑瘤 RNA 杂交, 可见这是器官专一的。

5. 乳癌: 1973 年 Gerwin 及 Bassin 用亲和层析 ( $dT_{12-18}$ -纤维素) 将其 RDDP 分离出来。

6. RD<sub>114</sub> 病毒: 这是一种人类癌肿病毒, 但

对其天然寄主是猫还是人正在争论中 详见三、(三)。

7. 澳大利亚抗原: 1971 年 Hirschman 在 VLP 中发现 RDDP, 很自然地就提出了下面的问题: 澳大利亚抗原与肝癌有什么关系?

既然细胞内普遍存在着 RDDP, 为什么还需要病毒专具 RDDP, 岂非多余?

### (五) RDDP 的纯化与结构

RDDP 曾经从很多病毒和细胞中分离过, 但其纯度与产品数量足以进行分子量测定, 结构分析, 并提供体外反转录用却不够。RDDP 一旦纯化, 就与内源 RNA 分开, 因此进行酶反应时, 必须外加模板。

纯化的 RDDP 中, 没有 RNase、DNA 内切酶,  $5' \rightarrow 3'$  及  $3' \rightarrow 5'$  DNA 外切酶。但是用所有目前试过的方法, 都不能将 RDDP 与 RNase H 分开来。

RDDP 占病毒粒子蛋白的 1%, 根据分子量可以计算出每个病毒粒子含有约 10 个 RDDP 分子。

现将纯化过的 RDDP 及其鉴定数据, 举例于下:

表1 纯化过的 RDDP 举例

| RDDP 来源         | 分子量                                                                  | 说明               | 研究者                  |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------|
| AMV             | $\alpha\beta = 160\ 000$                                             | PAGE 法           | Hurwitz 和 Leis, 1972 |
|                 | $\alpha = 69\ 000$<br>$\beta = 110\ 000$                             |                  | Kacian 等 1971        |
|                 | $\alpha = 65\ 000$<br>$\beta = 105\ 000$<br>$\alpha\beta = 165\ 000$ | 磷酸纤维素柱层析及 PAGE 法 | Grandganett 等 1973   |
| RSV             | —                                                                    | 用于体外反向转录         | Taylor 等 1973        |
| MuLV            | 70 000                                                               | 用凝胶过滤及沉降系数测定     | Ross 等 1971          |
|                 | 90 000                                                               | 沉降系数测定           | Hurwitz 和 Leis 1972  |
| 人急性淋巴母细胞白血病 VLP | 120 000                                                              |                  | Sarnghadharan 等 1973 |
| 鸡胚              | 27 000                                                               |                  | Stovrianopoula 1972  |
| 爬虫类 C 型病毒       | 109 000                                                              |                  | Twardzik 1974        |

(未完待续)