

综述

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)

三、RNA 指导的 DNA 合成的生物学意义

自从发现 RDDP 以来,生物学的各学科(包括老年学)都与之挂上了钩。有关 RDDP 与细胞分化、线粒体的来源及抗体形成等的关系,虽然有过报道,但数据矛盾。现将报道较多的几个方面介绍于下。

(一)生物遗传信息的传递方向

1958 年 Crick 提出,生物遗传信息的传递方向是 DNA→RNA→蛋白。此后,这就成为分子生物学的所谓“中心法则”。1962 年 Temin 提出前病毒设想时,因为其中涉及以 RNA 为模板的 DNA 聚合,与“中心法则”不符,所以当时没有受到重视与支持。1970 年 Temin 及 Baltimore 两个实验室从 RNA 肿瘤病毒分离出 RDDP 时,有人就认为这一事实动摇了“中心法则”。Crick (1970) 立即反驳说:“中心法则”并没有被动摇,因为他在 1958 年只说明当时已经认识的遗传信息传递方向,并没有说过 RNA→DNA 是不可能的,只说过信息一旦流到蛋白就再也流不出来了;而在他 1958 年发表文章前所作的原始草图中,则是全部箭头都有的(见图 2)。

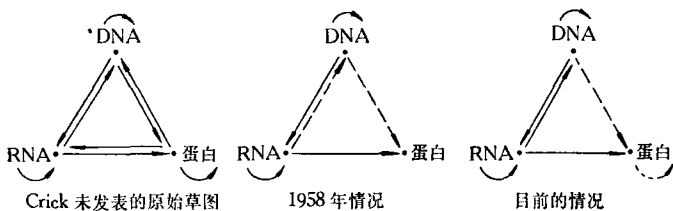


图 2 生物遗传信息传递方向示意图

——普遍存在的传递方向; ----不常见的传递方向

事物在发展,科学研究在深入,新的规律在继续被发现。1965 年 Spiegelman 等在 Q β 噬菌体中发现 RNA 复制酶; 1973 年 Downey 等第一次在兔子的网织红血球内发现 RNA 复制酶,用以复制其中的珠蛋白 mRNA, 这两个例子都说明遗传信息可以从 RNA→RNA。1965

年 McCarthy 发现在大肠杆菌 K12 的无细胞系统里如果有新霉素存在,变性 DNA 就能激发氨基酸掺入,而且掺入专一性与 DNA 密码一致,这就是说遗传信息可以直接由 DNA→蛋白。1967 年 Griffin 等及 Gibbons 等发现绵羊落毛病的致病因子和病毒一样是过滤性的,但不含核酸,仅含蛋白,它的复制不依赖核酸,其信息来源可能就是蛋白。近年来 Lipman 等用 RNase 处理过的无细胞系统靠多酶系统合成了短杆菌环肽 S。在这两个例子中,其遗传信息传递方向都可能是蛋白→蛋白。

如果以上的发现都能得到证实的话,那么今天的遗传信息传递方向就比 1958 年的多了。可是 Crick 认为所有这些新发现,并未超出或动摇他的“中心法则”,而是可以毫不违背“中心法则”地在其示意图中多加几个箭头。

(二)病毒 RDDP 与病毒复制

关于这个问题,可以从以下几个方面来探讨。

1. 对病毒突变型 RSV $\alpha_{(0)}$ 的研究

RSV $\alpha_{(0)}$ 是 RSV 的突变种,不能产生有感染力的子代,不能转化鸡成纤维细胞,也不具 RDDP 活力(既无内源 DNA 合成,又无外加模板的 DNA 合成)。RSV $\alpha_{(0)}$ 与病毒 RDDP 也没有交叉免疫反应。

RSV $\alpha_{(0)}$ 接种后,虽不产生有感染性的子代,却能代代保持下去,随时可以对寄主致癌。

如果 RSV 与 RSV $\alpha_{(0)}$ 的区别全在于有无 RDDP,这就说明从病毒 RNA 信息传递到前病毒 DNA 这一过程必需 RDDP。

但是这一结论还不能最后肯定,因为在有些类似突变型中发现也有 RDDP,而且把野生株的 RDDP 加进突变型中,

结果表明突变型中有抑制物。

2. 对 RDDP 抑制物的研究

人们一直希望能找到对 RDDP 专一的抑制物,但至今所试过的有效抑制物中,大都同时也抑制其他

* 续 1974 年第 4 期第 15 页

DNA 聚合酶,对细胞毒性很大。

从放线菌素 D 的抑制作用可以了解一些 RDDP 与病毒复制的关系:放线菌素 D 与 DNA 结合,但不与 RNA 结合,抑制 DNA 指导的而不抑制 RNA 指导的合成反应。在 DNA 指导的聚合反应中,抑制 RNA 聚合反应比抑制 DNA 聚合反应所需放线菌素 D 的浓度低。放线菌素 D 只能抑制 50% 的内源反应(所谓 50% 抑制是指合成反应产物 DNA 的总产量,有抑制物的是无抑制物的一半),提高抑制物浓度也不会提高抑制百分率,因为它只抑制以 DNA 为模板的后期反应,而不抑制以 RNA 为模板的早期反应。这也是为什么产物中只有 DNA·RNA 杂交体及杂交体被 RNase H 酶解剩下的 ssDNA,而没有 dsDNA;这也是为什么内源反应早期对放线菌素 D 不敏感的原因。若以珠蛋白 mRNA 为模板,用提纯的酶进行聚合反应,放线菌素 D 同样只能抑制 DNA 合成的 50%,而且所合成的 DNA 全部与模板互补。可见同一个纯化的酶分子既能利用 RNA 也能利用 DNA 为模板。

均聚核苷酸(例如 poly U, poly G, poly A, poly C)的抑制机理是:这些均聚物与模板竞争酶,他们虽不能充作模板,却能占用酶分子上的模板位置,从而抑制 DNA 合成。1974 年 Srivastava 发现 poly A, poly C, poly U, tRNA 及 rRNA 对细胞的 DNA 聚合酶抑制效率很低,而对 MuLV 及 FeLV 的 RDDP 抑制效率却比较高。这可能是因为这样的大分子不能从膜上渗透进去,却要依靠胞饮现象,而癌肿细胞的胞饮现象比正常细胞的旺盛。

3'-AdR 能抑制卤化嘧啶(如 1-UdR)诱导病毒,可能是由于在前病毒 DNA 转录成病毒 RNA 时,其中 poly A 的合成受到妨碍了。

显示专一性的 RDDP 的抑制剂是吡喃共聚物(Papas 等,1974)。它不像放线菌素 D 一样与模板 DNA 结合,而是与 RDDP 本身直接作用;但又不像均聚核苷酸一样与 RDDP 的模板位置结合,而是与酶的模板位置以外的位置相结合。所以不论用任何模板都不影响它的抑制能力。又因为它是大分子,还可以利用癌细胞特别旺盛的胞饮现象,进一步提高治癌的专一性。它对 DDDP 不但不抑制,反而促进,所以与细菌的 DDDP 对比,它对 RDDP 的抑制是有专一性的。但与细菌 DDRP 对比,它的专一性就显不出来了(见表 2)。

3. RDDP 对 RNase 的敏感性

RDDP 内源反应初期以 RNA(+)为模板, RNase 能破坏这个模板,所以 RDDP 对 RNase 敏感,但后期不受影响。一旦反应开始,再加入 RNase 则也不敏感。因为后期合成是以 RNA·DNA 杂交体中的 DNA(-)为模板,不涉及 RNA 模板。如果反应已经开始,后期所需要的模板 DNA(-)已经合成,则后期合成 DNA(+)的工作能够照常进行下去,这时再加 RNase 已不起作用。

表 2 吡喃共聚物对各种酶的抑制程度比较
(以 poly dA-dT 为模板, ³H-dTTP 为底物的掺入量)

酶	酶活力(微微克分子/毫升/10分)		抑制 %
	吡喃共聚物浓度(微克/毫升)		
	0	100	
RDDP-AMV	500	40	92
-MuLV	105	45	57
-爬虫类 C 型病毒	129	21	84
-PK-15 C 型病毒	222	81	63
DDDP-大肠杆菌	600	780	0
-藤黄小球菌	640	800	0
DDRP-大肠杆菌	325	50	88
DNA 聚合酶 I(人淋巴细胞)	43	32	19
DNA 聚合酶 II(人淋巴细胞)	9	7	22

4. 对 RNA 癌肿病毒中的其他酶的研究

RNA 癌肿病毒中还有其他的酶,例如 DNase, DNA 联接酶,各种激酶及 RNase 等等。

DNA 联接酶在病毒复制过程中的作用是将小片段 DNA 联接成大片 DNA,还可以帮助前病毒 DNA 整合到寄主 DNA 中去。

在 RNase 中,与病毒复制关系最密切的是 RNase H。

RNA 癌肿病毒复制的一个很大的谜就是:病毒具有 RNA,而在新生转化时,整合到寄主细胞染色体的却是 DNA。

1973 年 Leis 等根据他们对 RNase H 的研究,提出一个整合的假设: RDDP 聚合反应后,经过 RNase H 处理,只能暴露两个单链末端 DNA,而不能切链内的杂交 RNA(因为病毒 RNase H 是外切酶)。这两个单链末端 DNA,又借寄主细胞的重组机制,整合到寄主染色体上。所以在整合前,并不需要将病毒 RNA 全部转录成 DNA。一旦被整合以后,寄主细胞核内的 RNase H(一种内切酶)就能切去位于链内的杂交 RNA,然后通过寄主 DNA 修补系统的作用,将单链部分修补成双链 DNA。就是说,只有在形成转化前才需要病毒 RDDP,包括其中的 RNase H 活力。一旦被整合以后,就不再需要病毒 RDDP。至于维持转化状态,则只需要细胞内的酶系统就够了(见图 3)。

Trávněček 和 Riman (1973) 发现 RNA 癌肿病毒 70S RNA,经过加热或 90% 二甲亚砷或甲酰胺处理,可以分解为 35S 亚单位、4S RNA 和一些不均一的小分子 RNA。这些亚单位是由双链区域的 H-键联接成 70S RNA 大分子。70S RNA 的这种结构支持 Leis 设想的模型。但 Faras 用吡邻分析法的结果不能支持这种设想。

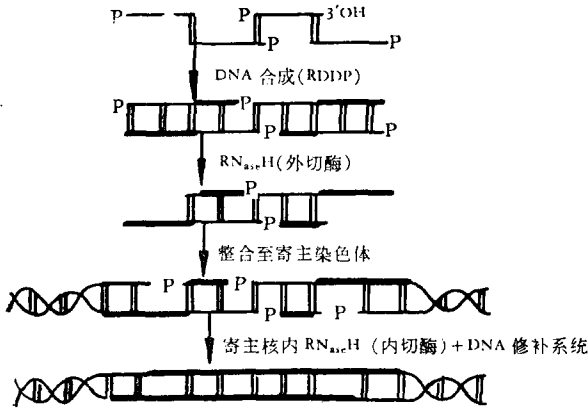


图3 RDDP和RNase H在病毒复制过程中所起作用的设想示意图

细线代表病毒RNA,粗线代表新合成的DNA,螺旋代表寄主染色体

根据以上介绍,可以把病毒复制过程的设想概括于下:

- (1) RDDP 以内源 RNA(+) 为模板合成杂交分子 RNA(+) \cdot DNA(-);
- (2) RNase H 酶解杂交末端中的 RNA(+),为进一步合成 DNA(+) 提供模板 DNA(-),形成 dsDNA;
- (3) 具有末端 DNA(但仍有链内 RNA)的复合物,利用寄主酶系统整合至寄主 DNA,此后就与寄主 DNA 同时复制,不再需要病毒 RDDP;
- (4) 由 DDRP 作用产生子代病毒 RNA。

(三) RDDP 与肿瘤研究

虽然至今不能明确人类肿瘤是由某种病毒引起的,却在许多人肿瘤细胞中找到类似于 RNA 肿瘤病毒的 VLP。那么这些 VLP 与已知 RNA 肿瘤病毒有什么关系?它们是如何产生的?其遗传信息与人的有什么关系?

这方面的工作很多,有的用免疫法来检查人肿瘤与已知肿瘤病毒的抗体抗原关系,有的用模板专一性来检查 RDDP 的异同。但抗原、抗体或 RDDP 都是蛋白,蛋白是遗传信息传递终点,即基因的表达形式,因此以上的检查法,始终停留于表型的检查。后来用核酸分子杂交法,即用 RNA 肿瘤病毒的 RNA 与不同寄主的 RNA 及 DNA 杂交,进一步又用这些病毒 RDDP 内源合成的 ^3H -DNA 作为探测剂与不同寄主的 RNA 及 DNA 杂交。鉴定杂交程度的方法有:磷灰石柱层析、链孢酶酶切和米曲霉 S_1 酶酶切(这两种酶都是专切单链核酸的)。检查 RNA 比检查蛋白进了一步,但 RNA 毕竟还只是遗传基因表达的部分。必须直接检查 DNA,才能真正检查基因的本身。

Spiegelman 等用严格的对照,直接检查了基因本

身。他们(Ruprecht 等,1973)的设想是:溶原噬菌体(例如 λ , $\phi 88$, 434, P22)与 RNA 癌肿瘤病毒有一个共同点,即都能把自己的遗传信息加进寄主细胞的基因组上去。这些噬菌体的 DNA 与未感染的寄主的 DNA 有相同部分,这种同源关系仅限于它们与它们的天然寄主。凡是裂解的 DNA 噬菌体或 RNA 噬菌体,不论在感染前后,与寄主 DNA 都没有这种同源关系。而在鸟类、鼠、猫及灵长类的 RNA 癌肿瘤病毒与正常寄主 DNA 之间确有同源部分。当发现新的 RNA 癌肿瘤病毒或 VLP 时,利用上述现象,就可以分析它的天然寄主在分类学上的位置。

现将 ^3H -DNA 探测剂与细胞 DNA 杂交的结果列于表 3。

表 3 总结了动物肿瘤方面的实验。至于人肿瘤的病毒病因,研究得比较详细的有 RD-114 病毒及人白血病。

Spiegelman 等发现 RD-114 病毒内源合成的 ^3H -DNA 与正常猫 DNA 杂交程度很高,而与正常人的 DNA 很少杂交,因此他们认为 RD-114 病毒来源于猫而不是人(Ruprecht 等,1973)。Gillespie 等(1973)也发现 RD-114 病毒中的 RNA 有 40% 与猫 DNA 杂交。Balluda 和 Roy-Burman(1973)用细胞中的 DNA 与病毒中的 RNA 杂交,Okabe(1973)用 RD-114 病毒内源合成的 ^3H -DNA 与细胞 RNA 杂交,其结果都说明 RD-114 病毒是一种猫癌肿瘤病毒。但以上结果与免疫血清学结果不一致,例如 Scolnick 等(1972)找不到 RD-114 病毒与猫的 FeLV, FeSV 有血清学上的关系。Haapala 等(1973)用 RD-114 病毒 RDDP 内源合成的 DNA 与猫 FeLV RNA 杂交的结果,也不能说明 RD-114 病毒与猫病毒的关系。

这些似乎矛盾的结果被 East 等(1973)解答了。他们发现 RD-114 病毒基因组与猫的 Crandell 病毒的核苷酸顺序有相同部分,并且其分子大小都是 50S,但是与 FeLV 或 FeSV 的不同。因此说明了,Spiegelman 等为什么发现 RD-114 病毒 RDDP 内源反应合成的 ^3H -DNA,能与猫细胞 DNA 杂交;也说明了,Scolnick 及 Haapala 等直接用 FeLV 及 FeSV 而不是泛用猫细胞时,就不能发现它们与 RD-114 病毒的关系。

Baxt 等(1972)用人白血病细胞中 VLP 内源合成的 ^3H -DNA 与细胞核的 DNA 进行分子杂交,发现只有病人细胞核中的 DNA 核苷酸顺序有相同部分,而正常人的则无。(用同一技术,还发现 Burkitt's 及 Hodgkin's 淋巴瘤组织中的核 DNA 与鼠白血病的核酸有相同部分,Kufe 等,1973)。这个实验虽然直接检查了遗传基因,但是病人与作为对照的正常人之间是任意无关的。

表 3 ³H-DNA 探测剂与细胞 DNA 杂交结果 (Ruprecht 等, 1973)

探测剂来源	与之杂交的细胞DNA来源 (有关动物)	反 应	作 者*	与之杂交的细胞DNA来源 (无关动物)	反 应	作 者*
RSV(SR)	鹌鹑胚	+	1,2	HeLa 细胞	-	2
	鸡胚	+	2	鲑鱼精	-	2
RAV-0				小牛胸腺	-	1
	鹌鹑胚	+	2	BHK-21 细胞株	-	1
	鸡胚 [COFAL(-)gs(-)]	+	2	HeLa 细胞	-	2
RAV-14	鹌鹑	+	1	鲑鱼精	-	2
RAV-60	CEF K-S ₁₃ 细胞株	+	1	小牛胸腺	-	1
AMV	鸡	+	3	BHK-21 细胞株	-	1
MuMTV				小鼠胚	-	3
	C-57 黑色小鼠纯系	+	5	大鼠胚成纤维细胞	-	3
FeLV				鲑鱼精	-	5
	猫肝	+	4	RSV 转化的大鼠细胞	-	5
				狨猴	-	6

* 1. Rosenthal 等, 1971; 2. Varmus 等, 1972; 3. Balluda, 1972;
4. Ruprecht 等, 1973; 5. Varmus, 1972; 6. Goodman 等, 1973

令人信服的实验是 Baxt 等 (1973) 用两对同卵双生子做的实验。Levine 等 (1972) 也曾用同卵双生子做过实验, 但仍然停留在检查抗原, 即表型的检查。Spiegelman 等则深入到基因本身, 他们所用的两对同卵双生子都各有一个患有白血病, 实验结果与 1972 年的相同, 即与 VLP 相同的病人细胞核 DNA 中的核苷酸顺序, 在正常人细胞核 DNA 中是没有的。一对同卵双生子的基因组来自同一受精卵, 任何直线传下来的信息, 应该是两个人都有的。如果其中一个人患白血病, 这就提供了一个研究癌肿病因的极好机会, 比用任意无关的健康人为对照更说明问题。上面的结果说明, 在白血病人细胞核里比正常双生兄弟的 DNA 顺序多余的部分是受精后整合进去的。这个结果, 符合前病毒学说, 而不支持致癌基因学说。因为后者假定病毒与恶变的全套信息都存在于所有细胞 DNA 中。这个结果, 也不支持原生病毒学说。原生病毒学说认为 RNA 癌肿病毒信息是从正常细胞的原生病毒进化而来。那么双生子中患白血病的一个的 DNA 应该与双生对照的 DNA 都具有这一同样顺序, 而事实不是这样。

由此可见, 癌肿病毒病因学说的研究, 有一个发展过程。所用实验材料从动物到人; 所用对照从无关对照到同卵双生对照; 研究对象从表型的蛋白, 经过信息传递的中间站 RNA, 到贮存信息的基因本身——DNA; 杂交方法从 RNA·RNA 杂交, 经过 RNA·DNA 杂交, 到 DNA·DNA 杂交; 检查杂交过程的方法由 Britten 和 Kohne 的 $\frac{1}{2}$ Cot 值到链孢霉核酸酶和米曲霉 S₁ 酶。这个过程就是一个“去粗取精、去伪存真、由此及彼、由表及里”的过程。

综上所述, 可见并不因为 RDDP 的发现, 就能明确肯定人癌肿是由某一种病毒引起的, 也并不因此就解

决了人癌肿的诊断、治疗和预防等重大问题, 但是在理论上统一了癌肿病因的遗传学说与病毒学说。

(四) RDDP 的发现促进真核细胞中聚合酶的研究

在原核细胞中存在的聚合酶已经研究得比较清楚, 例如对大肠杆菌中的 DDDP-I, II, III, DDRP 及 RDRP (例如 Q β 复制酶) 的研究等。

1970 年在 RNA 癌肿病毒中发现了 RDDP。因为 RNA 癌肿病毒的寄主是哺乳动物, 离开攻克人癌肿顽疾又接近了一步, 从而促使人们对真核生物 (包括人类) 的聚合酶系统 (尤其是 DNA 聚合酶) 进行研究。

由于这项工作是最初四年才大量开展起来的, 在命名方面还比较混乱, 没有统一。现将不同作者发现的酶的分类, 择要比较于表 4 (表中除末端转移酶外, 都要求四种 dNTP 为底物)。

这些酶是有区别的, 现将区别这些酶的手段举例于下:

(1) 分子量不同 用超速离心、PAGE 及凝胶过滤等方法, 可以看到各种 DNA 聚合酶分子量不同。关于病毒 RDDP 的分子量前已述及。

(2) 免疫血清学上的差异 利用各种病毒 RDDP 在免疫血清学上的差异, 可以寻找各种病毒的亲疏关系, 也可以追查人类癌肿的 VLP 与何种动物病毒有关。

(3) 柱层析分离 用凝胶过滤或磷酸纤维素柱不但可以将细胞中不同的聚合酶分开, 而且可以将它们与病毒 RDDP 区别开。

(4) 抑制物专一性 例如均聚核苷酸及吡喃共聚物。专一的抑制不仅是防治癌肿的要求, 也是研究病毒复制与癌肿病因的有力工具。

表 4 真核细胞中 DNA 聚合酶的分类比较

Fry 和 Weissbach (1973)	McCaffrey 等(1973)	Lewis 等 (1974)
D-DNA 聚合酶 普遍存在于真核细胞,以活化DNA为模板,但不以 poly A · (dT) ₁₂ , poly C · (dG) ₁₂ 或 poly I · (dC) ₁₂ 为模板引物系统	聚合酶 C 6—8 S', 在磷酸纤维素柱上用低盐浓度可以洗脱下来	DNA 聚合酶 I
R-DNA 聚合酶 以 poly A · (dT) ₁₂ 为模板引物	聚合酶 A 在磷酸纤维素柱上用低盐浓度可以洗脱下来	DNA 聚合酶 III
末端转移酶* 在动物中仅见于小牛胸腺,不见于其他细胞。不需要模板,只需要引物和单种 dNTP 就能聚合	聚合酶 T	
	聚合酶 N 3.3 S', 在磷酸纤维素柱上用高盐浓度才能洗脱;在静止细胞和分裂细胞中,在细胞核与细胞质中都有	DNA 聚合酶 II

* 最近在与 RNA 癌肿病毒有关的人急性淋巴母细胞白血病淋巴细胞中,发现另一种 DNA 聚合酶,即末端转移酶。这种酶在动物中只见于小牛胸腺细胞,不见于其他细胞。如今在白血病淋巴细胞中发现这种酶,而且在白血病缓解时,这种酶又消失。因而推论这种淋巴细胞增生是由胸腺细胞的分化受阻抑而来。这个实验结果,不仅说明了恶变淋巴细胞的来源,还提供了一个检查治疗效果的跟踪法 (McCaffrey, 1973)

(5) 模板专一性 过去,由于反应条件以及可供使用的模板种类的限制,认为 DDDP 只能以 DNA 为模板。当 RDDP 刚发现时,用的是内源 RNA,所以认为 RDDP 是依赖 RNA 的;似乎 DDDP 与 RDDP 的模板专一性是很强的。但是后来发现 RDDP 能以 DNA 为模板,DDDP 能以 RNA 为模板。特别是 Spiegelman 用多种化学合成的均聚物作为 RDDP 的模板,引起了一些混乱。而大肠杆菌 DDDP-I 除了能以 DNA 为模板外,还能以 poly AU 为模板合成 poly dAT,这一点早在1963年就被 Lee-Huang 及 Caralieri 发现了。这样一来,似乎模板专一性又很弱了。经过细致的比较后,发现各种不同的酶之间有差别。

若以核苷酸多聚物-寡聚物为模板引物,病毒 RDDP 优先利用核糖核酸多聚物为模板,例如 AMV-RDDP 优先利用 poly A, poly I, poly C, poly dC; MuLV-RDDP 优先利用 poly A, poly I, poly C, poly U, poly dC; 而大肠杆菌 DDDP-I 优先利用脱氧核糖核酸多聚物,例如 poly dA, poly dC, poly dI, poly dT, poly A。但若以核苷酸多聚物-多聚物为模板引物,这

种专一性就不显著了。

若以天然 RNA 为模板,则病毒 RDDP 能以珠蛋白 mRNA · 寡聚 dT 为模板引物,而大肠杆菌 DDDP-I 则不能。Q β -RNA 或 AMV-RNA 只能作为病毒 RDDP 的模板,不能作为大肠杆菌 DDDP-I 及小牛胸腺聚合酶的模板。噬菌体 ϕ_2 -RNA 可以作为 AMV-RDDP 的模板,不能作为大肠杆菌 DDDP-I 的模板。

来自不同病毒的 RDDP 对不同天然 RNA 模板,以及对合成的多聚核苷酸模板,所表现的活力也都不同。例如 poly U · 寡聚 dA 是鼠病毒 RDDP 的好模板,但不适合于鸟类病毒 RDDP。又如 poly A · 寡聚 dT 是鸟和鼠病毒 RDDP 的好模板,但不适合于猫肉瘤病毒或鼠白血病毒 RDDP。

但是在比较各种 DNA 聚合酶的差异时,存在以下两个问题:

1. 各实验室所用方法、条件、酶的纯度等等都不相同,没有用同一方法、同一条件对各种聚合酶同时进行比较的数据。所以只能将几个实验室的有关数据举例于下(见表 5, 6)。

表 5 比较不同来源的 DNA 聚合酶对活化 DNA 和 poly rC · 寡聚 dG 的复制能力 (Scolnick 等, 1972)

DNA 聚合酶来源	标记 dNTP 掺入量 (10 ⁻¹² 克分子)		活化 DNA
	活化 DNA	poly rC · 寡聚 dG	
非病毒类			
细胞峰 I	1.3	<0.005	>20/1
细胞峰 II	4.1	<0.001	>50/1
大肠杆菌 DDDP-I	16.2	<0.01	>50/1
支原体 (Mycoplasma)	22.3	<0.01	>50/1
病毒类			
RSV	6.6	160.3	1/25
MuLV	12.4	119.8	1/10
MP-MV	23.7	122.5	1/5
Visna 病毒	5.1	50.1	1/10
猴疱疹病毒	0.1	1.1	1/10
绒毛猴 C 型病毒	1.0	11.2	1/10
长臂猿 C 型病毒	0.3	4.8	1/15

表 6 比较病毒 RDDP 与细胞 RDDP 的模板利用率 (Fry 和 Weissbach, 1973)

模 板	鼠成纤维细胞 L-细胞 RDDP	AMV-RDDP
poly A · (dT) ₁₂	100%	100%
HeLa 细胞-RNA · (dT) ₁₂	0.1	34
Q β -RNA · (dT) ₁₂	0.0	26
兔珠蛋白 mRNA · (dT) ₁₂	2.6	36
脊髓灰质炎-RNA · (dT) ₁₂	0.0	
70S RNA · (dT) ₁₂	1.5	40.5

由表可见,不仅来自不同病毒的 RDDP 有区别,病毒 RDDP 和细胞 RDDP 与其他 DDDP 也有区别。但是要称呼一种酶为反向转录酶, Gallo 认为应该符合以下标准:

(1) 必须是来自颗粒部分,如要达到最佳活力,必须用非离子去垢剂处理;

(2) 应该能进行内源反应,即以同一颗粒内的 RNA 为模板的聚合反应,且对 RNase 敏感;

(3) 产物 DNA 与同一颗粒内的 RNA 至少能部分地杂交;

(4) 与同源 RNA 分开来的纯酶应该能利用 RNA, DNA·RNA, DNA 为模板引物;

(5) poly rA·寡聚 dT 的模板引物活力远远超过 poly dA·寡聚 dT,而对细胞里的 DNA 聚合酶来说则相反。

2. 关于模板专一性的问题

(1) 模板与引物相对长度问题 Stavrianopoulos 等 (1972) 发现大肠杆菌 DDDP-I 选择模板是以模板与引物相对长度为标准的,不论长链是脱氧的或不脱氧的,总是以长链为模板,短链为引物。所以 DNA 合成是 DNA 指导的还是 RNA 指导的,要看长链是 DNA 还是 RNA。

(2) pH 影响 Penner 等发现,用植物血球凝集素刺激的淋巴细胞中的 DNA 聚合酶,在 pH 4.7 时要求 DNA 模板;在 pH 5.3 时则要求 RNA 模板。

(3) 酶的纯度 如果聚合酶中有核酸酶,将模板或引物切出缺口来,也能改变模板引物关系。

(4) 天然 RNA 作为模板的问题 有些 RNA 本身具有引物,因此在聚合反应系统里有模板活力。但有些 RNA 本身没有引物,因此没有模板活力,只有在外加引物之后,才能起模板作用。

综上所述,DDDP 与 RDDP 有区别;在 RDDP 中,细胞的与病毒的不一样;在病毒 RDDP 中,来自不同病毒的又不相同。但是在这些聚合酶中,经过纯化和细致鉴定的只有 Kornberg 酶(即细菌 DDDP-I)与病毒 RDDP,可以对它们进行认真的比较。而且自从发现 RDDP 以来,又重新比较了 DDDP-I 的一些性质,产生了一些混乱与矛盾。现将这二者已经明确的异同总结于下:

1. 相同的性质

(1) 两者的活力表现都要求模板、引物,全部四种 dNTP 作为底物,二价阳离子;

(2) 两者的聚合方向都是从引物 3'-OH 开始延伸;

(3) 产物都是小分子 DNA;

(4) 二者的酶分子都可分为二个亚基;

(5) 同一酶分子既能利用 RNA 也能利用 DNA 为模板,两者都是这样,但有程度上的差异。

2. 不相同的性质

除了本节所述分子量、免疫血清学、柱层析行为、抑制物专一性及模板专一性之外,还有以下一些:

(1) DDDP-I 具有 3'→5' 及 5'→3' 核酸酶,而病毒 RDDP 则无;

(2) 病毒 RDDP 具有 RNase H,而 DDDP-I 则无;

(3) 病毒 RDDP 不能利用 rNTP 为底物,但 DDDP-I 在 Mn^{++} 存在下能使 rNTP 掺入。

(五) RDDP 与 rDNA 基因放大

这个问题正在争论中,还没有定论。

与多倍体不同,基因放大不是基因的全面加倍,而是某一个或某几个基因的数目在细胞生活史的某个时期突然大量增加,例如 rDNA。rDNA 除了为 18S 和 28S rRNA 编码外,还有一个嵌合在二者之间的间隔片段。rDNA 是 rRNA 前身物的基因。一般体细胞只有几百个 rDNA 分子,但是在卵母细胞里,却有上千倍之多,分布在上千个核仁里,用以生产大量核糖核蛋白,以备细胞大量分裂时旺盛的蛋白合成之用。

rDNA 放大的详细过程现在还不十分清楚。当 RDDP 被发现后, Crippa 和 Tochinn-Valantini 曾提出一个设想,认为 rDNA 的放大是通过 RDDP 来实现的,因为他们在爪蟾卵母细胞核仁里发现:第一, rDNA 的完整转录产物——47S RNA;第二,这个 47S RNA 与新合成的 DNA 形成的杂交体;第三,核仁中有 RDDP;第四,利福霉素的衍生物 AF/ABDMP 对 rDNA 合成的抑制大于对染色体 DNA 合成的抑制。

J. Brachet (Ficq 和 Brachet, 1971) 从形态学角度,也支持这一观点。

但是, Bird 等 (1973) 也用爪蟾卵母细胞为材料,却找不到转录产物 47S RNA,也找不到合成中间产物 RNA·DNA 杂交体,还发现 AF/ABDMP 不仅抑制 rDNA 的合成,也抑制染色体的合成,因此不能肯定 RDDP 与 rDNA 基因放大的关系。

(六) RDDP 与病毒分类

病毒分类的依据很多,如形状、大小、寄主、核酸组成 (DNA 或 RNA, 单链或双链)、感染后杀死细胞或转化细胞……等等。

如以核酸组成来分类: DNA 病毒复制时,对放线菌素 D 敏感; RNA 病毒复制时,对放线菌素 D 不敏感,就是说 RNA 病毒复制时,不涉及以 DNA 为模板的聚合反应。RNA 癌肿病毒虽属 RNA 病毒,但在它复制过程中,却受到放线菌素 D 的抑制,可见它不同于一般 RNA 病毒;在它的复制过程中,必须经过以 DNA 为模板的聚合反应。因此 Temin 就将病毒分为三类: DNA 病毒, RNA 病毒, RNA-DNA 病毒。

(下转第 55 页)

三、结 语

本文试图从分子水平扼要地阐述酶的结构与功能的关系。以研究得较为清楚而典型的酶为例,从酶活性与其一级结构中氨基酸残基之间的规律, X 光衍射所确定的空间构型,并联系它们的作用机制等方面,来说明酶为什么具有如此高度专一性和催化效率。

酶的结构与功能是酶学领域中最基本的课题,无论对于探索生命奥秘的理论研究,还是对于人类的实际生活,都有着十分密切的关系。诸如模拟酶催化来替代在高温高压下进行的化学反应;扩大和发展工业发酵的品种和产量,改革生产工艺;疾病的诊断与治疗;以及其他有关的工农业部门都与酶学有关。可以预期,通过人们的辛勤劳动,在从必然王国走向自由王国的征途上,酶学和其他学科一样,将会作出有益的贡献。

主要参考资料

- [1] Gray, C. J.: *Enzyme-catalysed Reaction*, 1971.
- [2] Lipscombe, W. W.: *Chem. Soc. Rev.*, 1, 80, 1972.
- [3] Freedman, R.: *New. scit.*, 58, 560, 1973.
- [4] Dickerson, Richard. D.: *Ann. Rev. Biochem.*, 41, 815, 1972.
- [5] Matheza, J. & Degens, E. T.: *Advan. in Enzymol.*, 34, 1, 1971.
- [6] Smellie, R. M. S.: *Biochem. soc. sym.* 31, "Chemical Reactivity and Biological Role of Functional groups in Enzymes" Acad. Press U.S.A. 1970.
- [7] Boyer, P. D.: "The Enzyme" Vol. 1, Third Ed. Acad. Pres, 1970.
- [8] Allewell N. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 248, 5291, 1973.
- [9] Lehninger, A. L.: "Biochemistry" Publ. by Worthpublisher, 1972.

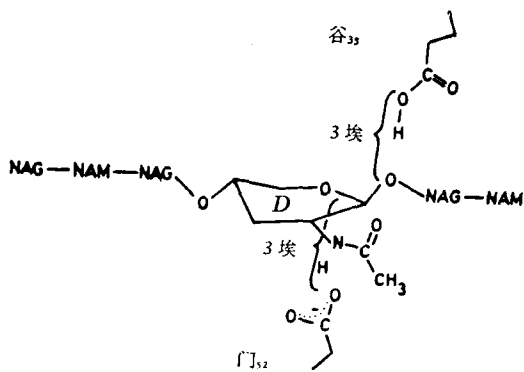


图7 “D”环的半椅式构型

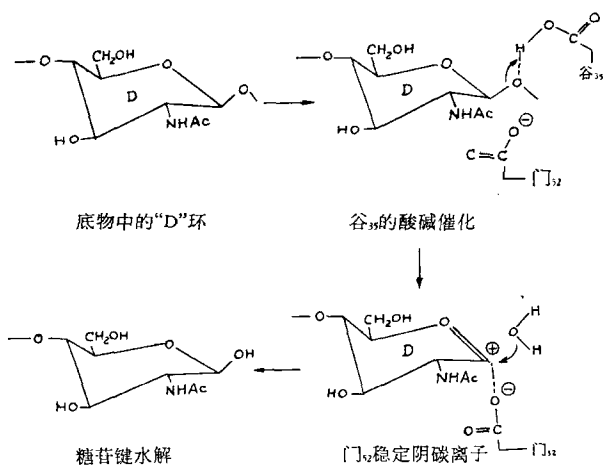


图8 溶菌酶的作用机制

一步是先拆开 DE 环之间的糖苷键。按 D 环 C₁ 形成阳碳离子的机制,其作用方式如图 8。

(上接第 46 页)如根据是否导致细胞转化来分类, Visna 病毒原来是不属于癌肿病毒的,但是由于以下三件事,就把它分类归属于癌肿病毒。第一,它有 RDDP;第二,它在羊身上虽不引起癌肿,但是它能将正常小鼠细胞转化为癌肿细胞;第三,它对放线菌素 D 敏感。这三点都与 RNA 癌肿病毒相似。

四、结 语

发现反向转录酶至今已四年多。在它被发现及以后的研究过程中,充满了矛盾。

1962 年,生物遗传信息从 RNA 传递到 DNA 这一前病毒设想发表时,由于分子生物学研究中所谓“中心法则”的影响和束缚,没有立即为人们所接受和重视。实践的需要推动科研工作向前发展,这是现代各门科学蓬勃发展的普遍规律。由于防治癌肿的实践需要,通过科学实验,生物遗传信息反向转录现象的被证实,

又一次说明了实践与认识的辩证关系。认识源于实践。人们在实践中对于真理的认识永远没有完结。在学术问题上,我们不应该因循守旧,而应该用发展的眼光辩证地对待。“通过实践而发现真理,又通过实践而证实真理和发展真理。”“停止的论点,悲观的论点,无所作为和骄傲自满的论点,都是错误的。”

关于生物遗传信息反向转录问题的研究,具有一定的理论意义和实践意义,是近年来生物学方面极为重要的动态之一。现有的研究资料虽然阐明了一些问题,但许多论述仍属于设想或假说,有些假说甚至还是相互矛盾的,有待于继续研究。“只要自然科学在思维着,它的发展形式就是假说。”(恩格斯:《自然辩证法》)可以预期,通过进一步的科学实验,人们的认识必将不断深化,去粗取精,去伪存真,“使这些假说纯化,取消一些,修正一些,直到最后纯粹地构成定律”。(恩格斯:《自然辩证法》)