

——Watson 教授的学术报告之一

美国冷泉港实验室主任 Watson 教授于 1981 年 12 月 12 日及 14 日在中国科学院生物物理所以《肿瘤与 DNA》、《单克隆抗体》为题作了二次学术报告。现整理如下,分两次刊登,供大家参考。通过这两个报告可以看到 DNA 分子重组技术和单克隆抗体技术在当前生物科学发展中所起的作用。

——编 者

今天谈一下关于肿瘤和核酸方面所做的一些实验,部分是目前在美其他实验室的工作,部分是冷泉港实验室所作的工作。近来用分子生物学技术,特别是应用 DNA 分子重组技术在肿瘤和核酸方面作了相当大量的工作。这类的工作开始于若干年之前,最初作的是细菌的病毒,后来人们把研究兴趣转到动物病毒——特别是能引起细胞癌变的病毒。当时研究肿瘤是一个困难的课题,特别是用人的细胞作材料来研究肿瘤和 DNA 的关系更是如此,因为同细菌相比,人的细胞要大得多,而且含有大量的 DNA。为了寻找一个比较简单的体系和更容易入手起见,我们最初选择 SV₄₀ 和 polyoma DNA。SV₄₀ DNA 分子量为 3×10^6 道尔顿,可以从猴的细胞和小鼠的细胞中得到。SV₄₀ 原来是感染猴细胞的病毒,当加到小鼠细胞中时,小鼠细胞也发生了癌变。当时人们假设, SV₄₀ DNA 是一个双链环状的分子,当 DNA 进入鼠细胞后,确实会整合到宿主染色体中,并产生与癌变有关的基因产物——一种蛋白质。因此,我们当时认为,如果能完全地、彻底地研究一下 DNA,一定会发现在此 DNA 上会有一个或一个以上的基因与细胞的癌变有关,这些基因把癌变因素转移到鼠细胞中来。当我们开始这一工作时, DNA 的重组技术还没有发现,因此当时大家还都不怎么明确,不知道怎么做这种实验。这样,当时分子生物学家要作这样的工作就要找个突变株。这个突变株已经失去使细胞癌变的能力,用此方法还是很有效的,当时确实发现在 DNA 上有个区域,这个区域编码一个与癌变有关的蛋白质,这就是所谓的 T 抗原, T 抗原出现在病毒生活周期的早期阶段,而且证明此蛋白质对转化的作用是主要的,其分子量为 90,000 道尔顿。当限制酶的技术出现之后,作了 SV₄₀ DNA 的限制性图谱,在 DNA 分子上的一个区域编码分子量为 90,000 道尔顿的 T 抗原。此后又发现 T 抗原总是同 DNA 复制的起点相结合。这样的一个结果使得我们很高兴,而且从表面看来问题变得非常地简单, T 抗

原可以启动 DNA 的合成,从而造成细胞的癌变;后来, RNA 剪接的技术发现之后,问题反而变得复杂了,人们发现这个基因实际产生二个蛋白质分子,一个是大的“T”,其分子量为 90,000 道尔顿,而另一个是比较小的蛋白,被称为小“t”,实验证明“t”对于使细胞癌变也是必要的。因此,我们认为 SV₄₀ 有二个基因产物,但“t”功能到底是什么,至今还没有弄清楚。我们推测它们是在细胞质中起作用,使正常的扁平细胞变成圆形的癌细胞。“t”可能帮助细胞通过细胞周期,其过程是首先 DNA 进行复制、细胞内微管破裂使细胞变成圆形,这样促进细胞通过分裂周期。这样看来,问题就变得逐渐复杂起来。过去研究病毒 DNA 都是用细菌做,因为用细菌可以得到大量的核酸,甚至可以得到毫克量的病毒 DNA;但在动物细胞体系中,病毒 DNA 不容易得到,所以后来用 DNA 重组技术可以得到大量的“T”。现在在冷泉港实验室把 SV₄₀ 的一个组份放到一个大的病毒当中去(腺病毒)可以使之变成高产,这样可以得到毫克量的“T”,甚至可以得到毫克量的结晶。有了足够量的蛋白就可以更好地研究蛋白质和核酸的相互作用,比如通过研究我们发现, T 同 DNA 复制原点结合的比例是 1:3,但至今对其结合的性质和过程还不清楚。这里面有一个生物化学的问题。大家认为这一定同 DNA 合成的启动有关。目前还没有得到一个无细胞体系,即在存在 SV₄₀ DNA、T 抗原、必要的酶的条件下,使 SV₄₀ DNA 能在试管中进行复制,因此,只有我们得到一个病毒体系,通过研究找出能致癌的基因,再把此基因的产物一种或多种特定的蛋白质分离纯化,得到足够大量的蛋白后,我们才可对其生物化学的作用进行研究。有关“T”的工作进行得比较顺利,然而要把工作深入下去就必须同很多生物化学家进行合作,并得到一个好的无细胞体系。“t”的工作在进行中就遇到困难,因为“t”的数量不够,所以为着得到相当数量的“t”,一定要应用 DNA 重组技术,得到一定的数量后,用微量注射的方法来观

察细胞的变化,比如可以观察当向细胞内注入“c”后,细胞的形状是否会产生改变,但到目前为止所得到的结果都是负的。

在冷泉港实验室已经研究了几种人的病毒,而最常用的是腺病毒。这是一个分子量相当大的圆形病毒,其分子量大约为 3,000 万道尔顿,有 40,000 碱基对组成。在十年前我们专门研究了它的生命周期,发现为二个阶段:准备 DNA 合成的前期阶段以及 DNA 合成和蛋白合成的后期阶段。因为腺病毒 DNA 链相当长,所以我们认为这样的体系比较复杂,但也不是太难做的体系。这个核酸的顺序分析现在已接近完成,目前至少证明这条核酸左端有 10% 的部分的基因产物与细胞的癌变有关,但现在还没有线索来研究到底它们是如何起作用的。看来它们似乎同某种调控机能有关系,当然现在仍然不清楚这种调控机能如何起作用。要完全了解它仍然必须通过 DNA 重组技术,通过研究有关基因的表达调控找出一些线索来说明这个问题。

另外, DNA 肿瘤病毒 DNA 有一个共同的特点,凡是使细胞癌变的蛋白都同病毒的繁殖有关。此外,还有一种完全不同的体系,那就是 RNA 肿瘤病毒,此病毒是以 RNA 作为遗传的物质基础。Temin 和 Baltimore 在 11 年前发现有一个体系可以把 RNA 反转录成 DNA,因为转录方向刚好同 DNA→RNA 的转录方向相反,所以这类病毒叫做 retrovirus。实际上这类病毒于 1910 年在美国和日本首先在鸡中发现,可是到了 60 年代才在分子水平上对其进行研究,到 70 年代才发现了 LL RNA→DNA 的反转录方向,而通过反转录得到 DNA 分子可以整合到鸡的染色体当中。在研究 RNA 肿瘤病毒致癌特性的过程中,发现了这种病毒的一个突变株,此毒株已丧失了使正常细胞发生癌变的能力。然而这种突变株同其他病毒的突变株不同,虽然失去使细胞癌变的能力,但其本身还能繁殖,所以人们推测,很可能这个病毒意外地得到一个基因,使得它获得繁殖下去的能力。而且人们证明,此失去致癌能力的病毒确实失去一个基因。利用 RNA 序列分析技术,人们从病毒上确实发现有一段分子量为 60,000 道尔顿蛋白质编码的基因称为“Sarc”的蛋白质。这种蛋白质是一种激酶,可以把磷酸加到蛋白质上,即使得蛋白质磷酸化。而后人们进一步证明了在正常鸡的细胞中也存在着 Sarc 基因,所以推测:在正常情况下 Sarc 基因是存在于正常细胞中的,但由于遗传学上的意外事件,这个基因跑到病毒中去,而使其得到过分的表达,产生出好多好多的复制本亲,这种过分地表达引起细胞发生癌变。

关于蛋白质的磷酸化问题,过去人们认为磷酸根是加到蛋白质的丝氨酸及苏氨酸上,所以开始人们也认为 Sarc 也是按上述方式通过使蛋白质中的丝氨酸和苏氨酸磷酸化来起作用,但后来发现,在 Sarc 的作

用下,磷酸是加到酪氨酸上去。这是一种新型的蛋白质磷酸化作用,但目前我们并不清楚在正常的蛋白质中或在大量复制的不正常情况下,磷酸化的酪氨酸到底在什么地方,虽然知道在 Sarc 的作用下,有一个分子量为 38,000 的蛋白质在酪氨酸上进行了磷酸化,但仍然还不清楚这种蛋白质的功能是什么,位置在什么地方。Sarc 通常存在于细胞的质膜上,因为质膜是细胞外膜,所以人们推测 Sarc 可能影响膜的一些必要的功能。现在确实知道在细胞膜内有一个叫做 Vinculon 的蛋白质,其分子量为 130,000 道尔顿,其形状为很长的纤维,有点像管运动的肌纤维,所以人们猜测 Vinculon 也可能同运动有关。

许多癌细胞共同的特点是以异常的速度吸收葡萄糖而放出乳酸,这就是人们早已熟悉的 Warburg 效应,而且吸引了很多的生物化学家去研究这一中间代谢过程。这一效应虽然已为人们知道达 60 年之久,但其分子基础尚不清楚。在 Rous 病毒转化的细胞中 Warburg 现象也存在,人们认为这同激酶有关,可以促进糖酵解作用,影响膜内的 K^+ 、 Na^+ ATPase。美国 Racker 实验室企图证明有一系列的磷酸化过程存在一直到 ATPase,而且将 Sarc 与 ATPase 联系起来,但人们不能重复 Racker 实验室的结果,也许真实的答案可能同他们的说法有相似之处。

* * *

关于人的肿瘤细胞: 当把人的癌变细胞的 DNA 加到正常小鼠细胞中后,可使小鼠细胞变成癌细胞,这样人们认为此变化可能是由于人癌细胞中 DNA 引起的。用纯化的 DNA 使正常细胞发生癌变的这一事实说明癌变细胞中的基因已经改变了,正是由于这种变化使得正常细胞癌变,但并不能由此实验得出很多的结论,只说明癌是一种遗传事件。为进一步证明这一点,我们必须应用基因分离技术、重组 DNA 技术。这些技术只不过是最近几年逐渐发展起来的,所以得到的结果也只是初步的。1972 年至 1973 年 DNA 重组的基本原则弄清楚后,人们对用 DNA 重组技术研究肿瘤有很多顾虑。人们害怕如果将致癌基因弄到细菌中之后,细菌变成致癌,这样细菌的传播可能引起人之间的癌病的传染。正是由于这种恐怖导致在欧美对这类工作进行了严格的控制,规定不准用癌细胞基因、病毒染色体特别是人的染色体 DNA 做此类工作。后来,上述限制逐渐取消,科学家才开始在这方面进行研究。当时做这类实验时的想法比较简单,因为关于 DNA 可引起细菌转化的实验在 1943 年就得到证明,后来人们逐渐地从对细菌的研究转入较高等生物的细胞。七、八年前人们发现当有大量 Ca^{++} 存在下,可以促进 DNA 分子被脊椎动物的细胞摄取。早期的研究人们都是用纯的 DNA,如 SV₄₀ DNA 加到鼠的细胞中,或用腺病毒 DNA 加到适当的细胞中进行转化实

验。现在大家常用 Thymidine Kinase 即 TK 基因作实验。美国哥伦比亚大学医学院的 Wigler 和 Axel 研究了一些方法,他们得到一个基因型为 TK⁻ 的突变细胞,从单疱疹病毒中分离出 TK 基因,在钙离子存在的条件下,将会 TK 基因的 DNA 片段放到 TK⁻ 的细胞中,通过筛选可以得到 TK⁺ 的细胞,而且人们发现当把 DNA 和细胞混合后,细胞可以摄取大量的 DNA。Wigler 和 Axel 的实验体系是首先把 TK 基因同 ϕ X174 DNA 混合,加到大量的培养细胞中,绝大部分的细胞什么也不摄取,有一个或少数几个细胞摄取了 TK 基因,那么同时也就摄取了 ϕ X174 DNA。出乎人们意料之外的是当 DNA 混合物进入细胞后,一段段连接起来,至今还没有人知道会产生这样的现象,但事实确是如此。Wigler 到冷泉港后他想做的就是这类实验。他从一种癌细胞中提取 DNA,然后放入正常细胞中来研究是否使正常的细胞癌变。当然这种思想也不是 Wigler 一个人自己所特有的,MIT 的 Weihberg 和哈佛医学院的 Cooper 也作过类似的实验。他从用化学致癌物造成的鼠癌细胞中抽取 DNA,然后将 DNA 放到正常的鼠细胞中(此鼠细胞株叫做 NIH 3T3,此细胞株比任何株都好得多)结果确实发现正常的扁平细胞变成圆形癌细胞。在这个实验中,我们可以在扁平的细胞中观察到一堆圆形癌变细胞,这是由于一个癌变了的细胞分裂而来的克隆群体。当再从圆形细胞中抽提 DNA 后,再将 DNA 放到正常的细胞中,我们可以得到遗传下去的癌变细胞。用这种方法可以得到人的各种癌细胞株,如肺癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、成神经细胞瘤等 30 个细胞株。人们发现,特别是从前列腺癌得到的 DNA 可以很好地把正常细胞转变为癌细胞,说明这种变化是显性的而不是隐性的,即使在很多正常基因存在下,有一个突变的致癌基因出现,也可以把细胞变成癌细胞。有时候你会发现这种转变是天然发生的,因此假如做了好几代的转化后,必须设法知道一下,原来人的基因是否还在那里?为此我们就要分析一下是否存在中等重复的序列,这种序列在其染色体上有数千个拷贝,人的中等重复的 DNA 序列是可同老鼠的 DNA 相区别的,所以可以把它从转化的细胞中分离出来,因此通过检查这个 DNA 重复序列是否存在,就可以确定此基因是否存在。如果我们对一给定的 DNA 用限制性内切酶消化,作出它的限制性图谱,经凝胶电泳把 DNA 片段按大小分开,再用一个用放射性标记的基因探针同其杂交,通过放射自显影我们就可以辨别出在给定 DNA 上是否存在特定的基因。用这种方法我们就可以从人的癌细胞 DNA 转化的鼠细胞中确认是否含有人的致癌基因。后来人们发现,来源于结肠癌的 DNA 同肺癌 DNA 是同样的;有人反过来做,他们发现一个重要的结果,如果一个肺癌基因过分表达了,也就是细胞

癌变了,那么它同结肠癌的致癌基因也一样。随后有人甚至将几个不相关的独立的肺癌基因拿来分析也同结肠癌一样,但人的前列腺癌 DNA 的重复序列就同其不一样。MIT 的 Weihberg 从前列腺癌细胞中得到 DNA,而在冷泉港的 Wigler 完全用另外一种来源的 DNA,二者都鉴定了各自的 DNA 的重复序列,结果发现它们是一样的,这是一个令人鼓舞的结果,这预示着各种不同癌的生物化学基础可能是一样的。

人们把人正常的 DNA 作成基因库(Library)即用限制性内切酶将 DNA 切后,用 λ 噬菌体进行包装(Package),如有 10^4 (注:此数可能是最低的值,一般应在 $>10^5$) 噬菌体就可以把所有的基因都装入噬菌体中,形成所谓的基因库。然后,对每一个噬菌体进行检测,来看那个噬菌体的 DNA 能使细胞发生癌变,这样就可以筛选出所要的癌基因,这个方法要花费很多的时间,而 Weihberg 就是用的这种方法。Wigler 用了另一种方法,首先将人癌细胞 DNA 同细菌的 Sup tRNA 基因混合,当癌基因进入细胞之后,由于意外的事件同 Sup tRNA 基因连在一起,然后连续地作几次转化后再把 DNA 分离出来。然后你选择一个 λ 噬菌体的突变株,此 λ 株只有当存在 Sup tRNA 基因时才能继续繁殖,这是因为在这种 λ DNA 上有一个 nonsense 即无意义密码,只有这个密码为 Sup tRNA 基因所“压制”后,此 λ 噬菌体才能繁殖存活。如果我们有了 Sup tRNA 基因和人的癌基因,通过装配得到一个 λ 噬菌体颗粒,如果 Sup tRNA 基因在此 λ DNA 上,那么与此相连的人的致癌基因也组入 λ DNA 中,最后我们就可以检测,是否把此 λ DNA 转入一个正常细胞后,可以引起其癌变,结果 Wigler 得到成功的结果。开始,我们有了一个带人的致癌基因的噬菌体,然后把此基因转到一个质粒上(plasmid)将人的癌基因作克隆,我们就可以得到我们所要的致癌基因。我们可以通过下面的办法来分析这个基因的产物:从前列腺癌细胞中分离出 mRNA,使其同变了性的质粒上的癌基因杂交,那么同此基因结合的 mRNA 就是编码此基因产物的 mRNA,然后把 mRNA 分离下来,在无细胞翻译体系中进行翻译,就可以得到癌基因的产物。在三周前第一次完成了这一实验,这个基因似乎是为分子量为 25,000 道尔顿的蛋白质编码的,此蛋白占细胞内蛋白的千分之一。这就是我们目前的状况。即我们已经分离了致癌基因和知道了它的基因产物的大小,但对其生物化学功能并不知道。当然如果我们将分离出来,能得到一定的数量、得到其单克隆的抗体,我们就可以知道它在细胞中的位置和是否是同蛋白质的酪氨酸磷酸化有关的一个激酶。我们对从这个实验得到的结论感到兴奋。在结肠癌和肺癌中共同的基因是一个非常长的基因,至少有 50,000 个碱基对,由于其太大,所以不能将其包装入一个 λ 噬菌体,因此推测它的

蛋白产物可能也是比较大的,估计六个月后可以得到比较肯定之结果。

从前列腺癌中得到的信使核糖核酸好像在 HeLa 细胞中也有, HeLa 原来也是人的癌细胞,但从 HeLa 细胞提取的 DNA 不能使别的细胞癌变,因此,这可能是一种不同类型的遗传学的变化,可能是 HeLa 细胞的基因已经发生改变,原来在结肠过表达的基因在 HeLa 细胞中可能也有过份表达。现在似乎人们已开

始了解了一些关于人肿瘤细胞的基本生物化学性质,因此我们应用基因重组技术可以研究人肿瘤细胞、找出致癌基因,这样可对其生物化学的功能有个足够的了解,以至于可以为化疗提供一些线索。当然在科学上我们很希望了解人的癌细胞中的致癌基因同其他物种的癌基因是否相同(如同鸟类的,比如 Sarc 是否相同)。我们希望在几年之内有所突破。

(薛国忠 整理)

科技消息

单克隆抗体在神经生物学研究中的应用

蚂蟥神经细胞单克隆抗体的建立是美国冷泉港实验室 1980 年度取得重大进展的研究项目之一。为研究感觉、记忆和学习现象中神经细胞如何在神经网络内相互联系的问题,冷泉港实验室选用了药用蚂蟥这样一个比较简单的模型体系作为研究对象。

蚂蟥神经束有 12,000 个神经细胞,组成 30 个结节状分段的神经节,每个神经节有两侧对称性,由大约 400 个细胞在两侧组成对等的、大小相同的两组。所有的神经节并不完全相同,其中位于头部和尾部的神经节比较复杂,具有类似于脑的功能;第 5 和第 6 两个神经节有特化的细胞控制蚂蟥的性行为。现在对其它几种形态不同的细胞的作用,以及若干联结着功能相关的细胞的突触位置也有了一些了解,但是还完全缺乏关于胚胎发育过程中神经细胞之间如何相互联系的一般概念,以及蚂蟥产生复杂行为反应时许多相互联系的神经网络方面的详细知识。除去少数细胞外,大多数神经细胞外观大致相似,在不久以前甚至要搞清具

体研究的是哪个特化细胞也无能为力,要收集神经细胞之间相互联络的信息更是不可思议。

为探讨更好的神经细胞标记方法,引用了单克隆抗体技术。把蚂蟥神经束注射给小鼠,待到小鼠开始生产神经细胞抗体以后,把产生抗体的脾脏细胞与小鼠黑色素瘤细胞融合,得到大量杂交瘤细胞株。现已鉴定出 40 个不同杂交瘤,各产生一种可与各个神经节中比较特化的细胞相结合的单克隆抗体。

尚待搞清的是这些抗体究竟对抗哪些神经细胞抗原。目前正用免疫电泳法鉴定可与不同单克隆抗体结合的细胞组份及其在细胞中的位置。希望能通过这些研究提供神经细胞如何相互联系的信息,并利用单克隆抗体技术作为鉴定决定神经细胞高度特异性的分子。目前单克隆抗体在神经生物学研究中的应用刚刚起步,有待进一步开拓。

(摘自美国冷泉港实验室 1980 年年度报告(情))

XFG-01 型显微分光光度计及 X 射线充氩多丝正比室魏森堡氏衍射仪通过鉴定

由科学院生物物理所学术委员会主持,于 1981 年 11 月 9 日在京召开了由生物物理所七室及六室研制的两台仪器鉴定会。会议前,由各测试小组按仪器鉴定大纲进行了测试。会议期间,代表们对仪器做了审查,并结合使用单位的报告作出鉴定。

XFG-10 型显微分光光度计是我国第一台成型的显微分光光度计,为生物学、医学及农学研究提供了定量显微分析工具。该仪器的杂散光和闪光误差、稳定度、光栏面积与透射率的线性关系等主要指标达到国际上同类(如西德 Lite, MPV-2 型 Opton, SMP-05 型)的水平。该仪器结构合理,外型美观,对生物样品的可见光吸收测量结果正确、性能稳定。与会代表认为该仪器技术资料基本齐全,建议移交工厂生产,以满足急

需。

X 射线充氩多丝正比室魏森堡氏衍射仪,是把二维多丝正比室的延迟线读出法与魏森堡氏照相机原理相结合,组成一个完整系统,加上使用计算机,使衍射器有数据处理和分析能力。这是国内首次将多丝正比室成功地应用于晶体结构分析领域内。研制过程中原子能所协同做了许多工作。

该仪器主要优点是:1)效率高,速度快,比照相法提高 10—30 倍,可大大缩短研究周期;2)操作简便,晶体调动容易;3)借助于双层幕图象显示设备,可以直观适时地了解晶体衍射情况。与会代表希望通过改进,进一步扩大此仪器使用范围。

(生物物理所 科技处)