

DNA 的 化 学 合 成

戚志红 陈常庆

(中国科学院上海生物化学研究所)

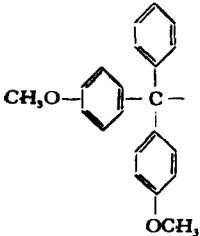
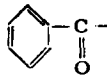
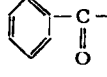
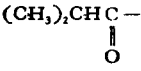
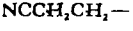
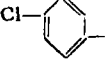
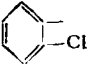

1955年,英国剑桥大学 Todd 实验室在经过十年努力后,首次合成了具有天然 DNA 3'→5' 磷酸二酯键结构的 TpT 和 pTpT,从而拉开了人工合成核酸的序幕。自那时以来三十年里, DNA 化学合成已经在生物化学和分子生物学的研究中发挥了极其重要的作用。与此同时,合成技术本身也得到很大提高。目前, DNA 化学合成不仅已常规化,而且有的还实现了自动化。本文拟对其进展作一粗浅的小结和介绍。

一、DNA 的液相合成

DNA 人工合成的关键是通过 3'→5' 磷酸二酯键的形成实现核苷酸的定向连接。合成中间体可以是磷酸二酯,磷酸三酯或者亚磷酸三酯。迄今为止曾采用过的三种反应方式即是以分别生成上述三种核苷间磷酸键为标志的磷酸二酯法、磷酸三酯法和亚磷酸三酯法。

作为合成的出发原料的脱氧核苷或核苷酸都是多官能团的化合物。所以为了确保形成具

表 1 几种常用保护基的结构和性质

结 构	缩 写	保护位置	脱 除 条 件
	Dmt	5'OH	80% 醋酸; 2% 苯磺酸的氯仿/甲醇(7:3)溶液; ZnBr ₂ /CH ₃ NO ₂ ; (C ₂ H ₅) ₂ AlCl 或 (iBu) ₂ AlCl; 2% 三氯乙酸的二氯甲烷溶液
	Bz	3'OH	OH ⁻ —或氨解
	bz	A 和 C 的氨基	氨解
	ib	G 的氨基	氨解
	Ce	末端磷酸和核苷间磷酸	OH ⁻ ; 氨解或三乙胺/吡啶
	Pcp	核苷间磷酸	氨解; 2-硝基苯甲醛肟四甲基胍或 2-吡啶甲醛肟四甲基胍
	Ocp		
	Me	核苷间磷酸	硫代苯酚三乙胺

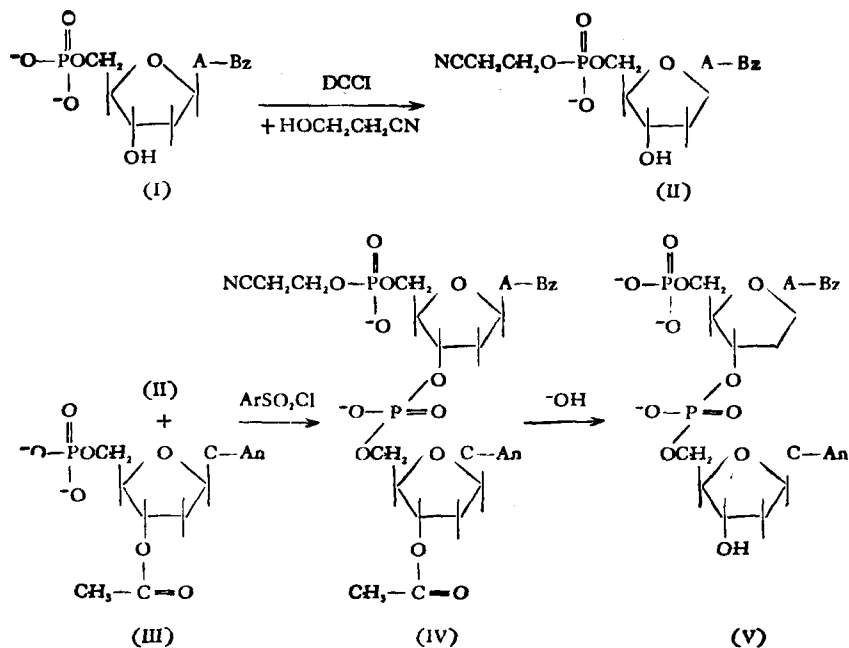


图 1 磷酸二酯法合成脱氧二核苷二磷酸

有特定顺序的3'→5'磷酸二酯键,一般都先将不需要反应的基团暂时保护起来,下一轮反应时再有选择地脱除某些官能团上的保护基(表1)。

磷酸二酯法是美国 Khorana 实验室于 50 年代中到 70 年代建立和发展的^[1]。此法一般用过量的 5' 磷酸单酯(又称 5' 磷酸组分)与 3' 羟基组分进行 5'→3' 缩合(图 1)。磷酸单酯比较容易被活化,因此除了用活性很强的芳磺酰氯(ArSO₂Cl)作为缩合剂外,使用活性较低的二环己基碳二亚胺(DCCI)缩合产率也较好。二酯法在 DNA 化学合成的前期曾立下汗马功劳。例如 Khorana 和 Jacob 等人在破译遗传密码的工作中,后来 Khorana 实验室在酵母丙氨酸 tRNA 结构基因和大肠杆菌酪氨酸校正 tRNA 前体基因的合成中都采用了此法。用此法还合成过半乳糖苷酶操纵基因、Lambda 操纵基因等。用二酯法合成最长曾达到二十脱氧核苷酸。但此法合成的中间产物具有一个未被保护的磷酸 OH 基,可以发生多种副反应,使产率随链长的增加急剧下降,即使加入大大过量的磷酸组分,也只能得到部分改善。另一方面,由于二酯法合成中带保护基的中间产物一般只能用 DEAE-纤维素或 DEAE-葡聚糖凝胶分离纯化,

其操作及产物鉴定都是相当麻烦和费时的。

为避免上述缺点,从 60 年代末, Letsinger^[2]、Reese^[3]、Itakura^[4,5] 和 Narang^[4,6] 等相继对早期的磷酸三酯法^[7]重新进行研究,从而开创了新的改良磷酸三酯法。此法除吸取磷酸二酯法中较好的羟基和氨基保护基外,主要作了以下三方面的改进:(1)采用了易于导入和较方便脱除的邻-或对-氯苯基来保护核苷间磷酸。(2)找到了一系列能活化磷酸二酯且副反应较少的高效缩合剂。其中活性最强的是 2,4,6-三甲苯基磺酰硝基三唑(MSNT)和 2,4,6-三异丙基苯磺酰四唑(TPSTe)。用它们缩合,反应只需半小时左右,并且一般只要求很小过量的磷酸组分就能得到很好的产率。(3)核苷间磷酸被保护以后极性下降,使产物可以很方便地用氯仿/NaHCO₃ 水溶液萃取分离,并用快速的硅胶短柱层析来分离纯化,大大提高了合成速度。

同二酯法相似,液相磷酸三酯法一般也都采取图 2 所示的缩合方式^[8]。即首先制备全保护单体(化合物 3),后者若用三乙胺/吡啶选择性脱去磷酸上的氰乙基可得到进一步缩合需要的磷酸组分,而用酸选择性脱除 5' 羟基上的

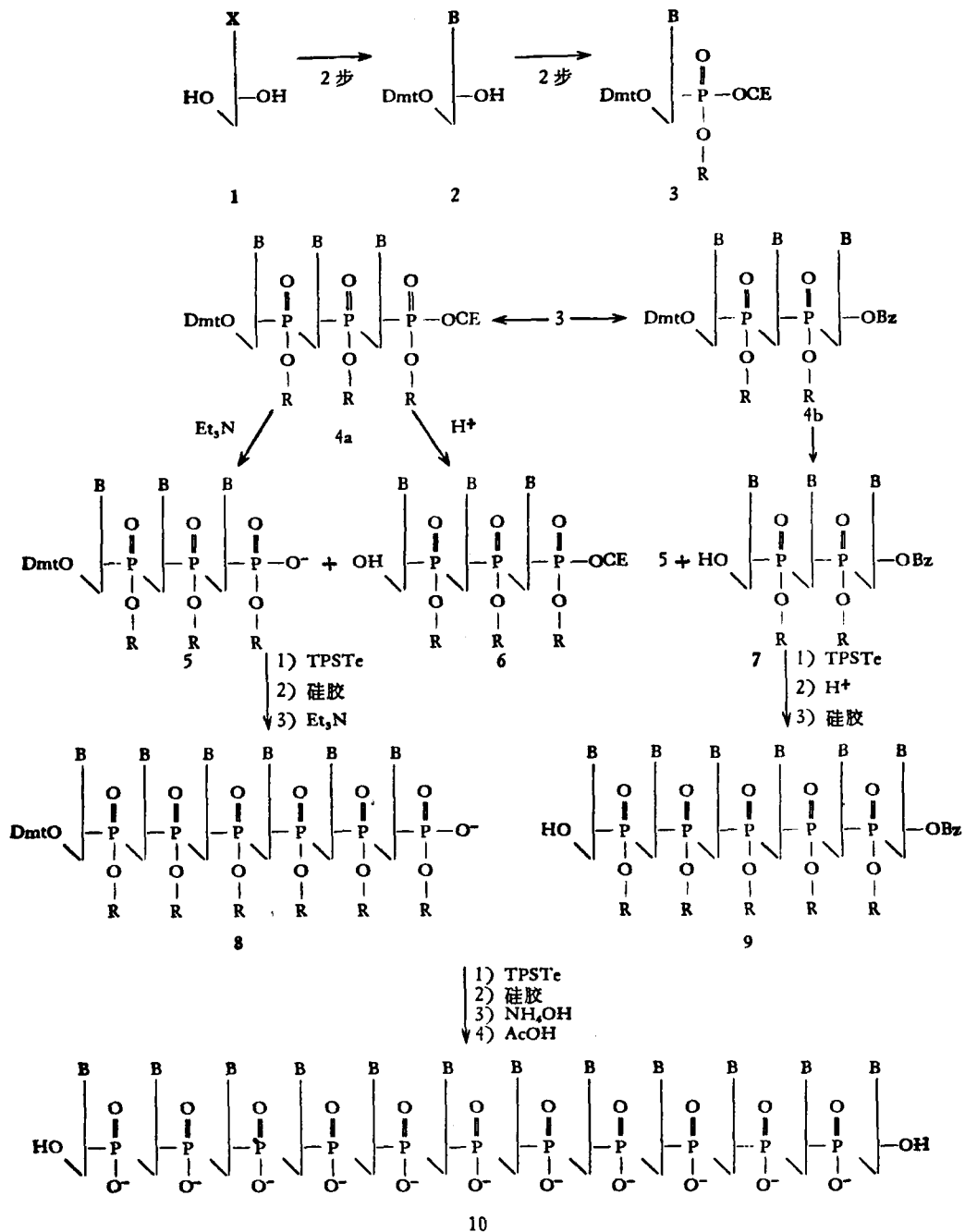
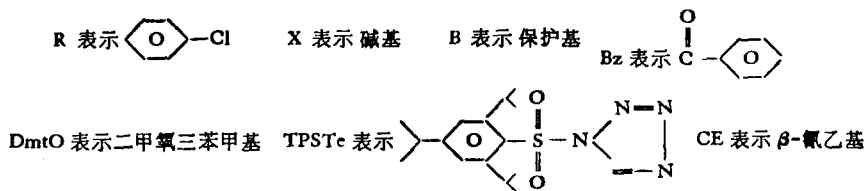


图 2 磷酸三酯法合成脱氧核苷酸



Dmt 则能得到羟基组分。经几次缩合后可得到 4a 和 4b, 最后再通过片段缩合而达到所需长度

的片段。

我国科学工作者在全合成脑啡肽基因的过

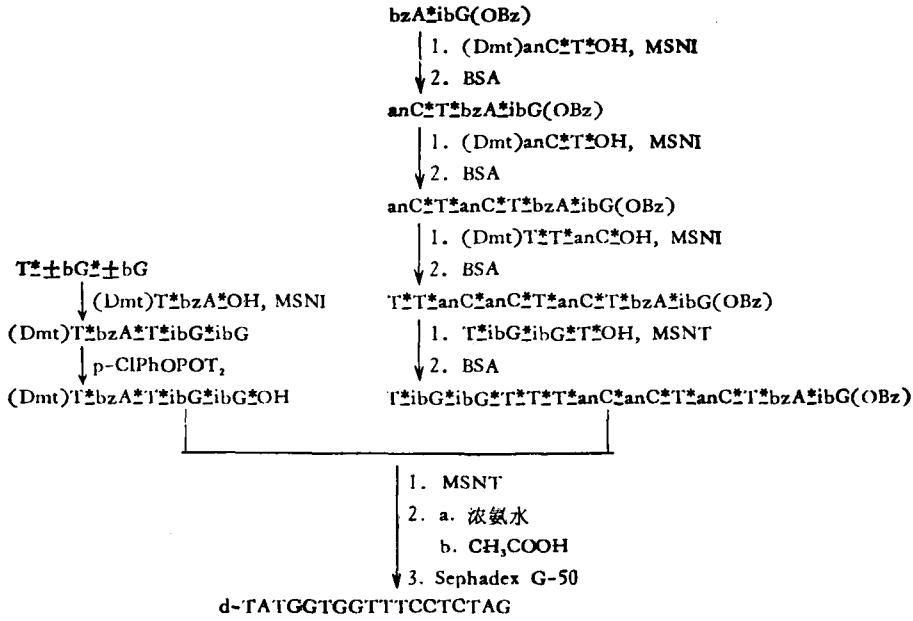
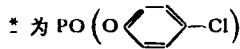


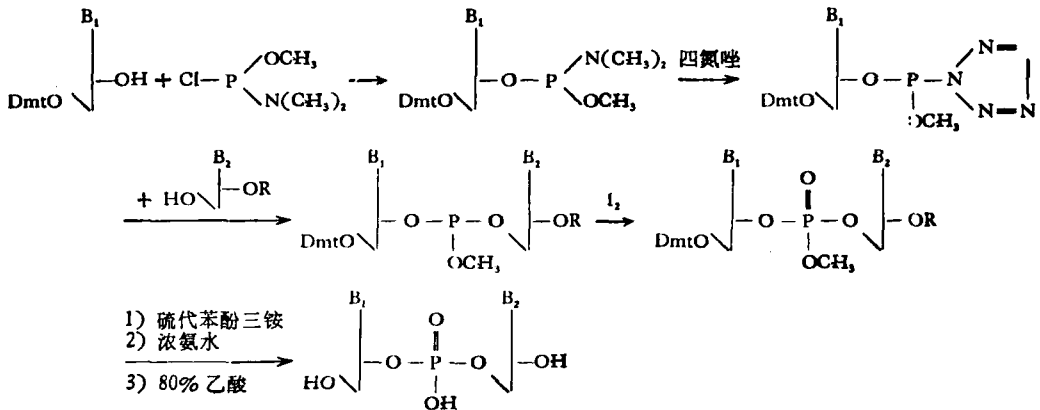
图3 亮-脑啡肽基因中脱氧十八核苷酸的合成



程中,在 Reese 等人工作的基础上,发展了片段后磷酸化方法^[9]。即磷酸组分不是来自预先保护的 3' 末端磷酸,而是先合成二聚至五聚带有游离 3' 羟基的各个保护寡核苷酸短片段,然后再进行 3' 磷酸化得到磷酸组分。图 3 是用此法合成的亮-脑啡肽基因中的十八脱氧核苷酸。

改进后的磷酸三酯法具有比二酯法副反应少,连接产率高、反应快,分离纯化简便、操作周期较短等优点。例如 Itakura 等仅用几个月即合成了人胰岛素 A 链和 B 链基因^[10],三酯法的优点使它亦能适宜于固相合成,从而为 DNA 合成的自动化创造了条件。

在 70 年代中期, Letsinger^[11] 和 Caruthers^[12] 等又发展起一种新的亚磷酸三酯法,其反应步骤是先使用 3' 羟基游离的保护脱氧核苷同 $\text{Cl}-\text{P} \begin{array}{l} \diagup \text{OCH}_3 \\ \diagdown \text{NR}_2 \end{array}$ (R 为甲基、异丙基或吗福啉基等) 反应生成稳定的亚磷酸二烷胺中间体,缩合时用四氮唑转化为活性中间体,再与羟基组分连接得到亚磷酸三酯产物,然后用碘氧化使不稳定的亚磷酸三酯成为稳定的磷酸三酯产物。核苷间磷酸基上的甲基可用硫代苯酚的三乙铵盐在二氧六圆溶液中选择性地脱除。反应式如下:在每次缩合以后立即进行氧化的效果较好,如



最后再来集中氧化则副产物较多，而且不易纯化。

亚磷酸三酯法的最突出优点是(1)产率高，几乎可以接近定量。(2)速度快、缩合和氧化两步总共 10 分钟左右，这些正是固相合成所需要的，所以此法很快就被发展成固相亚磷酸三酯法，而真正用于液相合成的例子倒并不多。

二、DNA 的固相合成

分子生物学的蓬勃发展，尤其是 70 年代中期 DNA 重组技术的建立，对于 DNA 化学合成提出了新的要求，而液相合成方法相对来说太费力、耗时，且难掌握，所以，发展一种简便、快速、通用、易操作的新方法，就成为核酸化学家面临的任务。

Merrifield 建立的多肽固相合成法^[13-15]自然引起了核酸化学家们的兴趣，事实上，从 70 年代初，就有不少实验室尝试将固相合成法用到

核酸合成中去^[16]。但经近 10 年的探索，进展有限，主要原因是当时依据的二酯法产率很低，副反应严重，并且副产物无法分离。直到近年，由于改良磷酸三酯法和亚磷酸三酯法的出现，DNA 固相合成方法的研究才迅速进展，并很快取得了突破。

固相合成是将要合成片段的末端核苷或核苷酸首先共价连接到一种不溶性的高聚物载体上，然后由此开始，按照所要求的碱基顺序逐步地延伸寡核苷酸链，每轮延伸可以接长一个核苷酸或一个二聚至三聚的小片段，反应后溶液中过量的原料、试剂或分解产物通过洗涤和过滤步骤除去，为了保证最终产物的纯度，往往在每步缩合后用合适试剂(如 AC_2O 、 $(C_2H_5O)_2POCl$ 及苯异硫脲等)将结合在固相载体上的未反应的羟基封闭。当寡核苷酸链延伸达到预期长度后，将它从固相载体上切下，脱去保护基，再经纯化，得到最终产物(图 4，图 5)。

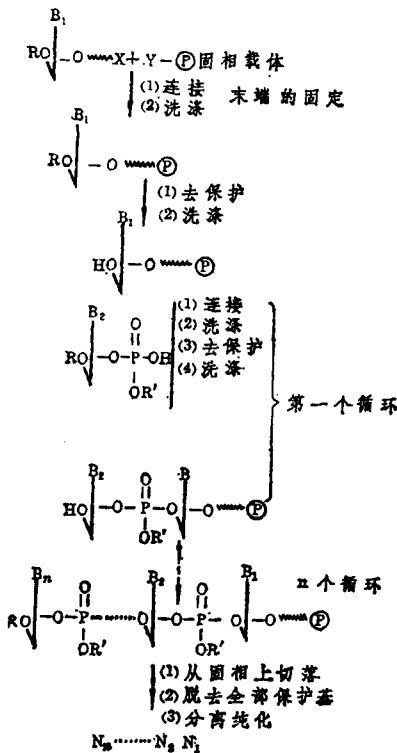


图 4 用固相磷酸三酯法合成寡核苷酸

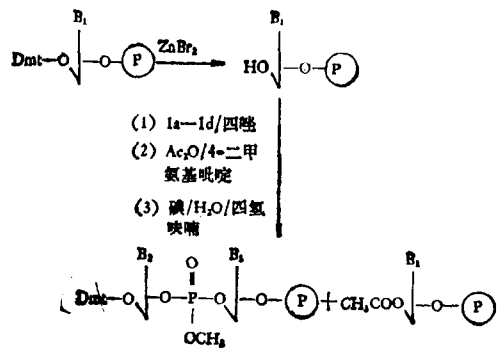
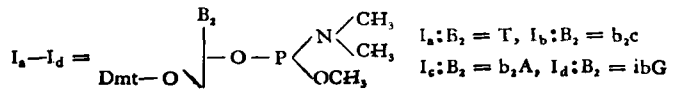


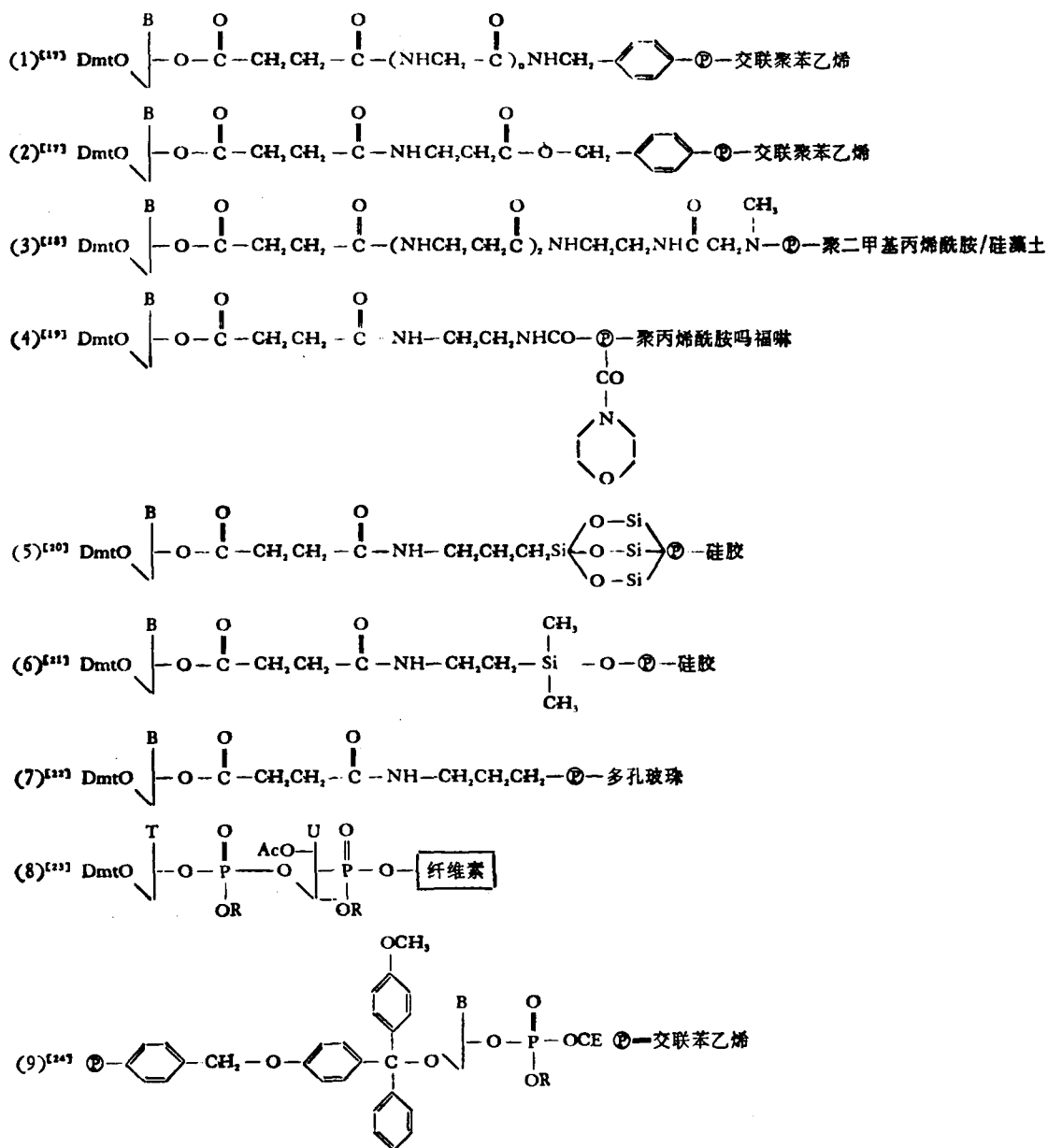
图 5 用固相亚磷酸三酯法合成二核苷酸

Ⓢ = 硅胶-(CH_2)₃-NHCO-CH₂CH₂-CO-



固相合成中的载体选择有以下几条选择标准：(1) 具有经受得起合成中各反应条件的稳定结构。如是可溶胀的有网状结构的高分子载体，其网格空间要足够容纳不断增长的寡核苷酸链，溶剂和反应物须能在载体中很快地渗透和扩散。如是不溶胀的“实心球”高分子载体，则应有较大的固相表面积，从而有满意的合成容量。(2) 有合适的固定核苷酸链的官能团。而且一般认为在“停靠”官能团与固相载体之间

要有一定长度的间隔区(Spacer)，使连接反应时空间阻碍较小；但最近也有不留间隔区的。(3) 树脂不吸附合成的中间产物。近几年较成功地应用的固相载体有交联的聚苯乙烯(1% 或 2% 交联度)，聚二甲基丙烯酰胺-硅藻土、聚丙烯酰吗福啉、硅胶等，也有少数用纤维素和玻璃珠为载体的。一般是将目的寡核苷酸片段的 3' 末端的第一个核苷固定在载体上，主要的固定形式有以下几种：



从(1)到(8)，都是用酸或 ZnBr_2 脱掉 Dmt 保护基后，作为羟基组分向 5' 端延伸寡核

苷酸链,而(9)则要用二异丙胺/吡啶脱去磷酸上的氰乙基。

最近, Frank 等人^[25]成功地用圆盘形纤维素滤纸片作为“可分割的固相载体”(Segmental solid support),此种载体能很方便地(例如用铅笔在滤纸片上编号)把合成不同寡核苷酸片段的纤维素纸片区别开来,所以当需要延长某一种核苷酸时,可以把这些纤维素纸片放在同一个反应器中同时完成缩合反应。也就是说,可以同时几个乃至上百个脱氧寡核苷酸片段的合成。

固相法比液相法有以下优点(1)合成产物始终连接在固相载体上,过量的反应物和溶液中的副产物用过滤、洗涤就能去除,省略了液相合成中每轮缩合后的中间分离步骤,损失减少,合成周期缩短。(2)可以用多倍过量的溶液中组分来提高产率和缩短时间,又不致影响产物的分离,并且在固相磷酸三酯法中过量磷酸组分经一定的萃取、洗涤、沉淀还可回收使用。(3)合成的量可小至1—2 μ mole。这是液相合成所无法达到的。(4)基本操作为缩合、洗涤、过滤,十分简便,非专搞合成的也不难掌握。更由于每一缩合循环顺序都相同,这就为合成的自动化铺平了道路。正因为固相法的优越性,它已成为 DNA 合成的主要方法。据报道在硅胶载体上用亚磷酸三酯法来合成 DNA 片段,最长的已达到80聚T,一般也能达到20—30聚长度,而合成一个二十脱氧核苷酸长度的片段通常只需一、二天。在很多实验室中, DNA 化学合成已成为常规操作。各种合成反应装置以及自动合成仪器也不断被试制出,成为商品。

三、合成产物的分离纯化

对于用液相三酯法所得到的全保护产物,先用少量吡啶溶解后用浓氨水(37 $^{\circ}$ C, 16—24小时;再50 $^{\circ}$ C, 6小时)脱去核苷间磷酸上邻-或对-氯苯基和碱基上的酰基保护基,然后再用80%醋酸(室温半小时)脱掉5'羟基上的保护基。固相磷酸三酯法合成的产物则往往首先用邻-硝基苯甲醛肟或2-吡啶甲醛肟的四甲基胍

盐溶液(二氧六圆-水, 9:1 或 1:1 v/v)处理24小时,这样在脱除磷酸保护基的同时寡核苷酸与固相载体之间的酯键也被水解断裂,然后依次脱去N-酰基和5'-Dmt基。对于用固相亚磷酸三酯法得到的产物,则在脱N-酰基和Dmt基之前预先用硫代苯酚三乙胺的二氧六圆溶液(室温45—90分钟)去掉核苷间磷酸上的甲基。

由于最后产物总带有副产物,必须经过适当分离。分离纯化的方法大致有以下几种,可选择一种或多种方法配合使用。

1. DEAE-纤维素或 DEAE-葡聚糖凝胶柱层析^[1, 9a, 24, 26, 27]。此法根据离子交换原理按分子所携带的电荷量进行分离,早期用二酯法时曾大量采用。对于十核苷酸左右的片段,一般分离效果较好。图6是用 DEAE-葡聚糖凝胶 A-25 纯化13聚体的柱层析图谱^[24]。

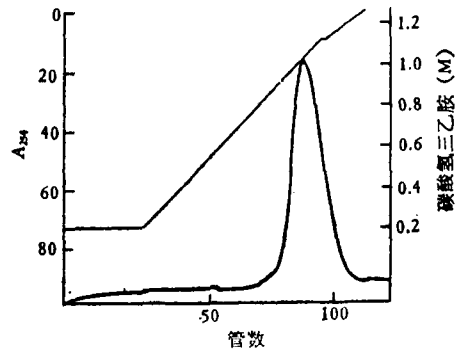


图6 d-(CTATTCCAGAAGT)的 DEAE-葡聚糖凝胶柱层析

2. 葡聚糖凝胶 G-50 或 G-75 柱层析 适用于分离较大的片段或双链 DNA。由于这种层析依据分子筛原理,所以最先洗脱下来的组分一般即是所需要的合成产物,此法负载量较大。可用于较大的制备分离,但也因为凝胶过滤的分辨率不高,一般只用于粗分离。

3. 聚次乙基胺 (PEI) 薄板层析 对于十几核苷酸左右的合成片段亦有人用 PEI 薄板层析(LiCl—7M 脲素)分离纯化^[28],但此法应用并不十分普遍。

4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) PAGE 的高分辨力已经在 DNA 顺序测定的应用中得到充分的显示,它甚至可将长度仅差一个核苷

酸的一系列片段分开。对于分离合成脱氧寡核苷酸片段，PAGE 也是一种强有力的手段。一般来说胶的浓度应随所分离片段的长度而降低。对于化学合成的二十聚左右或二十聚以下的片段通常用 20% 的聚丙烯酰胺凝胶^[20,23]。此外 PAGE 还可以在一块胶板上同时分离几个样品(图 7)。

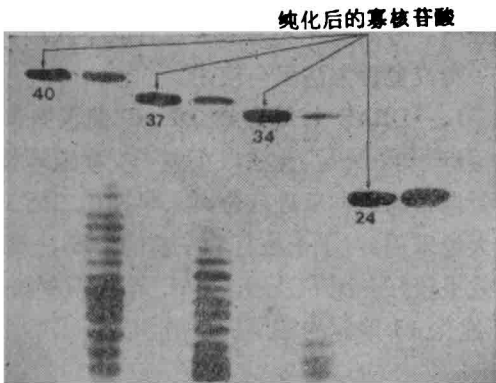


图 7 合成脱氧寡核苷酸片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱 (24, 34, 37, 40 分别表示该片段的长度,有数字的带为纯化后样品,与之相邻的为粗产物)

5. 高效液相层析 (HPLC) 分离速度快、效果好,是目前广泛采用的一种纯化方法。其中用得最多的是用十八烷基硅胶(简称 ODS 或 C_{18})作为固定相的反相柱层析^[31]以及阴离子交换柱层析 (permaphase AAX)^[17,19,23],有时将两者配合使用^[21]。HPLC 不仅可用于分离磷酸二酯法合成中带有保护基的中间产物(图 8)^[29],也可纯化脱去保护基后的片段(图 9)。

由于 Dmt 基对 C_{18} 柱有较大的亲和力,因

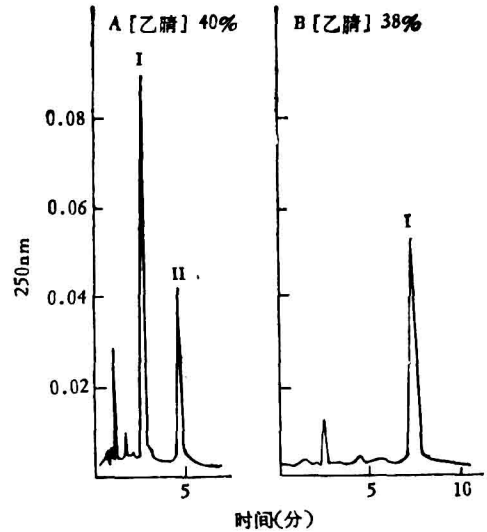


图 8 用 HPLC(C_{18}) 分离 $d[(Dmt)ibG-ibG](I)$ 和 $d[(Dmt)ibG-ibG(Ac)](II)$ 洗脱溶液分别为含 40%(A)和 38%(B)乙腈的 0.1M 乙酸铵水溶液

此,一种办法是在脱去核苷间磷酸以及碱基和 3' 羟基上的保护基后先用反相 HPLC 分离,这时只有最后一轮缩合所得的产物带有 Dmt,故很容易将带有 Dmt 基的产物与其它不带 Dmt 基的副产物分开,然后再脱去 Dmt 基进行第二次 HPLC(反相或离子交换)(图 10),或用其他手段纯化,得到纯产品。

结 语

不同学科和同一学科的不同领域的发展总是互相渗透、互相促进的。DNA 化学合成的巨大进展正在生物化学和分子生物学的许多领域

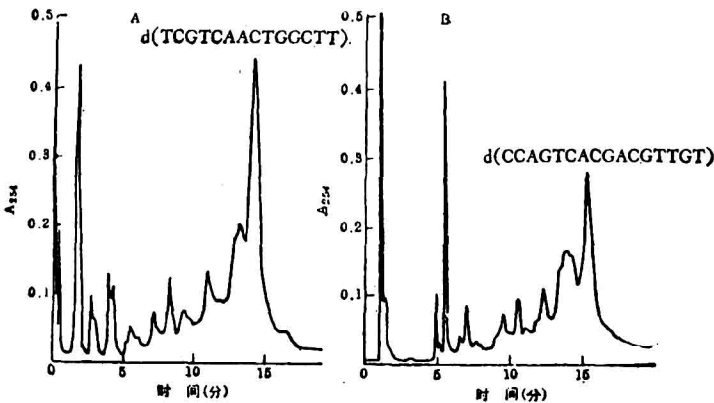


图 9 合成的脱氧寡核苷酸的 HPLC (AAX) 纯化

参 考 文 献

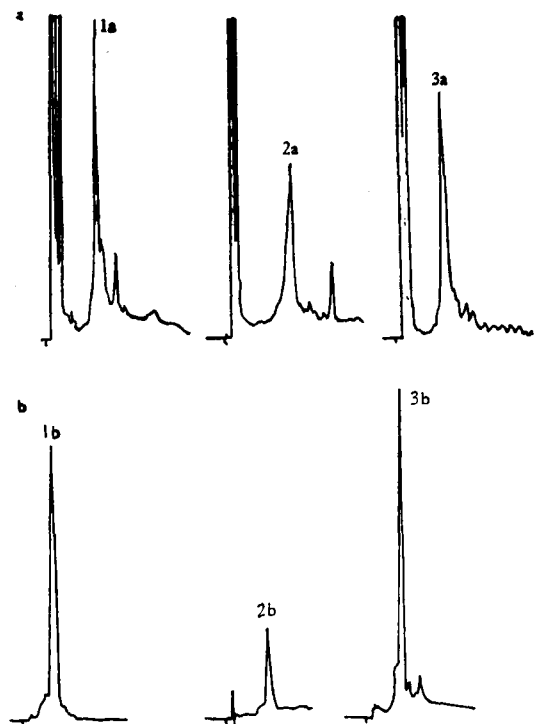


图 10 合成的脱氧寡核苷酸的两次 HPLC(C_{18}) 纯化
 1a, 2a, 3a 分别为 d-(Dmt) ACATCTGAG, d-(Dmt) TGTAATGTACC 和 d-(Dmt)CTTTGAAATGAC;
 1b, 2b, 3b 分别为 d-ACATCTGAG, d-TGTAATGTACC d-CTTTGAAATGAC, 图 10a 和图 10b 的洗脱液分别为含有 0.1M 乙酸三乙铵的 20—30% 和 10—15% 乙腈梯度 (1ml/分)

中发挥越来越广泛的作用。化学合成的具有特定碱基顺序的寡聚 DNA 片段,一方面可以通过与酶促合成相结合的途径连接成基因。另一方面,可直接作为引物、探针及产生新的限制性内切酶位点的接头片段而广泛用于 DNA 重组、基因工程、基因的单碱基突变、基因改造、DNA 顺序分析和构建新的 DNA 运载体等方面。此外,利用合成的特定顺序的 DNA 片段,还可研究 DNA 的溶液构象、晶体结构,以及 DNA 和蛋白质的相互作用等等。事实上,合成脱氧寡核苷酸片段的应用领域的广度尚难估量。可喜的是新的固相合成方法以及由此而实现的 DNA 合成的自动化已为满足对脱氧寡核苷酸的需求奠定了稳固的基础。

- [1] a) Khorana, H. G. et al.: *J. Mol. Biol.*, **72**, 209, 1972.
 b) Khorana, H. G.: *Science*, **203**, 614, 1979; *J. Biol. Chem.*, **254**, 5754, 1979.
 c) Brown, E. L. et al.: *Methods in Enzymology*, **68**, 109, 1979.
- [2] Letsinger, R. L. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3350, 3356, 3360, 1969.
- [3] Reese, C. B. et al.: *Tetrahedron Lett.*, **2727**, 1978; *Tetrahedron.*, **34**, 3143, 1978.
- [4] Itakura, K. et al.: *Can. J. Chem.*, **51**, 3649, 1973.
- [5] Itakura, K. et al.: *Science*, **198**, 1056, 1977.
- [6] Stawinski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 353, 1977.
- [7] Michelson, A. M. and A. R. Todd: *J. Chem. Soc.*, 2632, 1955.
- [8] Itakura, K. and A. D. Riggs: *Science*, **209**, 1401, 1980.
- [9] a) 汤锦炎、陈常庆、王德宝:《生物化学与生物物理学报》, **14**, 605, 1982。
 b) 汤锦炎等:《中国科学》(B辑), 1105, 1983。
- [10] Crea, R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 5765, 1978.
- [11] Letsinger, R. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 3655, 1976.
- [12] Caruthers, M. H.: *Tetrahedron Lett.*, **22**, 1859, 1981.
- [13] Stewart, J. M. and J. D. Yong: "Solid Phase Peptide Synthesis", Frecman, San Francisco, California, 1969.
- [14] Merrifield, R. B.: in "The Chemistry of Polypeptides" (P. G. Katsoyannis, ed.), Plenum, New York, 1973, pp. 336—361.
- [15] Birr, C.: in "Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry" (K. Hafner, C. W. Rees et al. eds), Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin and New York, 1978.
- [16] Amarnath, V. and A. D. Broom: *Chem. Rev.*, **77**, 183, 1977.
- [17] Miyoshi, K. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5507, 1980.
- [18] a) Gait, M. T. and R. C. Sheppard: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1135, 1977.
 b) ———: *ibid.*, **4**, 4391, 1977.
 c) ———: *ibid.*, **6**, 1259, 1977.
- [19] a) Narang, S. A. et al.: *Tetrahedron Lett.*, **1819**,

- 1977.
- b) Miyoshi, M. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5473, 1980.
- [20] a) Caruthers, M. H. et al.: in "Genetic Engineering" (ed. by Setlow and Hollaender), Vol. 4, pp 1—17, Plenum Publishing Corporation, 1982.
- b) Alvarado-Urbina, G. et al.: *Science*, **214**, 279, 1981.
- [21] Chow, P. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2807, 1981.
- [22] Cramer, F. and H. Köster: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **7**, 473, 1968.
- [23] Crea, R. and Horn, T.: *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2331, 1980.
- [24] Chattopadhyaya, J. B. and Reese, C. B.: *ibid.*, **8**, 2039, 1980.
- [25] Frank, F. et al.: *ibid.*, **11**, 4365, 1983.
- [26] 汤锦炎等: 《生物化学与生物物理学报》, **13**, 307, 1981.
- [27] 中国科学院上海细胞生物学研究所三室核酸研究组: 《生物化学与生物物理学报》, **10**, 203, 217, 235, 1978.
- [28] a) Stawinski, J. et al.: *Nucleic Acids Res.*, **4**, 353, 1977.
- b) Narang, S. A. et al.: *Methods in Enzymology*, **68**, 90, 1979.
- [29] Fritz, H. J. et al.: *Biochemistry*, **17**, 1257, 1978.

[本文于1983年11月21日收到]

蛋白激酶对细胞的正常生长分化及恶性转化的调控

施 产 甫

(南京铁道医学院科研所)

蛋白质转录后的磷酸化/去磷酸化可逆修饰,是调节控制蛋白质的酶学活性或生物学功能的重要途径。使蛋白质磷酸化的酶称为磷酸基转移酶或蛋白激酶。首先发现的是糖元磷酸化酶^[1]。目前已知用磷酸化/去磷酸化方式调节酶活性的酶类达三十多个。蛋白激酶还能催化许多非酶蛋白的磷酸化。多数蛋白激酶的活性是通过与相应特异的调节因子相互作用控制的。这些特异的调节因子常是细胞外信号的接续信使。据此可将蛋白激酶分为如下几类^[2,3]:

1. 依赖 cAMP 的; 2. 依赖 cGMP 的; 3. 依赖钙调节素的; 4. 依赖磷脂的; 5. 非特异性的或不依赖信使的。

以前认为,蛋白激酶仅催化靶蛋白分子上丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化。Eckhart 等^[4]首先发现了多瘤病毒 60K (即分子量 6 万的蛋白质)大 T 抗原上酪氨酸残基被磷酸化的迹象。随后,许多实验室相继报道了酪氨酸残基磷酸化型蛋白激酶(简称 Tyr-P 型蛋白激酶)的活性不但与多种肿瘤病毒基因、细胞原癌基因、特异生长因子有关,甚至还与分化诱导剂二甲亚砜等的生物学作用有密切关系,所以受到人们

的重视。Tyr-P 型蛋白激酶活性的调节一般不依赖 cAMP、cGMP, 磷脂以及钙调节素。其中某些成员(如肿瘤基因产物)尚未发现与何种信使信号有联系,按分类可列入上述的第 5 类。另一些成员则与特异的因子受体复合物发生关系(如生长因子),故无法归入上述的任何一类。本文就最近发现的两类蛋白激酶, Tyr-P 型蛋白激酶以及依赖磷脂的蛋白激酶与细胞的正常发育分化和恶性转化的关系作一概述。

一、Tyr-P 型蛋白激酶与病毒肿瘤基因

Tyr-P 型蛋白激酶的踪迹,首先在一株肿瘤病毒感染的细胞中被发现^[4]。由于磷酸化酪氨酸(Tyr-P)的丰度在正常或被转化的细胞中均只占总磷酸化量的百分之零点几(表 1),而且 Tyr-³²P 和 Thr-³²P 在电泳中的迁移速度很接近,所以,直到 1979 年才发现有 Tyr-P 型激酶活性。

Rous 肉瘤病毒(RSV)的转化基因产物 PP60^{src}是具有 Tyr-P 型激酶活性的代表^[5-8]。RSV 转化的细胞中 Tyr-P 的丰度是未感染细胞的 6—10 倍。这主要是由于细胞多肽的修饰