八、分子生物学的若干重大突破

（一）安芬森的肽链折叠的经典实验

美国生物化学家安芬森（ Anfinsen/Christian Boehmer， 1916—），1943 年获哈佛大学哲学博士学位，曾就职于美国、瑞典和以色列一些机构，历任细胞生理实验室主任、生物化学实验室主任，其主要研究课题为酶及其它蛋白质结构与功能的关系。

到 1960 年 S·穆尔（Stanford Moore）已完全测定出了核糖核酸酶中 124 个氨基酸序列，这是第一个这样分析了的酶。然而安芬森更关心的是酶的形状和结构以及容许它总是采取同一独特构型的力。核糖核酸酶的分子——一种球蛋白——由缠绕成一个球并通过 4 个二硫键而保持在一起的单链所构成。通过化学方法可以使二硫键分离，结果该酶就变成了一个不具备水解核糖核酸能力的简单多肽链，即它已变性了。一旦二硫键破裂，它们能以 105 种不同方式中的任何一种方式再结合。安芬森发现最小量的化学干扰——仅仅将此酶放入一个有利的环境——是足以诱导核糖核酸酶采取一种恢复活性的构型。

安芬森从这个观察得出的重要结论是：在蛋白质的氨基酸序列（它的一级结构）中必定含有装配三维蛋白质的所有信息。他接着证明其它蛋白质中的类似性质。因为这项工作，安芬森与穆尔以及斯坦共同获得了 1972 年诺贝尔化学奖。

（二）酶学的两大突破性进展——酶活性 RNA 和抗体酶

80 年代以来，酶学中具有突破性进展的是酶活性 RNA（ri-bozyme）和抗体酶（abzyme）的发现。

美国科罗拉多大学化学系教授切赫（Cech/Thomas Robert，1947—）等在研究原始的真核生物四膜虫（Tetrathymena）的 rRNA 加工过程中发现，在没有任何蛋白质酶类情况下，该 rRNA 可以自身剪接加工，并最终分离到一段具有催化活性的内含子（IVS），它具有转磷酸、转核苷酸和水解等多种功能。美国耶鲁大学生物系教授奥特曼（ Altman， Sidney， 1939—）也发现参与 tRNA 后加工的核糖核酸酶 P（ ri-bonuclease P）是由 MIRNA 和 C5 蛋白两部分组成的。起催化作用的是 RNA 组分，而蛋白质只是表现调节作用的辅基。这一重大发现打破了“ 酶是蛋白质 ”的经典概念。RNA 曾经既携带遗传信息，又具催化性，提示着生命起源过程中曾经有过一个 RNA 世界。正是由于酶活性 RNA 的发现，切赫和奥特曼共获 1989 年诺贝尔化学奖。

美国分子生物学家莱纳（Lerner）等人在研究抗原抗体相互作用的机理中发现，某些抗原决定簇并非原来就在抗体分子的表面。这种现象类似于酶与底物诱导契合。酶之所以能起催化化学反应，在于它和底物形成中间产物时提供了一个过渡态，从而降低活化能。而抗原和抗体的结合也可能有一个过渡态，使抗原分子的某些化学键断裂形成新的化学键。在此思想指导下，特拉蒙特诺（Tramontano）等人选择了一种在结构上与某些酯类水解反应的过渡态相类似的化合物为克原制备单克隆抗体。发现此种抗体竟能使酯的水解反应加速 1000 倍，并具有酶的基本特征，如底物特异性、pH 依赖性和可

被抑制性等。推测其机理可能是抗体与此半抗原契合时，使形成类似于酶—底物过渡态的构象，从而催化其水解。鉴于这类抗体兼有抗体和酶的双重特性，故命名为抗体酶（abzyme）。进而舒尔茨（Schultz）等人又发现，对硝基酚碳酸酯的过渡态类似物——对硝基酚磷酸胆碱的单克隆抗体可使上述碳酯的水解反应加速 15000 倍。可以预期，抗体酶的技术将为酶的定向设计展现广阔前景，如果能制造出对氨基酸序列有特异性的抗体酶，限制性地切割不同氨基酸残基间的肽键，则将对蛋白质的研究提供新的手段，并且使抗体酶的定向设计开辟了一个不依赖于蛋白质工程的真正酶工程领域。

（三）免疫球蛋白分子结构的发现

免疫学（immunology）是研究人体由于人体产生抗体（antibody）抵抗疾病和排斥器官移植之一门非常复杂的科学，这很可能是今日医学研究最有前途的一支。然而近 200 年以来，医生们已经知道利用接种疫苗（vaccines），可以使人体产生抗体而抵抗某些疾病（如天花、麻疹、小儿麻痹症……）。但直到目前，大家还是无法真正了解抗体如何在人体中产生，又如何地能发生作用。所以许多专家学者们认为若能解开这个谜，将会对癌症的控制和移植器官上所遭遇到的一些困难有所帮助。瑞典皇家卡罗琳学院将 1972 年诺贝尔生理学或医学奖赠予两位对这方面卓有贡献的学者。一位得奖者是任教于美国洛克菲勒大学生物化学教授艾德尔曼（Edelman/Gerald Maurice，1929—）。另一位得奖的是英国牛津大学生物化学教授波特（Porter/Rodeney Robert，1917—）。由于他们二位所领导的小组不约而同地独立地发现抗体分子的正确化学结构，扩展了抗体免疫学一个新的领域，而共获诺贝尔生理学或医学奖。

虽然他们各自独立从事自己的研究工作，但实际上自 1959 年起，他们二位所研究的路线就趋于一致——血蛋白抗体的研究。抗体是一个巨大而复杂的分子。他们二位原则上都是先分离出抗体，然后再将这巨大的抗体分子分裂为几位较小的部分，再给以分析鉴定。但实际上的操作方法却彼此不同。波特集中心力于抗体分子的某些部位上，这些部位能带给抗体有某些能力与抗元（antigen）或任何侵入人体的物质起作用并破坏之，所以，他使用木瓜蛋白酶（pa-pin）作为一种裂解蛋白质分子的酶，将抗体分子 IgG 打破成三个大部分再给予个别的分析。他发现这抗体分子呈“ Y ”字型，它们上面较小而相似的部分能够和抗元相结合而发生作用，但是较大的一部分却缺少这种能力，无法发生作用。艾德尔曼却是利用化学方法破坏抗体分子中较弱的二硫键，然后再予以分析组合，其发现结果与前相同。

他们二位研究的结果显示出生物分子构造的高度复杂性。这个γ球蛋白（gamma-globulin）抗体分子含有 19996 个原子，形成 1320 个氨基酸，再利用三个二硫键形成一个含有 4 条链的分子——它们之间有两条相似而较“ 轻 ”的链各由 214 个氨基酸所组成，另二条较“ 重 ”的链各由 446 个氨基酸所组成。这是彼时（1962 年）被研究的最大蛋白质分子。最重要的是，他们两位能使用分子模型说明抗体发生作用的部分和人体如何能对某一疾病产生某一专一性抗体的原因。当有外来物质（如抗元）进入人体时，抗体分子就会像七巧板一样地和抗元密接附着在一起而发生作用。

他们的发现的贡献实在太大了！正如卡罗琳学院所说的话“ 他们二位的

贡献是利用极合理合乎逻辑的发现，对以往一直所欠缺的免疫学知识铺上了一层坚固的基础，而开启了免疫学上一个新领域。”

（四）基因工程技术的重大突破

基因工程技术的重大突破——多聚酶链式反应（PCR）技术和寡聚核苷酸定点诱变技术的发明。

1.多聚酶链式反应（PCR）技术

多聚酶链式反应（PCR），又称“基因放大”方法，是由美国的生物化学家 K·B·穆利斯（Kary B Mullis，1945—）发明的。其基本原理如下：首先，根据待扩增 DNA 片断两端的核苷酸序列，用化学合成的方法，合成两个不同的寡聚核苷酸引物，它们与 DNA 的两条链互补配对。将过量的化学合成引物与 4 种脱氧核糖核酸（dNTP）、DNA 聚合酶以及含有待扩增片断的 DNA 分子混合，经过高温变性（使 DNA 双链解开）、低温退火（使引物与模板附着）和中温延伸（合成新的 DNA 片断）3 个阶段的多次循环。由于新合成的 DNA 链也能够作为模板，可以使模板 DNA 的信息以几何级数扩增。一般经过 30 次～35 次扩增循环，每一循环只需 3 分钟～10 分钟，可以得到足够数量的目的 DNA 片断，使基因放大了数万倍。据称，穆利斯在 1985 年一次深夜驾车时，大脑中猛然闪现出“多聚酶链式反应”的想法。同时他也意识到这一设想如果可行，他将名扬天下。穆利斯因发明 PCR 方法成名之后，就开始写他的第一本书，书中详细披露多聚酶链式反应的研究过程以及附后的法律争端。

PCR 的方法灵敏度高，扩增倍数大，对一段 2000 个碱基对长的 DNA，可以从原来的 1×10^{-12}g 扩增到（0.5-1.0）$\times10^{-6}$g。在结合其他生物化学方法时，可以测出占总 DNA 的 $1/10^{13}$ 比例的单拷贝序列。

2.寡聚核苷酸定点诱变技术

寡聚核苷酸定点诱变技术是由加拿大的生物化学家 M·史密斯（Michael Smith，1932—）发明的。其基本原理如下：应用寡聚核苷酸进行 DNA 的定点诱变时，首先要把含有待突变的 DNA 片断段克隆到 MI3 噬菌体载体中，MI3 噬菌体的正链可以感染具有纤毛的细菌，并在细菌体内进行复制后，以出芽的形式形成新的带有正链 DNA 的噬菌体。而存留在菌体内的则是双链状态的复制型 MI3。受 MI3 噬菌体感染的细菌长生速度减慢，在细菌培养皿上会形成透明的噬菌斑。

将目的 DNA 插入到复制型 MI3 的多克隆位点上，去转染细菌，提取单链 DNA 作为突变的模板。根据需要设计并合成带有突变核苷酸序列的寡聚核苷酸引物，使与带有目的 DNA 的单链 MI3 模板杂交，然后加入 DNA 聚合酶和 4 种脱氧核糖核苷酸，使杂交上的突变引物延伸，并用 DNA 连接酶使新合成的 DNA 成环状，再去转染细菌。可用 DNA 序列分析的方法从所得到的噬菌体中筛选出带有突变 DNA 序列的突变体。在制备出含有突变体的复制型 DNA 后，可以用突变的 DNA 片段置换未突变的 DNA 相应的区段，从而得到完整的 DNA 突变体。

M·史密斯于 1932 年出生于英国，毕业于英国的曼彻斯特大学。1956 年移居加拿大，曾任加拿大温哥华大不列颠哥伦比亚大学生物技术实验室主任。在英国剑桥大学作客座教授期间，他在一次工间休息喝咖啡时，与同事

讨论中突然想起一个主意：如果合成一个略加改造的寡聚核苷酸，并作为引物与一个 DNA 分子结合，再使其进入一个合适的宿主内复制，从理论上来讲，应该能引起 DNA 分子的突变,并产生一个改变了的蛋白质。到了 1978 年,M ·史密斯与他的同事就这一想法进行了试验，发明了寡聚核苷酸定点诱变技术。这就有可能在体外对已知的 DNA 片段内的核苷酸进行置换或增删式的突变，改变了已往对遗传物质 DNA 进行诱变时的盲目性和随机性，可根据实验者的设计而有目的地得突变体。

利用寡聚核苷酸定点诱变技术，可以人为地通过基因的改变来修饰、改造某一已知的蛋白质，从而可以研究蛋白质的结构及其与功能的关系、蛋白质分子之间的相互作用。目前，利用寡聚核苷酸定点诱变技术来进行酶及其他蛋白质的稳定性、专一性的活性研究，已经有很多实例。例如，对胰蛋白酶的功能基团的研究、高效溶栓蛋白类药物的研制、白细胞介素-2 结构与功能的分析等等，都必须利用这一方法。

随着 PCR 技术的广泛应用，使得在某些情况下的寡聚核苷酸定点诱变能够变得更加简便有效。同时，由于寡聚核苷酸定点诱变技术的发展，使得 PCR 技术有了新的用途。由此可见，PCR 和寡聚核苷酸定点诱变这两项技术，已经成为基因工程操作中先进而又基本的方法和工具，在未来的分子生物学研究中将大显身手。由于他们在遗传工程研究领域中各自取得突破性成就，共同分享 1993 年诺贝尔化学奖。