生物工程学报 1(1):15—16,1985

评论

生物工程研究中值得注意的两个新领域——蛋白质工程和重组RNA

郭礼和

（中国科学院上海细胞生物学研究所）

近几年来，由于遗传工程技术和原理在生物学不同研究领域的深入使用，新的思想、新的概念和新的方法不断涌现。有的已经成为新的学科生长点，有的已经发展成为新的研究领域。蛋白质工程和重组RNA就是这些新的生长点开出的两朵引人注目的鲜艳花朵。

蛋白质工程是现代科学相互交汇和渗透而产生的一个新兴研究领域。蛋白质（包括酶）是细胞内占主要成份的生物大分子，在生命活动中执行许多重要的功能：骨架、运输、通讯、运动、催化、信使、识别等。蛋白质的功能同它们的一级结构和高级结构是紧密相关的。从50年代初期开始人们已经注意了这方面的研究，30多年来已经积累了相当丰富的资料。近几年来由于电子计算机的运用，已经能够进行蛋白质数学模式研究，从而为重新设计自然界不存在的新蛋白质奠定了基础。这种人造蛋白在功能和理化性质上应该比天然的蛋白质要优越。例如，可以设计一个酶蛋白，集合好几种酶的催化活性，具有广泛的pH和温度适应范围，有较好的机械强度，不易变性，以及其他优点。根据上述设计要求，利用遗传工程技术，或用化学方法合成基因，或用突变方式对原有基因进行改造，然后将基因引进宿主细胞进行表达，通过发酵或组织培养方法进行生产。

蛋白质工程不仅可以用来生产人造蛋白或酶，也可用来研究蛋白质本身的结构和功能。由于基因能够用化学方法合成或进行改造，故而能够在蛋白质肽链内改变或删去或添加某个或某些氨基酸残基。通过这些手段可以有目的地进行蛋白质结构和功能的研究。

β-干扰素和白细胞介素Ⅱ都有三个半胱氨酸残基，分子内只能形成一对二硫键，多余的一个HS基是游离的。细菌生产出这种外源蛋白是不稳定的，容易形成二聚体，使蛋白失活。美国Cetus公司科学家们在基因上进行点突变，分别将一个半胱氨酸密码子突变成丝氨酸密码子。对这种突变的蛋白进行研究，发现β-干扰素的第一个半胱氨酸残基和白细胞介素Ⅱ的第三个半胱氨酸残基可以突变成丝氨酸残基而不影响分子内的二硫键形成和生物活力，尽管它们的游离HS基团变成OH基团。

美国加州Agouron研究所的科学家根据X-晶体衍射研究得到的酶蛋白三度空间结构详细资料，正在对这些蛋白质基团进行改造，以便改变这些蛋白酶的最适反应温度和pH（通常这种反应条件对酶是不稳定的）。他们进行研究的第一个酶是

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

二氢叶酸还原酶（DHFR）。剑桥分子生物学实验室G.Winter和P.Carter两位科学家正在利用遗传工程技术改变基因来研究酪氨酸tRNA合成酶和底物ATP结合的能力。随着对蛋白质构象的深入研究，利用电子计算机可以筛选出抗原分子的决定簇。例如，乙型肝炎表面抗原是一个比较大的多肽，使用计算机可以找到一个抗原决定簇只有26个氨基酸残基，用化学合成的26肽可以代替完整的蛋白分子。象这样小的多肽用基因工程来生产是很方便的。

尽管蛋白质工程的研究还处于起始阶段，还没有形成真正的生产力，但是有几家生物工程公司已经开始进行风险投资。例如Genex公司和Bendix公司签定了长期合同，主要进行蛋白质工程一般方法的研究。Genentech公司和Corning Glass(Gen-encor）公司合作研究酶的改造和生产。随着科学技术的发展，蛋白质工程有可能成为生物工程的一个重要研究领域。

在生物工程研究中另一个值得注意的新领域是重组RNA，这是美国哥伦比亚大学肿瘤研究所F. R. Kramer等人提出来的。它是重组DNA衍生出来的一种新技术。重组RNA是用噬菌体RNA作载体，将外源RNA(例如mRNA或病毒RNA)在体外与其重组，然后进入宿主细胞进行繁殖和大量合成蛋白质；重组体也可以在体外利用RNA复制酶进行大量复制或利用无细胞翻译体系进行蛋白质合成。这个技术可用于：（1）制备大量mRNA或病毒RNA，进行突变和其他研究；（2）体外制备分子杂交所需的探针；（3）合成所需要的蛋白质；（4）利用链的末端终止法可以直接进行RNA序列的测定。

载体RNA可以转变成cDNA，然后克隆到质粒上去，在它前面装上一个启动基因。这个重组体可以作为一个分子克隆的载体。从染色体上分离得到的带有内含子(intron)基因，插到这个载体上的cDNA内。经过细菌扩增，然后用RNA聚合酶将cDNA（含有外源DNA片段）转录出来，得到少量RNA转录产物。利用这个转录产物作模版，用RNA复制酶在体外进行大量复制。得到的RNA可用于基因内含子的拼接和加工等方面的研究。

目前所用的RNA载体是Q-β这类噬菌体。它的RNA复制酶是非常稳定的，可以长时间保存而不失活。在体外能将少量单链RNA于10分钟之内扩增100,000倍。在1 ml反应液里于12小时可合成5mg RNA。这个酶容易分离纯化。它对底物有高度专一性，故而外源RNA只能插进Q-β噬菌体RNA内才能复制。

现在使用的RNA载体是MDV-1（+）RNA，共有221个核苷酸，它具有Q-β复制酶的辨认区和产物合成所需的起始区（噬菌体3′端富C区）。经过改建的载体是在上述RNA的第63位和64位核苷酸之间插进了一个腺嘌呤核苷酸十聚体，RNA的长度变成231个核苷酸。如果是将外源RNA插在载体上，首先用胸腺嘧啶核苷酸十聚体与载体杂交，然后用RNase H酶处理，在杂交处切断载体。用T_4 RNA连接酶将外源RNA同载体连接起来，这样就产生了RNA重组体。

重组RNA技术的研究还刚开始，有许多方法需要继续完善。利用这门技术可以在体外得到大量RNA（包括mRNA或病毒RNA）和蛋白质，应该说这是重组DNA研究的一个补充。由于RNA处理比较困难（容易降解）和RNase很难除去，使重组RNA技术广泛应用受到一定的限制。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn