

RNA 与生命进化——核酶研究的某些进展

阎锡瑾 田 波

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

(一) 引言

在相当长的时间内, 关于生命的起源存在着不同的观点^[1-5]: 一种观点认为地球上最早出现的生物信息大分子是类蛋白质, 它是由氨基酸随机组成的, 并能够通过自组装的方式形成原始细胞^[3]; 另一种观点是所谓裸基因学说, 认为先有 DNA 后有蛋白质, 因为后者是以 RNA 为模板合成的。自从具有催化功能的 RNA 分子被发现以来, 围绕着 RNA 结构与功能的研究迅速开展起来。日新月异的发现, 改变了人们以往的传统观念, 开始重新评价 RNA 在生命活动中的作用及其在生命进化中的意义。越来越多的实验结果表明, 地球上最先出现的生物大分子, 不是蛋白质, 也不是 DNA, 而是 RNA。人们设想在生命进化中地球上曾经出现过以 RNA 为主宰的 RNA 世界, 并提出了 RNA 世界假说。本文主要介绍自核酶 (ribozyme) 发现以来围绕着 RNA 世界假说所进行的生命进化的研究进展。

(二) RNA 与生命进化

1. 核酶的发现: 真核生物的基因通常是由编码顺序和非编码顺序间插排列组成。编码区称外显子 (exon), 非编码区称内含子 (intron)。DNA 将其编码的信息传递给 RNA, 即为转录。在通常情况下, 转录得到的原始产物必须经过一系列的加工步骤, 才能成为成熟的、具有生物功能的 RNA。切除 RNA 前体中的内含子或间插序列 (intervening sequence) 的过程叫作 RNA 剪接 (splicing)。目前已知的 RNA 剪接方式有四种: I 型、II 型、核内 mRNA 和 tRNA 的剪接。I 型和 II 型的剪接反应是由内含子 RNA 自身催化的, 而核内 mRNA 的剪接则需要剪接体 (spliceosome) 参与。这三种剪接方式是通过转酯反应, 而 tRNA 剪接则是通过水解反应完成的。

1981 年, Cech 等人^[6,7]首先在体外发现了四膜虫细胞核 rRNA 中 I 型内含子的切除不需要蛋白质或酶参与, 仅在鸟苷和二价离子 (Mg^{2+} 或 Mn^{2+}) 的存在下, 通过其内部指导序列 GGAGGG 与上游外显子中的 CUCUCU 序列相互作用 (图 1-a), 在内含子的 5' 端和 3' 端分别进行二次转酯反应, 切除内含子并将其两端的外显子片段连接起来成为成熟的 rRNA^[8-10]。切割下来的内含子是一个含 414 个核苷酸的直链 RNA 分子, 经过进一步加工, 切除其中 19 个核苷酸后形成环状。其最后产物不仅能够催化 RNA 底物分子中磷酸二酯键的水解、连接和转移, 而且还能够水解 DNA^[11], 催化 tRNA 与氨基酸之间氨酰基酯键的形成^[12]。由于它的化学本质是核酸分子, 并且具有酶的催化特点, 因此被称为核酶。核酶的出现从根本上改变了以往只有蛋白质才具有催化功能的概念。Cech 与 Altman 因发现 RNA 具有催化功能而一起获得 1989 年诺贝尔化学奖。随着核酶的深入研究, 其催化中心的三维结构也得到了阐明^[13]。最新研究表明, 核酶的部分内部指导序列参与催化中心的形成 (图 1-b,c), 在活性中心第 302 位上的保守腺苷酸残基和底物中靠近切割位点的 -3 尿苷酸残基之间形成氢键而维持在一起。

1988 年 Jarrell 等人^[14]发现了 II 型内含子的自我剪接功能。II 型内含子主要存在于真菌和植物的线粒体以及叶绿体中, 具有与 I 型内含子不同的保守二级结构和切割机制。II 型内含子中存在着与上游外显子结合的位点并通过该结合位点与上游的外显子相互作用, 切除套索状的内含子。II 型自我剪接与细胞核 mRNA

本文承北京大学生物系朱圣庚教授审阅并提出宝贵修改意见, 特此致谢。

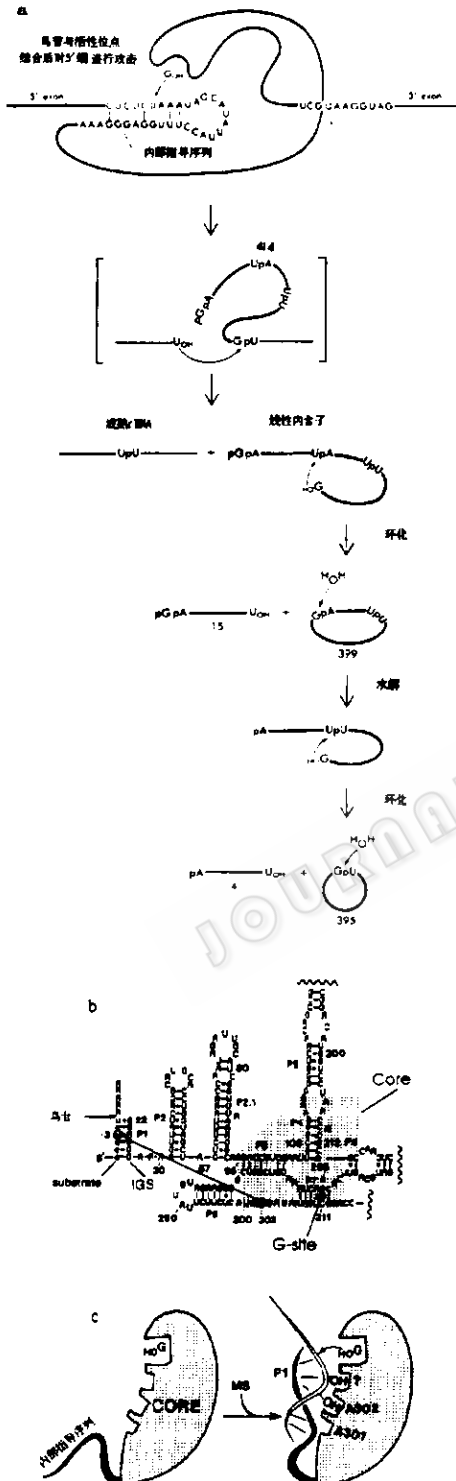


图 1 四膜虫 rRNA 内含子自我剪接过程 (a) 和核酶活性中心三维结构模式图 (b,c)^[13]

顺式剪接很相似,只是不需要剪接体的参与。目前认为,细胞核 mRNA 前体的剪接可能来源于 II 型内含子的自我剪接。剪接体也许是从 II 型内含子进化而来的^[15,16]。

在上述两种自我剪接反应中,由于没有高能量的辅助因子参加,因此都是可逆的。特别是 I 型内含子,作为一个易变的基因成分不仅能从 RNA 分子上被切割下来,而且还可以插入到合适的核苷酸序列中。其意义可能是在生命进化的初期, RNA 通过这种内含子的移位而得到重组以产生新的重组基因^[16,17]。这也许是生物进化前期在 RNA 水平上发生的基因重组。

自从四膜虫核酶发现以来,许多核酶相继发现于酵母、细菌、病毒、类病毒、卫星 RNA 以及蛛网卫星 DNA 的转录物等多种生物体内,其体内切割活性也得到了证实^[18]。然而,关于核酶在生物界中存在的普遍性及其在当代生物系统中的作用还有待于进一步的研究。

2. 核酶催化的 RNA 聚合反应:除了上述自我切割功能外,核酶还能够催化 RNA 的聚合反应^[19,20]。研究发现四膜虫核酶能够把任意几段寡核苷酸连接起来成为一条 RNA 链。其作用正如 DNA 连接酶能够催化两个与模板互补的冈崎片段相连接一样。核酶所催化的聚合反应可能是生命早期进化过程中的 RNA 自我复制形式。在这种自我复制过程中, RNA 兼有模板和复制酶双重功能。而这两种功能所需的分子结构是不同的。作为催化剂要求结构上折叠,作为模板则以简单线状的结构更有利于复制。那么, RNA 是如何催化其自身复制的呢?为了探讨 RNA 在生命初期的复制机制, Doudna 等人^[21]把一个能够以模板指导方式合成互补 RNA 链的核酶切成三个小 RNA 片段,使它们在保留核酶催化活性的同时又更利于作为模板。结果发现,这个多亚基组成的核酶能够有效地催化 cRNA 的合成,其中一个 RNA 片段能以自身为模板催化互补的 RNA 合成。这一观察结果提示在生物进化中,第一个 RNA 复制酶可能是由原始的 RNA 小分子自然组装而形成的。

3. 核酶和 RNA 在蛋白质生物合成中的作用

用: Noller 等人^[22]的最新实验结果强有力地证明了蛋白质合成过程中的一个基本环节,即氨基酸之间的肽键形成,是由核糖体内的 RNA 所催化。他们在检测核糖体 RNA 对肽键形成的作用时,用高浓度的蛋白酶和强变性剂破坏核糖体内的蛋白质,并且用有机溶剂抽提残留的蛋白质,结果发现经过上述处理的核糖体仍然对肽键形成保持活性。该活性能够被转肽酶抑制剂所抑制,而不被抑制蛋白质合成中其他环节的抗生素所抑制。更有意义的是该核糖体经过 RNase T1 处理后反应消失。这一发现证明了核糖体 RNA 具有转肽酶的功能,直接参与蛋白质合成过程中的肽键形成。

同时, Piccirilli 等人^[12]报道了他们对四膜虫核酶化学性质分析的最新进展,发现该核酶还具有氨酯酶的作用,能够水解氨酯基酯键,并能使肽链从 tRNA 上分离下来。这一新的发现给 Noller 等人的研究结果以有力的支持;证明了核酶催化功能的多样性,并提示了地球上最早出现的 tRNA 氨基酰化酶可能是 RNA 分子。

这两个引人注目的发现,使科学家开始重新评价核糖体中催化酶的化学本质,以往人们把研究的重点放在蛋白质分子上。占核糖体总量 60% 的 RNA 一直被认为是起结构和组织作用,而没有酶的功能。然而新的发现改变了人们的传统观念,目前认为核糖体中起催化作用的主要成分可能是 RNA 而不是蛋白质。RNA 分子集自我剪接、复制以及催化氨基酸之间的肽键形成等多种功能于一身,为 RNA 世界的假说提供了充分的证据。

4. 生物催化分子的进化: 根据目前已知催化剂结构与功能的不同,可将它们分为四种类型^[23]。

(1) 蛋白质型: 指只有蛋白质分子即可催化的水解反应,如各种蛋白水解酶。目前已知 99% 的蛋白酶不需要辅酶参与其催化作用。

(2) 蛋白质-RNA(辅酶)型: 包括除水解酶以外的所有的酶,例如,氧化-还原酶、转移酶、异构酶和合成酶等。它们需要辅酶或辅基参与催

化反应,如辅酶 A、FAD、NAD、NADP 和 tRNA 等。在这些蛋白质-RNA(辅酶)复合酶中,蛋白质的分子量大,辅酶的分子量小,两者共同参与活性中心的构建。

(3) RNA-蛋白质型: RNase P 是该型的典型代表。该酶的催化活性部分是 RNA 分子而不是蛋白质。但是在蛋白质存在的情况下,催化效率明显提高。此外,核糖体和剪接体也可归入此类中。

(4) RNA 型:即核酶。它们大部分是以 RNA 为底物水解磷酸二酯键或磷酸单酯键,此外,还有一些核酶能水解 DNA^[24],并与氨基酸和各种有机染料形成一个特殊的结合位点以催化非核酸的化学反应。

关于这四种生物催化剂的进化,一般认为, RNA 型可能是最原始的催化剂,开始仅具有一些简单的催化功能。例如,切除内含子和进行简单的复制。随着生命的不断进化, RNA 与后来出现的多肽结合,使 RNA 的结构复杂了,催化效率提高了,而且达到催化的多样性。有人认为,在进化前期,在 RNA 与 RNA-蛋白质之间很可能存在催化活性的肽基 RNA^[25]。随着蛋白质合成系统的进化,出现了各种复杂结构的蛋白质。由于蛋白质催化功能的多样性和高效率使其逐渐取代了原始 RNA 的催化作用。这个时期,可能是生命进化过程中的非常时期。由此可见,在现代细胞中执行主要催化功能的 I 型和 II 型催化剂是由 RNA 型演变而来的。支持这一观点的有:许多原核生物 RNase P 中的 RNA 具有全酶活性,而真核生物 RNase P 中的 RNA 则未发现其催化活性。迄今对于蛋白质催化剂已做了大量的研究和阐述,其结构与功能都比较清楚了,今后有必要对 III 型和 IV 型催化剂进行结构与功能上的基础研究。

5. 由 RNA 世界向 DNA 世界的进化:随着生命的复杂化, RNA 作为遗传物质已经不适应自然选择的需要,原因有以下几个方面^[23]:(1) RNA 在水溶液中,特别是在碱性溶液中、高温和锌离子的存在下,很容易被水解,而 DNA 在此条件下却比较稳定。(2) RNA 复制酶没有修

复功能,所以在 RNA 基因上易发生高频率的突变,而 DNA 的复制系统则具有完善的修复功能。(3)紫外线照射对单链 RNA 的损伤远比双链 DNA 更大。因此, DNA 作为遗传信息的载体具有更大的优越性。现已知道 DNA 不是从以脱氧核糖作为基本构成单位开始合成的,而是通过相应的核糖核苷酸的 2'-碳原子直接还原所形成的。所以,核糖核苷酸还原酶的出现,是从 RNA 导向 DNA 世界的关键。另一个关键酶是反转录酶 (reverse transcriptase),它的出现使信息从 RNA 流向 DNA 成为可能。反转录酶是在 1970 年由 Temin 和 Baltimore 在反转录病毒中首先发现的。以前认为反转录酶只存在于反转录

病毒中。现在知道,在 B 型肝炎病毒、花椰菜花叶病毒、酵母菌以及线粒体中也有反转录酶的存在。该酶在自然界中的存在,可能是在 RNA 世界向 DNA 世界演化过程中保存下来作为分子化石的痕迹。

(三) 原始型微生物中的核酶和核酶应用

除在原生动物四膜虫中发现的 I 型内含子核酶和在真菌及植物中发现的 II 型内含子核酶外,在微生物中特别是原始型的微生物中发现了许多结构更为简单的核酶,这就为研究 RNA 和核酶在生命起源和进化中的作用提供了有价值的材料。

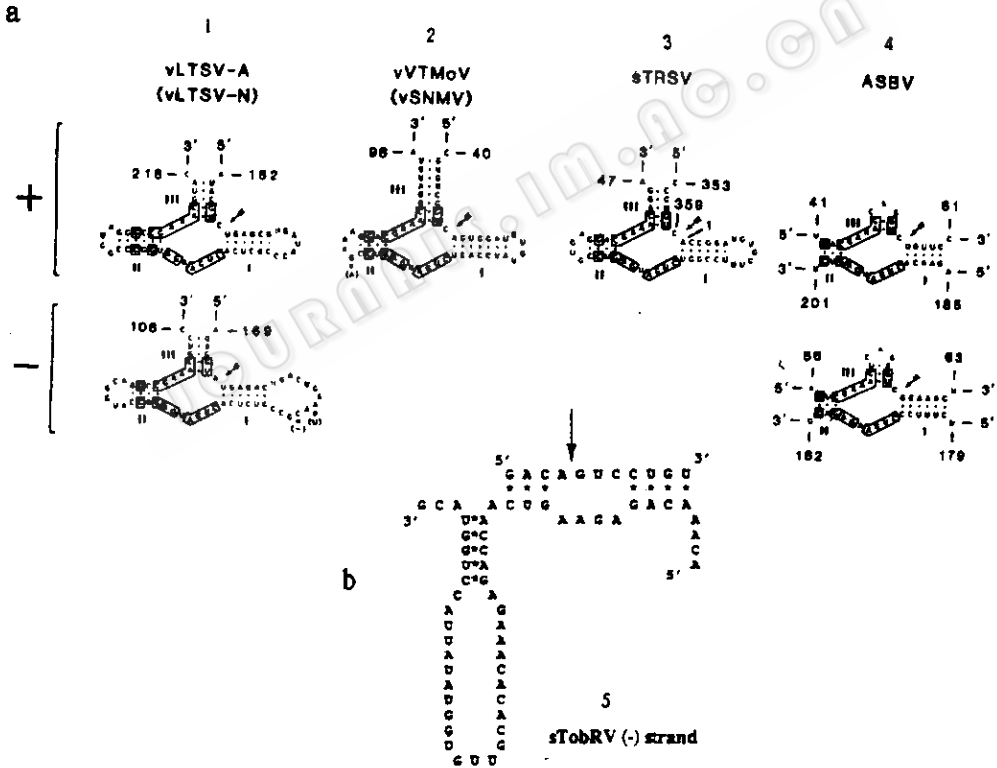


图 2 锤头样核酶 (a) 和发夹样核酶 (b) 二级结构模式图

1. 苜蓿暂时性条斑病毒
2. 绒毛烟斑驳病毒
3. 烟环斑病毒卫星 RNA
4. 鳄梨目斑类病毒
5. 烟草环斑病毒

1. 原始型微生物的核酶:

(1) 亚病毒(类病毒和卫星 RNA)中发现了多样性的核酶:

① 锤头样(hammer head)核酶: 主要在类病毒、拟病毒和卫星 RNA 复制过程中进行有效的自我切割反应。锤头样核酶是目前发现的分子量最小的一类核酶, 其二级结构是由中央单链区和周围三个短双链区组成的。中央单链区含有 13 个碱基的保守序列(图 2a)。所切割的产物均为 5' 端含羟基, 3' 端为 2'3' 环化磷酸。关于锤头样核酶将在后面讨论侵染性小分子 RNA 的复制与核酶时再作详细介绍。

② 发夹样(hearpin)核酶: 主要是在烟草环斑病毒的卫星 RNA (sTobRV) 负链中发现的^[26,27](图 2b)。拟南芥菜花叶病毒卫星 RNA (sArMV)50% 以上的核苷酸序列与 sTobRV 相同, 目前也认为在其负链 RNA 中存在着发夹样结构的核酶。发夹样核酶不仅能够切割 RNA 分子, 而且还具有连接功能。

③ 肝炎病毒(HDV) δ -因子中的核酶: 是目前在人类病毒卫星 RNA 中唯一发现的核酶^[28,29]。 δ -因子的结构和复制形式与类病毒和卫星 RNA 极为相似。它是由 1700 个核苷酸组成的单链 RNA 分子。目前关于 HDV 核酶的二级结构模型已有多种不同的计算形式^[30-32]。普遍认为, HDV 的 RNA 分子中有两个重要的单链区 [SSrA(726-731nt) 和 SSrB(762-766nt)] 参与核酶的催化功能。

(2) 病毒中的核酶: T_4 噬菌体 RNA 前体具有自我切割功能, 其催化中心的二级结构和切割机制都与 I 型内含子相同^[33,34]。它的活性中心涉用 196 个核苷酸, 是目前已知的 I 型内含子中最小的核酶。

(3) 大肠杆菌的核糖核酸酶 P(RNase P), 含有两个亚单位, 一个是 377 个核苷酸的 RNA, 另一个是 小多肽。它催化 tRNA 前体的 5' 前导序列的切割反应, 其切割产物为 3' 端含羟基, 5' 端含磷酸。1983 年 Altman 等人证实了该酶的催化单位是 RNA^[35], 其中蛋白质成份只起维护 RNA 构象的作用。近年来, 对核糖核酸酶

P 的 RNA 二级结构及催化机制做了大量的研究^[36]。

2. 传染性小 RNA 的复制与核酶:

(1) 类病毒: 是目前已知的最小植物致病病原。它由环状小分子 RNA(约 220-400 核苷酸)组成。由于其基因组甚小, 一般认为不编码任何蛋白质。它们的复制完全依赖于宿主。研究证明类病毒的复制是通过 RNA 到 RNA 的途径, 没有 DNA 作为复制中间体。其复制模式是一个滚环状模式^[37]: 环状类病毒进入寄主细胞后, 首先由正链类病毒为模板转录出多个单位长连锁体的负链复制中间物。这个负链复制中间物有两种可能的命运: 其一是负链复制中间物先被剪成单位长并连接成环状的负链分子, 然后以环状的负链为模板转录出多个单位长的正链复制中间物, 后者再经过剪接和环化成为具感染性的类病毒分子(图 3A)。其二是多个单位长的负链复制中间物不经剪接直接作为正链复制中间物的转录模板(图 3B)。自从在鄂梨日斑类病毒(ASBV)的正链和负链中发现具有自我切割功能的核酶后, 人们普遍认为 ASBV 组类病毒的正链及负链的复制中间物是由核酶将其切割成单位长的线状分子, 这种线状分子然后可连接成环状分子。

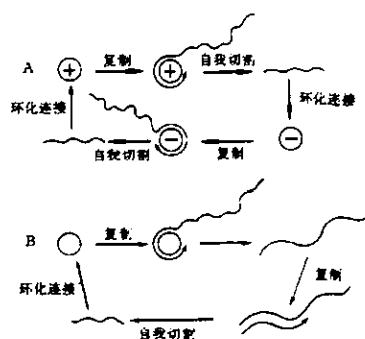


图 3. 类病毒滚环状复制的两种模式(A、B)

⊕ 示环状正链分子 ⊖ 示环状负链分子

迄今为止, 已在 ASBV、carSAV 和 PLMV 三类病毒中发现了具有自我切割活性的核酶。通过对这些小分子 RNA 核苷酸序列的分析和比较, 发现它们都含有一个锤头样的二级结构。这种锤头状结构构成了核酶活性的结构

基础。进一步的研究已经表明,在类病毒中所发现的核酶活性形式并不存在于具有感染性的环状小分子 RNA 单体中。只有由 ASBV 的线状双分子构成的锤头样结构才有较强的切割活性^[38]。无独有偶,在蝶螺卫星 DNA 的 RNA 转录物中也发现这种双分子锤头样的稳定切割结构^[39]。因此,它不同于卫星 RNA 中的锤头样核酶。后者的切割活性存在于单分子锤头样结构中。虽然对锤头样核酶来说,还没有体外连接活性的证据,但根据酶催化反应的双向性及人们发现的发夹样核酶具有连接活性,可以推测 ASBV 组类病毒的环状反应也是由核酶催化的,只是目前还没有发现而已。

(2) 病毒卫星 RNA: 是一种在病毒辅助下才能复制的小分子 RNA,但它能影响病毒复制,改变病毒引起的症状,被认为是一种病毒的分子寄主物^[40,41]并成功地应用于某些植物病毒病害的生物防治^[42-45]。卫星 RNA 有线状和环状两种形式,其中环状结构的卫星 RNA 称为拟病毒(virosoid)。卫星 RNA 的复制也是滚环状模式。它们在复制时,产生多个单位长连锁体的正链和负链 RNA 中间物,后者经过自我切割而形成卫星 RNA 单体。这种自我切割功能在体内和体外实验中都得到了证实^[46-48]。

在卫星 RNA 中发现有两种形式的核酶。大多数为锤头样核酶,如 vLTSV、sTRSV、sVTMV、sSNMV、sSCMV 以及 sTobRV 和 sArMV 的正链 RNA 中间物^[49-55]。另一种为发夹样核酶,在负链 sTRSV RNA 中发现。发夹样核酶是目前微生物中唯一发现的具有连接功能的核酶。

最近,在 Kaper 和我们实验室克隆了拟南芥菜花叶病毒卫星 RNA (sArMV),并对其核苷酸序列进行分析^[56,57]。结果表明:克隆的 sArMV cDNA 由 300 脱氧核糖核苷酸组成,与其 RNA 序列分析的结果相同。含有一个首尾相连的由 54 个核苷酸组成的核酶。具有完整的锤头状结构,能自我切割 5'-GUC↓-3' 的功能。

在类病毒、拟病毒和卫星 RNA 中发现的锤头样核酶是目前生物界中所发现的最简单的

一类。已知只有 13 个核苷酸组成的锤头样结构 RNA 分子就能进行 RNA 的切割反应^[58]。根据目前的研究资料分析,认为这些侵染性小分子 RNA 可能起源于逃脱了的内含子或更简单的 RNA 小分子。由于这类侵染性小分子 RNA 都具有结构周期性和具有自我剪接功能的核酶,特别是发现核酶还能以其自身或其他 RNA 分子作为模板使寡核苷酸聚合成相对长的分子。另外,生物分子的自我复制研究已经证明,由激化的单核苷酸能够聚合成小寡核苷酸分子^[59]。基于这些发现,不难想象在远古时期,自然界中存在的一些激化核苷酸随机聚合成一些小寡聚核苷酸片段。后者相互作用,形成具有催化活性的核酶,核酶以其自身或其他 RNA 小分子为模板,指导寡核苷酸聚合成相对长的分子。RNA 以这种简单的自我复制形式在自然界存留、扩增和变异。随着生物的进化,这些简单的催化和复制功能也逐渐进行分化,出现了高等的生物系统。在高等生物中 RNA 的多功能分别由高效率、高精确度和功能专一的蛋白质和 DNA 所取代。RNA 分子开始寄生在高等生物或病毒体内,并且依赖于寄主的酶系统进行复制,而它本身的复制系统可能变得不为其生存所必需,从而在进化过程中逐渐退化、消失。因此,类病毒和卫星 RNA 可能是细胞前生物进化的遗迹^[60]。

3. 核酶的应用: RNA 及核酶的研究不仅在生命进化等重大理论上具有重要意义,还具有诱人的应用前景。现举两例加以说明:

(1) 作为 RNA 限制性内切酶:核酶在鸟苷和金属离子的存在下,可将单链 RNA 分子进行有效的切割。不同的核酶所依赖的金属离子也不同,例如 I 型内含子核酶需要 Mg^{2+} ,而酵母 tRNA^{phe} 的自我切割需要铅离子参与^[61]。由于核酸在催化反应中对金属离子的依赖性,因此又称为金属核酶^[62]。

核酶的切割反应具有特异性,它可以识别底物 RNA 的特定序列并在专一位点上进行切割。其特异性接近 DNA 限制性内切酶,高于核酸酶。例如,核酸酶 RNase T₁ 在切割单链 RNA 底物时,仅对单个或两个核苷酸有特异性,而核

酶能够识别 4 个核苷酸序列。实验证明,无论是核酶活性部位和内部指导序列^[63],还是核苷酸识别序列的点突变^[64],都将改变核酶的序列特异性。因此,人们可以利用核酶的这种特性,发展一套序列特异的 RNA 内切酶,应用于 RNA 分子生物学的研究。

(2) 作为抗病的因子:由于锤头样核酶是目前已知核酶中最简单的一类,已知由 13 个核苷酸组成的锤头样核酶就能对底物 RNA 进行有效的切割。分子生物学家已经开始根据不同生物来源的靶子 RNA 序列(只要含有 GUN,这里 N 可以是 C、U 或 A 中的任何一个)作为底物,设计不同的核酶。人工合成它们的序列,利用基因工程技术进行克隆,或用作目的基因转化到植物、动物和微生物中使其在体内表达,有效地抑制相应靶子 RNA,从而达到抗病毒病和基因治疗的目的。

① 用于人类疾病的治疗: John Rossi 等人^[65]报道了锤头样核酶在细胞内能切割爱滋病毒(HIV)RNA。他们根据 HIV-1 的核苷酸序列设计并合成了特异性的核酶。在无细胞系统发现转录的核酶 RNA 能够有效而精确地切割 HIV RNA。随后将该核酶基因克隆到哺乳类动物的表达载体上,并转入到人的 Hela CD⁴⁺ 细胞中。当用爱滋病毒进行攻击时,转化的 Hela CD⁴⁺ 细胞表现出明显的抗 HIV-1 侵染的能力。Rossi 的实验结果为爱滋病的治疗提供了新途径。另外,肝炎病毒核酶和一些特异切割癌基因的核酶^[66]也将作为治疗剂用于肝炎、肿瘤和器官移植后排斥反应等疾病的治疗^[67]。

② 用于抗病植物:核酶作为一种新的抗病因子已应用于植物体内。其抗病机制可能是与基因的调控有关。澳大利亚学者 Gerlach^[68]设计、合成并克隆了特异性切割烟草花叶病毒(TMV)的核酶,体外实验证明该核酸对 TMV 具有特异性切割活性。最近他们将核酶的基因转入到烟草植物中。在 TMV 侵染时,该转基因烟草植物已表现出明显的抗 TMV 侵染的作用。

作者的实验室曾根据核酶的作用模式,设

计、合成并克隆了特异性切割马铃薯纺锤形块茎类病毒(PSTV)正链和负链 RNA 的核酶基因^[69]。以转录的 PSTV 正链及负链 RNA 作为底物与转录的核酶 RNA 一起保温,发现特异性切割 PSTV 正链及负链的核酶在体外具有相当高的特异切割活性,现已通过 Ti 质粒将该核酶基因导入马铃薯植物,以检测其体内活性,可望它在体内仍能够有效地切割类病毒分子,以达到防治 PSTV 的效果。

参 考 文 献

- Hiroshi Y et al.: *Kagaku* (Tokyo), **58**: 149, 1988.
- Giber W: *Nature*, **319**: 618, 1986.
- Fox Sidney W: *The emergence of life*, New York 1988.
- Wong J T: *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, **21**: 165, 1991.
- Orgel L E: *Nature*, **358**: 203, 1992.
- Cech T R et al.: *Cell*, **27**: 487, 1981.
- Kruger K et al.: *Cell*, **31**: 147, 1982.
- Watsib J D et al.: *Molecular Biology of the Gene Vol II The Benjamin/Cummings*, 1987.
- Sharp P A: *Cell*, **42**: 397, 1985.
- Cech T R: *Science*, **236**: 1532, 1987.
- Herschlag D and T R Cech: *Nature*, **344**: 405, 1990.
- Piccirilli J A et al.: *Science*, **256**: 1420, 1992.
- Pyle A M et al.: *Nature*, **358**: 123, 1992.
- Jarrell K A et al.: *J. Biol. Chem.*, **263**: 3432, 1988.
- Cech T R et al.: *Cell*, **44**: 207, 1986.
- Michel F et al.: *Gene*, **82**: 5, 1989.
- Dujon B: *Gene*, **82**: 91, 1989.
- Steinbeck P et al.: *The EMBO J.*, **11**: 1525, 1990.
- Kay P S et al.: *Nature*, **327**: 343, 1987.
- Doudna J A et al.: *Nature*, **339**: 519, 1989.
- Doudna T A et al.: *Science*, **251**: 1605, 1991.
- Noller H F et al.: *Science*, **256**: 1416, 1992.
- Hiroshi Y: *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **34**: 337, 1989.
- Forster A C et al.: *Science*, **249**: 784, 1990.
- Nordstrom K.: *TIBS*, **10**: 232, 1985.
- Haseloff J et al.: *Gene*, **82**: 43, 1989.
- Kaper J M et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**: 318, 1988.
- Sharmeen L et al.: *J. Virology*, **62**: 2674, 1988.
- Kumar P K R: *Nucleic Acids Res.*, **20**: 3919, 1992.
- Porrotta A T and Becn M D: *Nature*, **350**: 434, 1991.
- Branch A D and Robertso H D: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 1016, 1991.
- Wu H N et al.: *J. Mol. Biol.*, **223**: 233, 1992.
- Ehrenman K et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 5875, 1986.
- Gott J M et al.: *Gene Develop*, **2**: 1791, 1988.
- Altman S: *Trends Biochem. Sci.*, **11**: 515, 1986.
- Guerrier-Takada C et al.: *Cell*, **35**: 849, 1983.
- Altman S et al.: *Gene*, **82**: 63, 1989.
- 翟峰和田波: *病毒学报*, (待发表)。
- Forster A C et al.: *Nature*, **265**: 334, 1988.

40. Epstein L M and J G Gall: *Cell*, **48**: 535, 1987.
41. 田波: 病毒与农业, 科学出版社, 北京, 第 197 页, 1986.
42. Tien P et al.: *FEBS Letters*, **132**: 353, 1981.
43. Tien P et al.: *Ann. Appl. Biol.*, **111**: 143, 1987.
44. Tien P et al.: *Nucleic Acids Res*, **15**: 5069, 1987.
45. Tien P et al.: *Advance in Virus Research*, **39**: 321, 1991.
46. Gerhard S et al.: *Nucleic Acids Res*, **15**: 5085, 1987.
47. Reckwitz H R et al.: *Nature*, **291**: 297, 1981.
48. Wu G S et al.: *Ann. Appl. Biol*, **114**: 489, 1989.
49. Marcos J F and R Flores: *Virology*, **186**: 481, 1992.
50. Tol H V et al.: *Virology*, **180**: 23, 1991.
51. Buzayan J M et al.: *Nature*, **323**: 349, 1986.
52. Symons R H et al.: *J. Cell Sci. Suppl.*, **7**: 303, 1987.
53. Prody G A et al.: *Science*, **231**: 1577, 1986.
54. Epstein L M and J G Gall: *Cell*, **48**: 535, 1987.
55. Forster A C and R H Symons: *Cell*, **49**: 211, 1987.
56. 杨希才等: 微生物学报, **33**(4): 1993.
57. Kaper J M et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**: 318, 1988.
58. Jeffries A C and H Symons: *Nucleic Acids Res.*, **17**: 1371, 1989.
59. Inoue T and L E Orgel: *Science*, **219**: 859, 1983.
60. Diener T O: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 9370, 1989.
61. Behlen L S et al.: *Biochemistry*, **29**: 2525, 1990.
62. Pan T and O C Uhlenbeck: *Nature*, **358**: 560, 1992.
63. Warign R B et al.: *Nature*, **321**: 133, 1986.
64. Garriga G et al.: *Nature*, **322**: 86, 1986.
65. Sarver N: *Science*, **247**: 1222, 1991.
66. Scanlon K J et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 10591, 1991.
67. Edgington S M: *Bio/Technology*, **10**: 256, 1992.
68. Young M and W Gerlach: Gene manipulation in plant improvement II, Plenum Stadler genetics symposia Series ed. by J P Gustafson, New York, p. 313, 1990.
69. 叶寅等: 中国科学 (B 辑), **5**: 491, 1992.

(1992-11-23 收稿)