

# 基于核酶技术的人线粒体色氨酸 tRNA 的高效转录及其活性鉴定

巩菊芳<sup>1</sup>, 曹诣斌<sup>1</sup>, 陈祥龙<sup>2</sup>, 齐育平<sup>1</sup>, 杨小强<sup>1</sup>, 金晓玲<sup>3</sup>

1 浙江师范大学 化学与生命科学学院, 金华 321004

2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031

3 中南林业科技大学 环境艺术设计学院, 长沙 410004

**摘要:** 利用 T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase, T7 RNAP)的体外转录方法因其简便、高效而在 RNA 制备中得到广泛应用, 但该方法由于 T7 RNAP 的启动子跨越转录起始位点而会导致转录产物多出附加序列; 如果去掉 T7 启动子的转录起始位点, 则会严重降低 T7 RNAP 的转录活性。本实验很好地消除了以上弊端, 将 T7 RNAP 的高效转录系统与核酶高度专一的自剪切技术相结合, 成功构建了一种不影响转录效率的体外转录方法, 而且转录后核酶能够在设计的特定位置进行自剪切并释放出目的 RNA, 得到了活性达 113.6 pmol/μg 的人线粒体色氨酸 tRNA(HmtRNA<sup>Trp</sup>(UCA))。该方法转录效率高、重复性好, 适合 RNA 的大量精确制备。

**关键词:** 体外转录, 核酶, 人线粒体色氨酸 tRNA

## High-level transcription of human mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup> based on ribozyme and characterization on its aminoacylation activity

Jufang Gong<sup>1</sup>, Yibin Cao<sup>1</sup>, Xianglong Chen<sup>2</sup>, Yuping Qi<sup>1</sup>, Xiaoqiang Yang<sup>1</sup>, and Xiaoling Jin<sup>3</sup>

1 College of Chemistry and Biology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

2 State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

3 School of Environment and Art Design, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

**Abstract:** *In vitro* transcription systems with T7 RNA polymerase (T7 RNAP) were widely used in preparation of RNA because of their simplicity and high efficiency. The transcripts would have additional 5' sequence since T7 promoter spans the transcription start site, while deletion of the transcription start site would severely reduce the T7 RNAP transcriptional activity. We successfully developed an *in vitro* transcription by combining of T7 RNAP high efficient transcription system and highly specific self-splicing technology of ribozymes, in this system, ribozyme self-splices at the designed specific site and releases the aim RNA without affecting transcription efficiency of T7 RNAP, the aminoacylation activity of human mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup> (HmtRNA<sup>Trp</sup>(UCA)) is 113.6 pmol/μg. This method with its high efficiency on transcription and good repeatability is

**Received:** July 27, 2009; **Accepted:** October 9, 2009

**Supported by:** Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Nos. Y205353, Y2080644).

**Corresponding author:** Jufang Gong. Tel: +86-579-82291349; Fax: +86-579-82282269; E-mail: sky103@zjnu.cn

浙江省自然科学基金项目(No. Y205353, Y2080644)资助。

very suitable for preparation of accurate RNA in large scale.

**Keywords:** transcription *in vitro*, ribozyme, human mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup>

tRNA 基因突变导致疾病发生的分子机理是当前研究的热点问题<sup>[1]</sup>, 研究表明人线粒体 tRNA<sup>Trp</sup>(HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>)基因的点突变会导致发育迟缓、脑病、肠胃综合症等疾病<sup>[2-5]</sup>, 为深入研究突变对 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>生物学活性的影响, 需建立一整套人线粒体色氨酸 tRNA 合成酶(HmtTrpRS)与 tRNA<sup>Trp</sup> 的识别系统, 因此获得大量纯化的 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>及其突变体是研究必备条件。

但在以体外转录的方法制备 RNA 过程中, 噬菌体 T7 RNAP 的启动子跨越转录起始位点, 且严格保守, 通常需以 5'-GGG 起始, 这样虽然保证了 T7 RNAP 的转录活性, 但转录出来的产物 RNA 以启动子固有的转录起始位点作为开端, 与实际需要的目的 RNA 不符, 为保证目的 RNA 的准确性, 简单的方法就是去掉启动子中的转录起始位点 5'-GGG, 但又会导致 T7 RNAP 的转录活性急剧下降, 在实际研究中, 刚好以 5'-GGG 作为起始位点的 RNA 极少, 比如本实验中就需要转录以 5'-AGA 起始的 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>。因此本研究对传统的体外转录方法做了一些改进, 将 T7 RNAP 的高效性与目的 RNA 的精确大量获得很好结合在一起, 成功设计了带 5' 锤头核酶结构的 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>基因, 通过转录后核酶能够在特定位点进行自剪切并释放出正确目的 tRNA 的方法, 并得到了高活性的 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

受体菌大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和质粒 PMD18-T 均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 酶和试剂

限制性内切酶 *Bst*NI 购自 New England Biolabs 公司, 核酸分子量标准、T4 DNA 连接酶、dNTPs 和 Ex *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, RiboMAX<sup>TM</sup> Large Scale RNA Production System-T7 购自 Promega 公司, L-[5-<sup>3</sup>H]色氨酸为 Amersham Pharmacia 公司产品, L-色氨酸购自 Gibco BRL 公司,

Ni-NTA agarose 购自 Qiagen 公司, HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>基因和引物由 Invitrogen 公司合成, 丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自 BBI, 其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 能特异性切割出目的 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>的核酶的设计

根据 Haseloff<sup>[6]</sup>等提出的锤头状核酶的设计原则, 结合以往实验经验, 并用 pcFOLD 软件进行 RNA 二级结构预测, 设计出锤头状核酶。设计的锤头状核酶含有 33 个核苷酸, 其中包括 22 nt 催化核心和 11 nt (5' 5 nt - 3' 6 nt) 侧翼反义序列。核酶序列为 5'-ATTTCTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAA ATAGT-3' (划线部分为核酶与底物互补的侧翼)。

#### 1.3.2 带有核酶结构序列的 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>基因的克隆(图 1)

通过搜索数据库 <http://www.staff.uni-bayreuth.de/~btc914/search/index.html> 得到野生型 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>基因序列, 人工合成该基因 5'-AGAAATTGAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAGCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGCCA-3', 针对 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>和核酶结构的特点设计合成如下引物。

引物 1: 5'-ATTTCTCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAATAGTACTCACTATTAGAAATTT-3';

引物 2: 5'-CTCTAATACGACTCACTATAGGGATTTCTCTGATGAGTCCGTGAG-3', 方框所示部分为 T7 启动子;

引物 3: 5'-GCCTGGCAGAAATTAA-3', 下划线部分为 *Bst*NI 酶切位点。

采用两步 PCR 法, 第 1 步 PCR 用引物 1 和 3, 以合成的野生型 HmtRNA<sup>Trp (UCA)</sup>基因作为模板, 反应条件为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 48°C 25 s, 72°C 20 s, 30 个循环; 72°C 10 min。这样在 tRNA 基因的 5'和 3'端分别加上了核酶结构和 *Bst*NI 酶切位点 5'-CCTGG-3', 第 2 步 PCR 用引物 2 和 3, 以第 1 次 PCR 产物作为模板, 反应条件同第一步, 这样, 在

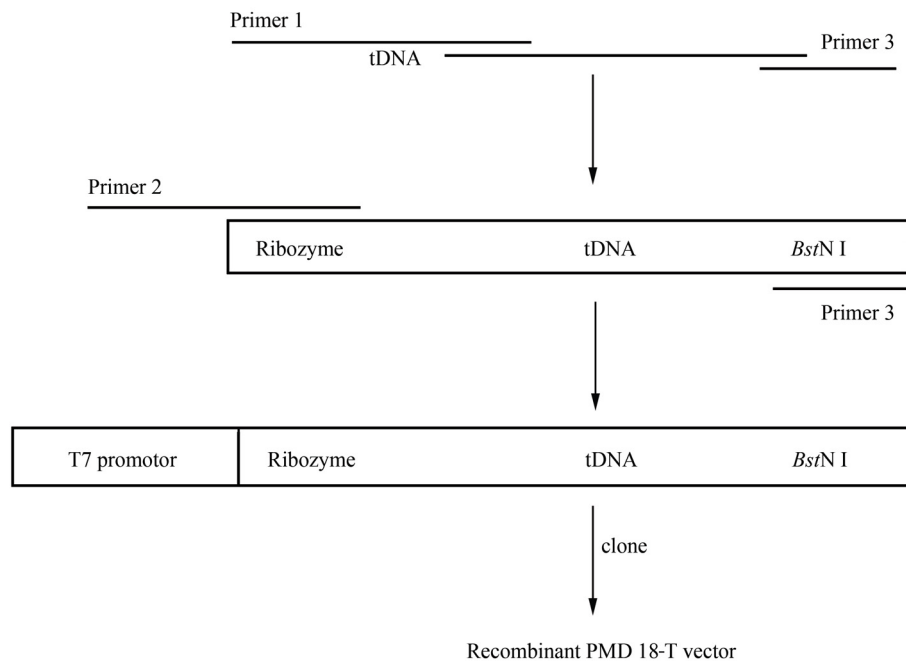


图 1 带有 T7 启动子和锤头核酶基因的  $HmtRNA^{Trp(UCA)}$  基因重组质粒构建  
 Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid of  $HmtRNA^{Trp(UCA)}$  gene.

第 1 次 PCR 产物的 5'端增加了 T7 启动子 5'-CTCT-AATACGACTCACTATAGGG-3'。第 2 次 PCR 产物通过 T4 DNA 连接酶连接到 PMD18-T 载体中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂平板,挑选阳性克隆,送上海 Invitrogen 生物技术公司测序。同时设立无核酶结构对照组,直接以不跨越转录起始位点的 T7 启动子 5'-CTCTAATACGACTCACTATA-3' (引物 5)和引物 3 为引物,以野生型  $HmtRNA^{Trp(UCA)}$  基因作为模板进行 PCR 扩增,克隆测序。

### 1.3.3 $HmtRNA^{Trp(UCA)}$ 的体外转录及核酶自动剪切得到目的片段

以测序正确的质粒为模板进行 PCR 扩增以制备转录模板 DNA,为增加酶切片段的长度,便于电泳鉴定,重新设计了一条与载体质粒 PMD18-T 互补配对的引物 4,碱基序列位于目的片段插入下游,为: 5'-TGCCTGCAGGTCGACGATT-3',采用引物 2 和引物 4,扩增后片段为 159 bp,目的片段割胶回收,在 60°C, *Bst*N I 酶切 4 h 产生 CCA 末端,用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, *V/V/V*)抽提去蛋白,然后用乙醇、醋酸铵沉淀,得到长度为 139 bp 的带有核酶结构基因序列的转录模板用于转录。对照组采用引物 5 和引物 3 进行扩增后用于转录。

100  $\mu$ L 转录体系中含有: 1  $\mu$ g 经 *Bst*N I 酶切的含核酶结构基因和  $HmtRNA^{Trp(UCA)}$  基因的转录模板, 40 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 15 mmol/L  $MgCl_2$ , 5 mmol/L DTT, 500 mg/L BSA, 1.5 mmol/L dNTPs, 40 U RNasin, 200 U T7 RNAP。该反应物在 37°C 保温 4 h。然后加入 10 U DNase, 37°C 保温 30 min 以水解 DNA 模板。转录产物经含 8 mol/L 尿素的 16%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后不需染色直接在紫外灯下割胶纯化<sup>[7]</sup>。

### 1.3.4 $HmtRNA^{Trp(UCA)}$ 色氨酸酰化活力测定

在进行酰化反应之前,转录产物于 94°C 加热 2 min,然后缓慢退火至室温,以便使  $HmtRNA^{Trp(UCA)}$  形成正确的高级结构。人线粒体色氨酸 tRNA 合成酶( $H_{mt}TrpRS$ )已由本实验室成功表达和纯化。

$HmtRNA^{Trp(UCA)}$  色氨酸接受活力用  $H_{mt}TrpRS$  (比活力为 3821.85 U/mg)进行测定,酰化反应条件为: 50  $\mu$ L 反应体系包含 4 mmol/L ATP、1 mmol/L DTT、1  $\mu$ Ci L-[5-<sup>3</sup>H]色氨酸、6  $\mu$ mol/L 色氨酸、40 mmol/L  $MgAc_2$  和 140 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8)。通过测定一系列时间的产物量确定初速度。

滤纸片先用 1 g/L 色氨酸溶液浸泡过夜以竞争性地降低本底,临用前烘干。反应后取 20  $\mu$ L  $HmtRNA^{Trp(UCA)}$  色氨酸酰化反应液点样,用 100 mL 冰

预冷的 50 g/LTCA(含 0.05% 色氨酸)洗涤 3 次, 再用 10 mL 95%乙醇及无水乙醚各洗涤 1 次。滤纸干燥后在 Wallac 1490 液闪计数器上对 $[5-^3\text{H}]$ -色氨酸计数。以反应体系中的底物浓度与对应的酶促反应速度为参数, Line-Burk 作图法计算 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>的动力学常数。色氨酸氨酰化活力单位(pmol/ $\mu\text{g}$ )定义为每微克 tRNA 可接受色氨酸的皮摩尔数。

## 2 结果

### 2.1 带有核酶结构的野生型 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>基因的质粒构建

71 nt 野生型 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>基因进行第一步 PCR 扩增后, 产物为 117 bp; 第二步 PCR 扩增产物长度为 140 bp。PCR 产物经 1%琼脂糖电泳, 在紫外凝胶成像系统下可见明亮清晰条带(图 2)。经两步 PCR 扩增, 在 5'端依次加上了核酶结构和 T7 启动子, 在 3'端加上了 *Bst*NI 酶切位点。第 2 次 PCR 产物连接到 PMD18-T 载体中(命名为 PMD18-T-HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>), 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 测序结果证实插入序列与设计的完全相符。

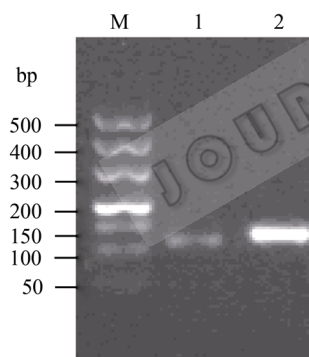


图 2 第一次和第二次 PCR 扩增产物鉴定图  
Fig. 2 PCR products analysis. M: DNA marker; 1: the first PCR products of human mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup>, 117 bp; 2: the second PCR products of human mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup>, 140 bp.

### 2.2 转录前 PCR 扩增及酶切结果

转录前模板需经 *Bst*NI 酶切以产生 tRNA 的 CCA 末端, 为增加酶切片段长度便于电泳检测, 采用引物 2 和一条与载体质粒 PMD18-T 互补配对的引物 4, 以测序正确的重组质粒 PMD18-T-HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>为模板进行 PCR 扩增, 扩增后片段为 159 bp, 目的片段割胶回收, 在 60°C, *Bst*NI 酶切 4 h 产生 CCA

末端, 用酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1, *V/V/V*)抽提去蛋白, 然后用乙醇、醋酸铵沉淀, 得到长度为 139 bp 的带有核酶结构基因序列的转录模板用于转录。1.7%琼脂糖凝胶电泳, 目的条带正确(图 3)。

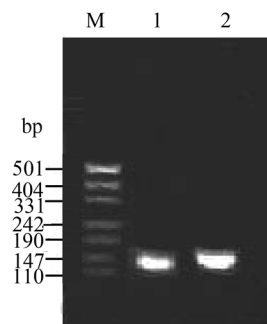


图 3 PCR 产物和 *Bst*NI 酶切结果  
Fig. 3 PCR products and restriction enzyme digestion analysis. M: DNA marker; 1: products digested with *Bst*NI, 139 bp; 2: PCR products, 159 bp.

### 2.3 体外转录及核酶自剪切释放目的片段 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>

如图 4 所示, 锤头状核酶位于 T7 启动子下游, 含有 33 个核苷酸, 其中包括 22 nt 活性中心和 11 nt (5' 5 nt - 3' 6 nt) 侧翼反义序列。

测序结果表明构建的核酶基因序列与设计的序列完全一致, 利用 *Bst*NI 线性化后的模板转录后自剪切产物应包含 2 个条带: 目的 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>长度为 71 nt, 附加片段 48 nt, 但是转录结果显示体外转录物除了以上 2 个条带外, 还有另一 119 nt 条带(图 5), 其为未自剪切的 119 nt 转录产物, 条带明显弱于目的 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>的 71 nt 条带, 表明大部分转录产物自剪切成功。对照组未见任何条带。本实验结果不需任何染色直接在紫外灯下观察即可看到明显条带, 说明转录效率较高, 但在该条件下对各条带回收后的含量进行测算, 核酶自剪切率为 85.6%。转录产物自剪切后释放出目的 tRNA, 证明本实验的设计是正确的。

取 71 nt 处的目的条带割胶纯化用于氨酰化活力测定。1  $\mu\text{g}$  转录模板转录后, 得到 100  $\mu\text{g}$  HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>(图 6)。

### 2.4 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>动力学常数测定

HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>色氨酸氨酰化反应动力学常数测定中, 反应总体积为 50  $\mu\text{L}$ , 200 nmol/L HmtTrpRS,

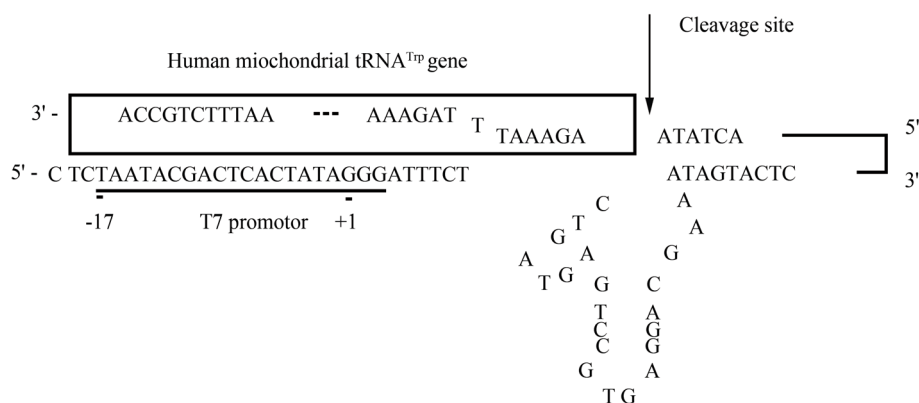


图4 锤头状核酶结构及剪切位点示意图

Fig. 4 Schematic representation of the hammerhead ribozyme. Arrow indicates the cleavage site.

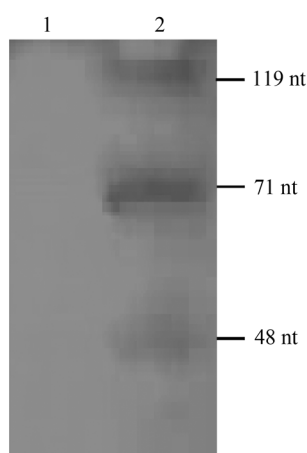


图5 转录后核酶自剪切产物电泳图

Fig. 5 Transcription products. 1: control group; 2: trial group.

tRNA 的浓度变化为 0.1 ~1.8  $\mu\text{mol/L}$ 。

纯化的 HmtRNA<sup>Trp</sup> (UCA) 在 HmtTrpRS 催化下其氨酰化活力达 113.6 pmol/ $\mu\text{g}$ 。

### 3 讨论

基于 T7 RNAP 及其强启动子之间识别的特异性而建立起来的高效转录系统, 已在 RNA 结构与功能研究中广泛应用<sup>[8-9]</sup>。但从现有的研究中可以发现, 不严格以 T7 启动子固有序列作为启动子的转录, 其效率较低, 目的 RNA 的产量只有模板的几倍<sup>[10]</sup>, 这在一定程度上限制了 RNA 结构与功能研究中对目的 RNA 的大量获得。因为, T7 RNAP 的高效性是建立在对 T7 启动子高度特异性的基础之上的<sup>[11]</sup>, T7 启动子含有 23 个高度保守的碱基序列-17→+6, 分为 2 个结构域,-16→-6 和-6→+6, 更重要的是, 它跨

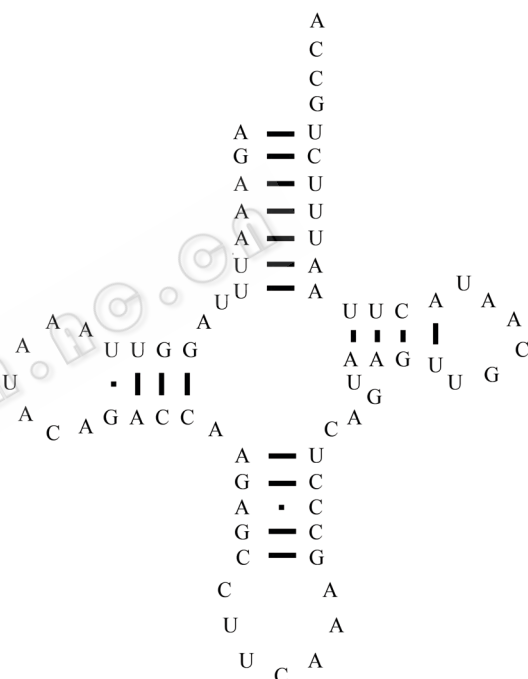
图6 野生型人线粒体 tRNA<sup>Trp</sup> 结构图

Fig. 6 Wild-type human mitochondria tRNA<sup>Trp</sup>.

越转录起始位点, 特别是+1 位到+3 位的 3 个 G(图 4),对 T7 RNAP 酶活性起着关键作用, 因为 T7 RNAP N 端的组氨酸、赖氨酸等活性区域分别与 T7 启动子的+1 位、+2 位和-14 位、-4 位结合<sup>[12-14]</sup>。而且, 研究还发现当+1 位的 G 突变后, T7 RNAP 的转录效率丧失了 1/2<sup>[15]</sup>, 当+3 位的 G 突变后, 转录效率只为原来的 3/4<sup>[16]</sup>, 因此转录起始位点的 5'-GGG 是保证 T7 RNAP 的转录活性所必需的。所以本实验 T7 启动子的设计保留了转录起始位点后面+1→+3 位的 3 个 G, 以便更好地保留 T7 RNAP 的转录活性。

但是, 这样转录出来的 tRNA 5'端必然带有附

加额外序列, 严重影响目的 tRNA 的精确性, 由此根据核酶能够在特定位点进行专一性剪切的特点设计了锤头核酶结构, 转录之后 RNA 可以自剪切切去多余的 RNA, 同时释放目的片段。核酶的基本组成包括中间极为保守的核苷酸序列(活性中心)和两端的侧翼序列。核酶活性中心决定了核酶的切割活性, 是高度保守的序列, 而侧翼序列则决定着核酶识别的特异性。人们发现在保证碱基互补的前提下, 改变侧翼序列中核苷酸的序列并不影响核酶的催化功能, 这一特性使核酶有可能成为特异性切割目的基因的又一有效工具, 人们可以根据不同的底物设计成具有针对性的核酶。根据靶 RNA 的序列, 确定核酶的识别区系列, 设计侧翼反义序列并加入高度保守的活性中心, 以形成完整的核酶结构, 结果表明设计的核酶具有较高的体外切割活性, 证明该方法精确得到了高活性的 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup>。

本实验结果显示转录产物有 3 个条带, 1 条为转录后未自剪切的总片段, 另 2 条分别为目的条带 HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup> 和多余片段, 且目的条带明显强于未剪切条带, 表明大部分转录产物自剪切成功。本实验结果不需任何染色直接在紫外灯下观察即可看到明显紫外吸收条带, 说明转录效率和剪切效率均是相当高的, 1  $\mu\text{g}$  转录模板转录后, 得到 100  $\mu\text{g}$  HmtRNA<sup>Trp(UCA)</sup> 所得目的 RNA, 达到了模板的 100 倍。对各条带回收后的含量进行测算, 核酶自剪切率为 85.6%, 没有达到理想的 100%, 研究表明<sup>[17]</sup>, 剪切温度与时间对核酶的切割活性影响较大, 50°C 时核酶的切割活性比 37°C 时高得多, 除了结构的影响外, 作为金属酶的核酶, 二价金属离子特别是  $\text{Mg}^{2+}$  也是核酶作用的重要条件。因此在以后的实验中还可以对转录后切割条件做进一步探索, 提高切割效率, 最大限度地得到目的 RNA。

以上结果说明本实验建立了较为理想的体外转录反应条件, 从而可以进一步扩大反应体积, 制备出足量的 tRNA, 应用于结构与功能的研究, 该方法同样可以用于其他 RNA 的体外转录制备。

## REFERENCES

- [1] Filosto M, Tomelleri G, Tonin P. Neuropathology of

mitochondrial diseases. *Biosci Rep*, 2007, **27**: 23–30.

- [2] Maniura-Weber K, Taylor RW, Johnson MA, *et al.* A novel point mutation in the mitochondrial tRNA(Trp) gene produces a neurogastrointestinal syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2004, **12**(6): 509–512.

- [3] Ribas de Pouplana L, Schimmel P. A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell Mol Life Sci*, 2000, **57**(6): 865–870.

- [4] Tulinius M, Moslemi AR, Darin N, *et al.* Leigh syndrome with cytochrome-c oxidase deficiency and a single T insertion nt 5537 in the mitochondrial tRNA<sup>Trp</sup> gene. *Neuropediatrics*, 2003, **34**(2): 87–91.

- [5] Valente L, Piga D, Lamantea E, *et al.* Identification of novel mutations in five patients with mitochondrial encephalomyopathy. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1787**(5): 491–501.

- [6] Haseloff J, Gerlach WL. Simple RNA enzyme with new and highly specific endoribonuclease activity. *Nature*, 1988, **334**(6183): 585–591.

- [7] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.

萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

- [8] Landick R. Active-site dynamics in RNA polymerases. *Cell*, 2004, **116**(3): 351–353.

- [9] Gamer M, Fröde D, Biedendieck R, *et al.* A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, **82**: 1195–1203.

- [10] Huang YX, Zhang L, Zhu SG. Construction of high-level transcription system *in vitro* by PCR. *Prog Biochem Biophys*, 1993, **20**(6): 464–466.

黄仪秀, 张磊, 朱圣庚. 利用 PCR 技术构建体外高效转录系统. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20**(6): 464–466.

- [11] Klement JF, Moorefield MB, Jorgensen E, *et al.* Discrimination between bacteriophage T3 and T7 promoters by the T3 and T7 RNA polymerases depends primarily upon a three base-pair region located 10 to 12 base-pairs upstream from the start site. *J Mol Biol*, 1990, **215**(1): 21–29.

- [12] Filippova SE, Ivanovskaia MG, Romanova EA, *et al.* Point contacts of T7 RNA polymerase in the promoter complex, as determined with phosphate-activated oligonucleotide derivatives. *Mol Biol (Mosk)*, 2002, **36**(4): 689–698.

- [13] Yin YW, Steitz TA. Structural basis for the transition from



- initiation to elongation transcription in T7 RNA polymerase. *Science*, 2002, **298**(5597): 1387–1395.
- [14] Nayak D, Guo Q, Sousa R. Functional architecture of T7 RNA polymerase transcription complexes. *J Mol Biol*, 2007, **371**(2): 490–500.
- [15] Chapman KA, Burgess RR. Constuction of bacteriophage T7 late promoters with point mutations and characterization by *in vitro* transcription properties. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(13): 5413–32.
- [16] Ikeda RA, CM Ligman, Warshamana S. T7 promoter contacts essential for promoter activity *in vivo*. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (10): 2517–2524.
- [17] Liu CH, Sun LQ, Tian B. Ribozyme which specifically cleave 12-lipoxygenase mRNA: *in vitro* activity and its dynamics. *Chin J Biotech*, 2000, **16**(1): 96–98.
- 刘灿辉, 孙仑泉, 田波. 特异切割 12—脂加氧酶 mRNA 的核酶体外活性及动力学研究. *生物工程学报*, 2000, **16**(1): 96–98.

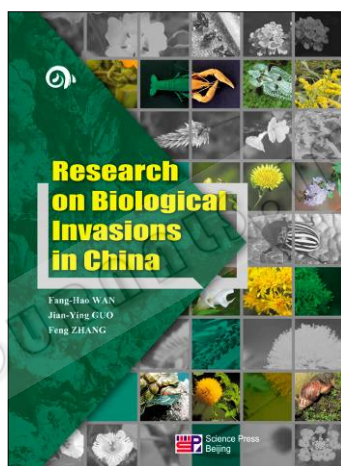
## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 中国生物入侵研究（中、英版）

万方浩 郭建英 张峰 等著

中文版 978-7-03-025800-7 ¥ 150 .00 2009年10月 出版

英文版 978-7-03-025799-4 ¥ 180 .00 2009年10月 出版



本书共分为九章,第一章主要分析了中国外来有害生物入侵现状、发生与发展趋势;第二章重点介绍了中国最具危害性与威胁性的 20 个农林入侵物种的分布与危害以及核心研究问题;第三章在因子分析及典范对应分析的基础上,深入剖析了外来有害生物成功入侵的因素;第四章应用不同的分析模式,评估了生物入侵对经济、生态与社会的影响;第五章重点构架与解析了中国生物入侵基础与应用研究的体系与模式,提出在基础理论研究方面需要重点关注的科学问题,简要介

绍了现阶段基础与应用研究的主题项目及代表前沿性研究的核心成果与突出亮点;第六章以典型农林入侵物种(病虫草)为对象,系统地归纳与总结了其入侵机制、扩张与暴发的生态学过程、与本地种的竞争与互作的关系以及对生态系统产生的影响等;第七章从预防预警、检测监测、应急处理、持续防控的技术与方法的角度,系统性总结了生物入侵防控技术的研究与发展;第八章从管理到研究等不同层面,提出了一些应对生物入侵的建议;第九章有针对性地提出了基础理论与防控技术的创新需求。

本书适合于从事生物入侵、生物多样性、生态安全、动植物检疫、植物保护与环境保护等领域的科研人员、大专院校师生以及行政管理人员等使用。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目