

核酶在我国植物抗病毒领域的研究和应用现状

刘萍, 祁喜涛, 胡建², 丁义峰, 常云霞, 韩德果, 赵乐

(1. 河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007; 2. 广东省农业科学院作物研究所, 广东广州 510640)

摘要 简要介绍了锤头型和发夹型核酶的结构、功能及催化机制, 并对我国利用核酶抗植物病毒病害方面的研究和应用现状作一概述。

关键词 锤头型核酶; 发夹型核酶; 植物病毒病

中图分类号 S432.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)13-2940-04

Study and Application of Ribozyme on Plant Antivirus in China

LIU Ping et al. (College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract In the article introduces briefly the structure, function and catalytic mechanism of Hammerhead ribozyme and Hairpin ribozyme were briefly introduced and the recent studies and application of ribozyme on inhibiting the propagation of plant viruses in China were summarized.

Key words Hammerhead ribozyme; Hairpin ribozyme; Plants virus disease

近年来, 植物病毒病害, 如烟草花叶病毒、马铃薯卷叶病毒、水稻条纹叶枯病毒等, 已成为植物病害中最大类群之一, 仅次于真菌病害, 给农业生产造成了巨大损失。人类在防治植物病毒病害的历史过程中积累了不少经验, 其中最有效的方法就是抗病育种。随着分子生物技术的发展, 我国在利用核酶防治植物病毒病害领域已取得了一定的进展, 笔者综述了我国在该方面的研究和应用现状。

1 核酶简介

核酶(Ribozyme), 又称催化 RNAs, 1981 年 Cech 和 Altman 在研究四膜虫 mRNA 前体的剪接中首先发现^[1,2]。随后的研究显示, 核酶广泛存在于自然界的植物、细菌、病毒和低等真核生物中^[3]。核酶是一类具有酶催化活性的 RNA 分子, 可与相应的 RNA 底物结合, 行使切割功能^[4]。因此, 有人形象地将核酶称为分子剪刀。目前已经认识的核酶有 7 种, 分别为 I 型内含子、II 型内含子、RnaseP、锤头型核酶、发夹型核酶、VS (Neurospora Varkud satellite ribozyme) 核酶和肝炎病毒(HDV) 核酶^[3]。根据分子大小将它们分为 2 类: 大分子核酶, 分子大小从数百个到 3 000 个核苷不等, 包括 RnaseP、I 型

内含子和 II 型内含子; 小型核酶, 分子比较小, 一般为 35 ~ 155 个核苷, 有锤头型核酶(Hammerhead)、发夹型核酶(或 Paperclip)、丁型肝炎和联包霉线粒体 RNA^[3,5-9]。

2 核酶的结构及其作用机制

在已发现的 7 种核酶中, 锤头型与发夹型核酶最具有应用价值。因此, 以下主要简述锤头型核酶与发夹型核酶。

2.1 锤头型核酶 锤头型核酶是世界上第 1 个获得完整 X 光晶体结构的催化 RNA, 分子空间结构呈 Y 字形(核酶和底物构成)^[10,11], 是最简单的结构形式, 大约 40 ~ 50 个核苷^[3]。由 2 个伸展的双臂(stem, stem) 和 1 个柄(stem) 组成, 另外还包括 3 个保守的单链^[12](图 1)。3 个螺旋区的长度是可变的, 其长度不同催化活性也不同。螺旋(stem) 的双链长度若超过 5 个 nt, 对切割有抑制作用^[13]。螺旋的双链长度也会影响催化活性, 2 对核苷酸活性最高^[14]。一般认为, 与底物配对的 stem 和 stem 有 6 或 7 个核苷酸残基会使酶有最佳活性; 但是, 拥有长 stem 和短 stem 比拥有长 stem 和短 stem 活性好^[12]。



图 1 锤头型核酶(a) 和发夹型核酶(b) 的二级结构(引自文献[3] 并修改)

核酶活性中心由 11 个保守和数目不等的非保守核苷酸 [5 GAAA(N)nNUH(N)n.CUGA(N)nGA3] 构成, 对催化反应起重要作用^[12,15]。核酶对靶 RNA 的裂解位点紧接在 NUH(N) 代表任意碱基, H 为 A、U、C) 的 3' 端下游, 以 GUC 的切割活性最高^[16], 此外还有 GUA^[17]、AUA^[18], 但 AUG 不是切割的有效位点^[15]。

在 Mg^{2+} 的参与下, 锤头型核酶将在特异位点切割底物, 生成 2',3'-环化的磷酸末端产物和 5'-OH 端的产物^[20]。大量研究表明, 核酶的催化活性需要金属离子参与。关于金属离子在核酶催化过程所起的作用, 比较流行的机制有 2 个: 单金属离子催化和双金属离子催化^[21]。前者机理如图 2(a), 在此模型中, 金属氢氧化物作为广义碱从 2'-OH 接受质子。活化的 2' 氧作为亲核试剂进攻切割位点的磷酸, 进而取代即将断裂的核苷酸上的 5' 氧^[22]。双金属离子机理如图 2(b), A 位点的金属离子作为路易斯酸(Lewis acid) 接受 2' 氧的电子,

使2-OH去质子更容易,B位点的金属离子也作为路易斯酸接受5'氧的电子,使OP键极化且键合力减弱,从而使氧原子更容易游离出来,2-O取代5-O与磷结合,从而产生5-羟



图2 锤头型核酶2种可能的催化机理(引自文献19)

2.2 发夹型核酶 发夹型核酶与底物结合形成的2级结构包括5个环和4个螺旋臂(图1),螺旋臂(stem)及对称的环1,5由核酶和底物组成,螺旋臂(stem)及环2,3,4由核酶自身折叠形成^[3,23,24]。这样的结构在三维空间上类似发夹(最早称为曲形针),因此称“发夹核酶”^[8]。4个螺旋包括18个碱基对,只有1个非正规碱基对A·G。腺苷酸残基A15连结2个结构域,使它们相互靠近相互作用,形成催化反应所必需的3级结构^[19]。

发夹型核酶既可催化切割反应又可催化连接反应,与锤头型核酶(其催化自切割的活性比催化连接反应的活性高100倍)相反,发夹型核酶催化连接反应的活性比催化切割反应的活性要高近10倍^[3,25]。顺式切割发夹型核酶的底物部分与核酶的其余部分是分离的,底物切割位点必须含有RYN*GUC这样一个序列,R代表嘌呤核苷酸,Y代表嘧啶核苷酸,N可以是任何核苷酸^[3]。发夹型核酶切割底物时stem必须含4个碱基对,而stem及stem却可显著延长其配对碱基数^[26,27]。催化发生时,发夹型核酶通过反式转酯反应于图1(b)的箭头处切割底物,产生5'-OH和2',3-环磷酸末端^[23]。

3 核酶的研究与应用

3.1 抗烟草花叶病毒 烟草花叶病毒(TMV)是分布广泛、侵染性很强的一类植物病毒,能感染30个科中的199种植物,在我国严重危害烟草、蔬菜和花卉等植物。为了抑制TMV的传播,人类曾使用过诸多方法,但效果均不明显。

近年来,随着人们对核酶研究的不断深入,利用核酶进行抗病毒研究已成为新的热点。许多研究者根据烟草花叶病毒基因组的基本结构,成功设计了针对TMV不同识别位点的核酶,取得令人兴奋的成果。于善谦等(1997)以烟草花叶病毒菜豆株30 kD蛋白质编码区(5 503~5 505)及CP基因编码区(5 952~5 954)的GUC为靶点,分别合成锤头型Rz-1和Rz-2及其相应的底物片段Sb-1(5 496~5 514)和Sb-2(5 942~5 963)的cDNA。体外实验表明,核酶Rz-1对底物Sb-1作用时,在底物与核酶的浓度比为1:10、1:20和1:50时均有明显酶切效果,且3种浓度比的酶解量未见明显差异;核酶Rz-2对底物Sb-2在底物与核酶浓度比为1:16时也有明显的切割效果^[28,29]。金春阳等(1998)选择烟草花叶病毒RNA中外壳蛋白装配起始区5 503~5 505的GUC作为靶点,按锤头模型设计并用化学方法合成了核酶Rz-1和小型化核酶Rz-2;核酶与底物体外作用的结果表明,在一定的浓度比下,2种核酶

基和2',3-环化磷酸的产物^[21]。大多数实验结果都倾向于支持双金属离子催化观点。

对底物Sb都有明显的降解作用^[30]。

在研究了单价核酶在体外具有特异切割特异RNA的活性的同时,一些学者又进行了多价核酶切割病毒RNA的探索。李洁等(1995)报道了2个简单的双价核酶对2个不同的TMV底物的体外切割活性。体外实验表明,双价核酶同一分子内的2个单元核酶能够独立地行使切割作用,互不影响,其专一性和切割效率也没有改变,并且双价核酶不仅能分别作用于2个靶序列,还能在一个系统中同时对这2个靶进行切割^[29]。宋任涛等(1999)将一个以黄瓜花叶病毒(CMV)外壳蛋白(CP)亚基因组RNA为底物的锤头型核酶(RZC)与专一切割烟草花叶病毒(TMV)移动蛋白(MP)亚基因组RNA的锤头型核酶(RZ1)相互串联构成一个双价核酶(RZ1C),体外实验表明,这个双价核酶能与相应的单价核酶RZ1和RZC一样专一而有效地切割CMV CP和TMV MP RNA^[31]。

体外实验的成功,为在生产上应用核酶抗病毒病害开辟了新的途径。杨建华等(1998)将设计的特异切割烟草花叶病毒RNA的锤头型核酶Rz-2转化烟草原生质体,通过检测TMVc对烟草原生质体的侵染性发现,转基因原生质体中TMV侵染性明显低于未转基因的对照组^[32]。

3.2 抗水稻条纹叶枯病毒 水稻条纹叶枯病是水稻的主要病毒病害之一。我国从1964年第1次报道该病发生,至今多次暴发流行,对水稻生产构成严重威胁。引起该病的水稻条纹叶枯病毒(Rice stripe virus,RSV),为一类特殊的单链、多组分RNA病毒^[33]。该类病毒经由飞虱传播,并能在介体昆虫体内增殖,经卵传递给下一代介体,在基因结构和组成上与侵染动物和人体的Phleboviruses和Unkiwiruses病毒相近似^[34]。

刘力等(1996)根据RSV序列,在分析其分子结构及病理特性的基础上设计合成了特异切割水稻条纹叶枯病毒RNA保守区及病害特异性蛋白(Disease specific protein,DSP)基因的核酶^[35]。病毒RNA保守区位于各RNA链的5'末端与3'末端,每一条链5'末端保守区的核酸序列完全一致,3'末端与5'末端的序列则几乎全部相同^[36]。一些研究认为,该区域与病毒RNA的识别、复制、装配有关。若用核酶破坏此区域,病毒的基本增殖环就难以进行。而DSP为病毒RNA4编码的一种蛋白,该蛋白在致病过程中出现,感病品种的细胞中量多,而抗病品种的细胞中量很少^[37]。体外切割实验表明,所设计的核酶具有特异切割RSV病毒的活性^[35]。

3.3 抗马铃薯卷叶病毒和马铃薯纺锤形块茎类病毒 马铃薯卷叶病毒(Potato leafroll virus, PLRV) 是一种严格由蚜虫以持久方式传播的病毒^[38], 属黄化病毒组(Luteovirus), 可引起马铃薯植株黄化、矮缩、卷叶、僵化等症状^[39]。由于 PLRV 难以控制, 给世界各地马铃薯生产造成巨大经济损失。因此, 有效地防治 PLRV 具有重要的经济效益。用常规育种方法培育抗马铃薯卷叶病毒品种费时费力, 且难以维持稳定的抗性, 无病毒种薯也难以防止再感染。因此, 至今对 PLRV 仍无特别有效的防治方法。

PLRV 是单链正链 RNA, 在寄主细胞内 PLRV 先转录成负链 RNA, 再以负链 RNA 为模板合成病毒正链 RNA。1990 年, Lamb J W 等设计了 2 个针对 PLRV 正链 RNA 的核酶, 能体外切割 PLRV(英国苏格兰分离株)的 CP 基因和复制酶基因^[40]。杨静华等(1998) 根据 PLRV 的繁殖特点, 设想把切割 PLRV 复制酶基因负链的核酶序列转入马铃薯, 利用核酶对 PLRV 复制酶基因负链的切割, 中断 PLRV 复制酶基因的合成, 从而干扰 PLRV 在马铃薯体内的复制和表达, 达到抗 PLRV 的目的^[41]。根据此设想, 设计、合成并克隆了马铃薯卷叶病毒中国分离株(PLRV-Ch) 复制酶基因负链 RNA 的核酶序列, 核酶的最佳切割位点位于 PLRV-S 序列的第 3 293 ~ 3 295 位核苷酸处^[42]。据此设计成一个具有切割活性的锤头状核酶, 其 5 端配对长度为 10 个核苷酸, 3 端为 12 个核苷酸^[41]。体外实验表明, 核酶 RNA 对 PLRV-Ch 复制酶基因负链 RNA 具有特异切割作用。

马铃薯纺锤形块茎类病毒(Potato spindle tuber viroid, PSTVd) 是引起马铃薯品种退化和产量降低的严重病害之一。已知 PSTVd 是在细胞核内复制和累积, 难以用行之有效的茎尖脱毒法和传统的抗病育种方法防治。马铃薯品种资源检测结果表明, 国内外许多优良的马铃薯生产品种都不同程度地感染有 PSTVd, 严重地阻碍了马铃薯新品种选育和良种繁育^[43]。邓文生等以类病毒 PSTVd 为靶子进行研究, 设计、合成并克隆了特异切割 PSTVd 正链和负链 RNA 的锤头型核酶基因。体外试验表明, 该核酶具有相当高的体外切割活性^[44]。应用植物基因工程技术将该核酶转入马铃薯, 经抗性筛选可获得抗 PSTVd 侵染的基因工程马铃薯^[43]。

3.4 抗番木瓜环斑病毒 番木瓜(Carica papaya L) 环斑病是热带和亚热带地区限制番木瓜生产的一种重要病害。引起病害的番木瓜环斑病毒(Papaya ringspot virus, PRV) 是马铃薯 Y 病毒组的成员之一, 由单一正链 RNA 构成^[45]。人们已试用过多种方法和措施来防治此病, 但收效甚微。近年来, 随着对核酶研究的不断深入, 利用核酶进行抗病毒研究已成为新的热点。赵志英等(1998) 通过基因工程手段将切割 PRV RNA 的核酶基因转入番木瓜, 分子鉴定表明已成功获得转基因植株; 进一步的攻毒试验表明, 转基因番木瓜对 PRV 具有一定的抗性^[45]。这是继杨建华等^[32]之后, 将核酶基因成功转入植物并获得抗性植株的又一成功实例。

此外, 孙洁霖等利用构建的核酶对苹果锈果类病毒(ASSVd) 负链的体外切割实验也表明具有特异切割活性^[46]。

4 核酶应用面临的问题及应用前景

核酶应用于抗植物病毒病, 虽然取得了令人兴奋的结

果, 但是也面临以下几方面尚需解决的主要问题:

4.1 切割效率低 由于切割位点的单一, 致使核酶切割效率较低。针对该问题, 能否设计一个由切割同一病毒不同位点的单价核酶串联而成的多价核酶, 对同一病毒 RNA 进行多位点同时切割, 只要其中有一个位点成功切割就可以达到抗病的目的, 从而提高其切割效率。

4.2 表达量不高 核酶的切割活性依赖高浓度的表达量, 当核酶表达量低时, 不能达到有效的抗病效果。因此能否通过构建多体自切割核酶, 并将其插入强启动子下游, 同时考虑植物基因表达时其他影响因素而达到提高表达量的目的。

4.3 稳定性差 核酶在体内最终是以 RNA 分子的形式起作用, 因此极易遭到细胞内 Rnase 的破坏。为解决此问题能否借鉴 mRNA 转录后 5 端加帽子结构, 3 端加 PolyA 尾巴的方法来提高核酶的稳定性。

4.4 依赖高浓度的表达量 核酶在植物体内的切割活性依赖高浓度的表达量, 尽管高浓度的核酶对宿主植物本身无毒害作用, 但对于未曾感染相应病毒的植物而言, 维持高浓度的核酶无疑是一种浪费。能否将核酶设计成象诱导酶一样, 平时在体内维持极低水平的表达量, 当感染相应病毒时可通过某种机制迅速提高表达量。

任何新技术的成熟都要经历一个不断完善的过程, 相信随着人们对核酶研究的不断深入和构效关系的进一步认识, 核酶抗病毒病的安全、高效等特点将会逐渐被人们所了解和应用, 核酶也将会在植物抗病毒病方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] CECHT R, ZAUG AJ, GRABOWSKI PJ. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of tetrahymena: Involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence[J]. Nature, 1981, 27(3): 487 - 489.
- [2] ALTMANS. Nobel lecture enzymatic cleavage of RNA by RNA[J]. Biosci Rep, 1990, 10(4): 317 - 322.
- [3] N KYLE TANNER. Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs[J]. FEMS Microbiology Reviews 1999, 23: 257 - 275.
- [4] KEHNTOFF M, ESQUEVEL E L, BRACH M A, et al. Clinical applications of ribozymes[J]. Lancet, 1995, 345(8956): 1027 - 1031.
- [5] CECHT R. Structure and mechanism of the large catalytic RNAs: group I and group II introns and ribonuclease P[C]// GESIELAND R F, ATKINS J F. The RNA World Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993: 239 - 269.
- [6] SYMONS R H. Ribozymes[J]. Curr Opin Struct Biol, 1994, 4: 322 - 330.
- [7] SCOTT W G, KLUG A. Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 220 - 224.
- [8] SYMONS R H. Part pathogenic RNAs and RNA catalysis[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 2683 - 2689.
- [9] TANNER N K. Ribozymes: characteristics and applications[J]. Virologie, 1998, 2: 127 - 137.
- [10] PLEY H W, FLAHERTY K M, MCKAY D B. Three dimensional structure of a hammerhead ribozyme[J]. Nature, 1994, 372: 68 - 74.
- [11] SCOTT W G, HINCH J T, KLUG A. The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage[J]. Cell, 1995, 81: 991 - 1002.
- [12] BIRKH K R, HEATON P A, ECKSTEIN F. The structure, function and application of the hammerhead ribozyme[J]. Eur J Biochem, 1997, 245: 1 - 16.
- [13] ORVAL B C, UHLENBECK O C. Hammerhead ribozymes with a faster cleavage rate[J]. Biochemistry, 1997, 36: 903 - 908.
- [14] TUSCH T, ECKSTEIN F. Hammerhead ribozymes: importance of stemloop for activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 6991 - 6995.
- [15] NAKAMAYE K L, ECKSTEIN F. AUA cleaving hammerhead ribozymes: attempted selection for improved cleavage[J]. Biochemistry, 1994, 33: 1271.
- [16] PERRINMAN R, DELVES A, GERLACH W L. Extended target-site specificity for a hammerhead ribozyme[J]. Gene, 1992, 113: 157.
- [17] KEESE P, BRUENING G, SYMONS R H. Comparative sequence and structure of circular RNAs from two isolates of Lucerne transient streak virus[J]. FEBS

- Lett,1983,159:185.
- [18] MILLER W A, HERCUS T, WATERHOUSE P M. A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleaving domain[J]. *Virology*,1991,183:711.
- [19] 王俊峰,廖祥儒,付伟. 小型核酶的结构和催化机理[J]. *生物化学与生物物理进展*,2002,29(5):674-677.
- [20] UHLENBECK O C. A small catalytic dinucleotide[J]. *Nature*,1987,328(6130):596-600.
- [21] PONIUS B W, LOTT B W, VON HPPPEL P H. Observations on catalysis by hammerhead ribozymes are consistent with a two divalent metal-ion mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1997,94(12):2290-2294.
- [22] DAHMS C, DERRICK W B, UHLENBECK O C. Evidence for the role of solvated metal hydroxide in the hammerhead cleavage mechanism[J]. *Biochemistry*,1993,32(48):13040-13045.
- [23] WALTER N G, BURKE J M. The hairpin ribozyme: structure, assembly and catalysis[J]. *Curr Opin Chem Biol*,1998,2:24-30.
- [24] 姚杰,杨克恭,陈松森. 发夹核酶的研究与应用[J]. *生命的化学*,2001,21(1):7-10.
- [25] BURKE J M. Hairpin ribozyme: current status and future prospects[J]. *Biochem Soc Trans*,1996,24:608-615.
- [26] MOOSBAUER J, TABLER M. A helix 1-extended hairpin ribozyme exhibits altered cleavage behavior in vitro[J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*,1997,7:79-87.
- [27] SARGUEIL B, PECCHA D B, BURKE J M. An improved version of the hairpin ribozyme functions as a ribonucleoprotein complex[J]. *Biochemistry*,1995,34:7739-7748.
- [28] 于善谦,吴政宏,朱乃硕,等. 两种核酶对烟草花叶病毒RNA片段的体外剪切[J]. *病毒学报*,1997,13(1):79-82.
- [29] 李洁,金海翎,张庆琪,等. 双价核酶对烟草花叶病毒的两个靶序列的专一切割作用[J]. *生物工程学报*,1995,11(1):20-26.
- [30] 金春阳,杨建华,岳颖,等. 核酶的化学合成及其对烟草花叶病毒RNA片段的体外剪切[J]. *复旦大学学报:自然科学版*,1998,37(2):191-196.
- [31] 宋任涛,张庆琪,李洁,等. 一个双价锤头型核酶在体外对两种不同植物病毒RNA的专一切割作用[J]. *植物生理学报*,1999,25(2):133-137.
- [32] 杨建华,王华林,于善谦,等. 核酶转基因载体的构建及在烟草原生质体中对TMV感染的抑制作用[J]. *复旦大学学报:自然科学版*,1998,37(4):547-550.
- [33] 刘力,陈声祥,陈光育,等. 我国水稻叶枯病病原性质研究[J]. *病毒学杂志*,1993(3):306-311.
- [34] KAKUTAN T, HAYANO Y, HAYASHI T, et al. Antisense segment of rice stripe virus: possible evolutionary relationship with plebeviruses and uukviruses[J]. *J Gen Virol*,1990,71:1427-1432.
- [35] 刘力,陈声祥,邱并生,等. 抗水稻条纹叶枯病毒核酶的设计、克隆及体外活性测定[J]. *中国病毒学*,1996,11(2):157-163.
- [36] TAKAHASHI M, TORIYAMA S, HAMAMATSU C, et al. Nucleotide sequence and possible antisense coding strategy of rice stripe virus RNA segment 2[J]. *J Gen Virol*,1993,71:769-773.
- [37] HAYANO Y, KAKUTAN T, MINOBE Y. Coding strategy of rice stripe virus: Major non-structural protein is encoded in viral RNA segment 4 and coat protein in RNA complementary to segment 3[J]. *Virology*,1990,177:372-374.
- [38] Harrison D B. Potato leafroll virus[J]. *CMV/AAB Description of Plant Viruses*,1984,19:291-293.
- [39] MATTHEWS R E F. Classification and nomenclature of viruses[J]. *Intervirology*,1982,17:140-141.
- [40] LAMB J W, HAY R T. Ribozyme that cleaves potato leafroll virus RNA within the coat protein and polymerase genes[J]. *J Gen Virol*,1990,71:2257-2264.
- [41] 杨静华,哈斯阿古拉,梁成罡,等. 特异切割马铃薯卷叶病毒复制酶基因负链的核酶研究[J]. *病毒学报*,1998,14(2):158-164.
- [42] MAYO MA, ROBINSON D J, JOLLY L A, et al. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA[J]. *J Gen Virol*,1989,70:1037-1051.
- [43] YANG X C, YIE Y, ZHU F, et al. Ribozyme mediated high resistance against potato spindle tuber virus in transgenic potatoes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1997,94:4861-4865.
- [44] 邓文生,杨希才,康良仪,等. 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒负链的多价核酶的构建和体外活性测定[J]. *病毒学报*,2000,16(4):370-373.
- [45] 赵志英,周鹏,曾宪松,等. 核酶基因转化番木瓜的研究[J]. *热带作物学报*,1998,19(2):20-25.
- [46] 孙洁霖,张朝春,周丽,等. 专一切割苹果锈果类病毒多体自切割核酶的克隆和转录物的体外活性测定[J]. *生物工程学报*,2002,18(5):588-592.