

4 遗传密码

现在可以想象的生物学问题中，也许除人脑思维之外最大的奥秘就是遗传密码。解析遗传密码对理解生命、研究生物、创立现代生物技术产业有广泛和深刻的意义。

遗传学发现和研究遗传规律，生物化学研究物质组成、代谢和能量。起源于生物化学与遗传学结合的分子生物学，其核心是研究遗传信息的产生、储存、复制、表达。知道 DNA 携带遗传信息、解析了 DNA 双螺旋结构之后，需要了解 DNA 如何携带信息，遗传信息如何决定生物学性状，核心问题就是遗传密码。

加入遗传密码研究的物理学家的代表为 Francis Crick 和 George Gamow，受其影响的生物学家代表如 Sydney Brenner，生化的代表有 Paul Zamecnik、Marshall Nirenberg 和 Severo Ochoa。物理学家及受其影响的生物学家重视思考，传统生物学家重视实验；物理学家重视信息及其传递，生物学家重视化学分子及其代谢。两种哲学、两条路线、两套人马，由相互隔离到相辅相成，成功地解析遗传密码。

4.1 基因与表型的关系

从孟德尔到摩尔根，我们知道基因影响性状，但不清楚从基因到性状，其间有多少步。



图 4-1 小鼠毛发实验及其结果，Cuénot，实验的推论

法国生物学家 Lucien Cuénot (1866-1951) 首先提出基因影响酶，酶决定色素而影响毛发颜色 (Cuénot, 1902, 1903; Wagner, 1989; Hickman and Cairns, 2003)。Cuénot 证明小鼠毛发颜色遵循孟德尔遗传律，鼠的灰对白是显性对隐性，他的实验结果为：F1 代灰鼠与白鼠交配得到的 F2 代全部是灰鼠，F2 代自交得到的 F3 代 198 只为灰鼠 (73.3%)、72 只为白鼠 (26.6%) (Cuénot, 1902) (约 3:1)。Cuénot 进一步发现，毛发灰色对毛发黑色也是显性，到 F2 代也是 3:1。而毛发黑色的小鼠与毛发黄色的小鼠交配后代毛发颜色是黑和黄的混合 (Cuénot, 1903)。

Cuénot 推断毛发的灰色源自黑色和黄色两种色素、黑毛源自黑色素、黄毛源自黄色素、白毛因为没有色素 (Cuénot, 1903)。

Cuénot 提出色素原 (Chromogen) 在酶的催化下形成色素。他称遗传因素为“mnémon”(记忆素)。黑鼠有两种记忆素，分别决定色素原和将色素原催化形成黑色素；黄鼠两种记忆素分别决定色素原和将色素原催化形成黄色素；灰鼠有三种记忆素，一种确定色素原，一种将色素原催化形成黑色素，一种将色素原催化为黄色素；白鼠全没有 (Cuénot, 1903; Wagner, 1989)。Cuénot 的模型隐含了基因与酶的对应关系。

英国医生 Archibald Garrod (1857-1936) 更为明确地提出基因与酶的关系。Archibald Garrod 于 1897 年接触到一例黑尿症患者，从此开始研究黑尿症 (alkaptonuria)。在 1859 年 Bödekerl 发现黑尿

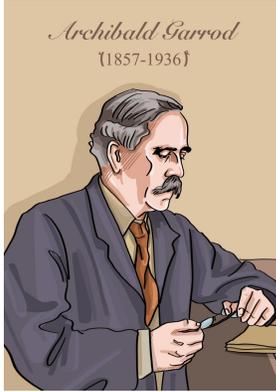


图 4-2 Garrod

症、1891 年 Wolkow 和 Baumann 确定造成黑尿症的化学分子(homogentisic acid, 尿黑酸, 2, 5 二羟苯乙酸)基础之上, Garrod 收集了当时有记载的 31 例, 指出黑尿症有家族聚集倾向 (Garrod, 1899)。他指出黑尿症不是感染造成, 而是人体本身的代谢出现异常、人与人之间可以有化学差异 (Garrod, 1901)。他发现近亲繁殖家庭发病率提高 (Garrod, 1901), 符合孟德尔遗传规律、为常染色体隐性遗传 (Garrod, 1902)。1908 年, 他在皇家内科医生学院 Croonian 讲座系列演讲, 总结包括黑尿症、白化病在内的多个先天代谢疾病, 提出“先天性代谢错误” (Garrod, 1908)。

1932 年, 黑尿症被确定为单基因突变为 (Hogben, Worrall and Zieve, 1932)。导致黑尿症的基因突变编码尿黑酸 1, 2 二氧化酶 (homogentisate 1,2-dioxygenase, HGD)。HGD 催化尿黑酸成为马来酰乙酰醋酸。HGD 基因突变造成 HGD 酶失去功能, 结果是尿黑酸过多 (La Du *et al.*, 1958)。编码 HGD 的基因位于人的三号染色体 (Pollak *et al.*, 1993; Janocha *et al.*, 1994)、小鼠的十六号染色体 (Montagutelli *et al.*, 1994)。

基因与酶的关系, 最初研究用鼠和人, 后续用了果蝇和真菌。

4.2 一个基因 一个酶：果蝇

果蝇眼的色素研究, 对基因与酶的关系有重要的推动。这一研究起源于摩尔根研究嵌合体。通常, 同一个个体全身不同部位的基因相同。但可以自发、也可以用实验方法造成不同部位基因有所不同。最早发现的是有些动物自发出现“雌雄嵌合体” (gynandromorph), 到二十世纪初, 摩尔根在果蝇中也发现雌雄嵌合体, 他的解释是: 果蝇雌性有两条 X 染色体, 而雄性只有一条 X 染色体, 在雌性发育早期如果某个细胞丢失了一条 X 染色体, 而其他细胞没有丢失, 那么这一个细胞及其分裂出来的后代细胞就是雄性, 而其他细胞照样是雌性, 所以形成雌雄嵌合 (Morgan, 1914)。丢失 X 染色体发生的越早, 雌果蝇背景下雄性细胞的数量占的比例就越高。最高当然是百分之五十, 因为在两个细胞时其中一个就丢失了 X 染色体, 其结果是单个果蝇的半个身体是雌性、半个身体是雄性。如果丢失发生的比较晚, 就只有少数细胞是雄性, 大部分是雌性。分析雌雄嵌合体, 可以研究特定基因的作用是在表达基因的细胞中起作用 (细胞自主作用)、还是基因产生于 A 细胞但影响临近本身不表达它的 B 细胞 (细胞非自主作用)。用雌雄嵌合体, 摩尔根发现多个基因是细胞自主作用 (Morgan and Bridges, 1919)。

摩尔根的学生 Alfred Sturtevant 发现, 虽然很多基因是细胞自主作用, 但影响果蝇眼睛颜色的 *vermilion* (“鲜红”) 基因不是 (Sturtevant, 1920)。他的实验如下: 雌果蝇 X 染色体上的几个隐性遗传基因(如 *scute*、*cut*、*forked*)是杂合体, 在她们出现雌雄嵌合体时, 背景是雌果蝇, 因为有一条野生型染色体所以是野生型表型, 而其因为失去野生型 X 染色体而基因型为雄性的身体部位 (例如: 头部), 多个表型都与其基因型一致, 说明这些基因是细胞自主作用。不过, *vermilion* 却不同, 虽然头部的基因型是 *vermilion*、身体其他部分基因型是野生型, 但头部表型仍然是野生型 (眼睛是野生型, 而不是 *vermilion*), 说明身体部位的细胞表达了野生型的 *vermilion* 基因, 可以弥补眼睛的颜色, 让后者仍然呈现野生型, *vermilion* 基因的作用是细胞非自主 (Sturtevant, 1920)。这一发现首次提示身体其他部位的 *vermilion* 基因的产物, 可能影响一种可以弥散分子, 弥散到头部, 影响眼睛的颜色 (Ephrussi, 1942)。

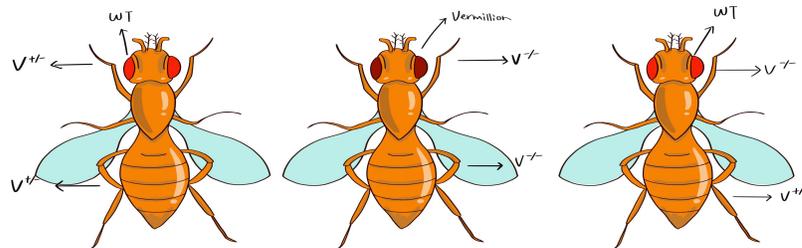


图 4-3 *vermilion* 嵌合体

为进一步确定基因与眼色的关系，俄国旅法生物学家 Boris Ephrussi (1901-1979) 与美国遗传学家 George Beadle (1903-1989) 发明了果蝇组织移植的方法。Ephrussi 和 Beadle 在多方面不一样，但研究背景互补。Ephrussi 来自俄国犹太银行家族，Beadle 来自美国农民家庭；1922 年 Ephrussi 毕业于法国 Sorbonne 大学的本科，Beadle 毕业于 Nebraska 农学院；Ephrussi 于 1932 年获 Sorbonne 的博士，Beadle 于 1931 年获 Cornell 大学博士；Ephrussi 的学术背景是实验胚胎学，Beadle 通过研究生导师 Rollins Emerson (1873-1947) 和同学 Barbara McClintock (1902-1992) 等得到了世界上最好的遗传学训练。Beadle (1931) 和 Ephrussi (1934) 先后到加州理工学院成为摩根的博士后，两人在学术上“情投意合”，很快开始合作。



图 4-4 Ephrussi 和 Beadle

1935 年，他们共赴巴黎到生物研究所新建的 Ephrussi 实验室合作研究。他们设计从一个果蝇中取一块组织，放到另外一个果蝇体内，看被移植的组织块（移植物）和宿主之间有没有影响、有什么影响（Ephrussi and Beadle, 1935; Beadle and Ephrussi, 1936）。

形成果蝇成虫眼睛的前体，在幼虫和蛹中称为眼成虫盘（eye disc）。野生型的眼盘，移植到野生型的宿主后，产生的眼睛仍然显现野生型颜色；*vermilion* 突变型的眼盘，移植到 *vermilion* 基因型的宿主后，产生的眼睛显现 *vermilion* 的眼色；野生型眼盘移植到 *vermilion*，呈野生眼色；*vermilion* 眼盘移植到野生型，呈野生眼色。以上结果，与雌雄嵌合体的实验结果一致，都能用野生型可以营救 *vermilion* 来解释。而且移植的眼盘放在宿主的肚子里，不在眼睛的位置，仍能营救。更说明基因因为野生型的宿主可以产生弥散性物质营救 *vermilion* 的眼睛，使后者呈现野生型眼色（Beadle and Ephrussi, 1936）。他们检测了二十多种基因型，发现野生型眼盘移植到含有一个或两个基因突变的宿主后，形成的眼色多是野生型（除外 *claret* 和 *bordeaux* 两个基因）。但这些基因突变的眼盘移植到野生型宿主的结果各不相同（有些如 *vermilion* 或 *cinnabar* 或 *claret* 基因突变种的眼盘移植到野生型呈野生型颜色，有些如 *white* 或 *apricot* 基因突变种的眼盘移植到野生型呈原来突变的眼色即 *white* 或 *apricot*）。而如果用 *vermilion* 基因突变种的眼盘移植到其他基因突变种的宿主，各不相同（移植到 *cinnabar* 或 *white* 呈野生型眼色，移植到 *claret* 或 *ruby*，呈 *vermilion* 眼色）。

他们专门关注 *vermilion* 基因突变、*cinnabar* 基因突变和野生型的关系：野生型眼盘移植到 *vermilion* 或 *cinnabar* 基因突变宿主，形成的眼睛都是野生型；*cinnabar* 基因突变种或 *vermilion* 突变种的眼盘移植到野生型得到的眼睛呈野生型眼色，*vermilion* 基因突变种的眼盘移植到 *cinnabar* 形成的眼睛呈野生型，但 *cinnabar* 基因突变的眼盘移植到 *vermilion* 宿主会形成 *cinnabar* 眼色。他们的推论是：*vermilion* 基因确定 v^+ 物质，*cinnabar* 基因确定 c^+ 物质，野生型果蝇具有这两种物质所以呈现野生型眼色，*vermilion* 基因突变种缺乏 v^+ 物质而呈 *vermilion* 眼色，*cinnabar* 基因突变种缺乏 c^+ 物质而呈 *cinnabar* 眼色。 v^+ 物质变成 c^+ 物质，*vermilion* 突变种眼盘可以被野生型和 *cinnabar* 突变型所营救产生野生型眼色是因为野生型和 *cinnabar* 都能产生可弥散的 v^+ 物质，而 *cinnabar* 基因突变种的眼盘缺乏 c^+ 物质、可以被野生型宿主所弥补过来的 c^+ 物质所弥补，但不能被 *vermilion* 基因突变种宿主所弥补，因为宿主缺 v^+ 物质、而移植物自己有 v^+ 物质但缺乏 *cinnabar* 而不能将 v^+ 物质转化为 c^+ 物质。 v^+ 物质在 c^+ 物质上游。

Implant	Host	Implant Phenotype
+	<i>cn</i>	+
+	<i>v</i>	+
<i>cn</i>	+	+
<i>v</i>	+	+
<i>cn</i>	<i>v</i>	<i>cn</i>
<i>v</i>	<i>cn</i>	+

图 4-5 移植实验结果

经过他们和其他人如 Butenandt (1903-1995) 的研究，到 1940 年代初便知道眼睛的色素由色氨酸经过多个酶促反应步骤而合成，*vermilion* 和 *cinnabar* 等基因产生特定的酶（Beadle and Tatum, 1941b; Ephrussi, 1942）、每一步酶促化学变化通常由一个基因所控制（Beadle, 1945）。

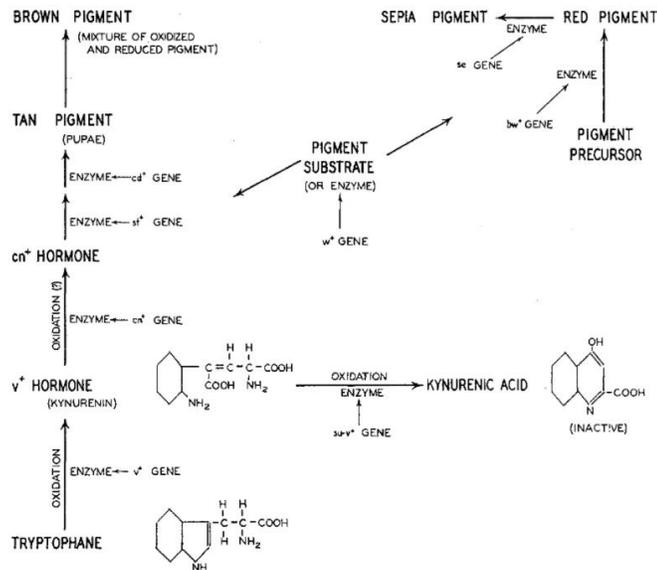


图 4-6 Beadle and Tatum (1941b): 基因和酶促反应

4.3 一个基因 一个酶：红色面包霉

Beadle 回到美国后，先在哈佛任教，1937 年到斯坦福生物系任教。Edward Tatum (1909-1975) 加入 Beadle 实验室，开始两人的合作。他们先是继续研究果蝇眼色，然后开始用称为红色面包霉 (*Neurospora*) 的霉菌做研究。

美国纽约植物园的 Bernard Dodge (1872-1960) 开创了红色面包霉的研究 (Dodge, 1927, 1952)。在摩尔根离开哥伦比亚大学去加州理工学院任生物系第一任系主任时，Dodge 建议摩尔根带上红色面包霉。摩尔根让研究生 Carl Lindegren (1896-1986) 把红色面包霉的遗传学作为其毕业论文 (Lindegren, 1932)，Lindegren 毕业的 1931 年正好是 Beadle 到摩尔根实验室的那年。

1941 年，Beadle 和 Tatum 选择红色面包霉研究生化遗传学 (Beadle and Tatum, 1941)。红色面包霉的细胞容易培养，生活周期短，有两种性别（或称交配型），其基因组是单倍体（七条染色体），容易产生突变株。红色面包霉生长需要的营养成分是：1) 碳源（如糖、淀粉、或脂肪），2) 氮源（ NO_3^- 、 NH_4^+ 、或有机氮），3) 提供磷酸、钾和微量元素的无机盐，4) B 类维生素的生物素 (Beadle, 1945)。Beadle 和 Tatum 设计用 X 线诱导基因突变，寻找对于生长所必需的条件性基因：如果一个基因突变之后，在含全部已知养料的培养基（“完全培养基”）中能够生长，而在缺乏一种特定营养成分的培养基（“基础培养基”）中不能生长，说明这一基因对于这一特定营养成分是必需的。在他们第一次筛选中，从约两千株突变种中，他们发现了三种突变株，一株不能合成维生素 B6 (pyridoxine, 吡哆醇)，一株不能合成对氨基苯甲酸 (para-aminobenzoic acid)，一株不能合成维生素 B1（进一步分析是可以合成 B1 的嘧啶部分、但不能合成 B1 的噻唑部分）(Beadle and Tatum, 1941)。

用这一方法，他们和其他科学家分析了多个化学反应链，为每一个反应链找到了多个参与的基因：如色氨酸合成的两个基因 (Tatum and Bonner, 1944)、鸟氨酸循环的 7 个基因 (Srb and Horowitz, 1944) 等等。他们的研究有机地结合了遗传学和生物化学，例如精氨酸合成的两个前体和两个酶，直接提示精氨酸代谢的机理。

Beadle 和 Tatum 的研究结果也为“一个基因-一个酶”的概念提供了强烈的支持。

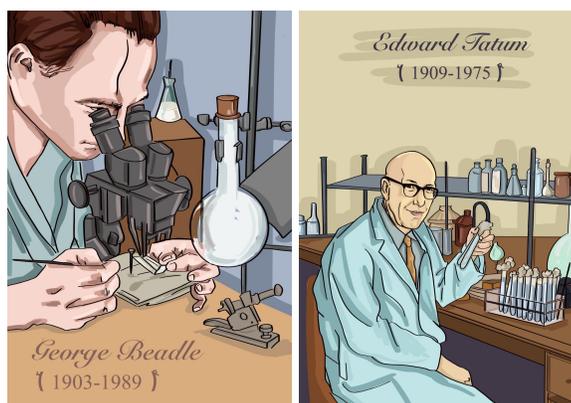


图 4-7 Beadle 和 Tatum

4.4 基因突变与蛋白质中氨基酸变化

果蝇或红色面包菌如果有健康要求的话，它们的一些突变也就是其遗传性疾病。

红细胞通过血红蛋白（hemoglobin, Hb）在肺部与空气交换获得氧气，依赖血液到人体各个部位，释放氧气。血红蛋白蛋白质具有四个亚基，两条 α 链、两条 β 链。血红蛋白功能降低是贫血的原因之一。1911年，美国芝加哥医生报道第一例后来称为“镰刀状红细胞贫血”的病例（Herrick, 1910），至1922年共四例（Washburn, 1911; Cook and Meyer, 1915; Mason, 1922），皆非裔而被误认为只有非裔发病。

南非出生的牛津大学遗传学家 Anthony Allison (1925-2014) 发现在非洲不同地区生活的人有不同，镰刀状红细胞贫血者在疟疾高发区多于疟疾低发区，可能因为其疟疾抵抗力更高（Allison, 1954; Allison, 2004）。

1949年，对镰刀状红细胞贫血的研究在遗传和化学上都有突破。家系分析显示镰刀状红细胞贫血是单基因的隐性遗传病（Beet, 1949; Neel, 1949），一条染色体携带突变者无症状、两个染色体的等位基因都突变才发病。化学家鲍林（Linus Pauling, 1901-1994）通过对比病人和正常人血红蛋白在不同 pH 环境下的电泳行为，揭示镰刀状红细胞贫血的血红蛋白（HbS）不同于正常人的血红蛋白（HbA）（Pauling *et al.*, 1949）。鲍林因此提出“分子病”的概念。

因为德国迫害犹太人而被迫于14岁移民英国的 Vernon Ingram (1924-2006) 背景是化学，偶然因素得到奥地利移民英国犹太科学家 Max Perutz (1914-2002) 的许可于1952年到英国剑桥的卡文迪许实验室工作（Ingram, 2004）。卡文迪许实验室当时的主任是发明X射线衍射分析分子结构的小布拉格（W. Lawrence Bragg, 1890-1971），他鼓励用X射线衍射分析生物分子的晶体结构。1947年，Perutz 和 John Kendrew (1917-1997) 在卡文迪许实验室用英国医学研究委员会（MRC）的经费建立了生物系统分子结构研究单元（1957年改称 MRC 分子生物学实验室）。1948年物理学家 Hugh Huxley (1924-2013) 加入（带来了肌肉研究的突破），1949年英国物理学家 Francis Crick (1916-2004) 到 Kendrew 实验室做博士后，1951年美国遗传学家 James Watson (1928-) 加入。Ingram 加入的正是物理学家和化学家在改变生物学的的时间和地点。

Perutz 长期用 X 线衍射的方法解析血红蛋白的结构，其中包括改进方法。Ingram 很快完成了 Perutz 交给的课题，正在缺课题的时候，自己用胰蛋白酶把血红蛋白切成多个片段。Allison 把镰刀状红细胞贫血患者的血红蛋白（HbS）课题带到剑桥，他试图研究 HbS 的晶体结构。Perutz 和 Crick 建议 Ingram 用上自己的血红蛋白片段分析方法来帮助分析 HbS（Ingram, 2004）。Ingram 对比了作为正常人自己的 HbA 和 Allison 留下的 HbS 样本。他首先用胰蛋白酶，它水解蛋白质中赖氨酸和精氨酸的羧基端，可以把 HbS 水解为 26 个片段（胰蛋白酶解肽，tryptic peptides），将一个当时较难分析的大的蛋白质变成较小的片段，然后将片段进行电泳分析。他进行了双向电泳，第一向在特定 pH 下根据电荷进行分离，第二向与第一向垂直，用丁醇和醋酸混合溶液受不带电氨基酸侧链影响分离

片段。最后通过观察肽段的电泳行为，比较 HbA 和 HbS 的差别 (Ingram, 1956; Ingram, 2004)。他发现，HbS 只有一个肽段与正常不同 (Ingram, 1956)。

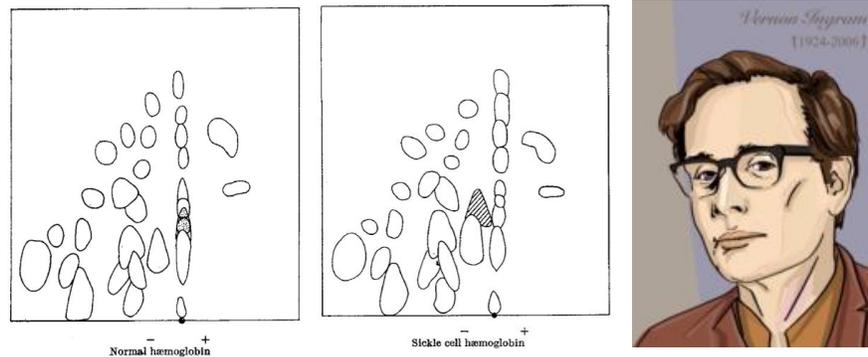


图 4-8 双向电泳：(左) 正常与 (中) 镰刀状红细胞贫血的血红蛋白，(右) Ingram

进一步分析这一肽段，他发现 HbS 与 HbA 的差别只是一个氨基酸 (Ingram, 1957)，血红蛋白 β 亚基的第六位氨基酸由正常人的谷氨酸变成了 HbS 的缬氨酸。更多的研究表明还有多种血红蛋白基因的突变造成不同的贫血。

由镰刀状红细胞贫血的分析，更清晰了基因与蛋白质的关系：基因突变影响蛋白质所含氨基酸的组成和序列。

4.5 生物学的中心法则

DNA-RNA-蛋白质。

这一简单的遗传信息流向图，是生物学最重要的规律之一。它的提出，与科学家对蛋白质合成的思考和遗传信息的表达都有关系。

早期对蛋白质合成的研究很少，直到 1935 年才知道成年动物有大量的蛋白质合成 (Campbell and Work, 1953)。1950 年代初期英国生物化学家 Frederick Sanger (1918-2013) 测定胰岛素的氨基酸序列 (Sanger and Tuppy, 1951; Sanger and Thompson, 1953)，大家不再疑问氨基酸线性排列为蛋白质的概念 (Campbell and Work, 1953)。

蛋白质是怎么合成的？是由几个氨基酸组成的短肽进行加合，还是模板指导蛋白质合成？

多聚机理 (Caldwell and Hinshelwood, 1950)：先由几个氨基酸合成短肽，短肽缩合成为更长的肽，也许就用蛋白水解酶催化水解的逆反应，也可能有专门的转肽酶，例如用已知的组织蛋白酶 (cathepsin)。

模板假说雏形起源于 1947 年。



图 4-9 Sanger

Phe. Val. Asp. Glu. His. Leu. CysSO_3H . Gly. Ser. His. Leu. Val. Glu. Ala. Leu. Tyr. Leu. Val. CysSO_3H . Gly. Glu. Arg. Gly. Phe. Phe. Tyr. Thr. Pro. Lys. Ala
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

图 4-10 胰岛素 A 链氨基酸序列 (Sanger and Tuppy, 1951)

1947年,英国物理学家 William Astbury 提出核酸链含一定周期性的间隔距离与蛋白质中氨基酸间距很接近可能并非巧合。Astbury 是老布拉格 (William Henry Bragg, 1862-1942) 的学生,继承了 X 线衍射分析的方法,研究过蛋白质如角蛋白,发现蛋白质的两个氨基酸之间的距离为 3.7\AA 。1938 年他和 Florence Bell 用 X 线衍射分析了 DNA 的结构,发现垂直于长轴的周期性间隔为 3.34\AA (Astbury and Bell, 1938)。这两个在二战前获得的实验结果,是 Astbury 在战后提出 DNA 可能与蛋白质有关的基础,他认为两个距离不太可能是数字的巧合,而有重要意义 (Astbury, 1947)。

1947年,法国生物学家 André Boivin 提出:细胞核的 DNA 通过催化作用主导细胞浆内 RNA 的构建, RNA 依次控制细胞浆内产生酶 (Boivin and Vendrely, 1947)。

1952年,美国罗彻斯特大学的 Alexander Dounce (1809-1997) 提出:肽链中氨基酸的特异安排是由相应的核酸分子中核苷酸特异安排所衍生。他具体提出了核酸复制、核酸指导蛋白质产生的化学模型 (Dounce, 1952)。

1953年,他进一步提出:“脱氧核糖核酸基因分子作为核糖核酸合成的模板,基因模板上合成的核糖核酸再作为蛋白质合成的模板...模板顺序为脱氧核糖核酸-核糖核酸-蛋白质” (Dounce, 1953)。

曾有担心蛋白质长链趴在核酸链上,很快有解释完全可以是部分趴在一起,合成后很快脱离模板 (Dalglish, 1953)。

1954年,美国遗传学家 James Watson (1928-) 曾手画一张:DNA-RNA-蛋白质的信息流,但他那时认为 DNA 是化学改变成为 RNA。

1956年10月, Crick 写下了“蛋白质合成的想法”,但只在朋友间传阅。他提出生物信息流的中心法则:“信息到了蛋白质之后,就出不来。在此,信息是指氨基酸序列或相关序列。所以,可以发生的是 DNA 给 DNA, DNA 给 RNA (甚至 RNA 给 DNA), RNA 给 RNA, RNA 给蛋白质,但绝不发生蛋白质给蛋白质、蛋白质给 RNA 或蛋白质给 DNA 传信息”。也就是说:DNA 指导 DNA 产生, DNA 指导 RNA 产生, DNA 可能指导蛋白质产生, RNA 可能指导 RNA 产生也可能指导 DNA 产生, RNA 指导蛋白质合成。但是蛋白质的信息不能流向 DNA、不能流向 RNA。

1958年, Crick 在“实验生物学会会议”上阐述“中心法则” (Crick, 1958)。

1970年,他再次阐述“分子生物学的中心法则” (Crick, 1970)。

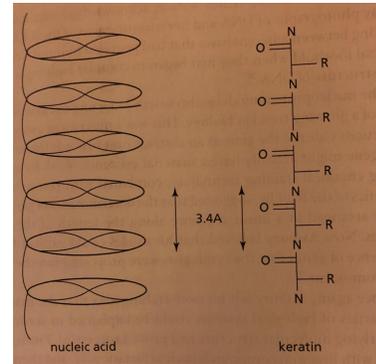


图 4-11 核酸序列与蛋白质内氨基酸序列

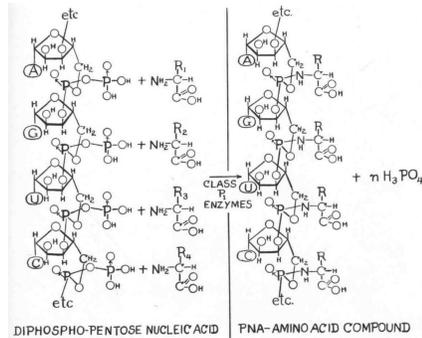


图 4-12 核酸与蛋白质的关系

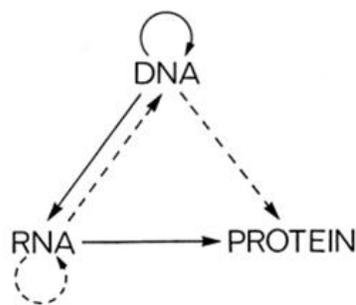


图 4-13 克里克提出的中心法则

细胞内有多种 RNA，其中作为蛋白质合成模板的为信使 RNA (messenger RNA, mRNA)。合成蛋白质的微粒体组分富含 RNA，在电子显微镜下可以观察到合成蛋白质的核糖体 (Hogeboom, Schneider and Pallade, 1948, 1953; Hultin, 1950; Siekevitz and Zamecnik, 1951)。核糖体内大量的 RNA 为稳定的核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA)，而不稳定的少部分 RNA 是 mRNA。1953 年，Alfred Hershey (1908-1997) 发现噬菌体感染细菌细胞后， ^{32}P 在最初 5 分钟快速进入一类新的、之前细菌没有的 RNA，10 分钟达到高峰，以后维持 (Hershey, 1953)。这一发现被验证，而且确定进入的 RNA 其核苷酸组成不同于细菌之前有的 (Volkin and Astrachan, 1956)。T2 噬菌体导致的新 RNA 不同于 T7 噬菌体引起的 (Volkin, Astrachan and Countryman, 1958)。T2 噬菌体引起 T2 特异的 RNA 形成、T7 噬菌体引起 T7 特异的 RNA (Nomura, Hall and Spiegelman, 1960)。进一步研究发现，T2 噬菌体引起细菌产生的 T2 特异的 RNA 可以与 T2 噬菌体的 DNA 进行分子杂交，而 T7 特异的细菌 RNA 可以与 T7 噬菌体 DNA 进行分子杂交 (Hall and Spiegelman, 1961)，支持这类 RNA 可能是模板 RNA。

法国生物学家 François Jacob (1920-2013) 和 Jacques Monod (1910-1976) 提出基因调控的操纵子模型时，提出了 mRNA 的名词及其作用 (Jacob and Monod, 1961)。1961 年，英国和美国科学家证明了 mRNA 的存在 (Brenner, Jacob and Meselson, 1961) 和 Gros *et al.*, 1961)。

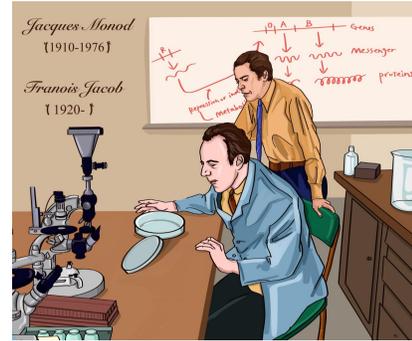


图 4-14 Jacob 和 Monod 及操纵子

4.6 遗传密码的理论思考

在 1953 年，蛋白质合成是按模板指导、还是小肽逐步缩合，还不能分清 (Campbell and Work, 1953)。但沃森和克里克提出的 DNA 双螺旋模型刺激科学家加入研究遗传信息，特别是遗传密码。

由苏联移民美国的犹太物理学家 George Gamow (1904-1968) 不仅在物理学作出重要贡献，也是重要的科普作家。他推进了遗传密码的研究。1954 年，他提出遗传密码的本质：遗传信息是由 4 个核苷酸组成的字，蛋白质是由 20 种不同氨基酸组成的，遗传密码就是如何将 4 个核苷酸组成的文字翻译为 20 个氨基酸组成的文字 (Gamow, 1954)。他具体提出在双螺旋上四个位置相近的核苷酸形成一个菱形的洞，因为 4 个核苷酸的不同，可以形成 20 种不同的洞，那么可能这就是密码的机制 (Gamow, 1954; Gamow, Rich and Yčas, 1956)。

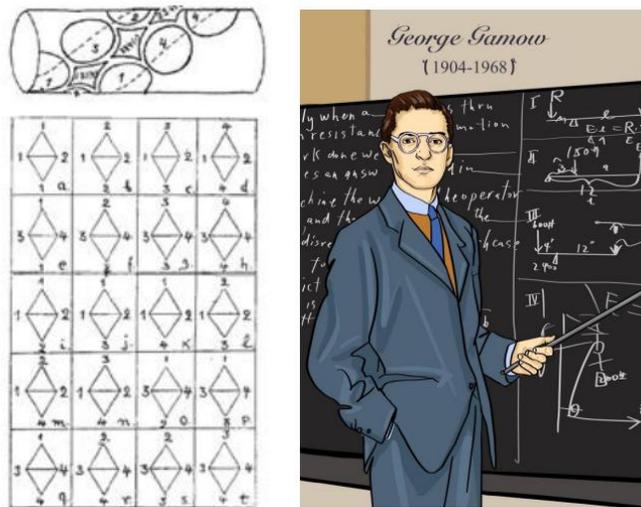


图 4-15 Gamow 密码模型

具体的数字正好吻合的 4 对 20 很有趣，但不代表就是正确的。他还提出了修饰的模型如三角模型 (Gamow, Rich and Yčas, 1956)。

1954 年夏天, Crick 认为除了核酸组成的密码, 还需要有酶参与蛋白质合成。如果要兼顾两者, 那么就需要有一种分子, 其一端可以与核酸的遗传密码通过氢键介导的碱基配对, 另一端通过酶促反应的特异性与氨基酸结合。他把这一想法写下来给了“RNA 领带俱乐部”的成员 (Crick, 1955), 其中提出了一种新的分子 (adaptor 分子), 一端是碱基配对, 而另一端通过酶促反应识别氨基酸, 无需核酸模板与氨基酸之间有直接的立体化学匹配 (Crick, 1955)。

Dunce 也提出过需要酶参与识别核苷酸与特定氨基酸的匹配 (Dunce, 1952; Dunce, Morrison and Monty, 1955)。Dunce 的匹配需要酶, 但无需类似 tRNA 的分子。

从统计上, 编码 20 个氨基酸至少需要三个核苷酸连在一起 (三联密码) 才有超过 20 种可能性。两个相邻的三联密码是共用其中一个或两个核苷酸 (重叠编码)、还是不重叠? Sydney Brenner (1927-2019) 分析了当时已知的蛋白质的氨基酸序列, 发现一个氨基酸旁边可以是任何一种氨基酸, 所以三联密码是非重叠编码 (Brenner, 1957)。Gamow 等实际得到了同一结论 (Gamow, Rich and Yčas, 1956)。Crick 等进一步分析认为有固定起始点、密码有简并性 (多种三联密码编码同一种氨基酸) (Crick *et al.*, 1961)。

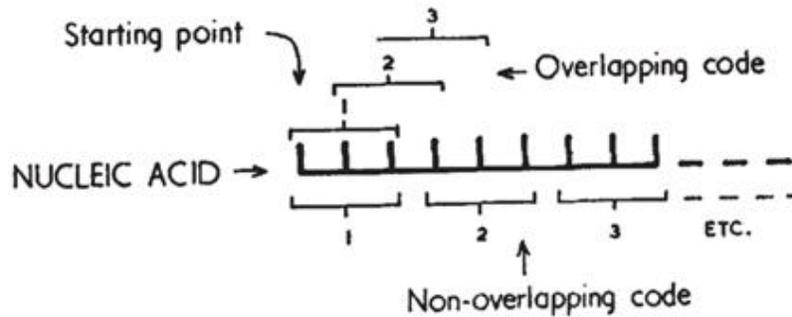


图 4-16 遗传密码的排列 (Crick *et al.*, 1961)

酶的参与, 特异识别的机理部分来源与酶选择氨基酸, 所以不能依靠理论来解决编码问题, 需要实验。

4.7 tRNA

1940 年代后期, 因为放射性同位素的合成和检测逐渐推广, 多个实验室开始用放射性同位素监测蛋白质合成。可以体内示踪、也可以体外示踪。取动物肝脏的切片, 加入 ^{35}S 或 ^{14}C 标记的氨基酸, 孵育后, 沉淀蛋白质, 检测其中放射性氨基酸掺入 (Melchior and Tarver, 1947; Frantz *et al.*, 1947; Borsook *et al.* 1948; Winnick *et al.*, 1948; Zamecnik *et al.*, 1948) 动物组织切片含有细胞, 也可以制作组织匀浆, 打破细胞, 成为无细胞体系, 同样可以检测蛋白质合成 (Winnick, Friedberg and Greenberg, 1948; Borsook *et al.*, 1948, 1950; Hultin, 1950; Siekevitz and Zamecnik, 1951; Siekevitz, 1952; Zamecnik and Keller, 1954; Littlefield *et al.*, 1955)。其中, 哈佛医学院附属麻省总医院 (MGH) 的 Paul Zamecnik (1912-2009) 领导的实验室有很多发现。蛋白质合成需要 ATP 功能, 需要氨基酸作为原料, 需要微粒体提供合成场所, 需要在他们研究过程中分离的所谓可溶、热敏组分。这一可溶、热敏组分对于氨基酸的活化很重要, 氨基酸 (AA) 首先结合于酶, AA 的羧基端 (C 端) 与 ATP 反应, 得到形成 AA-AMP (Hoagland, 1955; Hoagland, Keller and Zamecnik, 1956)。一个出乎他们意料之外的发现是: 他们标记的氨基酸, 居然在一定时期与 RNA 结合。因为这种 RNA 存在于他们分离过程的可溶部分, 他们称之为可溶 RNA (soluble RNA, sRNA) (Hoagland, Zamecnik and Stephenson, 1957; Ogata and Nohara, 1957; Hoagland *et al.*, 1958)。从时程上观察, 标记同位素的 AA 先进入 sRNA、后进入蛋白质 (Hoagland *et al.*, 1958)。

Zamecnik 及做实验的 Mahlon Hoagland (1921-2009) 等一开始不理解为什么氨基酸会结合 RNA, 当时在哈佛大学校本部的沃森于 1956 年圣诞节左右访问 Zamecnik 实验室, 看到这一结果告诉他们

发现的正是 Crick 预计的 adaptor 分子。当时 Hoagland 有点生气：我发现的分子，你们早就预计到了？但很快崇拜 Crick 的先见之明(Hoagland, 2004)。虽然 Zamecnik 实验室最初命名 adaptor 分子为 sRNA，以后改名为转移 RNA (transfer RNA, tRNA)。

Zamecnik 实验室没有纯化到具体的 tRNA 分子 (Stephenson and Zamecnik, 1961)。Cornell 大学的化学家 Robert Holley (1922-1993) 加入蛋白质合成研究晚些，也发现了 tRNA 的活性 (Holley, 1957)，纯化到了特异的 tRNA (Apgar, Holley and Merrill, 1962; Holley *et al.*, 1965)，确定了携带丙氨酸的 tRNA 的核酸序列，提出其三叶草结构模型 (Holley *et al.*, 1965)。

通过生物化学研究蛋白质合成需要酶、ATP 以及 tRNA 而知道：参与蛋白质合成的每一个 AA 活化后，被特异的酶所催化后，与特异的 tRNA 结合，tRNA 所含的 anti-codon，通过碱基配对识别模板 RNA，从而一个一个氨基酸按模板的指令合成特定的蛋白质。

4.8 遗传密码的实验解码

任何生物学问题，选择最佳的实验材料和模型，都有助于提高研究的成效。一般来说，如果研究一个生物学现象的机理，可以找存在这一现象的最简单、经济、快速而且可以着手研究的模型。

蛋白质合成的首先在动物个体上观察，后在动物组织（肝脏），继而用肝脏匀浆，不用完整的细胞，也就是所谓无细胞体系进行研究。如果用容易培养、生长迅速的细菌来做实验，可以进一步提高效率。例如，用细菌的无细胞体系做 DNA 合成的实验，使 Arthur Kornberg (1918-2007) 较快分离纯化到 DNA 多聚酶 (Lehman *et al.*, 1958)，推进 DNA 合成的机理研究。

Zamecnik 等几个实验室也用细菌的无细胞系实现了蛋白质合成的研究体系，细菌合成蛋白质体系需要的原料、以及其他特征类似于动物的蛋白质合成体系 (Lamborg and Zamecnik, 1960; Tissières, Schlessinger and Gros, 1960; Kameyama and Novelli, 1960)。

美国国立健康研究院 (NIH) 的犹太生化学家 Marshall Nirenberg (1927-2010) 获得独立实验室后 (Nirenberg, 2004)，决定做重要的研究，从原来的领域寻找新的重要课题，受法国巴斯德研究所的工作所刺激 (Pardee, Jacob and Monod, 1959)，认为基因调控和蛋白质合成最令人兴奋。他以前只研究过糖转运、糖原代谢和分离酶，没有研究过基因调控或蛋白质合成，虽然他知道课题危险性很高，同事告诉他这是自杀，他还是决定转领域。

Nirenberg 当时立下的近期研究目标是 mRNA 的存在，远期目标是合成青霉素酶。他研究 mRNA 的时候，当时还没有两篇证明 mRNA 的文章 (Brenner, Jacob and Meselson, 1961; Gros *et al.*, 1961)，但 Nirenberg 从 1953 年和 1958 年的文章得知有模板 RNA 指导蛋白质合成的想法 (Hershey, 1953; Volkin, Astrachan and Countryman, 1958)。Nirenberg 从 Zamecnik 实验室的基础开始 (Lamborg and Zamecnik, 1960)，在引进细菌蛋白质合成的体系。他探讨从合成青霉素酶的细菌中得到模板 RNA，用于合成青霉素酶。

一年半之后，德国的 Heinrich Matthaei (1929-) 到 Nirenberg 实验室做博士后。Matthaei 依据他以前的经验成功地用 ^{14}C 标记了所有二十种氨基酸，提高了敏感性。加入 RNA 可以提高蛋白质合成 (Matthaei and Nirenberg, 1961a)。依据其他科学家的发现 (Kameyama and Novelli, 1960; Tissières, Schlessinger and Gros, 1960)，Nirenberg 和 Matthaei 知道加入 DNA 酶降解 DNA 后，细菌蛋白质合成会降低，他们重复了这一结果，然后处理了 40 分钟 DNA 酶之后加入模板 RNA，这样可以观察到很好的引入的 RNA 引起蛋白质合成，估计原来细菌本底的 DNA 指导了模板 RNA 合成，去除 DNA 后，细菌原有 DNA 指导的 RNA 减少，更显出外源 RNA 指导的蛋白质合成 (Matthaei and Nirenberg, 1961b)。

Nirenberg 计划用烟草花叶病毒 (TMV) 的 RNA 作为模板，这样优于从细菌获得 RNA 再加入细菌的无细胞蛋白质合成体系。因此他离开华盛顿特区去加州大学伯克利分校请教 TMV 的专家。走之前，他给 Matthaei 一些多聚 U (Poly U)，建议他把 20 种分别用同位素标记的氨基酸加到蛋白质合成体系，看看 Poly U 能否指导一种标记的氨基酸参与蛋白质合成 (Nirenberg, 2004)。



图 4-17 Nirenberg

1961年5月27日凌晨3点, Matthaeci 观察到 Poly U 可以刺激苯丙氨酸掺入蛋白质。Poly A、Poly C、Poly I 都不能刺激苯丙氨酸掺入蛋白质, UMP、UDP、UTP 也都不能 (Nirenberg and Matthaeci, 1961)。他们用多种方法证明合成的蛋白质是苯丙氨酸的多聚体。在同一篇文章的最后, 他们加了一句: Poly C 刺激脯氨酸合成蛋白质 (Nirenberg and Matthaeci, 1961)。

1961年8月, 莫斯科召开的第五届国际生物化学大会, Nirenberg 被安排在一个只有三十五人的小会发言, 听众漠不关心, 但 Crick 偶然听到马上安排 Nirenberg 在大会重新讲, 获得全场起立鼓掌。Nirenberg 在 MIT 学术报告时, 纽约大学 Severo Ochoa 实验室的 Peter Lengyel (1929-2020) 上台告诉听众, 他们用合成的含多种核苷酸的多聚体可以指导氨基酸掺入蛋白质。

1955年, 苏联旅法生物学家 Marianne Grunberg-Manago (1921-2013) 在西班牙旅美生化学家 Severo Ochoa (1905-1993) 做博士后期间, 发现多核苷酸磷酸酶 (PNP), 它催化核苷二磷酸聚合为多核苷酸, 曾误认为 PNP 是合成 RNA 的重要酶, 后被否定 (Grunberg-Manago and Ochoa, 1955; Grunberg-Manago, Ortiz and Ochoa, 1955; Ochoa, 1980; Grunberg-Manago, 1997)。

匈牙利布达佩斯的学生 Lengyel 于 1955 年读了 PNP 的文章, 1957 年逃出苏联占领下的布达佩斯到达纽约的第二天找 Ochoa 申请加入其实实验室, 被接受成为研究生 (Lengyel, 2012)。1961 年 6 月 6 日, Ochoa 去欧洲旅行的当天, Lengyel 和纽约大学的同事到纽约长岛的冷泉港实验室听学术会议, 从 Brenner 的演讲得知 mRNA 可以作为蛋白质合成的模板 (Brenner, 1961), 而他想想自己所在的实验室发现的 PNP 是唯一可以合成 RNA 的酶 (至少在实验室可以), 那么就可以用 PNP 合成 RNA 作为模板来指导蛋白质合成, 先可以合成 poly A、poly C、poly G、poly U。有位同事指出: 如果蛋白质合成的过程中, 第一个密码子不是同一个核苷酸的重复, 可能就什么也不能合成。这一问题有先见之明, 确实有不同于后面密码子的特定的起始密码子 (AUG)。但是体外蛋白质合成体系的条件有点松, 允许非起始密码子直接得以指导蛋白质合成。6 月底, Lengyel 与纽约大学当时的副教授 Joseph Speyer (1926-1998) 商定, 用 Speyer 建立的无细胞蛋白质合成体系, Lengyel 合成 Poly A 和 Poly U, Ochoa 教授不在的情况下请同系的教授申请放射性同位素标记的氨基酸。Speyer 去冷泉港上暑期课, 他们计划等上完课再做实验。7 月 31 日傍晚, 有人电话 Lengyel 告诉他 NIH 的人解决了遗传密码, Poly U 编码多聚苯丙氨酸。Lengyel 觉得特别沮丧。他们后来想起, 用单核苷酸的多聚物只能解决四个氨基酸的密码, 而他们可以合成含多种核苷酸的核酸, 这样有可能解决 20 种氨基酸的密码。8 月 14 和 15 日, 他们先做了 Poly U 的实验, 证明它确实编码苯丙氨酸, 等于重复了 Nirenberg 和 Matthaeci 的尚未发表的经典实验。17 日再次重复这一实验。18 日, 他们碰到参加莫斯科的国际第五届生化大会回纽约大学的一位教授, 后者明确告诉 Lengyel 在会上 Nirenberg 宣布了这一结果。19 日, Lengyel 致信在欧洲旅行的 Ochoa, 告知 6 月 6 日以来的过程。20 号 Lengyel 与妻子开始旅行 12 天, 五十年后, 他觉得自己应该取消这次旅行。Lengyel 回纽约后, 与 Ochoa、Speyer 讨论了课题, Ochoa 热情支持。因为 Nirenberg 和 Matthaeci 已经做了单核苷酸多聚体的实验, 他们觉得自己的新意在于多种核苷酸的多聚体。10 月中旬, Lengyel 见通告版上 Nirenberg 要在 MIT 讲学术报告, 他就赶去波士顿听, 而且在 Nirenberg 讲完后的提问阶段, 上去宣布自己和 Ochoa 实验室同事也在研究遗传密码, 而且用了含多种核苷酸的模板。这次轮到 Nirenberg 焦虑, 赶紧回华盛顿自己的实验室抓紧研究, 也需要加上含不同核苷酸的模板, 一边赶紧去图书馆找文献、一边碰到了可以合作的对象, 解决合成含多个核苷酸聚合物的问题。两个实验室破解遗传密码在争先恐后的竞争中推进 (Nirenberg, 2004; Lengyel, 2012)。

Lengyel 等发现, 除了 Poly U 之外, Poly UC、Poly UA 也能刺激多聚苯丙氨酸合成, 而 Poly UC 可以刺激丝氨酸和亮氨酸参与合成蛋白质 (Lengyel, Speyer and Ochoa, 1961)。Lengyel 等还巧妙地

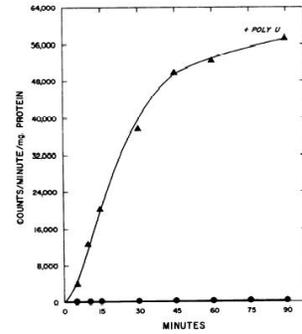


图 4-18 Poly U 指导蛋白质



图 4-19 Ochoa

在合成具有多种核苷酸的多聚体时加入不同的核苷酸的比例，在通过统计规律推测一部分对应的密码 (Lengyel, Speyer and Ochoa, 1961)。这一方法可以延伸用，而且可以是三种核苷酸按一定比例合成模板 RNA (Lengyel *et al.*, 1962)，可以帮助解析多个遗传密码 (Speyer *et al.*, 1962; Wahba *et al.*, 1962; Gardner *et al.*, 1962; Wahba *et al.*, 1963)。到 1963 年，Ochoa 实验室可以找到对应与 20 种氨基酸的遗传密码。Nirenberg 实验室也用同一方法分析了一些遗传密码 (Martin *et al.*, 1962; Matthaeci *et al.*, 1962; Nirenberg *et al.*, 1963)。

用合成的 RNA 作为模板指导蛋白质合成，加上比例分析，是很巧妙的方法 (Lengyel *et al.*, 1961)。

这种方法有其问题：有时一种氨基酸对应于几种可能的三联密码，虽然有时可以用改变比例来推测哪种氨基酸对应于哪种密码，有时还有不确定性。合成多聚核苷酸时，加入的核苷酸原料比例，与多聚核苷酸中含量比例的吻合度也存在不确定性。

1964 年 Nirenberg 和博士后 Philip Leder (1934-2020) 发明了新的破解遗传密码的方法 (Nirenberg and Leder, 1964; Leder and Nirenberg, 1964)。用蔗糖梯度离心分离核糖体，发现 Poly U 在蛋白质合成体系可以加入核糖体组分 (Spyrides and Lipmann, 1962; Barondes and Nirenberg, 1962)。进一步观察到，Poly U 可以刺激苯丙氨酸-tRNA 与核糖体结合 (Arlinghaus *et al.*, 1963; Nakamoto *et al.*, 1963; Kaji and Kaji, 1963)。Nirenberg 和 Leder 将蔗糖梯度离心改成更简单的滤纸过滤：¹⁴C 标记氨基酸，加入细菌无细胞蛋白质合成体系，与 tRNA 反应后，与核糖体结合，然后通过 0.4 微米孔径的滤纸，分开与核糖体结合的氨基酸-tRNA (每一个氨基酸对与 tRNA 的氨酰 tRNA)，能够通过的是没有结合核糖体，留下的是与核糖体结合的氨酰 tRNA，而同位素标记标记的特定氨基酸就能确定是何种氨基酸的密码，而加入的核苷酸就是密码。他们首先确定两个和一个核苷酸 (如 U 或 UU) 不能刺激氨酰 tRNA (如苯丙氨酰 tRNA) 与核糖体结合，所以密码子需要三个以上核苷酸组成。UUU 刺激苯丙氨酰 tRNA 与核糖体结合，AAA 刺激赖氨酰 tRNA 与核糖体结合，CCC 刺激脯氨酰 tRNA 与核糖体结合，其结论与肽链合成分析的结论一致 (Nirenberg and Leder, 1964)。在此基础上，他们合成 GUU、UGU 和 UUG，发现只有 GUU 可以刺激缬氨酰 tRNA 结合核糖体，GUU 不能刺激其他 17 种氨酰 tRNA 结合核糖体，所以 GUU 是缬氨酸的密码 (Leder and Nirenberg, 1964)。

Leder 等进一步改进了用 PNP 在二核苷酸的 3' 端添加一个核苷酸合成三联核苷酸 (Leder, Singer and Bramacombe, 1965)，NIH 的核酸化学家 Leon Heppel 在 1955 年发明的方法通过 RNA 酶在核苷酸的 5' 添加一个核苷酸 (Heppel, Whitfield and Markham, 1955)，这两种方法都能合成确定核苷酸序列的三联密码。用确定序列的三联密码通过核糖体结合方法，他们解析了 64 个可能的三联密码中的 54 个 (Nirenberg and Leder, 1964; Leder and Nirenberg, 1964; Bernfield *et al.*, 1965; Trubin *et al.*, 1965; Nirenberg *et al.*, 1965, 1966; Bramacombe *et al.*, 1965; Kellogg *et al.*, 1966)。印度旅美化学家 Gobind Khorana (1922-2011) 发明了顺序合成任何核苷酸多聚体的方法 (Jacob and Khorana, 1965)，用氨酰 tRNA 结合检测，确定了所有剩余的遗传密码 (Nishimura *et al.*, 1965a, 1965b; Söll *et al.*, 1965)。到 1965 年，所有氨基酸的遗传密码被解析。起始密码子为编码甲硫氨酸的 AUG (Clark and Marcker, 1966)，终止密码子有 UAA、UAG 和 UGA 三个 (Brenner *et al.*, 1965, 1967; Weigert and Garen, 1965)。到 1967 年，64 个密码子全部解码，也就是所有遗传密码都得以确定。

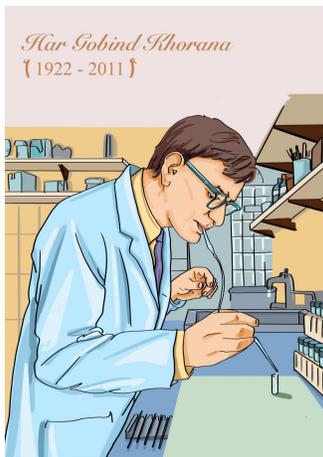


图 4-20 Khorana

Crick 等提出的密码简并性 (Crick *et al.*, 1961)，也在实验中得到验证 (Jones and Nirenberg, 1966)：几个密码子编码同一个氨基酸。经常出现第三位有差别的几个三联密码对应同一个氨基酸。Ochoa 和 Nirenberg 实验室都证明了遗传密码的普适性：从细菌到哺乳动物的不同物种用同一套遗传密码 (Speyer *et al.*, 1963; Marshall *et al.*, 1966)。

UUU UUC UUA UUG	PHE LEU	UCU UCC UCA UCG	SER	UAU UAC UAA UAG	TYR TERM TERM	UGU UGC UGA UGG	CYS TERM TRP
CUU CUC CUA CUG	LEU	CCU CCC CCA CCG	PRO	CAU CAC CAA CAG	HIS GLN	CGU CGC CGA CGG	ARG
AUU AUC AUA AUG	ILE MET	ACU ACC ACA ACG	THR	AAU AAC AAA AAG	ASN LYS	AGU AGC AGA AGG	SER ARG
GUU GUC GUA GUG	VAL	GCU GCC GCA GCG	ALA	GAU GAC GAA GAG	ASP GLU	GGU GGC GGA GGG	GLY

图 4-21 遗传密码

4.9 结语

遗传密码的研究，有物理学家从概念出发，提出简单而且可以检验的想法，tRNA 是超前的敏锐思维发挥了作用。但分离 tRNA、解析遗传密码都需要实验。解析遗传密码需要简便的蛋白质合成体系，需要同位素的敏感检测，需要思考如何用模板 RNA。

从 1865 年孟德尔提出遗传规律到 1967 年遗传密码解析的百余年，彻底改变了生命科学。

1960 年代后期至 1970 年代检测 DNA 序列的技术不断进步 (Wu and Kaiser, 1968; Wu and Taylor, 1971; Sanger *et al.*, 1973)，到 1977 年出现标准的 DNA 测序方法 (Sanger, Nicklen and Coulson, 1977; Maxam and Gilbert, 1977)。从 DNA 序列，对照密码本，可以确定基因编码的蛋白质中氨基酸序列。

操纵核酸序列的重组 DNA 技术诞生后 (Jackson, Symons and Berg, 1972; Cohen *et al.*, 1973)，因为遗传密码的普适性，可以将人类特定基因 (如胰岛素的基因) 转入细菌表达，成为经济、安全、快速生产蛋白质的途径，诞生了现代生物技术产业。通过基因敲除 (Thomas and Capecchi, 1987; Mansour, Thomas and Capecchi, 1988) 和基因修饰技术 (Jinek *et al.*, 2012)，对照遗传密码本，可以设计有目标地改变基因序列，增强、减少或改变其编码的蛋白质的生物学活性。通过改变基因的控制区域而改变基因表达的空间或时间，可以调控基因的生理功能。这些方法可以用于科学研究，医学实践 (基因测序用于诊断疾病、或治疗)。为人类带来了前所未有的可能和危险。

注 1: Garrod 的父亲 Alfred Garrod (1819-1907) 于 1848 年发现痛风患者血液尿酸增加、并能定量检测血液中尿酸结晶的重量 (Hopkins, 1938)。

注 2: 1959 年的诺贝尔奖生理或医学奖授予美国犹太科学家 Arthur Kornberg (1918-2007) 和西班牙裔的美国科学家 Severo Ochoa (1905-1993)，获奖是“因为他们发现核糖核酸与脱氧核糖核酸生物合成的机理”。Kornberg 具体是发现是 DNA 多聚酶，这是 DNA 合成的关键酶。Ochoa 发现的多核苷酸磷酸酶，它不是 RNA 合成的关键酶，奖错了。

注 3: 1968 年，诺贝尔奖生理或医学奖授予 Holley、Khorana 和 Nirenberg。

参考文献

- Allfrey V, Daly MM and Mirsky AE (1953). Synthesis of protein in the pancreas. II. The role of ribonucleoprotein in protein synthesis. *Journal of General Physiology* 37:157-75.
- Allison AC (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *British Medical Journal* 1:290-294.
- Apgar J, Holley RW and Merrill SH (1962). Purification of the alanine-, valine-, histidine-, and tyrosine-acceptor ribonucleic acids from yeast. *Journal of Biological Chemistry* 237:796-802.
- Arlinghaus R, Favelukes G and Schweet R (1963). A ribosome-bound intermediate in polypeptide synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 11:92-96.
- Astbury WT and Bell FO (1938). X-ray study of thymonucleic acids. *Nature* 141:747-748.
- Astbury WT (1947). X-ray studies of nucleic acids. *Symposium of the Society for Experimental Biology* 1:66-76.
- Avery OT, MacLeod CM and McCarty M (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine* 79:137-158.
- Barnett L, Brenner S, Crick F H C, Shulman R, Watts-Tobin R J (1967). Phase shift and other mutants in the first part of the rII B cistron of bacteriophage T4. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 252:487-560.
- Barondes SH and Nirenberg MW (1962). Fate of a synthetic polynucleotide directing cell-free protein synthesis II. Association with ribosomes. *Science* 138:813-817.
- Basilio C, Wahba AJ Lengyel P, Speyer JF and Ochoa S (1962). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, V. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:613-616.
- Beadle GW (1945). Biochemical Genetics. *Chemical Reviews* 37:15-96.
- Beadle GW and Ephrussi B (1936). The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. *Genetics* 21:225-247.
- Beadle GW, Anderson RL and Maxwell J (1938). A comparison of the diffusible substances concerned with eye color development in *Drosophila*, *Ephestia* and *Habrobracon*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 24:80-85.
- Beadle GW and Tatum EL (1941a). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 27:499-506.
- Beadle GW and Tatum EL (1941b). Genetic control of developmental reactions. *American Naturalist* 75:107-116.
- Beadle GW and Tatum EL (1945). *Neurospora*. II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *American Journal of Botany* 32:678-686.
- Beet EA (1949). The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. *Annals of Eugenics* 14:279-284.
- Boivin A and Vendrely R (1947). Sur le rôle possible des deux acides nucléiques dans la cellule vivante. *Experientia* 3:32-34.
- Bloch DP (1955). A possible mechanism for the replication of the helical structure of deoxyribonucleic acid. 41:1058-1064.
- Bonner D (1946). Biochemical mutations in *Neurospora*. *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology* 11:14-24.
- Borsook H, Deasy CL, Haagen-Smit AJ, Keighley G and Lowy P (1948). Isolation of a peptide in guinea pig liver homogenate and its turnover of leucine. *Journal of Biological Chemistry* 174:1041-1402.
- Borsook H, Deasy CL, Haagen-Smit AJ, Keighley G and Lowy P (1949). A peptide fraction in liver. *Journal of Biological Chemistry* 179:705-719.
- Borsook H, Deasy CL, Haagensmit AJ, Keighley G and Lowy PH (1950). Metabolism of C¹⁴ labeled glycine, L-histidine, L-leucine, and L-lysine. *Journal of Biological Chemistry* 187:839-48.
- Brenner S (1957). On the impossibility of all overlapping triplet codes in information transfer from nucleic acid to proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 43:687-694.
- Brenner S (1961). RNA, ribosomes, and protein synthesis. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 26:101-10.
- Brenner S, Stretton AO and Kaplan S (1965). Genetic code: the 'nonsense' triplets for chain termination and their suppression. *Nature* 206:994-998.
- Brenner S Barnett L, Katz ER and Crick FHC (1967). UGA: A third nonsense triplet in the genetic code. *Nature* 213:449-450.
- Burian RM, Gayon J and Zallen D (1988). The singular fate of genetics in the history of French biology,

- 1900-1940. *Journal of the History of Biology* 21:357-402.
- Butenandt A, Weidel W and Becker E (1940). Kynurenin als Augenpigmentbildung auslösendes Agens bei Insekten. *Die Naturwissenschaften* 28:63-64.
- Butenandt A, Weidel W and von Derjugin W (1942). Zur Konstitution des Kynurenins. *Naturwissenschaften* 30:1-3.
- Caldwell PC and Hinshelwood C (1950). Some considerations on autotrophy in bacteria. *Journal of Chemical Society* 3156-3159.
- Campbell PN and Work TS (1953). Biosynthesis of proteins. *Nature* 171:997-1001.
- Clancy CW (1942). The development of eye colors in *Drosophila melanogaster*. Further studies on the mutant Claret. *Genetics* 27:417-440.
- Clark BFC and Marcker KA (1966). The role of N-formyl-methionyl-sRNA in protein biosynthesis. *J Mol Biol* 17:394-406.
- Cook JE and Meyer J (1915). Severe anemia with remarkable elongated and sickle-shaped red blood cells and chronic leg ulcers. *Archives of Internal Medicine* 16:644-651.
- Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW and Helling RB (1973). Construction of bacterially functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:3240-3244.
- Crick FHC (1955). On degenerate templates and the adaptor hypothesis. A note for the RNA Tie Club.
- Crick FHC (1956). Ideas on protein synthesis.
- Crick FHC (1958). On protein synthesis. *Symposium of the Society for Experimental Biology* 1:138-163.
- Crick F (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature* 227:561-563.
- Crick FHC, Griffith JS and Orgel L (1957). Codes without commas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 43:416-421.
- Crick FHC, Barnett L, Brenner S and Watts-Tobin (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192:1227-1232.
- Crick FHC, Leslie Barnett FRS, Brenner S and Watts-Tobin RJ (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227-1232.
- Cuénot L (1902). La loi de Mendel et l'hérédité de la pigmentation chez les souris. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 3:27-30.
- Cuénot L (1903). L'hérédité de la pigmentation chez les souris. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 4:33-41.
- Dalgliesh CE (1953). The template theory and the role of transpeptidation in protein biosynthesis. *Nature* 171:1027-1028.
- Dodge BO (1927). Nuclear phenomena associated with heterothallism and homothallism in the ascomycete *Neurospora*. *Journal of Agricultural Research* 35:289-305.
- Dodge BO (1928a). Production of fertile hybrids in the ascomycete *Neurospora*. *Journal of Agricultural Research* 36:1-14.
- Dodge BO (1928b). Spore formation in asci with fewer than eight spores. *Mycologia* 20:18-21.
- Dodge BO (1928c). Unisexual conidia from bisexual mycelia. *Mycologia* 20:226-234.
- Dodge BO (1931). Inheritance of the albinistic non-conidial characters in interspecific hybrids in *Neurospora*. *Mycologia* 23:1-50.
- Dodge BO (1952). The fungi come into their own. *Mycologia* 44:273-291.
- Dounce AL (1952). Duplicating mechanism for peptide chain and nucleic acid synthesis. *Enzymologia* 15:251-258.
- Dounce AL (1953). Nucleic acid template hypotheses. *Nature* 172:541.
- Dounce AL, Morrison M and Monty KJ (1955). Role of nucleic acid and enzymes in peptide chain synthesis. *Nature* 176:597-598.
- Ephrussi B (1942). Chemistry of "eye color hormones" of *Drosophila*. *Quarterly Review of Biology* 17:327-338.
- Ephrussi B and Beadle B (1935). La transplantation des disques imaginaires chez les *Drosophiles*. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 201:98-99.
- Ephrussi B and Beadle GW (1937). Development of eye colors in *Drosophila*: Transplantation experiments on the interaction of vermilion with other eye colors. *Genetics* 22:65-75.
- Frantz ID Jr, Lofffield RB and Miller WW (1947). Incorporation of C¹⁴ from carboxyl-labeled dl-alanine into the proteins of liver slices. *Science* 106:544-545.
- Frantz ID Jr, Zamecnik PC, Reese JW and Stephenson ML (1948). The effect of dinuthrophenol on the incorporation of alanine labeled with radioactive carbon into the proteins of slices of normal and

- malignant rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 174:773-774.
- Gale EF and Folkes JP (1953). The assimilation of amino acids by bacteria. *Biochemical Journal* 55:721-729.
- Gamow G (1954). Possible relation between deoxyribonucleic acid and protein structures. *Nature* 173:318.
- Gamow G and Ycas M (1955). Statistical correlation of protein and ribonucleic acid composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 41:1011-1019.
- Gamow G, Rich A and Ycas M (1956). The problem of information transfer from the nucleic acids to proteins. *Advances in Biological and Medical Physics* 4:23-68.
- Gardner RS, Wahba AJ, Basilio C, Miller RS, Lengyel P and Speyer JF (1962). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, VII. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:2087-2094.
- Garrod AE (1899). A contribution to the study of alkaptonuria. *Medico-Chirurgical Transactions* 82:369-394.
- Garrod AE (1901). About alkaptonuria. *Lancet* ii:1484-1486.
- Garrod AE (1902). The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* ii:1616-1620.
- Garrod AE (1908). Inborn errors of metabolism. Lecture II alkaptonuria. *Lancet* ii:73-79.
- Goldschmidt R (1916). Genetic factors and enzyme reaction. *Science* 43:98-100.
- Grunberg-Manago M (1997). Severo Ochoa. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 43:351-365.
- Grunberg-Manago M and Ochoa S (1955). Enzymatic synthesis of and breakdown of polynucleotides; polynucleotide phosphorylase. *Journal of American Chemical Society* 77:3165-3166.
- Grunberg-Manago M, Ortiz PJ and Ochoa S (1955). Enzymatic synthesis of nucleic acid like polynucleotides. *Science* 122:907-910.
- Hall BD and Spiegelman S (1961). Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47:137-146.
- Heppel LA, Whitfield PR and Markham R (1955). Nucleotide exchange reactions catalyzed by ribonuclease and spleen phosphodiesterase. 2. Synthesis of polynucleotides. *Biochemical Journal* 60:8-15. ^[SEP]
- Hershey AD (1953). Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. II. Phage precursor nucleic acid. *Journal of General Physiology* 37:1-23.
- Herrick JB (1910). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Archives of Internal Medicine* 6:517-521.
- Hickman M and Cairns J (2003). The centenary of the one-gene one enzyme hypothesis. *Genetics* 163:839-841.
- Hoagland MB (1955). An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochimica Biophysica Acta* 16:288-289.
- Hoagland MB, Keller EB and Zamecnik PC (1956). Enzymatic carboxyl activation of amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 218:345-358.
- Hoagland MB, Zamecnik PC and Stephenson ML (1957). Intermediate reactions in protein biosynthesis. *Biochimica Biophysica Acta* 24:215-216.
- Hoagland MB, Stephenson ML, Scott, JF, Hecht LI, and Zamecnik PC (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 231:241-257.
- Hoagland M (2004). Enter transfer RNA. *Nature* 431:249.
- Hogben L, Worrall RL and Zieve I (1932). The genetic basis of alkaptonuria. *Proceedings of the Royal Society (Edinburgh)* 52:264-295.
- Hogeboom GH, Schneider WC and Pallade GE (1948). Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *Journal of Biological Chemistry* 172:619-35.
- Hogeboom GH, Schneider WC and Striebich MJ (1953). Localization and integration of cellular function. *Cancer Research* 13: 617-632.
- Holley RW (1957). An alanine-dependent, ribonuclease-inhibited conversion of AMP to ATP, and its possible relationship to protein syntehsis. *Journal of American Chemical Society* 79:658-662.
- Holley RW, Everett GA, Madison JT and Zamir A (1965). Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* 240:2122-2128.
- Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, Penswick JR and Zamir A (1965). Structure of a ribonucleic acid. *Science* 147:1462-1465.
- Hopkins FG (1938). Archibald Edward Garrod. *Obituary Notices of Fellows of the Royal Society (London)* 2:224-228.

- Horowitz NH (1950). Biochemical genetics of Neurospora. *Advances in Genetics* 3:33-71.
- Horowitz NH, Bonner D, Mitchell HK, Tatum EL and Beadle GW (1945). Genic control of biochemical reactions in Neurospora. *American Naturalist* 79:304-317.
- Horowitz NH and Leupold U (1951). Some recent studies bearing on the one gene one enzyme hypothesis. *Cold Spring Symposium on Quantitative Biology* 16:65-74.
- Hultin T (1950). Incorporation in vivo of ¹⁵N-labeled glycine into liver fractions of newly hatched chicks. *Experimental Cell Research* 1:376-381.
- Ingram VM (1956). A specific chemical difference between globins of normal and sickle-cell anemia hemoglobins. *Nature* 178:792-794.
- Ingram VM (1957). Gene mutations in human hemoglobin: the chemical difference between normal and sickle hemoglobin. *Nature* 180:326-328.
- Ingram VM (2004). Sickle-cell anemia hemoglobin: the molecular biology of the first “molecular disease”—the crucial importance of serendipity. *Genetics* 167:1-7.
- Ivan D, Frantz II Jr, Zamecnik PC, Reese JW and Stephenson ML (1948). The effect of dinitrophenol on the incorporation of alanine labeled with radioactive carbon into the proteins of slices of normal and malignant rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 174:773-774.
- Jackson DA, Symons RH and Berg P (1972). Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 69:2904-2909.
- Jacob TM and Khorana HG (1965). Studies on polynucleotides. XXXVII. the synthesis of deoxyribopolynucleotides. Further examination of the approach involving stepwise synthesis. *Journal of American Chemical Society* 87:368-374.
- Jacob F and Monod J (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* 3:318-356.
- Janocha S, Wolz W, Srsen S, Srsnova K, Montagutelli X, Guénet J-L, Grimm T, Kress W, Müller CR (1994). The human gene for alkaptonuria (AKU) maps to chromosome 3q. *Genomics* 19:5-8.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821.
- Jones OW and Nirenberg MW (1966). Degeneracy in the amino acid code. *Biochimica Biophysica Acta* 119:400-406.
- Kaji A and Kaji H (1963). Specific interaction of soluble RNA with polyribonucleic acid induced polysomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 13:186-192.
- Kameyama T and Novelli GD (1960). The cell-free synthesis of b-galactosidase by *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2:393-396.
- Keller EB, Zamecnik PC and Loftfield RB (1954). The role of microsomes in the incorporation of amino acids into proteins. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2:378-386.
- Knox WE (1958) Sir Archibald Garrod’s “Inborn Errors of Metabolism” II. Alkaptonuria. *American Journal of Human Genetics* 10:95-124.
- La Du BN, Zannoni VG, Laster L and Seegmiller JE (1958). The nature of the defect in tyrosine metabolism in alcaptonuria. *Journal of Biological Chemistry* 230:251-260.
- Lamborg MR and Zamecnik PC (1960). Amino acid incorporation into protein by extracts of *E. coli*. *Biochimica Biophysica Acta* 42:206-211.
- Leder P, Clark BFC, Sly WS, Pestka S and Nirenberg MW (1963). Cell-free peptide synthesis dependent upon synthetic oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 50:1135-1143.
- Leder P and Nirenberg MW (1964). RNA codewords and protein synthesis. II. Nucleotide sequence of a valine RNA codeword. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 52:420-427.
- Leder P, Singer MF and Brimacombe RLC (1965). Synthesis of trinucleoside diphosphate with polynucleotide phosphorylase. *Biochemistry* 4:1561-1567.
- Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES and Kornberg A (1958). enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 233:163-170.
- Lengyel P (2012). Memories of a senior scientist: on passing the fiftieth anniversary of the beginning of deciphering the genetic code. *Annual Review of Microbiology* 66:27-38.
- Lengyel P, Speyer JF, Ochoa S (1961). Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences USA* 47:1936-1942.
- Lengyel P, Speyer JF, Basilio and Ochoa S (1962). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, III. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:282-284.
- Lindgren CC (1932). The genetics of *Neurospora*. I. The inheritance of response to heat treatment. *Bulletin of Torrey Botanical Club* 59:85-102.
- Littlefield JW, Keller EB, Gross J and Zamecnik PC (1955). Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *Journal of Biological Chemistry* 217:111-123.
- Mansour SL, Thomas KR and Capecchi MR (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: A general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352.
- Martin RG, Matthaei JH, Jones OW and Nirenberg MW (1962). Ribonucleotide composition of the genetic code. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 6:410-414.
- Marshall RE, Caskey CT and Nirenberg M (1967). RNA codewords and protein synthesis. XII. Fine structure of RNA codewords recognized by bacterial, amphibian, and mammalian transfer RNA. *Science* 155:820-826.
- Mason VR (1922). Sickle cell anemia. *Journal of the American Medical Association* 79:1318-1320.
- Matthaei H and Nirenberg MW (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon RNA prepared from ribosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 4:404-408.
- Matthaei JH and Nirenberg MW (1961). Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in *E. coli* extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47:1580-1588.
- Matthaei JH, Jones OW, Martin RG and Nirenberg MW (1962). Characteristics and composition of RNA coding units. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:666-677.
- Maxam AM and Gilbert W (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:560-564.
- Melchior J and Tarver H (1947). Studies in protein synthesis in vitro. 1. On the synthesis of the labeled cystine (S^{35}) and its attempted use as a tool in the study of protein synthesis. *Archieve in Biochemistry* 12:301-308.
- Melchior J and Tarver H (1947). Studies in protein synthesis in vitro. 2. On the uptake of the labeled sulfur by the proteins o liver slices incubated with labeled methionine (S^{35}). *Archieve in Biochemistry* 12:309-315.
- Meselson M and Stahl FW (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 44:671-682.
- Montagutelli X, Lalouette A, Coude M, Kamoun P, Forest M and Guenet JL (1994). aku, a mutation of the mouse homologous to human alkaptonuria, maps to chromosome 16. *Genomics* 19:9-11.
- Morgan TH (1914). Mosaics and gynandromorphs in *Drosophila*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 11:171-172.
- Morgan TH and Bridges CB (1919). The origin of gynandromorphs. *Carnegie Institution of Washington Publications* 278:1-122.
- Nakamoto T, Conway T, Allende J, Spyrides G and Lipmann F (1963). Formation of peptide bonds. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 28:227-231.
- Neel JV (1949). The inheritance of sickle cell anemia. *Science* 110:64-66.
- Nirenberg M (2004). Historical review: Deciphering the genetic code-a personal account. *Trends in Biochemical Sciences* 29:46-54.
- Nirenberg MW and Matthaei JH (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47:1588-1602.
- Nirenberg MW, Matthaei JH and Jones OW (1962). An intermediate in the biosynthesis of polyphenylalanine directed by synthetic template RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:104-109.
- Nirenberg MW, Matthaei JH, Jones OW, Martin RG and Barondes SH (1963). Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA. *Federation Proceedings* 22:55-61.
- Nirenberg MW, Jones OW, Leder P, Clark BFC, Sly WS and Pestka S (1963). On the coding of genetic information. *Cold Spring Harbor on Symposia on Quantitative Biology* 28:549-557.
- Nirenberg M and Leder P (1964). RNA codewords and protein synthesis. I. The effect of trinucleotides upon the binding of sRNA to ribosomes. *Science* 145:1399-1407.
- Nirenberg M, Caskey T, Marshall R, Brimacombe R, Kellogg D, Doctur B, Hatfield D, Levin J, Tottman F,

- Pestka S, Wilcox M and Anderson F (1966). The RNA code and protein synthesis. *Cold Spring Harbor on Symposia on Quantitative Biology* 31:11-24.
- Nishimura S, Jones DS, Ohtsuka E, Hayatsu H, Jacob TM and Khorana HG (1965a). Studies on polynucleotides: XLVII. The in vitro synthesis of homopeptides as directed by a ribopolynucleotide containing a repeating trinucleotide sequence. New codon sequences for lysine, glutamic acid and arginine. *Journal of Molecular Biology* 13:283-301.
- Nishimura S, Jones DS and Khorana HG (1965b). Studies on polynucleotides. 48. The in vitro synthesis of a co-polypeptide containing two amino acids in alternating sequence dependent upon a DNA-like polymer containing two nucleotides in alternating sequence. *Journal of Molecular Biology* 13:302-324.
- Nomura M, Hall BD and Spiegelman S (1960). Characterization of RNA synthesized in *Escherichia coli* after bacteriophage T2 infection. *Journal of Molecular Biology* 2:306-326.
- Ochoa S (1980). The pursuit of a hobby. *Annual Review of Biochemistry* 49:1-30.
- Ogata K and Nohara H (1957). The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH5 enzyme in amino acid activation. *Biochimica Biophysica Acta* 25:659-660.
- Pardee AB, Jacob F and Monod J (1959). The control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *Journal of Molecular Biology* 1:165-178.
- Pauling L, Itano HA, Singer SJ and Wells IC (1949). Sickle cell anemia, a molecular disease *Science* 110:543-548.
- Pollak MR, Chou YH, Cerda JJ, Steinmann B, La Du BN, Seidman JG and Seidman GE (1993). Homozygosity mapping of the gene for alkaptonuria to chromosome 3q2. *Nature Genetics* 5:201-204.
- Sanger F and Tuppy H (1951a). The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochemical Journal* 49:463-481.
- Sanger F and Tuppy H (1951b). The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochemical Journal* 49:481-490.
- Sanger F and Thompson EOP (1953a). The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochemical Journal* 53:353-366.
- Sanger F and Thompson EOP (1953b). The amino-acid sequence in the glycyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochemical Journal* 53:366-374.
- Sanger F, Donelson JE, Coulson AR, Kössel H and Fischer D (1973). Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage ϕ 1 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70:1209-1213.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74:5463-5467.
- Scriver CR (2008). Garrod's Croonian lectures (1908) and the charter 'Inborn Errors of Metabolism': albinism, alkaptonuria, cystinuria, and pentosuria at age 100 in 2008. *Journal of Inheritable Metabolic Diseases* 31:580-598.
- Shear CL and Dodge BO (1927). Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Molilia Sitophila* group. *Journal of Agricultural Research* 34:1019-1042.
- Siekevitz P and Zamecnik PC (1951). In vitro incorporation of C^{14} DL-alanine into proteins of rat-liver granular fractions. *Federation Proceedings* 10:266-267.
- Siekevitz P (1952). Uptake of radioactive alanine in vitro into proteins of rat liver fractions. *Journal of Biological Chemistry* 195:549-565.
- Söll D, Ohtsuka E, Jones DS, Lohrmann R, Hayatsu H, Nishimura S and Khorana HG (1965). Studies on polynucleotides, XLIX. Stimulation of the binding of aminoacyl-sRNA's to ribosomes by ribotrinucleotides and a survey of codon assignments for 20 amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 54:1378-1385.
- Speyer JF, Lengyel P, Basilio C and Ochoa S (1962). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, II. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:63-67.
- Speyer JF, Lengyel P, Basilio C and Ochoa S (1962). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, IV. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:441-448.
- Speyer JF, Lengyel P, Basilio C, Wahba AJ, Gardner RS and Ochoa S (1963). Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 28:559-567.
- Spyrides GJ and Lipmann F (1962). Polypeptide synthesis with sucrose gradient fractions of *E. coli* ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1977-1983.
- Srb AM and Horowitz NH (1944). The ornithine cycle in *Neurospora* and its genetic control. *Journal of Biological Chemistry* 154:129-139.

- Sturtevant AH (1920). The vermin gene and gynandromorphism. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 17:70-71.
- Tatum EL and Haagen-Smit AJ (1941). Identification of *Drosophila* V⁺ hormone of bacterial origin. *Journal of Biological Chemistry* 140:575-580.
- Tatum EL and Beadle GW (1942). Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 28:234-243.
- Tatum EL and Bonner D (1944). Indole and serine in the biosynthesis and breakdown of tryptophane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 30:30-37.
- Thomas KR and Capecchi MR (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Tissières A, Schlessinger D and Gros F (1960). Amino acid incorporation into proteins by *Escherichia coli* ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 46:1450-1463.
- Tsugita, A. and Fraenkel-Conrat, H (1960). The amino acid composition and C-terminal sequence of a chemically evoked mutant of TMV. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 46: 636-642.
- Tsugita, A, Fraenkel-Conrat, H (1962). The composition of proteins of chemically evoked mutants of TMV RNA. *Journal of Molecular Biology* 4:73-82.
- Tsugita, A. (1962). The proteins of mutants of TMV: composition and structure of chemically evoked mutants of TMV RNA. *Journal of Molecular Biology* 5:284-292.
- Volkin E and Astrachan L (1956a). Phosphorus incorporation in *Escherichia coli* ribonucleic acid after infection with bacteriophage T2. *Virology* 2:149-161.
- Volkin E and Astrachan L (1956b). Intracellular distribution of labeled ribonucleic acid after phage infection of *Escherichia coli*. *Virology* 2:433-437.
- Volkin E, Astrachan L and Countryman JL (1958). Metabolism of RNA phosphorus in *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Virology* 6:545-55.
- Wagner RP (1989). On the origins of the gene-enzyme hypothesis. *Journal of Heredity* 80:503-504.
- Wahba AJ, Basilio C, Speyer JF, Lengyel P, Miller RS and Ochoa S (1962). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, VI. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1683-1686.
- Wahba AJ, Gardner RS, Basilio C, Miller RS, Speyer JF and Lengyel P (1963). Synthetic polynucleotides and the amino acid code, VIII. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 49:116-122.
- Washburn RE (1911). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Virginia Medical Semi-Monthly* 15:490-493.
- Watson JD and Crick FHC (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.
- Weigert MG and Garen A (1965). Base composition of nonsense codons in *E. coli* evidence from amino-acid substitutions at a tryptophan site in alkaline phosphatase. *Nature* 206:992-994.
- Winnick T, Friedberg F and Greenberg DM (1948). The utilization of labeled glycine in the process of amino acid incorporation by the protein of liver homogenate. *Journal of Biological Chemistry* 175:117-126.
- Wu R and Kaiser AD (1968). Structure and base sequence in the cohesive ends of bacteriophage lambda DNA. *Journal of Molecular Biology* 35:523-527.
- Wu R and Taylor E (1971). Nucleotide sequence analysis of DNA. II Complete nucleotide sequence of the cohesive ends of bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology* 57:491-511.
- Zamecnik PC, Frantz ID, Loftfield RB and Stephenson ML (1948). Incorporation in vitro of radioactive carbon from carboxyl-labeled dl-alanine and glycine into proteins of normal and malignant rat livers. *Journal of Biological Chemistry* 175:299-314.
- Zamecnik PC and Keller EB (1954). Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins. *Journal of Biological Chemistry* 209:337-354.

阅读

- Brenner S (1957). On the impossibility of all overlapping triplet codes in information transfer from nucleic acid to proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 43:687-694.
- Lengyel P, Speyer JF and Ochoa S (1961). Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47:1936-1942.