



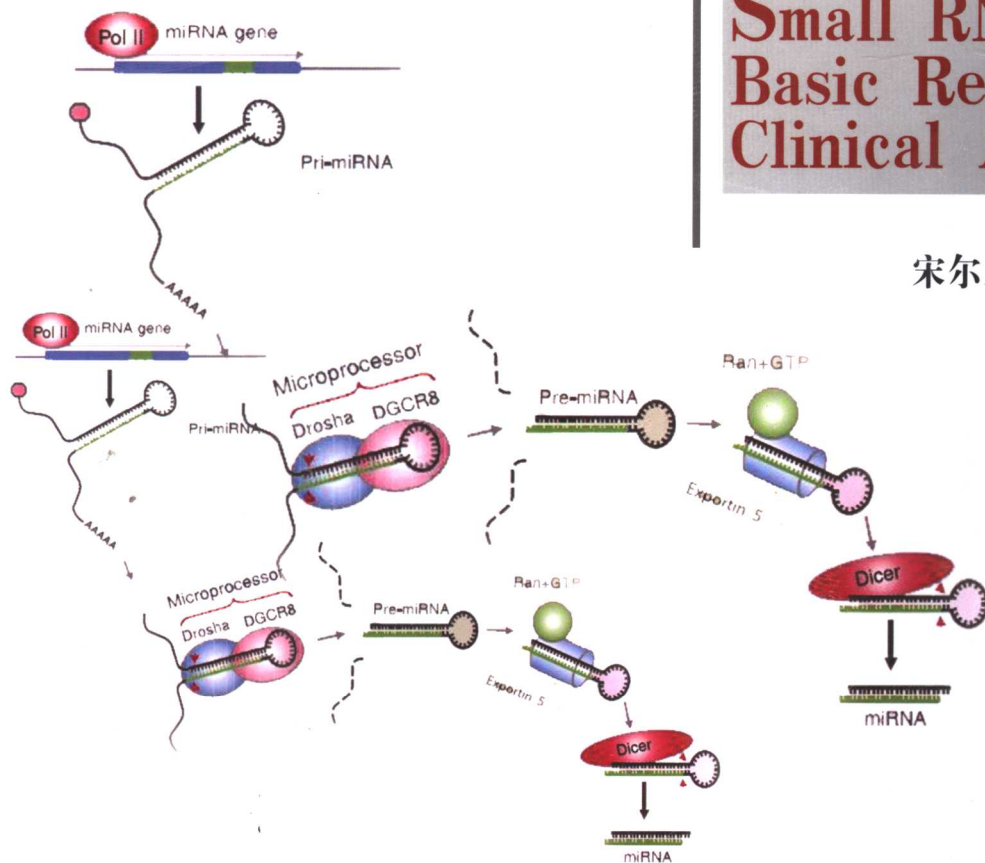
小分子RNA的

基础研究与应用

北京市重点图书

Small RNA:
Basic Research and
Clinical Application

宋尔卫 主编



国家科学技术学术著作出版基金资助出版

小分子 RNA 的

基础研究与临床应用

主 编 宋尔卫

副主编 姚和瑞 于风燕



北京科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

小分子 RNA 的基础研究与临床应用 / 宋尔卫主编. —北京:
北京科学技术出版社, 2007. 9

ISBN 978 - 7 - 5304 - 3592 - 2

I. 小… II. 宋… III. ①核糖核酸 - 生物技术 - 研究
②核糖核酸 - 生物技术 - 临床应用 IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 135881 号

· 小分子 RNA 的基础研究与临床应用

主 编: 宋尔卫

责任编辑: 李金莉

责任校对: 黄立辉

封面设计: 三重幻象

图文制作: 北京京鲁创业科贸有限公司

出 版 人: 张敬德

出版发行: 北京科学技术出版社

社 址: 北京西直门南大街 16 号

邮政编码: 100035

电话传真: 0086 - 10 - 66161951 (总编室)

0086 - 10 - 66113227 0086 - 10 - 66161952 (发行部)

电子信箱: bjkbpress@163.com

网 址: www.bjkbpress.com

经 销: 新华书店

印 刷: 三河国新印装有限公司

开 本: 889mm × 1194mm 1/16

字 数: 550 千

印 张: 21

版 次: 2007 年 9 月第 1 版

印 次: 2007 年 9 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5304 - 3592 - 2/R · 1000

定 价: 89.00 元



京科版图书, 版权所有, 侵权必究。

京科版图书, 印装差错, 负责退换。

编者名单

主 编 宋尔卫

副主编 姚和瑞 于风燕

编 者 (以姓氏笔画为序)

于风燕 广州中山大学附属第二医院

刘天浩 广州中山大学附属第二医院

宋尔卫 广州中山大学附属第二医院

李志华 广州中山大学附属第二医院

苏逢锡 广州中山大学附属第二医院

张小勤 广州中山大学附属第二医院

陈黎红 广州中山大学附属第二医院

陈静琦 广州医学院附属第二医院、中山大学附属第二医院

姚和瑞 广州中山大学附属第二医院

姚燕丹 广州医学院附属第二医院、中山大学附属第二医院

贾卫娟 广州中山大学附属第二医院

黄松音 广州中山大学附属第二医院

龚 畅 广州中山大学附属第二医院

潘秋辉 广州中山大学附属第二医院

序

近年来陆续发现 miRNA、siRNA 等小分子 RNA 具有调控基因表达的功能, 相关的研究为人们提供了一个全新的角度来认识生物基因及基因表达调节的本质。以前认为没有功能的“垃圾小分子 RNA”现在已成为生命科学领域的研究热点, 涉及此领域的研究成果多次被选入“年度全球十大科技突破”。此领域的研究必将引领生命科学进入一个崭新的年代。

中山大学附属第二医院长江学者、特聘教授宋尔卫是一位优秀的青年科技工作者, 他以敏锐的眼光对该领域进行深入的研究, 并取得丰硕的成果, 先后在《*Nature Medicine*》, 《*Nature Biotechnology*》上发表论著, 探讨 RNA 干扰技术与人类疾病的关系, 近年又对 miRNA 对乳腺癌干细胞的调控进行研究, 可谓成绩卓然、硕果累累。宋尔卫教授在小分子 RNA 领域的研究特色主要是很好地把小分子 RNA 的基础研究成果, 以及所产生的 RNA 干扰技术与疾病的诊断和治疗紧密地结合, 从而推动了该技术在临床上的应用进程。

今年宋尔卫教授主编了《小分子 RNA 的基础研究与临床应用》一书, 结合他自己的研究成果, 总结了小分子 RNA 的基础理论和研究进展, 侧重于小分子 RNA 在疾病发生机制中的作用, 以及对疾病诊断和治疗的贡献, 体现了“热点生物学技术”与临床的结合。

捧读此书, 深感其全面、新颖、实用, 对该领域的研究必将起到重要的参考作用, 为人类健康事业贡献点滴, 故为序。

黄洪章

2007 年 8 月

前言

近年来,随着 siRNA、miRNA 及其他小分子 RNA 的发现,非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 逐渐成为生命科学研究的热点。生物学家们在很长一段时期里都认为,既然几乎所有具体的生理功能都要由蛋白质来完成,那么不编码蛋白质的 ncRNA 应该是有用的,称其为“垃圾 RNA”。然而,现在发现以往一直被认为是垃圾 RNA 的,并不真是“垃圾”,而是细胞内调节基因表达的宝物,这个巨大的“垃圾场”可能蕴藏着丰富的“宝藏”。

在小分子非编码 RNA 的研究领域中最令人振奋的发现之一应该数哺乳动物细胞内 siRNA 能执行 RNA 干扰的功能,特异地沉默目标基因。1998 年,Fire 和 Mello 首次发现双链 RNA,引发抑制特定基因表达的现象,称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi),并证明即是转录后基因沉默。2001 年,Tuschl 等发现应用长度为 21 个碱基对的双链小分子 RNA (siRNA),能有效地抑制人类细胞同源序列的目标基因表达,把 RNA 干扰在人类细胞的应用推向新的高潮。miRNA 是新近发现的一类长度为 19~22 个核苷酸的参与基因转录后水平调控的非编码小分子 RNA。1993 年,Lee 等人在线虫 (*C. elegans*) 中克隆了 *lin-4* 基因,并发现 *lin-4* 并不编码蛋白,而是产生一种小 RNA 分子,最终导致 *lin-14* 蛋白质合成的减少。2000 年,发现了第 2 个 miRNA——*let-7*,并证实了它参与调控线虫发育的重要机制,此后,大量 miRNA 被发现,其生物学功能也逐渐被弄清,miRNA 具有调节细胞增殖、死亡、神经细胞分化、个体发育等生物学功能。miRNA 的发现,是对小分子 RNA 研究的又一个突破,同时也为人们提供了一种全新的角度来认识生物基因和基因表达调节的本质。

非编码小分子 RNA 对基因表达调控的生物学领域的研究已经积攒了累累的

硕果。人们不仅阐明了不同物种的细胞内非编码小分子 RNA 调控基因表达的作用机制,设计小分子干扰 RNA,通过沉默目标基因的表达来研究它们的生物学作用,为后基因组时代基因功能的研究提供了重要的工具。更重要的是,人们正努力开发非编码小分子 RNA 为主体的药物,通过靶向致病基因来达到诊断和治疗疾病的目的。正是由于非编码小分子 RNA 的发现不仅为生物学开辟了新的领域,更为生物科学原理应用于疾病治疗的转译研究提供了新的武器,使得涉及非编码 RNA 的研究成果先后 7 次在近 10 年美国《Science》杂志评选的“年度全球十大科技突破”中入选。

我们与哈佛医学院 Judy Lieberman 组合作,证实了 RNAi 不仅是基因功能分析研究的方法学,还具有治疗疾病的巨大应用潜能,课题组针对小鼠 Fas mRNA 设计并合成了 6 对 siRNA,研究它们沉默 Fas 基因和保护肝脏的作用。论文发表在 2003 年 3 月的《Nature Medicine》。麻省理工学院的 Philip A Sharp (1993 年诺贝尔医学奖得主,著名 RNAi 专家)在《Nature Cell Biology》发表的 RNAi 综述上把我们的研究定性为“The first report that siRNAs could be used therapeutically in whole animals (首次在整体动物疾病模型中显示 RNAi 治疗作用的报道)”；同年,被美国《Science》杂志评选的“2003 年度世界十大科技突破”第 4 项“RNAi: still hot (RNAi: 仍然是热点)”选用为代表性成果(其中引用了原著论文的图 3C 两图和引述了该课题研究在动物肝炎模型中应用 siRNA 的结果)。如何在体内把 siRNA 导入需要进行基因沉默的靶细胞是把该技术应用于临床实践的关键。我们与哈佛医学院开展应用 RNAi 抑制 HIV 感染的课题研究,首次证实了应用单链片段抗体(ScFv)与荷正电多肽的融合蛋白靶向导入 siRNA 的可行性,论文在 2005 年《Nature Biotechnology》上发表。

关于 miRNA 对肿瘤细胞生物学行为的调控,我们课题组进行了一些初步的研究。发现 let-7 表达下调同时促进癌细胞着地生长和不着地生长。同时,我们证明了 let-7 在乳腺癌中低表达,负调控 Ras,上调 let-7 的表达导致 Ras 表达下降,而减少 let-7 的表达,会导致 Ras 蛋白明显增加。另外我们初步的研究发现 miRNA 与乳腺癌化疗耐药密切相关。

可以说,小分子 RNA 已经成为生命科学领域里的研究热点,其进展必将引领生命科学进入一个崭新的时代。有感于小分子 RNA 在基因表达调控中的重要地位,我们结合自己的研究基础编写了本书,对小分子 RNA 的基础理论以及其临床应用进行总结,主要偏重于两种主要的小分子 RNA: miRNA 和 siRNA,力求系统而又突出重点地介绍与疾病密切相关的小分子 RNA 研究进展。概括起来,本书主要有下列特点:①内容新颖,本书详细介绍各种新概念、新技术,充分显

示小分子 RNA 领域的最新成果和发展动向,具有先进性和启发性。②注重实用性,在编写本书时,力求与临床疾病相联系,并结合我们自己的研究工作,内容丰富,信息全面,因此不仅对基础研究人员有较高的参考价值,对临床科研工作者亦有较好的指导作用。③我们在编写时尽可能使每一章保持相对独立性和完整性,又努力保持全书系统性,对该领域作一较为全面和深入的介绍,以适合不同类型的读者进行阅读。

由于编者的水平所限和时间仓促,本书难免存在这样或那样的问题和内容上的欠缺,以及文字上的错误,敬请读者批评赐教,以便再版时更正。

中山大学附属第二医院乳腺肿瘤中心 宋尔卫

2007 年 8 月 16 日

目 录

1	非编码小分子 RNA：从垃圾核酸到年度分子	1
1.1	RNA 的研究历程	1
1.2	“垃圾 RNA”真的是“垃圾”吗	3
1.3	非编码小分子 RNA 执行古老的生物学调控机制	4
1.3.1	双链 RNA (dsRNA) 在植物中介导的共遏制	4
1.3.2	小分子 RNA (siRNA) 在低等动物中介导的 RNA 干扰	5
1.3.3	微小分子 RNA (miRNA) 在高等动物中介导的翻译抑制	7
1.4	非编码小分子 RNA 的应用前景和全球十大科技突破	9
1.4.1	非编码小分子 RNA 的药用潜能	10
1.4.2	非编码小分子 RNA 与编码基因功能研究	14
1.5	小结	15
2	内源性 miRNA 与外源性 siRNA	26
2.1	miRNA 的生物合成	26
2.1.1	miRNA 的编码基因在基因组中的位置	27
2.1.2	miRNA 的编码基因的转录与转录初产物的剪接	28
2.1.3	miRNA 前体从细胞核转运到细胞浆	31
2.1.4	pre-miRNA 的剪切与 miRNA 的成熟	31
2.1.5	植物 miRNA 的成熟过程	31
2.2	miRNA 的生物学机制	32

2.3	外源性 siRNA 的合成和表达	34
2.4	siRNA 干扰目标基因的机制	34
2.4.1	dsRNA 的剪切	35
2.4.2	RISC 的形成	35
2.4.3	siRNA 介导的 RISC 对 mRNA 的剪切作用	35
2.5	miRNA 和 siRNA 的关系及药物开发前景	38
2.5.1	miRNA 和 siRNA 的关系	38
2.5.2	miRNA 和 siRNA 的药物开发前景	40
3	调控细胞生物程序的 miRNA	46
3.1	调控细胞程序性死亡的 miRNA	47
3.2	调控细胞增殖的 miRNA	50
3.3	调控细胞周期的 miRNA	51
3.4	调控细胞分化和发育的 miRNA	52
4	miRNA 的检测方法与疾病诊断	60
4.1	miRNA 的检测方法	60
4.1.1	miRNA 的抽提和富集	61
4.1.2	miRNA 微阵列	65
4.1.3	Northern 杂交: miRNA 检测的金标准	66
4.1.4	实时 PCR: miRNA 的定量检测	68
4.1.5	原位杂交: miRNA 的定位检测	71
4.2	miRNA 靶基因的预测与鉴定	73
4.2.1	miRNA 靶基因的生物信息学预测	73
4.2.2	miRNA 靶基因的鉴定	75
4.3	miRNA 检测与疾病的诊断及预后判断	76
4.3.1	miRNA 检测与疾病的早期诊断	76
4.3.2	miRNA 与疾病的治疗及预后判断	77
5	调节 miRNA 水平与疾病治疗	82
5.1	miRNA 应用于疾病治疗的研究基础	86
5.2	miRNA 拟似物及其在疾病治疗中的应用	89
5.2.1	在恶性肿瘤中 miRNAs 拟似物的治疗靶点及应用	89
5.2.2	在除恶性肿瘤以外的其他疾病中 miRNAs 拟似物的	

治疗靶点及应用	91
5.3 miRNA 拮抗分子及其应用	92
5.3.1 在恶性肿瘤中 miRNAs 拮抗分子的治疗靶点及应用	92
5.3.2 在除恶性肿瘤以外的疾病中 miRNAs 拮抗分子的 治疗靶点及应用	95
5.4 调控 miRNA 水平药物的开发	100
5.4.1 2'-O-甲基 AMOs	101
5.4.2 2'-O-甲氧乙基 AMOs	101
5.4.3 锁定的核苷酸 AMOs	102
5.5 结束语	102
6 miRNA 与恶性肿瘤	105
6.1 恶性肿瘤的 miRNA 表达图谱	106
6.1.1 恶性肿瘤 miRNA 表达图谱的特点	106
6.1.2 肿瘤 miRNA 表达变化的机制	109
6.2 miRNA 对肿瘤细胞生物程序的调控	112
6.2.1 调控细胞增殖的 miRNA	112
6.2.2 调控细胞凋亡的 miRNA	114
6.2.3 调控细胞黏附的 miRNA	115
6.2.4 调控细胞血管生成的 miRNAs	117
6.2.5 参与蛋白裂解、调控细胞信号传导的 miRNAs	117
6.3 作为抑癌基因和癌基因的 miRNA	118
6.3.1 作为抑癌基因的 miRNA	119
6.3.2 作为癌基因的 miRNA	120
6.4 miRNA 在肿瘤的诊断和治疗中的应用	123
6.4.1 miRNA 表达图谱可以作为肿瘤的诊断工具和判断 预后的工具	124
6.4.2 miRNA 在肿瘤治疗中的潜在应用	125
7 miRNA 与造血及血液系统疾病	129
7.1 miRNAs 在造血调控中的作用	129
7.1.1 miR-142 在造血组织中的表达	130
7.1.2 miR-155 与淋巴细胞	130
7.1.3 miR-181 与造血细胞分化	131

7.1.4	miR-221 和 miR-222 与红系分化	131
7.1.5	miR-223 与髓系细胞分化增殖	132
7.1.6	其他	132
7.2	miRNAs 在血液肿瘤中的研究	132
7.2.1	miRNAs 与慢性淋巴细胞性白血病	133
7.2.2	miRNAs 与急性白血病	134
7.2.3	miRNAs 与淋巴瘤	135
7.3	小结	138
8	miRNA 与神经系统	140
8.1	miRNA 在神经系统中的表达	140
8.2	miRNA 与神经系统发育	144
8.2.1	miRNA 参与神经系统形态发生	144
8.2.2	miRNA 参与神经系统的发育及分化	146
8.3	miRNA 与神经系统疾病	149
8.3.1	miRNA 与脆性 X 综合征	149
8.3.2	miRNA 与阿尔茨海默病	151
8.3.3	miRNA 与神经细胞凋亡相关性疾病	154
8.3.4	miRNA 与神经系统肿瘤的关系	158
8.3.5	miRNA 与其他神经系统疾病	161
8.4	小结	162
9	miRNA 与内分泌疾病	166
9.1	miRNA 与糖尿病	166
9.1.1	胰岛素分泌的机制	166
9.1.2	miRNA 对胰岛素分泌的调节作用	167
9.2	miRNA 与糖尿病慢性并发症	170
9.3	miRNA 与脂质代谢	171
9.3.1	miRNA 与脂肪细胞分化调控	171
9.3.2	miRNA 与非酒精性脂肪肝	173
9.4	miRNA 与内分泌肿瘤	175
9.5	小结	176

10	miRNA 与感染性疾病	178
10.1	miRNA 与病毒	178
10.1.1	病毒编码的 miRNA 生物起源	179
10.1.2	病毒与编码 miRNA 的特点	179
10.1.3	病毒 miRNA 的功能	181
10.1.4	病毒 miRNA 与细胞 miRNA	183
10.1.5	病毒 miRNA 的进化	184
10.1.6	不同类型病毒的 miRNA	184
10.1.7	应用与展望	192
10.2	病毒、miRNA 与肿瘤	193
10.2.1	病毒与 RNA 干扰途径	194
10.2.2	病毒 miRNA 的作用方式	194
10.2.3	病毒 miRNA 在癌症发生中可能发生作用	196
10.2.4	病毒和宿主 miRNA 途径的相互作用可能导致 肿瘤发生	198
10.3	细菌与 miRNA	199
10.3.1	细菌中 miRNA 的发现	200
10.3.2	miRNA 的调控机制	201
10.3.3	小分子 RNA 在调控通路中生物学特点	202
10.3.4	小分子 RNA 应用与展望	204
10.4	其他病原微生物与 miRNA	206
11	miRNA 与干细胞分化和个体发育	210
11.1	干细胞分化与个体发育中 miRNA 功能的研究方法	210
11.1.1	体内外转基因技术	210
11.1.2	细胞表达谱系的微阵列分析	211
11.1.3	miRNA “探测” 系统	211
11.1.4	荧光素酶基因报告系统	212
11.1.5	软件预测 miRNA 调控的靶基因	212
11.2	miRNA 对干细胞周期的调控	213
11.2.1	干细胞周期的调控	213
11.2.2	miRNA 对干细胞周期的调控	214
11.3	miRNA 对干细胞分化的调控	215
11.4	miRNA 对细胞凋亡的作用	217

11.5	miRNA 对神经系统发育过程的影响	217
11.5.1	神经特异性表达的 miRNAs	217
11.5.2	miRNAs 决定神经组织的分化方向	218
11.5.3	miRNAs 对神经组织分化状态的维持	219
11.5.4	miRNAs 调控神经元的寻路过程	219
11.5.5	miRNAs 调控神经突触的形成过程	220
11.5.6	miRNAs 与神经系统疾病的发生	222
11.6	miRNA 调节心肌细胞的分化	222
11.6.1	心脏的发育过程	222
11.6.2	信号分子与转录因子对心脏发育的调控	223
11.6.3	miR-1 对心脏发育的调控	224
11.7	miRNA 对骨骼肌细胞发育的调控	227
11.7.1	成肌细胞的分化过程	227
11.7.2	转录因子对成肌分化的调控	228
11.7.3	miRNA 对成肌分化的调控	229
11.7.4	转录因子对 miRNA 表达的调控	232
11.8	miRNA 对皮肤及毛囊的发育调控	233
11.9	miRNA 对其他组织发育的影响	235
12	治疗性 siRNA 的靶点选择	241
12.1	选择关键致病基因作为 RNA 干扰靶点	242
12.2	联合使用针对多个靶基因的 siRNA	246
12.3	选择高度保守的靶基因设计 siRNA	248
12.4	选择非编码 RNA 作为 RNA 干扰靶点	250
12.5	选择不同的细胞群作为干扰靶点	251
12.6	选择理想的基因序列作为 siRNA 靶点	254
12.7	小结	256
13	治疗性 siRNA 的导入方法	263
13.1	siRNA 的载体技术	263
13.1.1	RNA 的化学修饰与导入	263
13.1.2	非生物载体	266
13.1.3	生物载体	269

13.2	siRNA 的全身应用	274
13.2.1	高压静脉注射法导入 siRNA	275
13.2.2	受体介导的全身系统导入 siRNA	277
13.3	siRNA 的局部应用	281
13.3.1	吸入法导入 siRNA	281
13.3.2	阴道栓塞法导入 siRNA	282
13.3.3	透皮肤经皮导入 siRNA	283
13.3.4	局部肌肉注射导入 siRNA	284
13.3.5	从眼导入 siRNA	284
13.3.6	从神经系统导入 siRNA	285
13.4	siRNA 的区域灌注	286
13.4.1	区域灌注的原理和历史	286
13.4.2	区域灌注导入 siRNA 的前景	287
13.5	导入 siRNA 的生物导弹技术	287
13.5.1	导入 siRNA 新武器的发现	287
13.5.2	开发单链片段抗体成为导入 siRNA 的生物导弹	289
14	治疗性 siRNA 的优化	299
14.1	siRNA 的靶点特异性与脱靶效应	299
14.1.1	siRNA 的脱靶效应	301
14.1.2	设计高度特异的 siRNA	305
14.1.3	“抗脱靶” siRNA 的化学修饰	307
14.2	体内稳定型 siRNA 的化学修饰	312
14.2.1	甲硼磷酸化修饰	312
14.2.2	核酸锁定链	312
14.2.3	4'-氧和 2'-羟基核糖的化学修饰	313

非编码小分子 RNA：从垃圾核酸到年度分子

1.1 RNA 的研究历程

对于生物学这门学科的发展而言，1953 年是个划时代的年份，Francis Crick 和 James D. Watson 提出了 DNA 双螺旋互补结构模型。同年，Dounce 首先提出 DNA 遗传信息经 RNA 传递给蛋白质。在此基础上，1958 年 Crick 提出“中心法则”，揭示了遗传信息从 DNA 传递给 RNA，再从 RNA 传递给蛋白质的转录和翻译过程，以及遗传信息从 DNA 传递给 DNA 的复制过程。双螺旋结构模型展示两条 DNA 链的碱基是配对互补的，故模型本身就提示了自我复制的机制，并进一步指出了 DNA 作为遗传物质由亲代传给子代，执行生物个体的遗传功能。当时，还没有直接的实验证据证实 DNA 和 RNA 分子，以及 RNA 与蛋白质分子的相互作用，甚至当时连信使 RNA（mRNA）还没有发现，因此，Crick 提出的遗传信息中心法则也只能是一种假说。不过，这种假说天才地预言模板 RNA 的存在，并提出了在 DNA 模板上合成 RNA，再以 RNA 为模板在应接器（后来发现的转运 RNA）参与下氨基酸按密码顺序合成肽链。这是一个革命性的、历史性的创举，从此以后，在中心法则的影响下，生物学向基因和分子的新层次大踏步地前进着，生物学理论出现了日新月异的发展，并促成了后来基因工程的诞生和发展。

正是为了研究遗传信息是如何从细胞核内的 DNA 分子传递给细胞浆内的蛋白质，20 世纪 50 年代掀起了 RNA 研究的第一次热潮。当时很多科学家都在研究 DNA、RNA 和蛋白质合成有关的生物化学过程，证明在蛋白质合成中需要信

使 RNA (mRNA), 而信使 RNA 的合成有助于解读或破译遗传密码。1957 年 Zemecnik 发现了转运 RNA (tRNA), 证实了 Crick 等提出的 RNA 不能直接合成蛋白质, 其间需要一种小分子 RNA 作为“连接体”, 而这种“连接体”就是 tRNA。1959 年, 另一种 RNA 分子, 核糖体 RNA (rRNA) 被分离得到, 多年后证实这种 RNA 就是核酶, 是催化蛋白质的生物合成中肽键形成的化合物。1961 年, Crick 证明 DNA 长链中的碱基每 3 个组合形成密码子, 编码蛋白质的氨基酸残基。当有关蛋白质合成中模板 RNA 的作用、RNA 聚合酶的发现、tRNA (当时叫可溶性 RNA, sRNA)、核糖体和核糖体 RNA (rRNA) 的有关知识都已积累到一定程度的时候, Nirenberg 等用生物化学的方法在破译遗传密码的难题上取得了重大突破。他和其他科学工作者, 法国的 Monod 和 Jacob 等的研究工作提示 mRNA 的存在, 当时他们称之为“寿命短暂的 RNA”, 并指出 mRNA 的碱基序列与 DNA 的碱基序列互补, 并假定 mRNA 把 DNA 的遗传信息拷贝出来, 带到蛋白质的合成场所, 核糖体进行蛋白质合成。也正是在同一年, 很多实验室都证实了 mRNA 的存在, 其中最可靠的证据是 Spiegelman 等采用 ^{32}P 标记 DNA 和 ^3H 标记 mRNA 的新杂交技术, 证实 DNA 与 mRNA 以双重标记的杂合物形式存在。1965 年, Khorana 合成了遗传密码, Nirenberg 建立了体外物细胞蛋白质合成系统和核糖体结合技术, 为 1966 年破译遗传密码奠定了基础。1968 年, 基于对遗传密码的解读及其在蛋白质合成的作用的研究成果, Nirenberg 与 Khorana 和 Holley 共同分享了诺贝尔生理学 and 医学奖。至此, 人们意识到, RNA 分子既可以携带遗传信息, 又可以作为功能分子, 执行遗传信息的传递功能, 当时生物体细胞内发现的 3 种 RNA 分子: mRNA, tRNA 和 rRNA, 都被认为是具有功能的 RNA 分子。

但是, 中心法则也不是永恒不变的金科玉律, 自从 20 世纪 70 年代末期, 这个被誉为生物学中的相对论的定律, 开始不断受到 RNA 研究领域的新发现的挑战。80 年代中期, Sharp 阐明了 mRNA 前体剪接 (splicing) 的机制, 证实了 RNA 从 DNA 获得的遗传信息, 可以通过 RNA 水平进行调整, 从而在蛋白质水平反映出来。在病理情况下, mRNA 前体出现错误的剪接, 导致错误的蛋白质表达。这是 RNA 参与遗传信息传递的调控的首次证据。1993 年, Ambros 在线虫中发现调节 *lin-14* 基因表达的小分子 RNA, *lin-4*, 首次显示在动物细胞内小分子 RNA (miRNA) 参与了基因表达的调控。1999 ~ 2000 年, 通过核糖体 50S 大亚基晶体的高分辨率 X 线衍射分析结果发现, rRNA 就是催化蛋白质合成的酶, 再一次证实 RNA 参与遗传信息表达的调控。因此, RNA 在生命活动中的作用地位越来越受到重视, 甚至有人提出 RNA 世界 (RNA world) 的假说, 把 RNA 摆在生命进化早期的中心位置。在这个五彩缤纷的 RNA 世界里面, 以往曾一度认为不执行生物学功能的多种小分子 RNA, “垃圾 RNA”, 事实上是对基因表达起重