



生命科学前沿及应用生物技术

RNA Interference Molecular Mechanism
and Preventive Strategy Against Viruses

RNAi 分子机制与病毒防御

边中启 郑兆鑫 等 著



科学出版社

生命科学前沿及应用生物技术大系·典藏版

RNAi 分子机制 与病毒防御

RNA Interference Molecular Mechanism
and Preventive Strategy Against Viruses

边中启 郑兆鑫 等 著

科学出版社
北京

内 容 简 介

应用生物技术大系和现代生命科学前沿系列图书分别被列为“十一五”和“十二五”国家重点图书出版规划项目。本丛书针对生命科学领域前沿重点发展方向以及应用生物技术领域的新成果、新思路、新方法和新技术,全面展示了其最新的发展动态,涵盖了基础理论和主要技术方法,呈现了新的概念与理论、技术,在更深层次上阐明了生命的本质规律,给人们提供了新的认识生命本质的手段,也为生物技术服务于人类开辟了新的途径。涉及领域包括生物医药、干细胞技术、工业微生物学、蛋白质及蛋白质组、系统生物学、合成生物学、生物材料、农业生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、生物资源与安全等。

书在版编目(CIP)数据

生命科学前沿及应用生物技术大系:典藏版/舒红兵等编著. —北京:科学出版社, 2016

ISBN 978-7-03-047487-2

I. ①现… II. ①舒… III. ①生命科学—研究②生物工程—研究 IV. ①Q1-0②Q819

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043876 号

责任编辑:王 静 李 悦

责任印制:张 伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张: 2108

字数: 49 985 000

定价: 8900.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

RNA Interference Molecular Mechanism and Preventive Strategy Against Viruses

by

Bian Zhongqi Zheng Zhaoxin et al.

Science Press
Beijing

本书的出版得到国家自然科学基金
(No. 30672645) 项目资助

序

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是 20 世纪 90 年代末发现的一种真核生物细胞在转录后引发基因沉默 (gene silencing) 的分子机制, 该机制的发现 在 2001 年和 2002 年连续两年被美国 *Science* 杂志评为世界十大科技进展之首, RNAi 是近年来生命科学中最引人关注的重大研究进展。诱发 RNAi 的最关键分子是长度为 19~27 个核苷酸的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA), 称为小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA), 并由一系列蛋白 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 介导, 对与之具有序列同源性的基因在转录、转录后、翻译等水平进行表达调控。该机制在从酵母到哺乳动物等真核生物中普遍保守, 并证明在这些物种中发挥着发育调控、病毒免疫等重要功能。2006 年, Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 由于发现 RNAi 的卓越贡献获诺贝尔生理学或医学奖。RNAi 的发现开辟了生命科学新的研究领域, 目前成为 21 世纪国际上生命科学的研究热点和前沿, 并作为一种新颖的病毒感染的防御策略应用于人类抵抗重大传染病的研究获得了成功。

正是在 RNAi 和 miRNA (microRNA, miRNA) 的研究和应用不断取得重大成果的背景下, 科学出版社出版边中启、郑兆鑫等学者撰著《RNAi 分子机制与病毒防御》的专著。该书由从事 RNAi 相关研究领域的一线知名专家撰写, 根据著者原创性研究成果——siRNA 抑制 HBV、HCV、FMDV 和 SARS-CoV 病毒复制与感染的相关研究, 系统地阐述了发现 RNAi 分子机制及其作为病毒感染防御策略所取得的重要研究成果与主要研究方法, 并对 RNAi 策略在几种重要病毒性传染病研究中的应用进行了探讨。该专著的研究成果和发现对传染病的防治研究具有重要价值和很好的指导意义。该书具有科学性、系统性和实用性。目前 RNAi 和 miRNA 这个新的研究领域正在以惊人的速度快速发展, 从事该研究领域的科研人员与日俱增。我相信, 《RNAi 分子机制与病毒防御》专著的出版将对推动我国生命科学研究领域的发展起到重要的促进作用。

中国科学院院士

中国科学院昆明动物研究所所长



2008 年 2 月 2 日

前 言

自从 1998 年 Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 发现 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 诱导基因沉默 (gene silencing) 开辟了生命科学新的研究领域之后, 其基础研究与应用成为 21 世纪国际上生命科学的研究热点和前沿。RNAi 机制的发现被美国 *Science* 杂志评为 2001 年和 2002 年世界十大科技进展之首, 是近年来生命科学中最引人关注的重大研究进展。该机制在从酵母到哺乳动物等真核生物中普遍保守, 并证明在这些物种中发挥着发育调控、病毒免疫等重要功能。目前 RNAi 和 microRNA (miRNA) 这个新的研究领域正在以惊人的速度快速发展, 已经鉴定出三大类小 RNA (small RNA): 小干扰 RNA (siRNA)、miRNA 和 Piwi-interacting RNA (piRNA)。siRNA 主要参与转座子活性的抑制及病毒感染的防御。研究表明小 RNA 介导的基因沉默在动植物的病毒感染防御体系中发挥着重要功能, 不仅其分子机制得到了深入的阐释, 而且作为一种新颖的病毒感染防御策略应用于人类抵抗重大传染病的研究获得了成功。

近年传染病的再燃、局部流行和新发现的传染病及病原耐药性的出现等, 使人类仍面临传染病的严重威胁, 全球因传染病致死者约占死亡总数的 25%。因此, 提高传染病的救治水平, 对降低病死率具有极为重要的意义。据此, 本书是著者在国家、军队重点科技攻关课题的资助下, 针对重要病毒性传染病疫情控制中尚未解决的难点问题展开定向科研攻关, 取得的关于 RNAi 分子机制及其作为病毒感染防御策略的重大发现和原创性研究成果——siRNA 抑制 HBV、HCV、FMDV 和 SARS-CoV 病毒复制与感染的相关研究的基础上写成的专著, 对于一些重要发现则提炼成技术路线图叙述发现经过和主要研究方法, 使读者可以提纲挈领, 以启发思考、提高解决实际问题的能力。本专著的研究发现对传染病的防治研究具有重要意义。

本专著研究过程中自始至终得到复旦大学郑兆鑫教授、严维耀教授的鼓励和指导, 陈维灶博士为专著付出了艰辛的劳动, 本书出版得到国家自然科学基金项目资助。本专著得到中国科学院院士、中国科学院昆明动物研究所所长张亚平教授高度评价和认可并亲笔为本专著作《序》, 在此, 谨一并向为本专著作做出贡献者表示衷心的感谢!

书中疏漏和不足, 祈请前辈和读者赐教指正。

著 者

2008 年 2 月 8 日

目 录

序	
前言	
1 RNAi 分子机制与病毒防御	1
1.1 引言	1
1.2 RNAi 分子机制	3
1.3 microRNA 的表达与功能	18
1.4 RNAi 介导的细胞发育调控	29
1.5 RNAi 与病毒防御	35
1.6 siRNA 的设计、表达和转染	39
参考文献	43
2 RNAi 分子机制与脊椎动物免疫系统之间的进化关系	55
2.1 引言	55
2.2 RNAi 是天然的病毒感染防御机制	55
2.3 脊椎动物 RNAi 可能与蛋白质免疫系统协同作用	57
2.4 干扰素反应: RNA 沉默与蛋白质免疫系统之间的进化纽带	59
参考文献	62
3 siRNA 抑制 HBV 在 HepG2. 2. 15 细胞中的复制与表达	65
3.1 引言	66
3.2 实验材料	68
3.3 实验方法	70
3.4 实验结果	84
3.5 实验发现	91
参考文献	93
4 siRNA 抑制 HBV 在 BHK-21 细胞中的复制与表达	97
I 靶基因表达载体 pC-EGFP-N1 的构建	98
I 4.1 引言	98
I 4.2 实验材料	98
I 4.3 实验方法	100
I 4.4 实验结果	103
I 4.5 实验发现	105
II siRNA 表达载体的构建	106

II 4.1	引言	106
II 4.2	实验材料	106
II 4.3	实验方法	107
II 4.4	实验结果	112
II 4.5	实验发现	114
III	RNAi 抗 HBV 感染的研究	116
III 4.1	引言	116
III 4.2	实验材料	116
III 4.3	实验方法	116
III 4.4	实验结果	119
III 4.5	实验发现	122
	参考文献	123
5	RNAi 抑制 FMDV 在 BHK-21 细胞和乳鼠中的复制与感染	125
5.1	引言	126
5.2	实验材料	127
5.3	实验方法	128
5.4	实验结果	134
5.5	实验发现	141
	参考文献	144
6	靶向 FMDV 基因组保守区的 siRNA 对异源毒株感染的交叉抑制	147
6.1	引言	148
6.2	实验材料	148
6.3	实验方法	150
6.4	实验结果	154
6.5	实验发现	163
	参考文献	164
7	siRNA 抑制 FMDV 在 IBRS-2 细胞和动物体内的复制与感染	166
7.1	引言	167
7.2	实验材料	168
7.3	实验方法	169
7.4	实验结果	173
7.5	实验发现	186
	参考文献	187
8	靶向 FMDV 的 siRNA 诱导 IFN-β 的研究	189
8.1	引言	190
I	siRNA 表达载体的构建	190

I 8.2	实验材料	190
I 8.3	实验方法	191
I 8.4	实验结果	196
I 8.5	实验发现	197
II	siRNA 诱导 IFN- β 表达量的测定	198
II 8.2	实验材料	198
II 8.3	实验方法	199
II 8.4	实验结果	202
II 8.5	实验发现	208
	参考文献	210
9	siRNA 抑制 SARS-CoV 在 HEK 293T 细胞中的复制与表达	214
9.1	引言	215
9.2	实验材料	216
9.3	实验方法	218
9.4	实验结果	223
9.5	实验发现	226
	主要英文缩写词	232

1 RNAi 分子机制与病毒防御

1.1 引言

早在 1928 年, Wingard^[1,2]等发现了一种有趣的现象, 烟草感染环斑病毒后叶子发生了枯萎。但是, 顶上新生长出的嫩叶却没有发生病变, 而且新生叶子对再次病毒感染有天然的抵抗力 (图 1), 似乎是前次感染产生了免疫记忆, 就像哺乳动物的免疫记忆一样。尽管当时的研究人员对此现象深感疑惑, 无法解释, 但是并没有对此作出深入的研究。直到 20 世纪 90 年代初, 转基因植物研究发现, 外来的基因会导致与之同源的植物内源基因表达水平下降^[3], 而且, 若再次增加转基因的拷贝数甚至会下调原先转基因自身的表达效率^[4], 这种现象当时被称为共抑制 (co-suppression)。早期生物学家们意想不到的, 他们所观察到的现象在今天得到了解释, 从而开辟了分子生物学新的研究领域, 那就是基因沉默 (gene silencing)。



图 1 烟草^[2]

1995 年, Guo 等^[5]试图利用反义 RNA 技术去干扰秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) *par-1* 基因的表达。通常认为, 反义 RNA 技术是通过反义 RNA 与 mRNA 之间发生的碱基互补配对阻碍 mRNA 的剪接和翻译, 达到基因沉默的目的。令 Guo 等惊讶的是, 不仅反义 RNA 能够诱发基因沉默, 而且不能与 mRNA 发生碱基配对的仅被用作对照的正义 RNA 也同样能够诱导基因沉默。1998 年, Fire 等^[6]在这一领域做了进一步研究, 在研究秀丽新小杆线虫时他们发现双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 在基因沉默现象中扮演了重要角色。他们将绿色荧光蛋白 (GFP) 序列同源的 dsRNA 微注射果蝇, 高效地特异性抑制了 GFP 的表达, 而相比之下, 纯化的单链的正义 RNA 和单链的反义 RNA 只有微弱的抑制效果, 对照 dsRNA 没有引发显著的基因沉默 (图 2)。因此, Fire 等认为, dsRNA 才是基因沉默的根本诱导因子, 而且在反义 RNA 技术中, 不是反义 RNA 本身强有力地诱导基因沉默, 而是在单链 RNA 制备过程中所产生的少量的 dsRNA 起关键性的作用^[6], 这也解释了 Guo 等的工作中发现的正义 RNA 诱导有效的基因沉默现象。这一发现立刻引起广大研究人员的关注, 因为它不仅为基因沉默提供了一个简单有效的方

法，而且暗示着一种从未为人所知的在果蝇甚至整个真核生物世界里存在着的发育调控机制。然而，dsRNA 能够诱发序列特异性的基因沉默，这与此前发现的分子机制有着显著的冲突，其一：dsRNA 被证明能够激活蛋白激酶 R (PKR) / Rnase L/IFN 途径，使 mRNA 发生非特异性的降解，或者整体性地抑制蛋白质的翻译^[7,8]；其二，一般认为 dsRNA 在能量上是十分稳定的，不能再次进行序列特异性的 Watson-Crick 碱基互补配对。因此，Fire 等的发现使人们提出了这样一个假设，即存在一套与 dsRNA 螺旋结构解旋、在大量的细胞核酸中寻找识别特异的序列并与之进行配对、进而调控其转录表达等新的分子机制，这一分子机制被命名为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。

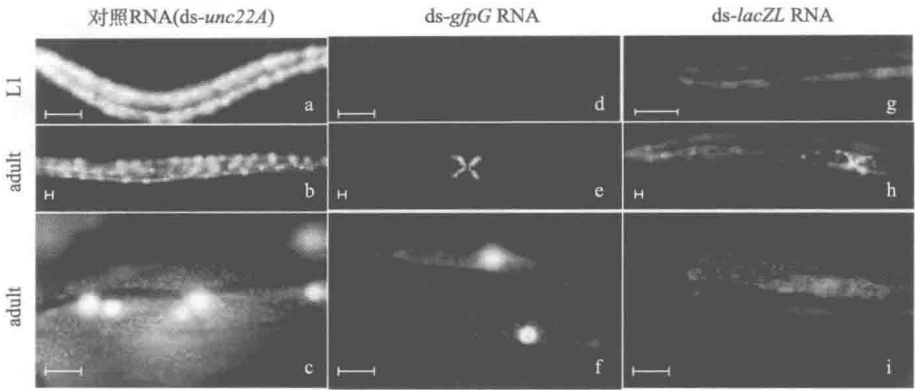


图 2 线虫中 dsRNA 诱导 GFP 基因沉默^[6]

由于发现了 RNAi 现象中的关键性分子 dsRNA，科学家们由此入手开始阐明其分子机制的漫长历程。使用生物化学和遗传学方法，在秀丽新小杆线虫中陆续发现了许多与 dsRNA 特异性诱导 RNAi 的相关基因^[9]。利用黑腹果蝇 (*D. melanogaster*) 胚胎和细胞提取物研究基因沉默现象时取得了一系列重大突破^[10,11]，即发现了一个可以把 dsRNA 进行加工形成长度为 21~23 个核苷酸的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的限制性内切核酸酶——Dicer 酶^[11~13]，以及发现了 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)^[10]，该蛋白复合体能将 Dicer 酶加工形成的 siRNA 结合携带，识别与 siRNA 同源的 mRNA 并将其切割降解^[11,13,14]。将秀丽新小杆线虫 RNAi 基因与果蝇^[15,16]、植物^[17]、真菌^[18]等其他真核生物基因沉默相关基因进行比较，发现在以往不同时间以不同形式命名的基因沉默现象，例如，转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)、共抑制、压制 (quelling) 等，是与秀丽新小杆线虫 RNAi 在实质上类似的基因沉默分子机制，而且十分保守地存在于绝大多数真核生物细胞中。随着相关研究在不同物种中的延伸，研究人员发现，在不同的物种中，dsRNA 导入细胞可能诱发至少四种不同的基因沉默反应，

包括 mRNA 降解、转录抑制、翻译抑制、染色体重构等^[19] (图 3)。



图 3 dsRNA 的分子调控分类^[19]

RNAi 分子机制的发现推动了与之有关的细胞生长发育调控等相关研究，同时，被用作类似于基因剔除 (gene knockout) 的反向遗传学手段进行基因功能研究，以及被认为是人类重大遗传性疾病和病毒性传染病的新的治疗策略，并进行深入地研究。本书着重阐述了发现 RNAi 分子机制及其作为病毒感染防御策略所取得的重要研究成果。

1.2 RNAi 分子机制

1.2.1 dsRNA 的产生

RNAi 机制中的关键分子 dsRNA 的来源^[20]可以是：细胞内源性基因的双向表达；具有反向重复结构的细胞内源性基因表达形成的发夹状 RNA (shRNA)；转基因表达的 mRNA 异常聚合；转座子转录^[21]；RNA 病毒基因组或病毒感染复制过程中的中间 RNA 产物；实验方法通过质粒载体或病毒载体转染表达的 dsRNA 或 shRNA；亦可能存在其他途径 (图 4)。

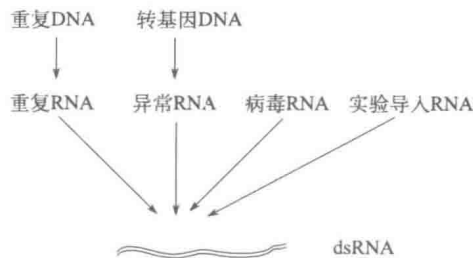


图 4 dsRNA 的几种来源^[20]

1.2.1.1 转基因

这里有必要首先提到的是，在真菌、植物和无脊椎动物细胞中，RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 可以介导对转基因表达的 mRNA 进行聚合作用，从而形成 dsRNA 这一有趣的过程。特别在植物细胞中，内源性的 RdRP 是转基因调节的共抑制作用所必需的蛋白质^[22,23]，而有趣的是，该蛋白质在病毒感染植物诱发基因沉默过程中却不是必需的，可能是由于病毒本身提供了病毒 RNA 聚合酶^[22]。实验证明，RdRP 能够在没有引物的情况下，以 mRNA 为模板合成双链的 dsRNA^[24,25]，这暗示转基因的单链 mRNA 产物可能是植物转基因诱发基因沉默最初诱导因子。在某些情况下，RdRP 不知何故视转基因 mRNA 为异常的外来物质，将其聚合为 dsRNA，进而诱发基因沉默。在这种起因的 RNAi 过程中，dsRNA 只能被认为是中间产物，真正的诱导因子是转基因 mRNA 本身。至于为何转基因 mRNA 会被视为外来物质，目前尚不清楚，其中一种可能性是转基因的高水平表达导致某些 mRNA 剪接的失误（例如末端没加腺嘌呤），这些缺陷的 mRNA 被 RdRP 视作异常物质^[2]。另一种可能性是宿主细胞出于自卫的需要^[26]，自然地将聚积的裸露转基因 DNA 加以标记，并通过 RdRP 介导的 RNAi 抑制其表达，直至清除外源 DNA。Volpe 等^[27]发现裂殖酵母的 RdRP 与处于非活跃状态的异染色质结合在一起，这为以上的假设提供了一个旁证。

1.2.1.2 转座子

转座子 (transposon) 是转座因子 (transposable element, TE) 的其中一类，是 dsRNA 的又一个重要来源^[21]。转座子指可以在基因组不同位置跳跃转移的 DNA 序列，通常可分为两类。I 类转座子在复制过程中首先转录获得 RNA 中间产物，然后以 RNA 中间产物为模板反转录大量扩增新的拷贝。这一类型的转座子在真核生物中的含量特别丰富，尤其是在植物中，例如在玉米中 I 类转座子约占细胞核 DNA 总量的 70%。I 类转座子大多数含有长末端重复序列 (long terminal repeat, LTR)，因此在复制过程中很容易产生大量发夹状结构的 dsRNA。II 类转座子存在于几乎所有的生物细胞中，特别是原核细胞。这类转座子含有末端反向重复序列 (terminal inverted repeat, TIR)，TIR 的长度从 11 个碱基到几百个碱基不等。II 类转座子家族中某些成员编码转座酶 (transposase)，它作用于 TIR 使转座子可以整合到基因组的其他区域^[28,29]。转座子在基因组内来回穿插，改变基因的结构和功能，成为基因组进化的动力之一。然而，转座子同时也对基因组造成严重的扰乱和破坏^[30]，为了保证基因组的行使正常功能，细胞通过基因沉默分子机制对转座子的活性进行抑制。出于这样的目的，转座子在复制表达过程中所产生的 dsRNA 作为基因沉默诱导因子起了重要的作用^[21]。

1.2.1.3 病毒

病毒感染细胞后在复制过程中亦会产生大量的 dsRNA。以植物为例，目前为止发现了超过 72 个属 500 多个种类的植物病毒^[31]，而且，不论单子叶植物还是双子叶植物，没有一个植物种类不会感染病毒，大多数植物甚至同时感染多种病毒。植物病毒有多种多样的宿主范围，包括昆虫、真菌、脊椎动物甚至人类。植物感染病毒症状轻微，可能不明显，但是感染严重时经常在叶子上出现花斑，甚至出现整体性的坏死枯萎现象（图 1）。有些植物病毒的基因组是单链 DNA (ssDNA) 或双链 DNA (dsDNA)，而有些病毒基因组本身就是 dsRNA。然而，超过 90% 的植物病毒基因组是 ssRNA，它们通过 RdRP 进行复制。因此，植物正是充分利用病毒复制所形成的 dsRNA 中间产物诱发 RNAi，藉此对大量的病毒感染作出防御。

今天，RNAi 作为一种简单有效的分子生物学技术，研究人员通常采用化学合成 dsRNA，或质粒载体、病毒载体表达所需要的 dsRNA，进而诱导特异有效的 RNAi 进行基因功能研究和疾病治疗。

1.2.2 起始阶段：dsRNA 被加工成为 siRNA

尽管在大多数情况下，dsRNA 是 RNAi 的初始诱导因子，但是，dsRNA 必须被进一步加工成为适当大小的 siRNA 方能发挥功能。Zamore 等^[32]最初发现，dsRNA 与果蝇胚胎提取物混合温浴后，dsRNA 被降解成长度约 22 个核苷酸的 RNA 小片段，进一步分析这些小片段发现它们是双链的，而且带有 5' 末端磷酸基团。因此，研究人员把注意力投向了具有核酸内切功能，且能使切成的小片段产生同样末端结构的 Rnase III 核糖核酸酶家族。

根据蛋白质结构，Rnase III 家族可以分为三类^[33,34]，第一：细菌 Rnase III，包含有一个催化结构域 (catalytic domain) 和一个 dsRNA 结合结构域 (dsRNA-binding domain)；第二：Drosha 家族核酸酶^[35]，包含两个催化结构域；第三：该类 Rnase III 也包含两个催化结构域^[36]，同时多了一个具有螺旋酶功能的螺旋酶结构域 (helicase domain)，还有一个 PAZ 结构域 (Piwi/Argonaute/Zwille domain)（图 5）。PAZ 结构域也存在于 Argonaute (Ago) 蛋白家族中，由于 Ago 家族在 RNAi 机制中发挥了重要的功能，因此认为，第三类的 Rnase III 是在 RNAi 过程中将 dsRNA 加工成 siRNA 所必需的蛋白质^[9,37]，该类 Rnase III 被命名为 Dicer 酶。上述理论假设在以果蝇为动物模型实验中获得了验证，果蝇基因组编码两个 Rnase III 基因 *CG4792* 和 *CG6493*，Bernstein 和他的同事^[38]用免疫亲和和层析法纯化了果蝇 *CG4792* 蛋白质，并证明了该蛋白质能够有效地将 dsRNA 切割成 siRNA，进而诱导 RNAi，由此，*CG4792* 蛋白被命名为 Dicer-1。研究发现，Dicer 酶在进化上相当保守，不论是在真菌^[27]、植物^[39,40]、昆虫^[41]、

还是哺乳动物^[42~44]细胞内普遍存在同源产物，这暗示在相应物种中 RNAi 分子机制也同样保守。

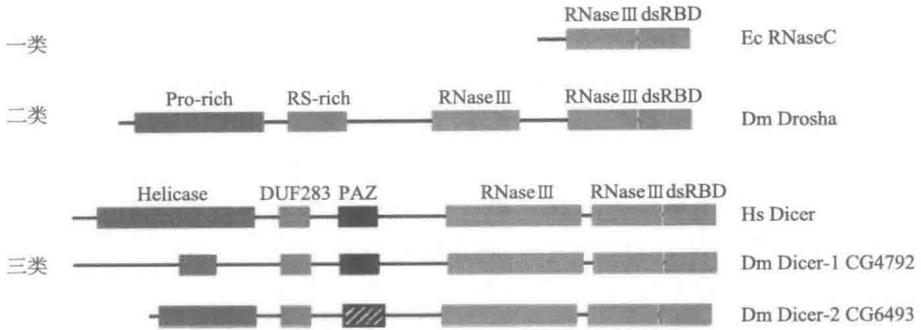


图 5 RNase III 家族分类^[34]

Dicer 酶是如何启动对 dsRNA 的切割呢？早期的假设认为，Dicer 酶在底物 dsRNA 螺旋结构上形成二聚体，然后催化四个核酸内切反应^[45]。最近的研究结果表明，Dicer 可能以单聚体形式催化两个核酸内切反应^[44,46]，Dicer 酶首先与 dsRNA 的末端结合，然后以从末端起约每 22 bp 为一个跨度进行切割，假如 dsRNA 的末端受到修饰，此时 Dicer 酶无法从双链末端启动切割，而必须从双链内部起始，反应就显著变慢^[44]。Zhang 等^[44]认为，从双链内部启动反应的效率远远比从末端启动效率低，但是，一旦 dsRNA 被从内部启动反应的 Dicer 酶切开之后，就暴露了新的正常的末端，随后反应就恢复到应有的速度。

Dicer 酶是如何对 dsRNA 进行内切反应的呢？第一类 Rnase III 晶体结构的解析^[47]为 Dicer 蛋白高级结构以及如何催化内切反应提供了很有价值的参考。第一类 Rnase III 晶体结构是在没有 dsRNA 结合的情况下获得的，但是研究人员根据晶体结构展现出来的催化氨基酸残基对 dsRNA 的结合位点作出了推测^[47]。该晶体结构显示（图 6），每个 Rnase III 单体有两个活性中心，而每个单体都有多个氨基酸残基与另一个单体共同形成复合的活性位点，由此形成的二聚体将能够从 dsRNA 的内部进行结合，催化内切反应形成的两条新链 3' 末端具有 2 个碱基的突出（overhang），突出碱基的数目和小片段 dsRNA 长度分别由二聚体一端的复合活性中心空间跨度和两个复合活性中心之间的距离决定。然而，第一类 Rnase III 催化反应的模式似乎并不适合 Dicer 酶，因为，与单体形式催化反应的 Dicer 酶相比，以二聚体形式催化反应的第一类 Rnase III 缺失了多个重要的具有催化功能的氨基酸残基。更令人惊奇的是，对 Dicer 酶的额外的有催化功能的氨基酸进行突变，不会降低 Dicer 酶的活性^[46]，这暗示 Dicer 酶的每一个 Rnase III 结构域可能不会有超过一个的活性中心存在。由此，Zhang^[46]和 Hammond^[34]等构建了更加合理的 Dicer 酶催化反应模型（图 7）。在这个模型中，Dicer 酶的两

个 Rnase III 结构域偶联形成分子内的假二聚结构，这样所形成的活性中心与第一类 Rnase III 二聚体类似。Dicer 酶 Rnase III 假二聚体结构的两个催化位点分别催化 dsRNA 双链的其中一条单链。形成的 siRNA 的 3' 末端 2 个碱基的突出由假二聚体形成的两个活性中心间的空间跨度所决定，与 Rnase III 催化位点在 Dicer 肽链上的氨基酸残基距离无关。而 siRNA 产物的长度由 PAZ 结构域与 Rnase III 活性中心间的距离决定。

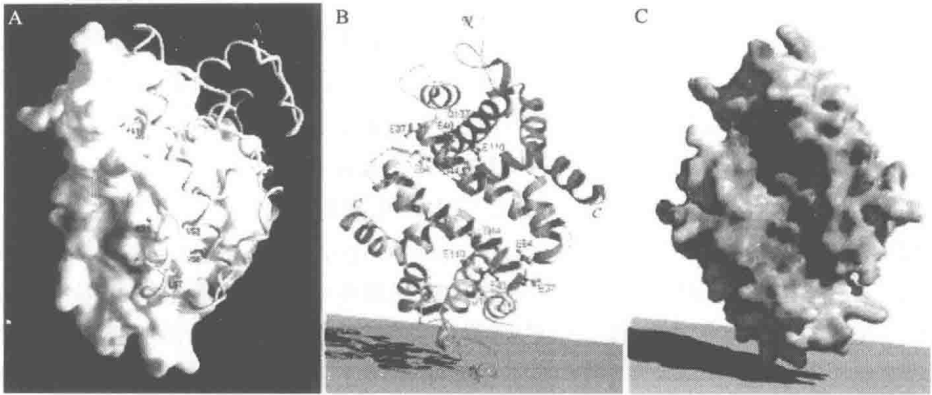


图 6 第一类 RNase III 晶体结构解析^[47]

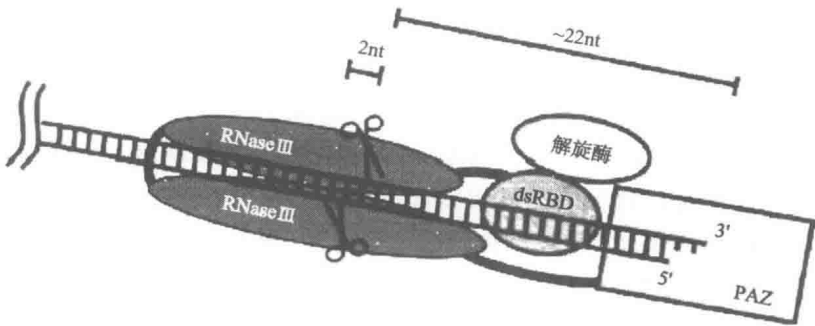


图 7 Dicer 酶催化 dsRNA 剪切反应模式^[34,46]

1.2.3 中间阶段：RISC 装载 siRNA

1.2.3.1 RISC 蛋白组分

正如前面所提到的，Fire 等^[6,48]首先预测到了一系列蛋白质的存在，它们与 siRNA 双螺旋结构解旋，和能够帮助 siRNA 识别特异性的靶 mRNA 并进行切割等功能有关。第一个验证性的工作由 Tuschl 等^[19]完成，他们发现，dsRNA