



華夏英才基金學術文庫

汤 华 主编

# RNA干扰

---

## 原理与应用



科学出版社

[www.sciencep.com](http://www.sciencep.com)



华夏英才基金学术文库

# RNA干扰 原理与应用

汤 华 主编

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

双链 RNA 可抑制含有特定序列的基因表达,即 RNA 干扰的发现开创了一个新的生命科学研究领域,目前这个研究领域正在快速发展之中。书中对 RNA 干扰的理论系统、技术体系及应用研究进行整体的构思,以该领域最新的研究成果为基础,除了双链 RNA 干扰之外,重点突出了对新发现的微小 RNA (miRNA) 进展的描述,从而全面系统地描述了 RNA 干扰;结合作者实验中的研究经验,系统地介绍了当今 RNA 干扰在多种生物体系中研究的实用技术方法。

本书适合生物学、医学及相关领域的实验人员、研究生等使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

RNA 干扰:原理与应用/汤华主编. —北京:科学出版社,2006  
(华夏英才基金学术文库)

ISBN 7-03-016331-1

I. R… II. 汤… III. 核糖核酸-生物技术 IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 115790 号

责任编辑:庞在堂 彭克里 席慧/责任校对:包志虹

责任印制:钱玉芬/封面设计:王浩

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>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2006年9月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2006年9月第一次印刷 印张:31 插页:1

印数:1—3 000

字数:688 000

定价:75.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(环伟))

## 编写人员名单

主 编 汤 华

参编人员 (按姓氏笔画为序)

马卓娅 王 芳 刘 民 汤 华

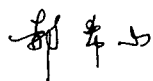
李 欣 李怡璇 沈志伟 唐晓燕

强 冉 薛晓荣

## 序 言

生命科学的进步是以对自然界新的发现、揭示生命规律为基础的；技术的创新是以科学进步、新的理论为基础的。RNA 干扰理论及技术是生命科学领域近十几年重大的进展之一，它加深了人们对生命规律的认识。由于 RNA 干扰理论及技术的逐步成熟，日益显现出其对生命科学、医药科学等领域的深刻影响，它的广泛应用大大加速了基因或基因组功能的确定，利用 RNA 干扰技术可能开发出治疗疾病的新方法或手段。因而近年来，RNA 干扰技术在其本身理论成熟的同时，迅速扩展到生命科学研究的各个领域及药物研发等领域，尤其在抗病毒、抗肿瘤等疾病研究和治疗方面日益体现出重要价值。

汤华教授根据该领域最新的研究成果并结合自己的经验，精心组织、设计并撰写了《RNA 干扰技术：原理与应用》一书。该书系统地描述了 RNA 干扰，包括微小 RNA (microRNA) 的作用原理及分子机制、可行的技术程序以及应用领域的研究成果，这些内容反映了国际上该领域最前沿的研究水平。我相信此书的出版将为 RNA 干扰技术在我国生命科学及医药领域的应用和基础研究起到积极的推动性作用。

郝希山 

中国工程院院士  
天津医科大学校长  
2006 年 6 月 28 日

# 前 言

RNA 不仅作为遗传信息表达的中介体,而且直接参与基因表达的调控过程,从而影响生命体的发育、细胞的分化与功能,这一重要发现是生命科学领域近 20 年来最大的进展之一。近几年来, RNA 干扰,尤其是 siRNA 及新近发现的微小 RNA (miRNA) 研究的发展迅速,目前 RNA 干扰的理论及相关技术已渗透到生命科学的各个领域,引起了越来越多的学者的关注与兴趣。因此,我们根据 RNA 干扰的研究进展并结合本实验室开展这方面工作的经验编写此书。

RNA 干扰现象及分子机制的阐明已逐步形成了新的理论系统,其相关的或由这种理论发展起来的技术方法具有特殊性, RNA 干扰技术作为表观遗传学 (epigenetics) 研究的高效工具在多种生物体的发育、细胞功能、疾病机制等方面得到广泛的应用,并有可能开发成治疗疾病的新方式或新的药物。因而本书按照 RNA 干扰理论 (第 1~7 章)、RNA 干扰技术原理与方法 (第 8~13 章) 和 RNA 干扰的应用研究 (第 14~18 章) 三大部分顺序编写。

本书是由直接从事 RNA 干扰工作的科研人员承担编写的,汤华参与各章节的编写及总审,其他章节的编写为:李欣 (第 1、2 章),王芳 (第 2、3、4、5、6、7、13、16 章),唐晓燕 (第 1、8、9、10、11、12 和 18 章),李怡璇 (第 12、14 和 16 章),强冉 (第 12、15 和 16 章),沈志伟 (第 12、14、17 章),马卓娅 (第 12、13、15 和 17 章),薛晓荣 (第 12、14 和 17 章),刘民 (第 14 章)。此外,唐晓燕、李怡璇、王芳和刘民为本书的校对做了大量的工作,在此表示感谢。

特别感谢中共中央统战部华夏英才基金管理委员会对本书出版的鼎力资助及关怀。中共天津市委、天津市教育卫生工作委员会及天津医科大学各级统战部领导对本书编写给予了热情支持,在此表示诚挚的谢意。

希望本书的出版能对同道们有所裨益,由于 RNA 干扰的理论技术是近几年发展起来的新领域,而且进展非常迅速,因此本书中不当之处在所难免,请读者批评指正。

汤 华

天津医科大学

天津市生命科学中心实验室

2005 年 12 月

# 目 录

序言  
前言

## 第 1 部分 RNA 干扰理论

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| 1 RNA 干扰的发展历史与意义 .....                        | 3  |
| 1.1 RNAi 的发现 .....                            | 3  |
| 1.2 RNAi 的意义 .....                            | 8  |
| 2 微小 RNA 概述 .....                             | 12 |
| 2.1 miRNA 的发现过程 .....                         | 12 |
| 2.2 miRNA 的生物学特征 .....                        | 14 |
| 2.3 miRNA 的基因组学 .....                         | 17 |
| 2.4 miRNA 的成熟及效应过程 .....                      | 22 |
| 2.5 miRNA 的功能 .....                           | 25 |
| 2.6 展望 .....                                  | 29 |
| 3 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 .....                     | 35 |
| 3.1 RdRP 在基因沉默中作用的发现及相关证据 .....               | 35 |
| 3.2 RdRP 的生化物理性质及其晶体结构 .....                  | 36 |
| 3.3 RdRP 与 RNA 病毒 .....                       | 38 |
| 3.4 RdRP 和 RNA 沉默 .....                       | 39 |
| 3.5 降级性 PCR、过渡性 RNAi 及系统性 RNAi .....          | 42 |
| 3.6 RdRP 作用过程中的问题 .....                       | 45 |
| 4 微处理器 .....                                  | 49 |
| 4.1 微处理器的相关蛋白成分及其对 miRNA 的加工 .....            | 49 |
| 4.2 pre-miRNA 从细胞核输出的过程 .....                 | 52 |
| 5 干扰性小 RNA 产生的关键性蛋白——Dicer .....              | 55 |
| 5.1 DCR 的发现背景 .....                           | 55 |
| 5.2 DCR 的一般生化属性及相关生物学功能 .....                 | 56 |
| 5.3 DCR 的作用方式及在不同生物体中的作用 .....                | 60 |
| 5.4 DCR 作用的底物——dsRNA 及 pre-miRNA 的特征及来源 ..... | 68 |
| 5.5 DCR 的加工产物——siRNA 和 miRNA .....            | 71 |
| 5.6 不同生物体中 DCR 的同源物及其基因 .....                 | 72 |

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| <b>6 RNA 诱导的沉默复合体</b>            | 78  |
| 6.1 RISC 的发现背景                   | 79  |
| 6.2 参与 RISC 组装的小 RNA 分子及其可能的组装模式 | 81  |
| 6.3 RISC 的主要成分——AGO 蛋白           | 85  |
| 6.4 RISC 在果蝇体内的组装模型              | 93  |
| 6.5 RNAi 的剪切模型                   | 95  |
| 6.6 RISC 指导的靶向性剪切的动力学研究          | 97  |
| 6.7 参与 RISC 组装及效应过程的相关蛋白质及影响因子   | 99  |
| 6.8 RISC 的功能                     | 113 |
| 6.9 小结与展望                        | 115 |
| <b>7 细胞核内的 RNA 干扰途径</b>          | 124 |
| 7.1 RNA 指导的 DNA 甲基化              | 124 |
| 7.2 RNAi 和异染色质的形成                | 128 |
| 7.3 RNAi 和 DNA 切除                | 135 |
| 7.4 减数分裂性沉默、配对和 RNAi             | 137 |
| 7.5 细胞核内 RNAi 途径的作用方式            | 138 |
| 7.6 其他生物体中的相关机制                  | 139 |
| 7.7 小结与展望                        | 140 |

## 第 2 部分 RNA 干扰技术原理与方法

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| <b>8 siRNA 或 dsRNA 的设计与筛选策略</b> | 149 |
| 8.1 重组质粒方法筛选 siRNA              | 151 |
| 8.2 高通量筛选 siRNA 的微阵列方法          | 154 |
| <b>9 化学方法合成 siRNA</b>           | 157 |
| 9.1 2'-tBDMS 方法                 | 158 |
| 9.2 2'-TOM 方法                   | 159 |
| 9.3 2'-ACE 方法                   | 159 |
| <b>10 siRNA 的体外转录及生物合成方法</b>    | 161 |
| 10.1 PCR siRNA 合成法              | 162 |
| 10.2 T7 RNA 聚合酶转录法              | 165 |
| 10.3 应用重组人 Dicer 体外合成 siRNA     | 168 |
| <b>11 基因工程方法制备 siRNA</b>        | 170 |
| 11.1 表达元件的构建                    | 170 |
| 11.2 载体构建                       | 180 |
| <b>12 siRNA 的实验技术方法</b>         | 191 |
| 12.1 siRNA 的体外合成及转染方法           | 191 |

|           |                                   |            |
|-----------|-----------------------------------|------------|
| 12.2      | 体外转录制备 dsRNA .....                | 198        |
| 12.3      | 基因工程方法制备 siRNA 及转染细胞的方法 .....     | 202        |
| 12.4      | RNAi 在其他生物体中的应用研究方法 .....         | 213        |
| <b>13</b> | <b>miRNA 的实验技术方法 .....</b>        | <b>234</b> |
| 13.1      | miRNA 的提取 .....                   | 234        |
| 13.2      | miRNA 克隆 .....                    | 238        |
| 13.3      | miRNA 分子杂交检测技术——Northern 印迹 ..... | 246        |

### 第 3 部分 RNA 干扰的应用研究

|                 |                                  |            |
|-----------------|----------------------------------|------------|
| <b>14</b>       | <b>RNA 干扰在研究基因组功能方面的应用 .....</b> | <b>259</b> |
| 14.1            | 动植物中的 RNAi .....                 | 259        |
| 14.2            | RNAi 在线虫全基因组功能研究中的应用 .....       | 262        |
| 14.3            | RNAi 在果蝇研究方面的应用 .....            | 286        |
| 14.4            | RNAi 技术在锥虫研究中的应用 .....           | 294        |
| 14.5            | PTGS 在植物基因及基因组功能方面的研究 .....      | 301        |
| <b>15</b>       | <b>RNA 干扰在研究胚胎发育方面的应用 .....</b>  | <b>319</b> |
| 15.1            | RNAi 在小鼠卵母细胞和胚胎中的应用 .....        | 319        |
| 15.2            | RNAi 在鸟类胚胎发育中的研究 .....           | 336        |
| <b>16</b>       | <b>RNA 干扰在抗病毒研究中的应用 .....</b>    | <b>358</b> |
| 16.1            | RNAi 抗 HIV-1 病毒感染 .....          | 358        |
| 16.2            | RNAi 抗禽类逆转录病毒感染 .....            | 373        |
| 16.3            | RNAi 抗肝炎病毒感染 .....               | 377        |
| 16.4            | RNAi 抗流感病毒感染 .....               | 392        |
| 16.5            | RNAi 抗 SARS 相关冠状病毒感染 .....       | 397        |
| 16.6            | RNAi 抗轮状病毒感染 .....               | 400        |
| <b>17</b>       | <b>RNA 干扰在肿瘤研究中的应用 .....</b>     | <b>410</b> |
| 17.1            | 目前常用的肿瘤相关基因功能的研究方法 .....         | 410        |
| 17.2            | RNAi 在肿瘤生物学中的应用 .....            | 413        |
| 17.3            | RNAi 在基因治疗中遇到的主要问题 .....         | 435        |
| <b>18</b>       | <b>RNA 干扰在其他领域的治疗研究 .....</b>    | <b>444</b> |
| 18.1            | RNAi 在心血管疾病中的应用研究 .....          | 444        |
| 18.2            | RNAi 在神经系统疾病中的应用研究 .....         | 446        |
| 18.3            | RNAi 在内分泌系统疾病中的研究进展 .....        | 454        |
| 18.4            | RNAi 在自身免疫性疾病中的应用研究 .....        | 456        |
| 18.5            | RNAi 在生物学和医学中的应用前景 .....         | 458        |
| <b>索引 .....</b> |                                  | <b>465</b> |

# 第 1 部分 RNA 干扰理论

传统意义上的 RNA 干扰 (RNAi) 主要是指外源性双链 RNA 在体内引发的基因沉默现象, 而新近发现的微小 RNA 导致的内源性 RNAi 赋予了 RNAi 新的内涵。

目前, 关于 siRNA 和微小 RNA 的产生以及基因沉默过程中涉及的相关成分 (RdRP、Drosha、Dicer、RISC 等) 的研究取得了重大突破。此部分将对 RNA 干扰现象的发现、生物发生及效应过程的分子机制进行系统介绍。

## 本部分包括以下 7 章:

1. RNA 干扰的发展历史与意义
2. 微小 RNA 概述
3. 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶
4. 微处理器
5. 干扰性小 RNA 产生的关键性蛋白——Dicer
6. RNA 诱导的沉默复合体
7. 细胞核内的 RNA 干扰途径



# 1 RNA 干扰的发展历史与意义

1908 年, 摩尔根实验室开始利用遗传突变筛选方法在果蝇 (*Drosophila*) 中分离获得数十种突变体。这种正向 (forward) 遗传筛选方法为理解细胞和器官的形成及功能作出了巨大的贡献。然而, 这种遗传筛选方法仅能在一些理想的有机体中进行。这种有机体具有在实验室条件下能繁殖、生命周期短、繁殖后代甚多等特点, 并需数月或数年的工作才能确定特异表型的决定基因。随着分子生物学技术的出现, 科学家开始寻找“后门进入”途径, 即以序列同源性或生物化学功能为基础来快速确定其基因生物学功能, 称之为反向遗传学 (reverse genetics, 从基因到表型)。

1984 年, Izant 和 Wostrarb 在这个方向上前进了一大步, 即用遗传工程构建表达与胸苷激酶 (thymidine kinase) 基因的反义 RNA 互补的 DNA 重组子转染培养的细胞, 发现胸苷激酶在这些细胞中的表达显著减少。此后, 研究者陆续发现多种反义 RNA 对各种特异基因活性表达有抑制作用。这种开拓性技术不仅对于研究相关细胞学和那些不能用经典遗传学分析方法研究的整个机体, 如爪蟾, 具有极其重要的意义, 而且对于建立基因功能研究模式做出了突出贡献。但因其作用相对较弱, 并且单链 RNA 相对很不稳定, 其应用研究未能广泛进行。

而新近发现的 dsRNA 介导对同源靶 RNA 的降解诱导产生了强大且特异性的基因表达抑制或沉默作用, 称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。这为研究生物体功能基因及表观遗传学 (epigenetics) 提供了极其有效的工具。

## 1.1 RNAi 的发现

### 1.1.1 RNAi 在植物和真菌中导致转录后的基因沉默

在 20 世纪 90 年代初期, 研究者发现在植物和真菌中存在对转基因序列应答的转录后基因沉默方式 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)。Aapoli 等设计将苯基乙烯酮合成酶 (chalcone synthetase) 基因转入矮牵牛属植物来提高色素产量时, 意外地发现转产量 40% 以上的转基因植物的花呈现白色或杂斑色而非紫色。这种效应不仅是由于所转苯基乙烯酮合成酶基因的作用, 而且是其内源性同源基因沉默或受到抑制的结果, 因而称之为共抑制 (cosuppressing)。1992 年, 同样研究色素产生的 Roman 和 Macino 报道在粗糙链孢菌 (*Neurospora crassa*) 中也发现类似的现象, 称之为清除 (quelling)。在这两类研究中观察到一些子代

完全恢复了父代表型或隐性状态。在这些研究中都试图高表达基因反而导致其沉默, 不过, 作用是短暂的。根据这些依据, 研究者们形成了这样的理论——DNA甲基化或 RNA 中间体介导了这种应答。关于真菌中基因表达清除来自于转录后过程的研究进一步确定其作用分子很可能是存在于细胞浆中的 RNA 分子。与此相反, 一些植物中转录后的共抑制作用可能与基因本身的甲基化有关, 导致了基因表达的下调。植物中转录抑制作用可通过基因表达的转录水平和转录后水平来进行调控, 后来均称为 RNAi, 并得出以下结论: RNA 分子是其介导效应分子。但当时其介导的 RNA 分子特点或结构尚未得到阐明。

### 1.1.2 在线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现 RNAi 现象

在体外合成反义 RNA 的研究中, 研究者应用同义 RNA 作为特异性的阴性对照, 但实验结果让人感到意外——分别注射同义和反义 RNA 产生了类似的表型。在果蝇中的研究证实了这一点, 同时注射同义和反义 RNA 都可产生特异性和可重复性的表型。这种相反但互补的分子设计所产生的效应被命名为“RNA 干扰”, 以此来区别经典的反义抑制作用。此互补双链 RNA 除能产生特异性抑制基因表达作用外, 还被发现能从注射原点扩散到周围的细胞。这提示干扰性 RNA 在线虫中能从起始注射点转移到大多数细胞的组织中, 引发系统性应答。利用这种反向遗传学方法, 研究人员将线虫浸泡在 RNA 分子中以获得有意义的表型, 从而在线虫中对 RNAi 应答的分子机制进行了研究<sup>[1]</sup>。

1998 年, 卡内基研究所的 Fine 等首次发现双链 RNA (dsRNA), 而非单链反义 RNA 能诱发果蝇体内序列特异性的内源性基因 mRNA 的降解。对于起初观察到的表型作用, 研究者认为可能是在体外用质粒做模板进行转录制备同义和反义 RNA 时, 产物包含有少量互补的极性 RNA 分子, 形成的 dsRNA 和单链 RNA 共同作用导致了上述的效应。结果证实经聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 纯化出来的单链 RNA 注射入体内所致的表型变化明显减少, 而正义链与反义链在体外退火形成的双链 RNA 则引起更为快速、特异的与其双链 RNA 正义链同源的 mRNA 的降解。

RNAi 具有很多的特征, 其中之一是已证明了小干扰 RNA (short/small interfering RNA, siRNA) 能引发机体组织细胞功能的变化, 且其发挥功能是以酶底物米-曼动力学方式进行的, 即一个分子能诱发数十甚至数百个靶 mRNA 个体分子的降解。这一点与反义单链 RNA 的反义抑制作用不同, 后者需要过量的反义单链 RNA (antisense RNA, asRNA) 来作用于靶 mRNA。然而, dsRNA 如何能靶定同源的核酸序列? 什么样的模式能解释 dsRNA 的作用机制或潜力?

有研究者利用原位杂交观察到 dsRNA 靶定的 mRNA 不能聚集, 当时认为 dsRNA 通过某种方式直接靶定基因, 可能干扰转录的起始或延伸, 这可解释为什么在单个细胞内一个或两个 dsRNA 分子可导致靶 mRNA 的明显减少。然而,

至今一直找不到明显且完整的证据支持这种理论构想。在 dsRNA 存在的情况下, 研究者发现 dsRNA 靶定的基因具有连续性及转录后性的特点。但其编码的 mRNA 在翻译之前即快速降解。支持转录后机制的证据还包括 dsRNA 不能靶定内含子或启动子区域, 这提示作用部位在细胞浆内这一机制。此外, 尚未发现靶定的细胞内新合成的这种 mRNA 的序列本身有任何改变。这并不奇怪, 因为 RNAi 作用是完全可逆的。在果蝇 RNAi 机制的研究中, 由于果蝇缺乏明显的甲基化系统, 尚不能确定靶定的基因是否被甲基化导致沉默效应。

目前, 关于 dsRNA 的作用机制主要有以下三种模式: ①在与靶基因序列完全互补的情况下, 导致靶序列的降解; ②在与靶基因序列不完全互补的情况下, 使靶基因翻译受到抑制; ③通过甲基化修饰影响染色体的结构 (如异染色质形成), 从而导致转录水平上的抑制。

在线虫中, dsRNA 引发的 PTGS 导致了这样一种理论, 即在转基因植物中 dsRNA 引发基因沉默的意外发现可能至少部分解释了植物中的 PTGS。此后不久, 其倡导者研究阐明在烟草和水稻植物中遗传工程表达 dsRNA 确实呈现了基因沉默。植物和线虫两者进化差异很大, 但对 dsRNA 的应答反应出现类似的方式。另外一个共同的特性是干扰性 RNA 能在组织之间扩散, 进而激活出现系统沉默效应。不过, 这种结果并不意味着所有的转基因诱导 PTGS 都是因体内正义链与反义转录物退火而成的 dsRNA 所致。一种解释模式是高水平同义转录物可能引发通过依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶形成拷贝 RNA (cRNA)。因而有研究者认为 dsRNA 或者 cRNA 本身可能是干扰 RNA 的来源。进而, 在植物中这种 RNA 可能反馈至基因, 并介导了 DNA 甲基化。此后的一系列研究也证实了这种理论。

在线虫中发现 RNAi 后, 科学家开始研究 dsRNA 是否在其他生物体中也存在诱发基因沉默的现象。在锥虫 (*Trypanosome*, 一种原生生物)、果蝇和许多其他的动物和植物种系中发现 RNAi 能关闭或减少基因表达。起初, 研究者认为 RNAi 在其他脊椎动物中的作用应该是有限的。这是由于对病毒或外源 RNA 应答的依赖于 dsRNA 激活的蛋白激酶 R (double-stranded RNA activated protein kinase R, PKR) 通过触发整个细胞剧烈的反应而最终导致细胞死亡。但是, 通过靶定的卵母细胞和 PKR 表达产生之前的小鼠胚胎, 证明 dsRNA 同样能引发序列特异性沉默。在斑马鱼研究中也获得类似的结果, 但似乎由于非特异性作用, 其结果不甚理想。因而, 尽管 dsRNA 在极大多数不同种类生物体中都可导致序列特异性沉默, 但并不在所有有机体中引发相同的结果。进一步的研究表明, RNAi、PTGS 和清除过程是相似的, 机体运用进化保守这种机制来阻止非自我或错误遗传信息的表达, 如病毒转位因子编码的蛋白质; 异常 RNA 结构, 如弥散性 dsRNA 或一些 RNA 病毒表达的复制中间体, 提示宿主细胞存在外源入侵物并引发沉默。支持这种 RNAi 和相关共抑制/PTGS 应答功能解释的依据是对

RNA 沉默分子途径成分进行的一些突变导致机体对病毒的敏感性增加。

### 1.1.3 RNAi 作用机制的模式

RNAi 在分析基因功能方面具有巨大的价值, 其作用过程中的奇妙机制同样引人注目。dsRNA 可以直接靶定多个拷贝的 mRNA 分子, 提示 dsRNA 在体内存在扩增机制。在对果蝇、蠕虫、真菌、植物和哺乳动物细胞的生化与遗传学研究中, 研究者获得大量相关证据, 在此基础上提出了作用机制的模式。RNA 沉默的应答的核心反应是引发 dsRNA 通过三磷酸腺苷 (ATP) 依赖性 RNA 酶 III (Dicer, DCR) 加工处理成 21~25bp (碱基对), 并具有两个核苷酸突出在其 3' 末端的片段。DCR 含有多个蛋白结构域, 包括有依赖于 ATP 的 RNA 解旋酶、PIWI 结构域、两个顺式排列的 RNA 酶 III (RNase III) 结构域及一个 dsRNA 结合结构域。DCR 作用产生的 21~25bp 的产物被称为短或小干扰 RNA 分子 (siRNA)。siRNA 是引发核酸酶降解 mRNA 的引导物, 每一个 siRNA 都与 RNA 诱导沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 相关联, 并且研究者推测在 RISC 中 siRNA 进行解链释放出其反义 RNA 通过碱基配对原则与靶 mRNA 结合。这种碱基配对结合导致靶 mRNA 的内源性降解, 被切断或产生失去 polyA 尾及 5'-甲基鸟嘌呤帽的片段, 释放出的每一片段更易被 RNA 监视机制进一步降解。在靶 mRNA 降解之后, 包含有 siRNA 的 RISC 复合体继续靶定另外的 mRNA 分子。

首先, 引发 dsRNA 能产生多个 siRNA, 一般一个 500bp dsRNA 能产生约 20 个左右的 siRNA, 然后 siRNA 整合入 RISC, 使复合体发挥催化活性靶定并切割多个 mRNA 分子。这种模式解释了引发 dsRNA 的酶底物米-曼氏动力学过程, 包括扩增步骤和催化反应过程。DCR 和 RISC 在可能的 RNAi 作用机制中是进化上最保守的两个成分, 并且是核心 RNAi 应答的主要催化反应过程发生的部位。

最近, 至少在一些研究中发现扩增反应的存在。次级 siRNA 可能通过称为过渡性 RNAi (transitive RNAi) 的机制产生。其过程可能是 siRNA 或短的反义 RNA 可发挥启动特异性依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRP) 合成与被靶定序列互补的 RNA (cRNA) 共同重新合成产生 dsRNA 的作用, 然后通过 DCR 裂解成新的 siRNA。也有新的证据表明有些 RdRP 也能非常高水平地进行特异性转录或在检测到如病毒入侵的异常 RNA 存在的情况下不需要启动子就能产生 cRNA。最早提出的这种设想是用来解释植物转基因产生的 PTGS 现象。推测对细胞带来的优势是更多的 mRNA 引发并导致更多的靶基因失活, 使得细胞更有效地清除感染的病毒。

在线虫、放线菌等生物体中进行 RdRP 突变的研究表明这些蛋白质分子在 RNAi 中起到保守和基础性作用。有意义的是一些突变体可增加机体对病毒的敏感性, 以及导致机体发育的缺陷。让人感到奇怪的是至今尚未在果蝇及人类基因

组中发现 RdRP 类似物。那么, 这种引发与扩增方式是否是 RNAi 的通用特性? 尽管在果蝇细胞提取物中观察到 siRNA 指导的 RNA 合成。然而, 3'-OH 被修饰的 siRNA 据推测是不能作为 RNA 合成的启动引物的, 但在人 HeLa 细胞和果蝇中却能引发 RNAi 产生。此外, 在小鼠卵母细胞中, RNAi 的过程并不需要 RNA 合成。这些证据表明, 即使在果蝇及人体细胞中 RNA 扩增对于其 RNAi 的应答也是非必需的。缺乏过渡性 RNAi 的优点是增加其特异性, 以致对这种 mRNA 的替换性剪切体 (alternative spliced mRNA) 可能需要分别进行靶定。

#### 1.1.4 RNAi 发挥的生物功能

防止通过 RNA 中介体的病毒或“跳跃”因子的基因表达可能是 RNAi 的主要功能之一, 显然这种通过 RNA 中介体裂解的机制对细胞是非常有利的, 进而通过引导 RNA 扩增而达到靶定许多不需要的 RNA 分子的目的, 从而使细胞更能有效地达到防止引发和靶定这种 mRNA 翻译成功能性蛋白质的作用。对哺乳动物细胞来说, 更大的意义在于 siRNA 并不释放 PKR 活性, 而是介导序列特异性沉默。目前, 以 siRNA 为基础的 RNAi 策略应用于包括哺乳动物在内的多种生物系统中。

RNA 沉默突变体的筛选最早是在放线菌中进行的, 最近在线虫和果蝇中也有所发展, 并导致确定了几种 RNAi 应答相应蛋白质必需的基因, 包括 DCR、RdRP、RISC 及各种解旋酶等。沉默包含的连续遗传学途径分析阐明了这些不同功能成分发挥作用的前后顺序及一些新的功能。有些 RNAi 相关基因缺失突变表现出一些表型, 包括增强了对病毒感染的敏感性, 增加了“跳跃”因子的移动, 发育时序的缺失, 有丝分裂和减数分裂的缺失, 不育和其他一些发育过程的缺陷。这些表型对进一步增强对 RNAi 功能的理解具有重大意义。

最激动人心的发现之一是 RNAi 调控有机体内源性基因的表达。这种内源性 RNAi 作用是由机体基因组编码的一类小的调控性 RNA (microRNA, miRNA) 所介导的。这种 miRNA 多数情况下与靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' untranslated region, 3'UTR) 完全互补结合, 有些 miRNA 功能上类似 siRNA, 整合入 RISC 并导致靶 mRNA 裂解。不过, 许多 miRNA 可能通过其他替代途径发挥作用, 它与靶序列并不完全互补结合, 因而不影响靶 mRNA 稳定性, 而是通过干扰翻译过程而阻止编码蛋白质的合成。最近发现, 这种干扰性 RNA 与靶 mRNA 的错配及甲基化的部位至关重要, miRNA 在与靶位杂交过程中, 其与靶序列的错配发生在结合区中间部位从而形成“U”形区域, 影响其靶基因的翻译过程。

假如 siRNA 分子能有效地结合其靶序列 (序列配对及其空间结构决定), 那么 siRNA 分子还可以导致靶 RNA 分子的切割。已有证据表明单一结合位点也可介导翻译过程的抑制或下调。然而, let-7 miRNA 的内源性靶分子的 3'UTR 含有多个与其结合的位点, 这提示有些情况下, 单一结合的情况可能不足以抑制靶基

因的表达。

### 1.1.5 RNAi 可能引发 DNA 的共价修饰

目前认为 RNAi 在细胞内发挥作用主要包括扩增和催化反应两个主要步骤。而在植物中,发现 RNAi 也能引发 DNA 甲基化,从而导致转录沉默<sup>[3]</sup>。现在证明 siRNA 可能通过直接 DNA 甲基化和在其他一些基因组中的共价修饰来完成转录过程。在植物中,这一活性可能由另外一类 siRNA 介导完成。

最近最有意义的发现之一是在粟酒裂殖酵母 (*S. pombe*) 中 RNAi 机制在合成和维持高度有序的染色质结构与功能中发挥至关重要的作用。缺失 RNAi 过程中的关键基因导致中心粒 DNA 和其他类型的异染色质的表观遗传沉默现象缺失。这些改变伴随着有这些区域的甲基化状态改变进而中心黏合作用丧失,导致核分裂过程中染色体的错误分离。有研究者据此提出理论解释了在野生型细胞中,中心粒重复序列的表达导致 dsRNA 的形成,DCR 将其裂解为 siRNA, siRNA 指导异源染色质位点的 DNA 甲基化。也有报道 siRNA 介导染色体结构更大的改变,在四膜虫中程序性基因组重排导致特异性 DNA 序列的切除。

## 1.2 RNAi 的意义

### 1.2.1 RNAi 在功能性基因研究中的应用

随着基因组结构及测序工作的完成,接下来的基因功能确定是生命科学的最具挑战的领域。传统的基因敲除、转基因或突变的方法存在周期长、不能大规模同步进行等缺点。RNAi 的发现及作为反向遗传学技术的应用似乎是最完美的技术,其最合理的用途可能是用来分析由不同的基因组项目推测的数以千计的基因功能。RNAi 被广泛应用在线虫及果蝇的基因功能的研究中,主要是通过大量研究对某一特异性遗传途径进行解析或通过研究系统性功能基因组中每个基因的方式来进行。RNAi 在基因组水平上用来筛选确定导致某一特异表型或改变转基因表达的基因。

或许至今最宏伟的计划是由英国和荷兰科学家联合启动的设计针对人类基因组中每个基因的 siRNA 项目,然后使用它们靶定肿瘤细胞系中的每个基因来确定细胞恶性转化所需的基因。更多的靶定途径是将微阵列分析及 RNAi 技术相结合,来选择性靶定在一些细胞和组织类型中上调和过表达的基因,使用这一途径已确定了控制结肠癌增殖相关的基因。

或许 RNAi 最有意义的应用途径之一是在那些最好的遗传学工具不能使用的有机体中进行基因功能性研究。RNAi 提供的反向遗传学方法给一些常规遗传学方式不很适合研究的有机体带来新的研究途径。RNAi 也能使种系之间如果蝇和