

实用RNAi技术

—— 线虫、果蝇和哺乳动物细胞基因

沉默的基本原则与方法

RNA Interference in Practice: Principles, Basics,
and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*,
Drosophila, and Mammals



原著 Ute Schepers

主译 王俊 宋尔卫



人民卫生出版社

实用 RNAi 技术

——线虫、果蝇和哺乳动物细胞基因沉默的基本原则与方法

RNA Interference in Practice: Principles, Basics,
and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*,
Drosophila, and Mammals

原 著 Ute Schepers

主 译 王 俊 宋尔卫

副主译 徐 丹

译 者 (按姓氏笔画排序)

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 丁国富 (第三军医大学药理学教研室) | 邹 俊 (中南大学湘雅医学院) |
| 马文财 (哈尔滨医科大学生物信息学系) | 宋尔卫 (中山大学附属第二医院) |
| 王智勇 (吉林大学生命科学院) | 柳 正 (北京大学医学部基础医学院) |
| 王志刚 (哈尔滨医科大学药学院) | 范 林 (福建医科大学附属协和医院) |
| 王 俊 (中山大学附属第一医院) | 周珏宇 (南方医科大学基因工程研究所) |
| 王 俊 (第三军医大学附属新桥医院) | 宦先贵 (南京来绮尔医药科技发展有限公司) |
| 牛丕业 (华中科技大学同济医学院) | 胡春林 (解放军第 181 医院) |
| 冯志华 (四川大学附属华西医院) | 赵进军 (解放军第 157 医院) |
| 卢忠鹰 (上海之江生物科技有限公司) | 赵 华 (重庆医科大学基础研究所) |
| 张华利 (第四军医大学附属口腔医院) | 徐 丹 (新加坡国立大学) |
| 刘 峰 (中国疾病预防控制中心病毒所) | 郭 燕 (第三军医大学附属新桥医院) |
| 李金清 (第四军医大学附属唐都医院) | 郭红辉 (中山大学公共卫生学院) |
| 李修彬 (中山大学附属第一医院) | 黄 芬 (华中科技大学同济医学院) |
| 张鹏华 (中国医学科学院心血管病研究所) | 章必成 (广州军区武汉总医院) |
| 姚 琳 (南京德宝生化器材有限公司) | 韩 强 (美国 Texas 大学) |
| 汤兆明 (华中科技大学同济医学院) | 裴 军 (上海吉凯基因化学技术有限公司) |

人 民 卫 生 出 版 社

RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*, *Drosophila*, and Mammals

Copyright © 2005 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstraße 12, D-69469 Weinheim, Federal Republic of Germany.

实用 RNAi 技术

——线虫、果蝇和哺乳动物细胞基因沉默的基本原则与方法

中文版权归人民卫生出版社所有。本书受版权保护。除可在评论性文章或综述中简短引用外，未经版权所有人书面同意，不得以任何形式或方法，包括电子制作、机械制作、影印、录音及其他方式对本书的任何部分内容进行复制、转载或传送。

图书在版编目(CIP)数据

实用 RNAi 技术——线虫、果蝇和哺乳动物细胞基因沉默的基本原则与方法/王俊等主译. —北京:人民卫生出版社, 2006. 8
ISBN 7-117-07833-2

I. 实... II. 王... III. 核糖核酸—生物技术
IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 075660 号

图字: 01-2006-2200

实用 RNAi 技术

——线虫、果蝇和哺乳动物细胞基因沉默的基本原则与方法

主 译: 王 俊 宋尔卫

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京人卫印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 787×1092 1/16 印张: 17.25

字 数: 341 千字

版 次: 2006 年 8 月第 1 版 2006 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-07833-2/R·7834

定 价: 37.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

序 言

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指小分子双链 RNA (siRNA) 转录后基因沉默。siRNA 主要通过特异地与序列互补的 mRNA 结合, 并促进其降解, 从而在细胞内发挥基因抑制的作用, 最终使细胞特定的基因表达下调。

20 世纪 90 年代, 美国康乃尔大学的 Su Guo 博士在秀丽隐杆线虫中使用反义 RNA 技术时, 无意中发现正义 RNA 可以阻断基因的表达, 但她未给予合理的解释。不久, 美国马萨诸塞大学癌症中心的 Craig Mello 和华盛顿卡耐基研究院的 Andrew Fire 经研究后证实了这一现象。2001 年, 《Science》杂志首次报道 siRNA 可以诱导哺乳动物细胞特异性基因沉默。此后, RNAi 逐渐成为生物医学研究中的一项重要的实验工具。目前, RNAi 技术可以替代传统的反义核酸技术诱导特异性基因沉默, 已经迅速而广泛地应用到基因功能鉴定、基因表达转录后调控等热门研究领域, 并为多种疾病的基因治疗提供了新的思路。RNAi 研究连续两年被《Science》杂志评为年度突破技术。

在此背景下, Wiley-VCH 出版公司组织从事 RNAi 研究的一线科学家编写了这本书。本书选题新颖, 不但系统论述 RNAi 的技术原理, 更注重对具体实验技术的详细介绍。目前, 国内 RNAi 技术的研究和应用才刚刚起步, 许多实验室尚未建立完整的实验体系和方案, 迫切需要一本理论和实践并重的 RNAi 技术参考书。

有鉴如此, 由第三军医大学附属新桥医院全军肿瘤研究所的王俊和中山大学附属第二医院宋尔卫为主译, 采取网络协作翻译的形式, 约请丁香园医学论坛 (<http://www.dxy.cn/bbs>) 数十位青年学者, 在较短的时间里翻译此书, 奉献读者。翻译人员来自全国高校, 多已获得博士或硕士学位。

2002~2003 年, 我作为国家教育部选拔的高访学者, 在美国 Nebraska 大学医学中心 (UNMC) 病理和微生物学系 Rakesh K. Singh 博士的实验室工作, 在 Singh 教授的指导下, 应用基因沉默这一新技术, 抑制特异的淋巴管生成因子——血管内皮生长因子-C (VEGF-C) 的表达, 发现 CL66 乳腺癌荷瘤小鼠肿瘤淋巴管生成减少, 淋巴结和自发性肺转移下降, 鼠的生存期显著延长。今天我有机会重温这一理论和技术, 尤感亲切和回味。衷心感谢各位译者在繁忙的学习

和工作之余辛勤劳动，把 RNAi、基因沉默这一新理论、新技术系统介绍到国内。我热忱地向大家推荐这部译著，希望对读者，特别是对涉及 RNAi 领域的科研人员有所裨益。

全 军 肿 瘤 研 究 所 所 长 陈正堂 教授
全军肿瘤学专业委员会主任委员

2006 年 5 月

译者序言

作为一本实验工具书，本书有以下特点：①理论性强。本书系统介绍了 RNAi 的作用机制，如 Dicer、RISC 和 RdRp 在 RNAi 作用中的地位。②时效性强。本书呈现给广大科研人员的是 RNAi 领域的最新进展和参考文献。③实践性强。本书含有大量 RNAi 相关的实验方法，可以引导初学者入门，并帮助 RNAi 研究人员熟练掌握这项技术。④指导性强。实验方案中的注意事项有助于提高实验者的工作效率。

本书内容丰富，图文并茂。全书共分为四个部分：①RNAi：2002 年的重大突破；②线虫的 RNAi；③果蝇的 RNAi；④哺乳动物的 RNAi。在每一部分中都包含有丰富、翔实的实验方案及问题解决方案。除此之外，本书每一部分均附有相关网站的网址、参考文献和书籍；在本书的末尾还提供了试剂公司的信息。

本书是 Wiley-VCH 公司出版的 RNAi 领域的最新书籍，为 2005 年第 1 版。它不仅可以作为从事 RNAi 相关领域科研人员的工具书，也可以作为学生、初学者的入门书籍，尤其适用于国内那些急于需要在自己实验室开展这一技术的科研工作者。希望它能对我国的 RNAi 研究起到一定的指导和推动作用。

王 俊 宋尔卫

2006 年 5 月

原版前言

当我第一次做 RNAi 专题报告时，很多学者问我这样的问题，“干扰是什么意思”，“RNA 怎样产生干扰”，“为何用这样一个被物理学家使用的词来阐述 RNA 的一些现象”。其实，物理中的干扰现象和 RNA 相关的干扰理论之间虽然没有什么共同之处，但通过物理中的干扰我们可以很好地理解 RNAi：干扰是指具有相同频率的波或具有相同序列的 RNA 彼此间的加强或削弱过程。

伴随着 Craig Mello 和 Andrew Fire 首次发现双链 RNA (dsRNA) 可以有效抑制秀丽隐杆线虫同源 mRNA 表达，基因沉默的新时代诞生了。从此以后，人们发表了在不同生物体中应用 RNAi 以及将其作为治疗手段的大量报道，内容涉及大量的数据和技术环节，一时间令人不知所措，难以抓住最基本和最重要的信息。《实用 RNAi 技术——线虫、果蝇和哺乳动物细胞基因沉默的基本原则与方法》这本书是为所有科研人员编写的，包括学生、初学者以及经常使用这项技术的研究人员。他们都希望将来可以在自己实验室里应用和扩展这项技术。

《实用 RNAi 技术》这本书是最新的版本，属于 Wiley-VCH 公司出版的“实践”系列丛书中的一册。前期出版的《蛋白质组学和电泳实践》详细介绍了蛋白质组学和电泳方面的理论知识，可以指导科研人员实验操作。实验方法中插入的许多注意事项可以帮助实验人员提高工作效率。其他“实践”系列丛书的出版表明，理论与实践相结合的风格对实验性的研究具有极大的指导作用。无疑，《实用 RNAi 技术》这本书不可能是最完整的，因为有关 RNAi 的研究日新月异。然而，我们的目的是要将最新的文献呈现给广大科研人员，包括 2004 年的最新文献概要；并介绍 RNAi 的基本技术以及 RNAi 在线虫、果蝇和哺乳动物中的应用。

成功的 RNAi 实验必备的条件是什么呢？成功不仅仅依赖于我们对 RNAi 机制的了解程度，也依赖于我们所掌握的技术方法以及现有的实验条件。在科研过程中，每个科研人员常常面临的最大挑战是如何评估和利用原始文献及说明书中介绍的方法，而这本书恰恰对 RNAi 实验中的重要环节作了重要阐述，包括如何设计 siRNA 或 dsRNA；RNA 如何导入到机体不同组织；如何设计对照。这本书的内容还包括发卡载体的克隆策略、分析工具及其应用前景分析。每一章后面都附有相关网站的网址、参考文献、书籍以及试剂公司的信息。此外，本书最后

还附录有词汇表。同时，我们已对书中介绍的大部分实验进行了验证，而且随时更新这些实验方法。本书不同于其他 RNAi 方面的书籍在于：它是实验室人员在实验过程中的经验总结，因此可以立即应用到实验研究中。我们鼓励这本书的读者通读本书所有章节，这可以帮助读者详细了解 RNAi 在不同机体中的应用现状，反过来，也可以刺激读者的创造力。

最后，我要感谢在我撰写这本书的过程中所有帮助和鼓励我的人。感谢 Wiley-VCH 公司的 Frank Weinreich 的耐心帮助。感谢我的导师 Konrad Sandhoff 的大力支持。此外，感谢所有合作者在实验方法设计、实验验证及封面和插图设计过程中付出的努力。特别要感谢的是 Katja Schmitz，他总是及时地给予我帮助和批评性的建议。最后，我必须感谢我的爱人 S. Braese 以及我的家人，他们的批评和宽慰增添了我在撰写本书过程中美好的经历。

Ute Schepers

2004 年 8 月

目 录

1 RNAi: 2002 年的重大突破	1
1.1 RNAi: 功能基因组研究的工具	2
1.2 RNAi 的作用机制	3
1.3 Dicer: 裂解 dsRNA 的启动器?	3
1.4 miRNA 与 siRNA: 参与 RNAi 的两类小 RNA	6
1.5 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC): 沉默 mRNA 的效应器?	8
1.6 RNA 依赖的 RNA 多聚酶 (RdRp) 在 RNAi 作用中的地位	12
1.7 RNAi 在基因表达调控中的作用	13
1.8 哺乳动物中的 RNAi	14
1.9 应用	16
参考文献	17
2 线虫的 RNAi	23
2.1 引言	23
2.2 RNAi 在线虫中的应用	26
2.3 靶向序列的评价	26
2.4 dsRNA 的合成	27
2.4.1 DNA 模板的制备	28
2.4.1.1 质粒模板	28
2.4.1.2 通过 PCR/RT-PCR 制备 DNA 模板	28
2.4.2 体外转录获取 dsRNA	31
2.5 dsRNA 的导入	34
2.5.1 线虫的解剖学知识	35
2.5.2 用于基因沉默的线虫	36
2.5.3 线虫培养	38
2.5.4 微注射法	38
2.5.5 浸泡法	39
2.5.6 喂饲法	40
2.5.7 喂饲大肠杆菌表达 dsRNA 所用的 DNA 模板	42
2.5.8 用于表达发夹 RNA 的 DNA 模板	43

2.5.8.1 线虫启动子	44
2.5.8.2 构建反向重复序列载体	44
2.6 线虫显微镜计数	49
2.7 基因组筛选	52
2.8 线虫研究的相关文献	53
2.9 相关网站	54
参考文献	54
3 果蝇的 RNAi	58
3.1 引言	58
3.2 RNAi 在果蝇中的应用	60
3.2.1 用线性 DNA 模板制备 dsRNA	61
3.2.2 用反向重复 DNA 序列制备 dsRNA	62
3.2.3 在果蝇细胞株中诱导表达 dsRNA	67
3.2.4 局限性	67
3.3 合成 dsRNA	68
3.3.1 体外转录合成 dsRNA	68
3.3.2 反向重复 DNA	72
3.4 注射	78
3.4.1 注射服务	78
3.4.2 注射方法	78
3.4.3 准备 dsRNA 或反向重复 DNA 序列	79
3.4.4 胚胎收集	79
3.5 细胞系	82
3.6 细胞培养	84
3.6.1 S2 细胞的复苏和培养	84
3.6.2 S2 细胞的冻存	85
3.7 S2 细胞的 RNAi	86
3.7.1 磷酸钙法转染 dsRNA	87
3.7.2 浸泡法导入 dsRNA	87
3.8 高通量筛选	88
3.9 相关网址	90
3.10 果蝇研究的相关书籍和文献	90
参考文献	91
4 哺乳动物的 RNAi	95
4.1 引言	95

4.2 细胞培养中的瞬时 RNAi	96
4.2.1 siRNA 的化学合成与修饰	96
4.2.1.1 优点	100
4.2.1.2 局限性	100
4.2.2 合成 siRNA 寡核苷酸	101
4.2.3 siRNA 设计原则	101
4.2.3.1 siRNA 序列的偏倚和脱靶	101
4.2.3.2 提高 siRNA 的稳定性	102
4.2.3.3 siRNA 设计: 新的“Tuschl”法则	104
4.2.3.4 BLAST、FASTA 或 Smith-Waterman 算法	107
4.2.3.5 问题解决	108
4.2.3.6 siRNA 设计程序和算法	108
4.2.3.7 准备 siRNA 双链体	110
4.2.4 酶促合成 siRNA	110
4.2.4.1 DNA 寡核苷酸的设计	111
4.2.4.2 体外 dsRNA 转录	113
4.2.5 长片段 dsRNA 加工	118
4.2.5.1 在 Hi5 昆虫细胞株中表达 Dicer	119
4.2.5.2 重组 Dicer 消化 dsRNA	122
4.2.5.3 大肠杆菌重组 RNase III 的制备	123
4.3 siRNA 导入细胞	126
4.3.1 转染	127
4.3.2 电穿孔	128
4.3.3 用细胞穿透肽 (CPP) 运载 siRNA	130
4.3.4 CPP 或蛋白质转导结构域 (PTD)	130
4.3.4.1 siRNA 与 CPP 耦联	132
4.3.4.2 化学合成 5'-巯基修饰的 siRNA	135
4.3.4.3 酶促合成 5'-巯基修饰的 siRNA	135
4.3.4.4 半胱氨酸修饰的 CPP 与 siRNA 耦联	138
4.3.4.5 用肽-siRNA 处理细胞	140
4.4 siRNA 分析	142
4.4.1 siRNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)	142
4.4.2 琼脂糖凝胶电泳分离、鉴定 dsRNA 和 siRNA	146
4.4.2.1 dsRNA 和 siRNA 双链体的检测	146
4.4.2.2 同时检测 siRNA 和 mRNA	146
4.5 短发卡 RNA (shRNA) 的 RNAi 作用	147

4.5.1 shRNA 表达载体	149
4.5.1.1 茎环结构	151
4.5.1.2 干扰素样反应	152
4.5.1.3 优点	152
4.5.1.4 局限性	153
4.5.1.5 方法	153
4.5.2 慢病毒介导的 RNAi	155
4.5.2.1 导入问题	155
4.5.2.2 局限性	157
4.5.2.3 克隆 RNAi 表达框	159
4.5.2.4 克隆策略	161
4.6 长发夹 RNA (lhrRNA) 的 RNAi 作用	172
4.6.1 来源于反向重复 DNA 序列的 lhrRNA	173
4.6.1.1 反向重复 DNA 序列	174
4.6.1.2 高通量方法分离反向重复 DNA 序列	178
4.6.2 用正向重复 DNA 序列表达 lhrRNA	181
4.6.3 缺失 5'-端帽子和多聚腺苷酸(A) 尾的反向重复序列	183
4.6.4 RNAi 与 dsRNA 脱氨基	186
4.7 检测干扰素样反应	188
4.7.1 RT-PCR 半定量法分析 2'-5'-OAS 活性	190
4.7.2 DNA 片段分析	191
4.7.3 PKR 活性和 eIF2 α 磷酸化分析	191
4.8 在哺乳动物细胞中诱导持续性的 RNAi	194
4.9 RNAi 在小鼠中的应用	198
4.9.1 高压尾静脉注射	198
4.9.2 体内电穿孔	199
4.9.3 腺病毒感染成年小鼠	201
4.9.4 慢病毒感染建立转基因小鼠	201
4.9.5 原核注射建立转基因小鼠	201
4.10 备选方法: 核酶裂解法制备 dsRNA	204
4.11 高通量筛选	205
4.11.1 条形码 shRNA 文库构建	205
4.11.2 酶修复全基因组 shRNA 文库	207
4.11.3 全基因组 siRNA 筛选	210
4.11.4 RNAi 芯片	211
4.12 有用的网页及链接	212

4.12.1 学术资源.....	212
4.12.2 公司资源.....	213
4.12.3 其他链接.....	213
参考文献.....	214
附录	225
附录 1 英文简称与中英文全名对照	225
附录 2 实验方法目录	235
附录 3 RNAi 相关化学试剂和探针供应商	237
附录 4 名词解释	239

1 RNAi: 2002 年的重大突破

2001 年,随着人类基因组测序的完成,针对其他多种生物的基因组测序计划也相继开展起来。在未来的一段时间内,科学界将不会出现比人类基因组测序更瞩目的技术。有人将人类基因组测序称为“21 世纪科学发展史上的里程碑”、“生物学领域最重要的成就之一”。然而时隔不久,同一年在哺乳动物中发现的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 掀起了一场风暴,而且愈演愈烈。《Science》杂志将 RNAi 称为“2002 年的重大突破” (Couzin, 2002)。毫无疑问, RNAi 将在未来的数年内给生物医学研究领域带来深远变革。

RNAi 主要通过转录后 (post-transcriptional) 水平阻断基因的表达,借此我们可以研究基因的功能。同时它为我们提供了一个治疗疾病的新途径。比如,我们可以按拟定的方式来关闭 (shutting off) 非必需或致病基因的功能。目前,人们可以利用 RNAi 来阻断多种靶基因的表达,这些基因包括肿瘤易感基因和病毒基因,例如 HBV (hepatitis B virus)、HCV (hepatitis C virus) 和 HIV (human immunodeficiency virus) 等病毒基因。

随着人们对多种生物体基因组序列了解的深入, RNAi 技术可以帮助我们更细致地了解复杂的生理学过程。RNAi 技术与基因组学、蛋白质组学和功能蛋白质组学密切相关,因此,人们可以利用 RNAi 开发更多的新药。

目前,在各种真核有机体中发现的几种转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 过程被统一命名为 RNAi,该现象由双链 RNA (double-strand RNA, dsRNA) 诱发 (Hannon, 2002)。

RNAi 在不同的生物中具有不同的表现,比如共抑制 (co-suppression) (Napoli 等, 1990)、阻抑 (quelling) (Cogoni 和 Macino, 1997) 和转基因诱导的沉默 (transgene-induced silencing) (Baulcombe, 1999), 尽管这些现象并不完全相同。某些科学家更倾向于使用 RNA 沉默,而不是 RNAi,前者仅发生在蠕虫、蝇类等非脊椎动物或脊椎动物。本书将仍然使用 RNAi 来描述这一现象,因为大多数的出版物用这一术语来描述 dsRNA 诱导的 RNA 沉默。

科学家们最早在植物 (Napoli 等, 1990) 和脉孢菌 (*Neurospora crassa*) (Cogoni 和 Macino, 1997) 中发现了 dsRNA 诱导的 RNA 沉默现象。RNAi 在这些机体中作为抗病毒的防御体系而发挥作用。虽然在上述发现中,转基因病毒可以编码具有沉默功能的基因片段,并在复制过程中产生 dsRNA,但针对 RNA 沉默现象的决定性发现还是由 Andrew Fire 和 Craig Mello 首先完成的。早在几

年前,在线虫中进行反义 RNA 实验时,Guo 和 Kemphues 就观察到正义 RNA also 具有很高的基因沉默活性 (Guo 和 Kemphues, 1995)。后来 Andrew Fire 和 Craig Mello 通过实验阐明了这一反常现象:将反义 RNA 和正义 RNA 同时注射到秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 比单独注射反义 RNA 诱导基因沉默的效率高 10 倍。由此推断,dsRNA 触发了高效的基因沉默机制并极大降低了靶 mRNA 水平 (Fire 等, 1998)。人们将这一现象命名为 RNAi (见综述: Arenz 和 Schepers, 2003)。

1.1 RNAi: 功能基因组学研究的工具

此后不久,研究人员就弄清了 RNAi 的多种基本特性,开始将其作为一种有效工具用于基因功能研究,同时还对某些疾病的致病基因表达进行干扰 (Schmitz 和 Schepers, 2004)。

如果外源性 dsRNA 与靶 mRNA 序列完全同源,那么 RNAi 技术将是降解靶 mRNA 非常理想的工具。在这一过程中,尽管基因的转录维持正常,但转录后水平的 mRNA 被选择性降解从而阻止特定蛋白质的翻译。此外发现,与 DNA 序列中的内含子及启动子同源的 dsRNA 不会诱发基因沉默,提示基因沉默是发生在转录后水平 (Fire 等, 1998; Montgomery 和 Fire, 1998; Montgomery 等, 1998)。

随着人类基因组测序的完成以及许多成熟模式生物的建立,研究人员能够选择合适的 dsRNA 来选择性降解特定基因表达的 mRNA,从而建立相应基因缺失的表型,且不影响其他相关基因的功能。亚当量的 dsRNA 在 2~3 小时内就可以有效降低同源 mRNA 水平。在某些物种中, RNAi 还可以遗传给子代 (Zamore 等, 2000),称为系统性 RNAi (systematic RNAi) (见第 2 章有关线虫的详细描述)。体外培养的细胞转染 dsRNA 后,连续培养的 9 代细胞均能维持相应的缺失表型 (Tabara 等, 1998)。

在对秀丽隐杆线虫及植物进行 RNAi 时发现, dsRNA 导入量与其长效生物活性不成比例 (Grishok 等, 2000; Wassenegger 和 Pelissier, 1998),这提示 RNAi 机制具有催化性作用,而不象反义 RNA 那样需要通过逐步增加内源性 RNA 浓度来维持其功能。

目前,研究人员推断, RNAi 是真核细胞的一种古老的自我防卫机制,机体可用 RNAi 来抵抗 RNA 病毒感染 (Ruiz 等, 1998; Voinnet, 2001) 以及转座子 (一种可移动的 DNA 片段,可插入宿主基因组) 作用 (Ketjing 等, 1999; Tabara 等, 1999)。这种防卫机制是 dsRNA 外源性基因片段在复制过程产生的,而决不会来自处于精密调控下的内源性基因。此外, dsRNA 也会被生物体内的一种蛋白质复合体识别并降解。研究人员认为,在不同的生物体内, RNAi 应当

还具有其他多种不同的功能。有证据显示, RNAi 可以清除机体内有缺陷的 mRNA (Plasterk, 2002); 针对秀丽隐杆线虫基因的 RNAi 和无意义介导的 mRNA 衰减 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) 具有重叠活性 (Domeier 等, 2000)。此外, 尽管目前在特定细胞中, RNAi 的作用程度尚未完全阐明, 但据研究人员推测, RNAi 可能通过严密调控蛋白质水平来应答不同外界环境的刺激 (McManus 等, 2002)。

RNAi 技术的发展源自于植物和线虫中观察到的 RNAi 现象, 即当外源性裸露的 dsRNA 序列与某一特定的 mRNA 同源时, 它会诱导 mRNA 发生基因沉默。

1.2 RNAi 的作用机制

自从 RNAi 现象发现至今, 研究人员对秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) (Qiao 等, 1995; Smardon 等, 2000)、拟南芥 (*Arabidopsis*) (Mourrain 等, 2000)、脉孢菌 (*N. crassa*) (Cogoni 和 Macino, 1997, 1999)、果蝇 (*Drosophila*) 和哺乳动物中参与 RNAi 过程的基因进行了鉴定, 并对其特性进行了研究, 取得了诸多进展。其中, 涉及 RNAi 过程的大部分重要环节及分子元件是在秀丽隐杆线虫、果蝇和植物中发现的。RNAi 的复杂程度远远超出我们的预料, 它与多种不同的蛋白质分子和小分子 RNA 有关。此外, 即使 RNAi 与目前已经阐明的 dsRNA 诱导的 RNA 沉默现象具有共同的特征, 如植物中的共抑制, 真菌中的阻抑等, 但它们是否具有相同的机制尚不清楚。

事实上, 通过对拟南芥 (Mourrain 等, 2000)、脉孢菌 (Cogoni 和 Macino, 1997, 1999) 及秀丽隐杆线虫 (Qiao 等, 1995; Smardon 等, 2000) RNA 沉默缺陷突变体遗传学进行研究, 科学家们发现了几种参与共抑制和阻抑的基因以及与 RNAi 作用相关的蛋白质家族, 包括解旋酶家族、RNA 酶 III 相关核酶、Argonaute 蛋白质家族成员和依赖 RNA 的 RNA 多聚酶 (RNA-dependent RNA polymerases, RdRp)。迄今为止, 研究人员发现, 各种 RNAi 现象互有异同, 其基本过程均包括起始阶段 (长片段 dsRNA 被切割为短 dsRNA 片段) 和效应阶段 (dsRNA 片段掺入一种蛋白质复合体中, 并在其保护作用下作为一种导向序列识别同源 mRNA 并将其切割) (Schmitz 和 Schepers, 2004)。

1.3 Dicer: 裂解 dsRNA 的启动器?

所有 dsRNA 引发的 RNA 沉默过程均有一个共同的特性——长片段的 dsRNA 被 RNA 酶 (Dicer) 特异性切割 (Bernstein 等 2001)。Dicer 可将 dsRNA 切割成 21~25bp (Hamilton 和 Baulcombe, 1999; Zamore 等, 2000)

的 RNA 片段, 即所谓的小分子干扰 RNA 双链体 (small interfering RNA duplexes, siRNA)。Baulcombe 和他的同事首先发现, 通过转基因或病毒诱导, 与沉默的靶向基因序列互补的小 dsRNA 可以诱导植物中的转录后基因沉默或共抑制。在这些植物中的研究表明, 小 dsRNA (后来称为 siRNA) 就是 RNA 沉默中的效应元件 (Hamilton 和 Baulcombe, 1999)。随后, 研究人员证实在其他物种中也存在这一现象, 例如对果蝇胚胎 (Yang 等, 2000) 和线虫 (Parrish, 等, 2000) 注射 dsRNA, 或对果蝇 S2 细胞转染长片段 dsRNA (Hammond 等, 2000) 均可诱导基因沉默。奇怪的是, 在哺乳动物中并没有发现内源性的 siRNA 表达, 提示不同物种的沉默机制存在差异。

科学家们已经全面研究了 siRNA 介导靶 RNA 切割和降解的机制。利用目前现有的实验设备和技术, 来自不同实验室的研究人员发现这一过程仅仅发生在细胞质中 (Hutvagner 和 Zamore, 2002a; Kawasaki 等, 2003; Zeng 和 Cullen, 2002)。基于这些研究结果, 人们可以在体外用果蝇细胞抽提物 (细胞质) 中的 RNase III 将长 dsRNA 切割成为 21~23bp 的 RNA 片段。

进一步研究发现, siRNA 双链体两侧 3'-末端的 2 个突出核苷酸 (Hamilton 和 Baulcombe, 1999; Parrish 等, 2000) 以及未磷酸化的羟基 (Elbashir 等, 2001b) 对 siRNA 与 RNAi 的其他组分间的识别过程十分重要。这些 siRNA 的特性同 RNase 核酶家族的作用十分相似, 它们可以选择性切割 dsRNA (Bernstein 等, 2001; Billy 等, 2001; Robertson 等, 1968), 并在两条单链上形成交错切口 (Zamore, 2001)。根据结构域的组成, 人们可将 RNase III 家族分成三类。第一类来自于细菌和酵母, 只包含一个保守的 RNase III 结构域和一个邻近 dsRNA 的结合结构域 (dsRNA binding domain, dsRBD)。第二类核酶含有串联的 RNase III 结构域、一个 dsRBD 结构域和一个位于氨基酸末端的未知功能结构域 (Filippov 等, 2000; Fortin 等, 2002; Lee 等, 2003)。

除了已鉴定的 RNase III 家族核酶, 如经典途径的 RNase III (Filippov 等, 2000) 和 Drosha (定位于胞核内的第二类 RNase III) (Wu 等, 2000), 通过同源性筛选, 人们还在果蝇基因组中发现了很多含有 RNase III 样结构域的新候选基因。Hannon 和他的同事 (Bernstein 等, 2001) 就从果蝇基因组中鉴定出一种新的核酸酶, 由 2 249 个氨基酸组成, 包括两个 RNase III 结构域 (Mian, 1997; Rotondo 和 Frendewey, 1996)、一个 dsRNA 结合基序 (dsRNA-binding motif, DSRM) (Aravind 和 Koonin, 2001)、一个氨基酸末端 DexH/DEAH RNA 解旋酶/ATP 酶 (helicase/ATPase) 结构域和一个被称为“PAZ 结构域” (PAZ domain) 的基序 (Cerutti 等, 2000)。这些是第三类核酶的主要特征, 它们与经典途径的 RNase III 完全不同。由于新发现的核酶可以将长 dsRNA 切割为大小一致的 RNA 片段, 因此被命名为 Dicer (Bernstein 等, 2001; Ketting 等, 2001b)。迄今为止, 人们发现 Dicer 与细胞质中的核糖体 (内质网和细胞质交界