

BIOTECH

21世纪生物技术系列

基因沉默 理论与技术

Jiyin Chenmo
Lilun Yu Jishu

第3版

NOLOGY



主编
王廷华
张连峰
董 坚



科学出版社

21 世纪生物技术系列

基因沉默理论与技术

主 编 王廷华 张连峰 董 坚

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是《21 世纪生物技术系列》的一个分册。全书系统地介绍了基因沉默的概念、原理、运用,以及不同的基因沉默技术的理论与技术细节。对基因沉默进入深入研究,可帮助人们进一步揭示生物体基因遗传表达调控的本质。利用基因沉默在基因治疗中有效抑制有害基因的表达,可达到治疗疾病的目的;在功能基因组方面,通过有选择地使某些基因沉默,可以测知这些基因在生物体基因组中的功能。基因沉默技术具有巨大的潜在应用价值。

本书可供生物医学专业研究生、本科生及从事基因沉默研究的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因沉默理论与技术/王廷华,张连峰,董坚主编. —北京:科学出版社, 2015.3

(21 世纪生物技术系列)

ISBN 978-7-03-043786-0

I. 基… II. ①王… ②张… ③董… III. 核糖核酸—研究 IV. Q522

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第052034号

责任编辑: 慧颖 沈红芬 责任校对: 胡小洁

责任印制: 李 利/封面设计: 范璧合

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>

四季青双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015年3月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2015年3月第一次印刷 印张: 9 3/4 插页 2

字数: 276 000

定价: 45.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《21 世纪生物技术系列》第 3 版编审委员会

主 审 李云庆
委 员 (按姓氏笔画排序)

王廷华

四川大学
特聘教授, 博导
昆明医科大学, 云南师范大学, 成都医学院

教授, 博导

白 洁

昆明理工大学医学院

教授, 博导

刘 进

四川大学华西医院

教授, 博导

李云庆

第四军医大学

教授, 博导

李成云

云南农业大学

教授, 博导

李兵仓

第三军医大学

教授, 博导

李官成

中南大学湘雅医学院

教授, 博导

李建国

上海交通大学医学院

教授, 博导

张连峰

北京协和医学院

教授, 博导

陈向东

华中科技大学同济医学院

教授, 博导

陆 地

昆明医科大学

教授, 博导

项 鹏

中山大学中山医学院

教授, 博导

胡幀明

重庆医科大学

教授, 博导

顾晓松

南通大学医学院

教授, 博导

曾园山

中山大学中山医学院

教授, 博导

游 潮

四川大学华西医院

教授, 博导

Jean Philippe Merlio

法国波尔多第二大学

教授, 博导

John W McDonald

美国霍普金斯大学医学院

教授, 博导

Leong Seng Kee

新加坡国立大学

教授, 博导

Xin Fu Zhou

澳大利亚南澳大学

教授, 博导

Zhi Cheng Xiao

澳大利亚莫纳什大学

教授, 博导

《基因沉默理论与技术》编写人员

主 编 王廷华 张连峰 董 坚

副主编 何 沐 尚飞飞 王友翠 朱月春

编 委 （按姓氏笔画排序）

习杨彦彬 马元武 马秋野 王友翠

王廷华 王廷勇 朱月春 刘 冉

刘 佳 刘素娟 邱德璐 何 沐

张连峰 尚飞飞 胡幛明 董 坚

《21 世纪生物技术系列》前言

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术的发展和需求,科学出版社于 2005 年组织编写了一套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》和《干细胞理论与技术》共 8 个分册。本丛书自 2005 年 3 月问世以来,即受到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月进行了重印;2009 年出版了第 2 版。本丛书对满足我国日益扩大的科研人员及研究生实践需求,以及推动我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的作用。

生物技术发展迅速,为了满足广大科技工作者的需求,本丛书于 2013 年推出第 3 版。在第 2 版的基础上,第 3 版主要对实验技术中的经验体会部分进行了全面增补,同时补充了新的理论技术,包括免疫荧光染色、诱导型干细胞理论与培养、基于病毒载体的转基因及 RNA 干扰技术、免疫共沉淀与蛋白质相互作用、蛋白芯片等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。重要的是,为了应对和满足前沿技术的发展需要,推出第 3 版的同时还增补了 4 个分册,即《基因沉默理论与技术》、《电生理理论与技术》、《生物信息学理论与技术》和《神经疾病动物模型制备理论与技术》,并将丛书名更改为《21 世纪生物技术系列》。至此,本丛书已达 12 个分册,从行为、形态、细胞、分子生物学、电生理和生物信息等多个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用,是我国 21 世纪生物技术著作中覆盖面最广、影响最大的一套著作。本丛书从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调对基本概念和理论进行简明扼要的阐述,注重基本技术实践,认真总结了编者的实验经验和体会,并提供了大量原版彩图,使丛书在兼顾理论的同时更具实用价值。

本丛书由王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。

由于编写时间有限,加之科学技术发展迅速,书中的错误和不足之处在

所难免，恳请各位读者批评指正。

值本丛书出版之际，感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家，他们的杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础；感谢国内外一批知名专家教授对丛书的指导和审阅；感谢编者们所付出的辛勤劳动；感谢中国解剖学会长期以来对本丛书组织工作的支持；感谢各位同道给予的鼓励 and 关心！

《21 世纪生物技术系列》编审委员会

2013 年 4 月 8 日

目 录

第一章 基因沉默概论.....	1
第一节 基因沉默的概念、发现及分类.....	1
第二节 基因沉默的原理及发生.....	1
第三节 研究基因沉默的意义.....	4
第四节 基因沉默的应用.....	5
第五节 展望.....	5
第二章 基于化学合成法的 siRNA 干扰技术.....	6
第一节 什么是 siRNA.....	6
第二节 靶序列确定及化学合成方法.....	8
第三节 siRNA 转染细胞的方法及注意事项.....	11
第四节 siRNA 有效片段筛选意义和方法.....	13
第五节 siRNA 干扰效率检测与效果评价.....	14
第六节 siRNA 在生物学中的应用.....	14
第七节 问题与展望.....	15
第三章 microRNA 沉默靶基因及其应用.....	18
第一节 microRNA 的发现和基本概念.....	18
第二节 microRNA 的结构与形成.....	18
第三节 microRNA 与疾病.....	19
第四节 microRNA 与 siRNA 的区别.....	20
第五节 microRNA 的研究手段.....	21
第六节 microRNA 功能分析确定.....	22
第七节 microRNA 表达检测.....	23
第八节 microRNA 研究展望.....	25
第四章 siRNA 技术构建 G6PD 缺陷型 A375 稳转细胞株.....	26
第一节 G6PD 缺陷型 A375 稳转细胞株的构建方法.....	26
第二节 A375-G6PD 稳转细胞株的功能检测.....	30
第三节 A375-G6PD 稳转细胞株的应用.....	30
第五章 基于 PENK 基因干扰克隆载体构建的 RNA 干扰技术.....	30
第一节 实验原理与实验目的.....	32
第二节 实验设备、试剂.....	32
第三节 实验步骤.....	34
第六章 α -突触核蛋白干扰技术.....	42

第七章 人类免疫缺陷病毒转染皮质神经元.....	64
第八章 单纯疱疹病毒转染原代皮质神经元和脊髓神经元.....	71
第九章 腺病毒转染原代皮质神经元和脊髓神经元.....	88
第十章 基因敲减理论与实验技术.....	93
第一节 基因敲减技术发展简史.....	93
第二节 基因敲减的概念.....	95
第三节 基因敲减的原理.....	95
第四节 基因敲减的应用前景.....	97
第五节 展望.....	97
第十一章 基因组编辑技术.....	98
第一节 显微注射技术.....	98
第二节 胚胎移植.....	101
第三节 转基因动物制作.....	104
第四节 基因打靶介导的敲除和敲入动物的制作.....	108
第五节 转座子技术在基因修饰中的应用.....	116
第六节 TALEN 技术介导的敲除动物的制作.....	118
第七节 CRISPR/Cas 技术介导的基因敲除动物的制作.....	120
第八节 克隆动物制作.....	123
第十二章 调控 eIF-5A1 的 microRNA 预测与验证.....	129
第一节 eIF-5A1 靶 microRNA 的生物信息学预测.....	129
第二节 eIF-5A1 靶 microRNA 荧光素酶报告实验验证.....	134

彩图

第一章 基因沉默概论

第一节 基因沉默的概念、发现及分类

一、基因沉默的概念

1986 年,在烟草植株中高表达反义 nos RNA,引发了 nos 基因沉默,因为它由反义 RNA 引发,所以称为反义沉默。RNA 和蛋白质在生物体中共同负责基因的表达和基因表达的调控,在生命活动中具有重要的作用。而转基因植物和转基因动物中往往会遇到这样的情况,外源基因存在于生物体内,并未丢失或损伤,但该基因不表达或表达量极低,这种现象就称为基因沉默。

基因沉默(gene silencing)是指生物体中特定基因由于种种原因不表达,是真核生物细胞基因表达调节的一种重要手段。在染色体水平,基因沉默实际上是形成异染色质(heterochromatin)的过程,被沉默的基因区段呈高浓缩状态。一方面,基因沉默是遗传修饰生物体(genetically modified organism)实用化和商品化的巨大障碍;另一方面,基因沉默是植物抗病毒的一个本能反应,为用抗病毒基因进行植物工程育种提供了具有较大潜在实用价值的策略——RNA 介导的病毒抗性(RNA-mediated virus resistance, RMVR)。

二、基因沉默的发现

基因沉默现象首先在转基因植物中发现,接着在线虫、真菌、昆虫、原生动物及小鼠中陆续发现。大量的研究表明,环境因子、发育因子、DNA 修饰、组蛋白乙酰化程度、基因拷贝数、位置效应、生物的保护性限制修饰及基因的过度转录等都与基因沉默有关。

三、基因沉默的分类

根据基因沉默发生的部位可以分为三类:位置沉默,发生在染色体 DNA 水平;转录沉默,发生在 RNA 转录水平;共抑沉默,发生在转录后水平。

第二节 基因沉默的原理及发生

基因沉默发生在两种水平上,一种是由于 DNA 甲基化、异染色质化及位置效应等

引起的转录水平上的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS); 另一种是转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS), 即在基因转录后水平上通过对靶标 RNA 进行特异性降解而使基因失活。在这两种水平上引起的基因沉默都与基因的同源性有关, 称为同源依赖性的基因沉默 (homology-dependent gene silencing, HDGS)。发生沉默的基因可以是外源性转移基因, 也可以是入侵的病毒或宿主内源性基因。研究发现, 环境因子、发育因子、DNA 修饰、组蛋白乙酰化程度、基因拷贝数、位置效应、生物的保护性限制修饰及基因的过度转录等均与基因沉默有关, 双链 RNA (dsRNA) 作为启动因素或中间体为不同生物基因沉默所共有。

PTGS 在多种生物中有共性, 人们对 PTGS 的激活和与其相关的 RNA 降解调控过程有了初步的认识, 也发现植物病毒在转基因植物和非转基因植物中都能和转基因一样诱发转录后基因沉默。令人吃惊的是, 转基因植物的共抑制现象 (转基因与同源的內源基因一起失活)、转基因植物的病毒抗性和非转基因植物对病毒正常自然侵染的抗性、真菌的阻抑 (quelling) 现象 (真菌中的共抑制)、各种动物的 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 及转座因子的转座失活等这些表面看来完全不相关的现象中竟然存在着非常相似的基因沉默机制, 即 PTGS。这种基因沉默可能是生物体的本能反应, 因为无论是转基因、转座因子还是病毒, 对植物而言都是诱发突变的外来侵入的核酸, 植物为保护自己, 在长期的生物进化中, 形成了基因沉默这种限制外源核酸入侵的防卫保护机制。在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中, RNAi 敏感性缺失突变体中转座子的转座活性增强, 表明转座子的转座失活是被一种类似 PTGS 的过程调控的, 这一过程与 RNAi 作用有关, 是通过细胞内双链 RNA 互作引起同源特异性的 RNA 降解。

PTGS 中的 RNA 在细胞质中的特异性降解并不需要 RNA 结合到核糖体上, 这与通常的 RNA 降解代谢调控需要与翻译相关联不同。对 RNAi 激发的 RNA 特异性降解机制进行了体外研究, 发现通过添加外源的双链 RNA 或靶标 mRNA 可以激活 PTGS, 这与早期在植物中发现的双链 RNA 介导 PTGS 一致。通过对发生 PTGS 的转基因植物进行嫁接实验和分析植物病毒病的恢复现象观察到, PTGS 是一种系统性的过程, 称为系统获得性沉默 (systemic acquired silencing, SAS)。PTGS 的系统传播性在真菌和线虫中也得到了证明。进一步研究发现, 转基因或病毒侵染介导的 PTGS 植物中普遍存在着大量的序列特异性正义和反义的大约 25 个核苷酸的小分子 RNA, 而正常的非转基因植物和没有发生 PTGS 的植物中则没有。这些小分子 RNA 作为信号分子, 在植物中与特定的运输蛋白特异结合, 防止被核酸酶降解, 通过胞间连丝和韧皮部筛管运送到植物体的各个部位, 使 PTGS 具有系统性、持久性。这一运转过程与植物病毒在植物体内的运输有着十分相似的机制。这些 25nt RNA 的积累需要转基因的转录或病毒的复制, 与其他双链 RNA 等多种异常 RNA 相比, 25nt RNA 对于 PTGS 的激发、靶标 RNA 的特异性降解及 PTGS 的系统性维持更为重要。

早在 20 世纪 70 年代初人们就发现, 病毒或类病毒侵入植物后, RNA 依赖性的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRP) 的活性明显提高。RdRP 是生物体内普遍存在的一种 RNA 聚合酶, 在体外能以单链 RNA 或单链 DNA, 甚至以双链 RNA 为模板, 合成与模板互补的 RNA (cRNA), 合成的 cRNA 可长达 100 个核苷酸。1993 年,

Lindbo 等认为在 PTGS 植物中的 RdRP 与 PTGS 同源依赖性的 RNA 特异性降解有关。而 Mourrain 等从缺失转基因介导的 PTGS 拟南芥突变体中分离的 *sgs2* (suppressor of gene silencing) 和 *sde1* (silencing defective) 两个基因与番茄中的 *RdRP* 基因十分相似, 支持了 Lindbo 的观点。粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 的 *qde-2* (quilling-defective gene) 和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的 *rde-1* (RNA interference-deficient gene) 与番茄的 *RdRP* 基因 also 具有很高的同源性。*RdRP* 基因剔除实验证明, *RdRP* 对 RNAi 和 PTGS 尤为重要。这些研究结果表明, 从比较低等的生物藻类、真菌到高等的植物再到动物线虫、锥虫、果蝇等中可能存在着一个由共同祖先进化来的相似的、抵抗外来 DNA 侵入自身基因组的本能防卫机制。

RNAi 引发的 PTGS 作为生物体中一种不完全的原始的生物免疫系统, 在植物抗病毒中研究得比较详细。研究发现, 植物病毒的 RNA 可以直接作为 PTGS 的激发子, 并且可能通过病毒来源的基因引发转基因植物对病毒的终生系统抗性, 这和 PTGS 从病毒感染点传播到整个植株及线虫中 PTGS 的系统性一起证明了 PTGS 具有系统传播性。拟南芥 PTGS 突变体 *sgs2* 和 *sgs3* 对黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 的敏感性提高了, 而突变体 *sde1* 对烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus, TMV) 和烟草脆裂病毒 (tobacco rattle virus, TRV) 的敏感性无变化。Baulcombe 研究组认为 *RdRP* (*sde1* 或 *sgs2*) 对于引发产生 PTGS 的双链 RNA 是必需的, 有些 RNA 病毒在复制中用自身的 *RdRP* 合成双链 RNA 直接进入 PTGS 网络, 而不需要寄主的 *RdRP* 激活 PTGS, 这些病毒如 TMV、TRV 能在 PTGS 突变体中和野生型中一样致病, 而另一些病毒如 CMV 需要寄主的 *RdRP* 来激活 PTGS, 所以 PTGS 突变体对这些病毒的敏感性要比野生型的高。另外, CMV 还可能与有些病毒产生的抑制 PTGS 的蛋白质有关, 如 CMV 和番茄不孕病毒 (tomato aspermy virus, TAV) 的 2b 蛋白及马铃薯 Y 病毒 (potato Y virus, PVY) 的蚜传辅助因子 (helper component/protease, HC-Pro) 有关等。由此可见, 不同的 RNA 病毒是通过不同的位点进入并引发 PTGS 网络的。由于拟南芥 PTGS 突变体是通过转基因介导的 PTGS 筛选的, 突变体对不同病毒敏感性的变化, 也可能表明转基因和病毒感染引发植物 PTGS 的机制是有差别的。在突变体 *sde1* 中, 与 PTGS 有关的 25nt 转基因特异性的 RNA 的积累明显减少, 而病毒特异性的 25nt RNA 的量不变, 这也表明转基因和感染病毒是通过不同途径引发 PTGS 的。

从大量的研究结果中可以推测, 生物体内有一套 RNA 监视系统, 可以通过多种异常 RNA 来激发。如果外来核酸是 DNA (包括转基因、重组基因、DNA 病毒、扩增子等), 靶标 RNA 需要在细胞核中完成转录后运转到细胞质中, 而侵入细胞质的病毒 RNA 可以直接提供靶标 RNA。各种不同的靶标 RNA (包括与外源基因同源的內源基因和外来的 DNA 产生的 RNA 及病毒的 RNA) 由寄主的 *RdRP* 或病毒自身的 *RdRP* 通过多种不同的途径将靶标 RNA 转变成为双链 RNA, 从而通过 RNAi 引发 PTGS。PTGS 被引发后就不再需要 *RdRP*。关于双链 RNA 介导的 RNAi 特异性靶标 RNA 的降解, Bass 提出了这样一个假说: 认为生物体内存在着一种复合酶——RNAi 核酸酶, 该酶具有双链 RNA 结合区、RNase 和 RNA 解旋酶 3 个活性区。首先双链 RNA 结合到该酶的双链 RNA 结合区并引导该酶识别靶标 RNA, 然后该酶的 RNA 解旋酶完成 ATP 依赖性的靶标 RNA 与该

酶结合的双链 RNA 的正义链的换位, RNase 在靶标 RNA 结合位点附近完成切割, 从而使靶标 RNA 能被进一步降解, 产生大量的小片段 RNA, 包括序列特异性的 25nt RNA。载有序列特异性的双链 RNA 的游离复合酶再去识别并降解其他的靶标 RNA, 产生更多 25nt RNA, 从而使 PTGS 具有系统性、持久性。

基因沉默需要经历不同的反应过程才能实现, 包括组蛋白 N 端结构域的赖氨酸残基的去乙酰基化加工、甲基化修饰[由甲基转移酶催化, 修饰可以是一价、二价和三价甲基化修饰, 后者又称为“过度”甲基化修饰 (hypermethylation)], 以及和甲基化修饰的组蛋白结合的蛋白质 (MBP) 形成“异染色质”, 在上述过程中, 除了部分组蛋白的 N 端尾部结构域需要去乙酰化、甲基化修饰之外, 有时也许要在其他的组蛋白 N 端尾部结构域的赖氨酸或精氨酸残基上相应地进行乙酰化修饰, 各种修饰的最终结果会导致相应区段的基因“沉默”失去转录活性。这个“原则”就是目前尚没有真正完全清楚的“组蛋白密码” (histone code)。能够与甲基化组蛋白结合的蛋白质有 Sir1~Sir4, 这是一组称为“silencing informative repressor”的蛋白质, 其中, Sir2 就是“去乙酰化”酶, 而 Sir1、Sir3 和 Sir4 则负责与甲基化修饰的组蛋白结合“沉默”相应的染色质为异染色质。

此外, 基因沉默也和 DNA 的甲基化修饰有关。例如, 在真核生物基因组中许多基因的 5'端分布有长约 1kb 碱基对的“CpG”岛序列 (CpG island), 其中的“C”芳香环 5 位可被甲基化修饰, 之后, 与甲基化修饰的 DNA 结合蛋白形成“沉默”区段, 使其下游基因不能表达。另外, 非编码的 RNA 分子 (non-coding RNA) 也参与“基因沉默”过程。这一类型常见于含有重复 DNA 序列的染色质区, 如着丝粒部位的基因沉默就需要非编码 RNA 分子的参与。简言之, 基因沉默涉及组蛋白甲基化、去乙酰化、乙酰化, DNA 的甲基化修饰, 甲基化修饰组蛋白结合蛋白 Sir2~Sir4, 甲基化 DNA 结合蛋白, 非编码 RNA 等在内的一系列复杂组分的生理反应过程。基因沉默导致相应区段内的遗传信息不能被转录。

第三节 研究基因沉默的意义

基因沉默是基因表达调控的一种重要方式, 是生物体在基因调控水平上的一种自我保护机制, 在外源 DNA 侵入、病毒侵染和 DNA 转座、重排中有普遍性, 因为无论是转基因、转座子还是病毒, 对生物而言都是诱发突变的外来侵入的核酸。通过基因沉默生物体可以限制这些外源核酸的入侵。

基因沉默的本质是一种由 RNA 介导的、序列特异性的获得性免疫反应, 且基因沉默与获得性免疫反应一样, 具有特异性、多样性、记忆性、可传递性等特征。除此之外, 基因沉默还与生物的生长发育有关, 它可能通过控制内源基因的表达来调控生长发育。

对基因沉默进行深入研究, 可帮助人们进一步揭示生物体基因遗传表达调控的本质, 使基因克服基因沉默现象, 从而使外源基因能更好地按照人们的需要进行有效表达; 利用基因沉默在基因治疗中有效抑制有害基因的表达, 达到治疗疾病的目的; 在功能基因组方面, 通过有选择地使某些基因沉默, 可以测知这些基因在生物体基因组中

的功能；通过抑制生物代谢过程中的某个环节，可以获得特定的代谢产物等。正是由于基因沉默具有巨大的潜在应用价值，因而有关基因沉默的研究进展很快。有人预言：对于基因沉默的研究将是未来 10 年生物学研究中最激动人心也最有可能产生丰富成果领域之一。

第四节 基因沉默的应用

基因沉默的应用主要在以下几个方面进行。

(1) 作物遗传育种。通过反义 RNA 与同源的内源基因转录的正义 RNA 配对形成双链 RNA，进而降解，造成内源基因沉默，达到人们抑制植株某一内源基因转录的目的。

(2) 功能性基因组学上的应用。利用转基因沉默中的抑制效应，可以有目的性、有选择性地抑制某一内源基因序列的活性，从而知道这一 DNA 序列在植株基因组中的功能。

(3) 利用共抑制效应，可以抑制植物代谢中某一关键酶基因的活性、中断该代谢循环的进程，从而使人们所需要的代谢产物能在某一代谢环节处不断积累下来，而不会被进一步反应消耗掉，获得高产量的特定代谢产物。

(4) 基因沉默还在抗肿瘤、抗病毒、功能基因组学及法医学中有广泛的用途。

第五节 展 望

基因沉默是基因表达调控的一种重要方式，是生物体在基因调控水平上的一种自我保护机制，在外源 DNA 侵入、病毒侵染和 DNA 转座、重排中有普遍性。对基因沉默进行深入研究，可帮助人们进一步揭示生物体基因遗传表达调控的本质，在基因工程中克服基因沉默现象，从而使外源基因能更好地按照人们的需要进行有效表达；利用基因沉默在基因治疗中有效抑制有害基因的表达，达到治疗疾病的目的，所以研究基因沉默具有极其重要的理论和实践意义。

(习杨彦彬)

参 考 文 献

- 陈雪梅, 杜显刚, 谭志巍, 等. 2005. 基因沉默研究进展. 法医与医学杂志, 12 (3): 227-230.
- 郭兴启, 朱常香, 宋云枝. 2000. RNA 沉默与植物病毒. 生命科学, 12 (4): 166-169.
- 孟祥兵, 王秀芳. 2001. 基因沉默. 生命的化学, 21 (2): 111-113.
- 田野, 曹雪松. 2010. 植物基因沉默的研究进展. 聊城大学学报, 23 (1): 45-48.
- Covey S, Al-Kaff N, Lángara A, et al. 1997. Plants combat infection by gene silencing. Nature, 385: 781-782.
- Ratcliff, Harrison BD, Baulcombe DC. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. Science, 276 (5318): 1558-1560.

第二章 基于化学合成法的 siRNA 干扰技术

第一节 什么是 siRNA

一、siRNA 概念及发现

siRNA (small interfering RNA) 是一种双链小 RNA 分子 (21~25 个核苷酸), 由 Dicer 酶 (RNase III 家族中对双链 RNA 具有特异性的酶) 加工而成。siRNA 是 RISC (RNA-induced silencing complex) 的主要成员, 激发与之互补的目标 mRNA 的沉默, 是 RNA 干扰的中间产物。其特点如下: 长度在 22nt 左右; 依赖 Dicer 酶的加工, 是 Dicer 酶的产物, 所以具有 Dicer 酶产物的特点; 由双链的 RNA 或 RNA 前体形成; 一般是人工体外合成, 通过转染进入生物体, 植物体内也存在内源的 siRNA; 在作用位置上, siRNA 可作用于 mRNA 的任何部位, 并与 mRNA 完全互补; 在作用方式上, siRNA 只能导致靶标基因的降解, 即转录水平后调控; siRNA 不参与生物生长, 是 RNAi 的产物, 原始作用是抑制转座子活性和病毒感染。

RNA 干扰现象是在 1990 年发表在 *Plant Cell* 上, Jorgensen 等研究查耳酮合成酶对花青素合成速度影响的文章中首次被报道。为得到颜色更深的矮牵牛花而过表达查耳酮合成酶, 结果意外得到了白色和白紫杂色的矮牵牛花, 且过表达查耳酮合成酶组的牵牛花中查耳酮合成酶的浓度反而比正常组低 50 倍。于是他们推测外源性编码查耳酮合成酶的基因可能抑制了花中内源性查耳酮合成酶基因的表达。

而 1992 年, Romano 和 Macino 等发现在粗糙链孢霉中导入外源基因可以抑制具有同源序列内源基因的表达。1995 年, Guo 和 Kempthues 在线虫中也发现了类似现象。RNA 干扰的概念正式被提出是在 1998 年, Fire 等选用秀丽隐杆线虫进行反义 RNA 抑制实验, 发现与正义或反义 RNA 对比, 本来作为对照加入的双链 RNA 却显示出了更强的抑制效果。进一步从靶 mRNA 分子质量考虑, 加入的双链 RNA 的抑制效果要强于理论上 1:1 配对时的抑制效果, 因此推测在双链 RNA 引导的抑制过程中存在某种扩增效应并且有某种酶参与其中。直到 2006 年, Mello 因在 RNAi 机制研究中的突出贡献而获得诺贝尔生理学或医学奖时, RNAi 才迅速成为研究人员关注的重点。

目前较为常用的 5 种制备 siRNA 的方法: ①化学合成; ②体外转录; ③长片段 dsRNA 经 RNase III 类降解; ④siRNA 表达载体或病毒载体在细胞中表达 siRNA; ⑤PCR 制备的 siRNA 表达框在细胞中表达。化学合成法是指通过化学方法人工合成所需要研究的 DNA 序列的方法。该技术主要依赖全自动核酸合成仪进行。化学合成法适用于获取较小的目的基因片段, 一般在 100~250bp。对于较长片段基因采取分段合成后再按一定顺序连接为完整的基因, 这样可以减少基因合成造成的错误。目前化学合成 siRNA 是应用最

为方便的方法,用户只需要提供 siRNA 序列或 GeneID、检索号、基因名称等即可。一般公司都可以根据用户要求提供高质量的化学合成 siRNA,并可以根据用户需求进行 Cy3、Cy5 等标记或甲基化修饰等。

二、siRNA 研究意义及其生物学机制

当代生命科学已经走到了科学研究的前沿,成为推动人类文明和社会发展、挑战人类智慧极限的巨大力量,而生物信息资源及高通量技术的发展也应运而生。大规模高通量测序技术的飞速发展,使得获取一个物种的全序列仅仅需要几个月时间。但是需要破解这些生命密码目前还存在很大困难,为了研究基因表达与功能,科学家煞费苦心。但是利用传统方法敲除一个目的基因至少需要半年时间,且耗资巨大。生命科学发展的瓶颈因 RNAi 技术出现被彻底打破,该技术成为后基因组时代功能基因组研究的一个强大工具。不仅如此, RNAi 技术还可以通过沉默或敲除疾病相关基因而达到治疗疾病的目的。而实现 RNAi 最为直接和方便的方法就是化学合成 siRNA 后转染细胞或注射入实验对象体内。化学合成的 siRNA 能够将 RNAi 快速沉默基因的优势充分发挥,对基因功能研究意义重大。

RNA 干扰 (RNAi) 技术是生命科学领域近十几年重大的进展之一,它利用具有同源性的双链 RNA (dsRNA) 诱导序列特异的目标基因的沉默,迅速阻断基因活性。siRNA 在 RNA 沉默通道中发挥核心作用,是 RNAi 途径中的中间产物,是 RNAi 发挥效应所必需的因子。siRNA 的形成主要由 Dicer 酶和 Rde-1 调控完成。由于 RNA 病毒入侵、转座子转录、基因组中反向重复序列转录等原因,细胞中内源 dsRNA, Rde-1 (RNAi 缺陷基因-1) 编码的蛋白质识别外源 dsRNA,当 dsRNA 达到一定量时, Rde-1 引导 dsRNA 与 Rde-1 编码的 Dicer 酶 (一种 RNase III 活性内切核酸酶) 结合,形成酶-dsRNA 复合体。Dicer 酶切割后形成 siRNA,在 ATP 的参与下,并入 RNA 诱导的沉默复合体 RISC (RNA-induced silencing complex) 特异降解靶标基因。因此, siRNA 只降解与其序列互补配对的 mRNA。其调控的机制是通过互补配对而沉默相应靶位基因的表达,所以是一种典型的负调控机制。siRNA 识别靶序列是有高度特异性的,因为降解首先在相对于 siRNA 来说的中央位置发生,所以这些中央的碱基位点就显得极为重要,一旦发生错配就会严重抑制 RNAi 的效应。

三、siRNA 化学合成

siRNA 靶序列选择是 RNAi 实验成败的关键。哺乳动物细胞 RNAi 实验中,使用最广泛且最有效的是 21bp siRNA。siRNA 由正义链和反义链组成,两条链 3'端均有 2 个碱基突出,一般为 UU 或 dTdT,其中正义链的前 19nt 与靶基因序列相同。

(一) 靶序列选取原则

(1) siRNA 双链设计时,一般在靶 mRNA 起始密码子下游 100~200bp 至翻译终止

密码子上游 d0~100bp 搜寻 AA 序列, 并记录每个 AA 3'端相邻 19 个核苷酸作为候选 siRNA 靶位点。其中 AA (N19) TT 是最理想的序列, 若靶 mRNA 中无此序列, 也可选用 NA (N21) 或 NAR (N17) YNN (R 表示嘌呤, Y 表示嘧啶), 但在合成时, siRNA 的正义链 3'端需用 dT-dT 代替。

(2) 在设计 siRNA 时不要针对 5'端和 3'端的 UTR, 原因是这些地方有丰富的调控蛋白结合区域, 而这些 UTR 结合蛋白或者翻译起始复合物可能会影响 siRNP 内切核酸酶复合物结合 mRNA, 从而影响 siRNA 的效果。

(3) 将潜在的序列和相应的基因组数据库 (人、小鼠或大鼠等) 进行比较, 排除那些和其他编码序列/EST 同源的序列。常将候选 siRNA 序列在 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) 进行 BLAST, 与非同源基因具有 3 个或 3 个以上碱基相异的序列方可选用。

(4) 选出合适的目标序列进行合成。通常一个基因需要设计多个靶序列的 siRNA, 以找到最有效的 siRNA 序列。

(二) siRNA 免费在线设计工具

本章节介绍的免费设计 siRNA 工具或是由一些知名厂家提供的。而且不同的在线设计工具采用不同的设计法则, 各不相同。显然没有哪个设计工具或者设计法则是完美的。当面对这么多免费工具可用时, 人们会想都尝试一下, 将目的基因序列分别用不同的在线工具设计, 期望得到相近的 siRNA 靶序列结果。但是, 这几乎不可能实现, 同一个基因序列用不同的法则设计 siRNA 序列得到的结果很可能不相同, 并且很难说哪个比较好, 哪个不好。只有通过实验实践才是检验真理的唯一标准。

siRNA 免费在线设计工具: <http://www.genesil.com/business/products/order2.htm>, http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.htm, <http://www.ic.sunysb.edu/Stu/shilin/rnai.html>, <http://design.dharmacon.com/rnadesign/default.aspx?SID=45358710>。

第二节 靶序列确定及化学合成方法

一、靶序列确定

(一) 高效 siRNA 的序列结构特征

siRNA 高效性相关的特征: ①G/C 含量低 (30%~52%), 正义链 3'端具较低稳定性, 有利于 siRNA 与 RISC 的结合和解链; ②无反向重复序列, 有利于降低 siRNA 的有效作用浓度, 提高 siRNA 干扰效率; ③正义链碱基的偏爱性 A19 (正义链中第 19 位碱基为 A, 如下表示类同)、A3、U10, 无 G/C (正义链中第 19 位碱基不为 G 或 C), 无 G13;