



高新技术科普丛书

RNA 干扰技术

TECHNIQUES OF RNA INTERFERENCE

■ 金由辛 赵波涛 马中良 编著



化学工业出版社

Q522-49
20/21

《中国标准书号》(CIP) 目录



高新技术科普丛书

RNA 干扰技术

TECHNIQUES OF RNA INTERFERENCE

■ 金由辛 赵波涛 马中良 编著

+++++

平装本 16开 320页 2008年1月第1版 2008年1月第1次印刷
定价：28.00元



化学工业出版社

· 北京 ·

化学工业出版社 北京

定价：28.00元

图书在版编目 (CIP) 数据

RNA干扰技术/金由辛, 赵波涛, 马中良编著. —北京: 化学工业出版社, 2013. 6

(高新技术科普丛书)

ISBN 978-7-122-17135-1

I . ① R… II . ①金…②赵…③马… III . ①核糖核酸 - 生物技术 - 普及读物 IV . ① Q522-49

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 082849 号

责任编辑: 傅四周

装帧设计: 史利平

责任校对: 蒋 宇

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张13¼ 字数236千字 2013年9月北京第1版第1次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 39.00元

版权所有 违者必究

编写人员名单

(按姓名汉语拼音排序)

董志诚 金 言 金由辛

李艳利 马中良 申雨晴

田 珂 王 强 韦嘉励

夏雨晴 袁天蔚 张冰洁

赵波涛 朱绍良

为了普及和推广高新技术，化学工业出版社自 2000 年以来组织出版了《高新技术科普丛书》。丛书涵盖了化学、化工、生物、材料、环境、能源、资源、先进制造、信息技术等专业领域，分四批出版，共计 44 个分册。有别于面向一般大众的科普图书，丛书面向科技工作者编写，知识起点更高，读者层次更专业，已构成了科普书的一个新类别。丛书已被列入“国家科普知识重点图书”，出版后广受读者好评，市场表现也非常突出。有专家评价该丛书“从理论到实践，从技术到工程化及产业化，既反映了最新成就，又充分体现了科学思想和科学精神，对开拓创新有重要作用”。

时至今日，丛书面市已逾 10 年。期间，化工技术有不小的应用进展，生物、材料、能源等技术领域又取得了许多重要的突破，很多新技术得以应用于生产，提供了更加优良的产品或服务。举例来说，2007 年，日本科学家山中伸弥所在的研究团队通过对小鼠的实验，发现诱导人体表皮细胞使之具有胚胎干细胞活动特征的方法，此方法为治疗多种心血管绝症提供了巨大助力，他因之获得了 2012 年度的诺贝尔生理学或医学奖。2011 年，基于中美两国的能源合作，中国国际航空公司使用现役波音 747-400 型客机加载由中国石油和美国 UOP 公司合作生产的航空生物燃料在首都国际机场执行本场验证飞行，获得圆满成功。

为此，我们紧密结合相关产业的国家“十二五”规划，遴选了一批今后有很大应用前景、对国家科技综合实力有重要影响的实用技术，请专家系统归纳整理出版，作为《高新技术科普丛书》的延续和新品，提供给从事相关领域研究的科技工作者，政府、企业的管理人员及相关专业的高校学生。

丛书介绍各类高新技术的原理、特点、重要地位、产业化现状、应用及发展前景，突出“新”及“高科技”；写作风格上力求深入浅出，图文并茂，做到知识性、科学性、通俗性、可读性及趣味性的统一；编写队伍源自国内知名的专家学者，他们均在各自领域取得了丰硕的研究成果。丛书第一批包括下列分册：

太阳电池及其应用

膜技术

新型与特种纤维

多孔固体材料

超临界流体技术及应用

RNA 干扰技术

作为出版者，我们由衷希望丛书的出版能在提升我国科学研究水平方面略尽绵薄之力，真诚祝愿我国科技事业蒸蒸日上、欣欣向荣！

化学工业出版社

2013 年 8 月

前言

Preface

美国斯坦福大学的安德鲁 (Andrew Z Fire) 和马萨诸塞大学医学院的克雷格 (Craig Mello) 在进行线虫基因沉默研究中, 分别注射肌肉蛋白的正义、反义和双链RNA。结果表明, 双链RNA的抑制效果是单链RNA的10 ~ 100倍。他们将这种双链RNA抑制基因表达的现象称为RNA干扰 (RNAi), 把引发RNA干扰现象的RNA称为干扰RNA (iRNA)。研究论文发表在1998年的《自然》(Nature) 周刊上, 他们因此获得了2006年诺贝尔生理学或医学奖。我们不说此前的矮牵牛花实验, 该实验导致了共阻遏的发现。我们也不追溯到此前发现的miRNA, 如let-7和lin-4。仅从1998年安德鲁和克雷格工作算起, RNAi研究已经走过了近15个年头。15年后的今天, RNA干扰, 包括miRNA, 已经成为被广泛应用的非常有效的敲低基因表达的工具。它们本身也成为探索生命奥秘的工具, 构成生命科学研究的前沿和热点。而早在此项目获得诺贝尔奖以前, 一些大制药公司已经将此技术引入到了制药研发工作中。如今, 它正在生命科学研究中发挥着重要作用, 也必将在医药领域有非常好的应用前景, 必将会造福于人类。

应化学工业出版社傅四周先生的邀请, 我于2011年底开始组织人员, 编写本书。参与此书编写的有: 上海大学生命科学学院的马中良 (博士、副教授, 编写第二、三章); 韦嘉励 (博士、讲师, 编写第四章和第五章部分内容); 赵波涛 (博士、讲师, 编写第六、七章); 我则写了第一章。另有中科院深圳先进技术研究院医药所的金言 (博士, 研究组长) 完成了韦嘉励博士未完成的第五章。初稿完成后, 由中科院华南植物园植物研究所的董志诚 (博士、研究员) 对第六、七章进行了文字修饰, 由我进行了审校。金言审

太阳能电池及其應用
技术

新理与材料科学

金属固体材料

生物医学工程

RNA干扰技术

前言

校了第一章，与我共同修改了其他几章，并提出大修意见。对各编写人员修改后的第二稿，上海大学生命科学学院的李艳利（博士、副教授）对第二、三章进行了修改，再由我对第二至第五章进行审校。李艳利对全书的插图进行了统一格式等的改动。本组的研究生参与了本书的绘图及文字校对工作，最后由我为全书定稿。在此，我衷心感谢所有为此书的出版付出辛勤劳动的各位博士及在读研究生。

上海大学生命科学学院教授

中科院上海生科院生化细胞所退休回聘研究员

金由辛

2013年7月

英文缩略语

英文缩写	英文名称	中文名称
17-AAG	17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin	17-烯丙基-17-去甲氧基德干霉素
AAV	adeno-associated virus	腺相关病毒
AD	Alzheimer's disease	阿尔茨海默病
AIM1	absent in melanoma 1	黑色素瘤缺失蛋白 1
ALS	amyotrophic lateral sclerosis	肌肉萎缩性侧索硬化症
APC	adenomatous polyposis coli	结肠腺瘤样息肉
APP	amyloid precursor protein	β -淀粉样蛋白的前体
aRNA	aberrant RNA	异常 RNA
ATF2	activating transcription factor 2	激活转录因子 2
ATP6V0D1	vacuolar ATPase	囊泡 ATP 酶
BiFC	bimolecular fluorescence comple- mentation	双分子荧光互补
CAM2B	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II β	钙调蛋白激酶 II
ca-siRNA	cis-acting siRNA	顺式作用 siRNA
CCT2	chaperonin containing T-complexprotein 1 subunit 2	含 t 复合体蛋白 1 伴侣蛋白亚基 2
CD	cyclodextrins	环糊精
CDK9	cyclin-dependent kinase 9	细胞周期依赖激酶 9
Chp1	chromatin protein 1	染色质蛋白 1
CHS	chitosan	壳聚糖
Cid12	caffeine-induced death resistant	Cid12 咖啡因诱导的死亡抗性基因 家族
CIT	citron rho interacting kinase	citron rho-相互作用激酶
CLK1	CDC-like kinase 1	CDC 样激酶 1
COP I	coat protein complex I	衣壳蛋白复合体 I
COPG	COPI coated vesicle transport	COPI 包裹的囊泡转运蛋白
CPP	cell-penetrating peptides	细胞穿膜肽
DCL	Dicer-like protein	Dicer 蛋白
DDM1	decrease in DNA methylation1	DNA 甲基化降低 1
DGKD	diacylglycerol kinase delta	二脂酰甘油激酶 δ
DOPC	dioleoylphosphatidylcholine	二油酰磷脂酰胆碱
DOPE	diplo-phospholipid ethanolamine	二油酰磷脂乙醇胺
DRDM1	defective in RNA directed DNA methylation 1	RNA 指导的 DNA 甲基化缺陷 1
dsRBD	double-stranded RNA binding domain	双链 RNA 结合结构域
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA

续表

英文缩写	英文名称	中文名称
EBV	Epstein-Barr Virus	艾巴氏病毒
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
EGFR	epidermal growth factor receptor	表皮生长因子受体
EREG	epiregulin	表皮调节素
esiRNAs	endoribonuclease-prepared siRNAs	内源核酸酶预制 siRNAs
Exp-5	Exportin-5	运载蛋白-5
FAD2	fatty acyl Δ 12 desaturase 2	脂肪酸去饱和酶
FGFR	fibroblast growth factor receptor	纤维生长因子受体
FTD	frontotemporal dementia	额颞痴呆
GALK2	galactokinase 2	半乳糖激酶2
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GSK3- β	glycogen synthase kinase 3	糖原合成酶激酶3
HA	hemagglutinin	血凝素
HCPPro	helper-component protease	辅助组分-蛋白酶
HD	huntington's disease	亨廷顿舞蹈病
HDAC	histone deacetylase	组蛋白去乙酰化酶
HIF-1	hypoxic-inducible transcription factor 1	低氧应答转录因子
HIV	human immunodeficiency virus	人类免疫缺陷病毒
HP1	heterochromatin protein 1	异染色质蛋白1
HPV	human papillomavirus	人乳头瘤病毒
Hrr1	helicase required for RNAi-mediated heterochromatin assembly	RNAi介导的异染色质组装必需的解螺旋酶
HTATIP	histone acetyl transferase TIP60	组蛋白乙酰基转移酶
HTLV-1	human T-cell leukemia virus type1	成人T细胞白血病中的 I 型T细胞白血病病毒
ICK	intestinal cell kinase	肠细胞激酶
IES	internal eliminated segment	内部切除片段
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	胰岛素样生长因子-1受体
ihpRNA	induced-hpRNA	诱导的 hpRNA
IRF	interferon regulatory factor	诱发干扰素应答因子
iRNA	interference RNA	干扰RNA
isRNA	immunological small RNA	免疫小RNA
KSHV	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus	卡氏肉瘤相关疱疹病毒
LNA	locked nucleic acid	锁核酸
LPD	lipid-protamine-DNA	脂-鱼精蛋白-DNA
MA	monoclonal antibodies	单克隆抗体药物

英文缩写	英文名称	中文名称
MAPK	mitogen-activated protein kinase	促分裂原活化蛋白激酶
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶 11
MC	microprocessor complex	微处理复合体
MDR	multi-drugs resistance	多耐药性
MET	mesenchymal-epithelial transition factor	间叶上皮转化因子受体
miRNA	microRNA	微小 RNA
MSUD	meiotic silencing by unpaired DNA	减数分裂的沉默
MTA1	metastasis-associated protein 1	转移相关蛋白 1
MVD	microvasculardensity	微血管密度
NA	neuraminidase	神经氨酸酶
nat-siRNA	natural antisense transcript-derived siRNA	天然反义转录 siRNA
ncRNA	non-coding RNA	非编码 RNA
NFκB	nuclear factor κB	核内因子 -κB
NP	nucleocapsid protein	核衣壳蛋白
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小细胞肺癌
NTR	nuclear transport receptor	核转运受体
ODN	oligodeoxynucleotide	反义寡脱氧核苷酸
OGT	O-GlcNAc transferase	O-乙酰葡萄糖胺转移酶
ORF	open reading frame	开放阅读框
P-body	Processing body	P 小体
PC	pachyonychia congenital	先天性厚甲症
PD	Parkinson's disease	帕金森病
PEI	polyethyleneimine	聚乙烯亚胺
PES	2-phenylethynesulfonamide	2-苯基乙炔氨苯磺胺
Pgp	permeability glycoprotein	P-糖蛋白
piRC	piRNA complex	piRNA 复合体
PKR	protein kinase R	蛋白激酶 R
pri-miRNA	primary miRNA	miRNA 初级转录本
PSKH1	protein serine kinase H1	蛋白丝氨酸激酶 H1
PSMA	prostate specific membrane-receptor antigen	前列腺特异膜受体抗原
PTGS	post-transcriptional gene silencing	转录后基因沉默
PTK	protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
Rb	retinoblastoma tumor suppressor	成视网膜细胞瘤抑制基因

续表

英文缩写	英文名称	中文名称
R III D	RNase III domain	RNase III 结构域
RdDM	RNA-directed DNA methylation	RNA 指导的DNA 甲基化
RDPK	RNA-dependent protein kinase	dsRNA 依赖的蛋白激酶
RDRC	RNA-dependent RNA polymerase complex	RNA 聚合酶复合体
RdRP	RNA-dependent RNA polymerase	RNA 依赖的RNA 聚合酶
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA 诱导的沉默复合体
RITS	RNA-induced initiation of transcriptional gene silencing	转录起始基因沉默复合体
RMCE	recombinase mediated cassette exchange	重组酶介导的盒式交换
RNA Pol III	RNA polymerase III	RNA 聚合酶 III
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
RPS6KA6	ribosomal S6 kinase 4, RSK4	核糖体 S6 激酶 4
SAH3	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase 3	S-腺苷同型半胱氨酸水解酶 3
SARS	severe acute respiratory syndrome	急性呼吸综合征
SCA	sickle cell anemia	镰刀形细胞贫血症
SCA	spinocerebellar ataxia	脊髓小脑共济失调
SCLC	small cell lung cancer	小细胞肺癌
shRNA	short hairpin RNA	短发夹 RNA
siRNA	small interfering RNA	小分子干扰 RNA
SM	small molecular	小分子药物
SNALP	stable nucleic acid lipid particle	稳定的核酸脂质颗粒
SOD1	superoxide dismutase 1	超氧化物歧化酶 1
ssiRNA	secondary siRNA	次级 siRNA
ssRNA	single-stranded RNA	单链 RNA
ta-siRNA	trans-acting siRNA	反式作用 siRNA
TGS	transcriptional gene silencing	转录基因沉默
TLR	Toll-like receptor	Toll 样受体
TNBC	triple negative breast cancer	三重阴性乳腺癌
TOR	target of rapamycin	雷帕霉素的靶点
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor	尿激酶型纤溶酶原激活物受体
3'-UTR	3'-untranslated region	3'-非翻译区
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	血管内皮生成因子受体
VIGS	virus induce gene silence	病毒诱导的基因沉默
YFP	yellow fluorescent protein	黄色荧光蛋白

目录

Contents

第1章 绪论	001
1.1 RNAi的发现史	001
1.2 发现RNAi的意义	003
1.2.1 RNAi的生理意义	003
1.2.2 发现RNAi的科学意义	004
1.2.3 科学在思想碰撞中前进	005
1.3 RNAi技术的应用	008
1.3.1 基因敲低	008
1.3.2 功能基因组学研究	008
1.3.3 医学上的应用	009
1.3.4 生物技术	009
1.3.5 全基因组筛选	009
参考文献	010
第2章 RNAi的基本原理	011
2.1 与RNAi有关的酶、蛋白	011
2.1.1 Drosha蛋白	011
2.1.2 DGCR8蛋白	013
2.1.3 运载蛋白-5	014
2.1.4 Dicer酶	014
2.1.5 TRBP蛋白	016

2.1.6	Argonaute蛋白	017
2.1.7	RNA依赖的RNA聚合酶	018
2.2	细胞质中的RISC	019
2.2.1	RISC的组成	019
2.2.2	RISC的装配	019
2.2.3	RISC的解旋	021
2.3	细胞质中RNAi作用的机理	021
2.3.1	mRNA的降解	021
2.3.2	翻译抑制	026
2.4	细胞核内的siRNA与基因沉默	027
2.4.1	siRNA与RdDM	028
2.4.2	siRNA与异染色质	030
2.4.3	siRNA与DNA切除	033
2.4.4	siRNA与减数分裂的沉默	034
2.5	其他小分子RNA	035
2.5.1	piRNA	037
2.5.2	其他几种小分子RNA	038
	参考文献	039

第3章 RNAi的基本技术

043

3.1	发展RNAi技术的不同途径	043
3.1.1	人工合成的siRNA	044
3.1.2	长链dsRNA	044
3.1.3	病毒载体表达的shRNA	044
3.2	人工合成siRNA的设计与合成	046
3.2.1	siRNA的设计原则	046
3.2.2	siRNA的合成	050
3.3	shRNA的设计及含shRNA载体的构建	053
3.3.1	shRNA的设计	053

3.3.2	shRNA载体的构建	055
3.4	siRNA的导入方法	063
3.4.1	裸siRNA的直接递送	064
3.4.2	siRNA的非病毒载体体内递送	065
3.4.3	病毒载体导入	071
	参考文献	072

第4章 RNAi用于基因及基因组功能研究

075

4.1	RNAi技术在动物系统中的应用	075
4.1.1	RNAi干扰分子在动物研究中的应用	075
4.1.2	在不同的动物系统中应用RNAi技术研究基因功能	079
4.1.3	条件型的基因沉默	083
4.1.4	RNAi的脱靶效应	085
4.1.5	采用全基因组规模的RNAi筛选策略研究基因及基因组功能	087
4.1.6	RNAi技术在动物系统中研究功能基因的进展	091
4.2	RNAi技术在植物系统中的应用	104
4.2.1	RNAi技术研究植物基因组与传统的方法相比的优越性与 局限性	105
4.2.2	植物siRNA相关的载体及载体构建	106
4.2.3	高效的植物RNAi载体	107
4.2.4	RNAi技术改良植物性状	108
	参考文献	109

第5章 RNAi用于药物靶点的确认

113

5.1	核酸药物	113
5.1.1	单核苷酸及其衍生物	113
5.1.2	寡核苷酸类	114
5.1.3	多核苷酸类	115

5.2 miRNA药物及siRNA技术用于药物靶标的研究	115
5.2.1 miRNA药物与靶标	118
5.2.2 siRNA技术用于药物靶标的研究	120
参考文献	132

第6章 RNAi用于治疗药物的研发

134

6.1 RNAi在抗病毒研究中的应用	142
6.1.1 抑制HIV的siRNA研究	147
6.1.2 抑制HCV的siRNA研究	150
6.1.3 抑制HBV的siRNA研究	150
6.1.4 抑制RSV的siRNA研究	151
6.1.5 抑制流感病毒的siRNA研究	152
6.1.6 抑制SARS冠状病毒的siRNA研究	153
6.2 RNAi在抗肿瘤研究中的应用	153
6.2.1 RNAi抑制肿瘤相关的基因	153
6.2.2 用RNAi来筛选肿瘤的治疗靶点	162
6.3 RNAi在抗其他治疗研究中的应用	163
6.3.1 RNAi应用于人类遗传性疾病	163
6.3.2 RNAi应用于人类过敏性疾病	166
6.4 RNAi应用中可能存在的问题	168
参考文献	172

第7章 天然RNAi

179

7.1 植物中的天然siRNA	179
7.1.1 反式作用siRNA	180
7.1.2 天然顺式反义转录本siRNA	180
7.1.3 异染色质siRNA	180
7.1.4 抗病毒相关的siRNA	181

7.2 动物中的天然siRNA	182
7.2.1 来自转座子成分的siRNA	182
7.2.2 来自顺式天然反义转录本的siRNA	184
7.2.3 来自哺乳动物假基因的siRNA	184
7.2.4 来自发夹转录本的siRNA	184
7.3 动植物中的miRNA分子	185
参考文献	191

20世纪70年代末,在眼虫生物中发现一类小分子RNA(长度为100~300个核苷酸),它随样虫细胞膜上有孔,膜孔由OMP1(由*omp1*基因编码)和OMP2(由*omp2*基因编码)两种蛋白组成,在任何情况下,组成膜孔的这种种蛋白的物质质量都是恒定的,但在不同生理条件下,它们的比例是不同的。原来*omp2*基因的表达受到生理状态的调控,而该基因转录出作为OMP2蛋白合成的模板mRNA时,也转录出一个长度为174个核苷酸(nucleotide, nt)的RNA,这种小分子RNA可以与*omp1* mRNA的部分序列反向互补配对,由于小分子RNA的占位现象而抑制了*omp1* mRNA的翻译,因此*omp1* mRNA翻译减少,*omp2* mRNA翻译增多,通过这种方式保持了两种蛋白数量的恒定,而两种蛋白的比例可随生理条件的变化而变化,这种小分子RNA与靶mRNA(通常称为正义链)反向互补,因此被称为反义RNA,这是第一次发现RNA具有调控功能。

此后,虽然很多实验表明,在真核生物中也可能存在反义RNA,但一直未能在真核生物中检测到天然的反义RNA,而沿用反义RNA的原理,如果人为合成反义RNA或反义寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)导入真核细胞,常常可以有效地抑制靶mRNA的翻译,因此,反义RNA和反义ODN这两种技术被广泛应用于细胞和医药研究中。如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,所以被称为反义沉默,沉默的效应是使基因不被表达。

20世纪90年代初,科学家在转基因花中导入与花青素合成有关的查尔酮合酶基因,原以为转基因的牵牛花会变得更鲜艳,结果却发现,一些花反而更苍白了,这种过度表达内源基因而引发的基因沉默被称为沉默。

在上述研究的背景下,幸运的安德鲁(Andrew Z. Fire)和克雷格(Craig Mello)赢得了那只已经燃遍了的最大的“爆竹”,他们最先开始对基因沉默的研究中,分别注射肌肉发育的正义RNA、反义RNA和双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA),结果发现是双链反义RNA,还是反义RNA,均未发现于代