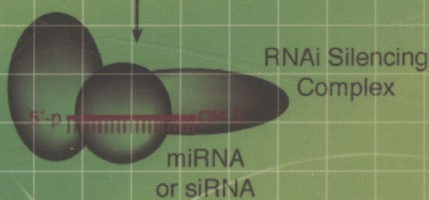
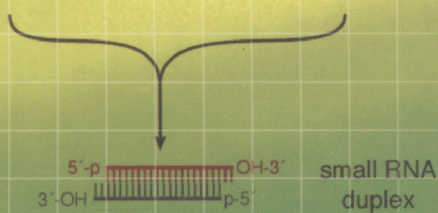
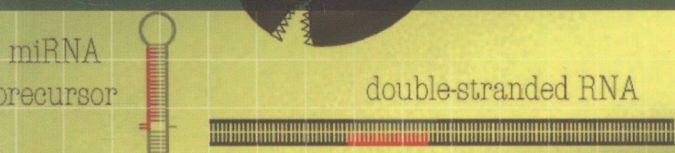


基因沉默

—— 原理及方法

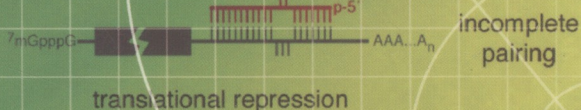
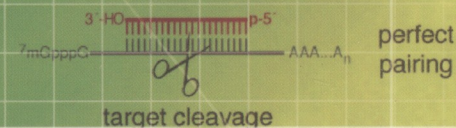


朱启顺 王熙才等 编著



miRNA function

siRNA function



JIYIN CHENMO YUANLI JI FANGFA

云南科技出版社



基 因 沉 默

——原理及方法

朱启顺 王熙才等 编著

云南科技出版社

·昆 明·

图书在版编目(CIP)数据

基因沉默:原理及方法/朱启顺,王熙才等编著. - 昆明:
云南科技出版社,2005.6

ISBN 7-5416-2183-8

I.基... II.①朱...②王... III.核糖核酸-研究
IV.Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 067953 号

云南科技出版社出版发行

(昆明市环城西路 609 号云南新闻出版大楼 邮政编码:650034)

昆明市五华区教育委员会印刷厂印刷 全国新华书店经销

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:16 字数:380千字

2005年7月第1版 2005年7月第1次印刷

印数:1~1000册 定价:39.00元

前 言

RNA 干扰 (RNA interference RNAi) 现象最先发现于秀丽线虫, 这是一种由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 诱导的抗双链 RNA 的反应, 这一反应导致序列特异性的基因沉默。随后发现这一机制存在于许多真核有机体中。大量的遗传学与生物化学研究表明 RNAi 诱导的基因沉默可分为两个过程: 第一步是由 Dicer 酶将 dsRNA 降解成 21~25 核苷酸的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)。第二步是将 siRNA 加入具有 Nase 活性的复合体 RISC (RNA-induced silencing complex)。激活 RISC 需要一个 ATP 依赖的将 siRNA 解双链的过程, 该复合体与相应的 mRNA 结合并使其降解。RNA 干扰的基因沉默具有许多令人瞩目的特性。首先它能高效并且特异地抑制同源 mRNA 的表达水平; 其次它能在整修有机体细胞之间传递。虽然目前在哺乳动物中尚未发现这种传递性, 但发现哺乳动物细胞内存在与 RNAi 传递相关的基因 sid-1 的同源物, 这说明哺乳动物体内也可能存在着 RNAi 的细胞间传递机制。再次, RNAi 效应在低等动物是持续的甚至是可遗传的。虽然哺乳动物细胞中的 RNAi 效应是较短暂的, 但 siRNA 载体的应用已能够使 RNAi 效应在哺乳动物中遗传。

RNAi 机制的发现为医学基础研究中基因功能的研究提供了新的手段, 使基因功能的研究可以大规模展开。在医学临床治疗方面, RNAi 的特异性及高效性使其可能成为一种前景光明的治疗方法。目前该方法已经通过质粒、腺病毒、逆转录病毒及慢病毒等载体试用于治疗感染性疾病、肿瘤以及遗传性疾病等。对感染性疾病的治疗, 以 HIV 和 HBV 为代表, 转入病毒

复制或感染相关基因的 siRNA 片段能有效抑制病毒的增殖和感染。我国在征服 SARS 病毒的战役中也采用了 RNAi 的研究手段，表明该方法能有效地抑制 SARS 病毒产生的细胞病变。RNAi 理论上可应用于发生、发展和转移过程中任何有基因异常高表达的任何环节。目前 RNAi 在肿瘤治疗领域的应用体现在几个方面：一、针对肿瘤相关融合基因转录产物；二、针对过表达的癌基因或凋亡抑制因子；三、针对肿瘤耐药基因；四、针对肿瘤血管生成因子及受体；五、等位基因特异性抑制 (allele-specific inhibition, ASI)。ASI 是一种对肿瘤细胞中与缺陷基因对应的正常等位基因进行治疗的方法，其前提是该等位基因属杂合子并且是细胞生命活动所必需的。抑制了正常等位基因的肿瘤细胞会死亡，而正常细胞由于等位基因的代偿而不受影响。RNAi 为显性负基因突变引起的遗传性疾病的治疗提供了新的手段。肌萎缩性脊髓侧索硬化症是由 Cu、Zn 超氧歧化酶 (SOD1) 基因突变产生的细胞毒性产物引起的，特异性抑制突变的等位基因就可达到疾病的治疗目的。

siRNA 技术的发展显示了它在基因治疗方面的广阔前景。虽然目前这一技术还不是十分完善，但随着其机制的进一步揭示，我们将能更好地用其进行治疗。另一方面，还应看到目前所用的载体仍然没有脱离传统的思路，仍然存在传统载体的不足，尚需进一步完善，或研究发现新的载体，提高其在肿瘤细胞中的转染效率。总之，RNAi 机制的发现为我们在肿瘤基因治疗方面开辟了新的思路，在攻克肿瘤这一顽症的道路上又迈进了一步。

继生物芯片技术之后，RNAi 作为后基因组时代的一种研究基因功能的利器，siRNA 能高效、特异地介导靶基因 mRNA 的降解，从而实现价廉而实用的“基因敲除”。这项技术不仅在 2001 年、2002 年两次夺得十大科技进步的赞誉，还被认为是生命科学领域掀起的一场革命！本书从 RNAi 所涉及到的原理及在功能基因研究、生物医药上广泛的应用前景等方面做了系统的阐述，并提供了有关的实验技术，是一本从事分子生物学以及生物化学必备的参考书。

参加编写的人员有：朱启顺（云南大学、中山大学），主要负责全书的统稿及参与绪论、第二章、第三章、第四章、第五章、第六章和第八章的编著；云南省肿瘤医院的王熙才，主要负责第九章、第十章、第十六章、第十七章的编著及部分统稿工作；云南大学的陈江虹，主要负责第一章和第十四章的编著；云南省红十字会的吴鸣、肖丽波，主要负责第十五章、第十二章和第十三章的编著；云南省老年病医院的谢斌，负责第七章和第十一章的编著。

本书在编写过程中，由于时间仓促，如有疏漏之处，敬请读者见谅。

编著者

目 录

绪论	(1)
一、基因沉默	(1)
二、基因沉默与 RNA 干扰的发现	(2)
三、RNA 干扰的机理	(4)
四、RNA 干扰所涉及的技术	(6)
五、RNAi 在功能基因研究方面的意义	(9)
六、RNAi 在医疗工作中的应用	(14)
七、RNAi 在生物与医学研究中的前景	(16)
第一章 RNA 干扰的生物化学	(21)
一、RNA 干扰的生物化学	(21)
二、RISC: RNAi 的催化引擎	(23)
三、Dicer 与 siRNA	(24)
四、Dicer 与 miRNA	(25)
五、哺乳动物细胞中 RNAi 的生物化学特性	(26)
六、不同生物中的 RNAi	(28)
七、RNAi 与人类疾病	(29)
八、RNAi 与基因组	(30)
第二章 核糖核酸酶 III 超家族	(34)
一、RNase III 超家族	(35)
二、细菌 RNase III 的功能	(36)
三、细菌 RNase III 同源底物反应抗原表位	(37)
四、细菌 RNase III 的作用机制	(38)
五、酵母 RNase III 同源物	(42)
六、高级真核细胞 RNase III 同源物的结构与功能	(43)
七、RNAi 与小调节 RNA 成熟中的 Dicer	(44)
八、RNase III 的起源	(46)
九、小结	(47)
第三章 基因沉默中依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶	(49)
一、概念	(50)
二、基因沉默中的 RdRP 同源基因	(53)
三、PCR 和移行 RNAi	(54)

四、基因沉默的工作模式	(56)
五、细胞和病毒 RdRP 之间的演化关系	(58)
六、 <i>QDE-1</i> 的 RdRP 活性	(59)
七、实验技术	(60)
第四章 转座元件, RNA 干扰及异染色质	(65)
一、控制元件的转座子	(65)
二、异染色质和转座子	(66)
三、转座子的沉默机制	(68)
四、RNAi 与转录沉默	(73)
五、结论	(76)
第五章 双链 RNA 介导的基因组调控	(79)
一、RNA 诱导的 DNA 甲基化	(79)
二、RdDM 和依赖于同源性的基因沉默	(80)
三、RNA 诱导的启动子甲基化与 TGS	(80)
四、植物中 dsRNA 的加工路径	(82)
五、RdDM 机理	(83)
六、染色质重塑因子与 RdDM	(85)
七、遗传筛选与 RdDM 的缺陷突变恢复	(86)
八、蛋白质编码区与启动子区的甲基化	(87)
九、RNA 介导的 TGS 在功能基因组中的应用	(90)
第六章 植物正义共抑制	(95)
一、共抑制机制	(95)
二、正义超表达转基因 RNA 沉默的诱导模式	(99)
三、RNA 沉默与 dsRNA 转录	(99)
四、植物基因沉默的概述	(101)
五、正义共抑制中的翻译	(102)
六、DNA 甲基化与 RNA 沉默	(103)
七、RNA 沉默信号的传递	(104)
第七章 PTGS 在植物大规模功能基因组研究中的应用	(107)
一、概念	(107)
二、PTGS 系统	(109)
三、病毒诱导的基因沉默 (VIGS)	(111)
四、扩增子介导的 VIGS	(113)
五、方法	(114)
六、前景	(117)
第八章 动物转基因共抑制	(120)
一、果蝇中的转基因沉默	(120)
二、果蝇的转录后转基因沉默	(121)

三、PIWI 和 AUBERGINE 与转录和转录后沉默	(122)
四、转基因对转座元件的影响	(123)
五、果蝇中 <i>Stellate</i> 与抑制子的相互作用	(124)
六、秀丽线虫中的共抑制	(124)
七、哺乳动物的共抑制	(125)
八、总结	(125)
第九章 秀丽线虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>) 中的 RNAi	(128)
一、RNAi 的缺失突变型	(128)
二、RNAi 机制	(129)
三、RNAi 的遗传性	(130)
四、移行 RNAi (transitive RNAi, tRNAi) 与免疫系统	(130)
五、RNAi 的传递	(131)
六、共抑制与 RNAi	(132)
七、转座子沉默、共抑制、RNAi	(133)
八、RNAi 的天然功能	(133)
九、实验技术	(135)
第十章 秀丽线虫中基因组水平上的 RNAi 筛选	(140)
一、秀丽线虫的 dsRNA 导入方法	(141)
二、大规模功能基因分析的工具——RNAi	(142)
三、RNAi 与传统遗传学	(143)
四、RNAi 筛选的相关问题	(145)
第十一章 果蝇细胞培养系中的 RNAi 技术	(149)
一、果蝇 S2 细胞系	(150)
二、实验技术	(152)
第十二章 黑腹果蝇中的 RNAi	(159)
一、概念	(159)
二、外源性与内源性 RNAi 方法的选择	(162)
三、实验技术	(164)
第十三章 鸟类胚胎期 RNAi	(182)
一、以鸡胚为模型研究神经系统发育时期的基因功能	(183)
二、实验技术	(185)
第十四章 哺乳动物的 RNA 干扰	(189)
一、Dicer 与长 dsRNA	(189)
二、siRNA 与 RISC	(190)
三、哺乳动物的 RNAi 与秀丽线虫或植物的 RNAi 的区别	(193)
四、哺乳动物细胞中利用 RNAi 进行功能基因分析	(194)
五、哺乳动物体细胞中表达 siRNA 或短发夹 RNA	(196)
六、方法	(198)

第十五章 shRNA 介导的哺乳动物基因表达沉默..... (208)

一、调节基因表达的发夹 RNA (208)

二、小干扰 RNA (209)

三、两种 RNA 沉默路径之间的联系..... (210)

四、沉默 RNA 的结构..... (211)

五、工程发夹 RNA 介导基因沉默..... (212)

六、动物体中 shRNAs 介导的沉默 (215)

七、总结 (216)

第十六章 RNAi 在鼠卵子与早期胚胎中的应用 (220)

一、哺乳动物细胞中的 dsRNA (220)

二、哺乳动物 RNAi 路径 (221)

三、RNAi 在早期哺乳动物胚胎中的角色..... (222)

四、作为研究早期哺乳动物发育工具的 RNAi (223)

五、展望 (226)

六、实验技术 (227)

第十七章 布氏锥虫与其他非经典模式有机体中的 RNA 干扰 (237)

一、人类研究进化多样性的工具——RNAi (237)

二、锥虫中 RNAi 的一般特征 (239)

三、siRNA 的特征 (241)

四、RNAi 与 mRNA 翻译..... (243)

五、锥虫 RNAi 的遗传分析 (244)

六、总结 (245)

绪 论

一、基因沉默

基因沉默可以分为两大类, 第一类:位置效应(position effect), 由于外源基因插入基因座(loci)两侧的 DNA 或插入特定的染色质部位对插入的基因起到了负影响所致(异染色质区); 第二类: 由于多拷贝的外源基因存在于同一染色体中而诱发的一种表遗传失活(epigenetic inactivation)现象, 由于是同源或互补的序列所诱导, 所以也称为同源依赖的基因沉默(homology dependent gene silencing, HDGS), 同源依赖的基因沉默又可以根据沉默发生的时期分为两类, 即转录水平的基因沉默(transcriptional gene silencing, TGS)和转录后水平的基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。转录水平的基因沉默是指由于 DNA 的修饰(如甲基化等)等原因使基因不能正常转录, 而导致外源基因不能表达; 转录后水平基因沉默是指外源基因在核内能够正常转录甚至超常转录, 但是转录产物在细胞质中的积累却很低或根本检测不到。一般来说, 同一染色体上的两个同源基因相互作用所产生的顺式沉默、不同染色体的两个同源基因所产生的反式沉默, 以及 DNA 甲基化所造成的沉默都属于转录水平上的沉默。而由反向重复序列产生的双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)所诱导的沉默或由单拷贝转基因所产生的异常 RNA(aberrant RNA)介导的沉默都属于转录后基因沉默。由于转录后基因沉默与植物和病毒的相互作用机制具有相似性, 所以下面重点讲述转录后基因沉默的主要特征, 即 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。

RNA 干扰极有可能与有机体细胞清除非必须外来基因有关, 外来基因以很高的拷贝数存在于细胞中, 它们是以病毒基因, 转座元件或以质粒等形式存在于细胞内。在过去的研究中发现, 在转基因的实验中, 虽然有多拷贝的靶基因转入细胞, 但转基因的表达受到明显的抑制, 而且在有转基因存在的情况下, 内源性同源基因也可能受到抑制 (Napoli 等, 1990), 虽然这些基因的沉默有可能发生在基因的转录水平, 但随着研究的进一步深入, 人们发现基因抑制的时期主要发生在转录后, 即所谓的 PTGS (post-transcriptional gene silencing), 而 PTGS 的本质则是 RNAi。它主要是通过 siRNA 对靶 mRNA 进行选择性的降解来完成基因沉默或抑制基因的表达。

二、基因沉默与 RNA 干扰的发现

PTGS 和 RNAi 是在研究植物、蠕虫等真核细胞的遗传转化中发现的。研究人员在研究过程中发现, 尽管转基因编码的 mRNA 的转录水平很高, 但是其同源性内源基因的 mRNA 的表达却很低或没有表达(Marathe 等, 2000)。研究人员在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*) (这两个物种的全基因组序列已经得到) 上揭示了 RNAi 的作用过程, 而且以这两个物种作为模型, 能快速地识别参与调节 RNAi 作用过程的相关基因。在植物中以随机的方式插入转基因时发现一个有趣的现象, 即转基因插入的拷贝数与基因表达的量成反比, 也就是增加特定基因插入的拷贝数就会导致与之同源的内源基因的沉默(Assaad 等, 1993)。最初的研究认为在紧密相连的两个拷贝之间相互作用, 形成了次级结构, 这一结构激发了 DNA 的甲基化, 抑制了 DNA 的转录, 从而导致了这类基因的沉默(Ye 等, 1996)。随着研究的进一步深入, 人类逐步认识了基因沉默的机理, 认为基因沉默可以发生在两个层面上, 即转录水平上的外源基因沉默(TGS)和转录后水平上的基因沉默(PTGS)。

转录水平上的外源基因沉默与位置效应、高度甲基化及启动子的失活相关。第一, 位置效应(position effect)是指基因在基因组中的位置对基因表达的影响。当外源基因整合到高度甲基化、转录活性低的异染色质区域时, 外源基因一般表现沉默, 这说明毗邻 DNA 的甲基化和异染色质化对插入的外源基因影响很大, 可能导致外源基因在转录水平上失活。如果整合到甲基化程度低、转录活性高的常染色体上, 其表达受两侧 DNA 序列的影响。第二, 启动子区域或 5' 端非编码区域的甲基化在真核生物中会引起基因失活, 同样转基因植物中甲基化也会导致外源基因的失活。还有, 重复序列诱导的 DNA 甲基化当转化基因以正向重复(direct repeated, DR)或反向重复(inverse repeated, IR)插入时, 容易引起外源基因的失活, 这种重复序列诱导的基因沉默(repeat induced gene silencing, RIGS)往往与 DNA 的甲基化相关。

而转录后基因沉默情况更加复杂。在此情况下, 启动子是活跃的, 外源基因也能被转录, 但不能正常积累 mRNA。当转基因植株中存在与外源基因同源的内源基因时, 不但外源基因在转录后水平上失活, 也诱导了与之同源的内源基因的沉默。由于外源和内源基因都表现沉默, 因而又被称为共抑制现象(cosuppression)。共抑制首先是在研究与花色素形成有关的基因中观察到的。共抑制是一个复杂的过程, 应用不同的系统, 从不同的角度研究, 提出了一些并不能完全统一的假说。其中 RNA 阈值模型认为, 由于激发了外源基因的高水平转录, 以至于积累到某个阈值, 从而启动了降解特定 mRNA 的反应, 造成转录后基因沉默。另外, PTGS 常与外源基因的甲基化有关, Ingelbrecht 等在一株外源基因 npt II 发生了 PTGS 的转基因烟草中, 发现 npt II 基因上游和下游区域被甲基化, 甲基化引起外源基因转录的非正常终止并产生非正常 mRNA。同时人们发现, PTGS 与一种依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRP)有关, RdRP 能以 mRNA 为模板合成小片段的互补 RNA (complementary RNAs, cRNA), cRNA

与 mRNA 杂交，从而成为专一性作用于双链 RNA 的 RNA 降解酶的底物，进而研究人员提出了 RdRP - cRNA 模型。RdRP - cRNA 模型可以很好地解释 PTGS 很强的序列特异性。

在研究 PTGS 的过程中，研究人员发现有双链 RNAs(dsRNAs)的存在，这些 dsRNAs 被切割成大约 23bp 长的 siRNAs，而且这些 dsRNA 的表达与 PTGS 中的开放读码框相对应 (Hamilton 等，1999)。

虽然 RNAi 作为 PTGS 的作用机理最早是在植物中发现的，其作用主要涉及到细胞抵御入侵的外来 DNA 和 RNA，在大多数真核细胞中，RNAi 主要的功能是调节内源性基因的表达。

在 20 世纪末，研究人员发现，利用人工的方法将 dsRNA 注入秀丽线虫时，对秀丽线虫基因沉默的效果远大于注入单链的反义 RNA (Fire 等，1998)。随着研究的进一步深入，发现由 dsRNA 引发的 PTGS 不仅作用于秀丽线虫的成虫，而且在其子代也有基因沉默的作用。研究证实，在细胞中靶 mRNA 的拷贝数远大于注入的 dsRNA 的拷贝数，即注入的 dsRNA 在浓度极低的情况下也能引起内源靶 mRNA 的降解，同时发现，由靶 mRNA 编码的蛋白质的抑制现象可以在经过好几代细胞分裂后观察到，说明细胞具有放大 RNAi 机理的机制，另外，RNAi 的作用不仅可以在细胞系中进行垂直传递，而且可以在细胞之间进行水平传递 (Fire 等，1998)。的确，Tabara 等在 1998 年以秀丽线虫为实验材料进行 RNAi 的研究中发现，当线虫浸泡在含有 dsRNA 的溶液或吞食表达 dsRNA 的菌后，dsRNA 可以进入细胞并诱导 PTGS。在 2002 年，Winston 等发现一种称为 SID - 1 的跨膜蛋白充当了 RNAi 在细胞间传递的介导体 (mediator)。

在动物方面，研究 RNAi 的材料不仅限于线虫，人们把研究的视线向其他生物转移，Kennerdell 和 Carthew 于 1998 年以果蝇为材料研究 RNAi，首次在果蝇中成功地利用 dsRNA 诱导基因沉默。发现了几种在 RNAi 过程中扮演重要角色的内源基因，其中的一种是具有 RNA 核酸酶活性的 RNA 诱导沉默复合体 (RNA - induced silencing complex, RISC)，它与内源性 mRNAs 的降解密切相关，另一种是小的核苷酸片段，大小一般在 25bp 以内，它充当了 RISC 的向导 (Hammond 等，2000)，后来的研究证实 RISC 是一种核糖核蛋白复合体。进一步的研究发现 RNAi 是依赖于 ATP 而独立翻译的事件，在这一过程中导入的 dsRNA 被加工成 21~23bp 的核苷酸片段 (siRNA)，siRNA 再引导内源性转录物的切割 (Zamore 等，2000)。经研究确定涉及到加工 dsRNA 的酶是 RNase III 家族的核酸酶，是与秀丽线虫 *rde - 1* 高度同源的一种蛋白，命名为 Dicer (Bernstein 等，2001)。在哺乳动物方面，Wianny 等于 2000 年首次以 RNAi 作为研究工具在鼠的胚胎和生殖细胞中成功诱导了靶基因的沉默，但是在哺乳动物的体细胞方面存在的主要问题是，将 dsRNA 人工导入细胞后会激活蛋白激酶 R (protein kinase R, PKR) 和 RNaseI 路径，这样导致了蛋白质合成受阻而诱导细胞程序性凋亡 (Gil 等，2000)。Elbashir 等 (2001) 将 21~23bp dsRNA 直接导入鼠和人的细胞，以避免较长 dsRNA 表达所带来的问题，实验结果显示 siRNA 能有效地在哺乳动物细胞中激活靶基因的沉默。

三、RNA 干扰的机理

在 PTGS 的基本模型中应包括必需的活性基因和沉默同源内源基因的 RNA 病毒 (English 等, 1997)。在近几年的研究中, 人们认识了一些参与介导 RNAi 的生物大分子, 这些分子有效地影响着靶 mRNAs 的选择性降解。PTGS 的核心问题是 dsRNA 的序列与靶 mRNA 的序列要有互补性; 单链的 RNA 是不足以诱导 PTGS 的, 这一点在转基因的研究中得到了证实。在转基因工程中, 只要合成少量的 dsRNA 就能获得 PTGS 和诱导共抑制的理想结果。获得 dsRNA 的方法有几种, 其中包括利用反向重复序列的转录 (Kennerdell 等, 2000) 和反向启动子 (opposing promoter) 进行互补正义链和反义链的转录 (Wang 等, 2000) 来合成发夹 mRNA, 其他方面的研究显示, 虽然细胞最初能合成非常长的 dsRNAs, 但是这些 dsRNAs 最终将被切割为小的 dsRNAs, 其长度为 21~25bp 核苷酸, 由这类小的 dsRNAs 来介导 RNAi (Hamilton 等, 1999)。

为什么与靶 mRNAs 有同源序列的 siRNAs 能够有效地产生 PTGS? 研究人员以秀丽线虫、抗 PTGS 的链孢霉和拟南芥为材料, 利用遗传学的方法筛选介导 RNAi 的蛋白质, 并鉴定了基因在每一个物种中的同源性, 接着人们又在哺乳动物中寻找参与 RNAi 的这类蛋白质的同源基因。筛选的结果显示, 在线虫中参与 RNAi 的基因是 *rde-1*, 链孢霉中是 *qde-2*, 拟南芥中是 *ago-1* (Tabara 等, 1999; Cogoni 等, 1996; Fagard 等, 2000)。这些基因编码的蛋白质均与翻译因子 eIF2C 具有同源性。研究发现, 在线虫中 *rde-1* 参与 RNAi 在子代中的传递, 而在细胞间的 RNAi 传递则不需要 *rde-1* (Grishok 等, 2000), 说明 *rde-1* 扮演 RNAi 信号的角色。在筛选的过程中还鉴定了秀丽线虫的 *ego-1*, 链孢霉的 *qde-1*, 拟南芥的 *sgs2/sde1* 等基因 (Tabara 等, 1999; Cogoni 等, 1999; Mourrain 等, 2000)。这些基因编码的蛋白质在 RNAi 过程中起到催化 dsRNA 产生的作用, 因为它们包含的功能区与参与将单链 RNA 转化为 dsRNA 的 RNA 介导的 RNA 聚合酶 (RdRP) 相类似。随着研究的进一步深入, 研究人员在秀丽线虫中又鉴定出了一些涉及 PTGS 的基因, 如 *smg-2*、*smg-5*、*smg-6*, 就这些基因而言它们编码的蛋白质与 dsRNA 起始沉默无关, 与维持基因抑制的长期性有关 (Domeier 等, 2000)。*Smg-2* 具有放大 RNAi 的功能, 使 RNAi 能持续线虫的一生, *Smg-5* 和 *Smg-6* 是磷酸酶。有意义的是, *Smg-2* 与酵母的 UPF1 基因有高度的同源性, 而 UPF1 是一种 RNA 结合蛋白, 具 ATP 酶和解旋酶活性 (Page 等, 1999)。在图 1 中显示了 RNAi 的工作模式。第一步是靶 mRNA 的 dsRNA 的产生; 第二步是 dsRNA 的识别以及 21~23bp 的小 RNA (siRNA) 的产生; 第三步是 RISC 的形成; 第四步也是至关重要的一步是 siRNA 对靶 mRNA 的识别与选择性地降解。通过质粒或病毒载体导入的 dsRNA, 在细胞中依赖于 ATP 酶的作用, 被切割成 21~23bp 长的双链 RNA 片段, 该片段具有 2 个核苷的 3'- 突端和磷酸化的 5'- 端 (Zamore 等, 2000; Elbashir 等, 2001)。这种核酸酶称作 Dicer, 该酶在植物、真菌、蠕虫、果蝇和哺乳动物中是高度保守的, 它是 dsRNA 特异性核糖核酸酶家族的一个成员。Dicer 酶能识别和加工 dsRNA (Ketting 等, 2001), 是 RNAi 过程的基础酶类, Dicer 不仅能将 dsRNA 加工为 siRNAs,

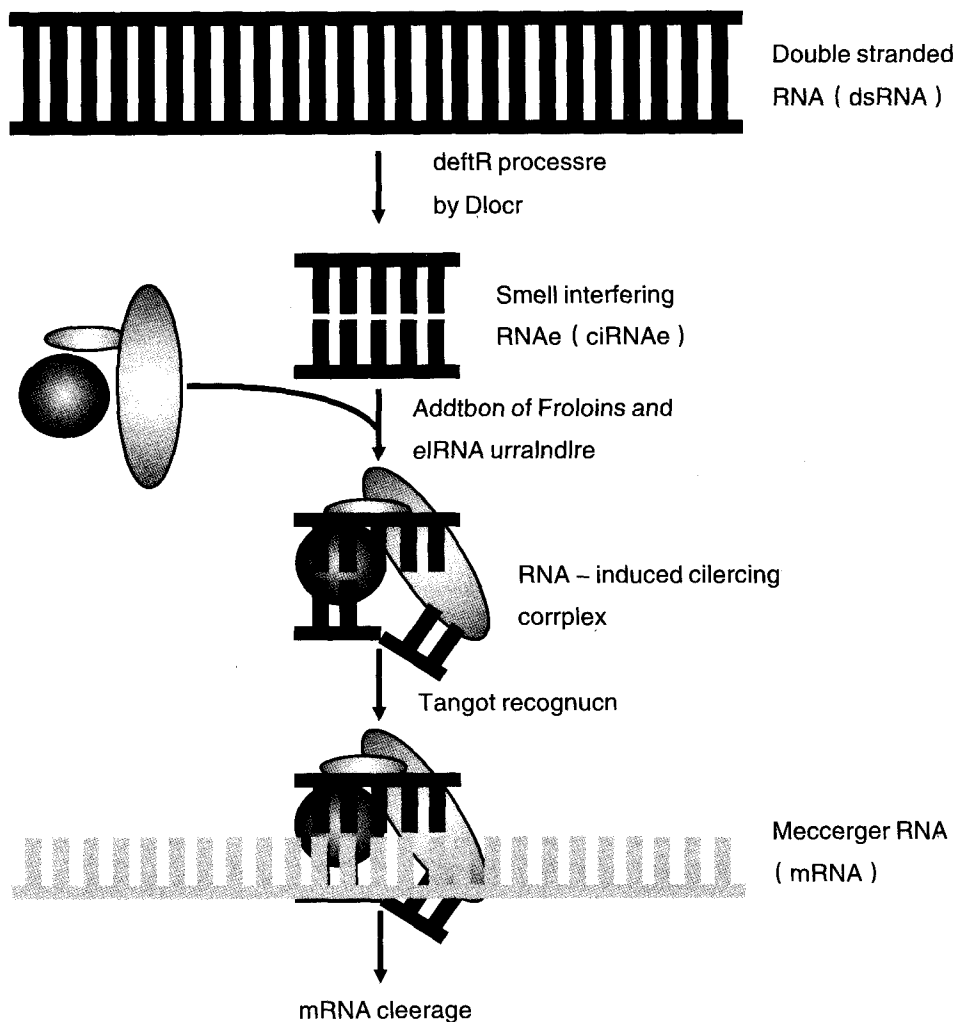


图1 RNAi干扰模式图（引自Consortium uses RNAi to uncover genes' function—MEDICINE AND HEALTH POLICY）

而且还能加工内源性的称作微RNAs (micro-RNAs) 的调节RNAs, Dicer有不同的功能区, 这些区域包括dsRNA结合区, RNase III活性区, 解旋酶活性区和PAZ (Piwi - Argonaute - Zucchini区, 该区有100个氨基酸, 能够调节底物与argonaute蛋白的相互作用) 功能区。鼠类的Dicer与人类的Dicer极为相似, 大小为1906个氨基酸, 分子量为215kDa, 含有一个串联重复(tandem repeat)RNase III催化功能区, dsRNA结合区, DexH/DEAH解旋酶区和一个PAZ区 (Nicholson等, 2002)。鼠类的Dicer基因位于第12条染色体上, 而且在细胞中得到广泛的表达。

一旦21~23bp的siRNA片段被称作RISC (核酸内切酶复合体) 的多重蛋白复合体识别后, 即可充当识别和降解靶mRNA的向导 (Nykanen等, 2001)。在以果蝇为材料的研究中证实RISC是以一种能被ATP激活的前体复合体的形式存在的, 这种前体能

被 ATP 激活形成具有内切酶活性的复合物，它能切割内源性的 mRNAs (Hammond, 2001)。虽然我们对 RISC 的特定成分还不十分了解，但是可以确定其一定包含有 Argonaut 家族的成员，这说明其与转录后基因沉默密切相关，另外 RISC 还包含有与内切和外切酶活性相关的蛋白质。最近在对人的 RISC 进行研究时，在纯化的 RISC 中分离到了 Argonaut 家族中的两种蛋白质，eIF2C1 和 eIF2C2，同时研究人员还发现 RISC 利用单链 siRNA 作为向导切割内源性的 mRNA，并证实 siRNA 反义链的 5'-端决定着 RNAi 的活性。

四、RNA 干扰所涉及的技术

一般来说，任何克隆的基因都可能成为寡 RNA 的靶，不管该 RNA 是人工设计的，还是 RNA 表达的病毒载体，只要其与靶基因转录的 mRNA 具有序列互补性即可。下面将 RNAi 主要涉及到的技术作一般的介绍。

(一) 干扰 RNA (siRNA) 的合成

20~23bp 的双链 siRNA 是可以进行大量合成的，而且也很容易进行细胞的转染。在这一过程中，首先需要获得目的基因的 cDNA 序列，然后以 cDNA 为模板合成 siRNA。虽然在 siRNA 的靶 mRNA 上的任何区域都可以成为 siRNA 的靶点，诱导靶 mRNA 的降解，但是实践经验显示选择 mRNA 上的特异性区域可以增加沉默成功的机率，一般人们选择的区域是以靶基因转录物的 AUG 起始密码子下游 50~100bp 处开始选择 siRNA 作用位点，而 5' 和 3' 非编码区和起始密码子附近区域应尽量避免，因为这些区域或是编码调节蛋白结合位点、非编码区结合蛋白或翻译起始复合物的区域，它们可能对 RISC 复合体的形成造成干扰，而削弱了 RNA 的作用。找出起始密码子下游的 AA，将连同其后 19 个 bp 一起作为 siRNA 的作用位点。

双链 siRNA 的设计、合成是进行 RNAi 研究的关键，化学合成法可用于 siRNA 的合成，但是费用过高，一般不用于日常的实验研究，与化学合成相对应的 siRNA 制备方法是 siRNA 的体外转录，这一方法可以直接制备双链的 siRNA，而且制备的费用比化学合成法低许多。这一方法所需要的条件是要拥有带噬菌体启动子的线性 DNA 模板以及相应的用于 PCR 扩增所涉及到的试剂，这其中包括噬菌体 RNA 聚合酶和 KlenowDNA 聚合酶。RNA 聚合酶是体外转录合成 siRNA 的关键性酶，常用的 RNA 聚合酶有 T7、T3 和 SP6，它们都以 DNA 为模板，并要求有特异性的启动子序列。每个 RNA 聚合酶对应的启动子共有序列如下：

T7

TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA

SP6

ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAG NG

AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA GA

RNA 聚合酶与双链的 DNA 启动子结合后, 它将打开双链 DNA 模板合成互补于 DNA 的 RNA 链。当然如果所用的模板是 cDNA, 可根据 cDNA 序列相对于启动子的方向设计正义、反义模板, 即可合成出对应的正义、反义 RNA 链, 经杂交可得双链 RNA。DNA 模板则可来源于质粒、PCR 产物和寡核苷酸链。与普通 DNA 模板所不同的是, 改进的 DNA 模板必须带有启动子, 启动子区域是 RNA 聚合酶结合和 RNA 开始合成的部位。一般情况下, 使用最多的方法就是通过克隆或 PCR 所得工程载体质粒。

(二) RNAi 质粒和病毒载体的构建

在进行 RNAi 研究中为什么要用到表达质粒和病毒载体呢? 其中一个主要的原因是表达载体可以在细胞中持续产生 siRNA 以达长久抑制靶 mRNA 的目的。另外的原因是特定的病毒载体对特定的细胞非常有效, 尤其是对后有丝分裂的细胞特别有效, 能增加细胞的转染率。第三个原因是, 就病毒载体本身而言, 其可以在细胞中进行持续表达。

短发夹 RNAs (shRNAs) 可以在培养细胞或活体中通过 RNA 聚合酶 III 启动子转录来制备, shRNA 在细胞中能够持续地抑制目的 mRNA 的表达 (Paddison 等, 2002a)。这一技术可以用于转基因鼠的研究, 特别是用这一方法来对鼠的基因进行基因敲除。Brummelkamp 等 (2002) 研发了一种新的载体系统, 该系统能够在哺乳动物细胞系中进行 siRNAs 的稳定表达, 他们使用的是聚合酶 III H1 - RNA 基因启动子, 该启动子能够产生一段尾端不带多聚 A, 有精确转录起始和终止信号的小 RNA。该设计还包括一个插入子, 该插入子来源于靶转录物, 具有序列特异性, 由大小为 19bp 的正向序列, 间隔子和 19bp 的反正向序列反向互补的 19bp 核苷酸等序列组成。这样就形成了 19bp 配对的茎环结构。Brummelkamp 等所构建的载体系统可以在不同类型的培养细胞中获得对靶基因表达的有效抑制。

目前已有许多研究小组成功地构建了包含 U6 启动子控制下的, 合成 siRNA 的 DNA 模板的质粒。Sui 等 (2002) 在鼠 U6 启动子控制的条件下, 插入一段制备小 RNA 的 DNA 模板, U6 启动子指导 Pol II - 特异性 RNA 的转录, 得到两段相同序列, 长度为 21bp, 但方向相反的核苷酸序列, 这两条序列被 6 个碱基对, 与序列没有同源性的间隔子所分隔。在重复序列的 3' 端加上 5T 的 Pol III 的终止信号, 这样就得到了具有几个 T 的 3' 突端的发夹 dsRNA。利用这种质粒, 他们对培养的人类细胞进行基因沉默研究, 证实其对 3 个不同类型的内源性基因 (核纤层蛋白 A/C, CDK - 2, DNA 甲基化转移酶) 的表达产生有效的抑制。除此之外, Devore 等 (2002) 还开发了反转录病毒传递系统。