



## 论文

## 组织特异 RNAi 转基因小鼠模型的构建

代蓉<sup>①②</sup>, 沈思军<sup>①</sup>, 甘尚权<sup>②</sup>, 毛青青<sup>③</sup>, 万鹏程<sup>②</sup>, 郭洪<sup>①</sup>, 孟庆勇<sup>④\*</sup>, 刘守仁<sup>②\*</sup>

① 石河子大学动物科技学院, 石河子 832000;

② 新疆农垦科学院畜牧兽医研究所, 石河子 832000;

③ 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095;

④ 中国农业大学, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193

\* 联系人, E-mail: nkysyb@163.com; qingyong.meng@gmail.com

收稿日期: 2011-02-27; 接受日期: 2011-03-28

国家自然科学基金(批准号: 31001002)、国家转基因生物新品种培育科技重大专项(批准号: 2008ZX08008-001, 2009ZX08008-001B)资助项目  
doi: 10.1360/052011-100

**摘要** RNAi 是一种行之有效的基因沉默的新方法, 被广泛地应用于基因功能的研究、疾病的治疗以及新型疫苗的研制等领域. 本研究通过原核显微注射干扰载体的方法制备转基因小鼠. 选用皮肤组织特异表达的人源角蛋白 14(K14)基因启动子(2000 bp)作为表达载体启动子, 成功地驱动融合表达载体 EGFP-shRNA 进行干扰片段前体的转录, 进而生成成熟的干扰片段, 靶向小鼠 *BMP4* 基因使其发生沉默. 所得到的转基因小鼠及其杂交后代经 PCR 和 Southern 杂交鉴定, 结果表明外源基因准确无误地整合到小鼠基因组. Northern 杂交结果证明, 小干扰 RNA 在皮肤组织中有较高水平的表达, 在肺和肠组织中有较低水平的表达. 研究表明, 利用 Pol II 型(K14)启动子驱动 shRNA 融合转录本的表达, 在特定组织高表达 siRNA, 从而达到抑制特定组织目的基因表达的技术路线是可行的. 同时为利用 K14 启动子进行毛囊相关基因干扰研究积累了基础数据, 为制备组织特异抑制基因表达的转基因大家畜提供了一个参考方法.

**关键词**  
组织特异  
RNAi  
转基因小鼠模型

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术是通过人工引入外源有效的小干扰 RNA(siRNA), 使特定的目的基因 mRNA 降解, 从而抑制基因表达的一种调控方法<sup>[1]</sup>. 与基因打靶技术相比, RNA 干扰技术因其操作技术简单、siRNA 易于制备等特点, 被广泛应用于基因功能的研究中. shRNA 表达载体法可以在细胞和体内实现较长时间持续抑制靶基因的表达, 而且制备简易, 从而被广泛应用于 RNAi 研究中. shRNA 表达载体常用 Pol III 型启动子, 如 U6 和 H1 等<sup>[2-5]</sup>, 但由于其广谱表达特性, 无法直接实现组织特异的

基因沉默. 而 Pol II 型启动子是在特定组织中高效表达外源基因的一种启动子, 可以驱动基因 mRNA 转录, 但小干扰 RNA 没有相对完整的基因表达结构, 因而 Pol II 型启动子不能直接驱动小 RNA 的表达. 为了实现 Pol II 型启动子与组织特异 RNAi 有机结合, 很多的研究小组从不同角度进行了探索. Boden 等人<sup>[6]</sup>用 CMV 启动子直接驱动 shRNA 的表达, 但 Northern 结果显示没有类似于小干扰 RNA 的转录物生成. 2004 年, Tiscornia 等人<sup>[7]</sup>和 Ventura 等人<sup>[8]</sup>选用慢病毒载体, 利用 Cre/LoxP 系统得到条件性干扰的转基因小

鼠. Hutvagner 和 Zamore<sup>[9]</sup>发现, 当 miRNA 与靶基因的互补程度较高时, 就有可能进入 RNAi 途径, 为 RNAi 的研究提供了一个新的思路. Zhou 等人<sup>[10]</sup>模拟了 miR-30 前体的茎环结构, 由 Pol II 型人泛素 C(UbC) 启动子驱动表达, 结果靶基因都能有效沉默. Rao 等人<sup>[11]</sup>利用 miR-30a 的前体茎环结构表达 shRNA 也在小鼠特定组织中抑制目的表达. Ling 和 Li<sup>[12]</sup>以存活素(survivin)为靶基因, 设计 shRNA 序列, 并连入 pEGFP-C1 载体中 EGFP 终止密码子的前面, 结果实现了有效的 RNAi. Yuan 等人<sup>[13]</sup>也采用相同的方法用 CMV 启动子驱动融合转录本的生成实现 RNAi.

生产转基因大家畜需要的时间周期长且技术难度大, 获得阳性动物的概率小, 无法进行早期屠宰, 必须经传代杂交后才能进行后续分析, 由于成本高等诸多因素, 在大家畜中利用 Cre/LoxP 制备条件性抑制基因表达的转基因动物研究很少. 本研究基于 shRNA 表达载体实现 RNA 干扰的方法, 选择皮肤组织特异表达的人角蛋白 14(K14)启动子, 驱动 EGFP-shRNA 的融合转录本的表达, 利用原核显微注射的方法制备转基因小鼠. 即避免基因敲除中技术等方面的要求, 又无需组织特异表达 Cre 酶的转基因动物, 直接使用一个载体实现了组织特异的 RNA 干扰. 为在研究大家畜中基因的功能提供了一个研究方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

昆明小鼠购自国家人口计生委科学技术研究所实验动物中心, 质粒 pEGFP-K14(自行构建)和 pMD T-19(TaKaRa); 去内毒素质粒中提试剂盒(QIAGEN)、质粒小提试剂盒(北京道普)、逆转录酶(Promega)、Taq E(Tiangen)、限制性内切酶(NEB)、LA-TAQ(TaKaRa)、高保真酶(TaKaRa)、T4 多核苷酸激酶(PNK 酶, NEB)、辣根过氧化物酶显色底物试剂盒(Thermo Scitific)、DNA 地高辛标记试剂盒(Roche)、杂交膜(GE)和放射性同位素 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(北京福瑞生物有限公司); 实验中所需的寡核苷酸序列均由北京奥科生物技术有限公司合成.

### 1.2 实验方法

(1) RNA 干扰序列的设计及双链合成. shRNA 表达载体的构建: 参考 NCBI 公布的小鼠 *BMP4*

mRNA 序列(NM\_0075540), 利用网上在线软件设计针对该基因的干扰序列(<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext>). 依据 Yuan 等人<sup>[13]</sup>的方法设计合成茎环结构的寡核苷酸单链, 在两条配对单链的 5'端分别加入 *Bam*H I, *Hind*III 酶切位点, Loop 环序列为 TTCAA-GAGA. 依据本研究小组在不同细胞水平的筛选结果(结果未发表), 选择干扰效率在 70%以上的干扰序列(方向 5'→3', 5#: UCCCAAGAAUCAUGGACUG)制备转基因小鼠. 寡核苷酸单链体外退火后电泳检测, 正确退火的双链在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶的作用下与 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切后回收的 pEGFP-K14 载体片段连接(图 1).

(2) 原核显微注射用 DNA 的准备. 利用去内毒素的质粒提取试剂盒大量提取构建好的重组质粒 pEGFP-K14-shRNA, *Ap*I 和 *Sph* I 酶切线性化质粒后回收纯化得到 3853 bp 片段, 溶于新鲜配制的 TE 中. 测定紫外分光光度计在波长 260 nm 下测定吸光度(A 值)及浓度. 回收的 DNA 的 A 值在 1.8~2.0 之间, 且条带单一, 无降解. 调整 DNA 浓度为 2 ng/ $\mu$ L 注射小鼠受精卵雄原核, 并移植入同期发情的假孕母鼠输卵管中, 制备转基因小鼠.

(3) 转基因小鼠的鉴定. 4 周龄小鼠用耳缺钳在小鼠的耳朵上打号, 取少许尾巴, 酚/仿抽提法提取小鼠基因组 DNA. 以提取好的基因组为模板, 利用注射片段设计引物(F: 5'-GTCTCTAACAGCGGGTCA-3'; R: 5'-TTGTGGCCGTTTACGTC-3'), 非转基因的野生型小鼠基因组为阴性对照, 载体 pEGFP-K14-shRNA 作为阳性对照进行 PCR 扩增反应, 筛选阳性小鼠, 阳性小鼠的扩增片段为 592 bp.

(4) Southern 杂交. 由于设计的引物只扩增了注射片段的一部分, 且存在 PCR 假阳性等问题, 为排除 PCR 筛选出的假阳性小鼠, 明确插入片段的完整性和正确性, 对转基因小鼠进行 Southern 杂交检测. 选择 *Ase* I 和 *Dra* I 酶切基因组及 pEGFP-K14-shRNA 质粒,

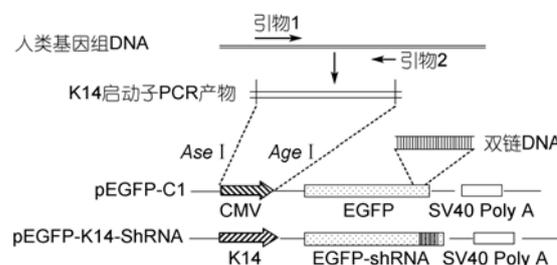


图 1 载体构建示意图

回收后目的片段大小为 2.8 kb. 选择野生型小鼠中没有的 *GFP* 基因序列, 设计引物(F: 5'-AAAGCACTC-GCATCC-3'; R: 5'-GATCGCGCTTCTCGTTGG-3')利用 PCR 的方法扩增并标记探针, 探针扩增片段大小为 715 bp. Southern 杂交具体操作方法参考 Roche 的试剂盒说明.

(5) Northern 杂交. 采用 Trizol 法提取小鼠组织总 RNA, 在含 8 mol/L 尿素的 12%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转入带正电的尼龙膜, 紫外交联固定后锡箔纸包裹, 4°C 保存备用. 探针是与待检测的 siRNA 序列和内参 U6 基因互补的 DNA 序列(5#: 5'-CAGTCCATGATTCTTGGGA; U6: ATTTGCGTGT-CATCCTTGCG-3'). 20 μL 探针标记体系中同时加入浓度为 25 pmol/L 目的 siRNA 探针和内参 U6 基因的探针, 在 PNK 酶的作用下将 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  标记到探针的 5'末端, 37°C 水浴 1 h, 98°C 变性 5 min, 迅速置于冰上, 使标记好的探针保持单链状态. 在 10×Denhardt's, 6×SSC 和 0.1%SDS 条件下, 65°C 预杂交 1 h; 弃去预杂交液, 在预杂交液的基础上加入新鲜标记的探针 20 μL, 25°C 杂交过夜(大于 8 h). 杂交结束后, 倒掉杂交液, 加入洗膜液(6×SSC, 0.1%SDS)漂洗 3 次, 前 2 次在室温下进行, 每次 10 min, 第 3 次 42°C, 洗膜 5 min. 洗完膜后用保鲜膜包裹放入磷屏曝光. 12~24 h 后, 检测曝光信号.

## 2 结果

### 2.1 真核表达载体的构建

设计合成的针对小鼠 *BMP4* 基因的有效干扰序列, 在退火缓冲液的作用下退火配对成双链(图 2(A)), 与 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切后的 pEGFP-K14 载体连接, PCR 鉴定正确插入双链的阳性克隆扩增片段大小为 250 bp(图 2(B)), 经测序验证表明外源片段的插入方向和大小正确, 与参考序列相比未发现变异, 得到 pEGFP-K14-shRNA. 利用去内毒素的中提试剂盒提取重组质粒, 限制性内切酶 *Apa*L I 和 *Sph* I 在 37°C 条件下反应 12 h 后经 0.8%的琼脂糖凝胶电泳分离(图 2(C))回收目的片段, 大小为 3853 bp, 回收产物 TE 溶解经紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测,  $A_{260/280}$  为 1.9, 回收目的片段大小正确且无降解, 4°C 保存备用.

### 2.2 转基因小鼠的检测

(1) PCR 筛选结果. 为筛选出有外源片段插入的转基因阳性小鼠, 需要用 PCR 方法进行初步鉴定. 取 4 周龄小鼠用耳缺钳在小鼠的耳朵上打号, 剪少许尾巴, 提取组织样 DNA. 以提取的基因组为模板, 注射片段的序列设计引物, 以普通小鼠基因组作为阴性对照(control), 载体 pEGFP-K14 作为阳性对照

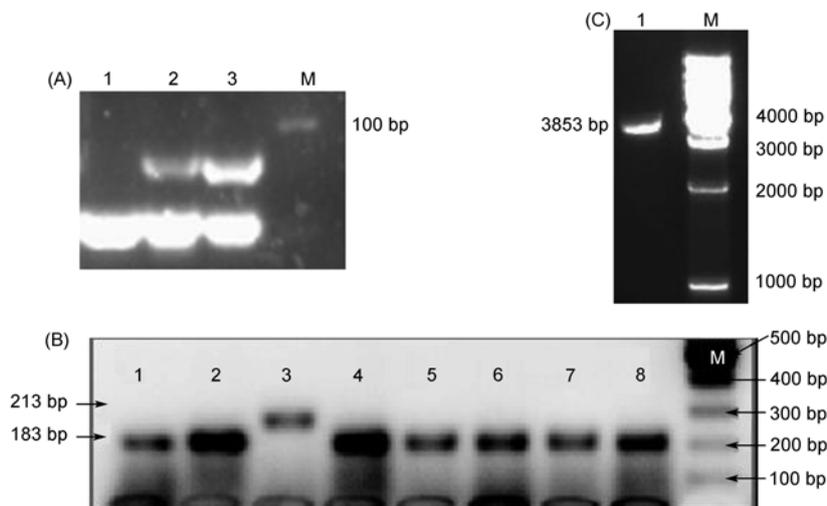


图 2 琼脂糖凝胶检测图

(A) 体外退火双链 DNA 检测. 泳道 1: 单链 DNA; 泳道 2 和 3: 双链 DNA; (B) 双链 DNA 插入检测. 泳道 3: 阳性克隆; (C) 转基因小鼠注射用片段. 泳道 1: 酶切后注射后片段. M: Marker

进行 PCR 扩增反应, 片段大小为 592 bp 片段. 从图 3 中可以看出, 泳道 3 和 6 与阳性质粒对照的扩增片段大小相同, 为转基因阳性小鼠. 通过显微注射得到的 F<sub>0</sub> 代转基因小鼠 92 只, 其中阳性 17 只, 阳性率为 18.48%. 将阳性小鼠与野生型小鼠交配, 获得的 393 只 F<sub>1</sub> 代个体经 PCR 检测确定其中 188 只为转基因阳性小鼠, 平均阳性率为 48%. F<sub>1</sub> 代的阳性小鼠再与野生型小鼠交配得到 F<sub>2</sub> 代, F<sub>2</sub> 代中仍能通过 PCR 确定有外源基因插入的阳性小鼠. 结果表明, 插入的外源片段可遗传给后代.

(2) 转基因小鼠 Southern 鉴定. ① 探针标记: 选择 Roche 的 PCR 标记地高辛的试剂盒, 通过 PCR 反应将地高辛标记的 dUTP 掺入到 PCR 产物中. 以重组质粒为模板扩增探针, 片段大小为 715 bp. PCR 扩增条件为模板 20 pg, 退火温度 55.5°C, 因标记后的探针有 DIG 的掺入故其分子量比相同条件下用普通 dNTP 扩增的产物分子量要大一些. 图 4 中泳道 2 为标记 DIG 的 PCR 产物, 与泳道 1 的未加地高辛的普通 PCR 相比分子量要大. 表明探针已经掺有 DIG, 标记成功; ② 基因组及质粒的酶切: 为了将基因组切割成大小合适的片段, 必须选择合适的内切酶进行切割. 常选择两个不同的内切酶组合切割基因组, 其中一个酶负责将基因组切成大小合适的片段, 不能把基因组切得太碎, 也不能将基因片段切得太大, 影响后续实验. 因此本实验选择可以将基因组切成片段大小平均为 2 kb 的 *Dra* I 酶, 其主要负责将基因组切割成大小合适的片段, 而 *Apa* I 与之组合使用得到的酶切片段在注射用片段内, 大小为 2985 bp; ③ Southern 杂交: 为确定外源片段是否整合入 PCR 鉴定的阳性小鼠基因组中, 利用特异的 DIG 标记的探针与酶切后的小鼠基因组杂交. 在图 5 中, 与质粒酶切的阳性对照相比, 8 号阴性对照小鼠, 没有目的条带的杂交信号; 检测的 7 个转基因小鼠中, 均表现出杂交阳性信号, 与 PCR 鉴定的结果相同. 选择泳道 4, 5 和 7 的小鼠传代留种.

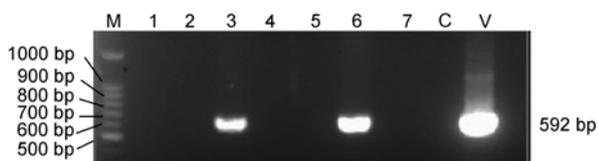


图 3 转基因小鼠 PCR 鉴定

M: DNA 分子量标记; 泳道 1~7: 转基因小鼠; C: 野生型小鼠;  
V: 质粒 pEGFP-K14-shRNA

(3) Northern 杂交. 本实验旨在制备在特定组织高效表达 siRNA 的转基因小鼠, 为了检测 siRNA 是否在皮肤组织高效表达, 选择 Northern 杂交分析小鼠体内各组织中 siRNA 的表达. 取小鼠各组织器官的总 RNA 各 15 μg 上样电泳, U6 为持家基因, 合成的干扰序列为阳性对照, 经转膜、固定及杂交等操作程序后检测小 RNA 的表达情况. 阳性小鼠(5# F<sub>0</sub>84-F<sub>1</sub>43 ♂)与阴性小鼠(5# F<sub>0</sub>84-F<sub>1</sub>41 ♂)都是以 5# 干扰序列制备的 84 号转基因小鼠的后代. 由图 6 可见, 在阳性小鼠(F<sub>0</sub>84-F<sub>1</sub>43 ♂)中, 皮肤、脾、肺和肠中都有小 RNA 的表达, 但在皮肤中的表达量最高. 而在阴性小鼠(F<sub>0</sub>84-F<sub>1</sub>41 ♂)中没有检测到外源转入的小 RNA 的表

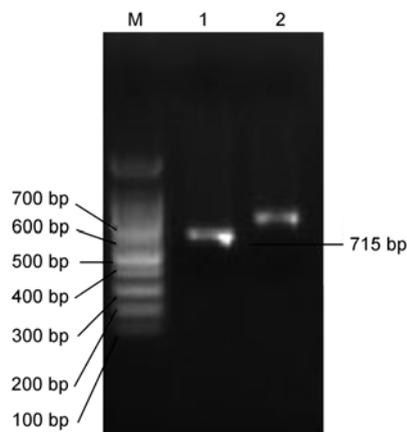


图 4 探针标记

泳道 1: 阴性对照; 泳道 2: 标记后的探针; M: DNA 分子量标记

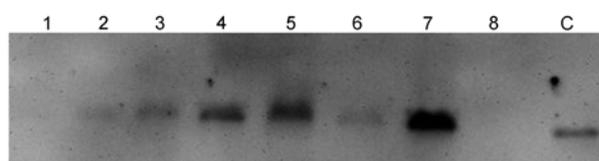


图 5 转基因小鼠 Southern 杂交

泳道 1~7: 转基因小鼠; 泳道 8: 野生型小鼠; C: 阳性质粒对照

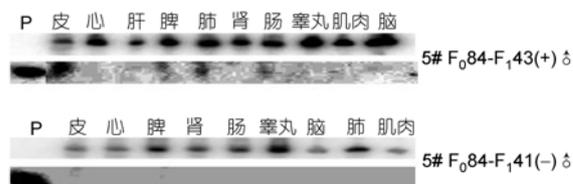


图 6 Northern 杂交结果

5# F084-F143 ♂: 阳性转基因小鼠; 5# F084-F141 ♂: 阴性转基因小鼠. P: 阳性质粒对照

达. 实验结果表明, 成功构建了在特异组织中高效表达特定基因的 siRNA 转基因小鼠, 从而证明实验方法可行, 为制备 RNAi 转基因大家畜提供了一个有效的参考方法.

### 3 讨论

RNAi 是继基因敲除技术后的另一种用于基因功能研究、疾病的干预治疗等研究的强有力的基因操作工具. *BMP4* 基因是影响皮肤和毛囊发育的一个关键候选功能基因, 在胚胎期毛囊形成和出生后毛囊周期循环过程的毛球间质细胞和表皮里广泛表达. 过表达 *BMP4* 基因的拮抗物 *noggin*<sup>[14,15]</sup> 的转基因小鼠, 毛发生长异常且形态发生改变. 利用 *K14* 启动子驱动 Cre 酶在皮肤特异表达的转基因小鼠制备条件性敲除 *BMP4* 受体 *BMPRII* 基因的小鼠, 其皮肤的内毛根鞘和毛干形态都发生很大的改变<sup>[16]</sup>. 毛的外部形态主要是由毛囊的类型决定的, 由于信号通路或基因表达异常导致毛囊类型发生改变, 因此使小鼠的皮毛形态发生改变. 这些都证明 *BMP4* 基因在不同毛囊类型的发育过程中发挥重要的作用. 本研究以干扰小鼠皮肤或毛囊中 *BMP4* 基因为研究对象, 成功地建立了能够在小鼠皮肤组织中持续干扰 *BMP4* 基因的转基因小鼠模型. 结果显示, 转基因小鼠能够稳定地表达小干扰 RNA (Northern 结果), 且 siRNA 在皮肤组织里高效表达, 在其他的组织器官(脾、肺和肠)中也有弱表达, 这与 *K14* 启动子的特性有关. 有研究表明, *K14* 启动子可在肝、肾、脑、舌、皮肤及其附属器官等组织中广泛表达<sup>[17]</sup>, 但在皮肤及其附属器官中的表达量最高, 因而该启动子被广泛用于探讨基因在皮肤

组织中功能的研究<sup>[18-20]</sup>.

本实验构建了持续表达 siRNA 的 pol II 型启动子驱动的表达载体, 同时建立了转基因小鼠模型, 并成功地将两者结合, 使其按照实验所设想的思路发挥沉默作用. 目前, 常用于表达 siRNA 的方法分为化学合成法和 DNA 载体介导体内转录 shRNA 法. 由于载体介导的方法较化学合成法作用时间长、价格低廉、技术和环境的要求不高, 因而被广泛采用. 载体介导在体内转录 shRNA 法常用的 Pol III 型启动子 U6/H1 无法实现特定组织高表达 siRNA. 为了能将 RNAi 方法应用于特定组织中某基因的功能研究, 有研究探讨利用 pol II 启动子实现组织特异表达 siRNA 的方法, 包括 Cre/LoxP 系统的运用<sup>[21-23]</sup>、融合转录本表达小干扰 RNA、基于 microRNA 前体结构<sup>[24,25]</sup> 的干扰载体的构建等. *K14* 启动子是一个典型的 pol II 型启动子. 袁圆阳等人<sup>[26]</sup> 利用 *K14* 启动子制备了 *Pygo2* 转基因小鼠, 免疫组化结果表明, 外源基因在皮肤和乳腺组织中过量表达. 任红艳等人<sup>[27]</sup> 培育了由 *K14* 启动子驱动 *c-Myc* 基因在皮肤表皮细胞里过表达的转基因小鼠.

基于本实验室前期研究基础与国际研究背景, 选取在上皮基底层细胞高表达的 *K14* 启动子驱动小干扰 RNA 在小鼠体内表达. 结果表明, 利用 pol II 型的 *K14* 启动子可以通过融合转录本的形式驱动外源 shRNA 在动物皮肤组织高表达 siRNA, 这在转基因家畜中实现组织特异 RNAi 提供了一个切实可行的参考方法.

目前, 本实验室正在分析统计小鼠皮肤相关表型性状, 并测试小鼠传代多次后干扰效率的遗传稳定性, 期待为研究皮肤相关的功能基因与治疗皮肤相关的疾病提供基础研究数据.

**致谢** 感谢中国农业大学农业生物技术国家重点实验室李宁教授、胡晓湘、郭英、费菁、刘炜玮、童佳、张云生、伊娜、成刚、陈敏、张宏、李淑芝、贾春霞、胡石丽等对本文的帮助、新疆农垦科学院石国庆研究员、周平副研究员、北京济普霖生物技术有限公司郑敏、王美丽、赵蕊对本实验的技术支持.

### 参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 906-811
- 2 曹明媚, 任浩, 赵平, 等. 小干扰 RNA 对庚型肝炎病毒基因在人 Huh-7 细胞中表达抑制作用. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2004, 34: 343-349
- 3 Sui G C, Soohoo C, Affar E B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 2002, 99: 5515–5520
- 4 王丰, 马家烈, 李惠明, 等. 靶向 E2F1 的 shRNA 抑制眼内视网膜细胞瘤生长. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36: 587–591
  - 5 姜颜坤, 罗娟, 代蓉, 等. 小鼠肌肉生长抑制素基因短发夹 RNA 促进 MyoD 在 C2C12 细胞中表达. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37: 451–459
  - 6 Boden D, Pusch O, Lee F, et al. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. Nucleic Acids Res. 2003, 31: 5033–5038
  - 7 Tiscornia G, Tergaonkar V, Galimi F, et al. CRE recombinase-inducible RNA interference mediated by lentiviral vectors. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 7347–7351
  - 8 Ventura A, Meissner A, Dillon C P, et al. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 10380–10385
  - 9 Hutvágner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. Science, 2002, 297: 2056–2060
  - 10 Zhou H, Xia X G, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. Nucleic Acids Res, 2005, 33: e62
  - 11 Rao M K, Pham J, Imam J S, et al. Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. Genes Dev, 2006, 20: 147–152
  - 12 Ling X, Li F Z. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. Biotechniques, 2004, 36: 450–458
  - 13 Yuan J, Wang X B, Zhang Y, et al. shRNA transcribed by RNA Pol II promoter induce RNA interference in mammalian cell. Mol Biol Rep, 2006, 33: 43–49
  - 14 Sharov A A, Weiner L, Sharova T Y, et al. Noggin overexpression inhibits eyelid opening by altering epidermal apoptosis and differentiation. EMBO J, 2003, 22: 2992–3003
  - 15 Botchkarev A V, Sharov A A, Funa K, et al. Modulation of BMP signaling by noggin is required for induction of the secondary (nonylotoch) hair follicle. J Invest Dermatol, 2002, 118: 3–10
  - 16 Andl T, Ahn K, Kairo A, et al. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. Development, 2004, 131: 2257–2268
  - 17 Vassar R, Rosenberg M, Ross S, et al. Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 1563–1567
  - 18 Seyed J H, Alireza Z, Razieh J, et al. A study of the expression of functional human coagulation factor IX in keratinocytes using a nonviral vector regulated by K14 promoter. Appl Biochem Biotech, 2010, 162: 1599–1611
  - 19 Purva S, Chen C, Sonali P G, et al. Loss of integrin  $\alpha 9 \beta 1$  results in defects in proliferation, causing poor re-epithelialization during cutaneous wound healing. J Invest Dermatol, 2009, 129: 217–228
  - 20 Wang X M, Sandra Z, Kenneth P, et al. Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 219–226
  - 21 Vivi K, Makoto M, Kazunari T, et al. Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. Nucleic Acids Res, 2004, 32: e66
  - 22 李福兵, 杜晓兰, 余英, 等. 骨形成蛋白 4 条件性 RNA 干扰小鼠的建立. 遗传, 2008, 30: 341–346
  - 23 Andrea V, Alexander M, Christopher P D, et al. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 10380–10385
  - 24 Frank S, Guang H, Richard J R, et al. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 13212–13217
  - 25 叶梅霞, 刘军梅, 李昊, 等. amiRNAi-实现高效稳定的特异基因沉默新方法. 中国生物工程杂志, 2010, 30: 118–125
  - 26 袁圆阳, 骆启聪, 李超, 等. Pygo2 转基因小鼠模型的建立及表形的初步分析. 厦门大学学报(自然科学版), 2010, 49: 266–271
  - 27 任红艳, 张兴举, 杨述林, 等. c-Myc 转基因小鼠构建的改良方法. 农业生物技术学报, 2008, 16: 37–40

## Tissue-Specific RNAi Expression in Transgenic Mice

DAI Rong<sup>1,2</sup>, SHEN SiJun<sup>1</sup>, GAN ShangQuan<sup>2</sup>, MAO QingQing<sup>3</sup>, WAN PengCheng<sup>2</sup>,  
GUO Hong<sup>1</sup>, MENG QingYong<sup>4</sup> & LIU ShouRen<sup>2</sup>

*1 College Animal Science & Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China;*

*2 Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China;*

*3 College Animal Science & Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China;*

*4 State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China*

Small interfering RNAs are short, double-stranded RNA molecules that can target mRNAs with complementary sequences for degradation. As a method for silencing of gene expression, RNAi is more simple and convenient compared with gene targeting. RNAi has been applied universally in research on gene function, treatment of disease and vaccine production. Accumulating evidence suggests that the Pol II promoter can be applied to RNAi. In this research, the human keratin 14 (K14) gene promoter was used to drive eGFP-shRNA fusion expression in order to interfere with BMP4 expression in skin. Transgenic mice were produced by the method of pronuclear microinjection and identified by PCR screening and Southern blotting. PCR and Southern blotting experiments show that the foreign gene was integrated in the genome of the transgenic mice. Northern blotting detected siRNA expression in lungs, intestines and skin, with the highest siRNA expression level found in skin. Our results demonstrate that *in vivo* siRNA expression driven by Pol II promoter fusion constructs is feasible. This method may provide a novel approach for the application of RNAi technology in suppressing gene expression for the analysis of gene function in skin and also for skin appendage development in livestock. In addition, it provides further data advancing progress of the use of pol II promoters in combination with RNAi.

**transgenic mouse, RNAi, tissue-specific**

doi: 10.1360/052011-100