

dsRNA 对家蚕核多角体病毒(BmNPV)复制的抑制作用

徐 颖 朱成钢 金勇丰 张耀洲 *

(浙江大学生物化学研究所, 杭州 310029; 浙江理工大学生物化学研究所, 杭州 310018.

* 联系人, E-mail: yaozhou@chinagene.com)

摘要 以 BmNPV 复制必需的 DNA 解旋酶基因和 DNA 聚合酶基因为靶序列, 人工设计并合成了长度分别为 435(A_{p1}), 300(A_{p2})和 399 bp(A_H)的 dsRNAs, 利用 TransMessenger™ Transfection Reagent 转染家蚕细胞, 研究其对 BmNPV 复制的抑制效果. 结果表明, 在野生型病毒 BmNPV 感染家蚕细胞实验中, A_{p2} 和 A_H 这 2 个 dsRNA 能够有效地抑制病毒 DNA 的复制, 并且在转染 dsRNA 后第 4 天抑制效果最佳, 它们使病毒滴度(PFU/mL 值)降低了 $10^3 \sim 10^4$, 而另外的 dsRNA(A_{p1})没有明显的抑制效果. RT-PCR 和 DNA 斑点杂交也证实了 2 种目的基因的表达水平和病毒 DNA 的量发生了明显的下调. 此外, 用荧光显微镜观察 dsRNA 在细胞内的定位, 发现在转染 24 h 后 dsRNA 开始在细胞核的周围呈不连续的聚集状态.

关键词 BmNPV RNAi dsRNA 复制 抑制

家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)属于杆状病毒科包涵体亚科多角体病毒属单粒包埋型亚属. 由于 BmNPV 引起的脓病是很常见的蚕病, 常常引起蚕业上很大的经济损失. 因此, 有效的防治 BmNPV 引起的蚕病是一个急需解决的重要课题. 在宿主昆虫细胞内, 病毒基因的表达及病毒 DNA 的复制是在一种有序的级联事件中发生的. BmNPV 的感染过程依赖于其上上百个基因的阶段性调节和依次表达. 病毒基因转录的阶段性特征以及基因表达的级联调控主要是在转录水平上进行的, 即前一阶段的基因产物直接或间接的反式作用于下一阶段的基因转录. BmNPV 的 DNA 聚合酶(polymerase)基因和 DNA 解旋酶(DNA helicase)基因是病毒 DNA 复制所必需的基因, 它属于早期表达的基因, 它们的表达不需要其他基因产物的存在. 如果抑制和破坏了这 2 个基因的表达, 理论上就能抑制病毒 DNA 的复制, 从而可以抑制 BmNPV 的繁殖.

RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是一种序列特异性地降解靶 mRNA 的基因调节机制, 它普遍存在于植物、真菌、果蝇、线虫及哺乳动物细胞内^[1,2]. RNAi 由外源导入或者转基因, 病毒感染等各种方式引入的双链 RNA(dsRNA)所引发, 在细胞内被一个称为 Dicer 的酶, 以一种 ATP 依赖的方式逐步切割成 21~23 核苷酸长的小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)^[3~5], 随后 siRNA 与一个核酶复合物结合, 形成 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing com-

plex, RISC), 激活的 RISC 通过碱基配对定位到同源 mRNA 上, 并在距离 siRNA 3' 端 12 个碱基 的位置切割 mRNA^[6~8], 从而抑制基因的表达. 由于 RNAi 是在转录后水平发生的, 因而我们通常也称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS).

RNA 介导的基因沉默为抑制病毒复制提供了一个潜在的有力的工具, 通过设计合成针对病毒复制所必需基因的 dsRNA 或 siRNA, 使靶基因发生基因沉默, 理论上可以有效的抑制病毒的复制. 由于目前没有满意的 dsRNA 或 siRNA 的设计原则, 而且实验过程中存在许多不可预计的因素, 因此, 我们希望通过研究 dsRNA 对 BmNPV 的抑制效果, 建立起一个抗病毒模型, 它将为以后在抗植物病毒和治疗人类病毒性疾病方面进行的研究提供实验依据和技术支持. 同时 dsRNA 抗 BmNPV 的可行性将解决传统蚕业经济中所面临的困境.

1 材料与方法

() 材料. 家蚕细胞 Bm-N 及野生型 BmNPV 为本实验室保存; 体外转录合成 dsRNA 试剂盒 MEGAScript™ RNAi Kit 购于 Ambion 公司; 转染试剂 TransMessenger™ Transfection Reagent 购于 QIAGEN 公司; 荧光素标记试剂盒 Silencer™ siRNA Labeling Kit-FAM 购于 Ambion 公司; TC-100 培养基购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物制品工程公司; DIG DNA Labeling and Detection Kit 购于 Boehringer Mannheim 公司; 总 RNA 提取试剂盒

(Total RNA Isolation System)、AMV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶、Oligo(dT)15 Primers 均为 Promega 公司产品。引物合成由上海博亚生物技术有限公司合成。此外,还有 OLYMPUS BX-51 型荧光显微镜(含 U-MWU2 和 U-MWB2 两种激发块,并配有显微成像系统 CCD 和图像分析软件);BIORAD 公司的凝胶成像系统 Versa DocTM Model 3000;流式细胞仪 (EPICS, Coulter 美国)。

() dsRNA 的设计与合成。根据 GenBank 中 BmNPV DNA 解旋酶和 DNA 聚合酶^[9]的基因序列,选取不同的靶位点,设计合成引物 P₁₋₆,旨在通过 PCR 的方法扩增出 3 个长度分别 435, 300 和 399 bp 的片段。其中每条引物的 5'端均引入 18 bp 长的 T7 启动子序列,通过 MEGAScriptTM RNAi Kit 试剂盒经体外转录、核酶消化、纯化、洗脱等步骤(具体操作按照试剂盒所附的说明书进行)合成 3 条 dsRNA,即 A_{P1}, A_{P2} 和 A_H。引物设计如下:

片段 A_{P1}(针对 DNA 聚合酶起始密码子下游第 2455~2890 位设计的 dsRNA):

P₁(正向): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGGT-CCGTCACCCAAA-3';

P₂(反向): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAC-AACCATCGTCAT-3';

片段 A_{P2}(针对 DNA 聚合酶起始密码子下游第 1~300 位设计的 dsRNA):

P₃(正向): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGATG-AAAATATATTCT-3';

P₄(反向): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAT-TTCCTTCCACGCC-3';

片段 A_H(针对 DNA 解旋酶起始密码子下游第 1~399 位设计的 dsRNA):

P₅(正向): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAT-GATTGACAACATT-3';

P₆(反向): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTG-TTAATGTATCCAG-3'。

() 细胞培养和转染。家蚕细胞 BmN 用 TC-100 培养液(含 10%胎牛血清)在 27 °C 下贴壁培养,取对数生长期细胞(传代次数 < 50),接种于 24 孔板,细胞密度控制在 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/孔。培养 24 h 以上,以确保细胞处于最好的生长状态,且细胞密度在 50%~80%。无血清转染按 TransMessengerTM Transfection Reagent 的说明书进行。dsRNA 与 TransMessenger Reagent 的比例($\mu\text{g} : \mu\text{L}$)为 1 : 4。

() 病毒滴度的测定。无血清转染 dsRNA 4 h 后将 24 孔板内的培养液吸去再加入 500 μL (含 10%胎牛血清)的 TC-100 培养液,同时在每孔内加入 5 μL 的 BmNPV 病毒原液(MOI = 10)。每隔 24 h 取孔内的细胞液,用 96 孔板进行病毒滴度的测定。按 $10^{-1} \rightarrow 10^{-12}$ 梯度稀释,每个梯度 8 个重复感染家蚕细胞,每孔 20 μL , 27 °C 连续观察 5~7 d,至不再有病变为止。用 Read & Muench 法计算 50%保护终点(TCID₅₀/mL),再换算成 PFU/mL(PFU/mL = TCID₅₀/mL $\times 0.69$)。

() RT-PCR 检测。将 5 个 24 孔板内处于对数生长期的家蚕细胞 BmN(1×10^5 个/孔)用 TransMessengerTM Transfection Reagent 分别无血清转染不同用量(0.5, 1, 2, 4 μg /孔)的 A_{P2} 和 A_H, 每组 12 个孔,4 h 后倾倒培养液再分别在每孔中加入 0.5 mL(含 10%胎牛血清)的 TC-100 培养液和 5 μL BmNPV 病毒原液(MOI = 10)。24 h 后收集每孔的细胞用 Total RNA Isolation System 提取总 RNA。并采用分光光度法测定提取的总 RNA 含量及纯度。cDNA 的合成采用 10 μL 逆转录反应体系:含 RNA 模板 1 μg , AMV 15 U, RNA 酶抑制剂 20 U, Oligo(dT)(15Primer) 50 mg/L 及适量 dNTP(10 mmol/L)、5 $\times$ RT 缓冲液,42 °C 反应 1 h; 95 °C 灭活 AMV 5 min。PCR 扩增引物为 A_{P2} 和 A_H(只是去除了 18 bp 的 T7 启动子序列),内参对照的引物设计参见 GenBank. *actin* A3: (正向)5'-GAAGAT-GACCCAGATCA-3'; (反向)5'-CCACGT-CGCACTT-CATG-3'。PCR 反应体系(50 μL): cDNA 5 μL , 4 $\times$ dNTP (2 mmol/L) 4 μL , 4 种引物各 1 μL , Taq 酶 1 μL , 10 $\times$ 缓冲液 4 μL , Mg²⁺ 4 μL , 用 ddH₂O 补至 50 μL 。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环; 72 °C 保温 10 min。PCR 扩增结束后,取 8 μL 样品用 2%琼脂糖凝胶电泳,并用凝胶成像系统进行定量分析和统计学处理。

() DNA 斑点杂交鉴定。将 2 个细胞瓶内的家蚕细胞 BmN(密度为 1×10^5 细胞/mL)用 TransMessengerTM Transfection Reagent 分别无血清转染 A_{P2} 和 A_H, 4 h 后倾倒培养液再分别在每瓶中加入 5 mL(含 10%胎牛血清)的 TC-100 培养液和 20 μL BmNPV 病毒原液(MOI = 10)。待第 4 天细胞变圆后收集细胞,提取胞内总 DNA,具体操作按 Promega 公司的基因组 DNA 提取和纯化试剂盒中所附的说明书进行。将提取出来的 DNA 样品分别点在尼龙膜上,每孔加样量均为 0.4 μg 。用 DIG 标记先前的 PCR 扩增产物,然后

进行杂交、洗膜和免疫显色,具体的操作步骤都按试剂盒所提供的说明书进行。

() 转染试剂的细胞毒性检测(MTT 法). 在 24 孔板内接种 BmN, 每孔 1×10^5 个, 27 下贴壁培养 24 h 后, 弃原培养液, 加入新鲜的无血清 TC-100 培养液. 然后每孔加入不同体积的 TransMessenger Reagent(2, 4, 8, 16, 32 和 64 μL), 每个梯度做 3 个复孔. 培养 4 h 后, 每孔加 MTT 溶液 60 μL (50 $\mu\text{g/L}$), 继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加二甲基亚砜 400 μL , 酶联免疫测定 490 nm 处各孔的吸光度(A), 以无血清培养基为空白对照, 取平均值, 并计算细胞存活率(%) = (实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) $\times 100\%$

() 荧光素标记的 dsRNA 的细胞摄入和胞内分布. 利用 Ambion 公司的 SilencerTM siRNA Labeling Kit-FAM 对 A_{P1} , A_{P2} 和 A_H 进行荧光素 FAM 标记, 具体操作按照试剂盒所附的说明书进行. 将标记好了的 dsRNA 用上述方法转染 24 孔板内的 BmN, 取 6 h 后的上述各组细胞 1×10^5 个, PBS 冲洗 5 次后荧光显微镜下观察无游离荧光, 用流式细胞仪上机检测 dsRNA 的细胞摄入率及胞内平均荧光强度. 将标记好了的 A_{P2} 和 A_H 用上述方法无血清转染 24 孔板内的 BmN, 然后在不同时间后用 1 mg/mL 的 DAPI(对 DNA 特异的荧光染料)对 BmN 进行负染, 孵育 15 min 后用 PBS 洗细胞 5 次, 将孔板中的细胞吹下制成细胞涂片, 在荧光显微镜下观察.

2 结果

2.1 dsRNA 对 BmNPV 的抑制作用

根据在靶 mRNA 的编码区内选择 dsRNA, 使其 (G+C) 含量在 45%~60%. 通过 BLAST 比对, 确保所选序列与其他非相关基因没有同源性, 设计并用 MEGAScriptTM RNAi Kit 体外转录合成的 3 个 dsRNA 片段, 经分光光度计测定其浓度分别为: A_{P1} , 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; A_{P2} , 1.67 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; A_H , 1.36 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. 为了研究不同浓度的 dsRNA 在转染后的不同时间内对 BmNPV 复制抑制效果的差别, 我们做了几个梯度(0.5, 1, 2 和 4 $\mu\text{g}/\text{孔}$)的 dsRNA, 在感染 BmNPV 后每隔 24 h 进行病毒滴度的测定, 然后取 PFU/mL 的对数值为纵坐标, 转染时间为横坐标作图(图 1). 从图中可以看出, A_{P1} 没有明显抑制病毒复制的效果, 而 A_{P2} 和 A_H 对 BmNPV 有较明显的抑制作用, 并且在一定范围内呈

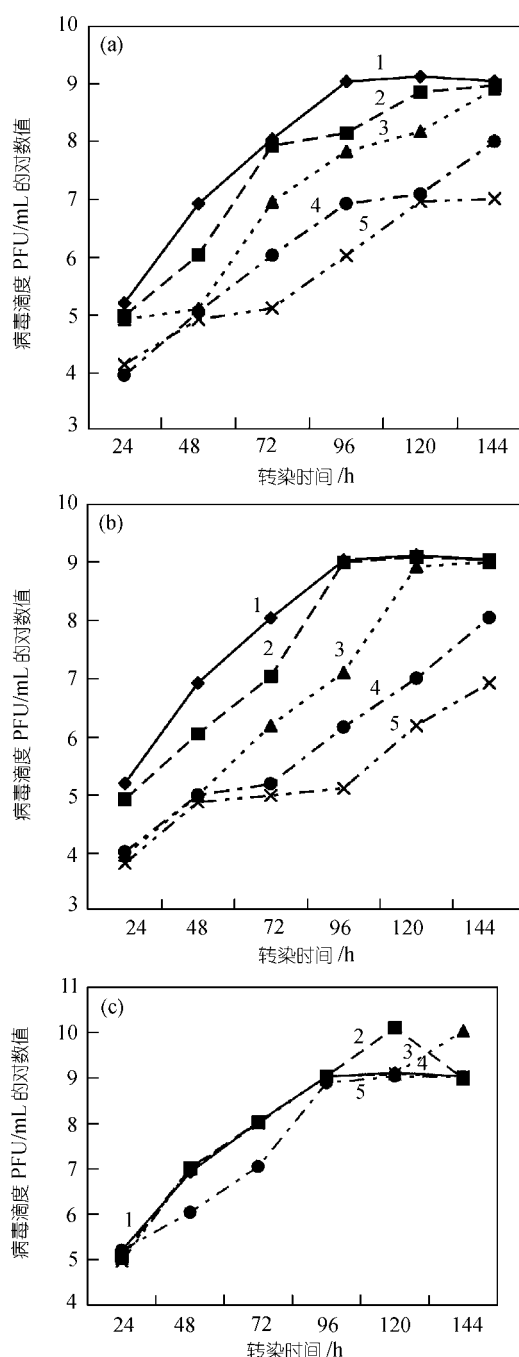


图 1 不同用量的 dsRNA 在转染后不同时间里对病毒滴度的影响

(a) 转染了 A_{P2} ; (b) 转染了 A_H ; (c) 转染了 A_{P1} . 1 示没有转染 dsRNA 的家蚕细胞受 BmNPV 感染后病毒滴度的变化曲线; 2 示 0.5 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 转染 dsRNA 的家蚕细胞受 BmNPV 感染后病毒滴度的变化曲线; 3 示 1 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 转染 dsRNA 的家蚕细胞受 BmNPV 感染后病毒滴度的变化曲线; 4 示 2 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 转染 dsRNA 的家蚕细胞受 BmNPV 感染后病毒滴度的变化曲线; 5 示 4 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 转染 dsRNA 的家蚕细胞受 BmNPV 感染后病毒滴度的变化曲线

浓度依赖性关系, 浓度越高抑制效果越显著. 但过高的浓度(如 $4 \mu\text{g}/\text{孔}$)时, 其抑制作用反而有所减弱. 另外, 由图中的曲线(以浓度为 $2 \mu\text{g}/\text{孔}$ 为例)我们可以看到在转染后第4天, 2种 dsRNA(A_{p2} 和 A_H)的抑制作用皆达到最高峰, 病毒滴度分别下降了 10^3 和 $10^{3.8}$, 而在第5和第6天 BmNPV 的病毒滴度又开始回升, 病毒滴度只降低了 10^2 左右.

2.2 RT-PCR 鉴定目的基因的表达水平

分光光度测定所提总 RNA, $A_{260}/A_{280} > 1.8$. 从图 2 的电泳条带可以看出, 利用 RT-PCR 分别得到 DNA 聚合酶基因(300 bp)、DNA 解旋酶基因(399 bp)及 *actin A3*(512 bp)产物. 同一批反应的不同样本, 在扩增模板量相同的情况下, DNA 聚合酶基因和解旋酶基因在不同用量的 dsRNA 作用下表达水平明显不同, 而作为内对照的 *actin A3* 表达却基本相同. 扩增产物以凝胶成像系统进行定量分析, 用目的基因/*actin A3* 的灰度比值来分别表示两种目的基因的相对表达水平, 并用统计学进行处理. 我们可以看到, dsRNA 的用量为 $2 \mu\text{g}/\text{孔}$ 时, 2 种目的基因(DNA 聚合酶基因和解旋酶基因)的表达水平下调了 78.27% 和 86.70%, 而其他用量时目的基因的表达水平只有略微的变化.

2.3 DNA 斑点杂交结果

将有抑制效果的 2 个 dsRNA(A_{p2} 和 A_H)进行 DNA 斑点杂交鉴定, 由图 3 所示, 作为阳性对照的正常家蚕细胞 BmN 的胞内总 DNA 无杂交信号, 而分别转染

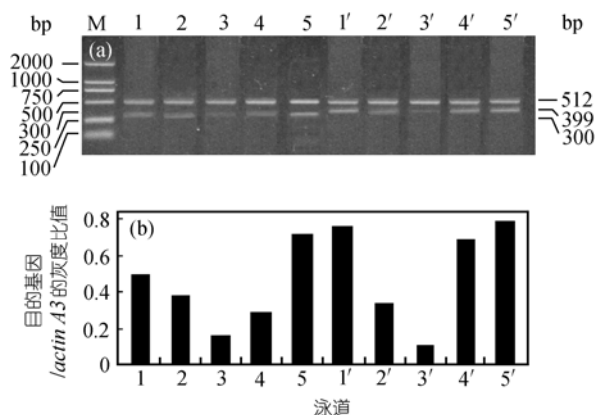


图 2 RT-PCR 鉴定目的基因表达水平

(a) RT-PCR 结果; (b) 凝胶成像系统定量目的基因的表达水平. M 示分子量标准; 1~4 示鉴定的 DNA 聚合酶基因, A_{p2} 用量分别为 0.5, 1, 2 和 $4 \mu\text{g}/\text{孔}$; 1'~4' 示鉴定的 DNA 解旋酶, A_H 用量分别为 0.5, 1, 2 和 $4 \mu\text{g}/\text{孔}$; 5 和 5' 示不加 dsRNA 的空白对照组

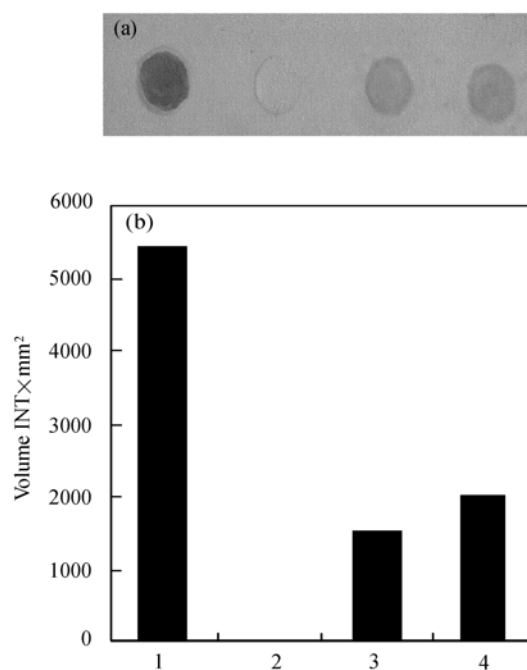


图 3 DNA 斑点杂交分析

(a) 斑点杂交结果; (b) Versa Doc™ Model 3000 扫描鉴定病毒 DNA 的含量. 1 示感染了 BmNPV 的正常家蚕细胞的胞内总 DNA; 2 示正常家蚕细胞的胞内总 DNA; 3 示转染了 A_{p2} 的受 BmNPV 感染的家蚕细胞的胞内总 DNA; 4 示转染了 A_H 的受 BmNPV 感染的家蚕细胞的胞内总 DNA; Volume INT $\times \text{mm}^2$ 表示杂交斑点的密度(它与病毒 DNA 的量成正比)

了 A_{p2} 和 A_H 的 BmN 其病毒 DNA 的含量很少, 因而与阴性对照相比只有很弱的杂交信号. 凝胶成像分析系统对杂交结果进行进一步的定量分析, 计算出斑点 1 的病毒 DNA 的量分别是斑点 3 和 4 的 3.6 倍和 2.7 倍(图 4(b)). 这更加验证了对 A_{p2} 和 A_H 对 BmNPV 的复制有抑制作用, 说明它们能有效地抑制病毒 DNA 的复制.

2.4 dsRNA 的胞内分布

Byrom 等人^[10] 研究表明, 在 dsRNA 中掺入荧光基团不会影响 dsRNA 诱发基因沉默的效果, 而且荧光团对细胞也不会产生毒副作用. 因此, 我们用 FAM 标记的 dsRNA 来进一步了解 dsRNA 在细胞内的分布及定位. 在荧光显微镜下发现在转染 dsRNA 4 h 后, 细胞胞浆中见少量细小的点状结构, 胞核内无明显荧光分布; 而在转染 24 h 后, 一部分 dsRNA 开始从转染试剂的脂质体中释放出来, 聚集在细胞核的周围, 呈不连续分布, 胞核内可见较强荧光分

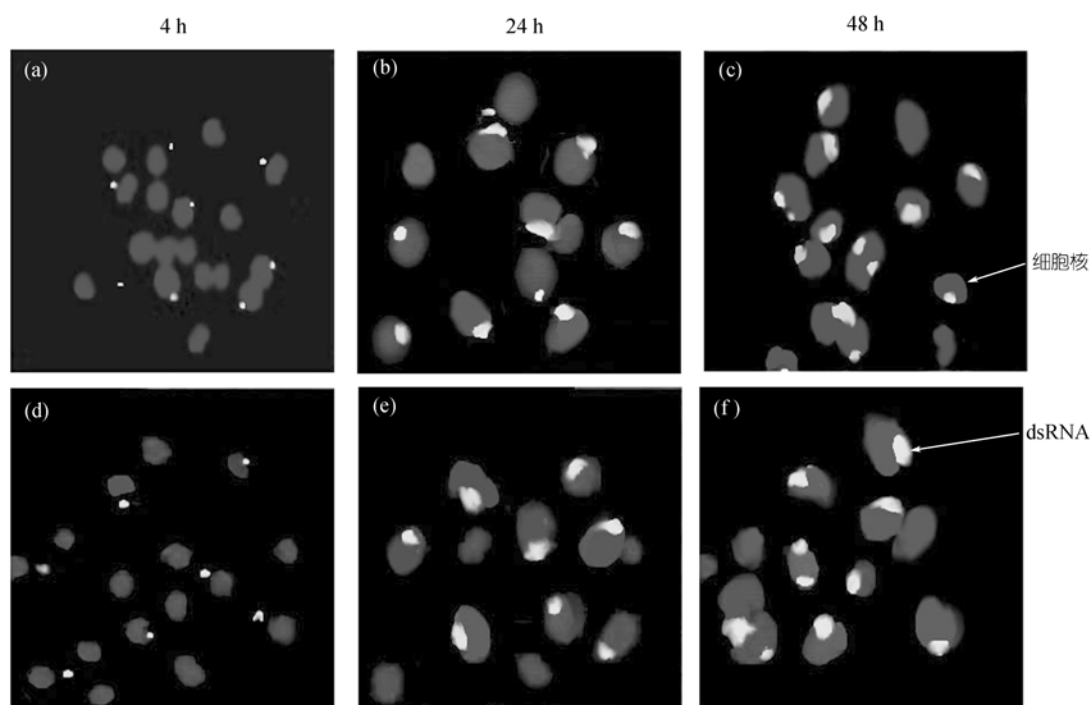


图 4 转染后不同时间内 dsRNA 在细胞之内的分布情况

(a)~(c)为 A_{p2} 在家蚕细胞内的分布情况; (d)~(f)为 A_H 在家蚕细胞内的分布情况. 灰色为经 DAPI 染色后的细胞核; 白色为用 FAM 标记的 dsRNA. 放大倍数: (a)和(d)为 $\times 400$; (b), (c), (e)和(f)为 $\times 1000$

布; 在转染 48 h 后, 细胞内荧光强度更强(图 4), 这与在哺乳动物细胞内所发现的 siRNA 的分布情况十分类似^[10], 其原因可能是更多的 dsRNA 不连续的聚集在细胞核的周围所致. dsRNA 在家蚕细胞中可以维持 5 d, 第 6 天时, 细胞内已检测不出荧光信号.

此外, 通过流式细胞仪检测 FAM 标记的 dsRNA 经 TransMessenger Reagent 介导转染后, 转染效率可达 60%~70%. MTT 实验发现当转染试剂的加入量为 32 和 64 μ L 的家蚕细胞, 体积缩小, 内有大量颗粒, 细胞数量明显减少, 细胞存活率仅为 55.67% 和 36.55%. 而转染试剂加入量为 16, 8 和 4 μ L 时, 细胞形态, 体积和数量都比较正常.

3 讨论

在本实验中, 我们尝试用人工合成的 dsRNA 在 BmN 中诱发 RNAi, 从而抑制病毒 DNA 的复制, 达到控制 BmNPV 生长繁殖的目的. 实验结果表明, 人工设计并合成的 3 个 dsRNA 中有 2 个(A_{p2} 和 A_H)能有效的抑制 BmNPV 的复制, 而另外一个 A_{p1} 却没有明显抑制 BmNPV 复制的效果, 这表明在设计 dsRNA 时存在一定的不确定性, 不同的靶位点其抑制效果

相距甚远. 通过对不同用量的 dsRNA 在转染后的不同时间对病毒抑制效果差异的研究, 我们发现 A_{p2} 和 A_H 对 BmNPV 的抑制作用有 2 个明显的特点: () 浓度效应. 由于高浓度的 dsRNA 能产生较多的 siRNA, 不仅能增强反应体系的效应而且还能抵消 ADARs (RNA 依赖的腺苷脱氨酶) 的作用^[11], 因而增强了抑制病毒复制的效果. 但过高的浓度(如 4 μ g/孔)时, 其抑制作用反而有所减弱. 其原因可能是过量的 dsRNA 会产生过多的 siRNA, 细胞分裂后就会有较多的 siRNA 残留在细胞中, 与其他 dsRNA 竞争与 RNAi 特异性酶的结合(该酶的序列识别特异性不高), 干扰其他细胞的 RNAi 反应. 另外, 当 dsRNA 的量太大时, 其所需的转染试剂 TransMessenger Transfection Reagent 的量也会随之增加, 而实验证明当这种转染试剂的浓度超过一定范围时(高于 32 μ L), 会对家蚕细胞产生一定的毒副作用, 从而影响了 dsRNA 在细胞内发挥作用. () 时间效应. 由于我们采用的是 dsRNA 瞬时转染家蚕细胞, 因而随着 RNAi 作用的发生, 在 mRNA 生成与降解之间存在一个动态平衡, 同时 RNAi 也会由于 ADARs 脱氨基活性的逐步增高

导致siRNA的生成减少而受到抑制,从而导致了病毒滴度的有所回升.因此,我们设想可以构建一个质粒载体,运用RNA聚合酶 的启动子(如U6, H1)在细胞内表达dsRNA或siRNA^[12],使细胞内siRNA的浓度始终保持在一个水平上,这样既可以大大缩减实验成本,又增加了RNAi技术的可操作性,使抑制效果更加彻底.此外,我们发现本实验中所采用的dsRNA的用量与文献^[13]有明显差别,其原因可能与细胞或病毒类型对dsRNA的敏感度有关.

从病毒滴度测定、RT-PCR和DNA斑点杂交分析的结果中,都可以看出dsRNA在转染BmN第4天抑制效果最明显,目的基因的表达水平明显下调,病毒滴度下降了 $10^3\sim 10^4$.这与我们在Drosophila S2细胞中看到的dsRNA抑制基因表达的效果在70%~100%是有一定差别的^[14].导致这种抑制效果的差异可能与细胞类型、dsRNA的选择和设计、转染试剂的转染效率和病毒的感染剂量等因素有关.

目前对于一些病毒性疾病如HIV, HBV, SARS等的治疗尚缺乏有效的方法,虽然已有一些药物批准在临床上应用,但效果不理想.因此, RNAi作为基因治疗的一种重要手段,在抗病毒基因治疗中具有广阔的应用前景.我们在本实验中建立的 dsRNA 抗病毒模型不仅为探索 dsRNA 在家蚕病害中的控制作用以及该技术用于病毒分子生物学研究具有重要意义,也为将来RNAi在治疗人类病毒性疾病方面做了初步的尝试,为今后的深入研究也奠定了一定的实验基础.相信在不久的将来 RNAi一定能为人类病毒性疾病的治疗带来新的曙光.

致谢 特别感谢浙江大学生物所王洪凯老师在荧光显微镜方面给予的指导和帮助.

参 考 文 献

- 1 Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391: 806~811[DOI]

- 2 Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411: 494~498[DOI]
- 3 Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev, 2001, 15: 188~200[DOI]
- 4 Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. RNAi as random degradative PCR siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. Cell, 2001, 107: 297~307[DOI]
- 5 Nykanen A, Haley B, Zamore P D. ATP Requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. Cell, 2001, 107: 309~321[DOI]
- 6 Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H. Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult *Drosophila* triggers RNA interference in the central nervous system. Mol Psychiatry, 2001, 6(6): 665~670[DOI]
- 7 Hutvagner G, Zamore P D. RNAi: Nature abhors a double-strand. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12: 225~232[DOI]
- 8 Grishok A, Pasquinelli A E, Conte D, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. Cell, 2001, 106: 23~34[DOI]
- 9 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学. 北京: 中国农业科技出版社, 1998, 228~229
- 10 Byrom M, Pallotta V, Brown B, et al. Visualizing siRNA in mammalian cells: Fluorescence analysis of the RNAi effect. Ambion Technotes, 2002, 9(3): 68
- 11 Liu Y, Alan H, Alexander R, et al. Double-stranded RNA-specific deaminase: Nucleic acid binding properties. Methods, 1998, 15(3): 199~205[DOI]
- 12 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 2002, 296: 550~553[DOI]
- 13 Means J C, Muro I, Clem R J. Silencing of the baculovirus Op-iap3 gene by RNA interference reveals that it is required for prevention of apoptosis during *Orgyia pseudotsugata* M nucleopolyhedrovirus infection of Ld652Y cells. J Virol, 2003, 77(8): 4481~4488[DOI]
- 14 Caplen N, Fleenor J, Fire A, et al. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: A tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene, 2000, 252: 95~105[DOI]

(2004-03-04 收稿, 2004-05-14 收修改稿)