

M 蛋白基因 shRNA 抑制 PRRSV 在 Marc145 细胞中复制的研究

黄娟, 姜平, 李玉峰, 蒋文明

(南京农业大学动物医学院/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 【目的】通过靶向 PRRSV 基因组中的 M 基因的 siRNA 来抑制 PRRSV 在 Marc145 细胞中的复制。【方法】构建 4 个能转录小发夹 RNA (shRNA) 的质粒, 将其与靶蛋白表达质粒共转染 HEK293A 细胞, 观察荧光或进行半定量 PCR; 或将其转染 Marc145 细胞, 感染 PRRSV 后进行 IFA、TCID₅₀ 和实时 PCR 检测。【结果】shRNA 表达质粒对 M 融合蛋白表达的抑制率约为 50%, 使 M 真核质粒表达蛋白的 mRNA 水平降低 54%~64%, 表达的 shRNA 在 PRRSV 感染后 48 h 使病毒的 TCID₅₀ 和 mRNA 水平平均降低到 1/10~1/100 倍, 间接免疫荧光结果表明 shRNA 表达质粒转染孔的荧光细胞数显著减少。【结论】shRNA 表达质粒特异性的抑制了靶蛋白 M 和 PRRSV 的复制, 靶向 PRRSV 基因组 M 基因不同区域的 siRNA 可以作为控制该病毒传播的候选策略。

关键词: PRRSV; RNA 干扰; M 蛋白基因

Inhibition of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Replication by Short Hairpin RNA Targeting to M Protein Gene

HUANG Juan, JIANG Ping, LI Yu-feng, JIANG Wen-ming

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture / College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: 【Objective】To evaluate the inhibition ability of siRNAs targeting to M protein gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. 【Method】shRNA-expressing plasmids were constructed and delivered to HEK293A or Marc145 cells, efficiency of RNA interfering was assayed by semiquantitative RT-PCR, indirect immunofluorescence assay (IFA), virus titre of TCID₅₀ and real time PCR. 【Result】After cotransfection with fusion-protein expressing plasmids, the fluorescence in HEK293A cells treated by shRNA expressing plasmids became obviously weaker compared to those cotransfected with target gene expressing plasmid and pSUPER plasmid. Different shRNA expressing vectors were also cotransfected into HEK293A cells with vectors expressing M proteins of PRRSV, and the mRNA level of M protein was inhibited by 54%-64% assayed by semi-quantitative PCR. These plasmids expressing shRNA were also delivered into Marc145 cells. After infection, these cells showed a significant decrease in virus yield when compared to control cells, by detection using virus titers (TCID₅₀), IFA and real-time RT-PCR. 【Conclusion】siRNA targeting to M protein gene of PRRSV could inhibit M protein expression and PRRSV replication in Marc145 cells.

Key words: PRRSV; RNA interference (RNAi); M protein gene

0 引言

【研究意义】猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是尼多病毒目动脉炎病毒科成员, 主要引起母猪早产、

流产等繁殖障碍, 仔猪、育肥猪呼吸困难及育成猪类流感疾病^[1]。目前该病在许多养猪国家爆发流行, 成为威胁养猪业安全的重要病原之一。虽然预防 PRRSV 的疫苗有灭活苗和弱毒苗, 然而, 疫苗的使用只能提供部分保护使机体不再出现临床症状, 不能阻止再

收稿日期: 2006-07-17; 接受日期: 2007-03-06

基金项目: 国家自然科学基金 (30471288、30270990)、江苏省自然科学基金 (BK2005093) 和教育部博士点基金项目 (20030307012)

作者简介: 黄娟 (1977-), 女, 河南罗山县人, 博士研究生, 研究方向为动物传染病防治, 现工作单位为青岛农业大学。Tel: 0532-86080170; E-mail: happyhj888@163.com; 通讯作者姜平 (1964-), 男, 江苏南通人, 教授, 博士生导师, 研究方向为动物分子病毒学与免疫学。Tel: 025-84395504; Fax: 025-84396640; E-mail: jiangp@njau.edu.cn

次感染。而且,弱毒苗毒株在自然状态下还有可能发生毒力返强现象^[2],并经过胎盘传播给胎儿,造成感染猪群的持续感染^[3],使得一些常规的疫苗很难取得理想的效果。因此,迫切需要开发一种新型的、能对所有 PRRSV 病毒株提供保护的抗病毒措施。【前人研究进展】RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 是由双链 RNA (dsRNA) 引发的信使 RNA (mRNA) 序列特异性消减现象,是一种保守的抗病毒机制。研究发现将 21~23nt 的小分子干扰 RNA 双链 (small interference RNA, siRNA) 或载体 DNA 转录^[4]的发夹 RNA (short hairpin RNAs, shRNAs) 导入细胞,可以抑制同源的内源或病原 mRNA 的表达。近几年, RNAi 技术已被用于干预乙肝病毒^[5]、爱滋病毒^[6]、流感病毒^[7]等人类病毒和口蹄疫病毒^[8]、猪圆环病毒^[9]等动物病毒的感染研究中,科学家们甚至应用 RNAi 技术建立了治疗阿森默氏综合征的小鼠动物模型^[10],这些研究成果无疑为控制 PRRSV 感染的研究带来了曙光。据 He^[11]和 Lu^[12]报道靶向 PRRSV N 蛋白的 shRNA 能抑制该病毒在细胞中的复制,笔者^[13]也报道了靶向 PRRSV GP5 和 N 蛋白的 shRNA 能抑制该病毒在细胞中的复制。【本研究切入点】而对于 ORF6 编码的、与 GP5 形成异源二聚体的糖基化膜蛋白 M 的 RNA 干扰研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究的目的是构建靶向 PRRSV M 蛋白基因的 shRNA 表达质粒,通过与 M 蛋白真核表达质粒共转染,观察 shRNA 的基因沉默作用,并探讨靶向 M 蛋白 shRNA 能否抑制 PRRSV 在细胞中复制及其机理。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Marc145 细胞、美洲型 PRRSV S1 株 (TCID₅₀ 为 10^{6.8}·ml⁻¹)、美洲型特异性单克隆抗体 JP₂₄ (针对 N 蛋白)、质粒 pSUPER、pEGFP-N1、真核表达质粒 pcDNA-M (包含完整的 S1 株 ORF6) 均由本实验室保存;其它试剂及材料购自生物公司。

1.2 方 法

1.2.1 siRNA 的设计与 shRNA 表达质粒的构建 根据 siRNA 设计的一般策略及 PRRSV S1 株基因组序列 (GenBank 登陆号: AF090173), 设计了 4 个 siRNA 片段, 其靶位点序列及在 M 基因中的位置分别为 pSUPER-M1 (187 bp): GCGCACTTTTCAGAGTACAA; pSUPER-M2 (205 bp): ATAAGGTCGCGCTCACTAT; pSUPER-M3 (275 bp): GGAAATTCATCACCTCCAG;

pSUPER-M4 (379 bp): GCAAATGATAACCACGCAT。shRNA 表达质粒的构建及鉴定同 Huang J^[13]。

1.2.2 M-EGFP 融合表达质粒的构建与融合蛋白表达 以 pcDNA-M 质粒为模板扩增 M 基因, 引物序列为 P1 (含 Hind III): ATCAAGCTTATGGGGTTCGTCC TTAG, P2 (含 BamH I): TGCGGATCCAGTTTGGCA TATTTGAC, 扩增片段大小为 543 bp。PCR 产物用 Hind III/BamH I 双酶切后胶回收, 并插入到 pEGFP-N1 质粒中 EGFP 基因的上游。将融合表达质粒转染 HEK293A 细胞, 并于转染后 24、48 和 72 h 于荧光倒置显微镜下观察绿色荧光。

1.2.3 shRNA 表达质粒对靶基因在蛋白质水平上的特异性抑制 将 shRNA 表达质粒分别与融合表达质粒等量共转染 HEK293A 细胞。每个转染孔质粒总量为 0.4 μg, shRNA 表达质粒和融合表达质粒各 0.2 μg, 每个转染孔重复 3 个孔。分别在转染后 24、48 和 72 h 于荧光倒置显微镜下观察绿色荧光。

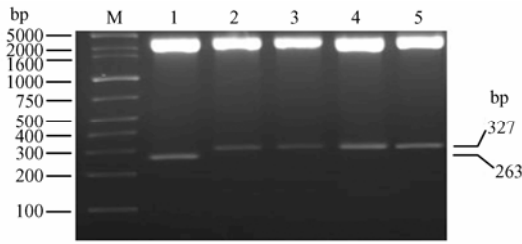
1.2.4 shRNA 表达质粒在 mRNA 水平上对 M 蛋白表达的抑制 将 shRNA 表达质粒与 pcDNA-M 真核表达质粒等量共转染 24 孔细胞培养板中的 HEK293A 细胞。每个转染孔质粒总量为 1.0 μg。转染后 48 h 提取细胞总 RNA 反转录, 半定量 PCR 检测 M 蛋白 mRNA 水平, 并以 GAPDH 基因作为内参。

1.2.5 shRNA 表达质粒抑制 PRRSV 在 Marc145 细胞中复制 将 shRNA 表达质粒分别转染 Marc145 细胞, 96 孔板 0.4 μg/孔 (24 孔板 0.8 μg/孔)。同时转染 pSUPER 作为载体对照, 设定无质粒转染孔作为病毒感染对照, 每个质粒转染 3 个孔。转染 24 h 后, 以 100TCID₅₀ 的病毒液感染各孔细胞 (24 孔板: 200 TCID₅₀/孔), 病毒感染后约 48 h, 96 孔板转染孔进行间接免疫荧光实验和病毒滴度的测定 (按常规方法进行), 24 孔板转染孔提取细胞培养物总 RNA 反转录, 参考黄娟等^[14]报道的方法进行实时 PCR, 同时绘制标准曲线及设定不加 cDNA 的阴性对照。

2 结果与分析

2.1 shRNA 表达质粒的构建与鉴定

用 EcoR I /Kpn I 将重组质粒和空质粒分别进行双酶切, pSUPER 质粒双酶切后产生一个 263 bp 的小片段, 重组质粒经双酶切后产生一个 327 bp 的小片段 (图 1)。将重组质粒送 Invitrogen 公司测序, 测序结果与设计的目的序列相同, 表明重组质粒含有正确的目的序列, 可进一步用于 RNA 干扰试验。



M: 1kb plus DNA ladder; 1: pSUPER 空质粒; 2~5: pSUPER-M1, pSUPER-M2, pSUPER-M3, pSUPER-M4
M: 1kb plus DNA ladder; 1: pSUPER; 2-5: pSUPER-M1, pSUPER-M2, pSUPER-M3, pSUPER-M4, respectively

图 1 shRNA 表达质粒的双酶切鉴定

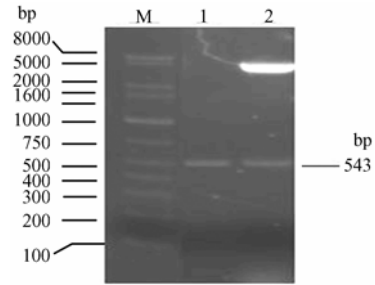
Fig. 1 Identification of the recombinant plasmids with *Kpn* I and *Eco*R I restriction enzymes digestion

2.2 M-EGFP 融合表达质粒的构建与表达

将 PCR 产物在 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶上电泳, 扩增产物大小在 500 bp 左右, 与预期相符。重组质粒以 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切, 切出与预期大小相符的外源片段 (图 2), 表明重组质粒构建成功, 命名为 pM-EGFP-N1。将该质粒转染 HEK293A 细胞, 24~72 h 后均可见到荧光的表达 (图 3)。

2.3 shRNA 表达质粒对靶基因在蛋白质水平上的特异性抑制

将 shRNA 表达质粒及 pSUPER 分别与 pM-EGFP-N1 共转染 HEK293A 细胞, 48 h 后观察荧光, 发现与对照相比 (即 pM-EGFP-N1 与 pSUPER 共转染的孔), shRNA 表达质粒共转染细胞的孔荧光均有不同程度的减弱, 荧光细胞数减少, 其中 pSUPER-M2 和 pSUPER-



M: 1kb plus DNA ladder; 1: M 基因扩增产物; 2: pM-EGFP-N1 *Hind* III/*Bam*H I 双酶切

M: 1kb plus DNA ladder; 1: PCR product of M protein gene; 2: pM-EGFP-N1 digested by *Hind* III/*Bam*H I

图 2 融合表达质粒的构建与鉴定

Fig. 2 Identification of fusion-protein expressing plasmid

图 3 融合蛋白表达的鉴定 (10×20)

Fig. 3 Expression of fusion-protein (10×20)

M3 质粒共转染的孔荧光减少得较为明显, 为 50% 左右 (图 4)。

图 4 不同 shRNA 对靶基因融合蛋白的抑制 (10×10)

Fig. 4 Inhibition of the expression of fusion protein by different shRNA expressing plasmid (10×10)

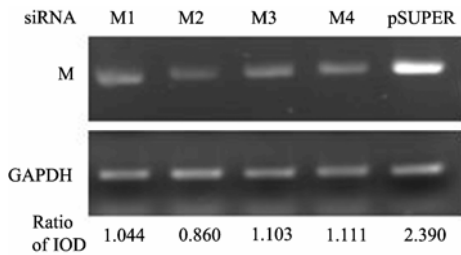
2.4 shRNA 表达质粒在 mRNA 水平上对 M 蛋白表达的抑制

以每个样品的反转录产物为模板, 扩增 M 基因和内参 GAPDH, PCR 产物分别取等量经 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳分离。并在 Labworks 分析系统上进行图象处理及灰度分析 (图 5)。结果表明, shRNA 表达质

粒对 M 蛋白的抑制率在 54%~64% 之间 (图 6)。

2.5 shRNA 表达质粒抑制 PRRSV 在 Marc145 细胞中复制

将 4 个 shRNA 表达质粒及 pSUPER 质粒分别转染 Marc145 细胞, 转染后 24 h 感染 PRRSV, 病毒感染后 48 h, 将一块 96 孔细胞板冻融, 分别测定各孔病毒滴度 (TCID_{50}), 发现 shRNA 表达质粒转染孔的



N1-M4: pSUPER-M1, pSUPER-M2, pSUPER-M3, pSUPER-M4

图 5 半定量 PCR 检测各 shRNA 对 M 蛋白表达的抑制
Fig. 5 Inhibition detected by semiquantitative RT-PCR

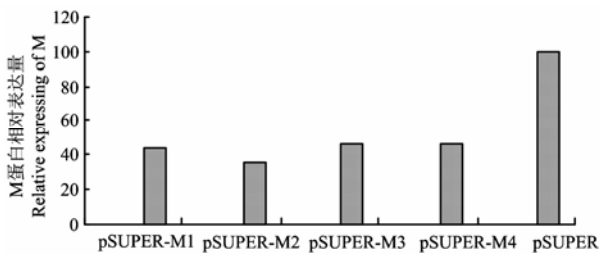


图 6 半定量 PCR 检测 M 蛋白相对表达水平
Fig. 6 Relative expressing of M detected by semiquantitative RT-PCR

TCID₅₀ 降低 1/10~1/100 倍 (图 7), 其中 pSUPER-M2 的抑制率最高, 降至 1/100 ($P < 0.05$)。另一块 96 孔细胞板用冷乙醇固定后, 与单抗 JP₂₄ 及 FITC 标记羊抗鼠 IgG 反应, 在荧光显微镜下观察, 与未转染孔及

pSUPER 转染孔相比, 各 shRNA 表达质粒转染孔的荧光染色细胞数均显著降低 (图 8)。将 24 孔细胞板冻融, 提取 RNA 反转录, 进行实时 PCR, 结果发现 shRNA 表达质粒转染孔的病毒 mRNA 水平也显著降低 ($P < 0.05$, 表), 其中 pSUPER-M2 的抑制率最高。

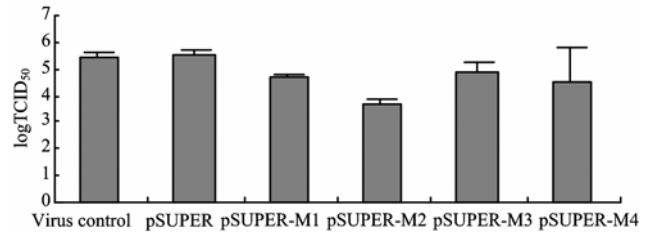


图 7 TCID₅₀ 检测 shRNA 对 PRRSV 复制的抑制作用
Fig. 7 Suppression of viral replication in Marc145 cells by RNAi detected by TCID₅₀

表 实时 PCR 检测 shRNA 表达质粒对 PRRSV 的抑制作用
Table Detection of PRRSV N protein gene by real-time PCR

	Cycle threshold(C_T)* (Mean \pm SD)	TCID ₅₀ · ml ⁻¹ (log ₁₀) (Mean \pm SD)
Virus control	11.72 \pm 0.88	4.6 \pm 0.26
pSUPER	11.58 \pm 1.29	4.64 \pm 0.38
pSUPER-M1	15.38 \pm 0.59	3.53 \pm 0.17
pSUPER-M2	17.22 \pm 3.83	3.00 \pm 1.12
pSUPER-M3	14.85 \pm 1.07	3.69 \pm 0.31
pSUPER-M4	15.865 \pm 1.83	3.39 \pm 0.53

* $C_T = -3.429 \log_{10}TCID_{50} + 27.49$

图 8 IFA 检测 shRNA 对 PRRSV 复制的抑制 (10 \times 20)
Fig. 8 Suppression of viral replication by RNAi detected by IFA

3 讨论

RNAi 的抗病毒机制可以用来预防和治疗病毒感染,如口蹄疫病毒^[8]、流感病毒^[7]等,但在 PRRSV 上的研究还少见,到目前为止尚没有靶向 PRRSV M 蛋白基因序列的 siRNA 研究。非糖基化的膜蛋白(M)是 PRRSV 主要的结构蛋白之一,与 GP5 蛋白形成异源二聚体,构成 PRRSV 病毒囊膜蛋白的主要组成成分,它运输 GP5、M 蛋白至高尔基体,也可能参与病毒出芽,还参与病毒与猪肺泡巨嗜细胞类肝磷脂受体的吸附过程。研究^[15]发现马动脉炎病毒粒子的产生依赖于两个主要的被膜蛋白,当 GP5 或 M 蛋白缺失时,没有病毒粒子释放,此前笔者的研究也证实 GP5 蛋白表达的抑制显著影响了 PRRSV 的复制^[13],进一步证实了 GP5 蛋白是病毒复制的必需基因这一假设,那么 M 蛋白是不是也是病毒复制的必需基因呢,本研究对此比较关注,因此选择了 M 基因作为靶基因。虽然各 shRNA 表达质粒表达 shRNA 的效率没有进行鉴定,shRNA 抑制病毒复制后其它蛋白的表达水平也没有进一步检测,但是本研究确实证实了靶向 PRRSV ORF6 的 shRNA 能在病毒整体水平上抑制病毒的复制。

本研究将 shRNA 表达质粒及 EGFP 和 M 融合表达质粒分别两两共转染 HEK293A 细胞,通过 EGFP 报告基因的表达来观察 shRNA 诱导的 RNA 干扰对融合蛋白的影响。荧光总强度的检测发现各 shRNA 不同程度降低了融合蛋白的表达,其中 pSUPER-M2、pSUPER-M3 质粒共转染的孔荧光减少较为明显,约为 50%左右,但是并没有完全抑制细胞表达荧光蛋白。可能原因有:转入 shRNA 表达质粒的细胞表达 shRNA 的强度不同;shRNA 表达质粒与融合表达质粒共转染后,shRNA 表达质粒与融合表达质粒表达效率或启动表达的时间不同,导致表达的 shRNA 与融合蛋白的含量不对等,在 shRNA 的表达尚未到达有效作用浓度时,已经有部分绿色荧光蛋白 RNA 转录并表达,并且 EGFP 具有较长的半衰期(在 24 h 以上),稳定性好,它可以在一些表达水平很低的细胞中进行积累,这样就会干扰 shRNA 真实的抑制效果^[16]。本研究还将 shRNA 表达质粒与表达 PRRSV M 蛋白的 pcDNA-M 分别两两共转染 HEK293A 细胞,通过半定量 PCR 检测 M 蛋白的 mRNA,结果表明,shRNA 表达质粒对 M 蛋白的抑制率在 36%~69%之间,一方面用另一套靶蛋白表达系统验证了 shRNA 的抑制作用,另一方面

探讨了 shRNA 对靶蛋白 mRNA 水平的抑制作用,从而更为客观地评价 shRNA 的效率。

本研究发现靶向同一基因的不同 siRNA 抑制病毒活性不同,这种抑制效率的差异性也被其他研究者所证实^[8]。RNAi 的效率与靶 mRNA 的二级结构有关,mRNA 靶序列上的蛋白也会导致位置效应^[17],shRNA 表达质粒表达 shRNA 的水平也有可能不同,其他因素如 siRNA 表达质粒的特性^[4]、5'siRNA 的磷酸化效率^[18]也会影响 siRNA 的活性。同一 shRNA 对融合蛋白、pCDNA3 真核表达质粒表达的蛋白及 PRRSV 全病毒的抑制效率也不尽相同,可能与所表达的蛋白质的组装、高级结构有关,也可能是由于在不同细胞内 shRNA 表达质粒表达 shRNA 的水平不同,或者是由于质粒表达的蛋白较为单纯,而病毒复制过程较为复杂,合成的结构蛋白之间相互会发生作用,一些病毒复制过程中的调控原件屏蔽了靶蛋白上的 siRNA 识别位点^[17],不同形式表达的靶蛋白半衰期也不尽相同,可能也干扰了对 shRNA 抑制效果的正确评价^[16]。转染效率、出现病毒逃逸突变株也可能影响了 RNA 干扰的效果。

本研究表明靶向 M 蛋白基因的 shRNA 能够抑制 PRRSV 在 Marc145 细胞中复制,但是这种抑制作用尚需在猪肺泡巨嗜细胞(PAM)或猪体内进一步试验验证,shRNA 导入到组织器官的途径也尚需进一步研究。

4 结论

本研究成功构建了 4 个靶向 PRRSV M 蛋白基因的 shRNA 表达质粒,证实了该 shRNA 不仅能够抑制 M 蛋白的表达和转录,还能抑制 PRRSV 在 Marc145 细胞中的复制,为研究病毒与受体相互作用、病毒结构蛋白在复制周期中的作用以及 PRRSV 的防控提供了新的手段和思路。

References

- [1] Rossow K D. Porcine reproductive and respiratory syndrome. *Veterinary Pathology*, 1998, 35(1): 1-20.
- [2] Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tatsanakit A, Damrongwatanapokin S. Genetics and geographical variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Thailand. *Veterinary Microbiology*, 2004, 101(1): 9-21.
- [3] Meng X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future

- vaccine development. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(4): 309-29.
- [4] Brummelkamp T R, Bernard R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 2002, 296: 550-553.
- [5] Uprichard S L, Boyd B, Althage A, Chisari F V. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 773-778.
- [6] Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Shank P R, Ramratnam B. Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 5033-5038.
- [7] Ge Q, McManus M T, Nguyen T, Shen C H, Sharp P A, Eisen H N, Chen J. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100: 2718-2723.
- [8] Chen W, Yan W, Du Q, Fei L, Liu M, Ni Z, Sheng Z, Zheng Z. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice. *Journal of Virology*, 2004, 78: 6900-6907.
- [9] Liu J, Chen I, Chua H, Du Q, Kwang J. Inhibition of porcine circovirus type 2 replication in mice by RNA interference. *Virology*, 2006, 347(2): 422-433.
- [10] Hayward P. *In vivo* silencing of disease genes with RNAi. *Neurology*, 2004, 3: 512.
- [11] He Y X, Hua R H, Zhou Y J, Qiu H J, Tong G Z. Interference of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication on MARC-145 cells using DNA-based short interfering RNAs. *Antiviral Research*, 2007, 74(2):83-91.
- [12] Lu L, Ho Y, Kwang J. Suppression of porcine arterivirus replication by baculovirus-delivered shRNA targeting nucleoprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 340(4): 1178-1183.
- [13] Huang J, Jiang P, Li Y, Xu J, Jiang W, Wang X. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by short hairpin RNA in MARC-145 cells. *Veterinary Microbiology*, 2006, 115(4): 302-310.
- [14] 黄 娟, 姜 平, 张常印, 唐泰山, 李永东, 张治涛. 猪繁殖与呼吸综合征病毒实时 PCR 方法的建立. *中国病毒学*, 2005, 20: 530-533.
- Huang J, Jiang P, Zhang C Y, Tang T S, Li Y D, Zhang Z T. Development of Real time PCR for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virologica Sinica*, 2005, 20: 530-533. (in Chinese)
- [15] Snijder E J, Dobbe J C, Spaan W J M. Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. *Journal of Virology*, 2003, 77: 97-104.
- [16] Choi I, Cho B R, Kim D, Miyagawa S, Kubo T, Kim J Y, Park C G, Hwang W S, Lee J S, Ahn C. Choice of the adequate detection time for the accurate evaluation of the efficiency of siRNA-induced gene silencing. *Journal of Biotechnology*, 2005, 120(3): 251-261.
- [17] Overhoff M, Alken M, Far R K, Lemaitre M, Lebleu B, Sczakiel G, Robbins I. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 348: 871-881.
- [18] Nykanen A, Haley B, Zamore P D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 2001, 107: 309-321.

(责任编辑 林鉴非)