

RNAi 对小鼠胚胎成纤维细胞中 MC1R 基因表达的影响

尹志红, 王恩峰, 白 瑞, 庞全海*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘 要: 旨在研究 RNAi 对小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)黑素皮质素受体 1(Melanocortin-1 receptor, MC1R) 基因表达的影响; 以 MC1R 基因作为影响哺乳动物毛色性状的候选基因, 通过 RNA 干扰(RNAi) 技术抑制小鼠胚胎成纤维细胞中 MC1R 基因表达。合成 3 对针对小鼠 MEF 中 MC1R 基因的瞬时干扰 siRNA, 采用反向转染法将 siRNA 转染入 MEF, 取转染 siRNA 48 h 后的小鼠胚胎成纤维细胞提取总 RNA 和总蛋白, 并通过 QRT-PCR 技术和 Western bolt 检测 MC1R mRNA 和其蛋白的相对表达量; 结果显示, siRNA1 组和 siRNA2 组的 MC1R mRNA 相对表达量和 MC1R 蛋白表达量显著低于空白对照组 ($P < 0.05$), 但 siRNA3 组表达不显著; 本试验利用反向转染方法, 成功地对外培养的小鼠胚胎成纤维细胞进行 siRNA 转染。MC1R 基因与蛋白的抑制情况相一致, 说明 siRNA1 和 siRNA2 对 MC1R 的抑制效果确实有效, 并筛选出有显著干扰效果的 siRNA, 为进一步研究 MC1R 在毛色发育过程中的调控机理提供科学依据。

关键词: 小干扰 RNA; 黑素皮质素受体 1 基因; 小鼠胚胎成纤维细胞; 抑制率

中图分类号: S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0218-07

Effect of RNAi on MC1R Expression in Mouse Embryo Fibroblasts

YIN Zhi-hong, WANG En-feng, BAI Rui, PANG Quan-hai*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: To study the effect of RNAi on MC1R expression in mouse embryo fibroblasts(MEF). MC1R gene was taken as candidate gene affecting the formation of mammal's hair color. The aim of the study was to inhibit the expression of MC1R by RNA interference in the MEF. Three pairs of specific siRNA for MC1R gene were designed for RNA interference and transferred into the MEF by reverse transfection. After 48 h, the total RNA and protein were extracted from the MEF, and the relative expression of MC1R mRNA and protein was detected by using QRT-PCR technology and Western bolt. The results showed that the relative expression of MC1R mRNA and MC1R protein in the siRNA1 and siRNA2 groups were significantly lower ($P < 0.05$) than those in the blank control group, but the expression of siRNA3 group was un conspicuous. These tests were successfully inhibited the expression of MC1R in the MEF by RNA interference (reverse transfection) with Lipofectamine™ RNAi-Mate. The expression tendency of MC1R gene and protein are consistent. The results showed that the inhibition effect of siRNA1 and siRNA2 groups were effective, the effective siRNA were screened from three specific siRNAs, can be served as a scientific foundation for the further study of regulation mechanism of MC1R in the process of coat development.

收稿日期: 2013-10-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972223; 31272628)

作者简介: 尹志红(1986-), 女, 山西朔州人, 博士生, 主要从事动物干细胞生物学研究, E-mail: yinhonghong1@163.com

* 通信作者: 庞全海, 教授, E-mail: pangquanhai@126.com

Key words: siRNA; MC1R; MEF; inhibition ratio

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA (Double stranded RNA, dsRNA) 分子介导、在 mRNA 水平上关闭相应序列基因表达、使其沉默的过程^[1]。RNA 干扰技术是转录后基因沉默机制,用它来诱导基因表达的沉默是一种制备基因功能缺失表型有效的新方法。1998 年, A. Fire 等首次提出 RNAi 概念^[2], 后来的不断研究发现, 在许多生物体细胞中均有 RNAi 现象^[3], 且 RNA 干扰技术广泛用于哺乳动物细胞中。有研究表明, RNA 干扰技术已成功用于小鼠胚胎干细胞中^[4]。

黑素皮质素受体 1 (Melanocortin-1 receptor, MC1R), 是调节哺乳动物皮毛颜色所涉及的关键蛋白之一, 它属于 G 蛋白耦合受体家族中最小的受体^[5], 位于毛囊的黑色素细胞的细胞膜上。对于多数物种, MC1R 基因是调控毛色变化的基因之一, 在色素沉着上起着重要的作用^[6-7]。有研究表明, 动物的毛色主要受 MC1R 基因及其等位基因的调控^[8-10], 且在不同羊驼毛色皮肤中的表达存在显著差异^[11]。分子研究表明, MC1R 的毛色扩展位点 E 编码 MC1R, 其在多种细胞上都有表达, 如黑色素细胞、角质形成细胞、成纤维细胞和内皮细胞等^[12]。而成纤维细胞是构成结缔组织的主要细胞, 通过细胞分裂来达到皮肤组织生长的目的^[13]。对小鼠的研究表明, MC1R 在决定毛内真黑素与褐黑素的数量中起着控制作用, 色素是通过黑色素细胞表面的受体即 MC1R (黑素皮质素受体 1) 受到黑素皮质素激素 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH) 的刺激后形成的^[14]。普遍认为, α -MSH 对黑素原产生的影响是通过 cAMP 第二信使系统来调节的。已有研究表明, α -MSH 影响黑素原产生而使动物呈现不同的毛色或羽色。 α -MSH 和 ACTH 均是通过 cAMP/PICA 信号途径^[15]与 MC1R 相互作用, 大部分依靠转录因子基因 (Microphthalmia) 位点的基因产物 MITF 诱导蛋白磷酸化与基因表达, 最后这个信号导致包括 TYR、P-蛋白、TYRP-1、TYRP-2 与 SILV 蛋白的黑素体的产生^[16], 若机体缺少 MC1R 蛋白, 例如 MC1R 与抑制性的 ASIP/ASP 蛋白结合, 则真黑素原不能形成黑素体, 且会产生不成熟的伪黑素体。

为了阐明 MC1R 基因的遗传基础, 本试验选用小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF), 通过 RNAi 技术抑制

MEF 中 MC1R 基因的正常表达, 以达到降低 cAMP/PICA 信号强度的目的, 探讨 siRNA 对 MC1R 基因是否有表达效果, 为研究 MC1R 在毛色发育过程中的调控机制及作用机理提供试验基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 8~9 周龄性成熟昆明小白鼠, 平均体重在 20 g 左右, 常规条件下分笼饲养, 自由采食和饮水, 适应饲养 1 周后进行超排处理。首先腹腔注射孕马血清促性腺激素 (PMSG, 10 IU·只⁻¹), 48 h 后注射相同剂量的绒毛膜促性腺激素 (HCG), 然后将母鼠与雄鼠 2:1 合笼, 第 2 天早晨检查阴道栓, 将有阴道栓小鼠饲养至 12.5 d 处死并取胚胎。

1.1.2 试验试剂与仪器 细胞培养基 (DMEM) 购自 HYclone 公司; 胰蛋白酶 (Trypsin) 购自 Gibco 公司; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物制品厂; RNAi-Mate 转染试剂购自上海吉玛制药技术有限公司; RNAisoTM Plus 和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (TaKaRa 公司); 兔抗 MC1R 单克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); HRP-山羊抗兔 IgG、Tubulin 兔抗多克隆抗体和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (博士德生物工程有限公司), IP 细胞裂解液 (碧云天)。

1.2 试验方法

1.2.1 胚胎成纤维细胞 (MEF) 的制备及 siRNA 转染
1.2.1.1 胚胎成纤维细胞 (MEF) 的制备和培养: 处死孕鼠, 在超净工作台中取出子宫, 放入盛有 PBS 的玻璃平皿中, 取出胚胎, 将其切碎, 加入消化液, 收集细胞, 在 37 °C 含 5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养。24 h 后更换新鲜的 MEF 生长培养液, 待细胞达 80%~90% 融合后, 按 1:2 传代培养, 将传至 3~5 代的纯化细胞用于后续转染试验。

1.2.1.2 siRNA 的化学合成: 根据 GenBank 中小鼠 MC1R 基因序列 (GeneID: 17199), 参考 siRNA 的设计原则, 并经 BLAST 确定序列特异性后, 选择其 cDNA 序列上均具有的 3 个位点, 送上海吉玛制药技术有限公司合成 3 对 siRNA。另由上海吉玛公司设计并合成了与小鼠基因序列无关的阴性对照以及针对小鼠管家基因 β actin (NM_007393.3) 的阳性对照, 并对其进行分组 (表 1)。

表 1 化学合成的 siRNA 序列

Table 1 The chemosynthetic siRNA sequences

组别 Group	正向(5'-3')Sense	反向(5'-3')Antisense
siRNA-1	GGGUGACAGUGAUAUCCAGTT	CUGGAUAUCACUGUCACCCTC
siRNA-2	GGUACUCAUCCCUUCCUGATT	UCAGGAAGGGAUGAGUACCTG
siRNA-3	GGAUGAGCUUUAAAAUAGATT	UCUAUUUUAAAGCUCaucCTG
Negative control	UUCUCCGAAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Mouse Actb-948	GUAAAGACCUCUAUGCCAATT	UUGGCAUAGAGGUCUUUACTT
Blank control		

每组设 3 个平行试验,采用反向转染方法,按照 RNAi-Mate;siRNA 为 3:1($w:\omega$)进行转染,后收集细胞,加 DMEM 培养液在 37 °C 5%CO₂ 饱和湿度条件下培养,48 h 后提取总 RNA 及总蛋白。

1.2.2.2 QRT-PCR 测定转染 siRNA 后 MC1R 基因表达量

1.2.2.2.1 细胞总 RNA 的提取及反转录合成 cDNA:siRNA 转染细胞 48 h 后,利用 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂(TaKaRa)提取各孔细胞总 RNA,操作过程严格按说明书进行,后反转录得到 cDNA,在 -20 °C 保存备用。

1.2.2.2.2 引物设计与合成:根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)GenBank 中公布的小鼠 MC1R 基因序列,为了检测各 RNA 样品完整性和反转录效率之间的差别,将待测样品中的管家基因 β actin 设为内参照。引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成,序列见表 2。

表 2 实时荧光定量 PCR 的引物

Table 2 Primer sequences for QRT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物/bp Product	登录号 Accession No.
MC1R	ATTGACGTGCT- CATCTGTGG CATGTGGGCA- TACAGAATCG TTGCTGACAGG-	273	NM_ 008559
β actin	ATGCAGAAG ACATCTGCTGG- AAGGTGGAC	141	NM_ 031144.2

1.2.2.3 QRT-PCR 反应体系的建立:将反转录合成的 cDNA、设计并合成好的目的基因和内参基因的引物,利用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(TaKaRa)进行实时荧光定量 PCR 反应,每个样品设 3 个重复,反应体系为 30 μ L:cDNA 模板 3 μ L,上、下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹)各 1.2 μ L,SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 \times)15 μ L,ROX Reference Dye II(50 \times)0.6 μ L,灭菌蒸馏水加至 30 μ L。反应条件:95 °C 预变性 30 s,95 °C 5 s,61 °C 20 s,72 °C 10 s,45 个循环;95 °C 1 min,55 °C 30 s,95 °C 30 s。

1.2.2.4 数据分析:目的基因的相对表达量采用 $\Delta\Delta$ Ct 法^[13]计算,目的基因相对表达水平:目的基因与内参基因的倍数差异(待测样本)/目的基因与内参基因的倍数差异(对照样本)= $2^{-(\Delta\text{Ct}_{\text{待测}} - \Delta\text{Ct}_{\text{对照}})}$,siRNA 抑制率为 $1 - 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 。

实时荧光定量 PCR 结果均用“平均值 \pm 标准误(Means \pm SE)”表示,数据采用 SPSS 统计分析软件进行单因素方差分析。

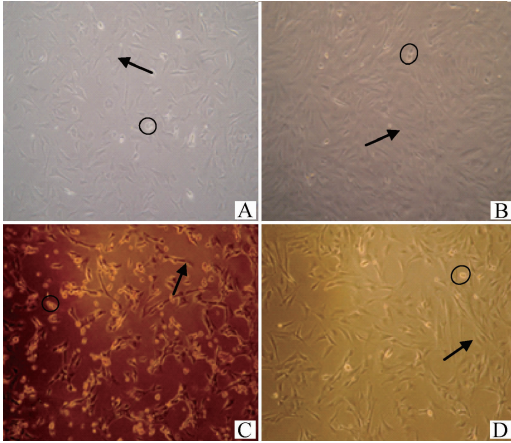
1.2.3 Western blot 检测转染 siRNA 后 MC1R 蛋白表达量 siRNA 转染细胞 48 h 后,利用 Western 细胞裂解液提取细胞总蛋白,放在 -80 °C 保存。利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定提取的总蛋白浓度,再用 Western blot 检测 MC1R 蛋白表达水平,蛋白抑制率按公式计算:蛋白抑制率= $[1 - (MC1R/Tubulin)_n / (MC1R/Tubulin)_{\text{空白}}] \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 细胞转染后的结果

观察转染前后的 MEF 形态,分别对原代、第 3 代、转染 siRNA 24 h、转染 siRNA 48 h 的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)进行拍照,如图 1 所示,原代 MEF 和传至第 3 代的 MEF 细胞形态相似,与原代

MEF 细胞相比,传至第 3 代 MEF 细胞分布密集,单个细胞较大(图 1A、B);与传至第 3 代 MEF 细胞相比,转染 siRNA 24 h 的 MEF 形态发生了改变,分布不均匀且稀疏,有空隙,说明有死亡现象,但是细胞有着染现象,说明转染成功(图 1C);转染 siRNA 48 h 的 MEF 细胞的形态又恢复正常,虽有死亡现象但整体生长良好(图 1D)。



A. 原代小鼠胚胎成纤维细胞(PMEF);B. 传至第 3 代的 MEF;C. 转染 siRNA 24 h 的 MEF;D. 转染 siRNA 48 h 的 MEF

A. The primary of MEF; B. Passage 3 of MEF; C. MEF was transfected siRNA in 24 h; D. MEF was transfected siRNA in 48 h

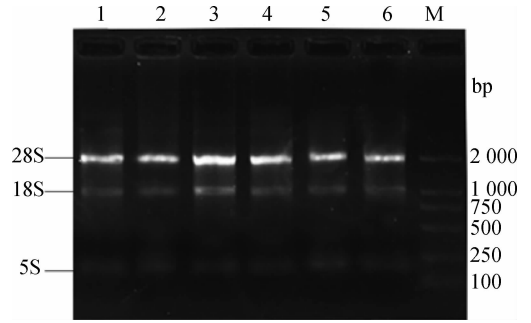
图 1 转染 siRNA 前后的小鼠胚胎成纤维细胞 100×
Fig. 1 MEF before and after siRNA transfection 100×

2.2 RNAi 对小鼠 MC1R mRNA 表达的影响

2.2.1 总 RNA 的提取结果 将提取的总 RNA 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示,总 RNA 的 5S、18S 和 28S 3 条带清晰整齐,带与带之间无明显拖尾现象(图 2),表明总 RNA 无降解,无明显的 DNA 污染;总 RNA 的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 值均为 1.8~2.0,说明总 RNA 未被蛋白质、酚类污染,即所提取的总 RNA 质量良好,可以进行后续试验。

2.2.2 RT-PCR 检测 将提取好的总 RNA,经由反转录试剂盒常规 RT-PCR 反应,以 6 组细胞的 cDNA 为模版进行目的基因的 PCR 反应,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,均检测到扩增产物(图 3),MC1R 基因扩增片段大小为 273 bp,可看出各目的基因片段大小与预期目的基因片段大小相符,表明所扩增片段为特异性的目的片段,其 cDNA 可用于实时荧光定量 PCR 检测。

2.2.3 QRT-PCR 结果 QRT-PCR 结果分析显示,siRNA1 组和 siRNA2 组的相对表达量显著低



1. siRNA1; 2. siRNA2; 3. siRNA3; 4. 阴性对照; 5. 阳性对照; 6. 空白; 图 3 和 5 同. M. DNA 分子质量标准

1. siRNA1; 2. siRNA2; 3. siRNA3; 4. Negative; 5. Positive; 6. Blank; The same as Fig. 3 and Fig. 5. M. DL2000 DNA marker.

图 2 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of total RNA

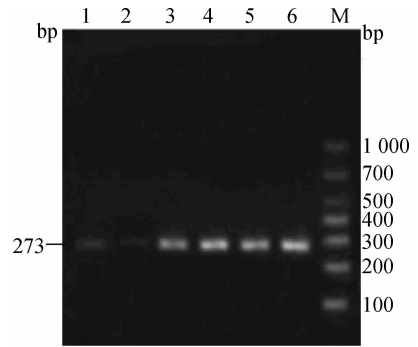
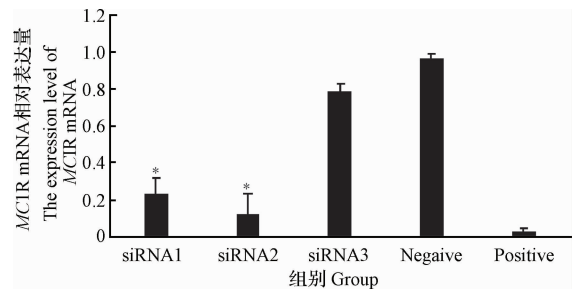


图 3 MC1R 基因 QRT-PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 The electrophoresis photograph of MC1R gene after QRT-PCR amplification

于空白对照组 ($P < 0.05$), siRNA3 和阴性对照组与空白对照组相比差异不显著, siRNA1、siRNA2 2 组与空白对照组相比对 MC1R 基因的抑制率分别为 76.51% 和 87.47% (表 3、图 4),说明基因沉默后的 MC1R 基因在各组细胞中 mRNA 的相对表达量存在明显差异。



*. $P < 0.05$

图 4 MC1R mRNA 在各组细胞中的相对表达量

Fig. 4 The expression level of MC1R mRNA in each group of cells

表 3 QRT-PCR 检测 MC1R mRNA 在各组细胞中的表达量

Table 3 MC1R mRNA level detected by QRT-PCR in each group of cells ($n=3$, means \pm SE)

组别 Group	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	相对表达量 Relative expression	抑制率/% Inhibition ratio
siRNA1	13.58 \pm 0.08	2.09 \pm 0.19	0.24 ^c	76.51
siRNA2	14.49 \pm 0.10	3.00 \pm 0.09	0.13 ^b	87.47
siRNA3	11.84 \pm 0.04	0.35 \pm 0.06	0.79 ^d	21.54
Negative	11.55 \pm 0.03	0.06 \pm 0.02	0.96 ^d	4.07
Positive	6.27 \pm 0.01	5.21 \pm 0.11	0.03 ^a	97.30
Blank	11.49 \pm 0.01	—	—	—

相同小写字母为差异不显著 ($P>0.05$), 不同小写字母为差异显著 ($P<0.05$)。表 4 同

Values with the same small letters indicated no significant difference ($P>0.05$), and with the different small letters indicated significant difference ($P<0.05$). The same as table 4

2.3 RNAi 对小鼠 MC1R 蛋白表达的影响

Western blot 检测各组细胞中 MC1R 蛋白的表达水平。利用 Image-pro plus6.0 软件分析 MC1R 蛋白和内参的蛋白印迹结果, 检测其条带的灰度值以及面积, 结果显示, siRNA1、siRNA2 2 组的 MC1R 蛋白表达量显著低于空白对照组 ($P<0.05$), 如图 5, siRNA1 组与 siRNA2 组之间差异亦

显著 ($P<0.05$), siRNA3 组与空白对照组相比, MC1R 蛋白的表达差异无统计学意义。各组内参照 Tubulin 蛋白表达水平差异不显著 ($P>0.05$)。siRNA1、siRNA2 2 组与空白对照组相比 MC1R 蛋白的表达抑制率分别为 60.53% 和 79.82% (表 4), 说明基因沉默后的 MC1R 基因在各组细胞中蛋白的相对表达量存在明显差异。

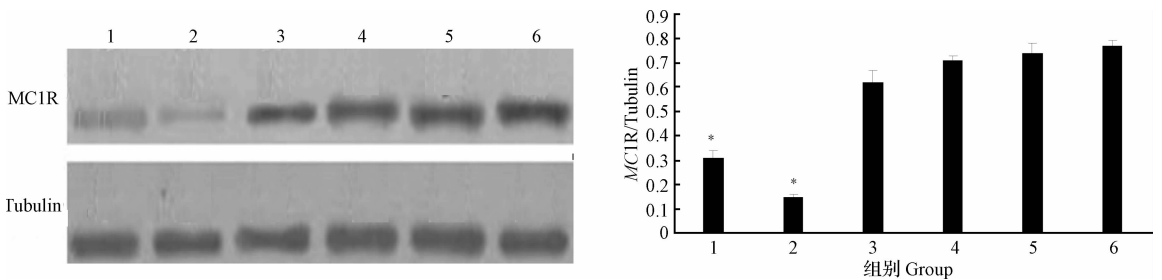


图 5 Western blot 检测各组细胞中 MC1R 蛋白的表达水平

Fig. 5 Protein level of MC1R detected by Western blot in each group of cells

表 4 MC1R 在各组细胞中表达的相对值

Table 4 Relative contents of MC1R in each group of cells ($n=3$, means \pm SE)

组别 Group	条带的灰度强度 ($\times 10^6$) The gray intensity of the bands		MC1R/Tubulin	抑制率/% Inhibition ratio
	MC1R	Tubulin		
siRNA1	9.23 \pm 0.18	30.80 \pm 0.32	0.31 \pm 0.03 ^c	60.53
siRNA2	4.69 \pm 0.13	29.86 \pm 0.35	0.15 \pm 0.01 ^b	79.82
siRNA3	18.77 \pm 0.41	29.54 \pm 0.36	0.62 \pm 0.05 ^a	—
Negative	21.87 \pm 0.20	31.43 \pm 0.32	0.71 \pm 0.02 ^a	—
Positive	22.58 \pm 0.31	30.12 \pm 0.24	0.74 \pm 0.04 ^a	—
Blank	23.15 \pm 0.26	30.52 \pm 0.49	0.77 \pm 0.02 ^a	—

3 讨论

3.1 小鼠 MEF 细胞的培养和转染

经典 siRNA 沉默机制认为,转录后的 siRNA 沉默效应阶段主要发生在细胞质中^[17],但由于 RNAi 转染效率低而成为其发展的瓶颈并限制了其进一步应用^[18]。因此将 siRNA 导入哺乳动物细胞中是诱导 RNAi 发生的关键。为保证高转染效率,本试验选用上海吉玛公司提供的阳离子脂质体 RNAi-Mate 为转染试剂。采用反向转染法(即“Reverse transfection”或“neofection”)进行转染,其特点是不用预先接种细胞,而是先加入转染试剂 siRNA 混合物在培养板上共同温育,然后再加入细胞铺板,培养。本试验发现,siRNA/RNAi-Mate 复合物在转染 siRNA 24 h 后开始吸附于细胞表面,到 48 h 时转染基本完成,该方法的优点是转染效率高,且可节省约 1 d 的时间,其转染效率更高的原因可能是未贴壁细胞在接触转染试剂 siRNA 复合物的表面积更大。

3.2 RNAi 对小鼠 MC1R 表达的影响

RNAi 作为一种新的强有力的研究工具,在功能基因组学中具有重要地位。目前试验证实, RNAi 在哺乳动物细胞中能高效特异地阻断体内特定基因,它进入细胞后与一些蛋白质和酶结合,形成 RNA 诱导沉默复合物 RISC(RNA-induced silencing complex), siRNA 引导此复合物寻找、识别与之互补的 mRNA, siRNA 的反向 RNA 链通过 RISC 的螺旋结构域与目的 mRNA 结合,剪切目的 mRNA,从而阻止目的基因的表达,产生 RNAi 现象^[19]。研究表明,当 siRNA 的靶向裂解部位位于靶基因 mRNA 二级结构中的表面位置,且 siRNA 与 RISC 结合后比较容易进入靶 mRNA 裂解部位,所以干扰效果显著;与此相反, siRNA 的靶向裂解部位均位于靶基因 mRNA 二级结构较复杂处,这可能导致 siRNA 与 RISC 复合物难以进入到靶 mRNA 裂解部位,导致干扰失败^[20]。比较本试验设计的 3 对 siRNA,初步判断 siRNA1 和 siRNA2 均位于 MC1R mRNA 二级结构中的表面位置,所以比较容易进入 MC1R mRNA 裂解部位,因此干扰效果显著,而 siRNA3 的靶向裂解部位均位于 MC1R mRNA 二级结构较复杂处,所以难以进入到 MC1R mRNA 裂解部位,导致干扰失败。

本试验的 QRT-PCR 结果分析表明,基因沉默

后的 MC1R 基因在各组细胞中 mRNA 的相对表达量存在明显差异, siRNA1 组和 siRNA2 组对 MC1R mRNA 抑制率分别为 76.51% 和 87.47%。 siRNA3 和阴性对照组与空白对照组相比差异不显著,说明 siRNA3 对 MC1R 基因干扰效果不明显。阴性对照组与空白对照组相比 MC1R 和 β actin mRNA 表达差异均不显著($P > 0.05$),排除了转染试剂本身以及非特异性靶基因对 MC1R 基因表达的影响;推测 siRNA1 组和 siRNA2 组干扰效果显著可能是因为降低 cAMP/PKA 的信号强度。本试验的 Western blot 结果表明,基因沉默后的 MC1R 蛋白在各组细胞中的相对表达量存在明显差异, siRNA1 组和 siRNA2 组对 MC1R 蛋白的抑制率分别为 69.53% 和 79.82%,说明 siRNA1 和 siRNA2 抑制了 MC1R 基因蛋白的表达,就不能与抑制性的 ASIP/ASP 蛋白结合,也就不能形成黑素体,从而阻断了 MC1R 基因的正常表达。另外,正义链 GC 含量的理想标准是 50%,而 siRNA1 和 siRNA2 (47.62%) 比 siRNA3 (28.57%) 更接近这个理想值,提高了 siRNA1 和 siRNA2 对 MC1R 基因 mRNA 的识别效率。

4 结论

4.1 利用反向转染方法,成功地对外培养的小鼠胚胎成纤维细胞进行了 siRNA 转染,说明反向转染法对 siRNA 转染细胞更有效。

4.2 siRNA1 组和 siRNA2 组对 MC1R 基因的正常表达有显著地抑制效果,说明通过这 2 组 siRNA 作用于 MC1R mRNA 二级结构中不同的靶点位置可以调控 MC1R 基因的表达量。在以后的试验中, siRNA 的设计应该充分考虑到 mRNA 靶点位置这个因素,但 siRNA 的有效性在这个因素中能持续多长时间还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 和琼姬,燕飞,陈剑平. RNA 干扰机制及其主要蛋白因子研究进展[J]. 浙江农业学报, 2011, 23(2): 415-420.
- [2] FIRE A, XU S Q, MONTGOMERY M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.
- [3] BOSHER J M, LABOUESSE M. RNA interference:

- genetic wand and genetic watchdog[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: E31-E36.
- [4] LEI L, DOU L, WANG H Y. The defined siRNAs suppress Nanog and Sox2 expressions in mouse ES cells[J]. *Agric Sci China*, 2011, 10(9): 1475-1481.
- [5] KIJAS J M, WALES R, TÖRNSTEN A, et al. Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs[J]. *Genetics*, 1998, 150(3): 1177-1185.
- [6] WANG G D, CHENG L G, FAN R X, et al. Signature of balancing selection at the MC1R gene in Kunming dog populations[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e55469.
- [7] MIAO Y W, WU G S, WANG L, et al. The role of MC1R gene in buffalo coat color[J]. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(2): 267-272.
- [8] 高荣琨, 陈伟, 区海娥, 等. 黑素皮质素受体 1 (MC1R) 基因与 VC-獭兔毛色关系的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(6): 888-893.
- [9] JOHNSON J A, AMBERS A D, BURNHAM K K. Genetics of Plumage color in the Gyrfalcon (*Falco rusticolus*): analysis of the melanocortin-1 receptor gene[J]. *J Hered*, 2012, 103(3): 315-321.
- [10] 李洪涛, 曾献存, 张文祥, 等. 哈萨克绵羊 MC1R 和 ASIP 基因多态性及表达量与被毛颜色表型相关性的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(3): 366-375.
- [11] 任玉红, 任彬, 范瑞文, 等. 羊驼 MC1R 基因克隆及其在不同毛色个体中表达水平研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(6): 841-845.
- [12] SMITH A G, BOX N F, MARKS L H, et al. The human melanocortin-1 receptor locus: analysis of transcription unit, locus polymorphism and haplotype evolution[J]. *Gene*, 2001, 281(1-2): 81-94.
- [13] 王婷, 刑海权, 曹靖, 等. IGF-1 对羊驼皮肤成纤维细胞作用的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(6): 880-887.
- [14] JOHN P R, MAKOVA K, LI W H, et al. DNA polymorphism and selection at the melanocortin-1 receptor gene in normally pigmented southern African individuals[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 994: 299-306.
- [15] LAMOREUX M L, ZHOU B K, ROSEMBLAT S, et al. The pinkeyed-dilution protein and the eumelanin/pheomelanin switch; in support of a unifying hypothesis[J]. *Pigment Cell Res*, 1995, 8(5): 263-270.
- [16] DENG S H, GAO J, CHEN K F, et al. Studies of the relationship of melanocortin receptor1 (MC1R) gene with coat color phenotype in pigs[J]. *JGG*, 2003, 30(10): 949-954.
- [17] 张超, 庞全海. siRNA 与 miRNA 在生物体基因调控中沉默机制的比较[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(5): 393-398.
- [18] ERFLE H, NEUMANN B, LIEBEL U, et al. Reverse transfection on cell arrays for high content screening microscopy[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2): 392-399.
- [19] HANNON G J. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.
- [20] 王明志, 天文儒, 姜同泉, 等. 小鼠胚胎诱导型 Hsp70 基因的 RNA 干扰有效序列筛选[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(9): 2902-2908.

(编辑 程金华)