

功能 RNA 分子的构建、表达及其在 基因功能鉴定中的应用

范圣此¹, 杨致荣¹, 仲伟方², 李润植¹

(1. 山西农业大学 农业生物工程中心, 中国山西 太谷 030801 ;
2. 扬州大学 动物科学与技术学院, 中国江苏 扬州 225009)

摘要: 人工构建的 siRNAs、aptazymes、maxizymes 以及 intramers 等功能 RNA 分子, 可以在 mRNA 或蛋白质水平上调控基因的功能。功能 RNA 分子可在活体内或转基因模式动、植物中抑制目标基因的表达, 使目标基因和蛋白质功能丧失, 进而引起表型变异。胞内表达的活性 RNAs 可作为有效的研究工具应用于基因及其编码蛋白的功能鉴定, 并在药物开发和人类疾病治疗上有潜在的应用前景。

关键词: 小分子干涉 RNA; 核酶; 蛋白质结合的 RNA 基序

中图分类号: Q34

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)S1-0033-07

Construction, Expression and Application of Functional RNA Molecules in Identification of Gene Functions

FAN Sheng-ci¹, YANG Zhi-rong¹, ZHONG Wei-fang², LI Run-zhi¹

(1. Center for Agricultural Biotechnology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China;
2. Animal Science and Technology College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China)

Abstract: In vivo expression of engineered functional RNA molecules, such as short interfering (si) RNAs, aptazymes, maxizymes and intramers, can regulate gene function at the mRNA or protein level. The present paper discusses new progress in the construction and *in vivo* expression technology of these functional RNAs and their applications. Intracellularly active RNAs can serve as a powerful research tool for the studies on genomics and proteomics, indicating positive potentials in new drug discovery and human disease therapy.

Key words: siRNA; ribozymes; aptamers

(Life Science Research, 2004, 8(4): 033 ~ 039)

随着人类、小鼠、拟南芥和水稻等模式生物全基因组测序工程的实施和相继完成, 已积累了大量的基因组序列数据。如何破译愈来愈多已知基

因组序列所编码的产物和生物学意义, 就构成了功能基因组学和蛋白组学研究的主要内容。因此, 急需建立一种新的研究工具, 可在活细胞环境

收稿日期: 2004-05-20; 修回日期: 2004-10-22

基金项目: 国家教育部归国留学人员科研基金 (2001-11), 国家教育部科技重点项目

作者简介: 范圣此 (1976-), 男, 江苏赣榆县人, 山西农业大学硕士研究生, 主要从事植物分子遗传与基因工程的研究, E-mail: fan-shengci@163.com; 李润植 (1959-), 男, 山西人, 山西农业大学教授, 博士, 通讯作者, 主要从事植物分子遗传与基因工程的研究,

中选择性调控基因表达及基因产物的合成,以便阐明各个基因、蛋白质以及蛋白质网络的生物学功能。

在生物细胞内, RNA 分子的结构和功能具有多样性,除了有编码作用的 mRNA,组成核糖体的 rRNA 和转运氨基酸的 tRNA 外,还发现了许多具有特殊功能的 RNA 分子,例如,小分子干涉 RNA (small interfering RNAs, siRNAs)、与蛋白质结合的 RNA 基序 (aptamers) 以及具催化功能的 RNAs (核酶 (ribozyme), 包括大酶 (maxizyme) 及别构核酶 (aptazymes) 等)。近来的研究表明天然的和人工合成的 siRNA、核酶和 aptamers 等功能 RNA 分子,可作为研究功能基因组学和蛋白质组学的一种有效的、且高度特异的工具^[1,2]。尤其是人工合成的功能 RNAs 应用于这些方面的研究已取得了较大的成效,并建立了活体胞内表达活性功能 RNA 分子的技术体系。这些技术还可用于特异性锚定与疾病相关的转录本,发现药物作用的靶位点,从而能引起人类疾病的药物治疗和基因治疗方法的革新^[3]。

核酶和 RNAi (RNA interfering) 技术,在不直接对目标基因进行遗传操纵的情况下 (即未改变基因组序列),可以使目标基因在转录水平上失活。胞内表达的 RNA aptamers (称作 intramers) 则可用于在蛋白质水平上调控基因的功能^[3-5]。本文综述了这些功能 RNA 分子构建策略、胞内表达功能 RNA 分子的技术体系及其应用于基因组学和蛋白质组学研究的新进展。

1 siRNA 表达系统的构建及其应用

转录后基因沉默是生物体内基因表达调控的一种机制,也是抵御外源入侵的一种措施,它可因病毒感染和外源基因导入等因素诱发^[6]。RNAi 是指双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子特异地使其有同源序列的目标基因发生转录后沉默的现象,它广泛存在于植物、线虫 (*C. elegans*)、果蝇 (*Drosophila*)、涡虫、锥虫、刺胞动物、斑马鱼、小鼠和人类等哺乳动物细胞^[2,7]。小分子干涉 RNA 是由 21~23 个核苷酸组成的双链 RNA,这些核苷酸通过 RNAi 作用抑制其互补序列的哺乳动物基因的表达^[8-10]。较长双链 RNA (> 23 nt) 则常用于植物、线虫、果蝇和其它非哺乳动物细胞内诱导 RNAi。RNAi 的基因沉默技术已愈来愈多地应用于基因功能和基因网络鉴定以

及基因治疗等的研究中^[11]。

近年来,几个不同研究组各自独立地构建 siRNA 表达载体系统,包括质粒和病毒表达载体系统^[12-14]。这些系统能在细胞内稳定地表达 siRNAs。由此建立了高效的对各种哺乳动物细胞中目标基因功能丧失的表型进行快速分析的技术。这种技术也可作为未来培育转基因哺乳动物的一条新途径。

Brummelkamp 等^[12]建立了一种被称为 pSUPER 的 siRNA 表达系统。这一载体系统可使 RNA 的转录处于 RNA 聚合酶 III-H1 启动子的控制下。这个启动子可折叠成所设计的茎-环 (stem-loop) 结构,经过进一步细胞过程后,导致内源 siRNA 大量表达。该系统能在哺乳动物 MCF-7 细胞系中产生内源 siRNAs,进而抑制细胞分裂后期促进复合体 (anaphase-promoting complex) 激活所需的 CDH1 基因的表达。pSUPER 载体能长时间有效介导目标基因表达的稳定抑制,还未检测到任何对细胞产生的毒害效应。

新近设计构建的另一类 siRNA 表达系统——siRNA 表达盒,是在 U6 启动子控制下、具有折叠-茎-环 (fold-back stem-loop) 结构的^[15-18]。Paul 等^[15]应用此类 siRNA 表达系统在 HeLa 细胞系内成功地表达,对编码人类 Lamin A/C 的目标 mRNA 进行了研究。该表达盒编码一个由 19 个碱基对组成的螺旋状 siRNA 的茎,在反义链末端连接有 3'-UUUU 用作终止序列,RNA 有义链和反义链被一个稳定的 UUCG 四体环 (tetraloop) 所连接,从而确保双链 siRNA 在活体内的合成和有效退火。在 HeLa 细胞系中该 siRNA 表达盒的表达,抑制了目标 mRNA 的表达,使胞内 laminA/C 水平明显减少。

为促进两条链的退火和获得 siRNA 分子的高效内源表达, Lee 等进一步构建了包含一个固有连续的茎-环状结构的 siRNA 双链结构的表达盒^[19]。与其他表达系统不同,这种 siRNA 表达盒使用两个独立的 U6 启动子分别控制有义链和反义链,且在两条链的末端连接有一小段 UUUU 序列以终止 RNA 序列的合成。他们的研究表明, siRNA 可作用于编码 HIV-1 Rev 的 mRNA 靶标序列,提高绿色荧光蛋白的表达。Miyagishi 和 Taira^[20]应用相似的策略构建哺乳动物的 siRNA 表达系统,使编码 β -链环蛋白的内源基因发生沉默获得了成功。

McManus 等建立了一种发夹微 RNA (hairin microRNA) 表达体系^[21], 用聚合酶 III_{H1}-RNA 为启动子. 他们用该体系特异地使 CD8 α 基因沉默. 在 HeLa 细胞内, 这种表达载体可与 CD4 和 CD8 α 表达载体一起瞬时表达, 从而可分析被敲低 (knockdown) 基因的影响. 上述这些研究已经证实胞内 siRNA 表达是一种可普遍应用的 RNAi 技术, 并能可靠地抑制目标基因的表达. 胞内 siRNA 的稳定表达不仅能对那些难以用外源 siRNAs 处理的细胞 (例如人类 T- 细胞) 基因进行功能分析, 而且可作为建立新的基因治疗技术的一个新起点, 抑制持久性病毒的感染^[18].

2 核酶表达体系的构建及应用

核酶是一种具有催化功能的 RNA 分子, 它可对目标 mRNA 分子进行特异切割, 使目标 mRNA 功能丧失, 它也可介导突变 RNA 和 DNA 的修复, 它本身亦可直接用作药物. 人们利用核酶来抑制各种细胞、组织和生物体中与治疗相关基因的表达, 分析真核细胞基因的功能以及检测核酶在基因修复中的作用, 都取得了成功.

核酶分子设计和表达载体的不断优化, 极大地改进了核酶切除的有效性、在活细胞中的稳定性、切除位点的选择性和靶标可接近性等^[5, 22, 23]. 1988 年, Haseloff 与 Gerlach 等构建了锤头状的核酶 (hammerhead ribozymes, HHR), 它包括由茎-II (stem-II) 连接的两个保守区段及与特异底物结合的侧翼序列. 1992 年, McCall 对 HHR 进行了改造, 用短的核苷酸链取代茎-II, 获得了仍具有活性的变短的核酶, 称作小酶 (minizyme). 小酶可形成带有普通茎-II 的二聚体, 称为大酶 (maxizyme). 大酶可同时切割两个不同底物或同一底物的两个不同位点^[24]. 大酶比 HHR 短, 且催化活性提高.

由于 mRNA 二、三级结构的复杂性, 通常核酶较难接触到 mRNA 分子上的靶位点. 为了克服这些限制, Taira 等设计出 RNA- 蛋白质杂种核酶, 这种核酶能到达目标 RNA 上的靶位点, 而且不依赖于 RNA 分子的折叠^[25]. 核酶的有效性取决于表达载体的设计. 杂合核酶常应用 RNA 聚合酶 III 为启动子, 含有两个结合底物的臂部序列^[2]. 一些研究表明, 用人的 tRNA^{val} 基因为启动子, 可提高其有效性. 亦有将核酶与 RNA 解螺旋酶结合构建的杂合核酶, 更有利于核酶与靶位点接近, 实行更有效地切割^[26].

可镶嵌在编码人类 tRNA^{val} 基因 3'- 末端的 HHR 常用作激活结构, 启动依赖于 RNA 聚合酶 III 的 RNA 正确表达. 此种 HHR-tRNA 结构可在 3'- 末端与一种细胞质 RNA 传输信号连接, 这种组成型传输因子 (constructive transport elements, CTE) 来自猿猴 D 型逆转病毒的 RNA. 该因子与胞内 RNA 解螺旋酶之间的强烈交互作用可使结合于解螺旋酶的核酶在目标 mRNA 分子上进行结合、滑动和解旋等活动. 这种设计的原理是解螺旋酶在裂解复杂的核糖核酸结构时所提供的引导作用, 从而使核酶准确结合到 mRNA 分子上的切割位点. CTE- 核酶杂合体能结合于 HIV-1 长末端重复 (long teminal reapt, LTR) 区域的 TAR 区和编码小鼠 *Procaspase CPP32* 的 mRNA. CPP32 是核酶难以有效切割的一种结构. 用适宜的质粒表达载体感染小鼠的 NIH3T3 细胞后, 在 RNA 聚合酶 III 控制下, CTE- 核酶杂合结构才能表达. LTR- 驱动的荧光素酶活性的抑制和 *Procaspase-3* 表达水平的定量分析表明: 与仅用核酶对 RNA 分子进行裂解相比, CTE- 核酶杂合结构对目标 mRNA 分子裂解更有效. Yokoyama 等也运用相似的基于编码 tRNA^{val} 基因的 HHR 表达系统来探查作为转录辅助激活剂作用的 P300 和 cAMP 反应因子——主要参与视黄酸诱导的分化、细胞循环关闭以及胚性癌细胞凋亡 (apoptosis)^[27].

胞内表达的核酶与 RNA 解螺旋酶结合构建的杂合核酶技术也用来鉴定参与 Fas 和肿瘤坏死因子- α 介导的编程性细胞死亡途径的基因^[26, 28]. 用于此研究的技术策略是采用替代核酶的结合 mRNA 臂部区域以获得随机序列, 或者通过 poly (A) 结合蛋白 (poly(A) binding protein, PABP) 和 PABP 互作蛋白-1 (PABP-interacting protein-1, PAIP-1) 之间的相互作用, 应用多聚腺苷 (poly A) 基序将解螺旋酶 eIF4A1 连接到核酶上. Kawasaki 等以 HeLa-Fas 细胞系为活体系统, 应用此策略来鉴定参与 Fas 介导的编程性细胞死亡的基因^[26]. 他们先构建编码随机的核酶-poly A 杂合体文库的逆转录病毒载体, 再通过逆转录病毒载体的转染将每一个核酶结合臂上的十个核苷酸随机导入细胞. 从 119 个阳性克隆中, 鉴定到 4 个已知参与 Fas 介导的编程性细胞死亡途径的基因, 他们分别是 Fas 介导的死亡区域蛋白 (Fas-associated death domain protein, FADD), caspases 3, 8 和 9. 该研究应用 poly A 基序有两个优点, 其一有助于

内源 RNA 解螺旋酶 eIF4AI 的复原, 其二可更有效地与目标 mRNA 协同定位。

采用逆转录病毒表达系统, 已稳定地将包括随即结合底物的臂部在内的杂种核酶文库 (hybrid ribozyme libraries), 导入人类乳腺癌培养细胞 (MCF-7) 中。被感染的细胞用重组 TNF- α 和放线菌酮进行处理以诱发 TNF- α 介导的编程性细胞死亡。在处理 72 h 以后, 收集存活的克隆, 分离含有核酶的基因组 DNAs, 用核酶特异引物进行 PCR 扩增, 进一步鉴定所获得的核酶序列。采用这种方法和基因序列数据库检索比较, 可将各种核酶所作用的靶标基因关联序列解读出来。现已鉴定了几个重要基因, 例如, TNF 受体 1 相关的死亡区域 (TNF receptor 1-associated death domain, TRADD), caspase 以及其他在 TNF- α 诱导的编程性细胞死亡中具有前体凋亡功能 (proapoptotic function) 的基因。另外, 用 TNF- α 处理后, 大约 30 种新的目标基因明显减少了编程性细胞死亡。重要的是, Poly A 连接的核酶库产生的假阳性较少。因此, 可以认为这种 Poly A 连接的核酶比不连接有 Poly A 的核酶对基因功能研究更有效。Poly A 连接的核酶有利于 eIF4AI (一种在翻译中应用的解螺旋酶) 的复原, 因而潜在地增加了这些核酶对目标 mRNA 的有效锚定。

3 RNA intramers 的胞内表达与蛋白质功能的鉴定

核酶和 siRNA 技术是通过修饰目标基因的表达模式来鉴定目标基因的功能, 不能证实目标基因所编码蛋白的功能。要正确理解目标蛋白的功能和作用机制, 就需要采用抑制分子来直接识别和抑制目标蛋白。因此, 在活体上直接抑制目标天然蛋白质的技术在蛋白质功能研究上日显重要, 建立特异抑制剂快速鉴定蛋白质功能的方法更是迫切, 以满足后基因组时代对众多蛋白功能研究的日益增长的需要。这种鉴定蛋白质功能的技术应该是: 简便易行、不依赖特定的目标蛋白、易于自动化、与其他分子具有兼容性、识别具有特异性以及适于在细胞中应用等。

Aptamers 是一种与蛋白质结合的 RNA 基序, 其功能是蛋白质专一的结合剂和潜在的抑制剂, 它很容易从含大约 10^{15} 种不同分子的随机核酸文库中分离出来。Aptamers 也可在胞内表达, 并且能通过调控目标蛋白质的生物功能而改变细胞

表型。这些在胞内表达的功能 Aptamers 被称作 Intramers。应用 Intramers 可精确地探查特定分子的功能, 例如, 同源蛋白质的专一性识别^[29]。与单克隆抗体相比, Aptamers 对目标蛋白的亲力和特异性更强, 在胞内表达很小或没有副作用, 也不引起免疫反应。Aptamers 有分子识别功能, 可用作分子感应器 (sensor) 或靶向药物的载体, 也可制成芯片 (microarray) 用于蛋白组学和代谢组学的研究。它也可用作亲和性基质分离蛋白质, 可作为抗体的替代品, 用于诊断学^[29-30]。

Good 等应用 Intramers 抑制 HIV-1 Rev 蛋白的功能。在 RNA 聚合酶 III 的表达载体控制下, 胞内抗 -Rev Aptamers 能有效地抑制培养细胞中 HIV-1 的产生^[31]。Konopka 等用人类巨噬细胞病毒或鲁斯氏肉瘤病毒启动子控制的抗 -Rev DNA Aptamer 表达载体, 感染人类 Hela 细胞, 感染的细胞内 HIV-1 复制明显减少^[32]。

Intramers 也可应用于抑制细胞核和细胞质中的内源蛋白的活性。Thomas 等构建了一个特异结合酵母 RNA 聚合酶 II 的 Aptamer 表达载体, 用 RNA 聚合酶 III 为启动子。该 Aptamer 表达载体导入酵母细胞, 并组成性地表达, 结果导致细胞生长受阻^[33]。这与 RNA 聚合酶 II 低水平表达的酵母突变体生长缺陷表型相似。这种生长缺陷只在体内表达 Intramer 的细胞中观察到, 在那些表达不含 Intramer 的 RNA 的阴性对照细胞中没有发现。B52 是果蝇丝氨酸/精氨酸蛋白质家族的一员, Shi 等构建了一个五聚体 Aptamer, 可直接抑制 B52 的活性^[34]。将该五聚体 Aptamer 插入果蝇多线染色体, 获得了表达 Aptamer 的转基因果蝇。与剔除了 B52 基因的果蝇致死性表型相似, 抗 B52 Intramer 多聚体的表达引起成年转基因果蝇发育减少 50%。相反, B52 的过量表达则导致某些形态缺陷型, 例如在成年动物中缺少唾液分泌腺或刚毛缺失。有趣的是, B52 过量表达所产生的表型能被这种五聚体 Intramer 的表达所逆转, 表明在活体内五聚体 Intramer 行使 B52 的拮抗剂或抑制剂的功能。

Intramers 还可介导细胞质膜蛋白区域功能的修饰, 产生高度特异的细胞效应^[30]。研究表明 Intramers 所识别的是人类 $\alpha_1\beta_2$ 整合蛋白 β_2 亚基的细胞质区域。在免疫和炎症的反应中, 这些异源二聚体的转膜蛋白可介导白细胞附着到内皮细胞上。整合蛋白 α 和 β 链的细胞质区域也被认为

参与了从细胞内部、穿过原生质膜到达细胞外表面的信号传导。这样,激活了 $\alpha_1\beta_2$ 整合蛋白的细胞外区域,进一步可与细胞间粘性分子 (Intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 结合^[35]。用基于重组牛痘病毒的 Intramer 表达系统,以 T7 RNA 聚合酶为启动子,目标 Intramer 在白细胞质中成功地得到表达。由于牛痘病毒的复制只在细胞质中进行, Intramers 的转录也就仅在细胞质中发生。构建两个重组病毒表达载体,其一载有编码 Intramers 的 DNA 序列,其二载有编码 T7 RNA 聚合酶的序列。用这两个重组病毒对细胞进行双重感染,结果引起细胞质内高水平表达 Intramers (图1)^[26]。这些表达体系特异地抑制 $\alpha_1\beta_2$ -整合蛋白介导的、沸波酯刺激的细胞附着在固定的 ICAM-1 分子上。此研究证明, Intramers 可作为一种强有力的工具来调控细胞质膜蛋白区域的功能。

Mayer 等采用于相似的技术策略来特异探测 Cytohesin 1 Sec-7 区域的功能^[36]。Cytohesin-1 是一个胞质信号分子, Sec-7 区域的功能是作为 ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor, ARF) GTP 酶上的一个小的鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF), 参与泡囊运输和细胞粘附的调控^[37]。Aptamer 特异地抑制 GDP-GTP 对 ARF-1 的转化, 这样也就抑制了 ARF-1 在离体条件下的活化。抗 Cytohesin-1/Sec-7 的 Intramer 在 T-细胞的细胞质中表达时, 特异地引起了细胞扩散缺陷表型, 与此同时细胞粘合形成纤连蛋白, F-肌动蛋白发生急剧的重新组合。在 Cytohesin-1 的 GEF 缺失突变体显性失活 (dominant-negative) 表达时, 也观察到同样的效应, 其原因是 Intramer 的活性被抑制。简言之, 将有效选择抑制剂分子和在适宜的细胞体系中正确表达目标分子的技术相结合, 可用于直接检测单个蛋白的功能。

- Viral replication, 病毒复制
- T7 RNA polymerase expression, T7 RNA 聚合酶表达
- Aptamer expression, Aptamer 表达

图1 基于双重感染的 Intramer 表达系统

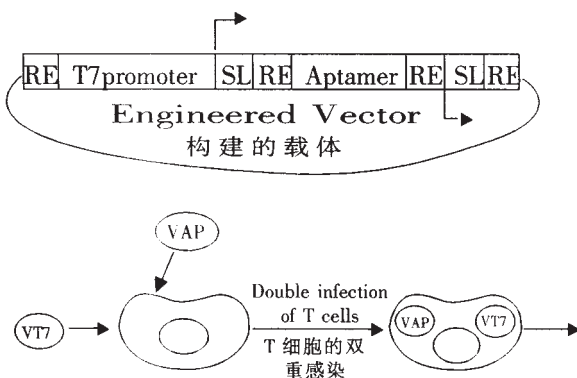
上图为含 T7 启动子的 Aptamer 表达载体; 下图为重组痘苗病毒感染。RE: 限制性酶切点; SL: 稳定茎-环结构; vT7: 表达 T7 RNA 聚合酶的转基因痘苗病毒; vAp: 编码 Aptamer 的转基因痘苗病毒。

在活体细胞内表达 Intramers 存在的一个问题是他们在细胞质中的方向和定位, 这依赖于所要检测的蛋白是细胞质蛋白, 还是内膜蛋白。解决此问题的一条途径是将 Aptamers 与模拟细胞核输出信号的 RNA 序列融合在一起。Hamm 等和 Grimm 等曾描述过这样的 RNA 基序及其在 RNA 选择上的应用^[38-40]。Gwizdek 等^[41] 研究表明腺病毒 VA1 RNA 的核输出基序的末端序列适合作为模拟细胞核输出信号的 RNA 序列, 还鉴定了一种短的微小螺旋基序, 可用作顺式细胞质 RNA 定位信号。

4 展望

本文阐述了功能 RNA 分子胞内表达技术以及它们在功能基因组学中的应用。通过功能丧失表型分析, siRNA 技术在已被广泛应用于探查基因的功能。核酶技术, 尽管其设计和应用较复杂, 在鉴定基因功能也有很大的潜力。如前所述, 带有随机杂交臂的核酶可从头鉴定参与某些关键细胞功能的基因, 如细胞凋亡。与反义 RNA, 同源重组和基因敲除 (knockout) 等技术相比, 由于不对基因组序列进行改造, siRNA 和核酶技术在鉴定参与代谢途径和发育过程中多个基因功能更有效。胞内应用的 Aptamers 的可作为一种直接的生化工具去筛选和获得特异的抑制剂, 这些抑制剂可特异作用于在天然的细胞表达环境中或适宜的细胞内某基因蛋白产物, 可获得通过某个基因单独下游调控所不能得到的有关蛋白质的信息。相信未来能设计出在诱导型内源启动子控制下的 Intramer 表达载体系统, 从而使其准确定位, 便于结合靶分子。

对设计靶标作用分子来说, siRNAs 和应用螺旋酶构建的杂种核酶技术比 Aptamer (Intramer) 技术更简单和更有效。尽管在极短时间内通过自动挑选技术可容易获得 Aptamers, 仍需要采用经典



的生化方法来确定这些 Aptamers 是否是可作为抑制剂。然而, Intramer 技术可提供更有价值的蛋白组信息。因此, 对于目标蛋白分子功能的鉴定、药物作用靶标识别和 新药发现来讲, Intramer 技术是 siRNAs 和应用螺旋酶技术的有益补充。综合应用这些活体表达功能 RNA 分子的技术, 有利于从多种途径探查和更全面地认识基因和蛋白质的功能。

参考文献 (References):

- [1] KUWABARA T, WARASHINA M, TAIRA K. Allosterically controllable maxizymes cleave mRNA with high efficiency and specificity[J]. Trends Biotechnol, 2000, 18(11): 462-468.
- [2] 刘敏, 曹毅, 将彦. 利用 RNAi 技术大规模分析基因功能的研究, 植物学通报, 2002, 19 (4) 491-495.
- [3] BRANCH A D. A good antisense molecule is hard to find[J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23, 45-50.
- [4] ROSSI J J. Ribozymes, genomics and therapeutics[J]. Chem Biol, 1999, 6, 33-37.
- [5] ROSSI J J. Ribozymes to the rescue: repairing genetically defective mRNAs[J]. Trends Genet, 1998, 14(8): 295-298.
- [6] 刘征, 李润植. 转录后基因沉默与抗病毒防卫机制 [J]. 植物生理学通讯, 2001, 37 (6) 274-279.
- [7] 陈忠斌, 于乐成, 王升启. RNA 干扰作用 (RNAi) 研究进展 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18 (6) 525-528.
- [8] ELBASHIR S M, LENDECKEL W, TUSCHL T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev 2001, 15(2): 188-200.
- [9] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836): 494-498.
- [10] TUSCHL T. Functional genomics: RNA sets the standard[J]. Nature, 2003, 421(6920): 220-221.
- [11] QIN X F, AN D S, CHEN I S, et al. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(1): 183-188.
- [12] BRUMMELKAMP, T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296: 550-553.
- [13] CZAUDERNA F, FECHTNER M, AYGUN H, et al. Functional studies of the PI(3) -kinase signaling pathway employing synthetic and expressed siRNA[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(2): 670-682.
- [14] TISCORNIA G, SINGER O, IKAWA M, et al. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(8): 6035-6042.
- [15] PAUL C P, GOOD P D, WINER I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 505-508.
- [16] PADDISON P J, CAUDY A A, BERNSTEIN E, et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(8): 948-958.
- [17] YU J Y, DERUITER S L, TURNER D L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(9): 6047-6052.
- [18] TUSCHL, T. EXPANDING small RNA interference[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 446-448.
- [19] LEE N S, DOHJIMA T, BAUER G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 500-505.
- [20] MIYAGISHI M, TAIRA K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 497-500.
- [21] MCMANUS M T, PETERSEN C P, HAINES B B, et al. Gene silencing using micro-RNA designed hairpins[J]. RNA, 2002, 8(6): 842-850.
- [22] BRAMLAGE B, LUZI E, ECKSTEIN F. Designing ribozymes for the inhibition of gene expression[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(10): 434-438.
- [23] SAMARSKY D, FERBERYRE G, BERTRAND E. Expressing active ribozymes in cells[J]. Curr Issues Mol Biol, 2000, 2(3): 87-93.
- [24] 郭静, 金由辛, 核酶 (Ribozyme) 与 Minizyme、Maxizyme[J]. 生命的化学, 2000, 20 (6) 266-267.
- [25] WARASHINA M, KUWABARA T, KATO Y, et al. RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5572-5577.
- [26] KAWASAKI H, TAIRA K. Identification of genes by hybrid ribozymes that couple cleavage activity with the unwinding activity of an endogenous RNA helicase[J]. EMBO Rep, 2002, 3: 443-450.
- [27] KAWASAKI H, ECKNER R, YAO T P, et al. Distinct roles of the coactivators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation[J]. Nature, 1998, 393(6682): 284-289.
- [28] KAWASAKI H, ONUKI R, SUVAMA E, et al. Identification of genes that function in the TNF-alpha-mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(4): 376-380.
- [29] FAMULOK M, BLIND M, MAYER G. Intramers as promising new tools in functional proteomics[J]. Chem Biol, 2001, 8(10): 931-939.
- [30] BLIND M, KOLANUS W, FAMULOK M. Cytoplasmic RNA modulators of an inside-out signal-transduction cascade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(7): 3606-3610.
- [31] GOOD P D, KRIKOS A J, LI S X, et al. Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei[J]. Gene Ther, 1997, 4

- (1): 45-54.
- [32] KONOPKA K, LEE N S, ROSSI J, *et al.* Rev-binding aptamer and CMV promoter act as decoys to inhibit HIV replication[J]. *Gene*, 2000, 255(2): 235-244.
- [33] THOMAS M, CHEDIN S, CARLES C, *et al.* Selective targeting and inhibition of yeast RNA polymerase II by RNA aptamers[J]. *J Biol Chem* 1997, 272(44): 27980-27986.
- [34] SHI H, HOFFMAN B E, LIS J T. RNA aptamers as effective protein antagonists in a multicellular organism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(18): 10033-10038.
- [35] KOLANUS W, ZEITLMANN L. Regulation of integrin function by inside-out signaling mechanisms[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1998, 231: 33-49.
- [36] MAYER G, BLIND M, NAGEL W, *et al.* Controlling small guaninenucleotide-exchange factor function through cytoplasmic RNA intramers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(9): 4961-4965.
- [37] JACKSON C L, CASANOVA J E. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine- nucleotideexchange factors[J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10: 60-67.
- [38] HAMM J, HUBER J, LUHRMANN R. Anti-idiotypic RNAs selected with an anti-nuclear export signal antibody is actively transported in oocytes and inhibits Revand cap-dependent RNA export[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24): 12839-12844.
- [39] HAMM J, FORNEROD M. Anti-idiotypic RNAs that mimic the leucine-rich nuclear export signal and specifically bind to CRM1/exportin 1[J]. *Chem Biol*, 2000, 7: 345-354.
- [40] GRIMM C, LUND E, DAHLBERG J E. Selection and nuclear immobilization of exportable RNAs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24): 10122-10127.
- [41] GWIZDEK C, BERTRAND E, DARGEMONT C, *et al.* Terminal minihelix, a novel RNA motif that directs polymerase III transcripts to the cell cytoplasm. Terminal - minihelix and RNA export[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 25910-25918.