

# siRNA 对 SGC7901/VCR 细胞 *mdr1* 基因沉默效果的影响因素分析

高福莲<sup>1,2</sup>, 朱晓燕<sup>1</sup>, 王峰<sup>1</sup>, 吴景兰<sup>1</sup>, 张钦宪<sup>1</sup>

**Analysis of Influence Factors on siRNA Efficacy Silencing *mdr1* Gene in SGC7901/VCR Cells**

GAO Fu-lian<sup>1,2</sup>, ZHU Xiao-yan<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>1</sup>, WU Jing-lan<sup>1</sup>, ZHANG Qin-xian<sup>1</sup>

1. Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Henan Key Laboratory of Molecular Medicine, Zhengzhou 450052, China; 2. Xinxiang Medical College

Corresponding Author: ZHANG Qin-xian

**Abstract:** **Objective** To analyze the influence factors on siRNA efficacy silencing *mdr1* gene in human gastric cancer SGC7901/VCR cells. **Methods** Four siRNAs (*mdr1*si326, *mdr1*si1513, *mdr1*si2631 and *mdr1*si3071) specifically targeting *mdr1* gene were designed and synthesized by in vitro transcription. The silencing efficacy of the four siRNAs was evaluated with RT-PCR for *mdr1* mRNA expression, immunoblotting for P-glycoprotein (P-gp, MDR1) expression, flowcytometry for adriamycin (ADR) accumulation and MTT for sensitivity to ADR after transfection into SGC7901/VCR cells with respective siRNAs. The molecular biology software was used to analyze the influence factors on siRNA efficacy. **Results** The targeting sequences of *mdr1*si326 with best and *mdr1*si2631 with better efficiency encoded the cross membrane region of P-gp and had no any stalk or loop, while those of *mdr1*si3071 with lower and *mdr1*si1513 with lowest efficacy encoded intracellular region of P-gp and the former had stalk and loop in itself. Besides, the targeting sequences of *mdr1*si326 with best and *mdr1*si2631 with better efficiency had less numbers of base matched pairs or hydrogen bonds in the targeting sites and surrounding sites. There was no correlation between the gene silencing and the A/U number at the 3' or 5' end of siRNA, neither N<sub>1</sub>/N<sub>19</sub> or the number of G/C. **Conclusion** The efficacy of siRNA to *mdr1* gene in human gastric cancer SGC7901/VCR cells had close relationship with local RNA target structure.

**Key words:** siRNA; *mdr1* gene; SGC7901/VCR cells; Gene silencing efficacy; siRNA design

**摘要:**目的 分析 siRNA 沉默人胃癌 SGC7901/VCR 细胞 *mdr1* 基因效果的相关因素。方法 设计并体外转录合成 4 条靶向 *mdr1* 的 siRNA (*mdr1*si326、*mdr1*si1513、*mdr1*si2631 和 *mdr1*si3071), 转染 SGC7901/VCR 细胞, 用 RT-PCR 和免疫印迹检测 *mdr1* mRNA 和 P-gp 的表达、流式细胞仪检测细胞内阿霉素的蓄积和 MTT 法检测细胞对阿霉素的敏感性, 综合这 4 方面结果评价 4 条 siRNA 的沉默效果情况; 用分子生物学软件分析 siRNA 沉默效果的影响因素。结果 沉默效果最好的 *mdr1*si326 和较好的 *mdr1*si2631 靶序列编码 P-gp 的跨膜区而且自身无茎和环; 沉默效果较差的 *mdr1*si3071 和最差的 *mdr1*si1513 靶序列编码 P-gp 的胞内区, 前者自身成茎和成环。沉默效果最好的 *mdr1*si326 和较好的 *mdr1*si2631 靶序列在靶位点和靶位点外间有较少的碱基配对和氢键。siRNA 的沉默效果与 siRNA 3' 5' 端 3 个碱基中的 A/U 数量、N<sub>1</sub> 和 N<sub>19</sub>、GC 含量间无规律可循。结论 siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 *mdr1* 的效果与靶序列的结构关系密切。

**关键词:** 小分子干扰 RNA; *mdr1* 基因; SGC7901/VCR 细胞; 基因沉默效果; siRNA 设计

**中图分类号:** R73-36<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2006)03-0151-05

## 0 引言

众多研究表明, 靶向同一基因 mRNA 不同靶点的 siRNA, 封闭基因表达的效果明显不同<sup>[1-3]</sup>, 判断不同靶点的 siRNA 沉默基因效果的手段是实验。本研究设计了以 *mdr1* 为靶标的 4 条 siRNA, 从其对人胃癌多药耐药 SGC7901/VCR 细胞 *mdr1* 的

收稿日期: 2005-06-20; 修回日期: 2005-09-29

基金项目: 河南省重大科技攻关资助项目(0222031300)

作者单位: 1. 450052 郑州大学基础医学院组胚教研室, 河南省分子医学重点学科开放实验室; 2. 新乡医学院

通讯作者: 张钦宪

作者简介: 高福莲(1963-), 女, 博士研究生, 副教授, 主要从事消化道肿瘤分子细胞生物学研究

mRNA、P-gp 表达、P-gp 功能和阿霉素耐药性逆转角度,综合评定各条 siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 *mdr1* 的效果,用分子生物学软件分析沉默效果的影响因素,以助于选择引发高效 RNAi 的 siRNA 靶序列。

## 1 材料和方法

### 1.1 siRNA 的设计和合成

按 Tuschl 等的 siRNA 靶序列设计原则<sup>[4]</sup>,对 GenBank 中最新的 *mdr1* cDNA 全长序列(登录号 NM\_000927.3)设计并选定潜在靶点 16 个;结合潜在靶点的位置和结构等因素,选准 4 个靶序列,用 T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express RNAi System(Promega),体外转录合成 siRNA,分别为 *mdr1*si326、*mdr1*si1513、*mdr1*si2631 和 *mdr1*si3071。

### 1.2 siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 *mdr1* 效果的检测

培养人胃癌耐药 SGC7901/VCR 细胞(第四军医大学西京医院消化病研究所樊代明教授惠赠)和其亲本 SGC7901 细胞(本研究室保存)于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640、37℃、5% CO<sub>2</sub> 中。SGC7901/VCR 的培养液中加入 VCR 0.5~1.0μg/ml,以维持其耐药表型,在实验前撤除 VCR 2 周。用 CodeBreaker<sup>TM</sup> siRNA 转染试剂(Promega),分别将 siRNA 以 20nmol 的终浓度转染 SGC7901/VCR 细胞,48h 或 72h 后收获细胞进行检测,实验重复 3 次。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.5 进行统计学分析,组间比较采用配对 *t* 检验和方差分析,率的比较用行  $\chi^2$  列表的  $\chi^2$  检验,水准  $\alpha = 0.05$ 。实验分 7 组,(1)对照组:SGC7901/VCR 细胞,PBS;(2)转染试剂组:转染试剂 + PBS;(3) *mdr1*si326 组:转染试剂 + *mdr1*si326;(4) *mdr1*si1513 组:*mdr1*si1513;(5) *mdr1*si2631 组:*mdr1*si2631;(6) *mdr1*si3071 组:*mdr1*si3071;(7) SGC7901 组:SGC7901 细胞,PBS。检测项目如下:

1.2.1 RT-PCR 用 TRIzol 试剂(Gibco BRL 产品)按说明书提取转染 24h 后的细胞总 RNA,紫外分光光度法测定 RNA 的纯度和浓度,电泳判定 RNA 的完整性。取总 RNA 4.2μg,用上海生物工程公司的 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。用 PRIME 5.0 设计 *mdr1* (NM\_000927) 和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin, NM\_001101)引物,由上海生物工程公司合成。*mdr1* 引物上游序列为 5'-tgactaccagctcgcgaatgat-3',下游为 5'-tgtgccaccaagtaggctccaaa-3',扩增片段跨越 3 个内含子,产物 457bp。 $\beta$ -actin 引物上游序列为 5'-tctctgtggcatccacgaaact-3',

下游为 5'-gaagcatttgcggtggacgat-3',产物 314bp。取 5μl cDNA,用上海生物工程公司的 PCR 扩增试剂盒进行 PCR,体系 25μl。目的和内参引物同时加入,同管扩增。以 pUC19 DNA/Msp 作参照,取 5μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,以 *mdr1* 和  $\beta$ -actin 的比值进行 *mdr1* 基因 mRNA 表达水平的半定量分析。

1.2.2 免疫印迹 用 TRIzol 试剂(Gibco BRL 产品)按说明书,从分离 RNA、沉淀 DNA 后的有机相提取蛋白质,用考马斯亮蓝 G-250 标准曲线法测定其浓度。以每泳道 50μg 总蛋白,进行 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。按预染蛋白分子量标志物标记,切取分子量在 120~215kDa 和 36~47kDa 之间的凝胶,用水浴式电转移将蛋白转移到硝酸纤维素膜上。0.3% Triton X-100 的 TBS 复性蛋白质,5% 脱脂奶粉封闭;转移上 120~215kDa 之间蛋白的硝酸纤维素膜,依次和兔抗人 P-gp (MDR1) 多克隆抗体(Santa Cruz 产品,1:100)、羊抗兔生物素标记抗体(1:200)和 SABC(1:200)孵育;转移上 36~47kDa 之间蛋白的膜,依次和 actin Ab-5 (NeoMarkers 产品,1:400)、羊抗鼠 HRP 标记抗体(1:2000),DAB 显色。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞内阿霉素蓄积 常规消化收取转染 siRNA 48h 细胞,调节细胞密度为  $(1 \sim 2) \times 10^5$ /ml,在 6 孔板培养 24h。加入阿霉素使终浓度达 10μg/ml,作用 90min 后收获细胞。4 PBS 洗涤细胞,75%乙醇固定,重悬于冷 PBS 中,上样行流式细胞仪检测,接收波段为 FL2 (564~606nm)。每样本检测  $1 \times 10^4$  个细胞。不加阿霉素作为空白对照,进行 3 次独立实验,每次 3 复孔。

1.2.4 MTT 法检测阿霉素敏感性 收获转染 siRNA 48h 的细胞,按每孔  $2 \times 10^4$  铺入 96 孔培养板,培养 24h 后,加入不同浓度的阿霉素(ADR),继续培养 48h,按常规方法依次加入 MTT、二甲基亚砜,在酶标仪上测定各孔的吸光度  $A_{492}$ 。每种药物浓度接种 3 复孔,设立只加 PBS 的细胞对照和无细胞的试剂对照。用对照组和药物组  $A_{492}$  分别减去试剂组  $A_{492}$ ,得出校正对照组和药物组  $A_{492}$ ,计算存活率(存活率 = 校正药物组  $A_{492}$  / 校正对照组  $A_{492}$ )。用 Origin 7.0 软件,绘制剂量生存曲线,求出肿瘤细胞对 ADR 的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。按以下公式计算相对逆转效率:相对逆转效率 =  $(IC_{50} A - IC_{50} B) / (IC_{50} A - IC_{50} C)$ ,其中 IC<sub>50</sub> A 是 SGC7901/VCR 细胞的 IC<sub>50</sub>,IC<sub>50</sub> B 是转染 siRNA 或转染试剂的 SGC7901/VCR 细胞的 IC<sub>50</sub>,IC<sub>50</sub> C 是 SGC7901 细胞的 IC<sub>50</sub>。

### 1.3 siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 效果的影响因素的获取

在 GenBank 用 Blast Research 软件,对 mdr1 si326、mdr1 si1513、mdr1 si2631 和 mdr1 si3071 进行全基因组比对和序列同源分析,获取 mdr1 si326、mdr1 si1513、mdr1 si2631 和 mdr1 si3071 靶序列位置。用 DNASIS 软件,预测 mdr1 cDNA 的二级结构,查出靶位点自身成茎成袢、和靶位点外碱基配对数及氢键数。用 Ambion 公司的 siRNA 设计程序,获取 siRNA 的正义链 5 和 3 末端碱基的种类和 GC 含量等。

## 2 结果

### 2.1 siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 的效果

SGC7901/VCR 细胞转染 siRNA 48 h 后,mdr1 基因 mRNA 表达均下降 ( $P < 0.05$ ),均未达到亲本 SGC7901 细胞水平,见图 1,mdr1 si326 组下降 58%、mdr1 si2631 组下降 51%,二者差别不大 ( $P > 0.05$ );mdr1 si1513 组下降 26%、mdr1 si3071 组下降 36%,二者差别也不大 ( $P > 0.05$ ),mdr1 si326 或 mdr1 si2631 组和 mdr1 si1513 或 mdr1 si3071 组间差别较大 ( $P < 0.05$ )。72h 后,免疫印迹显示,见图 1,P-gp 的表达减少,以 mdr1 si326 组的变动最明显。

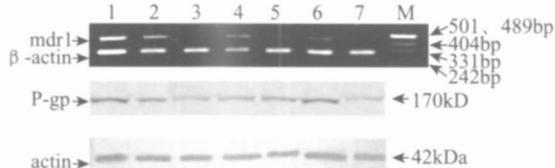


图 1 siRNA 对胃癌耐药细胞 mdr1 mRNA 和 P-gp 的影响  
泳道 1 为对照组;泳道 2 为转染试剂组;泳道 3、4、5 和 6 分别为 mdr1 si326、mdr1 si1513、mdr1 si2631 和 mdr1 si3071 组;泳道 7 为 SGC7901 组;M 为 Marker

SGC7901/VCR 细胞转染 siRNA 48h 后,见表 1,细胞内阿霉素荧光阳性率明显增加,各组间的差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );阿霉素特异性荧光

强度增强 ( $P < 0.05$ ),除 mdr1 si1513 和 mdr1 si3071 组间外,mdr1 si326 组与 mdr1 si2631 组之间、mdr1 si2631 组与 mdr1 si1513 或 mdr1 si3071 组间的差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞对阿霉素的  $IC_{50}$  减少 ( $P < 0.05$ ),mdr1 si2631 组明显低于 mdr1 si326 组 ( $P < 0.05$ ),mdr1 si326 组也低于 mdr1 si3071 组 ( $P < 0.05$ )。相对逆转率增加,mdr1 si2631 组最高,mdr1 si326 组其次 ( $P < 0.05$ ),mdr1 si1513 组和 mdr1 si3071 组的差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

4 条 siRNA 均能不同程度逆转 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 介导的多药耐药,综合组间差别进行统计学处理下的 mRNA、P-gp 表达水平及 P-gp 功能和阿霉素耐药逆转程度的结果,得出:mdr1 si326 沉默 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 效果最好,mdr1 si2631 其次,mdr1 si3071 较差,mdr1 si1513 最差。

### 2.2 siRNA 沉默 mdr1 效果和沉默效果影响因素的关系

siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 的效果和靶位点在 mdr1 cDNA 序列的次序性,见表 2。覆盖外显子的数量、同源性大小及编码 P-gp 的功能位点之间无规律可循,沉默效果最好的 mdr1 si326 和较好的 mdr1 si2631 靶位点均编码 P-gp 的跨膜区,而沉默效果较差的 mdr1 si3071 和最差的 mdr1 si1513 靶位点均编码 P-gp 的胞内区,见表 3。

siRNA 沉默效果较差的 mdr1 si3071 有自身成茎和成袢。在自身无茎和袢的 mdr1 si326、mdr1 si1513 和 mdr1 si2631 靶位点中,沉默效果最好的 mdr1 si326 和较好的 mdr1 si2631 的靶位点和靶位点外碱基配对和氢键的数较少,沉默效果较差的 mdr1 si1513 的靶位点和靶位点外碱基配对和氢键的数较多,见表 4。

siRNA 的 mdr1 沉默效果与 3',5' 端 3 个碱基中的 A/U 数量差异、 $N_1$  和  $N_{19}$  的差异、GC 含量间无规律可循,见表 5。

表 1 siRNA 转染后细胞内阿霉素蓄积和细胞对阿霉素敏感性的变动

组别	细胞内阿霉素蓄积		细胞对阿霉素敏感性	
	阿霉素特异性荧光强度	阳性率 (%)	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	相对逆转率 (%)
对照	6.25 ± 35.48 <sup>#</sup>	22.04	490.78 ± 87.47 <sup>#</sup>	
转染试剂	7.11 ± 46.78 <sup>#</sup>	25.20	501.34 ± 54.25 <sup>#</sup>	4.19 ± 9.63
mdr1 si326	39.45 ± 38.79 <sup>*#</sup>	97.85	257.36 ± 68.38 <sup>*#</sup>	51.51 ± 13.23
mdr1 si1513	29.33 ± 36.94 <sup>*#</sup>	83.05	318.03 ± 23.90 <sup>*#</sup>	39.96 ± 4.29
mdr1 si2631	34.63 ± 107.35 <sup>*</sup>	95.98	12.19 ± 2.06 <sup>*</sup>	98.12 ± 0.26
mdr1 si3071	29.55 ± 40.53 <sup>*#</sup>	91.68	358.71 ± 20.66 <sup>*#</sup>	32.06 ± 6.73
SGC7901	35.38 ± 20.57 <sup>*</sup>	94.63	2.17 ± 0.40 <sup>*</sup>	

注: \* 和对照组比较,  $P < 0.05$ ; # 和 SGC7901 组比较,  $P < 0.05$

表 2 siRNA 的靶序列及其 mdr1 mRNA 位置和沉默效应

siRNA	靶序列 5' 3'	NM_000927.3	读码框	沉默效果
mdr1 si326	AA GACATGACCA GGTA TGCC	744 ~ 764	326 ~ 346	最好
mdr1 si1513	AA GGAA GCCAA TGCCTA TGAC	1931 ~ 1951	1513 ~ 1533	最差
mdr1 si2631	AA TGTGTCTGGACAA GCACT	3049 ~ 3069	2631 ~ 2651	较好
mdr1 si3071	AA GGCCTAATGCCGAACACAT	3489 ~ 3509	3071 ~ 3091	较差

表 3 siRNA 靶点和外显子、同源性及编码 P-gp 的关系与其沉默效应

siRNA	外显子	同源性		编码 P-gp		沉默效果
		物种	mdr1	分布部位	功能位点	
mdr1 si326	5、6	人	mRNA	第 1 跨膜区	无	最好
mdr1 si1513	13	人、其他	基因、mRNA	第 2 胞内区	无	最差
mdr1 si2631	21	人、其他	Gene、mRNA	第 2 跨膜区	无	较好
mdr1 si3071	24、25	人	mRNA	第 3 胞内区	无	较差

表 4 siRNA 靶点的结构和沉默效应

siRNA	自身成茎	自身成袂	靶点和其外配对碱基	碱基配对总数	氢键数	沉默效果
mdr1 si326	无	无	A G,CA,ACCAG,CC	11	26	最好
mdr1 si1513	无	无	AA,CCAAU,CC,AU GAC	14	36	最差
mdr1 si2631	无	无	GA, GU,GG,ACAA	10	25	较好
mdr1 si3071	GCC	UAAU	A	9	9	较差

表 5 合成 siRNA 的序列和 3',5' 端特征与其沉默效应

siRNA	正义链 5' 3'	A/U 含量		反义链 5' 3'	GC 含量	沉默效果
		5 bp	3 bp			
mdr1 si326	GACAU GACCA GGU AU GCCUUU	1	3	A GGCAU ACCU GGUCAU GUCUU	47.6 %	最好
mdr1 si1513	GGAA GCCAAU GCCU AU GACUU	1	2	GUCAU GGCAU UGGCU UCCUU	47.6 %	最差
mdr1 si2631	U GUU GUCU GGACAA GCACUUU	2	3	A GU GCUU GUCCA GACAACAUU	42.9 %	较好
mdr1 si3071	GGCCUAAU GCCGAACACAUU	0	3	AU GU GUUCGGCAUUA GGCCUU	47.6 %	较差

### 3 讨论

mdr1 为最早认识的、人类 mdr 基因家族中唯一有功能的耐药基因, P-gp 为药物外排泵, 参与肿瘤的多药耐药。P-gp 跨细胞膜分布, 分为胞内 3 段和跨膜疏水区 2 个, 跨膜疏水区有 11 个药物结合位点, 第 2、3 胞内段各包含 2 个 ATP 结合位点<sup>[5,6]</sup>。siRNA 是哺乳动物细胞 RNAi 的触发者<sup>[7]</sup>, 选择沉默效果好的 siRNA 对进行哺乳动物细胞 RNAi 的研究十分重要。由于 mdr1 基因经转录、剪切形成 mRNA 的读码框长达 3 840bp, 符合 Tuschl<sup>[4]</sup>等的设计原则的 mdr1 cDNA 位点有 16 条; 同一基因 mRNA 的不同靶点, 封闭基因表达的效果明显不同<sup>[1-3]</sup>, 这使选定靶向 mdr1 的 siRNA 靶序列十分困难。为使设计的 siRNA 具有明显的沉默 mdr1 效果, 本研究结合靶点的位置和结构等因素, 选准 4 个靶点, 实验证实靶向它们的 siRNA 均能封闭 mdr1 的表达, 但封闭效果有别。这种位置效应可能和蛋白因子的竞争结合、热动力学稳定性和序列依赖的 RNA 诱导沉默复合物形成等因素有关<sup>[8]</sup>。本研究中, 选择的靶点位于始密码 325bp 后, 避免了转录

因子等的竞争结合; 在考虑到其他位置因素中, siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 效果和靶位点在 mdr1cDNA 序列的次序性、覆盖外显子的数量、同源性大小及编码蛋白质的功能位点之间无规律可循; 靶向编码 P-gp 的跨膜区位点的 siRNA 较编码 P-gp 的胞内区的效果好。mdr1cDNA 序列的次序性方面和 Celius 等<sup>[9]</sup>的研究结果一致, 靶向编码 P-gp 的分布部位方面和 Celius 的有异, Celius 等用靶向 mdr1 基因 mRNA 的 4 条 siRNA, 转染人大肠癌耐药 Caco-2 细胞, 筛选出 2 条高效的 siRNA, 其序列靶向编码 P-gp 的第 1 跨膜区和第 3 胞内区。提示靶向 mdr1 siRNA 沉默基因效果和靶向编码 P-gp 的分布部位之间有无关系, 有待进一步研究。

用 DNASIS 软件预测二级结构, mdr1cDNA 的读码区广泛存在成茎和成袂现象, 查找对比选准的 4 条靶序列, 发现他们为成茎、成袂数量尽可能少和成茎尽可能短的部位。本研究显示, siRNA 沉默 SGC7901/VCR 细胞 mdr1 的效果和靶位点的结构有关, 靶序列自身成茎和成袂者, 沉默效果较差; 靶序列和靶序列外碱基配对多者, 形成氢键的数量多

者,沉默效果也差,和 Schubert、Luo、Overhoff<sup>[10-12]</sup>的研究相符。

有研究认为 siRNA 正义链 5 和 3 末端 3bp 中的 A/U 含量和功能相关,有功能的序列 3 末端 3bp 中的 A/U 含量高于 5 末端,U<sub>1</sub>和 G<sub>19</sub>序列常常没有功能,G/C<sub>1</sub>和 U/A<sub>19</sub>和功能相关<sup>[13-15]</sup>。本研究中,4 条 siRNA 的 3 末端 3bp 中的 A/U 含量高于 5 末端,AA 后没有一条为 U<sub>1</sub>和 G<sub>19</sub>序列,和他人研究一致,但 siRNA 沉默效果和 3 5 端 3 个碱基中的 A/U 数量差异,G/C<sub>1</sub>和 U/A<sub>19</sub>序列无一致性,有待进一步探讨。siRNA 的 GC 含量和功能密切相关,主要参与双链的解旋、靶向识别和杂交等过程<sup>[16]</sup>,本实验证实有沉默效果的 4 条 siRNA 中,GC 含量在 42.9%~47.6%之间,GC 含量和沉默效果之间无规可循,和筛选中严格限制了 GC 含量有关,类似于 Amarzguioui 等<sup>[13]</sup>的研究结果。

本研究提示:在 siRNA 靶序列设计和选择中,除了遵守 Tuschl 等的设计原则外,还应考虑靶序列的位置、靶序列结构、siRNA 的正义链 5 和 3 末端碱基的种类,尤其是靶序列结构,尽可能选择自身无成茎和成环现象、靶序列和靶序列外碱基配对和氢键的数量最少的部位。

#### 参考文献:

- [1] Holen T, Amarzguioui M, Wiiger MT, et al. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30 (8): 1757-1766.
- [2] Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Journal of Cell Science*, 2001, 114 (Pt 24): 4557-4565.
- [3] Phipps KM, Martinez A, Lu J, et al. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: in vitro potency, specificity, and mechanism[J]. *Antiviral Research*, 2004, 61 (1): 49-55.
- [4] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *Methods*, 2002, 26 (2): 199-213.
- [5] Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42(7): 1007-1017.
- [6] Loo TW, Clarke DM. Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (50): 39272-39278.
- [7] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W. Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [8] Kretschmer-Kazemi FR, Sczakiel G. The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(15): 4417-4424.
- [9] Celius T, Garberg B, Lundgren. Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 324 (1): 365-371.
- [10] Schubert S, Grunweller A, Erdmann VA, et al. Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: Systematic Analysis of Intentionally Designed Binding Regions[J]. *J Mol Biol*, 2005, 348(4): 883-893.
- [11] Luo KQ, Chang DC. The gene-silencing efficiency of siRNA is strongly dependent on the local structure of mRNA at the targeted region[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 318(1): 303-310.
- [12] Overhoff M, Alken M, Far RK, et al. Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: A Systematic Global Analysis[J]. *J Mol Biol*, 2005, 348(4): 871-881.
- [13] Amarzguioui M, Prydz H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 316(4): 1050-1058.
- [14] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias[J]. *Cell*, 2003, 115 (2): 209-216.
- [15] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex [J]. *Cell*, 2003, 115 (2): 199-208.
- [16] Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(19): 2497-2508.

[编辑:周永红]