

· 论 著 ·

靶向胰腺癌细胞株增殖诱导配体基因小干扰 RNA 的制备及纯化

毛振彪^{1*}, 邵建国^{2△}, 王唯一¹, 谭 畅³, 黄伟达³, 黄介飞¹

(1. 南通大学附属医院消化内科, 南通 226001; 2. 南通市第三人民医院消化内科, 南通 226006; 3. 复旦大学生命科学院生物化学系, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 制备及纯化针对增殖诱导配体基因(APRIL)的小干扰 RNA(APRIL siRNA), 为进一步研究 APRIL 基因在胰腺癌中的作用奠定基础。**方法:** 构建靶向胰腺癌 CFPAC-1 细胞株 APRIL 基因双链 RNA(APRIL dsRNA) 的表达质粒 pET-22b-APRIL, 在大肠杆菌中发酵表达 APRIL dsRNA, 并利用 CF-11 树脂亲和层析纯化; 用大肠杆菌 III 型 RNA 水解酶(RNase III) 水解 dsRNA, 制备 APRIL siRNA, 应用 DEAE 树脂离子交换层析使 RNase III 与核苷酸分离, 分子筛层析进一步分离纯化 APRIL siRNA。将纯化后的 APRIL siRNA 转染 CHO 细胞, 荧光显微镜下观察转染后 CHO 细胞 APRIL 蛋白的表达情况。**结果:** pET-22b-APRIL 转染大肠杆菌后, 经 IPTG 诱导能大量表达 APRIL dsRNA, 表达产物经 CF-11 树脂纯化能得到纯化的 APRIL dsRNA; dsRNA 经 RNase III 水解后, 过 DEAE 树脂离子交换层析柱, 经 5% PAGE、12% SDS-PAGE 电泳证实 RNase III 与核苷酸分离, 进一步经分子筛层析分离纯化, 得到纯化 APRIL siRNA。荧光显微镜下观察结果表明, APRIL siRNA 转染 CHO 细胞能明显抑制 APRIL 蛋白的表达。**结论:** 成功制备了靶向 CFPAC-1 细胞株的 APRIL siRNA, 为下一步敲减 CFPAC-1 细胞 APRIL 基因的研究奠定了基础。

[关键词] 增殖诱导配体; RNA 干扰; 胰腺肿瘤; 体外转录法

[中图分类号] R 735.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)08-0827-06

Preparation and purification of siRNA targeting a proliferation-inducing ligand of pancreatic cancer cell line

MAO Zhen-biao^{1*}, SHAO Jian-guo^{2△}, WANG Wei-yi¹, TAN Chang³, HUANG Wei-da³, HUANG Jie-fei¹ (1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China; 2. Department of Gastroenterology, The 3rd People's Hospital of Nantong, Nantong 226006; 3. Department of Biochemistry, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare and purify siRNA targeting a proliferation-inducing ligand targeted (APRIL-siRNA), so as to provide a basis for studying the role of APRIL in human pancreatic cancer. **Methods:** pET-22b-APRIL was constructed to express APRIL dsRNA of human pancreatic cancer cell line CFPAC-1 in *E. coli* and the product was purified by chromatography using CF-11 column. APRIL dsRNA was digested by RNase III to prepare APRIL siRNA, then the reaction mixture was loaded onto a DEAE ion exchange chromatography to remove RNase III from oligonucleotides, and size exclusion chromatography was used to purify 21 bp siRNA. The purified APRIL siRNA was used to transfect Chinese hamster ovary (CHO) cells and the expression of APRIL in CHO cells was observed under fluorescence microscope. **Results:** APRIL dsRNA was successfully expressed in *E. coli* after IPTG induction and was purified by CF-11 column. dsRNA was hydrolyzed with RNase III and was purified by DEAE ion exchange chromatography and size exclusion chromatography. 15% nondenaturing PAGE and 12% SDS-PAGE confirmed that RNase III was removed from oligonucleotides and 21 bp siRNA was purified with size exclusion chromatography. It was also found that APRIL siRNA obviously depressed APRIL expression in CHO cells. **Conclusion:** We have successfully constructed APRIL siRNA targeting APRIL gene of CFPAC-1 cells with *in vitro* transcription, which provides a basis for knock-down of APRIL gene in CFPAC-1 cells.

[KEY WORDS] proliferation-inducing ligand; RNA interference; pancreatic neoplasms; *in vitro* transcription

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(8): 827-832]

增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL) 是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族的新成员, 在体内和体外均能刺激肿瘤细胞生长, 与肿瘤生长的调节关系密切。前期研究^[1-2]发现 APRIL 在胰腺癌细胞株和胰腺癌组织中有异常高表达现象, 但其确切的上调机制尚不明确, 有必要进一步观察其在胰腺癌发生中的可能机

[基金项目] 江苏省社会发展基金(BS2005029). Supported by Social Development Foundation of Jiangsu Province(BS2005029).

[作者简介] 毛振彪, 硕士, 教授, 硕士生导师。

△共同第一作者, 邵建国, 博士, 副主任医师。

E-mail: shaojianguo4144@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: mzb63@163.com

制。本研究参照 Qian 等^[3-4]建立的体外转录法,进一步优化实验条件,构建靶向 CFPAC-1 细胞株 APRIL 基因双链 RNA (APRIL dsRNA),诱导其在大肠杆菌中的发酵表达,用大肠杆菌 III 型 RNA 水解酶 (RNase III) 水解 dsRNA,制备分离纯化 APRIL siRNA,进一步观察其转染细胞后对 APRIL 表达的影响,为进一步的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株及培养基 人胰腺癌细胞株 CFPAC-1 购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心,CHO 细胞株由复旦大学生命科学院生物化学系生化与分子生物实验室馈赠。DMEM、IMDM、RPMI 1640 和 Ham's F12k 细胞培养基购自美国 Invitrogen 公司,新生牛血清和胎牛血清购自 Hyclone 公司。

1.2 主要试剂及设备 质粒 pBluescriptSK 购于 TaKaRa 公司,HBVP siRNA、大肠杆菌 RNase III 和 pET-22b-loop 由复旦大学生物化学系生化与分子生物实验室馈赠; *Escherichia coli* BL21-Codon-Plus[®] (DE3)-RIL 购自美国 Stratagene 公司;限制性内切酶和 Taq 聚合酶购自 TaKaRa 公司;RNase A 购自美国 Ambion 公司;Whatman[®] fibrous cellulose powder CF-11 树脂购自美国 Whatman 公司;DEAE Sepharose Fast Flow 购自 Amersham Pharmacia 公司;层析系统和预装柱:Biologic Duo-flow[™] Chromatography System (Bio-Rad, USA) 和 25 ml Superdex75 FPLC column (Amersham Pharmacia);转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;其他化学试剂均为分析纯试剂。

1.3 细胞培养 分别用含 10% 胎牛血清的 DMEM、IMDM、Ham's F12k 和 RPMI 1640 细胞培养基,单层培养 CFPAC-1 胰腺癌细胞株、CHO 细胞株于 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度的恒温孵育箱内,以 0.25% 胰蛋白酶传代消化。

1.4 APRIL dsRNA 表达载体的构建

1.4.1 引物的设计与合成 根据 TaKaRa 公司 siRNA 设计程序,选取 APRIL 基因中包含 3 个分值最高的 siRNA 的一段作为 APRIL dsRNA 表达模板,针对该片段设计引物,并在引物 5' 端加上限制性酶切位点。APRIL 引物序列为: F5'- CGT CGA CTC TAG AAC AGA AGA AGC AGC ACT CT - 3' (下划线部分为引入的 *Sal* I 和 *Xba* I 识别位点), R5'- TAG AAT TCG GAT CCG AAG GTT CCA TGT GGA GAG - 3' (下划线部分为引入的

*Eco*R I 和 *Bam*H I 识别位点)。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4.2 pET-22b-APRIL 载体的构建 由于肿瘤细胞中普遍存在基因突变的情况,为了得到针对 CFPAC-1 细胞株 APRIL 基因抑制表达效率最高的 siRNA,本研究以 CFPAC-1 细胞株 cDNA 为模板,按以下条件扩增 APRIL 基因部分序列 (约 420 bp): 5℃ 30 s; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 30 个循环; 72℃ 7 min。得到的 420 bp DNA 片段用 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切,并连接到 pBluescriptSK 的相应位点中,用 APRIL 引物 PCR、酶切以及测序鉴定其正确性。再分别用 *Bam*H I、*Xba* I 和 *Eco*R I、*Sal* I 从测序正确的质粒中切下目的片段,连接到 pET-22b-loop 的相应位点中,得到的表达质粒命名为 pET-22b-APRIL。

1.5 APRIL dsRNA 的表达及纯化

1.5.1 APRIL dsRNA 在大肠杆菌中的表达 将 dsRNA 表达载体 pET-22b-APRIL 通过常规的氯化钙法转化到大肠杆菌中。挑单菌落接种到含有 100 μg/ml 氨苄西林的 LB 培养基中,在 37℃ 摇床中以 250 r/min 的转速培养过夜。取 10 ml 该种子液接种到 200 ml 新鲜的含 100 μg/ml 氨苄西林的 LB 培养基中,在 37℃ 摇床中以 250 r/min 的转速培养。当菌液 600 nm 处光密度值 (*D*) 达到 1.0 时,加入 IPTG 至终浓度 0.1 mol/L。以相同的条件继续培养 3 h 后收集菌体。为了判断 dsRNA 是否表达,本研究以同样培养但未加 IPTG 诱导的表达菌株 BL21 (转化了 pET-22b-APRIL 的大肠杆菌) 为对照。用碱法抽提质粒 DNA 的方法从菌体中提取核酸,然后用 RNase A 处理,1% 琼脂糖凝胶电泳以检测 dsRNA 的表达情况。

1.5.2 APRIL dsRNA 的纯化 利用 CF-11 树脂可以特异地吸附 dsRNA 的特性来纯化 dsRNA。按 1.5.1 项下方法发酵 dsRNA,将 3 000 r/min × 15 min 离心收集的菌体,以每 1 g 菌体中加入 10 ml 1.5 × STE (以 5 × STE 稀释,5 × STE 为 0.5 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris · HCl, 5 mmol/L EDTA, pH 8.0) 充分悬浮后,破壁机破壁,70℃ 水浴 30 min 冷却后,4℃ 6 900 r/min 离心 30 min,收集上清液后用于纤维素 CF-11 吸附纯化。取上清液加入无水乙醇至终浓度为 20%,预冷后上样到用含 20% 乙醇的 STE 溶液平衡的 CF-11 层析柱中;用含有 18% 乙醇的 STE 溶液洗 CF-11 柱以除去单链 RNA 和 DNA,然后用 STE 溶液洗脱 dsRNA。洗脱液用 2 倍体积的无水乙醇沉淀,用 70% 乙醇洗盐,室温晾

干后溶于 TE (10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)。用分光光度计测定其 260 nm 处 D 值,按每个 D_{260} 值为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 计算 dsRNA 的浓度,以调整不同浓度 dsRNA。

1.6 APRIL siRNA 的制备及纯化

1.6.1 APRIL dsRNA 水解制备 APRIL siRNA 及其初步纯化

在含 50 mol/L Tris · HCl, pH 7.5, 100 mol/L NaCl, 1 mol/L DTT, 1 μg dsRNA, Mn^{2+} 浓度 10 mol/L 20 μl 反应体系中分别加 1、2、4、6、8 μg RNase III。在 37°C 反应 1 h 后用 15% PAGE 电泳分析水解产物。根据以上酶切效率的检测,确定反应体系,大量酶切 dsRNA 来制备 siRNA。dsRNA 被大肠杆菌 RNase III 水解后补加 NaCl 至终浓度为 250 mol/L,然后上样到已用上样 Buffer (含 20 mol/L Tris · HCl, 125 mmol/L NaCl, pH 7.5) 平衡的 DEAE 柱上 (1 cm × 10 cm 树脂),继续用上样 Buffer 洗至基线,然后用 250 mmol/L、500 mmol/L 和 1 000 mmol/L 的 NaCl 梯度洗脱被吸附的水解产物。酶切后混合物经过 DEAE 纯化后,取样行 15% PAGE 和 12% SDS-PAGE 蛋白胶观察。

1.6.2 分子筛进一步分离纯化 siRNA

由于用大肠杆菌 RNase III 水解后的 siRNA 一般含有未被完全水解的长双链 RNA (大于 30 bp) 和过度水解产生的短链寡核苷酸 (小于 21 bp),经 DEAE 纯化的水解产物需要进一步分离纯化出其中的 siRNA。选用分子筛 (Biologic Duoflow™ Chromatography System + 25 ml Superdex75 FPLC column) 分离该混合物,以获得所需要的 21 bp 大小的 siRNA。

1.7 APRIL siRNA 转染 CHO 细胞

用 3T 细胞作为阳性对照,制备了带有 APRIL 基因片段的荧光蛋白质粒 pEGFP-APRIL,转染该质粒后 CHO 细胞将能够表达带有 APRIL 序列的荧光蛋白。实验设 4 组:单转染 pEGFP-APRIL 组; pEGFP APRIL + APRIL siRNA 共转染组; pEGFP- C_2 + APRIL siRNA 共转染组; pEGFP-APPIL + HBVP siRNA 共转染组。

用含 10% (V/V) 新生牛血清、100 g/ml 链霉素和 100 IU/ml 青霉素的 DMEM (高糖) 培养基,在 37°C 含饱和水蒸气和 5% (V/V) CO_2 的培养箱中培养。所有细胞在转染前 24 h 按一定的细胞数接种到 24 孔细胞培养板中。然后用 Lipofectamine 2000 转染试剂,按供应商提供的转染方法转染细胞。将 pEGFP- C_2 、pEGFP-APRIL 质粒、APRIL siRNA、HBVP siRNA 混合稀释于 50 μl OptiMEM 中,将 2 μl Lipofectamine 2000 稀释于 50 μl OptiMEM 中,

室温放置 5 min 后,将后者温和加入前者,混匀,室温放置 15 min 后,将混合溶液加入预先换成 500 μl 无血清新鲜 DMEM 培养基的 24 孔培养板内。5 h 后每孔加入 500 μl 含 20% (V/V) 新生牛血清的 DMEM。转染后 48 h 进行检测,根据荧光蛋白表达量比较转染后各组细胞 APRIL 的表达情况。

2 结果

2.1 pET-22b-APRIL 表达载体的构建及鉴定

构建的 dsRNA 表达载体 pET-22b-APRIL,经酶切鉴定可见目的基因片段分别以正向和反向连接到 loop 两侧的多克隆位点中,测序正确。这表明载体构建成功。

2.2 APRIL dsRNA 的表达及纯化

结果显示 (图 1): IPTG 诱导后菌株的表达产物经 RNase A 处理后,电泳分析可见 APRIL dsRNA 条带;而未经 IPTG 诱导菌株的表达产物经 RNase A 处理后未见 dsRNA 条带。

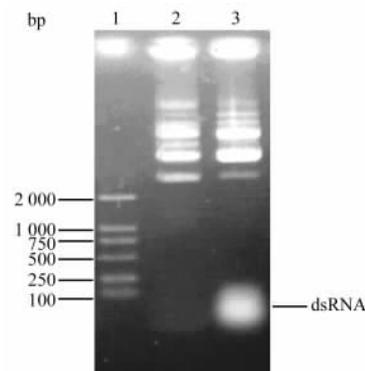


图 1 APRIL dsRNA 在大肠杆菌中的诱导表达

Fig 1 Electrophoresis analysis of APRIL dsRNA's expression in *E. coli*

1; 2 kb DNA ladder; 2: The extract from *E. coli* (not induced with IPTG) treated with RNase A; 3: The extract from *E. coli* (induced with IPTG) treated with RNase A

纯化结果 (图 2) 显示,质粒 DNA 和单链 RNA 与 CF-11 树脂的亲合力较弱,它们在上样时流出或被含 18% 乙醇的 STE 溶液洗脱;而 dsRNA 最后成功用 STE 溶液洗脱。

2.3 APRIL siRNA 的获取及纯化结果

2.3.1 APRIL dsRNA 的水解及其优化条件的筛选

APRIL dsRNA 经 RNase III 酶切水解后 15% PAGE 观察,发现在 21 bp 处出现预期 APRIL siRNA 条带 (图 3)。含 1 μg dsRNA/1 μg RNase III 的 20 μl 反应体系酶解效率最高。

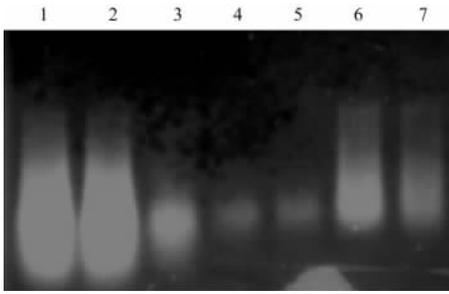


图2 dsRNA经CF-11柱纯化结果

Fig 2 Purification of dsRNA with CF-11 column

1: Before purification; 2: The effluent from CF-11; 3-5: 18% ethanol STE elutriant; 6-7: STE elutriant

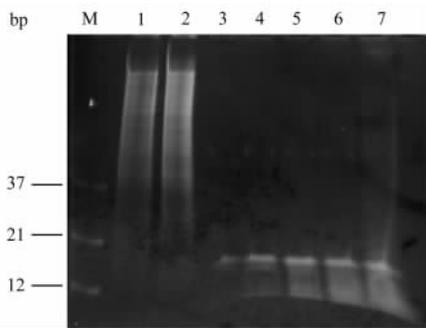


图3 APRIL dsRNA水解产物的15%PAGE电泳图

Fig 3 15%PAGE electrophoresis analysis of digested dsRNA with RNase III

M: dsDNA marker; 1, 2: 1 μg dsRNA; 3-7: 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 μg dsRNA were digested by 1 μg RNase III, respectively

2.3.2 APRIL siRNA的大量制备及纯化 选取1 μg dsRNA/1 μg RNase III的20 μl反应体系,将体系扩大5 000倍至100 ml大量制备siRNA。酶切后混合物经过DEAE纯化后,取样行15%PAGE和12%SDS-PAGE蛋白胶观察,发现15%PAGE胶上第6条带处见siRNA片段(图4A),12%SDS-PAGE蛋白胶上未看到RNase III蛋白条带,仅在第1,2道上样处见到RNase III蛋白(图4B)。以上结果说明,经过梯度NaCl溶液洗脱,RNase III蛋白被125 mmol/L、250 mmol/L NaCl溶液洗脱而与siRNA分离,siRNA被500 mmol/L NaCl溶液洗脱而成功分离出来。

以上经DEAE初步纯化后的含siRNA的混合物通过Superdex75分子筛分离后可得到纯化的21 bp大小的siRNA(图5)。

2.4 APRIL siRNA转染后CHO细胞荧光蛋白的表达 pEGFP-APRIL、pEGFP-C₂+APRIL siRNA

及pEGFP-APRIL+HBVP siRNA质粒转染组CHO细胞APRIL荧光蛋白表达较强(图6A、6B、6C),而pEGFP-APRIL+APRIL siRNA共转染组细胞荧光蛋白表达较弱,明显受到抑制(图6D)。

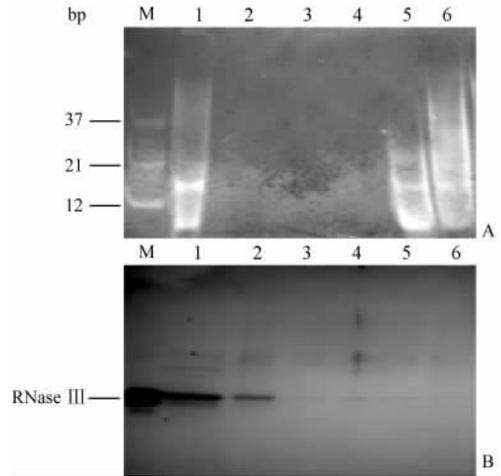


图4 酶切产物经DEAE离子柱处理后的15%PAGE(A)和12%SDS-PAGE(B)胶电泳图
Fig 4 15%PAGE(A) and 12%SDS-PAGE(B) analyses of separated siRNA mixture by DEAE ion exchange chromatography

M: dsDNA marker; 1: Sample before purification; 2: The effluent from DEAE ion column; 3: 125 mmol/L NaCl elutriant; 4, 5: 250 mmol/L NaCl elutriant; 6: 500 mmol/L NaCl elutriant

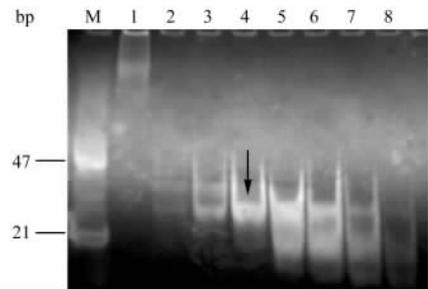


图5 DEAE离子柱处理后的酶切产物经分子筛纯化后各组分的15%PAGE电泳图
Fig 5 15%PAGE analysis of purified siRNA by Superdex 75 size exclusion chromatography

M: dsDNA marker; 1-8: Different compositions of effluent. The arrow showing purified 21 bp siRNA

3 讨论

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指dsRNA(double stranded RNA, dsRNA)特异性地诱发与其序列同源的mRNA分子被降解,从而导致相应基因的表达被抑制的现象,是一种特殊的转录后基因表达沉默(post transcriptional gene silence,

PTGS)现象^[5]。RNAi 高效而专一地抑制基因表达的特点使其在基因功能研究方面得到了广泛的应用^[6-8]。然而在哺乳动物细胞中,长度超过 30 bp 的双链 RNA 会激活 α -干扰素信号转导系统,导致普遍的翻译起始抑制以及非序列特异性的 RNA 降解,最终导致非特异性的基因表达抑制^[9]。这种机制阻碍了 RNAi 技术在哺乳动物细胞中的应用。

Elbashir 等^[10]首次证明用化学合成的 21 bp 小干扰 RNA(short interfering RNA, siRNA)能够激活哺乳动物细胞体系中的 RNA 干扰机制,而不会激活 α -干扰素信号转导系统,从而专一性地抑制目的基因的表达。这项工作拓展了 RNAi 技术的应用领域,使其在基因功能研究中得到更为广泛的应用,也为其被开发成为一种新的疾病治疗手段提供了可能。

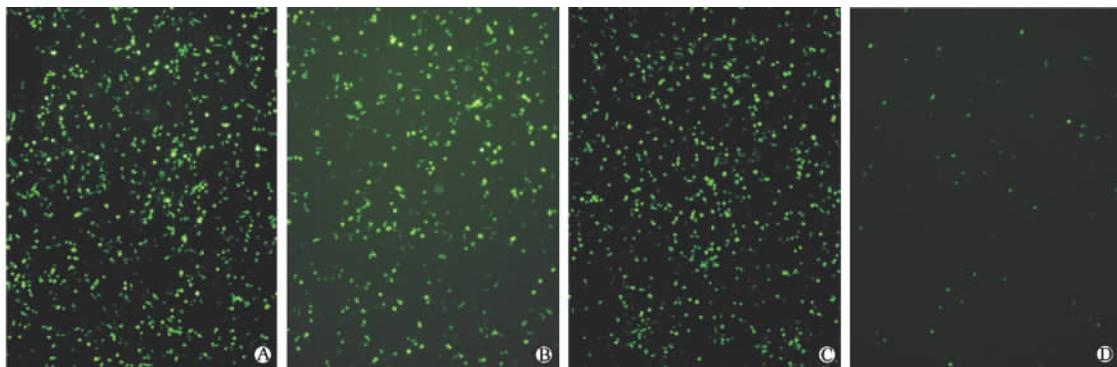


图 6 荧光显微镜下观察转染后各组细胞荧光蛋白的表达

Fig 6 Inhibitory effect of APRIL siRNA on APRIL expression under fluorescent microscope(10×10)

A: pEGFP-APRIL; B: pEGFP-C₂ + APRIL siRNA; C: pEGFP-APRIL + HBVP siRNA; D: pEGFP-APRIL + APRIL siRNA

目前有 5 种 siRNA 的制备方法:化学合成法(chemical synthesis)^[10],体外转录法(*in vitro* transcription)^[11], dsRNA 的 RNase III 家族体外消化法^[12-13], siRNA 表达载体法(siRNA expression vectors)^[14-15], siRNA 表达框架法(siRNA expression cassettes, SECs)^[16]。前 3 种方法是在体外制备 siRNA,然后通过转染或电转的方法导入到细胞中,后 2 种方法则是基于具有合适启动子的载体或转录元件在哺乳动物或细胞中转录生成 siRNA。5 种方法有各自的优缺点,可以根据实验研究需要选择适合的制备方法。虽然通过 siRNA 表达载体法表达的 shRNA 可以在哺乳动物细胞体系中激活 RNA 干扰机制,对特定基因表达的抑制率达到 90% 以上,优于人工合成的 siRNA^[17-18],但要将这种方法应用于临床,它会面临许多困难,如靶向性、安全性等问题。

本研究以 pET-22b-loop 质粒为出发载体,构建了 T7 promoter 启动子下的 dsRNA 表达载体 pET-22b-APRIL,通过 IPTG 诱导,该质粒能够在大肠杆菌中大量表达 dsRNA,并且能够利用 CF-11 树脂从提取的核酸中分离纯化得到 dsRNA。然后通过 RNase III 酶切 dsRNA 成 siRNA,利用 DEAE 树脂离子交换层析和分子筛层析分离纯化出 APRIL

siRNA,将其转染 CHO 细胞后能明显抑制 APRIL 的表达。尽管用 His-RNase III 制备 siRNA 时的得率不如 Dicer,但基因工程重组 RNase III 的制备比 Dicer 容易,而且其酶切活性比 Dicer 高。综合考虑以上因素,可以认为对于体外大量制备 siRNA 来说,在优化的条件下, RNase III 要优于 Dicer。本研究成功制备了针对 CFPAC-1 细胞株的 APRIL siRNA,为下一步敲减 CFPAC-1 细胞 APRIL 基因的研究奠定了基础,也为进一步研究 APRIL 基因在胰腺癌中的作用提供了方法。

[参考文献]

- [1] 邵建国,毛振彪,谭 畅,等. 消化系统肿瘤增殖诱导配体高表达细胞株的筛选[J]. 胰腺病学,2006,6: 289-291.
- [2] 王唯一,毛振彪,潘正平,等. 人胰腺癌组织中增殖诱导配体蛋白的表达及意义[J]. 第二军医大学学报,2007,28:214-215.
- [3] Qian Z K, Xuan B Q, Min T S, et al. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells [J]. World J Gastroenterol, 2005,11: 1297-1302.
- [4] Xuan B, Qian Z, Tan C, et al. esiRNAs purified with chromatography suppress homologous gene expression with high efficiency and specificity[J]. Mol Biotechnol,2005,31: 203-209.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature,1998,391: 806-811.

- [6] Gonczy P, Echeverri C, Oegema K, et al. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III [J]. *Nature*, 2000, 408: 331-336.
- [7] Ashrafi K, Chang F Y, Watts J L, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes [J]. *Nature*, 2003, 421: 268-272.
- [8] Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi [J]. *Nature*, 2003, 421: 231-237.
- [9] Stark G R, Kerr I M, Williams B R, et al. How cells respond to interferons [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 227-264.
- [10] 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: 494-498.
- [11] Donzé O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e46.
- [12] Myers J W, Jones J T, Meyer T, et al. Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 324-328.
- [13] Yang D, Buchholz F, Huang Z, et al. Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9942-9947.
- [14] 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.
- [15] 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: 500-505.
- [16] Castanotto D, Li H, Rossi J J. Functional siRNA expression from transfected PCR products [J]. *RNA*, 2002, 8: 1454-1460.
- [17] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 5515-5520.
- [18] 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.
- [收稿日期] 2007-01-29 [修回日期] 2007-06-30
[本文编辑] 尹 茶, 贾泽军

· 消 息 ·

“机械通气技术临床应用与进展”、“危重病急救医学进展”学习班招生

为更好地促进我国危重急救医学的发展,提高广大临床医务人员的专业水平,上海交通大学医学院附属新华医院急救中心/成人ICU科举办第7期“机械通气技术临床应用与进展”(2007-03-02-105)、第3期“危重病急救医学进展”(2007-03-10-027)学习班。招生对象为从事急诊、急救、危重病、ICU、呼吸、麻醉等专业人员,招生名额为每个学习班30~50名。学习班分别以宋志芳教授主编的《现代呼吸机治疗学——机械通气与危重病》和《危重病急救与重症监护》为教材,重点阐述机械通气技术的临床应用与进展、危重病急救医学的研究进展,经培训考核合格的学员每个学习班授予国家级继续教育I类学分12分。每个学习班学费与资料费为800元,食宿费为600元。

举办时间:“机械通气技术临床应用与进展”学习班为2007年10月14日至10月21日,“危重病急救医学进展”学习班为2007年10月21日至10月28日,即日起即可报名。

举办地点:上海交通大学医学院附属新华医院。

联系电话:021-65790000-7505/7503/7500/6062,联系人:叶云洁(7505/7503) 潘曙明(6062) 宋志芳(7500)