维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0636-04

表达 HPV-16 E6 基因 siRNA 真核载体的构建及体外转染效率鉴定

成海恩[1]，张　溢[1]，张翠莉[2]，石　华[1]，潘巍巍[1]，易发平[1]，马永平[1]，宋方洲[1]

（重庆医科大学 1.基础医学院生物化学与分子生物学教研室；2.公共卫生学院生殖医学教研室，重庆　400016）

【摘　要】目的：采用 RNA 干扰技术选择性的沉默宫颈癌 Ca Ski 细胞株中 HPV-16 E6 基因的表达。为观察 HPV-16 E6 基因的小干扰片段能否在 Ca Ski 细胞特异性的抑制 E6 基因的表达，构建能在哺乳动物细胞中表达 E6 小干扰 RNA 的真核表达质粒，并观察其转染效率。方法：根据 HPV-16 E6 基因序列，设计特异性的小干扰片段，并将其定向克隆到带有卡那霉素抗性和增强绿色荧光蛋白的真核表达载体 pGenesil-1 上，将其转染至 Ca Ski 细胞中，观察荧光表达，鉴定其转染效率。结果：通过酶切鉴定和序列测定，成功的构建二条表达小干扰 RNA 的质粒及其阴性对照质粒，并成功的转染到 Ca Ski 细胞株中，转染效率达到 50%以上。结论：siRNA 真核表达载体的构建及体外转染的成功为下一步研究奠定了良好的基础。

【关键词】HPV16 E6 基因；RNA 干扰；转染

【中国图书分类法分类号】R737.33；R349.5　　**【文献标识码】**A　　**【收稿日期】**2006-03-09

Construction of HPV16 E6 siRNA expressing recombinants and identification of transfection efficiency in vitro

CHENG Haien, et al

(*Department of Biochemistry and Molecule Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To silence the expression of HPV16 E6 gene in Ca Ski cell line with RNA interference technique. In order to understand if the HPV16 E6 siRNA could inhibit the expression of E6 gene specifically, recombinant eukaryotic vectors were constructed and transfected into Ca Ski cell line. The transfection efficiency was observed. *Methods:* According to the sequence of HPV16 E6 gene, the E6 siRNA was designed and cloned into the EGFP reporter plasmid pGenesil-1, and then transfected into CaSki cell line. The fluorescence expression was observed and the transfection efficiency was identified. *Results:* Two siRNA expressing recombinants and the corresponding negative control vector were constructed and transfected into Ca Ski cell successfully, and the transfection efficiency achieved about 50%. *Conclusion:* The construction of recombinant E6 siRNA eukaryotic vectors and transfection of them into Ca Ski cell line successfully established a favourable foundation for further study.

【Key Words】HPV16 E6 gene; RNA interference; Transfection

宫颈癌的发生和发展与人乳头瘤病毒（human papillomavirus，HPV），特别是 HPV-16 和 18 型的感染密切相关[1]。HPV-16 感染引起的宫颈癌主要与病毒癌基因 E6 和 E7 有关，E6 癌基因编码合成的 E6 蛋白可以与 P53 蛋白相结合，加速 P53 经泛素介导的途径降解，从而使 P53 抑制细胞生长及促进凋亡的作用丧失，使细胞中 DNA 损伤累积，从而诱导宫颈组织癌变。分子检测显示绝大多数宫颈癌患者以前感染过 HPV，在肿瘤组织中能检测出病毒的 DNA。因此，HPV16 的 E6 基因可能是宫颈癌基因治疗的一个较为理想的靶标之一。本实验通过结合生物信息学工具设计并选择 HPV-16 E6 基因特异性的小干扰 RNA（small interferece RNA，siRNA），把它克隆到真核表达质粒上，体外转染到宫颈癌 Ca Ski 细胞株中，并通过优化实验条件来提高转染效率，为进一步研究抑制宫颈癌 Ca Ski 细胞株中 HPV-16 E6 基因的表达奠定基础。

作者介绍：成海恩(1973-　)，男，博士，主要研究方向：宫颈癌的基因治疗。

基金项目：国家自然科学基金(No:30371479)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 材料来源

主要材料：人宫颈癌 Ca Ski 细胞株（购自北京肿瘤研究所）；所用 pGensil-1 质粒购自武汉晶赛公司；转染试剂采用脂质体 lipofectamine 2000（Invitrogen 公司）；限制酶如 *BamH* I、*Hind* III、EcoRI、SalI、PstI、小量胶回试剂盒 Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver.2.0、连接试剂盒 DNA Ligation Kit Ver. 2.0 购自大连宝生物（TAKARA）公司；质粒抽提纯化试剂盒（上海华舜公司）；大肠杆菌菌株 DH5α 为本室保存。

1.2 HPV16 E6 siRNA 的设计

HPV-16 E6 基因的序列引自 GeneBank，GI：19744691。采用 ambion 公司的在线设计工具（http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html），将 HPV-16 E6 基因的 Accession Number 或者个长序列（477bp）输入到在线工具中，根据 Tuschl[9]和 Boutla[10]提出的原则，在 34 条候选靶序列中选取两条 19nt 的序列，1 号：GCAACAGTTACTGCGACGT（在基因中位置为 121－142）；2 号：CAAACCGTTGTGTGATTTG（298－319）。另设计一条由 1 号序列随机重排而成的阴性对照：GACTTCATAAGGCGCATGC。经过 NCBI 的网上比对工具 BLASTN（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/）比对分析与人类其它基因编码序列无同源性。siRNA 的设计结构如下：

BamHI+Sense+**TTCAAGACG**+Antisense+**TTTTT**+SalI+*HindIII*

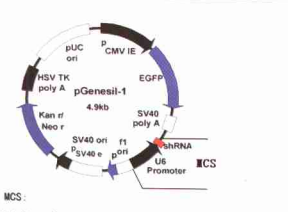
根据文献选择中间的 9nt 的茎环结构序列：TTCAA－GACG。将所选择的片段呈反向互补加到茎环序列的两端，在正义链和反义链的 5′ 分别加上限制酶 *BamH* I 和 *HindH* I的粘端，正义链的 3′ 端酶切位点之前加入 polIII 启动子终止信号 TTTTT，为构建后质粒的鉴定，我们在终止信号后加上了一个 SalI 的酶切位点。将得到设计的 siRNA 片段分别命名为 CH1（小干扰序列 1），CH2（小干扰序列 2）和 HK（阴性对照）（见表 1），交由上海生工合成。

1.3 合成序列退火、载体与片段的连接及转化

Oligos 单链分别用无核酸酶无菌水稀释，等摩尔混合。加入退火缓冲液（10 × ：100 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，1 mol/L NaCl，10 mmol/L EDTA），加入适量 Nuclease-free water 使终体积中 Oligos 浓度为 100nmol/ml，退火缓冲液为 1 ×，94℃水浴退火自然冷却至室温。退火产物储存于 −20℃。取 pGenesil-1 空质粒（图 1）用 *BamH* I 和 *Hind* III 于 37℃水浴酶切 2h。酶切后进行载体胶回收，电泳鉴定后与 siRNA 小片段进行连接。质粒与插入片段摩尔数比例为 1:10，连接过夜，连接产物直接转化大肠杆菌 DH5α 感受态。转化后感受态细胞经 37℃摇床复苏后涂布于含卡拉霉素（25ng/ul）平板放入 37℃孵箱孵育过夜。除 3 条重组质粒外另加设阴性

表 1 siRNA 小片段序列

SiRNA	The sequence of siRNA oligonucleotide
CH1	5′-GATCCGCAACAGTTACTGCGACGTTTCAAGACGACGTCGCAGTAACTGTTGCTTTTTGTCGACA -3′
	3′-GCGTTGTCAATGACGCTGCAAAGTTCTGCTGCAGCGTCATTGACAACGAAAAACAGCTGTTCGA-5′
CH2	5′-GATCCGCAAACCGTTGTGTGATTTGTTCAAGACGCAAATCACACAACGGTTTGTTTTTGTCGACA -3′
	3′-GCGTTTGGCAACACACTAAACAAGTTCTGCGTTTAGTGTGTTGCCAAACAAAAACAGCTGTTCGA-5′
HK	5′-GATCC GACTTCATAAGGCGCATGC TTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTTGTCGACA -3′
	3′-GCTGAAGTATTCCGCGTACGAAGTTCTGCCGTACGCGGAATACTTCAAAAAACAGCTGTTCGA-5′



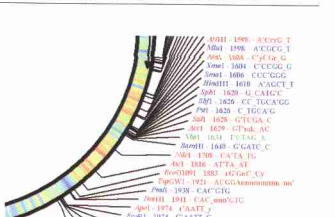


图 1 pGensil-1 空载体图及其多克隆位点

维普资讯 http://www.cqvip.com

对照组。

1.4 重组载体的酶切鉴定

每个平板挑取 3 个克隆于 5ml 含卡拉霉素（25ng/ul）LB 培养基中，37℃摇床生长 2~4h 至菌液混浊，提取质粒做酶切鉴定：重组质粒分别用 *Hind* III，EcoRI 和 *BamH* I，EcoRI 双酶切。Pgenesil-1 质粒的多克隆位点（MCS）见图 1A，在 *BamH* I 和 *Hind* III 之间有 SalI 和 PstI 酶切位点，经酶切后这两个位点失去，在插入的目的基因片段里，我们设计了一个 SalI 的酶切位点，插入在质粒 pGenesil-1 的 *BamH* I 和 *Hind* III 之间，如若插入正确，就能被 SalI 酶切出 1 条约 400bp 的 DNA 小带，因此我们分别用 SalI 和 PstI 进行酶切鉴定。另外我们也分别用 *Hind* III，EcoRI 和 *BamH* I，EcoRI 双酶切。若质粒重组正确，会在多克隆位点的 *BamH* I 和 *Hind* III 间多出 60bp 片段，在远端选择 EcoRI 分别与 *BamH* I 和 *Hind* III 进行双酶切会出现大小差异的片段（图 1B）。对酶切鉴定正确的质粒送公司测序。鉴定正确的克隆进行保种和质粒的大量抽提。分别命名为 pGenesil-CH1，pGenesil-CH2，pGenesil-HK。

1.5 细胞培养和转染条件的优化

培养使用 DMEM 培养基，10% 胎牛血清，37℃，5% CO_2 孵箱孵育，每隔 2 天换 1 次液。将细胞种植于 96 孔板，密度为 1×10^5 每孔，当细胞的汇合度约 70%~80%时，即可进行转染。转染操作前 1 天培养基换为不含血清和抗生素的 DMEM 培养基。分别将质粒与 Lipofectamine 2000 分别按照质量与体积比 1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、1∶5 的比例混合。室温孵育 20min 后，将此混合物加入到培养板中，转染 6h 后更换为含 10%血清的 DMEM 培养基。分别在转染后 24h、48h、72h 在荧光显微镜下计数表达荧光的细胞的数量，确定转染率。每个比例做 4 个复孔，计算平均值。转染效率 = 表达荧光的细胞数 / 计数的细胞总数 × 100%。

1.6 细胞转染

将细胞转到 24 孔板中使细胞量为 5×10^4，用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃，5% CO_2 孵箱培养，当细胞汇合度达到 70%时换成不含血清的 DMEM 培养基，培养过夜。将质粒 DNA 3μg 加入到 50μl 的无血清 DMEM 中（每孔），Lipofectamine2000 每孔 3μl 加到 50μl 的无血清 DMEM 中，轻轻混匀，室温放置 5min 后将二者混合在一起，混匀，室温放置 20min 后即可加入到细胞中，轻轻混匀。转染 6h 后换液，48h 后荧光显微镜下观察结果。

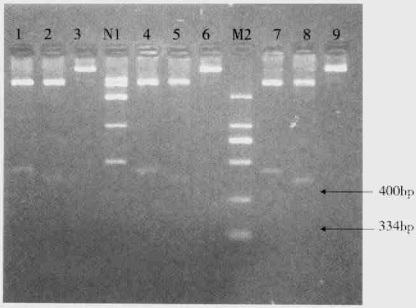
1.7 统计学分析

结果用 *F* 检验进行统计学分析。

2 结 果

2.1 siRNA 表达载体的构建

siRNA 退火后与线性化的 pGensil-1 载体连接，重组子转化大杆菌 DH5α，转化 18h 后卡那抗性平板上除阴性对照外，其余平板均可观察到有菌落的生长。挑取阳性克隆提取质粒，将质粒用酶切，



M1:Marker IV,7000,5500,3500,2000,1000,500;M2: Marker DL2000,2000,1000,750,500,250,100;

Band 1,4,7: 分别为 pGensil-CH1、pGensil-CH2、pGensil-HK 被 EcoRI 和 HindIII 双酶切；

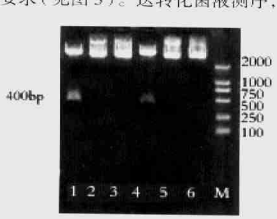
Band 2,5,8: 分别为 pGensil-CH1、pGensil-CH2、pGensil-HK 被 EcoRI 和 BamHI 双酶切；

Band 3,6,9: 分别为 pGensil-CH1、pGensil-CH2、pGensil-HK 空载体。

图 2 siRNA 表达质粒的双酶切鉴定

可看到切下的小片段大小有差异（见图 2）。

为进一步确认小片段已经正确连接，我们分别用 PstI 和 SalI 进行单酶切鉴定。质粒 Pgenesil-1 具有 PstI 的酶切位点，应该能够被 PstI 所酶切，而插入目的基因片段之后，PstI 酶切位点被取代，故不能被 PstI 所酶切。在插入的目的基因片段里，我们设计了一个 SalI 的酶切位点，插入在质粒 Pgenesil-1 的 *BamH* I 和 *Hind* III 之间，如若插入正确，就能被 SalI 酶切出一条约 400bp 的 DNA 小带；经酶切鉴定分析，质粒 pGensil-CH1、pGensil-CH2、pGensil-HK 符合设计要求（见图 3）。送转化菌液测序，测序结果



1,4：pGensil-CH1、pGensil-CH2 分别用 SalI 单酶切；

2,5：pGensil-CH1、pGensil-CH2 分别用 PstI 单酶切；

3,6：pGensil-CH1、pGensil-CH2 空质粒

图 3 重组质粒的 SalI、PstI 单酶切鉴定

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 质粒转染 Ca Ski 细胞后不同时间转染效率的观察

质粒 DNA：脂质体（g/L）	转染后 24h	转染后 48h	转染后 72h
1:1	39%*	51%*	45%*
1:2	21%	25%	20%
1:3	16%	20%	18%
1:4	12%	15%	13%
1:5	14%	20%	16%

* $P<0.05$

表明片段插入正确，表明质粒构建成功。

2.2 细胞转染条件的优化

pGensil-1 质粒中本身带有 EGFP，通过观察表达荧光的细胞即可得出细胞的转染效率。分别将质粒与脂质体按不同的比例转染到 Ca Ski 细胞中，在转染后不同的时间转染效率见表 2。结果表明，质粒转染 24h 即有荧光表达，转染 48h 后表达效率最高，高达 51%，到转染 72h 后，转染效率有所下降，贴壁细胞数量减少，悬浮细胞增多。当质粒与脂质体的质量与体积比为 1:1 时，转染的效率最高。

2.3 细胞形态学及荧光的观察

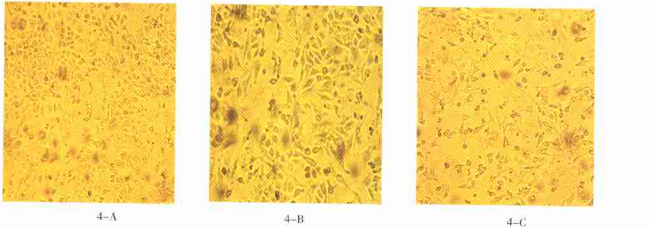
质粒转染细胞 24h 后，细胞生长状态良好，绝大部分细胞贴壁生长，细胞形态正常，悬浮细胞少；转染 48h 后，细胞生长状态良好，极少数细胞变圆，细胞脱落少；转染 72h 后，小部分细胞变圆、皱缩、悬浮，贴壁细胞数量减少。见图 4。

将质粒按照优化后条件转染细胞后，48h 观察它们的荧光表达情况，结果发现，转染 pGensil-CH1、pGensil-CH2 和 pGensil-HK 的细胞中有强烈的荧光表达，细胞的转染效率均达到 50%左右。只加了脂质体未加质粒的（试剂对照）的细胞无荧光表达。结果见图 5。

3 讨 论

HPV 感染是子宫颈癌的主要危害因素[1]。HPV 感染人类上皮细胞后，病毒的基因组能整合到细胞的基因组中，在病毒整合过程中 E2 基因区被部分删除，从而使其表达及活性降低，失去对癌基因 E6、E7 的遏制作用，使 E6、E7 的表达持续增高[2]。E6 和 E7 基因在细胞的转化过程中相互协作，E7 作为有丝分裂的变异基因和生长刺激因子干扰细胞的衰老的正常分化；而 E6 则抑制 HPV 阳性细胞的凋亡效应，在 E7 的刺激下使细胞异常生长，最终导致基因异常的细胞生长失控[3]。E6 在宫颈癌的发生发展过程中起着重要的作用，可以作为宫颈癌基因治疗的良好靶点之一。RNA 干扰技术是近年来出现的一种新的功能基因表达的阻断技术，通过一些小的双链 RNA 高效、特异的阻断体内特定基因表达，促使其 mRNA 降解，诱使细胞表现出特定基因缺失的表型。本实验中，我们采用 RNAi 技术，以 HPV16 E6 基因为目标，进行了表达 HPV16 E6 siRNA 的真核表达质粒的构建，并将其成功的转染到人宫颈癌 Ca Ski 细胞中。

研究发现，siRNA 序列对 RNAi 效率影响很大，siRNA 序列的设计和选择在 RNAi 中至关重要。Elbashir 等[7]提出：避免在起始密码子和无义区域附近选择目的序列，同时还要避免序列中含有 3 个以上的 T 以免转录被提前终止，GC 含量最好在 30%~50%之间。Tuschl 等[8]建议设计 siRNA 不要针对 5' 和 3' 端的非编码区，因为此处含有丰富的调控蛋白

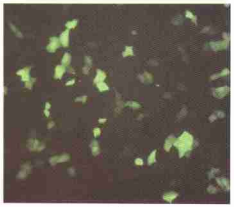


4-A 4-B 4-C

图 4 质粒转染 Ca Ski 细胞后光镜下形态的观察

4-A pGensil-hk 转染 24h 后细胞形态（×100）；4-B pGensil-CH1 转染 24h 后细胞形态（×400）；4-C pGensil-CH2 转染 24h 后细胞形态（×100）

维普资讯 http://www.cqvip.com



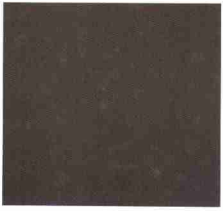
5-A



5-B



5-C



5-D

图 5 质粒转染 Ca Ski 细胞后荧光的观察

5-A pGensil-CH1 转染 48h 后荧光表达(×400);5-B pGensil-CH2 转染 48h 后荧光表达(×400);
5-C pGensil-HK 转染 48h 后荧光表达(×400);5-D 用脂质体转染细胞 48h 后荧光表达。

结合区域,这些结合蛋白或翻译起始复合物可能会影响 siRNP 核酸内切酶复合物结合 mRNA 从而影响 RNAi 的干扰效果。本实验中,我们利用 Internet 上的 siRNA 设计工具,综合前人的经验,筛选了两条 siRNA 片段,它们的 GC 含量分别为 47.6% 和 38.1%,经 BLAST 查询与人类其它基因无同源性;同时设计了 1 条阴性对照片段,即将其中的 1 条序列随机打乱,并经 BLAST 查询与其它基因无同源性。将这 3 条目的片段插入到带有 EGFP 的真核表达载体中,通过筛选、酶切鉴定和序列分析,结果表明,成功的构建了表达 HPV16 E6 的 siRNA 质粒。

为了进一步研究 E6 siRNA 表达质粒的效果,我们以人宫颈癌 Ca Ski 细胞株作为靶细胞,对其进行了质粒的转染。Ca Ski 细胞株中整合有 HPV16 的基因组,而且可以高达 600 多拷贝,能较好的观察抑制效果。为了提高转染效率,我们对转染条件和转染效率进行了优化和鉴定。结果发现,当质粒 DNA 与脂质体的质量与体积比为 1:1 时转染效率最高,质粒转染细胞 24h 即有强烈的荧光表达,48h 时荧光表达的强度最高,到 72h 后荧光逐渐减弱。通过对其形态学的观察,转染 72h 后,部分细胞开始变园、皱缩,发生悬浮,呈现凋亡的形态变化。经光镜和荧光观察发现,发生悬浮的细胞一般为表达荧光的细胞。可能的原因是质粒转到细胞后引起了细胞的凋亡,尚有待进一步研究证实。

质粒转染细胞后,我们进行了荧光及转染效率的观察,结果发现,除了试剂对照外,转染了 siRNA 载体的细胞均能表达荧光,转染效率均达到 50% 左右。表明成功的将质粒转染到了细胞中,为进一步研究特异性抑制宫颈癌 Ca Ski 细胞中 HPV16 E6 的表达奠定了基础。

(下转第 676 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

肌收缩和泵血功能，可能启动负反馈机制，刺激心肌细胞增殖。而心肌细胞是永久细胞，一般情况下不发生增殖或增殖率极低，所以当心肌细胞凋亡增加时，由于心脏不能依靠心肌细胞增殖来完成功能修复，机体便通过系列的调节，刺激成纤维细胞增殖，通过间质纤维化和胶原增加来维持心脏的结构。但是这种代偿往往是无益的，反而启动或促进了甲亢性心脏病的形成。

心房颤动是临床上常见的心律失常，其发病率和致残率都很高。临床观察甲亢患者约 4%~20%并发房颤[9]。关于甲亢性房颤的确切机制现在尚未完全阐明，可能与甲状腺素对心脏的直接毒性有关。本实验观察到实验组左房体积增大，心肌纤维化程度增加，左房 Fas 阳性表达增加，这提示 Fas/FasL 可能参与了左房的结构重构，从而为房颤的发生提供了基质。

甲亢性心脏病是多种因素作用的结果，近几年，随着分子生物学研究的进展，对甲亢性心脏病发病机制的认识已更加深入。本实验观察到 Fas 在左房、左室的表达高于对照组，说明 Fas/FasL 可能在甲亢性心脏病和甲亢性房颤中发挥了一定的作用，因此干预 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径也许能成为甲亢性心脏病和甲亢性房颤的一种辅助治疗方法。

参 考 文 献

[1] Kahaly GJ, Kampmann C, Mohr-Kahaly S. Cardiovascular hemodynamics and exercise tolerance in thyroid disease [J].Thyroid, 2002; 12 (6): 473-481.

[2] Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, et al. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism [J].J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87 (3): 968-974.

[3] Riaz K, Forker AD, Isley WL, et al. Hyperthyroidism: a "curable" cause of congestive heart failure-three case reports and a review of the literature[J].Congest Heart Fail, 2003; 9 (1): 40-46.

[4] 祝宝华，张寄南，马文珠，等. 肌浆网钙泵测定及其在高血压心肌中的变化[J].南京医科大学学报，1998；18（5）：390-392.

[5] Thomas LR, Henson A, Reed JC, et al. Direct binding of Fas-associated death domain (FADD) to the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor DR5 is regulated by the death effector domain of FADD[J]. J Biol Chem, 2004; 279 (31): 32780-32785.

[6] Kobori H, Ichihara A, Suzuki H, et al. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rat by hyperthyroidism [J].Am J physiol, 1997; 273: H593-H564.

[7] Kobori H, Hayashi M, Saruta T. Thyroid Hormone Stimulates Renin Gene Expression Through the thyroid hormone Response Element[J].Hypertension, 2001; 37 (1): 99-104.

[8] Nitahara JA, Cheng W, Liu Y, et al. Intracelluar calcium, DNAse activity and myocyte apoptosis in the aging Fischer 344 rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 1998; 30: 519-535.

[9] Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system[J]. N Engl J Med, 2001; 344: 501-509.

（上接第 640 页）

参 考 文 献

[1] Lee CJ, Suh EJ, Kang HT, et al. Induction of senescence-like state and suppression of telomerase activity through inhibition of HPV E6/E7 gene expression in cells immortalized by HPV 16 DNA [J].Exp Cell Res, 2002; 277 (2): 173-182.

[2] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy [J].Mol Interv, 2002; 2 (3): 158-167.

[3] Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, et al. Variations of the 3' protruding ends in synthetic short interfering RNA (siRNA) tested by microinjection in Drosophila embryos [J].Oligonucleotides, 2003; 13 (5): 295-301.

[4] DiPaolo JA, Alvarez-Salas LM. Advances in the development of therapeutic nucleic acids against cervical cancer [J].Expert Opin Biol Ther, 2004; 4 (8): 1251-1264.

[5] zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application [J].Nat Rev Cancer, 2002; 2 (5): 342-350.

[6] Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, et al. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells [J].Oncogene, 2003; 22 (38): 5938-5945.

[7] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate [J].EMBO J, 2001; 20 (23): 6877-6888.