

利用人工microRNA实现基因沉默

陈起振 张志仙 曹家树*

(浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029)

摘要 MicroRNA是一组长度约为21 nt的非编码蛋白质的短序列RNA, 能通过碱基互补配对的方式指导降解靶基因mRNA或抑制靶基因的翻译。MicroRNA的主要功能是调控基因的表达, 在生物体的生长、发育及疾病发生中扮演着重要的角色。本文介绍了利用microRNA实现基因沉默的作用原理, 人工合成microRNA, 构建转基因载体, 实现对目的基因的沉默及这种工具在生命科学领域的应用前景。

关键词 人工microRNA; RNAi; 基因沉默

MicroRNA是一类由内源基因编码的长度约为21 nt的非编码单链RNA分子, 它们在动植物中参与转录后基因表达的调控。最早被确认的microRNA是在线虫中首次发现的*lin-4*和*let-7*^[1-3], 随后多个研究小组在包括人类、果蝇、植物等多种生物物种中鉴别出数百个microRNA。microRNA能够降解靶基因mRNA或抑制靶基因的翻译, 从而调控基因的表达, 所以在真核生物中, microRNA也能引起RNA干扰(RNAi)现象^[4]。近年来利用人工microRNA(artificial microRNA, amiRNA)的技术, 实现特定基因的沉默, 特别是用于共同抑制几个相关基因, 这种包含一个发卡结构前体的载体也被称作第二代RNAi载体^[5]。这种技术以其特异性、高效性受到了研究人员的关注, 在动植物抵抗外源病毒、生长发育调控方面起着重要的作用, 而且在功能基因组研究、基因治疗方面有着广泛的应用前景。

1 amiRNA的作用原理

amiRNA利用的是microRNA抑制基因表达的原理, 成熟的microRNA形成后, 整合到microRNA介导的沉默复合体(miRNA-induced silencing complexes, miRISC)中, 然后与靶基因mRNA结合, 能够与靶基因mRNA完全互补或不完全互补的microRNA可能会导致靶基因的特异性剪切, RISC中的Argonaute (Ago)蛋白能直接切开与microRNA互补的靶mRNA中的磷酸二酯键, 形成小片段并直接降解。另外一种情况是, microRNA与目的基因mRNA之间匹配程度较低的时候会抑制mRNA翻译, 在植物和动物中

这是microRNA抑制基因表达的默认机制, 但是microRNA具体是阻碍翻译起始, 还是阻碍翻译的延伸还存在争议^[6]。由于microRNA和靶基因mRNA之间不用完全匹配就可以实现调控, 所以一个microRNA可以有多个靶基因, 几个microRNA也可以共同调控一个基因。大部分动物microRNA是通过抑制靶基因翻译进行调控的, 与此同时mRNA会由于脱腺苷化、去帽作用和外显子溶解消化等而降解, 但这种现象并不是由Ago蛋白引起的切割造成的^[7], 并且有证据证明mRNA的降解和翻译的抑制是两条独立的调控途径^[6]。

amiRNA的原理就是将pre-microRNA的miRNA和miRNA*(与miRNA互补配对的序列)置换为设计好的序列后转入动植物中, 利用microRNA的作用机制来抑制特定靶基因的功能^[8,9]。

2 amiRNA的设计和载体构建

amiRNA最初是在人类细胞系中应用的^[10], 随后又用于拟南芥中^[11]。这些研究结果显示都能有效抑制靶基因的表达, 而且amiRNA无论是组成型表达还是特异型表达都能很好起到应有的作用, 组成型表达的效果和内源microRNA一样都具有高度的特异性^[8,9,12]。

用该方法抑制目的基因的表达, 首先要设计针对于目的基因的amiRNA, 设计的amiRNA在第一

收稿日期: 2010-09-18 接受日期: 2010-11-30

国家自然科学基金(No.30871715)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

个碱基位置为尿嘧啶,在第十个碱基的位置是腺嘌呤,因为内源microRNA中大都是这样,更利于microRNA的抑制效率^[12]。用于植物的amiRNA可以用WMD(web microRNA designer)来设计,只需要将目的基因的序列输入,就能够得到相应的候选amiRNA,目前已经有100多种植物可以通过这个网站来设计amiRNA (<http://wmd3.weigelworld.org>)。动物方面amiRNA设计通常是通过BLOCK-iT™ RNAi Designer/miR RNAi (<http://rnaidesigner.invitrogen.com>)完成的。

之后要选择合适的amiRNA骨干,也就是合适的microRNA前体(pre-miRNA)。用于构建amiRNA载体的pre-miRNA要符合以下几点:首先这个前体的序列不要太长;预测的二级结构能形成一个短而简单的发卡结构;miRNA*和miRNA能够完全互补,而没有插入或缺失;前体序列应在EST数据库中存在,或有和它相关的文献研究^[9]。现有的研究用过很多microRNA前体,拟南芥miRNA前体经过修改后已经成功地沉默了拟南芥、番茄、烟草中的基因^[8,9,11,13,14]。但是,现在还没有研究表明拟南芥中的前体在所有植物中都能起作用,所以也许用自身内源microRNA前体作为骨干会更好,特别是那些高效的microRNA的前体。水稻中的osa-MIR528已经用于水稻amiRNA的构建^[15],莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)中的前体cre-MIR1157和cre-MIR1162也成功用于该物种^[16-18]。miR30^[19-22]、miR155^[23-29]也在人类和动物细胞中得到了应用。

但是选择了合适的amiRNA后,必须将其连接到一个miRNA前体上,这一步通常用几次PCR来替代内源miRNA的序列,如图1所示,引物I~IV用来替换miRNA和miRNA*(蓝色部分),引物A和B是miRNA前体上的序列,首先分别以A-IV、II-III、I-B为引物扩增,然后以它们的产物为模板,A和B为引物扩增,即可得到包含amiRNA的前体^[9]。Hu等^[27]改进了这项技术,可以用两对引物通过一次PCR克隆amiRNA。

构建高效的amiRNA载体是比较简单易行的。研究表明,在组成型或诱导型强启动子下游插入amiRNA的前体是该载体的基本形式。现已有多种载体用于植物的研究。Niu等^[13]利用Invitrogen公司的Gateway重组克隆技术,构建高通量基因沉默的载体pBA-pre-amiR系列。Molnar等^[16]根据Gateway技

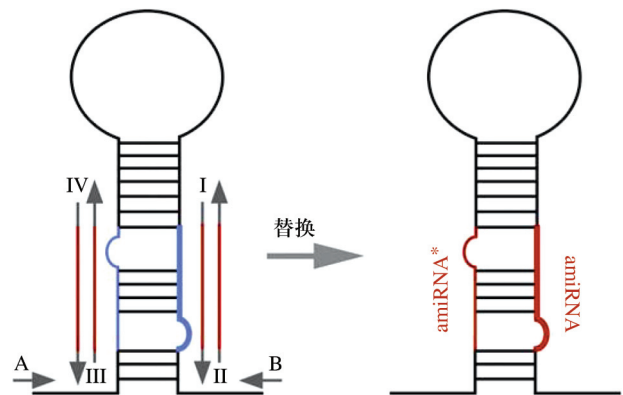


图1 amiRNA的合成(根据文献^[9]做适当修改)

Fig.1 Engineering of amiRNAs using overlapping PCR (modified from^[9])

术将pCB740改造成pChlamiRNA1和pChlamiRNA2两个载体,这两个载体都由HSP70A-RBCS2组成型串联启动子启动。Schwab等^[30]设计了两种载体:pRS300和pNW55,分别包含了ath-MIR319a和osa-MIR528,可以直接将设计好的amiRNA替换到这两个载体里面,已有的研究也证明这两个载体的高效^[31]。动物方面用过的载体有Block-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector (Invitrogen)^[23,32]、pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR(Invitrogen)^[24-26,28]、pFBGR^[33]、pDsRed^[27]、pSM155^[29]。虽然这些载体有所差别,但是都含有较强的启动子,并且有EmGFP等可以方便检测表达的标记基因。Hu等^[34]研究了哺乳动物细胞中不同amiRNA载体的表达效果,结果显示9个载体中有3个表达效果明显,另外,多amiRNA表达载体中amiRNA的数量最好不要超过4个,而在多amiRNA表达载体中amiRNA的相对位置,并不会明显影响其RNA干扰活动。

3 amiRNA转基因植株的检测和抑制效率

对于转基因动植物,通常要检测amiRNA的表达效果和对目的基因的抑制效率,一般用Northern杂交检测amiRNA的表达,靶基因的表达量可以用RT-PCR来检测,同时可以用oligo引物,用改进的RACE-PCR可以确定amiRNA的切割位点^[35]。

由于amiRNA技术是近年刚应用的新技术,所以还没有与其它RNAi方法相比。在动物中,研究显示不论在体外还是小鼠体内,shRNA(short hairpin RNA)载体的抑制效果都要比amiRNA的效果好^[33],

但是shRNAs会影响microRNA的生物合成和功能, 而amiRNA就不会产生这种影响。Boudreau等^[36]以小鼠小脑为实验材料, 检测shRNA和amiRNA载体的安全性, 注入shRNA载体使得小鼠浦肯雅细胞神经中毒, 而amiRNA载体没有产生毒性, 而且抑制效果也很好; McBride等^[22]在研究用RNAi抑制小鼠脑部HDh的表达时发现, 原本能够产生神经中毒的shRNA序列, 用amiRNA载体表达的时候毒性就会变小, 而且对目的基因进行了有效的抑制。这说明在哺乳动物中amiRNA更适合用于RNAi。现有研究表明amiRNA的成功率大约在90%以上^[8,9,13,14,37,38], 在拟南芥中, 不论是作用于一个基因还是多个基因, 这种方法的抑制效率都可以达到75%^[30]。

另外, 该方法在植物中的遗传稳定性也有一定的保障, 现有的研究显示用RT-PCR或Northern杂交的方法都能在转基因植株T1代中检测到amiRNA的表达。Schwab等^[9]和Park等^[31]获得的拟南芥转基因植株T1代有90%表现出了突变体的表型。Qu等^[14]利用amiRNA提高植物对烟草花叶病毒的抗性, 研究结果显示63.63%的转基因T1代对CMV具有抗性, 获得T2代后, 发现具有抗性的植株比率达到了82%。Warthmann等^[15]在用该方法对水稻基因的研究过程中发现, 转基因植株的T1代的表型出现了3: 1的分离, 这也符合孟德尔的遗传学说。Zhang等^[39]用该方法构建了两个amiRNA载体以获得抗CMV的转基因番茄, 结果分别有85.7%~100%和92.9%~100%转基因植株T2代表现出对CMV的抗性。

4 amiRNA的应用

4.1 植物基因功能研究

随着拟南芥、水稻等植物基因组测序的完成, 获得了大量的功能未知的基因, 这些基因的功能验证、基因的表达调控、改造及基因间的互作也成为现在的研究重点。到目前为止, RNAi已经成为研究植物基因功能的重要工具, 而amiRNA作为一种实现基因沉默的新方法, 在这方面也有一定的应用。

Warthmann等^[15]研究了amiRNA在水稻中的抑制效果, 靶基因是*Pds*、*Spl11*、*CYP714D1*三个已知突变体表型的基因, 对每个基因分别设计了两个amiRNA, 结果显示各有一个amiRNA起到了抑制作用, 其中*Pds*转基因植株中有92.9%表现出了突变体的表型。Molnar等^[16]用该方法对莱茵衣藻中的

COX90、*PSY*、*DCLI*三个基因进行了研究, 转基因系大部分表现出了相应突变体的表型, 比率大约为72%。Zhao等^[17]研究了莱茵衣藻中另外两个基因: *MAA7*和*RBCS1/2*, 分别用amiRNA对它们进行抑制, 效率分别为95%和45%, 用两个amiRNA同时抑制这两个基因时, 这两个基因的表达量只有原来的10%和15%。Schmollinger等^[18]研究了amiRNA对莱茵衣藻*HSF1*(*heat shock factor 1*)的抑制效果, 作者用了*MIT1*启动子, 该启动子被铵盐抑制, 被硝酸盐诱导, 转基因材料从铵盐培养基转移到硝酸盐培养基中2 h后, *HSF1*转录本减少, HSF1蛋白水平从8 h开始降低, 到24 h蛋白水平才有严重降低。Park等^[31]研究了amiRNA对拟南芥中基因的抑制效果, 首先抑制了*API*, 转基因植株表现型同缺失突变体一样, 对于*API*, 一个amiRNA的抑制效率为48%, 而载体中三个amiRNA的抑制效率为78%, 当amiRNA和靶基因之间没有错配的时候, 抑制效率竟达到了98%, 这说明抑制效果可能和错配没有关系, 也可能是与不同基因有关; 然后又构建包含两个amiRNA的载体, 同时抑制*API*和*CAL1*这两个不相关的基因, 抑制效率达到了90%以上, 但是很少表现强双突变体表型。Khraiwesh等^[40]构建amiRNA载体抑制了小立碗藓(*Physcomitrella patens*)中的两个基因*PpFtsZ2-1*和*PpGNT1*, 转基因植株中靶基因mRNA的表达量都降低了, 靶基因的mRNA表达量都下降了80%~98%, 抑制效果明显, 并且表现出了缺失突变体的表型。

4.2 增强动植物抗病性

病虫害是导致农作物减产的重要因素之一。随着基因工程技术的发展, 利用RNAi技术培育抗病新品种更是较为有效的防治方法。Niu等^[13]利用amiRNA技术提高拟南芥对芜菁黄花叶病毒(TYMV)和芜菁花叶病毒(TuMV)的抗性, amiRNA的靶基因为编码TYMV和TuMV的两种基因沉默抑制因子(分别为P69和HC-Pro)的mRNA, 结果表明转基因植株分别对这两种病毒有很好的抗性, 而且将这两个amiRNA同时连在一个载体上转入植株就能获得同时对这两种病毒的抗性。Qu等^[14]研究了用amiRNA提高植物对烟草花叶病毒的抗性, 设计的amiRNA的靶基因是编码CMV沉默抑制因子2b的mRNA, 转基因烟草对CMV的抗性非常明显, 而且这种抗性的水平同amiRNA的表达量是成正比的。Kim等^[29]用amiRNA实现了对鱼细胞系中病毒外壳蛋白基因的抑制, 病

毒外壳蛋白53R是从RGV(*Rana grylio virus*)中分离的蛋白,在病毒组装过程起重要的作用,RT-PCR检测表达结果显示有效率达到了58%,电镜观察表明病毒组装能力降低甚至不能组装。Dmytro等^[41]设计了分别作用于*CI*、*Nib*和*CP*基因的amiRNA,整合入拟南芥miR159前体,转入烟草中以后都能检测到amiRNA的表达,而且转基因植株对不同马铃薯Y病毒属病毒都有显著的抗性。

4.3 amiRNA与基因治疗

RNAi可以作为一种基因治疗的手段用于一些慢性病(比如HIV-AIDS)的治疗^[42,43],现在也有许多科研工作者研究了用amiRNA这种新的工具治疗肿瘤、HIV、肝炎等疾病的可行性。Liang等^[23]用amiRNA方法抑制CXCR4的表达,转染乳腺肿瘤细胞后CSCR4的表达量明显降低,另外,将这些细胞注射到小鼠体内后,癌细胞向肺转移的数量也比对照要少。Son等^[24]利用amiRNA对于HIV的抑制效果,载体中包含了作用于*Tat*和*Vif*基因的amiRNA,转染细胞后都能有效地起到作用,持续抑制HIV的复制。Wang等^[25]研究了用amiRNA抑制人类胃腺癌细胞系SGC7901中PRL-3的表达量,载体质粒的转染效率达到了53%以上,RT-PCR和Western blot结果显示对目的基因抑制效果非常明显,转染成功的SGC7901细胞抵抗感染的能力显著提高,而且明显抑制了SGC7901细胞的增殖,减缓肿瘤的生长。Gao等^[26]利用amiRNA抑制HepG2.2.15细胞系中B型肝炎病毒(HBV)的作用,amiRNA载体转染效率为55%~60%,转染72 h后,对HBV mRNA的抑制效率达到了40%~83%,对HBV DNA的抑制效率达到了40%~70%,对两种肝炎病毒抗原(HBsAg与HBeAg)的最高抑制率分别达到了81.5%和51.8%。此外,该方法也可用于治疗狂犬病,Israsena等^[28]的研究表明注射amiRNA载体72 h后,Neuro2A细胞中狂犬病毒核壳体的数量减少了90%。Baek等^[32]将一种能够表达作用于NK1R(neurokinin-1 receptor)的amiRNA的慢病毒载体注入小鼠脑部,4周后,与对照相比,amiRNA降低了小鼠乙醇的摄取量,同时在海马体中NK1R的表达也降低了,表明这种方法可能对于治疗乙醇依赖有一定的作用。

5 小结与展望

amiRNA是根据microRNA的作用原理而发明

的一种新的RNAi的工具,近年来已经有许多关于这种方法的报道,已经证明在植物和动物中都能取得良好的抑制效果,可以用于基因功能研究、增强动植物抗病性和基因治疗肝炎、HIV、癌症等疾病。作为一种新方法,它在应用中也存在一定的问题,比如由于对植物microRNA从前体到成熟的加工过程的了解较少,所以设计的amiRNA可能不能够正常合成,不能对目的基因进行有效的抑制。另外,如果靶mRNA存在高级结构,amiRNA可能无法靠近靶标。针对以上几点,已有的研究通常会对一个基因设计两个或两个以上amiRNA,以提高成功率^[13-18,23-32]。另外,在基因功能研究方面,只是用功能已知的基因来验证amiRNA的可行性,还没有得到广泛的应用。但是与其它方法相比,amiRNA的序列更短,所以其特异性更高,而且允许和靶基因之间有错配,所以可以同时干扰几个同源基因,而且具有很好的遗传稳定性,在动物实验中的毒性更小。相信随着研究的不断深入,amiRNA一定能够成为生命科学领域不可忽视的力量。

参考文献(References)

- 1 Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *Lin-14* by *Lin-4* mediates temporal pattern-formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75(5): 855-62.
- 2 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *Lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *Lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- 3 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901-06.
- 4 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 5 Tang GL, Galili G, Zhuang X. RNAi and microRNA: breakthrough technologies for the improvement of plant nutritional value and metabolic engineering. *Metabolomics* 2007; 3(3): 357-69.
- 6 Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642-55.
- 7 Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4 : NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Gene Dev* 2006; 20(14): 1885-98.
- 8 Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell* 2006; 18(5): 1134-51.

- 9 Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2006; 18(5): 1121-33.
- 10 Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed microRNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 2002; 9(6): 1327-33.
- 11 Parizotto EA, Dunoyer P, Rahm N, Himber C, Voinnet O. *In vivo* investigation of the transcription, processing, endonucleolytic activity, and functional relevance of the spatial distribution of a plant miRNA. *Gene Dev* 2004; 18(18): 2237-42.
- 12 Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* 2005; 8(4): 517-27.
- 13 Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, *et al.* Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nat Biotechnol* 2006; 24(11): 1420-8.
- 14 Qu J, Ye J, Fang RX. Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol* 2007; 81(12): 6690-9.
- 15 Warthmann N, Chen H, Ossowski S, Weigel D, Herve P. Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS One* 2008; 3(3): e1829.
- 16 Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, *et al.* Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2009; 58(1): 165-74.
- 17 Zhao T, Wang W, Bai X, Qi YJ. Gene silencing by artificial microRNAs in *Chlamydomonas*. *Plant J* 2009; 58(1): 157-64.
- 18 Schmollinger S, Strenkert D, Schroda M. An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr Genet* 2010; 56(4): 383-9.
- 19 Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(3): 1154-8.
- 20 Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ, *et al.* Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet* 2005; 37(11): 1289-95.
- 21 Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(37): 13212-7.
- 22 McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, *et al.* Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(15): 5868-73.
- 23 Liang Z, Wu H, Reddy S, Zhu A, Wang S, Blevins D, *et al.* Blockade of invasion and metastasis of breast cancer cells via targeting CXCR4 with an artificial microRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(3): 542-6.
- 24 Son J, Uchil PD, Kim YB, Shankar P, Kumar P, Lee SK. Effective suppression of HIV-1 by artificial bispecific miRNA targeting conserved sequences with tolerance for wobble base-pairing. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374(2): 214-8.
- 25 Wang Z, He YL, Cai SR, Zhan WH, Li ZR, Zhu BH, *et al.* Expression and prognostic impact of PRL-3 in lymph node metastasis of gastric cancer: its molecular mechanism was investigated using artificial microRNA interference. *Int J Cancer* 2008; 123(6): 1439-47.
- 26 Gao YF, Yu L, Wei W, Li JB, Luo QL, Shen JL. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA. *World J Gastroenterol* 2008; 14(29): 4684-9.
- 27 Hu T, Fu Q, Chen P, Ma L, Sin O, Guo D. Construction of an artificial MicroRNA expression vector for simultaneous inhibition of multiple genes in mammalian cells. *Int J Mol Sci* 2009; 10(5): 2158-68.
- 28 Israsena N, Supavonwong P, Ratanasetyuth N, Khawplod P, Hemachudha T. Inhibition of rabies virus replication by multiple artificial microRNAs. *Antiviral Res* 2009; 84(1): 76-83.
- 29 Kim YS, Ke F, Lei XY, Zhu R, Zhang QY. Viral envelope protein 53R gene highly specific silencing and iridovirus resistance in fish Cells by AmiRNA. *PLoS One* 2010; 5(4): e10308.
- 30 Schwab R, Ossowski S, Warthmann N, Weigel D. Directed gene silencing with artificial microRNAs. *Methods Mol Biol* 2010; 592: 71-88.
- 31 Park W, Zhai JX, Lee JY. Highly efficient gene silencing using perfect complementary artificial miRNA targeting AP1 or heteromeric artificial miRNA targeting AP1 and CAL genes. *Plant Cell Rep* 2009; 28(3): 469-80.
- 32 Baek MN, Jung KH, Halder D, Choi MR, Lee BH, Lee BC, *et al.* Artificial microRNA-based neurokinin-1 receptor gene silencing reduces alcohol consumption in mice. *Neurosci Lett* 2010; 475(3): 124-8.
- 33 Boudreau RL, Monteys AM, Davidson BL. Minimizing variables among hairpin-based RNAi vectors reveals the potency of shRNAs. *Rna* 2008; 14(9): 1834-44.
- 34 Hu T, Chen P, Fu Q, Liu Y, Ishaq M, Li JW, *et al.* Comparative studies of various artificial microRNA expression vectors for RNAi in mammalian cells. *Mol Biotechnol* 2010; 46(1): 34-40.
- 35 Llave C, Xie ZX, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 2002; 297(5589): 2053-6.
- 36 Boudreau RL, Martins I, Davidson BL. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: Improved safety as compared to shRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Mol Ther* 2009; 17(1): 169-75.
- 37 Choi K, Park C, Lee J, Oh M, Noh B, Lee I. Arabidopsis homologs of components of the SWR1 complex regulate flowering and plant development. *Development* 2007; 134(10): 1931-41.
- 38 Mathieu J, Warthmann N, Kuttner F, Schmid M. Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral in-

- duction in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; 17(12): 1055-60.
- 39 Zhang X, Li H, Zhang J, Zhang C, Gong P, Ziaf K, *et al.* Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Res* 2010; doi: 10.1007/s11248-010-9440-3Online First™.
- 40 Khraiweh B, Ossowski S, Weigel D, Reski R, Frank W. Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: An alternative to targeted gene knockouts. *Plant Physiol* 2008; 14 (2): 684-93.
- 41 Dmytro U, Chen KC, Yeh SD. Construction of artificial miRNA for generating transgenic resistance against potyviruses in plants. *Plant Pathol Bull* 2008; 17(1): 93.
- 42 Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques* 2006; 40(4): 25-9.
- 43 Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic therapies against HIV. *Nat Biotechnol* 2007; 25(12): 1444-54.

Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNA

Qi-Zhen Chen, Zhi-Xian Zhang, Jia-Shu Cao*

(*Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

Abstract MicroRNAs are post-transcriptional regulators, composed by approximately 21 ribonucleic acid (RNA) molecules. By binding to complementary sequences of target genes, they can cause degradation of the mRNAs of target genes or inhibit their translation. MicroRNAs have been implicated in processes and pathways such as development, cell proliferation, apoptosis, metabolism and morphogenesis, and in diseases including cancer. This paper aimed to introduce achieving silencing of target gene by using artificial microRNAs, and applications of this method in life science.

Key words artificial microRNAs; RNAi; gene silencing

Received: September 18, 2010 Accepted: November 30, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30871715)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn