

用 RNase III 制备的小干涉 RNA 降解 SARS 冠状病毒基因的细胞内转录物

朱旭东* 党颖 冯怡 李涛 黄培堂

(北京生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 SARS 冠状病毒是引起重症急性呼吸综合症的主要原因,目前尚没有特效药物或疫苗对抗这种新病毒。RNA 干涉是指双链 RNA 可以特异地降解细胞内同源基因的 mRNA。在哺乳动物细胞中, < 30bp 的小双链 RNA 能引起 RNA 干涉,又可以避免干扰素反应。通过体外转录得到 SARS 病毒 3 种基因 RNA 依赖的 RNA 聚合酶、刺突蛋白及核衣壳蛋白部分片段的长双链 RNA,然后用 RNase III 有限切割成长度 < 30bp 的小干涉 RNA。同时把上述 3 种基因片段分别连接到质粒 pGL3-Control 中,得到的 3 个质粒 pGL-R、pGL-S 和 pGL-N 可以分别在细胞内转录出荧光素酶-RNA 依赖的 RNA 聚合酶、刺突蛋白、核衣壳蛋白的杂合 mRNA。上述质粒分别和相应的小干涉 RNA 共转染 HEK293F 细胞,测定荧光素酶活性,结果小干涉 RNA 使相应质粒表达荧光素酶的活性显著下降;用逆转录定量 PCR 反应测量 mRNA 丰度,结果表明上述小干涉 RNA 可以特异地降解相应的病毒基因转录物。

关键词 SARS 冠状病毒, RNA 干涉, RNA 依赖的 RNA 聚合酶, 刺突蛋白, 核衣壳蛋白

中图分类号 Q89.R373 **文献标识码** A **文章编号** 1000-306X(2004)04-0484-06

SARS 冠状病毒(SARS coronavirus, SARS-Cov)已被确定是引起“重症急性呼吸综合症(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)”的主要原因^[1]。虽然有关 SARS-Cov 病毒的研究包括全基因组序列测定等取得了很多进展^[2,3],但是目前尚没有特效药或疫苗对抗这种新病毒。

RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是指双链 RNA 会引起细胞内同源基因 mRNA 的特异性降解。自然界的 RNAi 反应中, RNase III 家族的核酸酶 Dicer 把长双链 RNA 切割成 21~25bp 的小干涉 RNA(short interfering RNA, siRNA)这些 siRNA 和相关蛋白组装成“RNA 引起的沉默复合物”(RNA-induced silencing complex, RISC)随后使同源基因的 mRNA 降解。在线虫、果蝇等低等生物中,可以引入长双链 RNA 来抑制靶基因的表达。但是在哺乳动物细胞中,长双链 RNA(> 30bp)会引起干扰素反应,使细胞凋亡。而直接用 < 30bp 的 siRNA 转染哺乳动物细胞,既能引起 RNAi,又可以避免干扰素反应。获得 siRNA 有很多方法,其中用 RNase III 在体外有限降解长双链

RNA 得到的 siRNA 称为“核酸内切酶制备的 siRNA”(endoribonuclease-prepared siRNAs, esiRNA)^[4]。

已经证实 RNAi 可以抑制包括脊髓灰质炎病毒、HIV、HBV、HCV 及流感病毒 A 等病毒在细胞和小鼠中的增殖^[5-9]。SARS 冠状病毒属于单链正义 RNA 病毒,已知有多种病毒蛋白在其生活周期中起重要作用,其中 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)是 SARS-Cov 病毒基因组 RNA、互补 RNA 及各种 mRNA 复制所必需的酶;核衣壳蛋白(nucleocapsid)结合病毒基因组 RNA,保护其免遭环境中核酸酶的降解;刺突蛋白(spike)与 SARS-Cov 病毒感染细胞的过程相关,是重要的病毒表面结构蛋白。通过 RNAi 抑制这 3 种病毒蛋白的表达,有望破坏 SARS-Cov 病毒的复制、蛋白表达及病毒组装等过程,抑制病毒的增殖。本研究是用 RNAi 技术抑制上述 3 种 SARS-Cov 病毒基因在细胞中的表达,获得的 esiRNA 分别可以降解细胞中病毒刺突蛋白、核衣壳和 RdRp 基因的 mRNA 片段。

收稿日期 2004-01-05, 修回日期 2004-04-15。

基金项目 国家 973 计划项目基金资助(No. 2002CB513204)。

* 通讯作者。Tel 86-10-66948831; Fax 86-10-63833521; E-mail: xd_zhu@263.net

1 材料和方法

1.1 质粒 pGL-R、pGL-N 和 pGL-S 的构建

pGL3-Control 用 *Xba* I (New England BioLabs 公司) 线性化, 碱性磷酸酯酶 (Promega 公司) 去磷, 用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 公司) 进行琼脂糖凝胶电泳纯化。以 SARS 病毒 cDNA 为模板, 分别用以下引物:

RdRp 基因 1-780bp 序列 (两端带 *Xba* I 位点) 的引物:

5' 端引物: 5'-GCTCTAGATCTGCGGATGCATCAAC-3'

3' 端引物: 5'-GCTCTAGAATCAGCATCCATATGGACT-3'

核衣壳蛋白基因序列 (两端带 *Xba* I 位点) 的引物:

5' 端引物: 5'-GCTCTAGAATGTCTGATAATGGACCCCAATC-3'

3' 端引物: 5'-GCTCTAGATTATGCCTGAGTTGAATCAGCAG-3'

刺突蛋白 2454-3456bp 基因序列 (两端带 *Xba* I 位点) 的引物:

5' 端引物: 5'-GCTCTAGAATATGGCGAATGCCTAGGTG-3'

3' 端引物: 5'-GCTCTAGATGAAATGTCCCAAGATCAA-3'

PCR 扩增得到 3 个两端都带有 *Xba* I 位点的 SARS 病毒基因 DNA 片段, 经 *Xba* I 处理后用琼脂糖凝胶电泳纯化。将上述 3 种处理后的 SARS 病毒基因片段分别和线性化的 pGL3-Control 用 T4 DNA 连接酶 (New England BioLabs 公司) 连接, 筛选正确的克隆, 获得质粒 pGL-R、pGL-N 和 pGL-S。

1.2 长双链 RNA 的合成与退火

以 SARS 病毒 cDNA 为模板, 分别用以下引物:

RdRp 基因 1-780bp 序列 (两端带 T7 小启动子) 的引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATATCTGCGGATGCATCAAC-3'

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATaATCAGCATCCATATGGACT-3'

核衣壳蛋白基因序列 (两端带 T7 小启动子) 的引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATAATGTCTGATAATGGACCCCAATC-3'

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATATTATGC-

CTGAGTTGAATCAGCAG-3'

刺突蛋白 2454-3456bp 基因序列 (两端带 T7 小启动子) 的引物:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATAATATGGCGAATGCCTAGGTG-3'

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGAATATGAAATGTCGCCAAGATCAA-3'

PCR 扩增得到 3 个两端都带有 T7 小启动子的 SARS 病毒基因 DNA 片段, 琼脂糖凝胶电泳纯化。以上述 DNA 片段为模板, 使用试剂盒 T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega 公司) 进行体外转录反应, 操作根据说明书进行。反应完成后, 20 μ L 反应液中加入 80 μ L DEPC-处理过的去离子水和 1 μ L RQ1 RNase-free DNase (Promega 公司), 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 75 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 然后冷却到室温进行退火。酚/氯仿、氯仿抽提去蛋白。加入 10% NaAc (5mol/L) 和 2.5 倍体积乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 12000r/min 离心 20min, 倒掉上清后, 用 75% 乙醇洗, 晾干, 溶于 50 μ L DEPC-处理过的去离子水中, 测浓度。

1.3 esiRNA 的制备

长双链 RNA 用 RNase III 切割获得 esiRNA, 反应条件: 10 μ L NEB 缓冲液 2, RNase III (New England BioLabs 公司) 10 μ L, 40 μ g 长双链 RNA, DEPC-处理过的去离子水补到 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 反应适当时间, 使双链 RNA 的长度在 30bp 以下。用 VIVASPIN500 (10000MWCO, Sartorius 公司) 超滤, -20 $^{\circ}$ C 贮存。

1.4 细胞培养和转染

HEK293F 细胞用 DMEM 培养基, 10% 胎牛血清, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养。质粒与 esiRNA 的共转染使用 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司), 操作参照产品说明书。96 孔板每个孔用 0.5 μ L Lipofectamine2000, 0.2 μ g pGL-R、pGL-N 或 pGL-S, 0.04 μ g pRL-TK (Promega 公司), esiRNA 终浓度 40nmol/L, 转染的细胞用于荧光素酶活性检测。24 孔板每个孔用 2.5 μ L Lipofectamine2000, 0.8 μ g pGL-R、pGL-N 或 pGL-S, 0.2 μ g esiRNA, 转染的细胞用于逆转录定量 PCR。

1.5 荧光素酶活性检测

荧光素酶活性用试剂盒 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 公司) 在荧光光度计 TD-20/20 (Turner Designs 公司) 上测定。操作参照产品说明书。

1.6 细胞总 RNA 的提取

细胞总 RNA 的提取使用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司), 24 孔板每孔细胞用 1ml Trizol 试剂, 操作参

照产品说明书。得到的细胞总 RNA 溶于 $50\mu\text{L}$ DEPC-处理的去离子水中,加入 $6\mu\text{L}$ RQ1 DNase $10\times$ Reaction Buffer 和 $1\mu\text{L}$ RQ1 RNase-free DNase(Promega 公司) 37°C 反应 30min 去除残余的 DNA。加入 $6\mu\text{L}$ RQ1 DNase Stop Solution 65°C 水浴 10min 灭活酶。

1.7 逆转录定量 PCR 反应

逆转录定量 PCR 反应的引物和探针序列如下:

GAPDH:

左引物 $5'$ -CCATGTTTCGTCATGGGTGTGA- $3'$

右引物 $5'$ -CATGGACTGTGGTCATGAGT- $3'$

TaqMan 探针 $5'$ -FAM-TCCTGCACCACCAACTGC-TTAGCA-TAMRA- $3'$

荧光素酶:

左引物 $5'$ -TTGACCGCCTGAAGTCTCTGA- $3'$

右引物 $5'$ -TTGAGCAAGATGGATTCCAA- $3'$

TaqMan 探针 $5'$ -FAM-AAAGGCTATCAGGTGGCT-CCCCTG-TAMRA- $3'$

逆转录反应用 $0.5\mu\text{L}$ 总 RNA, 2pmol 荧光素酶和 GAPDH 的右引物, $1\mu\text{L}$ dNTP (10mmol/L), 加 DEPC-处理的去离子水使反应体积为 $13\mu\text{L}$, 65°C 水浴 5min , 迅速冰浴。然后加入 $4\mu\text{L}$ $5\times$ First-strand Buffer, $2\mu\text{L}$ DTT (0.1mol/L), $1\mu\text{L}$ SuperScript II RNaseH-逆转录酶(Invitrogen 公司) 42°C 反应 50min , 然后 70°C 15min 灭活酶。加入 $30\mu\text{L}$ 水使体积为 $50\mu\text{L}$ 。

定量 PCR 反应体系是 $25\mu\text{L}$ TaqMan Universal PCR Mix(Applied Biosystems 公司), $1\mu\text{L}$ cDNA, 左右引物和 TaqMan 探针都为 $0.1\mu\text{g}$, 加水使体积为 $50\mu\text{L}$ 。反应条件是 95°C 10min , 然后 95°C 15s , 58°C 1min , 反应 40 个循环。仪器是 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems 公司)。

2 结果

2.1 质粒 pGL-R、pGL-N 和 pGL-S 的构建

质粒 pGL-R、pGL-N 和 pGL-S 的构建方法见材料和方法 1.1。如图 1 所示, 质粒 pGL-R 转染细胞后通过 SV40 启动子, 会转录得到荧光素酶-RdRp (1-780bp) 的杂合 mRNA, 如果 siRNA 造成杂合 mRNA 中 RdRp 序列部分的降解, 那么整个杂合 mRNA 也会很快降解, 使最终翻译荧光素酶的量显著下降。同样, 质粒 pGL-N 和 pGL-S 转染细胞后会产生荧光素酶-核衣壳、荧光素酶-刺突蛋白(2454~3456bp) 的杂合 mRNA, 如果 siRNA 造成杂合 mRNA 中核衣壳或刺突蛋白序列部分的 RNA 降解, 那么整个杂合

mRNA 也会很快降解, 使最终翻译荧光素酶的量显著下降。所以, 只要测定荧光素酶的活性变化, 就可以了解 siRNA 对靶基因的降解效率。

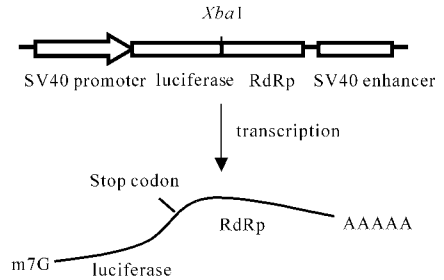


图 1 质粒 pGL-R 转录荧光素酶-RdRp 杂合 mRNA 的示意图
Fig.1 Hybrid mRNA of luciferase-RdRp transcribed from plasmid pGL-R

2.2 SARS-Cov 病毒 3 种基因的长双链 RNA 的合成

用两端都带有 T7 小启动子的基因片段为模板, 在同一个反应体系中同时转录长双链 RNA 的 2 条链, 可以使转录得到的两条 RNA 链的量大致相同。SARS-Cov 病毒 RdRp 基因片段(1~780bp)、核衣壳基因和刺突蛋白基因片段(2254~3456bp) 如材料和方法 1.2 所述进行体外转录与退火, 结果如图 2, 分别得到相应大小的双链 RNA。

2.3 小双链 RNA 的制备

3 种基因的长双链 RNA 分别如材料和方法 1.3 所述用 RNase III 有限切割成 $<30\text{bp}$ 的 esiRNA。基因 RdRp 得到的 esiRNA 称为 esiRNA-R, 核衣壳基因得到的 esiRNA 称为 esiRNA-N, 刺突蛋白基因得到的 esiRNA 称为 esiRNA-S。图 3 所示的是 esiRNA-R 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

2.4 3 种 esiRNA 分别特异性地降解相应 SARS 病毒基因的 mRNA

如材料和方法 1.4 和 1.5 所述, 质粒 pGL-S、pRL-TK 共转染 HEK293F 细胞。pGL-R 表达的萤火虫荧光素酶(Firefly luciferase, F-luc)作为检测抑制程度的报道基因, pRL-TK 表达的 Renilla 荧光素酶(Renilla luciferase, R-luc)作为内对照。每种转染重复 3 个孔, 数据处理时把不加 esiRNA 的对照组的萤火虫荧光素酶活性/Renilla 荧光素酶活性的平均值设定为 100%, 其它组的数据以此标准化, 就得到图 4 中纵坐标 F-luc/R-luc Ratio 的数值。如图 4-1, 共转染 esiRNA-R 可以使 F-luc 的表达量下降为无 esiRNA 组的 13%。为了试验 esiRNA 对基因表达的抑制是否具有特异性, 我们用 esiRNA-N 与质粒 pGL-R、

pRL-TK 共转染 293F 细胞, F-luc 的表达量与无 esiRNA 组无显著差别, 说明 esiRNA 对基因表达的抑制是有特异性的。

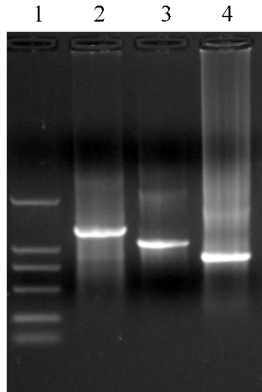


图 2 体外转录的长双链 RNA

Fig.2 Long double-stranded RNA transcribed *in vitro*

- 1 :DNA marker (100 300 500 700 900 1200bp);
- 2 :dsRNA of nucleocapsid ;
- 3 :dsRNA of spike ;
- 4 :dsRNA of RdRp

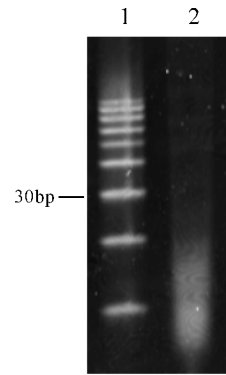


图 3 长双链 RNA 用 RNase III 切割成长度 30bp 的小干扰 RNA

Fig.3 RNase III -prepared siRNA

- 1 :10bp DNA ladder ;
- 2 :RNase III -prepared siRNA

同样, 如图 4-2, 质粒 pGL-S、pRL-TK 共转染 293F 细胞。esiRNA-S 可以使 F-luc 的表达量下降为无 esiRNA 组的 11%, 而 esiRNA-N 对 pGL-S 表达 F-luc 几乎无影响。如图 4-3, 质粒 pGL-N、pRL-TK 共转染 293F 细胞, esiRNA-N 可以使 F-luc 的表达量下降为无 esiRNA 组的 40%, 而 esiRNA-R 对 pGL-N 表达 F-luc 无显著影响。

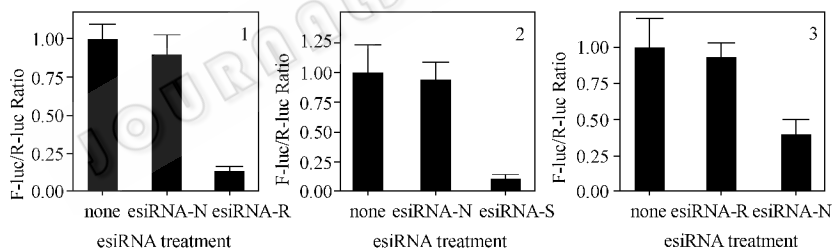


图 4 小干扰 RNA 特异地抑制 pGL-SARS 基因质粒表达荧光素酶

Fig.4 siRNAs inhibit luciferase expression from plasmids pGL-SARS genes

- 1 :effect of esiRNAs to inhibit pGL-R expression ;
- 2 :effect of esiRNAs to inhibit pGL-S expression ;
- 3 :effect of esiRNAs to inhibit pGL-N expression

为了证实 esiRNA 对相应质粒表达荧光素酶活性的抑制作用确实是通过降解杂合 RNA 引起的, 我们通过逆转录定量 PCR 反应直接了解 esiRNA 对荧光素酶-SARS 基因杂合 RNA 的降解情况。如材料和方法 1.4、1.6 和 1.7 所述, 我们用 esiRNA 和质粒 pGL-SARS 基因共转染 HEK293F 细胞, 用转染 pGL-SARS 基因的 HEK293F 细胞作为对照, 然后提取细胞总 RNA, 通过逆转录定量 PCR 反应测量荧光素酶-SARS 基因杂合 RNA 丰度, 同时测量 GAPDH 基因 mRNA 的丰度作为内对照。每种转染作 3 个重复孔, 数据处理时把仅转染 pGL-SARS 基因质粒的荧

光素酶-SARS 基因杂合 RNA/GAPDH mRNA 的数值的平均数设定为 100%, 其它组的数据以此标准化, 就得到图 5 的纵坐标 luciferase/GAPDH mRNA ratio 的数值。如图 5 所示, esiRNA 可以显著地降低细胞内相应的荧光素酶-SARS 基因杂合 RNA 的数量, 证明 esiRNA 对相应质粒表达荧光素酶活性的抑制作用确实是通过降解杂合 RNA 引起的。

所以, 我们用 RNase III 制备的针对 SARS 病毒 3 种基因的 esiRNA 都可以有效地降解相应基因片段在细胞内的转录物, 而且这种作用具有很好的特异性。

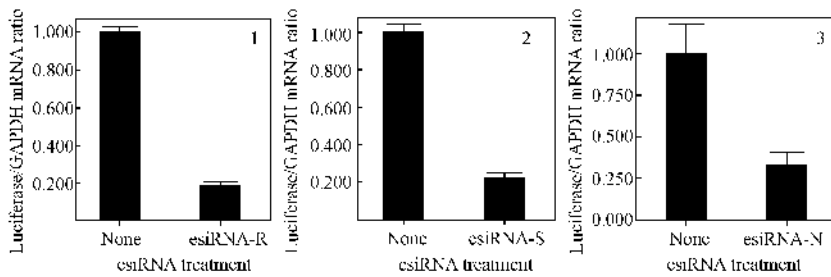


图 5 小干扰 RNA 降解 HEK293F 细胞中荧光素酶-SARS 病毒基因的杂合 mRNA

Fig. 5 siRNAs induce degradation of luciferase-SARS genes hybrid mRNA in HEK293F cells

1 esiRNA-R induces degradation of luciferase-RdRp hybrid mRNA ;

2 esiRNA-S induces degradation of luciferase-spike hybrid mRNA ;

3 esiRNA-N induces degradation of luciferase-nucleocapsid hybrid mRNA

3 讨论

RNAi 技术因为在疾病治疗方面有巨大的潜力而极受关注,但是如何把小干扰 RNA 有效地递送进入人体靶细胞是目前的主要困难之一。2003 年 9 月,德国波恩 Kekulé 有机化学和生化研究所的 Katja Schmitz 和 Ute Schepers 发布消息,宣称他们用一种蛋白转导结构域(protein transduction domain,PTD)和 siRNA 连接后,可以 100% 有效地把 siRNA 导入哺乳动物细胞。这个研究结果为 siRNA 用于疾病治疗带来了更多的希望。

RNAi 研究中常常使用化学合成的方法获得序列确定的 siRNA,但是这种方法的价格十分昂贵,而且因为不同 siRNA 对靶基因表达的抑制效率是不同的,所以在实际工作中,往往需要合成很多个不同的 siRNA,才会找到抑制效率比较高的靶序列位点,这种筛选过程,时间和经费的投入都比较大。而用 RNase III 制备的 esiRNA 就具有价格低廉,操作方便,抑制效率可以得到很好的保证的优点。此外,SARS 病毒是一种 RNA 病毒,而 RNA 病毒的变异速度一般比较快,也往往通过序列突变逃逸药物的作用,而 esiRNA 实际上是由很多小干扰 RNA 组成的库,同时作用于靶基因 mRNA 上的多个位点,所以可以更好地防止病毒逃逸。

用 RNase III 制备 esiRNA 时,因为对长双链 RNA 是进行不完全切割,所以需要通过调整酶量和反应时间优化反应条件,使大部分 esiRNA 的长度 < 30bp,但又尽可能使片段长度不要太小。然后用超滤方法可以进一步去除大片段双链 RNA,避免出现非特异性抑制和干扰素反应。

因为 SARS 病毒是一种高危的病毒,需要用到具感染性的 SARS 病毒的研究必须在生物安全 3 级

以上的实验室进行,各项操作都非常麻烦。RNAi 是通过降解靶基因的 mRNA 来使靶蛋白的表达下调的,事实上只要考察所用的 siRNA 是否能够有效降解靶基因的 mRNA,就可以了解该 siRNA 的作用效率。本研究中把 SARS 病毒 3 个靶基因与报道基因荧光素酶连在一起,可以在细胞内转录出荧光素酶和靶基因的杂合 mRNA,通过最终测量荧光素酶的活性来了解杂合 mRNA 的降解程度,从而评估 siRNA 的效率。这种分子模型避免了使用病毒进行研究,所有工作都可以在普通实验室进行,极大方便了操作。

总之,本研究用 RNase III 制备的 siRNA 可以有效降解 SARS 病毒 3 个基因在细胞中的转录物,可望进一步用于 RNAi 方法抗 SARS 病毒的研究。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Ksiazek TG, Ertman D, Goldsmith CS *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, **348**(20): 1953 - 1966
- [2] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS *et al.* Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, **300**(5624): 1394 - 1399
- [3] Marra MA, Jones SJ, Astell CR *et al.* The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2003, **300**(5624): 1399 - 1404
- [4] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(15): 9942 - 9947
- [5] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 2002, **418**(6896): 430 - 434
- [6] Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV - 1 replication by RNA interference. *Nature*, 2002, **418**(6896): 435 - 438

- virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(6): 639 – 644
- [8] Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(4): 2014 – 2018
- [9] Ge Q, McManus MT, Nguyen T *et al*. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(5): 2718 – 2723

RNase III -prepared Short Interfering RNAs Induce Degradation of SARS-coronavirus mRNAs in Human Cells

ZHU Xu-Dong* DANG Ying FENG Yi Li Tao HUANG Pei-Tang

(Beijing Institute of Biotechnology ,Beijing 100071 ,China)

Abstract SARS-associated coronavirus has been identified for the cause of Severe Acute Respiratory Syndrome , for which there is no efficacious drugs or vaccines. RNA interference (RNAi) is a process in cell to degradation specific target mRNA by double-stranded RNA. In mammalian cells , RNAi can be triggered by short interfering RNA (siRNA). RNA interference of virus-specific genes has emerged as a potential antiviral mechanism. This work evaluated if RNase III -prepared short interfering RNAs can induce specific degradation of SARS-coronavirus mRNAs in human cells. Three of SARS genes , RNA dependent RNA polymerase (RdRp) , spike and nucleocapsid , were amplified with T7 promoter-flanked primers. Long length double-stranded RNA of these genes were transcribed in vitro and then were cleaved to < 30bp length short interfering RNA with *E. coli* RNase III . These siRNAs were termed esiRNA-R , esiRNA-S and esiRNA-N respectively. RdRp , spike and nucleocapsid DNA fragments were inserted into the plasmid pGL3-Control , obtained plasmids pGL-R , pGL-S and pGL-N can express hybrid mRNAs luciferase-RdRp , -spike and -nucleocapsid in cells. Above plasmids and esiRNAs were co-transfected to HEK293F cells with reference plasmid pRL-TK. Firefly luciferase and Renilla luciferase activity were measured. Hybrid mRNAs ' abundance was measured using reverse transcription real-time PCR. Firefly luciferase expression of pGL-R was reduced to 13% by esiRNA-R. Expression of pGL-S was reduced to 11% by esiRNA-S. Expression of pGL-N was reduced to 40% by esiRNA-N. Control esiRNAs didn 't affect luciferase expression ; Hybrid mRNAs ' abundance was dramatically reduced by corresponding esiRNAs. RNase III -prepared short interfering RNAs induce robust and specific degradation of SARS-coronavirus mRNAs in HEK293F cells. These siRNAs could be used to inhibit SARS-coronavirus in future research.

Key words SARS-associated coronavirus , RNA interference , RNA dependent RNA polymerase , spike , nucleocapsid

Received : 01-05-2004

This work was supported by Grant from National Basic Research Program (No. 2002CB513204).

* Corresponding author. Tel 86-10-66948831 ; Fax 86-10-63833521 ; E-mail : xd_zhu@263.net