

应用 H1-U6 双启动子 RNAi 载体筛选人泛素结合酶 hUBE2W 的 RNAi 有效靶点

张莹莹*, 李朝*, 杨志新, 许龙, 朱恒奇, 周晓巍, 黄培堂

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

摘要: hUBE2W 是新近鉴定出的一种 I 型泛素结合酶, 可能在肿瘤发生和 DNA 损伤修复过程中起重要作用。RNA 干涉是指通过形成局部双链 RNA 进而特异性地降解细胞内同源基因 mRNA 的机制, 目前已成为基因功能研究的有力工具。通过构建 H1-U6 双启动子 RNAi 载体, 可以在体内直接转录出针对 *hUbe2w* 基因的两段互补小 RNA, 更接近于生理状态下小干扰 RNA 的作用。利用 RT-PCR 方法从 293FT 细胞总 RNA 中扩增出 *hUbe2w* 基因, 分别将其连接至质粒 pGL3-Control、pCMV-myc 和 pDsRed-express-C1 中, 以便在 mRNA 水平和蛋白水平检测 RNA 干涉效果。RNA 干涉载体分别与上述报告载体共转染 293FT 细胞, 测定荧光素酶活性和 hUBE2W 蛋白表达水平, 结果显示靶点 125 和 259 能够在 mRNA 水平和蛋白质水平显著降低 *hUbe2w* 的表达。

关键词: 泛素结合酶, hUBE2W, RNA 干涉

Selecting Functional siRNA Target Sites of hUBE2W Based on H1-U6 Dual Promoter RNAi Plasmid

Yingying Zhang, Chao Li, Zhixin Yang, Long Xu, Hengqi Zhu, Xiaowei Zhou, and Peitang Huang

Beijing Institute of Biotechnology, The Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: hUBE2W, a newly identified class I ubiquitin conjugating enzyme, probably plays an important role in tumorigenesis and DNA repair processes. RNA interference (RNAi) is a process in cells to degrade specific homologous mRNA by forming duplex RNA and has been developed into a powerful tool to study gene functions. In this study, the H1-U6 dual promoter RNAi plasmid was constructed and the target sequence for *hUbe2w* could be transcribed from both strands and form a double stranded RNA with two 5'Uridine overhangs, which closely resembles endogenous functional siRNA. The *hUbe2w* cDNA was amplified from reverse transcription of the 293FT total RNA by RT-PCR, and then cloned into the pGL3-Control, pCMV-myc and pDsRed-express-C1 plasmids respectively, which were selected as report vectors to detect the RNAi effects. The plasmids were co-transfected into HEK293FT cells, and then the luciferase activity and hUBE2W protein expression were measured respectively. The Resulted reduction of mRNA and protein level demonstrate that the targets of 125 and 259 could significantly inhibit the *hUbe2w* expression.

Keywords: ubiquitin conjugating enzyme, hUBE2W, RNA interference (RNAi)

Received: April 3, 2008; **Accepted:** June 10, 2008

Supported by: the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30470379).

Corresponding author: Xiaowei Zhou and Peitang Huang. Tel: +86-10-66948832; E-mail: amms832@126.com

* Yingying Zhang and Chao Li contributed equally to this work

国家自然科学基金项目(No. 30470379) 资助。

泛素结合酶(Ubiquitin conjugating enzyme, E2)是蛋白泛素化修饰所需的第 2 个连接酶,通过接受来自泛素激活酶(Ubiquitin Activating Enzyme, E1)的活化泛素,在依赖或不依赖泛素连接酶(Ubiquitin ligase protein, E3)的帮助下将泛素连接至特定底物蛋白,从而在细胞周期调控、DNA 损伤修复及肿瘤形成等多种生物途径中发挥重要作用^[1-3]。UBE2W 是本实验室最近鉴定出的一个能够与范可尼贫血蛋白 FANCL 相互作用的 I 型 E2 酶,其氨基酸序列在从无脊椎动物到脊椎动物演化过程中呈现高度保守,鼠源蛋白 mUBE2W 在小鼠各组织中广泛表达^[4]。人源基因 *hUbe2w* 定位于 8 号染色体 q21.11,此区域常常存在基因的高度扩增如 *TPD52*、*PC-1* 和 *WWP1* 等基因并导致恶性肿瘤发生^[5-7],提示 *hUbe2w* 在细胞中的异常表达可能在肿瘤发生过程中起重要作用。最近的研究表明, hUBE2W 可与 E3 酶 BRCA1 (The breast and ovarian cancer suppressor protein 1)相互作用,并可在体外介导 BRCA1 单泛素化,提示其还可能参与到 DNA 损伤尤其双链断裂(DSBs)损伤修复过程^[8,9]。本研究结果显示,鼠源蛋白 mUBE2W 在细胞中高表达能够显著降低 Uv 诱导的细胞凋亡(待发表)。因此通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的方法敲低 *hUbe2w* 基因在细胞中的表达,将会为此新泛素结合酶的功能研究提供良好的实验平台。

本研究中,通过构建 H1-U6 双启动子 siRNA 表达载体,直接在体内生成 2 段互补的小 RNA,并利用此载体筛选到 2 个针对 *hUbe2w* 基因的 RNAi 有效靶点,为 *hUbe2w* 的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞系和质粒

大肠杆菌 DH5 α 和 293FT 细胞由本室保存;质粒 pCMV-myc、pEGFP-C1 和 pDsRed-express-C1 购自 Clontech 公司,质粒 pGL3-Control、pBIND 和 pGEM-T 购自 Promega 公司,shRNA 表达载体 pSilencerTM 2.1-U6/neo 由本所二室段德民馈赠,慢病毒表达载体 pLenti6/V5-GW/EGFP 由本室武瑞琴构建。

1.1.2 工具酶、试剂和抗体

Taq plus DNA 聚合酶购自上海生工;限制性内

切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;RT-PCR 试剂盒 TaKaRa BcaBEST RNA PCR Kit Ver.1.1 购自 TaKaRa 公司;RNA 提取试剂盒和细胞转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司;萤光素酶活性检测试剂盒 Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司;PVDF 膜和 ECL 显色试剂盒购自 Amersham 公司;抗 myc 标签鼠单克隆抗体购自 TIANGEN 公司,抗 β -actin 鼠单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 双启动子 siRNA 载体的构建

分别以质粒 pLenti6/V5-GW/EGFP 和 pSilencerTM 2.1-U6/neo 为模板,以表 1 中所列序列为上、下游引物,用 H1F/H1R 扩增 H1 启动子序列,用 U6F/U6R 扩增 U6 启动子序列,序列两端均带有 *Mlu* I 和 *Eco*R I 位点,同时 H1 和 U6 启动子中间引入 2 个 *Bst*X I 位点,便于 siRNA 编码框的插入和转录。*Mlu* I 和 *Eco*R I 双酶切扩增序列,回收酶切产物后与用 *Mlu* I 酶线性化的 pEGFP-C1 载体连接,构建双启动子 siRNA 载体 pGFP-HU,挑选阳性克隆并测序。

1.2.2 siRNA 的设计及载体构建

根据 siRNA 设计原则,在 *hUbe2w* 基因编码区 50~500 bp 区域选取 5 个 RNAi 靶点,同时设计一段无义序列作为阴性对照和针对 Firefly Luciferase 基因的靶点序列作为阳性对照^[13],并于每条序列 3'端加 4 个腺嘌呤(T),以方便 siRNA 表达框插入载体(表 2),将干涉序列正、反义链各 5 μ mol/L 混合于 50 μ L 退火缓冲液体系,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,缓慢降低温度至室温。退火产物直接连接至 pGFP-HU 载体,挑取阳性克隆并测序。

1.2.3 人 *hUbe2w* 全长 cDNA 的克隆

利用 Invitrogen Micro-to-Midi Total RNA Purification System 提取并纯化 293FT 细胞总 RNA,反转录试剂盒进行 RT-PCR 合成 cDNA。以该 cDNA 为模板,*Ube2w*-F、*Ube2w*-R 为引物(表 1),Taq Plus DNA 聚合酶进行 PCR 扩增出 *hUbe2w* 全长片段。扩增策略为:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,首先扩增 20 个循环,以此 PCR 产物为模板相同条件下再次扩增 25 个循环得到最终产物。扩增片段直接接入 pGEM-T 载体,挑取阳性克隆,测序。

表 1 PCR 扩增所用的引物及其序列
Table 1 Primer sequences used in the amplification of H1 and U6 promoters and *hUbe2w*

Primer name	Primer sequence (5'-3')
H1F	CGACGCGTAATTCGAACGCTGACGTCA
H1R	CGGAATTCACCAATTTTTGGGTGGTCTCATAAGAACT
U6F	CGACGCGTCAAGGTCGGGCAGGAAGA
U6R	CGGAATTCGTCCAATTTTTGGGTCTTTCCACAAGATAT
<i>hUbe2w</i> -F	TGGCCTCGCCGGTCTTGGGGGGATGGTTCC
<i>hUbe2w</i> -R	AGGATGATAACAGTGGCATCAACAAGTATC
<i>hUbe2w</i> -XbaIF	GCTCTAGAATGGCGTCAATGCAGA
<i>hUbe2w</i> -XbaIR	GCTCTAGAACAAAGTATCATCATGATAC
<i>hUbe2w</i> -EcoRIF	CGGAATTCGGATGGCGTCAATGCAGA
<i>hUbe2w</i> -BglIIR	GAAGATCTTCAACAAGTATCATCATGATAC
<i>hUbe2w</i> -BglIIF	GAAGATCTATGGCGTCAATGCAGACCAC
<i>hUbe2w</i> -EcoRIR	CGGAATTCCTCAACAAGTATCATCATGATAC

表 2 合成的编码 siRNA 的寡核苷酸序列
Table 2 Oligonucleotides used in RNAi

Name	Sense strand (5'-3')	Antisense strand (5'-3')
<i>hUbe2w</i> -94	AATTCATTACACAGTGGACTTTT	GTCCACTGTGTAATTGAATTTTTT
<i>hUbe2w</i> -125	AGTGCACCAGGTACCTTATC TTTT	GATAAGGTACCTGGTGCACCTTTT
<i>hUbe2w</i> -235	CCTGTTATCCTCATGTTTATCTTTT	GATAAACATGAGGATGAACAGGTTTT
<i>hUbe2w</i> -259	ATGGTCATATCTGTTTATCCTTTT	GGATAAACAGATATGACCATTTTT
<i>hUbe2w</i> -363	AGAGACGACCACCGGATAACTTTT	GTTATCCGGTGGTCTCTCTTTTT
<i>hUbe2w</i> -Control	ATCTGCCTTCATACTATCTACTTTT	GTAGATAGTATGAAGGCAGATTTTT
Luci	ATTAAGACGACTCGAAATCTTTT	GATTCGAGTCGTCTTAATTTTT

1.2.4 RNA 干扰报告质粒的构建

以表 1 中 *hUbe2w*-Xba IF 和 *hUbe2w*-Xba IR, *hUbe2w*-EcoRIF 和 *hUbe2w*-BglIIR, *hUbe2w*-BglIIF 和 *hUbe2w*-EcoRIR 为上、下游引物, 质粒 pGEM-T/*hUbe2w* 为模板, 退火温度 55°C, 常规 PCR 反应 25 个循环, 分别扩增出两端带有限制性酶切位点的 *hUbe2w* 序列, *hUbe2w*(Xba I-Xba I)、*hUbe2w*(EcoR I-Bgl II) 和 *hUbe2w*(Bgl II-EcoR I)。限制性内切酶酶切 PCR 产物和载体(pGL3-control、pCMV-myc 和 pDsRed-express-C1), 琼脂糖凝胶电泳纯化、回收 *hUbe2w* 片段和线性化载体, T4 DNA 连接酶 16°C 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 经克隆筛选, 获得插入 *hUbe2w* 片段的 pGL3/*hUbe2w* 和 pCMV-myc/*hUbe2w* 和 pDsRed-express-C1/*hUbe2w* 重组子。挑取单克隆进行酶切鉴定并测序。

1.2.5 荧光素酶活性检测

RNAi 载体, pGL3/*hUbe2w* 和 pBIND 质粒按照质量比 8:1:1 比例转染 293FT 细胞, 36 h 后收获细胞, 荧光素酶活性检测试剂盒检测荧光强度。操作参照

产品说明。每个 RNAi 靶点载体重复 3 孔, 整个实验独立重复 3 次。

1.2.6 蛋白免疫印记检测

RNAi 载体和 pCMV-myc/*hUbe2w* 质粒按照质量比 9:1 比例转染 293FT 细胞, 48 h 后, 1 \times SDS 上样缓冲液直接裂解细胞提取总蛋白, myc 标签抗体 Western blotting 检测 *hUbe2w* 在细胞中的表达, 同时以 β -actin 检测作为内参照。整个实验独立重复 3 次。

1.2.7 细胞荧光检测

RNAi 载体和 pDsRed-express-C1/*hUbe2w* 质粒按照质量比 1:1(0.5 μ g: 0.5 μ g) 比例转染 293FT 细胞, 36 h 后, 在荧光显微镜下 557 nm 激发光观察 *hUBE2W* 的表达抑制情况, 同时在一视野下 488 nm 激发光下观察 RNAi 载体转染效率并作为荧光检测内参照。

2 结果

2.1 成功构建双启动子 RNAi 载体

PCR 分别扩增出 H1 和 U6 启动子(图 1), 酶切后直接与线性化的 pEGFP-C1 载体进行三片段连接,

测序得到序列正确的双启动子 RNAi 载体, 命名为 pGFP-HU。在载体中, H1 和 U6 启动子相向排列, 2 个启动子 3'端-8~-1 位碱基被 *BstX* I 酶切位点“CCAAAAATTGG”所替代, 在便于 siRNA 编码框插入的同时, 也引入了另一启动子的终止信号。可以在中间 *EcoR* I 酶切位点插入一些较长的无关序列, 以便于后续用 *BstX* I 酶切时进行效果分析(图 2a)。

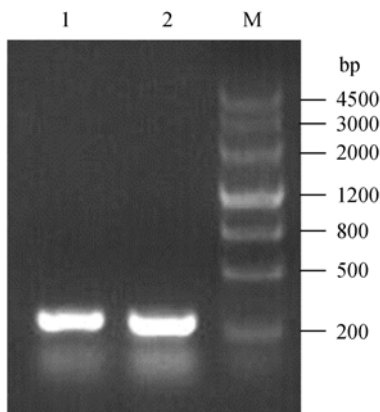


图 1 扩增出 H1 和 U6 启动子序列
Fig. 1 Amplification of the H1 and U6 promoters
1: H1 promoter; 2: U6 promoter; M: marker

2.2 构建针对靶序列的 RNAi 载体

针对 *hUbe2w* 基因和 Firefly Luciferase 基因的靶点序列, 及一段无义序列均正确从 *BstX* I 酶切位点连入 H1 与 U6 启动子之间, 序列分析显示 H1 和 U6 启动子的起始转录位点为靶序列的第一个碱基(图 2b)。

2.3 扩增人 *hUbe2w* 基因并构建报告载体

通过两轮 PCR 的富集扩增, 从 293FT 细胞总 cDNA 中扩增出约 500 bp 的 *hUbe2w* DNA 片段(图 3), 测序结果显示得到正确序列。分别利用含各自酶

切位点的引物扩增 *hUbe2w* 序列, 连接入 pGL3-control、pCMV-myc 和 pDsRed-express-C1 载体, 测序结果表明成功构建 *hUbe2w* 基因表达报告载体。

2.4 在 mRNA 水平筛选 hUBE2W 的有效靶点

构建成功的萤光素酶报告质粒 pGL3/*hUbe2w* 转染细胞, 会转录出萤光素酶-*hUbe2w* 杂合 mRNA, siRNA 造成杂合 mRNA 中 *hUbe2w* 的降解, 会引发整个杂合 mRNA 的快速降解, 从而使翻译萤光素酶的量显著下降。将针对特定片段的 RNAi 载体, pGL3/*hUbe2w* 和 pBIND 质粒共转染 293FT 细胞。RNAi 载体 pGFP-HU 表达的绿色荧光蛋白(GFP)用于监测转染效率, pGL3/*hUbe2w* 表达的萤火虫萤光素酶(Firefly luciferase, F-luc)作为检测抑制程度的报告基因, pBIND 表达的 Renilla 萤光素酶(Renilla luciferase, R-luc)作为内参。数据结果以转染了 pGFP-HU 空质粒的对照组 F-luc/R-luc 的平均值设定为 100%, 其他组数据以此标准化。结果如图 4 所示, 在大致相同转染效率下, 靶点 125、259 和 363 可以较明显的在 mRNA 水平降低 *hUbe2w* 的表达, 其中靶点 363 基本与阳性对照 Luci 相当, 使 F-luc 的表达量下降为空载体对照组的 40%。

2.5 靶点 125 和 259 能够明显降低外源 hUBE2W 蛋白的表达

将各靶点 RNAi 载体与 pCMV-myc/*hUbe2w* 质粒或 pDsRed-express-C1/*hUbe2w* 质粒共转染 293FT 细胞, 分别利用 myc 标签抗体免疫印记检测或荧光显微镜观察 hUBE2W 在细胞中表达水平。免疫印记检测结果(图 5a)基本与 mRNA 水平检测结果相符, 靶点 125 和 259 能够在蛋白水平显著降低 hUBE2W 的表达。hUBE2W 与红色荧光蛋白(RFP)进行融合表达,

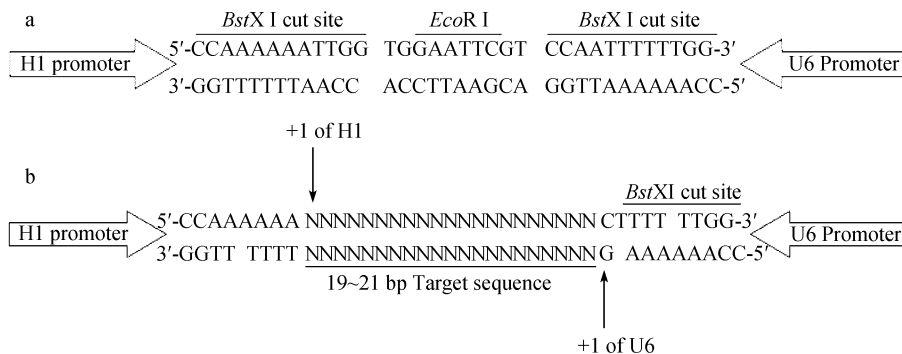


图 2 H1-U6 双启动子 RNAi 载体表达框示意图

Fig. 2 Structure of the H1-U6 dual promoter RNAi vector

An *EcoR* I restriction enzyme site (a) and targeting DNA inserts (b) are cloned into the *BstX* I restriction site between the H1 and U6 promoters

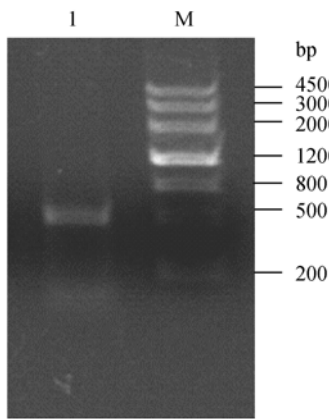


图 3 RT-PCR 扩增 hUbe2w DNA 序列
Fig. 3 The *hUbe2w* cDNA amplified by reverse transcription of the 293FT total RNA
1: *hUbe2w* cDNA; M: marker

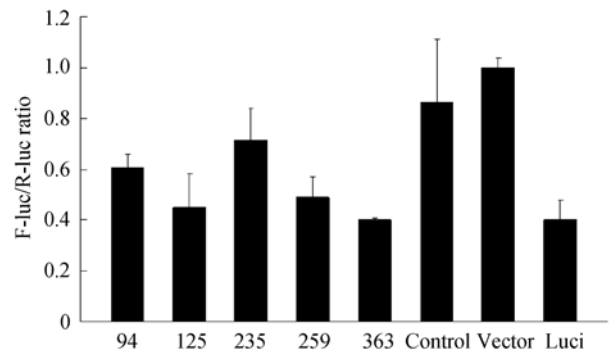


图 4 H1-U6 双启动子 RNAi 载体在 mRNA 水平降低 *hUbe2w* 表达
Fig. 4 Effect of H1-U6 dual promoter RNAi vector to depress the expression of *hUbe2w* mRNA

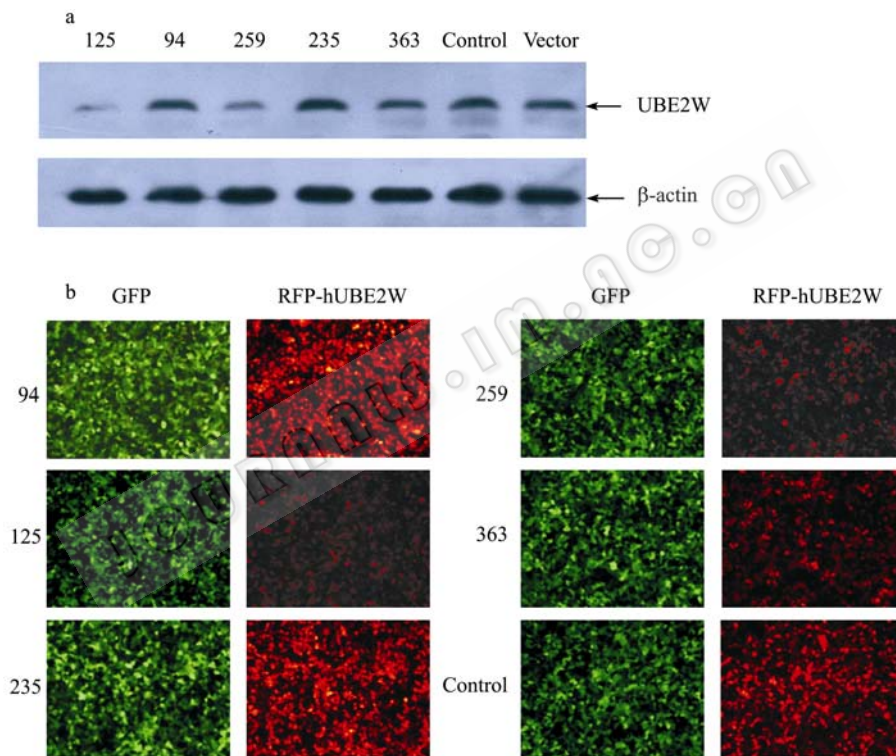


图 5 Western blotting(a)和细胞荧光(b)检测 H1-U6 双启动子 RNAi 载体在蛋白水平降低 hUBE2W 的表达
Fig. 5 Western blotting (a) and cellular fluorescence (b) analysis of effect of H1-U6 dual promoter RNAi vector to depress hUBE2W protein expression level

利用荧光显微镜可以在活细胞下观察其表达情况, 而 RNAi 载体可表达绿色荧光蛋白(GFP), 因此可以用来控制各靶点转染组的转染量及效率。结果如图 5b 所示, 在各 RNAi 载体表达量基本一致的情况下, 与阴性对照相比, 靶点 125、259 和 363 可以较明显降低 hUBE2W 荧光强度和发荧光细胞数目, 其中靶点 125 和 259 抑制效果更为显著。

3 讨论

RNAi 是生物体内双链小 RNA(dsRNA)引起的特异序列的基因沉默现象, 首先 Dicer 酶切割 dsRNA 为 21~25 bp 的小干涉 RNA(Small interfering RNA, siRNA), 随后与相关蛋白结合形成核苷酸蛋白复合体(Ribonucleotide protein complex, RNP),

RNP 以 ATP 依赖的方式活化 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 最终导致同源基因 mRNA 降解^[10]。随着对 RNAi 发生过程及机制的深入认识, RNAi 技术已经成为探索基因功能的新手段^[11]。

目前已有很多成熟的方法获得 siRNA, 其中利用质粒或病毒载体内源性表达 shRNA, 筛选稳定表达株, 从而在细胞中持续抑制靶基因的表达^[12]。但表达 shRNA 的方法一般需要合成较长序列, 且序列中的发卡结构给后续退火、连接带来一定难度, 同时还可能导致构建载体在某些菌株如 DH5 α 中不稳定^[13]。2003 年, Tran 等利用 2 个相对排列的 U6 启动子构建 RNAi 载体, 可在体内直接转录生成 siRNA 并具有较高抑制活性^[14], 但本实验室及第三军医大学程小星实验室均发现利用 2 个相同的 U6 启动子构建载体异常不稳定, 导致转化大肠杆菌难于形成克隆^[15]。随后 Kaykas 等及 Jian 等多个实验室在此基础上构建 H1-U6 双启动子载体, 大大提高了载体的稳定性, 并应用其构建随机 siRNA 文库进行高通量筛选, 拓展了此类载体在基因规模化功能研究中的应用^[13,16]。与 shRNA 表达载体相比, H1-U6 双启动子 RNAi 载体避免合成具有反向互补序列的长片段 DNA, 不仅节约费用, 而且小片段 DNA 与载体的高效连接更有利于载体的快速构建^[14], 从而能够快速筛选出特定基因的有效 RNAi 靶点, 这对于单个基因的功能研究非常便利。

基于此思路, 以 pEGFP-C1 载体为原始载体, 插入相向排列的 H1-U6 启动子表达框, 构建了双启动子 RNAi 载体, 并利用此载体从 hUBE2W 的 5 个候选 RNAi 靶点中筛选出 2 个有效靶点。结果显示, 无论在 mRNA 水平还是蛋白水平, 此 2 个有效 RNAi 靶点均能够明显降低 hUBE2W 的表达, 为进一步研究 hUBE2W 的功能打下基础。同时, H1-U6 双启动子载体也为本实验室进一步利用其进行 RNAi 文库的构建奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Prendergast JA, Ptak C, Steussy CN, *et al.* Identification of a positive regulator of the cell cycle ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 (Ubc3). *Mol Cell Biol*, 1996, **2**(16): 677-684.
- [2] Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, *et al.* UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res*, 2003, **63**: 4167-4173.
- [3] Zhao GY, Sonoda E, Barber LJ, *et al.* A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell*, 2007, **25**: 663-675.
- [4] Zhang YY, Zhu HQ, Zhao LX, *et al.* Generation of mouse UBE2W antibody and analysis of UBE2W expression in mouse tissues. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(4): 547-552. 张莹莹, 朱恒奇, 赵莉霞, 等. 小鼠泛素结合酶 UBE2W 的抗体制备及组织表达谱分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(4): 547-552.
- [5] Wang RX, Xu JC, Saramäki O, *et al.* PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, **64**: 1589-1594.
- [6] Porkka K, Saramäki O, Tanner M, *et al.* Amplification and overexpression of elongin C gene discovered in prostate cancer by cDNA microarrays. *Lab Invest*, 2002, **82**(5): 629-637.
- [7] Chen C, Sun X, Guo P, *et al.* Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer. *Oncogene*, 2007, **26**: 2386-2394.
- [8] Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE. E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(10): 941-948.
- [9] Wu WW, Koike A, Takeshita T, *et al.* The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div*, 2008, **3**: 1.
- [10] Birmingham A, Anderson E, Sullivan K, *et al.* A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity. *Nature Protocols*, 2007, **2**(9): 2068-2078.
- [11] Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, *et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci*, 2001, **114**:4557-4565.
- [12] Hammolld SM, Caudy AA, Hannon G. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2001, **2**: 110-119.
- [13] Kaykas A, Moon RT. A plasmid-based system for expressing small interfering RNA libraries in mammalian cells. *BMC Cell Biol*, 2004, **5**:16.
- [14] Tran N, Cairns MJ, Dawes IW, *et al.* Expressing functional siRNAs in mammalian cells using convergent transcription. *BMC Biotechnol*, 2003, **3**: 21.
- [15] Jian R, Cheng XX, Peng T, *et al.* RNA interference mediated by U6 and H1 dual promoter vector. *China Biotechnology*, 2004, **11**(24): 26-31. 蹇锐, 程小星, 彭涛, 等. U6 和 H1 双启动子载体用于 RNAi 的实验研究. *中国生物工程杂志*, 2004, **11**(24): 26-31.
- [16] Jian R, Cheng XX, Jiang X, *et al.* A cDNA-based random RNA interference library for functional genetic screens in embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2007, **25**(8): 1904-1912.