

# 利用 RNA 干扰技术沉默基因表达在本科实验教学中的设计与实践

宋亚坤, 张敏, 王翹楚, 彭玉荔, 贾方兴, 余春红

南方科技大学生物系, 生命科学实验教学中心, 深圳 518055

**摘要:** RNA 干扰是由双链小 RNA 介导的基因沉默现象, 已成为一个被广泛应用的反向遗传学研究技术。为了让学生更好地理解该技术, 本实验教学让学生自己选择靶基因, 设计小干扰 RNA 和引物, 然后检测小干扰 RNA 介导的基因沉默效果。以 2018 年第五组为例, 该组挑选了小鼠长链脂酰辅酶 A 合成酶 1 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, *Acs11*) 为靶基因, 设计了两对特异性靶向 *Acs11* mRNA 的小干扰 RNA, 通过电穿孔的方式将其转染到 3T3-L1 中, 然后提取细胞总 RNA 和合成 cDNA, 最后用相对定量 PCR 检测 mRNA 的表达量。结果显示两对小干扰 RNA 都有 60% 以上的沉默效果。近 3 年内, 大约 83% 的学生都能独立完成所有实验并最终成功筛选到至少一对有效的小干扰 RNA。该教学实践增强了学生对 RNA 干扰原理和实验的理解, 锻炼了学生的实验与科研能力。

**关键词:** RNA 干扰; 小干扰 RNA 设计; 实验课程; 本科生教育

## Laboratory design and practice for undergraduates: Using RNAi to modulate gene expression

Yakun Song, Min Zhang, Qiaochu Wang, Yuli Peng, Fangxing Jia, Chunhong Yu

Life Science Experimental Teaching Center, Department of Biology, Southern University of Science and Technology, Shenzhen 518055, China

**Abstract:** RNA interference is a gene silencing phenomenon mediated by short double-stranded RNAs, which has become a widely used research technology for reverse genetics. In order to make students understand the technology better, the students were required to select target genes, to design small interfering RNAs (siRNAs) and primers, and then to test the effect of gene silencing mediated by siRNAs. Taking the fifth group in 2018 as an example, *Mus musculus* acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (*Acs11*) was selected as the target gene, two pairs of siRNAs targeting *Acs11* mRNA were designed and transfected into 3T3-L1 by electroporation, then the total

收稿日期: 2019-01-18; 修回日期: 2019-05-12

基金项目: 南方科技大学教学改革项目(编号: ZLGC201603, JG201604, SJZLGC201701)资助[Supported by the Teaching Reform Projects of

Southern University of Science and Technology (Nos. ZLGC201603, JG201604, SJZLGC201701)]

作者简介: 宋亚坤, 硕士, 实验员, 研究方向: 生物实验教学。E-mail: songyk@sustech.edu.cn

通讯作者: 余春红, 博士, 工程师, 研究方向: 生物实验教学。E-mail: yuch@sustech.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.18-343

网络出版时间: 2019/6/4 15:32:35

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190604.1532.002.html>

RNAs were extracted and synthesized to cDNA, and the expression levels of mRNAs were finally tested by relative quantitative PCR. The results showed that both pairs of siRNAs had more than 60% silencing effects. In the past three years, about 83% of the students completed all the experiments successfully and screened out at least a pair of effective siRNA. This teaching practice for undergraduates enhances students' understanding of RNA interference principle and technology, and exercises students' lab experience and scientific research ability.

**Keywords:** RNA interference (RNAi); siRNA design; laboratory course; undergraduate education

经典的 RNA 干扰是由双链小 RNA 介导的靶基因表达下降的现象,早期在植物<sup>[1]</sup>、真菌<sup>[2]</sup>、线虫<sup>[3,4]</sup>等生物中被发现,后来被证实是一种高度保守的机制,广泛存在于生物界<sup>[5-7]</sup>。2006 年, RNAi 机制的发现者 Andrew Fire 和 Craig Mello 被授予诺贝尔生理及医学奖。RNA 干扰技术已成为一个很好的反向遗传学研究工具,被广泛用于基因功能的研究<sup>[5-7]</sup>和基因治疗方式的研发<sup>[8-10]</sup>。其原理是双链 RNA (double strand RNA, dsRNA) 在细胞质内被一种称为 Dicer 的酶特异识别并剪切成长度为 20~23 bp 的双链小分子干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)<sup>[11,12]</sup>; 然后 siRNA 被组装到 RNA 诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)中。该复合体含有多种蛋白成分,如核糖核酸酶、解旋酶。RISC 被激活后, siRNA 双链被解链成正义链与反义链,反义 siRNA 链按照碱基互补的原则与靶标 mRNA 完全互补结合,引导 RISC 对 mRNA 进行切割。切割位点发生在与反义 siRNA 完全互补结合的 mRNA 区,距离反义 siRNA 5'末端 10~12 bp 处。mRNA 被切割后降解,基因表达因此受到抑制<sup>[5-7]</sup>。

经历 20 年的发展, RNA 干扰技术日渐成熟,从科研实验室走进了本科实验教学。常见的教学内容是学生将教师设计和准备好的小干扰 RNA 或表达载体转入细胞或机体中,检测靶基因(如荧光蛋白)的表达或观察机体的变化<sup>[13-17]</sup>。虽然教学效果良好,但这样的设计让学生动手操作的实验主要是细胞转染和结果观察或检测。虽然教师会讲 RNA 干扰的原理,但学生对 RNA 干扰原理和过程的理解可能不深刻或不全面。为了让学生更好地理解该技术,本教学实践在现代生物技术实验课里,以敲低 3T3-L1 细胞中基因的表达为目的,让学生自己选择靶基因、

设计 siRNA、分析 siRNA 结合靶基因 mRNA 的区域和验证 siRNA 介导的基因沉默效果。该项目将序列分析、siRNA 的设计和验证等实验融合成一个小项目“利用 RNA 干扰技术沉默基因表达”,要求学生全程自己动手完成所有实验,强调对学生能力的培养和强化学生对 RNA 干扰机制和过程的理解。本文介绍了该课程的主要内容,以及本实验设计的目的和意义,为 RNA 干扰在分子遗传学实验课、现代分子生物学实验课或现代生物技术实验课等相关实验课程的教学提供参考。

## 1 课程内容设计

该课为现代生物技术实验课,自 2014 年开始教学,授课对象为三年级的本科生,是生物技术专业的必修课,生物科学和生物信息专业的选修课。整个实验课程的内容是一个小设计型实验项目“利用 RNA 干扰技术沉默基因的表达”。首先让学生选择感兴趣的靶基因,查找相关信息,并分析序列、结构等,让学生参与实验的设计。其次,由于 RNA 干扰的作用机制中介导基因沉默的是 siRNA,化学合成的 siRNA 也用于基因功能的研究<sup>[18,19]</sup>和 siRNA 药物的研发<sup>[8-10]</sup>,本课程就让学生设计 siRNA,然后由公司合成,待收到合成的 siRNA 后,将其转染进细胞,然后检测 siRNA 对靶基因表达的影响,从而增加学生对 RNA 干扰机制的理解。该课让学生全程自己操作完成所有实验,更好地锻炼学生的动手能力和分析能力。课程的主要内容包括靶基因的挑选和分析、siRNA 和引物设计、引物扩增效率检测、细胞培养、转染、细胞总 RNA 的提取和检测、cDNA 合成和基因表达检测等(图 1)。

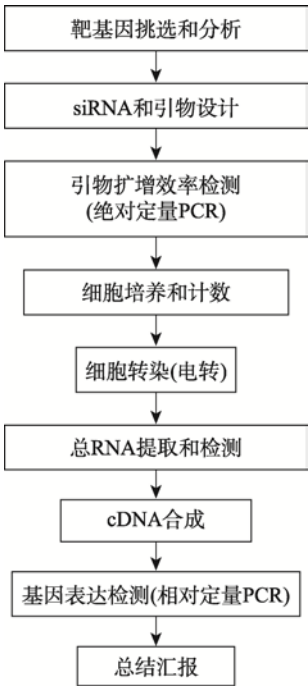


图 1 课程实验流程图

Fig. 1 Flow chart of experiments in the course

学生设计的 siRNA 是利用在线算法预测的,未必真正有效。为了让学生验证自己的实验操作没问题,课程提供了一对阴性对照 siRNA 和一对靶向 *Gapdh* 且已验证过的 siRNA 作为阳性对照 siRNA。若学生敲低了阳性对照基因(*Gapdh*)的表达,敲低效率在 30% 以上,且  $P < 0.05$ ,说明学生的实验操作是成功的。课程对学生设计的 siRNA 能否起到介导沉默的作用不做要求,但设定靶基因表达被敲低 30% 以上才说明 siRNA 有效。若学生设计的 siRNA 有很好的沉默效果,有兴趣继续往下研究,可以跟教师商量实验方案后,利用课后时间继续深入实验。

考虑到本科生的上课时段是固定的,课程将项目内容分解成了 8 次课,包括 7 次实验课和 1 次总结汇报课,基本上每次都可以在固定的 4 学时教学时段内完成教学,共约 32~36 学时,适合本科生的时间安排。为了增强教学效果,课程实行小班教学,每个班 10~12 人,2 人一组,共 5~6 组,如果学生人数多会多开几个班级。具体课程内容和安排见表 1。

表 1 课程内容和安排

Table 1 Course contents & arrangement

课次	实验内容	学时数	课程内容	教师准备工作
1	靶基因挑选和分析	4(也可以 2 学时,让学生在课后分析)	(1)介绍项目内容及相关背景知识 (2)介绍如何应用数据库和工具分析基因的表达、序列、结构等信息 (3)指导学生查找感兴趣的靶基因并分析其表达、序列和结构等信息	(1)检查在线资源和工具的正常使用 (2)提醒学生带笔记本电脑
2	SiRNA 和引物设计	4	(1)介绍 siRNA 和 qPCR 引物的设计原则,以及如何应用在线资源设计 siRNA 和引物 (2)介绍如何分析 siRNA 和引物的特异性;并分析其对应基因结构的位点 (3)指导学生当堂完成设计和分析	(1)检查在线资源和工具的正常使用 (2)提醒学生带笔记本电脑 (3)课后一一检查学生交上来的分析结果,并把 siRNA 和引物发给公司合成
3	引物扩增效率检测	4	(1)介绍采用 qPCR 检测引物扩增效率的原理、操作和相关数据分析 (2)指导学生溶解引物,梯度稀释 cDNA 模板和完成 qPCR 实验	(1)准备 3T3-L1 细胞的 cDNA,并预实验检测其质量 (2)准备试剂盒和灭菌水等 (3)预约定量 PCR 仪 2~3 台/班 (4)课后及时分析学生数据;安排结果不好的学生补做或重新设计引物或换靶基因(如果表达量不高的话)
4	细胞培养和计数	4	(1)介绍细胞培养的原理和常规操作,细胞生长状态分析 (2)指导学生熟练完成细胞的消化、计数和传代等操作 (3)第 2 天指导学生观察细胞生长状态	(1)准备 3T3-L1 细胞 (2)准备培养液、胰酶、PBS 和培养皿等 (3)准备细胞计数仪

续表

课次	实验内容	学时数	课程内容	教师准备工作
5	细胞转染	4	(1)介绍电穿孔法转染细胞的原理、影响因素和操作 (2)指导学生完成细胞转染实验 (3)指导学生第3天用 Trizol 试剂裂解细胞, 收集细胞裂解液, 置-80℃冰箱保存	(1)准备 3T3-L1 细胞 (2)准备细胞培养液、胰酶、PBS、培养板、电转试剂盒、Trizol 试剂、12 孔板等 (3)准备 1~2 台电转仪/班
6	细胞总 RNA 的提取和检测; 以及 cDNA 合成	6	(1)介绍细胞总 RNA 提取和检测的原理、操作、注意事项和结果分析 (2)介绍逆转录反应的原理和操作步骤; (3)指导学生完成所有实验 备注: 学生做最后一次定量 PCR, 未必都能一次成功。为防止 RNA 反复冻融导致 cDNA 质量不好, 本次实验直接合成双份 cDNA, 一份 cDNA 预备给学生重做最后一次定量 PCR	(1)准备 RNA 提取和检测的常规试剂和耗材, 如氯仿-异戊醇、70%乙醇、DEPC 水、胶染料、逆转录试剂盒等; 无菌、无 DNA 酶、无 RNA 酶的枪头和 1.5 ml 离心管等 (2)准备高速冷冻离心机、电泳仪、凝胶成像系统、PCR 仪等
7	基因表达检测	6	(1)介绍相对定量 PCR 原理、操作步骤和注意事项、数据分析等 (2)指导学生完成实验	(1)准备 qPCR 试剂盒 (2)预约至少 2~3 台定量 PCR 仪/班 (3)课后及时分析学生数据; 安排结果不好的学生重做 qPCR
8	汇报	4(汇报时间缩短些也可以 2 学时)	学生总结汇报	提前熟悉每组学生的数据, 教师点评

## 2 代表性结果

以 2018 年第五组的实验为例, 该组同学选择的基因为小鼠(*Mus musculus*)的长链脂酰辅酶 A 合成酶 1 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, *Acs1l*), 与细胞内长链脂肪酸代谢有关。由 NCBI 数据库查得该基因的 mRNA (transcript variant 2) 序列编号为 NM\_007981.4。由 UniProt 的 Genevisible 数据库查得该基因在 3T3-L1 细胞系中高表达(图 2), 适合进行后续的 RNA 干扰实验。

首先应用 Thermo Fisher Scientific 公司提供的免费在线资源 BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer 设计 2 对 siRNA, 序列如表 2。用 NCBI 上的 Primer-BLAST<sup>[20]</sup> 设计定量 PCR 引物 1 对, 从 PrimerBank<sup>[21]</sup> 中查找引物 1 对, 序列见表 3。找出 siRNA 和引物对应基因结构上的位置见图 3。

接下来采用定量 PCR 检测引物的扩增效率和特异性。先将引物稀释到工作浓度, 置冰上备用。然后将小鼠 3T3-L1 细胞的 cDNA (教师预先准备) 进行

浓度梯度的稀释: 1; 1/5; 1/10; 1/25; 1/125; 1/625; 1/3125 (选做), 做实时定量 PCR 实验, 最后做数据分析。以 lg cDNA 的相对浓度为横坐标, 荧光强度达到阈值的 PCR 循环数  $C_T$  值为纵坐标, 做标准曲线。再根据公式  $E=10^{-1/\text{slope}}-1$  计算引物的扩增效率。该公式中  $E$  为扩增效率; slope 为标准曲线的斜率。代表性结果如图 4。

在熟练掌握细胞消化、计数等操作的基础上, 将 4 对 siRNA (阴性对照 siRNA、阳性对照 RNA 和 2 对设计的 siRNA) 分别转染到 3T3-L1 细胞。每对 siRNA 做 3 个复孔, 共 12 个孔。电转后将细胞培养约 48h。用 Trizol 试剂裂解细胞, 然后参照 Trizol 试剂的说明书提取细胞总 RNA, 通过非变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性(曾试过甲醛变性胶检测 RNA, 但配制甲醛变性胶时甲醛刺鼻, 不利于学生健康, 后来改用琼脂糖凝胶电泳)(图 5), 同时利用超微量紫外/可见分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 随后将 RNA 逆转录成 cDNA, 置于-20℃冰箱保存。

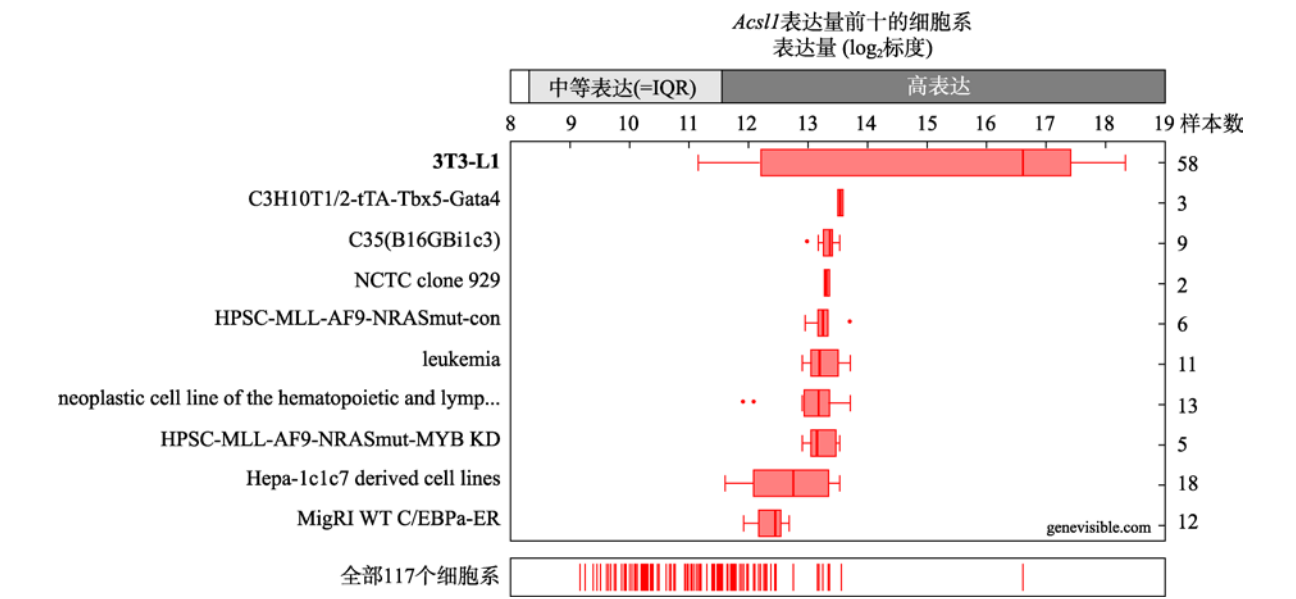


图 2 *Acs11* 基因在不同细胞中的表达水平

**Fig. 2 Expression levels of the *Acs11* gene in different cell lines**

来源于 UniProt 基因表达的 Genevisible 数据库 P41216。

表 2 siRNA 序列

**Table 2 siRNA sequences**

siRNA	基因	序列(5'→3')	来源
ACSL1 siRNA 1	<i>Acs11</i>	s: CCAGCCCUAUGAGUGGAUUTT	第五组设计
		as: AAUCCACUCAUAGGGCUGGTT	
ACSL1 siRNA 2	<i>Acs11</i>	s: GGAUGCUUCUCUACUCAATT	第五组设计
		as: UUGAGUAAGAGAAGCAUCCTT	

小鼠 *Acs11* 基因 siRNA1&2 序列末尾加 TT 以增加 siRNA 的稳定性。s:正向序列; as:反向序列。

表 3 RT-PCR 引物序列

**Table 3 Primer sequences used for qPCR**

引物	基因	序列(5'→3')	来源
mACSL1-1	<i>Acs11</i>	F: TGCCAGAGCTGATTGACATTC	PrimerBank
		R: GGCATACCAGAAGGTGGTGAG	ID: 31560705a1
mACSL1-2	<i>Acs11</i>	F: AGCTCTGGAGGACCTTGGA	第五组设计
		R: CATTGCTCCTTTGGGGTTGC	

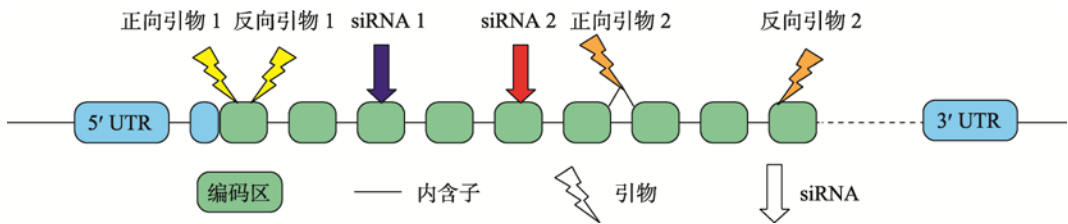


图 3 小鼠 *Acs11* 基因结构示意图

**Fig. 3 Schematic diagram of the mouse *Acs11* gene structure**

引物和 siRNA 对应基因结构的位点分别用不同图形标记。



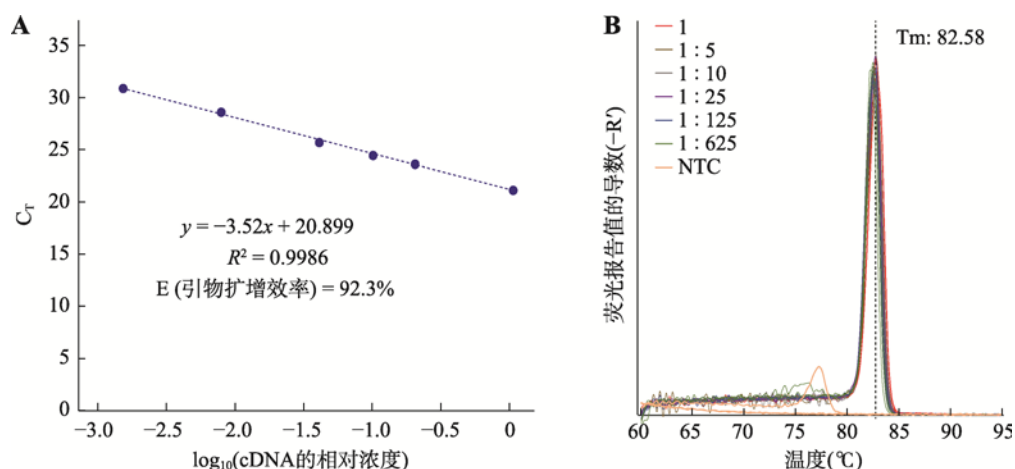


图 4 定量 PCR 引物检测结果

Fig. 4 Results for qPCR primer testing

A: 引物 mACSL1-2 扩增标准曲线, E 为计算的引物扩增效率; B: mACSL1-2 扩增熔解曲线。

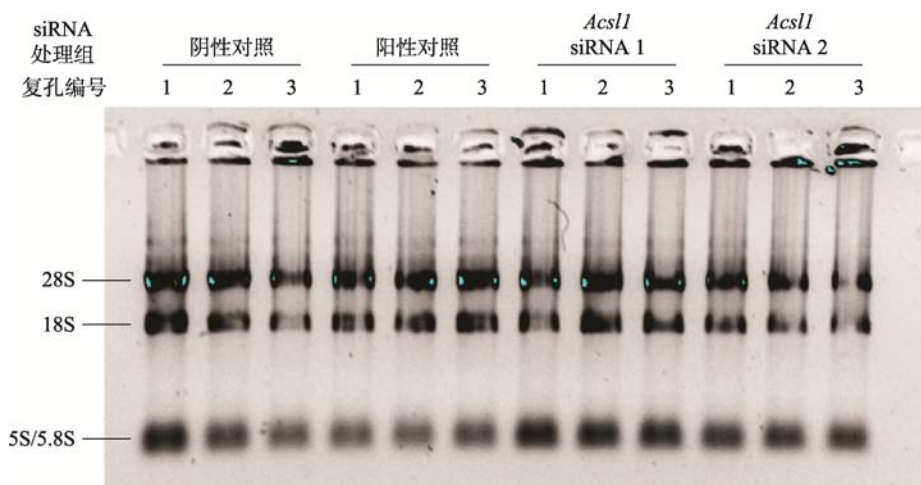


图 5 细胞总 RNA 非变性琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 5 Non-denaturing agarose gel electrophoresis of total RNAs

*Acs11* siRNA1,2: 为转染 *Acs11* siRNA 的编号; 阴性对照: 为转染 NC siRNA 组; 阳性对照: 为转染 *Gapdh* siRNA 组; 1、2、3: 各处理组复孔编号。

最后采用相对定量 PCR 检测 mRNA 的表达量, 应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算 mRNA 的表达情况<sup>[22]</sup>。根据结果做柱形图, 并做单因素方差分析, 结果如图 6。

### 3 实验教学总结

该课程从 2014 年开展至今 5 年, 教学细节逐步完善。我们统计了近 3 年(2016~2018 年)同学们的实验结果(表 4), 大多数学生都能从头到尾顺利完成所有实验, 少数同学需要换靶基因和重做定量 PCR。50%

的实验组设计的 2 对 siRNA 均能有效敲低靶基因的表达; 约 83% 的实验组至少有 1 对设计的 siRNA 有明显敲低效果。筛选到有效 siRNA 的实验组一般阳性对照 siRNA 的敲低效果也很明显(代表性结果见图 6)。教学实践结果表明项目的难易程度适合高年级本科生。

学生必须在第八次课上做一次总结汇报, 然后写一份实验报告, 检测他们对实验的理解情况, 也锻炼他们的口头和书面表达能力。从汇报和实验报告中发现, 学生对项目背景、材料与方法、实验操

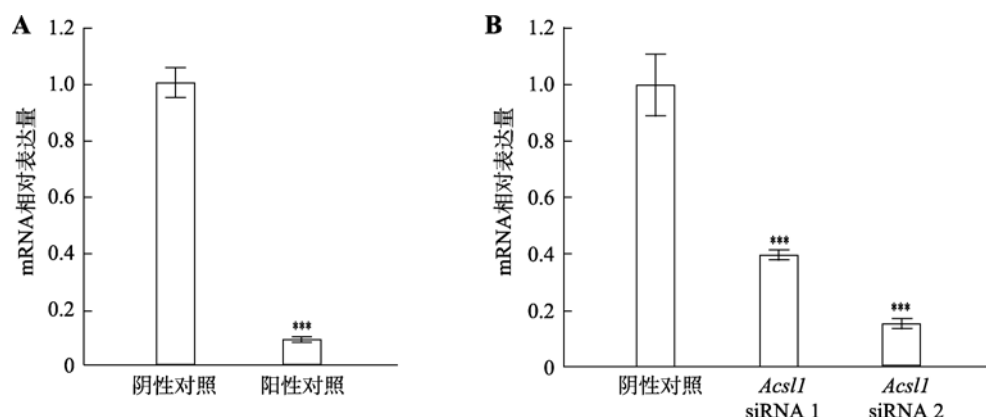


图 6 敲低效果比较图

**Fig. 6 The comparison of expression levels between knockdown and control groups**

A: *Gapdh* mRNA 在阴性对照和阳性对照中的相对表达情况；B: *Acs11* mRNA 在阴性对照和实验组中的相对表达情况。

\*\*\*:  $P < 0.001$ , 差异极显著。

表 4 近 3 年(2016~2018 年)学生实验结果统计

**Table 4 Statistical analyses of students' experimental results in the recent three years**

年度	组数			
	A <sup>+</sup>	A	B	C
2016	4	3	3	1
2017	7	6	4	0
2018	15	8	0	1
小计	26	17	7	2

A<sup>+</sup>: 学生设计的两对 siRNA 均有明显敲低效果；A: 学生设计的两对 siRNA 中只一对有明显敲低效果；B: 学生设计的 siRNA 无明显敲低效果，但阳性对照有明显敲低效果；C: 学生设计的 siRNA 和阳性对照均无明显敲低效果。

作过程和各阶段的实验结果都有清楚的认识和自己的感悟。

## 4 教学效果

### 4.1 增强了学生对序列和 RNA 干扰机制的理解

与以往 RNA 干扰实验的教学设计不同的是，本实验课程让学生参与实验的设计。学生选择靶基因，利用免费的在线资源设计 siRNA，然后自己全程动手完成所有实验验证其设计。课后学生反馈该实验课的设计感和参与感都很强。在这个过程中，学生学会了查找基因的相关信息和使用一些序列分析工具和数据库。这些分析让学生印象深刻，很有收获，

对序列、外显子和内含子等概念有了更深刻和直观的认识，也加深了对小分子 RNA 介导 RNA 干扰的机制的理解。还有学生在分析一篇已发表的科技论文时，惊奇地发现文中的序列跟实验材料的物种不相符，数据不可信！

21 世纪是基因组信息爆发的时代。作为新时代的本科生，非常有必要了解和掌握一些常见的基因序列分析技术和数据库的应用能力。本课程是一个将生物信息分析基础技术与实验课程相结合教学的一个有益探索，相信这也是现代生物实验教改与时俱进的一个方向。

### 4.2 通过项目型实验课程锻炼学生的动手能力和分析能力

本科生的上课时段是固定的，较难在实验课中引入一个较为完整的项目，因此常规本科实验课程中每个实验大都是独立、相互不影响的。该课程以项目型实验课程的形式开设，融合进来的知识和技术有 RNA 干扰、电穿孔、定量 PCR 技术及其应用、RNA 提取、检测和逆转录、如何应用数据库或在线资源查找基因序列、分析基因结构、设计 siRNA 和定量 PCR 的引物，等等。该实验教学将这些整合成一个小项目“利用 RNA 干扰技术沉默基因的表达”。项目内任何一个实验的失败都会影响最终的实验结果，学生需要准确地完成所有实验，非常锻炼动手能力。该项目还设计了阴性和阳性 siRNA 对照，

qPCR 中必须有内参基因的扩增,对照和内参若做失败了,实验就失败了。这些让学生深刻体会到对照和内参都是不可或缺的,也增加了学生严谨的思维分析能力和数据分析能力。课后学生反馈希望以后有更多类似的、结合现代技术的项目型实验课程。

该课结束后,还有少数同学在以后的课题研究中碰到问题来求助任课教师。如有的同学采用化学试剂转染细胞效果不佳,返回教学实验室自己利用电转仪转染细胞;有的同学在课题中需要设计 siRNA 构建载体来请任课教师帮忙看看;有的同学在做定量 PCR 时碰到问题来咨询任课教师等等。这些说明本科生阶段有必要设立这样的实验课程,然而仅仅通过一次实验课程的学习还不能让他们全部都精通这些实验技术以应变各种应用中碰到的问题,本科生在这方面的实验教学训练还需要进一步加强。

### 4.3 该实验教学的推广性分析

该实验教学对学生的要求是学过生物化学与分子生物学实验课,最好修完细胞生物学实验课(内容应包含哺乳动物细胞培养)。历经几年的教学实践,我们发现未学习生物化学与分子生物学实验的同学做定量 PCR 实验很有难度,从未接触过哺乳动物细胞培养的同学,操作细胞需要多练练,以防止操作带来的污染和提高电转细胞的存活率。

很多高校,尤其是开展高水平 and 双一流建设的大学,都具备该实验实施的软件和硬件。首先用于设计 siRNA 的在线工具是商家网站上免费提供的;分析序列的数据库和工具都是科研上常用的。其次是该课涉及的设备设施都是现代生物实验常用的。一个 12 人的小班需要的仪器有 2 台小型台式高速冷冻离心机、2 台定量 PCR 仪、1 台电转仪(也可以不用)和 1 个容纳 8 人以上的细胞培养房,很多高校都具备这个条件。如果学生人数多,教学设施设备数量不够,建议借用科研公共平台和科研实验室的设备;另外还可以采用学生错峰使用和春秋两季滚动开课等方式解决。有的高校若设施设备较多,可以设立人数多一些的班级。该实验教学采用了电穿孔法转染细胞,该方法常用于转染难转染的细胞。如果电转条件不具备,采用化学试剂转染细胞也可以

取得较好的效果<sup>[18]</sup>。另外也可以换其他易于转染的细胞株。不同的教学实验室可以根据自己的条件调整该实验内容和安排,让更多学生受益。

### 参考文献(References):

- [1] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279–289. [DOI]
- [2] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, 1992, 6(22): 3343–3353. [DOI]
- [3] Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, 1991, 113(2): 503–514. [DOI]
- [4] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811. [DOI]
- [5] Han H. RNA interference to knock down gene expression. *Methods Mol Biol*, 2018, 1706: 293–302. [DOI]
- [6] Buduru S, Zimta AA, Ciocan C, Braicu C, Duda D, Irimie AI, Berindan-Neagoe I. RNA interference: new mechanistic and biochemical insights with application in oral cancer therapy. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 3397–3409. [DOI]
- [7] Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoust N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E. Molecular mechanisms and biological functions of siRNA. *Int J Biomed Sci*, 2017, 13(2): 48–57. [DOI]
- [8] Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(5): 329–340. [DOI]
- [9] Titze-de-Almeida R, David C, Titze-de-Almeida SS. The race of 10 synthetic RNAi-based drugs to the pharmaceutical market. *Pharm Res*, 2017, 34(7): 1339–1363. [DOI]
- [10] Crooke ST, Witztum JL, Bennett CF, Baker BF. RNA-targeted therapeutics. *Cell Metab*, 2018, 27(4): 714–739. [DOI]
- [11] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188–200. [DOI]



- [12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494–498. [DOI]
- [13] Pi Y, Qiao XJ, Lin J, Huang Y, Wu YH, Yang J, Qiao SY. A teaching exploration of the scientific thinking introduced in genetic experiments: conducting and feedback of the experiment about RNA interference. *Biol Teach Univ Elect Edit*, 2012, 2(2): 40–43.  
皮妍, 乔晓京, 林娟, 黄燕, 吴燕华, 杨继, 乔守怡. 遗传学实验中引入科研思维的探索教学—RNA 干扰实验的开展与反馈. 高校生物学教学研究(电子版), 2012, 2(2): 40–43. [DOI]
- [14] SHENG G, LI PC, GUO B, WANG BW, QIAO SY. Introduce a method of quantitative experiment in genetic experiments. *Biol Teach Univ Elect Edit*, 2015, 5(4): 48–51.  
盛冠, 李鹏程, 郭滨, 王博文, 乔守怡. 将定量实验方法引入遗传学实验教学. 高校生物学教学研究(电子版), 2015, 5(4): 48–51. [DOI]
- [15] Song HT, Xiang BQ, Zhang W. RNAi technique based on green fluorescent protein and its application in course of cell biology experiment. *Chin J Cell Biol*, 2010, 32(6): 902–907.  
宋宏涛, 向本琼, 张伟. 基于绿色荧光蛋白的 RNAi 技术在细胞生物学实验课程中的应用实例. 中国细胞生物学学报, 2010, 32(6): 902–907. [DOI]
- [16] Ma XY, Zhao YL, Jia FX, Song YK, Tse YC. Utilization of *Caenorhabditis elegans* in laboratory teaching of genetics. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39 (8): 763–768.  
马小英, 赵颖岚, 贾方兴, 宋亚坤, 谢宇聪. 秀丽隐杆线虫在高校遗传学实验中的应用. 遗传, 2017, 39(8): 763–768. [DOI]
- [17] Joanna A. Miller, D. Scott Witherow, and Susan Carson. A laboratory-intensive course on RNA interference and model organisms. *CBE-Life Sciences Education*, 2009, 8: 316–325. [DOI]
- [18] Li H, Feng JC, Li GL, Wang X, Li MZ, Liu HF. The effect of lnc-RAP3 on 3T3-L1 preadipocyte differentiation in mouse. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(9): 758–766.  
李欢, 冯晋川, 李贵林, 王讯, 李明洲, 刘海峰. lnc-RAP3 对小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响. 遗传, 2018, 40(9): 758–766. [DOI]
- [19] Quan R, Li GL, Mo JX, Zhong CL, Li ZC, Gu T, Zheng EQ, Liu DW, Cai GY, Wu ZF, Zhang XW. Effects of RNA interference on the porcine NHEJ pathway repair factors on HR efficiency. *Hereditas(Beijing)*, 2018, 40(9): 749–757.  
全绒, 李国玲, 莫健新, 钟翠丽, 李紫聪, 顾婷, 郑恩琴, 刘德武, 蔡更元, 吴珍芳, 张献伟. RNA 干扰猪 NHEJ 通路修复因子对 HR 效率的影响. 遗传, 2018, 40(9): 749–757. [DOI]
- [20] Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *Bmc Bioinformatics*, 2012, 13: 134. [DOI]
- [21] Spandidos A, Wang X, Wang H, Seed B. PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(Database issue): D792–D799. [DOI]
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [DOI]

(责任编委: 陈德富)