

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.01031

小发夹 RNA 在稀有鮡鲫胚胎中的表达

杨琳^{1,2} 汪亚平¹ 廖兰杰¹ 朱作言¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 由小的干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA)介导的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年来快速发展的一种转录后基因沉默方法, 已被广泛的应用于基因功能的研究, 基因网络调控的探讨以及疾病的治疗等方面。多数的 siRNA 表达载体依赖 RNA 聚合酶III启动子中的一种, 操纵一段短发夹结构 RNA (Small hairpin RNA, shRNA)在细胞或体内表达。这一类启动子主要包括人源和鼠源的 U6 启动子和人 H1 启动子等。为了探明鱼类自身的 RNA 聚合酶III启动子是否能有效驱动 shRNA 在鱼体内表达, 从而更好地利用 RNAi 进行鱼类基因功能和抗病毒研究, 研究利用斑马鱼的 H1 和 U6 启动子以及草鱼的 H1 启动子, 以草鱼呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)外衣壳蛋白 VP7 基因为靶基因, 以增强型绿色荧光蛋白(eGFP)为报告基因, 分别构建了三个 shRNA 表达载体: pZH1siGCRV-CMVVeGFP、pZU6siGCRV-CMVVeGFP 和 pCH1siGCRV-CMVVeGFP。通过显微注射将三种表达载体分别导入稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)受精卵中。由于 siRNA 片段很短, 其表达检测非常困难, 研究采用 stem-loop RT-PCR 方法, 对稀有鮡鲫胚胎发育不同时期的 shRNA 表达进行了检测。研究结果表明, 采用的三种鱼类自身的 RNA 聚合酶III启动子均能有效驱动 GCRVsiRNA 的表达; 在取样的各个胚胎发育时期均能检测到 GCRV siRNA 的表达; stem-loop RT-PCR 方法可以便捷检测 siRNA 的表达。研究构建的鱼类胚胎 siRNA 有效持续表达载体, 建立的简易快捷 siRNA 检测方法, 为进一步的抗 GCRV 转基因鱼研制以及 siRNA 的病毒复制干扰机制研究奠定了重要基础并提供有力的技术支撑。

关键词: RNA 干扰; 小干扰 RNA; 小发夹 RNA; Stem-loop RT-PCR; 草鱼出血病病毒

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2010)05-1031-06

1998 年, Andrew Fire 和 Craig Mello^[1]在线虫的研究中发现双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子能特异性抑制靶基因的表达, 即 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)。此后, RNA 干扰技术在线虫、果蝇和小鼠等多种生物的基因功能、信号转导和基因治疗研究中得到广泛的应用^[2-4]。Zhao, *et al.*^[5]最早将双链 RNA 分子干扰技术应用于斑马鱼的基因功能研究, 但由于大分子双链 RNA 可能导致非特异性应答, 未能获得特异表型效应。采用小的干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)策略, RNA 干扰技术在斑马鱼 MSN^[6]、GnRH^[7]、Bcl-2^[8]和 PRL

受体^[9]等基因的功能研究中得到成功应用; 同时, siRNA 介导的 RNA 干扰也开始用于虹鳟等经济鱼类的基因功能研究^[10]。已有的研究结果显示, 鱼类细胞中存在与线虫、果蝇和哺乳动物类似的 RNA 干扰机制。

RNAi 作为天然存在的抗病毒免疫反应已经在哺乳动物细胞中被证实, 它可以减少病毒 RNA 的数量、阻断病毒蛋白的表达、抑制病毒的复制、切断病毒的感染途径, 从而达到预防和治疗病毒感染的目的^[11]。最近, 有研究者在对虾中尝试 siRNA 的抗病毒研究。Yodmuang, *et al.*^[12]的研究发现, 注射

收稿日期: 2009-06-10; 修订日期: 2010-03-12

基金项目: 国家 863 项目(2007AA10Z186)资助

作者简介: 杨琳(1984—), 女, 湖北武汉人; 硕士研究生; 主要研究方向为分子遗传学。E-mail: alice_y1_318@163.com

通讯作者: 汪亚平, E-mail: wangyp@ihb.ac.cn

YHV 基因 dsRNA 的对虾, 病毒在体内的复制被完全抑制。Xu, *et al.*^[13]在对虾抗白斑综合症病毒(WSSV)的研究中证实, 以 WSSV 囊膜蛋白 VP28 和 VP15 基因为靶基因设计 siRNA, 注射了 siRNA 的对虾死亡率显著下降, 体内病毒 DNA 复制受到明显抑制。在体内直接注射 dsRNA 或 siRNA 提高对虾抗病毒能力的分子机制尚不清楚, 研究者认为 dsRNA 或 siRNA 可能激活对虾的先天性抗病毒免疫系统, 而且还可能引起一系列特异性的抗病毒反应^[14]。上述研究结果表明, RNAi 可以使 WSSV 的特定基因发生沉默, 是一种治疗 WSSV 感染的新策略。然而, 注射的 siRNA 或 dsRNA 在体内的效应时间有限, 需要多次注射^[15], 使这一策略的实际应用受到极大的限制。siRNA 在体内的持续表达是解决这一问题的可能途径, 目前在水产动物的抗病毒研究中尚未见报道。

草鱼出血病病毒(Grass carp reovirus, GCRV)是草鱼、青鱼等我国重要水产养殖鱼类的高危病原, 对水产养殖业造成极大危害, 抗出血病育种研究是我国水产育种的一个历史性课题。本研究以稀有鮠鲫为模型, 以草鱼出血病病毒衣壳蛋白 VP7 基因为靶基因, 探索 VP7-siRNA 在体内持续表达的可能途径, 为草鱼抗出血病转基因育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验鱼 稀有鮠鲫(*Gobiocypris rarus*), 养殖于本实验室室内循环水系统, 水温 28℃。

试剂和引物 限制性内切酶, *Taq* DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, DNA Marker 购自 Fermentas 公司。DNA 胶回收试剂盒, 质粒小量制备试剂盒购自 Axygen 公司。总 RNA 提取试剂 TRIzol Reagent 和 Superscript III 逆转录酶购自 Invitrogen 公司。测序和引物合成由 Invitrogen 公司完成。本研究所用引物序列(表 1)。

1.2 方法

siRNA 表达载体的构建 斑马鱼 *H1* 基因启动子片段(FJ911602, 1—826)、斑马鱼 *U6* 基因启动子片段(FJ911603, 1—414)和草鱼 *H1* 基因启动子片段(FJ911601, 417—738)由本实验室克隆。上述启动子片段的 PCR 扩增产物经 *Hind*III 和 *Sal* I 酶切, 分别连接到质粒 pCMVeGFP(由本实验构建)中, 获得

三个中间重组质粒。根据 GCRV991 毒株外壳蛋白 VP7 基因序列(AF403411), 选择 3 个 19 碱基的 RNAi 靶位点, 经细胞感染实验筛选获得最佳 RNAi 靶位点 (5'-GCCGTACTGTAGACTATCA-3')(资料未显示)。针对 GCRV 靶位点的 shRNA 表达元件通过人工合成获得, 如表 1 中 siGCRV(+) 和 siGCRV(-), 合成 DNA 片段包括一对反向串联的 RNAi 靶位序列, 中间是 9 个碱基的间隔区, 5'端有 5 个连续 T 碱基组成的转录终止序列, 合成 DNA 片段的两端分别是 *Sal* I 和 *Bgl* II 酶切位点序列。siGCRV(+) 和 siGCRV(-)退火后形成双链, 分别连接到上述 3 个中间重组质粒中, 得到 3 个 GCRV 靶位点的 shRNA 表达载体: pZH1siGCRV-CMVeGFP、pZU6siGCRV-CMVeGFP 和 pCH1siGCRV-CMVeGFP(图 1)。

基因转移 人工授精的方式获得稀有鮠鲫受精卵。在第一次卵裂前, 采用显微注射方法将 siRNA 表达载体 pZH1siGCRV-CMVeGFP、pZU6siGCRV-CMVeGFP 和 pCH1siGCRV-CMVeGFP 导入受精卵动物极, 未转基因的胚胎作为阴性对照。注射剂量 1—2 nl/卵, DNA 浓度 100 ng/μL。转基因和对照组胚胎在 Holf's 液中培养, 水温 25℃。

稀有鮠鲫胚胎总 RNA 的提取 在稀有鮠鲫胚胎发育到受精后 1、4、8、24、36 和 48h 时, 分别从 3 个转基因组和未转基因对照组中取材 100 枚胚胎, 按照 Trizol Reagent 说明书提取总 RNA。检测 RNA 样品 260nm/280nm 波长吸光值, 计算 RNA 样品浓度及纯度。所有 RNA 样品浓度调至 1 μg/μL,

表 1 所用引物及序列
Tab. 1 Primers and sequences used in the study

名称 Name	序列 Sequence (5' to 3')
ZH1P+H	CAGAAGCTTGTGACAAATGTCTTCTCTA
ZH1P-S	CAGGTCGACCCGGTTATGACGTAGTC
ZU6P+H	CAGAAGCTTTCTTTAGCCTCCGAGAG
ZU6P-S	CAGGTCGACGAAGTACGAGCCTGGAG
CH1+H	CAGAAGCTTTAGCAAGTTACAACCAACC
CH1-S	CAGGTCGACTAACTAAACCGTTGCGAGA
siGCRV(+)	TCGACGCCGTACTGTAGACTATCATTGAAG AAGTGATAGTCTACAGTACGGCTTTTAA
siGCRV(-)	GATCTAAAAAGCCGTACTGTAGACTATCACT TCTTCAATGATAGTCTACAGTACGGCG
Stem-loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGC
RT primer	ACTGGATACGACTGATAG
Forward primer	TCGCGCCGTACTGTAGA
Reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT

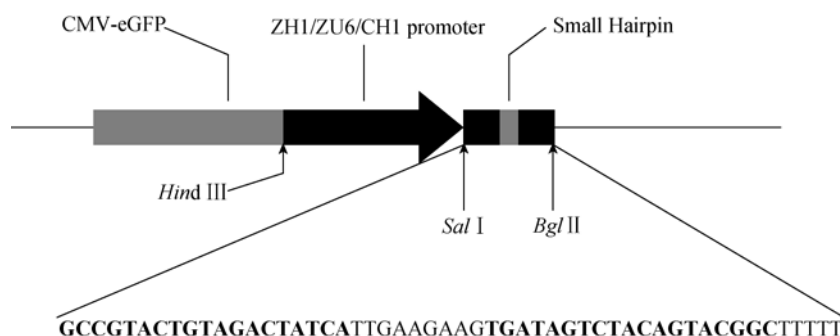


图 1 shGCRV 表达载体结构示意图

Fig. 1 The construction of shGCRV expression vector

-80℃贮存备用。

稀有鮕鲫早期胚胎中 GCRV siRNA 的表达检测 根据 Chen, *et al.*^[16]建立的 microRNA PCR 检测方法, 设计一条具有茎环结构的反转录引物 (Stem-loop RT primer), 其 5'端能形成茎环结构, 3'端具有 6 个与 GCRV siRNA 3'端序列互补的碱基, 以 GCRV siRNA 为模板, 引导合成第一条 cDNA 链。另外设计一对 PCR 引物, 以第一条 cDNA 链为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 的反向引物根据反转录引物的茎环序列设计, 作为通用反向引物 (Universal reverse primer), PCR 正向引物 (Forward primer) 根据 GCRV siRNA 的序列设计, 长度为 17 nt, 其 3'端的 13 个碱基与 GCRV siRNA 5'端的 13 个碱基一致 (表 1、图 2)。

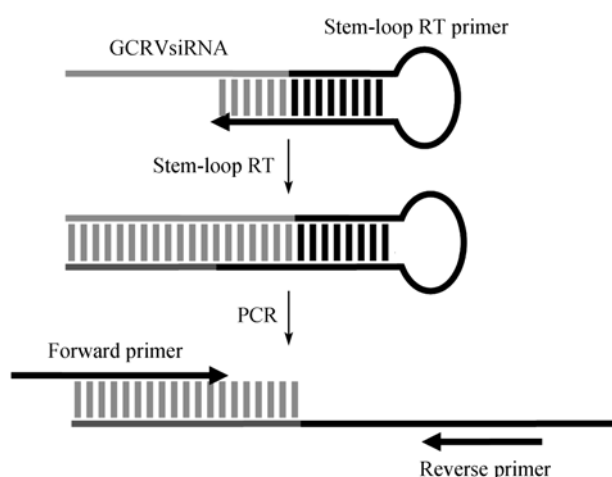


图 2 stem-loop RT-PCR 原理示意图

Fig. 2 The principle of stem-loop RT-PCR

GCRV siRNA cDNA 第一链的合成: 1 μL RNA 样品与 0.5 μL 10 mmol/L dNTPs、1 μL 1 μmol/L stem-loop RT primer 和 11.15 μL nuclease-free water

混合, 65℃孵育 5min 后迅速放置冰上 2min 以上, 短暂离心后加入 4 μL 5×First-Strand buffer, 2 μL 0.1 μmol/L DTT, 0.1 μL RNaseOUT (40 U/μL), 0.25 μL Superscript III RT (200 U/μL) 形成 20 μL 反转录体系。同时设置无 RNA 模板的对照和无逆转录酶的对照。反应程序为 16℃ 30min, 42℃ 30min, 最后在 85℃孵育 5min 失活逆转录酶。取 1 μL 逆转录产物进行 PCR 反应。PCR 反应体系为: 2 μL 10×reaction buffer, 1.8 μL 25 mmol/L MgCl₂, 0.4 μL 10mmol/L dNTPs, 各 0.4 μL 10 μmol/L 正向和反向引物, 1 μL 1 U/μL Taq DNA Polymerase, 反应体积 20 μL。PCR 反应程序: 预变性 94℃ 2min, 35 个循环 94℃ 30s、55℃ 30s、72℃ 30s, 最后 72℃延伸 5min。PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶电泳中检测。

2 结 果

2.1 不同启动子驱动下的 GCRV siRNA 的表达

收集受精后 24h 时的稀有鮕鲫转基因胚胎, 提取的胚胎总 RNA, 以此为模板, 进行 stem-loop RT-PCR, 扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳检测 (图 3)。结果显示, 受精后的 24h, 三种稀有鮕鲫转基因胚胎 (pZH1siGCRV-CMV-eGFP、pZU6siGCRV-CMV-eGFP 和 pCH1siGCRV-CMV-eGFP) 中均能检测到 GCRV siRNA 的表达, 表达的强度没有显著差异。未转基因稀有鮕鲫胚胎样品及对照样品中均未出现相应扩增条带。实验结果表明, 斑马鱼的 H1 和 U6 启动子以及草鱼的 H1 启动子均能有效驱动小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 的表达。

2.2 不同胚胎发育时期中的 GCRV siRNA 的表达

分别收集受精后 1、5、8、24、32 和 48h 的稀有鮕鲫转基因胚胎 (pCH1siGCRV-CMV-eGFP) 和未转基因胚胎, 提取胚胎总 RNA, 以此为模板进行

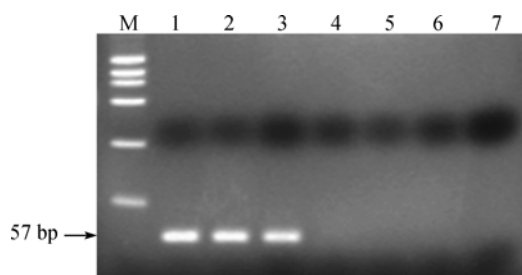


图3 各种启动子驱动下 siGCRV 的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of siGCRV driven by different promoters M. DNA marker DL2000; 1. 草鱼 H1 启动子; 2. 斑马鱼 U6 启动子; 3. 斑马鱼 H1 启动子; 4. 未转基因胚胎阴性对照; 5. 无 RNA 模板阴性对照; 6. 无逆转录酶阴性对照; 7. 无反转录产物 PCR 阴性对照

M. DNA marker DL2000; 1. carp H1 promoter; 2. zebrafish U6 promoter; 3. zebrafish H1 promoter; 4. negative control :embryos without transgene; 5. negative control: no RNA template; 6. negative control: no reverse transcriptase; 7. PCR negative control: no RT product

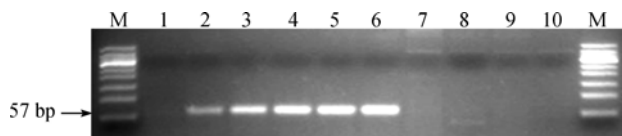


图4 草鱼 H1 启动子驱动下的 siGCRV 在转基因稀有鮕鲫胚胎发育中的 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of siGCRV driven by grass carp H1 promoter during early development of transgenic rare minnow embryos

M. 50 bp DNA Ladder; 1. 受精后 1h; 2. 受精后 5h; 3. 受精后 8h; 4. 受精后 24h; 5. 受精后 32h; 6. 受精后 48h; 7. 未转基因胚胎阴性对照; 8. 无 RNA 模板阴性对照; 9. 无逆转录酶阴性对照; 10. 无反转录产物 PCR 阴性对照

M. 50 bp DNA Ladder; 1. 1h after fecundation; 2. 5h after fecundation; 3. 8h after fecundation; 4. 24h after fecundation; 5. 32h after fecundation; 6. 48h after fecundation; 7. negative control :embryos without transgene; 8. negative control: no RNA template; 9. negative control: no reverse transcriptase; 10. PCR negative control: no RT product

stem-loop RT-PCR, 扩增产物在琼脂糖凝胶中电泳检测(图 4)。结果显示, 稀有鮕鲫转基因胚胎在受精后 1h 检测不到 GCRV siRNA 的表达, 从 5、8 到 24h, GCRV siRNA 的表达逐渐增强, 在 32—48h, GCRV siRNA 维持在较高的表达水平。未转基因稀有鮕鲫胚胎及对照样品中均未出现相应的扩增条带。

3 讨论

细胞内 siRNA 表达载体涉及两个基本元件, 即启动子和结构基因。哺乳类细胞 siRNA 表达载体的

启动子多采用 RNA 聚合酶 III 启动子, 如 U6 snRNA、H1 RNA 和 tRNA 启动子^[17,18]。近来有研究显示, RNA 聚合酶 II 启动子, 如 CMV 启动子^[19]和 T7 启动子^[20]在斑马鱼胚胎中亦可驱动 shRNA 的表达, RNA 聚合酶 II 启动子同时具有组织特异性表达和驱动报告基因表达的特点^[21]。本研究比较了斑马鱼 H1、U6 启动子以及草鱼 H1 启动子的转录活性, 结果显示它们在稀有鮕鲫胚胎均能有效驱动 GCRV siRNA 表达, 如果不涉及组织特异性表达问题, 鱼类聚合酶 III 启动子是转基因鱼研究的理想选择。也有研究者尝试将 RNA 聚合酶 II 启动子和 RNA 聚合酶 III 启动子融合, 共同驱动 shRNA 表达, 以期增强 siRNA 的表达效率^[22], 这或许是集成两类启动子优势的可能途径。

siRNA 表达载体的结构基因通常采用 shRNA 和反向串联拷贝^[23]的策略。研究表明, 两种策略都可以产生基因沉默, 但是 shRNA 表达载体比串联型载体抑制效果更高而且有效剂量更低。发夹结构的形成不但不会影响其基因沉默活性, 而且 shRNA 载体在细菌中扩增时具有更高的稳定性。因此, 本研究采用 shRNA 策略。另外, stem-loop RT-PCR 检测结果同时证实, shRNA 分子在稀有鮕鲫胚胎细胞中可以被有效酶切, 形成 siRNA 分子, 因为茎环结构的 shRNA 分子不能进行 stem-loop RT-PCR 扩增。shRNA 策略在鱼类中的应用是可行的。

siRNA 片段通常只有 19—21 nt, 其表达检测非常困难。采用 Northern 杂交方法, 探针设计受到极大限制, RNA 样品需求量大, 而且操作繁琐^[24]。本研究采用 Chen, *et al.*^[16]建立的 microRNA PCR 检测方法, 只需要 1 μg 甚至更少的 RNA 样品进行反转录, 继之常规 PCR 即可检测 siRNA 的表达, 此反转录模板亦可用于荧光定量 PCR 分析。这一方法的建立极大简便了 siRNA 表达的检测。

本研究构建了鱼类胚胎 siRNA 有效持续表达载体, 并建立了简易快捷的 PCR 检测方法, 为进一步的抗 GCRV 转基因鱼研制以及 siRNA 的病毒复制干扰机制研究奠定了重要基础并提供有力的技术支持。

参考文献:

- [1] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhab-*

- ditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, **391**: 806—811
- [2] Harborth J, Elbashir S M, Bechert K, *et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs [J]. *Journal of Cell Science*, 2001, **114**(24): 4557—4565
- [3] DasGupta R, Kaykas A, Moon R T, *et al.* Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signaling pathway [J]. *Science*, 2005, **308**(5723): 826—833
- [4] Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, *et al.* siRNA-Directed inhibition of HIV-1 infection [J]. *Nature Medicine*, 2002, **8**(7): 681—686
- [5] Zhao Z X, Cao Y, Li M, *et al.* Double-Stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish [J]. *Developmental Biology*, 2001, **229**: 215—223
- [6] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, *et al.* Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, **119**: 324—331
- [7] Wu S, Page L, Sherwood N M. A role for GnRH in early brain regionalization and eye development in zebrafish [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, **257—258**: 47—64
- [8] Kratz E, Eimon P M, Mukhyala K, *et al.* Functional characterization of the Bcl22 gene family in the zebrafish [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2006, **13**: 1631—1640
- [9] Liu N A, Liu Q, Wawrowsky K, *et al.* Prolactin receptor signaling mediates the osmotic response of embryonic zebrafish lactotrophs [J]. *Molecular Endocrinology*, 2006, **20**(4): 871—880
- [10] Boonanuntanasarn S, Yoshizaki G, Takeuchi T. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **310**: 1089—1095
- [11] Chen Y, Zhu Z Y. Application of RNA interference (RNAi) in virus resistance [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(3): 356—359 [陈芸, 朱作言. RNA 干扰在抗病毒研究中的应用. *水生生物学报*, 2006, **30**(3): 356—359]
- [12] Yodmuang S, Tirasophon W, Roshorn Y, *et al.* YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, **341**: 351—356
- [13] Xu J Y, Han F, Zhang X B. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA [J]. *Antiviral Research*, 2007, **73**: 126—131
- [14] Robalino J, Browdy C L, Prior S, *et al.* Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate [J]. *Journal of Virology*, 2004, **78**(19): 10442—10448
- [15] Westenberg M, Heinhuis B, Zuidema D, *et al.* siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus [J]. *Virus Research*, 2005, **114**: 133—139
- [16] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(20): 79
- [17] Miyagishi M and Taira K. Development and application of siRNA expression vector [J]. *Nucleic Acids Research Supplement*, 2002, **2**: 113—114
- [18] Miyagishi M and Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, **20**(5): 497—500
- [19] Su J G, Zhu Z Y, Wang Y P, *et al.* The cytomegalovirus promoter-driven short hairpin RNA constructs mediate effective RNA interference in zebrafish *in vivo* [J]. *Mar Biotechnol*, 2008, **10**(3): 262—269
- [20] Wang N, Sun Y H, Liu J, *et al.* Knock down of *gfp* and *no tail* expression in zebrafish embryo by *in vivo*-transcribed short hairpin RNA with T7 plasmid system [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2007, **14**: 767—776
- [21] Zeng Y, Cullen B R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells [J]. *RNA*, 2003, **9**: 112—123
- [22] Su J G, Zhu Z Y, Xiong F, *et al.* Hybrid Cytomegalovirus-U6 promoter-based plasmid vectors improve efficiency of RNA interference in zebrafish [J]. *Mar Biotechnol*, 2008, **10**: 511—517
- [23] Wadhwa R, Kaul S C, Miyagishi M, *et al.* Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy [J]. *Mutation Research*, 2004, **567**(1): 71—84
- [24] Va'lo'czi A, Hornyik C, Varga N, *et al.* Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**(22): 75

EXPRESSION OF SMALL HAIRPIN RNA (SHRNA) IN RARE MINNOW(*GOBIOCYPRIS RARUS*) EMBRYOS

YANG Lin^{1,2}, WANG Ya-Ping¹, LIAO Lan-Jie¹ and ZHU Zuo-Yan¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: RNA interference, mediated by small interfering RNA, is a fast developed post-transcriptional gene silencing method in recent years, which has been extensively used in the fields of gene function research, gene networks regulation and disease therapy, etc. Most siRNA expression vectors dependent on one of the RNA polymerase III promoters, operating small hairpin RNA expressing in cell or *in vivo*. These promoters mainly include human and mouse U6 promoters and human H1 promoter. In this study, in order to explore whether fish RNA polymerase III promoters could efficiently drive shRNA expression *in vivo*, and consequently make better use of RNAi to research gene function and virus resistance in fish, three shRNA expression vectors- pZH1siGCRV-CMV_eGFP, pZU6siGCRV-CMV_eGFP and pCH1siGCRV-CMV_eGFP were constructed by employing zebrafish H1/U6 promoters and grass carp H1 promoter respectively, using outer capsid protein VP7 gene of grass carp reovirus (GCRV) as target gene and eGFP as report gene. Then the three vectors were injected into rare minnow embryos respectively. Since siRNA was short and difficult to be detected, stem-loop RT-PCR technique has been introduced to detect shRNA expression in different development stages of rare minnow embryos. Experiment results have showed that all of the three fish RNA polymerase III promoters could efficiently drive shRNA expression. At the same time, GCRV siRNA can be detected in all of the sampling embryo development stages. And stem-loop RT-PCR technique was proved to be a simple and facile tool to detect siRNA. The construction of efficient and lasting siRNA expressing vector in fish embryo and establishment of easy and fast siRNA detection method have provided a solid foundation and forceful technique support for producing GCRV resistant transgenic fish and studying siRNA interfering mechanisms in virus replication.

Key words: RNA interference (RNAi); Small interfering RNA (siRNA); Small hairpin RNA (shRNA); Stem-loop RT-PCR; Grass carp reovirus (GCRV)