

特异性抑制伪狂犬病毒 *EPO* 基因表达的 siRNA 分子的合成与筛选*

习 杨, 周 锐**, 郭 洪, 胡勤芹, 方六荣, 陈焕春

(华中农业大学动物医学院, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

Synthesis and Selection of siRNAs Specifically Inhibiting the Expression of the *EPO* Gene of Pseudorabies Virus

XI Yang, ZHOU Rui**, GUO Hong, HU Qin-qin, FANG Liu-rong, CHEN Huan-chun

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: *EPO*, an early protein gene of pseudorabies virus (PRV), plays important roles in viral replication and possibly in PRV latency. In order to select an siRNA that specifically inhibits the expression of *EPO*, three siRNA templates, EP04, EP08 and EP12, were designed and synthesized according to the *EPO* sequence of PRV Ea strain and the siRNA design guidance of Ambion, and then cloned into the siRNA expression vector pSilencer 4.1-CMV neo containing a CMV promoter. This resulted in three recombinant plasmids p4.1-EP04, p4.1-EP08 and p4.1-EP12. Another recombinant plasmid pEP0-EGFP was also constructed by an in-frame fusing the *EPO* coding sequence to the 5'-end of the EGFP gene in the expression vector pEGFP-N3. The p4.1-EP04, p4.1-EP08, p4.1-EP12 and a negative control p4.1-NK were separately co-transfected into IBRS-2 cells. Fluorescence microscopic observation, flow cytometric and RT-PCR analysis revealed that all the three siRNA could inhibit *EPO* expression in the model as well as in PRV replication, with EP08 being the most efficient one, followed by EP12 and EP04. Our data are important to further study the function of *EPO* in PRV replication and latency.

Key words: siRNA; Pseudorabies virus; *EPO*

摘要: *EPO* 基因是伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 的早期基因, 可能与病毒复制及潜伏感染等有关。为了筛选特异性抑制 *EPO* 基因表达的 siRNA 序列, 本研究按照 Ambion 公司公布的 siRNA 分子设计原则, 设计并合成了 3 个针对 PRV Ea 株 *EPO* 基因的 siRNA 模板 EP04、EP08 和 EP12, 分别克隆到以 CMV 启动子的 siRNA 表达载体 pSilencer 4.1-CMV neo 中, 构建相应的重组表达质粒 p4.1-EP04、p4.1-EP08 和 p4.1-EP12。同时, 将 *EPO* 基因的编码区克隆到真核表达载体 pEGFP-N3 中, 按照读码框架与 EGFP 基因的 5'端融合, 获得重组表达质粒 pEP0-EGFP。将 p4.1-EP04、p4.1-EP08、p4.1-EP12 和阴性对照质粒 p4.1-NK 分别与 pEP0-EGFP 共转染 IBRS-2 细胞, 荧光显微镜观察、流式细胞仪和半定量 RT-PCR 检测结果表明, 三个 siRNA 分子均能不同程度地抑制 *EPO* 基因的表达, 抑制效率从高到低依次为 EP08、EP12 和 EP04; 在进一步的病毒感染实验中也得到了与细胞转染模型一致的结论。这为深入研究 *EPO* 基因在 PRV 复制和潜伏感染中的作用奠定了基础。

关键词: siRNA; 伪狂犬病毒; *EPO*

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0565-06

收稿日期: 2006-04-06, 修回日期: 2006-07-20

* 基金项目: 国家自然科学基金(30471293)

作者简介: 习 杨(1981-): 女, 湖北省籍, 硕士研究生, 从事伪狂犬病毒潜伏感染机理研究

** 通讯作者: Corresponding author. Tel: 027-87281878, E-mail: rzhou@mail.hzau.edu.cn

伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 是 α -疱疹病毒亚科的成员之一, 引起多种家畜和野生动物的伪狂犬病, 除猪以外的其它动物感染后通常是致死性的。猪是 PRV 的自然宿主, 感染后引起初生仔猪大量死亡, 怀孕母猪发生流产、产死胎或木乃伊胎, 及公猪睾丸炎等繁殖障碍, 给世界养猪业造成严重的经济损失^[1]。美国和欧洲国家先后启动了以基因缺失疫苗免疫配合区分疫苗免疫猪与野毒感染猪的鉴别诊断技术为基础的伪狂犬病根除计划, 期望从猪群中彻底消灭 PRV^[2]。然而, 该计划进展得没有预期的那么顺利, 其中一个最重要的原因就是 PRV 的潜伏感染问题。PRV 是一种嗜神经病毒, 一旦感染猪群即可在神经组织中建立潜伏感染, 在体内检测不到病毒粒子, 也不向外排毒, 而在应激时潜伏感染被激活, 重新产生感染性病毒粒子, 导致动物发病, 并传播给其它动物。疫苗免疫只能预防动物不发病, 但不能阻止 PRV 潜伏感染的建立与重新激活^[3], 因此潜伏感染是伪狂犬病根除计划的重要障碍。

潜伏感染是疱疹病毒的共同特性, 而潜伏感染建立、维持和激活的分子机制尚不清楚。近年来, 多个学者在不同的疱疹病毒感染组织或细胞中发现一种“潜伏感染相关转录物(Latency-associated transcripts, LAT)”, 并推测它与潜伏感染的发生有关^[4]。在 PRV 基因组中, LAT 与病毒复制必需早期基因 *IE180*、*EPO* 位于同一区段, 转录方向相反^[5], 因此, 采取传统基因突变技术不能分别研究这些基因的功能及其与潜伏感染的关系。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术的出现为疱疹病毒潜伏感染的研究提供了有力的手段, 该技术可在不影响基因组结构的情况下在 RNA 水平调控基因的表达,

从而成为研究基因功能的用力工具^[6]。为此, 本研究旨在寻找能够有效和特异抑制 *EPO* 基因转录的 siRNA 分子, 为深入研究 *EPO* 基因在病毒复制和潜伏感染中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 DH5 α 、IBRS-2 细胞由本实验室保存; *EPO* 基因的原核表达质粒 pET-EPO 为本实验室构建和保存^[7]; 质粒 pEGFP-N3 为 Clontech 公司产品; pSilencer4.1-CMV neo siRNA 表达载体试剂盒购自美国 Ambion 公司。

RNA 提取试剂 Trizol 和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs、限制性内切酶、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; 细胞培养基 DMEM 为 Sigma 公司产品, Opti-MEM 为 Gibco 公司产品; 无支原体初生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司; 转染试剂 Superfect 为 Qiagen 公司产品; 引物和 siRNA 模板寡核苷酸由北京奥科公司合成。

1.2 siRNA 模板的设计、合成和表达质粒的构建

根据本实验室发表的伪狂犬病毒 Ea 株 *EPO* 基因序列(GenBank: AF298586), 利用 Ambion 在线软件(http://www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html)获得 18 个 19nt 的候选 siRNA 靶序列, 根据 G+C 含量和 BLAST 结果, 从中筛选出 G+C 含量 <50%, 且与哺乳动物和其它动物病毒基因没有同源性的 3 个 siRNA 靶序列(表 1), 再根据 pSilencer 4.1-CMV neo siRNA 表达载体的特点, 设计出相应的具有发夹结构的 siRNA 合成模板, 每个靶序列的 siRNA 模板有 2 条互补的 55nt 的寡核苷酸组成(表 1)。

表 1 *EPO* siRNA 靶序列和相应的合成模板
Table 1 *EPO* siRNA target sites and their corresponding hairpin templates

SiRNA	Target ^a	siRNA templates				
		<i>Bam</i> HI	Sense sequence(19nt)	Loop	Antisense sequence(21nt)	<i>Hind</i> III
EP04	554-574	5'-GATCC	GAGGATGAGCCGGTAGGGG	TTCAAGAGA	CCCTACCGGCTCATCTCAA	3'-GCTCCTACTCGCCATCCC
						3'-GCTCCTACTCGCCATCCC
Ep08	754-774	5'-GATCC	CATCGT CGAGATTATCCAG	TTCAAGAGA	CTGGATAATCTCGACGATGAA	3'-GGTAGCAGCTCTAATAGGTC
						3'-GGTAGCAGCTCTAATAGGTC
Ep12	925-945	5'-GATCC	CTATATCGACACGTGCGAG	TTCAAGAGA	CTCGCACGTGTCGATATAGAA	3'-GGATATAGCTGTGCACGCTC
						3'-GGATATAGCTGTGCACGCTC

^aPosition of the target site in the *EPO* gene coding sequence

siRNA 模板由北京奥科公司合成后, 溶于 TE buffer 并稀释至 1 μ g/ μ L, 取正义和反义模板寡核苷酸各 2 μ L, 加入 46 μ L 的 1x DNA Annealing Solution, 混合后在 90 $^{\circ}$ C 加热 3min, 然后冷却至 37 $^{\circ}$ C 退火

60min, 形成 5'端和 3'端分别为 *Bam*HI 和 *Hind* III 粘性末端的双链 DNA, 连接到经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的 siRNA 表达载体 pSilencer 4.1-CMV neo, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取重组质粒, 分别命名为

p4.1-EP04、p4.1-EP08 和 p4.1-EP12, 用 Sanger 法测序鉴定插入模板的正确性。同时在大肠杆菌 DH5 α 中扩增 pSilencer 4.1-CMV neo siRNA 表达载体试剂盒提供的阴性对照质粒 p4.1-NK (表达的 siRNA 与已知的人、小鼠和大鼠的基因组没有明显的同源性)。

1.3 重组质粒 pEP0-EGFP 的构建

根据前述 PRV Ea 株 EP0 基因序列, 设计一对引物, PCR 扩增不包含终止密码子的 EP0 基因的编码序列, 引物序列为:

EP#3 : 5'-CGTACGAAGCTTACCATGGGCTGCA CGGTC-3' (*Kpn*I)

EP#4 : 5'-CGCTAGGGTACCGTCGTCGTCCTGG GTGAG-3' (*Hind*III)

PCR 以含 EP0 基因的重组质粒 pET-EP0 为模板, 在 50 μ L 反应体系中进行: 质粒模板 5 μ L, 10x Pyrobest buffer 5 μ L, 2mmol/L dNTPs 2.5 μ L, 2 mmol/L EP#3 和 EP#4 各 2.5 μ L, Pyrobest DNA Polymerase 0.25 μ L, DMSO 5 μ L, ddH₂O 27.25 μ L。PCR 程序为: 94 °C 变性 5min 后, 在 94 °C 1min, 59 °C 1min, 72 °C 2min 进行 35 个循环, 最后在 72 °C 延伸 10min。PCR 产物用 TaKaRa 回收试剂盒回收纯化后, 用 *Kpn*I 和 *Hind*III 酶切, 与经同样酶切处理的 pEGFP-N3 在 T4 DNA 连接酶作用下进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取重组质粒 pEP0-EGFP, 进行酶切鉴定和测序分析 EP0 基因与 EGFP 基因融合得是否正确。

1.4 细胞转染与检测

将 IBRS-2 细胞在 6 孔板中培养(DMEM+10% 牛血清; 37 °C, 5% CO₂), 细胞单层长至 60%~70% 时, 用 PBS 洗 2 次。取 0.5 μ g p4.1-EP04、p4.1-EP08、p4.1-EP12、p4.1-NK, 分别与 1 μ g pEP0-EGFP 加入 1.5mL 离心管中, 然后加 Opti-MEM 至 100 μ L, 再与 10 μ L Superfect 混合, 置室温 5min。最后, 加入 Opti-MEM 至 600 μ L, 混匀后分别加到各细胞孔中, 非转染细胞对照孔加 600 μ L Opti-MEM, 37 °C, 5% CO₂ 培养 2h 后换新鲜细胞生长液。

转染后每 10-12h 用荧光显微镜观察各孔内细胞的荧光表达情况, 并在转染后 21h 收集细胞用 FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Bioscience, USA) 定量分析荧光表达量。

收集细胞, 用 Trizol 试剂按照试剂说明书提取细胞的总 RNA。取 5 μ g 总 RNA, 在 10 μ L 反应体系中, 用 RNase-free DNase I 在 37 °C 消化 30min, 以除去总 RNA 中少量的 DNA, 再在 75 °C 加热 10min,

以灭活 DNase I。从中取出 5 μ L RNA, 加入 600 μ g/ μ L 的 Random hexamer primer 1 μ L、10m mol/L dNTPs 2 μ L、5 \times first strand buffer 4 μ L、0.1M DTT 2 μ L、M-MLV 反转录酶 0.1 μ L 和 0.1% DEPC-H₂O 5.9 μ L, 在 37 °C 作用 30min 后, 再在 95 °C 灭活 10min, 合成的 cDNA 置于冰上备用。取 2 μ L cDNA 用作 PCR 模板, 用另一对 EP0 基因的 PCR 引物 EP#1: 5'-TCATGGACTGCCCCATCT-3'/EP#2: 5'-CTCGA CGATGTTGTCCAC-3' 用半定量 PCR 检测 EP0 基因的表达。半定量 PCR 循环数以系列稀释的质粒 pET-EP0 为模板进行确定, PCR 程序为: 94 °C, 5min; 94 °C 1min, 55 °C 1min, 72 °C 2min; 72 °C 10min。同时以 β -actin PCR 作为对照^[8]。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行检测。

2 结果

2.1 pEP0-EGFP 的构建

以质粒 pET-EP0 为模板, 用引物 EP#3 和 EP#4 PCR 扩增到不包含终止密码子的 EP0 基因的编码序列, 大小约为 1.2kb, 与预计大小相符(图 1)。将 PCR 产物纯化后用 *Kpn*I 和 *Hind*III 双酶切, 与经同样酶切的 pEGFP-N3 质粒连接, 获得重组质粒 pEP0-EGFP。酶切鉴定和测序分析结果表明, EP0 基因按照正确的读码框架被融合到 EGFP 基因上游(图 1)。

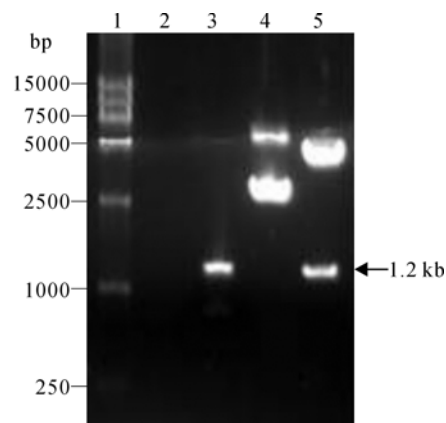


图 1 EP0 基因的 PCR 扩增与 pEP0-EGFP 的构建
Fig.1 PCR amplification of EP0 gene and construction of pEP0-EGFP

1, DNA Marker DL 15 000; 2, Negative control for PCR(H₂O); 3, PCR product of EP0 gene without stop codon; 4, pEP0-EGFP; 5, pEp0-EGFP/*Kpn*I+*Hind*III.

2.2 siRNAs 对 EP0 基因表达的影响

将 p4.1-EP04、p4.1-EP08、p4.1-EP12 和 p4.1NK 分别与 pEP0-EGFP 共转染 IBRS-2 细胞, 转染后 21h, 在荧光显微镜下可观察到不同处理孔的细胞中荧光表达量的差异(图 2)。从图中可以看出,

p4.1-NK 和 pEP0-EGFP 共转染组的荧光阳性细胞量与 pEP0-EGFP 单独转染组无明显差异，而 p4.1-EP04、p4.1-EP08、p4.1-EP12 与 pEP0-EGFP 共转染组的荧光阳性细胞量均比上述两个对照组

少，而且荧光强度减弱，其中以 p4.1-EP08 与 pEP0-EGFP 共转染组最少，其次为 p4.1-EP12 与 pEP0-EGFP 共转染组。该现象可以持续到转染后 36h，此时对照组的荧光强度也降低。

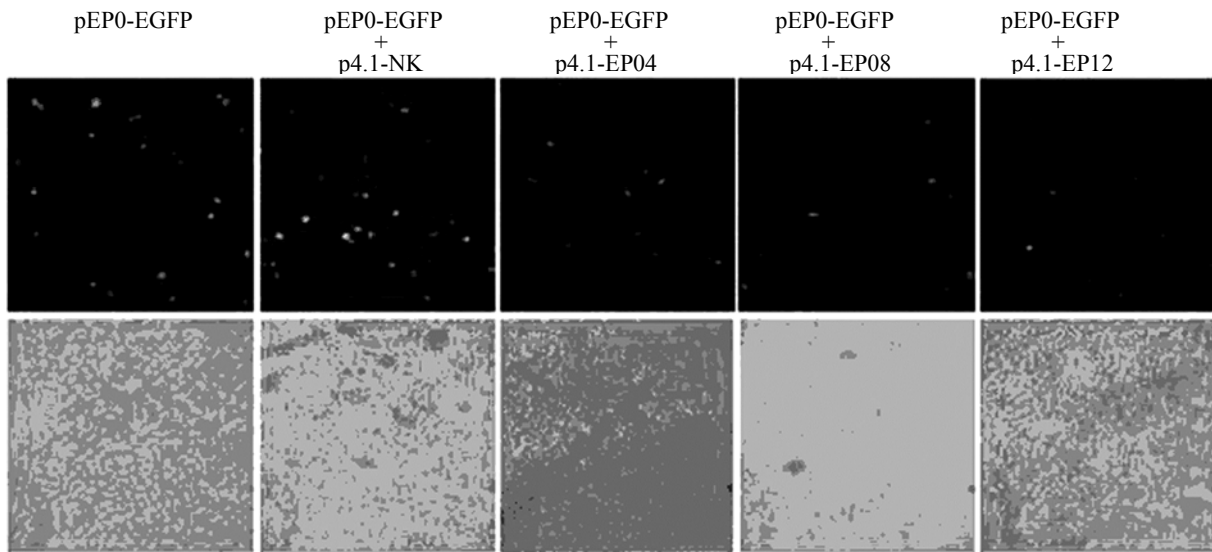


图 2 siRNA 在 IBRS-2 细胞中对绿荧光表达量的影响

Fig. 2 The effect of siRNA on the expression of green fluorescence protein in IBRS-2 cells
Up: fluorescence microscopic photographs; Down: visible microscopic photographs.

转染后 21h 收集细胞，用流式细胞仪测定荧光表达量，结果如图 3 所示，与荧光显微镜观察结果一致。EP04、EP08 和 EP12 对荧光表达表达

量的抑制效率依次为 20.0%、53.3%和 43.9% (p4.1-NK 和 pEP0-EGFP 共转染组的荧光量为 100%)。

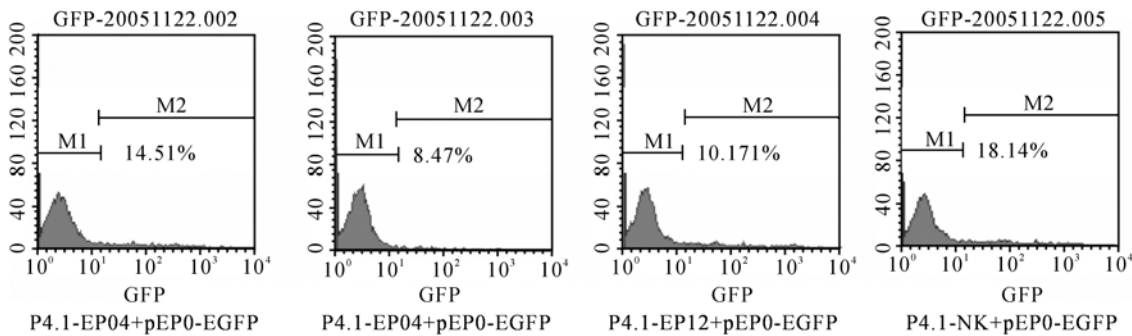


图 3 流式细胞仪定量检测绿荧光阳性细胞的百分比

Fig. 3 The percentages of GFP positive cells determined by the flow cytometry

转染后 21h 收集细胞，提取总 RNA，用半定量 RT-PCR 比较不同处理组的细胞中 *EPO* 和 β -actin 基因相对表达量的差异。当用 35 个循环进行 PCR 时，各组没有显示明显差异，当把循环数降至 30 个时，*EPO* 基因的表达量从低到高依次为 p4.1-EP08、p4.1-EP12、p4.1-EP04 和 p4.1-NK 处理组，而 p4.1-NK 和 pEP0-EGFP 共转染组，与 pEP0-EGFP 单独转染组无明显区别； β -actin 基因表达量保持相对稳定 (图 4)。

2.3 siRNAs 在 PRV 病毒中对 *EPO* 基因表达的影响

转染后 21h 给 6 孔板各孔细胞接毒 5 μ L(TCID₅₀ = 10^{-5.8}/0.1mL)，接毒 24h 后置 -20 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次收毒，超速离心后用沉淀的重悬液提取总 RNA，用半定量 RT-PCR 比较不同处理组的细胞中 *EPO* 和 β -actin 基因相对表达量的差异。当用 35 个循环进行 PCR 时，各组没有显示明显差异，当把循环数降至 30 个时，*EPO* 基因的表达量从低到高依次为 p4.1-EP08、p4.1-NK、p4.1-EP12、p4.1-EP04 和细胞对照组； β -actin 基因表达量保持相对稳定 (图 5)。

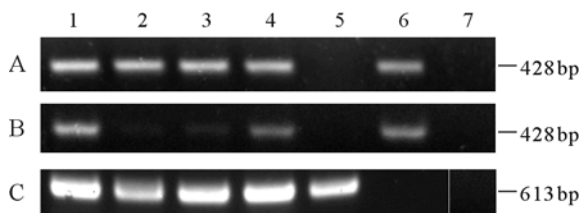


图4 半定量 RT-PCR 检测 siRNA 对 EPO 基因表达的影响
Fig.4 The effect of siRNA on expression of EPO gene detected by semi-quantitative RT-PCR.

A: EPO RT-PCR with 35 cycles; B: EPO RT-PCR with 30 cycles; C: β -actin RT-PCR with 30 cycles. The RT-PCR products of the mRNA from IBSR-2 cells transfected with pEPO-EGFP/p4.1-EP04 (lane 1), pEPO-EGFP/p4.1-EP08 (lane 2), pEPO-EGFP/p4.1-EP12 (lane 3) and pEPO-EGFP/p4.1-NK (lane 4) were shown. Lane 5, IBSR-2 cell control; Lane 6, positive control (pEPO-EGFP); Lane 7, negative control (H₂O).

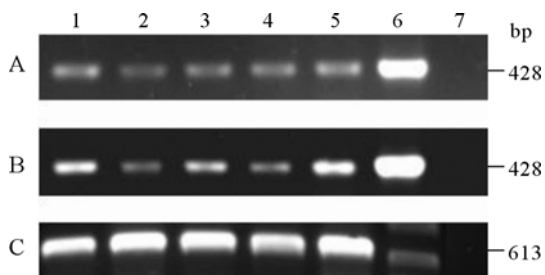


图5 PRV 病毒悬液样本中半定量 RT-PCR 检测 siRNA 对 EPO 基因表达的影响

Fig.5 The effect of siRNA on expression of EPO gene in PRV-infected cells determined by semi-quantitative RT-PCR in PRV

A: EPO RT-PCR with 35 cycles; B: EPO RT-PCR with 30 cycles; C: β -actin RT-PCR with 30 cycles. The RT-PCR products of the mRNA from PRV-infected IBSR-2 cells transfected previously with p4.1-EP04 (lane 1); p4.1-EP08(lane 2); p4.1-EP12(lane 3); p4.1-NK(lane 4); lane 5, PRV-infected IBSR-2 cell control; lane 6, Positive control; lane 7, Negative control (H₂O).

3 讨论

疱疹病毒在自然界分布很广, 已知的有80余种, 不同的疱疹病毒感染敏感宿主后均能在不同组织建立潜伏感染, 增加了疱疹病毒的防治难度, 是PRV等动物疱疹病毒性传染病难以控制和根除的重要原因。疱疹病毒潜伏感染的发生、维持与再激活机制的阐明, 无疑对疱疹病毒的防治与根除具有重要意义^[3]。伪狂犬病毒 (PRV) 是一种 α 疱疹病毒, 猪是其天然宿主, 在自然感染和人工感染后可以建立潜伏感染, 是研究疱疹病毒潜伏感染的良好模型。

潜伏感染包括建立、维持和再激活等过程。从理论上讲, 潜伏感染的建立伴随着基因组表达的关闭, 潜伏感染的再激活伴随着病毒基因组重新启动表达。在潜伏感染维持期, 除产生一种或一组转录物 LAT 外, PRV 的其它基因均处于关闭状态 (不表达), 而 LAT 在潜伏感染中的作用尚不清楚。研究表明, LAT 与其立即早期基因 IE180 和早期基因 EPO 反向互补, 即由同一基因组区段编码, 但转录方向

相反^[5]。疱疹病毒基因组表达具有明显的时序性, 早期基因表达产物对中晚期基因表达具有重要的调控作用, 是病毒启动复制所必需的。因此, 病毒潜伏感染的建立、维持与再激活应该与 IE180、EPO、LAT 等基因的表达具有直接关系。鉴于 IE180、EPO 和 LAT 在 PRV 基因组中的特殊结构关系, 从 DNA 水平基因敲除来分别研究它们的功能是非常困难的。RNA 干扰技术可以通过转录水平的表达下调来研究基因的功能^[6]。本研究的细胞共转染实验结果证实, 这 3 个 siRNA 分子均能不同程度地抑制 EPO 基因的表达, 抑制效率从高到低依次为 EP08、EP12 和 EP04。在病毒中得到的结果与干扰模型基本一致。

RNAi 技术自建立以来, 广泛用于遗传病、感染性疾病和肿瘤的基因治疗及基因功能的研究^[9-11]。早期的研究主要应用 RNA 聚合酶 III 启动子来表达 siRNA, 如 U6 和 H1 启动子。2002 年, Xia *et al.* 发现 RNA 聚合酶 II 启动子也能高效表达功能性的 siRNA^[12]。本研究选用含有人巨细胞病毒 (CMV) 启动子的 siRNA 表达载体 pSilencer 4.1-CMV neo 在猪肾细胞系 IBSR-2 中表达 EPO 基因的 3 个 siRNA 分子, 均能特异性抑制 EPO 基因的表达, 进一步证明用 RNA 聚合酶 II 启动子驱动 siRNA 的表达是可行的。CMV 启动子是一种很强的 RNA 聚合酶 II 启动子之一, 广泛用于驱动真核基因在哺乳动物细胞的高效表达, 比 U6 和 H1 启动子适应的细胞谱更广。

本研究以目标基因 EPO 和报告基因 EGFP 的融合表达质粒 pEPO-EGFP 为评估 3 个 siRNA 分子对 EPO 基因表达影响的工具, 具有简单、直观和快速等优点^[13,14], 绿色荧光的显微镜定性观察和流式细胞仪的定量分析, 评估了融合基因 EPO-EGFP 的表达量, 间接反映了目标基因 EPO 的表达水平; 半定量 RT-PCR 检测进一步直接评估了 EPO 基因的表达情况。从图 2、图 3 和图 4 结果可以看出, 三种评估方法的结果一致。在通过荧光表达载体 pEPO-EGFP 模拟筛选出了最佳干扰 EPO 基因的 siRNA 分子后, 将其直接运用于病毒复制的干扰。图 5 从 mRNA 水平分析 siRNA 分子对病毒复制早期基因 EPO 表达的影响, 得到了与干扰模型一致的结果。特异性抑制 EPO 基因表达的 siRNA 分子的获得对研究 EPO 基因在 PRV 复制和潜伏感染中的作用具有重要意义。

References

[1] Tong G Z, Chen H C (童光志, 陈焕春). Prevalence of pseudorabies

- and prevention in China [J]. *Chin J of Veter Sci (中国兽医学报)*, 1999, 19 (1): 1-2.
- [2] Jin S Z, Chen H C, Xiong F (金升藻, 陈焕春, 熊 符). Research progress on pseudorabies gene-deleted vaccine [J]. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2002, 35 (1): 89-93.
- [3] Huai J S, Chen H C (怀济森, 陈焕春). Research on the latency of pseudorabies virus [J]. *Prog Veter Med (动物医学进展)*, 1997, 18 (3): 17-19.
- [4] Wagner E K, Bloom D C. Experimental investigation of herpes simple virus latency [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1997, 10 (3): 419-443.
- [5] Cheung AK. Cloning of the latency gene and the early protein 0 gene of pseudorabies virus [J]. *J Virol*, 1991, 65: 5260-5271.
- [6] Chen Z B, Yu L C, Wang S Q (陈忠斌, 于乐成, 王升启). Recent advances on the RNA interference [J]. *Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报)*, 2002, 18 (5): 525-528.
- [7] Fang L R, Chen H C, Xiao S B (方六荣, 陈焕春, 肖少波), *et al.* Cloning, sequence analysis and expression in *E.coli* of the EP0 gene of pseudorabies virus Ea strain [J]. *Virologica Sinica (中国病毒学)*, 2001, 16 (2): 183-187.
- [8] Zhou R, Heinrich F, Schneider M R, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-4 inhibits growth of the thymus in transgenic mice [J]. *J Mol Endocrinol*, 2004, 32 (2): 349-364.
- [9] Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, *et al.* Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance [J]. *Cell*, 2000, 101: 533-542.
- [10] Glen A C, Bryan R C. Potent and Specific Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by RNA Interference [J]. *J Virol*, 2002, 76 (18): 9225-9231.
- [11] Sharookh B K, Amy B A, Francis V C. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (4): 2014-2018.
- [12] Xia H, Mao Q, Paulson H, Davidson B. siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo [J]. *Nature Biotechnol*, 2002, 20: 1006-1010.
- [13] Ou X, Zhao M, Zuo Z H (欧 璇, 赵 旻, 左泽华), *et al.* The functional prediction of HMAT1 gene in cervical carcinoma cells and the silencing effect of its siRNA [J]. *Tumor (肿瘤)*, 2005, 25 (2): 113-117.
- [14] Mingmei Cao, Hao Ren, *et al.* Inhibition of EGFP expression by siRNA in EGFP-stably expressing Huh-7 cells [J]. *J Virol*, 2004, 119: 189-194.

Notice of Inviting Contributions for English Version of *Virologica Sinica*

VIROLOGICA SINICA is an academic, professional periodical. It is published bimonthly by the Wuhan Institute of Virology, CAS and Chinese Society for Microbiology and distributed worldwide. It is the core issue in the biology and medicine science in China, and indexed and abstracted in Chemical Abstract (CA), BIOSIS previews (BA), Cambridge Science Abstracts(CSA), Life Sciences Collection, TOXLINE, Abstract Journal VINTI (AJ VINTI), Index of Copurnicus (IC), Excerpta Media (EM) and some Chinese periodical citation abstracts and Databases.

VIROLOGICA SINICA will change its publishing language into English in 2007. It will be published for every 2 month. English manuscripts from any part of the world will be welcome, and should be sent to:

Editorial Office for *Virologica Sinica*,
Xiaohongshan Central 44,
Wuchang, Wuhan 430071,
CHINA

E-mail: bjb@wh.iov.cn

<http://www.virol.cn>