doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.21.002

用于筛选 shRNA 的新型双萤光素酶报告基因载体的构建及应用 *

胡志嵩[1#] 刘欣禹[2#] 杜 晓[1] 欧阳清[3] 李 昂[3] 杨安钢[3] 赵 晶[1△] 阎 博[1△]

（1 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032；2 第四军医大学学员旅 陕西 西安 710032；
3 第四军医大学免疫学教研室 陕西 西安 710032）

摘要 目的：构建一个新型双萤光素酶报告基因载体用于准确高效地筛选有效抑制靶基因表达的 shRNA。**方法：**采用 PCR、定向克隆、基因重组等分子生物学方法，将双萤光素酶报告基因系统中需要的报告基因载体、shRNA 真核表达载体和内参载体三个功能，整合于一个新型的双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 之中。应用该载体对靶向人 PD1 基因以及 Furin 基因的 shRNA 进行干涉效果比较。**结果：**应用 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 载体进行单质粒转染方法与传统的三质粒转染方法均提示 shRNA#1 对靶基因 PD1 的抑制效果最优；但是使用新型双萤光素酶报告基因载体检测结果的标准差数值显著低于传统方法。以 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 单质粒转染方法得到的各组样品结果的均一性显著提高，能够准确地反映出 shRNA#3 较 shRNA#2 具有更强的 Furin 基因抑制作用；而传统方法未能有效判断二者的差异。**结论：**新型双萤光素酶报告基因载体简化了操作步骤，降低了传统三质粒共转染方法所引起的检测结果大幅波动，进一步增强了双萤光素酶报告基因系统的信噪比，提高了筛选抑制靶基因表达 shRNA 的准确性。

关键词：双萤光素酶报告基因；shRNA；载体

中图分类号：Q75；Q78；Q81 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2017)21-4007-05

Construction and Application of a Novel Dual-Luciferase Reporter Gene Vector for shRNA Screening*

HU Zhi-song[1#], LIU Xin-yu[2#], DU Xiao[1], OUYANG Qing[3], LI Ang[3], YANG An-gang[3], ZHAO Jing[1△], YAN Bo[1△]

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;
2 School of Student Brigade, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;
3 Department of Immunology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To construct a novel dual-luciferase reporter gene vector for accurate and efficient shRNA screening. **Methods:** Using standard molecular biological methods of polymerase chain reaction, directional cloning and gene recombination, a novel dual-luciferase reporter gene vector namely pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA was constructed. This recombinant vector integrated functions of the reporter gene vector, the eukaryotic expression vector of shRNA and the reference vector. Target gene (PD1 or Furin) and candidate shRNAs were respectively directional cloned into the multiple cloning site one and two of the new-established vector. The interference effects of shRNAs on target gene were compared with standard dual luciferase reporter gene assay. **Results:** Compared to the traditional method of cotransfected with three plasmids, the new established shRNA screening method using pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA only needs to transfect a single plasmid. In the experiment which target gene was PD1, similar results were obtained by the two competitive methods; yet, the standard deviations of each shRNA group detected by pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA were significantly lower than that of traditional method. The results obtained by the new method have superior uniformity, which can accurately reflect the difference of the inhibition efficiency of shRNA#2 and shRNA#3 targeting Furin gene. However, this trend has not been detected by traditional method of cotransfected with three plasmids. **Conclusions:** By alleviating the fluctuation of results obtained by traditional method, the novel reporter gene vector pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA enhances the dual-luciferase system signal-to-noise ratio, and improves the accuracy of shRNA screening.

Key words: Dual-luciferase reporter gene; shRNA; Vector

Chinese Library Classification(CLC): Q75; Q78; Q81 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)21-4007-05

---

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81372459）；国家自然科学基金重点项目（81630069）

作者简介：胡志嵩（1990-），硕士研究生，研究方向：肿瘤免疫治疗，E-mail: xz9051@fmmu.edu.cn；
刘欣禹（1993-），医学学士，E-mail: 506419642@qq.com
为共同第一作者
△ 通讯作者：阎博（1982-），讲师，研究方向：肿瘤免疫治疗，E-mail: yb5870@163.com；
赵晶（1975-），教授，研究方向：肿瘤靶向治疗，E-mail: zhaojing@fmmu.edu.cn

（收稿日期：2017-02-21 接受日期：2017-03-15）

前言

RNA 干扰(RNAi)是短发夹 RNA(shRNA)或小干扰 RNA(siRNA)介导的抑制或沉默目标基因表达的过程,该技术已广泛应用于基因功能、肿瘤发生发展及基因治疗等研究领域[1-3]。为了使特定基因沉默表达,可针对该基因序列信息设计不同靶点的 shRNA,但不同 shRNA 所引起的沉默表达程度往往存在较大差异 [4-6]。因此,准确高效地筛选有效抑制靶基因表达的 shRNA 是应用 RNAi 技术进行研究和应用的基础[7,8]。

双萤光素酶报告基因实验(Dual-Luciferase Assay)是检测 shRNA 对靶基因表达抑制程度的首选研究方法[9-11]。完成此项实验通常需要构建三个质粒:一是将靶基因构建至萤火虫萤光素酶(Firefly Luciferase, FLuc)基因 3' 非翻译区的报告基因质粒,二是产生候选 shRNA 的真核表达质粒,三是表达海肾萤光素酶(Renilla Luciferase, RLuc)的内参质粒[12-14]。将上述三个质粒按照一定比例混合后,共同转染哺乳动物细胞,而后分别测定 FLuc 和 RLuc 活力,计算二者比值,比值越低表示 shRNA 对靶基因表达的抑制效果越强。然而在多质粒共转染实验的具体操作中,由于无法避免的质粒加样误差以及细胞转染效率差异等诸多因素的影响,使得实际进入各个细胞的三个质粒的比例必然不会完全相同,造成较大的系统性误差,导致相同 shRNA 实验组的不同重复样本的萤光素酶活力比值之间存在较大的波动,大大削弱了实验的准确性和可靠性。

本文构建了一个新型的质粒载体,同时具备报告基因载体、shRNA 真核表达载体和 RLuc 内参载体三个功能,试图解决应用传统实验方法筛选抑制靶基因表达 shRNA 时测定结果波动较大、重复性差的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pEGFP-C1、pGL3-Basic 和 pRL/TK 为本实验室保存。人 PD1 基因(NCBI 注册码:NM_005018.2)和人 Furin 基因(NCBI 注册码:NM_002569.2)ORF 全长 cDNA 购自北京义翘神州生物技术有限公司。293A 细胞为本实验室传代培养。限制性核酸内切酶为美国 NEB 公司产品。PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为 TAKARA 公司产品。EsayGeno 快速重组克隆试剂盒、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。转染试剂 Lipofectamine™2000、α-MEM 培养液、胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司。双萤光素酶报告基因检测试剂盒为美国 Promega 公司产品。引物合成及基因合成技术服务由北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。萤光素酶活力检测使用 Promega 公司 GLOMA 20/20 LUMINOMETER 照度计完成。

1.2 新型双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 的构建

以 pGL3-Basic 质粒为模板,使用引物 P1 和 P2 对 FLuc 基因片段进行 PCR 扩增;将 PCR 产物与 pEGFP-C1 质粒以限制性内切酶 *Nhe*I 和 *Xho*I 双酶切后进行连接,得到重组质粒 pFLuc-C。

以 pRL/TK 质粒为模板,使用引物 P3 和 P4 进行 PCR 反应,扩增包括 HSV-TK 启动子、人 β- 球蛋白内含子、RLuc 编码基因及同源重组短臂在内的核酸片段;以限制性内切酶 *Afl*II 对重组质粒 pFluc-C 进行线性化;将 PCR 产物和线性化质粒应用 EasyGeno 重组克隆试剂盒进行定向重组连接,得到重组质粒 pFLuc-C-TK-RLuc。

以重组质粒 pFLuc-C-TK-RLuc 为模板,使用引物 P5 和 P6 进行 PCR 反应;扩增所得核酸片段经限制性内切酶 *Pac*I 酶切后连接成环,得到新型双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA。

表 1 引物及序列

Table 1 Primers and sequences

Primers	Sequences (From 5' to 3')
P1	ggggctagcgtcgaccgccaccatggaagacgccaaaaacataaag
P2	tttctcgagccttctgttgggttaagaagtcgattacacggcgatctttccgcccttc
P3	caatttacgccttaaagatctaaatgagtcttcggacctc
P4	atcaatgtatcttaatcatgtctgctcgaagcggccgctc
P5	aaattaattaaactagtgcgggactctggggttcgaaatgaccgac
P6	aaattaattaagatatctcagaagaactcgtcaagaaggcgatagaag
PD1-f	aaactcgagatgcagatcccacaggcgccctg
PD1-r	aaaggatcctcagaggggccaagagcagtgtc
Furin-f	aacagaaggctcgagatggagctgaggccctggttgct
Furin-r	agatccggtggatcctcagagggcgctctggtctttga

1.3 构建报告基因载体筛选有效干涉 PD1 基因的 shRNA

以人 PD1 基因 ORF 全长 cDNA 为模板,使用引物 PD1-f 和 PD1-r 进行 PCR 反应;将 PCR 产物以限制性内切酶 *Xho*I 和 *BamH*I 双酶切后,分别与相同限制性内切酶切割后的 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 质粒和 pFLuc-C 质粒进行连接,得到重组质粒 pFLuc-PD1-TK-RLuc-shRNA 和报告基因质粒 pFLuc-PD1。

根据人 PD1 基因序列,设计合成四条候选 shRNA,分别命名为 PD1-shRNA#1~#4;设计合成一条对人类基因无干涉作用的 shRNA 作为对照,命名为 shRNA#NC。上述 shRNA 参照 miR-E 骨架结构进行设计[18],候选 shRNA 中的靶基因反向互补序列通过 BLOCK-iT™ RNAi Designer 软件预测获得。上述 shRNA 片段的 5' 端含有 *Xho*I 和 *EcoR*V 酶切位点、3' 端含有 *Spe*I 和 *EcoR*I 酶切位点,由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成后,以 *Xho*I 和 *EcoR*I 双酶切克隆入 pEGFP-C1 质粒,重组质粒命名为 pEGFP-PD1-shRNA#1/ #2/ #3/ #4 以及 pEGFP-shRNA#NC,作为 shRNA 真核表达质粒。

以 *EcoR*V 和 *Spe*I 将候选和对照 shRNA 序列从上述 shRNA 真核表达质粒中切出,连入相同内切酶切割的 pFLuc-PD1-TK-RLuc-shRNA,得到五个基于新型双萤光素酶报告基因载体构建的重组质粒 pFLuc-PD1-TK-RLuc-shRNA#1/ #2/ #3/ #4/ #NC。

1.4 构建报告基因载体筛选有效干涉 Furin 基因的 shRNA

参照 1.3 步骤,将靶基因 Furin 和候选 shRNA 序列克隆入报告基因载体,构建重组质粒 pFLuc-Furin-TK-RLuc-shRNA#1/ #2/ #3/ #4/ #NC 和 pFLuc-Furin。

1.5 细胞转染

293A 细胞以α-MEM+10 %(V/V) 胎牛血清培养，接种至 48 孔板中(1× 10^5 个细胞 / 孔),待细胞汇合率达到 85~95 %进行转染。对于新型双萤光素酶报告基因载体，每孔细胞转染 0.4 μg 重组质粒;若使用传统三质粒共同转染方法,每孔细胞转染 0.3 μg pFLuc-PD1/Furin 质粒（FLuc 报告基因载体)、0.1 μg pEGFP-PD1/Furin-shRNA#1~4 或 pEGFP-shRNA#NC 质粒(shRNA 表达载体)以及 5 ng pRL/TK 质粒(RLuc 内参载体)。转染 48 小时后进行报告基因检测。各实验组均设置三次重复。

1.6 萤光素酶活力检测及数据处理

转染后细胞以 D-PBS 洗涤细胞一次；每孔加入 100 μL 1× Passive Lysis Buffer 裂解细胞;将细胞裂解液以 12000 rpm，4 ℃离心 15 min；吸取 5 μL 细胞裂解上清与 10 μL Lucifersae Assay Buffer II 充分混匀后,在照度计中读数 10 秒,检测 FLuc 活力;再加入 10 μL Stop & Glo Reagent 充分混匀,再次读数 10 秒,检测 RLuc 活力。

首先计算各样品两次读数的比值;再将各样品读数比值与 shRNA#NC 组样品读数比值相除,进行均一化处理;计算均一化处理后各 shRNA 组样品的均值和标准差，均值越小表示该 shRNA 对靶基因的抑制效果越好；应用 SPSS 13.0 软件以单因素方差分析法比较各 shRNA 处理组之间是否具有显著性差异。

2 结果

2.1 新型双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 结构说明

pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 质粒经全长测序，证实与预期序列完全一致,该质粒结构如图 1 所示。新型双萤光素酶报告基因载体具有以下三个功能:1、FLuc 基因终止码后为一个多克隆位点(MCS-1),用于插入被抑制的靶基因序列,产生 FLuc/靶基因嵌合 mRNA，行使报告基因载体功能;2、Kan/Neo 抗性基因终止码后为另一个多克隆位点（MCS-2)，用于插入候选 shRNA；插入的 shRNA 位于抗性基因 mRNA 的 3' 非翻译区内,随抗性基因一同转录后加工成熟,行使 shRNA 真核表达载体功能;3、包含 RLuc 基因表达框,用于低水平、组成性地表达 RLuc,行使内对照载体功能。

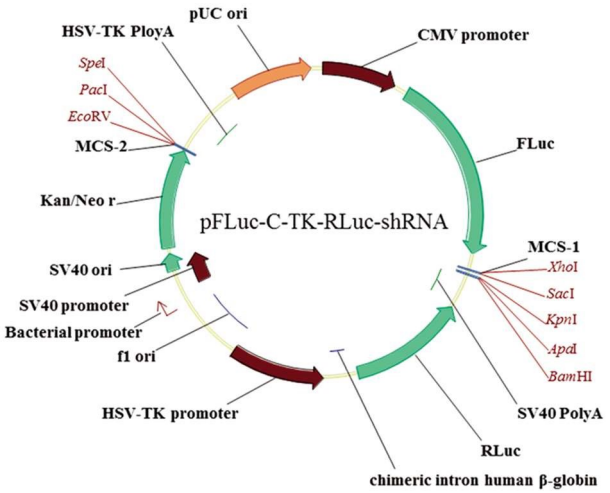

图 1 新型双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 结构示意图

Fig.1 Schematic representation of pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA

2.2 筛选有效干涉 PD1 基因的 shRNA

应用新型双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 进行单质粒转染方法与传统的三质粒转染方法所得结果趋势一致,均提示在 4 条候选 shRNA 中,shRNA#1 对靶基因 PD1 的抑制效果最显著(图 2)。通过对两种测定方法的结果比较可以发现,应用单质粒转染方法得到的各组样品的标准差均显著低于传统三质粒转染方法,提示以新型双萤光素酶报告基因载体进行单质粒转染方法所得数据的重复性明显优于传统方法。

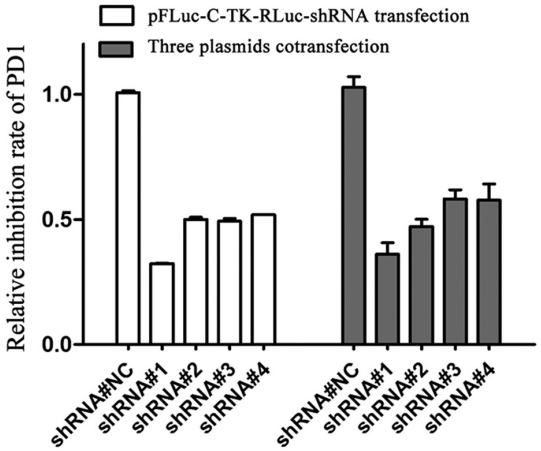

图 2 应用两种方法筛选有效干涉 PD1 基因的 shRNA

Fig.2 Comparison of the inhibition efficiency of shRNAs targeting PD1 by two methods

2.3 筛选有效干涉 Furin 基因的 shRNA

传统三质粒转染方法结果显示，相对于 #1 和 #4 shRNA，shRNA#2 和 shRNA#3 均对靶基因 Furin 具有显著地抑制作用。但是由于同组内样品数据的均一性差、波动较大,导致各组数据的标准差数值较高,统计结果显示 shRNA#2 和 shRNA#3 对 Furin 基因的抑制作用并无显著性差异(P=0.789)(图 3)。应用 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 重组质粒以单质粒转染方法进行 shRNA 筛选实验,能够显著提高同组数据的重复性,准确地反映出 shRNA#3 较 shRNA#2 具有更强的 Furin 基因抑制作用(P<0.001)。

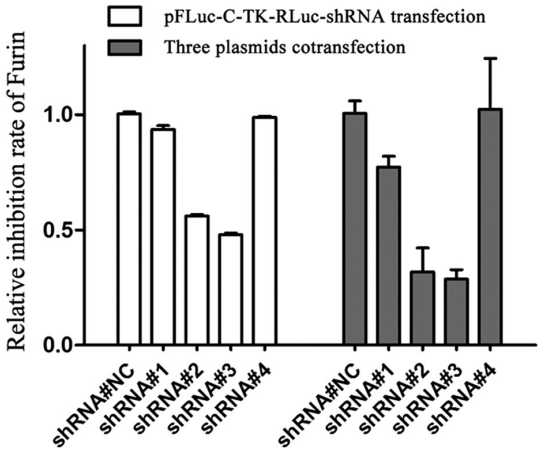

图 3 应用两种方法筛选有效干涉 Furin 基因的 shRNA

Fig.3 Comparison of the inhibition efficiency of shRNAs targeting Furin by two methods

3 讨论

RNAi 技术能够对靶基因的表达进行特异性敲减，在基因功能研究、基因治疗等领域应用广泛[15,16]。然而并非所有理论层面设计合理的 shRNA 都能有效地降低靶基因表达水平[17]。因此，准确、高效地评价候选 shRNA 的基因沉默能力十分必要[18,19]。双萤光素酶报告基因系统为筛选有效干涉靶基因的 shRNA 提供了良好的手段[20]。该方法的基本原理是将靶基因构建到 FLuc 基因的 3' 非翻译区，使靶基因跟随 FLuc 基因一同转录为嵌合 mRNA。若 shRNA 对靶基因具有抑制作用，则会使 FLuc/ 靶基因嵌合 mRNA 稳定性降低，导致 FLuc 表达量下降，引起 FLuc 活力减弱。shRNA 对靶基因的抑制作用越强，FLuc 活力降低的程度越明显。为了减小细胞活性和转染效率等外在因素对测定结果的影响，在细胞中同时组成性表达 RLuc 作为内对照，使测定结果规一化。双萤光素酶报告基因系统在细胞中同时表达 FLuc 和 RLuc，两者来源于不同物种并对应不同的反应底物，故而不会产生交叉干扰[21,22]。相比于先前开发的使用氯霉素乙酰基转移酶（CAT）、β- 半乳糖苷酶（β-Gal）、碱性磷酸酶（SEAP）等作为内对照的报告基因系统，双萤光素酶报告基因系统在检测灵敏度和检测速度等方面具有显著优势。

然而，传统的双萤光素酶报告基因系统筛选抑制靶基因表达 shRNA 的实验方法并不便利，需要将报告基因载体、shRNA 真核表达载体和 RLuc 内参载体以一定比例混合后，共同转染哺乳动物细胞。多质粒共转染操作步骤繁复，不同细胞实际转入的三种载体比例必然存在一定程度的差异，引起较大的系统性误差，导致通过该方法测定的实验结果稳定性差，重复实验组间差异较大，削弱了实验的精确性，甚至造成无法准确评价候选 shRNA 的情况（图 3）。针对这一弊端，Promega 公司将 FLuc 和 RLuc 两种萤光素酶基因的完整独立表达框构建于同一个载体上，开发制备了两种改进型双萤光素酶报告基因载体 psiCHECK™-2 和 pmirGLO（专利号：EP1341808），使报告基因载体功能与内参载体功能整合于同一个质粒。但是，受限于上述载体的价格不菲，限制了其推广应用。毕延震等通过同源重组方法，将 FLuc 和 RLuc 基因表达框融合于同一个载体中，制备了与商品化 psiCHECK™-2 报告基因载体功能类似的双萤光素酶单载体 pMiSensor[23]。将靶基因序列插入上述双萤光素酶单载体后，与一定比例的候选 shRNA 真核表达载体混合，把二者共转染哺乳动物细胞，即可完成 shRNA 筛选实验。此类双萤光素酶单载体，可将传统双萤光素酶报告基因系统所必须的三个功能质粒共转染操作，简化为两质粒共转染，减小了多质粒共转所引起的系统性误差。虽然，上述改进型的双萤光素酶单载体相比传统方法提高了 shRNA 筛选的准确性，但是实验仍然依托于多质粒共转染操作，由此而来的系统性误差并未完全消除。这也是此类载体未被相关领域科研人员广泛使用的主要原因。

目前，常用的 shRNA 真核表达载体有两类。一类是利用序列长度较短的 III 类启动子直接转录生成 shRNA，其优点在于转录终止位点明确，冗余序列较少。另一类则借鉴内源性 miRNA 的结构，将 shRNA 置于宿主基因的 3' 非翻译区，使用 II 类启动子进行转录，shRNA 加工成熟的同时亦实现了宿主基因表达。有研究对上述两类载体转录生成成熟 shRNA 的效率进行了系统比较，结果证实后者的效率显著高于前者[24]。如今，越来越多的相关领域研究采用 II 类启动子转录产生模拟内源性 miRNA 结构的 shRNA [14]。本文构建的 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 载体，其 Kan/Neo 抗性基因编码序列上游具有细菌启动子和 SV40 II 类启动子，使新霉素磷酸转移酶 II 分别在大肠杆菌和哺乳动物细胞中表达，在大肠杆菌中表现出卡那霉素抗性，在哺乳动物细胞中表现出遗传霉素抗性。通过加端 PCR 的方法，在抗性基因终止码后加入酶切位点，将候选 shRNA 序列插入到抗性基因 mRNA 的 3' 非翻译区（图 1）。通过 SV40 启动子介导的抗性基因转录，在哺乳动物细胞中高效地加工生成候选 shRNA。而 shRNA 序列的插入不会影响新霉素磷酸转移酶 II 的表达，该载体依然能够在大肠杆菌中进行卡那霉素抗性筛选。通过对质粒载体中抗性基因结构的改造，不但将 shRNA 真核表达的功能赋予了载体，又未引入过多的冗余序列。

SV40 PloyA 能够高效地终止上游基因的转录，被广泛应用于质粒载体的构建。pGL3-Control 和 pShuttle-CMV-LacZ 两种商品化载体均使用了 SV40 PloyA 序列，然而我们意外地发现这两个载体中的 SV40 PloyA 却互为反向互补序列。这一发现提示，SV40 PloyA 不但能够终止上游基因的转录，对下游基因也具有同样的作用。我们在 SV40 PloyA 正向序列及反向互补序列中均能找到发挥转录终止功能的核心基序 "AATAAA" [25]，为其双向终止转录的能力提供了理论依据。本文构建的 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 载体，其 FLuc 和 RLuc 两种萤光素酶基因的表达框对向排列，共享一个 SV40 PloyA 序列（图 1），即可实现两种萤光素酶的顺利表达。而前文所述的三种双萤光素酶单载体，均采用两种萤光素酶基因表达框同向排列的方式，需要两段 PloyA 序列分别用于终止 FLuc 和 RLuc 基因的转录。相对已有的双萤光素酶单载体，pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 载体通过共用一段 PloyA 序列，不但精简了载体的分子量大小，更避免了使用两个相同 PloyA 序列（pMiSensor 载体）所引起的质粒重组风险。

本文创新性地将双萤光素酶报告基因系统中需要的报告基因载体、shRNA 真核表达载体和 RLuc 内参载体三个功能，整合于一个新型的双萤光素酶报告基因载体 pFLuc-C-TK-RLuc-shRNA 之中。该载体具有两个独立的多克隆位点，分别用于插入靶基因序列和候选 shRNA 序列。应用此新型双萤光素酶报告基因载体筛选对靶基因表达抑制程度最优的 shRNA 时，仅需要向细胞转染一个质粒，即可替代三个质粒或两个质粒共同转染的操作，彻底消除了多质粒共转染的系统性误差。极大降低了由于多质粒共转染操作稳定性差所引起的萤光素酶活力比值的大幅波动，进一步增强了双萤光素酶报告基因系统的信噪比，提高了筛选抑制靶基因表达 shRNA 的准确性。

参 考 文 献（References）

[1] Maduri S. Applicability of RNA interference in cancer therapy: Current status[J]. Indian Journal of Cancer, 2015, 52(1): 11-21

[2] Morry J, Ngamcherdtrakul W, Gu S, et al. Targeted treatment of metastatic breast cancer by PLK1 siRNA delivered by an antioxidant nanoparticle platform [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2017, 16 [Epub ahead of print]

[3] Scherman D, Rousseau A, Bigey P, et al. Genetic pharmacology: progresses in siRNA delivery and therapeutic applications[J]. Gene Therapy, 2017, 24[Epub ahead of print]

[4] Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, et al. RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far[J]. Frontiers in Physiology, 2016, 7: 553

[5] Liu Y, Zhu X, Zhang H. Effects of chemokine receptor 3 gene silencing by RNA interference on eosinophils[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2017, 13(1): 215-221

[6] Wang Y, He J, Zhang S, et al. Knockdown of Immature Colon Carcinoma Transcript 1 Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells [J]. Technology in Cancer Research & Treatment, 2016,15[Epub ahead of print]

[7] Mohr SE, Smith JA, Shamu CE, et al. RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014, 15(9): 591-600

[8] Forloni M, Ho T, Sun L, et al. Large-Scale RNA Interference Screening to Identify Transcriptional Regulators of a Tumor Suppressor Gene[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1507: 261-268

[9] Dyer BW, Ferrer FA, Klinedinst DK, et al. A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis[J]. Analytical Biochemistry, 2000, 282(1): 158-161

[10] Grentzmann G, Ingram JA, Kelly PJ, et al. A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals[J]. Rna, 1998, 4(4): 479-486

[11] Wei J, Qi X, Zhan Q, et al. miR-20a mediates temozolomide-resistance in glioblastoma cells via negatively regulating LRIG1 expression[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 71: 112-118

[12] Ibrahim NM, Marinovic AC, Price SR, et al. Pitfall of an internal control plasmid: response of Renilla luciferase (pRL-TK) plasmid to dihydrotestosterone and dexamethasone [J]. BioTechniques, 2000, 29 (4): 782-784

[13] Van VT, Do VN. Customization of Artificial MicroRNA Design[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1509: 235-243

[14] Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, et al. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi[J]. Cell Reports, 2013, 5(6): 1704-1713

[15] Barata P, Sood AK, Hong DS. RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions [J]. Cancer Treatment Reviews, 2016, 50: 35-47

[16] Nelms B, Dalomba NF, Lencer W. A targeted RNAi screen identifies factors affecting diverse stages of receptor-mediated transcytosis[J]. The Journal of Cell Biology, 2017, 216(2): 511-525

[17] Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(4): 2014-2018

[18] Misra A, Green MR. Fluorescence Reporter-Based Genome-Wide RNA Interference Screening to Identify Alternative Splicing Regulators[J]. Methods in Molecular Biology, 2017, 1507: 1-12

[19] Zhu YX, Yin H, Bruins LA, et al. RNA interference screening identifies lenalidomide sensitizers in multiple myeloma, including RSK2 [J]. Blood, 2015, 125(3): 483-491

[20] Alvarez ML. Faster experimental validation of microRNA targets using cold fusion cloning and a dual firefly-Renilla luciferase reporter assay[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1182: 227-243

[21] Laios E, Obeid PJ, Ioannou PC, et al. Expression hybridization assays combining cDNAs from firefly and Renilla luciferases as labels for simultaneous determination of two target sequences [J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(17): 4022-4028

[22] Xu YZ, Kanagaratham C, Jancik S, et al. Promoter deletion analysis using a dual-luciferase reporter system [J]. Methods in Molecular Biology, 2013, 977: 79-93

[23] 毕延震, 郑新民, 邵长伟, 等. 检测 miRNA 活性的双荧光素酶单载体[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(8): 775-780
Bi Yan-zhen, Zheng Xin-min, Shao Chang-wei, et al. A dual luciferase single plasmid to monitor miRNA activity [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 28(8): 775-780

[24] Zhou H, Xia XG, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(6): 62

[25] Proudfoot NJ. Ending the message: poly (A) signals then and now[J]. Genes & Development, 2011, 25(17): 1770-1782