

## 基因功能的研究方法

纪宗玲<sup>1</sup> 刘继中<sup>2</sup> 陈苏民<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 第四军医大学生物化学教研室, <sup>2</sup> 第四军医大学全军骨科研究所, 西安 710032)

**摘要** 人类基因组计划的顺利进行使基因功能研究成为生命科学领域中的重大课题, 基因转导、反义技术、转基因和基因剔除、染色体转导、RNA 干涉是目前研究基因功能的主要方法, 新的技术不断涌现, 且各有其特点和局限性。

**关键词** 基因功能, 基因转导, 反义核苷酸, 转基因, 基因剔除, 染色体转导, RNA 干涉

**中图分类号** Q753 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2002)01-0117-04

随着人类基因组计划的顺利进行, 越来越多的新基因被发现, 基因功能研究成为生命科学领域中的重大课题, 目前基因功能研究方法主要有基因转导、反义技术、转基因和基因剔除、染色体转导、RNA 干涉等。

### 1 基因转导技术

将目的基因转入某一细胞中, 通过观察细胞生物学行为的变化来认识基因的功能, 是目前应用最多、技术最成熟的基因功能研究方法。由于基因表达受转导效率和是否持续稳定表达两方面因素影响, 因此需慎重选择转导系统<sup>[1]</sup>。常用的基因转导系统分为非病毒性表达系统和病毒性表达系统。

#### 1.1 非病毒性表达载体

主要通过 DNA 直接注射或与多聚赖氨酸、阳离子脂类混合, 使目的基因穿过细胞膜。由于转录效率、mRNA 的加工、mRNA 的稳定性及翻译效率、目的基因的拷贝数以及目的蛋白翻译后加工等因素影响目的基因的表达, 因此在选择表达载体时应注意以下调控元件:

**1.1.1 选择强启动子和增强子:** 常用的启动子有三种: 最早用于构建真核表达载体的非洲猿猴病毒启动子 SV40, 以及人类巨细胞病毒启动子 CMV 和人延伸因子的启动子 EF1- $\alpha$ 。人 CMV 启动子上游存在一个增强子<sup>[2]</sup>, 用该启动子控制人  $\beta$  因子表达, 表达效率较 SV40 启动子显著增高<sup>[3]</sup>。EF1- $\alpha$  是从人成纤维细胞的染色体中分离得到的延伸因子的启动子<sup>[4]</sup>, 用启动子 EF1- $\alpha$  构建的表达载体 pEF321-CAT 较 SV40 启动子强数倍至 100 倍, pEF321 质粒的启动子在 neo 基因的稳定表达上也比 SV40 早期基因启动子或者 Rous 肉瘤病毒长末端重复序列强得多<sup>[5]</sup>。EF1- $\alpha$  是迄今报道的作用最强的启动子。

**1.1.2 选择高效的多聚腺苷酸加尾信号 (PolyA):** 因为真核基因的 hnRNA 的加工过程需要多聚腺苷酸加尾信号, 在目

的基因的 3' 端加上 polyA 信号后, 表达水平至少提高 10 倍, 说明 polyA 信号对外源基因的有效表达是必需的<sup>[6]</sup>。目前应用较多的是 SV40 的早期和晚期 polyA, 牛生长激素基因的 polyA 和人工合成的 polyA 信号。

**1.1.3 内含子序列:** 受表达载体容量的限制, 目的基因常常以 cDNA 的形式克隆入表达载体, 但由于某些内含子中有重要的基因功能调控序列, 而以基因组基因的形式克隆入载体能得到高效表达。例如  $\beta$ -珠蛋白基因的内含子在真核细胞中表达是必需的<sup>[7]</sup>。为了增加翻译效率, 表达载体中一般含有天然的或者人工合成的内含子序列, 以稳定外源蛋白的前体 mRNA。

**1.1.4 内部核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, IRES):** IRES 是从细小 RNA 病毒中发现的, 该病毒以新的 5' 帽子非依赖的形式进行翻译, 其核糖体结合位于细小病毒 RNA 5' 非编码区内部的一个区域<sup>[8]</sup>。这一区域包括 450 个核苷酸长度, 核糖体与其 3' 端结合后扫描 (Scan) RNA 到达翻译起始点。在表达载体中设计 IRES 可以使它所连接的 ORF 同时翻译, 便于构建双顺反子和多顺反子真核表达载体, 表达多亚基蛋白或多个作用相关的蛋白。

此外, 基因本身的结构对表达水平也有很大影响。Kozak M<sup>[9]</sup> 用单个碱基替代突变的方法对真核细胞翻译起始密码子 AUG 附近的序列进行分析, 发现最有效的翻译起始共有序列是 5'-CCA/GCCATGG-3', 称为 Kozak 序列。提示优化目的基因的翻译起始区可提高表达效率。

#### 1.2 病毒表达载体

以病毒为载体介导的基因转移因其转染效率高、目的基因可稳定表达等优势被广泛应用。目前构建的多种病毒载体各有特点。逆转录病毒载体可携带外源基因整合进靶细胞的基因组中, 从而实现目的基因的持久表达, 某些亚型几乎能稳定转导 100% 靶细胞。但缺点是只能感染正在分裂的细胞, 有插入突变和激活癌基因的危险, 并且繁殖滴

收稿日期: 2001-05-28, 修回日期: 2001-07-21。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30000091, No. 39870380)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-29-3376599; E-mail: chensm@fmmu.edu.cn

度较低。人腺病毒载体具有宿主范围广、滴度高、装载量大(重组腺病毒最大包装容量为野生型腺病毒的 105%)等优点,是对分裂细胞和静息细胞均有效的基因传递系统。如以门静脉注射的方式用腺病毒载体介导人 LDLR 基因,在 90% 以上的肝细胞中得到表达<sup>[10]</sup>。但不能将外源基因整合到细胞染色体上,所介导的基因只能短暂表达,这一特点使腺病毒载体特别适用于某些骨病的基因治疗。缺点是同时表达大量病毒蛋白质,引起机体免疫反应。腺相关病毒载体(AAV)是一种单链线状非致病性 DNA 病毒,是目前发现的唯一一种以点特异性方式整合在人 19 号染色体上的真核病毒,对分裂期细胞和静息细胞(如神经元、肌细胞、造血干细胞等)均较敏感,不伴随任何病毒基因<sup>[11]</sup>表达,是比较理想的基因转移和表达系统。

I 型单纯疱疹病毒对非分裂细胞有天然亲和力,是一种亲神经元病毒<sup>[12]</sup>,适用于神经系统内的基因转移。痘苗病毒具有广泛的宿主细胞,能产生表达外源抗原,在基因转移系统中具有独特的应用。如利用痘苗病毒在小鼠中表达了人类免疫缺陷病毒的外膜蛋白 HIV-1 Env(rVVenv)和小鼠 IL-12(rVVlucIL-12)基因,发现 IL-12 以剂量依赖的方式增强机体对 HIV 的细胞免疫反应<sup>[13]</sup>。

## 2 反义技术

根据碱基互补原理,利用人工或生物合成的特异互补的 DNA 或 RNA 片段(或其修饰产物)抑制或封闭目的基因的表达。包括反义寡核苷酸技术、反义 RNA 技术和核酶(Ribozyme)技术。

### 2.1 反义寡核苷酸技术(Antisense oligonucleotides, ASON)

ASON 就是用一段人工合成的能与 RNA 或 DNA 互补结合的寡核苷酸链抑制基因的表达<sup>[14]</sup>。

目前 ASON 用于基因功能研究效果较好,可用自动 DNA/RNA 合成仪很方便地合成。由于合成后的未修饰寡核苷酸对核酸酶的抵抗力较弱,不易透过细胞膜,与靶序列的亲合力也较低,故经常需要修饰。常用的修饰手段有:磷酸二酯键修饰,磷酸修饰(应用最多的是硫代修饰,修饰后在生物体液中的半衰期至少是未修饰者的 10 倍<sup>[15]</sup>),对糖环修饰,对碱基及杂环修饰,以及引入亲脂性基团或改变其负电性以增加 ASON 进入靶细胞等等。一般认为 ASON 长度以 15~30 nt 较合适,有报道认为 8-mer 的经磷硫修饰的 ASON 即可明显抑制基因的功能。ASON 设计需要综合考虑诸如长度、定位、特异性、能否形成发卡结构、mRNA 的二级结构以及能否形成二聚体等因素<sup>[16]</sup>。一般选择位于编码区或者 3' 非翻译区,有计算机软件可以帮助设计 ASON 的序列。

### 2.2 反义 RNA 技术

利用基因重组技术,构建人工表达载体,使其离体或体内表达反义 RNA,反义 RNA 能与靶 mRNA 形成较稳定的二聚体,从而抑制靶基因的表达。其作用机理可能在 DNA 复制、转录及翻译多水平抑制靶基因的表达<sup>[17]</sup>。

### 2.3 核酶(Ribozyme)技术

核酶又称基因剪刀,是一类具有催化活性的特殊的 RNA 分子,通过碱基配对原则特异性灭活靶 RNA 分子。单个核酶分子可以结合多个 mRNA 分子并使之在特定部位断裂,而

核酶本身具有不易受 RNase 攻击的较为稳定的空间结构,使得催化效率比反义 RNA 高<sup>[18]</sup>。常见的核酶有锤头状、发夹状和斧头状三种,应用最多的是锤头状核酶。核酶的基本组成有中间极为保守的核苷酸序列(活性中心)和两端的引导序列,当引导序列与靶 RNA 互补结合时,中间极端保守序列即在该位点切断。但也有人认为核酶的作用原理是反义抑制和切割活性的综合结果。核酶已经成功地应用于培养细胞中基因表达的阻断,主要靶基因包括 HIV、c-fos、bcr-abl 和 H-ras 等<sup>[19]</sup>。但应用中仍然存在切割效率低和易被 RNase 降解等缺点。

## 3 基因剔除和转基因技术

利用基因剔除(Gene knockout)技术或转基因技术获得的模式生物可能是目前研究基因功能最具价值的手段。

### 3.1 基因剔除小鼠

用同源重组的方法在胚胎干细胞定位突变某个基因,再将突变的胚胎干细胞注射入正常小鼠的囊胚期胚胎,随着胚胎发育而分化成为生殖细胞,最后通过小鼠培育获得该基因突变的杂合子和纯合子小鼠,这种技术称为基因剔除技术,所得到的小鼠则为基因剔除小鼠<sup>[20]</sup>。目前主要的基因剔除技术有:Cre/loxP 系统、FLP/FRT 系统、GAL4/UAS 系统及基因足迹(Genetic footprinting)等。Cre/loxP 系统主要用于小鼠,已经发展到可定时剔除和靶基因调控表达<sup>[21]</sup>。

### 3.2 转基因小鼠

1974 年,Jaenisch 等<sup>[22]</sup>用显微注射法将 SV40 的 DNA 导入小鼠的囊胚(Blastocyst)中,在子代小鼠的肝、肾组织中检测到了 SV40 的 DNA。这一结果证明,将外源基因导入胚胎细胞并实现整合是可能的。经受精卵注射将克隆的 DNA 整合入小鼠基因组中,再将受精卵移植入假孕小鼠使之发育成为基因组中带有注射的 DNA 的子代小鼠,这种小鼠即为转基因小鼠。此后转基因技术得到了长足的发展,如根据同源重组的原理,实现了导入的外源基因与宿主染色体定点整合,即“基因打靶”(Gene targeting);利用组织特异性启动子,导入的外源基因可在特定组织细胞内表达,应用重金属元素、热休克蛋白和甾体激素等多种手段进行表达调控;应用 Cre/loxP 重组酶系统实现了外源基因的时间特异性表达,等等。

虽然基因剔除技术在基因功能研究中占有重要地位,但具有技术条件和费用较高、仅限于小鼠等缺点,并且在胚胎期消除了目的基因的功能,可能只反映一部分基因功能,其它则被别的基因代偿;或者某些重要基因被剔除后可导致小鼠在胚胎期死亡,无法检测对各发育阶段的影响,使基因剔除技术的应用受到限制。

## 4 人工染色体的转导

转基因技术是蛋白功能分析和基因表达调控的有力手段,但使用小的质粒重组体存在表达水平低、缺乏组织特异性等缺点,而将大的 DNA 片段克隆入酵母人工染色体(YACs)、细菌人工染色体中可产生较好的表达水平和组织特异性,并可精确地调节同源重组<sup>[23]</sup>。

YAC DNA 转导的方法主要有前核注射、脂质体介导和

与酵母原生质体融合等。目前完整的 YAC DNA 已能转入小鼠,结合在酵母体内利用同源重组进行基因突变,该技术可对 100kb 以上的基因功能以及多基因的体内定位进行分析<sup>[26,27]</sup>。例如研究人类  $\beta$  珠蛋白在发育中的调节,将携带两型突变的人  $\beta$  珠蛋白基因(248kb)的 YACs 转入小鼠,分析转基因小鼠的表型变化,结果表明 YACs 转基因小鼠可用于研究哺乳类发育过程中基因的调控<sup>[28]</sup>。采用 YAC 转基因的方式可使导入基因的水平与内源基因相当,并且具有类似于天然的剪接机理,适用于复杂的基因功能分析。

## 5 RNA 干涉——基因功能研究的新途径

所有有机物都含有限制异常或外源基因表达的保护机制。随着转基因技术的广泛应用,发现转入的基因可被机体当作外源遗传物质。以植物为例,发现转入基因可诱导其自身沉默,并以一种称为转录后基因沉默(Post transcriptional gene silencing, PTGS)或者共抑制(Cosuppression)的过程同时引起同源内源基因的沉默<sup>[29]</sup>。而当在线虫中转入双链 RNA 后导致的同源基因沉默比正义或反义 RNA 更为有效,这一现象因此引起研究者的关注。在许多种属中引入双链 RNA(Double stranded RNA, dsRNA)可以引起强烈、特异性的基因沉默(Gene silencing),这种现象称为 RNA 干涉<sup>[30,31]</sup>(RNA interference, RNAi)。RNAi 现象存在于非脊椎动物如昆虫、锥虫(Trypanosome)、涡虫(Planaria)和脊椎动物斑马鱼(Zebrafish)和小鼠中。

### 5.1 RNA 干涉的作用机理

在植物中,基因沉默发生于转录和转录后两种水平,而在动物中迄今仅报道了转录后水平的 RNAi。目前认为 RNAi 至少包括两步 RNA 的降解过程,第一步为 dsRNA 降解形成特征性的与靶基因同源的 22 个核苷酸的 RNA,第二步为这些短核苷酸序列参与形成多亚基复合物,并引导复合物中的核酸酶降解特异性的信使 RNA。最近 Bernstein E 等报道从果蝇中成功分离到执行上述第一步核酸降解过程的名为 Dicer 的酶,它是特异性酶解 dsRNA 的 RNase III 核酸酶家族成员,在进化中高度保守<sup>[32]</sup>。

### 5.2 RNA 干涉的作用特点

RNA 干涉的作用特点有:(1)特异性抑制目的基因。针对某特定的内源基因的 dsRNA 转入动物体内或胚胎内,能特异抑制该基因的功能,而单链正义或反义 RNA 的抑制作用较弱或缺失。(2)广泛分布且可遗传。dsRNA 分子能够在体细胞内被有效转运至全身各处,用经小肠微注射或者浸润喂食线虫的方法都能得到各组织中对靶基因的抑制,在体细胞和生殖细胞中能检测到 RNA 的表达,并且其子代也产生了对相应基因强烈而特异的抑制效应。但这种遗传只限于子一代,子二代往往又回复到野生型<sup>[33]</sup>。(3)靶序列的选择性。RNAi 的靶序列需要慎重选择,实验证明,外显子序列的 dsRNA 能产生特异和高效的基因抑制作用,而只针对内含子序列的 dsRNA 不能产生这种作用;dsRNA 的长度对 RNAi 的效率有影响<sup>[34]</sup>,但最短的有效长度目前还不清楚。一般认为应长于 500bp;选择靶序列时应避免高度同源序列之间的交叉干扰。例如对线虫的体壁肌肉肌球蛋白重链的编码区基因进行 RNAi 实验,当选择其 5' 端高度保守区作为靶序列

进行 dsRNA 注射时产生致死表型,而选择其它部分进行实验时则产生预期的瘫痪表型<sup>[35]</sup>。

### 5.3 RNA 干涉的导入方式与应用

在简单生物常用电转化的方式导入 dsRNA,多细胞真核生物的生殖细胞或者早期胚胎,可采用微注射的方式。对于线虫来说,小肠注射与生殖细胞注射效果相仿,喂食表达 dsRNA 的细菌或者只是浸浴到含 dsRNA 的溶液中也很有效<sup>[36]</sup>。

为了对线虫表达基因的功能进行批量分析,日本学者 Maeda I I 等<sup>[37]</sup>在传统 RNAi 技术的基础上,建立了以浸泡进行 RNAi 方法。用该方法对相当于线虫预期基因数量一半的大约 10000 个基因进行分析,从目前获得的 2500 个基因功能信息中,发现 27% 可检测到表形变化,诸如胚胎期死亡、胚胎后期死亡、不育、表型异常等。详细分析 F1 不育表型,24 个基因可能在胚胎发育过程发挥重要作用,结合这些基因 cDNA 的表达谱有可能对这些基因的功能进行深入研究。目前可以实现 RNAi 在特定时期针对特定组织细胞对目的基因功能的干涉,如 dsRNA 成功地用于小鼠早期胚胎特异基因的阻断,分别阻断了卵母细胞的 *c-mos* 和早期胚胎(植入前)的 *E-cadherin* 及 GFP 转基因的表达<sup>[38]</sup>,为基因调控和发育研究提供了广泛使用该技术的可能。推测生物体内天然存在的 dsRNA 是基因表达调控、适应环境、抵御外来侵害的重要途径。人工导入 dsRNA 以抑制基因功能将成为在后基因组时代进行基因功能分析的有效手段。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Inder M, Verma, Nikun J Somla. Gene therapy-promise, problem and prospects. *Nature*, 1997, **389**(18):239 ~ 242
- [2] Boshart M, Weber F, Jahn G *et al*. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 1985, **41**(2):521 ~ 530
- [3] Palmer T D, Thompson A R, Miller A D. Production of human factor IX in animals by genetically modified skin fibroblasts: potential therapy for hemophilia B. *Blood*, 1989, **72**(2):438 ~ 445
- [4] Kim D W, Uetsuki T, Kaziro Y *et al*. Use of the human elongation factor I alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 1990, **91**(2):217 ~ 223.
- [5] Uetsuki T, Naito A, Nagata S *et al*. Isolation and characterization of the human chromosomal gene for polypeptide chain elongation factor-I alpha. *J Biol Chem*, 1989, **264**(10):5791 ~ 5798
- [6] Kaufman R J, Sharp P A. Construction of a modular dihydrofolate reductase cDNA gene: analysis of signals utilized for efficient expression. *Mol Cell Biol*, 1982, **2**(11):1304 ~ 1319
- [7] Bender M A, Miller A D, Gelinas R E. Expression of the human beta-globin gene after retroviral transfer into murine erythroleukemia cells and human BFU-E cells. *Mol Cell Biol*, 1988, **8**(4):1725 ~ 1735
- [8] Jackson R J, Howell M T, Kaminski A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem Sci*, 1990, **15**(12):477 ~ 483
- [9] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 1986, **44**(2):283 ~ 292

- [10] Parks R J. Improvements in adenoviral vector technology: overcoming barriers for gene therapy. *Clin Genet*, 2000, **58**(1): 1 ~ 11
- [11] Schwarz E M. The adeno-associated virus vector for orthopaedic gene therapy. *Clin Orthop*, 2000 Oct, (379 Suppl): S31 ~ 39
- [12] Fraefel C, Jacoby D R, Breakefield X O *et al*. Herpes simplex virus type 1-based amplicon vector systems. *Adv Virus Res*, 2000, **55**: 425 ~ 451
- [13] M Magdalena Gherardi, Juan C Ramirez. IL-12 Delivery from Recombinant Vaccinia Virus Attenuates the Vector and Enhances the Cellular Immune Response Against HIV-1 Env in a Dose-Dependent Manner. *J Immunol*, 1999, **162**: 6724 ~ 6733
- [14] Agrawal S. Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta*, 1999, **1489**(1): 53 ~ 68
- [15] Stein C A. Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(5): 147 ~ 149
- [16] Mitsuhashi M. Strategy for designing specific antisense oligonucleotide sequences. *J Gastroenterol*, 1997, **32**(2): 282 ~ 287
- [17] Weintraub H M. Antisense RNA and DNA. *Sci Am*, 1990, **262**(1): 40 ~ 46
- [18] Fedor M J. Structure and function of the hairpin ribozyme. *J Mol Biol*, 2000, **297**(2): 269 ~ 291
- [19] Rossi J J. Ribozyme therapy for HIV infection. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, **44**(1): 71 ~ 78
- [20] Fassler R, Martin K, Forsberg E *et al*. Knockout mice: How to make them and why. *The immunological approach*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995, **106**: 323 ~ 324
- [21] Liu J L, Yakar S, LeRoith D. Conditional knockout of mouse insulin-like growth factor-1 gene using the Cre/loxP system. *Proc Soc Exp Biol Med*, 2000, **223**(4): 344 ~ 351
- [22] Jaenisch r, Mintz B. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocytes injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974, **71**: 1250 ~ 1254
- [23] Kirk R, Capocchi M R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, **51**: 503 ~ 512
- [24] Gu H, Zou Y R, Rajewsky K *et al*. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-Mediated gene targeting. *Cell*, 1993, **73**: 1155 ~ 1164
- [25] Lamb B T, Gearhart J D. YAC transgenics and the study of genetics and human disease. *Curr Opin Genet Dev*, 1995, **5**(3): 342 ~ 348
- [26] Huxley C. Exploring gene function: use of yeast artificial chromosome transgenesis. *Methods*, 1998, **14**(2): 199 ~ 210
- [27] Peterson K R, Li Q L, Clegg C H *et al*. Use of yeast artificial chromosomes (YACs) in studies of mammalian development: production of beta-globin locus YAC mice carrying human globin developmental mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(12): 5655 ~ 5659
- [28] Peterson K R, Navas P A, Stamatoyannopoulos G. beta-YAC transgenic mice for studying LCR function. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, **850**: 28 ~ 37
- [29] Vaucheret H, Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet*, 2001, **17**(1): 29 ~ 35
- [30] Meins F Jr. Related Articles RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. *Plant Mol Biol*, 2000, **43**(2 ~ 3): 261 ~ 273
- [31] Boshier J M, Labouesse M. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. *Nature Cell Biology*, 2000, **2**: E31 ~ E36
- [32] Bernstein E, Caudy A A, Hammond S M, Hannon G J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 2001, **409**(6818): 363 ~ 366
- [33] Baulcombe D. RNA silencing: Diced defence. *Nature*, 2001, **409**(6818): 295 ~ 296
- [34] Scott M Hammond, Emily Bernstein *et al*. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, **404**: 293 ~ 296
- [35] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, **15**(2): 188 ~ 200
- [36] Boshier J M, Dufourcq P, Sookharea S *et al*. RNA interference can target pre-mRNA: consequences for gene expression in the *C. elegans* operon. *Genetics*, 1999, **153**: 1245 ~ 1256
- [37] Maeda I I, Kohara Y, Yamamoto M *et al*. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol*, 2001, **11**(3): 171 ~ 176
- [38] Wianny F. Specific interference with gene function by double-strand RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 70 ~ 75

## Strategies of Functional Analysis of New Genes

JI Zong-Ling LIU Ji-Zhong CHEN Su-Min\*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract** Functional analysis of new genes is playing a central role in postgenomic era. Here we reviewed several main strategies including bioinformatics, gene transduction, antisense technology, certain gene silence induced by RNA interference (RNAi), transgene and gene knockout and artificial chromosome transduction.

**Key words** gene function, gene transduction, antisense, gene knockout, RNA interference

Received: 05-28-2001

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30000091, No. 39870380).

\* Corresponding author. Tel: 86-29-3376599; E-mail: chensm@fmmu.edu.cn