

小鼠胚胎 *Sry* 基因的 RNA 干涉研究

赵金红²⁾ 杜卫华¹⁾ 道尔吉²⁾ 裴杰³⁾ 张丽³⁾ 林秀坤^{1)*}

¹⁾中国农业科学院畜牧研究所, 北京 100094; ²⁾内蒙古农业大学动物医学与动物科学学院, 呼和浩特 010018;

³⁾西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要 为了研究 *Sry* 基因的调控网络, 采用 siRNA 技术使 *Sry* 基因沉默, 探讨了有效沉默 *Sry* 基因的途径和最佳条件. 设计、合成针对小鼠 *Sry* 基因的发夹状寡核苷酸链, 退火后连入真核表达载体 pSilencer 4.1-CMV neo vector, 构建以小鼠 *Sry* 基因为靶点的 siRNA 干扰载体 pSilencer 4.1/*Sry*217 及 pSilencer 4.1/*Sry*565, 通过尾静脉注射法将载体质粒导入妊娠小鼠体内, 于小鼠妊娠第 11.5 天, 即 11.5 dpc (days post coitum, 性交后天数) 取出胚胎, 采用双重 PCR 法对胚胎进行性别鉴定, 鉴定为雄性的胚胎采用半定量 RT-PCR 法检测 *Sry* 基因的表达量, 研究不同干扰序列、不同注射时间及注射剂量对 *Sry* 基因表达量的影响. 研究结果, 确定了质粒的最佳注射时间为 9.5 dpc, 注射剂量为 20 μg , 注射干扰质粒 pSilencer 4.1/*Sry*565 对 *Sry* 基因的抑制效率达 85% 左右. 结果表明, siRNA 可以显著抑制雄性胚胎 *Sry* 基因的表达.

关键词 siRNA, *Sry*, 小鼠胚胎, 基因沉默

学科分类号 Q812

哺乳动物性别决定是由 Y 染色体上 *SRY* (sex-determining region of the Y chromosome, *SRY*) 基因决定的^[1]. 众多研究表明: *SRY* 基因突变引起人或其他哺乳动物性腺发育受阻. 将小鼠 *Sry* 基因导入 XX 雌性小鼠受精卵, 可使其向雄性化转变, 包括支持细胞的分化、迁移, 并发育形成睾丸^[2]. 这说明, *SRY* 基因是性别决定的核心基因, 直接诱导精巢发育, 对睾丸发育起着关键性的作用^[3]. 由于 *SRY* 基因仅在胚胎发育过程中短暂表达, 难以建立供分析、鉴定的体外细胞培养系统, 尽管 *SRY* 基因的发现已有近 20 年的历史, 但迄今为止 *SRY* 的靶基因还没有鉴别出来, 它对下游基因调控的具体机理尚不清楚. 目前在此方面的研究主要集中在对性腺发育缺陷基因突变体的分析和对 *Sry* 转基因小鼠的研究^[4], 采用 siRNA 技术沉默 *Sry* 基因的相关研究尚未见报道.

RNA 干涉 (RNA interference) 技术^[5]是使基因沉默的重要工具. 能够迅速而简单地使某个基因功能缺失. 但由于小鼠 *Sry* 基因的表达具有特殊性, 只发生在胚胎发育特定阶段, 因此干扰 *Sry* 基因的表达具有一定困难, 我们构建了 siRNA 干扰载体, 探讨了有效沉默 *Sry* 基因的干扰序列及导入途径和

剂量, 确定了恰当的导入时间点, 使正常雄性胚胎 *Sry* 基因的表达量明显下调. 本研究结果, 使 *Sry* 基因功能缺失, 为进一步研究其对下游基因调控机理奠定了基础, 使从反向遗传学的角度研究 *Sry* 基因成为可能.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物. 健康成年雄鼠及 5 周龄 ICR 雌鼠, 由北京大学医学部动物部提供. 5 周龄雌性小鼠进行超排: 腹腔注射 PMSG 5 U / 只, 48 h 后再注射相同剂量的 HCG. 超排后与雄鼠按 1 : 1 合笼, 12 h 后检查阴栓, 查见阴栓的雌鼠进行后续实验, 超排后 18 h 定为 0.5 dpc (days post coitum, 性交后天数).

1.1.2 菌株及载体. pSilencer 4.1-CMV neo 载体购自 Ambion 公司; 模板寡聚核苷酸序列由上海英骏生物技术有限公司合成; 大肠杆菌 DH5 α 系中国农业科学院畜牧研究所基因与细胞工程研究室保存.

* 通讯联系人. Tel: 010-62813339, E-mail: linxiukun@yahoo.com

收稿日期: 2006-04-06, 接受日期: 2006-04-30

1.1.3 工具酶与主要试剂. Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 各种限制性内切酶、T4 连接酶、rTaq 酶购自 TaKaRa 公司; M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京天为时代有限公司。

1.2 方法

1.2.1 构建以小鼠 *Sry* 基因为靶点的 siRNA 干扰载体. 根据 GenBank 提供的小鼠 *Sry* 基因 mRNA 序列 (gi:6755760), 针对编码区靶序列设计发夹状互补 DNA 双链, 提交发卡状 RNA 设计网站 (www.ambion.com) 按设计原则寻找靶位点, 通过 BLAST 分析, 挑选 21 个碱基的特异性寡核苷酸序列. 本实验选取了 2 个靶序列, 分别是: *Sry*217~237, AAATATCAGCCTCATCGGAGG; *Sry*565~585, AAGCAGCAGTTTCATGACCAC. 合成发夹状 siRNA 寡核苷酸链及其互补链, 分别在 5' 和 3' 端引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点. 合成的寡核苷酸序列如下: *Sry*217s, 5' GATCC ATATCAGCCTCATCGGAGG TTCAAGAGA CCTCCGATGAGGCTGATATTT A 3'; *Sry*237a, 5' AGCTT AAATATCAGCCTCATCGGAGG TCTCTTGAA CCTCCGATGAGGCTGATAT G 3'; *Sry*565s, 5' GATCC GCAGCAGTTTCATGACCAC TTCAAGAGAGTGGTTCATGAAACTGCTGCTT A 3'; *Sry*585a, 5' AGCTT AAGCAGCAGTTTCATGACCAC TCTCTTGAA GTGGTCATGAAACTGCTGC G 3'. 将 *Sry*217s 与 *Sry*237a 混合、加热变性、退火与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的 pSilencer 4.1-CMV neo 载体连接, 构建成 siRNA 表达载体 pSilencer4.1/*Sry*217; 将 *Sry*565s 与 *Sry*585a 混合、加热变性、退火与 pSilencer 4.1-CMV neo 表达载体连接构建成表达载体 pSilencer4.1/*Sry*565.

1.2.2 尾静脉注射法导入 siRNA 表达质粒. 每批妊娠鼠分别依据实验目的采取不同 siRNA 表达质粒、不同时间、不同剂量梯度进行尾静脉注射, 同时设有 2 个阴性对照组, 分别注射对照质粒 pSilencer 4.1-CMV neo 与生理盐水, 对照质粒可以表达 siRNA, 但该序列在小鼠的基因组中不存在, 因此可以作为十分理想的阴性对照。

1.2.3 胚胎的性别鉴定.

注射后雌鼠于 11.5 dpc 脱颈处死取出胚胎, 将胚胎头部用酚-氯仿法提取 DNA, 其余部分置于 RNA 样品保存液中 4℃ 保存. 以雄鼠和雌鼠 DNA 作参照, 双重 PCR 进行胚胎性别鉴定^[9]. 在同一

Eppendorf 管中同时扩增常染色体上 *IL3* 基因和雄性特异的 *Sry* 基因, 扩增 *IL3* 基因引物序列如下: *IL3*-s, 5' GGGACTCCAAGCTTCAATCA 3', *IL3*-a, 5' TGGAGGAGGAAGAAAAGCAA 3'. 扩增 *Sry* 基因引物序列如下: *Sry*-s1, 5' TGGTCCC-GTGGTGAGAGGC 3', *Sry*-a1, 5' TATGTGATGGCATGTGGGTTCC 3'.

扩增条件为 95℃ 3 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 1 min, 33 个循环, 72℃ 8 min. 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并拍照。

1.2.4 RT-PCR 半定量测定 *Sry* 基因的表达量.

按 Trizol 试剂说明书操作提取 RNA, 将性别鉴定为雄性的胚胎, 加入 1 ml Trizol 试剂在组织研磨器中充分匀浆, 转至 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 冰上静置 10 min, 加入 200 μl 氯仿, 剧烈震荡 15 s 后室温静置 5 min 分层, 4℃ 12 000 g 离心 15 min, 取上层水相于一新的 Eppendorf 管中, 加入 500 μl 异丙醇, 混匀后静置 10 min, 4℃ 12 000 g 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用 1 ml 的 75% 乙醇洗涤后室温干燥, 适量 DEPC 水溶解. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的提取质量, 并用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度. 根据样品在 260 nm 波长处的吸光度值确定 RNA 样品的浓度, 以便在反转录的过程中进行定量。

cDNA 第一条链合成, 用 M-MLV 反转录酶将总 RNA 反转录为 cDNA. 具体过程如下: 取每个样品总 RNA 2 μg, oligo (dT)₁₅ 1 μg, 加入 DEPC 水至 10 μl, PCR 仪上 70℃ 反应 5 min, 迅速置于冰上冷却, 加入 5× 反应缓冲液 5 μl, dNTP (10 mmol/L) 1.25 μl, RNA 酶抑制剂 25 U, M-MLV 反转录酶 (200 U/μl) 1 μl, 用 DEPC 水补至总体积为 25 μl (以上操作均在冰上进行) 稍离心后置于 PCR 仪上反应, 42℃ 保温 60 min, 95℃ 灭活 10 min, 将所得 cDNA 产物置于 -20℃ 保存。

每个样品都以反转录所得 cDNA 体积的 1/10 为模板, 用小鼠 *Sry* 基因特异引物扩增, 比较不同处理条件下 *Sry* 基因的表达量. RT-PCR 扩增 *Sry* 基因特异引物序列如下: *Sry*-s2, 5' AGCTC-TTACACTTTAAGTTTTGACTTC 3'; *Sry*-a2, 5' GCAGCTCTACTCCAGTCTTGCC 3'. 扩增条件为 95℃ 3 min, 94℃ 30 s, 60℃ 50 s, 72℃ 40 s, 40 个循环, 72℃ 8 min. 同时以小鼠 *β-actin* 基因作为内参照, 引物序列如下: *β-actin*-s, 5' AACCC-TAAGCCAACCGTG 3'; *β-actin*-a, 5' CAGGA-

TTCCATACCCAAGAAGG 3' . 扩增条件为 95°C 3 min, 94°C 30 s, 60°C 50 s, 72°C 40 s, 22 个循环, 72°C 8 min. 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并拍照.

2 结果与分析

2.1 性别鉴定结果

IL3 基因扩增片段的长度为 544 bp, *Sry* 基因扩增片段长度为 296 bp, 依照扩增的条带鉴定胎儿性别 (图 1), 在鉴定的 5 个胚胎中 3 个呈现 2 条带 (图 1, 泳道 1~3), 确定为雄性胚胎, 另外 2 个样品扩增出 544 bp 一条带 (图 1, 泳道 4, 5) 确定为雌性胚胎. 以雄鼠和雌鼠 DNA 扩增结果为参照 (图 1, 泳道 6, 7), 结果雄性出现 2 条带 544 bp 和 296 bp, 雌性只有 544 bp 一条带与胚胎性别鉴定结果相一致. 此外我们进行了大量胚胎的鉴别实验, 结果表明, 采用 PCR 鉴定的雄性胚胎与雌性胚胎的比率基本符合 1 : 1, 与理论值相一致.

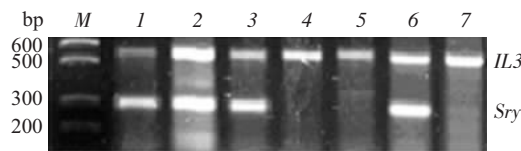


Fig. 1 Identification of sex of mouse embryos by PCR

Genomic DNA was extracted from mouse embryos at 11.5 dpc, and 0.1 μ g DNA was used as template for PCR amplification. In male embryos, a *Sry* gene was amplified (lane 1~3). In contrast, there is no *Sry* gene amplified in female mouse embryos (lane 4 and 5). Lane 6 indicates the PCR results of adult male mouse while lane 7 represents the PCR results of female.

2.2 不同靶序列对 *Sry* 基因的干扰作用

为了比较不同靶序列对 *Sry* 基因的干扰效果, 我们于雌鼠 9.5 dpc 分别注射 siRNA 表达质粒 pSilencer4.1/*Sry*565 和 pSilencer 4.1/*Sry*217 各 30 μ g, 并以注射同体积生理盐水组和对照质粒 pSilencer 4.1-CMV neo 组为对照. 在 11.5 dpc 取出胚胎鉴定性别后, 对雄性胚胎采用半定量 PCR 技术测定不同组别 *Sry* RNA 的表达量 (图 2). 发现, 9.5 dpc 注射 siRNA 表达质粒 pSilencer4.1/*Sry*565, 孕鼠体内雄性胎儿 *Sry* 基因表达水平受到显著影响 (图 2 C), 定量分析发现与对照组相比 *Sry* 基因表达量已下降到 15% 左右. 注射 siRNA 表达质粒 pSilencer4.1/*Sry*217, *Sry* 基因的表达量下降到 50% 左右 (图 2D). 于 9.5 dpc 注射生理盐水组和注射对

照质粒 pSilencer 4.1-CMV neo 组 *Sry* 表达量基本一致 (图 2 A, B). 结果表明, siRNA 对胚胎发育过程中 *Sry* 基因的沉默作用有有序列选择性, 经比较 pSilencer 4.1/*Sry*565 抑制效果较强, 在后续实验中我们只选择 pSilencer 4.1/*Sry*565 做进一步的研究.

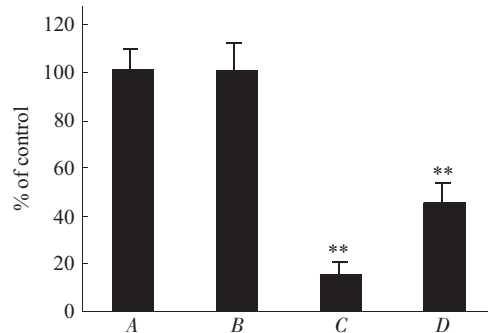


Fig. 2 Effect of different siRNA expression vector on *Sry* silencing in male mouse embryos

Total RNA was extracted from 11.5 dpc male mouse embryos. RT-PCR technique was used for determine the expression level of *Sry*. The results are expressed as the $\bar{x} \pm s$ ($n > 20$). Physiological saline (A), pSilencer4.1-CMV neo (B), pSilencer4.1/*Sry*565 (C) and pSilencer 4.1/*Sry*217 (D) were injected in mouse by tail vein respectively. The two stars indicate $P < 0.01$ compared with the control.

2.3 不同注射时间对 *Sry* 基因沉默作用的影响

为比较不同注射时间对 *Sry* 基因的沉默作用, 我们分别于雌鼠 8.5 dpc、9.5 dpc、10.5 dpc 注射 siRNA 表达质粒 pSilencer 4.1/*Sry*565, 在 11.5 dpc 取出胚胎, 采用半定量 PCR 技术测定雄性胚胎 *Sry* RNA 的表达量 (图 3). 发现于 8.5 dpc 注射, 对不同胚胎 *Sry* 基因的表达量影响不大 (图 3 C, 条带 1~4). 9.5 dpc 注射, 不同胚胎 *Sry* 基因表达量受到显著影响 (图 3 D, 条带 1~4), 定量分析发现与对照组相比 *Sry* 基因表达的抑制率可达 85%. 而于 10.5 dpc 注射 *Sry* 基因的表达有一定程度的影响 (图 3 E, 条带 1~4). 于 9.5 dpc 注射生理盐水组或注射对照质粒 pSilencer 4.1-CMV neo 组 *Sry* 表达量基本一致, 均出现显著的扩增条带 (图 3A, 图 3B, 条带 1~4). 结果说明 siRNA 对胚胎发育过程中 *Sry* 基因的沉默作用有很强的时间依赖性, 于 9.5 dpc 注射效果最好.

2.4 siRNA 注射剂量对 *Sry* 基因表达的影响

孕鼠于 9.5 dpc, 分别以尾静脉注射 0、5、10、20、30、40 μ g siRNA 质粒 pSilencer 4.1/*Sry*565, 于 11.5 dpc 取出胚胎, 半定量 PCR 法测定雄性胚胎 *Sry* 基因的表达量, 注射不同剂量 siRNA 表达质

粒后, 如图 4: 注射量在一定范围内 (0~20 μg), 随注射剂量增加, 抑制效果逐渐增强, 但注射质粒剂量达到一定水平后, 抑制效果的增强趋势趋于平缓, 20~40 μg 之间抑制效果变化不明显. 表明 siRNA 对胚胎发育过程中 *Sry* 基因的沉默作用有明显的剂量依赖性且有剂量平台, 20 μg 即可达到显著的抑制效果.

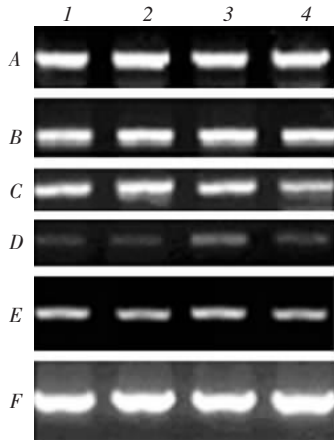


Fig. 3 Effect of RNA interference injected at different time
Total RNA was isolated from embryos 11.5 dpc. 2 μg of RNA was reverse-transcribed into cDNA as described in **Materials and methods**. The PCR products were resolved in 1.5% agarose and stained with ethidium bromide. A and B indicated the expression of *Sry* RNA injected with physiological saline and control vector pSilencer4.1-CMV neo. C, D, E represent the expression of *Sry* RNA injected with pSilencer4.1/*Sry*565 at 8.5, 9.5, 10.5 dpc respectively; F is β -actin gene expression.

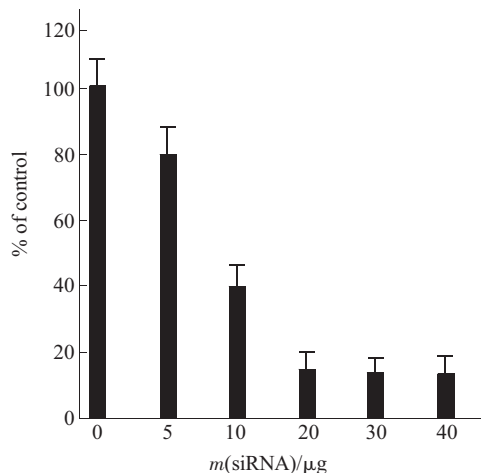


Fig. 4 Dose-dependent effect of siRNA expression plasmid on the interfering efficiency of *Sry* in mouse embryos

pSilencer 4.1/*Sry*565 vector with 0~40 μg was injected in gestation mouse by tail vein at 9.5 dpc. Expression level of *Sry* was determined by RT-PCR at 11.5 dpc. The relative amount of *Sry* expression in mouse without injection of siRNA expression vector was defined as 100%.

3 讨 论

性别决定和性别分化是在众多的基因参与下精确调控的过程, 某一基因的功能丧失或表达失控有可能导致相应的性别发育异常. *Sry* 基因在性别发育过程中直接决定雄性性状的出现, 是性别发育的总开关. *Sry* 表达后即可见到 *SOX9*, *FGF9*, *DHH*, 与 *VNN1* 等基因的表达^[7~9], 但 *Sry* 在生殖嵴细胞内的直接靶基因尚未得到证实, 它对下游基因调控的具体机理还不清楚, 本研究利用 RNA 干扰技术有效地抑制了胚胎内 *Sry* 基因的表达, 这一结果为进一步阐明其对下游基因调控机理奠定了基础.

利用 siRNA 技术沉默胚胎内的基因表达一般采用显微注射的方法, 将 siRNA 直接注入胚胎原核内^[10~12], 由于 siRNA 在哺乳动物体内作用时间仅能维持一周左右, 而 *Sry* 基因只在小鼠胚胎发育的 10.5~12.5 d 表达, 因此采用显微注射的方法使 *Sry* 基因沉默具有一定难度. 我们在预实验中尝试应用显微注射的方式将质粒导入胚胎但未能获得理想的结果. 2003 年 Gratsch 等^[13]将干扰质粒通过尾静脉注射法导入妊娠小鼠体内干扰了附植后胚胎 BMP-4 基因的表达, 这种方法可使胚胎在母体内继续生长, 操作简便易于检测, 但此方法的应用还处于探索阶段, 相关报道比较少, 为此, 我们做了大量的探索性工作, 经过多次重复实验终于确定以尾静脉注射法将 siRNA 导入妊娠小鼠体内, 能够有效干扰 *Sry* 基因的表达, 并在此基础上寻求 siRNA 干扰作用的最佳条件.

Sry 基因在小鼠体内表达具有很强的时间特异性, 从 10.5 dpc 开始, 11.5 dpc 达到高峰, 然后急速下降, 24 h 后便无法测得^[14~16]. 因此利用 siRNA 技术沉默 *Sry* 基因给药时间的选择非常重要, 我们比较了不同时间注射的效果, 发现于小鼠 9.5 dpc 注射效果最好, 而 8.5 dpc 注射, 不同胚胎内 *Sry* 基因的表达量影响不大, 10.5 dpc 注射 *Sry* 基因的表达受到一定程度的影响, 表明 siRNA 对 *Sry* 基因的抑制效果有很强的时间依赖性. 这说明, siRNA 对 *Sry* 基因的干扰效果可能与 *Sry* 的表达时相密切相关, *Sry* 因在胚胎 10.5 dpc 即开始有微量表达, 在 10.5 dpc 注射可能由于 *Sry* 基因已经有了一定量的表达所以其抑制效果较差, 而过早(8.5 dpc)注射, 可能 siRNA 生物体内有降解, 未能完全发挥对 *Sry* 基因的抑制作用. 另外, 我们比较了不同

siRNA 剂量对 *Sry* 基因沉默作用的影响, 发现 siRNA 对胚胎 *Sry* 基因的抑制效果有剂量依赖性, 在一定范围内, 抑制效果随剂量增加而增强, 但剂量达到一定水平后, 出现类似“平台期”的效应, 这与 Kobayashi 等^[7]报道的小鼠体内高压快速注射干扰载体介导剂量依赖性 RNAi 效应相一致。

本研究结果表明, 采用最新的尾静脉注射技术, 选择适当的注射时间点, siRNA 可有效干扰胚胎内特定时间表达的 *Sry* 基因, 为进一步研究 *Sry* 基因对下游基因调控机制奠定了基础, 也为研究性别控制基因的调控网络开拓了新的思路。

参考文献

- Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, *et al.* A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, **346** (6281): 240~244
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, *et al.* Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 1991, **351** (6322): 117~121
- Knower K C, Kelly S, Harkey V R. Turning on the male-SRY, SOX9 and sex determination in mammals. *Cytogenet Genome Res*, 2003, **101** (3~4): 185~198
- Capel B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu Rev Physiol*, 1998, **60** (1): 497~523
- Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391** (6669): 806~811
- Lambert J F, Benoit B O, Colvin G A, *et al.* Quick sex determination of mouse fetuses. *J Neurosci Methods*, 2000, **95** (2): 127~132
- Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*, 2004, **5** (7): 509~521
- Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*, 1999, **13** (7): 755~767
- Mittwoch U. Sex determination in mythology and history. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2005, **49** (1): 7~13
- Haraguchi S, Saga Y, Naito K, *et al.* Specific gene silencing in the pre-implantation stage mouse embryo by an siRNA expression vector system. *Mol Reprod Dev*, 2004, **68** (1): 17~24
- Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, *et al.* Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett*, 2002, **532** (1~2): 227~230
- Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2000, **2** (2): 70~75
- Gratsch T E, De Boer L S, O'Shea K S, *et al.* RNA inhibition of BMP-4 gene expression in postimplantation mouse embryos. *Genesis*, 2003, **37** (1): 12~17
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, *et al.* Expression of *Sry*, the mouse sex determining gene. *Development*, 1995, **121**(6): 1603~1614
- Jeske Y W, Bowles J, Greenfield A, *et al.* Expression of a linear *Sry* transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet*, 1995, **10** (4): 480~482
- Bullejos M, Koopman P. Spatially dynamic expression of *Sry* in mouse genital ridges. *Dev Dyn*, 2001, **221** (2): 201~205
- Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, *et al.* Vector-Based *in vivo* RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, **308** (2): 688~693

Study on The RNA Interference of *Sry* in Mouse Embryos

ZHAO Jin-Hong²⁾, DU Wei-Hua¹⁾, DAO Er-Ji²⁾, PEI Jie³⁾, ZHANG Li³⁾, LIN Xiu-Kun^{1)*}

¹⁾Institute of Animal Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China;

²⁾College of Animal Science and Medicine of Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

³⁾China Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract In order to study the regulation mechanism of *Sry* in sex determination, the siRNA technique was used to silence the *Sry* expression in mouse embryos. Two siRNA expression vectors were synthesized, pSilencer4.1/*Sry*217 and pSilencer 4.1/*Sry*565. The siRNA expression vectors were injected into gestated mouse through tail vein. The sex was identified by PCR, and the expression level of *Sry* gene was determined using RT-PCR technique in the male mouse embryos at 11.5 dpc(days post coitum). The time- and dose -dependent effects was studied. The results confirmed that one of the siRNA expression plasmids, pSilencer4.1/*Sry*565, could inhibit the *Sry* gene expression significantly. Eighty-five percent inhibition was obtained when injecting 20 μ g siRNA vector at 9.5 dpc.

Key words siRNA, *Sry*, mouse embryos, gene silencing

*Corresponding author . Tel: 86-10-62813339, E-mail: linxiukun@yahoo.com

Received: April 6, 2006 Accepted: April 30, 2006